

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
KONFERENCIE CENTIER EXCELENTNOSTI



Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, Bratislava
25. marec 2014

Editor: RNDr. Mária Dzúrová

Recenzoval: Ing. Vladimír Pätoprstý, PhD.

ISBN 978 – 80 – 971156 – 2 – 3



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja



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

Projekt: Centrum excelentnosti pre glykomiku ITMS 26240120031

Prijímateľ: Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava

Partneri projektu:

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

Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava

Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava

Ústav pre výskum srdca SAV, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava

Ústav zoológie SAV, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava

Farmaceutická fakulta UK v Bratislave, ul. Odbojárov 10, 832 32 Bratislava

Projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu ITMS 26220120054

Prijímateľ: Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava

Partner: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

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

Obsah

1. Vplyv metformínu, pycnogenolu® a ich kombinácie na vybrané biometrické a hemodynamické parametre u diabetických a hypertenzno-diabetických sŕdc potkanov, *Kráľová E., Jankyová S., Čuboň J., Čižárová V., Hrabovská A., Stankovičová T.*
2. Dymeklín: Expressia v *Kluyveromyces lactis*, *Z. Kiliánová, L. Riapošová, A. Hrabovská*
3. Stability of Ellman's reagent in TRIS buffer, *Dominika Dingova, Anna Hrabovska*
4. Kardiometabolické rizikové faktory, tlak krvi a hmotnostné parametre u hypertonikov, *K. Blahútová, M. Černáková, A. Hrabovská, A. Čorejová.*
5. Detekcia modifikovaných glukoamyláz *Saccharomycopsis fibuligera* separovaných pomocou PAGE založená na retrogradácii škrobu, *J. Gašperik, S.Hostin*
6. Elektrická aktivita srdca u myši s absenciou génu pre M2 podtyp muskarínových receptorov, *K. Mrvová, M. Kučera, A. Hrabovská,*
7. Preliminary crystallographic analysis of *Drosophila melanogaster* lysosomal α -mannosidase. *I.Nemčovičová, M. Nemčovič, and J. Mucha*
8. Vlákňité huby a kvasinky a najnovšie pohľady na etiológiu sarkoidózy, *E. Paulovičová, M. Bucová, M. Suchánková, L. Paulovičová, E. Tibenská, I. Majer I, E. Tedlová, H. Novosadová,*
9. Various target uptake is discriminative for phagocytosis of mice neutrophils and monocytes, *E. Paulovičová, R. Pilišiová, L. Paulovičová,*
10. Influence of branched α -oligomannoside structures on stimulation of anti – *Candida* humoral immune response, *L. Paulovičová, E. Paulovičová, A. A. Karelin, Y. E. Tsvetkov, N. E. Nifantiev, S. Bystrický*
11. Immune responsiveness of *Candida glabrata* cell wall mannan, *L. Paulovičová, E. Paulovičová, E. Pericolini, E. Gabrielli, A. Vecchiarelli*
12. Synthetically prepared manno- and glucooligosaccharides mimicking *Candida albicans* cell wall glycan antigens - novel tools to study host-pathogen interactions, *E. Paulovičová, L. Paulovičová, R. Pilišiová, S. Bystrický, D. V. Yashunsky, A.A. Karelin, Y.E. Tsvetkov, N.E. Nifantiev*
13. Carboxymethylation significantly increases antioxidant potential of yeast mannans and glucans, *E. Machová, A. Čížová and S. Bystrický*
14. Preparation and immunogenicity of conjugate based on hydrazine detoxified LPS antigen of *Vibrio cholerae* O139, *A. Fleischhackerová and S. Bystrický*
15. Rabbit antisera elicited by mannan-protein conjugates prevent yeast growth, *E. Machová and S. Bystrický*
16. Preparation of novel carboxymethyl derivatives of yeast mannans, *E. Machová, A. Maloviková and S. Bystrický*
17. Môžu mikroorganizmy v oblačnej vode ovplyvniť formu zrážok? *M. Matulová*
18. Produkcia biosurfaktantu baktériou izolovanou z oblačnej vody *Bacillus* 7B11, *M. Matulová, I. Uhliariková, M. Sancelme, Anne-Marie Delort*
19. Produkcia biosurfaktantu baktériou izolovanou z oblačnej vody *Pseudomonas* sp. 14B2, *M. Matulová, I. Uhliariková, M. Sancelme, Anne-Marie Delort,*
20. "Critical point" between the stem and the catalytic enzyme domain of core α 1,3 fucosyltransferase cloned from plant, *P. Both, L. Sobczak, Ch. Breton, I. B.H. Wilson and J. Mucha*
21. Molecular Analysis of GNPTAB gene in Mucopolipidosis type II, *B. Tappino, S. Regis, D. Baroni, MG. Pittis, J. Mucha, F. Corsolini, M. Stroppiano, A. Donati, T. Beccari, S. Dominissini, M. Di Rocc and M. Filocamo*
22. Prvé skúsenosti a úskalia v diagnostike kongenitálnych porúch glykozylácie na Slovensku, *A. Šalingová, D. Behúlová, Z. Pakanová, J. Mucha, H. Hansíková*

23. MS ANALYSIS IN DIAGNOSTICS OF TETRASACCHARIDE IN POMPE DISEASE , *J. Mucha, Z. Pakanová, M. Matulová, D. Behúlová, A. Šalingová, A. Hlavatá,*
24. Positional specificity of the *Orpinomyces* sp. CE6 acetylxyylan esterase on natural polysaccharide, *I. Uhliariková, M. Vršanská, P. Biely*
25. Účinky agonistu PPAR- γ receptorov pioglidazónu na redox-senzitívnu bunkovú signalizáciu u mladých spontánne hypertenzných potkanov, *I. Dovinová, M. Majzúnová, P. Bališ, M. Barančík*
26. Vplyv ionizujúceho žiarenia na myokardiálne a cirkulujúce matrixové metaloproteinázy, *M. Barančík, M. Fogarassyová, E. Okruhlicová, M. Barteková, J. Slezák*
27. Kvercetín zlepšuje postischemickú obnovu hemodynamických parametrov izolovaných srdc u normálnych, juvenilných, ako aj doxorubicínom liečených potkanov, *M. Barteková, M. Barančík*
28. pH optimum transglykozyáz Phr1 a Phr2 bunkovej steny kvasiniek, *K. Kováčová a V. Farkaš*
29. Teplotné optimum transglykozyáz Phr1 a Phr2 bunkovej steny kvasiniek, *K. Kováčová a V. Farkaš*
30. Acceptor specificity of transglycosylases Crh1 and Crh2 of the yeast cell wall *K. Kováčová K., Z. Firáková., N. Blanc., J. Arroyo and V. Farkaš*
31. Analysis of the hybrid polysaccharide product formed from CM-chitin and L5-SR by Crh1-catalyzed transglycosylation reaction, *K. Kováčová, Z. Firáková, N. Blanco, J. Arroyo, P. Řehulka and V. Farkaš*
32. Analýza hybridného polysacharidového produktu vytvoreného transglykozylačnou reakciou katalyzovanou Crh1 proteínom z CM-chitínu a X6-SR, *K. Kováčová a V. Farkaš*
33. Analýza hybridného polysacharidového produktu vytvoreného transglykozylačnou reakciou katalyzovanou Crh1 proteínom z CM-chitínu a C5-SR, *K. Kováčová a V. Farkaš*
34. Sledovanie vplyvu kultivačného média a doby kultivácie na identifikáciu kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* pomocou hmotnostnej spektrometrie, *B. Stratilová, J. Jäger, P. Řehulka, R. Vadkertiová, J. Mucha*
35. Identifikácia variety patogénneho mikroorganizmu *Cryptococcus neoformans* pomocou hmotnostnej spektrometrie, *B. Stratilová, J. Molnárová, P. Řehulka, R. Vadkertiová, E. Stratilová*
36. Identifikácia kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* pomocou hmotnostnej spektrometrie – druh *Cryptococcus flavescens* (fylogenetická skupina I), *J. Jäger, B. Stratilová, J. Molnárová, P. Řehulka, J. Omelková, R. Vadkertiová, E. Stratilová*
37. Identifikácia kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* pomocou hmotnostnej spektrometrie – druh *Cryptococcus laurentii* (fylogenetická skupina I), *J. Jäger, B. Stratilová, J. Molnárová, P. Řehulka, J. Omelková, R. Vadkertiová, E. Stratilová*
38. Biotypizácia *Bulleromyces albus* pomocou hmotnostnej spektrometrie, *B. Stratilová, J. Jäger, J. Molnárová, P. Řehulka, R. Vadkertiová, J. Mucha*
39. Biotypizácia *Cryptococcus magnus* pomocou hmotnostnej spektrometrie, *B. Stratilová, J. Jäger, J. Molnárová, P. Řehulka, R. Vadkertiová, J. Mucha*
40. Identifikácia kvasinkovitých mikroorganizmov skupiny *Cryptococcus laurentii* pomocou hmotnostnej spektrometrie – druh *Cryptococcus carnescens* (fylogenetická skupina II), *J. Jäger, B. Stratilová, J. Molnárová, P. Řehulka, J. Omelková, R. Vadkertiová, E. Stratilová*
41. Biotypizácia kvasiniek *Cryptococcus flavus* pomocou hmotnostnej spektrometrie, *J. Jäger, B. Stratilová, J. Molnárová, P. Řehulka, R. Vadkertiová, J. Mucha, E. Stratilová*
42. Atómová silová mikroskopia pre štúdium kapsulárnych kvasiniek, *B. Stratilová, J. Filipa, J. Jäger, J. Molnárová, R. Vadkertiová, J. Omelková, J. Mucha*
43. Optimalizácia metódy na prípravu vzorky pre identifikáciu kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* pomocou hmotnostnej spektrometrie, *B. Stratilová, J. Jäger, P. Řehulka, R. Vadkertiová, Ján Mucha*
44. Skladovacia stabilita extracelulárnych kvasinkových lipáz, *M. Vršanská, S. Voběrková, J. Omelková, R. Vadkertiová b, Jana Molnárová, E. Stratilová*
45. Identifikácia majoritného extracelulárneho proteómu *Bacillus subtilis* v rozsahu 17-55 kDa; *B. Stratilová, P. Damborský, P. Řehulka, Z. Firáková, S. Voběrková, J. Omelková, E. Stratilová*

46. Skrining kvasiniek pre produkciu lipáz, *M. Vršanská, S.Voběrková, J. Omelková, R.Vadkertiová, J. Molnárová, E. Stratilová*
47. Biotypizácia kvasinkových mikroorganizmov skupiny *Cryptococcus laurentii*, *J. Jäger, B. Stratilová, J. Molnárová, P. Řehulka, R.Vadkertiová, J. Omelková, E. Stratilová*
48. Stanovenie primárnej štruktúry nešpecifickej xyloglukánendotransglykozylázy z kľúčiacich semien kapucínky, *Z. Firáková, J. Klaudivy, E. Stratilová*
49. Väzba ruténiovej červenej na povrch myších leukemických buniek ovplyvnených tunikamycínom, *A. Rusnák, Z. Sulová, A. Breier, B. Uhrík*
50. pH optimum a pH stabilita lipáz *Pseudozyma fusiformata*, *M.Vršanská, S.Voběrková, J. Omelková, R. Vadkertiová, J. Molnárová, E. Stratilová*
51. Teplotné optimum a tepelná stabilita lipáz *Pseudozyma fusiformata*, *M.Vršanská, S.Voběrková, J. Omelková, R. Vadkertiová, J. Molnárová, E. Stratilová*
52. Vplyv zdroja uhlíka na rast kvasinky *Pseudozyma fusiformata* a jej produkciu lipolytických enzýmov, *M.Vršanská, S.Voběrková, J. Omelková, R. Vadkertiová, J. Molnárová, E. Stratilová*
53. pH stabilita a pH optimum lipolytických enzýmov *Meyerozyma guilliermondii*, *M.Vršanská, S.Voběrková, J. Omelková, R. Vadkertiová, J. Molnárová, E. Stratilová*
54. Teplotné optimum a tepelná stabilita lipolytických enzýmov *Meyerozyma guilliermondii*, *M.Vršanská, S.Voběrková, J. Omelková, R. Vadkertiová, J. Molnárová, E. Stratilová*
55. Vplyv zdroja uhlíka na rast kvasinky *Meyerozyma guilliermondii* a jej produkciu lipolytických enzýmov, *M.Vršanská, S.Voběrková, J. Omelková, R. Vadkertiová, J. Molnárová, E. Stratilová*
56. pH optimum a pH stabilita lipáz *Yarrowia lipolytica*, *M.Vršanská, S.Voběrková, J. Omelková, R. Vadkertiová, J. Molnárová, E. Stratilová*
57. Teplotné optimum a tepelná stabilita lipáz *Yarrowia lipolytica*, *M.Vršanská, S.Voběrková, J. Omelková, R. Vadkertiová, J. Molnárová, E. Stratilová*
58. Vplyv zdroja uhlíka na rast kvasinky *Yarrowia lipolytica* a jej produkciu lipolytických enzýmov, *M.Vršanská, S.Voběrková, J. Omelková, R. Vadkertiová, J. Molnárová, E. Stratilová*
59. Vplyv ligandov jadrových receptorov pre retinoidy: all-trans a 9cis retinových kyselín na P-gp sprostredkovanú multidrug rezistenciu v L1210 bunkách, *V. Boháčová, J. Štetka, Z. Sulová, D. Macejová, J. Brtko, A. Breier*
60. Multidrug rezistencia pri liečbe myelodysplastického syndromu, *L. Messingerová1, A. Jonášová, M. Barančík, L. Suarez, Z. Sulová, A. Breier*
61. Koexpresia P-glykoproteínu a nestinu ľudských leukemických bunkových línii SKM-1 a MOLM-13, *M. Cocul'ová, D. Imrichová, L. Messingerová, Z. Sulová, A. Breier*
62. Zmeny v expresii MDR proteínov vyvolané VINKRIS-TÍNOM a MITOXANTRÓNOM v dvoch bunkových líniiach derivovaných od pacientov s AML vyvinutou z MDS, *D. Imrichová, L. Messingerová, A. Breier, Z. Sulová*
63. VPLYV INHIBÍCIE N- A O-GLYKOZYLÁCIE NA P-GP POZITÍVNE A NEGATÍVNE BUNKY, *L. Pavlíková, M. Šereš, M. Hano, A. Breier, Z. Sulová*
64. Inhibícia glykozylácie P-glykoproteínu tunikamycínom bez vplyvu na jeho lokalizáciu a transportnú aktivitu u buniek L1210, *M. Šereš, D. Cholujoová, T. Bubeníková, A. Breier, Z. Sulová*
65. ANTIOXIDAČNÉ ÚČINKY FLAVONOIDOV V IZOLOVANÝCH HEPATOCYTOCH POTKANA, *Š. Bezek, N. Mrvová, L. Račková*
66. ÚČINNOSŤ A BEZPEČNOSŤ MONOTERAPIE METABOLICKÉHO SYNDRÓMU U POTKANOV, *Š. Bezek, Z. Brnoliaková, R. Sotníková*
67. ÚČINKY STOBADINU V OXIDAČNOM STRESE V SYSTÉME IZOLOVANÝCH HEPATOCYTOV POTKANA, *Š. Bezek, Z. Brnoliaková, N. Mrvová, L. Račková*
68. VÝVINOVÝ POVOD CHRONICKÝCH OCHORENÍ, *Š. Bezek, M.Mach, E. Ujházy, M. Dubovický.*

69. Characterisation of class I and II α -mannosidases from *Drosophila melanogaster*, *I. Nemčovičová*, *S. Šesták*, *D. Rendić*, *M. Plšková*, *J. Mucha* and *I. B. H. Wilson*
70. Úloha fosforylácie v aktivácii Ire1 proteínu, *V. Fáberová*, *S. Šesták*, *M. Schröder*, *J. Mucha*
71. ANTITUSSIVE ACTIVITY OF SULFATED GLUCURONOXILAN, *G. Nosáľova*, *L. Jureček*, *L. Prisenžňáková*, *S. Fraňová*, *J. Turjan*, *P. Capek*
72. AN ARABINO(GLUCURONO)XYLAN ISOLATED FROM SAGE, *P. Capek*, *M. Matulová*
73. POLYMER – DECORATED QUANTUM DOTS, *I. Capek*, *P. Capek*
74. FUNCTIONALIZED IRON MAGNETIC NANOPARTICLES, *I. Capek*, *P. Capek*
75. POLYMER – DECORATED GOLD NANOPARTICLES, *I. Capek*, *P. Capek*
76. NANOTECHNOLOGY IN CANCER DIAGNOSIS AND TREATMENT, *I. Capek*, *P. Capek*
77. Efficacies of pyridoindoles and flavonoids in modulation of functions and survival of BV-2 microglia, *L. Račková*, *N.Mrvová*, *Š. Bezek*, *V. Ergin*, *E. Burcu Balı*, *C. Karasu*
78. Glucotoxicity and oxidative stress in HT-22 mouse hippocampal cells, *L. Račková*, *N.Mrvová*, *Š. Bezek*, *M. Štefek*, *T. Jung*
79. Protective efficacy of pyridoindole SMe1EC2 against H₂O₂ damage in INS-1E b cells, *L. Račková*, *Š. Bezek*, *A. Cumaoglu*, *M. Štefek*, *Ç. Karasu*
80. Analýza obsahu mastných kyselín v extrakte materskej kašičky pomocou GC-MC, *M. Šedivá*, *S. Vlčková*, *J. Klaudivy*
81. Modification of antibacterial bee peptide defensin1 in manuka honey, *J. Majtan*, *J. Bohova*, *L. Kohútova*, *M. Dzurova*, *Maria Sediva*, *P.Takac* and *J. Klaudivy*
82. Antibakteriálna aktivita extraktu materskej kašičky voči včeliemu patogénu, *M. Šedivá* a *J. Klaudivy*
83. Porovnanie expresie defenzín1 mRNA a defenzín1 peptidu vo včelstvách, *L. Kohútová*, *J. Klaudivy*, *K.Bachanová*, *M. Dzúrová*, *J. Kopernický*, *J.Majtán*
84. Extracelulárne biopolyméry rias a cyanobaktérií, *P. Capek*
85. New pharmacodynamic activities of *Arnica montana* conjugate, *M. Šutovská*, *P. Capek*
86. Charakterization of *Matricaria chamomilla* conjugate, *I. Pawlaczyk*, *P. Capek*
87. Anticoagulant a activity and chemical studies of *Fragaria vesca* conjugates, *I. Pawlaczyk*, *P. Capek*
88. Acetylácia alditolov, *S. Bystrický*, *P. Bystrický*, *S. Vlčková* .
89. Hmotnostná spektrometria alditol acetátov, *S. Bystrický*, *P. Bystrický*, *S. Vlčková*
90. Trifluóracetylácia alditolov, *S. Bystrický*, *P. Bystrický*, *S. Vlčková*
91. Hmotnostná spektrometria trifluóracetátov alditolov, *S. Bystrický*, *P. Bystrický*, *S. Vlčková*
92. Metylačná analýza sacharidov pomocou GC, *S. Bystrický*, *P. Bystrický*, *S. Vlčková*
93. Metylačná analýza sacharidov pomocou MALDI MS, *S. Bystrický*, *P. Bystrický*, *S. Vlčková*
94. Derivatizácia aminosacharidov pre HPLC s UV detekciou, *Bystrický*, *P. Bystrický*, *S. Vlčková*
95. Fragmentácie sacharidov – Akarbóza, *J.Mucha*, *P. Bystrický*, *S. Vlčková* .
96. Chloroformáty a derivatizácia sacharidov, *J.Mucha*, *P. Bystrický*, *S. Vlčková* .
97. Analýza glykánov pomocou priradenia MALDI MSⁿ spektier, *P. Bystrický*, *S. Vlčková*, *J. Mucha*
98. Degradácia glykolipidov pomocou endoglykoceramidázy (ECGázy), *P. Bystrický*, *S. Vlčková*, *J. Mucha*
99. Extrakcia glykolipidov, *P. Bystrický*, *S. Vlčková*, *J. Mucha*
100. Kvantifikácia glykánov pomocou externých štandardov, *P. Bystrický*, *S. Vlčková*, *J. Mucha*
101. Metódy pre mapovanie miest O-glykozylácie, *P. Bystrický*, *S. Vlčková*, *J. Mucha*
102. Mliečne oligosacharidy – príprava oligosacharidov z materského mlieka, *P. Bystrický*, *S. Vlčková*, *J. Mucha*

103. Použitie bakteriálnych lyáz glykozaminoglykánov na depolymerizáciu hyaluronanu, *P. Bystrický, S. Vlčková, J. Mucha*
104. Použitie N-Glykanázy, *P. Bystrický, S. Vlčková, J. Mucha*
105. Rýchla a citlivá analýza O-glykánov použitím priamotokového systému na ich uvoľnenie, *P. Bystrický, S. Vlčková, J. Mucha*
106. Uvoľnenie N-glykánov pomocou hydrazinolýzy, *P. Bystrický, S. Vlčková, J. Mucha*
107. Zistenie N-glykánového profilu pomocou LC-MS, *P. Bystrický, S. Vlčková, J. Mucha*
108. Polyfosfátkinázy organizmu *Ruegeria pomeroyi*, *Lucia Achbergerová, Jozef Nahálka*
109. Využitie systémovej biokatalýzy v syntéze substrátu pre sialyltransferázové reakcie, *Klaudia Talafová, Eva Hrabárová a Jozef Nahálka*

VPLYV METFORMÍNU, PYCNOGENOLU® A ICH KOMBINÁCIE NA VYBRANÉ BIOMETRICKÉ A HEMODYNAMICKÉ PARAMETRE U DIABETICKÝCH A HYPERTENZNO – DIABETICKÝCH SRDC POTKANOV

*Kráľová E., Jankyová S., Čuboň J., Čižmárová V., Hrabovská A., Stankovičová T.
Katedra Farmakológie a toxikológie, Farmaceutická Fakulta UK, Bratislava, Slovenská Republika*

Diabetes mellitus (DM) je chronické metabolické ochorenie, ktoré je často komplikované hypertenziou. Dlhodobá expozícia kardiovaskulárneho systému hyperglykémiami má za následok vznik chronických komplikácií diabetu. Keďže oxidačný stres je jedným z faktorov vzniku komplikácii pri DM, adjuvantná terapia antioxidantnými látkami sa javí pri jeho terapii ako prospešná. Metformín je v súčasnosti liečivom prvej voľby pri terapii DM2. Znižuje riziko vzniku kardiovaskulárnych príhod a má aj antioxidantné účinky. Jedným z najpredávanejších voľnopredajných prípravkov s antioxidantnými vlastnosťami je Pycnogenol®, ktorý pozitívne ovplyvňuje aj kardiovaskulárny systém. Skúmali sme teda vplyv Pycnogenolu®, metformínu a ich vzájomnej kombinácie na diabetické a hypertenzno-diabetické srdcia potkanov. Predpokladali sme synergický účinok vzájomnej kombinácie týchto dvoch látok.

V experimente sme použili Wistar potkany (Kontrola, potkany bez diabetu). Experimentálny model diabetu mellitu sme navodili u Wistar potkanov (Diabetes, D) a SHR potkanov (Hypertenzia-Diabetes, HD) 3 dni po sebe idúcou dávkou streptozotocínu (25 mg/kg. i.p). Po 10 dňoch od podania streptozotocínu sme začali 6 týždňovú p.o. terapiu Pycnogenolom® (20mg/kg), metformínom (12mg/kg) a ich vzájomnej kombinácie. Zmeny v hemodynamických parametroch sme sledovali na izolovaných srdciach perfundovaných podľa Langendorffa. Biometrické parametre (hrúbka ľavej komory- LK, hrúbka septa) sme zmerali pomocou posúvneho meradla, hmotnosť LK sme zmerali na analytických váhach.

Zistili sme, že hmotnosť ľavej komory stúpala v poradí Kontrola < D < HD. V rovnakom trende stúpala aj hrúbka LK a septa pri oboch patologických modeloch. Pycnogenol® znížil hmotnosť LK u oboch patologických skupín, výraznejšie však u diabetických potkanov. Rovnako stenčil hrúbku LK a septa u oboch modelov takmer na úroveň kontrolných zvierat. Metformín taktiež znížil hmotnosť LK a stenčil jej hrúbku, dokonca výraznejšie než Pycnogenol® v porovnaní so zvieratami bez liečby. Súčasné podanie oboch látok síce znížilo hodnoty sledovaných parametrov, ale nie tak výrazne ako ich jednotlivé podanie.

Kontrakciu myokardu (vyjadrenú ako systolicko - diastolický rozdiel tlakov v ľavej komore) mali najviac oslabené zvieratá v diabetickej skupine v porovnaní s kontrolnou ale aj hypertenzno - diabeticou skupinou. Srdcia izolované z diabetických zvierat mali aj najslabší koronárny prietok. Metformín výrazne zlepšil kontrakciu izolovaných srdcí u oboch modelov bez liečby, čím sa zlepšil prietok koronárnymi cievami. Rovnako aj výživový doplnok Pycnogenol® zlepšil hodnoty týchto sledovaných parametrov. Premedikovanie kombináciou metformínu a Pycnogenolu® viedlo k zlepšeniu kontrakcie a tým aj k nárastu koronárneho prietoku oproti patologickým skupinám bez premedikácie. Avšak pri porovnaní hemodynamických parametrov samostatne podaných látok a ich kombinácie sme zistili, že opäť bolo účinnejšie ich samostatné podanie.

Naše výsledky poukazujú, že v nami sledovanom modeli experimentálneho diabetu mellitu a hypertenzie - diabetu liečivo metformín, ale aj výživový doplnok Pycnogenol® pozitívne ovplyvnili hodnoty vybraných biometrických a hemodynamických parametrov. Účinnejšie však boli ako samostatne podané, než v spoločnej kombinácii.

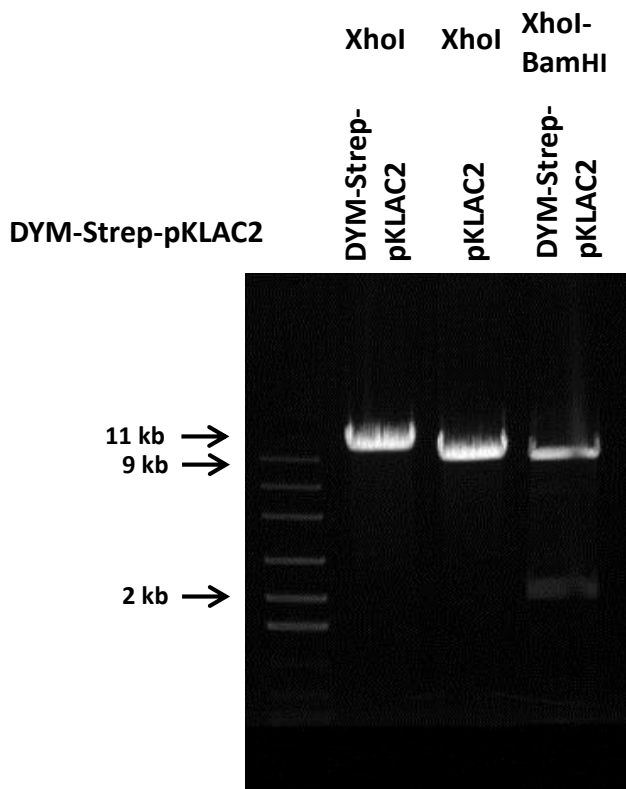
Podakovanie: Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

DYMEKLÍN: EXPRESIA V KLUYVEROMYCES LACTIS

Úvod: Dyggveov-Melchiorov-Clausenov syndróm je zriedkavé ochorenie podmienené autozomálne recesívnou dedičnosťou a charakterizované mikrocefáliou, nízkym vzrastom, deformáciami stavcov a kostí končatín a mentálnou retardáciou. Príčinou ochorenia je mutácia génu DYM, ktorý kóduje proteín dymeklín. Dymeklín má 669 aminokyselín, avšak jeho funkcia doposiaľ nebola objasnená. Štúdium dymeklínu by umožnila príprava rekombinantného proteínu. Cieľom nášho projektu bolo overiť navrhnutú stratégiu prípravy rekombinantného dymeklínu.

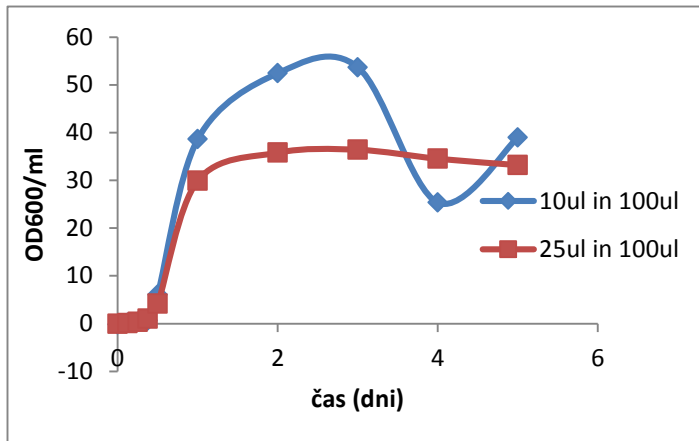
Metodika: Stratégia sa zakladala na expresii proteínu nesúceho Strep-tag® za použitia expresného kitu Kluyveromyces lactis. Pracovali sme v spolupráci s Dr. V. El Ghouzzi, INSERM U676, Hôpital Robert Debré, Francúzsko. Navrhli sme PCR primery s epitopom Strep-tagII a s vhodnými restriktčnými miestami pre následnú ligáciu do expresného vektora pKLAC2. Kvasinky Kluyveromyces lactis sme kultivovali v tekutom médiu pri 30°C s trepaním (250 rpm) a denzitu kultúry sme stanovovali meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 600nm (OD600). Pre jednotlivé stanovenia sme odoberali kultivačné médium, v ktorom sme metódou Western blot stanovovali proteín dymeklín pomocou Strep-Tactin-HRP (IBA, Nemecko).

Výsledky: Pomocou navrhnutých primerov nesúcich epitop Strep-tagII a potrebné restriktčné miesta XhoI a BamHI sme metódou PCR amplifikovali Strep-DYM. Restriktčným štiepením enzýmami XhoI, BamHI a následnou ligáciou sme DYM-Strep vložili do expresného vektora pKLAC2 (Obr. 1).



Obrázok 1: Restriktčná analýza DYM-Strep v pKLAC2. V prvej dráhe je DYM-Strep-pKLAC2 štiepený pomocou XhoI, v druhej dráhe samotný pKLAC2 štiepený XhoI, v tretej dráhe DYM-Strep-pKLAC2 štiepený pomocou XhoI a BamHI, čo umožňuje vyštiepenie insertu DYM-Strep (2kb).

Následne sme sledovali rast kvasiniek Kluyveromyces lactis a na základe merania OD sme skonštruovali rastové krivky za účelom stanovenia doby potrebnej pre saturovanú kultúru (Obr. 2).



Obrázok 2: Rastová krivka *Kluyveromyces lactis* na základe merania OD600/ml v rôznych časoch po inokulácii kultúry, pričom boli odoberané rôzne objemy kultivačného média.

Na základe rastových kriviek sme identifikovali začiatok saturačnej fázy kultúry, ku ktorej dochádza po 2 dňoch kultivácie. Následne sme v rôznych časových intervaloch odoberali kultivačné médium s obsahom buniek *Kluyveromyces lactis*, v ktorých sme metódou Western blot detegovali DYM-Strep pomocou Strep-Tactin-HRP. Analýza kultivačného média a bunkových lyzátov nepotvrdila prítomnosť dymeklínu, a teda zvolená stratégia nie je vhodná pre prípravu rekombinantného proteínu.

Záver: Pomocou PCR metódy sme úspešne generovali konštrukciu DYM-Strep v expresnom vektore pKLAC2. V kultúre kvasiniek *Kluyveromyces lactis* sme nepotvrdili analýzou typu Western blot prítomnosť dymeklínu, čo nasvedčuje, že nami zvolená metóda nebola vhodná pre jeho prípravu.

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.

Stability of Ellman's reagent in TRIS buffer

Dominika Dingova^{a,b}, Anna Hrabovska^a

^aComenius University, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology and Toxicology, Bratislava, Slovakia

^bUniversité Paris Descartes, CNRS UMR 8257 MD 4, COGNAC G, France

Introduction: Cholinesterases play an important role in cholinergic neurotransmission. Due to their hydrolytic action on acetylcholine, they control level of this neurotransmitter in the body. Activity of cholinesterases has been linked to etiopathogenesis of some diseases, e.g. Alzheimer's disease, Parkinson's diseases, cardiovascular diseases, liver disorders or obesity¹⁻⁶. Therefore, an efficient method for determination of cholinesterase activity is needed. The widely used method to study cholinesterase activity is Ellman's assay⁷. It is a two-step method. In the first step, substrate is hydrolyzed by cholinesterase when thiocholine (TCh) is produced. In the second step, TCh reacts with Ellman's reagent (DTNB) when yellow anion 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB) is produced. The method is fast, simple and cheap, however, it has a few limitations e.g. instability of DTNB in time, low detection sensitivity or high background in biological material. This complicates the measuring of cholinesterases activity mainly in biological samples. Ellman's assay is usually performed in phosphate buffer, but also TRIS buffer is widely used for determination of cholinesterase activity. However, the effect of TRIS buffer on enzyme activity has never been properly tested.

The aim of this project was to determine the favorable assay conditions and thus to lower the background and reagent instability, which would allow measurement of low activities of cholinesterases.

Method: Stability of 0.5 mM DTNB in 5 mM TRIS (5mM TRIS/0.05M phosphate) and 0.1 M phosphate buffer pH 7 - 8.5 was studied over 90 hours at 412 nm. Additionally, DTNB stability was also recorded in presence of the substrate - 0.5 and 1 mM butyrylthiocholine iodide. Assays were performed in 96-well plates at room temperature, protected from light.

Pure recombinant human butyrylcholinesterase (140 mU/ml, 0.7µg/ml) was chosen as model enzyme in Ellman's assay. 1 mM butyrylthiocholine iodide was used as substrate. The full spectrum was recorded in 5 mM TRIS buffer or 0.1M phosphate buffer pH = 7 - 8.5. Velocity of the product formation was followed at 412 nm and time dependence was determined in both mentioned buffers pH = 7 - 8.5.

Results: Stability of DTNB highly depended on pH value (Fig 1). It decreased with increasing pH value in phosphate and also TRIS buffers. The highest increase in the absorbance was observed in first five hours. Subsequent increase of color continued at lower rate till 50 hours and then it changed just slightly. In general, DTNB was more stable in TRIS buffers than in phosphate buffers. Absorbance of DTNB in TRIS pH 7.0-8.0 was almost unchanged during measurement. In TRIS pH 8.5 we recorded a small increase in absorbance, which almost corresponds to phosphate buffer pH 7.0. Presence of substrate initiated faster decomposition of DTNB: the higher concentration of substrate, the higher instability of reagent.

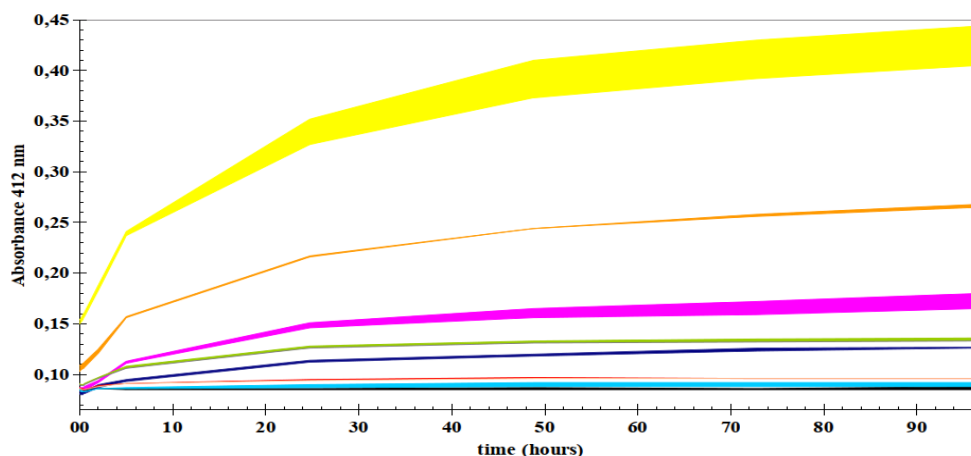


Fig 1: Stability of DTNB in phosphate and TRIS buffers

The full spectrum (Fig2) proved that the product of reaction was formed at the same wavelength in both phosphate and TRIS buffers at all studied pH. The velocity of product formation, however, does not suggest the same kinetics of butyrylcholinesterase-catalyzed reaction with butyrylthiocholine in phosphate buffer pH 8.0 versus TRIS buffers pH 7.0-8.5.

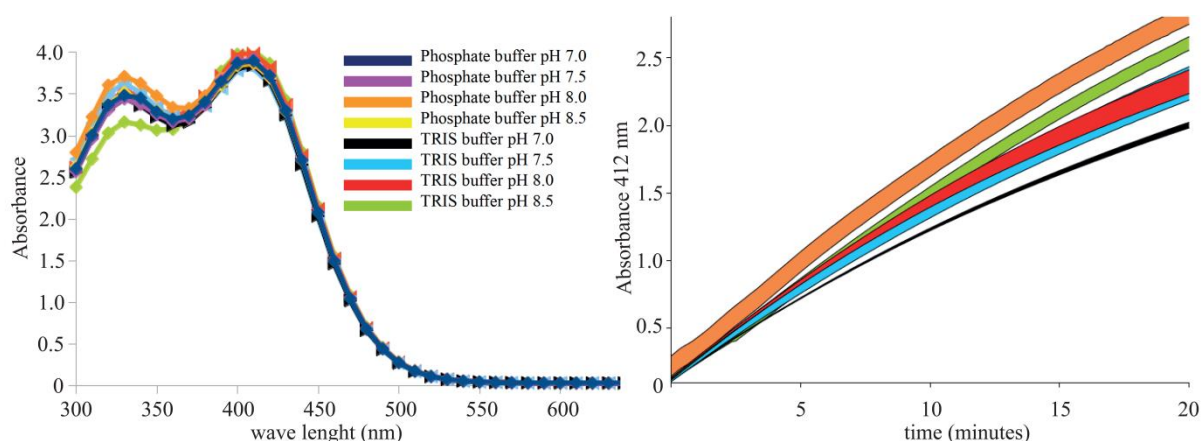


Fig 2: Full spectrum and v/t curve in phosphate and TRIS buffers

Discussion: In the original paper⁷, phosphate buffer pH 8.0 was suggested as a buffer of choice for determination of cholinesterase activity by Ellman's assay. Low solubility of DTNB in other anorganic solvents makes the study of its properties more difficult. We used a different strategy to prepare DTNB solution when powder was solubilized by addition of 0.05M phosphate buffer into 5 mM TRIS buffer at matching pH values. In this paper we refer, that DTNB is unstable in phosphate buffer in comparison to TRIS buffer and its stability in liquid depends strictly on pH. While the presence of TRIS buffer does not affect the wave length of product formation, it clearly influences the velocity of enzyme hydrolysis.

Conclusion: Despite the great stability of DTNB in TRIS buffer, it is not convenient for Ellman's assay, because of slow product formation velocity. However, our approach of DTNB solubilization can be used for study of DTNB stability in different buffers. Stabilization of DTNB will enable a long incubation assays and following of low cholinesterase activities.

References:

1. L. Santarpia, I. Grandone, F. Contaldo, and F. Pasanisi, "Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature," *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 4, no. 1, pp. 31–39, Mar. 2013.
2. E. Giacobini, "Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease," *Neurochem. Res.*, vol. 28, no. 3–4, pp. 515–522, Apr. 2003.
3. N. I. Bohnen and R. L. Albin, "The cholinergic system and Parkinson disease," *Behav. Brain Res.*, vol. 221, no. 2, pp. 564–573, Aug. 2011.
4. E. W. Randell, M. S. Mathews, H. Zhang, J. S. Seraj, and G. Sun, "Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome," *Clin. Biochem.*, vol. 38, no. 9, pp. 799–805, Sep. 2005.
5. V. M. Alcântara, L. C. Oliveira, R. R. Réa, H. L. Suplicy, and E. A. Chautard-Freire-Maia, "Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients," *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC*, vol. 43, no. 3, pp. 285–288, 2005.
6. V. M. Alcântara, E. A. Chautard-Freire-Maia, M. Scartezini, M. S. J. Cerci, K. Braun-Prado, and G. Picheth, "Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease," *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 62, no. 5, pp. 399–404, 2002.
7. G. L. ELLMAN, K. D. COURTNEY, V. ANDRES Jr, and R. M. FEATHER-STONE, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, pp. 88–95, Jul. 1961.

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.*

Kardiometabolické rizikové faktory, tlak krvi a hmotnostné parametre u hypertonikov

Blahútová K.¹, Černáková M.³, Hrabovská A.^{1,2}, Čorejová A.¹

¹ Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského Bratislava

² Toxikologické a antidopingové centrum, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského Bratislava

³ Kardiologická ambulancia, Ružomberok

Úvod: Kardiometabolické (KM) ukazovatele patria medzi ovplyvniteľné rizikové faktory kardiovaskulárnych ochorení. Ich modifikácia nefarmakologickým a farmakologickým prístupom tvorí jeden z hlavných spôsobov prevencie kardiovaskulárnych príhod. Z týchto dôvodov sa v klinickej praxi pri určovaní kardiovaskulárneho rizika pacienta s kardiovaskulárnym ochorením monitorujú hodnoty tlaku krvi (TK), koncentrácia KM rizikových faktorov (triacyglyceroly, celkový cholesterol, HDL-cholesterol, glukóza) a hmotnostných ukazovateľov (obvod pása, body mass index). Zníženie celkového cholesterolu o 10 % sa spája s 25 % redukciami incidencie koronárnych chorôb srdca, pokles LDL cholesterolu o 1 mmol/l znižuje výskyt koronárnych príhod o 22 % (1). HDL cholesterol sa považuje za protektívny faktor z hľadiska rozvoja kardiovaskulárnych ochorení (2), jeho zvýšenie o 0,39 mmol/l znižuje kardiaskulárne riziko o 22 % (3).

Cieľ a metódy: Cieľom práce bolo vyhodnotiť vzťah KM rizikových faktorov k hodnotám TK a k hmotnostným ukazovateľom a zhodnotiť vplyv hypolipidemickej liečby na dosahované hodnoty plazmatických lipidov. Pri klasifikovaní rizikových faktorov sa vychádzalo z odporúčaní ESH/ESC z roku 2007 (4) a JNC VII (5). Za potenciálne diabetogénne liečivá boli považované betablokátory a tiazidové diuretiká (6). Na základe retrospektívneho vyhodnotenia zdravotných záznamov sme analyzovali údaje 413 ambulantne liečených pacientov s primárnou diagnózou esenciálna hypertenzia (I10) liečených v kardiologickej ambulancii. Vekový rozsah probandov bol 19 – 89 rokov (priemerný vek 63,0 ± 11,7 rokov), pričom z hľadiska pohlavia bol súbor proporcionálne rozložený (muži 58,4%, ženy 41,6%). Hodnotilo sa obdobie dvoch rokov liečby.

Výsledky a záver: Po dvoch rokoch dosahovalo fyziologické hodnoty triacyglycerolov 63 % pacientov, celkového cholesterolu 49 %, HDL-cholesterolu 78 % a glukózy 78 % pacientov. Počas tohto obdobia došlo aj k prerozdeleniu pacientov zo štádia s vyššou hodnotou celkového cholesterolu a triacyglycerolov v prospech kategórií s nižšou hodnotou, pričom táto zmena bola štatisticky významná. Pri zmene koncentrácie KM parametrov počas dvoch rokov sa neprejavila aj štatisticky významná zmena hodnoty TK, okrem glukózy, kde bola zmena štatisticky významná. Štatisticky významne vyššie hodnoty TK boli zaznamenané už pri zvýšenej hodnote glukózy (> 5,6 mmol/l). Zvýšené hodnoty TK (štatisticky nevýznamné) boli aj pri prítomnosti pridruženej diagnózy hypercholesterolémie. Korelácia medzi KM parametrami a TK sa nám nepotvrdila. Aj napriek tomu, že 43 % pacientov malo nadhmotnosť a 35 % bolo obézných, korelácia medzi hmotnostnými ukazovateľmi (obvod pása, BMI) a KM parametrami sa nám rovnako nepotvrdila.

Najvýraznejší pokles hodnôt celkového cholesterolu a triacyglycerolov bol zaznamenaný pri liečbe rosuvastatínom. Najpoužívanejším statínom bol atorvastatín, pri ktorom bolo zaznamenané počas dvojročného obdobia aj štatisticky významné zníženie celkového cholesterolu. Pri pridruženej diagnóze hypercholesterolémie a užívaní hypolipidemickej liečby boli koncentrácie plazmatických lipidov vo fyziologickom rozmedzí.

Pacienti liečení potenciálne diabetogénnym liečivom dosahovali po dvoch rokoch vyššie hodnoty glukózy. Najvyššie hodnoty glukózy boli u hypertonikov liečených kombináciou betablokátoru s tiazidovým diuretikom, najvýraznejší nárast glukózy bol zaznamenaný pri liečbe tiazidovým diuretikom. Pri betablokátoroch bol najvýraznejší (štatisticky nevýznamný) nárast glukózy zaznamenaný pri liečbe atenololom.

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že aj napriek zmene hodnôt niektorých KM rizikových faktorov počas dvojročného obdobia, sa ich vzťah k hmotnostnými ukazovateľom a TK

nepotvrdil. U pacientov liečených potenciálne diabetogénnymi liečivami bol po dvoch rokoch kontinuálnej liečby zaznamenaný nárast hodnoty glukózy.

Literatúra:

1. BAIGENT, C. a kol. 2005. Efficacy and safety of cholesterol lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. In *Lancet*, 2005, 366, s.1267–1278.
2. BESLER, C. a kol. 2010. High-density lipoprotein-mediated anti-atherosclerotic and endothelial-protective effects: a potential novel therapeutic target in cardiovascular disease. In *Curr Pharm Des*, 2010, 16: 1480-1493.
3. BARTER, P. a kol. 2007. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol and cardiovascular events. In *Engl. J. Med*, 2007, 357 (13), s. 1301-1310.
4. ESH/ESC, 2007. ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension. In *Eur heart J*, 2007, 28, s.1462-1536.
5. JNC VII, 2003. The Seventh report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. In *JAMA*, 2003, 289, s.1206–1252.
6. SARAFIDIS, P.A. a kol. 2006. Antihypertensive treatment with beta-blockers and the spectrum of glycaemic control. In *QJM*, 2006, 99 (7), s. 431-436.

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.

Detekcia modifikovaných glukoamyláz *Saccharomyces fibuliger* separovaných pomocou PAGE založená na retrogradácii škrobu

Juraj Gašperík, Stanislav Hostin*

Ústav molekulárnej biológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovensko

*Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Slovensko

Kľúčové slová: Glukoamylázy, elektroforéza, priama detekcia, retrogradácia škrobu

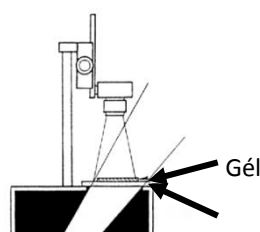
Glukoamylázy (D-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3) patria do skupiny enzýmov s významným potenciálom pre priemyselné využitie. Sú to enzýmy schopné postupne odštiepovať molekuly glukózy z neredukujúceho konca škrobu alebo maltooligosacharidov.

Priama detekcia enzymovej aktivity amylolytických enzýmov v polyakrylamidovom géli je výhodné pri ich hľadaní v surových proteínových zmesiach, pri sledovaní tvorby izoform počas fermentácie, pre rozlíšenie natívnych a denaturovaných foriem enzýmov a pod. Za natívnych podmienok je možné elektroforeticky separovať enzýmy, ktoré si počas celého procesu zachovávajú svoju hydrolázovú aktivitu. Alternatívne je možné za denaturačných podmienok (napr. v prítomnosti dodecyl sulfátu sodného) separovať aj enzýmy schopné následnej *in situ* renaturácie. Doteraz bol popísaný rad techník, pri ktorých sa substrát inkorporuje do gélu, alebo po elektroforetickej separácii sa do gélu penetruje. Pre lokalizáciu aktívneho enzýmu je možné využiť zmeny absorbancie vo viditeľnom alebo UV svetle, fluorescencie alebo zafarbenia substrátu či produktu.

U amylolytických enzýmov sa pre *in situ* detekciu najčastejšie využíva detekcia pomocou jódu, ktorá je založená na skutočnosti, že krátke reťazce degradovaného škrobu sa ním nefarbia. Prítomnosť katalyticky aktívneho amylolytického enzýmu v géli sa preto prejavuje po primerane dlhej inkubácii ako bezfarebná zóna.

Skupina glukoamyláz z variantných kmeňov potravinárskej kvasinky *Saccharomyces fibuliger* je dobrým východiskovým materiálom pre prípravu modifikovaných enzýmov či už pre sledovanie vzťahu medzi ich štruktúrou a funkciou alebo pre zlepšenie ich technologických vlastností. Pre jednoduché a rýchle sledovanie zmien ich fyzikálnych vlastností v dôsledku cieľných bodových mutácií sme vyvinuli vysoko citlivú detekciu elektroforeticky separovaných modifikovaných glukoamyláz *S. fibuliger* pomocou natívnej PAGE. Táto je založená na skutočnosti, že v mieste, kde sa nachádza tento enzým, popri dominantnej glukóze vzniknutej hydrolýzou, nehydrolyzovaný zvyšok linearizovaného škrobu vytvára agregáty v procese zvanom retrogradácia. Vzniknuté agregáty sú rezistentné voči ďalšiemu pôsobeniu amylolytického enzýmu a sú pozorovateľné ako zákalové zóny. Citlivosť tejto metódy niekoľkonásobne vzrastá pri pozorovaní gélu v temnom poli pri bočnom osvetlení (obr. 1).

Využitie tejto techniky je možné aj pre iné amylolytické enzýmy. Základnou podmienkou je však, že ich separácia sa musí realizovať za takých podmienok (pH alebo teploty), pri ktorých je potlačená ich katalytická aktivita do tej miery, že počas elektroforézy nedochádza k výraznejšej degradácii škrobu na maltooligosacharidy.



Obr. 1

Jednoduché zariadenie pre sledovanie a dokumentovanie zákalu v tzv. temnom poli.

V prípade využitia retrogradácie sa pracuje s podstatne menším množstvom rozpustného škrobu v géli ako je obvyklé pri farbení jódom. V dôsledku toho nevzniká nežiaduce pozadie, v ktorom by bol zákal retrogradovaného škrobu ťažko identifikovateľný. Navyše, po fotografickom zdokumentovaní zón lokalizujúcich prítomnosť amylolytických enzýmov, je možné následne uskutočniť klasické farbenie všetkých separovaných bielkovín, napr. s coomassie brilliant blue alebo aktívny enzým z gélu eluovať a použiť ho v ďalších pokusoch.

Elektroforetickú separáciu glukoamyláz *S. fibuligera* s molekulovou hmotnosťou cca 55 kDa a s pH optimom pri 5,6 je účelné robiť pomocou vertikálnej elektroforézy v 10% polyakrylamidovom géli pripravenom nasledovným postupom:

75 mg rozpustného Leulierovho škrobu suspendovaného v roztoku pripravenom z 2.5 ml 1.5 M Tris.HCl pH 8,8 a 4 ml destilovanej vody sa za miešania povarí 5 min. Po ochladení a doplnení na pôvodný objem sa pridá 3.3 ml roztoku akrylamidu (30% akrylamid + 2.6% bisakrylamid vo vode), 120 µl 10% persíranu amónneho a 5 µl TEMED. Ako vrchný koncentračný gél možno použiť štandardné gély pre natívnu elektroforézu.

Po skončení elektroforetickej separácie amylolytických enzýmov sa gél ponorí do 0.2 M tlmivého roztoku zodpovedajúceho pH optimu príslušného enzýmu (v prípade glukoamyláz *S. fibuligera* je to octan sodný pH 4.8 až 5.6). Po 3-4 výmenách roztoku v 5 min. intervaloch, počas ktorých sa za miešania pH v géli ustáli, sa gél vyberie z roztoku, zabalí sa do fólie a umiestni do termostatu na cca 40°C až pokiaľ sa nevytvorí zóna nerozpustného retrogradovaného škrobu v intenzite vhodnej pre fotografickú detekciu (zvyčajne 10 min. až 1 hod. v závislosti od množstva a aktivity enzýmu).

Pozn.: Kvalita rozpustného škrobu a tým aj schopnosť jeho retrogradácie je značne variabilná. Pre dosiahnutie maximálnej citlivosti je vhodné otestovať si škrob od viacerých výrobcov resp. z rôznych šarží.

PodĎakovanie:

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.

Elektrická aktivita srdca u myši s absenciou génu pre M2 podtyp muskarínových receptorov

Autonómny nervový systém je hlavný modulátor srdcovej činnosti. Na inervácii srdca sa podieľajú v rovnakej miere parasymptatikový a sympatikový systém. Parasymptatiková inervácia je sprostredkovaná nikotínovými receptormi na úrovni ganglia a muskarínovými receptormi (MR) na úrovni efektorovej bunky. Stimulácia MR acetylcholínom vedie predovšetkým k poklesu tepovej frekvencie a kontraktility myokardu. Ako vo všetkých orgánoch aj v srdci boli popísané všetky podtypy MR. Expresia jednotlivých podtypov MR v myokarde je druhovo špecifická s predominantným zastúpením M2 podtypu.¹ V roku 1999 Gomeza et al. pripravili myši s deléciou M2 podtypu MR a preukázali, že je zodpovedný za negatívny chronotropný účinok. Aj napriek delícii tohto génu sa myši fenotypovo nelíšili od jedincov divokého kmeňa.² K zmene pomeru zastúpenia jednotlivých podtypov MR dochádza pri rôznych srdcových ochoreniach a taktiež s narastajúcim vekom organizmu. Vagová eferentná stimulácia je v súčasnosti považovaná za ochranný systém pred srdcovými ochoreniami a za nový možný terapeutický postup pri náhlom srdcovom zlyhaní.³ V praxi sa na liečbu srdcového zlyhania využíva elektrostimulácia *nervus vagus*. Parasymptatiková stimulácia vyvolala u pacientov zvýšenie produkcie oxidu dusnatého, redukcii zápalových procesov v myokarde a zlepšenie srdcovej variability.⁴

Cieľom tohto projektu bolo sledovať zmeny v elektrickej aktivite srdca u myši s deléciou majoritného M2 podtypu MR. Projekt bol zrealizovaný za pomoci geneticky modifikovaných zvierat s deléciou génu pre M2 podtyp MR (M2^{-/-}). Ako kontroly boli použité myši divokého kmeňa so zmesným genetickým pozadím. Zvieratá boli poskytnuté Českým fyziologickým ústavom 1. Lekárskej fakulty v Prahe, v spolupráci s ktorým bol projekt riešený. Zo zvieratami sa manipulovalo v súlade s platnými legislatívami Slovenskej republiky a Českej republiky. Tento projekt bol schválený Štátnou veterinárnou správou a potravinovou správou Slovenskej republiky (Ro-557/11-221/2). Myši boli uvedené do anestézie intraperitoneálnym podaním 2,5% vodného roztoku tribrometanol v dávke 15 µl/gram. Po dosiahnutí chirurgického štádia a po ustálení fyziologických hodnôt sme urobili záznam trojzvodového EKG za pomoci ktorého, sme sledovali rozdiely v elektrickej aktivite srdca. Následne sme vyhodnotili RR interval, dĺžku trvania PQ intervalu, QRS komplexu a QT intervalu. Interval RR udáva dĺžku trvania srdcového cyklu. PQ interval popisuje prevod vzruchu z predsieni na komory. QRS komplex vyjadruje dĺžku trvania depolarizácie komôr. QT interval predstavuje celkovú dĺžku trvania komorového cyklu.

V rámci jednotlivých parametrov sme nezaznamenali žiadne štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými genotypmi. Mierne predĺžený RR interval však viedol k trendu zníženej srdcovej frekvencie u M2^{-/-} myši. Predĺženie tohto intervalu vyplýva zo zmeny v QT intervale.

Na základe našich výsledkov, delécia majoritne vyskytujúceho M2 podtypu MR v srdci nevedie k zmenám v elektrickej aktivite srdca. Nezmenené bazálne srdcové hodnoty M2^{-/-} myši sú pravdepodobne dôsledkom viacerých adaptačných mechanizmov. Absencia M2 podtypu MR môže viesť k adaptačnej zmene v zastúpení ostatných podtypov MR v srdci, rovnako ako to bolo preukázané pri mnohých srdcových ochoreniach. Nezmenené bazálne srdcové parametre popísané u M2^{-/-} myši môžu byť taktiež zapríčinené aj heterológnou reguláciou receptorových systémov, keďže cholinergický a adrenergický systém sú v srdci úzko prepojené.

Literatúra:

1. Woo, S., et al. 2005. Excitatory effect of M1 muscarinic acetylcholine receptor on automaticity of mouse heart. In *Arch Pharm Res* (2005), 28(8), p. 930-5

2. GOMEZA, J., 1999. Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999), 96(4), p. 1692-7
3. De Ferrari, G., et al. 2011. Chronic vagus nerve stimulation: a new and promising therapeutic approach for chronic heart failure. In *European Heart Journal* (2011), 32, p. 847–855
4. Klein, H., et al. 2010. Vagus nerve stimulation: A new approach to reduce heart failure. In *Cardiol J* (2010), 17(6), p. 638-44

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.

Preliminary crystallographic analysis of *Drosophila melanogaster* lysosomal α -mannosidase.

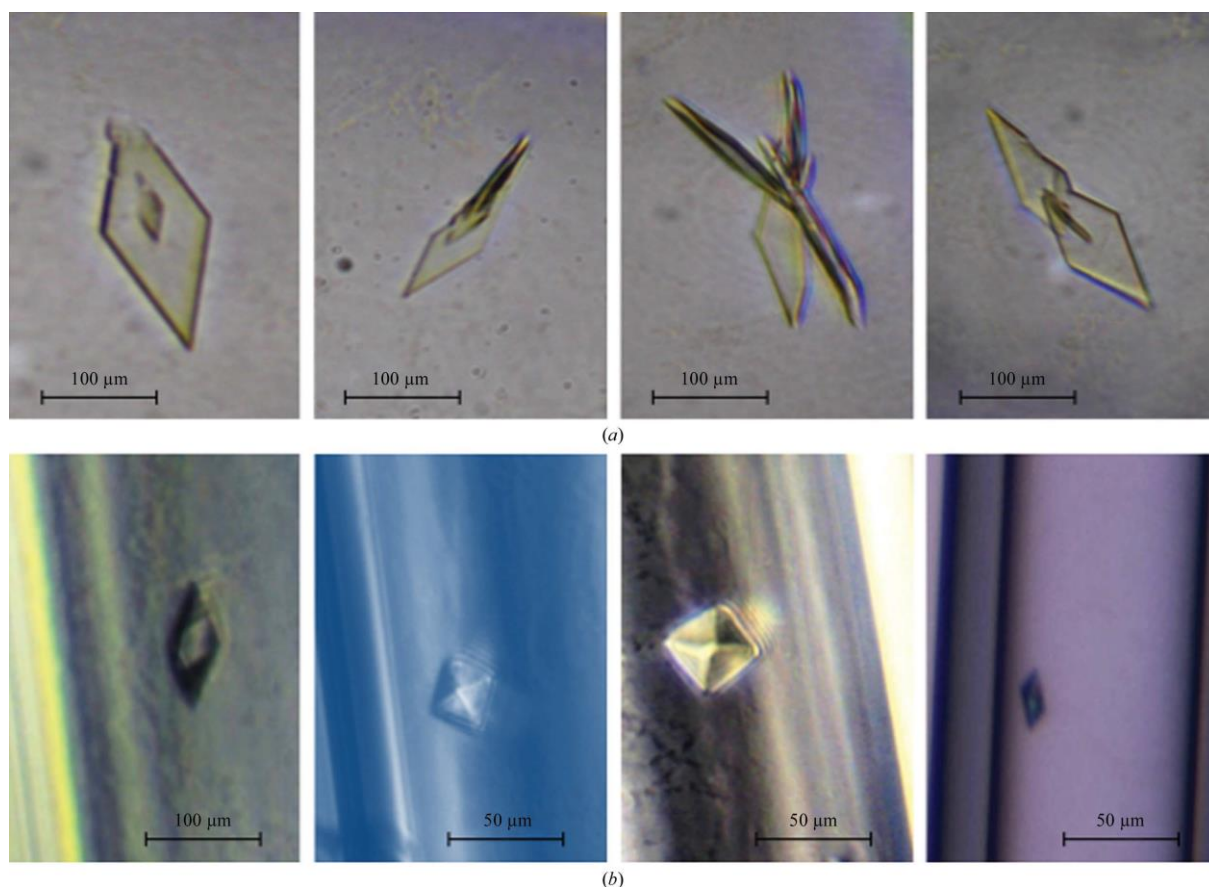
Nemčovičová^a, M. Nemčovič^b, and J. Mucha^b

a) Department of Cellular Biology, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, 9420 Athena Circle, La Jolla, CA 92037, USA,

b) Department of Glycobiology, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia.

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 two different methods.

- (a) The sitting-drop and hanging-drop vapour-diffusion crystallization techniques yielded thin plate-shaped crystals;
- (b) crystals of tetragonal bipyramid shape were grown in capillaries using the standard counter-diffusion crystallization technique.



Optimized crystals were obtained using both the abovementioned crystallization methods after several days using the following conditions: 30% (v/v) PEG 8000, 150 mM sodium acetate, 50 mM sodium cacodylate pH 4.5–6.0. The observed resolution of the plate-like dLM408 crystals was not better than 3.5 Å and the tetragonal bipyramid crystals diffracted even more weakly (7 Å). However, the dLM408 plate-like crystals were found to belong to the orthorhombic space group $P212121$.

X-ray diffraction data-collection statistics for plate-like crystals of dLM408.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

X-ray source	Beamline 7-1, SSRL
Data-collection temperature (K)	100

Wavelength (Å)	1.2389
No. of images	260
Oscillation range (°)	1
Exposure time (s)	10
Space group	<i>P</i> 212121
Unit-cell parameters (Å , °)	a = 66.22, b = 92.63, c = 102.91, $\alpha = \beta = \gamma = 90$
No. of reflections	50888 (6830)
No. of unique reflections	10824 (1474)
Resolution limits (Å)	50.00–3.50 (3.75–3.50)
Mean I/ δ (I)	11.6 (2.1)
Completeness (%)	98.7 (96.6)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	11.0 (26.2)

Acknowledgements:

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.

Vláknité huby a kvasinky a najnovšie pohľady na etiológiu sarkoidózy

Paulovičová E², Bucová M¹, Suchánková M¹, Paulovičová L², Tibenská E³, Majer I⁴, Tedlová E⁴, Novosadová H⁴,

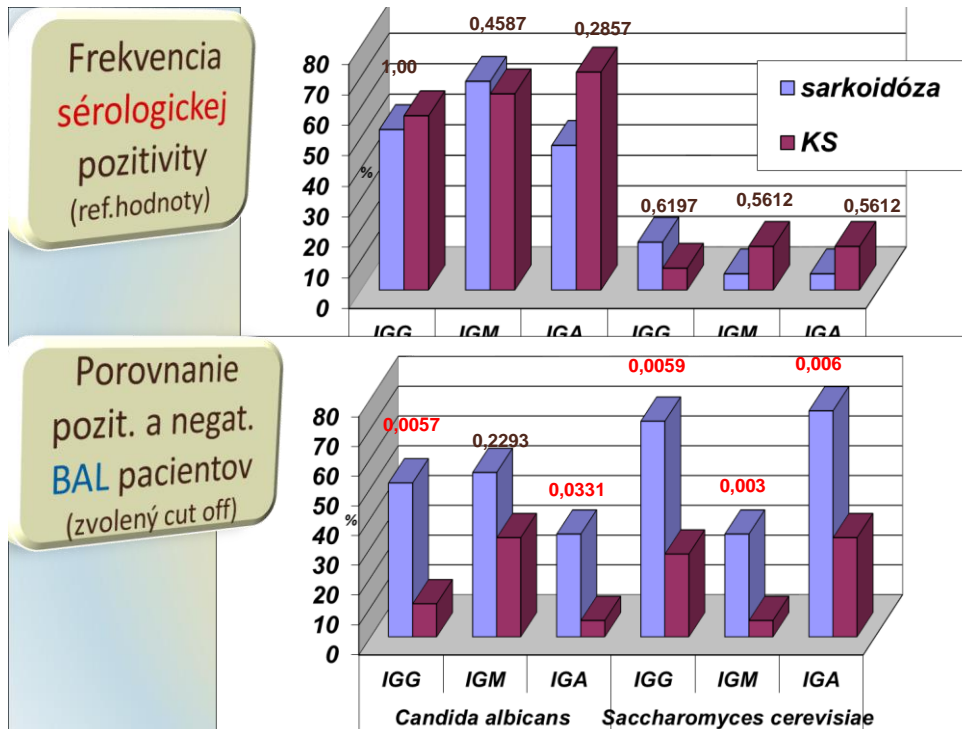
Úvod: Sarkoidóza je choroba neznámej etiológie. Zaujímavé sú najnovšie štúdie slovinskej autorky M. Tercej, zamerané na detekciu mykotického agens. Títo autori majú tiež dobré skúsenosti s liečbou sarkoidózy antimykotikami. Závěry najnovších štúdií zameraných na etiológiu sarkoidózy a nápadná podobnosť imunitnej odpovede pri sarkoidóze a pri fungálnych infekciách nás viedli k formulovaniu hypotézy možného zvýšenia antimykotických protilátok v bronchoalveolárnej laváži (BAL), resp. v sére u pacientov s pľúcnou sarkoidózou (PS).

Súbor pacientov a metodika: Do súboru sme zaradili 29 pacientov s pľúcnou sarkoidózou, 18 pacientov s inými intersticiálnymi pneumopatiemi (kontrolná skupina BAL) a 170 zdravých jedincov (kontrolná skupina sérum). V experimentálnej práci sme sa zamerali na detekciu a vyhodnotenie hladiny IgG, IgA a IgM špecifických protilátok voči stenovému β -D-glukánu a manánu *C. albicans* a *S. cerevisiae* v BAL tekutine a aj v sére metódou heterogénnej ELISA (Biogema, Košice).

Výsledky: 1. Zistili sme zvýšenie IgG, IgM, IgA špecifických protilátok proti β -D-glukánu *C. albicans* a *S. cerevisiae* u pacientov s pľúcnou sarkoidózou v BAL v porovnaní s kontrolnou skupinou pacientov s inými IPP v BAL (*C. albicans*: IgG $p=0.0329$, IgM $p=0.0076$, IgA $p=0.0156$; *S. cerevisiae*: IgG $p=0.0062$, IgM $p=0.0367$, IgA $p=0.0095$). 2. Zistili sme zvýšenie IgG, IgM, IgA špecifických protilátok proti β -D-glukánu *C. albicans* a *S. cerevisiae* u pacientov s pľúcnou sarkoidózou v BAL v (*C. albicans*: IgG $p=0.0329$, IgM $p=0.0076$, IgA $p=0.0156$; *S. cerevisiae*: IgG $p>0.05$, IgM $p<0.05$, IgA $p<0.001$). 3. Špecifické IgG, IgM, IgA protilátky proti β -D-glukánu *C. albicans* a *S. cerevisiae* boli signifikantne zvýšené aj u pacientov s inými IPP v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých jedincov v sére. 4. Hodnotili sme percento pozitívnych pacientov. Zistili sme zvýšenie anti-kandidových protilátok u viac ako 50% pacientov v oboch skupinách (sarkoidóza, iné IPP) v sére. Anti-saccharomyces protilátky boli zvýšené u menej ako 20% pacientov v sére u oboch skupín. Avšak na rozdiel od séra sme zaznamenali signifikantne vyšší počet pozitívnych pacientov so sarkoidózou v porovnaní s počtom pozitívnych pacientov s inými IPP v BAL (u oboch sledovaných mikroorganizmov). Zaujímavé bolo najmä zvýšenie anti-saccharomyces protilátok až u 75% pacientov so sarkoidózou (iné IPP menej ako 35% pozit. pacientov).

Korelácie sérum/BAL sarkoidóza						
	IgG (BAL)	IgM (BAL)	IgA (BAL)	IgG (BAL)	IgM (BAL)	IgA (BAL)
	c. albic.			s. cerevis.		
sérum	IgG $P<0,0001$	IgM $P=0,0867$	IgA $P<0,0001$	IgG $P=0,6073$	IgM $P=0,8725$	IgA $P=0,0286$

Korelácie sérum/BAL KS						
	IgG (BAL)	IgM (BAL)	IgA (BAL)	IgG (BAL)	IgM (BAL)	IgA (BAL)
	c. albic.			s. cerevis.		
sérum	IgG $P=0,0176$	IgM $P=0,0093$	IgA $P=0,0353$	IgG $P=0,9583$	IgM $P=0,4544$	IgA $P=0,1306$



Záver: Vedecká hypotéza: etiologickým agens sarkoidózy sú huby je zaujímavá a tejto problematike sa oplatí venovať pozornosť.

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.

Various target uptake is discriminative for phagocytosis of mice neutrophils and monocytes.

E. Paulovičová, R. Pilišiová, L. Paulovičová,
Dept. Immunochemistry of Glycoconjugates, Center of Excellence GLYCOMED, Institute of Chemistry, Centre
for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dubravská cesta 9,
84538 Bratislava, Slovakia.

Summary: The study demonstrates, that phagocytosis and metabolic activity, covered both phagocytosis and respiratory burst of phagocytes, critically depends on the combination of the phagocytic cells and the material to be engulfed. Differences in phagocytosis rates at the level of a specific target (*Candida albicans*-yeast, *Candida albicans* hyphae, *Staphylococcus aureus* BioParticles® and microspheric hydrophilic particles (MSHP)) could be largely explained based on a different manner of cell-invader specific pattern-recognition receptors - pathogen-associated molecular patterns-mediated internalization. The next differences were found between monocyte's and neutrophil's efficiency to phagocyte different microbial and abiotic targets, due to their specific receptor-mediated phagocytosis pathways.

The yeast-to-hypha transition as the most prominent morphological change in the *C. albicans* life cycle specifically influenced the manner of phagocyte cell recognition of pathogen.

This complex study compared the microbial and synthetic targets' efficacy in the process of phagocytosis and stressed the different immune cell-invader inter-reactivities, mediating the phagocytosis pathways. Our observations provide further insight, especially into the complexity of phagocytosis and respiratory burst, and pointed out the importance of effective target-immunomodulating relationships.

2. Experimental procedures

2.1 Animals

Mice (five animals per group, female, 6-8 weeks old, variety BALB/c, breeding facility VELAZ, Prague, Czech Republic) were used for *in vitro* tests of phagocytic and metabolic activity of peripheral blood neutrophils and monocytes. The animal experiments were conducted in accordance with the revised Declaration of Helsinki, and followed the criteria for the welfare of experimental animals, and complied with the ethical guidelines issued by the Research Base of Slovak Medical University, Institute of Preventive and Clinical Medicine (Bratislava, Slovakia), under the approval No. Ro 2939/09-221 of the State Veterinary and Food Administration of the Slovak Republic. Following 2 weeks quarantine, the blood specimens were obtained by retro-orbital puncture. Blood samples were collected into lithium-heparine complex (Multivette 600 LH, Sarstedt, Germany) and were immediately subjected to functional cellular tests.

2.2 Microorganisms and growth conditions

Clinical isolate of *C. albicans* CCY 29-3-32 (serotype A) (Culture Collection of Yeasts, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Science, Slovakia) was grown in a nutrient rich liquid yeast peptone dextrose medium (YPD) (Difco Laboratories, Detroit, MI) for 24 hr, at 28 °C. To induce hyphal growth, strain was inoculated in RPMI 1640 medium (Lonza, Belgium) enriched with 2% BSA and grown at 37 °C, with shaking, for 2 days. The density of cells was determined spectrophotometrically at 630 nm. The yeast and hyphal suspensions were adjusted to 1.0 extinction value, corresponding to 0.8×10^8 yeast cells per mL

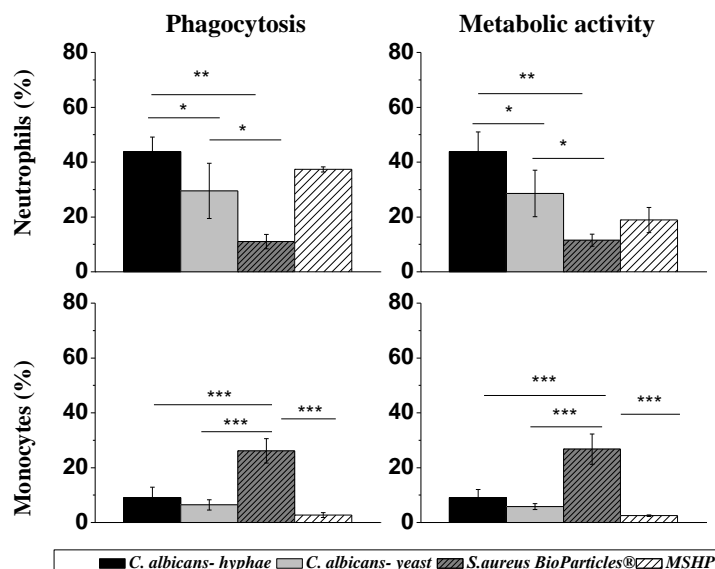
2.3 Fluorescein-isothiocyanate labeling of *Candida* yeast and hyphae cells

Ethanol-fixed *Candida albicans* CCY 29-3-32 (70 % ethanol for 1hr) was labelled according (Bjerknes,1984) with fluorescein-isothiocyanate (FITC) (Sigma, USA) by stirring the fungi (0.8×10^8

yeast cells per mL) in 0.5 M carbonate/bicarbonate buffer (pH = 9.5) containing 0.1 mg FITC per mL for 1hr at 20 °C. Aliquotes of ethanol-fixed *Candida albicans* yeast and hyphae cells were stored at -80 °C until use.

2.4 Immunocytometric evaluation of simultaneous phagocytosis and oxidative burst

Phagocytosis accompanied by respiratory burst of mice neutrophils and monocytes was evaluated by the flow cytometry (Beckman-Coulter FC 500 flow cytometer running under CXP software). For each sample, the fluorescence histogram of 10, 000 cells was generated and analyzed. Gates were set separately around neutrophils and monocyte populations to exclude debris. Measurements of phagocytosis i.e. the ingestion of bacteria, *Candida* and MSHP, respectively, took place under the controlled conditions using a fluorescein labelled opsonised *Staphylococcus aureus* BioParticles® (SPA-FITC) (Molecular Probes, The Netherlands), fluorescein labelled *C. albicans* yeast and hyphal cells and microspheric hydrophilic particles (MSHP), diameter 1.2µm, FITC conjugated (ARTIM Ges.m.b.H., Praha, Czech republic). Metabolic activity was determined *via* the oxidative-burst of the stimulated transformation of originally non-fluorescent hydroxyethidine (HE) (Polysciences, USA) to fluorescent ethidium, which intercalates into DNA and give arise of red fluorescence (excitation of 488 nm) following ingestion of FITC labelled *Staphylococcus aureus* BioParticles®, *Candida* yeast and hyphae, and MSHP. Aliquots of Li-heparine blood (30 µL) were incubated with HE (15.75 mg in 5 ml of dimethylformamide, Merck, Germany) for 15 min at 37 °C. Following the treatment with *Staphylococcus aureus* BioParticles®-FITC, *Candida*-FITC or MSHP-FITC for the next 15 min at 37 °C, the reaction was stopped on ice. The subsequent lysis was performed for 15 min with an ice-cold ammonium chloride-potassium chloride (ACK) lysing buffer.



Influence of different agents on phagocytic effectiveness and metabolic activity (simultaneous phagocytosis & oxidative burst) of monocytes and neutrophils. The data represent means \pm standard error of the mean (SEM) of duplicate values. Phagocytosis and metabolic activity are expressed as percentage of cells actually undergoing these processes toward total cell number equal to 10,000. Levels of significance were expressed as follows: ***, $0 < P < 0,001$, **, $0,001 < P < 0,01$, *, $0,01 < P < 0,05$.

Conclusions

Study model of simultaneous phagocytosis and metabolic activity stressed effectively the differences between the engulfment and subsequent processing of different pathogens i.e. two morphological forms

of *C. albicans* and *S.aureus* and abiotic MSHP particles by mouse phagocytic cells as neutrophils and monocytes. The experimental study pointed out the influence of size, character and recognition by cell surface receptors. Moreover, the dissimilarity between both neutrophils and monocytes concerning target uptake has been characterized.

Acknowledgements:

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.

**Influence of branched α -oligomannoside structures on stimulation of anti –
Candida humoral immune response**

Lucia Paulovičová¹, Ema Paulovičová¹, Alexander A. Karelin², Yury E. Tsvetkov², Nikolay E. Nifantiev², Slavomír Bystrický¹

¹Institute of Chemistry, Department of Immunochemistry of Glycoconjugates, Centre of Excellence Glycomed, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Laboratory of Chemistry of Glycoconjugates, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract

Several studies have established the potential efficacy of humoral immunity, primarily mannan specific antibodies, in host protection against major fungal pathogen *Candida albicans*. In this study, we analysed humoral immune response induced by immunization with BSA-based conjugates bearing synthetic α -1,6-branched α -oligomannosides (pentamannosides (M5) or hexamannosides (M6)) mimicking antigenic sequences of *Candida* cell wall mannan. We analysed the ability of antibodies prepared by immunization to recognize relevant antigenic determinants in mannan polysaccharide structure and in *C. albicans* yeast and hyphal morphoforms. M6-BSA conjugate induced markedly higher levels of mannan specific IgG compared to M5-BSA conjugate. In contrast to M5-BSA conjugate, M6-BSA conjugate induced immunoglobulin isotype class switch from IgM to IgG, as revealed also from ELISpot analysis. Immunization induced antibodies showed higher reactivity with hyphal form of *C. albicans* cells. The reduced immunogenicity of M5-BSA conjugate seems to be related to branching point location at terminal non-reducing end in comparison with M6-BSA oligomannoside with branching point at non-terminal location.. Limited capacity of α -1,6-branched oligomannoside – BSA conjugates to induce antibodies significantly enhancing candidacidal activity of polymorphonuclear leukocytes was presumably related to absence of antibodies with strong reactivity to corresponding antigenic determinants in natural cell wall mannan and with reduced ability to activate complement. The study documented markedly structure dependent immunogenicity and limited capacity of branched α -mannooligosides conjugates to induce production of potentially protective antibodies.

Material and methods

Oligosaccharide-conjugate preparation

Conjugation of BSA with spacers oligosaccharide derivatives (compounds *a* on Fig. 1) bearing synthetic pentamannoside (M5: α -D-Man-(1 \rightarrow 3)-[α -D-Man-(1 \rightarrow 6)]- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man) and hexamannoside (M6: α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man-(1 \rightarrow 3)-[α -D-Man-(1 \rightarrow 6)]- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man-(1 \rightarrow 2)- α -D-Man) ligands was performed by squarate method [15, 16]. Thus the treatment with diethyl squarate at pH 7 gave corresponding monosubstituted adducts (*b* on Fig. 1). Their subsequent coupling with BSA at pH 9 resulted in the formation of conjugates (*c* on Fig. 1) designed as M5-BSA and M6-BSA (Fig. 1). According to MALDI TOF mass spectrometry M5-BSA conjugate contained on the average 10 pentasaccharide residues and M6-BSA conjugate contained on the average 8.5 hexasaccharide residues per one BSA molecule [16]. Selected oligomannosides mimic natural structures of *Candida* antigenic factor 4 [9, 11] in acid-stable mannan part of both *C. albicans* serotypes [8, 9] and *C. guilliermondii* [11]

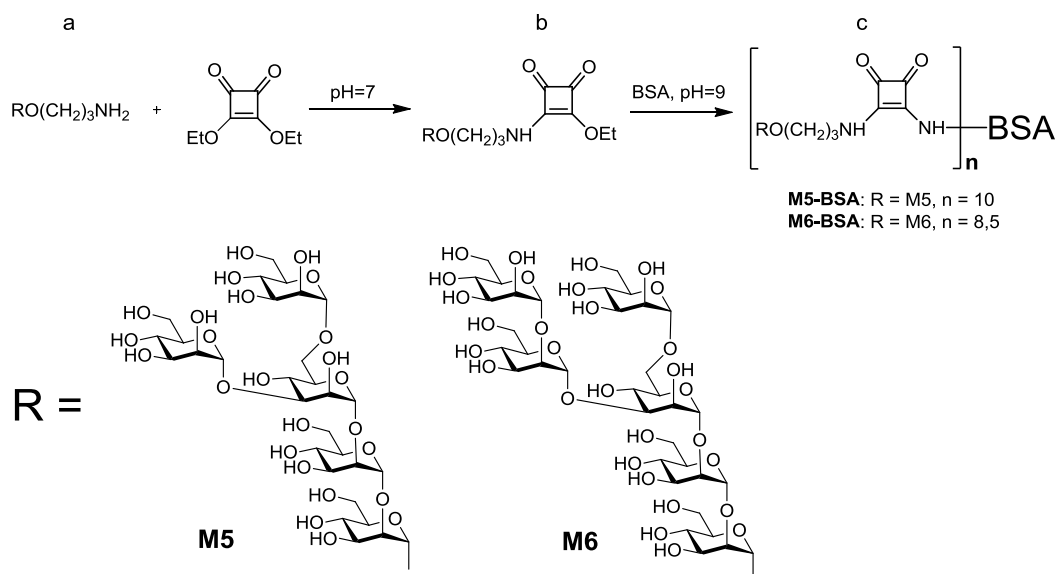


Figure 1: Structures of BSA-based glycoconjugates M5-BSA and M6-BSA.

Conjugates were prepared by squarate method [16].

Results

We observed higher yeast and hyphae specific IgM sera levels following M5-BSA immunization in comparison with control although without significant alteration throughout immunization. M5-BSA conjugate immunization induced significantly higher levels of yeast and hyphae specific IgG antibody levels in comparison with IgG levels in sera of controls only after the primary sc injection of conjugate (Fig. 5). IgG levels induced by subsequent M5-BSA conjugate injections were comparable or lower than IgG levels in sera of controls for both morphological forms of *C. albicans* serotype A. Yeast and hyphae specific IgA levels significantly increased after primary M5-BSA conjugate injection and decreased after the primary sc booster administration to the levels comparable with IgA levels in sera of controls (Fig. 5).

For M6-BSA conjugate and whole cell specific IgM levels we obtained similar results as for M5-BSA conjugate immunization. Hyphae specific IgM levels in immune sera were slightly higher than or comparable with control (yeast form, secondary ip booster injection, 3rdip) but without significant alteration throughout immunization (Fig. 5). Immunization with M6-BSA conjugate induced *C. albicans* serotype A yeast form specific IgG levels comparable with yeast form specific IgG levels in sera of controls. For hyphal form of *C. albicans* serotype A primary sc booster injection and secondary booster injections (both routes of administration, 3rdip and 3rdsc) induced significantly higher IgG levels in comparison with sera of controls with maximal peak after secondary ip booster injection (Fig. 5). Only for hyphal form of *C. albicans* whole cell specific IgA levels significantly increased after primary M6-BSA conjugate injection.

The alterations in *C. albicans* serotype A whole cell specific IgG levels after individual administrations of conjugates reveal differences between conjugates. Different changes of the whole cell specific IgG levels in the course of immunization with conjugates indicated different specificity of induced IgG antibodies and indicate M6-BSA conjugate as preferable for induction of potentially opsonising antibodies. According to high yeast and hyphae specific IgM levels in control sera higher level of nonspecific interaction of serum IgM antibodies with *C. albicans* serotype A whole cells could be assumed

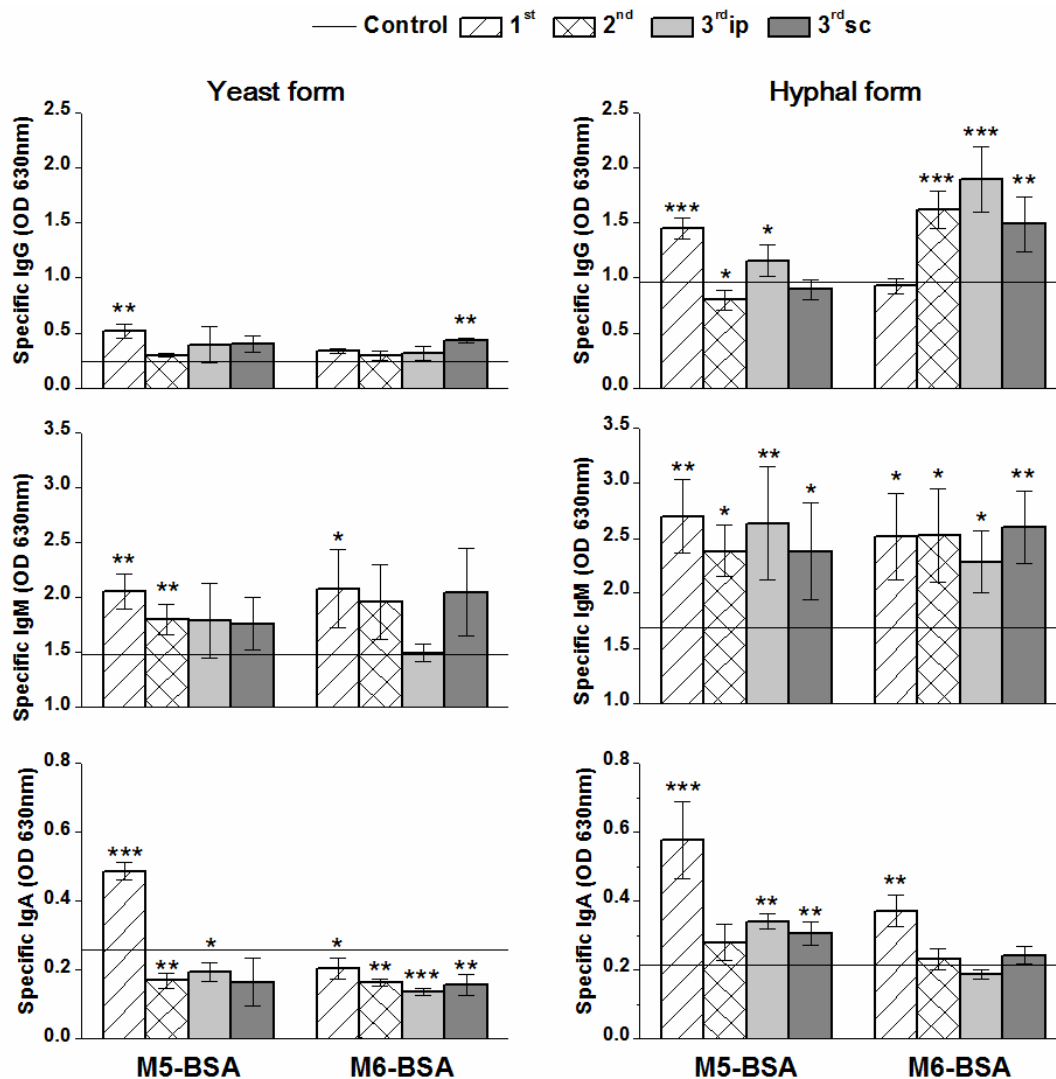


Figure 5: Anti - *C. albicans* serotype A whole cell antibodies levels

C. albicans serotype A yeast (Yeast form) and hyphae (Hyphal form) specific antibodies levels detected in sera on day 14 after each injection of M5-BSA or M6-BSA conjugate (after the primary sc injection (1st, n=10), the primary sc booster injection (2nd, secondary sc injection, n=10), the secondary ip booster injection (3rd ip, tertiary ip injection, n=10) and the secondary sc booster injection (3rd sc, tertiary sc injection, n=10) of conjugate). Control represents yeast and hyphae specific antibodies in sera of mice after third sc injection of saline (n=10). All data were expressed as mean \pm SD, statistical significance of differences between immunized and control mice are expressed: *** - $P < 0.001$, ** - $0.001 < P < 0.01$, * - $0.01 < P < 0.05$.

Conclusions: The study documented markedly structure dependent immunogenicity and limited capacity of branched α -mannooligosides conjugates to induce production of potentially protective antibodies.

Acknowledgments:

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.

Immune responsiveness of *Candida glabrata* cell wall mannan

Lucia Paulovičová¹, Ema Paulovičová¹, Eva Pericolini², Elena Gabrielli², Anna Vecchiarelli²

¹Center of excellence Glycomed, Department of Immunochemistry of Glycoconjugates, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia; chemluli@savba.sk

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

Abstract: The yeasts *Candida glabrata* is a human commensal fungus that resides on the skin, mucosa surfaces and gastrointestinal tract of healthy individuals. Although *C. glabrata* is not pathogenic under normal host conditions, it can cause infections when host defence is compromised. *C. glabrata* is one of the most common causes of candidiasis following *C. albicans*. This fungus is associated with a wide spectrum of diseases in humans, ranging from acute superficial infections of skin and mucosal membranes due to impaired epithelial barrier functions in immunocompetent individuals to inflammatory diseases and severe life-threatening infections in immunocompromised patients. *C. glabrata* is of special importance because of a recent increase in its frequency and its innately reduced susceptibility to antifungal agents, specifically to azoles. The immunomodulation of fungal infections depends on the specific recognition of cell-wall antigens, representing the pathogen associated molecular patterns by immunocompetent cells. The dendritic cells (DCs) model 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 and methods

Mannan preparation

Yeast strain *C. glabrata* CCY 26-20-1 (Culture Collection of Yeasts, 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) and purified using precipitation with Fehling's reagent.

Experimental animals

Mice (female CD1 mice, 4 - 6 weeks of age, Charles River Breeding Laboratories, Calco, Lecco, Italy) were used for isolation of DCs and subsequent analysis of DCs activation and mice (female, BALB/c, 6 weeks old, Research Institute of Animal Production Velaz, Prague, Czech Republic) were used for isolation of splenocytes and following analysis of cytokine production and proliferation assay.

Cells separation

Spleens were placed into ice cold saline, homogenized and resuspended in ACK lysis buffer to lyse the red blood cells and washed twice with saline and resuspended in complete RPMI-1640 (Lonza, Belgium) containing 10 % fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin sulphate (Gibco, Germany). The cell density was adjusted to 1×10^6 cells per mL with RPMI-1640. 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

Purified splenocytes and splenic CD11c⁺ DCs (105 cells/mL) were stimulated for 24 or 48 h with *Escherichia coli* LPS and mannan *C. glabrata*. After stimulation, cells were harvested and stained with anti-CD80 and anti-CD86 monoclonal antibodies (Antigenix America Inc., USA). After incubation, cells were analyzed by flowcytometry. Control staining of cells with irrelevant antibodies was used to obtain background fluorescence values.

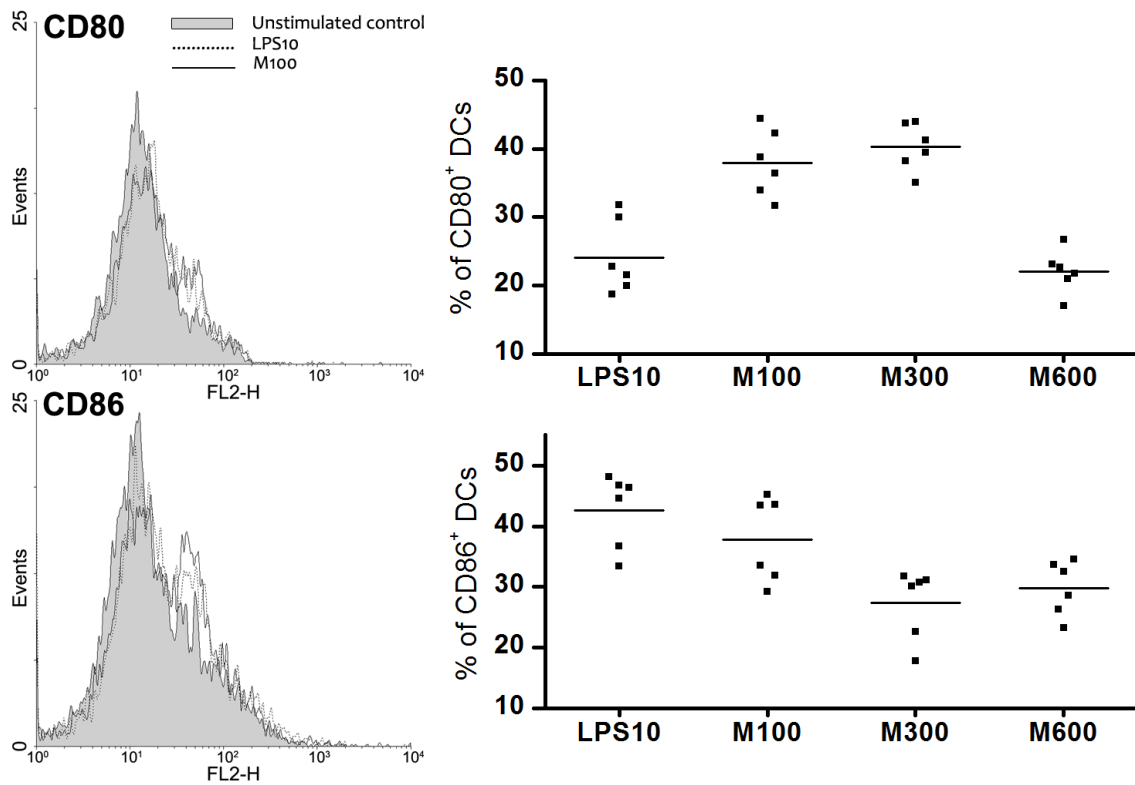


Fig.1: Expression of CD80 and CD86 DCs stimulated for 24 h with 10 $\mu\text{g/ml}$ *E. coli* lipopolysaccharide (LPS10), 100 $\mu\text{g/ml}$ mannan *C. glabrata* (M100), 300 $\mu\text{g/ml}$ mannan *C. glabrata* (M300) and 600 $\mu\text{g/ml}$ mannan *C. glabrata* (M600).

Acknowledgement

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

Synthetically prepared manno- and glucooligosaccharides mimicking *Candida albicans* cell wall glycan antigens - novel tools to study host-pathogen interactions.

E. Paulovičová¹, L. Paulovičová¹, R. Pilišiová¹, S. Bystrický¹, D. V. Yashunsky², A.A. Karelin², Y.E. Tsvetkov², N.E. Nifantiev²

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

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

Summary

The immunobiological efficacy of synthetically prepared mannoooligosaccharides and a glucoooligosaccharide, mimicking the structure of *Candida albicans* cell wall glycans was assessed *in vivo* and *in vitro* to exploit immune responses. The exposure of mice splenocytes to BSA-based conjugates of synthetic oligomannosides and oligoglucoside revealed intense influence on T-cell subsets polarization. The conjugates biased the immune responses towards T_h1 and T_h17 with respect to the prevalence of interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin (IL)-17 (IL-17) over IL-4 and IL-10 levels.

Post-vaccination anti-mannoooligosaccharide and anti-glucoooligosaccharide anti-sera were subjected to an evaluation of the structure-immunomodulation activity relationship. Clinical isolates of *C. albicans* CCY 29-3-32 and *C. albicans* CCY 29-3-164 were applied to study interactions between *Candida* cells and anti-oligosaccharide antibodies. *In situ* recognition of parietal oligomannosyl- and oligoglucosyl-sequences in *C. albicans* cell wall by the antisera raised against BSA-based conjugates of synthetic oligomannosides- and oligoglucoside revealed the effective recognition of specific distribution of natural oligosaccharide sequences in the cell wall of *C. albicans* serotype A. With respect to these results, it can be concluded, that novel, synthetically prepared oligosaccharides mimicking *Candida* cell wall structures represent prospective immunobiologically effective components for further immunopharmacologically relevant *Candida* vaccine design.

Material and Methods.

Animals, experimental design and immunisation

Female 8-week old rabbits (2000g of weight, variety New Zealand, Research Institute of Animal Production, Nitra, Slovakia) and mice (female, 6-8 weeks old, variety BALB/c, breeding facility VELAZ, Prague, Czech Republic) were used for sequential immunisations with synthetically prepared oligosaccharide-BSA conjugates. These animal experiments were conducted in accordance with the revised Declaration of Helsinki, and followed the criteria for the welfare of experimental animals, and complied with the ethical guidelines issued by the Research Base of Slovak Medical University, Institute of Preventive and Clinical Medicine (Bratislava, Slovakia), under the approval No. Ro 2939/09-221 of the State Veterinary and Food Administration of the Slovak Republic. The animals were housed in a temperature controlled environment at 22-24 °C, with 12 hr day-night cycles, and received food and tap water ad libitum.

Primary immunisation and, following, two booster immunisations of the mice (10 mice/group) were administered subcutaneously (s.c.) at 2-week intervals, with 100 μ L doses of 6 μ g of M5-2, M6, M7-A glycosides in conjugate, or at 3-week intervals (M7-B and G9). The rabbits (5 animals/group) were immunised intravenously (i.v.) with 50 μ g/doses of M2 and M5-1 in marginal ear vein three times, 2 weeks apart. Mice and rabbit prime–boost immunisation protocols also included a placebo group of saline-injected animals.

Whole cell ELISA

Evaluation of anti-*Candida* yeast- and anti-*Candida* hyphae-growth forms specific Ig isotype antibodies was performed *via* whole-cell ELISA assay using *C. albicans* CCY 29-3-32 (serotype A) and Itraconazole, Voriconazole and Fluconazol resistant strain *C. albicans* CCY 29-3-164 hyphal and yeast

cells as antigens in coating step (microtitre plates Immulon 4HBX, Dynex, USA). Anti-*Candida* yeast and hyphal specific IgG, IgA and IgM antibody levels were detected at optimal 1:100 sera dilution in Milk diluent (KPL Inc., USA). The goat-anti mouse IgG, IgM and IgA alkaline phosphatase conjugates (Bethyl Laboratories, Inc., USA) were used as detection secondary antibodies. After specific colour development (BluePhos® Phosphatase substrate, KPL Inc., USA) the *Candida* yeast and hyphae recognizing antibody isotypes levels were expressed as a mean absorbance at 630 nm.

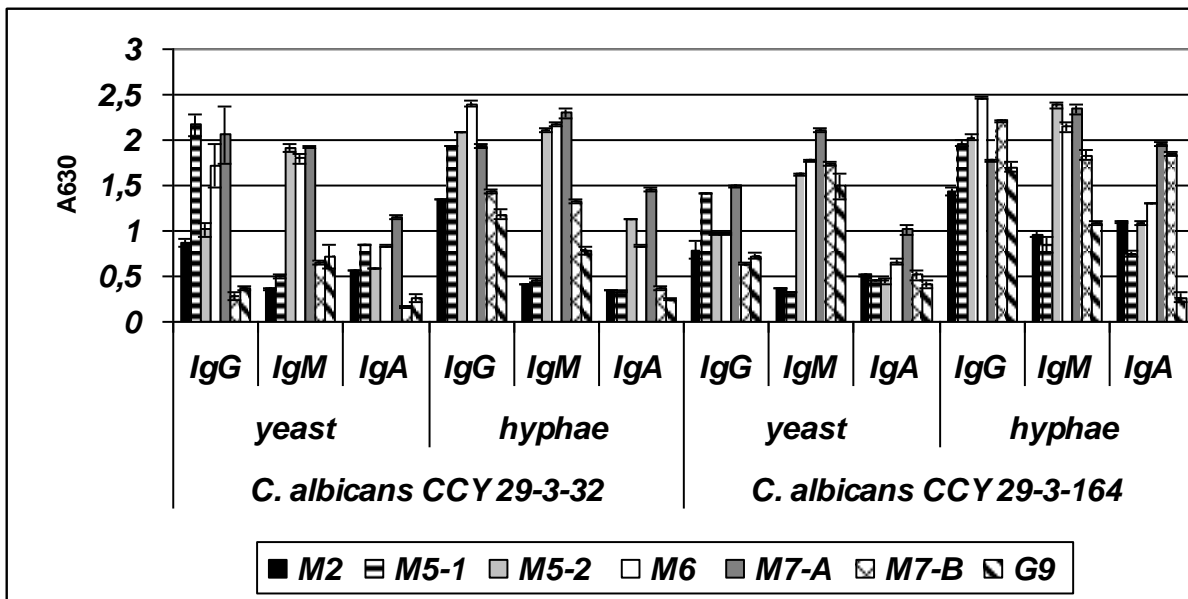
Indirect immunofluorescence

Indirect immunofluorescence staining was used to detect specific interactions between anti-mannooligosaccharide and anti-glucooligosaccharide conjugate post-vaccination sera and natural oligosaccharidic sequences of *C. albicans* cell-wall glycans. Briefly, 100 µL aliquots of prepared viable yeast and hyphae of *C. albicans* CCY 29-3-32 and *C. albicans* CCY 29-3-164 cultures were placed in 1.5 mL micro centrifuge tubes. The cells were washed three times with PBS, by centrifugation ($210 \times g$ / 5min/ 4 °C). Then, the *Candida* cells were treated with different anti-oligosaccharide post-vaccination sera (dilution 1:3 in PBS) at 37 °C for 2 hr, washed again with PBS and subsequently incubated with the fluorochrome-conjugated secondary anti-mouse antibodies. The samples were developed with goat anti-mouse- and goat anti-rabbit IgG and IgM FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugated antibodies (dilution 1: 200, Bethyl Laboratories, Inc., USA) at 37 °C for another 1hr, in the dark. Afterwards, the cells have been washed three times with PBS, by centrifugation, to remove the unbound antibodies. Finally, the samples were resuspended in PBS and mounted on slides and stained cells were observed under a fluorescence microscope Imager A.1, running under AxioVision software and equipped with AxioCam MRC camera and Plan-Neofluar objectives, (Zeiss, Germany).

Results and Discussion

***Candida* whole-cell ELISA**

The overview of the resulting values evidenced the major role of anti-oligosaccharidic IgG and IgM isotype antibodies, contrary to IgA response (Fig.1.). The maximal induced increase of IgG and IgM was reached with oligosaccharide conjugates M5-1, M5-2, M6 and M7-A in *C. albicans* CCY 29-3-32 yeast and hyphal models. The oligosaccharidic moiety of these conjugates is branched (M5-1, M5-2, M6) or highly substituted (M7-A), contrary to the M2 and M7-B structures. Such Ig class engagement can be ascribed to the oligosaccharide structure-immunobiological efficacy interrelationships (Paulovicova *et al.*, 2012; Dang *et al.*, 2012; Han *et al.*, 1999; Cutler *et al.*, 2007). Moreover, the antibody isotype and subclass may strongly influence the specificity and the antifungal protective capacity of certain anti-saccharide antibodies (Torres & Casadevall, 2008). The results of oligosaccharide conjugates inducible Ig isotype antibodies revealed with *C. albicans* CCY 29-3-164 yeast and hyphal growth forms resembled the dominance of IgG and IgM class antibodies directed against oligosaccharidic conjugates, more evident with the hyphal morphoform. Contrary to *C. albicans* CCY 29-3-32, the intense interaction of specific anti-oligosaccharidic isotype IgA with complementary sequences presented in hyphae resulted in higher values. That the anti-oligosaccharide conjugate sera enhanced inter-reaction with natural oligosaccharidic epitopes presented in hyphae growth form is of interest because the sequential mechanism of candidosis is closely associated with *Candida* dimorphism, hyphal formation, adhesion, and tissue organ invasion (Vinh *et al.*, 2011; Berman & Sudber, 2002; Naglik *et al.*, 2011; Egiman *et al.*, 2003).



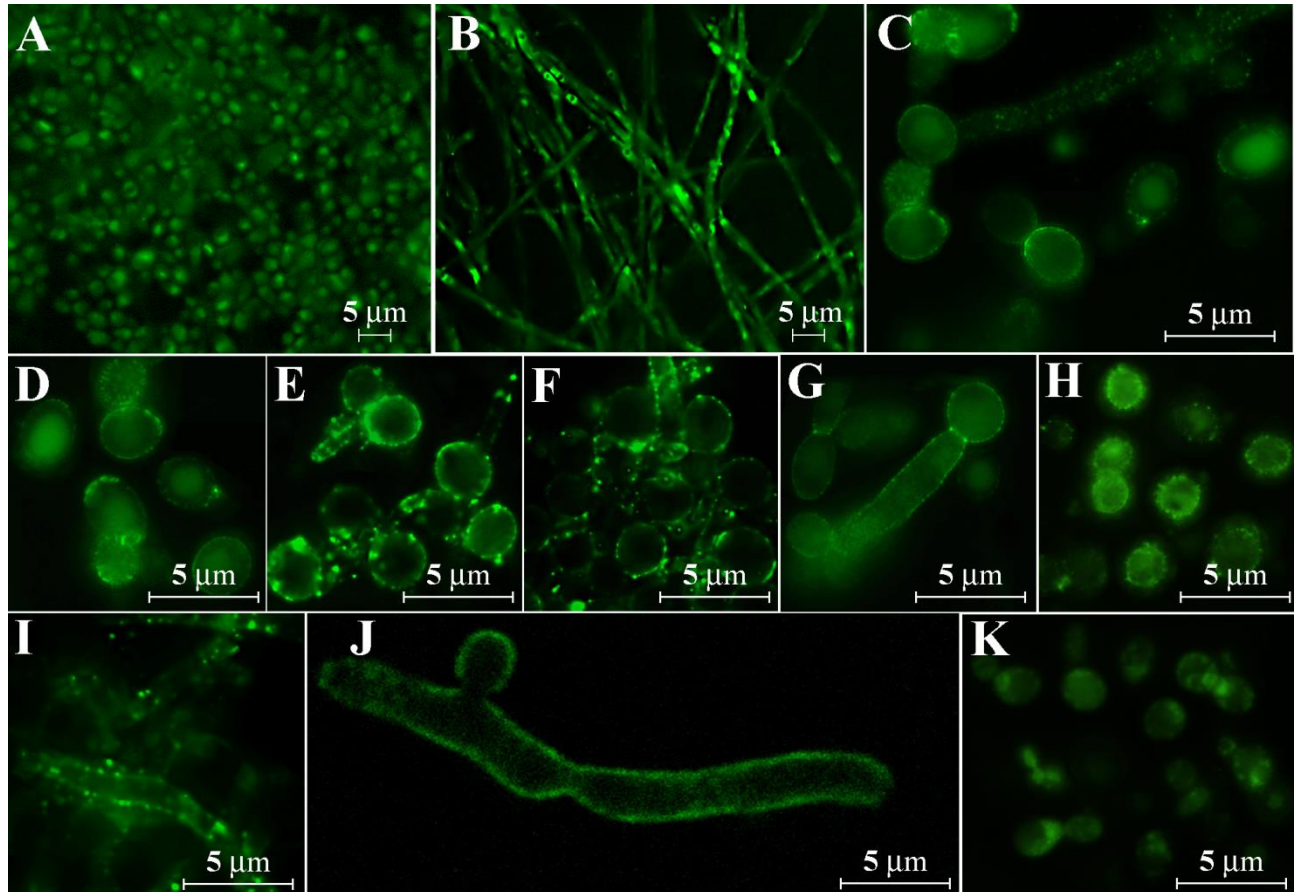
An overview of anti-whole cell *C. albicans* CCY 29-3-32 and anti-whole cell *C. albicans* CCY 29-3-164 yeast and hyphae specific Ig class antibody responses. The results of two parallel measurements are expressed as average \pm S.D.

Indirect immunofluorescence.

The indirect immunofluorescence assay was performed in situ in order to verify the ability of anti-oligosaccharide conjugate antisera to recognize naturally expressed *Candida* yeast and hyphal cell-wall oligomannose and oligoglucose sequences. As a result of the higher average titres of anti-*C. albicans* CCY 29-3-32 and anti-*C. albicans* CCY 29-3-164 yeast and hyphal specific IgG class antibodies (Fig.2) and the previously observed high possibility of anti-oligosaccharide conjugate IgM non-specific interaction with *C. albicans* whole cells (Paulovicova *et al.*, 2012), the immunofluorescence patterns were developed by goat anti-mouse and/or anti-rabbit IgG (H+L)-FITC conjugated. The overview of immunofluorescence patterns (Fig.2) strongly suggested the heterogenous distribution of the cell-wall oligomannosyl moieties recognised by sera directed against M2 - M7-B synthetically prepared mannanoligosaccharide antigens. Comparable immunofluorescence patterns were observed even different anti-mannooligosaccharide conjugate sera with different specificity towards particular mannanoligosaccharidic sequence of side chains of natural mannan molecule have been used. This could be explained by the fact that the structure of synthetic mannanoligosaccharide sequences is derived from *C. albicans* naturally expressed mannanoligosaccharides as characterised by antigenic factor polyclonal sera (Candida Check, Iatron, Tokyo Japan) and by cell-wall localisation of complex mannan moiety (Chauhan *et al.*, 2002 ; Suzuki *et al.*, 1997, Fukazawa *et al.*, 1997).

Taking into account, that relevant sequences of mannanoligosaccharides are visualised with higher intensity in the germ-tube and mycelial form, their role in the yeast-hyphal transition can be proposed. Shibata *et al.* pointed out the structural changes and different engagement of acid-labile and acid-stable mannan moieties throughout yeast-hyphal transition (Shibata *et al.*, 2007). In contrast, the reactivity of anti-G9 prepared antiserum with corresponding oligoglucosyl sequences of *Candida* cell-wall was more dominant in yeast and budding yeast form than in hyphal morphoform, where the signal was fainter or mostly absent. This finding is in agreement with studies on β -glucan specific interactions with Dectin-1, β -glucan recognizing receptor. It demonstrates that β -glucan is exposed at discrete patches on the *C. albicans* yeast form and also in bud and birth scars resulting from separation of the budding yeast. By contrast, during filamentous growth, the core β -glucan layer is obscured by the outer layer (mostly mannan) (Ganther *et al.*, 2005; Goodridge *et al.*, 2009). This rearrangement of the cell wall with

masking β -glucan underneath a mannan/mannoprotein layer, and in this way blocking recognition by immune competent phagocytosing cells, is one of the most important features of the mechanisms of immune evasion in *Candida* (Collette&Lorenz, 2011; Romani, 2011).



Immunofluorescence patterns of expression of natural *C.albicans* CCY 29-3-32 cell-wall mannooligosaccharides, recognized by post-immunisation antisera against synthetically prepared BSA conjugates of oligomannoside (A,B,C -anti-M2 serum, D,E,F,G I, J- anti-M6, H -anti-M7-A, K-anti-G9) in yeast (A, C, D, H, K) budding yeast (E,F) and pseudo-hyphae (J,G) and true hyphae (B, I).

The reaction was revealed with FITC-conjugated anti-mouse and anti-rabbit IgG (Imager A.1, magnification 400 x times (A and B), 630 x times (C-K) AxioVision, Zeiss,Germany).

Acknowledgements:

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.

Carboxymethylation significantly increases antioxidant potential of yeast mannans and glucans.

Eva Machová, Alžbeta Čížová and Slavomír Bystrický
Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovak Republic

We compared the antioxidant activities against hydroxyl radicals of original polysaccharides and their CM-derivatives with similar DS (0.41 – 0.45). All CM-derivatives prepared from mannans and β -glucan were stronger antioxidants than original ones. Comparing CM-mannans, the highest antioxidant activity against OH• was achieved by CM-mannan from *C. dubliniensis* (49.8%), the lowest value (40.8%) belonged to the *C. glabrata* CM-mannan and CM- β -glucan (DS 0.43) appeared as weaker antioxidant (34.1%) (Table 1). The differences between CM-mannans could be evoked by different branching of original mannans - *C. dubliniensis* mannan is much more branched than *C. glabrata* mannan. On the other hand, the antioxidant activities of original mannans were significantly lower, from 12.5% for *C. tropicalis* mannan to 10.5% for *C. glabrata* mannan. It was impossible to compare CM- β -glucan and β -glucan alone as antioxidants due to water insolubility of underivatized β -glucan.

From our results it is evident that the presence of carboxymethyl groups on mannans markedly increased the scavenging of OH• and therefore the antioxidant activity of CM-derivatives.

Acknowledgements:

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.

Preparation and immunogenicity of conjugate based on hydrazine detoxified LPS antigen of *Vibrio cholerae* O139

Anna Fleischhackerová and Slavomír Bystrický
Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

The appearance and rapid spread of *V. cholerae* O139 serogroup with epidemic and pandemic potential poses a serious threat to developing countries. Effective vaccine against cholera caused by *Vibrio cholerae* O139 is currently needed. Lipopolysaccharide is dominant protective antigen of *V. cholerae*. A glycoconjugate construct was based on attachment of hydrazine detoxified LPS (dLPS) to carboxylated BSA (CBSA) via its amino group. The immunologic properties of the glycoconjugate were tested using BALB/c mice injected subcutaneously without any adjuvant three times at 2 weeks interval. The immunogenicity of the conjugate was estimated by enzyme-linked immunosorbent assay, testing of anti-lipopolysaccharide IgG, IgM and IgA antibodies. The conjugate elicited a statistically significant increase of LPS-specific IgG levels in mice ($P < 0.001$). The specific anti-LPS IgG and IgA response after the second booster dose were significantly higher compared to reference and unconjugated dLPS response. Antibodies elicited by the dLPS-CBSA conjugate were vibriocidal.

Acknowledgements:

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.

Rabbit antisera elicited by mannan-protein conjugates prevent yeast growth

Eva Machová and Slavomír Bystrický

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences,

Candida albicans mannan and capsular galactoglucoxylo-mannan of *Cryptococcus laurentii* were isolated and chemically attached to serum albumin. Antisera elicited by intensive immunization of rabbits with both conjugates showed effective cross-reactive growth inhibition of different representatives: *C. albicans* CCY 29-3-32; *C. tropicalis* CCY 29-7-6; *C. parapsilosis* CCY 29-20-1; *C. glabrata* CCY 26-20-1; *Cr. laurentii* CCY 17-3-5; *Cr. neoformans* CCY 17-1-5 and *Cr. albidus* CCY 17-4-6). Chromatographic profile of proteins of rabbit antiserum elicited by *C. albicans* mannan-HSA conjugate comprised of five fractions. Only one of them (fraction IV) inhibited the growth of examined yeasts. Gel electrophoresis of fraction IV showed two dominant bands at 25 and 55 kDa, evidently belonging to light and heavy chains of IgG. The decisive factor for production of antibodies which considerably inhibited the growth of various yeasts is probably the conservative part of mannan structure, common for *Candida* and *Cryptococcus* microorganisms.

Acknowledgements:

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.

Preparation of novel carboxymethyl derivatives of yeast mannans

Eva Machová, Anna Malovíková and Slavomír Bystrický

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

Carboxymethyl derivatives of yeast mannans were prepared by reaction of chloroacetate with concentrated polysaccharides in alkaline aqueous solution. Mannans from yeasts differing in size and space structures show similar reactivity. The degree of substitution at *Candida albicans* mannan (DS = 0.3, 0.41, 0.73) was proportional to amount of added monochloroacetate. The effectiveness of derivatization of mannans was lower than that of branched glucan – dextran (DS = 0.33, 0.6, 1.1) at the same reaction conditions. Though strong alkaline conditions cause degradation of polysaccharides, the resulted carboxymethyl derivatives have higher molecular weight than original mannans. Non-uniform, variable position of substitutions causes non-proportional change of optical rotation and increase of NMR spectra complexity. Physico-chemical characteristics of novel carboxymethyl manans obtained by FT-IR, UV, HPLC, ¹H NMR and optical rotation measurements are presented.

Acknowledgements:

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.

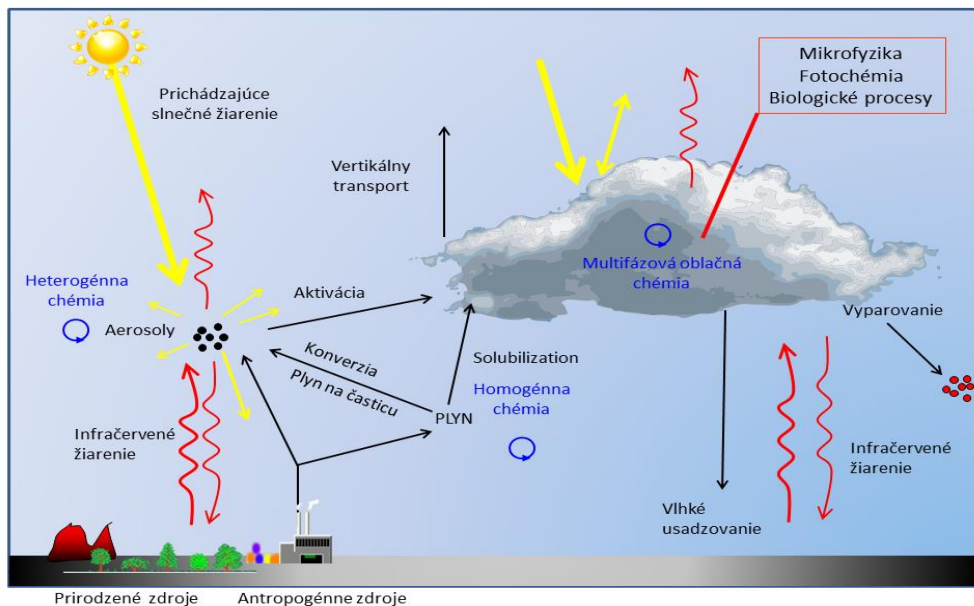
Môžu mikroorganizmy v oblačnej vode ovplyvniť formu zrážok?

Mária Matulová

Chemický ústav, Centrum glykomiky SAV, Bratislava, Slovensko

Výskum v ostatnom desaťročí ukázal, že v atmosférickej vode a snehu sú prítomné živé mikroorganizmy. Oblaky predstavujú extrémne prostredie pre živé organizmy, charakteristické nízkymi teplotami, kyslým pH, UV žiarením a nedostatkom živín a rýchlymi zmenami fyzikálno-chemických podmienok v priebehu krátkych časových intervalov. Nedávne štúdie dokázali, že sú v nich prítomné metabolicky aktívne mikrobiálne komunity, a tým vyvolali záujem o definovanie ich štruktúry a fungovania. Predmet tohto výskumu predstavuje inovatívnu a skoro nedotknutú oblasť. Oblaky sú heterogénne médium (pevná, kvapalná a plynná fáza) obsahujúce komplexnú zmes organických a anorganických látok. Taktiež môžu byť považované za skutočný reaktor, kde prebiehajú rôzne typy chemických a fyzikálnych procesov. Doteraz sa predpokladalo, že tu prebiehajú iba fotochemické reakcie radikálovou cestou pôsobením solárnej energie. Porozumenie týchto procesov prebiehajúcich v oblakoch je kľúčovou otázkou pretože majú dopad na tvorbu a oblakov a zrážky a teda aj na klímu. Iba do nedávna bol vplyv neživých (abiotických) procesov vedúcich k transformáciám organickej hmoty v oblakoch. Tieto procesy sa týkali radikálovej chémie a to fotochémie. Pohľad sa však zmenil zistením, že v oblačnej vode sú prítomné metabolicky aktívne mikroorganizmy aj napriek nehostinným podmienkam ako sú napr. extrémne nízke teploty, kyslé pH riziko vysušenia. Vynorili sa tak nové vedecké otázky : "Môžu tieto mikroorganizmy participovať na chémii atmosféry a mikrofyzičke oblakov? Sú biologické procesy v konkurencii s abiotickými?"

Troposféra je komplexné multifázové prostredie pozostávajúce z plynov a rozptýlených pevných a vodných častí vrátane hmly, oblačných kvapiek a kryštálov. Molekuly plynov a častí sa označujú za troposferické aerosoly. Primárne aerosólové častice sa dostávajú do troposféry antropogénnymi aktivitami (ako je spaľovanie palív) a prirodzenými procesmi (prachom, rozprašovaním morskej častí prispieva k znečisteniu ovzdušia hlavne v mestských zónach. Sekundárne aerosoly vznikajú konverziou plynu do častíc vody a biogénnymi aktivitami) (Obrázok 1).



Obrázok 1: Interakcie medzi oblakom, aerosolmi a chémiou. Červené šípky znázorňujú infračervené žiarenie uvoľňované zemou, žlté znázorňujú slnečné žiarenie.

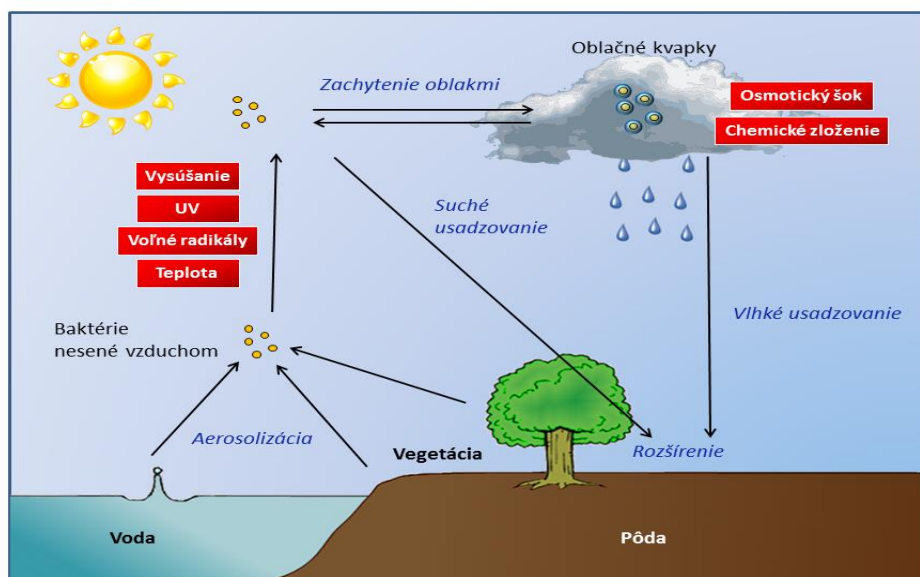
Fyzikálno-chemické vlastnosti aerosólov závisia od ich pôvodu a dĺžky pobytu v atmosfére a keďže sú transportované vzduchom na veľké vzdialenosti tieto sú modifikované vplyvom rôznych faktorov (zloženie ovplyvnené kondenzáciou, veľkosť vyparovaním...).

Aerosoly priamo interagujú so slnečným žiarením rozptylom a absorpciou svetla a majú tak nepriamy vplyv na bilanciu radiácie zeme. Tento efekt je viazaný na schopnosť aerosólových častíc pôsobiť ako

kondenzačné jadrá oblakov na tvorbu kvapiek v oblakoch, na fyzikálno-chemické vlastnosti vytváraných oblakov – reflektivitu a dobu života. Chemické interakcie vo vodnej fáze ovplyvňujú cyklovanie aerosólov a mikrofyzikálne procesy v oblakoch, také ako distribúciu veľkostí aerosólových častíc a ich chemické zloženie. Modifikované častice vo všeobecnosti obsahujú po vyparení rozpustné frakcie v dôsledku čoho sa dostávajú do oblačných kvapiek už pri nízkej supersaturácii. Toto vedie k vytváraniu opticky jasných oblakov zložených z malých kvapiek, ktoré zvyšujú dobu života oblaku/častice a redukujú ich potenciál zrážok.

Donedávna bola venovaná veľká pozornosť chémii v oblakoch v závislosti na anorganických zložkách ako je síra, zatiaľ čo vplyvu organických zlúčenín bol študovaný v menšom rozsahu. Značnú časť aerosólových častíc v troposfére predstavujú prchavé organické zlúčeniny (VOC) (mnohé sú vodorozpustné), ktoré môžu podliehať oxidačným reakciám. VOC sú teda priamo aj nepriamo spojené s vodnou chémiou radikálov, radikálových aniónov, neradikálových oxidantov a iónov prechodných kovov. Oxidácia organických látok v oblakoch môže byť zdrojom sekundárnych organických aerosólov v atmosfére po vyparení oblačnej kvapky.

Prítomnosť mikroorganizmov v atmosfére bola predpokladaná už Antonie van Leeuwenhoekom v 1641. Prítomnosť živých mikroorganizmov vo vzduchu v Paríži neskôr dokázal Pasteur. Záujem o mikroorganizmy v atmosfére bol dlhú dobu iba z pohľadu zdravia a prenosu patogénov a neskôr z pohľadu klimatológie a atmosférických procesov. V súčasnosti záujem o ich možný vplyv na chémiu a mikrofyziku oblakov stúpa. Metabolicky aktívne mikroorganizmy v boli identifikované vo všetkých častiach atmosféry od suchého vzduchu k oblačnej vode, v hmle, zrážkach od hladiny mora až po mezoféru. Sú na zemi všadeprítomné, vo vode, zemi, na vegetácii v dôsledku čoho sa počas svojho životného cyklu môžu dostať aj do atmosféry tak ako to ilustruje Obrázok 2.



Obrázok 2: Schematická reprezentácia životného cyklu mikroorganizmov v atmosfére sumarizujúca faktory ktoré obmedzujú ich prežitie a aktivitu.

Baktérie prítomné v atmosfére sa môžu vyskytovať osamotene ale najčastejšie v zhlukoch mnohých bakteriálnych buniek, fragmentoch vegetácie a prachu, ku ktorým boli prichytené. Sú prenášané na veľké vzdialenosti. V atmosfére sa zdržujú pomerne dlhú dobu, až niekoľko dní a týždňov. Dĺžka tohto obdobia závisí od mnohých faktorov, hlavne od veľkosti a schopnosti vytvárať kondenzačné jadrá oblakov. Vďaka ich schopnosti vytvárať na svojom povrchu polysacharidy a proteíny sú mikroorganizmy známe ako účinné aktivátory kondenzačných jadier oblakov. Môžu tvoriť podklad na

vytvorenie kvapiek a ľahko sa pripojiť k oblaku. Oblaky sú pre mikroorganizmy drsným prostredím, dokonca nehostinnejším ako atmosféra (Obrázok 2). Okrem vysušenia, nízkeho obsahu živín, vplyvu slnečného žiarenia a radikálov v suchej atmosfére musia mikroorganizmy v oblakoch čeliť toxickým látkam, zmenám osmotického tlaku, rozsahu pH od 3 do 7 a cyklu zmrazovanie/rozmrazovanie.

Výsledky nedávneho štúdia ukázali, že študované mikroorganizmy môžu transformovať ako biokatalyzátory organické zlúčeniny prítomné v oblačnej vode. Ich významný vplyv sa prejavuje počas noci pri absencii slnečného žiarenia. Navyše sú schopné produkovať exopolymérne látky, ktoré jednak zvyšujú ich pravdepodobnosť prežitia v nehostinnom prostredí oblakov, ale môžu ovplyvniť aj mikrofyziku oblakov a formu zrážok tým, že ich povrch sa zmáčateľnejším.

Literatúra

1. M.JOLY, L.DEGUILLAUME, M.VAĎTILINGOM, Y.LONG, V. VINATIER, M. MATULOVÁ, N. CHAUMERLIAC, M. SANCELME, Anne-Marie. DELORT : Cloud Microorganisms and their Potential Implication in Atmospheric Chemistry. In "Clouds: Classification, Microbiology and Environmental Effects" Editors: Marta Thelin and Julienne Maheux, 2013, Novapublishers, pp. 1-46.
2. M.MATULOVÁ, S.HUSÁROVÁ, P.CAPEK, M.SANCELME, Anne-Marie.DELORT, Biotransformation of various saccharides and production of exopolymeric substances by cloud-borne *Bacillus* sp. 3B6. Environ. Science Technology (zaslané do tlače)

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.

Produkcia biosurfaktantu baktériou izolovanou z oblačnej vody *Pseudomonas* sp. 14B2.

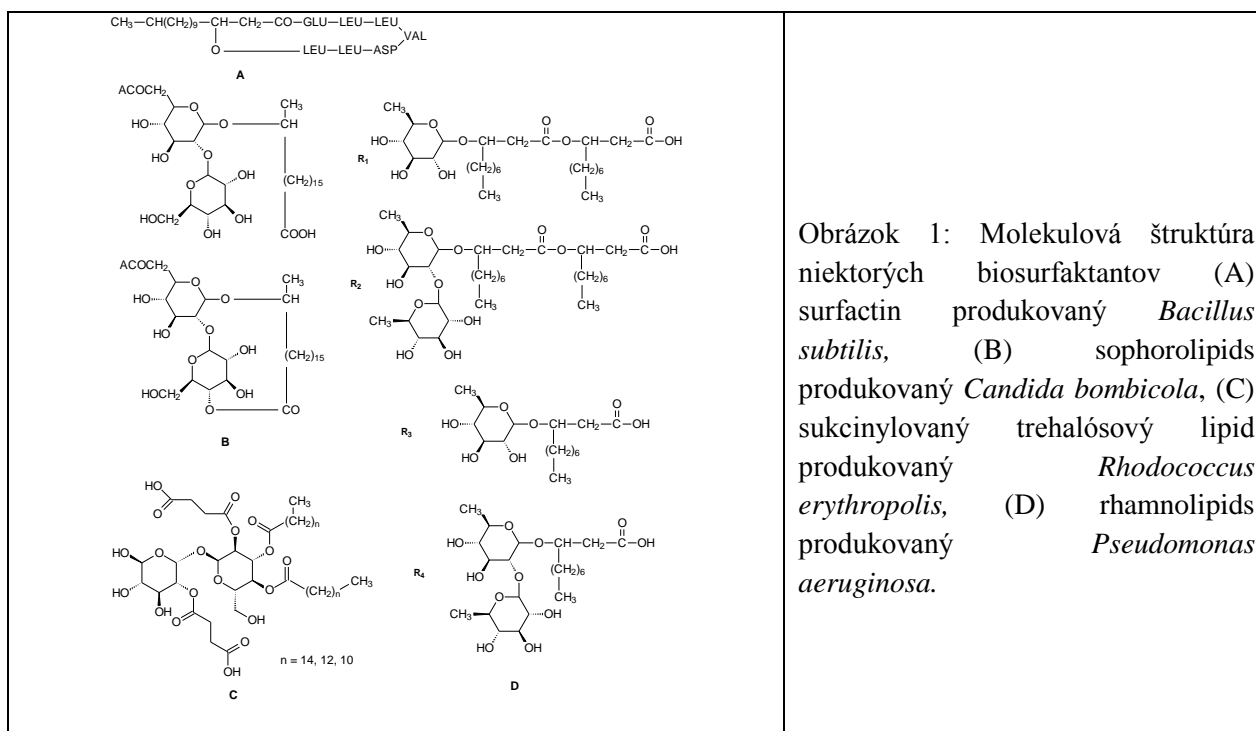
Mária Matulová^a, Iveta Uhliariková^a, Martine Sancelme^{b,c}, Anne-Marie Delort^{b,c}

^aChemický ústav, Centrum glykomiky SAV, Bratislava, Slovensko

^bClermont Université, Université Blaise Pascal, ICCF, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^cCNRS, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, F-63177 Aubière, France

Baktérie prítomné v atmosfére sa môžu vyskytovať osamotene ale najčastejšie v zhlukoch mnohých bakteriálnych buniek, fragmentoch vegetácie a prachu, ku ktorým boli prichytené. Sú prenášané na veľké vzdialenosti. V atmosfére sa zdržujú pomerne dlhú dobu, až niekoľko dní a týždňov. Dĺžka tohto obdobia závisí od mnohých faktorov, hlavne od veľkosti a schopnosti vytvárať kondenzačné jadrá oblakov. Vďaka ich schopnosti vytvárať na svojom povrchu polysacharidy a proteíny sú mikroorganizmy známe ako účinné aktivátory kondenzačných jadier oblakov. Môžu tvoriť podklad na vytvorenie kvapiek a ľahko sa pripojiť k oblaku. Mikrofyziku oblakov môžu ovplyvniť tak, že môžu pôsobiť ako jadrá ľadu IN - ice nuclei, alebo vďaka ich proteínovej membráne umožňujú tvorbu snehových kryštálov pri vyššej teplote ako je to v prípade homogénnej kryštalizácie snehových vločiek a tým sa priamo zúčastňujú tvorby snehu. Niektoré mikroorganizmy môžu slúžiť ako kondenzačné jadrá oblakov CCN - cloud condensation nuclei, pretože sú aerosólmi so špecifickými povrchovými vlastnosťami, ktoré majú pôvod v ich biologických štruktúrach. Môžu to byť extracelulárne polymérne látky (polysacharidy a ich konjugáty, alebo proteíny). Môžu produkovať biosurfaktanty - molekuly s hydrofilnou a hydrofóbnou časťou molekuly. Ich štruktúra môže byť rozmanitá od nízkomolekulových štruktúr až po polyméry. Obrázok 1 znázorňuje niektoré z nízkomolekulových štruktúr biosurfaktantov.



Obrázok 1: Molekulová štruktúra niektorých biosurfaktantov (A) surfactin produkovaný *Bacillus subtilis*, (B) sophorolipids produkovaný *Candida bombicola*, (C) sukcinylovaný trehalosový lipid produkovaný *Rhodococcus erythropolis*, (D) rhamnolipids produkovaný *Pseudomonas aeruginosa*.

Medzi 157 testovanými kmeňmi bolo identifikovaných mnoho mikroorganizmov schopných produkovať biosurfaktanty, hlavne bakteriálne druhy rodu *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Clavibacter*, *Microbacterium*, *Frigobacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia* a *Pantoea* a kvasinky rôznych kmeňov *Diozegia*, *Udeniomyces* a *Bullera*.

Ako druhý bol na testovanie zvolený *Pseudomonas* sp. kmeň 14B2.

Produkcija a izolácia biosurfaktantu:

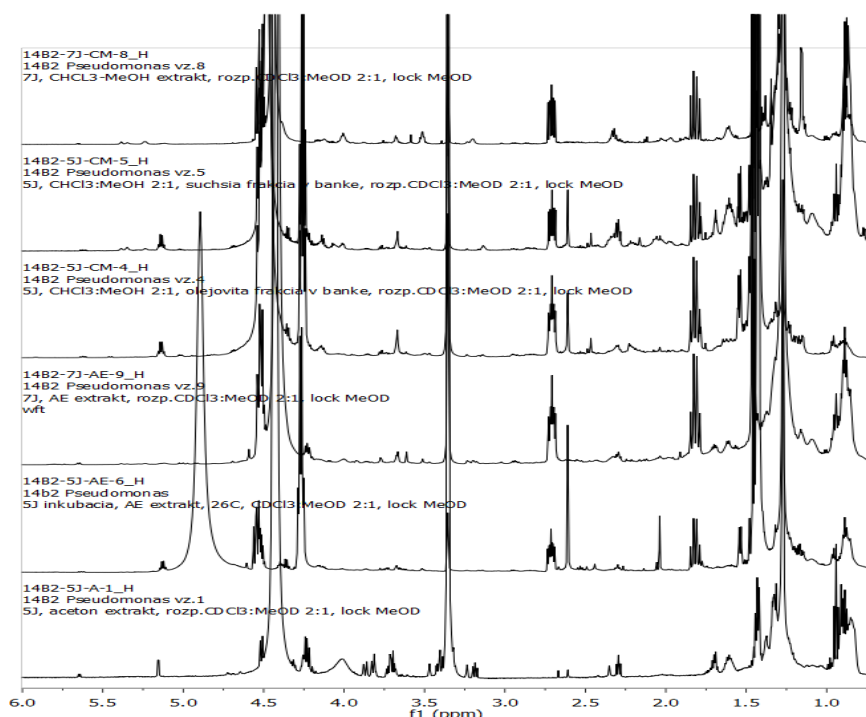
Inkubačné podmienky:

glukóza 20g/100mL, Na₂HPO₄ 6g/L, KH₂PO₄ 4g/L, MgSO₄.7H₂O 0.25g/L, NH₄NO₃ 4g/L, EDTA 0.1g/L, MnSO₄.H₂O 0.2g/L, FeSO₄.7H₂O 0.01g/L, CaCl₂ 0.01g/L, CoCl₂ 0.01g/L, ZnSO₄ 0.01g/L, CuSO₄ 0.001g/L, H₃BO₄ 0.001g/L, Na₂MoO₄ 0.001g/L. Inkubácia bola robená pri 27°C. Vzorky boli odobraté pri 48h, 120h a 168h (2, 5 and 7 dní) inkubácie.

Optimalizácia separácie biosurfaktantu:

1. Testované boli tri typy extrakčných postupov (Schéma 1):
 - precipitácia acetónom
 - extrakcia zmesou Chloroform:Metanol ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 2:1$) (CM)
 - extrakcia Ethyl Acetatom (AE).

Každou extrakciou bola získané rozdielne frakcie. Ich zloženie bolo kontrolované ^1H NMR spektroskopiou. Obrázok 2 ukazuje spectra frakcií získaných extrakciou organickými rozpúšťadlami a vyzrážaním acetónom, v ktorých bol biosurfaktant prítomný v zmesi s inými zlúčeninami.



Obrázok 2 ^1H NMR spektrá frakcií po extrakcii organickými rozpúšťadlami alebo vyzrážaním.

Optimalizácia extrakcie biosurfaktantu z acetónového precipitátu

Zlyofilizovaný precipitát po 5 dňovej inkubácii *Pseudomonas* 14B2 po vyzrážaní acetónom bol zložený z amorfnej zložky a kryštalických produktov. Urobená bola následná extrakcia v mnohých krokoch kvôli separácii jednotlivých zložiek zmesi čo viedlo k získaniu rôznych frakcií (Schéma 1). Z každej z nich bolo zmerané ^1H NMR spektrum a oil spread test na zistenie prítomnosti biosurfaktantu. Amorfná zložka predstavovala nespotrebovanú glukózu a glycerol. Kryštalická obsahovala zmes organických molekúl.

Porovnanie NMR spektier ukázalo, že extrakcia Metyl Tert-Butyl Éterom (MTBE) a zmesou $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ boli najefektívnejšie. Preto precipitát po 7-mich dňoch inkubácie bol rozdelený na polovicu a jedna z nich bola extrahovaná s MTBE a druhá zmesou $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$.

PodĎakovanie:

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.

**Produkcia biosurfaktantu baktériou izolovanou z oblačnej vody
Bacillus 7B11.**

Mária Matulová^a, Iveta Uhliariková^a, Martine Sancelme^{b,c}, Anne-Marie Delort^{b,c}

^a*Chemický ústav, Centrum glykomiky SAV, Bratislava, Slovensko*

^b*Clermont Université, Université Blaise Pascal, ICCF, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

^c*CNRS, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, F-63177 Aubière, France*

Za hlavný zdroj premeny organických zlúčenín prítomných v atmosfére bola donedávna považovaná radikálová chémia pôsobením slnečného žiarenia. Zistenie prítomnosti metabolicky aktívnych

mikroorganizmov v atmosférických vodách vzbudilo otázku ako môžu mikroorganizmy ovplyvniť atmosférickú chémiu a mikrofyziku oblakov.

Vplyv na atmosférickú chémiu: Mikroorganizmy môžu byť považované za biokatalyzátory schopné transformovať organické zlúčeniny a tak ovplyvňovať atmosférickú chémiu. Štúdium vybraných mikroorganizmov izolovaných z oblačnej vody ukázalo, že majú potrebnú enzymatickú výbavu na metabolizovanie mono- a dicarboxylových kyselín (sukcinát, acetát, laktát, kyselinu mravčiu), metanolu a formaldehydu (Amato et al. 2005, 2007c, Vaitilingom et al 2010, Ariya et al 2002, 2004). Tieto organické toxické zlúčeniny sú prítomné v oblakoch v najväčšom množstve.

Vplyv na mikrofyziku oblakov : Po prvé, niektoré mikrobiálne druhy (hlavne *Pseudomonas* a *Xanthomonas*) môžu pôsobiť ako jadrá ľadu IN - ice nuclei. Vďaka ich proteínovej membráne je možná tvorba snehových kryštálov pri vyššej teplote ako je to v prípade homogénnej kryštalizácie snehových vločiek (Morris, 2004; Möhler, 2007) a tým sa priamo zúčastňujú tvorby snehu. Po druhé, niektoré mikroorganizmy môžu slúžiť ako kondenzačné jadrá oblakov CCN - cloud condensation nuclei, pretože sú aerosólmi so špecifickými povrchovými vlastnosťami, ktoré majú pôvod v ich biologických štruktúrach.

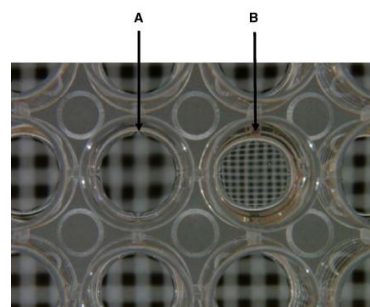
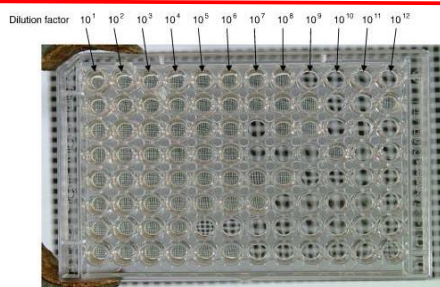
Nedávno bolo ukázané, že baktérie izolované z oblačnej vody, hlavne *Pseudomonas*, boli schopné produkovať biosurfaktanty (Ahern, 2007). Prítomnosť týchto molekúl bola dokázaná aj v atmosférických aerosóloch (Ekström, 2009). Podľa najnovšej vedeckej hypotézy, mikroorganizmy môžu meniť povrchové napätie aerosólov a tým aj formu zrážok. V spolupráci s laboratóriom SEESIB Univerzity Blaise Pascal vo Francúzsku sme produkciu biosurfaktantov mikroorganizmami izolovanými z oblačnej vody začali študovať iba nedávno. Počas skríningu časti francúzskej mikrobiálnej banky (> 500 mikroorganizmov) bolo objavených mnoho so schopnosťou produkovať biosurfaktanty. Predmetom slovensko- francúzskeho bilaterálneho projektu bol:

- Skrining francúzskej mikrobiálnej banky na produkciu biosurfaktantov
- Identifikácia najlepších producentov biosurfaktantov
- Hľadanie podmienok pre nadprodukcii biosurfaktantov
- Identifikácia ich štruktúry

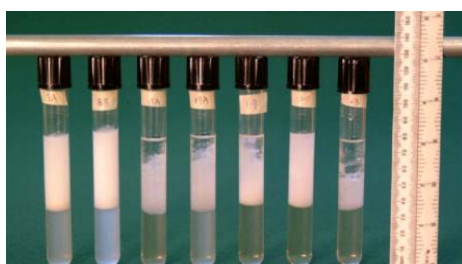
Skrining:

Na stanovenie prítomnosti biosurfaktantov v inkubačných médiách mikrobiálnych kmeňov boli prevedené boli 3 druhy testov (Obr. 1):

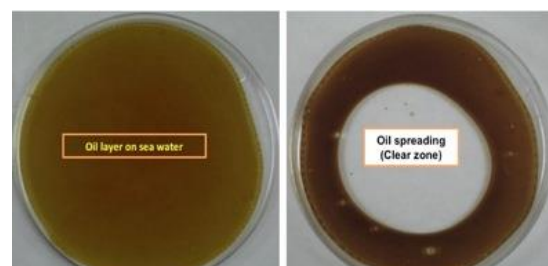
test v 96 well mikroplatničkách



Emulzifikácia



Oil spreading



Obrázok 1 Testy použité pri skriningu aktivitu biosurfaktantov

Medzi 157 testovanými kmeňmi bolo identifikovaných mnoho mikroorganizmov schopných produkovať biosurfaktanty, hlavne bakteriálne druhy rodu *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Clavibacter*, *Microbacterium*, *Frigobacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia* a *Pantoea* a kvasinky rôznych kmeňov *Diozegia*, *Undeniomyces* a *Bullera*.

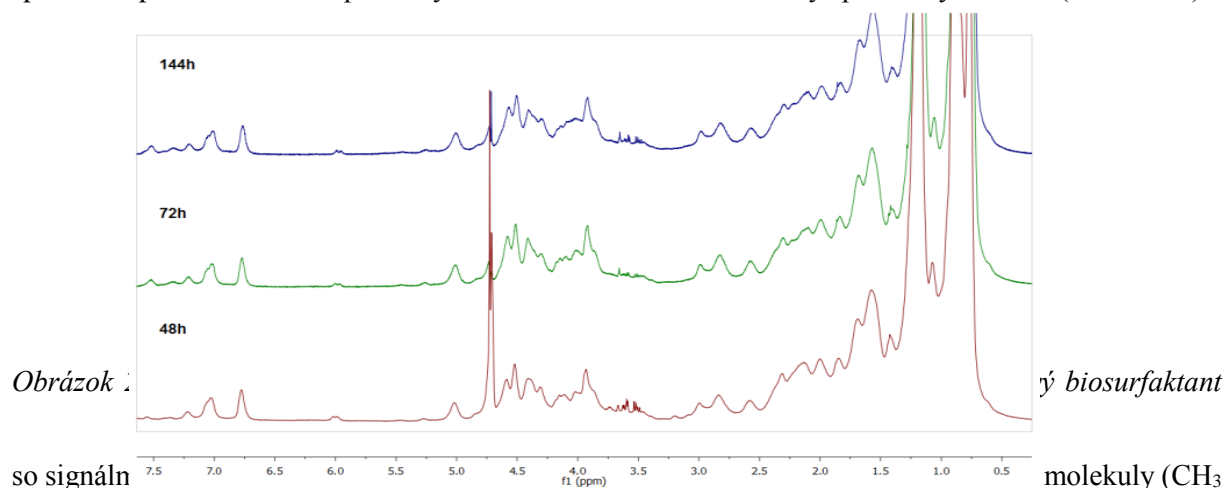
Ako najlepší producent bol identifikovaný *Bacillus* sp. kmeň 7B11, ktorý bol vybraný na ďalšie štúdium.

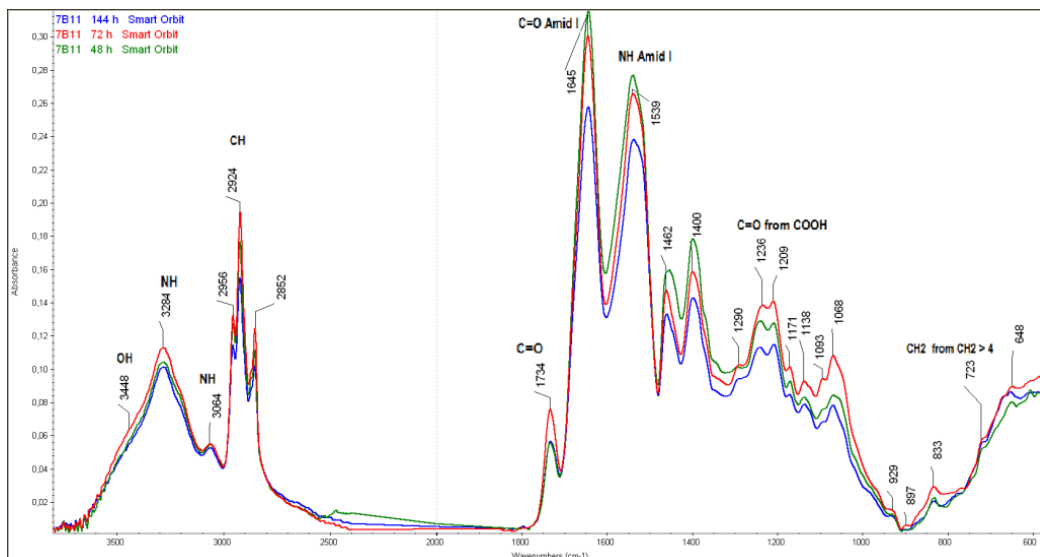
Produkcja a izolácia biosurfaktantu:

V skriningových testoch sa *Bacillus* sp. 7b11 ukázal ako najlepší producent biosurfaktantov. Pretože produkcia biosurfaktantov je ovplyvnená inkubačnými podmienkami tieto boli starostlivo vybrané. Zloženie inkubačného média a extrakčné podmienky boli identické ako u Kumar a spol. (2007). Inkubácia bola prevedená pri 27°C, vzorky odobraté po 48h, 72h a 144h. Biosurfaktant bol izolovaný vyzrážaním po oksylení inkubačného média na pH=2. Sediment po centrifugácii bol premytý vodným roztokom HCl a pH upravené na pH=8, aby sa rozpustil. Získaný roztok bol zlyofilizovaný.

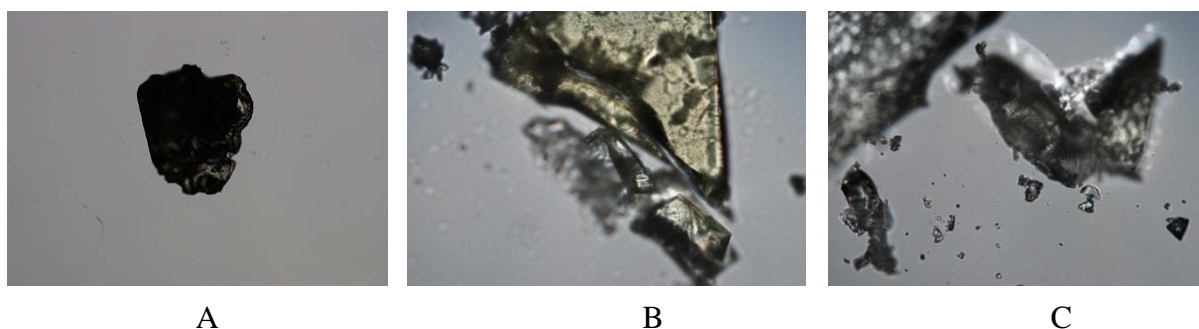
Purifikácia a Identifikácia:

Testované boli 2 postupy extrakcie. Extrakcia dichlórometánom neposkytla čistú zlúčeninu. Úspešná bola extrakcia zmesou organických rozpúšťadiel CHCl₃:methanol=2:1. Vzorky odobraté po 48h, 72h a 144h extrakciou poskytli následne tri vzorky, ktoré boli analyzované 1D a 2D NMR a IČ spektroskopiami. ¹H NMR spektrá týchto troch vzoriek mali rovnaký spektrálny obrazec (Obrázok 2)





Obrázok 3 Infráčervené ATR spektrá extraktov obsahujúcich lipoproteínový biosurfaktant z inkubačných médií po 48, 72 a 144 hodinách.



Obrázok 4 Obrázky biosurfaktantu- lipoproteínových kryštálov zachytené optickým mikroskopom. A – kryštál biosurfaktant lipoproteínu získaný extrakciou dichlorometánom z inkubačného média po 48h; B – po extrakcii 72h inkubačného média zmesou CHCl_3 : metanol = 2:1; C – po extrakcii s CHCl_3 : metanol = 2:1 z média po 144h inkubácie.

Literatúra:

- Ahern, H. E., Walsh, K.A., Hill, T.C.J., Moffett, B.F., 2007. Biogeosciences 4, 115-124.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., Delort, A-M., 2007a. FEMS Microbiology Ecology 59, 242-254.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., Delort, A-M., 2007b. Atmosph. Environment 41, 8253-8263.
- Amato, P., Demeer, F., Melaouhi, A., Martin-Biesse, A-S, Sancelme, M., Laj, P., Delort, A-M., 2007c. Atmosph. Chemistry and Physic 7, 4159-4169.
- Ariya, P. A., Amyot, M., 2004. Atmosph. Environment 38, 1231-1232.
- Ariya, P.A., Nepotchatykh, O., Ignatova, O., Amyot, M., 2002. Geophysical Res. Letters, 29, 2077-2080.
- Burrows, S.M., Elbert, W., Lawrence, M.G., Pöschl, U., 2009a. Atmosph. Chem.Phys.Discussion 9(3), 10777-10827.
- Delort A.-M., Vaitilingom M., Amato P., Sancelme M., Parazols M., Mailhot G., Laj P., Deguillaume. L. 2010, Atmosph. Res. 98, 249–260.

9. Deguillaume, L., Leriche, M., Amato, P., Ariya, P.A., Delort, A.-M., Pöschl, U., Chaumerliac, N., Bauer, H., Flossmann, A.I., Morris, C.E., 2008. *Biogeosciences* 5, 1073-1084.
10. Ekström, S., Noziere, B., Hultberg, M., Alsberg, T., Magner, J., Nilsson, E.D., Artaxo, P.A., 2009. *Biogeosciences discussion (Online)*, v. 6, p. 10035-10056.
11. Möhler, O., DeMott, P.J., Vali, G., Levin, Z., 2007. *Biogeosciences* 4, 1059-1071.
12. Morris, C.E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., 2004. *J. de Physique IV France* 121, 87-103.
13. Sattler, B., Puxbaum, H., Psenner, R., 2001. *Geophys.Res.Lett.* 28, 239–242.
14. Vaitilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Laj, P., Leriche, M., and Delort, A.-M. 2010 *Appl.Environ. Microbiology*, 76, 23-29, doi:10.1128/aem.01127-09.

Acknowledgements:

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.

Produkcia biosurfaktantu baktériou izolovanou z oblačnej vody *Pseudomonas sp.* 14B2.

Mária Matulová^a, Iveta Uhliariková^a, Martine Sancelme^{b,c}, Anne-Marie Delort^{b,c}

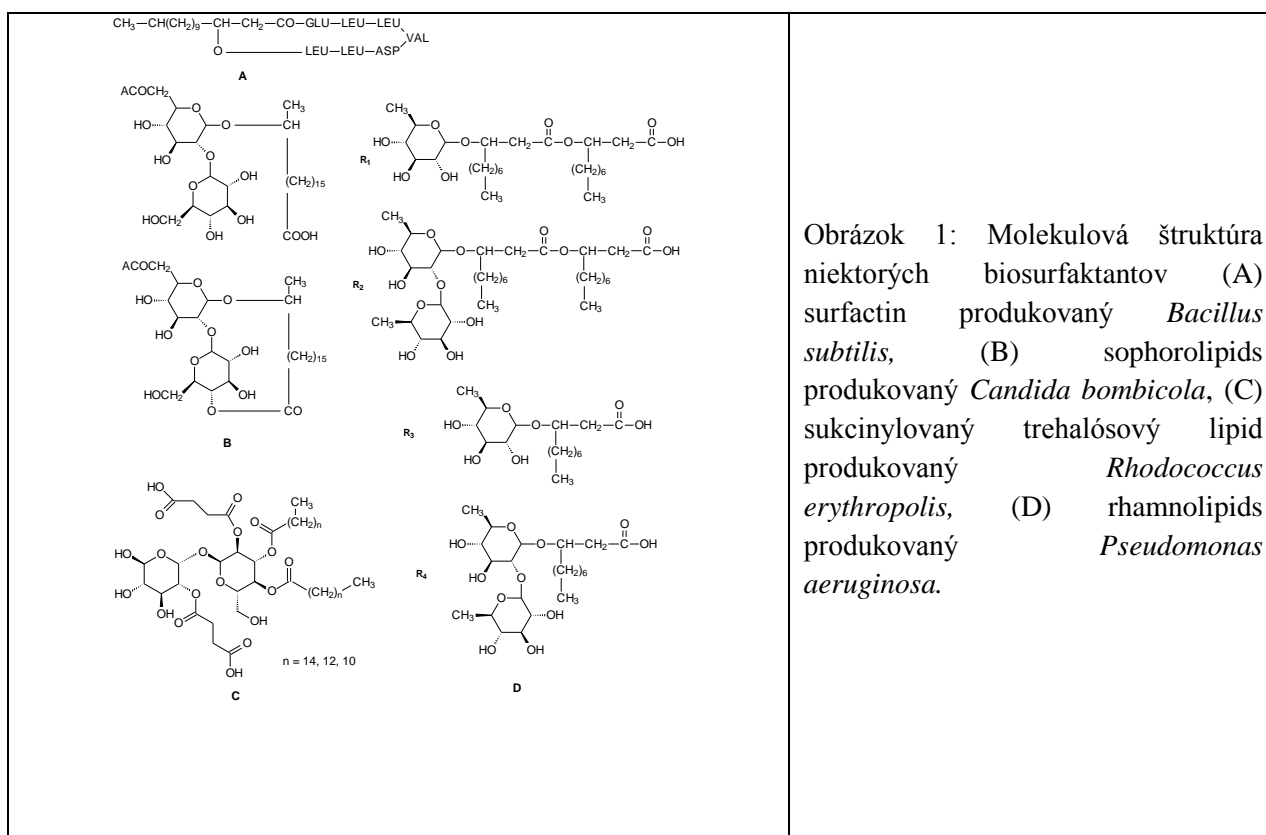
^a*Chemický ústav, Centrum glykomiky SAV, Bratislava, Slovensko*

^b*Clermont Université, Université Blaise Pascal, ICCF, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

^c*CNRS, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, F-63177 Aubière, France*

Baktérie prítomné v atmosfére sa môžu vyskytovať osamotene ale najčastejšie v zhlukoch mnohých bakteriálnych buniek, fragmentoch vegetácie a prachu, ku ktorým boli prichytené. Sú prenášané na

veľké vzdialenosti. V atmosfére sa zdržujú pomerne dlhú dobu, až niekoľko dní a týždňov. Dĺžka tohto obdobia závisí od mnohých faktorov, hlavne od veľkosti a schopnosti vytvárať kondenzačné jadrá oblakov. Vďaka ich schopnosti vytvárať na svojom povrchu polysacharidy a proteíny sú mikroorganizmy známe ako účinné aktivátory kondenzačných jadier oblakov. Môžu tvoriť podklad na vytvorenie kvapiek a ľahko sa pripojiť k oblaku. Mikrofyziku oblakov môžu ovplyvniť tak, že môžu pôsobiť ako jadrá ľadu IN - ice nuclei, alebo vďaka ich proteínovej membráne umožňujú tvorbu snehových kryštálov pri vyššej teplote ako je to v prípade homogénnej kryštalizácie snehových vločiek a tým sa priamo zúčastňujú tvorby snehu. Niektoré mikroorganizmy môžu slúžiť ako kondenzačné jadrá oblakov CCN - cloud condensation nuclei, pretože sú aerosólmi so špecifickými povrchovými vlastnosťami, ktoré majú pôvod v ich biologických štruktúrach. Môžu to byť extracelulárne polymérne látky (polysacharidy a ich konjugáty, alebo proteíny). Môžu produkovať biosurfaktanty - molekuly s hydrofilnou a hydrofóbnou časťou molekuly. Ich štruktúra môže byť rozmanitá od nízkomolekulových štruktúr až po polyméry. Obrázok 1 znázorňuje niektoré z nízkomolekulových štruktúr biosurfaktantov.



Obrázok 1: Molekulová štruktúra niektorých biosurfaktantov (A) surfactin produkovaný *Bacillus subtilis*, (B) sophorolipids produkovaný *Candida bombicola*, (C) sukcinylovaný trehalósový lipid produkovaný *Rhodococcus erythropolis*, (D) rhamnolipids produkovaný *Pseudomonas aeruginosa*.

Medzi 157 testovanými kmeňmi bolo identifikovaných mnoho mikroorganizmov schopných produkovať biosurfaktanty, hlavne bakteriálne druhy rodu *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Clavibacter*, *Microbacterium*, *Frigobacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia* a *Pantoea* a kvasinky rôznych kmeňov *Diozegia*, *Udeniomyces* a *Bullera*. Ako druhý bol na testovanie zvolený *Pseudomonas* sp. kmeň 14B2.

Produkcia a izolácia biosurfaktantu:

Inkubačné podmienky:

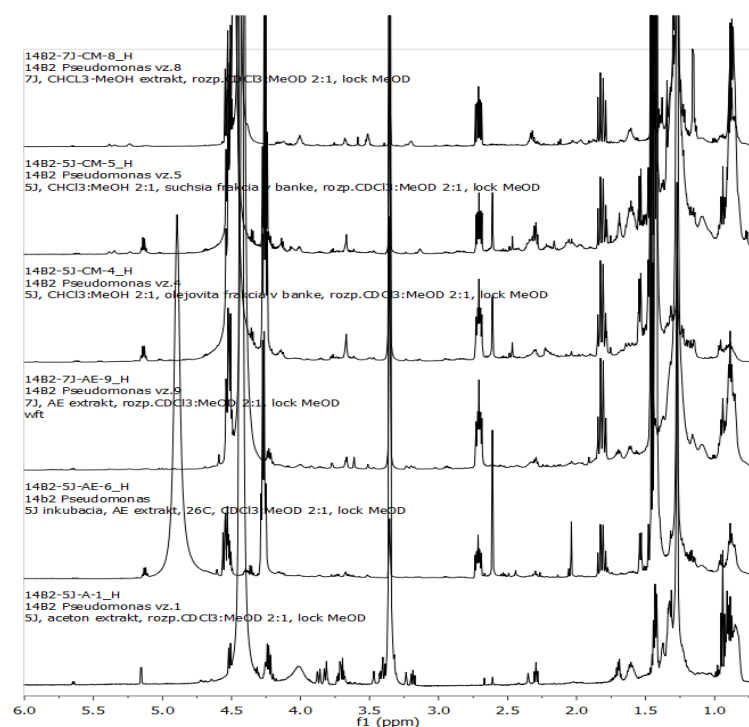
glukóza 20g/100mL, Na₂HPO₄ 6g/L, KH₂PO₄ 4g/L, MgSO₄.7H₂O 0.25g/L, NH₄NO₃ 4g/L, EDTA 0.1g/L, MnSO₄.H₂O 0.2g/L, FeSO₄.7H₂O 0.01g/L, CaCl₂ 0.01g/L, CoCl₂ 0.01g/L, ZnSO₄ 0.01g/L, CuSO₄ 0.001g/L, H₃BO₄ 0.001g/L, Na₂MoO₄ 0.001g/L. Inkubácia bola robená pri 27°C. Vzorky boli odobraté pri 48h, 120h a 168h (2, 5 and 7 dní) inkubácie.

Optimalizácia separácie biosurfaktantu:

2. Testované boli tri typy extrakčných postupov (Schéma 1):

- precipitácia acetónom
- extrakcia zmesou Chloroform:Metanol ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 2:1$) (CM)
- extrakcia Ethyl Acetatom (AE).

Každou extrakciou bola získané rozdielne frakcie. Ich zloženie bolo kontrolované ^1H NMR spektroskopiou. Obrázok 2 ukazuje spectra frakcií získaných extrakciou organickými rozpúšťadlami a vyzrážaním acetónom, v ktorých bol biosurfaktant prítomný v zmesi s inými zlúčeninami.



Obrázok 2 ^1H NMR spektrá frakcií po extrakcii organickými rozpúšťadlami alebo vyzrážaním.

Optimalizácia extrakcie biosurfaktantu z acetónového precipitátu

Zlyofilizovaný precipitát po 5 dňovej inkubácii *Pseudomonas* 14B2 po vyzrážaní acetónom bol zložený z amorfnej zložky a kryštalických produktov. Urobená bola následná extrakcia v mnohých krokoch kvôli separácii jednotlivých zložiek zmesi čo viedlo k získaniu rôznych frakcií (Schéma 1). Z každej z nich bolo zmerané ^1H NMR spektrum a oil spread test na zistenie prítomnosti biosurfaktantu. Amorfná zložka predstavovala nespotrebovanú glukózu a glycerol. Kryštalická obsahovala zmes organických molekúl.

Porovnanie NMR spektier ukázalo, že extrakcia Metyl Tert-Butyl Éterom (MTBE) a zmesou $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ boli najefektívnejšie. Preto precipitát po 7-mich dňoch inkubácie bol rozdelený na polovicu a jedna z nich bola extrahovaná s MTBE a druhá zmesou $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$.

PodĎakovanie:

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.

“Critical point” between the stem and the catalytic enzyme domain of core α 1,3 fucosyltransferase cloned from plant.

Peter Both^{1,2}, Lukas Sobczak³, Christelle Breton⁴, Iain B.H. Wilson³ and Ján Mucha²

²Department of Glycobiology, Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38, Bratislava, Slovakia; ³ Department für Chemie, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 Wien, Austria; ⁴Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, CNRS, BP53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

Abstract

Core α 1,3-fucosylation is a conserved feature of plant and invertebrate N-linked oligosaccharides with not yet known biological function. Core α 1,3-fucosyltransferases share some common features as the

motifs of the donor substrate binding subdomain and the general topology of these enzymes. In addition, plant core α 1,3-fucosyltransferases possess an unique C-terminal tail of 100-115 amino acid (aa) residues of unknown function. We present here a structure-function study of two core α 1,3-fucosyltransferases FucTA (*A. thaliana*) and FUT-1 (*Caenorhabditis elegans*) which catalyse the same reaction, but which have different acceptor substrate specificity. In this study we report results of protein truncations and peptide fusions to both N- and C- terminal parts of the enzymes. N-terminal truncations up to 78 aa residues of FUT-1 and 88 aa residues of FucTA did not abolish the enzyme activities, however removal of 95 aa residues resulted in complete inactivation of both FUT-1 and FucTA, suggesting location between the stem and the catalytic enzyme domain.

Key words: Arabidopsis/Caenorhabditis/fucosyltransferase

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.

Molecular Analysis of GNPTAB gene in Mucopolipidosis type II

Tappino B¹, Regis S¹, Baroni D¹, Pittis MG², Mucha J³, Corsolini F¹, Stroppiano M¹, Donati A⁴, Beccari T⁵, Dominissini S², Di Rocco M⁶ and Filocamo M¹

¹Laboratorio Diagnosi Pre-Postnatale Malattie Metaboliche and ⁶UO Pediatria II – IRCCS G. Gaslini, Genoa, Italy; ²Unità di Malattie Metaboliche, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italy; ³Institute of Chemistry, Centre for Glycomics, Bratislava, Slovakia, ⁴Metabolic Unit, Dept Pediatrics, Meyer Childrens' Hospital Florence, Italy; ⁵Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy

Mucopolipidosis II (MLII or I-cell disease) is an autosomal recessive metabolic disease with severe clinical and radiologic features. The disease onset is within the first months of life, and the clinical symptoms include congenital dislocation of the hip, thoracic deformities, hernia, and hyperplastic gums which are evident soon after birth. MLII results from defects in the multimeric GlcNAc-1-phosphotransferase (GNPTA) responsible for the initial step in the generation of the mannose 6-phosphate (M6P). M6P residues on oligosaccharides of newly synthesized lysosomal enzymes are important for the receptor-mediated transport to the endosomal/prelysosomal compartment. Failure of acquisition of this marker, therefore, leads to mistargeting of lysosomal enzymes and consequent accumulation of the respective substrates which appear as phase-dense intracytoplasmic inclusion bodies.

GlcNAc-1-phosphotransferase is a heterohexamer composed of two alpha, two beta and two gamma subunits. Mutations in alpha and beta subunits, encoded by the *GNPTAB* gene (chr.12), cause Mucopolipidosis type II, whereas mutations in gamma subunit, encoded by the *GNPTG* gene (chr.16) cause Mucopolipidosis type III.

GNPTAB gene contains 21 exons and spans a genomic region of approximately 80 kb; *GNPTAB* cDNA encodes a protein of 1,256 amino acids.

We now report on the molecular characterisation of a cohort of 38 MLII patients. The mutational profile consists of 22 different alleles, due to 20 diverse mutations, including two still unknown. The two previously reported mutations, p.L1168QfsX5 and p.R1205X, account for 57% of the mutant alleles. The remaining eighteen alleles are due to new mutations. Among these, twelve are insertions or deletions leading to frameshifts (p.N250KfsX5, p.K286KfsX6, p.S399AfsX10, p.I403YfsX5, p.D467IfsX33, p.V653VfsX3, p.P655PfsX2, p.M741RfsX2, p.K850NfsX10, p.S887KfsX33, p.V1148AfsX2, p.M1175PfsX32), three are nonsense (p.S252X, p.R375X, p.Q507X) and two are missense mutations (p.Q926P, p.L1001P). Finally, we identified an Alu-insertion mutation causing an exon skipping.

Our findings provide further evidence that mutations in the *GNPTAB* gene are responsible for Mucopolipidosis II. The molecular characterization of index case is very valuable for identifying individual carriers in at risk families. The availability of molecular test also corroborates the prenatal diagnosis procedures.

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.

Prvé skúsenosti a úskalia v diagnostike kongenitálnych porúch glykozylácie na Slovensku

Šalingová A.¹, Behúlová D.¹, Pakanová Z.², Mucha J.², Hansíková H.³

¹Centrum dedičných metabolických porúch, Detská fakultná nemocnica s poliklinikou Bratislava; ²Centrum excelentnosti pre Glykomiku, Chemický ústav SAV, Bratislava, Slovensko; ³Laboratórium pre štúdium mitochondriových porúch Klinika detského a dorastového lekárstva I.LF UK a VFN, Česká republika

Kongenitálne poruchy glykozylácie (CDG) sú rýchlo rastúcou skupinou autozómovo recesívne dedičných metabolických porúch charakterizovanou abnormálnou glykozyláciou glykoproteínov a glykolipidov. Doteraz je známych viac ako 50 porúch, klinické prejavy sa pohybujú od výrazného multisystémového ochorenia až po špecifické poškodenie orgánov alebo mierny klinický priebeh.

Klinický obraz CDG zahŕňa predovšetkým psychomotorickú retardáciu, neprospievanie, záchvaty, ataxiu, hypotóniu, atrofiu mozôčka, periférnu neuropatiu, cievne príhody, faciálnu dysmorfriu, strabizmus, invertované prsné bradavky, abnormálne ukládanie tuku, hypogonadizmus, hepatopatiu, koagulopatiu, život ohrozujúce kardiálne symptómy a iné. Cieľom práce bolo zavedenie a vyhodnotenie skriningovej metódy pre záchyt CDG, ktorá nebola zatiaľ v krajine dostupná.

Diagnostika CDG sa začína vyšetrením glykozylačného statusu sérového transferínu (Tf). K detekcii sialovaných izoforiem Tf sme použili metódu izoelektrickej fokusácie (IEF) s následnou imunofixáciou na PhastSystème™ (GE Healthcare, USA), ktorá je skriningovou metódou považovanou za zlatý štandard pre vyhľadávanie pacientov s CDG. Umožňuje detegovať poruchy N-glykozylácie proteínov a samotná analýza vyžaduje iba minimálny objem vzorky patientského séra.

V rámci skriningu CDG sme vyšetřili od septembra 2011 do februára 2012 spolu 183 pacientov poukázaných z metabolických ambulancií a jednotlivých kliník Detskej fakultnej nemocnice a selektovaných na základe klinických príznakov. U 2 pacientov (porucha N-glykozylácie II. typu a kombinovaná porucha N- a O-glykozylácie) boli potvrdené pozitívne IEF obrázky. Títo pacienti boli už identifikovaní v zahraničí v priebehu posledných rokov.

Zavedená metóda IEF Tf je najefektívnejším skriningovým testom pre vyhľadávanie pacientov s CDG a ponúka nové možnosti diagnostiky týchto zriedkavých ochorení. Poruchy sú v našej krajine výrazne poddiagnostikované z viacerých dôvodov: neuspokojivé lekárske povedomie, vysoká mortalita v prvom roku života a nedostupnosť štandardného špecifického laboratórneho testu v minulosti. O indikácii na vyšetřenie CDG by sa malo uvažovať najmä u každého pacienta s nevysvetleným multisystémovým poškodením.

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.

MS ANALYSIS IN DIAGNOSTICS OF TETRASACCHARIDE IN POMPE DISEASE

Ján Mucha, ¹Zuzana Pákanová¹, Mária Matulová¹, Darina Behúlová², Anna Šalingová², Anna Hlavatá³,

¹Institute of Chemistry, Center of Excellence for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava

²Centre of Inherited Metabolic Diseases, Department of Laboratory Medicine, Children's Faculty Hospital, Limbová 1, 83340 Bratislava

³2nd Children's Clinic, Faculty of Medicine of Comenius University and Children's Faculty Hospital, Limbová 1, 83340 Bratislava, zuzana.pakanova@savba.sk

This study deals with a comparison of different diagnostic opportunities of Pompe disease of newborn patient, including high-tech spectral approaches, with causistics description. Pompe disease is caused by deficiency of lysosomal acid α -glucosidase, which participates in metabolism of glycogen degradation in tissues. Wide variety of clinical symptoms classifies this lysosomal storage disorder as difficult to diagnose. Laboratory tests became a necessary part of the correct determination of diagnosis.

Specific glucose tetrasaccharide $\text{Glc}\alpha(1\rightarrow6)\text{Glc}\alpha(1\rightarrow4)\text{Glc}\alpha(1\rightarrow4)\text{Glc}$, accumulated in significantly higher concentrations in patient's urine, is used as a screening biomarker. Besides a traditional method using high performance thin layer chromatography (HPTLC), urine oligosaccharides can be detected also by means of new diagnostic tools: MALDI TOF/TOF mass spectrometry and ^1H NMR spectroscopy. For successful treatment of Pompe disease the early therapy onset is necessary. Analysis of patient's urine by mass spectrometry and NMR spectroscopy abbreviates the time needed for results acquisition as well as it decreases the cost of consumables. Both techniques have been shown very effective in diagnostic of inherited metabolic diseases due to a high specificity, reproducibility and sensitivity. Moreover, they allow a monitoring of the patient during the therapy.

Acknowledgement:

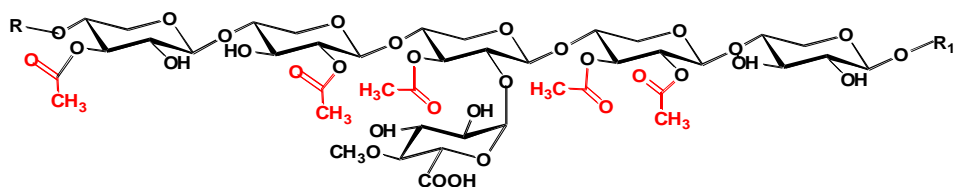
This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Positional specificity of the *Orpinomyces* sp. CE6 acetylxylan esterase on natural polysaccharide

Iveta Uhliariková, Mária Vršanská, Peter Biely

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

Hardwood glucuronoxylans are partially acetylated heteropolysaccharides. Xylopyranosyl (Xylp) residues linked β -1,4-glycosidically form the polysaccharide main chain and this is substituted with α -1,2-linked 4-O-methyl-D-glucuronic acid (MeGlcA) residues. In native state, that is in plant cell walls, the polysaccharide is partially acetylated. More than a half of Xylp residues of the main chain is monoacetylated at position 2 or 3, or 2,3-di-O-acetylated. 3-O-acetylation is to a high degree observed on Xylp residues substituted with MeGlcA.



Acetylxylan esterase (AcXE) from *Orpinomyces* sp. belonging to carbohydrate esterase family 6 efficiently deacetylates birch acetyl glucuronoxylan. The monitoring of the deacetylation by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy showed that the enzyme targets are all acetyl groups of the polysaccharide except of the 3-O-acetyl group on xylopyranosyl residues α -1,2-substituted with 4-O-methyl-D-glucuronic acid. The enzyme attacks also the di-O-acetylated xylopyranosyl residues. The position 2 appears to be deacetylated faster than position 3 in both mono- and di-O-acetylated residues.

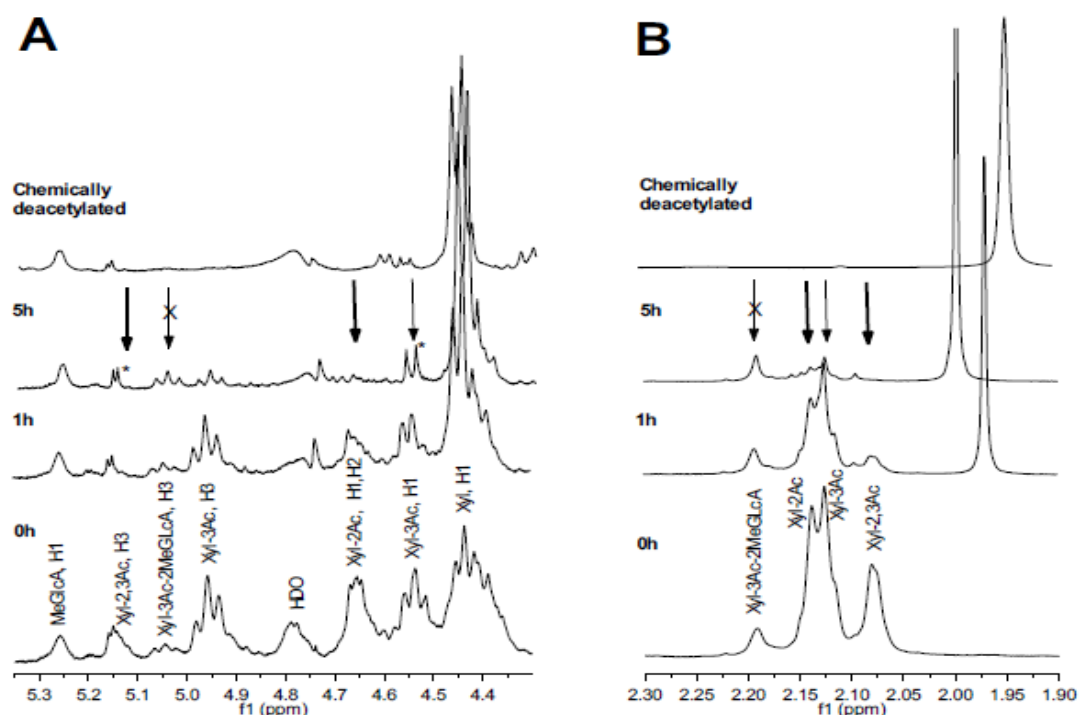


Fig.1 Monitoring of the action of *Orpinomyces* sp. CE6 AcXE on birch acetylglucuronoxylan by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. The signal intensity changes of acetylated Xylp residues in the anomeric region of the spectrum are shown in Part A, intensity changes of the methyl protons of acetyl groups are in Part B. The most rapidly decreasing signals are marked with thick arrows, slower decreasing signals with thinner arrows. Signals of protons not influenced by the enzymes are marked with crossed arrows. The spectrum of the chemically deacetylated polysaccharide is shown on the top of Part A, B. The following designations are used: Xyl, non-acetylated Xylp; Xyl-3Ac, 3-O-acetylated Xylp; Xyl-2Ac, 2-O-acetylated Xylp; Xyl-2,3Ac, 2,3-di-O-acetylated Xylp; Xyl-3Ac-2MeGlcA, 3-O-acetylated Xylp 2-O-linked with MeGlcA. α Xylred at 5.15 ppm and β Xylred at 4.55 ppm are marked by asterisk.

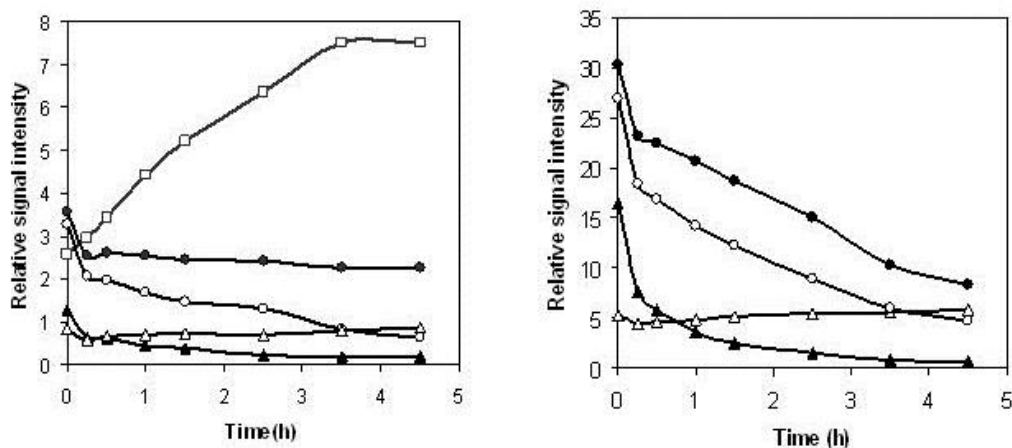


Fig.2. Time course of the decrease in intensity of signals of acetylated Xylp residues in the anomeric region of the spectrum (Part A) and signals of the methyl protons of acetyl group (Part B) during incubation of birch acetyl glucuronoxylan with *Orpinomces sp.* AcXE.

Symbols of xylopyranosyl residue: □- Xyl-isol, ●- 3-O-acetyl , ○-2-O-acetyl, ▲- 2,3-di-O-acetyl, △-3-O-acetyl-2-O-MeGlcA.

The $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy approach to study positional and substrate specificity of acetylxyylan esterases outlined in this work appears to be a simple way to characterize catalytic properties of plant polysaccharide deacetylating enzymes on natural substrates. The detail knowledge of the mode of action of polysaccharide deacetylating enzymes is important in view of the development of efficient bioconversion of plant materials that did not undergo alkaline pretreatment leading to hydrolysis of ester 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.

Účinky agonistu PPAR- γ receptorov pioglidazónu na redox-senzitívnu bunkovú signalizáciu u mladých spontánne hypertenzných potkanov

Úvod

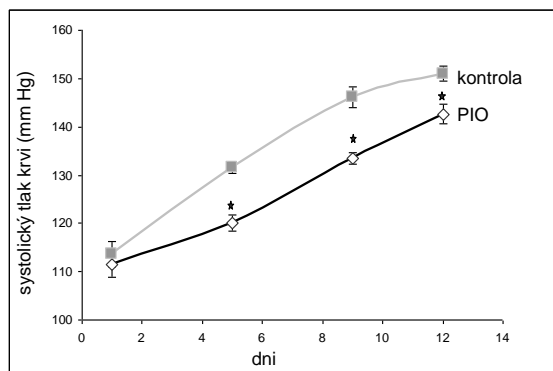
Hypertenzia je vážnym zdravotným problémom a je rizikovým faktorom poškodenia viacerých orgánov a orgánových systémov (mozog, obličky, kardiovaskulárny systém). Medzi najzávažnejšie dôsledky hypertenzie patrí trvalé poškodenie kardiovaskulárneho systému. Rozvoj hypertenzie a endotelovej dysfunkcie je multifaktoriálny proces a existuje viacero regulačných systémov, ktoré sú zahrnuté v patogenéze ich rozvoja. Nedávne štúdie poukazujú na potenciálnu úlohu nukleárných receptorov PPAR („peroxisome proliferator-activated receptors“) v týchto procesoch. Aktiváciou PPAR možno ovplyvňovať nielen lipidový profil a inzulínovú rezistenciu, ale aj priebeh hypertenzie resp. kontraktilitu a relaxáciu ciev u experimentálnych zvierat s hypertenziou.

Metódy

V práci boli sledované účinky agonistu PPAR-gama receptorov, pioglidazónu (PIO), na reguláciu krvného tlaku u mladých spontánne hypertenzných potkanov (SHR) a skúmané taktiež molekulárne mechanizmy zahrnuté v účinkoch PIO. Ako experimentálny model boli v štúdiu použité 5 týždňov starí samci SHR, ktorým bol v dávke 10 mg/kg/deň podávaný počas dvoch týždňov PIO. Kontrolným potkanom bol podávaný fyziologický roztok. Pred a v priebehu podávania PIO (fyziologického roztoku) bola u zvierat sledovaná telesná hmotnosť, denný príjem potravy a vody. Systolický tlak krvi bol meraný na chvostovej artérii potkanov z oboch experimentálnych skupín a na meranie tohto parametra bola použitá metóda neinvazívnej pletyzmografie. Merania systolického tlaku krvi boli uskutočnené počas aplikácie PIO (1., 5., 9. a 12. deň). Na konci experimentu boli odobraté vzorky tkaniva srdca (ľavá komora - LK) a mozgu (mozgový kmeň - MK). Ďalšie spracovanie vzoriek záviselo od špecifickej analýzy. Celkové aktivity superoxididismutázy (SOD) boli analyzované s využitím špecifického kitu a aktivity syntázy oxidu dusnatého (NOS) meraním konverzie rádioaktívneho ³H-L-Arginínu na ³H-L-Citrulín. Na sledovanie hladín proteínov boli využívané imunochemické analýzy s využitím špecifických protilátok, zmeny v expresii génov boli sledované qPCR.

Výsledky

Bolo zistené, že u mladých SHR dochádza medzi piatym až siedmym týždňom života k významnému zvýšeniu systolického tlaku krvi zo 113 mmHg na 151 mmHg, pričom podávanie PIO významne znižovalo tento nárast krvného tlaku (Obrázok 1). Podávanie PIO nemalo významný vplyv na niektoré ďalšie fyziologické (biometrické) parametre, ako je hmotnosť tela, hmotnosť srdca a jeho komôr.



Obrázok 1. Vplyv PIO na zmeny systolického krvného tlaku u mladých SHR.

Pri skúmaní potenciálnych mechanizmov zahrnutých v účinkoch PIO bol v ľavej komore srdca a mozgovom kmeni sledovaný vplyv PIO na PPAR-gama, enzýmy zahrnuté v regulácii hladín radikálov (SOD, NOS) a zložky vnútrobunkových signalizačných dráh (Akt kináza, beta-atenín). Bolo zistené, že kým v mozgovom kmeni dochádza účinkom PIO k významnému zvýšeniu expresie mRNA pre

PPAR-gama, v ľavej komore srdca sa účinky PIO neprejavujú. Boli pozorované taktiež rozdielne účinky PIO na bunkovú signalizáciu a enzýmy zahrnuté v regulácii tvorby radikálov (SOD, NOS) na úrovni ľavej komory srdca a mozgového kmeňa. V MK bola zvýšená expresia génu PPAR-gama sprevádzaná zvýšenou expresiou superoxiddismutázy-2 (SOD2) a potlačením expresie SOD1. Celkové aktivity SOD ako aj NOS neboli účinkom PIO v mozgovom kmeni významne zmenené. V ĽK, na rozdiel od MK, boli účinky PIO spojené so zvýšením aktivity SOD, ako dôležitej súčasti antioxidantnej odpovede bunky. Pri štúdiu mechanizmov potenciálne zahrnutých v účinkoch PIO bolo zistené, že v MK dochádza u zvierat, ktorým bol podávaný PIO, k zvýšeniu proteínových hladín Akt kinázy, enzýmu, ktorý je súčasťou PI3K/Akt kinázovej signálnej dráhy. Tkanivovo rozdielne účinky po aplikácii PIO boli pozorované v prípade beta-katenínu. Kým v ĽK došlo k zvyšovaniu proteínových hladín, v MK bol pozorovaný opačný účinok PIO a hladiny tohoto proteínu výrazne poklesli.

Záver

Získané výsledky poukazujú na to, že účinky PIO na znižovanie (spomaľovanie) nárastu tlaku krvi u mladých SHR sú spojené s ovplyvňovaním enzýmov zahrnutých v regulácii hladín radikálov (SOD), ako aj vnútrobunkových signalizačných dráh, ktorých súčasťou sú Akt kináza a beta-katenín.

PodĎakovanie:

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."

Vplyv ionizujúceho žiarenia na myokardiálne a cirkulujúce matrixové metaloproteinázy

*Miroslav Barančík, Mária Fogarassyová, Ludmila Okruhlicová, Monika Barteková, Ján Slezák
Ústav pre výskum srdca SAV, Bratislava, Slovenská republika*

Úvod

Aj napriek využívaniu moderných a dobre definovaných protokolov, vykazuje terapia s využitím ionizujúceho žiarenia nežiadúce účinky na normálne tkanivá. Pri ožarovaní onkologických pacientov v oblasti hrudníka a mediastína je významným nežiadúcim účinkom, ktorý môže viesť k zvýšenej morbidite a mortalite, poškodenie srdca a ciev vyvolané účinkom žiarenia. Cieľom štúdie bolo skúmať molekulárne markery a mechanizmy radiačného poškodenia zdravého tkaniva, ktoré by mohli priniesť relevantné údaje pre hľadanie nových preventívno-ochranných intervenčných opatrení.

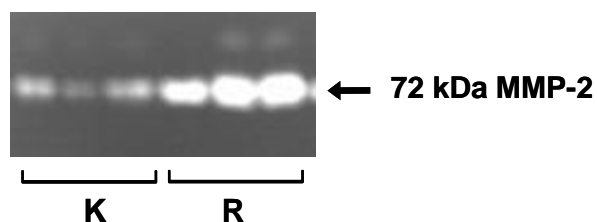
Metódy

Ako experimentálny model boli v štúdiách použité samce potkanov kmeňa Wistar. Potkany vo veku 12 týždňov boli rozdelené do kontrolnej skupiny zvierat a zvierat vystavených účinkom ionizujúceho žiarenia. V skupine zvierat vystavených účinkom radiácie bola potkanom aplikovaná jedna dávka ionizujúceho žiarenia o intenzite 25 Gy, a to v oblasti mediastína a pľúc. Po vystavení ionizujúcemu žiareniu boli potkany ponechané nažive ešte 6 týždňov, a po tomto časovom úseku boli odobraté vzorky tkaniva pravej a ľavej komory srdca a plazmy. S využitím transmisnej elektrónovej mikroskopie boli na úrovni tkaniva ľavej komory srdca sledované štrukturálne zmeny vyvolané účinkami ionizujúceho žiarenia. Sledované boli tiež subchronické účinky žiarenia na matrixové metaloproteinázy (MMP), a to v komorách srdca a v cirkulácii (vzorky plazmy). Proteínové hladiny MMP-2 boli stanovované imunochemickou Western blot analýzou (s využitím špecifickej protilátky), na meranie aktivít bola využitá technika zymografie (so želatínou ako substrátom).

Výsledky a diskusia

Analýzy ultraštruktúry elektrónovou mikroskopiou ukázali, že účinkami radiácie dochádza v tkanive ľavej komory srdca k miernym subcelulárnym zmenám na úrovni kardiomyocytov. Pri štúdiu zmien na úrovni extracelulárnej matrix (ECM) bolo zistené, že ionizujúce žiarenie malo za následok heterogénnu štrukturálnu disorganizáciu ECM, akumuláciu denzného materiálu a zvýšenie obsahu proliferujúcich fibroblastov v ECM. Tieto zmeny neboli pozorované u kontrolných (neožiarených) potkanov. Zo štúdia subštruktúry tiež vyplynulo, že skoré zmeny po účinku ionizujúceho žiarenia môžu byť spojené s degeneráciou endotelových buniek, ale súčasne i s aktiváciou/proliferáciou endotelu a angiogenezou.

Účinky radiácie na proteínové hladiny MMP-2 boli sledované s využitím špecifickej protilátky interagujúcej s 63 aj 72 kDa formou tohto enzýmu. Bolo zistené, že v pravej komore srdca potkana nedochádza účinkom ionizujúceho žiarenia k významným zmenám v proteínových hladinách 63 kDa MMP-2. Na druhej strane, po radiácii boli v pravej komore srdca významne znížené hladiny 72 kDa MMP-2. V súlade s týmto zistením bolo v pravej komore srdca pozorované aj významné zníženie aktivity 72 kDa MMP-2. Aktivácia tejto formy MMP-2 korešponduje s konformačnými zmenami proteínu, ktoré môžu byť vyvolané oxidatívnym stresom. V ľavej komore srdca potkana nemala radiácia vplyv na proteínové hladiny MMP-2, významným spôsobom však indukovala zvýšenie aktivity 73 kDa MMP-2. Tieto výsledky poukazujú na to, že ionizujúce žiarenie aplikované do oblasti mediastína má rozdielne účinky na MMP-2 v pravej a ľavej komore srdca. U potkanov vystavených účinkom žiarenia boli pozorované taktiež významné zmeny v aktivitách MMP uvoľnených do cirkulácie. Zistili sme, že v sére zvierat ovplyvnených účinkami ionizujúceho žiarenia dochádza k významnému zvýšeniu aktivít 72 kDa formy MMP-2 (Obrázok 1).



Obrázok 1. Vplyv ionizujúceho žiarenia na aktivity MMP-2 v sére.

K – kontrolné potkany, R – potkany vystavené účinkom ionizujúceho žiarenia.

Záver

Výsledky dokumentujú tkanivovo špecifické zmeny v aktivácii srdcových MMP-2 šesť týždňov po vystavení potkanov účinkom ionizujúceho žiarenia v oblasti mediastína. V rámci ľavej komory srdca bolo zistené, že tieto zmeny v aktivácii MMP-2 sú spojené s ultraštruktúrnymi zmenami na úrovni extracelulárnej matrix. Získané výsledky poukazujú na zapojenie matrixových metaloproteináz, hlavne 72-kDa MMP-2, do procesov vyvolaných subchronickými účinkami ionizujúceho žiarenia a javí sa tiež, že pozorované zmeny v aktivitách cirkulujúcej MMP-2 po aplikácii DOX súvisia so zistenými zvýšenými hladinami superoxidu a zvýšenou produkciou oxidu dusnatého (v dôsledku pozorovanej indukcie NOS2). Stimulačné účinky radiácie na cirkulujúce MMP-2 poukazujú na to, že tento enzým môže mať priamy súvis s vývinom účinkov vyvolaných ionizujúcim žiarením a môže byť dôležitý pre vývin patologických zmien vyvolaných v dôsledku účinkov ionizujúceho žiarenia aplikovaného do oblasti mediastína.

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."

Kvercetín zlepšuje postischemickú obnovu hemodynamických parametrov izolovaných srdce u normálnych, juvenilných, ako aj doxorubicínom liečených potkanov.

*Monika Barteková, Miroslav Barančík
Ústav pre výskum srdca SAV, Bratislava, Slovenská Republika*

Úvod

Kvercetín je prírodný bioflavonoid, u ktorého boli zistené viaceré pozitívne účinky na kardiovaskulárny systém. Hlavnými zdrojmi kvercetínu v ľudskej strave sú jablká, cibuľa, hrozno, čaj, ale napríklad aj červené víno. Bolo zistené, že kvercetín znižuje krvný tlak u hypertenzných jedincov a má tiež silnú schopnosť ochraňovať orgány pred ischemicko-reperfúznym poškodením. Tento efekt kvercetínu bol zistený na viacerých experimentálnych modeloch ischemie a reperfúzie, napríklad pečene, obličiek či mozgu. Je však len veľmi málo známe o tom, ako pôsobí kvercetín na ischemicko-reperfúzne poškodenie srdca. Preto cieľom našej súčasnej práce bolo zistiť na modeli izolovaného perfundovaného srdca potkana, či má kvercetín schopnosť chrániť srdce pred ischemicko-reperfúznym poškodením.

Mnohé liečivá, ale aj prírodné látky majú rozdielny vplyv, najmä čo sa týka sily účinku, na dospelý a na mladý, ešte sa rozvíjajúci organizmus. My sme napríklad v predchádzajúcich prácach zistili, že kvercetín môže zabrániť rozvoju hypertenzie u kmeňa spontánne hypertenzných potkanov, keď je podávaný v čase dospievania jedinca. Preto bolo ďalším cieľom našej súčasnej práce zistiť, či má kvercetín rozdielny vplyv na odolnosť srdca voči ischemii u juvenilných ako u dospelých potkanov.

Doxorubicín je antracyklínové antibiotikum, ktoré je často úspešne používané v liečbe malígnych ochorení. Má však viaceré negatívne účinky, medzi ktoré patrí aj možný vznik vážnej kardiomyopatie, v odbornej literatúre označovanej ako doxorubicínová (alebo všeobecnejšie antracyklínová) kardiomyopatia. K tejto patológii pritom spravidla dochádza niekoľko týždňov, mesiacov alebo aj rokov po ukončení liečby doxorubicínom. Preto bolo ďalším cieľom našej práce zistiť, či môže kvercetín ovplyvniť odolnosť srdca potkanov liečených doxorubicínom voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu.

Metódy

V práci sme použili samce potkanov kmeňa Wistar, z ktorých boli v hlbokoj anestézii izolované srdcia a následne perfundované na špeciálnej perfúznej aparatúre podľa Langendorffovej metódy. Srdcia boli po úvodnej 30-minútovej stabilizačnej perfúzii vystavené globálnej 30-minútovej ischemii a následnej 40-minútovej reperfúzii. Hemodynamické parametre srdca boli sledované na konci stabilizácie tesne pred ischemiou a potom počas celej reperfúzie v 5-minútových intervaloch. Z hemodynamických parametrov sme hodnotili systolický a diastolický tlak, tlakovú amplitúdu (LVDP), maximálne rýchlosti nárastu a poklesu tlaku v ľavej komore ($+dP/dt_{max}$, $-dP/dt_{max}$), ako aj hodnoty koronárneho prietoku a frekvencie srdca. V prvej fáze experimentu sme použili srdcia z normálnych zdravých potkanov a sledovali sme účinok kvercetínu na ich postischemickú obnovu, pričom sme kvercetín podávali srdciam priamo v perfúznom roztoku. Dávka kvercetínu bola $15\mu\text{mol/l}$ a bola podávaná buď počas stabilizácie pred ischemiou (posledných 15 minút stabilizácie, skupina Q1) alebo počas celej reperfúzie (skupina Q2). V druhej fáze experimentu sme podávali kvercetín priamo živým zvieratám, ešte pred ich usmrtením a izoláciou srdca, a to potkanom dospelým ako aj juvenilným (4-týždňové na začiatku podávania kvercetínu). Dávka kvercetínu bola 20mg/kg/deň a bola zvieratám podávaná po dobu 4 týždňov. V tretej fáze experimentu sme podávali kvercetín v rovnakej dávke ako bolo uvedené vyššie (20mg/kg/deň) zvieratám, ktoré boli súčasne liečené doxorubicínom (kumulatívna dávka 15 mg/kg , rozdelená do 7 i.p injekcií podaných počas 21 dní). Kvercetín sme zvieratám podávali súčasne s doxorubicínom a ešte ďalšie tri týždne po ukončení podávania doxorubicínu (spolu 6 týždňov). Zvieratá boli ponechané nažive ešte ďalších 5 týždňov a následne boli ich srdcia perfundované podľa Langendorffovej metódy a vystavené ischemii a reperfúzii.

Výsledky

Výsledky našej práce ukázali, že kvercetín významne zlepšuje postischemickú obnovu srdca u dospelých aj juvenilných potkanov, a tiež u potkanov súčasne liečených doxorubicínom. Toto zlepšenie sa prejavilo najmä zlepšením postischemickej obnovy tlakových parametrov srdca (systolický tlak, LVDP), ako aj parametrov kontraktility ($+dP/dt_{max}$, $-dP/dt_{max}$). Kvercetín podávaný priamo do perfúzneho roztoku

tiež dokázal znížiť nárast diastolického tlaku po ischémii a tým zmierniť nástup diastolickej dysfunkcie srdca. Ukázalo sa, že kvercetín má silnejší účinok u srdca juvenilných potkanov oproti účinku na srdcia dospelých jedincov. Na druhej strane sa ukázalo, že účinok kvercetínu, najmä čo sa týka sily jeho účinku, výrazne závisí na jeho dávkovaní, ako aj na spôsobe a dĺžke trvania jeho podávania a veku jedinca, ktorému je podávaný.

Záver

Výsledky našej práce možno zhrnúť do konštatovania, že prírodný polyfenol kvercetín má pozitívne účinky na odolnosť myokardu voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu. Tieto zistenia sú v súlade so zisteniami o iných pozitívnych účinkoch kvercetínu na organizmus a osobitne na kardiovaskulárny systém..

PodĎakovanie:

Táto práca 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.

pH optimum transglykozyláz Phr1 a Phr2 bunkovej steny kvasiniek

Kováčová K¹ a Farkaš V.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovakia, kristina.kovacova@savba.sk

Bunková stena kvasiniek má zásadnú funkciu v interakcii hostiteľ-patogén. Formovanie bunkovej stebý kvasiniek je závislé na koordinácii aktivity niekoľkých extracelulárnych enzýmov, ktoré spájajú

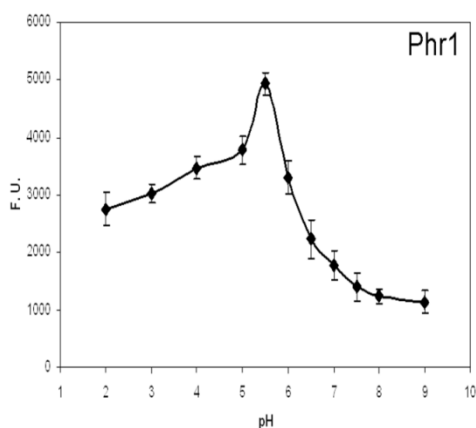
jednotlivé zložky bunkovej steny a remodelujú bunkovú stenu. V prípade *Candidy albicans* sú týmito enzýmami Phr1 a Phr2 proteíny, ktoré patria do rodiny glykozylových hydroláz GH72 a majú β -(1,3)-glukanozyl transferázovú aktivitu. pH-regulované enzýmy (Phr) sú dôležité pri spájaní molekuly β -(1,3)-glukánu s ďalšou molekulou β -(1,3)-glukánu *in vivo*, dochádza k homotransglykozyláci. Gény *PHR1* a *PHR2* sú rôzne regulované prostredníctvom extracelulárneho pH. *PHR1* je exprimovaný pri pH 5.5 alebo vyššom, zatiaľ čo expresia *PHR2* je regulovaná opačne, teda pri pH 5,5 a nižšom. Delícia týchto dvoch génov vedie k pH-závislým defektom v morfogéneze a virulencii kvasiniek (1). Cieľom tejto práce bolo stanoviť pH optimum transglykozylačnej aktivity transglykozyláz bunkovej steny kvasiniek Phr1p a Phr2p, ktoré boli produkované rekombinantnou kvasinkou *Picchia pastoris*, fluorescenčnou *in vitro* metódou.

Metódy

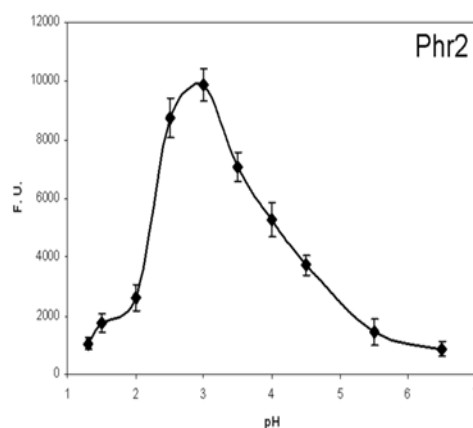
pH optimum rekombinantných proteínov Phr1 a Phr2 exprimovaných v *Picchia pastoris* bolo stanovené fluorescenčnou *in vitro* metódou. Ako akceptor bola použitá laminarihexaóza značená sulforodamínom (L6-SR) a laminarín ako donor. Inkubačná zmes obsahovala 0,25% laminarín, 30 μ M L6-SR, 10 μ g proteínu Phr1 alebo 10 μ g Phr2 a 50 mM citrátový pufr, pH 1,2 - 9 pre Phr1 a 1,2 - 6,6 pre Phr2 v celkovom objeme 100 μ L. Táto zmes bola inkubovaná 4h pri 37°C. K 20 μ L alikvótom inkubačnej zmesi bolo pridaných 20 μ L 40% (v/v) kyseliny mravčej na zastavenie reakcie. Zo zastavenej zmesi bolo pipetovaných v quintupletoch 5 μ L na celulózovú papierovú (Whatman 3MM) matricu. Papierová matrica bola vysušená a premývaná 16h s 66% (v/v) etanolom s obsahom 5% (v/v) kyseliny mravčej. Nezreagovaná L6-SR sa odstránila premývaním, kým vysokomolekulový produkt zložený z laminarínu s akceptorom L6-SR zostal ukotvený na matricu. Matrica bola vysušená a umiestnená medzi dve sklenené tabuľky a fluorescencia bola meraná pomocou Synergy HT-1 ELISA microplate reader s fluorescenčným detektorom a filtrami s excitačnou vlnovou dĺžkou 530 nm a emisnou 575 nm.

Výsledky a diskusia

Poznať pH optimum transglykozylačnej aktivity proteínov Phr1 a Phr2 je dôležité z hľadiska ich ďalšieho skúmania ako potenciálnych terčov nových antimykotík. Výsledky založené na relatívnej rýchlosti transglykozylácie pri rôznom pH citrátového pufru ukazujú, že pH optimum proteínu Phr1 je 5,6 (obr. 1) a pH 3 pre proteín Phr2 (obr. 2). Tieto výsledky taktiež ukazujú, že enzýmy Phr1 and Phr2 sú schopné transglykozylačného prenosu v širšom rozsahu pH.



Obr. 1 pH optimum Phr1p



Obr. 2 pH optimum Phr2p

Použitá literatúra

1. Calderon, J., Zavrel, M., Ragni, E., Fonzi, E. A., Rupp, S. and Popolo, L. (2010) PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion, *Microbiology*, 156: 2484-2494

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.

Teplotné optimum transglykozyláz Phr1 a Phr2 bunkovej steny kvasiniek

Kováčová K.I a Farkaš V.I

I Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovakia, kristina.kovacova@savba.sk

Bunková stena kvasiniek má zásadnú funkciu v interakcii hostiteľ-patogén. Formovanie bunkovej stebý kvasiniek je závislé na koordinácii aktivity niekoľkých extracelulárnych enzýmov, ktoré spájajú jednotlivé zložky bunkovej steny a remodelujú bunkovú stenu. V prípade *Candida albicans* sú týmito enzýmami Phr1 a Phr2 proteíny, ktoré patria do rodiny glykozylových hydroláz GH72 a majú β -(1,3)-glukanozyl transferázovú aktivitu. pH-regulované enzýmy (Phr) sú dôležité pri spájaní molekuly β -(1,3)-glukánu s ďalšou molekulou β -(1,3)-glukánu *in vivo*, dochádza k homotransglykozylácii. Gény *PHR1* a *PHR2* sú rôzne regulované prostredníctvom extracelulárneho pH. *PHR1* je exprimovaný pri pH 5.5 alebo vyššom, zatiaľ čo expresia *PHR2* je regulovaná opačne, teda pri pH 5,5 a nižšom. Delécia týchto dvoch génov vedie k pH-závislým defektom v morfogéneze a virulencii kvasiniek (1). Cieľom tejto práce bolo stanoviť teplotné optimum transglykozylačnej aktivity transglykozyláz bunkovej steny kvasiniek Phr1p a Phr2p, ktoré boli produkované rekombinantnou kvasinkou *Picchia pastoris*, fluorescenčnou *in vitro* metódou.

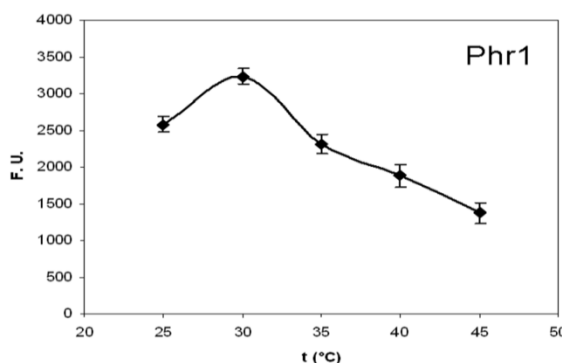
Metódy

pH optimum rekombinantných proteínov Phr1 a Phr2 exprimovaných v *Picchia pastoris* bolo stanovené fluorescenčnou *in vitro* metódou. Ako akceptor bola použitá laminarihexaóza značená sulforodamínom (L6-SR) a laminarín ako donor. Inkubačná zmes obsahovala 0,25% laminarín, 30 μ M L6-SR, 10 μ g proteínu Phr1 alebo 10 μ g Phr2 a 50 mM citrátový pufo, pH 5,6 pre Phr1 a pH 3 pre Phr2 v celkovom objeme 100 μ L. Táto zmes bola inkubovaná 2h pri 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C a 45°C. K 20 μ L alikvótom inkubačnej zmesi bolo pridaných 20 μ L 40% (v/v) kyseliny mravčej na zastavenie reakcie. Zo zastavenej zmesi bolo pipetovaných v quintupletoch 5 μ L na celulóзовú papierovú (Whatman 3MM) matricu. Papierová matrica bola vysušená a premývaná 16h s 66% (v/v) etanolom s obsahom 5% (v/v) kyseliny mravčej. Nezreagovaná L6-SR sa odstránila premývaním, kým vysokomolekulový produkt zložený z laminarínu s akceptorom L6-SR zostal ukotvený na matricu. Matrica bola vysušená a umiestnená medzi dve sklenené tabuľky a fluorescencia bola meraná pomocou Synergy HT-1 ELISA microplate reader s fluorescenčným detektorom a filtrami s excitačnou vlnovou dĺžkou 530 nm a emisnou 575 nm.

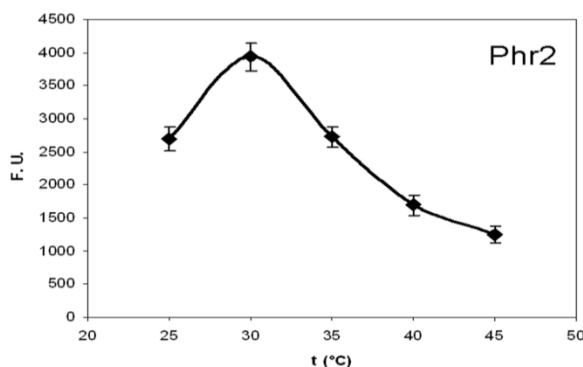
Výsledky a diskusia

Poznať teplotné optimum transglykozylačnej aktivity proteínov Phr1 a Phr2 je dôležité z hľadiska ich ďalšieho skúmania ako potenciálnych terčov nových antimykotík. Výsledky založené na relatívnej rýchlosti transglykozylácie pri rôznej teplote ukazujú, že teplotné optimum oboch proteínov Phr1 (obr. 1) aj Phr2 (obr. 2) je 30°C.

Obr. 1 teplotné optimum Phr1p



Obr. 2 teplotné optimum Phr2p



Použitá literatúra

1. [Calderon, J.](#), [Zavrel, M.](#), Ragni, E., Fonzi, E. A., Rupp, S. and Popolo, L. (2010) PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion, *Microbiology*, 156: 2484-2494

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.

Acceptor specificity of transglycosylases Crh1 and Crh2 of the yeast cell wall

Kováčová K.¹, Firáková Z.¹, Blanco N.,² Arroyo, J.,² and Farkaš V.¹

¹Institute of Chemistry, Slovak academy of sciences, Bratislava, Slovakia,

²Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain, kristina.kovacova@savba.sk

Introduction

The yeast cell wall is an essential structure that determines the cell shape, mediates cellular interactions, protects the cells from adverse effects of the environment and provides protection against internal turgor pressure. Inner layer of the yeast cell wall consists mainly of three principal polysaccharides: the major structural component - β -(1-3)-glucan, β -(1-6)-glucan and chitin.. The external layer of the cell wall is formed by mannoproteins. These individual components are mutually linked by covalent bonds into large macromolecular complexes, which are based on β -(1,3)-glucan backbone. Carbohydrate-active enzymes (Crh) are necessary for connection of chitin to β -(1,3)-glucan and to β -(1,6)-glucan *in vivo* (1). The aim of this work was determinate of substrate specificity of Crh1 and Crh2 transglycosylases of the yeast cell wall expressed in *Picchia pastoris*.

Methods

Transglycosylation activities of recombinant proteins Crh1 and Crh2 expressed in *Picchia pastoris* were determined by a fluorescent *in vitro* assay. The wide spectrum of oligosaccharides labeled by sulforhodamine (SR) was tested as the artificial acceptors: laminarioligosaccharides; N-acetyl-chitooligosaccharides, cellooligosaccharides and oligo-xyloglucosides derived from xyloglucan, mixed-linkage β -(1,3/1,4)-glucan; β -(1,6)-linked glucooligosaccharides derived from pustulan; β -(1,4)-linked mannooligosaccharides and α -(1,4)-maltotetraose as the artificial acceptors. Carboxymethyl-chitin (CM-chitin) was used as the donor. The incubation mixture contained 0,1% carboxymethyl-chitin (CM-chitin), 30 μ M SR-labeled oligosaccharides, 2,5 μ g of the Crh1 protein or 10 μ g of the Crh2 protein and 50 mM citrate buffer, pH 3,5 in a total volume of 100 μ L. This mixture was incubated at 37°C for 3h. 20 μ L aliquot from incubation mixture was added to 20 μ L of 40% (v/v) formic acid to stop of reaction. 5 μ L aliquots from the stopped mixtutre were spotted in quintuplicates onto a filter paper (Whatman 3MM) template. This filtrate paper was drying and then was washed for 16h with 66% (v/v) ethanol containing 5% (v/v) formic acid. Unreacted SR-oligosaccharides was removed by washing, whereas the high-Mr products of CM-chitin with the SR-labeled acceptors remained attached to the paper. The paper was dried, placed between two glass plates and the fluorescence was measured in a Synergy HT-1 ELISA microplate reader equipped with a fluorescent detector and filters with excitation wavelenght at 530 nm and emission wavelenght at 575 nm.

Results and discussion

Results based on relative rates of transglycosylation with different acceptors have shown that β -(1,4)-linked N-acetyl-chitooligosaccharides are the preferred acceptors for both Crh transglycosylases, followed by β -(1,3)-linked laminarioligosaccharides, β -(1,4)-linked cellooligosaccharides and β -(1,4)-linked oligo-xyloglucosides. The transglycosylation of CM-chitin to β -(1,3/1,4)-linked glucan was lower than to the oligosaccharides. There was no transglycosylation from CM-chitin to β -(1,4)-mannooligosaccharides and α -(1,4)-maltotetraose mediated by Crh1,2 observed. The substrate specificity of Crh1 and Crh2 was similar for both enzymes except that Crh2 could use also β -(1,6)-linked pustulooligosaccharides as the acceptors. The rate of transglycosylation mediated by Crh1 was higher than by Crh2.

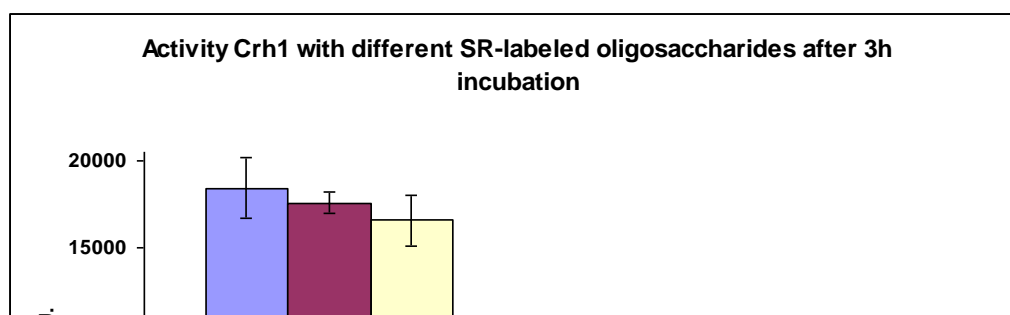


Fig. 1: Activity of the Crh1 with different types of the oligosaccharides.

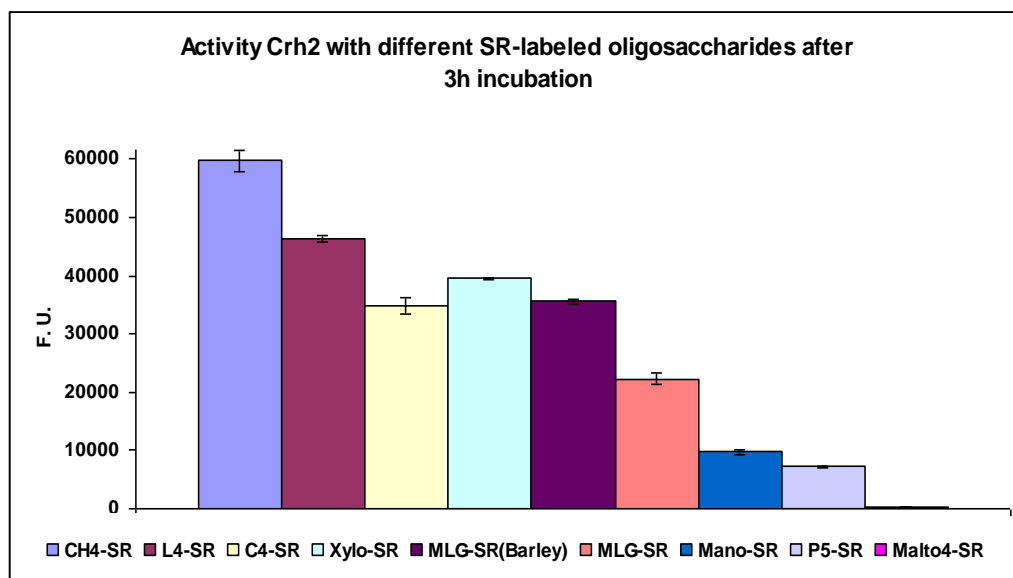


Fig. 2: Activity of the Crh2 with different types of the oligosaccharides.

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

Cabib E., Farkaš V., Kosik O., Blanco N., Arroyo J., and McPhie P. (2008) Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 283: 29859-29872

Analysis of the hybrid polysaccharide product formed from CM-chitin and L5-SR by Crh1-catalyzed transglycosylation reaction.

Kováčová K.¹, Firáková Z.¹, Blanco N.,² Arroyo, J.,² Řehulka, P.,³ and Farkaš V.¹

¹Institute of Chemistry, Slovak academy of sciences, Bratislava, Slovakia,

²Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain,

³Institute of Molecular Pathology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Třebešská 1575, CZ-500 01 Hradec Králové, Czech Republic, kristina.kovacova@savba.sk

Introduction

Carbohydrate-active enzymes Crh1 is necessary for connection of chitin to β -(1,3)-glucan and to β -(1,6)-glucan *in vivo* at *Saccharomyces cerevisiae* (1). The protein encoded by *CRH1* was heterologously expressed in *Pichia pastoris* and a sensitive fluorescent *in vitro* soluble assay was devised for determination of their transglycosylating activities. Crh1p act as chitin transglycosylase; it uses soluble chitin derivatives as the oligoglycosyl donors, and oligosaccharides derived from chitin, β -(1,3)-glucan (laminarin or laminarioligosaccharides) and β -(1,6)-glucan, fluorescently labeled with sulforhodamine or fluorescein isothiocyanate as acceptors (2). The transglycosylase reaction catalyzed by Crh1 involves the cleavage of the β -(1,4) linkages of the chitin and subsequent attachment of the fragment of the donor molecule through the newly formed reducing end onto the OH-group of the acceptor molecule, presumably by β -(1,4) glycosidic bond. The nature of the newly formed bond is indicated by the fact that it can be hydrolyzed by purified chitinase (2).

Methods

Reaction mixture contained 0,1% CM-chitin, 50 μ M SR laminaripentaose labeled by suphorodamine (L5-SR), 25 mM citrate buffer, pH 3.5, 2.5 μ g Crh1 protein and 0.02% NaN₃. The incubation was carried out at 37 °C for 16 h. Then ice-cold ethanol were added to precipitate the polysaccharide, and centrifuged. The sediment was washed several times with 66 % (v/v) ice-cold ethanol to separate the unreacted L5-SR until the supernatant was clear. The sediment containing CM-chitin-L5-SR hybrid product was dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 6 and 10 μ g of glucanase-free chitinase from *Serratia marcescens* were added and incubated at 37 °C for 1 h. Dilute solutions of the incubation mixture were then applied onto a preparative TLC plate with 0.5 mm thick Silicagel 60 layer (Merck) and ascending chromatography was run twice with intermittent drying using the solvent system *n*butanol- ethanol-water (5:3:2, by vol.). The major fluorescent zones (a) – (d) corresponding to L5-SR and hybrid products were located under the UV light (Figure 1), scraped out from the TLC plate and eluted with 20 % (v/v) ethanol. The eluates were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry using UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF system (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). α -Cyano-4- hydroxycinnamic acid (5 mg.ml⁻¹ in 60% acetonitrile and 0,1% trifluoroacetic acid) was used as MALDI matrix. One μ l of the extracted supernatant was mixed with 1 μ l of matrix solution directly on the MALDI target plate. Measurements were done in the positive reflectron mode.

Results and discussion

Products of the transglycosylation reactions were hybrid molecules composed of the acceptor and portions of carboxymethyl chitin attached to its nonreducing end. MALDI TOF mass spectrometry of the fluorescent fragments obtained after treating the product with purified glucanase-free *Serratia* chitinase and their separation by TLC (Figure 1) identified the hydrolysis products migrating in zones (a) – (d) as L5-SR with attached portions of CM-chitin of varying length (Figure 2). Zone (a) on the chromatogram corresponded to liberated L5-SR. The hydrolysis product HP1 migrating on TLC plate in zone (b) consisted of the acceptor L5-SR with one unit of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) attached to it. Zone (c) contained fragment HP2 consisting of L5-SR with two GlcNAc units attached and a minor fraction HP2-CM where one of the two GlcNAc's was carboxymethylated. Zone (d) contained a single compound HP3-CM identified as L5-SR with three GlcNAc units, one of them carboxymethylated.

These results have proved that Crh1 really catalyses heterotransglycosylation from chitin to β -(1,3)-glucan.

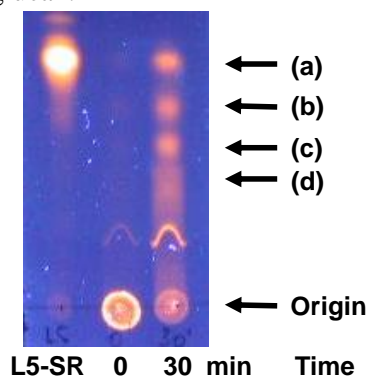


Fig. 1 Separation fluorescent fragments obtained after treating the product with purified glucanase-free *Serratia* chitinase by TLC

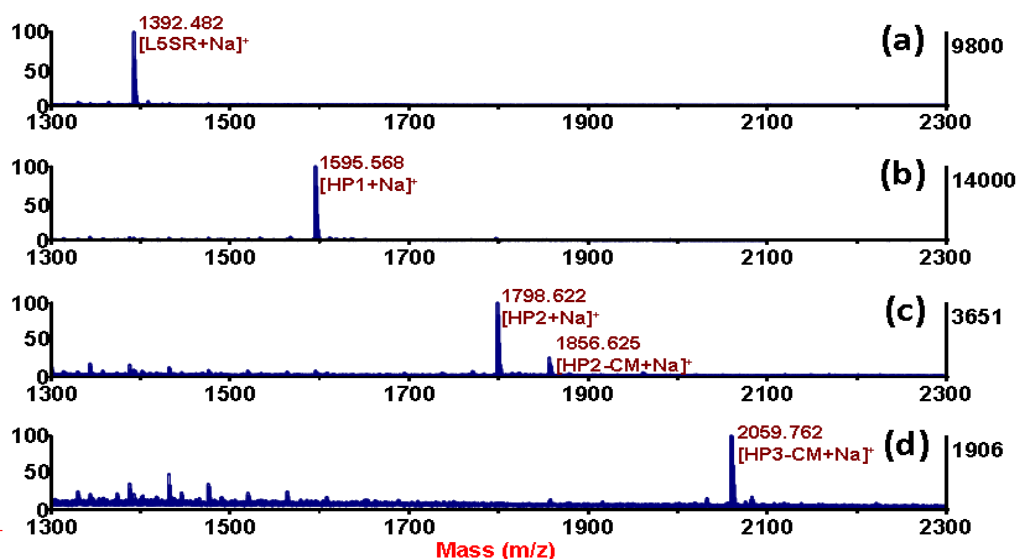


Fig. 2 MALDI TOF mass spectrometry analysis of the individual zones from the TLC chromatogram.

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. Cabib E., Farkaš V., Kosik O., Blanco N., Arroyo J., and McPhie P. (2008) Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 283: 29859-29872
2. Mazáň, M., Blanco, N., Kováčová, K., Firáková, Z., Řehulka, P., Farkaš, V., Arroyo, J. (2013) A novel fluorescent assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *Biochemical journal.* 455(3): 307-18

Analýza hybridného polysacharidového produktu vytvoreného transglykozylačnou reakciou katalyzovanou Crh1 proteínom z CM-chitínu a X6-SR.

„Carbohydrate-active“ enzým Crh1 je dôležitý pre pripojenie chitínu k β -(1,3)-glukánu a β -(1,6)-glukánu *in vivo* v *Saccharomyces cerevisiae* (1). Crh1p má aktivitu chitín transglykozylázy; využíva rozpustné deriváty chitínu ako oligoglykozylový donor, a fluorescenčne značené oligosacharidy odvodené od chitínu, β -(1,3)-glukánu a β -(1,6)-glukánu ako akceptory. Transglykozylačná reakcia katalyzovaná proteínom Crh1 zahŕňa štiepenie β -(1,4) väzieb v chitíne a následne pripojenie fragmentu molekuly chitínu cez novo vytvorený redukujúci koniec na OH-skupinu molekuly akceptora, pravdepodobne β -(1,4) glykozidickou väzbou (2). Naše predchádzajúce výsledky získané fluorescenčnou *in vitro* papierovou metódou ukazujú, že Crh1 je tiež schopný heterotransglykozylačného prenosu z chitínu na iné glukány, napr. β -(1,4)-viazané oligo-xyloglukozidy (xylán, typický pre rastlinné bunkové steny a niektoré riasy).

Methods

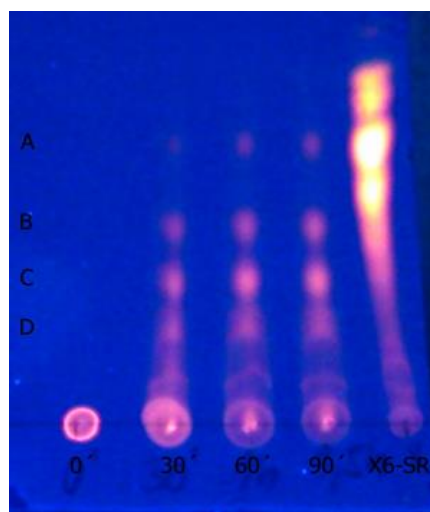
Reakčná zmes obsahovala 0,1% karboxymetylchitín (CM-chitín), 50 μ M xylohexaózu značenú sulforodamínom (X6-SR), 25 mM citrátový pufr, pH 3,5, 2,5 μ g proteínu Crh1 a 0,02% NaN₃. Zmes bola inkubovaná pri 37 °C, 16 h. Následne ľadovo studeným etanolom bol vyzrážaný polysacharid a scentrifugovaný. Sediment bol premytý ľadovo studeným etanolom na odstránenie nezreagovanej X6-SR, až kým nebol supernatant bezfarebný. Sediment pozostávajúci z hybridného produktu CM-chitín-X6-SR bol rozpustený v 0,1 M citrátovom pufrí, pH 6 a pridalo sa k nemu 10 μ g chitinázy bez glukanázy zo *Serratia marcescens* a zmes bola inkubovaná pri 37°C, 90 min. Následne bola inkubačná zmes nanosená na preparatívnu TLC platničku s 0,5 mm vrstvičkou silikagélu 60 layer a platnička bola vyvíjaná dvakrát v systéme *n*butanol-etanol-voda (5:3:2). Hlavné fluorescenčné zóny (A) – (D) korešpondujúce s X6-SR (obr. 2) Transglykozylačnou reakciou katalyzovanou Crh1 vznikli z CM-chitínu a X6-SR

vysokomolekulové hybridné produkty. Na ich analýzu bolo nutné získať menšie produkty, ktoré boli pripravené chitinázovou hydrolýzou.

1) a hybridnými produktami boli lokalizované pod UV svetlom, následne boli tieto zóny vyškrapané z TLC platničky a eluované 20 % (v/v) etanolom. Eluáty boli analyzované MALDI-TOF hmotnostnou spektrometriou použitím systému UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). α -Cyano-4- hydroxyškoricová kyselina (3 mg.ml⁻¹ v 60% acetonitrile a 0,1% trifluorooctovej kyseliny) bola použitá ako MALDI matrica. 1 μ l eluátu bol zmiešaný s 1 μ l roztoku matrice priamo na MALDI (Anchorchip). Meranie prebiehalo v pozitívnom reflektornom móde.

Výsledky a diskusia

Pomocou MALDI TOF hmotnostnej spektrometrie fluorescenčných fragmentov získaných po hydrolýze produktov transglykozylačnej reakcie čistou *Serratia* chitinázou bez glukanázy a ich následnou separáciou na TLC platničke (Obr. 1) sme identifikovali hydrolyzačné produkty migrujúce v zónach (A) – (D) ako X6-SR s pripojenou časťou CM-chitín rôznej dĺžky.



Obr. 1 Separácia produktov po chitinázovej hydrolýze pomocou TLC

Tieto produkty sú zložené z akceptora X6-SR a časti CM-chitínu pripojeného k neredukujúcemu koncu X6-SR (obr. 2). Zóna (A) na chromatograme odpovedá samotnej X6-SR.

Zóna (B) je tvorená hydrolyzačným produktom HP1, ktorý pozostáva z akceptora X6-SR, na ktorý je viazaná jedna jednotka *N*-acetyl-D-glukózamínu (GlcNAc); a minoritná frakcia HP2 pozostávajúca z X6-SR, na ktorú sú viazané dve jednotky GlcNAc.

Zóna (C) obsahovala fragment HP2 pozostávajúci z X6-SR, na ktorý sú viazané dve jednotky GlcNAc a minoritné frakcie - HP3-CM zložená z X6-SR a troch jednotiek GlcNAc, kde jedna jednotka GlcNAc bola karboxymetylovaná; a HP4-CM zložená z X6-SR a štyroch jednotiek GlcNAc, kde jedna jednotka GlcNAc bola karboxymetylovaná.

Zóna (D) pozostáva zo zlúčeniny HP3, ktorá bola identifikovaná ako X6-SR s naviazanými tromi jednotkami GlcNAc a minoritná frakcia HP4 zložená z X6-SR a štyroch jednotiek GlcNAc.

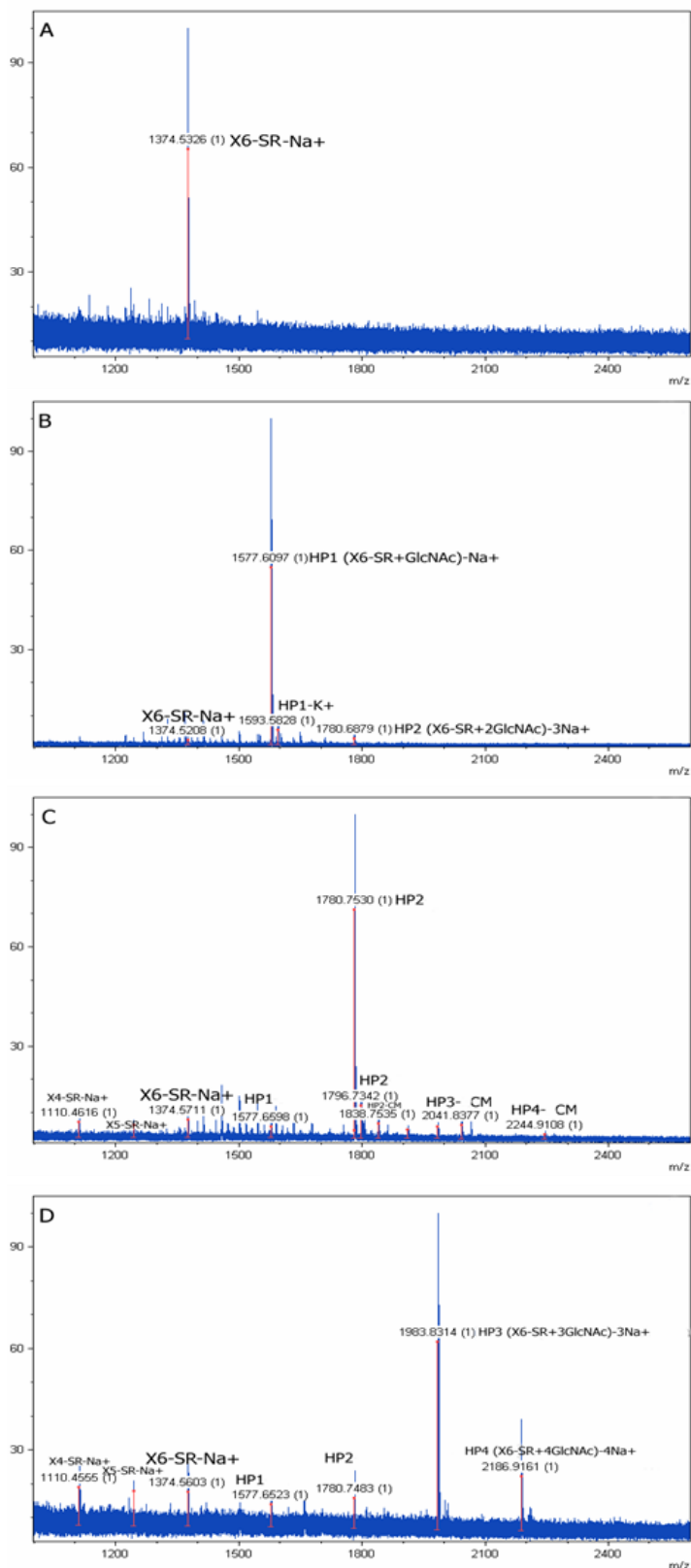
Tieto výsledky dokazujú, že Crh1 skutočne katalyzuje tiež heterotransglykozylačný prenos z chitínu na β -(1,4)-glukán *in vitro*.

Použitá literatúra

1. Cabib E., Farkaš V., Kosik O., Blanco N., Arroyo J., and McPhie P. (2008) Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 283: 29859-29872
2. Mazáň, M., Blanco, N., Kováčová, K., Firáková, Z., Řehulka, P., Farkaš, V., Arroyo, J. (2013) A novel fluorescent assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *Biochemical journal.* 455(3): 307-18

PodĎakovanie

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.



Obr. 2 Výsledky z MALDI TOF hmotnostnej spektrometrie fluorescenčných fragmentov získaných po hydrolyze produktov transglykozylačnej reakcie chitinázou

Analýza hybridného polysacharidového produktu vytvoreného transglykozylačnou reakciou katalyzovanou Crh1 proteínom z CM-chitínu a C5-SR.

Kováčová K. a Farkaš V.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovakia, kristina.kovacova@savba.sk

„Carbohydrate-active“ enzým Crh1 je dôležitý pre pripojenie chitínu k β -(1,3)-glukánu a β -(1,6)-glukánu *in vivo* v *Saccharomyces cerevisiae* (1). Crh1p má aktivitu chitín transglykozylázy; využíva rozpustné deriváty chitínu ako oligoglykozylový donor, a fluorescenčne značené oligosacharidy odvodené od chitínu, β -(1,3)-glukánu a β -(1,6)-glukánu ako akceptory. Transglykozylačná reakcia katalyzovaná proteínom Crh1 zahŕňa štiepenie β -(1,4) väzieb v chitíne a následne pripojenie fragmentu molekuly chitínu cez novo vytvorený redukujúci koniec na OH-skupinu molekuly akceptora, pravdepodobne β -(1,4) glykozidicko väzbou (2). Naše predchádzajúce výsledky získané fluorescenčnou *in vitro* papierovou metódou ukazujú, že Crh1 je tiež schopný heterotransglykozylačného prenosu z chitínu na iné glukány, napr. β -(1,4)-viazané celooligosacharidy typické pre rastliny.

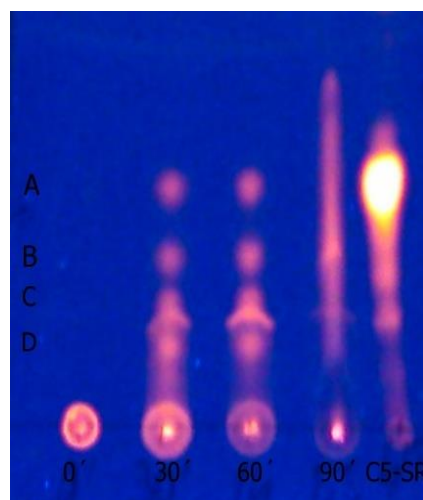
Metódy

Reakčná zmes obsahovala 0,1% karboxymetylchitín (CM-chitín), 50 μ M celopentaózu značenú sulforodamínom (C5-SR), 25 mM citrátový pufr, pH 3,5, 2,5 μ g proteínu Crh1 a 0,02% NaN_3 . Zmes bola inkubovaná pri 37 °C, 16 h. Následne ľadovo studeným etanolom bol vyzrážaný polysacharid a scentrifugovaný. Sediment bol premytý ľadovo studeným etanolom na odstránenie nezreagovanej C5-SR, až kým nebol supernatant bezfarebný. Sediment pozostávajúci z hybridného produktu CM-chitín-C5-SR bol rozpustený v 0,1 M citrátovom pufrí, pH 6 a pridalo sa k nemu 10 μ g chitinázy bez glukanázy zo *Serratia marcescens* a zmes bola inkubovaná pri 37°C, 90 min. Následne bola inkubačná zmes nanosená na preparatívnu TLC platničku s 0,5 mm vrstvičkou silikagélu 60 layer a platnička bola vyvíjaná dvakrát v systéme *n*butanol-etanol-voda (5:3:2). Hlavné fluorescenčné zóny (A) – (D) korešpondujúce s C5-SR (obr. 1) a hybridnými produktami boli lokalizované

pod UV svetlom, následne boli tieto zóny vyškrapané z TLC platničky a eluované 20 % (v/v) etanolom. Eluáty boli analyzované MALDI-TOF hmotnostnou spektrometriou použitím systému UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). α -Cyano-4- hydroxyškoricová kyselina (3 mg.ml⁻¹ v 60% acetonitrile a 0,1% trifluorooctovej kyseliny) bola použitá ako MALDI matrica. 1 μ l eluátu bol zmiešaný s 1 μ l roztoku matrice priamo na MALDI (Anchorchip). Meranie prebiehalo v pozitívnom reflektónovom móde.

Výsledky a diskusia

Pomocou MALDI TOF hmotnostnej spektrometrie fluorescenčných fragmentov získaných po hydrolýze produktov transglykozylačnej reakcie čistou *Serratia* chitinázou bez glukanázy a ich následnou separáciou na TLC platničke (Obr. 1) sme identifikovali hydrolyzačné produkty migrujúce v zónach (A) – (D) ako C5-SR s pripojenou časťou CM-chitín rôznej dĺžky.



Obr. 1 Separácia produktov po chitinázovej hydrolýze pomocou TLC

Transglykozylačnou reakciou katalyzovanou Crh1 vznikli z CM-chitínu a C5-SR vysokomolekulové hybridné produkty. Na ich analýzu bolo nutné získať menšie produkty, ktoré boli pripravené chitinázovou hydrolyzou. Tieto produkty sú zložené z akceptora C5-SR a časti CM-chitínu pripojeného k neredukujúcemu koncu C5-SR (obr. 2).

Zóna (A) na chromatograme odpovedá samotnej C5-SR. Zóna (B) je tvorená hydrolyzačným produktom HP1, ktorý pozostáva z akceptora C5-SR, na ktorý je viazaná jedna jednotka *N*-acetyl-D-glukózamínu (GlcNAc); a minoritná frakcia HP1-CM, kde GlcNAc bol karboxymetylovaný.

Zóna (C) obsahovala fragment HP2 pozostávajúci z C5-SR, na ktorý sú viazané dve jednotky GlcNAc.

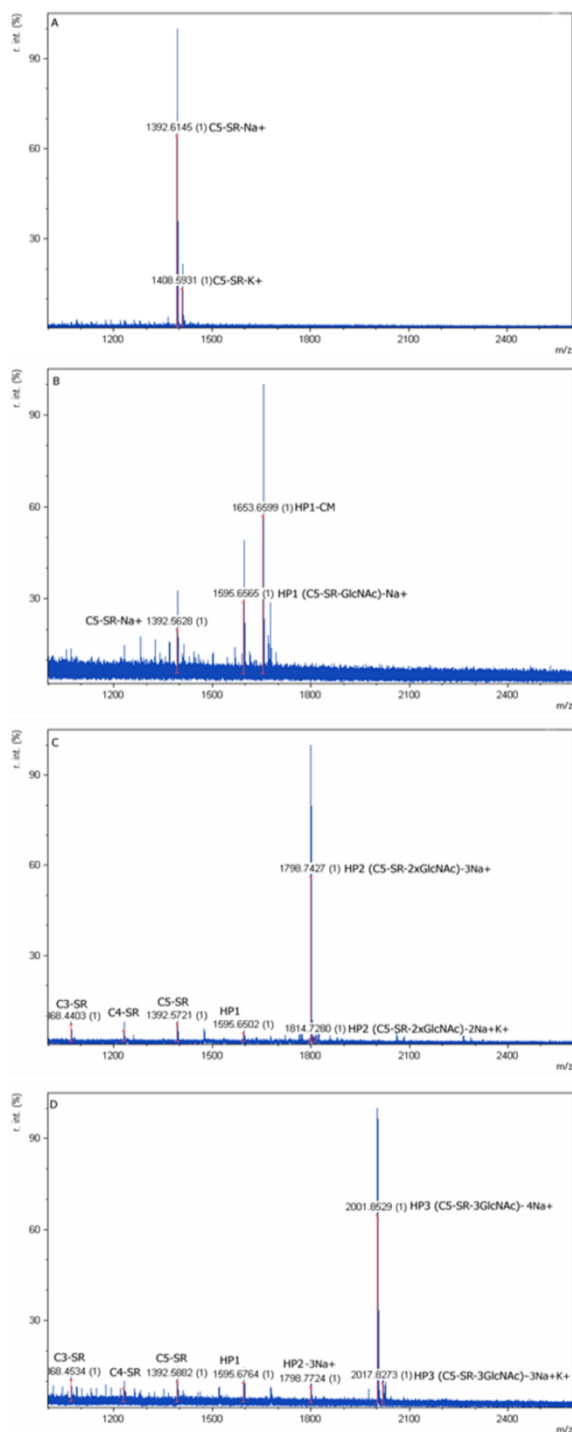
Zóna (D) pozostáva zo zlúčeniny HP3, ktorá bola identifikovaná ako C5-SR s naviazanými tromi jednotkami GlcNAc. Tieto výsledky dokazujú, že Crh1 skutočne katalyzuje tiež heterotransglykozylačný prenos z chitínu na β -(1,4)-glukán *in vitro*.

Použitá literatúra

1. Cabib E., Farkaš V., Kosik O., Blanco N., Arroyo J., and McPhie P. (2008) Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 283: 29859-29872
2. Mazáň, M., Blanco, N., Kováčová, K., Fíráková, Z., Řehulka, P., Farkaš, V., Arroyo, J. (2013) A novel fluorescent assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *Biochemical journal.* 455(3): 307-18

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.



Obr. 2: Výsledky z MALDI TOF hmotnostnej spektrometrie fluorescenčných fragmentov získaných po hydrolyze produktov transglykozylačnej reakcie chitinázou

Sledovanie vplyvu kultivačného média a doby kultivácie na identifikáciu kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* pomocou hmotnostnej spektrometrie

Barbora Stratilová^{a,b}, Jakub Jäger^c, Pavel Řehulka^d, Renáta Vadkertiová^a, Ján Mucha^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chemjmic@savba.sk

^bPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^cFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^dÚstav molekulární patologie FVZ UO, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Biotypizácia, *Cryptococcus laurentii*, hmotnostná spektrometria, kapsula, polysacharidy

Úvod

V Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, je približne 40 kmeňov kvasiniek zaradených do skupiny *Cryptococcus laurentii*. Toto zaradenie bolo založené na určitých morfológických, fyziologických a biochemických vlastnostiach jednotlivých kmeňov. V poslednej dobe sa začalo postupné preverovanie zaradenia kmeňov pomocou sekvenovania D1/D2 LSUrRNA.

Okrem molekulárno-biologických metód sa v posledných rokoch začína stále viac presadzovať metóda biotypizácie mikroorganizmov hmotnostnou spektrometriou, a to najmä pri taxonomickom a diagnostickom zaradovaní prokaryontov [van Veen et al., 2010; Ho a Reddy, 2010]. Napriek určitým ťažkostiam sa začínajú objavovať aj práce týkajúce sa eukaryontov, a v rámci nich aj vybraných mikroorganizmov rodu *Cryptococcus* [Stevenson et al., 2010; Dhiman et al., 2011; Yan et al., 2011; McTaggart et al., 2011]. Komerčné databázy však stále poskytujú málo informácií o spektrách tohto rodu a už vôbec nie dostatočné informácie na rozlíšenie druhov patriacich do skupiny *Cr. laurentii*.

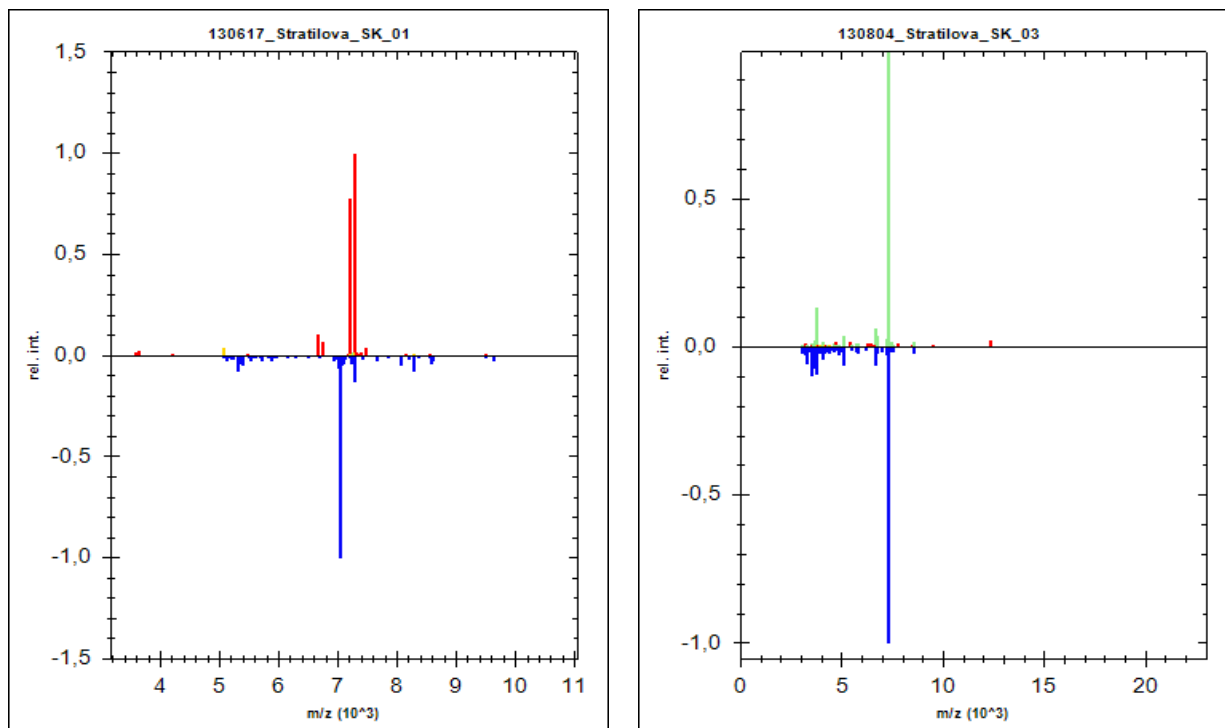
Náplňou tejto práce bolo zistiť, ako ovplyvňuje použité kultivačné médium a doba kultivácie spektrá intracelulárnych látok získaných z kmeňov kvasinkových mikroorganizmov skupiny *Cr. laurentii*.

Materiál a metódy

Sedem kmeňov *Cryptococcus laurentii* zo Zbičky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, CCY 17-3-5, CCY 17-3-15, CCY 17-3-17, CCY 17-3-29, CCY 17-3-33, CCY 17-3-34 a CCY 17-3-38, bolo kultivovaných na šikmom agare, ktorý slúži aj ako ich úschovné médium a na tekutom médiu s obsahom laktózy (2%) ako zdroji uhlíka. Druhý, štvrtý, šiesty, ôsmy a desiaty deň kultivácie boli odobraté očkovacou slučkou vzorky z kultúr (jedno očko alebo 1 ml média) do mikroskúmavky s vrchnáčikom, premyté 7x vodou a potom vystavené na 20 min zmesi zloženej z kyseliny ferulovej (10 mg/ml) a kyseliny sinapovej (30 mg/ml) v 70% acetonitrile (ACN) s 3% kyselinou trifluóroctovou (TFA). Po centrifugácii sa naniesol 1 μ l supernatantu na meráciu platničku MTP 384 target plate polished steel T F (Bruker) a nechal vysušiť. Vzorky boli pripravené aj podľa postupu navrhnutého v manuáli softvéru Biotyper (Bruker) pre obtiažne prípady. MALDI-TOF MS merania boli robené na zariadení UltrafleXtreme (Bruker) v lineárnom pozitívnom móde pre oblasť m/z 2-22 kDa. Zariadenie bolo kalibrované na Cytochróm C (Sigma). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru Biotyper (Bruker).

Výsledky a diskusia

Ako sme očakávali, všetky kmene vykazovali zmeny spektier v dôsledku rastu na odlišnom kultivačnom médiu a na fáze rastu buniek. Na Obr. 1 sú znázornené vzorové zmeny pre dva kmene, CCY 17-3-29 a CCY 17-3-34. Namerané údaje sú spracované do tzv. čiarových spektier (program Biotyper). Zmeny boli výraznejšie v prípade odlišného kultivačného média, kde došlo k zmene hlavných pík. V prípade inej doby kultivácie sa hlavné píky nemenili, dochádzalo len k pribúdaniam alebo úbytku niektorých látok. Tento fakt vylučuje použitie automatizovaného systému vyhodnocovania Biotyper-a aj keby bola databáza rozšírená o údaje týkajúce sa týchto kmeňov. Dôvodom je systém jej vyhodnocovania identity a podobnosti, ktorý zahrňuje aj pomer jednotlivých pík. Dá sa predpokladať, že toto bol hlavný dôvod návrhu McTaggart et al. [2011], aby sa pre rod *Cryptococcus* považovalo za vierohodnú identifikáciu už skóre 1,8 namiesto 2,0, ktoré je stanovené pre ostatné mikroorganizmy (program Biotyper).



Obr. 1: Porovnanie čiarových spektier kmeňa CCY 17-3-29 rastúceho na šikmom agare a tekutom laktózovom médiu (vľavo) a CCY 17-3-34 odobratého zo šikmého agaru štvrtý a šiesty deň po inokulácii (vpravo)

Záver

Pri biotypizácii eukaryontov pomocou hmotnostnej spektrometrie je nevyhnutné použiť rovnaké kultivačné médium pre vzorku a pre štandard. V prípadoch, kedy stačia na rozlíšenie druhu hlavné píky spektra intracelulárnych látok, doba kultivácie nerozhoduje, hoci najlepšie výsledky sa dosahovali medzi štvrtým a šiestym dňom kultivácie. Kratšia doba mohla spôsobiť, že kultúra nebola dostatočne narastená pre odber vzorky a dlhšia znamenala nárast kontaminácie spôsobenej produkciou extracelulárnych látok mikroorganizmami typickej pre celý rod *Cryptococcus*.

Literatúra

1. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL (2011) *J Clin Microbiol* 49:1614 Ho Y-P, Reddy PM (2010) *Clin Chem* 56:4, 525
2. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A., Zhang SX (2011) *J Clin Microbiol* 49:3050
3. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR (2010) *J Clin Microbiol* 48:348van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) *J Clin Microbiol* 48:900
4. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton ChW, Kostrzewa M, Tang Y-W (2011) *J Clin Microbiol* 49:2528

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.

Identifikácia variety patogénneho mikroorganizmu *Cryptococcus neoformans* pomocou hmotnostnej spektrometrie

Barbora Stratilová^{a,b} Jana Molnárová^a Pavel Řehulka^c Renáta Vadkertiová^a Eva Stratilová^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chemevi@savba.sk

^bPrirodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^cÚstav molekulární patologie FVZ UO, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Biotypizácia, *Cryptococcus neoformans*, hmotnostná spektrometria

Úvod

Identifikácia patogénnych mikroorganizmov hmotnostnou spektrometriou sa stále viac stáva nerozlučnou súčasťou techník používaných v medicínskych diagnostických laboratóriách [van Veen et al., 2010; Ho a Reddy, 2010] a pri taxonomickom zaradovaní nových kmeňov. Kým identifikácia prokaryontov je jednoduchšia a jednoznačnejšia, vďaka čomu sa využíva rutinne, databázy stále neobsahujú dostatočné údaje o eukaryotických druhoch. Niektoré z nich jednoducho po príprave vzoriek podľa predpísaných protokolov nedávajú spektrá, s ktorými by sa dalo ďalej pracovať. Medzi takéto mikroorganizmy môžu napr. patriť niektoré druhy rodu *Cryptococcus*, kvasinkového mikroorganizmu, ktorý produkuje jednak extracelulárne polysacharidy, ale väčšinou aj ťažko zničiteľnú bariéru v podobe polysacharidovej kapsule. Neslávne známymi zástupcami rodu *Cryptococcus* sú *Cr. neoformans* a *Cr. gattii*, pôvodcovia tzv. kryptokokózy, ktorá má často smrteľné následky. Z tohto dôvodu už boli publikované prvé práce o identifikácii týchto dvoch druhov hmotnostnou spektrometriou [Stevenson et al., 2010; Dhiman et al., 2011; Yan et al., 2011], dokonca bola naznačená možnosť rozlíšiť touto metódou jednotlivé variety, hoci práve v jednom prípade *Cr. neoformans* došlo k nesprávnej interpretácii [McTaggart et al., 2011].

Náplňou tejto práce bolo zistiť, či sa metóda biotypizácie patogénnych mikroorganizmov pomocou hmotnostnej spektrometrie dá skutočne použiť aj na úrovni stanovenia variety daného mikroorganizmu, konkrétne *Cryptococcus neoformans*. Stanovenie variety je pre klinickú prax esenciálne, keďže odlišné variety vykazujú rôznu citlivosť voči liečivám.

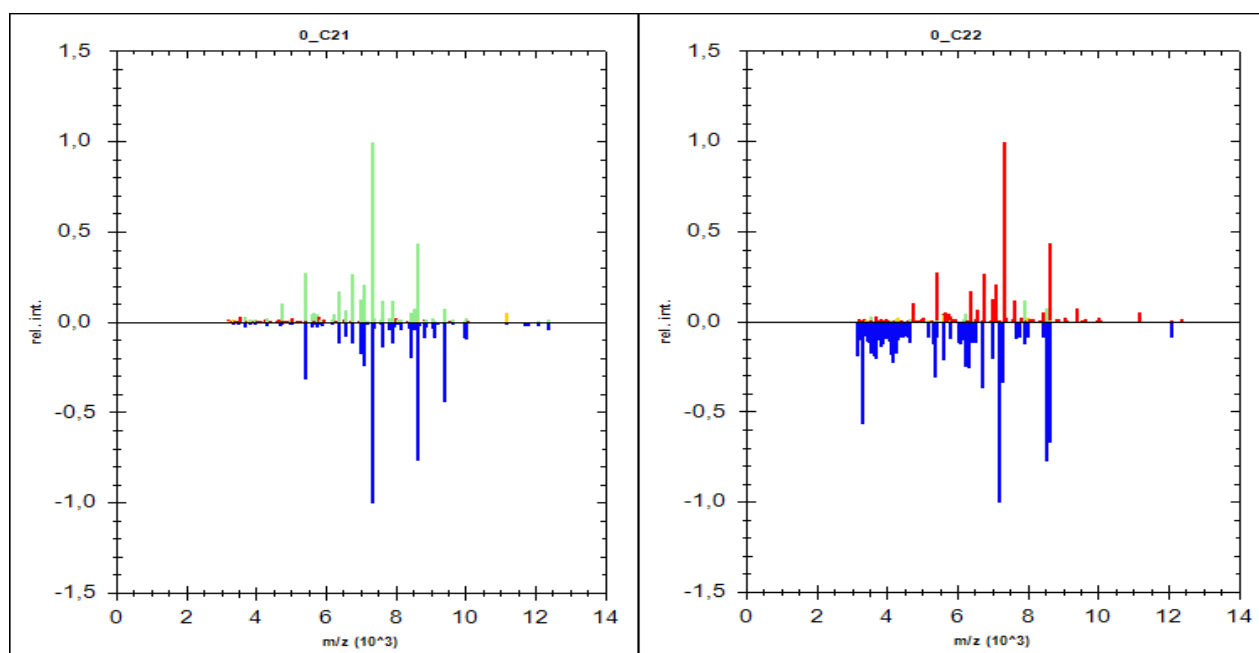
Materiál a metódy

Tri kmene *Cryptococcus neoformans* zo Zbičky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, CCY 17-1-4, 17-1-5 a 17-1-8, boli kultivované na šikmom agare, ktorý slúži aj ako ich úschovné médium. Štvrtý a šiesty deň kultivácie boli očkovacou slučkou odobraté vzorky z kultúr (jedno očko) do mikroskúmavky s vrchnáčikom, premyté 7x vodou a potom vystavené na 20 min zmesi zloženej z kyseliny ferulovej (10 mg/ml) a kyseliny sinapovej (30 mg/ml) v 70% acetonitrile (ACN) s 3% kyselinou trifluóroctovou (TFA). Po centrifugácii sa naniesol 1 µl supernatantu na meraciu platničku MTP 384 target plate polished steel T F (Bruker) a nechal vysušiť. Vzorky boli pripravené aj podľa postupu navrhnutého v manuáli softvéru Biotyper (Bruker) pre obtiažne prípady. MALDI-TOF MS merania boli robené na zariadení UltrafleXtreme (Bruker) v lineárnom pozitívnom móde pre oblasť m/z 0,2-22 kDa. Zariadenie bolo kalibrované na Cytochróm C (Sigma). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru Biotyper (Bruker).

Výsledky a diskusia:

Program Biotyper umožňuje spracovanie údajov do tzv. čiarových spektier, ktoré potom porovnáva so svojou databázou. Hodnoty podobnosti spektier sa pohybujú v rozmedzí 0-3, pričom o identifikácii kmeňa sa dá uvažovať pri hodnotách nad dva. Napriek tomu, že táto databáza obsahuje okolo sedem spektier, ktoré patria kvasinkám rodu *Cryptococcus*, pri kultivácii sme vychádzali z požiadaviek na úschovu mikroorganizmov a nie protokolu predpísaného dodávateľom softvéru, takže sme nemohli využiť vyhodnocovanie proti databáze, ktoré tento softvér poskytuje. V prípade, že sme použili firemný postup pre elúciu intracelulárnych látok, sme v niektorých prípadoch vôbec nezískali spektrum, s ktorým by sa dalo ďalej pracovať. Pravdepodobným dôvodom sú extracelulárne a kapsulárne polysacharidy typické pre rod *Cryptococcus*. Preto sme softvér použili na porovnanie spektier CCY 17-1-4, 17-1-5

a 17-1-8 navzájom (Obr. 1), pričom sme dospeli k záveru, že kmene CCY 17-1-4 a 17-1-5 by mali byť identické, kým kmeň CCY 17-1-8 sa od nich odlišuje.



Obr. 1: Porovnanie čiarových spektier kmeňov CCY 17-1-4 a CCY 17-1-5 (skóre 2,65) a CCY 17-1-4 a CCY17-1-8 (skóre 1,17)

Po identifikácii týchto kmeňov sekvenovaním D1/D2 LSUrRNA sa zistilo, že CCY 17-1-4 a CCY 17-1-5 patria medzi *Cr. neoformans* var. *neoformans* a CCY17-1-8 je *Cr. neoformans* var. *grubii*.

Záver:

Biotypizácia mikroorganizmov pomocou hmotnostnej spektrometrie je rýchlou, v prípade dostupnosti zariadenia lacnou a spoľahlivou metódou na stanovenie variety aj tzv. obtiažnych prípadov, medzi aké nesporne patria kapsulárne kvasinky druhu *Cr. neoformans*. Rozhodujúcou je metóda prípravy vzorky, ktorá musí zaručiť reprodukovateľné uvoľňovanie látok z bunky mikroorganizmov a existencia štandardu v databáze (či už komerčnej alebo vlastnej) získaného rovnakým postupom ako sa získala vzorka.

Literatúra

1. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL (2011) *J Clin Microbiol* 49:1614
2. Ho Y-P, Reddy PM (2010) *Clin Chem* 56:4, 525
3. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A., Zhang SX (2011) *J Clin Microbiol* 49:3050
4. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR (2010) *J Clin Microbiol* 48:3482
5. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) *J Clin Microbiol* 48:900
6. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton ChW, Kostrzewa M, Tang Y-W (2011) *J Clin Microbiol* 49:2528

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.

Identifikácia kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* pomocou hmotnostnej spektrometrie – druh *Cryptococcus flavescens* (fylogenetická skupina I)

Jakub Jäger^a, Barbora Stratilová^{b,c}, Jana Molnárová^b, Pavel Řehulka^d, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chemevi@savba.sk

^cPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^dÚstav molekulární patologie FVZ UO, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Biotypizácia, *Cryptococcus flavescens*, hmotnostná spektrometria, kapsula, polysacharidy

Úvod

V Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, sa nachádza okolo 40 kmeňov, ktoré boli v minulosti zaradené na základe určitých morfológických, fyziologických a biochemických vlastností do druhu *Cryptococcus laurentii*.

Taxonómia *Cr. laurentii* všeobecne podliehala pomerne častým zmenám, ktoré záviseli jednak od metód zaraďovania, ako aj od individuálneho prístupu jednotlivých vedeckých skupín, ktoré sa nimi zaoberali. Dnešný prístup bol ovplyvnený najmä zavedením molekulárno-biologických metód. Klinické izoláty kmeňov kvasinkovitého mikroorganizmu *Cryptococcus laurentii* vytvorili v rámci fylogenetického stromu založeného na porovnávaní ITS oblasti a D1/D2 LSUrRNA dve fylogenetické skupiny (Sugita a kol. 2000). Neskôr bola časť týchto kmeňov preskupená do samostatných druhov (Takashima et al. 2003) v rámci „skupiny“ *Cryptococcus laurentii*, pričom tento názov súčasne ostal aj ako názov jedného druhu z prvej fylogenetickej skupiny. Okrem *Cr. laurentii* obsahuje táto fylogenetická skupina aj *Cr. flavescens* a *Cr. aureus*. Zmeny v taxonómii si vyžiadali aj opätovné preverenie zaradenia jednotlivých kmeňov v Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV. Okrem sekvenovania D1/D2 LSUrRNA bola testovaná aj možnosť využiť biotypizáciu pomocou hmotnostnej spektrometrie.

Táto práca je zameraná na identifikáciu 14 kmeňov zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV a jedného nového izolátu, ktorý sa od nich odlišuje, keďže netvorí polysacharidovú kapsulu.

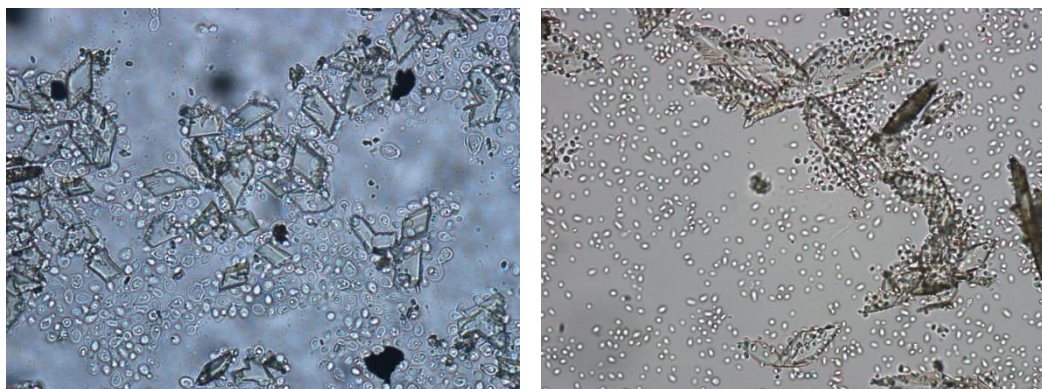
Materiál a metódy

Kapsulárne kmene označené ako *Cryptococcus laurentii* zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, CCY 17-3-4, CCY 17-3-15, CCY 17-3-16, CCY 17-3-19, CCY 17-3-28 až CCY 17-3-34, CCY 17-3-38, CCY 17-3-39 a jeden nový akapsulárny izolát, boli kultivované na šikmom sladínovom agare, ktorý slúži aj ako ich úschovné médium. Štvrtý a šiesty deň kultivácie boli očkovacou slučkou odobraté vzorky z kultúr (jedno očko) do mikroskúmavky s vrchnáčikom, premyté 7x vodou a potom vystavené na 20 min zmesi zloženej z kyseliny ferulovej (10 mg/ml) a kyseliny sinapovej (30 mg/ml) v 70% acetonitrile (ACN) s 3% kyselinou trifluóroctovou (TFA). Po centrifugácii sa naniesol 1 µl supernatantu na meraciu platničku MTP 384 target plate polished steel T F (Bruker) a nechal vysušiť. Vzorky boli pripravené aj podľa postupu navrhnutého v manuáli softvéru Biotyper (Bruker) pre obtiažne prípady. MALDI-TOF MS merania boli robené na zariadení UltrafleXtreme (Bruker) v lineárnom pozitívnom móde pre oblasť m/z 0,2-22 kDa. Zariadenie bolo kalibrované na Cytochróm C (Sigma). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru Biotyper (Bruker).

Mikroskopické merania mikroorganizmu s matricou a bez matrice boli robené na mikroskope Nikon Eclipse 80i (CFI 15 × 40) a dokumentované kamerou DS-Fil Nikon (5 Mpx rozlíšenie).

Výsledky a diskusia

Obr. 1 zobrazuje vybrané kmene v prítomnosti matrice, ktorá bola použitá na extrakciu ribozomálnych proteínov z buniek a súčasne na meranie týchto proteínov hmotnostnou spektrometriou.



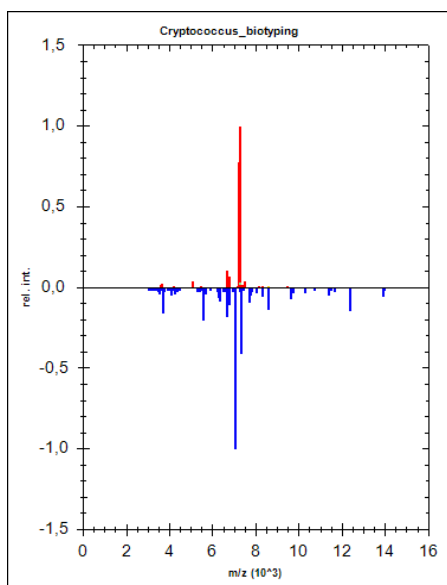
CCY 17-3-28

CCY 17-3-29

Obr. 1: Mikroskopia CCY 17-3-28 a CCY 17-3-29 s kryštálkami matrice (kyselina ferulová a kyselina sinapová v 70% ACN s 3% TFA)

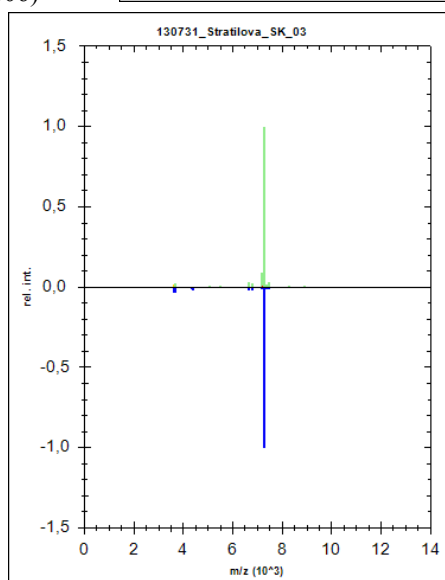
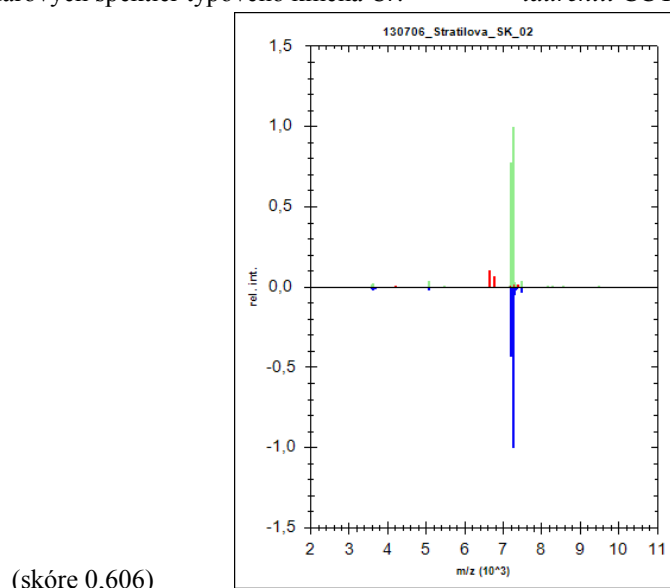
Kmene zaradené v Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, pod označeniami CCY 17-3-4, CCY 17-3-15, CCY 17-3-16, CCY 17-3-19, CCY 17-3-28 až CCY 17-3-34, CCY 17-3-38, CCY 17-3-39 a jeden nový akapsulárny izolát vykazovali pri biotypizácii hmotnostnou spektrometriou typické spektrum (Obr. 2, 3). Spektrá sú zobrazené po spracovaní pomocou programu Biotyper do tzv. čiarových spektier. Tieto sme porovnávali navzájom a nie s databázou, ktorú program ponúka. Dôvodom boli iné podmienky kultivácie mikroorganizmov, hoci metódy prípravy vzoriek pre meranie boli použité obe, ako optimalizovaná, tak aj doporučená dodávateľom prístroja a softvéru. Kým optimalizovaná metóda viedla k získaniu reprodukovateľných spektier vo všetkých prípadoch, v prípade, že sme použili firemný postup pre elúciu intracelulárnych látok, v niektorých prípadoch sme vôbec nezískali spektrum, s ktorým by sa dalo ďalej pracovať.

Na Obr. 2 je porovnanie čiarových spektier typového kmeňa *Cr. laurentii* (CCY 17-3-2) a kmeňa z tejto skupiny, CCY 17-3-29, ktorý D1/D2 LSUrRNA sekvenácia identifikovala ako *Cr. flavescens*. Obr. 3 zobrazuje porovnanie spektier rôznych kmeňov *Cr. flavescens* identifikovaných tiež aj D1/D2 LSUrRNA sekvenáciou. Hodnoty podobnosti spektier sa všeobecne pohybujú v rozmedzí 0-3, pričom o identifikácii kmeňa sa dá uvažovať pri hodnotách nad dva, čo v prípade týchto kmeňov bolo splnené.



Obr. 2: Porovnanie čiarových spektier typového kmeňa *Cr.*

laurentii CCY 17-3-2 s CCY 17-3-29



Obr. 3: Porovnanie čiarových spektier kmeňov CCY 17-3-29 a CCY 17-3-31 (skóre 2.611) – vľavo a kmeňov CCY 17-3-31 a CCY 17-3-34 (skóre 2.228) – vpravo.

Záver:

Biotypizácia mikroorganizmov pomocou hmotnostnej spektrometrie je rýchlou, v prípade dostupnosti zariadenia lacnou a spoľahlivou metódou na stanovenie aj tzv. obtiažnych prípadov, medzi aké nesporne patria kapsulárne kvasinky druhu *Cr. flavescens*. Tieto mikroorganizmy patria do prvej fylogenetической skupiny skupiny *Cr. laurentii* spolu s druhom *Cr. laurentii*, od ktorého sa výrazne odlišujú svojim spektrom. Tvorba kapsule neovplyvnila spektrum látok, na základe ktorého tento druh identifikujeme.

Literatúra

1. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL (2011) *J Clin Microbiol* 49:1614
2. Ho Y-P, Reddy PM (2010) *Clin Chem* 56:4, 525
3. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A., Zhang SX (2011) *J Clin Microbiol* 49:3050

4. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR (2010) *J Clin Microbiol* 48:3482
5. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) *J Clin Microbiol* 48:900
6. Sugita T, Takashima M, Ikeda R, Nakase T, Shinoda T (2000) *J Clin Microbiol* 38:1468
7. Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T (2003) *Int J Sys Evol Microbiol* 53:1187
8. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton ChW, Kostrzewa M, Tang Y-W (2011) *J Clin Microbiol* 49:2528

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.

Identifikácia kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* pomocou hmotnostnej spektrometrie – druh *Cryptococcus laurentii* (fylogenetická skupina I)

Jakub Jäger^a, Barbora Stratilová^{b,c}, Jana Molnárová^b, Pavel Řehulka^d, Jiřina Omelková, Renáta Vadkertiová^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chemevi@savba.sk

^cPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^dÚstav molekulární patologie FVZ UO, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Biotypizácia, *Cryptococcus laurentii*, hmotnostná spektrometria, kapsula, polysacharidy

Úvod

Taxonómia kapsulárneho kvasinkového druhu *Cryptococcus laurentii* podliehala pomerne častým zmenám, ktoré záviseli jednak od metód zaraďovania, ako aj od individuálneho prístupu jednotlivých vedeckých skupín, ktoré sa nimi zaoberali. Už „klasické“ zaraďovanie (na základe určitých morfológických, fyziologických a biochemických vlastností) poukázalo na existenciu viacerých odlišných variet v rámci tohto druhu. Zmenu prinieslo zaraďovanie na základe molekulárno-biologických metód.

Klinické izoláty kmeňov druhu *Cryptococcus laurentii* vytvorili v rámci fylogenetického stromu založeného na porovnaní ITS oblasti a D1/D2 LSU rRNA dve fylogenetické skupiny (Sugita a kol. 2000). Neskôr bola časť týchto kmeňov preskupená do samostatných druhov (Takashima et al. 2003) v rámci „skupiny“ *Cryptococcus laurentii*, pričom tento názov súčasne ostal aj ako názov jedného druhu z prvej fylogenetickéj skupiny. Cieľom tejto práce bolo zistiť, či sa druhy v rámci skupiny *Cryptococcus laurentii* dajú odlíšiť aj pomocou biotypizácie hmotnostnou spektrometriou.

Identifikácia patogénnych mikroorganizmov hmotnostnou spektrometriou sa stala nerozlučnou súčasťou techník používaných v diagnostických laboratóriách [van Veen et al., 2010; Ho a Reddy, 2010] ako aj pri taxonomickom zaraďovaní nových kmeňov. Kým identifikácia prokaryontov je jednoduchšia a jednoznačnejšia, databázy stále neobsahujú dostatočné údaje o eukaryotických druhoch. Dôvodom je, že niektoré z nich po príprave vzoriek podľa predpísaných protokolov nedávajú spektrá, s ktorými by sa dalo ďalej pracovať. Medzi takéto mikroorganizmy môžu patriť napr. niektoré druhy

rodu *Cryptococcus*, ktoré produkujú extracelulárne polysacharidy, ale väčšinou aj ťažko zničiteľnú bariéru v podobe polysacharidovej kapsule.

Materiál a metódy

Kmene *Cryptococcus laurentii* zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, CCY 17-3-2, 17-3-7 až 17-3-11, 17-3-14, 17-3-17, 17-3-20 až 17-3-25 a 17-3-27, boli kultivované na šikmom sladínovom agare, ktorý slúži aj ako ich úschovné médium. Štvrtý a šiesty deň kultivácie boli očkovacou slučkou odobraté vzorky z kultúr (jedno očko) do mikroskúmvky s vrchnáčikom, premyté 7x vodou a potom vystavené na 20 min zmesi zloženej z kyseliny ferulovej (10 mg/ml) a kyseliny sinapovej (30 mg/ml) v 70% acetonitrile (ACN) s 3% kyselinou trifluóroctovou (TFA). Po centrifugácii sa naniesol 1 μ l supernatantu na meraciu platničku MTP 384 target plate polished steel T F (Bruker) a nechal vysušiť. Vzorky boli pripravené aj podľa postupu navrhnutého v manuáli softvéru Biotyper (Bruker) pre obtiažne prípady. MALDI-TOF MS merania boli robené na zariadení UltrafleXtreme (Bruker) v lineárnom pozitívnom móde pre oblasť m/z 0,2-22 kDa. Zariadenie bolo kalibrované na Cytochróm C (Sigma). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru Biotyper (Bruker).

Mikroskopické merania mikroorganizmu s maticou a bez matrice boli robené na mikroskope Nikon Eclipse 80i (CFI 15 \times 40) a dokumentované kamerou DS-Fil Nikon (5 Mpx rozlíšenie).

Výsledky a diskusia

Obr. 1 zobrazuje vybrané kmene *Cr. laurentii* v prítomnosti matrice, ktorá bola použitá na extrakciu ribozomálnych proteínov z buniek a súčasne na meranie týchto proteínov hmotnostnou spektrometriou.



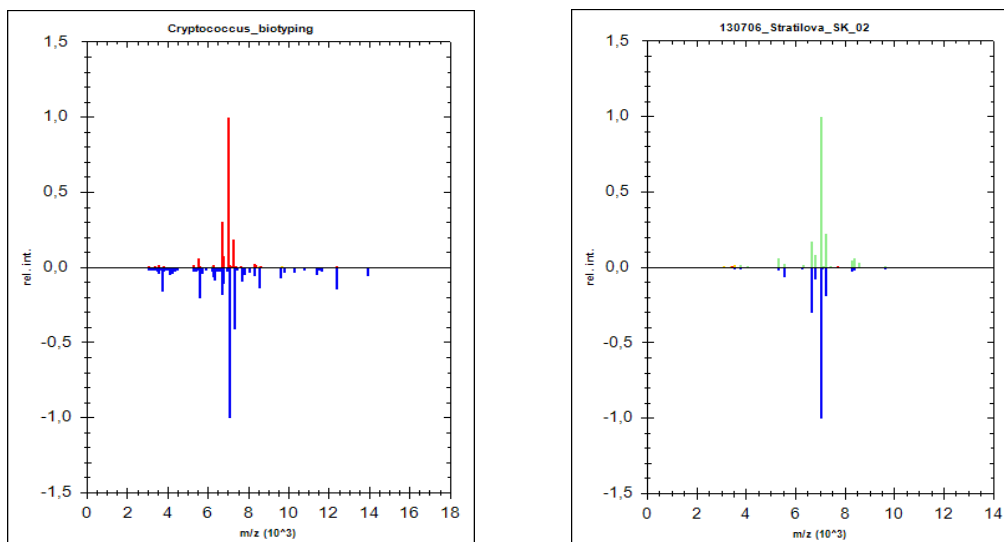
CCY 17-3-2

CCY 17-3-8

CCY 17-3-17

Obr. 1: Mikroskopia *Cr. laurentii* s kryštálkami matrice (kyselina ferulová a kyselina sinapová v 70% ACN s 3% TFA)

Kmene kvasiniek zaradené v Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, pod označeniami CCY 17-3-2, 17-3-7 až 17-3-11, 17-3-14, 17-3-17, 17-3-20 až 17-3-25 a 17-3-27 ako *Cr. laurentii*, vykazovali pri biotypizácii hmotnostnou spektrometriou dva typy rozdielnych spektier (Obr. 2, vľavo). Do prvej skupiny patril kmeň CCY 17-3-2 (typový kmeň *Cr. laurentii*), do druhej skupiny izoláty (spolu 14) z vody a sedimentov slovenských rybníkov, riek (Dunaj a Morava) ako aj lesnej a lúčnej pôdy. Všetky izoláty vykazovali vynikajúcu zhodu spektier so skóre vyšším ako 2,0 (vzor – Obr. 2 vpravo).



Obr. 2: Porovnanie čiarových spektier kmeňov CCY 17-3-17 a CCY 17-3-2 (typový kmeň *Cr. laurentii*) – vľavo a kmeňov CCY 17-3-17 a CCY 17-3-9 (skóre 2,138) - vpravo

Po identifikácii kmeňov z oboch skupín sekvenovaním D1/D2 LSUrRNA sa zistilo, že napriek rozdielnym spektrám patria všetky k druhu *Cr. laurentii*.

Záver:

Napriek tomu, že sme skúmané kmene rozdelili na základe spektier do dvoch skupín, sekvenovanie D1/D2 LSUrRNA preukázalo, že všetky mikroorganizmy patria k druhu *Cr. laurentii*. Predpokladáme identifikáciu dvoch variet, ktoré sa odlišujú v inej ako D1/D2 oblasti.

Literatúra

1. Ho Y-P, Reddy PM (2010) *Clin Chem* 56:525
2. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) *J Clin Microbiol* 48:900
3. Sugita T, Takashima M, Ikeda R, Nakase T, Shinoda T (2000) *J Clin Microbiol* 38:1468
4. Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T (2003) *Int J Sys Evol Microbiol* 53:1187

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.

Biotypizácia *Bulleromyces albus* pomocou hmotnostnej spektrometrie

Barbora Stratilová^{a,b}, Jakub Jäger^c, Jana Molnárová^a, Pavel Řehulka^d, Renáta Vadkertiová^a, Ján Mucha^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chemjmic@savba.sk

^bFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^cPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^dÚstav molekulární patologie FVZ UO, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Biotypizácia, *Bulleromyces albus*, hmotnostná spektrometria

Úvod

Bulleromyces albus je kvasinkový druh, ktorý umiestňujú fylogenetické stromy založené na porovnávaní D1/D2 LSUrRNA [Fell a kol., 2000] do bezprostrednej blízkosti kvasiniek patriacich do skupiny *Cryptococcus laurentii* (Tremellales → Indecorata). Podobne aj porovnávanie ITS oblasti ukázalo umiestnenie *Bulleromyces albus* vedľa *Cr. aureus*, *Cr. flavescens* a *Cr. laurentii*, ktoré tvoria prvú fylogenetickú skupinu *Cr. laurentii* [Takashima a kol., 2003]. Z tohto dôvodu môže dojsť pri identifikácii týchto mikroorganizmov klasickými metódami založenými na stanovení morfológických, fyziologických a biochemických vlastností k omylu.

Keďže sa identifikácia mikroorganizmov hmotnostnou spektrometriou stále viac stáva nerozlučnou súčasťou techník používaných pri taxonomickom zaraďovaní nových kmeňov do svetových Zbierok mikroorganizmov, testovali sme využiteľnosť tejto metódy pre skupinu *Cr. laurentii* napriek tomu, že existujú protichodné názory o vhodnosti tejto metódy pre rod *Cryptococcus* [Stevenson et al., 2010; Dhiman et al., 2011; Yan et al., 2011; McTaggart et al., 2011]. Pravdepodobnou príčinou je produkcia

extracelulárnych polysacharidov, ale väčšinou aj ťažko zničiteľnej bariéry v podobe polysacharidovej kapsule.

Náplňou tejto práce bola identifikácia troch izolátov z uhlia zo Zbieky kvasiniek CHÚ SAV, CCY 17-3-35, CCY 17-3-36 a CCY 17-3-37, ktoré boli pôvodne zaradené ako *Cr. laurentii*.

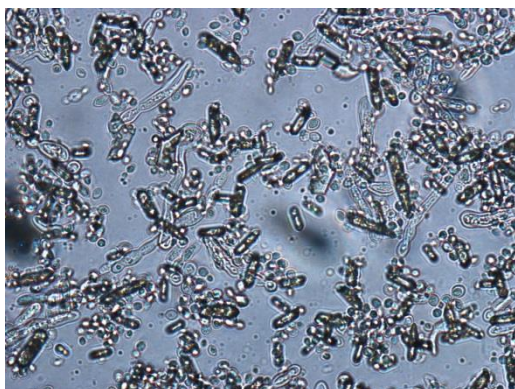
Materiál a metódy

Tri kmene zo Zbieky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, CCY 17-3-35, CCY 17-3-36 a CCY 17-3-37 (všetky tri izolované z uhlia, ČR), ktoré boli pôvodne zaradené ako *Cr. laurentii*, boli kultivované na šikmom sladínovom agare, ktorý slúži aj ako ich úschovné médium. Štvrtý a šiesty deň kultivácie boli očkovacou slučkou odobraté vzorky z kultúr (jedno očko) do mikroskúmavky s vrchnáčikom, premyté 7x vodou a potom vystavené na 20 min zmesi zloženej z kyseliny ferulovej (10 mg/ml) a kyseliny sinapovej (30 mg/ml) v 70% acetonitrile (ACN) s 3% kyselinou trifluóroctovou (TFA). Po centrifugácii sa naniesol 1 µl supernatantu na meráciu platničku MTP 384 target plate polished steel T F (Bruker) a nechal vysušiť. Vzorky boli pripravené aj podľa postupu navrhnutého v manuáli softvéru Biotyper (Bruker) pre obtiažne prípady. MALDI-TOF MS merania boli robené na zariadení UltrafleXtreme (Bruker) v lineárnom pozitívnom móde pre oblasť m/z 0,2-22 kDa. Zariadenie bolo kalibrované na Cytochróm C (Sigma). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru Biotyper (Bruker).

Mikroskopické merania mikroorganizmu s matricou a bez matrice boli robené na mikroskope Nikon Eclipse 80i (CFI 15 × 40) a dokumentované kamerou DS-Fil Nikon (5 Mpx rozlíšenie).

Výsledky a diskusia

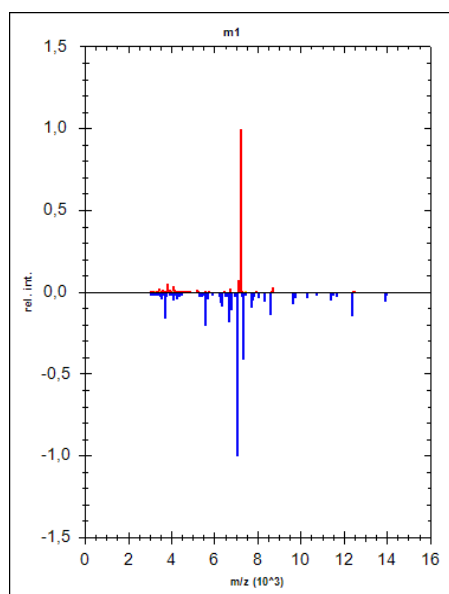
Obr. 1 zobrazuje kvasinku CCY 17-3-37 v prítomnosti matrice, ktorá bola použitá na extrakciu ribozomálnych proteínov z buniek a súčasne na meranie týchto proteínov hmotnostnou spektrometriou.



Obr. 1: Mikroskopia CCY 17-3-37 s kryštálkami matrice (kyselina ferulová a kyselina sinapová v 70% ACN s 3% TFA)

Obr. 2 zobrazuje spracované čiarové spektrum kmeňa CCY 17-3-37, ktoré bolo identické s čiarovými spektrami kmeňov CCY 17-3-38 a CCY 17-3-39. Takéto spracovanie údajov získaných hmotnostným spektrometrom umožňuje program Biotyper, ktorý potom údaje porovnáva so svojou databázou. Hodnoty podobnosti spektier sa pohybujú v rozmedzí 0-3, pričom o identifikácii kmeňa sa dá uvažovať pri hodnotách nad dva. Napriek tomu, že táto databáza obsahuje okolo sedem spektier, ktoré patria kmeňom rodu *Cryptococcus*, pri kultivácii sme vychádzali z požiadaviek na úschovu mikroorganizmov a nie protokolu predpísaného dodávateľom softvéru, takže sme nemohli využiť vyhodnocovanie proti databáze, ktoré tento softvér poskytuje. V prípade, že sme použili odporúčaný firemný postup pre elúciu intracelulárnych látok, v niektorých prípadoch sme vôbec nezískali spektrum, s ktorým by sa dalo ďalej pracovať. Vzhľadom na odlišnosť týchto spektier od zatiaľ získaných spektier kvasiniek skupiny *Cr. laurentii* (ako je možné pozorovať napr. na Obr. 2), bolo potrebné overiť pomocou molekulárno-biologických metód, či ide o ďalšieho zástupcu tejto skupiny alebo nie.

Identifikácia kmeňa CCY 17-3-35 sekvenovaním D1/D2 LSUrRNA vylúčila tento kmeň zo skupiny *Cr. laurentii* a ukázala, že ide o druh *Bulleromyces albus*.



Obr. 2: Čiarové spektrum kmeňa CCY 17-3-35 versus typového *Cr. laurentii* (skóre 0).

Záver:

Biotypizácia mikroorganizmov pomocou hmotnostnej spektrometrie je rýchlou, v prípade dostupnosti zariadenia lacnou a spoľahlivou metódou na stanovenie druhu aj tzv. obtiažnych prípadov, medzi aké nesporne patria kapsulárne kmene kvasiniek rodu *Cryptococcus*. V prípade troch kmeňov zaradených pôvodne ako *Cr. laurentii* naznačili spektrá, ktoré boli identické navzájom, ale naprosto odlišné od ostatných spektier získaných s kmeňmi skupiny *Cr. laurentii*, že je potrebná analýza pomocou sekvenovania D1/D2 LSUrRNA. Táto definitívne ukázala, že ide o druh *Bulleromyces albus*. Získané spektrá môžu byť v budúcnosti využité pri identifikácii u nových izolátov.

Literatúra

1. Dhiman N, Hall L, Wohlfel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL (2011) *J Clin Microbiol* 49:1614
2. Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A (2000) *Int J Sys Evol Microbiol* 50:1351
3. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A., Zhang SX (2011) *J Clin Microbiol* 49:3050
4. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR (2010) *J Clin Microbiol* 48:3482
5. Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T (2003) *Int J Sys Evol Microbiol* 53:1187
6. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton ChW, Kostrzewa M, Tang Y-W (2011) *J Clin Microbiol* 49:2528

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.

Biotypizácia *Cryptococcus magnus* pomocou hmotnostnej spektrometrie

Barbora Stratilová^{a,b}, Jakub Jäger^c, Jana Molnárová^a, Pavel Řehulka^d, Renáta Vadkertiová^a, Ján Mucha^{a,*}

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

^bFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^cPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^dÚstav molekulární patologie FVZ UO, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Biotypizácia, *Cryptococcus magnus*, hmotnostná spektrometria, kapsula, polysacharidy

Úvod

Identifikácia mikroorganizmov hmotnostnou spektrometriou sa stále viac stáva nerozlučnou súčasťou techník používaných v medicínskych diagnostických laboratóriách pre rýchle rozpoznanie patogénov [van Veen et al., 2010; Ho a Reddy, 2010; Stevenson et al., 2010; Dhiman et al., 2011; Yan et al., 2011] ako aj pri taxonomickom zaraďovaní nových kmeňov. Táto metóda je dokonca využiteľná aj na úrovni variety [McTaggart et al., 2011].

Kým identifikácia prokaryontov je jednoduchšia a jednoznačnejšia, vďaka čomu sa využíva rutinne, databázy stále neobsahujú dostatočné údaje o eukaryotických druhoch. Niektoré z nich jednoducho po príprave vzoriek podľa predpísaných protokolov nedávajú spektrá, s ktorými by sa dalo ďalej pracovať. Medzi takéto mikroorganizmy môžu patriť napr. niektoré druhy rodu *Cryptococcus*, kvasinky, ktorá produkuje jednak extracelulárne polysacharidy, ale väčšinou aj ťažko zničiteľnú bariéru v podobe polysacharidovej kapsule.

Náplňou tejto práce bolo overiť, či sa metóda biotypizácie pomocou hmotnostnej spektrometrie dá aplikovať na kmene druhu *Cryptococcus magnus*. V prípade získania reprodukovateľného spektra by toto mohlo v budúcnosti slúžiť ako referenčné pre potreby Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV.

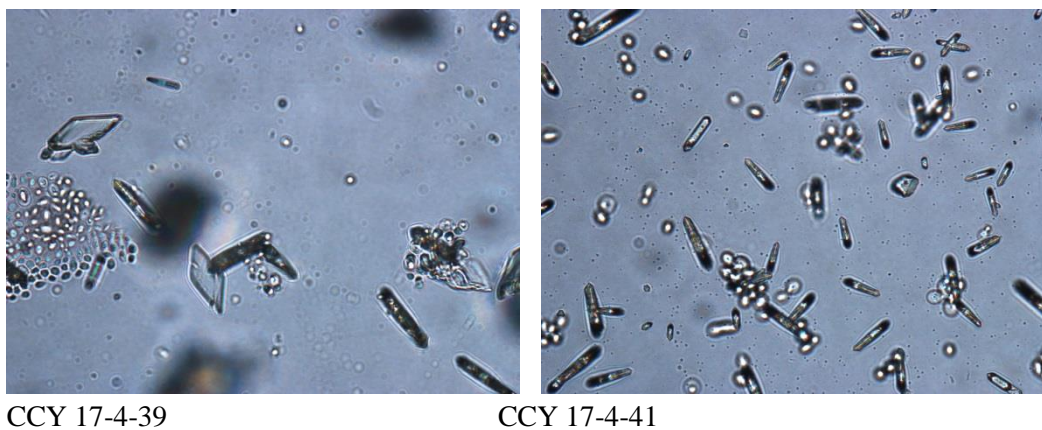
Materiál a metódy

Tri kmene *Cryptococcus magnus* zo Zbieky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, CCY 17-4-39, 17-4-40 a 17-4-41, boli kultivované na šikmom agare, ktorý slúži aj ako ich úschovné médium. Štvrtý a šiesty deň kultivácie boli očkovačou slučkou odobraté vzorky z kultúr (jedno očko) do mikroskúmvky s vrchnáčikom, premyté 7x vodou a potom vystavené na 20 min zmesi zloženej z kyseliny ferulovej (10 mg/ml) a kyseliny sinapovej (30 mg/ml) v 70% acetonitrile (ACN) s 3% kyselinou trifluóroctovou (TFA). Po centrifugácii sa naniesol 1 µl supernatantu na meraciu platničku MTP 384 target plate polished steel T F (Bruker) a nechal vysušiť. Vzorky boli pripravené aj podľa postupu navrhnutého v manuáli softvéru Biotyper (Bruker) pre obtiažne prípady. MALDI-TOF MS merania boli robené na zariadení UltrafleXtreme (Bruker) v lineárnom pozitívnom móde pre oblasť m/z 0,2-22 kDa. Zariadenie bolo kalibrované na Cytochróm C (Sigma). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru Biotyper (Bruker).

Mikroskopické merania mikroorganizmu s matricou a bez matrice boli robené na mikroskope Nikon Eclipse 80i (CFI 15 × 40) a dokumentované kamerou DS-Fil Nikon (5 Mpx rozlíšenie).

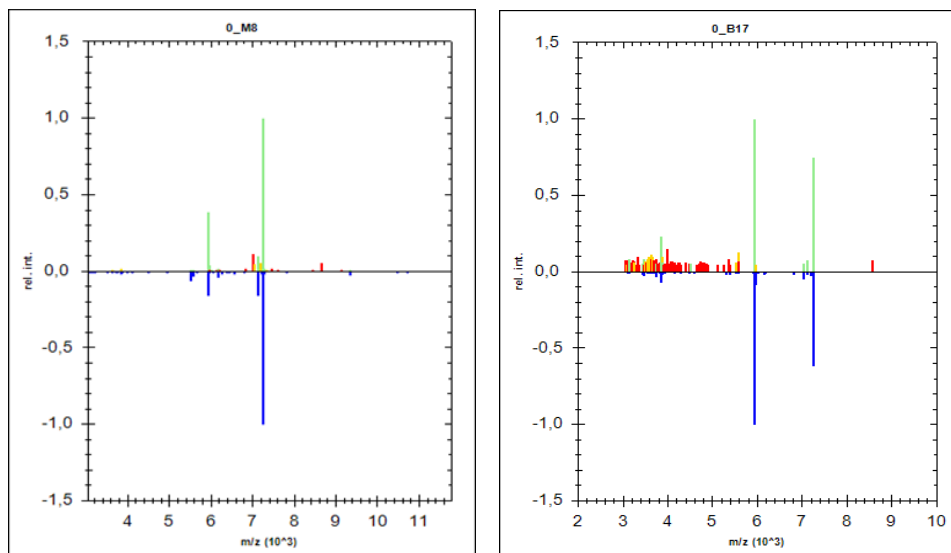
Výsledky a diskusia

Obr. 1 zobrazuje vybrané kmene *Cr. magnus* v prítomnosti matrice, ktorá bola použitá na extrakciu ribozomálnych proteínov z buniek a súčasne na meranie týchto proteínov hmotnostnou spektrometriou.



Obr. 1: Mikroskopia *Cr. rmagnus* s kryštálkami matrice (kyselina ferulová a kyselina sinapová v 70% ACN s 3% TFA)

Program Biotyper umožňuje spracovanie údajov do tzv. čiarových spektier, ktoré potom porovnáva so svojou databázou. Hodnoty podobnosti spektier sa pohybujú v rozmedzí 0-3, pričom o jednoznačnej identifikácii kmeňa sa dá uvažovať pri hodnotách nad dva. Hodnoty nad 1,8 naznačujú, že by mohlo ísť o daný kmeň. Napriek tomu, že táto databáza obsahuje okolo sedem spektier, ktoré patria druhom rodu *Cryptococcus*, pri kultivácii sme vychádzali z požiadaviek na úschovu mikroorganizmov a nie protokolu predpísaného dodávateľom softvéru, takže sme nemohli využiť vyhodnocovanie proti databáze, ktoré tento softvér poskytuje. V prípade, že sme použili firemný postup pre elúciu intracelulárnych látok, v niektorých prípadoch sme vôbec nezískali spektrum, s ktorým by sa dalo ďalej pracovať. Pravdepodobným dôvodom sú extracelulárne a kapsulárne polysacharidy typické pre rod *Cryptococcus*. Obr. 2 ukazuje čiarové spektrá sekvenovaných kmeňov CCY 17-4-41 a CCY 17-4-39 (skóre 2,070) a porovnanie spektier sekvenovaného kmeňa CCY 17-4-41 a nesekvenovaného 17-4-40 (vpravo, skóre 1,91). V druhom prípade vidíme, že hlavné píky sú identické pre oba kmene, zníženie skóre je zapríčinené výskytom početného množstva látok, ktoré sa v referenčnej vzorke nevyskytujú. Na základe porovnania výsledkov zo sekvenácie a hmotnostnej spektrometrie sa dá konštatovať, že druh sa dá spoľahlivo rozlíšiť už na základe hlavných píkov. K tomuto záveru dospela pravdepodobne aj McTaggart a kol. [2011], ktorí navrhli pre rod *Cryptococcus* znížiť identifikačné skóre z dvoch na 1,8 a pravdepodobnostné skóre z 1,8 na 1,6.



Obr. 2: Porovnanie čiarových spektier sekvenovaných kmeňov CCY 17-4-41 a CCY 17-4-39 (vľavo, skóre 2,070) a sekvenovaného kmeňa CCY 17-4-41 a nesequenovaného 17-4-40 (vpravo, skóre 1,91).

Záver:

Biotypizácia mikroorganizmov pomocou hmotnostnej spektrometrie je rýchlou, v prípade dostupnosti zariadenia lacnou a spoľahlivou metódou na stanovenie aj tzv. obtiažnych prípadov, medzi aké patria kapsulárne kvasinky druhu *Cr. magnus*. Rozhodujúcou je metóda prípravy vzorky, ktorá musí zaručiť reprodukovateľné uvoľňovanie látok z bunky mikroorganizmov a existencia štandardu v databáze (či už komerčnej alebo vlastnej) získaného rovnakým postupom ako sa získala vzorka. Práve na referenčné účely budú v budúcnosti slúžiť spektrá získané v tejto práci.

Literatúra

1. Dhiman N, Hall L, Wohlfel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL (2011) *J Clin Microbiol* 49:1614
2. Ho Y-P, Reddy PM (2010) *Clin Chem* 56:4, 525
3. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A., Zhang SX (2011) *J Clin Microbiol* 49:3050
4. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR (2010) *J Clin Microbiol* 48:3482
5. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) *J Clin Microbiol* 48:900
6. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton ChW, Kostrzewa M, Tang Y-W (2011) *J Clin Microbiol* 49:2528

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.

Identifikácia kvasinkovitých mikroorganizmov skupiny *Cryptococcus laurentii* pomocou hmotnostnej spektrometrie – druh *Cryptococcus carnescens* (fylogenetická skupina II)

Jakub Jäger^a, Barbora Stratilová^{b,c}, Jana Molnárová^b, Pavel Řehulka^d, Jiřina Omelková^a, Renáta Vádkertiová^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chemevi@savba.sk

^cPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^dÚstav molekulární patologie FVZ UO, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Biotypizácia, *Cryptococcus carnescens*, hmotnostná spektrometria

Úvod

Identifikácia mikroorganizmov hmotnostnou spektrometriou sa stále viac stáva nerozlučnou súčasťou techník používaných v medicínskych diagnostických laboratóriách [van Veen et al., 2010; Ho a Reddy ,2010] a pri taxonomickom zaradovaní nových kmeňov. Kým identifikácia prokaryontov je jednoduchšia a jednoznačnejšia, vďaka čomu sa využíva rutinne, databázy stále neobsahujú dostatočné údaje o eukaryotických druhoch. Niektoré z nich jednoducho po príprave vzoriek podľa predpísaných protokolov nedávajú spektrá, s ktorými by sa dalo ďalej pracovať. Medzi takéto mikroorganizmy môžu patriť napr. niektoré druhy rodu *Cryptococcus*, kvasiniek, ktoré produkujú jednak extracelulárne polysacharidy, ale väčšinou aj ťažko zničiteľnú bariéru v podobe polysacharidovej kapsule. Napriek tomu už boli publikované prvé práce o identifikácii týchto mikroorganizmov hmotnostnou spektrometriou, ktoré boli zamerané najmä na patogénne druhy *Cr. neoformans* a *Cr. gattii* a ich variety [Stevenson et al., 2010; Dhiman et al., 2011; Yan et al., 2011; McTaggart et al., 2011]. Stále častejšie sa však objavujú prípady, kedy sa patogénmi stávajú druhy, ktoré sa pôvodne považovali za neškodné, ako napr. mikroorganizmy skupiny *Cr. laurentii* [Sugita a kol. 2000; Takashima et al. 2003]. Práve túto značne rôznorodú skupinu sme sa rozhodli preveriť pomocou hmotnostnej spektrometrie. Za základ nám slúžili kmene uchovávané v Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV.

Náplňou tejto práce bola biotypizácia kmeňa CCY 17-3-13 izolovaného z vôd Dunaja a zaradeného v Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ako *Cryptococcus laurentii*.

Materiál a metódy

Kmeň označený ako *Cryptococcus laurentii* CCY 17-3-13 bol kultivovaný na sladinovom šikmom agare, ktorý slúži aj ako jeho úschovné médium. Štvrtý a šiesty deň kultivácie boli očkovacou slučkou odobraté vzorky (jedno očko) do mikroskúmvky s vrchnáčikom, premyté 7x vodou a potom vystavené na 20 min zmesi zloženej z kyseliny ferulovej (10 mg/ml) a kyseliny sinapovej (30 mg/ml) v 70% acetonitrile (ACN) s 3% kyselinou trifluóroctovou (TFA). Po centrifugácii sa naniesol 1 µl supernatantu na meráciu platničku MTP 384 target plate polished steel T F (Bruker) a nechal vysušiť. Vzorky boli pripravené aj podľa postupu navrhnutého v manuáli softvéru Biotyper (Bruker) pre obtiažne prípady. MALDI-TOF MS merania boli robené na zariadení UltrafleXtreme (Bruker) v lineárnom pozitívnom móde pre oblasť m/z 0,2-22 kDa. Zariadenie bolo kalibrované na Cytochróm C (Sigma). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru Biotyper (Bruker). Spracované spektrum bolo porovnané so spektrami ostatných kvasiniek zo zbierky, ktoré boli zaradené do skupiny *Cr. laurentii*. Mikroskopické merania mikroorganizmu s maticou a bez matrice boli robené na mikroskope Nikon Eclipse 80i (CFI 15 × 40) a dokumentované kamerou DS-Fil Nikon (5 Mpx rozlíšenie).

Výsledky a diskusia

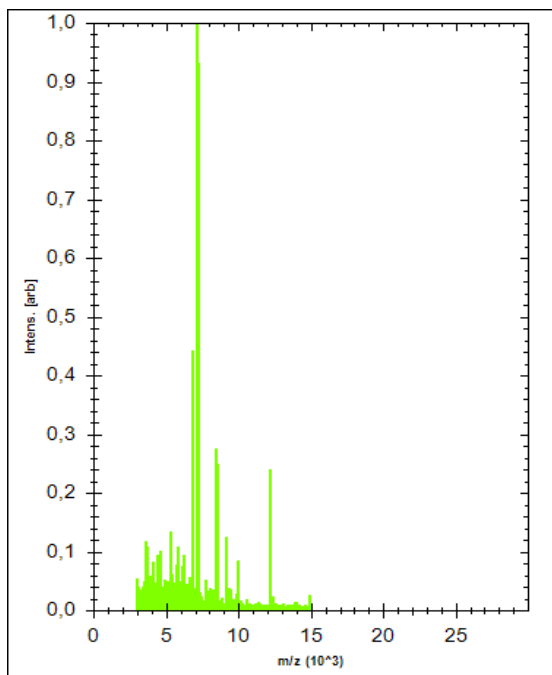
Obr. 1 zobrazuje kvasinku v prítomnosti matrice, ktorá bola použitá na extrakciu ribozomálnych proteínov z buniek a súčasne na meranie týchto proteínov hmotnostnou spektrometriou.



Obr. 1: Mikroskopia CCY 17-3-13 s kryštálkami matrice (kyselina ferulová a kyselina sinapová v 70% ACN s 3% TFA)

Porovnanie spracovaného spektra kmeňa CCY 17-3-13 (Obr. 2) so spektrami všetkých kmeňov, ktoré boli pôvodne zaradené do skupiny *Cr. laurentii* ukázalo, že sa toto spektrum odlišuje od všetkých ostatných.

Následná identifikácia tohto kmeňa sekvenovaním D1/D2 LSU rRNA ho zaradila ako *Cr. carnescens* do druhej fylogenetickej skupiny kvasiniek *Cr. laurentii* [Sugita a kol. 2000; Takashima et al. 2003].



Obr. 2: Čiarové spektrum kmeňa CCY 17-3-13

Záver:

Biotypizácia mikroorganizmov pomocou hmotnostnej spektrometrie je rýchlou a v prípade dostupnosti zariadenia aj lacnou a spoľahlivou metódou na stanovenie druhu, prípadne variety. V tomto prípade, keďže sme nemali k dispozícii referenčné spektrum, viedla k následnej identifikácii kmeňa sekvenovaním D1/D2 LSUrRNA. Kmeň bol zaradený ako *Cr. carnescens* do druhej fylogenetickej skupiny *Cr. laurentii*. Spektrum bude slúžiť ako referenčné pri pomocných stanoveniach druhu u nových izolátov.

Literatúra

1. Dhiman N, Hall L, Wohlfel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL (2011) *J Clin Microbiol* 49:1614
2. Ho Y-P, Reddy PM (2010) *Clin Chem* 56:4, 525
3. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A., Zhang SX (2011) *J Clin Microbiol* 49:3050
4. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR (2010) *J Clin Microbiol* 48:3482
5. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) *J Clin Microbiol* 48:900
6. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton ChW, Kostrzewa M, Tang Y-W (2011) *J Clin Microbiol* 49:2528
7. Sugita T, Takashima M, Ikeda R, Nakase T, Shinoda T (2000) *J Clin Microbiol* 38:1468
8. Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T (2003) *Int J Sys Evol Microbiol* 53:1187

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.

Biotypizácia kvasiniek *Cryptococcus flavus* pomocou hmotnostnej spektrometrie

Jakub Jäger^a, Barbora Stratilová^{b,c}, Jana Molnárová^b, Pavel Řehulka^d, Renáta Vadkertiová^b, Ján Mucha^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chemevi@savba.sk

^cPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^dÚstav molekulární patologie FVZ UO, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Biotypizácia, *Cryptococcus flavus*, hmotnostná spektrometria, kapsula, polysacharidy

Úvod

Identifikácia mikroorganizmov hmotnostnou spektrometriou sa stále viac stáva nerozlučnou súčasťou techník používaných v medicínskych diagnostických laboratóriách [van Veen et al., 2010; Ho a Reddy, 2010], ako aj pri taxonomickom zaraďovaní nových kmeňov. Kým identifikácia prokaryontov je jednoduchšia a reprodukovateľnejšia, vďaka čomu sa využíva rutinne, databázy stále neobsahujú dostatočné údaje o eukaryotických druhoch. Dôvodom je, že vo vysokom percente prípadov po príprave vzoriek podľa predpísaných protokolov sa nezískajú interpretovateľné spektrá. Medzi takéto mikroorganizmy môžu patriť napr. niektoré druhy rodu *Cryptococcus*, kvasiniek, ktoré produkujú veľké

množstvá extracelulárnych polysacharidov. Väčšina z nich je navyše obalená ťažko zničiteľnou bariérou v podobe polysacharidovej kapsule. Napriek tomu už boli publikované prvé práce o identifikácii týchto mikroorganizmov hmotnostnou spektrometriou, ktoré boli zamerané najmä na patogénne druhy *Cr. neoformans* a *Cr. gattii* [Stevenson et al., 2010; Dhiman et al., 2011; Yan et al., 2011; McTaggart et al., 2011]. Problémom je, že sa stále častejšie objavujú prípady, kedy sa patogénmi stávajú aj druhy, ktoré sa pôvodne považovali za neškodné, ako napr. mikroorganizmy skupiny *Cr. laurentii* [Sugita a kol. 2000; Takashima et al. 2003]. Práve túto značne rôznorodú skupinu sme sa rozhodli preveriť pomocou hmotnostnej spektrometrie. Za základ nám slúžili kmene uchovávané v Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV.

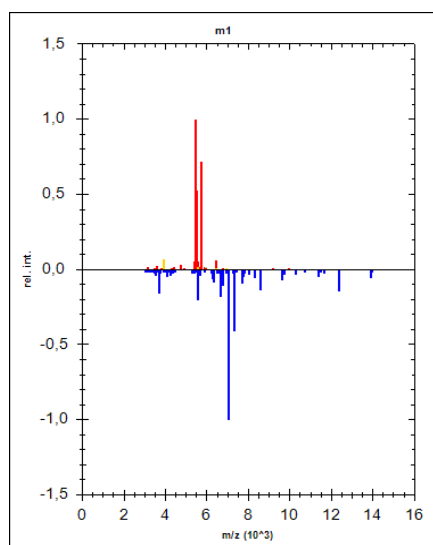
Náplňou tejto práce bola biotypizácia kmeňa CCY 17-3-5 zaradeného v Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ako *Cryptococcus laurentii*.

Materiál a metódy

Kmeň označený v Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ako *Cryptococcus laurentii* (CCY 17-3-5), bol kultivovaný na šikmom sladínovom agare, ktorý slúžil aj ako jeho úschovné médium. Štvrtý a šiesty deň kultivácie boli očkovačou slučkou odobraté vzorky (jedno očko) do mikroskúmavky s vrchnáčikom, premyté 7x vodou a potom vystavené na 20 min zmesi zloženej z kyseliny ferulovej (10 mg/ml) a kyseliny sinapovej (30 mg/ml) v 70% acetonitrile (ACN) s 3% kyselinou trifluóroctovou (TFA). Po centrifugácii sa naniesol 1 μ l supernatantu na meraciu platničku MTP 384 target plate polished steel T F (Bruker) a nechal vysušiť. Vzorka bola pripravená aj podľa postupu navrhnutého v manuáli softvéru Biotyper (Bruker) pre obtiažne prípady. MALDI-TOF MS merania boli robené na zariadení UltrafleXtreme (Bruker) v lineárnom pozitívnom móde pre oblasť m/z 0,2-22 kDa. Zariadenie bolo kalibrované na Cytochróm C (Sigma). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru Biotyper (Bruker). MS spektrá boli porovnávané so spektrami typového kmeňa *Cr. laurentii*.

Výsledky a diskusia

Porovnanie spracovaného spektra kmeňa CCY 17-3-5 so spektrom typovej kvasinky *Cr. laurentii* poukázalo na 100% nezhodu oboch spektier (Obr. 1). Rovnaký výsledok sa získal porovnaním tohto spektra so spektrami všetkých kmeňov, ktoré boli pôvodne zaradené do skupiny *Cr. laurentii*.



Obr. 1: Porovnanie MS spektier typového kmeňa *Cr. laurentii* (CCY 17-3-2) a kmeňa CCY 17-3-5 (skóre 0)

Záver:

Kmeň CCY 17-3-5 vykazoval v porovnaní s typovým kmeňom *Cr. laurentii* (CCY 17-3-2) nezhodné MS spektrum ribozomálnych proteínov (skóre 0). Na základe D1/D2 LSU rRNA sekvenovania bol kmeň identifikovaný ako *Cr. flavus* a vyradený zo skupiny *Cr. laurentii*.

Literatúra

1. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL (2011) *J Clin Microbiol* 49:1614
2. Ho Y-P, Reddy PM (2010) *Clin Chem* 56:4, 525
3. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A., Zhang SX (2011) *J Clin Microbiol* 49:3050
4. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR (2010) *J Clin Microbiol* 48:3482
5. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) *J Clin Microbiol* 48:900
6. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton ChW, Kostrzewa M, Tang Y-W (2011) *J Clin Microbiol* 49:2528
7. Sugita T, Takashima M, Ikeda R, Nakase T, Shinoda T (2000) *J Clin Microbiol* 38:1468
8. Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T (2003) *Int J Sys Evol Microbiol* 53:1187

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.

Atómová silová mikroskopia pre štúdium kapsulárnych kvasiniek

Barbora Stratilová^{a,b}, Jaroslav Filip^a, Jakub Jäger^c, Jana Molnárová^a, Renáta Vadkertiová^a, Jiřina Omelková^c, Ján Mucha^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chemjmic@savba.sk

^bPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^cFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

Kľúčové slová

Atómová silová mikroskopia, AMF, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus flavus*, kapsula

Úvod

Kvasinky rodu *Cryptococcus* patria medzi všeobecne rozšírené patogény. Neslávne známymi zástupcami sú *Cryptococcus neoformans* a *Cryptococcus gattii*, ktorí sú priamymi pôvodcami kryptokokálnej meningitídy, najmä medzi jedincami so zníženou imunitou. Ich najdôležitejším virulentným faktorom je polysacharidová kapsula, ktorá ich chráni pred nepriaznivými podmienkami prostredia vrátane imunitnej odpovede napadnutého organizmu [Pirofski a Casadevall, 1996]. Rearanžovanie kapsule počas pučania, resp. uvoľňovanie kapsulárnych polysacharidov do prostredia, bolo opísané ako dôsledok fyzikálnych dejov (Zaragoza et al., 2006). Títo autori predpokladajú, že existuje mechanizmus, ktorý blokuje výmenu kapsulárneho materiálu medzi materskou a dcérskou bunkou pri pučaní. Zistili, že uvoľnenie kapsuly počas pučania nastane v oblasti pučania bez súčasnej

degradácie kapsuly. Keďže pučanie naznačuje degradáciu bunkovej steny a kapsula je spojená s bunkovou stenou, sú pravdepodobne vlákna kapsuly uvoľňované pomocou reorganizovania bunkovej steny a nie priamou degradáciou kapsulárnych polysacharidov. V štúdiu rodu *Cryptococcus* zostáva tento jav kľúčovým bodom, ktorý je potrebné ďalej skúmať (Zaragoza a kol., 2009).

V tejto práci sme sa venovali pozorovaniu povrchu dvoch kapsulárnych kmeňov z rodu *Cryptococcus*, *Cryptococcus flavus*, ktorý pochádzal z listov ovocného stromu a *Cryptococcus laurentii*, ktorý bol izolovaný z vody rieky Dunaj. Povrch buniek bol študovaný pomocou atómového silového mikroskopu, ktorý okrem celkového obrazu bunky je schopný poskytnúť aj údaje o vybraných charakteristikách povrchu.

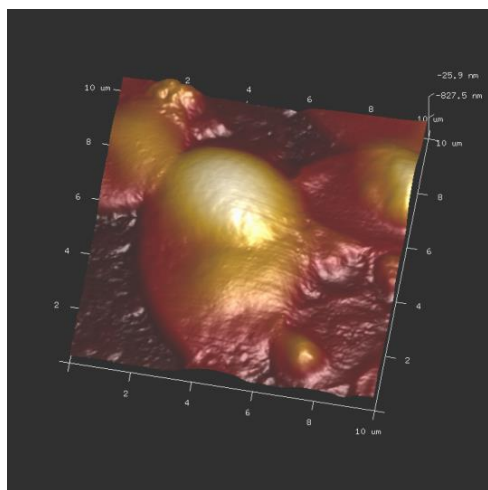
Materiál a metódy

Dva kmene rodu *Cryptococcus*, *Cryptococcus flavus* CCY 17-3-5 a *Cryptococcus laurentii* CCY 17-3-17 zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, boli kultivované na šikmom sladínovom agare. Po narastení kultúr boli pripravené mikroskopické preparáty vo vodnej kvapke, ktorá bola následne vysušená nad plameňom. Ďalším 20 min zahrievaním nad plameňom boli bunky fixované na podložné sklíčko. Takto pripravené preparáty boli použité na sledovanie dehydratovaných kapsulárnych buniek atómovou silovou mikroskopiou na zariadení Bioscope Catalyst (Bruker) pomocou naostreného silikónového hrotu na nitridovej páčke (model SCANASYST-AIR, Bruker).

Výsledky a diskusia

Atómová silová mikroskopia preukázala, že bunky napriek intenzívnemu zahrievaniu nad plameňom nevykazujú žiadne známky dehydratácie (Obr. 1, 2). Povrch buniek vyzerá kompaktný (Obr. 1, 2), čo je v rozpore s vláknitou štruktúrou kapsule pozorovanou skenovacou elektrónovou mikroskopiou (Van Duin a kol., 2004). Tento jav sa dá pripísať práve dehydratácii kapsule, ktorá vytvorila pri zahrievaní okolo bunky kompaktný obal, čím ju chránila pred stratou tekutín. Toto pozorovanie je v súlade so závermi Zaragoza a kol. (2006), ktorí opísali zmenšenie objemu kapsule v dôsledku pôsobenia rôznych fyzikálnych a chemických faktorov, ktoré by mohli poškodiť bunky.

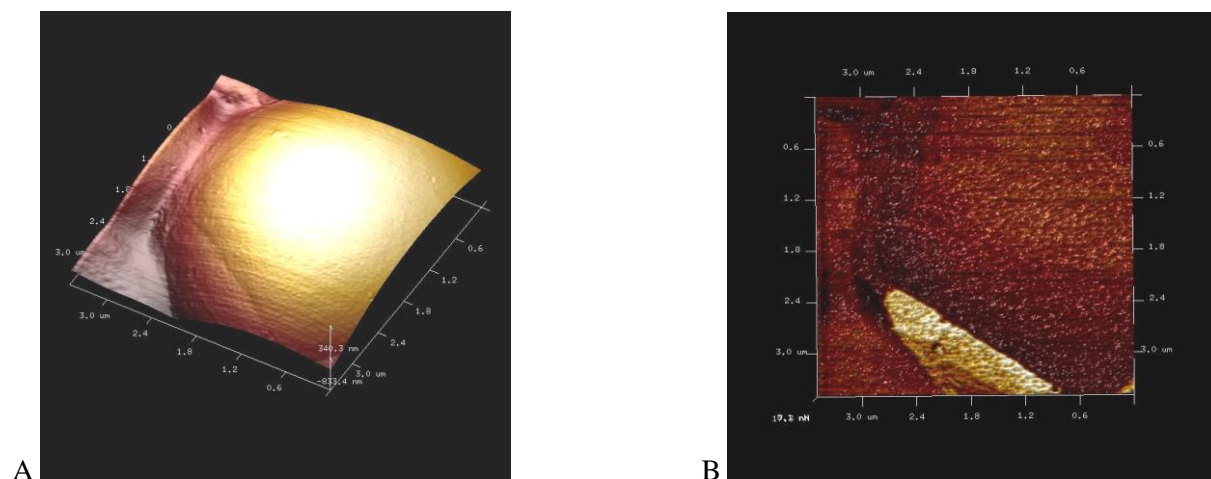
Bunky boli navzájom doslova pozliepané vysušenými extracelulárnymi polysacharidmi, čo je dobre viditeľné najmä v prípade kmeňa *Cr. flavus* (Obr. 1).



Obr. 1: Atómová silová mikroskopia kmeňa CCY CCY 17-3-5, *Cr. flavus*

V prípade *Cryptococcus laurentii* (Obr. 2) sa podarilo nájsť jazvu po pučaní a oddelení buniek (Obr. 2A), pričom práve vďaka použitému zariadeniu sa podarilo zistiť, že celý povrch ohraničený jazvou vykazuje iné vlastnosti (adhézia a rozptyl) ako zvyšok povrchu (Obr. 2B). Toto zistenie by mohlo súvisieť s iným zložením polysacharidov, ktoré tvoria povrch v mieste oddelenia dcérskej bunky. Otázne

je, či sa pozeráme na polysacharidy kapsule alebo bunkovej steny. Nové informácie by mohlo priniesť preskúmanie daného miesta pomocou Ramanovej mikroskopie. Vzhľadom na to, že podľa Zaragoza a kol. (2009) uvoľnenie kapsúl počas pučania nastane v oblasti pučania bez súčasnej degradácie kapsúl, je dôležité aj zodpovedať otázku, či prípadné rozdiely súvisia s pozorovaním iných druhov rodu *Cryptococcus*.



Obr. 2: Atómová silová mikroskopia kmeňa CCY CCY 17-3-17, *Cr. laurentii*.

A – zobrazenie povrchu bunky s jazvou,
B – vlastnosti povrchu ako adhézia a rozptyl.

Literatúra

1. Pirofski L. A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriolog.* 284: 475
2. Van Duin D, Cleare W, Zaragoza O, Casadevall A, Nosanchuk JD. (2004) [Antimicrob. Agents Chemother.](#) 48:2014
3. Zaragoza O, Telzak A, Bryan AR, Dadachova E, Casadevall A (2006) *Mol. Microbiol.* 59:67
4. Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A (2009) *Adv. Appl. Microbiol.* 68:133

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. Študijný pobyt Bc. Jakuba Jägera na CHÚ SAV bol finančne podporovaný z projektu BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt je realizovaný v rámci Operačného programu vzdelávania pro konkurenceschopnost, ktorý je spolufinancovaný z Európskeho sociálneho fondu a štátneho rozpočtu ČR.

Optimalizácia metódy na prípravu vzorky pre identifikáciu kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* pomocou hmotnostnej spektrometrie

Barbora Stratilová^{ab}, Jakub Jäger^c, Pavel Řehulka^d, Renáta Vadkertiová^a, Ján Mucha^{a,*}

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

^bPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^cFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^dÚstav molekulární patologie FVZ UO, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Biotypizácia, skupina *Cryptococcus laurentii*, hmotnostná spektrometria, kapsula, polysacharidy

Úvod

Biotypizácia patogénnych prokaryontov pomocou hmotnostnej spektrometrie sa stala nerozlučnou súčasťou techník, ktoré sa využívajú v medicínskych diagnostických laboratóriách [van Veen et al., 2010; Ho a Reddy, 2010] a pri taxonomickom zaraďovaní nových kmeňov. Rutinnú identifikáciu baktérií umožňuje reprodukovateľnejšia kultivácia, jednoduchšie uvoľňovanie ribozomálnych proteínov z buniek a absencia väčšieho množstva kontaminujúcich látok v kultivačnom médiu, vďaka čomu sa získavajú reprodukovateľné prehľadné spektrá vedúce k jednoznačnej interpretácii, ktorá následne umožňuje automatizáciu stanovenia. Toto je dôvodom, prečo existujúce databázy spektier stále neobsahujú dostatočné údaje o eukaryotických druhoch. Niektoré z nich jednoducho po príprave vzoriek

podľa predpísaných protokolov nedávajú spektrá, s ktorými by sa dalo ďalej pracovať. Medzi takéto mikroorganizmy môžu patriť aj niektoré druhy rodu *Cryptococcus*, kvasinkového mikroorganizmu, ktorý produkuje jednak extracelulárne polysacharidy, ale väčšinou aj ťažko zničiteľnú bariéru v podobe polysacharidovej kapsule. Napriek určitým ťažkostiam sa začínajú objavovať práce týkajúce sa eukaryontov a v rámci nich aj vybraných mikroorganizmov rodu *Cryptococcus* [Stevenson et al., 2010; Dhiman et al., 2011; Yan et al., 2011; McTaggart et al., 2011].

Náplňou tejto práce bolo vypracovať vhodnú metódu prípravy vzoriek z kmeňov skupiny *Cr. laurentii* pre získanie optimálnych spektier použiteľných na biotypizáciu hmotnostnou spektrometriou. Výsledky získané optimalizovanou metódou boli porovnané s komerčnou metódou navrhnutou pre obtiažne prípady, ktorá je ponúkaná spolu s porovnávacím programom a databázou.

Materiál a metódy

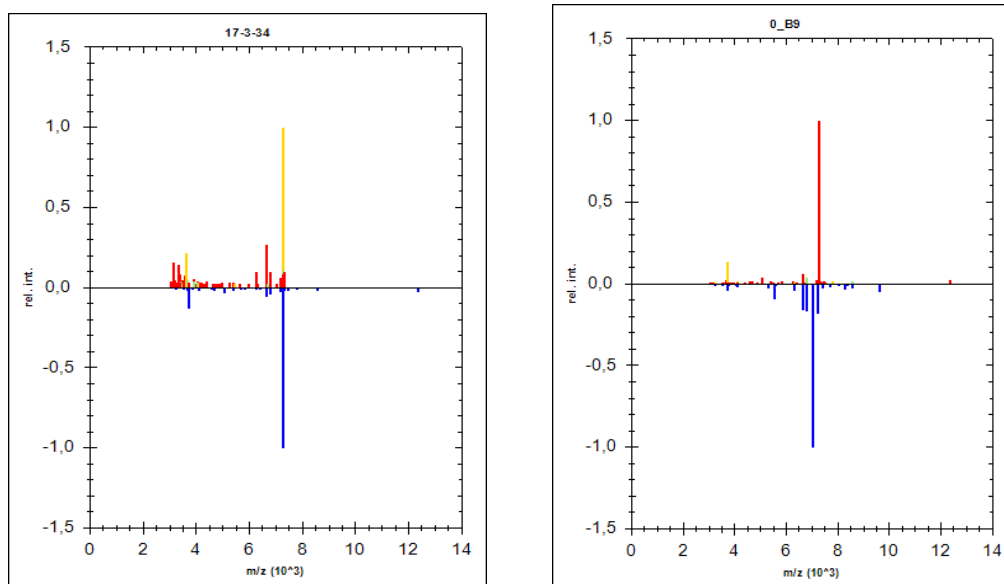
Sedem kmeňov *Cryptococcus laurentii* zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, CCY 17-3-5, CCY 17-3-15, CCY 17-3-17, CCY 17-3-29, CCY 17-3-33, CCY 17-3-34 a CCY 17-3-38, bolo kultivovaných na šikmom sladínovom agare, ktorý slúži aj ako ich úschovné médium. Štvrtý deň kultivácie boli očkovacou slučkou odobraté vzorky z kultúr (jedno očko) do mikroskúmaviek s vrchnáčikom. Dve vzorky z každého kmeňa boli premyté 5x vodou, 10x vodou alebo 1x vodou a potom 1x 33% etanolom. Takto premyté vzorky boli alebo vystavené na 20 min zmesi zloženej z kyseliny ferulovej (10 mg/ml) a kyseliny sinapovej (30 mg/ml) v 70% acetonitrile (ACN) s 3% kyselinou trifluóroctovou (TFA), pričom sa po centrifugácii naniesol 1 µl supernatantu na meraciu platničku MTP 384 target plate polished steel T F (Bruker) a nechal vysušiť, alebo 70% kyseliny mravčej s koncentrovaným ACN (1:1) na 30 min, po čom nasledovala centrifugácia a nanosenie alebo 1 µl supernatantu na platňu, vysušenie a prídanie 1 µl matrice (CHCA - kyselina hydroxyškoricová, 10 mg/ml v TFA : voda : ACN, 2,5% : 47,5% : 50% alebo kyselina ferulová, 10 mg/ml a kyselina sinapová, 30 mg/ml v 70% ACN) alebo bol na platničku nanosený 1 µl zmesného roztoku vzorky a jednej alebo druhej matrice. MALDI-TOF MS merania boli robené na zariadení UltrafleXtreme (Bruker) v lineárnom pozitívnom móde pre oblasť m/z 2-22 kDa. Zariadenie bolo kalibrované na Cytochróm C (Sigma). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru Biotyper (Bruker).

Výsledky a diskusia

Premývanie buniek vodou sa ukázalo efektívnejšie (aj keď zdĺhavejšie) ako vodou a 33% etanolom, ktoré je doporučené pre problematiku prípadov v manuáli softvéru Biotyper. Premývanie vodou 5x bolo nepostačujúce, 10 x zbytočné, napokon sme ho optimalizovali na 7x. Strata času pri premývaní bola kompenzovaná, keď sa použila priama elúcia ribozomálnych proteínov v matrici (kyselina ferulová a kyselina sinapová v 70% ACN s 3% TFA). Časť postupu ohľadom matrice bola rozhodujúca, spôsob premývania bol druhoradý. Prejavilo sa to tým, že s výnimkou kmeňa CCY 17-3-5, ktorého spektrum sme nezískali, dávali ostatné kmene spektrá, ktorých kvalita sa znižovala v poradí: premývanie 7 x vodou - kyselina ferulová a kyselina sinapová v 70% ACN s 3% TFA > premývanie voda a etanol - kyselina ferulová a kyselina sinapová v 70% ACN > premývanie voda a etanol - 70% kyselina mravčia s koncentrovaným ACN (1:1) na 30 min - CHCA v TFA : voda : ACN (2,5% : 47,5% : 50%). Ako sa dalo očakávať, matrica s obsahom kyseliny sinapovej vizualizovala najmä oblasti vyšších molekulových hmotností, CHCA zas nižších. Spektrá s CHCA, ktorá je doporučená v manuáli Biotyper-a sú bohatšie (Obr. 1), a preto vhodnejšie na automatizované vyhľadávanie a porovnávanie, problém je však v tom, že sme ich vo väčšine prípadov vôbec nezískali. Spektrá s kyselinou sinapovou sú síce jednoduchšie, vizualizovali sa však píky jedinečné pre daný druh mikroorganizmu (Obr. 2). Spektrá v obrázkoch sú zobrazené po spracovaní do tzv. čiarových spektier, čo nám umožnil program Biotyper. V prípade použitia dvojstupňovej prípravy vzorky (uvoľnenie proteínov a prídanie matrice), bolo vo všetkých prípadoch výhodnejšie vzorku nechať vysušiť a potom naniesť matricu, ako použiť zmiešaný roztok.

Získané spektrá sa dali rozdeliť do troch skupín; jedna bola tvorená kmeňom CCY 17-3-17 a druhá, s navzájom identickými spektrami, kmeňmi CCY 17-3-15, CCY 17-3-29, CCY 17-3-33, CCY 17-3-34

a CCY 17-3-38 (Obr. 2). Sekvenovanie D1/D2 LSUrRNA jednotlivých kmeňov určilo, že kmeň CCY 17-3-17 je *Cr. laurentii*, kmene CCY 17-3-15, CCY 17-3-29, CCY 17-3-33, CCY 17-3-34 a CCY 17-3-38 patria do druhu *Cr. flavescens* (tiež príslušníci skupiny *Cr. laurentii*). Tretí typ spektra patril kmeňu CCY 17-3-5 a D1/D2 LSUrRNA sekvenovanie určilo, že ide o *Cr. flavus*, ktorý do skupiny *Cr. laurentii* vôbec nepatrí.



Obr. 1: (vľavo): Porovnanie čiarových spektier kmeňa CCY 17-3-34 pripraveného na meranie pomocou hmotnostnej spektrometrie podľa protokolu predpísaného v programe Biotyping (matrica - CHCA) a optimalizovanej metódy (matrica – zmes kyselina sinapová a ferulová)

Obr. 2 (vpravo): Porovnanie čiarových spektier kmeňa CCY 17-3-34 a kmeňa CCY 17-3-17 pripraveného na meranie pomocou hmotnostnej spektrometrie podľa optimalizovanej metódy (matrica – zmes kyselina sinapová a ferulová). Kmene CCY 17-3-15, CCY 17-3-29, CCY 17-3-33 a CCY 17-3-38 mali spektrum identické s kmeňom CCY 17-3-34.

Záver:

Biotypizácia mikroorganizmov pomocou hmotnostnej spektrometrie je rýchlou, v prípade dostupnosti zariadenia lacnou a spoľahlivou metódou na stanovenie kvasinkového druhu skupiny *Cr. laurentii*. Vyžaduje ovšem optimalizovanú prípravu vzorky, v ktorej je kľúčovým použiť ako matricu zmes kyseliny sinapovej a ferulovej namiesto kyseliny hydroxyškoricovej.

Literatúra

1. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL (2011) *J Clin Microbiol* 49:1614
2. Ho Y-P, Reddy PM (2010) *Clin Chem* 56:4, 525
3. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A., Zhang SX (2011) *J Clin Microbiol* 49:3050
4. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR (2010) *J Clin Microbiol* 48:3482
5. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) *J Clin Microbiol* 48:900
6. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton ChW, Kostrzewa M, Tang Y-W (2011) *J Clin Microbiol* 49:2528

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.

Skladovacia stabilita extracelulárnych kvasinkových lipáz

Martina Vršanská^a, Stanislava Voběrková^a, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Jana Molnárová^b, Eva Stratilová^{b,}*

^a*Fakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika*

^b*Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko, chemevi@savba.sk*

Kľúčové slová

CCY, kvasinky, lipázy, skladovacia stabilita

Úvod

Z 92 testovaných kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ktoré patrili k 29 druhom, vykazovalo viac ako 50% lipolytickú aktivitu testovaných na Tween 80 [Molnárová a kol., 2013]. Vzhľadom na to, že testovanie v tejto práci bolo vyhodnocované kvalitatívne (opaleskujúce okolie kultúry rastúcej v miske s médiom s obsahom Tween 80) [Slifkin 2000], bolo zaujímavé nájsť kmene s kvantitatívne najvyššou lipolytickou aktivitou a ocharakterizovať produkované enzýmy. Jednou zo základných charakteristík, od ktorej sa priamo odvíja možnosť priemysleného využitia enzýmov je ich skladovacia stabilita.

Materiál a metódy

Na základe produkovaných lipolytických aktivít boli zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, vybrané tri kmene kvasiniek - *Yarrowia lipolytica* CCY 29-26-52, *Meyerozyma guilliermondii* CCY 39-23-5 a *Pseudozyma fusiformata* 89-1-1.

Kmene boli kultivované na trepačke pri 28 °C v médiu s obsahom TWEEN 60/80 alebo olivového oleja ako zdroja uhlíka. Vzorky boli odobraté z kultivačného média po 24/48 hod a po 144 hod od zaočkovania v závislosti od doby dosiahnutia najvyššej aktivity v médiu.

Vzorky boli uložené pri -20 °C a 4 °C po dobu piatich týždňov, v priebehu ktorých sa stanovovala zostatková lipolytická aktivita. Testovala sa aj stabilita extracelulárnych lipáz pri 40 °C. Aktivita sa stanovovala na PNP-laureát ako substrát, pričom sa využívalo meranie žltého zafarbenia úmerného uvoľnenému množstvu PNP (para-nitrofenyl).

Výsledky a diskusia

Porovnanie aktivity lipáz vybraných kmeňov kvasiniek v čase odberu a po piatich týždňoch skladovania pri -20 °C a 0 °C je zobrazená v Tab. 1. Na Obr. 1 je ukážka spôsobu vyhodnotenia, ktorého výsledok vidíme v Tab. 1. Prípadný pokles aktivity bol vypočítaný z rovníc priamok pre $x_0 = 0$ a $x = 5$, vyjadrený v % a spriemerovaný pre pararelné stanovenia. Obr. 2 vizualizuje stabilitu extracelulárnych lipáz inkubovaných pri 40 °C.

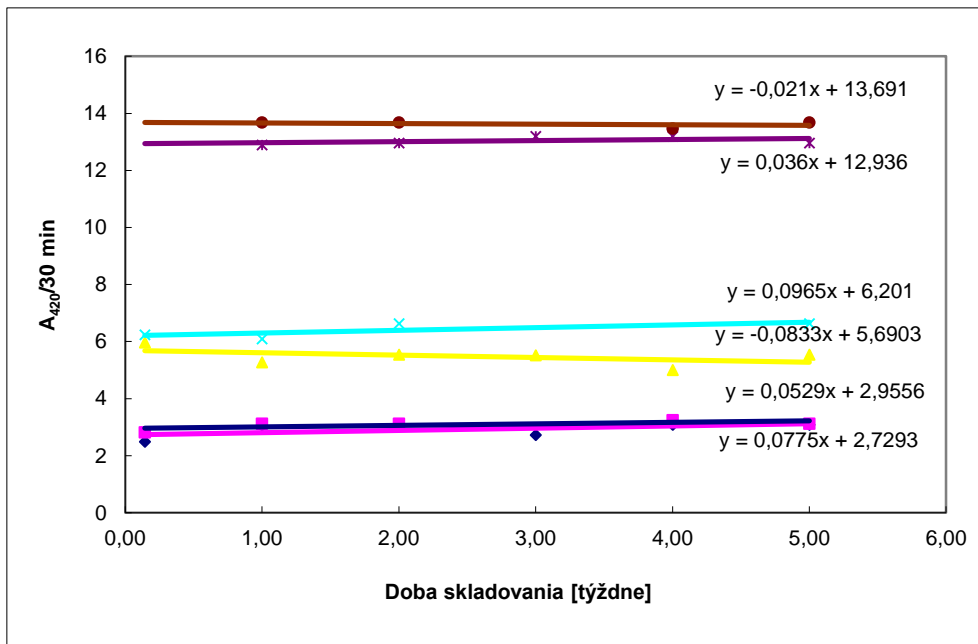
Záver

V priebehu skladovania v mrazničke (-20 °C) sa aktivita znížila o 0-3.26%, pričom vzorky odobraté v neskoršom časovom intervale boli stabilné. Lipázy odobraté v neskoršom časovom intervale produkované kmeňom 29-26-52 boli stabilné aj pri skladovaní pri 4 °C. V prípade ostatných vzoriek skladovaných pri 4 °C bol zistený pokles aktivity 0-7.13%.

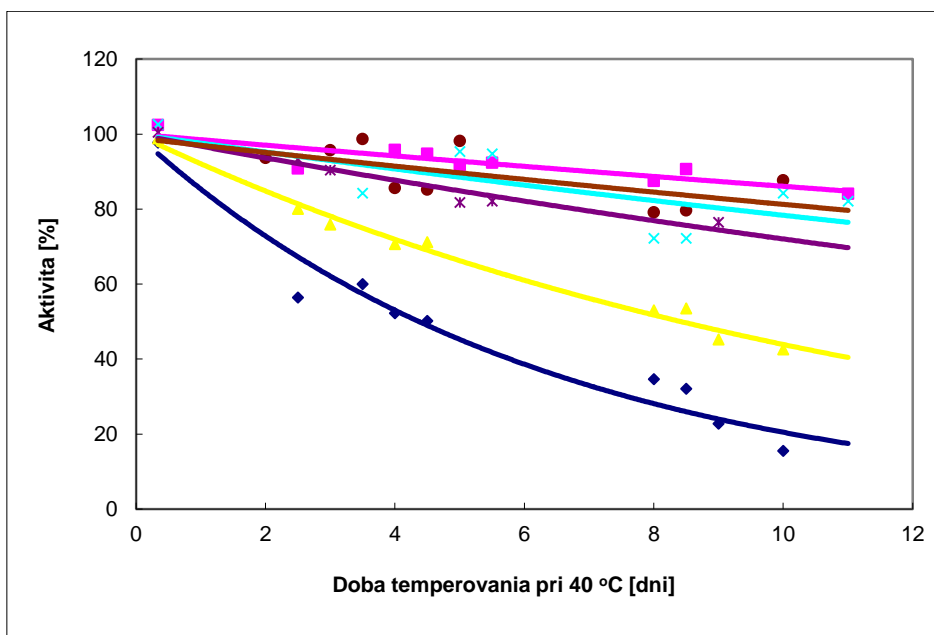
Vo všetkých prípadoch boli lipázy, ktoré boli produkované v neskorších fázach kultivácie stabilnejšie, ako tie, ktoré boli produkované na začiatku kultivácie a umožnili rast kmeňov na kultivačnom médiu, ktoré obsahovalo lipidy ako jediný dostupný C-zdroj. Toto sa prejavilo najmä pri dlhodobom inkubovaní vzoriek pri 40 °C.

Tab. 1: Skladovacia stabilita extracelulárnych lipáz kmeňov CCY 89-1-1, CCY 39-23-5 a CCY 29-26-52 vyjadrená ako pokles aktivity lipáz v kultivačnom médiu po 5 týždňovom skladovaní

Kmeň/doba kultivácie/C-zdroj	Skladovanie pri 4 °C	Skladovanie pri -20 °C
89-1-1/24 hod/OO	7.13%	0%
89-1-1/24 hod/TW60	0%	1.71%
89-1-1/144 hod/OO	2%	0%
89-1-1/144 hod/TW60	0%	0%
39-23-5/48 hod/OO	2.47%	0%
39-23-5/48 hod/TW80	0%	0%
39-23-5/144 hod/OO	0%	0%
39-23-5/144 hod/TW80	6.36%	0%
29-26-52/48 hod/OO	0%	2.69%
29-26-52/24 hod/TW80	6.31%	3.26%
29-26-52/144 hod/OO	0%	0%
29-26-52/144 hod/TW80	0%	0%



Obr. 1: Ukážka spôsobu vyhodnotenia skladovacej stability. Vzorky boli odoberané po 144 hod kultivácii a boli skladované pri -20 °C. Kmeň 89-1-1 kultivovaný na médiu s OO (◆—◆, paralelka ■—■), 89-1-1 na médiu s TW60 (▲—▲, paralelka x—x) a kmeň 29-26-52 na médiu s TW80 (*—*, paralelka ●—●).



Obr. 2: Stabilita extracelulárnych lipáz inkubovaných pri 40 °C. Aktivita enzýmov produkovaných kmeňom 89-1-1 kultivovaným 24 hod (◆—◆) a 144 hod (■—■), kmeňom 39-23-5 kultivovaným 48 hod (▲—▲) a 144 hod (x—x) a kmeňom 29-26-52 kultivovaným 24 hod (*—*) a 144 hod (●—●).

Literatúra

1. Molnárová J., Vadkertiová R., Stratilová E. (2013) J. Basic Microbiol.. 53:1
2. Slifkin M. (2000) J. Clin. Microbiol. 38:4626

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.

Identifikácia majoritného extracelulárneho proteómu *Bacillus subtilis* v rozsahu 17-55 kDa

Barbora Stratilová^{a,b}, Pavel Damborský^c, Pavel Řehulka^d, Zuzana Firáková^a, Stanislava Voběrková^c, Jiřina Omelková^c, Eva Stratilová^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chemevi@savba.sk

^bPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^cFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^dÚstav molekulární patologie FVZ UO, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Bacillus subtilis, extracelulárne proteíny, hmotnostná spektrometria, SDS-PAGE

Úvod

Bacillus subtilis slúži ako modelový organizmus pri štúdiu diferenciácie a vývoji prokaryotických buniek. Z tohto dôvodu bol medzi prvými mikroorganizmami, ktorým sa stanovila kompletná štruktúra genómu [Kunst et al., 1997], na ktorej sa doteraz intenzívne pracuje [Berka et al., 2002; Kobayashi et al., 2003; Barbe et al., 2009]. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* kmeň 168 ponúka v databázach na porovnanie 4185 proteínových sekvencií [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

Náplňou tejto práce bola identifikácia majoritných extracelulárnych proteínov *B. subtilis* CCM 1999 v rozsahu 17-55 kDa, ktoré sa dajú stanoviť z kultivačného média pomocou hmotnostnej spektrometrie.

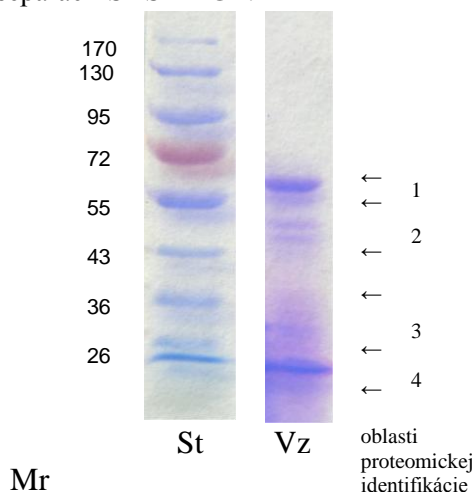
Materiál a metódy

Bacillus subtilis CCM 1999 (Česká zbierka mikroorganizmov, MU Brno, ČR) bol kultivovaný na médiu s obsahom glukózy (20g/l), peptónu (30g/l), kvasničného extraktu (10g/l) a NaCl (5g/l). Sedemdnňová kultúra bola scentrifugovaná a médium sa použilo na identifikáciu extracelulárnych proteínov.

Proteíny z média boli separované SDS-PAGE [Laemli, 1970], vizualizované Coomassie blue a po redukcii a alkylácii štiepené v géli trypsínom [Jensen a kol., 1999]. Po elúcii bol roztok so štepmi nanosený na kapilárnu mikrokolónku (dĺžka 30 mm) naplnenú reverznou fázou (C18), z ktorej sa peptidy vytlačali gradientom acetonitrilu (0-80%) priamo na meraciu platničku (MTP AnchorChip 384 BC, Bruker). MALDI-TOF MS a MS/MS merania boli robené manuálne na zariadení UltrafleXtreme riadeného programom FlexControl v. 3.4 (Bruker) v reflektónovom pozitívnom a „lift“ móde špecifickom pre toto zariadenie. Zariadenie bolo kalibrované na Peptide calibration standard II (Bruker). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru FlexAnalysis v. 3.4, z ktorého boli zaslané do ProteinScape v. 3.0 (oba Bruker). Databázové vyhľadávanie v NCBI prebehlo pomocou programu Mascot v. 2.4.1. a bolo založené na identite primárnych štruktúr sekvencií proteínov z kultivačného média a sekvencií odvodených zo známeho génu *B. subtilis*.

Výsledky a diskusia

Na Obr. 1 sú znázornené majoritné extracelulárne proteíny *B. subtilis* vizualizované Coomassie blue po separácii SDS-PAGE.



Obr. 1: SDS-PAGE proteínov z kultivačného média *B. subtilis* CCM 1999

Vzhľadom na to, že priame nanosenie kultivačného média na gél (bez akejkoľvek predbežnej úpravy ako odsolenie alebo zahustenie) spôsobilo, že jednotlivé zóny na géle neboli jasne oddelené (Obr. 1), zaradili sme po tryptickom štiepení v géli ďalší separačný krok, a to kvapalinovú chromatografiu na reverznej fáze. Táto prebiehala manuálne na mikrokolónke. Výsledok identifikácie štepov je zobrazený v Tab. 1.

Tab. 1: Identifikácia extracelulárnych proteínov *B. subtilis* z kultivačného média pomocou Mascot programu. V tabuľke je uvedené merané/experimentálne m/z sekvencií, názov identifikovaného proteínu z databázy, jeho pokrytie identifikovanými sekvenciami, jeho databázové číslo (Uniprot) a zdroj.

m/z meraná/experimentálna	Proteín	Pokrytie sekvencie	UniProt	Mr	Organizmus
---------------------------	---------	--------------------	---------	----	------------

741.3581/740.3508, 1570.8344/1569.8271, 1669.8098/1668.8025, 1760.8597/1759.8525, 1938.9764/1937.9692, 1939.0795/1938.0722, 2383.2188/2382.2115, 3193.4753/3192.4681, 3210.5642/3209.5569	UPF0173 metal- dependent hydrolase YtkL	53%	YTKL_BACSU Q795U4	24816	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis kmeň 168
1629.8333/1628.8260, 1401.7777/1400.7704, 1181.6056/1180.5983, 987.5554/986.5481, 1879.9121/1878.9048, 1105.4814/1104.4742, 940.5567/939.5494	manganese- binding lipoprotein MntA	27%	MNTA_BACSU O34385	33454	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis kmeň 168
1617.9006/1616.8934; 1912.8599/1911.8526	Uncharacterized protein YlqB	19%	YLOB_BACSU O31737	17789	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis kmeň 168
1462.8654/1461.8581, 1665.7921/1664.7848, 1509.7897/1508.7824, 2495.1274/2494.1202, 1132.5996/1131.5923	vegetative catalase EC 1.11.1.6	15%	CATA_BACSU P26901; P77838	54757	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis kmeň 168
1515.7096/1514.7023, 1199.6472/1198.6399, 1589.8584/1588.8511	uncharacterized protein YbdN	14%	YBDN_BACSU O31436; Q7DL54	31484	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis kmeň 168
1529.7985/ 1528.7912, 1893.9979/ 1892.9906, 1663.8322/ 1662.8249	subtilisin E EC3.4.21.62	12%	SUBT_BACSU P04189; O07613; P70989	39455	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis kmeň 168
1306.6198/1305.6125 2285.2000/2284.1927	Putative aminopeptidase YhfE EC3.4.11.-	9%	YHFE_BACSU O07603; Q796U6	38883	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis kmeň 168
888.4806/887.4733 1547.8025/1546.7952	Beta-lactamase EC3.5.2.6	7%	BLAC_BACSU P39824; O34848	33597	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis kmeň 168
1534.7819/1533.7746	Beta-glucanase EC3.2.1.73	5%	GUB_BACSU P04957	27365	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis kmeň 168

Záver

V kultivačnom médiu bolo identifikovaných deväť majoritných extracelulárnych proteínov *B. subtilis* CCM 1999. Všetky mali sekvencie identické s proteínmi kmeňa *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* kmeň 168 [Kunst et al, 1997]. Výsledok má slúžiť ako referenčný k proteomickým štúdiám extracelulárnych proteínov *B. subtilis* produkovaných v rôznych kultivačných podmienkach, ako napr. pri indukcii proteínov zdrojom uhlíka a dusíka.

Literatúra

1. Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Medigue C, Danchin A (2009) *Microbiology* 155:1758
2. [Berka RM](#), [Hahn J](#), [Albano M](#), [Draskovic I](#), [Persuh M](#), [Cui X](#), [Sloma A](#), [Widner W](#), [Dubnau D](#) (2002) [Mol Microbiol](#), 43:1331.
3. 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

4. [Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, Amati G, Andersen KK](#), et al. (2003) [Proc Natl Acad Sci USA](#) 100:4678
5. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, et al. (1997) *Nature* 390: 249
6. Laemmli U. K. (1970) *Nature* 227:68
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

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. Študijný pobyt Bc. Pavla Damborského na CHÚ SAV bol finančne podporovaný z projektu BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt je realizovaný v rámci Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, který je spolufinancovaný z Európskeho sociálneho fondu a štátneho rozpočtu ČR.

Skríning kvasiniek pre produkciu lipáz

Martina Vršanská^a, Stanislava Voběrková^a, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Jana Molnárová^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko, chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

CCY, kvasinky, lipázy, rastová krivka

Úvod

Z 92 testovaných kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ktoré patrili k 29 druhom, vykazovalo viac ako 50% lipolytickú aktivitu testovanú na Tween 80 [Molnárová a kol., 2013]. Vzhľadom na to, že testovanie v tejto práci bolo vyhodnocované kvalitatívne (opaleskujúce okolie kultúry rastúcej v miske s médiom s obsahom Tween 80) [Slifkin 2000], bolo zaujímavé nájsť kmene s kvantitatívne najvyššou lipolytickou aktivitou a ocharakterizovať produkované enzýmy. Cieľom tejto práce bolo vybrať kmene kvasiniek produkujúce najvyššie lipolytické aktivity.

Materiál a metódy

Bolo vybraných 10 kmeňov kvasiniek alebo kvasinkovitých mikroorganizmov, ktoré vykazovali najvyššie aktivity pri predbežnom skríningu kmeňov [Molnárová et al., 2013] stanovených vyčistením substrátu s hovädzím tukom alebo Tweenom 80:

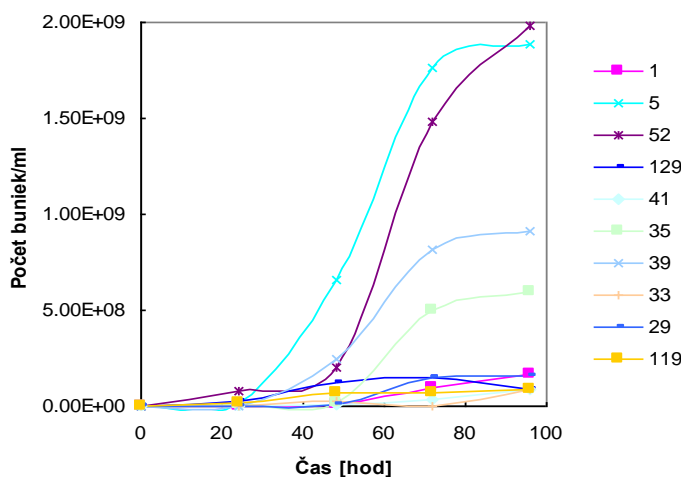
CCY	Kmeň	Aktivita zistená na*:	
		Tween 80	Hovädzí tuk
16-1-29	<i>Galactomyces candidus</i>	+	
17-3-33	<i>Cryptococcus flavescens</i>	+	
17-4-39	<i>Cryptococcus magnus</i>	+	
20-1-35	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	

20-2-41	<i>Rhodotorula glutinis</i>	+	
27-1-119	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	
29-2-129	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	+	
29-26-52	<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	+
39-23-5	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	
89-1-1	<i>Pseudozyma fusiformata</i>	+	

Kmene boli kultivované na médiu s obsahom TWEEN 80 ako zdrojom uhlíka. V priebehu kultivácie sa stanovoval rast kvasiniek počítaním buniek v Bürkerovej komôrke a lipolytická aktivita v médiu s bunkami (celková aktivita) a bez nich (aktivita extracelulárnych lipáz). Aktivita sa stanovovala na PNP-laureát ako substrát, pričom sa využívalo meranie žltého zafarbenia úmerného uvoľnenému množstvu PNP (para-nitrofenyl).

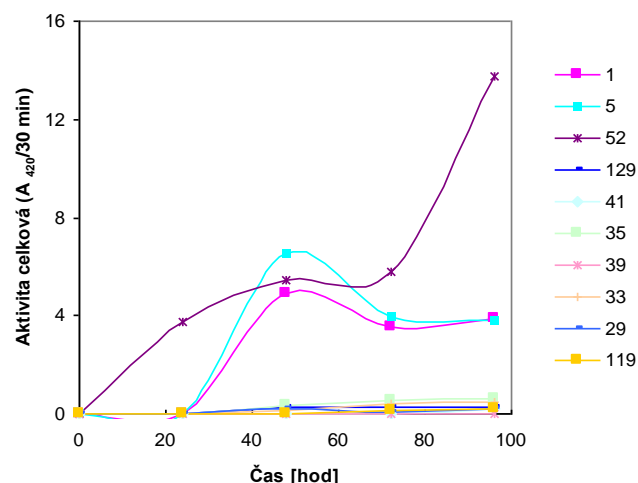
Výsledky a diskusia

Ako už naznačili predošlé testy, všetky vybrané kmene boli schopné rásť na médiu s obsahom TWEEN 80 ako zdroja uhlíka, len miera rastu nebola rovnaká (Obr. 1). Najrýchlejšie rástli *Meyerozyma guilliermondii* a *Yarrowia lipolytica*, približne o polovicu pomalšie *Cryptococcus magnus* a *Rhodotorula*

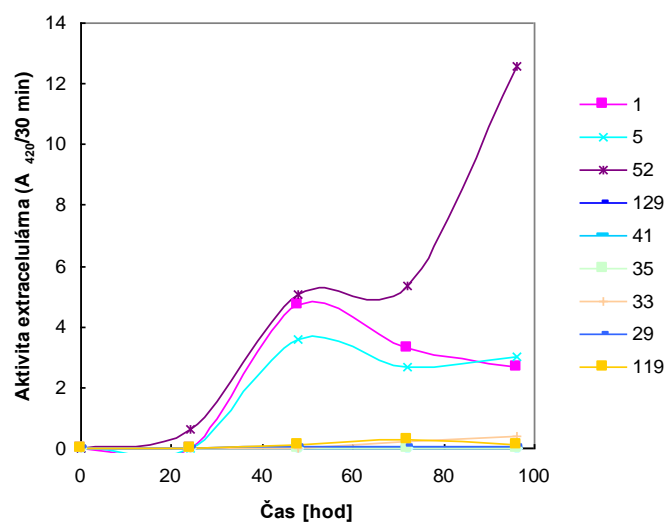


Obr. 1: Rast kmeňov kvasiniek na médiu s TWEEN 80 ako zdrojom uhlíka. 1 – CCY 89-1-1 *Pseudozyma fusiformata*; 5–CCY 39-23-5 *Meyerozyma guilliermondii*; 52 – CCY 29-26-52 *Yarrowia lipolytica*; 129 – CCY 29-2-129 *Metschnikowia pulcherrima*; 41 – CCY 20-2-41 *Rhodotorula glutinis*; 35 - CCY 20-1-35 *Rhodotorula mucilaginosa*; 39 – CCY 17-4-39 *Cryptococcus magnus*; 33 – CCY 17-3-33 *Cryptococcus flavescens*; 29 – CCY 16-1-29 *Galactomyces candidus*; 119 – CCY 27-1-119 *Aureobasidium pullulans*

V počiatku exponenciálnej fázy rastu sa v médiu a na bunkách dala stanoviť lipolytická aktivita, ktorá bola výrazne vyššia v prípade kmeňov *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* a *Pseudozyma fusiformata* (Obr. 2, 3). Kým v prípade prvých dvoch kmeňov kopíroval výsledok výsledok z rastu kultúr, v prípade kmeňa *Pseudozyma fusiformata* nekorešpondoval s rastom a bol o to prekvapujúcejší. Keďže priebeh kriviek indikoval dvojfázovú produkciu lipáz, po 48 hod (pravdepodobne prejav adaptácie kmeňov na C-zdroj, ktorá im umožnila rast) a po dlhšej dobe kultivácie (udržiavanie kultúry v médiu), sa charakterizácia enzýmov naplánovala s odbermi v oboch časových intervaloch.



Obr. 2: Celková lipolytická aktivita produkovaná kmeňmi kvasiniek na médiu s TWEEN 80 ako zdrojom uhlíka. 1 – CCY 89-1-1 *Pseudozyma fusiformata*; 5 – CCY 39-23-5 *Meyerozyma guilliermondii*; 52 – CCY 29-26-52 *Yarrowia lipolytica*; 129 – CCY 29-2-129 *Metschnikowia pulcherrima*; 41 – CCY 20-2-41 *Rhodotorula glutinis*; 35 - CCY 20-1-35, *Rhodotorula mucilaginosa*; 39 – CCY 17-4-39 *Cryptococcus magnus*; 33 – CCY 17-3-33 *Cryptococcus flavescens*; 29 – CCY 16-1-29 *Galactomyces candidus*; 119 – CCY 27-1-119 *Aureobasidium pullulans*



Obr. 3: Extracelulárna lipolytická aktivita produkovaná kmeňmi kvasiniek na médiu s TWEEN 80 ako zdrojom uhlíka. 1 – CCY 89-1-1, *Pseudozyma fusiformata*; 5 – CCY 39-23-5, *Meyerozyma guilliermondii*; 52 – CCY 29-26-52, *Yarrowia lipolytica*; 129 – CCY 29-2-129, *Metschnikowia pulcherrima*; 41 – CCY 20-2-41, *Rhodotorula glutinis*; 35 - CCY 20-1-35, *Rhodotorula mucilaginosa*; 39 – CCY 17-4-39, *Cryptococcus magnus*; 33 – CCY 17-3-33, *Cryptococcus flavescens*; 29 – CCY 16-1-29, *Galactomyces candidus*; 119 – CCY 27-1-119, *Aureobasidium pullulans*

Záver:

Kmene CCY 29-26-52 (*Yarrowia lipolytica*), CCY 39-23-5 (*Meyerozyma guilliermondii*) a CCY 89-1-1 (*Pseudozyma fusiformata*) vykazovali rádovo vyššiu produkciu lipolytickej aktivity ako ostatné kmene. Z tohto dôvodu boli vybrané na ďalšie experimenty, ktoré prvotne vyžadovali charakterizáciu produkovaných enzýmov.

Literatúra

- Molnárová J., Vadkertiová R., Stratilová E. (2013) J. Basic Microbiol. 53:1
Slifkin M. (2000) J. Clin. Microbiol. 38:4626

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. Študijný pobyt Bc. Martiny Vršanskej na CHÚ SAV bol finančne podporovaný z projektu BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt je realizovaný v rámci Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, který je spolufinancovaný z Európskeho sociálneho fondu a štátneho rozpočtu ČR.

Biotypizácia kvasinkových mikroorganizmov skupiny *Cryptococcus laurentii*

Jakub Jäger^a, Barbora Stratilová^{b,c}, Jana Molnárová^b, Pavel Řehulka^d, Renáta Vadkertiová^b, Jiřina Omelková^a, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chemevi@savba.sk

^cPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

^dÚstav molekulární patologie FVZ UO, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Biotypizácia, *Cryptococcus laurentii*, hmotnostná spektrometria, kapsula, polysacharidy

Úvod

Taxonómia kapsulárneho kvasinkového mikroorganizmu *Cryptococcus laurentii* podliehala pomerne častým zmenám, ktoré záviseli jednak od metód zaradovania, ako aj od individuálneho prístupu jednotlivých vedeckých skupín, ktoré sa nimi zaoberali. Už zaradovanie na základe určitých morfológických, fyziologických a biochemických vlastností poukázalo na existenciu viacerých odlišných variet v rámci tohto druhu. Ďalšie zmeny prinieslo zaradovanie na základe molekulárno-biologických metód.

Klinické izoláty kmeňov *Cryptococcus laurentii* vytvorili v rámci fylogenetického stromu založeného na porovnávaní ITS oblasti a D1/D2 LSUrRNA dve fylogenetické skupiny [Sugita a kol. 2000]. Neskôr bola časť týchto kmeňov zaradená do samostatných druhov [Takashima et al. 2003] v rámci „skupiny“ *Cryptococcus laurentii*. Prvá fylogenetická skupina je tvorená druhmi *Cr. laurentii*, *Cr. flavescens*, *Cr. aureus* a *Bullera pseudoalba*, druhá minimálne druhmi *Cr. peneaus*, *Cr. victoriae* a *Cr. carnescens* [Takashima et al. 2003]. Cieľom tejto práce bolo zistiť, či sa druhy v rámci skupiny *Cr. laurentii* dajú odlišiť aj pomocou biotypizácie hmotnostnou spektrometriou.

Identifikácia patogénnych mikroorganizmov hmotnostnou spektrometriou sa stala nerozlučnou súčasťou techník používaných v diagnostických laboratóriách [van Veen et al., 2010; Ho a Reddy,

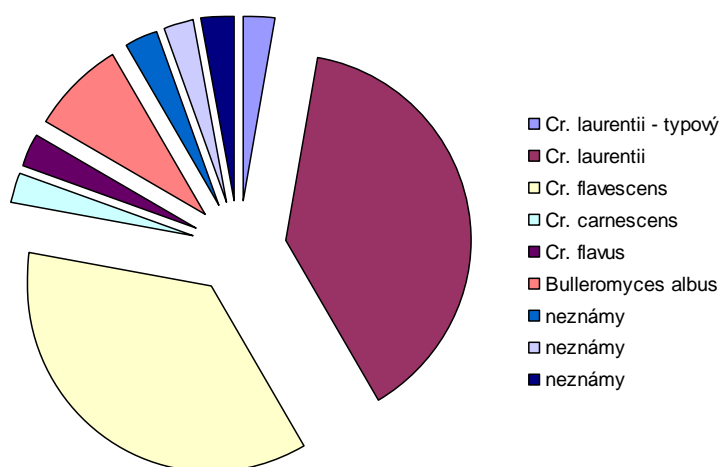
2010] a pri taxonomickom zaraďovaní nových kmeňov. Kým identifikácia prokaryontov je jednoduchšia a reprodukovateľnejšia, databázy stále neobsahujú dostatočné údaje o eukaryotických druhoch. Dôvodom je, že niektoré z nich po príprave vzoriek podľa predpísaných protokolov neposkytujú interpretovateľné spektrá. Medzi takéto mikroorganizmy môžu patriť napr. niektoré druhy rodu *Cryptococcus*, kvasiniek, ktoré produkujú extracelulárne polysacharidy, ale väčšinou aj ťažko zničiteľnú bariéru v podobe polysacharidovej kapsule.

Materiál a metódy

Kmene (36) označené v Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ako *Cryptococcus laurentii* (CCY 17-3-), boli kultivované na šikmom sladínovom agare, ktorý slúži aj ako ich úschovné médium. Štvrtý a šiesty deň kultivácie boli očkovacou slučkou odobraté vzorky z kultúr (jedno očko) do mikroskúmavky s vrchnáčikom, premyté 7x vodou a potom vystavené na 20 min zmesi zloženej z kyseliny ferulovej (10 mg/ml) a kyseliny sinapovej (30 mg/ml) v 70% acetonitrile (ACN) s 3% kyselinou trifluóroctovou (TFA). Po centrifugácii sa naniesol 1 µl supernatantu na meraciu platničku MTP 384 target plate polished steel T F (Bruker) a nechal vysušiť. Vzorky boli pripravené aj podľa postupu navrhnutého v manuáli softvéru Biotyper (Bruker) pre obtiažne prípady. MALDI-TOF MS merania boli robené na zariadení UltrafleXtreme (Bruker) v lineárnom pozitívnom móde pre oblasť m/z 0,2-22 kDa. Zariadenie bolo kalibrované na Cytochróm C (Sigma). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru Biotyper (Bruker).

Výsledky a diskusia

Príprava vzoriek podľa odporúčaného postupu viedla k interpretovateľným spektrám len v 20% prípadov. Optimalizovaná metóda priniesla úspech vo všetkých. Výsledkom bolo deväť rôznych typov spektier. Pomerné zastúpenie kmeňov s identickými spektrami je na Obr. 1. Druh kvasinky bol priradený k spektrám pomocou sekvenovania D1/D2 LSUrRNA náhodne vybraných kmeňov.



:

Obr. 1: Pomerné zastúpenie kmeňov označených ako *Cr. laurentii* usporiadaných podľa typu spektra ich ribozomálnych proteínov.

Záver

Z deviatich typov spektier, ktoré sme získali pre 36 kmeňov kvasiniek pôvodne zaradených ako *Cr. laurentii*, sa zatiaľ podarilo priradiť druh kvasinky na základe sekvenovania D1/D2 LSUrRNA šiestim. Skupine *Cr. laurentii*, t.j. druhom *Cr. laurentii*, *Cr. flavescens* a *Cr. carnescens* zodpovedali štyri typy spektier, keďže pre druh *Cr. laurentii* sme získali dva typy spektier. Predpokladáme výskyt rozdielnych variet, ktoré sa odlišujú v inej ako D1/D2 oblasti, čo čiastočne môže súvisieť aj s oblasťou, z ktorej sa tieto kvasinky získali (stredná Afrika/juhozápad Slovenska). Najpočetnejšie boli zastúpené druhy *Cr.*

laurentii a *Cr. flavescens*. Z testovaného súboru kmeňov boli vyčlenené tri kmene *Bulleromyces albus* a jeden kmeň *Cr. flavus*. Identifikácia troch kmeňov, z ktorých každý dával odlišné spektrum (ako v porovnaní s identifikovanými kmeňmi, tak aj navzájom), metódami molekulárnej biológie, je úlohou najbližšieho obdobia.

Literatúra

1. Ho Y-P, Reddy PM (2010) Clin Chem 56:4, 525
2. Sugita T, Takashima M, Ikeda R, Nakase T, Shinoda T (2000) J Clin Microbiol 38:1468
3. Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T (2003) Int J Sys Evol Microbiol 53:1187
4. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) J Clin Microbiol 48:900

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. Študijný pobyt Bc. Jakuba Jägera na CHÚ SAV bol finančne podporovaný z projektu BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt je realizovaný v rámci Operačného programu vzdelávani pro konkurenceschopnost, který je spolufinancovaný z Európskeho sociálneho fondu a štátneho rozpočtu ČR.

Stanovenie primárnej štruktúry nešpecifickej xyloglukánendotransglykozylázy z kľúčiacich semien kapucínky

Zuzana Firáková, Jaroslav Klaudivy, Eva Stratilová

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

Kľúčové slová

Heterotransglykozylácia, nešpecifický enzým, primárna štruktúra, XET, xyloglukánendotransglykozyláza

Úvod

Xyloglukánendotransglykozyláza bola prvýkrát popísaná v roku 1992 [Fry et al., 1992; Nishitani a Tominaga, 1992; Farkaš et al., 1992]. Ako vyplýva z názvu, tento enzým primárne operuje na xyloglukáne rastlinnej bunkovej steny, ktorej umožňuje rozpínanie bez straty pevnosti a pružnosti. Transglykozylačná reakcia tohto enzýmu je založená na štiepení polymérneho donorového substrátu, uvoľnení fragmentu, ktorý obsahuje pôvodný redukujúci koniec a na kovalentnom naviazaní akceptorového substrátu (polymérneho alebo oligomérneho) na fragment donorového substrátu, ktorý zostal viazaný na enzýmeu. Sporadicky bola popísaná pre niektoré xyloglukánendotransglykozylázy heterotransglykozylačná aktivita [Ait-Mohand a Farkaš, 2006; Hrmová et al., 2007], t.j. schopnosť rozštiepiť a kovalentne naviazať štrukturálne odlišné sacharidy. Enzýmom so zatiaľ najväčšou popísanou nešpecificitou je majoritná forma xyloglukánendotransglykozylázy z kľúčiacich semien kapucínky s izoelektrickým bodom 6.3 (XET6.3) [Stratilová et al., 2010].

Cieľom tejto práce bolo stanovenie primárnej štruktúry tohto enzýmu.

Materiál a metódy

RNK bola izolovaná z naklíčených semien kapucínky (*Tropaeolum majus*) pomocou GeneJET™ Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, USA). DNK bola odstránená pomocou SiMax™ Total RNA Columns Isolation kit (Ecoli, Slovakia). Kvalita získanej RNK bola overená pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.

Rýchla amplifikácia cDNK koncov bola urobená podľa modifikovanej metódy Frohman et al. (1988). Primery, ktoré boli použité na reverznú transkripciu a PCR amplifikáciu cDNK sú uvedené v Tab. 1.

Tab. 1: Primery použité pri reverznej transkripcii a PCR amplifikácii cDNK

Primery		Aplikácia
Názov	Nukleotidová sekvencia	
AOdTA	5'- GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTT TTTTTTTV-Wobbles-3'	syntéza 3' cDNA konca (RT) amplifikácia 3' cDNA konca amplifikácia 5' cDNA konca
XETp1f	5'-TTCAACCAAGATGTTGATATTACTTGG GGNGAYGG-3'	amplifikácia 3' cDNA konca
XET5RT	5'-TTCAGCATCCCAAAGTGTGC-3'	syntéza 5' cDNA konca (RT)
XET5amp	5'-CCTTTCGATTGTAAGTAAGACGTAG-3'	amplifikácia 5' cDNA konca

3' a 5' cDNK konce boli syntetizované pomocou ReverAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA). Fragменты 5' cDNK koncov boli po syntéze purifikované s High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Germany). PCR amplifikácie 3' a 5' cDNK fragmentov boli robené pomocou Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA).

Amplifikované 3' a 5' cDNK fragmenty s predpokladanou dĺžkou boli purifikované agarózovou elektroforézou s použitím Wizard® SV Gel a PCR Clean-Up System (Promega, USA) a ligované do vektora (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific, USA). Po transformácii *E. coli* XL10 Gold (Stratagene, USA) boli plazmidové DNK izolované z viacerých klonov pomocou GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, USA) a komerčne sekvenované. Sekvencia kompletnej XET6.3 cDNK bola získaná pomocou programu BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html). Na preklad cDNA bol použitý program Translator (www.justbio.com) a signálny peptid bol predikovaný pomocou programu PrediSi (www.predisi.de).

Výsledky a diskusia

Primárna štruktúra XET6.3 so zvýraznenou N-terminálovou sekvenciou a podčiarknutými sekvenciami, ktoré boli stanovené hmotnostnou spektrometriou [Stratilová et al., 2010], je na Obr. 1:

MKIISRFSTIINIFLIICITSLSFTIIS**AGNFNQD**V**DITWGDGR**AKILDNGDLLTSLD
KASGSGFQSKNEYIFVKTD**MQIKLIHGNSAGTVTTSYLQSKGATWDEIDFEFLGNLSGDP**
YIVHTNIFVQKGAREQQFYLWFDPTTDFHTYSIIWSPQHIVLLVDNIPIREFKNLESIG
VPYPKYQPMR**LQCTLWDAEDWATRGGQVKTDWTQAPFIASYKYFNADTNKNPSTSTWFSQ**
QLDSNSKEK**LKWVRDNYMIYDYCKDFKRFSQGLPRECSVN**

Obr. 1: Primárna štruktúra XET 6.3. Boldom je vyznačená N-terminálová sekvencia, podčiarknuté sú sekvencie, ktoré boli stanovené pomocou hmotnostnej spektrometrie.

Porovnanie primárnych štruktúr tejto XET so známymi primárnymi štruktúrami XET z iných častí kapucinky alebo iných rastlinných zdrojov, zaradilo podľa fylogenetického stromu navrhnutého Hrmovou et al. [2009] nešpecifickú XET6.3 do skupiny XTH II.

Záver

Sekvenačné údaje sa nachádzajú v European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/HF968473>) pod prístupovým číslom: xet6.3 gene (HF968473), *Tropaeolum majus* mRNA for xyloglucan endotransglycosylase 6.3

Literatúra

1. Ait-Mohand, F. a Farkaš, V. (2006) Carbohydr. Res. 341, 577
2. Farkaš, V., Sulová, Z., Stratilová, E., Hanna, R. a Maclachlan, G. (1992) [Arch. Biochem. Biophys.](#) 298, 365
3. Frohman, M.A., Dush, M.K. a Martin, G.R. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998
4. Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D.J., Hodge, S.K. a Matthews, K.J. (1992) Biochem J., 282, 821
5. [Hrmová, M.](#), [Farkaš, V.](#), [Lahnstein, J.](#) a [Fincher, G.B.](#) (2007). J. Biol. Chem. 282, 12951
6. [Hrmová, M.](#), [Farkaš, V.](#), [Lahnstein, J.](#) and [Fincher, G.B.](#) (2007) J. Biol. Chem. 282, 12951.
7. Nishitani, K. a Tominaga, R. (1992) J. Biol. Chem. 267, 21058
8. [Stratilová, E.](#), [Ait-Mohand, F.](#), [Řehulka, P.](#), [Garajová, S.](#), [Flodrová, D.](#), [Řehulková, H.](#) a [Farkaš, V.](#) (2010) Plant Physiol. Biochem. 48, 207

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.

Väzba ruténiovej červenej na povrch myších leukemických buniek ovplyvnených tunikamycínom

Andrej Rusnák, Zdenka Sulová, Albert Breier, Branislav Uhrík

Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, 83334 Bratislava, andrej.rusnak@savba.sk

Úvod

V transmisnej (TEM), skenovacej (SEM) a transmisnej skenovacej (STEM) elektrónovej mikroskopii je obraz preparátu získavaný detekciou prejdejších, resp. odrazených primárnych elektrónov. Takto získaný obraz však neposkytuje informáciu o látkovom zložení skúmaného objektu, resp. jeho chemickej aktivite. Klasická biologická elektrónová mikroskopia (EM) je špecifická, pretože preparát možno pozorovať až po dôkladnej úprave vzorky, ktorá pozostáva z fixácie a kontrastovania – proces, pri ktorom sa jednotlivé bunkové štruktúry zvýraznia atómami ťažkých kovov (rozptyľujú elektrónový lúč a vytvárajú negatívny obraz preparátu, ktorý možno detegovať). V biológii sa využívajú rôzne typy histochemických značení, jedným z nich je značenie kyslých povrchových polysacharidov buniek pomocou polykatiónových farbičiek, medzi ktoré patrí aj Ruténiová červená (RR) dobre pozorovateľná v TEM, ako výrazný kontrastný pás na povrchu bunky. Na určenie koncentrácie a jednoznačné potvrdenie RR je potrebná ďalšia analytická metóda napr. EDS, ELLS, elektrónová difrakcia.

EDS - Energo-disperzná mikroanalýza (Energy-Dispersive X-ray Analysis) pracuje na princípe merania energie röntgenového žiarenia, ktoré je vyvolané dopadom primárneho elektrónu na valenčný elektrón prvku, kde je tento elektrón vyrazený a následne nahradený elektrónom z nižšej hladiny. Táto energia je pre každý prvok a elektrónovú hladinu charakteristická a jej hodnota určuje prvok. Množstvo vyžiarených kvánt určuje zastúpenie (koncentráciu) daného prvku.

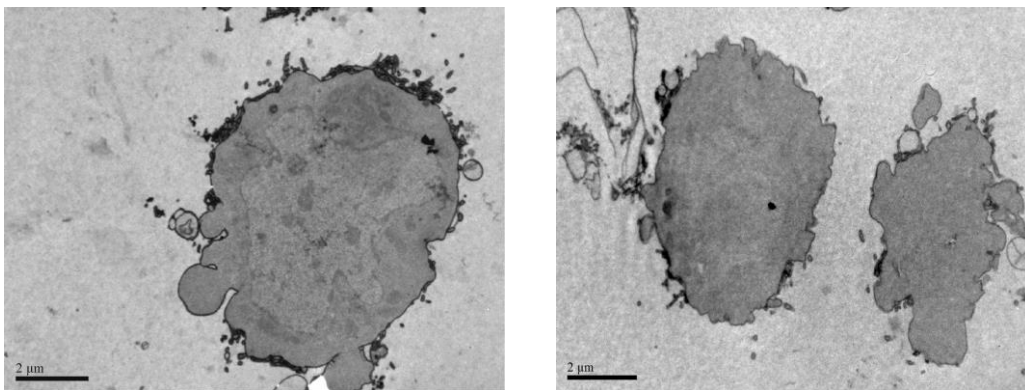
Použili sme tri línie myších leukemických buniek L1210: parentálna senzitívna línia (S) a rezistentná sublínia (R) a bunky transfekované génom pre ľudský P-glykoproteín (T), kultivované 24 hodín s tunikamycínom a príslušné kontroly. Tunikamycín je známy ako inhibítor N-glykozylácie prebiehajúcej v endoplazmatickom retikule. Inhibuje prenos N-acetylglukozamín 1-fosfátu z uridín difosfát N-acetyl glukozamínu na PP dolichol fosfát Inhibícia celkovej glykozylácie ako aj glykozylácie P-gp môže viesť k navodeniu zvýšenej citlivosti buniek na rôzne lieky. Inhibícia glykozylácie P-gp tunikamycínom tiež môže viesť k masívnej ubikvitinácii a postupnej degradácii P-gp. Tunikamycín môže zvyšovať alebo znižovať rezistenciu, čo závisí od typu bunkovej kultúry. V konečnom dôsledku mení zloženie kyslých povrchových sacharidov na povrchu bunky.

Materiál a metódy

Bunky L1210 boli kultivované 24h s tunikamycínom. Preparáty pre TEM boli pripravené štandardným spôsobom. Bunková kultúra bola fixovaná 2% glutaraldehydom a následne 1% osmiom, oba v prostredí kakodylátového tlmivého roztoku, v prítomnosti 0,3% ruténiovej červene. Bunková kultúra sa zaliala do živice DurcupanACM Fluka. Boli pripravené ultratenké rezy hrúbky 100 nm, použitím ultramikrotómu Powertome fy. Boeckeler. Elektrónovým mikroskopom JEOL 1200EX (TEM) so skenovacím zariadením ASID 10 (SEM, STEM) a EDS analyzátorom INCA energy OXFORD Instruments boli pripravené elektrónogramy, RTG prvkové mapy a získali RTG spektrá vybraných lokalít buniek.

Výsledky a diskusia

Transmisná elektrónová mikroskopia poskytne veľmi všeobecnú informáciu o väzbe kontrastujúceho agenta na povrch bunky



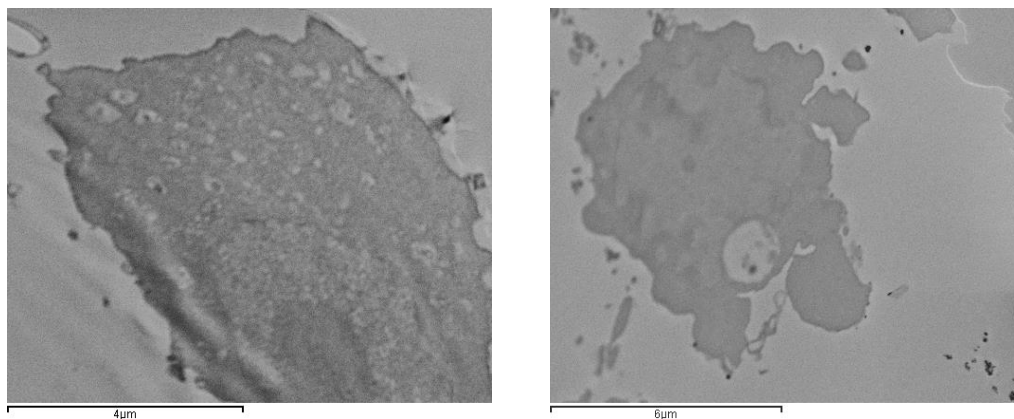
Obr.1: Vplyv tunikamycínu na väzbu ruténiovej červenej, vľavo ovplyvnené, vpravo neovplyvnené bunky, oboje v procese kontrastovania ruténiovou červeňou (RR) v TEM zobrazení

Na obr. 1 možno pozorovať zmeny v povrchovom značení RR a možno konštatovať, že bunky ovplyvnené tunikamycínom majú vyššiu afinitu k RR. Subjektívne je možné zhodnotiť rozdiely medzi jednotlivými typmi buniek:

- v kontrolách $S \approx T > R$
- v bunkách ovplyvnených tunikamycínom je väzba výraznejšia ako v kontrolách

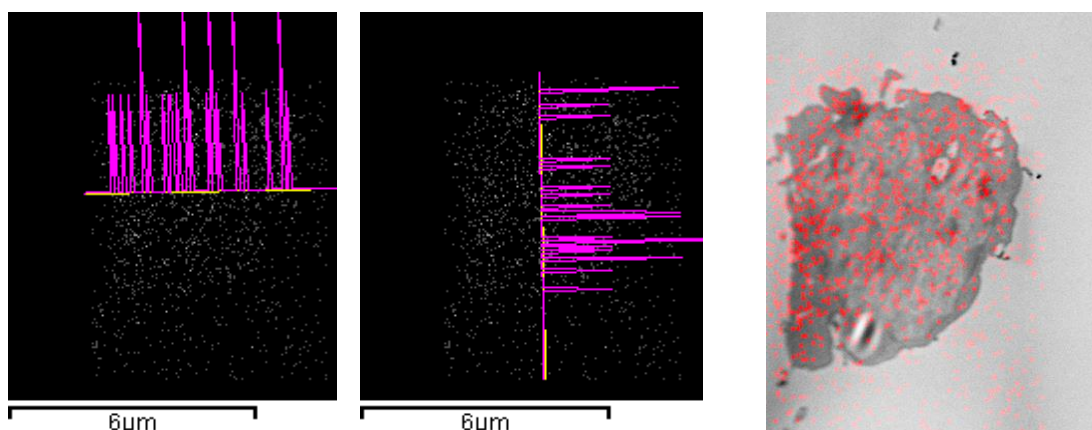
V tomto momente však výpovedná hodnota klasickej elektrónovej mikroskopie o väzbe RR a o povrchovej koncentrácii negatívneho náboja na povrchu buniek dosiahla svoje limity, čo poukazuje na zmeny v štruktúre kyslých polysacharidov na povrchu.

STEM mikroskopia bez EDS analýzy poskytuje obdobné odpovede ako TEM (obr. 2).

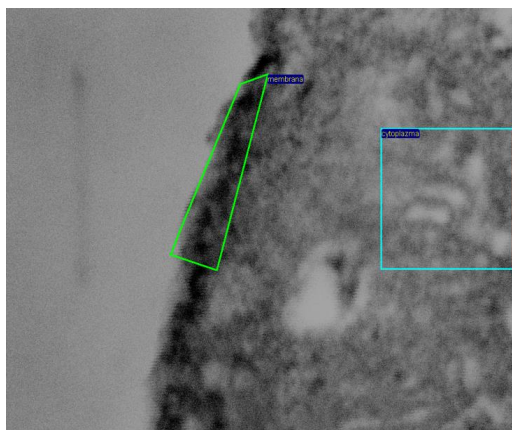


Obr.2: Vplyv tunnikamycínu na väzbu ruténiovej červenej , vľavo ovplynené, vpravo neovplyvnené bunky, oboje v procese kontrastovania ruténiovou červeňou (RR) v STEM zobrazení

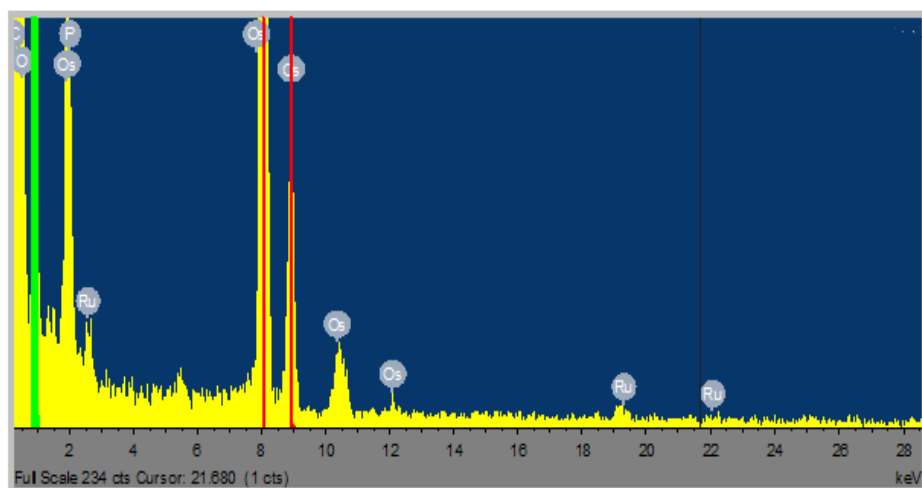
V STEM zobrazení je možné prepojiť obraz s chemickou analýzou bunky pomocou EDS, ktorá umožnila stanoviť lokálne koncentrácie ruténia. Veľkým problémom EDS je voľba vhodného štandardu. Za vnútorný štandard sme zvolili síru, ktorá je relatívne rovnomerne zastúpená v celej bunke a poskytuje dostatočný signál. Dôkazom pre toto tvrdenie je obr. 3. Ďalším problémom je drift (pohyb vzorky v dôsledku ohrievania preparátu sekundárnymi elektrónmi v kombinácii s otrasmi budovy), je eliminovaný riadiacim softvérom systému INCA. Na obr. 3 je možné pozorovať jasné kontúry signálu síry v dobrej zhode s obrysom bunky. S ohľadom na lokálny výskyt ruténia na povrchu bunky nebolo možné vykonať jeho mapovanie pri malých zväčšeniach (8000–krát). Mapovanie pri veľkých zväčšeniach (100–120 tisíc krát) nebolo možné, pretože preparát bol deštruovaný v dôsledku vysokej intenzity žiarenia. Pri veľkých zväčšeniach sa analyzovali viaceré lokálne miesta, (obr. 4).



Obr. 3: 12–hod. mapovanie rozloženia síry v bunke. Vľavo a v strede možno pozorovať kontúry bunky tvorené prvkovou mapou síry, preložené grafom počtu kvánt po priereze. V pravo je bunka preložená bodmi s najväčšou pravdepodobnosťou výskytu síry (malý posun doľava je dôsledkom driftu počas 12–hod. experimentu).



Obr. 4: Bunka značená RR, zväčšená 120000 krát v STEM zobrazení , vľavo membrána – označená lichobežníkom, vpravo cytoplazma – označená štvorcem



Obr. 5: EDS spektrum membrány bunky obr.4), Ru identifikuje píky pre ruténium. Vhodným výberom miest na povrchu a vo vnútri bunky sme stanovili relatívnu koncentráciu ruténia voči síre a vzájomne dali do pomeru povrchovú vnútrobunkovú koncentráciu ruténia tab. 1.

Tab. 1: Koncentrácia ruténia vo vnútri a na povrchu bunky

bunky		rel. koncentrácia Ru/S		rel. Konc. Ru membrana/ vnútro bunky
		povrch bunky	vnútro bunky	
Senzitívne	kontrola	0,12	0,03	4,39
	tunikamycín	7,14	1,00	7,13
Rezistentné	kontrola	9,40	11,80	0,80
	tunikamycín	3,66	0,34	10,91
Transfekované	kontrola	2,19	0,06	38,19
	tunikamycín	10,36	0,65	15,98

Z tab. 1. vyplýva, že EDS analýza potvrdzuje predbežné výsledky TEM. Tunikamycín jednoznačne zväčšuje množstvo negatívneho náboja na povrchu S a R buniek. Transfekcia génom pre ľudský P-Gp výrazne mení povrch S buniek.

Záver

Cieľom predkladanej práce bolo úspešné zavedenie metódy EDS na našom pracovisku. V širšom kontexte práca spolu s ďalšími biochemickými meraniami poukazuje na zmeny povrchových sacharidov vplyvom inhibície N-glykozylácie prebiehajúcej v endoplazmatickom retikule vplyvom tunikamycínu.

PodĎakovanie

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.

pH optimum a pH stabilita lipáz *Pseudozyma fusiformata*

Martina Vršanská^a, Stanislava Voběrková^a, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Jana Molnárová^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko,chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

CCY, kvasinky, lipázy, pH optimum, pH stabilita, *Pseudozyma fusiformata*

Úvod

Z 92 testovaných kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ktoré patrili k 29 druhom, vykazovalo viac ako 50% lipolytickú aktivitu testovaných na Tween 80 [Molnárová a kol., 2013]. Vzhľadom na to, že testovanie v tejto práci bolo vyhodnocované kvalitatívne (opaleskujúce okolie kultúry rastúcej v miske s médiom s obsahom Tween 80) [Slifkin 2000], bolo zaujímavé nájsť kmene s kvantitatívne najvyššou lipolytickou aktivitou a ocharakterizovať produkované enzýmy. Kvantitatívne najvyššia produkcia celkových aj extracelulárnych lipáz bola detegovaná u kmeňov *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* a *Pseudozyma fusiformata*.

Cieľom tejto práce bolo študovať pH optimum a pH stabilitu extracelulárnych lipáz kvasinky *Pseudozyma fusiformata* so zameraním na enzýmy, ktoré sa produkujú v skorších a neskorších fázach rastu kmeňa. *Pseudozyma fusiformata* je známa ako producent celobiózových lipidov, ktoré majú antifungálnu aktivitu, keďže v dôsledku zvýšenia permeability bunkovej steny uvoľňujú z buniek askomycét a bazídiomycét ATP, čo vedie k ich usmrteniu [Kulakovskaya a kol. 2009].

Materiál a metódy

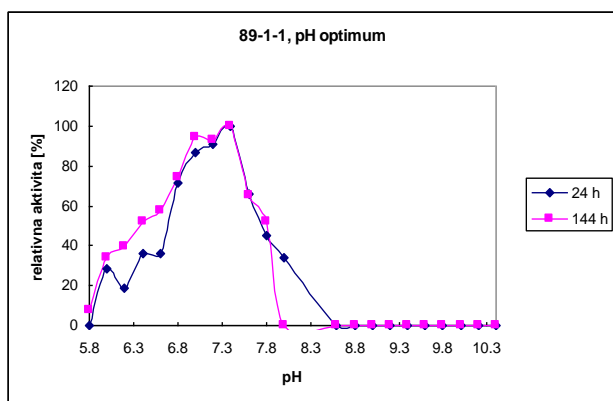
Ako testovací kmeň bola použitá kvasinka *Pseudozyma fusiformata*, CCY 89-1-1, zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV.

Kmeň bol kultivovaný na médiu s obsahom TWEEN 80 ako zdrojom uhlíka. V 24 hod kultivácie a po 144 hod boli odobraté vzorky z kultivačného média. Po ich centrifugácii sa stanovovala v supernatante lipolytická aktivita (aktivita extracelulárnych lipáz) na PNP-laureát ako substrát, pričom sa využívalo meranie žltého zafarbenia úmerného uvoľnenému množstvu PNP (para-nitrofenyl).

Na stanovenie pH optima sa použili roztoky substrátu s pH v rozmedzí 5,8-10,3, pričom na nariadenie (1:9) kultivačného média sa použili rovnaké tlmivé roztoky, ako na prípravu substrátov. Po 24 hod bola aktivita v nariadenom médiu opätovne stanovená a z rozdielu aktivít sa zistila pH stabilita enzýmov vyjadrená vo forme zostatkovej aktivity.

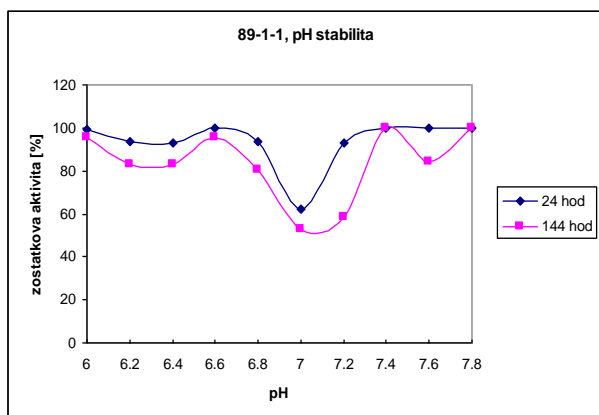
Výsledky a diskusia

pH optimum extracelulárnych lipáz produkovaných kvasinkou *Pseudozyma fusiformata* v skorších fázach kultivácie (24 hod) a jej neskorších fázach (144 hod), je zobrazená na Obr. 1. Priebeh krivky jednoznačne nasvedčuje na produkciu viacerých foriem lipáz (minimálne piatich), ktoré sa líšia pH optimami. Majoritná forma mala pH optimum 7,4, ďalšie optimá sme zaznamenali pri pH 7,0, 7,8, 6,4 a 6.0. Rozdiely v produkcii typu jednotlivých foriem v priebehu kultivácie zo stanovenia pH optim nevyplývajú, skôr sa mení ich zastúpenie.



Obr. 1: pH optimum lipáz produkovaných kmeňom *Pseudozyma fusiformata* v skorších (24 hod) a neskorších (144 hod) fázach kultivácie

Rozdiely medzi lipázami produkovanými v skorších a neskorších fázach kultivácie sa však prejavili v ich pH stabilite (Obr. 2). Zvláštnosťou tohto kmeňa bolo, že enzýmy produkované v skorších fázach rastu boli o niečo stabilnejšie (všeobecne 80-100% po 24 hod s výnimkou pH 7.0-7.2, kde predpokladáme 50% inaktiváciu formy s pH optimom 7.0)



Obr. 2: pH stabilita lipáz produkovaných kmeňom *Pseudozyma fusiformata* v skorších (24 hod) a neskorších (144 hod) fázach kultivácie

Záver:

Pseudozyma fusiformata, CCY 89-1-1, produkovala viacej foriem lipáz s pH optimami v rozmedzí pH 6,0 - 7,8, pričom majoritná forma mala pH optimum 7,4. Enzýmy produkované v počiatkových fázach

rastu kmeňa boli stabilnejšie, v pH 6,0– 7,8 si po 24 hod zachovávali aktivitu nad 90% s výnimkou enzýmu s pH optimom 7,0, ktorého aktivita klesla o 50%.

Literatúra

1. [Kulakovskaya T.](#), [Shashkov A.](#), [Kulakovskaya E.](#), a kol. (2009) *J. Oleo. Sci.* 58:133
2. Molnárová J., Vadkertiová R., Stratilová E. (2013) *J. Basic Microbiol.* 53:1
3. Slifkin M. (2000) *J. Clin. Microbiol.* 38:4626

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.

Teplotné optimum a tepelná stabilita lipáz *Pseudozyma fusiformata*

Martina Vršanská^a, Stanislava Voběrková^a, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Jana Molnárová^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko, chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

CCY, kvasinky, lipázy, teplotné optimum, tepelná stabilita, *Pseudozyma fusiformata*

Úvod

Z 92 testovaných kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ktoré patrili k 29 druhom, vykazovalo viac ako 50% lipolytickú aktivitu testovaných na Tween 80 [Molnárová a kol., 2013]. Vzhľadom na to, že testovanie v tejto práci bolo vyhodnocované kvalitatívne (opaleskujúce okolie kultúry rastúcej v miske s médiom s obsahom Tween 80) [Slifkin 2000], bolo zaujímavé nájsť kmene s kvantitatívne najvyššou lipolytickou aktivitou a ocharakterizovať produkované enzýmy. Kvantitatívne najvyššia produkcia celkových aj extracelulárnych lipáz bola detegovaná u kmeňov *Mayerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* a *Pseudozyma fusiformata*.

Cieľom tejto práce bolo študovať teplotné optimum a tepelnú stabilitu extracelulárnych lipáz kvasinky *Pseudozyma fusiformata*. Táto kvasinka, známa najmä ako producent celobiózových lipidov s antifungálnu aktivitu najmä voči bazídiomycétam [Kulakovskaya a kol. 2009], vykazovala podľa pH optim produkciu viacerých foriem lipáz.

Materiál a metódy

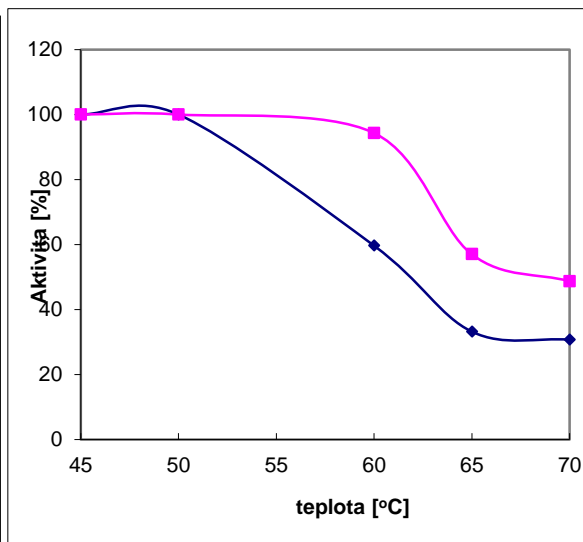
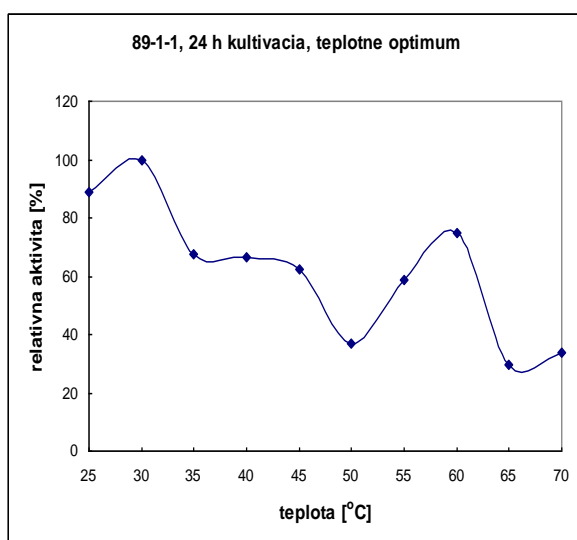
Ako testovací kmeň bola použitá kvasinka *Pseudozyma fusiformata* CCY 89-1-1 zo Zbierky kvasiniek CHÚ SAV. V 24 hod kultivácie a po 144 hod boli odobraté vzorky z kultivačného média. Po ich centrifugácii sa stanovovala v supernatante aktivita extracelulárnych lipáz na PNP-laureát ako substrát, pričom sa využívalo meranie žltého zafarbenia úmerného uvoľnenému množstvu PNP (para-nitrofenyl). Na stanovenie teplotného optima sa médium s extracelulárnymi lipázami a substrát najprv inkubovali 5 min, aby dosiahli teplotu, pri ktorej sa aktivita potom stanovovala (25 – 70 °C). Na tepelnú stabilitu boli

vzorky média inkubované pri danej teplote 2 hod, potom sa všetky ochladili na teplotu 30 °C a aktivita sa stanovila pri tejto teplote.

Výsledky a diskusia

Krivka teplotného optima naznačila rovnako ako krivka pH optima prítomnosť viacerých foriem lipáz s rôznymi teplotnými optimami, minimálne pri 30 °C, 40-45 °C a 60 °C (Obr. 1).

Tak ako v prípade pH stability, aj tepelná stabilita foriem produkovaných v neskorších dobách kultivácie bola vyššia (Obr. 2). Vo všeobecnosti boli lipázy *Pseudozyma fusiformata* stabilné do 50 °C, tie, ktoré boli produkované v neskorších fázach rastu približne pri 60 °C. Pri 70 °C si po dvoch hodinách zachovali 30 % resp. 50 % aktivity.



Obr. 1: Teplotné optimum lipáz produkovaných kmeňom *Pseudozyma fusiformata* detegovaných v kultivačnom médiu po 24 hod rastu kmeňa

Obr. 2: Tepelná stabilita (2-hodinová inkubácia) lipáz produkovaných kmeňom *Pseudozyma fusiformata* v skorších (24 hod) a neskorších (144 hod) fázach kultivácie

Záver:

Priebeh krivky teplotného optima naznačil prítomnosť viacerých foriem lipáz produkovaných kmeňom *Pseudozyma fusiformata* CCY 89-1-1, pričom sa výrazne prejavilo teplotné optimum pri 30 a 60 °C a ďalšie v rozpätí 40-45 °C. V dvojhodinovom experimente boli lipázy stabilné do 50 °C, pričom tepelná stabilita foriem produkovaných v neskorších dobách kultivácie bola o vyššia (60 °C).

Literatúra

1. [Kulakovskaya T.](#), [Shashkov A.](#), [Kulakovskaya E.](#), a kol. (2009) *J. Oleo. Sci.* 58:133
2. Molnárová J., Vadkertiová R., Stratilová E. (2013) *J. Basic Microbiol.* 53:1
3. Slifkin M. (2000) *J. Clin. Microbiol.* 38:4626

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.

Vplyv zdroja uhlíka na rast kvasinky *Pseudozyma fusiformata* a jej produkciu lipolytických enzýmov

Martina Vršanská^a, Stanislava Voběrková^a, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Jana Molnárová^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko,chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

CCY, kvasinky, lipázy, rastová krivka

Úvod

Z 92 testovaných kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ktoré patrili k 29 druhom, vykazovalo viac ako 50% lipolytickú aktivitu testovaných na Tween 80 [Molnárová a kol., 2013]. Vzhľadom na to, že testovanie v tejto práci bolo vyhodnocované kvalitatívne (opaleskujúce okolie kultúry rastúcej v miske s médiom s obsahom Tween 80) [Slifkin 2000], bolo zaujímavé nájsť kmene s kvantitatívne najvyššou lipolytickou aktivitou a ocharakterizovať produkované enzýmy. Kvantitatívne najvyššia produkcia celkových aj extracelulárnych lipáz bola detegovaná u kmeňov *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* a *Pseudozyma fusiformata*.

Cieľom tejto práce bolo študovať vplyv zdroja uhlíka prítomného v kultivačnom médiu na rast kvasinky *Pseudozyma fusiformata* a na jej produkciu lipolytických enzýmov, či už extracelulárnych alebo celkových. Zaujímavé je, že táto kvasinka je skôr známa ako producent celobiózových lipidov, ktoré majú antifungálnu aktivitu najmä voči bazídiomycétam [Kulakovskaya a kol. 2009].

Materiál a metódy

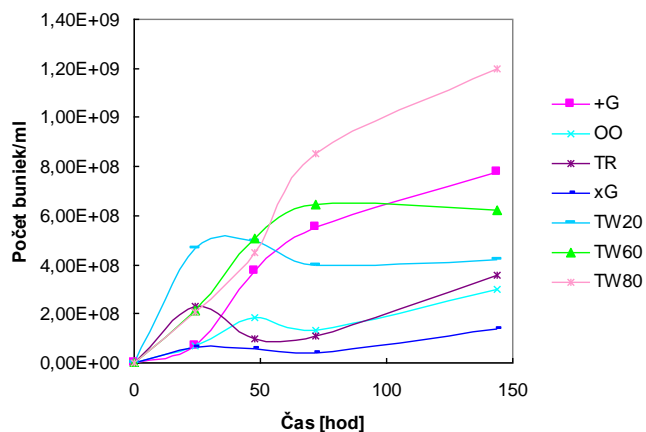
Ako testovací kmeň bola použitá kvasinka *Pseudozyma fusiformata*, CCY 89-1-1, zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV. Kmeň bol kultivovaný na médiu bez zdroja uhlíka (xG), s obsahom olivového oleja (OO), glukózy (+G), Tritonu X100 (TR), TWEEN 20 (TW20), TWEEN 60 (TW60), alebo TWEEN 80 (TW80) ako zdroja uhlíka. V priebehu kultivácie sa stanovoval rast kvasiniek počítaním buniek v Bürkerovej komôrke a lipolytická aktivita v médiu s bunkami (celková aktivita) a bez nich (aktivita extracelulárnych lipáz). Aktivita sa stanovovala na PNP-laureát ako substrát, pričom sa využívalo meranie žltého zafarbenia úmerného uvoľnenému množstvu PNP (para-nitrofenyl).

Výsledky a diskusia

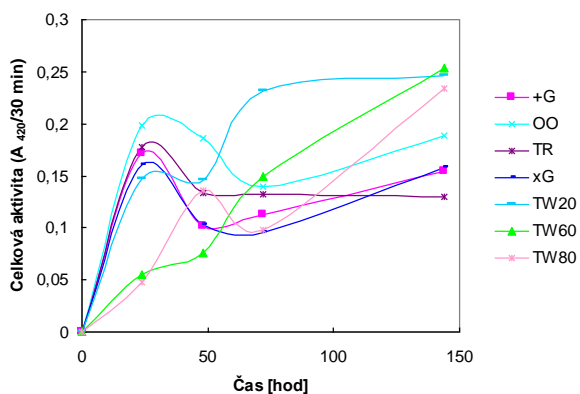
Ako sa dalo očakávať, rast kvasiniek *Pseudozyma fusiformata* bol najslabší v médiu, ktoré neobsahovalo iný zdroj uhlíka ako kvasničný autolyzát (Obr. 1). Rast na médiu s olivovým olejom a s Tritonom X100 bol nižší ako rast na glukóze, TWEEN 20 a TWEEN 60. Najvyšší rast bol pozorovaný na TWEEN 80.

S výnimkou rastu na glukóze, TWEEN 60 a TWEEN 80 naznačovali krivky určité adaptačné obdobie kmeňa na zdroj uhlíka v médiu.

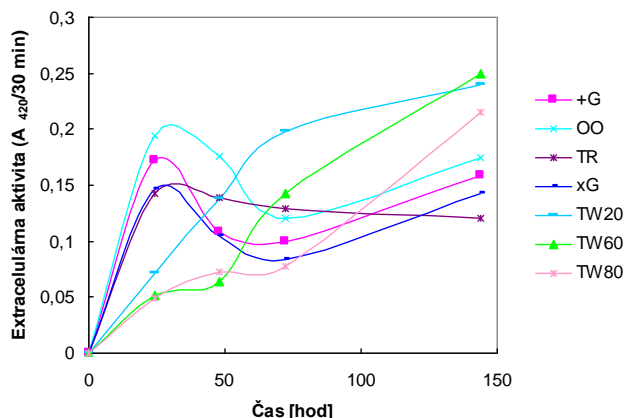
Z hľadiska produkovanej lipolytickej aktivity boli v skorších fázach kultivácie najvhodnejšími zdrojmi uhlíka olivový olej, Triton X100, glukóza a médium bez zdroja uhlíka, v prípade aktivity na bunkách aj TWEEN 20. V dlhodobých kultiváciách sa praznivo prejavil vplyv TWEEN v poradí TWEEN 20 > TWEEN 60 > TWEEN 80 (Obr. 2 a Obr. 3).



Obr. 1: Rast kmeňa *Pseudozyma fusiformata*, CCY 89-1-1, na médiu s rôznymi zdrojmi uhlíka. +G – glukóza; OO – olivový olej; TR – Triton X100; xG – bez C-zdroja; TW20 – TWEEN 20; TW60 – TWEEN 60; TW80 – TWEEN 80



Obr. 2: Celková lipolytická aktivita produkovaná kmeňom *Pseudozyma fusiformata*, CCY 89-1-1, na médiu s rôznymi zdrojmi uhlíka. +G – glukóza; OO – olivový olej; TR – Triton X100; xG – bez C-zdroja; TW20 – TWEEN20; TW60 – TWEEN60; TW80 – TWEEN80



Obr. 3: Extracelulárna lipolytická aktivita produkovaná kmeňom *Pseudozyma fusiformata*, CCY 89-1-1, na médiu s rôznymi zdrojmi uhlíka. +G – glukóza; OO – olivový olej; TR – Triton X100; xG – bez C-zdroja; TW20 – TWEEN 20; TW60 – TWEEN 60; TW80 – TWEEN 80

Záver:

Rast a produkcia lipáz kvasinkou *Pseudozyma fusiformata*, CCY 89-1-1, boli ovplyvnené zdrojom uhlíka v kultivačnom médiu a dĺžkou kultivácie. Najvyšší rast kmeňa bol pozorovaný na médiu s obsahom TWEEN 80, aj keď v počiatočnom štádiu rástol kmeň rýchlejšie na TWEEN 20. Produkcia enzýmov bola najvyššia na médiu s obsahom TWEEN 20 a TWEEN 60, v skorších fázach kultivácie aj na médiu, ktoré obsahovalo olivový olej.

Literatúra

1. [Kulakovskaya T., Shashkov A., Kulakovskaya E.](#), a kol. (2009) *J. Oleo. Sci.* 58:133
2. Molnárová J., Vadkertiová R., Stratilová E. (2013) *J. Basic Microbiol.* 53:1
3. Slifkin M. (2000) *J. Clin. Microbiol.* 38:4626

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.

pH stabilita a pH optimum lipolytických enzýmov *Meyerozyma guilliermondii*

Martina Vršanská^a, Stanislava Voběrková^a, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Jana Molnárová^b, Eva Stratilová^{b,}*

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko, chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

CCY, kvasinky, lipázy, *Meyerozyma guilliermondii*, pH optimum, pH stabilita

Úvod

Z 92 testovaných kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ktoré patrili k 29 druhom, vykazovalo viac ako 50% lipolytickú aktivitu testovaných na Tween 80 [Molnárová a kol., 2013]. Vzhľadom na to, že testovanie v tejto práci bolo vyhodnocované kvalitatívne (opaleskujúce okolie kultúry rastúcej v miske s médiom s obsahom Tween 80) [Slifkin 2000], bolo zaujímavé nájsť kmene s kvantitatívne najvyššou lipolytickou aktivitou a ocharakterizovať produkované enzýmy. Kvantitatívne najvyššia produkcia celkových aj extracelulárnych lipáz bola detegovaná u kmeňov *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* a *Pseudozyma fusiformata*.

Cieľom tejto práce bolo študovať pH optimum a pH stabilitu extracelulárnych lipáz kvasinky *Meyerozyma guilliermondii* so zameraním na enzýmy, ktoré sa produkujú v skorších a neskorších fázach rastu kmeňa.

Materiál a metódy

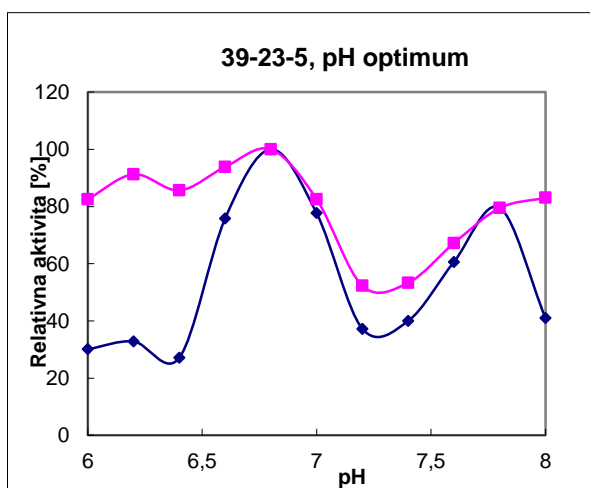
Ako testovací kmeň bola použitá kvasinka *Meyerozyma guilliermondii*, CCY 39-23-5, zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV.

Kmeň bol kultivovaný na médiu s obsahom TWEEN 80 ako zdrojom uhlíka. V 48 hod kultivácie a po 144 hod boli odobraté vzorky z kultivačného média. Po ich centrifugácii sa stanovovala v supernatante lipolytická aktivita (aktivita extracelulárnych lipáz) na PNP-laureát ako substrát, pričom sa využívalo meranie žltého zafarbenia úmerného uvoľnenému množstvu PNP (para-nitrofenyl).

Na stanovenie pH optima sa použili roztoky substrátu s pH v rozmedzí 6,0-8,0, pričom na nariedenie (1:9) kultivačného média sa použili rovnaké tlmivé roztoky, ako na prípravu substrátov. Po 24 hod bola aktivita v nariedenom médiu opätovne stanovená a z rozdielu aktivít sa zistila pH stabilita enzýmov vyjadrená vo forme zostatkovej aktivity.

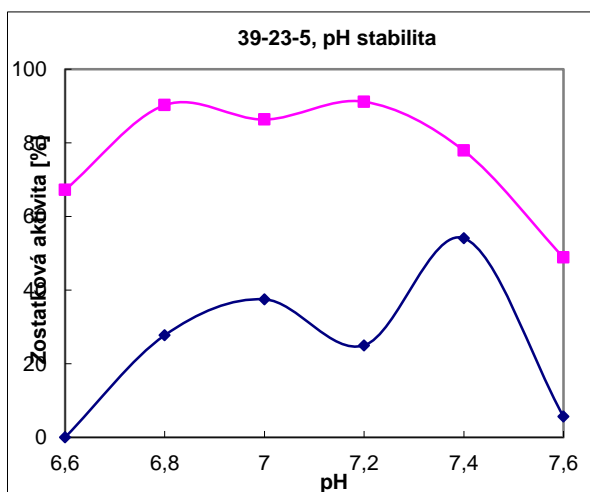
Výsledky a diskusia

pH optimum extracelulárnych lipáz produkovaných kvasinkou *Meyerozyma guilliermondii* v skorších fázach kultivácie (48 hod) a jej neskorších fázach (144 hod), je zobrazená na Obr. 1. Priebeh krivky jednoznačne nasvedčuje na produkciu viacerých foriem lipáz (minimálne troch), ktoré sa líšia pH optimami. Majoritná forma mala pH optimum 6,8, ďalšie optimá sme zaznamenali pri pH 6,2 a 7,8. Rozdiely v produkcii typu jednotlivých foriem v priebehu kultivácie zo stanovenia pH optim nevyplývajú, skôr sa mení ich zastúpenie.



Obr. 1: pH optimum lipáz produkovaných kmeňom *Meyerozyma guilliermondii* v skorších (48 hod - modrá) a neskorších (144 hod - ružová) fázach kultivácie

Rozdiely medzi lipázami produkovanými v skorších a neskorších fázach kultivácie sa však prejavili v ich pH stabilite (Obr. 2). Jednoznačne sa dá konštatovať, že enzýmy produkované v neskorších fázach rastu sú stabilnejšie.



Obr. 2: pH stabilita lipáz produkovaných kmeňom *Meyerozyma guilliermondii* v skorších (48 hod - modrá) a neskorších (144 hod - ružová) fázach kultivácie

Záver:

Meyerozyma guilliermondii, CCY 39-23-5, produkovala viacej foriem lipáz s pH optimami v rozmedzí pH 6,2 - 7,8, pričom majoritná forma mala pH optimum 6,8. Enzýmy produkované v neskorších fázach rastu kmeňa boli stabilnejšie, v pH 6,7– 7,3 si po 24 hod zachovávali aktivitu 80 – 90%.

Literatúra

1. Molnárová J., Vadkertiová R., Stratilová E. (2013) J. Basic Microbiol. 53:1
2. Slifkin M. (2000) J. Clin. Microbiol. 38:4626

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.

Teplotné optimum a tepelná stabilita lipolytických enzýmov *Meyerozyma guilliermondii*

Martina Vršanská^a, Stanislava Voběrková^a, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Jana Molnárová^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko, chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

CCY, kvasinky, lipázy, *Meyerozyma guilliermondii*, teplotné optimum, tepelná stabilita

Úvod

Z 92 testovaných kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ktoré patrili k 29 druhom, vykazovalo viac ako 50% lipolytickú aktivitu testovaných na Tween 80 [Molnárová a kol., 2013]. Vzhľadom na to, že testovanie v tejto práci bolo vyhodnocované kvalitatívne (opaleskujúce okolie kultúry rastúcej v miske s médiom s obsahom Tween 80) [Slifkin 2000], bolo zaujímavé nájsť kmene s kvantitatívne najvyššou lipolytickou aktivitou a ocharakterizovať produkované enzýmy. Kvantitatívne najvyššia produkcia celkových aj extracelulárnych lipáz bola detegovaná u kmeňov *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* a *Pseudozyma fusiformata*.

Cieľom tejto práce bolo študovať teplotné optimum a tepelnú stabilitu extracelulárnych lipáz kvasinky *Meyerozyma guilliermondii*. Keďže proteóm tejto kvasinky je známy, známe sú aj jej lipolytické enzýmy [Butler a kol., 2009]. Pri štúdiu produkovaných enzýmov však nesmieme zabudnúť na potenciálne rozdiely medzi jednotlivými kmeňmi. Stanovenie pH optima naznačilo prítomnosť viacerých foriem lipolytických enzýmov *Meyerozyma guilliermondii*, takže bolo zaujímavé zistiť, či sa táto rôznorodosť prejaví aj na teplotných optimách.

Materiál a metódy

Ako testovací kmeň bola použitá kvasinka *Meyerozyma guilliermondii*, CCY 39-23-5, zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV. V 48 hod kultivácie a po 144 hod boli odobraté vzorky z kultivačného média. Po ich centrifugácii sa stanovovala v supernatante aktivita extracelulárnych lipáz na PNP-laureát ako

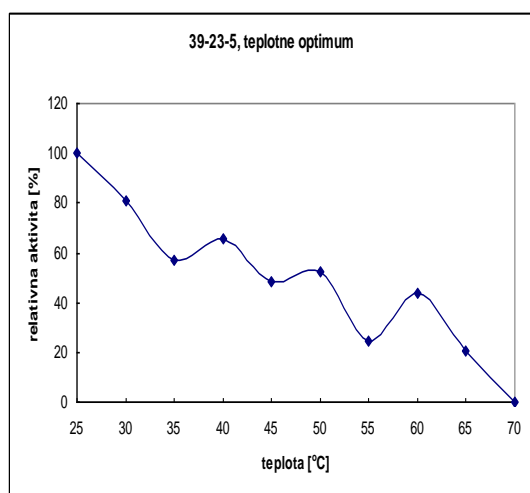
substrát, pričom sa využívalo meranie žltého zafarbenia úmerného uvoľnenému množstvu PNP (para-nitrofenyl).

Na stanovenie teplotného optima sa médium s extracelulárnymi lipázami a substrát najprv inkubovali 5 min, aby dosiahli teplotu, pri ktorej sa aktivita potom stanovovala (25 – 70 °C). Na tepelnú stabilitu boli vzorky média inkubované pri danej teplote 2 hod, potom sa všetky ochladili na teplotu 30 °C a aktivita sa stanovila pri tejto teplote.

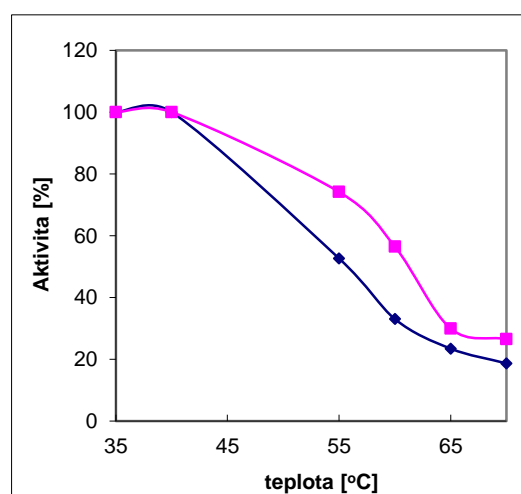
Výsledky a diskusia

Krivka teplotného optima naznačila rovnako ako krivka pH optima prítomnosť viacerých foriem lipáz s rôznymi teplotnými optimami, minimálne pri ≤ 25 °C, 40 °C, 50 °C a 60 °C (Obr. 1).

Tak ako v prípade pH stability, aj tepelná stabilita foriem produkovaných v neskorších dobách kultivácie bola vyššia (Obr. 2). Vo všeobecnosti boli lipázy *Meyerozyma guilliermondii* stabilné do 40 °C, tie, ktoré boli produkované v skorších fázach rastu kmeňa stratili 50% aktivity po 2 hod pri 55 °C a tie, ktoré boli produkované v neskorších fázach rastu približne pri 62 °C.



Obr. 1: Teplotné optimum lipáz produkovaných kmeňom *Meyerozyma guilliermondii* detegovaných v kultivačnom médiu po 48 hod rastu kmeňa



Obr. 2: Tepelná stabilita (2-hodinová inkubácia) lipáz produkovaných kmeňom *Meyerozyma guilliermondii* v skorších (48 hod) a neskorších (144 hod) fázach kultivácie

Záver: Priebeh krivky teplotného optima naznačil prítomnosť viacerých foriem lipáz produkovaných kmeňom *Meyerozyma guilliermondii*, CCY 39-23-5, pričom sa prejavilo teplotné optimum pri ≤ 25 °C, 40 °C, 50 °C a 60 °C.

V dvojhodinovom experimente boli lipázy stabilné do 40 °C, pričom tepelná stabilita foriem produkovaných v neskorších dobách kultivácie bola o niečo vyššia (50% strata aktivity pri 55 resp. 62 °C).

Literatúra

1. Molnárová J., Vadkertiiová R., Stratilová E. (2013) J. Basic Microbiol. 53:1
2. Slifkin M. (2000) J. Clin. Microbiol. 38:4626
3. [Butler G.](#), [Rasmussen M. D.](#), [Lin M. F.](#), a kol. (2009) Nature 459:657

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.

Vplyv zdroja uhlíka na rast kvasinky *Meyerozyma guilliermondii* a jej produkciu lipolytických enzýmov

Martina Vršanská^a, Stanislava Voběrková^a, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Jana Molnárová^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko, chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

CCY, kvasinky, lipázy, *Meyerozyma guilliermondii*, rastová krivka

Úvod

Z 92 testovaných kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ktoré patrili k 29 druhom, vykazovalo viac ako 50% lipolytickú aktivitu testovaných na Tween 80 [Molnárová a kol., 2013]. Vzhľadom na to, že testovanie v tejto práci bolo vyhodnocované kvalitatívne (opaleskujúce okolie kultúry rastúcej v miske s médiom s obsahom Tween 80) [Slifkin 2000], bolo zaujímavé nájsť kmene s kvantitatívne najvyššou lipolytickou aktivitou a ocharakterizovať produkované enzýmy. Kvantitatívne najvyššia produkcia celkových aj extracelulárnych lipáz bola detegovaná u kmeňov *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* a *Pseudozyma fusiformata*.

Cieľom tejto práce bolo študovať vplyv zdroja uhlíka kultivačného média na rast kvasinky *Meyerozyma guilliermondii* a na jej produkciu lipolytických enzýmov, či už extracelulárnych alebo celkových. Keďže proteóm tejto kvasinky je známy, známe sú aj jej lipolytické enzýmy [Butler a kol., 2009], napriek tomu, že musíme brať do úvahy rozdiely medzi jednotlivými kmeňmi.

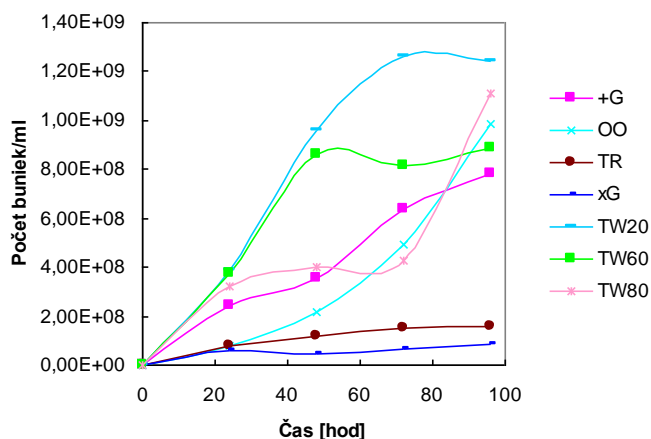
Materiál a metódy

Ako testovací kmeň bola použitá kvasinka *Meyerozyma guilliermondii*, CCY 39-23-5, zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV. Kmeň bol kultivovaný na médiu bez zdroja uhlíka (xG), s obsahom olivového oleja (OO), glukózy (+G), Tritonu X100 (TR), TWEEN20 (TW20), TWEEN60 (TW60), alebo TWEEN 80 (TW80) ako zdroja uhlíka. V priebehu kultivácie sa stanovoval rast kvasiniek počítaním buniek v Bürkerovej komôrke a lipolytická aktivita v médiu s bunkami (celková aktivita) a bez nich (aktivita extracelulárnych lipáz). Aktivita sa stanovovala na PNP-laureát ako substrát, pričom sa využívalo meranie žltého zafarbenia úmerného uvoľnenému množstvu PNP (para-nitrofenyl).

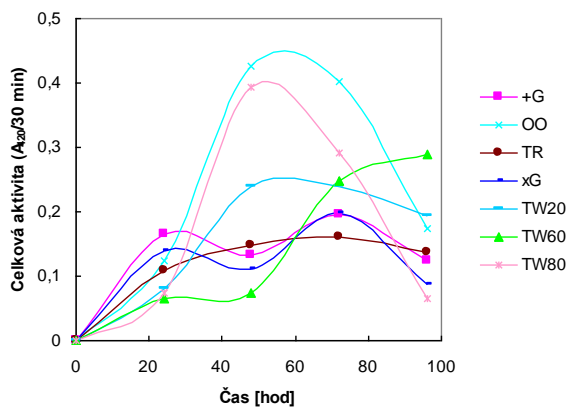
Výsledky a diskusia

Ako sa dalo očakávať, rast kvasiniek *Meyerozyma guilliermondii* bol najslabší v médiu, ktoré neobsahovalo iný zdroj uhlíka ako kvasničný autolyzát (Obr. 1). Kvasinka mala problémy aj s rastom na médiu s Triton X100. Rast na médiu s olivovým olejom sa prejavoval v neskorších fázach kultivácie, kedy dosahoval úroveň rastu na médiu s TWEEN 80. Najvyšší rast bol pozorovaný na TWEEN 20, pričom v počiatočných fázach kultivácie bol porovnateľný s rastom na médiu s TWEEN 60.

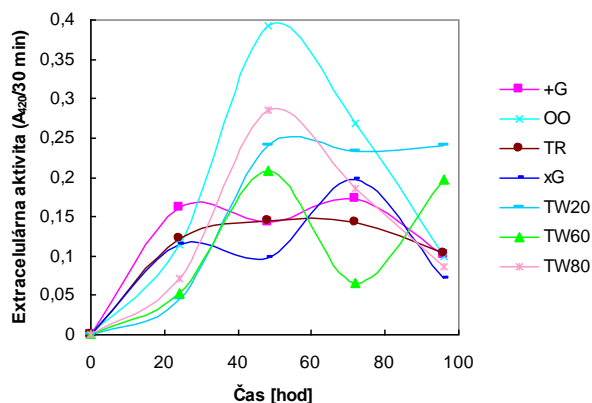
Z hľadiska produkovanej lipolytickej aktivity bol zaujímavý nárast aktivity v 48 hod kultivácie na médiu s olivovým olejom a TWEEN 80, pričom v prípade druhého média bol pozorovaný nárast aj na bunkách (Obr. 2 a Obr. 3).



Obr. 1: Rast kmeňa *Meyerozyma guilliermondii*, CCY 39-23-5, na médiu s rôznymi zdrojmi uhlíka. +G – glukóza; OO – olivový olej; TR – Triton X100; xG – bez C-zdroja; TW20 – TWEEN 20; TW60 – TWEEN 60; TW80 – TWEEN 80



Obr. 2: Celková lipolytická aktivita produkovaná kmeňom *Meyerozyma guilliermondii*, CCY 39-23-5, na médiu s rôznymi zdrojmi uhlíka. +G – glukóza; OO – olivový olej; TR – Triton X100; xG – bez C-zdroja; TW20 – TWEEN 20; TW60 – TWEEN 60; TW80 – TWEEN 80



Obr. 3: Extracelulárna lipolytická aktivita produkovaná kmeňom *Meyerozyma guilliermondii*, CCY 39-23-5, na médiu s rôznymi zdrojmi uhlíka. +G – glukóza; OO – olivový olej; TR – Triton X100; xG – bez C-zdroja; TW20 – TWEEN 20; TW60 – TWEEN 60; TW80 – TWEEN 80

Záver:

Rast a produkcia lipáz kvasinkou *Meyerozyma guilliermondii*, CCY 39-23-5, boli ovplyvnené zdrojom uhlíka v kultivačnom médiu a dĺžkou kultivácie. Najvyšší rast bol pozorovaný na TWEEN 20, pričom v počiatoch kultivácie bol porovnateľný s rastom na médiu s TWEEN 60. Z hľadiska produkovanej lipolytickej aktivity bol zaujímavý nárast aktivity v 48 hod kultivácie na médiu s olivovým olejom a TWEEN 80, pričom v prípade druhého média bol pozorovaný nárast aj na bunkách.

Literatúra

1. Molnárová J., Vadkertiová R., Stratilová E. (2013) J. Basic Microbiol. 53:1
2. Slifkin M. (2000) J. Clin. Microbiol. 38:4626
3. [Butler G.](#), [Rasmussen M. D.](#), [Lin M. F.](#), a kol. (2009) Nature 459:657

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.

pH optimum a pH stabilita lipáz *Yarrowia lipolytica*

Martina Vršanská^a, Stanislava Voběrková^a, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Jana Molnárová^b, Eva Stratilová^{b,}*

^a*Fakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika*

^b*Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko, chemevi@savba.sk*

Kľúčové slová

CCY, kvasinky, lipázy, pH optimum, pH stabilita, *Yarrowia lipolytica*

Úvod

Lipázy sú serínové hydrolázy, ktoré v prírode katalyzujú hydrolýzu esterových väzieb dlhoreťazcových triacylglycerolov na glycerol a mastné kyseliny. Z 92 testovaných kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ktoré patrili k 29 druhom, vykazovalo viac ako 50% lipolytickú aktivitu testovanú na Tween 80 [Molnárová a kol., 2013]. Vzhľadom na to, že testovanie v tejto práci bolo vyhodnocované kvalitatívne (opaleskujúce okolie kultúry rastúcej v miske s médiom s obsahom Tween 80) [Slifkin 2000], bolo zaujímavé nájsť kmene s kvantitatívne najvyššou lipolytickou aktivitou a ocharakterizovať produkované enzýmy. Kvantitatívne najvyššia produkcia celkových aj extracelulárnych lipáz bola detegovaná u kmeňov *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* a *Pseudozyma fusiformata*.

Cieľom tejto práce bolo študovať pH optimum a pH stabilitu extracelulárnych lipáz kvasinky *Yarrowia lipolytica* so zameraním na enzýmy, ktoré sa produkujú v skorších a neskorších fázach rastu kmeňa. O tejto kvasinke je známe, že má potencionálne 16 kódujúcich génov pre lipázy, ale zatiaľ boli čiastočne charakterizované len tri izoenzýmy, Lip2p, Lip7p and Lip8p [Fickers a kol. 2011], pričom majoritnou formou je Lip2p [Pignède a kol., 2000].

Materiál a metódy

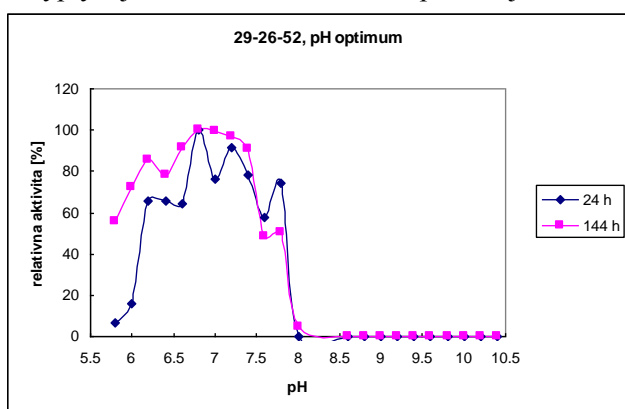
Ako testovací kmeň bola použitá kvasinka *Yarrowia lipolytica*, CCY 29-26-52, zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV. Kmeň bol kultivovaný na médiu s obsahom TWEEN 80 ako zdrojom uhlíka. V 24 hod kultivácie a po 144 hod boli odobraté vzorky z kultivačného média. Po ich centrifugácii sa stanovovala v supernatante lipolytická aktivita (aktivita extracelulárnych lipáz) na PNP-laureát ako

substrát, pričom sa využívalo meranie žltého zafarbenia úmerného uvoľnenému množstvu PNP (para-nitrofenyl).

Na stanovenie pH optima sa použili roztoky substrátu s pH v rozmedzí 5,75-10,5, pričom na nariadenie (1:9) kultivačného média sa použili rovnaké tlmivé roztoky, ako na prípravu substrátov. Po 24 hod bola aktivita v nariadenom médiu opätovne stanovená a z rozdielu aktivít sa zistila pH stabilita enzýmov vyjadrená vo forme zostatkovej aktivity.

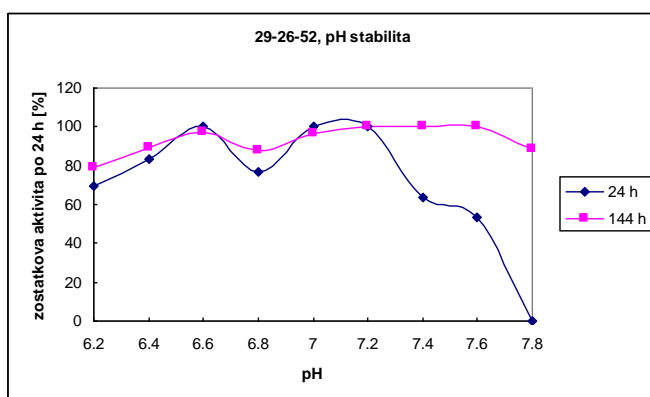
Výsledky

pH optimum extracelulárnych lipáz produkovaných kvasinkou *Yarrowia lipolytica* v skorších fázach kultivácie (24 hod) a jej neskorších fázach (144 hod), je zobrazená na Obr. 1. Priebeh krivky jednoznačne nasvedčuje na produkciu viacerých foriem lipáz (minimálne štyroch), ktoré sa líšia pH optimami. Majoritná forma mala pH optimum 6,8, ďalšie optimá sme zaznamenali pri pH 7,2, 7,8 a 6,2. Rozdiely v produkcii typu jednotlivých foriem v priebehu kultivácie zo stanovenia pH optim nevyplývajú, skôr sa mení ich zastúpenie, aj keď nie výrazne.



Obr. 1: pH optimum lipáz produkovaných kmeňom *Yarrowia lipolytica* v skorších (24 hod) a neskorších (144 hod) fázach kultivácie

Rozdiely medzi lipázami produkovanými v skorších a neskorších fázach kultivácie sa však prejavili v ich pH stabilite (Obr.2). Jednoznačne sa dá konštatovať, že enzýmy produkované v neskorších fázach rastu sú stabilnejšie. Najstabilnejšou oblasťou je okolo pH 7,2 (100%), oblasť so 70% stabilitou v rozmedzí pH 6,2 – 7,3 (- 7,8 pre dlhšie kultivácie).



Obr. 2: pH stabilita lipáz produkovaných kmeňom *Yarrowia lipolytica* v skorších (24 hod) a neskorších (144 hod) fázach kultivácie

Záver:

Yarrowia lipolytica, CCY 29-26-52, produkovala viacej foriem lipáz s pH optimami v rozmedzí pH 6,2 - 7,8, pričom majoritná forma mala pH optimum 6,8. pH optimá naznačovali tvorbu minimálne štyroch

foriem lipáz, pričom Fickers a kol. [2011] popisujú produkciu len troch. Enzýmy produkované v neskorších fázach rastu kmeňa boli stabilnejšie, v pH 6,2 – 7,8 si po 24 hod zachovávali aktivitu 80 – 100%.

Literatúra

1. [Fickers P.](#), [Marty A.](#), [Nicaud J.M.](#) (2011) *Biotechnol. Adv.* 29:632
2. Molnárová J., Vadkertiová R., Stratilová E. (2013) *J. Basic Microbiol.* 53:1
3. Slifkin M. (2000) *J. Clin. Microbiol.* 38:4626
4. [Pignède G.](#), Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M., Nicaud J.-M. (2000) *J. Bacteriol.* 182:2802

PodĎakovanie

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.

Teplotné optimum a tepelná stabilita lipáz *Yarrowia lipolytica*

Martina Vršanská^a, Stanislava Voběrková^a, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Jana Molnárová^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko, chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

CCY, kvasinky, lipázy, teplotné optimum, tepelná stabilita, *Yarrowia lipolytica*

Úvod

Lipázy sú serínové hydrolázy, ktoré v prírode katalyzujú hydrolýzu esterových väzieb dlhoreťazcových triacylglycerolov na glycerol a mastné kyseliny. Z 92 testovaných kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ktoré patrili k 29 druhom [Molnárová a kol., 2013], vykazovali kvantitatívne najvyššiu produkciu celkových aj extracelulárnych lipáz kmene *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* a *Pseudozyma fusiformata*.

Cieľom tejto práce bolo študovať teplotné optimum a tepelnú stabilitu extracelulárnych lipáz kvasinky *Yarrowia lipolytica*. O tejto kvasinke je známe, že má potencionálne 16 kódujúcich génov pre lipázy, ale zatiaľ boli čiastočne charakterizované len tri izoenzýmy, Lip2p, Lip7p and Lip8p [Fickers a kol. 2011], pričom majoritnou formou je Lip2p [Pignède a kol., 2000].

Materiál a metódy

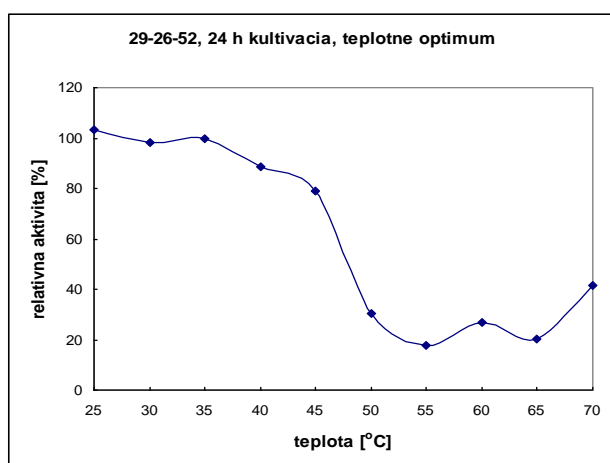
Ako testovací kmeň bola použitá kvasinka *Yarrowia lipolytica*, CCY 29-26-52, zo Zbierky kvasiniek CHÚ SAV. Kmeň bol kultivovaný na médiu s obsahom TWEEN 80 ako zdrojom uhlíka. V 24 hod kultivácie a po 144 hod boli odobraté vzorky z kultivačného média. Po ich centrifugácii sa stanovovala v supernatante aktivita extracelulárnych lipáz na PNP-laureát ako substrát, pričom sa využívalo meranie žltého zafarbenia úmerného uvoľnenému množstvu PNP (para-nitrofenyl).

Na stanovenie teplotného optima sa médium s extracelulárnymi lipázami a substrát najprv inkubovali 5 min, aby dosiahli teplotu, pri ktorej sa aktivita potom stanovovala (25 – 70 °C). Na tepelnú stabilitu boli vzorky média inkubované pri danej teplote 2 hod, potom sa všetky ochladili na teplotu 30 °C a aktivita sa stanovila pri tejto teplote.

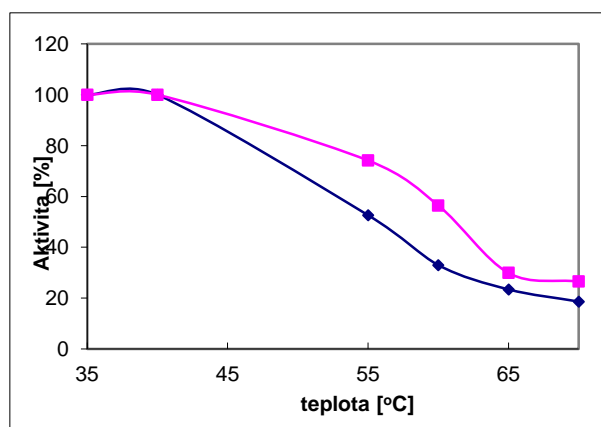
Výsledky a diskusia

Stanovenie pH optima naznačilo, že použitý kmeň *Yarrowia lipolytica* CCY 29-26-52, by mohol produkovať najmenej štyri formy lipáz, pričom pre túto kvasinku sú zatiaľ opísané len tri [Fickers a kol. 2011]. Z tohto dôvodu bolo zaujímavé zistiť, ako sa tento fakt prejaví na dvoch ďalších charakteristikách enzýmov, na teplotnom optime a tepelnej stabilite produkovaných lipáz.

Nezvyčajne široké teplotné optimum medzi 25 – 45 °C opäť naznačilo prítomnosť viacerých foriem lipáz s rôznymi teplotnými optimami (Obr. 1). Ďalšie, výrazne slabšie, sa črtali pri vyšších teplotách. Tak ako v prípade pH stability, aj tepelná stabilita foriem produkovaných v neskorších dobách kultivácie bola vyššia (Obr. 2). Vo všeobecnosti boli lipázy stabilné do 40 °C, tie, ktoré boli produkované v skorších fázach rastu kmeňa stratili 50% aktivity po 2 hod pri 55 °C a tie, ktoré boli produkované v neskorších fázach rastu približne pri 62 °C.



Obr. 1: Teplotné optimum lipáz produkovaných kmeňom *Yarrowia lipolytica* detegovaných v kultivačnom médiu po 24 hod rastu kmeňa



Obr. 2: Tepelná stabilita (2-hodinová inkubácia) lipáz produkovaných kmeňom *Yarrowia lipolytica* v skorších (24 hod) a neskorších (144 hod) fázach kultivácie

Záver:

Priebeh krivky teplotného optima naznačil prítomnosť viacerých foriem lipáz produkovaných kmeňom *Yarrowia lipolytica* CCY 29-26-52, pričom väčšina foriem má teplotné optimum v rozmedzí 25 – 45 °C. V dvojhodinovom experimente boli lipázy stabilné do 40 °C, pričom tepelná stabilita foriem produkovaných v neskorších dobách kultivácie bola o niečo vyššia.

Literatúra

[Fickers P.](#), [Marty A.](#), [Nicaud J.M.](#) (2011) [Biotechnol. Adv.](#) 29:632

Molnárová J., Vadkertiová R., Stratilová E. (2013) *J. Basic Microbiol.* 53:1

[Pignède G.](#), Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M., Nicaud J.-M. (2000) *J. Bacteriol.* 182:2802

PodĎakovanie

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.

Vplyv zdroja uhlíka na rast kvasinky *Yarrowia lipolytica* a jej produkciu lipolytických enzýmov

Martina Vršanská^a, Stanislava Voběrková^a, Jiřina Omelková^a, Renáta Vadkertiová^b, Jana Molnárová^b, Eva Stratilová^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko, chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

CCY, kvasinky, lipázy, rastová krivka, *Yarrowia lipolytica*

Úvod

Z 92 testovaných kmeňov kvasiniek zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV, ktoré patrili k 29 druhom, vykazovalo viac ako 50% lipolytickú aktivitu testovaných na Tween 80 [Molnárová a kol., 2013]. Vzhľadom na to, že testovanie v tejto práci bolo vyhodnocované kvalitatívne (opaleskujúce okolie kultúry rastúcej v miske s médiom s obsahom Tween 80) [Slifkin 2000], bolo zaujímavé nájsť kmene s kvantitatívne najvyššou lipolytickou aktivitou a ocharakterizovať produkované enzýmy. Kvantitatívne najvyššia produkcia celkových aj extracelulárnych lipáz bola detegovaná u kmeňov *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* a *Pseudozyma fusiformata*.

Cieľom tejto práce bolo študovať vplyv zdroja uhlíka kultivačného média na rast kvasinky *Yarrowia lipolytica* a na jej produkciu lipolytických enzýmov, či už extracelulárnych alebo celkových. Táto kvasinka má potencionálne 16 kódujúcich génov pre lipázy, ale zatiaľ boli čiastočne charakterizované len tri izoenzýmy, Lip2p, Lip7p and Lip8p [Fickers a kol. 2011], pričom majoritnou formou je Lip2p [Pignède a kol., 2000].

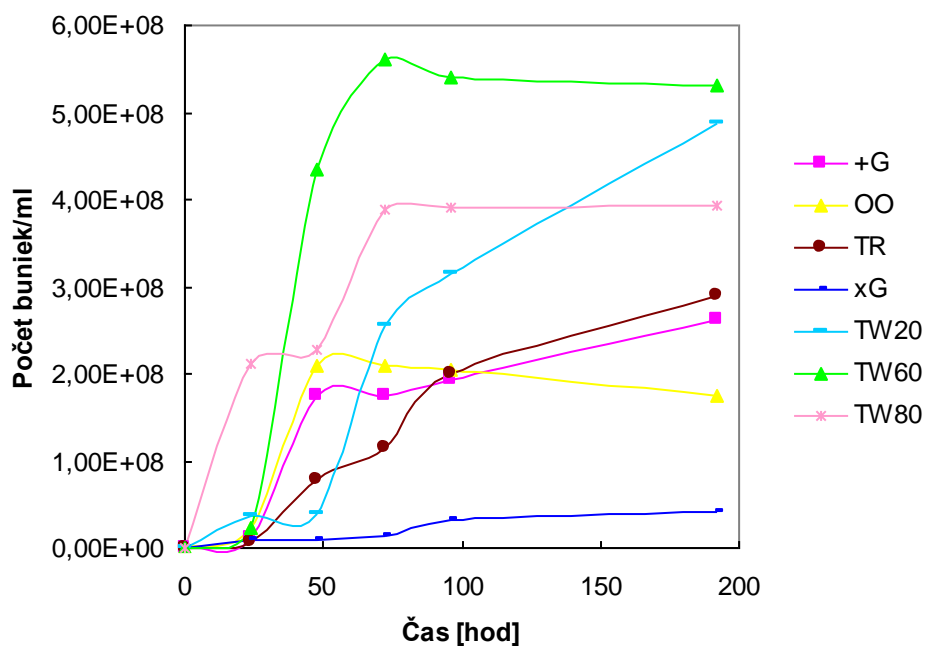
Materiál a metódy

Ako testovací kmeň bola použitá kvasinka *Yarrowia lipolytica*, CCY 29-26-52, zo Zbierky kultúr kvasiniek, CHÚ SAV. Kmeň bol kultivovaný na médiu bez zdroja uhlíka (xG), s obsahom olivového oleja (OO), glukózy (+G), Tritonu X100 (TR), TWEEN 20 (TW20), TWEEN 60 (TW60), alebo TWEEN 80 (TW80) ako zdroja uhlíka. V priebehu kultivácie sa stanovoval rast kvasiniek počítaním buniek v Bürkerovej komôrke a lipolytická aktivita v médiu s bunkami (celková aktivita) a bez nich (aktivita extracelulárnych lipáz). Aktivita sa stanovovala na PNP-laureát ako substrát, pričom sa využívalo meranie žltého zafarbenia úmerného uvoľnenému množstvu PNP (para-nitrofenyl).

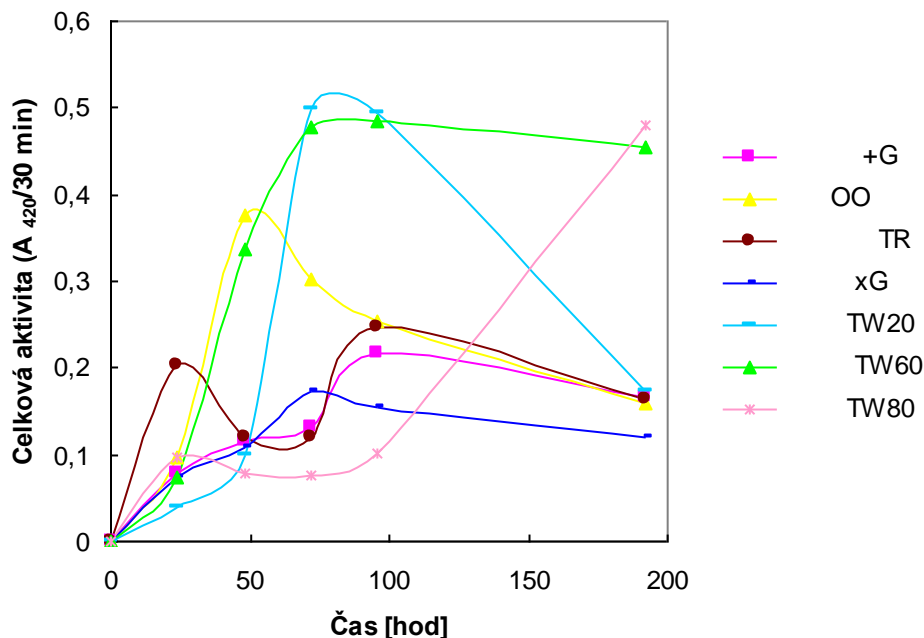
Výsledky a diskusia

Ako sa dalo očakávať, rast kvasiniek *Yarrowia lipolytica* bol najslabší v médiu, ktoré neobsahovalo iný zdroj uhlíka ako kvasničný autolyzát (Obr. 1). Rast na médiu s olivovým olejom v skorších fázach rastu

a s Tritonom X100 v neskorších fázach rastu bol porovnateľný s rastom na glukóze. Najvyšší rast bol pozorovaný na TWEEN 20 – 80, pričom najlepším zdrojom uhlíka z hľadiska rastu kvasiniek bol TWEEN 60. Väčšina kriviek naznačovala určité adaptačné obdobie kmeňa na zdroj uhlíka v médiu.

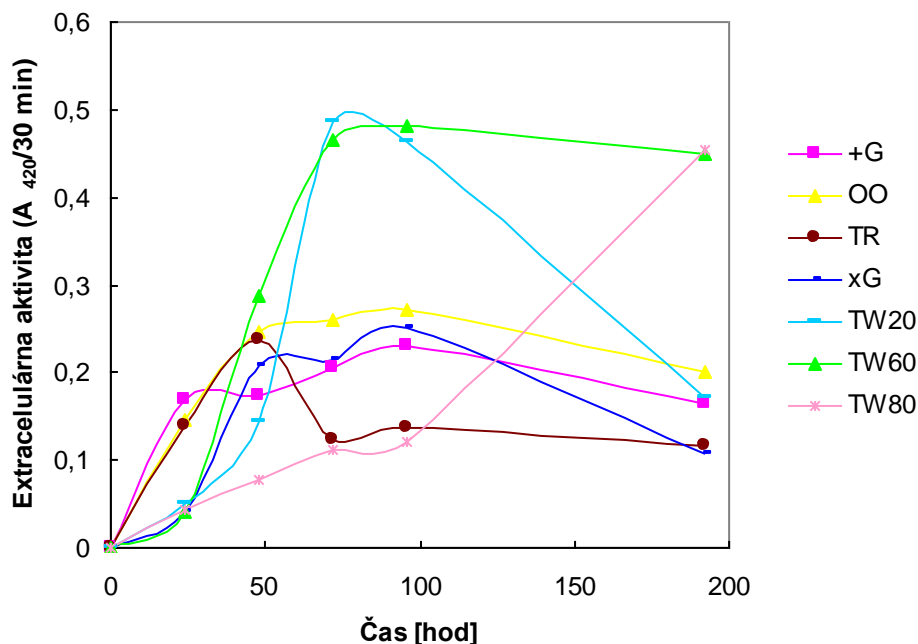


Obr. 1: Rast kmeňa CCY 29-26-52, *Yarrowia lipolytica* na médiu s rôznymi zdrojmi uhlíka. +G – glukóza; OO – olivový olej; TR – Triton X100; xG – bez C-zdroja; TW20 – TWEEN 20; TW60 – TWEEN 60; TW80 – TWEEN 80



Obr. 2: Celková lipolytická aktivita produkovaná kmeňom CCY 29-26-52, *Yarrowia lipolytica* na médiu s rôznymi zdrojmi uhlíka. +G – glukóza; OO – olivový olej; TR – Triton X100; xG – bez C-zdroja; TW20 – TWEEN 20; TW60 – TWEEN 60; TW80 – TWEEN 80

Z hľadiska produkovanej lipolytickej aktivity boli najvhodnejšími zdrojmi uhlíka TWEEN 20 a TWEEN 60, v dlhodobých kultiváciách aj TWEEN 80, na ktorý sa kvasinka musela najprv pravdepodobne adaptovať (Obr. 2 a Obr. 3). Porovnanie celkovej a extracelulárnej aktivity naznačuje zvýšenú tvorbu lipáz aj na bunkách, ktoré boli kultivované v prítomnosti olivového oleja.



Obr. 3: Extracelulárna lipolytická aktivita produkovaná kmeňom CCY 29-26-52, *Yarrowia lipolytica* na médiu s rôznymi zdrojmi uhlíka. +G – glukóza; OO – olivový olej; TR – Triton X100; xG – bez C-zdroja; TW20 – TWEEN 20; TW60 – TWEEN 60; TW80 – TWEEN 80

Záver:

Rast a produkcia lipáz kvasinkou *Yarrowia lipolytica*, CCY 29-26-52, boli ovplyvnené zdrojom uhlíka v kultivačnom médiu. Navyšší rast kmeňa a produkcia enzýmov boli pozorované na médiu s obsahom TWEEN 20 a TWEEN 60.

Literatúra

1. [Fickers P.](#), [Marty A.](#), [Nicaud J.M.](#) (2011) *Biotechnol. Adv.* 29:632
2. Molnárová J., Vadkertiiová R., Stratilová E. (2013) *J. Basic Microbiol.* 53:1
3. Slifkin M. (2000) *J. Clin. Microbiol.* 38:4626
4. [Pignède G.](#), Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M., Nicaud J.-M. (2000) *J. Bacteriol.* 182:2802

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.*

Vplyv ligandov jadrových receptorov pre retinoidy: all-*trans* a 9*cis* retinových kyselín na P-gp sprostredkovanú *multidrug* rezistenciu v L1210 bunkách

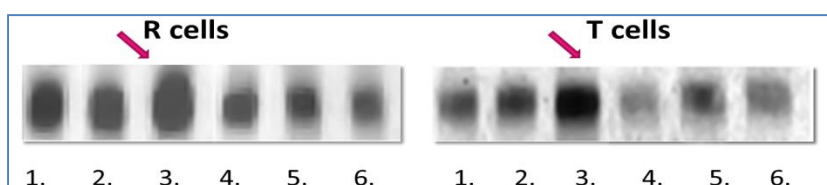
Viera Boháčová, Ján Štetka, Zdena Sulová, Dana Macejová¹, Július Brtko¹, Albert Breier

Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, ¹Ústav experimentálnej endokrinológie SAV, Bratislava, SR

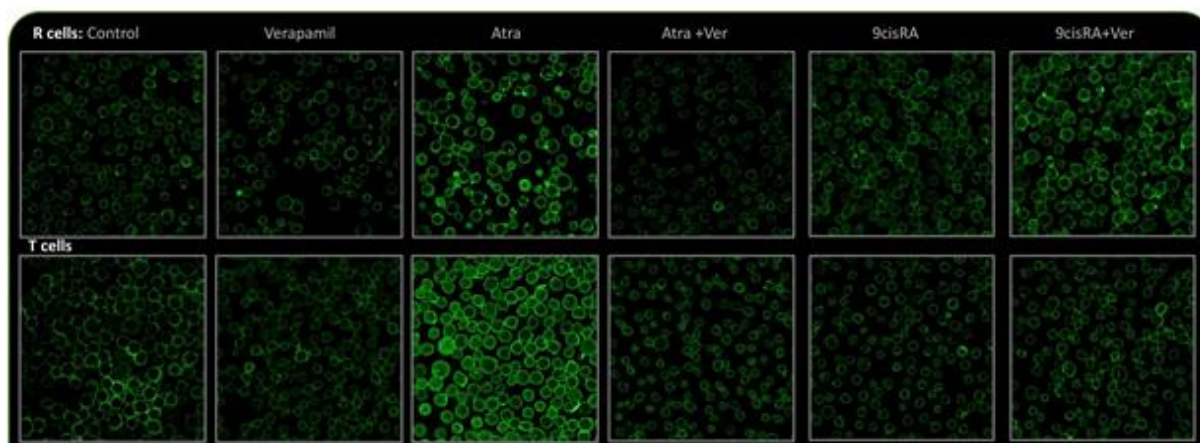
Významnou príčinou zlyhania či zníženia efektivity chemoterapie nádorových ochorení je viaclieková (*multidrug*) rezistencia. Predstavuje špecifický typ rezistencie, pri ktorej sa stávajú neoplastické bunky odolné voči viacerým, štruktúralne a funkčne odlišným látkam. Dôležitým mechanizmom, ktorý sa uplatňuje pri *multidrug* rezistencii je zníženie hladiny cytotoxických látok v bunke pomocou integrálneho proteínu plazmatickej membrány: P-glykoproteínu (Pgp), ktorý patrí medzi ABC transportéry. Keďže zvýšená expresia Pgp je negatívnym prognostickým faktorom pri liečbe nádorových ochorení, sú poznatky o mechanizme regulácie expresie Pgp veľmi dôležité.

Retinové kyseliny, biologicky aktívne metabolity A, zohrávajú dôležitú úlohu v procesoch ako vývoj, rast, imunita, bunková diferenciácia a smrť. Tieto funkcie sú sprostredkované pomocou jadrových receptorov pre retinové kyseliny (RARs) a retinoid X receptorov (RXRs). Viacerí autori popísali vplyv all-*trans* retinovej kyseliny (AtRA, ligand pre RARs receptory) na zmeny v expresii a transportnej aktivite Pgp v rezistentných nádorových bunkových líniiach. V našej predchádzajúcej práci bola zistené, že spoločným pôsobením AtRA a verapamilu (inhibitor transportnej funkcie Pgp) došlo k výraznejšiemu zníženiu expresie i transportnej funkcie Pgp v rezistentných bunkách L1210, než pôsobením verapamilu samotného (1).

Cieľom tejto štúdie bolo sledovanie vplyvu all-*trans* retinovej kyseliny a 9-*cis* retinovej kyseliny (9*cis*RA, ligand pre RARs a RXRs receptory) na expresiu Pgp. V práci sme použili myšiu leukemickú líniu L1210 (senzitívna, P-gp negatívna línia) a dve rezistentné, P-gp pozitívne sublínie, z ktorých jedna vznikla postupnou adaptáciou na vinkristín (R) a druhá stabilnou transfekciou génu pre ľudský Pgp (T). Zistili sme, že pôsobením samotnej AtRA došlo v T bunkách k zvýšeniu expresie Pgp. Proteínové hladiny Pgp boli stanovené Western blot analýzou (Obr. 1) a detegované imunofluorescenčnou vizualizáciou pomocou konfokálnej mikroskopie (Obr. 2).



Obr. 1. Vplyv AtRA (3.3 $\mu\text{mol/L}$) a 9*cis*RA (3.3 $\mu\text{mol/L}$) na proteínové hladiny P-gp v rezistentných bunkových líniiach R a T v prítomnosti (10 $\mu\text{mol/L}$) a neprítomnosti verapamilu počas 20 hodín. (1- kontrola, 2- verapamil, 3- AtRA, 4- AtRA+verapamil, 5- 9*cis*RA, 6- 9*cis*RA+verapamil). Proteínové hladiny P-gp boli stanovené metódou Western blotu, použitím špecifickej protilátky c219.



Obr. 2. Imunofluorescenčná vizualizácia Pgp pomocou konfokálneho mikroskopu

Pri spoločnom pôsobení AtRA a verapamilu sme zistili, že dochádza ku down-regulácii expresie Pgp v oboch rezistentných líniiach. Po ovplyvnení R a T bunkovej línie 9cis retinovou kyselinou sme zaznamenali veľmi podobné hladiny expresie Pgp v porovnaní s kontrolou. K výraznejším zmenám nedošlo ani pri sledovaní efektu 9cisRA spolu s verapamilom, čo bolo potvrdené pre R i T rezistentné bunkové línie.

Uvedené výsledky naznačujú vplyv signálnej dráhy all-*trans* retinovej kyseliny na reguláciu expresie P-glykoproteínu v rezistentných L1210 bunkách, zatiaľčo významný vplyv signálnej dráhy 9cis retinovej kyseliny nebol potvrdený.

Literatúra

(1) Sulova, Z., Macejova, D., Seres, M., Sedlak, J., Brtko, J., Breier, A. Combined treatment of P-gp-positive L1210/VCR cells by verapamil and all-trans retinoic acid induces down-regulation of P-glycoprotein expression and transport activity. *Toxicology In Vitro*, 2008, 22, (1), 96-105.

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.

Multidrug rezistencia pri liečbe myelodysplastického syndrómu

L. Messingerová¹, A. Jonášová², M. Barančík³, L. Suarez⁴, 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

⁴Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, USA

Myelodysplastický syndróm (MDS) je klonálna porucha pluripotentnej kmeňovej bunky charakterizovaná neefektívnou diferenciáciou hematopoetických progenitorových buniek, dyspláziou kostnej drene, genetickou instabilitou a vysokým rizikom transformácie do akútnej myeloidnej leukémie (AML). Heterogenita tohto ochorenia si vyžaduje rozličné terapeutické prístupy medzi ktoré patrí transfúzia krvných elementov, podávanie hematopoetických rastových faktorov (Eprex, Neorecormon, Aranesp), imunosupresívna terapia, imunomodulačná terapia (Lenalidomid), alogénna transplantácia kmeňových buniek, kombinovaná chemoterapia, hypometylačné látky a inhibítory histón deacetyláz (azacytidín, deoxyazacytidín). Epigenetické zmeny ovplyvňujú expresiu genetickej informácie bez zmeny samotnej sekvencie DNA. Medzi epigenetické liečivá používané pri liečbe MDS patria 5-azacytidín (5-aza) a decitabín (5-aza-2-deoxycytidín, DAC). miRNA sú evolučne dobre konzervované, malé, nekódujúce molekuly RNA približne 20-22 nukleotidov dlhé, ktorých expresia môže byť ovplyvnená epigenetickými liečivami. Tieto malé molekuly RNA sú dôležité regulátory expície proteínov v bunkách a mnohých bunkových procesov vrátane diferenciácie, apoptózy a odpovede bunky na stress. Imunomodulačné liečivá (IMiDS) medzi ktoré patrí aj lenalidomid (LD) sú skupinou zlúčenín odvodených od prvého imunomodulačného liečiva- talidomidu. Závažným problémom pri liečbe onkologických pacientov je vznik rezistencie na liečbu. Multidrug rezistencia (MDR) je často spôsobená zvýšenou expresiou dvoch génov kódujúcich ABC transportéry a to: MDR 1, ktorý kóduje transmembránový P-glykoproteín (P-gp) a MRP1, ktorý kóduje “*multidrug resistance associated protein*” (MRP).

Materiál a metódy:

Cieľom našej štúdie bolo sledovať efekt terapie lenalidomidom u pacientov s MDS na expresiu P-gp, MRP a sledovanie prognostických faktorov ako zmeny v hladinách a aktivitách LDH (laktát dehydrogenáza) a MMP. Vzorky periférnej krvi a kostnej drene od pacientov s MDS 5q- liečených lenalidomidom boli spracované separáciou leukocytov na Ficolle a expresie P-gp a MRP boli stanovené pomocou RT-PCR. Aktivita MMP bola stanovovaná vo vzorkách plazmy pomocou želatinovej zymografie priamo v elektroforetickom gély. Hladiny MMP proteínov boli sledované pomocou Western blotu. Aktivita LDH bola stanovená ako oxidácia NADH na NAD za súčasnej redukcie pyruvátu na laktát spektrofotometricky podľa štandardného protokolu. Druhým cieľom našej štúdie bol skrining 8 miRNA na bunkových líniiach HL60 a HL60R (rezistentná bunková línia HL60 na DAC). Bunky boli synchronizované v jednej fáze bunkového cyklu pomocou tymidínového dvojbloku a synchronizácia bola overená pomocou väzby propidium jodidu na DNA. Následne bola sledovaná expresia miRNA pomocou real-time PCR.

Výsledky a záver:

Zistili sme, že liečba MDS pacientov lenalidomidom neindukovala zvýšenú expresiu P-gp a MRP mRNA. Pacienti s MDS mali signifikantne zvýšené aktivity LDH a MMP v krvnej plazme. Na druhej strane liečba lenalidomidom vyvolala signifikantnú redukciu MMP a LDH aktivít v plazme. 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 obsahu MMP a LDH v krvnej

plazme monitorujú účinnosť liečby MDS pacientov lenalidomidom. Skrúingom 8 miRNA (miRNA 329, miRNA 370, miRNA 432, miRNA 494, miRNA 665, miRNA 150, miRNA 1305, miRNA 583) na bunkových líniách HL60 a HL60R sme potvrdili rozdielnú expresiu miRNA 494 pri 24H, 48H a 72H inkubácii s DAC, pričom liečivo bolo bunkám podávané v 24H intervale pri koncentrácii 1µM. Z pozorovaných rozdielov expresie sa možno domnievať, že miRNA 494 je zapojená do rezistencie na DAC.

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.

Koexpresia P-glykoproteínu a nestinu ľudských leukemických bunkových líniach SKM-1 a MOLM-13

Martina Cocul'ová^b, Denisa Imrichová^a, Lucia Messingerová^a, Zdena Sulová^a, Albert Breier^b

^aÚstav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied, Vlárská 5, Bratislava, 833 34 Slovenská Republika

^bÚstav biochémie, výživy a ochrany zdravia, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská Republika

Nestin patrí do triedy VI intermediárnych filamentárnych proteínov. Tvorí ho 1621 aminokyselín a zvyčajne sa vyskytuje v dvoch formách, 220 kDa glykozylovanej a 177 kDa deglykozylovanej forme. V súčasnosti sa nestin považuje za marker kmeňových a progenitorových buniek. Jeho expresia však bola pozorovaná aj v iných typoch buniek (1). Počas cicavčej embryogenézy je nestin exprimovaný migrujúcimi a proliferujúcimi bunkami a následkom bunkovej diferenciácie dochádza k jeho down-regulácii (2, 3). Vo všeobecnosti expresia nestinu v bunkách dospelých jedincov indikuje nediferencované stavy, plasticitu, zvýšenú mobilitu a patologické stavy (1). Zvýšená produkcia nestínu bola pozorovaná počas odpovede na poranenie, nestin môže zohrávať dôležitú úlohu pri oprave tkanív (4). Nestin má tiež vplyv na angiogézu, o čom svedčí jeho nadprodukcia v proliferujúcich endoteliálnych bunkách v novo formovaných krvných cievach (5, 6). Navyše zvýšená expresia nestínu bola pozorovaná v rôznych nádorových bunkách, vrátane nádorov CNS, prostaty, prsníka, gastrointestinálneho traktu a melanómov (7). Len nedávno bola dokázaná expresia nestinu v niektorých leukemických bunkách (8). Yamamoto a spol. (9) priniesol dôkaz o korelácii expresie nestinu a P-glykoproteínu (P-gp, ABCB1 člen rodiny ABC transportérov) v nervových kmeňových/progenitorových bunkách. P-glykoproteín je integrálny proteín plazmatickej membrány, ktorý slúži ako efluxná pumpa. Počas jeho expresie v neoplastických bunkách dochádza k rozvoju viaccliekovej rezistencie a k zlyhávaniu chemoterapie (10). V tejto práci sme sa zamerali na otázku, či expresia P-gp navodená adaptáciou na vinkristín (VCR), známy P-gp induktor, (11) v dvoch bunkových líniach s akútnou myeloidnou leukémiou (AML) (SKM-1 a MOLM-13) súvisí s koexpresiou nestinu.

Materiál a metódy:

V tejto práci boli použité dve bunkové línie získané od pacientov s AML vyvinutej z myeloblastického syndrómu:

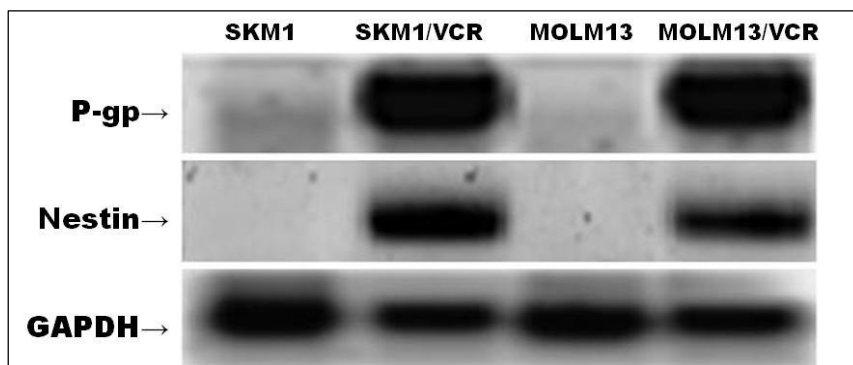
1. SKM-1 pochádzajúce z periférnej krvi 76 ročného pacienta (AML M5)
2. MOLM-13 pochádzajúce z periférnej krvi 20 ročného pacienta (AML FAB M5a)

Obidve bunkové línie boli adaptované na VCR. Postupným pasážovaním v médiu so zvyšujúcou sa koncentráciou VCR sme získali rezistentné bunkové línie SKM-1/VCR a MOLM-13/VCR schopné rásť v médiu s 2,50 nmol/l VCR. Expresia mRNA bola sledovaná pomocou PCR.

Výsledky

Adaptáciou SKM-1 a MOLM-13 bunkových línií na cytostatikum vinkristín (VCR) bola navodená zvýšená expresia P-glykoproteínu, ktorá má za následok radikálne zníženie citlivosti na rôzne cytotoxické látky. Takto sme získali VCR rezistentné SKM-1/VCR a MOLM-13/VCR bunkové línie, schopné rásť v médiu obsahujúcom 2,50 nmol/l VCR. Súčasne sme v týchto rezistentných bunkách pozorovali výskyt mRNA pre nestin, pričom parentálne senzitívne línie (SKM-1 a MOLM-13) neobsahovali detekovateľnú hladinu mRNA nestinu. Na základe výsledkov sme dospeli k záveru, že

koexpresia P-gp a nestinu sa vyskytuje nielen v nervových kmeňových/progenitorových bunkách (9), ale pod selekčným tlakom VCR je navodená aj v leukemických bunkách.



Obr.1 Detekcia génového transkriptu P-glykoproteínu a nestinu v bunkových líniah SKM-1/VCR a MOLM-13/VCR pomocou reverznej transkripčnej PCR reakcie. Výsledky pochádzajú z troch nezávislých experimentov.

Literatúra

1. O. Krupkova, Jr., T. Loja, I. Zambo, R. Veselska, Nestin expression in human tumors and tumor cell lines. *Neoplasma* 57 (2010) 291-8.
2. JM. Krum, JM. Rosenstein, Transient coexpression of nestin, GFAP, and vascular endothelial growth factor in mature reactive astroglia following neural grafting or brain wounds. *EXP Neurol.* 160 (1999) 348-60.
3. D. Cízková, T. Soukup, T. Mokřý, Nestin expression reflects formation, revascularization and reinnervation of new myofibers in regenerating rat hind limb skeletal muscles. *Cells Tissues Organs.* 189 (2009) 338-47.
4. T. Ishiwata, M. Kudo, M. Onda, T. Fujii, K. Teduka, T. Suzuki, Defined localization of nestin-expressing cells in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas* 32 (2006) 360-8.
5. N. Teranishi, Z. Naito, T. Ishiwata, N. Tanaka, K. Furukawa, T. Seya, Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *Int J Oncol* 30 (2007) 593-603.
6. Y. Amoh, M. Yang, L. Li, J. Reynoso, M. Bouvet, AR. Moossa, Nestin-linked green fluorescent protein transgenic nude mouse for imaging human tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 65 (2005) 5352-7.
7. S. Parry, K. Savage, C. Marchio, JS. Reis-Filho, Nestin is expressed in basal-like and triple negative breast cancers. *J Clin Pathol* 61 (2008) 1045-50.
8. T. Loja, M. Borský, T. Bernard, M. Doubek, Nestin expression in leukemia cells. in: T. Kalina, (Ed.), *Analytical cytometry VII*, AMCA, Spol. sro, Mikulov, Czech Republic, September 21-24, 2013.
9. A. Yamamoto, T. Shofuda, M.O. Islam, Y. Nakamura, M. Yamasaki, H. Okano, and Y. Kanemura, ABCB1 is predominantly expressed in human fetal neural stem/progenitor cells at an early development stage. *J Neurosci Res* 87 (2009) 2615-23.
10. A. Breier, L. Gibalova, M. Seres, M. Barancik, and Z. Sulova, New insight into p-glycoprotein as a drug target. *Anticancer Agents Med Chem* 13 (2013) 159-70.
11. A. Breier, D. Imrichova, H. Paulikova, M. Barancik, Z. Sulova, Vincristine as an inducer of drug resistance marker expression in neoplastic cells. in: J.M. Coello, and Y.D. Sabres, (Eds.), *Vincristine: Clinical Uses, Pharmacokinetics and Impacts on Health*, Nova Science Publishers, 2013, pp. 1-31; online on: https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=46763.

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.*

Zmeny v expresii MDR proteínov vyvolané vinkriviv VINKRIS-TÍNOM a MITOXANTRÓNOM v dvoch bunkových líniách derivovaných od pacientov s AML vyvinutou z MDS.

*Denisa Imrichová, Lucia Messingerová, Albert Breier, Zdenka Sulová
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV, 833 34 Bratislava, SR*

Myelodisplastický syndróm (MDS) je skupina chorôb vyznačujúca sa poruchami dozrievania kmeňových hemopoetických buniek a zvýšeným rizikom prechodu do akútnej myeloidnej leukémie (AML). Možnosti liečby starších pacientov s rozvinutým MDS sú pomerne obmedzené a prognóza nie je dobrá. Z tohto dôvodu je nevyhnutný výskum zameraný na vývoj nových terapeutík.

V mnohých experimentálnych molekulárno-biologických štúdiách sa využívajú bunkové línie pochádzajúce od pacientov s rôznymi typmi leukémie. Hlavným zámerom našej experimentálnej práce je analýza expresných profilov génov, ako je gén *MDR1* (multidrug resistance 1), kódujúci P-glykoproteín, gén *MRP1* (multidrug resistance-associated protein 1) a *BCRP* (breast cancer resistance protein). Zvýšená expresia spomínaných proteínov je úzko spojená s mnohopočetnou rezistenciou (MDR - multidrug resistance) v rôznych typoch nádorových buniek, čo následne vedie k zlyhaniu chemoterapie.

Analyzovali sme vplyv dvoch liečiv, vinkristínu (VCR) a mitoxantrónu (MTX), na myeloidné bunkové línie SKM-1 a MOLM-13. Obidve tieto línie sú od pacientov s AML, ktorej predchádzal MDS. Dlhodobou adaptáciou pôvodných bunkových línií na liečivá sme získali línie rezistentné na uvedené cytostatiká : SKM/VCR, MOLM/VCR a SKM/MTX, MOLM/MTX.

Pomocou RT-PCR sme sledovali expresiu MDR génov v jednotlivých parentálnych ako aj získaných rezistentných bunkových líniách. Hladiny proteínov boli stanovené pomocou techniky Western blot.

Súčasne sme sledovali aj expresiu dvoch ďalších proteínov, zapojených do regulácie apoptózy, a to antiapoptického Bcl-2, resp. proapoptického Bax. Z doterajších výskumov vyplýva, že zvýšená expresia proteínu Bcl-2 je asociovaná s nádorovou iniciáciou, progresiou a vznikom rezistencie nádorovej bunky voči terapeutikám používaným pri liečbe onkologických ochorení.

V senzitivných, ako aj v rezistentných bunkových líniách sme pomocou prietokovej cytometrie sledovali hladinu apoptózy. Ako apoptotické a nekrotické markery boli použité látky anexín a propidiumjodid. Zvýšená expresia mRNA ako aj proteínu P-gp bola zaznamenaná v bunkových líniách SKM-1, ktoré boli liečené mitoxantrónom, resp. vinkristínom. V prípade bunkovej línie MOLM-13 bol pozorovaný nárast expresie P-gp na úrovni mRNA pri obidvoch liečivách, avšak pomocou pri stanovení pomocou imunoblotu bola potvrdená translácia proteínu P-gp len v bunách liečených mitoxantrónom. Zvýšená expresia proteínu P-gp bola sprevádzaná zníženou expresiou proteínu MRP1.

V rezistentnej línii SKM/VCR bola pozorovaná znížená expresia génu BCRP v porovnaní s parentálnou líniou SKM-1. Podobný efekt bol pozorovaný aj v prípade génu GSTP1, ktorého produkt je zapojený do metabolizmu xenobiotík.

V bunkovej línii MOLM/VCR bola zaznamenaná zvýšená expresia génov Bax a Bcl-2 v porovnaní s parentálnou líniou MOLM-13, zatiaľ čo línia MOLM/MTX vykazovala zníženú hladinu expresie Bcl-2. Obidve rezistentné línie SKM/VCR a SKM/MTX vykazovali zníženú expresiu Bcl-2 v porovnaní s parentálnou líniou SKM-1.

PodĎakovanie 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.

Vplyv inhibície N- A O-Glykozylácie na P-GP pozitívne a negatívne bunky.

Úvod:

Chemoterapia je najdôležitejšou formou liečby mnohých druhov nádorových ochorení. V súčasnej dobe sa na liečbu používa kombinácia cytostatík, ktoré majú rôzne intracelulárne ciele. Hlavným problémom pri chemoterapii je vznik MDR fenotypu. Za rozvoj MDR je najčastejšie zodpovedná expresia ATP-závislých efluxných púmp z rodiny ABC transportérov, ktoré proti koncentračnému gradientu transportujú xenobiotiká z intra do extracelulárneho priestoru (Nooter a Herweijer, 1991). Jednou z týchto púmp je P-glykoproteín (P-gp), ktorý prvýkrát identifikovali Juliano a Ling (Juliano a Ling, 1976). Expresia P-gp v neoplastických bunkách spôsobuje zníženie, alebo stratu ich citlivosti na cytostatiká a zároveň spôsobuje mnoho zmien v mikroštruktúre a metabolizme buniek. Ako je už známe z literatúry P-gp je masívne glykozylovaný, molekulová hmotnosť P-gp na základe aminokyselinového zloženia je 140 kDa, po glykozylácii sa jeho molekulová hmotnosť zvyšuje na 170-180 kDa (Ichikawa a kol., 1991). Glykozylácia P-gp nie je dôležitá pre jeho transportnú aktivitu, ale je dôležitá pre kontrolu kvality v ER a transport do cytoplazmatickej membrány (Schinkel a kol., 1993). Experimenty v Laboratóriu biochémie a cytochémie nám ukázali, že inhibícia N-glykozylácie tunikamycínom neovplyvňuje transport P-gp do cytoplazmatickej membrány (Šereš a kol., 2008), ďalej sa zistilo, že expresia P-gp vedie k remodelácii povrchových sacharidov, ktorá nesúvisí priamo s glykozyláciou P-gp (Sulová a kol., 2009), a že tieto zmeny nie sú spôsobené adaptáciou buniek na cytostatiká ale súvisia priamo s expresiou P-gp (Sulová a kol., 2010).

Materiál a metódy: Ako model na experimenty sme použili tri sublinie experimentálnych buniek myšej leukemickej línie L1210. Parentálnu na cytostatiká senzitivnú líniu S buniek, ktorá neexprimuje P-gp a dve rezistentné línie exprimujúce P-gp. R bunky, ktorým sa expresia P-gp navodila postupnou adaptáciou S buniek na cytostatikum vinkristín. T bunky, ktoré boli pripravené transfekciou materskej línie plazmidom obsahujúcim gén pre ľudské P-gp. Ako inhibitor N-glykozylácie sme použili tunikamycín a benzil 2-acetamid-2-deoxy- α -D-galakto-pyranosidom ako inhibitor O-glykozylácie. V začiatkových experimentoch sme určili pracovné koncentrácie pomocou MTT testu, ktorým sa hodnotí metabolická aktivita buniek. Vplyv expresie P-gp a inhibitorov glykozylácie na zloženie povrchových sacharidov sme sledovali pomocou lektínov. Testované lektíny a ich sacharidová špecificita je uvedená v tab. 1.

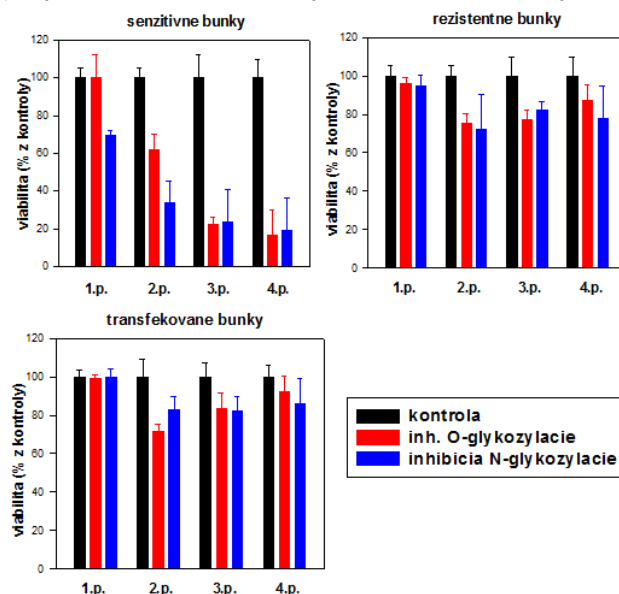
Tab. 1 Použité lektíny a ich sacharidová špecificita.

Lektín	Rozpoznávaný sacharid
LEA (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	poly-LacNAc a (GlcNAc) _n
WGA (<i>Triticum vulgare</i>)	(GlcNAc) _n
GNA (<i>Galanthus nivalis</i>)	α -D-Man-(1-3)
SNA (<i>Sambucus nigra</i>)	α -D-Sia-(2-6)- β -D-Gal-(1-4)-Glc(Nac), α -D-Sia-(2-6)- β -D-Gal(NAc)

Interakcie lektínov s membránovými frakciami proteínov izolovaných z testovaných buniek sme porovnávali pomocou lektín blotov.

Výsledky a diskusia: Oba inhibitory potláčajú viabilitu buniek a táto inhibícia je koncentračne závislá. Na kultiváciu v prítomnosti inhibitorov sú citlivejšie parentálne senzitivné S bunky. Tento efekt sa výraznejšie prejavil pri opakovanej kultivácii. Naproti tomu P-gp pozitívne bunky prežívajú aj po opakovanej kultivácii a ich viabilita neklesá pod 80%. Antiproliferačný efekt tunikamycínu na bunky je

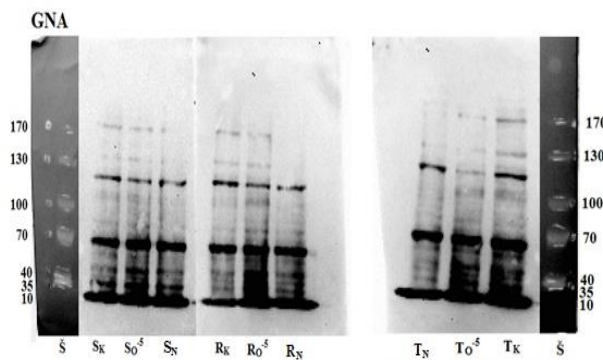
spojený so zníženou glykozyzáciou proteínov a zvýšenou intracelulárnou hladinou UDP-N-acetylglukozamínu a so zmenami v ultraštruktúre endoplazmatického retikula (Morin a kol., 1983). Výrazné zníženie hladiny UDP-cukrov v P-gp pozitívnych bunkách, ktoré pozorovali v predchádzajúcej práci (Fiala a kol., 2003), by mohlo súvisieť so zvýšenou rezistenciou týchto buniek na tunikamycín.



Obr. 1 Vplyv inhibitorov N- a O-glykozylácie na viabilitu nádorových buniek pri opakovanom pasážovaní.

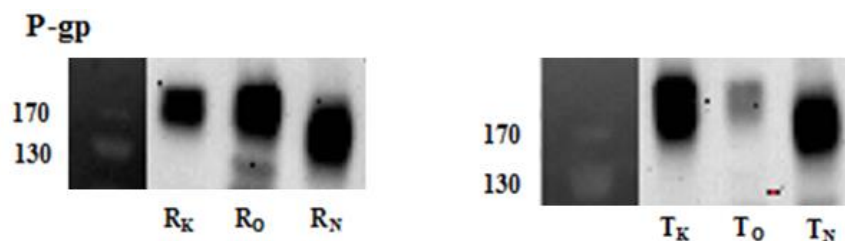
Zatiaľ je opísaná iba čiastočná štruktúra oligosacharidov na molekule P-gp v ľudských nádorových bunkách. Greer a Ivey určili štruktúru sacharidov na troch reťazcoch, jeden obsahuje vetvený manozový oligosacharid a zvyšné dva obsahujú koncovú kyselinu sialovú (Greer a Ivey, 2007).

V membránových frakciách izolovaných z R a T buniek kultivovaných v prítomnosti tunikamycínu sa stráca väzba lektínov SNA a GNA na membránový proteín s molekulovou hmotnosťou 170 kDa, čo naznačovalo, že tieto lektíny interagujú s oligosacharidmi na molekule P-gp.



Obr. 2 Väzba lektínu GNA na membránové frakcie izolované z S, R a T buniek.

To že oligosacharidové reťazce na molekula ľudského P-gp interagujú s lektínom GNA a SNA popísali Greer a Ivey (Greer a Ivey, 2007). Zistili sme stratu väzby GNA a SNA aj v prípade R buniek, ktoré exprimujú myšiu P-gp, dá sa teda predpokladať, že aj P-gp exprimovaný v myších neoplastických bunkách obsahuje oligosacharidy s vetveným manozylom a s kyselinou sialovou viazanou α 2-6 väzbou. To že sa jedná skutočne o P-gp sme potvrdili imunodetekciou pomocou protilátky C219 proti P-gp. Na obrázku môžeme pozorovať pokles hmotnosti P-gp zo 170 kDa na 130 kDa v membránach buniek, ktoré boli kultivované s inhibítorom N-glykozylácie tunikamycínom.



Obr. 3 Vázba protilátky C219 proti P-gp na membránové frakcie izolované z R a T buniek.

Záver: Výsledky naznačujú, že tunikamycín inhibuje glykozyláciu u oboch P-gp pozitívnych sublinií a neovplyvňuje transportnú aktivitu a lokalizáciu P-gp v membráne. Inhibitor O-glykozylácie nemal výraznejší efekt na bunky L1210. Myši P-glykoproteín exprimovaný v myších neoplastických bunkách obsahuje oligosacharidy s vetveným manozylovaným zvyškom a s kyselinou sialovou viazanou α 2-6 väzbou.

Literatúra:

1. Fiala, R., Sulova, Z., El-Saggan, A. H., Uhrík, B., Liptaj, T., Dovinova, I., Hanusovska, E., Drobna, Z., Barancik, M., and Breier, A. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1639**, 213-224.
2. Greer, D.A., Ivey, S., (2007). *Biochim Biophys Acta* **1770**, 1275-1282.
3. Ichikawa, M; Yoshimura, A.; Furukawa, T.; Sumizawa, T.; Nakazima, Y.; Akiyama, S. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**, 309-315.
4. Juliano, R.L., Ling, V., (1976) *Biochim Biophys Acta* **455**, 152-162.
5. Morin, M. J., Porter, C. W., and McKernan, P., *et al.* (1983. *J Cell Physiol* **114**, 162-172.
6. Nooter K. and Herweijer H. (1991) *Br. J. Cancer*, **63**, 663-669.
7. Schinkel, A.H.; Kemp, S.; Dolle, M.; Rudenko, G.; Wagenaar, E. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 7474-7481.
8. Sulova, Z., Mislovicova, D., Gibalova, L., Vajcnerova, Z., Polakova, E., Uhrík, B., Tylkova, L., Kovarova, A., Sedlak, J., and Breier, A (2009).. *J Proteome Res.* **8**, 513-20.
9. Sulova, Z., Ditte, P., Kurucova, T., Polakova, E., Rogozanova, K., Gibalova, L., Šereš, M., Škvarkova, L., Sedlak, J., Pastorek, J., and Breier, A. (2010).. *Anticancer Research*, **30**, 3661-3668.
10. Šereš, M., Polaková, E., Križanová, O., Hudecová, S., Klymenko, S.V., Breier, A., Sulová, Z., (2008). *Gen. Physiol. Biophys.* **27** (3), 211-221.

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.

Inhibícia glykozylácie P-glykoproteínu tunikamycínom bez vplyvu na jeho lokalizáciu a transportnú aktivitu u buniek L1210.

Mário Šereš1, Dana Cholujová2, Tatiana Bubenčíková1, Albert Breier1, Zdena Sulová1

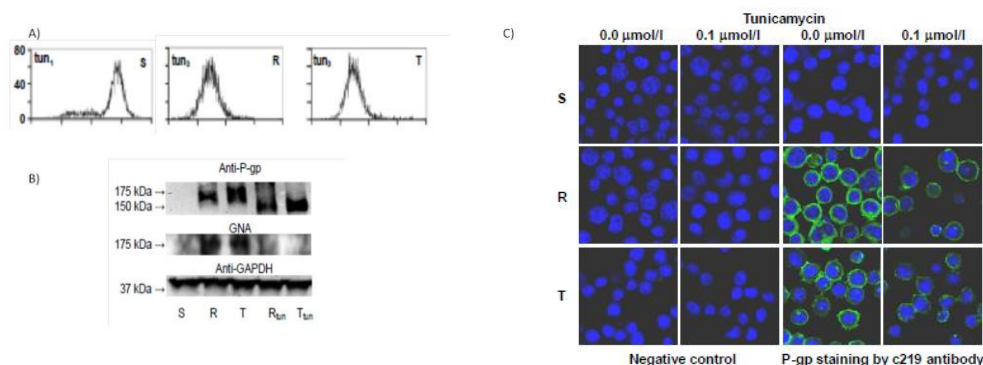
1 Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Vlárská 5, 833 91, Bratislava, Slovakia

2 Cancer Research Institute, Slovak Academy of Sciences, Vlárská 7, 833 91, Bratislava, Slovakia;

Problémom zlyhania liečby rakoviny chemoterapiou je vznik mnoholiekovej rezistencie (MDR). Rakovinové bunky sa tak stávajú rezistentné na látku, ktorá rezistenciu vyvolala, ale aj na cytostatiká rôznej štruktúry a spôsob ich účinku. Jedným z mechanizmov mnoholiekovej rezistencie je prítomnosť detoxifikačných transportných proteínov nachádzajúcich sa na povrchu plazmatickej membrány buniek. Jedným z najznámejších transportných proteínov je P-glykoprotein (P-gp). P-gp je kodovaný *mdr1* génom a patrí do rodiny ABCB1 transportných proteínov s ATP-ázovou aktivitou. Je syntetizovaný ako polypeptid (140kDa) a glykozylovaný do konečnej podoby 170kDa. P-gp je glykozylovaný na prvej extracelulárnej slučke, na ktorej sa nachádzajú tri glykozylačné miesta. Glykozylácia sa považuje za dôležitý proces pre správnu maturáciu proteínov v endoplazmatickom retikule a zabudovanie do plazmatickej membrány.

Tunikamycín je známy ako inhibítor N-glykozylácie prebiehajúcej v endoplazmatickom retikule. Inhibuje prenos N-acetylglukozamín 1-fosfátu z uridín difosfát N-acetyl glukozamínu na PP dolichol fosfát (Bretthauer, 2009). Tunikamycín môže indukovať zvýšenie expresie P-gp vo Fao hepatických bunkách (Ledoux et al., 2003). Inhibícia celkovej glykozylácie ako aj glykozylácie P-gp môže viesť k navodeniu zvýšenej citlivosti buniek na rôzne lieky. Inhibícia glykozylácie P-gp tunikamycínom tiež môže viesť k masívnej ubikvitinácii a postupnej degradácii P-gp. Tunikamycín môže zvyšovať alebo znižovať rezistenciu, čo závisí od typu bunkovej kultúry.

V našich experimentoch boli použité myšie leukemické bunky L1210 a to P-gp neexprimujúce (senzitivne na liečivá) a P-gp exprimujúce, ktoré boli získané zo senzitivných buniek postupnou adaptáciou na vinkristín, alebo transfekciou ľudského P-gp pomocou plazmidu (Sulova et al., 2010). Fenotyp MDR je spájaný so zmenami v transglykozylačných reakciách spojenými so znížením hladiny UDP sacharidov, glykogénu a kyselinou sialovou na povrchu bunkovej membrány (Fiala et al., 2003). Rezistentné bunky sa líšia oproti senzitivným v zložení povrchových cukrov na bunkovej membráne, ktoré sú ligandom lektínov Concanavalin A a *Lycopersicon esculentum* (Sulova et al., 2009). Glykozylačný reťazec na P-gp je detekovateľný lektínmi *Galanthus nivalis* agglutinín (GNA) a *Sambucus nigra* agglutinín (Greer and Ivey, 2007).



- A) záznam z prietokovej cytometrie **S**-senzitivne bunky, **R**- rezistentné bunky (P-gp navodené postupnou adaptáciou na vinkristín), **T**- bunky transfekované plazmidom kódujúci ľudský P-glykoprotein kultivované v prítomnosti tunikamycínu (**tun**).
- B) western blot- použitie protilátky proti P-glykoproteínu (**Anti P-gp**), lektínu *Galanthus nivalis* (**GNA**), použitie protilátky proti glycerinaldehydu 3-fosfát dehydrogenázy (**Anti-GAPDH**).

- C) snímky z konfokálnej mikroskopie bunky **S**- senzitivne, **R**- rezistentné (bunky kultivované postupnou adaptáciou na vinkristín), **T**- transfekované plazmidom kódujúcim ľudský P-glykoproteín kultivované v prítomnosti 0,0-0,1µm/l tunikamycínu. Tunikamycín efektívne inhiboval glykozylačný proces P-glykoproteínu u obidvoch rezistentných variantách buniek L1210. Lektín blot pomocou GNA nerozoznával band v oblasti 170kDa zodpovedajúci P-gp, tento band bol rozoznaný iba po použití špecifickou protilátkou proti P-glykoproteínu. Inhibícia glykozylácie P-gp tunikamycínom neovplyvnila jeho lokalizáciu alebo aktivitu v plazmatickej membráne.

Literatúra:

1. Bretthauer, R.K., 2009. Structure, expression, and regulation of UDP-GlcNAc: dolichol phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase (DPAGT1). *Curr Drug Targets* 10 (6), 477-482.
2. Ledoux, S., Yang, R., Friedlander, G., Laouari, D., 2003. Glucose depletion enhances P-glycoprotein expression in hepatoma cells: role of endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res* 63 (21), 7284-7290.
3. Greer, D.A., Ivey, S., 2007. Distinct N-glycan glycosylation of P-glycoprotein isolated from the human uterine sarcoma cell line MES-SA/Dx5. *Biochim Biophys Acta* 1770 (9), 1275-1282.
4. Sulova, Z., Mislovicova, D., Gibalova, L., Vajcnerova, Z., Polakova, E., Uhrik, B., Tylkova, L., Kovarova, A., Sedlak, J., Breier, A., 2009. Vincristine-induced overexpression of P-glycoprotein in L1210 cells is associated with remodeling of cell surface saccharides. *J Proteome Res* 8 (2), 513-520.
5. Sulova, Z., Ditte, P., Kurucova, T., Polakova, E., Rogozanova, K., Gibalova, L., Seres, M., Skvarkova, L., Sedlak, J., Pastorek, J., Breier, A., 2010. The presence of P-glycoprotein in L1210 cells directly induces down-regulation of cell surface saccharide targets of concanavalin A. *Anticancer Res* 30 (9), 3661-3668.
6. Fiala, R., Sulova, Z., El-Saggan, A.H., Uhrik, B., Liptaj, T., Dovinova, I., Hanusovska, E., Drobna, Z., Barancik, M., Breier, A., 2003. P-glycoprotein-mediated multidrug resistance phenotype of L1210/VCR cells is associated with decreases of oligo- and/or polysaccharide contents. *Biochim Biophys Acta* 1639 (3), 213-224.

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.

Antioxidačné účinky flavonoidov v izolovaných hepatocytoch potkana

Bezek Š., Mrvová N., Račková L.

V súčasnosti je známych okolo 4000 antioxidantov, najznámejšie a najvýznamnejšie (neenzymatické) sú vitamín C, vitamín E, karotenoidy, koenzým Q10, glutatión, kyselina lipoová, kyselina močová, selén, transferín, feritín, ceruloplazmín. Medzi ďalšie látky s antioxidantnými vlastnosťami patria fenolové alebo polyfenolové zlúčeniny rastlinného pôvodu, ako sú resveratrol, katechín, quercetín a flavonoidy. Z enzymatických antioxidantov je známa superoxiddizmutáza, glutatiónpoxidáza, kataláza, glutatiónttransferáza.

Fyziologické účinky flavonoidov

Flavonoidy sa vyznačujú rôznymi biologickými účinkami, ale známe sú predovšetkým ako účinné antioxidanty. Svoj antioxidantný účinok vykonávajú viacerými mechanizmami. Môžu pôsobiť priamo a inaktivovať už existujúce voľné radikály. Vtedy účinkujú ako lapače alebo zhášače. Flavonoidy tiež môžu spolupracovať s inými antioxidantmi, napr. s vitamínom A, E a β -karoténom, zvyšovať ich účinok a znižovať ich degradáciu. V prípade, že flavonoidy inhibujú aj samotnú tvorbu radikálov, hovoríme o nepriamom antioxidantnom účinku, ktorý môžu vyvíjať dvomi spôsobmi. Buď inhibujú enzýmy kaskády kyseliny arachidónovej, alebo tvoria cheláty s kovovými iónmi (napr. so železom alebo meďou).

Vzťah medzi štruktúrou flavonoidov a ich antioxidantnými schopnosťami

Antioxidantné schopnosti flavonoidov nie sú viazané na základný skelet, ale ovplyvňuje ich konfigurácia a počet hydroxylových skupín, ktoré sú na ňom naviazané. Vo všeobecnosti platí, že čím viac hydroxylových skupín je naviazaných na základnom skelete, tým budú silnejšie antioxidantné účinky flavonoidov. Základné štrukturálne charakteristiky flavonoidov, ktoré sú potrebné pre efektívne vychytávanie radikálov, sú orto-dihydroxy (catecholová) štruktúra kruhu B, 2,3-dvojitá väzba v konjugácii s 4-oxo skupinou v kruhu C a hydroxylové skupiny v polohách 3 a 5, ktoré poskytujú vodíkové väzby na oxo skupinu. Najvýznamnejšia je prítomnosť dvoch hydroxylových skupín v polohe 3' a 4' na aromatickom kruhu B (catecholová štruktúra).

Oxidačné bunkové poškodenia, markery oxidačného poškodenia

Vzhľadom na to, že oxidačný stres môže mať v niektorých prípadoch aj pozitívne účinky, je pochopiteľná snaha vedcov určiť, ktoré účinky oxidačného stresu už môžeme definitívne pokladať za negatívne, pretože vedú k poškodeniu tkanív. Vo všeobecnosti sa za zásadné negatívne pôsobenie, ktoré zohráva úlohu v etiopatogenéze ochorení súvisiacich s oxidačným stresom, pokladajú zmeny biomakromolekúl spôsobené voľnými radikálmi. RFS ľahko reagujú s väčšinou biologických makromolekúl, čím ich znehodnocujú a ničia. Za zásadné zmeny sa pokladá oxidačné poškodenie lipidov, bielkovín a DNA.

Poškodenie lipidov, lipidová peroxidácia (LPO), spôsobuje pokles fluidity až stratu integrity membrány. V dôsledku toho cez membrány prechádzajú aj látky, pre ktoré je za normálnych podmienok nepriepustná. Reakcia peroxylových radikálov má za následok poškodenie membránových bielkovín a následnej inaktívácii membránových receptorov, enzýmov a prenášačov. Degradáciou lipidových peroxidov vznikajú mnohé produkty, z ktorých medzi najvýznamnejšie patrí malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxynonenal (HNE). Tieto produkty sa používajú ako indikátory oxidačného poškodenia pri rôznych patologických stavoch.

K poškodeniu bielkovín môže dôjsť reakciou s produktmi LPO, ale aj priamou reakciou s reaktívnymi formami kyslíka a dusíka. Voľnými radikálmi môžu byť poškodené bočné reťazce všetkých aminokyselín v bielkovinách. Rozličnými mechanizmami pôsobenia radikálov vznikajú karbonylové skupiny, a preto sa ich koncentrácia často používa ako jeden z významných indikátorov oxidačného

poškodenia bielkovín. Oxidačné a nitračné modifikácie zapríčiňujú zmeny sekundárnej a terciárnej štruktúry bielkovín, čo obvykle vedie k strate ich biologickej funkcie.

Oxidačné poškodenie DNA môže byť rovnako ako poškodenie bielkovín spôsobené produktmi LPO, ale aj samotnými voľnými radikálmi. Voľné radikály priamo reagujú so všetkými stavebnými jednotkami DNA. Najznámejšou oxidačnou reakciou je vznik 8-hydroxyguanínu, ktorý sa preto používa ako indikátor oxidačného poškodenia DNA v organizme. Oxidačne poškodená DNA je terčom bunkových reparačných systémov. Pokiaľ tieto mechanizmy nie sú dostatočné, môže zvýšené oxidačné poškodenie alebo znížená oprava DNA viesť k mutagenéze, karcinogenéze a starnutiu. Mitochondriová DNA je zvlášť citlivá na oxidačné poškodenie, pretože nie je chránená histónovými bielkovinami a jej reparačný mechanizmus nie je taký účinný ako pri DNA.

Materiál a metodika

Izolácia hepatocytov enzýmovou perfúziou pečene potkana. Hepatocyty sa izolovali dvojstupňovou perfúziou enzýmom kolagenázou. V experimentoch sa použili potkany samce kmeňa Wistar priemernej hmotnosti 220±30g, ktorým sa v pentobarbitalovej anestéze (30 mg/kg) otvorila brušná dutina v linea alba. Po heparinizácii (500 j. heparínu) do véna iliolumbalis dextra sa kanylovala portálna žila a pečeň sa pripojila na mimotelový perfúzný systém a in situ sa perfundovala perfúznym bezkalciovým roztokom. Po 10-12 minútovej otvorenej jednocestnej perfúzii sa pečeň perfundovala perfúznym médiom s obsahom 0,05% enzýmu kolagenázy, ktorý v priebehu 15 minút rozpustil intersticiálny kolagén a hepatocyty sa uvoľnili do média. Parenčymové hepatocyty sa získali trojnásobnou diferenciálnou centrifugáciou a premývaním. Primárna suspenzia izolovaných hepatocytov sa nariedila na zásobnú koncentráciu $40 \cdot 10^6$ /ml a držala sa na ľade až do použitia v experimente. Hepatocyty sa inkubovali v CO₂ inkubátore pri teplote 37°C na kultivačných platničkách na rotačnej trepačke celkovom objeme Krebs-Henseleitovho roztoku 5 ml. Ako modelová látka sa na indukciu oxidačného stresu v systéme izolovaných hepatocytov použil t-BHP, ktorý sme aplikovali v koncentráciách 0,5 mM. Jednotlivé flavonoidy sme aplikovali 5 minút po podaní t-BHP v koncentráciách 0,01 a 0,1 mM. Po 60 minútovej inkubácii sa z testovanej suspenzie odobral aliquot 1 ml na centrifugáciu (1000 otáčok/min). Supernatant sa použil na stanovenie uoľňovanie LDH. Vitalita hepatocytov sa stanovila sekvenčným farbením akridín-oranž/ethidium bromid a preparáty sa snímali mikroskopickou digitálnou kamerou Moticam 1000.

Tab. č.1. Fyz.-chem. vlastnosti testovaných flavonoidov

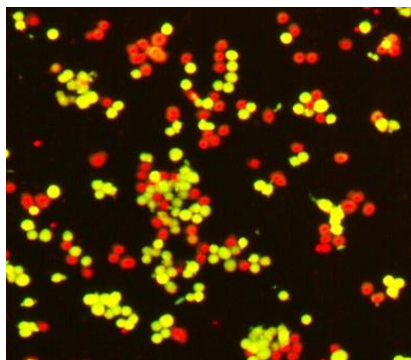
No.	Dátum(kód)/pracovný názov	M.h.	T.t. °C	R _f	TLC (silica, glass plates) Eluent	Rozpustnosť
1.	080910/1 Diquercetin	602.48	205-15	0.3	CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH : HCOOH (9 : 0.5 : 0.1)	Dobre rozpustný DMSO, mierne rozpustný MeOH,
2.	310810/1 - F4/5 Monochloropivaloyl Quercetin	420.80	93-100	0.6	CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH : HCOOH (9 : 0.5 : 0.1)	Dobre rozpustný DMSO, mierne rozpustný MeOH,aceton
3.	260810/1 - F6 1,3',4',7-tri-chlorpivaloyl Quercetin	657.92	95-98	0.6 0.5	CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH : HCOOH (9 : 0.5 : 0.1) CH ₂ Cl ₂	Dobre rozpustný DMSO, MeOH,aceton
4.	020710/1 3'-morfolinohydroxypropoxy Quercetin	743.84	105-10	0.6 0.5	CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH : HCOOH (9 : 0.5 : 0.1) H ₂ Cl ₂	Dobre rozpustný DMSO, MeOH,aceton

5.	020710/2R 5-morfolinohydroxypropoxy Quercetin	473.47	65-70			Dobre rozpustný DMSO, MeOH, acetón
6.	160610/1-2/3/R Chloronaphthoquinone Quercetin	492.82	165-70	0.5 0.9	CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH : HCOOH (9 : 0.5 : 0.1) EAc : CH ₃ OH(9 . 0.1)	Dobre rozpustný DMSO, mierne rozpustný MeOH, acetón
7.	010610/1 MK Pentaacetyl Quercetin	512.42	190-95	0.9 0.8	EAc : CH ₃ OH(9 . 0.5) EAc : CH ₃ OH(9 . 0.1)	Dobre rozpustný DMSO, mierne rozpustný MeOH, acetón, acetonitril
8.	0712/4-2 Monoadamantoyl:tetraadamantoyl Quercetin	951 464	100-5	0.8	CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH : HCOOH (9 : 0.5 : 0.1)	Dobre rozpustný DMSO, rozpustný MeOH,

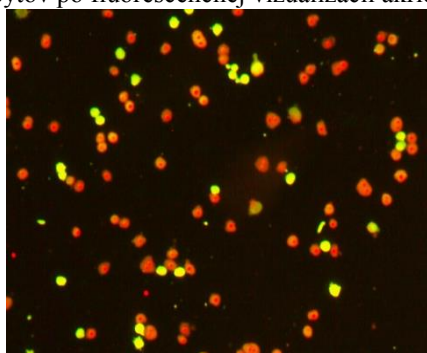
Tab. č. 2 . Vplyv jednotlivých flavonoidov (0,01 mM: 0,1 mM) na uvoľňovanie LDH v systéme izolovaných hepatocytov v oxidačnom strese, priemerné hodnoty LDH z dvoch experimentov.

Test. látka	Flavonoidy 0,01 mM	Flavonoidy 0,1 mM
C 60	4,23	2,14
t-BH	30,94	32,24
F/1	24,81	29,39
F/2	21,42	16,50
F/3	17,24	39,63
F/4	28,19	0.89
F/5	0.67	1,92
F/6	14,04	13,09
F/7	17,36	15,93
F/8	2,20	1,07

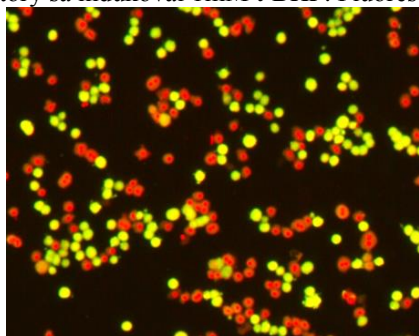
Obr. 1. Kontrolná suspenzia hepatocytov. Test prežívania hepatocytov farbením akridín/etidinium bromid po fluorescenčnej vizualizácii .



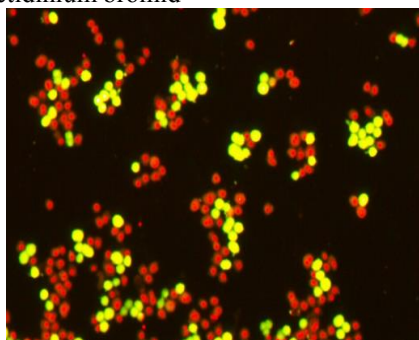
Obr. 2. Vplyv oxidačného stresu, ktorý sa indukoval t-butyhydroperoxidom (TBH 0,5 mM) na prežívanie hepatocytov po fluorescenčnej vizualizácii akridín/etidinium bromid.



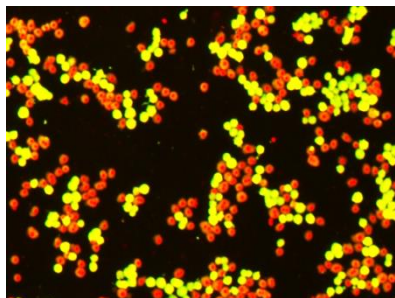
Obr. 3 . Účinky flavonoidu Diquercetin (F/1) v koncentrácii 0,100 mM na prežívanie hepatocytov v oxidačnom strese, ktorý sa indukoval 1mM t-BHP. Fluorescenčná vizualizácia akridín/etidinium bromid



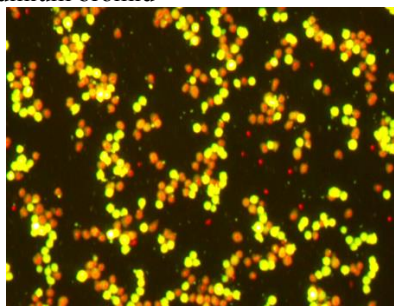
Obr. 4 . Účinky flavonoidu Monochloropivaloyl Quercetin (F/2) v koncentrácii 0,100 mM na prežívanie hepatocytov v oxidačnom strese, ktorý sa indukoval 1mM t-BHP. Fluorescenčná vizualizácia akridín/etidinium bromid



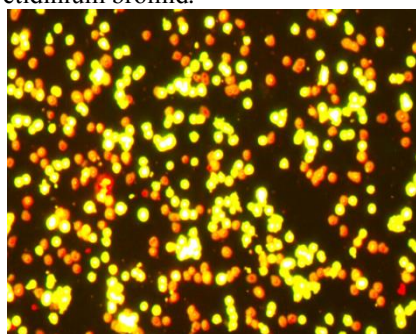
Obr. 5 . Účinky flavonoidu 13',4',7-tri-chlorpivaloyl Quercetin (F/3) v koncentrácii 0,010 mM) na prežívanie hepatocytov v oxidačnom strese, ktorý sa indukoval 1mM t-BHP. Fluorescenčná vizualizácia akridín/etidinium bromid



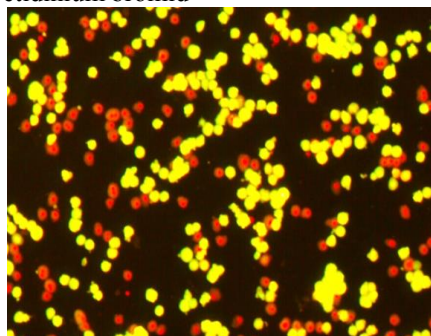
Obr. 6. Účinky flavonoidu 3'-morfolinohydroxypropoxy Quercetin (F/4) v koncentrácii 0,100 mM na prežívanie hepatocytov v oxidačnom strese, ktorý sa indukoval 1mM t-BHP. Fluorescenčná vizualizácia akridín/etidinium bromid



Obr. 7 . Účinky flavonoidu 5-morfolinohydroxypropoxy Quercetin (F/5) v koncentrácii 0,100 mM na prežívanie hepatocytov v oxidačnom strese, ktorý sa indukoval 1mM t-BHP. Fluorescenčná vizualizácia akridín/etidinium bromid.



Obr. 8. Účinky flavonoidu Monoadamantoyl:tetraadamantoyl Quercetin (F/8) v koncentrácii 0,010 mM na prežívanie hepatocytov v oxidačnom strese, ktorý sa 1mM t-BHP. Fluorescenčná vizualizácia akridín/etidinium bromid



Zhrnutie výsledkov a záver: flavonoidy v koncentrácii $1 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹ čiastočne inhibovali účinky oxidačného stresu hepatocytov, zatiaľ čo flavonoidy v 10-násobne vyššej koncentrácii štatisticky významne zvýšili prežívanie hepatocytov. Najúčinnnejšími derivátmi sa ukázali 13',4',7-trichlorpivaloyl Quercetin (F/3), 3'-morfolinohydroxypropoxy Quercetin (F/4), 5-morfolinohydroxypropoxy Quercetin (F/5), Chloronaphtoquinone Quercetin (F/6). Monoadamantoyl:tetraadamantoyl Quercetin (F/8) mal veľmi účinné protektívne pôsobenie v koncentrácii 0,01 mM a výraznejšie v koncentrácii 0,1mM. Stanovením hladiny biochemického markera LDH v bunkovej kultúre sa takisto prejavili protektívne účinky testovaných látok. Najvýraznejší účinok sa prejavil pri deriváte 3'-morfolinohydroxypropoxy Quercetin (F/4) v koncentrácii 0,1mM, pri derivátoch 5-morfolinohydroxypropoxy Quercetin (F/5) a Monoadamantoyl:tetraadamantoyl Quercetin (F/8) v oboch použitých koncentráciách.

PodĎakovanie

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.

Účinnosť a bezpečnosť monoterapie metabolického syndrómu u potkoanov

Bezek Š., Brnoliaková Z., Sotníková R.

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

Úvod: Metabolický syndróm (MetS) sa manifestuje v obraze etiopatogenetického pôsobenia rizikových faktorov ako je aterogénna dislipidémia (zvýšenie LDL-C, TAG a zníženie HDL-C), hypertenzie, metabolických porúch glukózy (inzulínová rezistencia alebo glukózová intolerancia), protrombotického a proinflamačného stavu. Terapeutické možnosti ovplyvnenia MetS sú limitované, pretože v súčasnosti sú k dispozícii len liečivá jednotlivých rizikových faktorov MetS ako sú: antihypertenzíva, hypolipidemiká, antitrombotiká, lieky na zníženie hyperglykémie a hmotnosti. V tejto súvislosti sa intenzívna pozornosť farmakologického výskumu venuje hľadaniu účinnej látky s komplexným účinkom na viaceré rizikové faktory metabolického syndrómu (1). Nedávne predklinické štúdie poskytli dosť dôkazov, že pyridoindol stobadín znižuje hladinu glukózy, cholesterolu a triacylglycerolov v krvi a zabraňuje peroxidácii lipidov a glykácii proteínov v experimentálnom modeli diabetu vyvolaného streptozocínom u potkanov (2,3). Z týchto výsledkov možno predpokladať, že v tejto štúdii použitý nový derivát stobadínu - SMe1EC2, by mohol ovplyvniť viaceré rizikové faktory MetS.

Experimenty sa realizovali na genetickom modeli hHTG potkanov, u ktorých už bola popísaná manifestácia MetS hypertenziou, hyperglykémiou a hypertri-glyceridémiou (4). Cieľom štúdie bolo zistiť vplyv vysokocholesterolovej diéty na lipidový profil hHTG potkanov, študovať účinok dlhodobého podávania originálnej látky pyridoindolu SMe1EC2 na vybrané fyziologické a biochemické parametre a porovnať efekt SMe1EC2 s účinkom klinicky používaného hypolipidemika fenofibrátu.

Materiál a metódy: Potkanom samcom kmeňa Wistar resp. hHTG kŕmeným štandardnou diétou (KKZ) alebo vysokocholesterolovou diétou (hCholD - 1% cholesterol + 7,5 % bravčová masť) (5) sa v priebehu 4 týždňov denne perorálne podávali látky v 0,5 % roztoku metylcelulóзовého gélu: SMe1EC2 (S10 mg/kg) resp. fenofibrát (F100 mg/kg). Fyziologický stav zvierat sa monitoroval sledovaním preprandiálnej hladiny glukózy, orálneho glukózového tolerančného testu a meraním krvného tlaku v chvostovej artérii pletysmografickou metódou. Lipidový profil sa charakterizoval hladinami celkového cholesterolu (TC), podielom lipidových častíc cholesterolu s vysokou (HDL-C), resp. nízkou denzitou (LDL-C) a triacylglycerolov (TAG), ktoré boli stanovené komerčnými kitmi RANDOX Laboratories Ltd. (Veľká Británia). Usporiadanie a značenie experimentálnych zvierat do skupín: WISTAR + KKZ; hHTG + KKZ; hHTG + KKZ + S10 (SMe1EC2 - 10 mg/kg v.h. p.o.); hHTG + HCholD; hHTG + HCholD + S10 (SMe1EC2 - 10 mg/kg v.h. p.o.); hHTG + HCholD + F100 (fenofibrát - 100 mg/kg v.h. p.o.). Počet zvierat v skupine n=7.

Výsledky a diskusia: Hereditárny hypertriglyceridemický kmeň potkanov (hHTG) bol vyvinutý ako genetický model metabolického syndrómu (4,6), ktorý sa v experimentoch manifestoval hypertenziou, hypertriacylglyceridémiou a hypercholesterolémiou.

V skupinách potkanov s hCholD diétou sa v porovnaní so štandardnou diétou KKZ nezmenili hmotnostné prírastky, ale významne boli ovplyvnené hladiny lipoproteínov (Tabuľka 1). V porovnaní s potkanmi kmeňa Wistar sa u hHTG potkanov na konci experimentu signifikantne zvýšili hladiny TC a TAG. Podávaním látky SMe1EC2 hHTG potkanom sa významne znížili hladiny TC a TAG. Hypolipidemická aktivita látky SMe1EC2 sa zistila ako v skupinách kŕmených KKZ, tak aj hCholD, pričom efekt bol porovnateľný s účinkom referenčnej látky fenofibrátu.

Tabuľka 1. Lipidový profil experimentálnych zvierat na konci pokusu. TAG – triacylglyceroly, TC – celkový cholesterol, HDL-C – lipoproteín cholesterolu s vysokou hustotou, LDL-C - lipoproteín cholesterolu s nízkou

hustotou, SEM. Hodnoty v tabuľke sú priemery \pm SEM, n=7. Štatistické vyhodnotenie ANOVA: *p<0,05 resp. **p<0,01 Wistar+KKZ vs hHTG+KKZ; †p<0,05 resp. ††p<0,01 resp. †††p<0,001 hHTG+HCholD vs hHTG+HCholD+F100; ∞ p < 0,05 hHTG+HCholD vs hHTG+HCholD+S10; $\Delta\Delta\Delta$ p < 0,001 hHTG+KKZ vs hHTG+HCholD.

	TAG [mmol/l]	TC [mmol/l]	HDL-C [mmol/l]	LDL-C [mmol/l]
Wistar+KKZ	0,97 \pm 0,19	< 2,59	0,53 \pm 0,03	1,89 \pm 0,57
hHTG+KKZ	1,88 \pm 0,24 **	3,12 \pm 0,34	0,56 \pm 0,02 *	0,68 \pm 0,09 *
hHTG+KKZ+S10	1,45 \pm 0,25	2,64 \pm 0,05	0,57 \pm 0,03	1,42 \pm 0,51
hHTG+HCholD	1,59 \pm 0,14	2,93 \pm 0,15	0,43 \pm 0,02 $\Delta\Delta\Delta$	2,11 \pm 0,31 $\Delta\Delta\Delta$
hHTG+HCholD+S10	1,08 \pm 0,29	< 2,59	0,45 \pm 0,05	3,76 \pm 0,84 ∞
hHTG+HCholD+F100	0,68 \pm 0,14 †††	2,59 \pm 0,17	0,66 \pm 0,08 †	6,61 \pm 1,59 ††

U hHTG potkanov sa v priebehu experimentu významne zvýšil krvný tlak, pričom testované látky mali tendenciu normalizovať tieto hodnoty (Tabuľka 2). Medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami sa nezistili významné rozdiely v hladinách preprandiálnej glukózy (Tabuľka 3).

Experimenty potvrdili rozdielny lipidický profil potkanov kmeňa Wistar a hHTG, pričom kŕmením HCholD sa dyslipidémia ešte zvýraznila. Výsledky tejto štúdie preukázali, že látka SMe1EC2 pri dlhodobom podávaní hHTG potkanom znížila prejavy hypercholesterolémie a hyperlipidémie.

Tabuľka 2. Krvný tlak (KT) a tepová frekvencia (TF) u experimentálnych zvierat na začiatku (A) a na konci (B) pokusu. SEM – stredná chyba aritmetického priemeru. Hodnoty v tabuľke sú priemery \pm SEM, n=5. Štatistické vyhodnotenie ANOVA: (A) Začiatok pokusu: *p<0,05 resp. **p<0,01 Wistar vs hHTG; (B) Koniec pokusu: * p < 0,05 Wistar+KKZ vs hHTG+KKZ; ††† p < 0,001 hHTG (zač. pokusu) vs hHTG+KKZ (koniec pokusu).

	KT [mmHg]	TF [BPM]
A) Začiatok pokusu		
Wistar	118, 6 \pm 4,4 *	400,0 \pm 12,6 **
hHTG	110,9 \pm 1,5	362,2 \pm 2,2
B) Koniec pokusu		
Wistar + KKZ	118,2 \pm 2,8 *	376,4 \pm 10,1
hHTG + KKZ	127, 0 \pm 2,4 †††	362,6 \pm 17,2
hHTG + KKZ + S10	118,4 \pm 4,7	339,4 \pm 16,7
hHTG + HCholD	111,0 \pm 1,2	345, 0 \pm 16,0
hHTG + HCholD + S10	119,8 \pm 3,9	337,0 \pm 6,2
hHTG + HCholD + F100	114,0 \pm 1,2	355,4 \pm 12,7

Tabuľka 3. Preprandiálna hladina glukózy u experimentálnych zvierat na konci pokusu. GLU – glukóza, SEM – stredná chyba aritmetického priemeru. Hodnoty v tabuľke sú priemery \pm SEM, n=5.

	GLU [mmol/l]
Wistar + KKZ	4,98 ± 0,35
hHTG + KKZ	5,24 ± 0,99
hHTG + KKZ + S10	5,12 ± 0,28
hHTG + HCholD	6,22 ± 1,75
hHTG + HCholD + S10	6,44 ± 1,48
hHTG + HCholD + F100	5,13 ± 0,96

V etiopatogenéze metabolického syndrómu hrá dôležitú úlohu aj oxidačný stres (7). Dyslipoproteinémia sa prejavuje zvýšenými hladinami TAG, zníženou koncentráciou HDL-C, čo prispieva k zvýšeniu zápalovej aktivity, ktorá spolu so zvýšenou tvorbou reaktívnych foriem kyslíka (RFK) vyvoláva aterogénnu dysfunkciu endotelu (8). V predchádzajúcich štúdiách sa prezentovali významné protektívne účinky látky SMe1EC2 na cievny endotel (9). Popísané boli aj ďalšie protiradikálové antioxidačné účinky SMe1EC2 na centrálny nervový systém (10). RFK majú dôležitú úlohu v patogenéze hypertenzie (11) a oxidačný stres sa potvrdil aj v centrálnom mechanizme hypertenzie (12). Z našich výsledkov možno predpokladať, že protiradikálový mechanizmus by sa mohol uplatniť pri znížení krvného tlaku pri opakovanom podávaní látky SMe1EC2 hHTG potkanom.

V nedávnych štúdiách sa prezentovali priaznivé výsledky toxicity pyridoindolových derivátov (13) a prenatalnej toxicity látky SMe1EC2 (14). Tieto závery ako aj významné hypotenzívne a hypolipidemické pôsobenie látky SMe1EC2 poukazujú na jej potenciál pri ovplyvňovaní porúch lipidového metabolizmu. Nový hexahydropyridoindolový derivát stobadínu - SMe1EC2 sa preto javí ako vhodné liečivo aterogénnych dyslipidémii.

Literatúra

1. Grundy SM: Metabolic Syndrome: Connecting and Reconciling Cardiovascular and Diabetes Worlds. *J Am Coll Cardiol* 47, s. 1093–1100, 2006
2. Stefek M, Sotnikova R, Okruhlicova L, Volkovova K, Kucharska J, Gajdosik A, Gajdosikova A, Mihalova D, Hozova R, Tribulova N, Gvozdjakova A: Effect of dietary supplementation with the pyridoindole antioxidant stobadine on antioxidant state and ultrastructure of diabetic rat myocardium. *Acta Diabetol* 37(3), s. 111-117, 2000
3. Pekiner B, Ulusu NN, Das-Evcimen N, Sahilli M, Aktan F, Stefek M, Stolc S, Karasu C: In vivo treatment with stobadine prevents lipid peroxidation, protein glycation and calcium overload but does not ameliorate Ca²⁺-ATPase activity in heart and liver of streptozotocin-diabetic rats: comparison with vitamin E. *Biochim Biophys Acta* 1588, s. 71-78, 2002
4. Klimes I, Vrána A, Kunes J, Seböková E, Dobesová Z, Stolba P, Zicha J: Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new animal model of metabolic alterations in hypertension. *Blood Press* 4, s. 137-142, 1995
5. Vecera R, Skottová N, Vána P, Kazdová L, Chmela Z, Svagera Z, Walterá D, Ulrichová J, Simánek V: Antioxidant Status, Lipoprotein Profile and Liver Lipids in Rats Fed on High-Cholesterol Diet Containing Currant Oil Rich in n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Physiol Res* 52(2), s. 177-187, 2003
6. Zicha J, Pecháňová O, Čačányiová S, Cebová M, Kristek F, Török J, Šimko F, Dobešová Z, Kuneš J: Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? *Physiol Res* 55 Suppl 1, S49-63, 2006
7. Isomaa B: A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life Sci* 73, s. 2395–2411, 2003

8. Meerarani P, Badimon JJ, Zias E, Fuster V, Moreno PR: Metabolic syndrome and diabetic atherothrombosis: implications in vascular complications. *Curr Mol Med* 6(5), s. 501-514, 2006
9. Zúrová-Nedelčevová J, Navarová J, Drábiková K, Jančinová V, Petříková M, Bernátová I, Kristová V, Šnirc V, Nosáľová V, Sotníková R: Participation of reactive oxygen species in diabetes-induced endothelial dysfunction. *Neuro Endocrinol Lett* 27 (Suppl. 2) s.168-171, 2006
10. Štolc S, Šnirc V, Májeková M, Gáspárová Z, A. Gajdošíková A, Štvrtina S: Development of the New Group of Indole-Derived Neuroprotective Drugs Affecting Oxidative Stress Cellular and Molecular. *Neurobiology* 26, s. 1493-1502, 2006
11. Paravicini TM, Touyz RM: Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 71, s. 247–258, 2006
12. Hirooka Y: Role of reactive oxygen species in brainstem in neural mechanisms of hypertension. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 142, s. 20–24, 2008
13. Štolc S, Šnirc V, Gajdošíková A, Gajdošík A, Gáspárová Z, Ondrejčíčková O, Sotníková R, Viola A, Rapta P, Jariabka P, Syneková I, Vajdová M, Zacharová S, Nemček V, Krchnárová V: New pyridoindoles with antioxidant and neuroprotective actions. *Trends in Pharmacol Res*, Eds. V. Bauer et al., s. 118-136, 2008
14. Ujhazy E, Dubovicky M, Ponechalova V, Navarova J, Brucknerova I, Snirc V, Mach M: Prenatal developmental toxicity study of the pyridoindole antioxidant SMe1EC2 in rats. *Neuroendocrinol Lett* 29, s. 639-643, 2008.

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 STOBADINU V OXIDAČNOM STRESE V SYSTÉME IZOLOVANÝCH HEPATOCYTOV POTKANA

Najnovšie závery experimentálnych výskumov naznačujú, že voľné kyslíkové radikály a oxidačný stres majú významný podiel v patogenéze mnohých alkoholových a toxických poškodení pečene a vírusových hepatítid. Patologické stavy organizmu, ktoré súvisia s oxidačným stresom, sa označujú aj ako „voľnoradikálové ochorenia“. Patria sem ischemicko-reperfúzne poškodenie pečene, metabolické poruchy ako diabetes mellitus, ateroskleróza, rakovina

Izolácia hepatocytov enzýmovou perfúziou pečene potkana

Hepatocyty sa izolovali dvojstupňovou perfúziou enzýmom kolagenázou. V experimentoch sa použili potkany samce kmeňa Wistar priemernej hmotnosti 220 ± 30 g, ktorým sa v pentobarbitalovej anestéze (30 mg/kg) otvorila brušná dutina v linea alba. Po heparinizácii (500 j. heparínu) do véna iliolumbalis dextra sa kanylovala portálna žila a pečeň sa pripojila na mimotelový perfúzný systém a in situ sa perfundovala perfúznym bezkalciovým roztokom. Po 10-12 minútovej otvorenej jednocestnej perfúzii sa pečeň perfundovala perfúznym médiom s obsahom 0,05% enzýmu kolagenázy, ktorý v priebehu 15 minút rozpustil intersticiálny kolagén a hepatocyty sa uvoľnili do média. Parenčymové hepatocyty sa získali trojnásobnou diferenciálnou centrifugáciou a premývaním. Primárna suspenzia izolovaných hepatocytov sa nariedila na zásobnú koncentráciu $40 \cdot 10^6$ /ml a držala sa na ľade až do použitia v experimente.

Hepatocyty sa inkubovali v CO₂ inkubátore pri teplote 37°C na kultivačných platničkách na rotačnej trepačke celkovom objeme Krebs-Henseleitovho roztoku 5 ml. Ako modelová látka sa na indukciu oxidačného stresu v systéme izolovaných hepatocytov použil t-BHP, ktorý sme aplikovali v koncentráciách 0,5 mM; 1,0 mM a 2,0 mM. Stobadín sme aplikovali 10 minút pred podaním t-BHP v koncentráciách 0,01; 0,1 a 1,0 mM. Po 60 minútovej inkubácii sa z testovanej suspenzie odobral aliquot 1 ml na centrifugáciu (1000 otáčok/min). Supernatant sa použil na stanovenie uoľňovanie LDH a sediment na stanovenie MDA. Vitalita hepatocytov sa stanovila sekvenčným farbením akridín-oranž/ethidíum bromid a preparáty sa snímali mikroskopickou digitálnou kamerou Moticam 1000.

Stanovenie počtu izolovaných hepatocytov.

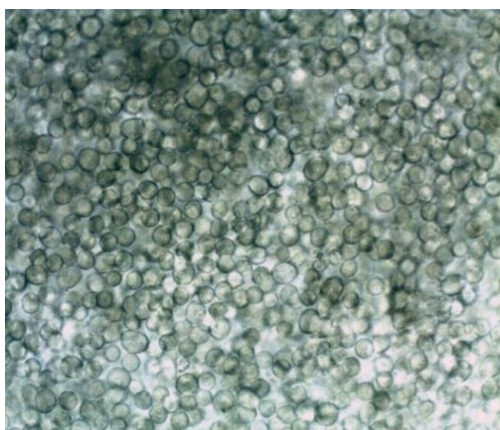
Pred vlastným experimentom sa stanovil počet hepatocytov v Bürkerovej komôrke. 10 µl rozsuspendovaných hepatocytov sa napipetuje do mikroskúmavky s 990 µl Krebs-Henseleitova média, zamiešame a takto pripravenou suspenziu napipetujeme do Bürkerovej komôrky a počítame v 2 x 25 veľkých štvorcach. Podľa počtu hepatocytov suspenziu nariedíme na potrebnú koncentráciu pre ďalšie experimenty.

Stanovenie prežívania hepatocytov testom exklúzie trypanovej modrej.

Stanovenie prežívania (viability) izolovaných hepatocytov sa stanovuje testom exklúzie vitálneho farbiva trypanovej modrej. Princípom metódy je použitie trypanovej modrej a jej schopnosti prenikať porušenou cytoplazmatickou membránou do mŕtvych buniek. Živé hepatocyty zostávajú neofarbené, cytoplazma mŕtvych hepatocytov sa farbí na modro. V teste používame 0,4% roztok trypanovej modrej. 0,1 ml toztoku trypanovej modrej zmiešame s 10 µl suspenzie hepatocytov, priložíme krycie sklíčko a počítame v zornom poli mikroskopu mŕtve a živé bunky v 10 štvorčekoch pri zväčšení 200x. Viabilita izolovaných hepatocytov bola vo všetkých experimentoch vyššia ako 90%.

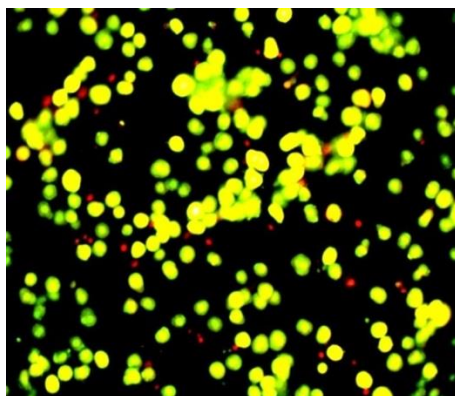
Výsledky:

Obr. 1. Kontrolná suspenzia izolovaných hepatocytov pred farbením



Ako ukazuje tabuľka č.1 spracovaných výsledkov testu exklúzie trypanovej modrej, viabilita hepatocytov bola v kontrolných vzorkách vysoká (96 %). Zreteľné rozdiely farebnosti vidieť na obr.2, kde sa na vizualizáciu morfológie hepatocytov použilo sekvenčné farbenie akridín-oranžovou a ethidínium bromid a preparáty sa snímali mikroskopickou digitálnou kamerou Moticam 1000. Na obrázkoch sa živé hepatocyty sfarbili do žltá až zelenožltá, zatiaľ čo mŕtve bunky sa sfarbili do červena. So zvyšujúcou sa koncentráciou t-BHP sa znižoval počet živých hepatocytov, čiže viabilita klesala.

Obr. 2. Kontrolná suspenzia izolovaných hepatocytov po sekvenčnom farbení akridín-oranž a ethidínium bromid. Žltá až žltozeleno sfarbené sú živé hepatocyty, červené sú sfarbené jadrá mŕtvych hepatocytov etidium bromidom



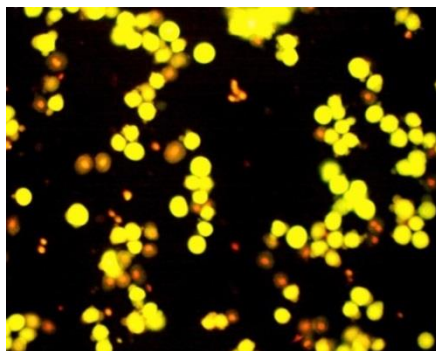
Indukcia oxidačného stresu v systéme izolovaných hepatocytov

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. V tejto práci sme použili t-BHP v koncentráciách 0,5 mM; 1,0 mM a 2,0 mM. Viabilita hepatocytov sa po 60 minútovej inkubácii stanovila testom exklúzie trypanovej modrej (0,4 % roztoku v Krebs-Henseleitovom pufre). Jadrá hepatocytov s porušenou integritou bunkovej membrány sa v obraze svetelného mikroskopu sfarbila na modro. Aliquot hepatocytov (20 ul) sa zmiešal s roztokom trypanovej modrej a hepatocyty sa počítali v Burkerovej komôrke.

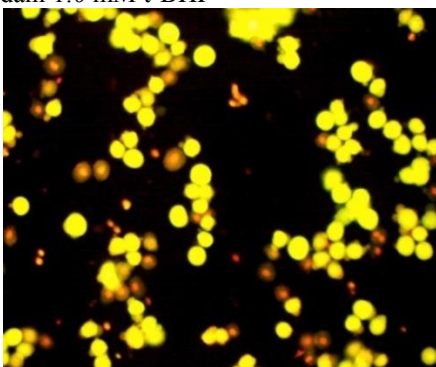
Tab. 1

Hepatocyty+látka	Kontrola	t-BHP 0,5mMol	t-BHP 1mMol	t-BHP 2mMol
Viabilita v %	96	76	60	52

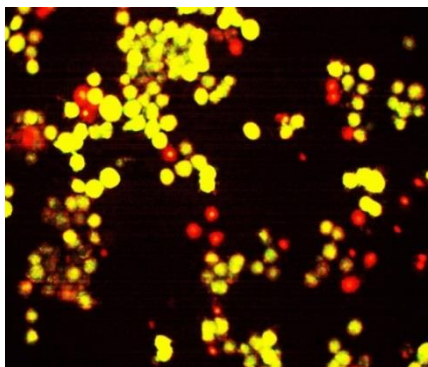
Obr. 3. Indukcia oxidačného stresu v systéme izolovaných hepatocytov t-BHP. Izolované hepatocyty sa inkubovali 60 minút po pridaní 0.5 mM t-BHP



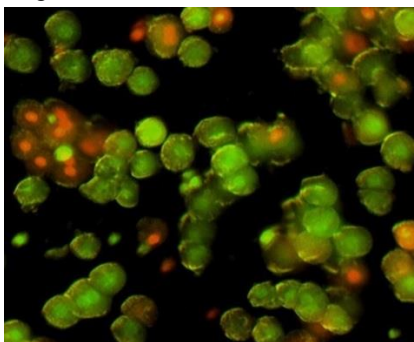
Obr. 4. Indukcia oxidačného stresu v systéme izolovaných hepatocytov t-BHP. Izolované hepatocyty sa inkubovali 60 minút po pridaní 1.0 mM t-BHP



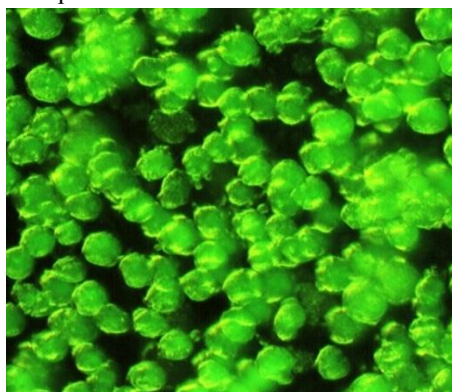
Obr. 5. Indukcia oxidačného stresu v systéme izolovaných hepatocytov t-BHP. Izolované hepatocyty sa inkubovali 60 minút po pridaní 2.0 mM t-BHP



Obr.6. Protektívne účinky stobadinu v oxidačnom strese v systéme izolovaných hepatocytov. Izolované hepatocyty sa inkubovali 60 minút s 0.5 mM t-BHP. Testovaná látka stobadin (0,1 mM) sa aplikovala do inkubačného média v 5 min po indukcii oxidačného stresu.



Obr 7. Protektívne účinka stobadinu v oxidačnom strese v systéme izolovaných hepatocytov. Izolované hepatocyty sa inkubovali 60 minút s 0,5 mM t-BHP. Testovaná látka stobadin (1,0 mM) sa aplikovala do inkubačného média v 5 min po indukcii oxidačného stresu.



Diskusia a záver:

Inkubáciou izolovaných hepatocytov s organickým hydroperoxidom t-BHP sa v závislosti od jeho koncentrácie znížila vitalita izolovaných hepatocytov potkana. Hepatotoxický účinok sa prejavil významným zvýšením peroxidácie lipidov. Predinkubáciou hepatocytov s pyridoindolovým derivátom stobadínom sme zistili protektívny účinok stobadínu. Zníženie hepatotoxických účinkov sa prejavilo:

- zvýšením vitality izolovaných hepatocytov
- znížením uvoľňovania LDH a MDA

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.

Vývinový pôvod chronických ochorení

Bezek Š., Bezek, Š., Mach M., Ujházy E., Dubovický M.

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

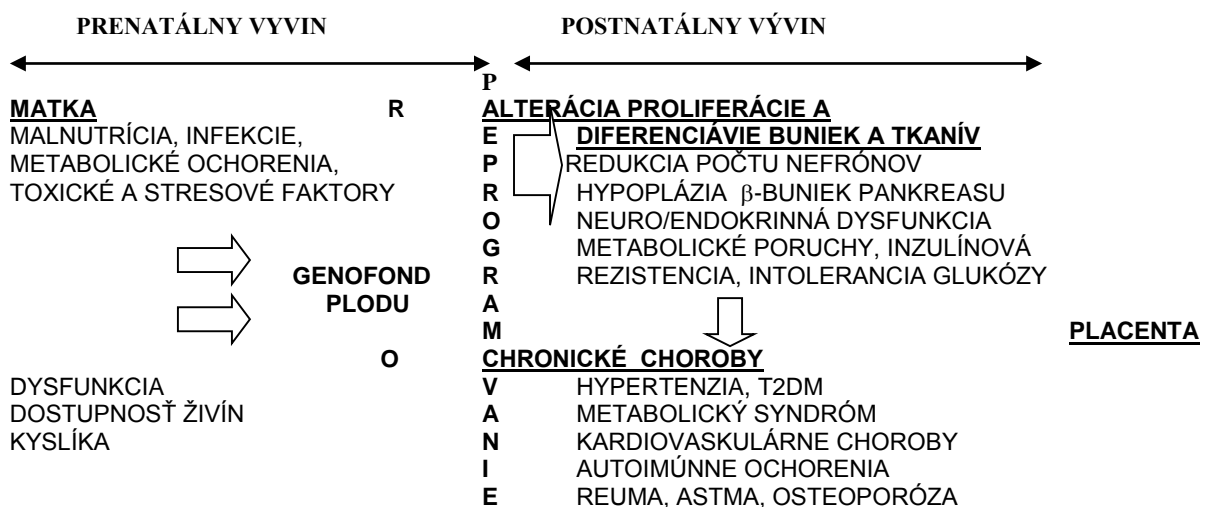
Chronické choroby (ChO) sú závažným zdravotným problémom, najmä z hľadiska pracovnej neschopnosti a dlhoročnej invalidity pacientov, ale aj vysokých liečebných nákladov zdravotných poisťovní a celej spoločnosti. Najzávažnejší epidemiologický problém predstavujú srdcovocievne ochorenia, diabetes mellitus, nádorové ochorenia, osteoporóza a obezita, a to predovšetkým pre ich neustále narastajúci výskyt v populácii. Celosvetovo, ale aj v rámci Slovenska, narastá aj výskyt afektívnych, kognitívnych a behaviorálnych porúch. Takmer polovica úmrtí na ChO pripadá na srdcovocievne ochorenia. Varovné trendy sa prejavujú vo výskyte *diabetes mellitus* a obezity, ktoré postihujú stále väčšiu časť populácie, a začínajú sa prejavovať už v mladšom veku. Z celosvetových prognóz WHO vyplýva, že do roku 2020 budú ChO príčinou takmer troch štvrtín všetkých úmrtí; 71% bude pripadať na ischemickú chorobu srdca (IChS). Počet ochorení na *diabetes mellitus* v rozvojových krajinách sa zvýši 2,5-násobne, z 84 miliónov na 228 miliónov v roku 2025. V Európe sa do roku 2010 zvýši počet diabetických pacientov na 33 miliónov. V Európskej únii predstavujú v súčasnosti náklady na liečbu diabetu typu 2 ročne 15 miliárd € a tvoria 8% celkových výdavkov na zdravotnú starostlivosť (WHO/FAO Expert Consultation, 2002).

Hypertenzia postihuje 25% pacientov starších ako 45 rokov a je svojim výskytom jedným z najrozšírenejších ochorení vo svete. Výsledky epidemiologických štúdií poukazujú, že determinujúcim faktorom vzniku hypertenzie a postihnutia vencovitých ciev je nielen životný štýl, ale tiež vplyvy prostredia v priebehu prenatálneho vývinu jedinca (Amann a kol., 2004). Hypertenzia sa u cca 10% pacientov vyvíja sekundárne, v dôsledku pôsobenia organických príčin zvyšujúcich tlak krvi. U pacientov, u ktorých nie je známa príčina hypertenzie, sa diagnostikuje tzv. *esenciálna* resp. *primárna hypertenzia*. Približne 50% prípadov primárnej hypertenzie možno vysvetliť pôsobením genetických faktorov. Zvyšných 50% prípadov je však nejasnej etiológie. Táto skupina pacientov je veľmi heterogénna, ale možno u nej predpokladať spoločný etiopatogenetický mechanizmus – IURR. V dôsledku IURR sa indukuje zvýšené riziko fetálnej, perinatálnej a neonatálnej morbidity a mortality (Salam a spol., 2014). Ukazuje sa, dôsledky nízkej pôrodnej hmotnosti sa môžu prejaviť na kardiovaskulárnej reaktivite u ľudí v staršom veku (Feldt a Kajantie, 2006).

Prenatálny vývoj plodu od koncepcie až po narodenie je zložitý proces, ktorý je vo veľkej miere determinovaný genetickou konfiguráciou jedinca, dostupnosťou nutritívnych látok, kyslíka, rastových faktorov a hormónov pre matku a vyvíjajúci plod. Narušenie homeostázy prenatálneho vývoja organizmu v dôsledku nedostatočnej výživy matky v priebehu gestácie, zásobovania plodu živinami a kyslíkom placentou v dôsledku environmentálnych toxických a stresových faktorov prostredia v kritickom období organogenézy negatívnym spôsobom ovplyvňuje vývin plodu (Bezek a spol., 2008). V podmienkach intrauterinnej deprivácie nutritívnych látok a kyslíka dochádza k stratám štrukturálnych jednotiek ako sú neuróny, kardiomyocyty, nefróny a pankreatické beta bunky vyvíjajúcich sa tkanív plodu. Pre prežitie sa funkcie orgánov plodu adaptujú na zníženú dostupnosť nutritívnych látok a kyslíka s trvalými negatívnymi dôsledkami pre rast a aktivity organizmu (Simmons 2006).

Výsledky klinických a experimentálnych štúdií u zvierat ukazujú, že metabolická, endokrinná a fyziologická adaptácia na suboptimálne intrauterinne podmienky majú za následok permanentnú alteráciu vývinu celulárnej proliferácie a diferenciácie kľúčových tkanivových a orgánových systémov (Barker, 1988). Dlhodobá zmena fyziológie, morfológie alebo metabolizmu plodu, ktorá vzniká ako reakcia na špecifický stimul v kritickom období organogenézy sa v literatúre označuje ako vývinové

programovanie (developmental programming), pretože v procese dochádza k epigenetickým zmenám fenotypu, čo ovplyvňuje zdravie, resp. zvyšuje riziko vzniku chronických ochorení v dospelosti (Developmental Origins of Adult diseases, DOHaD) (Gluckman a Hanson, 2004). Epigenetické programovanie sa definuje ako proces, v ktorom nepriaznivé podmienky prostredia ovplyvňujú genotyp vyvíjajúceho plodu v dôsledku čoho sa napriek identickej genetickej informácii,aa vytvára fenotyp s novými unikátnymi štruktúrami a funkciami buniek a tkanív (Tang a Ho, 2007). Výsledné fenotypy, ktoré zodpovedajú podmienkam prostredia budú podporovať zdravie, zatiaľ čo vysoká miera nesúladu bude brániť adaptácii na novšie životné podmienky, v dôsledku čoho sa zvyšuje riziko ochorení. Vplyv znečistenia životného prostredia, množstvo nových syntetických chemických látok môže viesť k rozporu s naprogramovanými adaptačnými zmenami, ktoré vznikli počas raného vývoja (Bezek a spol., 2008).



Obr. 1. Vývinové procesy epigenetického programovania chronických ochorení

Mechanizmus epigenetického vývinového programovania

Mechanizmus fetálneho programovania „Fetal programming“ alebo vývinového pôvodu zdravia a ochorení v dospelosti (DOHaD) nie je objasnený. Výsledky animálnych experimentálnych štúdií ukazujú, že prejavy intrauterinnej rastovej retardácie (IURR) vznikajú v dôsledku hypoxie a ischémie/reperfúzie citlivých štruktúr v kritickom období organogenézy. Zvýšenou produkciou reaktívnych foriem kyslíka dochádza k oxidatívne poškodeniu mitochondrií, celulárnych proteínov, lipidov a nukleových kyselín, čo môže ovplyvniť expresiu génov a proliferáciu bunkových systémov (Huang et al., 2004)

Vývinový pôvod chronických ochorení sa vysvetľuje aj endokrinnym mechanizmom, pretože hormóny sú dôležitou súčasťou vývinového neuro-endokrino-imunitného systému, ktorý reguluje rozhodujúce procesy prenatálneho vývinu. Nefyziologické koncentrácie hormónov fungujú v kritickom období organogenézy ako „endogénne funkčné teratogény“ (Plagemann, 2005). V priebehu procesov epigenetickej transformácie hrajú dôležitú úlohu hormóny osi HPA a glukokortikoidy. Glukokortikoidy indukujú permanentné zmeny fyziologických systémov, pretože ovplyvňujú biologickú dostupnosť hormónov, celulárnu expresiu receptorov, enzýmov, iónových kanálov, membránových transportérov a cytoarchitektoniku proteínov fetálnych tkanív.

Molekulárny mechanizmus DOHaD spočíva v epigenetickej alterácii génovej expresie v ranných štádiách vývinu embrya, ktorá sa uskutočňuje metyláciou DNK a modifikáciou histónov. Acetylácia

alebo metylácia histónov môže zmeniť afinitu väzby s DNK s následnou zmenou expsie génov a patofyziologickými funkciami orgánov (Wu et al., 2004).

Hypertenzia

Klinické a experimentálne výsledky ukazujú, že obličky plodu sú extrémne citlivé na účinky IURR. V štúdiách IURR u ľudských plodov sa zistila neporovnateľne vyššia zraniteľnosť obličiek v porovnaní s ostatnými orgánmi plodu. Redukciou počtu funkčných renálnych nefrónov v procese IURR sa zvyšuje krvný tlak s následnou progresiou renálnej dysfunkcie a vznikom hypertenzie. Obličky s nižším počtom funkčných nefrónov udržujú svoje hemodynamické a exkretorické funkcie zvýšením krvného tlaku. Zvýšený tlak v nefrónoch má za následok progresívne poškodzovanie a postupnú stratu ich funkčnosti s klinickými prejavmi obličkového zlyhania. Zvýšený tlak v jednotlivých nefrónoch a zvýšená vaskulárna rezistencia sa klinicky manifestuje zvýšením systémového krvného tlaku (Amann et al., 2004). Kľúčovú úlohu v regulácii krvného tlaku majú jednotlivé komponenty renín-angiotensínového systému (RAS). Na systémovej úrovni, ale aj v regulácii vaskularizácie väčšiny orgánov hrá dôležitú úlohu tvorba vazokonstriktorického hormónu angiotensinu II, čo sa prejavuje zvýšenou vaskulárnou rezistenciou a zvýšením krvného tlaku (Langley-Evans, 2001).

Diabetes melitus typu 2

Obdobie fetálneho vývinu jedinca je rozhodujúcim obdobím vo vývoji pankreasu. Nepriaznivé podmienky prostredia v dôsledku poruchy výživy, placentárnej dysfunkcie negatívne ovplyvňujú vývin buniek pankreasu. V dôsledku narušenia expsie a transkripcie génovej informácie sa vyvíja populácia β -buniek, ktoré nie sú plnohodnotné z kvantitatívneho ani s kvalitatívneho hľadiska, vzniká intolerancia glukózy a inzulínová rezistencia (Hill and Duvillié, 2000).

Metabolický syndróm

Novorodenci s IURR sú obzvlášť rizikovejší k vzniku a vývoju metabolického syndrómu (syndrom X), ktorý sa manifestuje symptómami hypercholesterolémie, arteriálnej hypertenzie, ischemickou chorobou srdca, zhoršenou glukózovou toleranciou a vývojom T2DM. Táto asociácia je výsledkom adaptačných zmien fetálnych-metabolických mechanizmov na narušené intrauterinné prostredie pre zaistenie prežitia plodu. V dôsledku narušeného fetálneho prostredia dochádza preprogramovaniu metabolickej homeostázy, čo sa v dospelosti prejavuje patologickými prejavmi krvného tlaku, dyslipidémiou a glukózovou intoleranciou (Varvarigou, 2010). Ateroskleróza, oxidačný stres, chronický zápal a endotelová dysfunkcia ciev sa považuje za rizikové faktory kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych ochorení (Leduc a spol., 2009).

Neuropsychiatrické ochorenia

IURR sa môže prejavovať vývojom psychických ochorení, miernym neurologickým deficitom s príznakmi hyperaktivity, deficitom sústredenia a zaostávaním vo vývoji, čo sa označuje ako minimálna nervová dysfunkcia. Tento deficit pretrváva do školského veku a prejavuje sa zhoršeným prospechom v škole, aj keď sú kognitívne schopnosti v norme. Zistila sa príčinná súvislosť medzi zníženou výživou v priebehu intrauterinného vývoja a zníženými kognitívnymi schopnosťami po narodení (Lucas, 1998). Hypoxické poškodenie mozgu plodu má za následok zvýšenú neonatálnu morbiditu a mortalitu, ale aj sekvenciu dlhodobých nepriaznivých následkov ako je mentálna retardácia, vývoj kľúčových prejavov, avšak mechanizmus vzniku týchto patogénnych procesov nie je úplne objasnený. Výsledky epidemiologických a neuropatologických štúdií ukazujú, že patogénne procesy, ktoré vrcholia vývojom schizofrenie by mohli byť iniciované v ranných štádiách prenatalného vývoja. Neurovývojovú hypotézu vzniku schizofrenie podporujú aj súvislosti pôrodných komplikácií s vývojom schizofrenie, najmä v prípadoch vzniku schizofrenie v rannom veku. (Bellingham-Young and Adamson-Macedo, 2002).

Autoimunne ochorenia

Vývoj autoimunných ochorení ako je reumatoidná artritída závisí od interakcie medzi genetickým základom a početných environmentálnych faktorov. V priebehu fetálneho vývoja je imunitný systém pod neustálym vplyvom početných environmentálnych faktorov, ktoré môžu indukovať zmeny vo vývoji jeho komponentov. Takými to inzulami sa môžu stať bežné infekcie, ktoré môžu v kritickom období vývoja imunitného systému indukovať permanentné zmeny ovplyvňujúce potenciál B a T lymfocytov a relatívnu hladinu pro- a antiinflatórných cytokínov. Vzájomná interakcia špecifického genetického prostredia a environmentálnych genetických faktorov má za následok vývoj imunitného ochorenia (Edwards and Cooper 2006).

Astma a iné respiračné ochorenia

Výsledky klinických a experimentálnych štúdií dokazujú, že nepriaznivé podmienky v priebehu gestácie spomaľujú vývin a rast plodu, čo sa prejavuje postnatálnymi respiračnými anomáliami a funkčnými poruchami v dospelosti (Edwards et al., 2003). Riziko astmy a iných respiračných ochorení v dospelosti sa zvyšuje po environmentálnej expozícii matky v gestácii škodlivými toxickými látkami (Wang a Pinkerton 2007).

Osteoporóza

Experimentálne modely prenatálneho programovania osteoporózy sú založené na dietetickej manipulácii ovplyvnenia vývinu plodu malnutríciou (deficientná proteínová alebo hyperlipidová diéta matky). V ranných štádiách postnatálneho vývinu sa zistilo rozšírenie rastovej platničky kostnej epifýzy a ďalšie príznaky zmeneného vývinu chrupaviek a kostí, (Mehta et al., 2002). V dôsledku deficientnej proteínovej diety matky sa znížila proliferácia a diferenciácia buniek kostnej drene (Cooper et al., 2005).

Literatúra

1. Amann K, Plank C, Dotsch J. Low nephron number--a new cardiovascular risk factor in children? *Pediatr Nephrol.* 2004, 19:1319-23. Review.
2. Barker, SD. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond).* 1998, 95: 115-28
3. Bellingham-Young, D., Adamson-Macedo E.: Prediction and psycho-immunologic mediation of minor illness in adulthood. *Neuroendocrinology letters* 2002, 23: 219-225
4. Bezek S., Mach M., Ujházy E., Dubovický M. Nongenomic memory of foetal history in chronic diseases development. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008, 29, 620-626.
5. Bezek S., Ujházy E., Mach M., Dubovický M. Developmental origin of chronic diseases: Toxicological implication *Interdisc. Toxicol.* 2008, 1: 101–103.
6. Cooper C, Javaid K, Westlake S, Harvey N, Dennison E., Developmental origins of osteoporotic fracture: the role of maternal vitamin D insufficiency. *J Nutr.* 2005,135, 2728S-34S
7. Edwards C.J. a Cooper C.: Early environmental factors and rheumatoid arthritis *Clinical & Experimental Immunology* 2006, 143, 1-9
8. Feldt K. a Kajantie K.: Gestational age at birth predicts cardiovascular stress responses 60 years later. *Biol. Psych. Psychopharmacol.* 2006, 8, 14.
9. Gluckman P. and Hanson M.A.: Developmental Origins of Disease Paradigm: A Mechanistic and Evolutionary Perspective *Pediatric Res.* 2004, 56, 311-317
10. X. Hill, D.J., Duvillié, B.: Pancreas development and adult diabetes *Pediatr. Res.* 2000, 48: 269-274
11. Huang, S.-T. J., Vo, K. C. T., Lyell, D. J., Faessen, G. H., Tulac, S., Tibshirani, R., Giaccia, A. J., Giudice, L. C. Developmental response to hypoxia. *The FASEB Journal* 2004, 18, 1348-1365
12. Langley-Evans, S.C.: Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc,* 2001, 60: 505-513

13. 12. Leduc L, Levy E, Bouity-Voubou M, Delvin E. Fetal programming of atherosclerosis: possible role of the mitochondria, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010, 149, 127-30
14. Lucas, L.: Programming by early nutrition: An experimental approach. *J. Nutr.*, 1998, 128: 401S-406S
15. 14. Mehta G., H. I. Roach, S. Langley-Evans, P. Taylor, I. Reading, R. O. C. Ore.o, A. Aihie-Sayer, N. M. P. Clarke, C. Cooper. Intrauterine Exposure to a Maternal Low Protein Diet Reduces. Adult Bone Mass and Alters Growth Plate Morphology in Rats, *Calcif Tissue Int* 2002, 71, 493–498
16. Plageman A. Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity, *Physiol Behav.* 2005, 86, 661-668
17. Salam RA, Das JK, Bhutta ZA., Impact of intrauterine growth restriction on long-term health, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2014
18. Simmons R (2006). Developmental origins of adult metabolic disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 35:193-204
19. Tang W.Y., Ho S.M: Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007, 8, 173-82.
20. Wang L., Pinkerton K.E.: Air pollutant effects on fetal and early postnatal development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 2007, 81, 144-154
21. Varvarigou AA., Intrauterine growth restriction as a potential risk factor for disease onset in adulthood. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2010, 23, 215-224.
22. Wu G., Bazer F.W., Cudd T.A., Meininger C., Spencer T.E. Recent Advances in Nutritional Sciences. *Maternal Nutrition and Fetal Development J. Nutr.* 134:2169-2172, September 2004

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.

Characterisation of class I and II α -mannosidases from *Drosophila melanogaster*

Ivana Nemčovičová¹, Sergej Šesták¹, Dubravko Rendić², Margita Plšková¹, Ján Mucha¹
and Iain B. H. Wilson^{2,*}

¹ Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

² Department für Chemie, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 Wien, Austria

Abstract

Homology searches indicated that up to five class I α -mannosidases (glycohydrolase family 47) and eight class II α -mannosidases (glycohydrolase family 38) are encoded by the fruitfly (*Drosophila melanogaster*) genome. Selected example mannosidases were expressed in secreted form using the yeast *Pichia pastoris*. A number of characteristics of these enzymes were determined with *p*-nitrophenyl- α -mannoside as substrate; particularly striking were the low optima (pH 5) of three class II mannosidases most closely related to known lysosomal mannosidases and the distinct Co(II)-requirement of a mannosidase previously named ManIIb. Other than previous characterisations of the well-known Golgi mannosidase II, this is the first study summarising various properties of recombinant mannosidases from the fruitfly.

Material and methods

Cloning of the Drosophila melanogaster mannosidase cDNAs:

By searching of *D. melanogaster* database using the protein sequence of bovine lysosomal α -mannosidase (Genbank L31373.1) as the query, seven putative lysosomal mannosidases were retrieved that are classified as glycosyl hydrolase family 38 (GH38) members in the CAZy database. The cDNA encoding the soluble domain of the LManII protein (i.e., lacking first 33 amino acids corresponding to signal peptide of bovine lysosomal mannosidase Man2B1) was amplified by RT-PCR using total RNA from *Drosophila melanogaster* type CS embryos. PCR products were gel purified and cloned into the pPICZ α FLAGC3 vector.

Expression and purification of the fusion proteins:

Plasmids were transformed into the *Pichia pastoris* host strain GS 115. The *Pichia* transformants expressing the highest level of extracellular α -mannosidase activity were used in a large-scale experiment. The optimal expression was achieved in MMYC media at 18°C with methanol induction over five days. The recombinant protein was concentrated and partially purified by ammonium sulphate step precipitation with increasing amounts of ammonium sulphate (up to 75%). For more detailed studies, the LManII-His-Flag protein was further affinity purified on an Ni-NTA agarose column (Qiagen) using elution with imidazole.

Enzyme assay and characterisation of recombinant α -mannosidases:

Mannosidase activity of enzyme preparations were measured using *p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside (pNP-Man; Sigma) as a substrate at a concentration of 2 mM in 100 mM acetate buffer pH 5.2 (unless indicated otherwise) and 10-20 μ l (original medium) or 1-5 μ l (concentrated samples), in a total volume of 50 μ l for 1-2 h at 37 °C. The reactions were terminated with ten volumes (0.5 ml) of 100 mM sodium carbonate and the production of *p*-nitrophenol was measured at 410 nm using a spectrophotometer (Beckmann). Inhibition tests, the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) and K_i-value were performed with swainsonine (Sigma) and mannosatin A (Calbiochem) at concentrations of 5-400 nM and 1-30 μ M, respectively. The IC₅₀ were determined from a dose-response curves and K_i values from Dixon semi-reciprocal plots (30).

Results

Characteristics of fruitfly class II mannosidases

After initial optimisation tests, the effects of temperature on enzyme activity were tested at pH 5.2 for

the lysosomal enzymes and at pH 5.8 (in the presence of Co(II)) in the case of ManIIb; the optimum for the latter was at 37 °C, whereas the three lysosomal enzymes were most active in the range 40-50 °C. (**Figure 1A**). A typical hallmark of lysosomal enzymes is an acidic pH optimum, whereas Golgi enzymes tend to have an optimum of around pH 6. The assays indeed indicated that the three putatively lysosomal enzymes had pH optima of around pH 5, whereas ManIIb had one of pH 5.8 (**Figure 1B**). The effects of metal ions also distinguished the ‘acidic’ mannosidases from ManIIb. Except for Zn(II), which is present in the active site of Golgi mannosidase II and bovine lysosomal mannosidase, all other cations tended to have negative effects on the activity of these mannosidases, whereas ManIIb was 13-fold more active in the presence of Co(II) as compared to the control with no added cations. Only Mn(II) also had a positive effect on the activity of this enzyme (**Figure 1C**). In terms of kinetic characteristics, the K_m values for all enzymes towards the simple substrate were in the millimolar range (1.2 – 2.5 mM; **Table I**). The K_i values for the two inhibitors were determined using Dixon plots and varied in the range 2.9 – 71 nM for swainsonine and 0.075 – 12.5 μ M for mannostatin A (**Table I**).

Figure 1. Characterisation of *Drosophila* class II mannosidases.

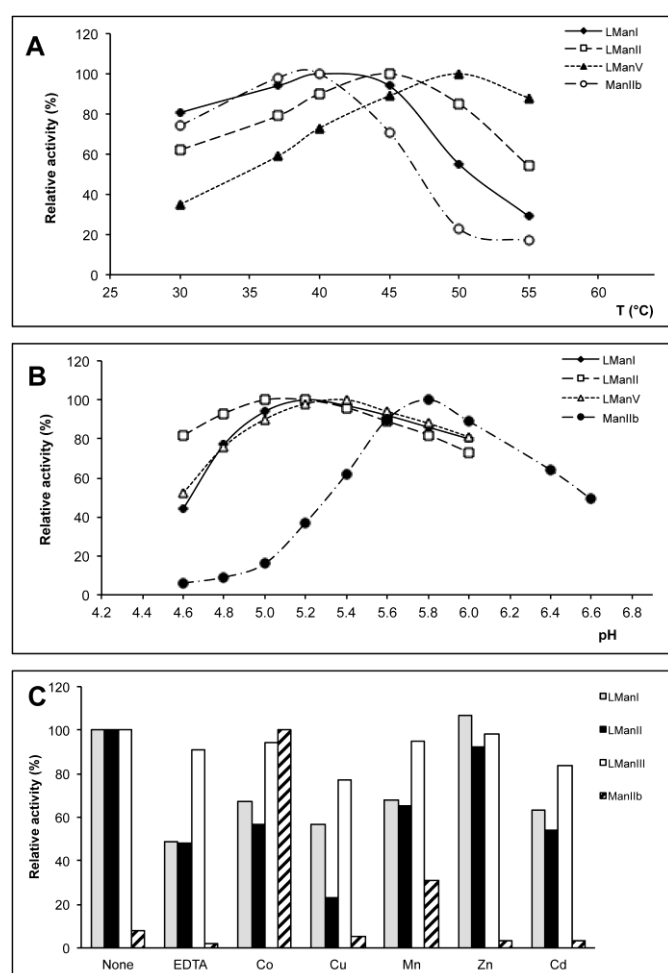


Table I. Kinetic parameters of recombinant *Drosophila* class II mannosidases.

Enzyme	pH	K_m (mM)	Swainsonine (nM)		Mannostatin (μ M)	
			IC ₅₀	K_i	IC ₅₀	K_i

LManI	5.2	2.1	95.0	61.5	1.8	1.1
LManII	5.2	2.3	12.0	7.1	3.3	3.1
LManV	5.2	1.2	135	71.0	15.5	12.5
ManIIb	5.8	2.5	4.0	2.9	0.15	0.075
ManII	5.7 ¹³	*5.5 ⁴⁷	17 ¹³	20 ¹⁷	n.d	0.036 ¹⁵

Acknowledgements

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.

Úloha fosforylácie v aktivácii Ire1 proteínu

Veronika Fáberová^a, Sergej Šesták^a, Martin Schröder^b, Ján Mucha^a

Úvod

V eukaryotických bunkách, všetky proteíny, ktoré sú syntetizované a triedené v sekrečnej dráhe musia prejsť cez endoplazmatické retikulum (ER), aby boli správne zbalené a modifikované. Zvýšená potreba zbalovania proteínov, ktorá súvisí so zvýšenou biosyntézou proteínov v bunke, môže spôsobiť hromadenie zle zbalených a nezbalených proteínov, čo aktivuje signálnu dráhu nazývanú „unfolded protein response“ (UPR). Aktivácia UPR indukuje zvýšenie transkripcie génov, ktoré kodujú proteíny, ktoré sa zúčastňujú pri zbalovaní proteínov (šaperóny, foldázy), ako aj pri degradácii „ER-associated degradation“ (ERAD). Zároveň to vedie k expanzii ER (Rubio a kol., 2011).

V kvasinkách *S. cerevisiae* je UPR aktivovaná ER transmembránovým receptorom Ire1 (inositol requiring enzyme 1). Ire1 sa skladá z N-terminálnej luminálnej domény, ktorá vníma zle zbalené proteíny v ER a z cytosolickej domény, ktorá sa delí na Ser/Thr kinázovú doménu a C-terminálnu endoribonukleázovú doménu (RNázu) (Ali a kol., 2011). Kľúčovým krokom na šírenie signálu je oligomerizácia luminálnej domény, ktorá umožní priblíženie kinázových domén a trans-fosforyláciu v aktivačnej slučke Ire1. Princíp aktivácie RNázovej domény nie je známy, ale predpokladá sa, že je aktivovaná autofosforyláciou kinázových domén, čo spôsobí konformačné zmeny a priblíženie RNázových domén (Ron a Hubbard, 2008). Aktívna RNáza katalyzuje nekonvenčný splicing HAC1 mRNA vyštiepením 252-nukleotidového intrónu a umožní transláciu HAC1 mRNA na Hac1 transkripčný faktor, ktorý aktivuje transkripciu UPR cieľových génov (Korenykh a kol., 2011).

Výsledky

Overenie fenotypu niektorých mutantov v aktivačnej slučke kinázovej oblasti IRE1.

Fosforylácia serínových zvyškov S840 a S841 v aktivačnej slučke kinázovej oblasti je považovaná za esenciálnu pre aktiváciu kinázovej aktivity IRE1. Dvojité mutant S840A S841A bol uvádzaný ako neschopný prežívania ER stresu. V predchádzajúcej práci sa zistilo, že spomínaný dvojité mutant, ako aj ďalšie viacnásobné mutanty (Q-A a P-A) sú výrazne citlivé na ER stres, ale zachovávajú si určitú aktivitu a tým aj schopnosť čiastočného prežívania (pri slabšom strese).

P-A mutant

Q-A mutant

↑ ↑↑ ↑ ↑

816 QTGAENLRIL ISDFGLCKKL DSGQSSFR¹LN LNNP²SGTSGW 855

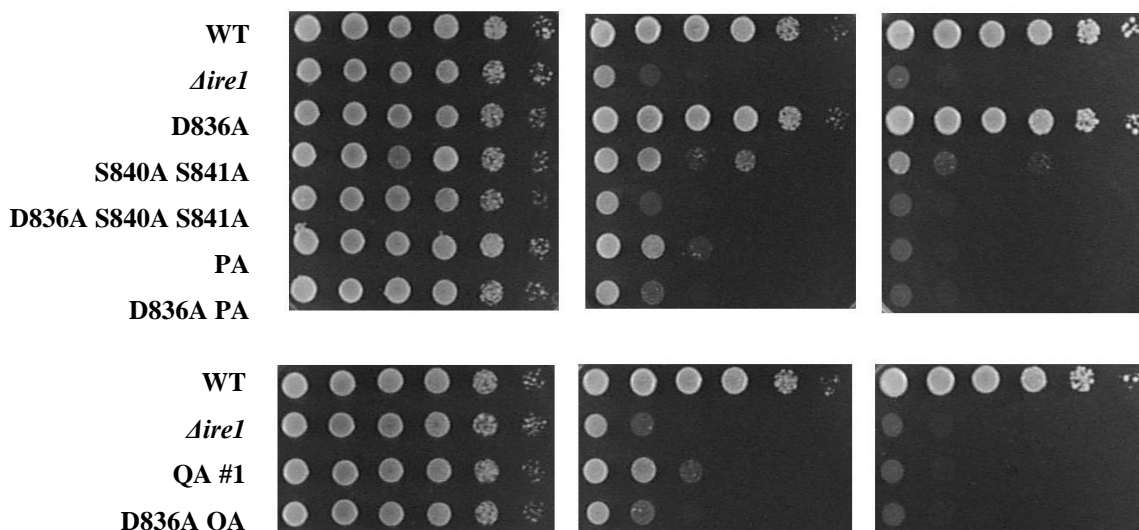
Activation loop

Nakoľko D836 je na základe podobnosti s inými proteínkinázami tohto typu, kandidátom, ktorý ovplyvňuje proces aktivácie v kinázovej oblasti, testovali sme úlohu tejto aminokyseliny nafenotyp spomínaných fosforylačných mutantov. Bola pripravená séria mutantov v plazmide YCplac33 s naklónovaným IRE1 génom. Po selekcií v baktériách *E. coli*, boli jednotlivé plazmidy natransformované do kvasiniek *S. cerevisiae* s nefunkčným IRE1 génom (Δ Ire1). Získané kvasinkové mutanty boli testované na schopnosť aktivácie UPR dráhy počas ER stresu metódou „spotting assay“.

0

Tm 0,6 µg/ml

1,5 mM DTT



Všetky kmene za normálnych fyziologických podmienok rastú bez problémov. Ako náhle navodíme podmienky, pri ktorých nedochádza k správne zbalovaniu proteínov - ER stres, bunky, ktoré nedokážu aktivovať UPR dráhu nedokážu prežiť za daných podmienok. Stresové podmienky sme spôsobili použitím ditiotreitolu (DTT), ktorý redukuje disulfidové väzby a teda bráni správne zbaleniu proteínov a tunikamycínu, ktorý blokuje N-glykozyláciu proteínov v ER. Pozitívnu kontrolou bol WT kmeň, ktorý má plne funkčný Ire1 proteín, ktorý po navodení stresu spustí UPR dráhu a bunky prežívajú. Negatívnu kontrolou bol kmeň $\Delta ire1$, ktorý nemá Ire1 proteín a nie je schopný prežiť ER stres. Mutácie, ktoré výraznejšie potláčajú aktivitu Ire1, spôsobujú aj väčšiu citlivosť buniek na ER stres. Samostatná mutácia D836A neovplyvnila aktivitu Ire1 a ani prežívanie buniek počas ER stresu. Kombinácia tejto mutácie s fosforylačnými mutantmi (S840A S841A, Q-A, P-A) však mala synergický účinok a ovplyvnila ich citlivosť na ER stres. Mutanty D836A Q-A a D836A P-A už neboli schopné prežiť stresové podmienky.

Zoznam literatúry:

1. Lee, P.K., Dey, M., Neculai, D., Cao, C., Dever, T. E., Sicheri, F. (2008) Structure of the Dual Enzyme Ire1 Reveals the Basis for Catalysis and Regulation in Nonconventional RNA Splicing. *Cell* **132**, 89 – 100.
2. Ron, D., Hubbard, S. R. (2008) How Ire1 Reacts to ER Stress. *Cell* **132**, 24 – 26.
3. Ali, M. U. M., Bagratuni, T., Davenport, E. L., Nowak, P. R., Silva-Santisteban, M. C., Hardcastle, A., McAndrews, C., Rowlands, M. G., Morgan, G. J., Aherne, W., Collins, I., Davies, F. E., Pearl, L. H. (2011) Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *The EMBO Journal* **30**, 894 – 905.
4. Rubio, C., Pincus, D., Korennykh, A., Schuck, S., El-Samad, H., Walter, P. (2011) Homeostatic adaptation to endoplasmic reticulum stress depends on Ire1 kinase activity. *J. Cell. Biol.* **193**, 171 – 184.
5. Korennykh, A. V., Korostelev, A. A., Egea, P. F., Finer-Moore, J., Stroud, R. M., Zhang, C., Shokat, K. M., Walter, P. (2011) Structural and functional basis for RNA cleavage by Ire1. *BMC Biology* **9**, 47 – 63.

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.

ANTITUSSIVE ACTIVITY OF SULFATED GLUCURONOXILAN

G. Nosál'ova¹, L. Jureček¹, L. Prisenžňáková¹, S. Fraňová¹, J. Turjan², P. Capek²

¹Department of Pharmacology, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University, 036 01 Martin, Slovak Republic

²Department of Glycomaterials, Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovak Republic

The traditional medicine is revalued by an extensive activity of research on different plant sources and their therapeutic principles. Bark of beech has found relatively extensive application in traditional medicine. Decoctions from *Fagus sylvatica* bark were found to have antacid, antipyretic, antiseptic, antitussive, expectorant or odontalgic effects [1,2]. It was used internally as a stimulating expectorant and externally as an application to various skin diseases [3]. Xylans showed cholesterol lowering ability, decreased the risk of atherosclerosis, colorectal cancer and diabetes. Besides, they showed immunomodulatory, anticomplement, antioxidant, anti-HIV and antitussive activities [4].

In the present study the antitussive activity of sulfated 4-*O*-methyl-glucuronoxylan was investigated using adult guinea pigs as a test system. Highly sulfated polymer was shown to exhibit promising antitussive effect. Its effect was slightly lower than that of narcotic codeine, the strongest antitussive agents used in a clinical practice. It has been found that reactivity of airways smooth muscle was not affected by sulfated polymer. This phenomenon indicates that sulfated glucuronoxylan is not involved in the bronchodilation or bronchoconstriction processes. Moreover, during experiments were not observed any notable side effects after administration of sulfated glucuronoxylan, supporting thus its potential role as an antitussive agent.

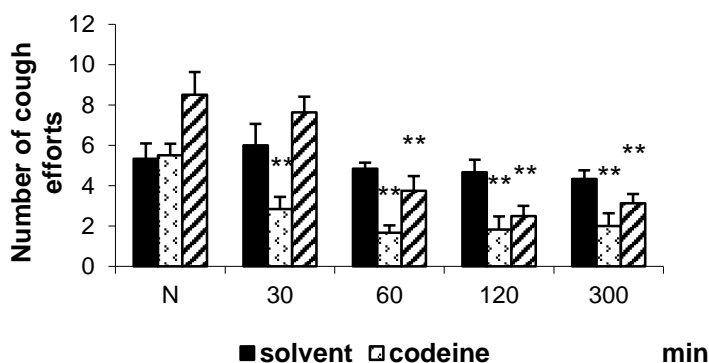


Fig. 1. Changes in number of cough efforts induced by water solvent (1 ml/kg), codeine (10 mg/kg) and sulfated glucuronoxylan (MGXS, 50 mg/kg).

References: [1] R. Chiej, Encyclopaedia of Medicinal Plants, Edinburgh, MacDonald, 1984. [2] E. Launert, Edible and Medicinal Plants, London, Hamlyn, 1981. [3] A. Grive, A Modern Herbal, Penguin, 1984. [4] D. Brown, Encyclopedia of Herbs and their Uses. London, Dorling Kindersley, 1995.

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.

AN ARABINO(GLUCURONO)XYLAN ISOLATED FROM SAGE

P. Capek, M. Matulová

Salvia officinalis L. (sage) is worldwide spread medicinal plant. Since ancient times it is used in traditional medicine and nowadays also for culinary and cosmetics purposes. The meaning of the word *salvia* in Latin means to heal. Sage disposes with a large scale of bioactive compounds as tannins, resin, volatile oils, flavones, flavonoid glycosides, estrogenic compounds, etc. Due to a diversity of its contained compounds, the medicinal use of sage in traditional medicine was relatively extensive. Sage as a remedy was recommended for almost every disease. The most known effects of sage are: antibiotic, astringent, antiseptic, carminative, antispasmodic, antihydrotic and hypoglycemic. Nowadays, sage is mostly used in treatment of respiratory diseases, cough, various infections, cold and sore throat. It is recommended in cases of nervous complaints, problems with digestion, liver and kidney disorders, as a lotion against ulcers, etc. [1]. In the view of above mentioned effects, sage seems to be the most popular home remedy nowadays.

Hemicellulose material isolated by alkaline extraction of aerial parts of sage, was shown to be the most active immunomodulatory fraction of sage [2]. Till now, no detailed structural studies on arabino(glucurono)xylan have been done. Present study of the polymer, isolated from the most active immunomodulatory fraction of sage, confirmed its arabino-(glucurono)xylan structure. It was found that arabino-(glucurono)xylan has a molecular mass 84 000 and it consists of linear chains of β -(1 \rightarrow 4)-linked xylopyranosyl residues, slightly branched at *O*-2 and *O*-3 by glucuronic acid, its 4-*O*-methyl derivative and short arabinofuranose chains. Structural analysis of oligomers obtained after mild acidic hydrolysis was also performed.

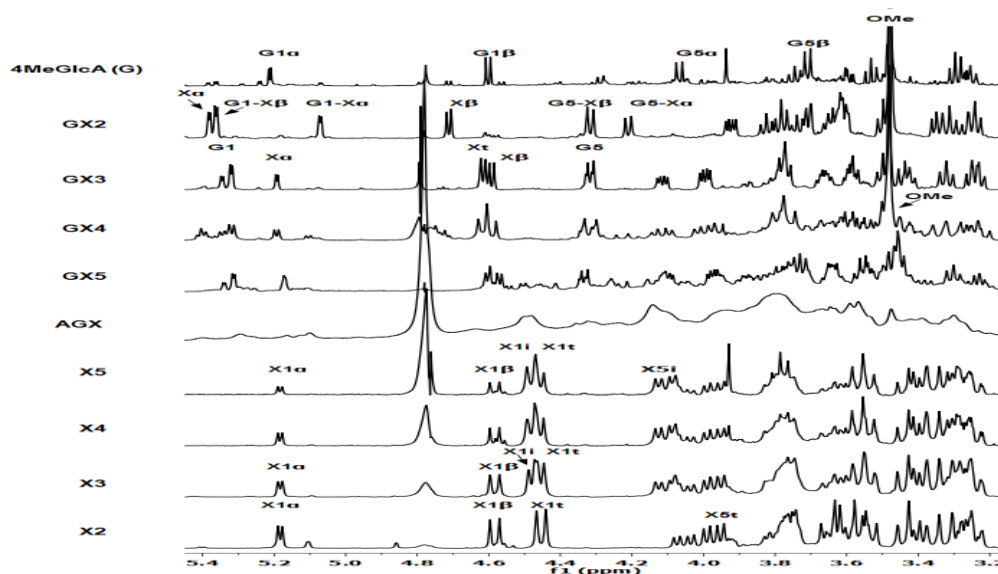


Fig. 1. ^1H NMR spectra of sage arabino(glucurono)xylan (AGX) and AGX-derived oligomers. Neutral oligo: X2-X5, acidic oligo: GX2-GX5. G : 4-*O*-methyl α -D-glucuronic acid, X : xylose, X α , X β : reducing end xylose units, X t : terminal not reducing xylose unit, X i : internal xylose unit, X1 : H1 signal of xylose, G1 : H1 of 4-*O*-methyl α -D-glucuronic acid, OMe : *O*-methyl

In lower acidic oligomers (dimer, trimer and tetramer) was the position of 4-*O*-methyl-glucuronic acid determined only at *O*-2 of the xylose residues. However, most of pentamers have been found to be substituted by glucuronic acid. On the basis of obtained data it may be concluded that the xylan backbone of sage is branched by both, glucuronic acid and its 4-*O*-methyl derivative. At average every fourteenth

xylose residue was substituted by uronic acid. Based on methylation analysis data arabinofuranose residues could be located mostly at *O*-3 of xylose in the form of short branched or unbranched oligomeric chains. A low phenolic content determined in AGX could be linked through arabinose side chains. These phenolics, as another functional site of polymer, can be responsible as well for some biological activity of sage drug.

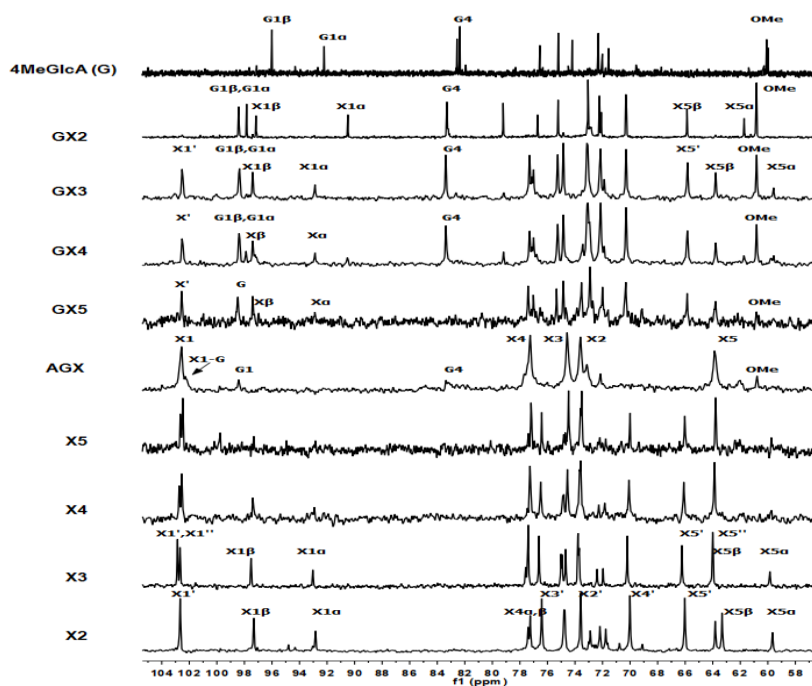


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of sage arabino(glucurono)xylan (AGX) and AGX-derived oligomers. Neutral oligo: X2-X5, acidic oligo: GX2-GX5. G : 4-*O*-methyl α -D-glucuronic acid, X : xylose.

References:

- [1] Y. Lu, L.Y. Foo, *Phytochemistry*, 59 (2002)117-140.
- [2] P. Capek, V. Hříbalová, E. Švandová, A. Ebringerová, V. Sasinková, J. Masarová, *Int. J. Biol. Macromol.* 33 (2003) 113-119.

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

POLYMER – DECORATED QUANTUM DOTS

I. Capek¹, P. Capek²

¹Polymer Institute, Institute of Chemistry, Institute of Measurement Science, Slovak Academy of Sciences Bratislava; Faculty of Industrial Technologies, TnUni, Púchov; Slovakia

²Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovak Republic

One class of inorganic nanoparticle displaying interesting optical properties and interactions with light are semiconductor quantum dots (QDs). Colloidal quantum dots comprise nanocrystals of semiconductors, such as cadmium selenide and, in core-shell materials, this semiconductor core is capped by a larger band-gap material, such as zinc sulfide. Thiol groups (SH) are generally anchored on the ZnS shell with terminal carboxyl (COOH) groups in order to increase the hydrophilicity of QDs. Quantum dots demonstrate higher brightness and photostability than conventional organic dyes. They possess a broad wavelength range for excitation, and narrow and symmetric emission spectrum properties. The colloidal dimensions of quantum dots (5–50 nm) confine the electron-hole pair excitons to dimensions comparable to that of the Bohr exciton radius, giving them their interesting size-dependent optical properties. The larger the quantum dot, the lower the energy of its fluorescence spectrum. The ability to tune the wavelength of the fluorescence spectrum through the size of the particle and the continuous broad-absorption spectrum make quantum dots a superior choice to traditional organic dyes for many labeling applications [1].

The QDs can be prepared in micellar solutions as well as in solutions where both reaction media are saturated with precursors [2]. In the former case reverse micelles can be used as soft template nanoreactors to prepare uniform and size controllable quantum dots by modulating the contents of water and stabilizer. In the latter case QDs can be prepared by homogeneous and heterogeneous nucleation where the reaction between precursor(s) proceeds usually under high temperature in the presence of stabilizers. The reverse microemulsion method provided good control over particle size and required no prior ligand exchange (Figure 1).

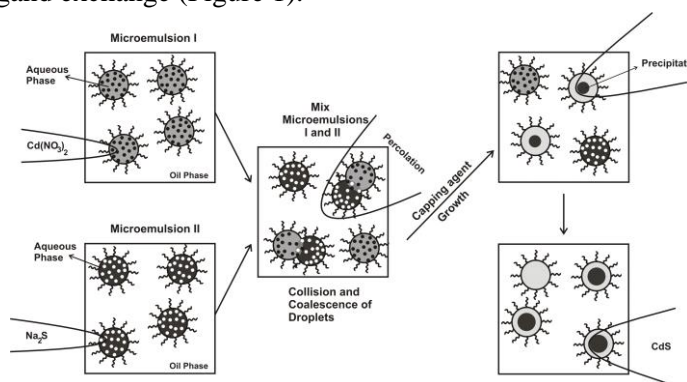


Figure 1. Proposed mechanism for the formation of QDs metal particles by the microemulsion approach [2].

Poly(ethylene glycol) (PEG)-modified metal nanoparticles have been synthesized by a reverse microemulsion method. The polymer coating provided a barrier against oxidation of the QD core and reduced nonspecific adsorption on the NPs. Various functionalized PEGs could be incorporated onto nanoparticle surfaces for bioconjugation applications. The in vitro cytotoxicity studies conducted on different cell lines showed that PEG-coated QDs were much less toxic compared with other water-soluble QDs coated with organic thiols.

The polymer (primary) coating favours the interactions of the metal nanoparticles with their environment in both vitro and vivo. This has been tackled using amphiphilic triblock copolymers that can be coupled to targeting ligands for tumor-antigen recognition and poly(ethylene glycol) (PEG) moieties for improved biocompatibility and circulation [3]. The ABC triblock copolymer comprises

hydrophobic polybutylacrylate and polyethylacrylate segments and a hydrophilic polymethacrylic acid block, to which an eight-carbon atom hydrophobic alkyl side chain is coupled. The hydrophobic blocks adsorb on the quantum dots that are capped by the hydrophobic tails of trioctylphosphine oxide-coordinating ligands for brush-forming diblock copolymers adsorbing from selective solvents. It is found that this spontaneous encapsulation process removes the problems of particle aggregation and fluorescence loss observed for quantum dots in physiological buffers. The trioctylphosphine oxide layer serves to form a hydrophobic protection layer that will resist hydrolysis and enzymatic degradation, but will tend to lead to aggregation mediated by hydrophobic interactions. Dynamic light scattering measurements suggest a hydrodynamic thickness for the polymer coating of 2 nm and that this layer is responsible for the particle's hydrodynamic interaction with the environment, which is similar to polymeric micelles. Measurements suggest that just four to five triblock polymers are adsorbed in a compact configuration that tightly wraps the particles. After linking to PEG molecules, the polymer-coated quantum dots were isolated from their environment to such a degree that their optical properties (absorption–emission spectra and fluorescence quantum yields) did not change over a broad range of pH and salt conditions. A similar approach employs PEG-b-PDMA diblock copolymers, in which the PDMA block acts as a multidentate ligand for the quantum dot and the PEG block enhances the water solubility and provides potential biocompatibility [4].

Following the trend described for gold nanoparticles, quantum dots have also been coated with responsive polymers, such as poly(2-[dimethylamino]ethyl methacrylate) [5], although to date, no biomedical applications have been described. The biocompatibility of quantum dots has been demonstrated for chitosan [6] and PEG-functionalized particles [7].

The type of secondary surface coating may affect the toxicity of the QD complex. Polyethylene glycol (PEG), a common pharmaceutical excipient, is used extensively in commercially available QDs. The first example is QDs coated with amphiphilic polyacrylic acid and simultaneously conjugated to different molecular weights of PEG (750 and 5000). By monitoring QDs in mice with fluorescent imaging, it was found that significant liver uptake was visible even at 1 min using (750)-PEG-QD, but completely cleared away after 1 h, while (5000) PEG-QD was absorbed by liver in 1-3 h post-injection. Under the latter condition no significant liver toxicity was determined; however, some differences in accumulation and clearance were observed [8]. A longer study (28 days) was carried on a commercially available QD, (5000)-PEG-QD705, (about 13 nm). After a single i.v. injection in mice, it was demonstrated that the liver and spleen were the main accumulative organs. QDs were not detected in either urine or feces, which would suggest accumulation of QDs with high molecular weight PEG [9]. When PEG-QDs are injected subcutaneously, QDs clear from the site of injection and accumulate in the regional lymph nodes along with the liver, spleen, and kidney [10]. Therefore, the type of injection would need to be considered for QD accumulation and toxicity [11]. Albumin is another commonly used secondary coating for QD in vivo applications. Fisher et al. coated CdSe/ZnS with MUA/ lysine to form QD-LM (about 25 nm) or coated the QD-LM with bovine serum albumin (BSA) to form QD-LM-BSA (about 80 nm). After i.v. injection in the rat, both QDs were mainly detected in the liver, although QDs were detected in the spleen, lung, kidney, and bone marrow. However, the QD-LM-BSA liver uptake was greater (99%) relative to the QD-LM uptake (40%). This corresponded with a faster blood clearance of QD-LM-BSA. Neither type of QD was detected in the urine or feces up to 10 days, which would suggest accumulation in the liver, especially with BSA conjugation [12]. Overall, most studies have indicated that differences in coating polymer material and size lead to changes in pharmacokinetics and can potentially cause toxicity.

The potential toxic effects of QDs have become a hot issue that must be further addressed before clinical applications would be possible. Most studies recommend that not all QDs are similar in their toxicity, and toxicity of differing QDs must be considered individually. The adverse effects of QD can be mitigated or eliminated by proper choices of coating materials and modification techniques that reduce QD instability. Although studies are conflicting regarding the magnitude and mechanisms of nanomaterial toxicity, it is evident that some nanomaterials that were previously considered biocompatible due to safety of the bulk material may indeed be toxic. Nanoparticle toxicology is a relatively young field, and the bulk of reports have focused on acute toxicity. Long-term toxicity of the materials and examination of chronic exposure are critical to understanding the toxicology of nanomaterials *in vivo*. Evaluation of toxicity has proven to be challenging as several factors may be working in tandem to cause nanoparticle toxicity. Furthermore, as nanomaterials are inherently quite complex, many unexpected interactions (based on bulk properties) with biological components may arise. However, with appropriately validated analytical methods and carefully designed experimentation, the mechanisms of toxicity may become clearer so that nanomaterials can safely be used as therapeutics and as diagnostic tools [13].

While CdSe based QDs have been investigated widely, toxicity of cadmium ions in the core of QDs is a serious concern, which, combined with limitations associated with tissue penetration, low resolution in deep tumor tissues, biodistribution profiles, metabolism and excretion characteristics have remained major challenges in clinical imaging using QDs. Non-cadmium containing QDs with NIR fluorescence properties have been developed for *in vivo* applications. Manganese-doped silicon quantum dots have been developed to provide both luminescence and magnetic MRI properties for applications in bio-imaging. Development of sophisticated imaging technologies, enhancement of QD photostability, use of biocompatible chemistries, and reduction of QD toxicity can accelerate the use of these nanoparticles in tumor imaging. Manganese-doped silicon quantum dots have been developed to provide both luminescence and magnetic MRI properties for applications in bio-imaging. Development of sophisticated imaging technologies, enhancement of QD photostability, use of biocompatible chemistries, and reduction of QD toxicity can accelerate the use of these nanoparticles in tumor imaging [14].

Akerman et al. employed QD-peptide conjugates in order to target tumor vasculature or tumor lymphatic vessels in mice [15]. Histological sections of different organs showed that the tissuespecific peptide coating on (CdSe)ZnS QDs increased nanoparticle accumulation at vascular sites in the tumor xenograft following intravascular injection. Although the study did not describe QD imaging in a live mouse, it demonstrated the potential of using QDs for molecular level detection. QDs conjugated with poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAM) were injected intravenously via the tail vein in mice bearing JHU-31 prostate cancer tumors and tested for *in vivo* targeting. Three hours after nanoparticle injection, the mice were sacrificed; tissues were recovered and cryo-sectioned for imaging. It was found that the QD-PNIPAM was localized at the periphery of the tissue sections while unmodified QDs were not found in the cancer tissue. QDs conjugated with antibodies to the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) accumulated at the tumor xenograft in live nude mice following targeting of the prostate tumor cells. Tail vein injections showed that untargeted or passive targeting of QD probes demonstrated weak or no signals, while antibody-conjugated to QDs showed intense signals inside the tumor. QDs conjugated to EGFR and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) antibodies were demonstrated to accumulate in MIA PaCa-2 pancreatic and human breast cancer tumor tissues, respectively in mice. CdSe QDs conjugated with folate receptors were employed for targeting mouse lymphoma cells *in vivo*; folate-QD conjugates were specifically detected in cancer cells compared to normal cells [14].

References:

- [1] D.L. Klein, R. Roth, A.K.L. Lim, A.P. Alivisatos, P.L. Mc Euen, *Nature* 389 (1997) 699-701.
- [2] R.S. Kane, R.E. Cohen, R. Silbey, *Chem Mater* 8 (1996) 1919-1924.
- [3] X.H. Gao, Y.Y. Cui, R.M. Levenson, L.W.K. Chung, S.M. Nie, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 969–976.
- [4] M. Wang, N. Felorzabihi, G. Guerin, J.C. Haley, G.D. Scholes, M.A. Winnik, *Macromolecules* 40 (2007) 6377–6384.
- [5] L. Zhou, C. Gao, W.J. Xu, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 5655–5664.
- [6] W.B. Tan, Y. Zhang, *J. Biomed. Mater. Res.* 75A (2005) 56–62.
- [7] M. Howarth, W.H. Liu, S. Puthenveetil et al., *Nat. Methods* 5 (2008) 397–399.
- [8] B. Ballou, B.C. Lagerholm, L.A. Ernst, M.P. Bruchez, A.S. Waggoner, *Bioconjug. Chem* 15 (2004) 79–86.
- [9] R.S. Yang, L.W. Chang, J.P. Wu, M.H. Tsai, H.J. Wang, Y.C. Kuo, T.K. Yeh, C.S. Yang, P. Lin, *Environ. Health Perspect* 115 (2007) 1339–1343.
- [10] Robe A, Pic E, Lassalle H, Bezdetnaya L, Guillemin F, Marchal F. *BMC Cancer* 22 (2008) 111–1120.
- [11] R.A. Hardman, *Environ. Health Perspect* 114 (2006) 165–172.
- [12] H.C. Fischer, L. Liu, K.S. Pang, W.C.W. Chan, *Adv. Funct. Mater* 16 (2006) 1299–1305.
- [13] K.L. Aillona, Y. Xiea, N. El-Gendya, C.J. Berklanda, M.L. Forresta, *Adv Drug Deliv Rev.* 61 (2009) 457–466.
- [14] H.C. Huang, S. Barua, G. Sharma, S.K. Dey, K. Rege, *Journal of Controlled Release* 155 (2011) 344–357.
- [15] M.E. Akerman, W.C.W. Chan, P. Laakkonen, S.N. Bhatia, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 12617–1262.

Acknowledgements

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. Research was supported by the APVV-0125-11 project.

FUNCTIONALIZED IRON MAGNETIC NANOPARTICLES

I. Capek¹, P. Capek²

¹*Polymer Institute, Institute of Chemistry, Institute of Measurement Science, Slovak Academy of Sciences Bratislava; Faculty of Industrial Technologies, TnUni, Púchov; Slovakia*

²*Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovak Republic*

Magnetic particles (microspheres, nanospheres, and ferrofluids) are widely studied and applied in various fields of chemistry, biology and medicine such as magnetic targeting of drugs, genes, and radiopharmaceuticals, magnetic resonance imaging, diagnostics, immunoassays, RNA and DNA purification, gene cloning, and cell separation and purification. These magnetic nanoparticles generally exist in a hybrid configuration in which biological species, such as cells, nucleic acids, and proteins, are bound to the magnetic “core” through organic linkers, which are often organized as an organic “shell” around the core]. The core of magnetic nanoparticles (MNPs) is usually composed of Fe₃O₄, Co, FePt, or Fe₂O₃, and its primary modification with an organic shell can include the adsorption of an organic agent or the covalent attachment of a functionalized organic ligands [1].

Super paramagnetic iron-oxide nanoparticles (SPIONs) possess unique magnetic properties that make them attractive candidates as advanced biomedical materials. They can serve as contrast agents in MRI, as miniaturized heaters capable of killing malignant cells and as colloidal carriers for drug delivery targeted at cancer diagnosis and therapy. The superparamagnetic property of iron oxide particles originates from the large magnetic moment they acquire in the presence of an external magnetic field; removing the field eliminates the paramagnetism. The large magnetic moment results in higher signal change or contrast per unit of particles and thus small quantities of SPIO are needed for imaging thereby limiting cellular toxicity. In addition to possessing excellent magnetic properties, SPIONs are biocompatible and biodegradable and hence have found widespread use in biomedical applications. Upon degradation, the free iron ions released do not appreciably increase the body's native iron pool, get incorporated in hemoglobin in erythrocytes and are thus degraded along normal iron recycling pathways [2].

Various synthesis methods were developed and adjusted to meet the requirements for preparation of stable metal nanoparticles with different coatings, hydrodynamic sizes in the range 5 - 25 nm and controlled size and magnetization. The size of metal particles prepared by the microemulsion varies with the ratio $w = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{surfactant}]$. The volume of water is the main parameter controlling the droplet diameter and final particle size [3].

Water-soluble MNPs were prepared using a coprecipitation method using NaOH - FeCl₂ - FeCl₃. An oxidation precipitation method in a FeCl₂-NaNO₃-NaOH aqueous system appeared larger MNPs 24 - 400 nm. In the presence of various stabilizers we can prepared core-shell nanoparticles with different coatings, such as 2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA)-, phosphonoacetic acid (PA)-, dextran (Dx)-, aminodextran (ADx)-, carboxydextran (CDx) and citric acid (CA)-coated samples (Fig. 1). The colloidal stability and particle size is also function of costabilizers (or solvents, such as acetone, acetonitrile,..) which passivate the particle size.

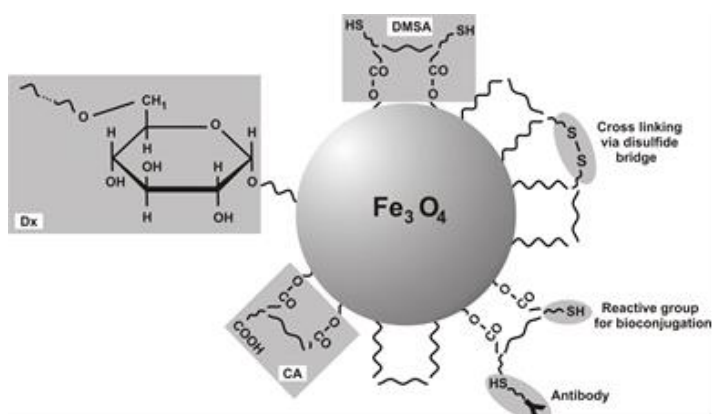


Figure 1. Schematic picture of 2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA), dextran (Dx) and citric acid (CA) - coated

The most common method of synthesis of SPIONs is by alkaline coprecipitation of $\text{Fe}(\text{OH})_2$ and $\text{Fe}(\text{OH})_3$ suspensions particles by precipitation in the presence of poly(vinyl alcohol) PVA at high pH. Particle size can vary between several nanometers and several hundred nanometers in diameter. A variety of methods have been employed to functionalize the SPIO particles with a coating of inert polymers including dextran, polysaccharides, and poly(ethylene glycol) (PEG) in order to increase their stability, circulation half-life and biocompatibility [4].

PEGylated phospholipids have been already successfully explored for imparting water solubility and in some cases functionality to hydrophobic particles in biological applications. Carboxy-terminated PEGylated phospholipids (HOOC-PEG-PL) was mixed with the as-prepared oil-soluble Fe_xO_y nanoparticles to yield micelle-coated nanoparticles. In a typical experiment, oleic acid coated iron nanoparticles of ~ 20 nm were dissolved in chloroform. HOOC-PEG-PL was added to the solution and completely solubilized by sonication followed by the removal of chloroform by evaporation. The residual solid was heated in an 80°C bath, and deionized water was added immediately. After of vigorous stirring, a uniform transparent brownish-black aqueous solution was formed. Ultracentrifugation was applied to remove unbound COOH-PEG-PL. The assembly process is driven by hydrophobic interactions between the lipids and the oleic acid tails on the nanoparticle surface. The surface of the micelle surrounding the nanoparticle is thus characterized by an anionic surface charge (from terminal -COOH groups) and hydrophilic properties (from the PEG chains), two important characteristics for encapsulation [5].

The layer-by-layer (LbL) approach was employed to prepare magnetic and fluorescent composite nanoparticles [6]. The LbL approach was based on the electrostatic attraction between the oppositely charged species deposited. The major advantage is that it permits the preparation of coated colloids of different shapes and sizes, with uniform layers of diverse composition as well as controllable thickness. The Fe_3O_4 nanoparticles were used as a magnetic source and template for the deposition of polyelectrolyte multilayers/PABA. 4-Aminobenzoic acid (PABA) has a strong fluorescence and double functional groups ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$), which can react with biological particles, such as nucleic acids, proteins, and so on [7]. And it also can increase the magnetic and fluorescent nanocomposite water-solubility to most biological application. Furthermore, the nanocomposites have excellent magnetic property and can be conveniently separated and collected under an external magnetic field. They could be utilized in the fields of biolabeling, bioseparation immunoassay, and various other diagnostic applications.

The $\text{Fe}_3\text{O}_4/(\text{NaOL}/\text{CTAB})_n/4\text{-Aminobenzoic acid (PABA)}$ nanocomposites were used to detect the protein via changes in the relative fluorescence intensity of the system. The diameter of the Fe_3O_4

nanoparticles and coated Fe₃O₄ (Fe₃O₄/(NaOL/CTAB)_n/PABA) nanocomposites are about 10 nm and 25 nm, respectively. The relative fluorescence intensity of the system was measured at $\lambda_{em} = 348$ nm ($\lambda_{ex} = 282$ nm). The fluorescence spectrum of pure (1.0×10^{-6} mol L⁻¹) PABA has a peak at 348 nm (pH 6.98, $\lambda_{ex} = 282$ nm) [7].

It was found that the fluorescence (FL) intensity depends on the pH values of the aqueous medium. The relative fluorescence intensity in the absence (I_0) and presence of γ -globulin (I) varied with pH as follows: (I_0/I)/pH:

(790/800)/5.5, (820/850)/6.0, (850/890)/6.5, (925/990)/7.0, (840/850)/7.5

Maximum and constant ΔI ($\Delta I = I - I_0$, I_0 , the intensity of fluorescence of nanocomposites; I, the intensity of nanocomposites- γ -globulin binding system) was obtained at pH ca. 7.0

FL intensity increased with the increase of the concentration of the nanocomposites solution and reached a maximum in the range (2.0×10^{-7} to 4.0×10^{-7} mol L⁻¹, 3.0×10^{-7} mol L⁻¹ was used). Intensities of fluorescence are stable when the NaCl concentration is 4×10^{-2} mol L⁻¹, and decrease when the NaCl concentration is higher than 4×10^{-2} mol L⁻¹. The phenomenon possibly indicates that there is small electrostatic force in the binding system. It might prove that the PABA was adsorbed around the Fe₃O₄ nanoparticles just by the electrostatic attraction at the beginning of the reaction and along with the reaction excessive surfactant might wrap it around the Fe₃O₄ nanoparticles, forming layers of PABA/NaOL or PABA/CTBA. At this time, the electrostatic attraction in the nanocomposites is not obvious. In the nanocomposites- γ -globulin binding system, when the content of NaCl increases, the effect of the electrostatic shielding of charges will reduce the binding of dye to protein and result in a decreased signal. The low effect of NaCl content on the fluorescence intensity indicated that the interaction of proteins and nanocomposites was mainly a result of covalent binding. So, low ionic strength has no effect on the assay.

The Fe₃O₄ nanoparticles were used as a template for controlled adsorption of PABA/polyelectrolyte multilayers. The nanocomposites simultaneously exhibited excellent magnetic properties and could be easily separated from solution using a permanent magnet. The authors used them to detect γ -globulin, HSA, BSA and the results of determination for human body fluid samples were in well agreement with clinical data. This method is sensitivity, simplicity, selectivity and stability. So, it is suggested this method might not only be a valuable tool for the study on the properties of proteins both in chemistry and biochemistry, but also might open a way for us to work on the promising properties of the magnetic and fluorescent nanocomposites. In a few words, the fluorescent, magnetic and water-soluble properties of the nanocomposites would allow them to find a large range of applications for biolabeling, bioseparation, immunoassay, and diagnostics [7].

Ferritin template can be used to generate precisely sized and shaped magnetic particles in the protein cavity. For this purpose, the nonmagnetic natural core that was composed of 5Fe₂O₃·9H₂O was chemically removed from the protein cavity, and an artificial magnetic core that was composed of magnetite (Fe₃O₄) or magnetite/maghemite (Fe₃O₄/□-Fe₂O₃) was generated inside apo-ferritin. It was shown that the iron-oxide core of ferritin is electrically contacted with the electrode and its reductive dissolution yielded the apo-ferritin. Genetic engineering was employed to tune the size of the cavity to provide monodisperse ferric oxide magnetic NPs of variable size [8].

The efficiency of the binding of a biomaterial to the primary organic shell that surrounds the magnetic core was analyzed by various techniques including capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [9]. Most of the applications of biomaterial-magnetic-particle hybrid conjugates involve the concentration, separation, regeneration, mechanical translocation, and targeting of

biomaterials. Phospholipid-coated magnetic NPs with a mean magnetite core size of 8 nm were used for the recovery and separation of proteins from protein mixtures [10]. Antibodies were adsorbed on synthetic Fe₃O₄ magnetic particles, and these particles were then used for specific binding to cells and the separation of the cells by an external magnetic field [11].

While methods for the synthesis of magnetic particles with control over size and shape exist, their surface functionalization with biomolecules often requires elaborate synthetic schemes. A major advance would be to develop a synthetic method that leads to composite materials that have both the stability, surface chemistry, and optical properties of gold and the magnetic properties of superparamagnetic particles. Direct coating of magnetic particles with noble metal is a difficult task due to the dissimilar nature of the two surfaces. Methods that are based on the synthesis of one of the components in the presence of the other have led to structures with minimal interface contact between gold, silver,.. and the magnetic particle [12]. The size-controlled synthesis of magnetite (Fe₃O₄) NPs was reported in organic solvents [15]. The monodisperse oil-soluble nanoparticles are in the next step transformed into the water-soluble which is time-consuming and expensive. The surface modification of iron nanoparticles is not easy and therefore gold nanoparticles are coated with the gold film and then modified with different groups. Gold-coated iron NPs are prepared and then coated with a specific magnetic moment of 145 emu⁻¹ and a coercivity of 1664 Oe were prepared and tested for biomedical applications [14]. The gold shell allows the further modification of the magnetic NPs with biomolecules by using the self-assembly method.

These magnetic beads can be used as reporters (tags) in association with stripping voltammetry measurements of the iron content for the detection of DNA hybridization. A related protocol involved probes that were labeled with gold-coated iron core/shell NPs. The application of functionalized magnetic particles as carriers for DNA samples provided convenient analytical schemes for complicated purposes. Single nucleotide polymorphism genotyping of the aldehyde dehydrogenase 2 gene was studied by using a single bacterial magnetic particle [15].

One of the most important applications of MNPs (SPIOs) is as contrast agents in magnetic resonance (MR) imaging of tumors. SPIOs, due to their large magnetic moment, have the capability to distort the local magnetic characteristics of the tissue in order to yield an enhancement in image contrast. For liver tumors and metastases, the RES (reticuloendothelial system) macrophage-mediated uptake of SPIOs has been successful in detecting tumors as small as 2–3 mm. Similarly, the clearance of SPIOs by macrophages of the lymphatic system and their subsequent accumulation in the lymph nodes have been used to diagnose lymph node metastases. Ultra Small SPIO (USPIO) with diameters less than 40 nm have also been clinically investigated as contrast agents that can accumulate at the margins of human brain tumors, thereby improving their delineation on magnetic resonance images [16].

When subjected to an alternating magnetic field, SPIOs convert electromagnetic energy into heat, which can later be dissipated to the surrounding medium. It has been shown that successful tumor ablation can be achieved by using only 5–10 mg of SPIO/cm³ of tissue. A major requirement for SPIO-mediated tumor ablation is to use targeted nanoparticles to ensure selective uptake by tumor cells. It is also important to monitor both the tissue distribution of SPIOs prior to heating treatment as well as the temperature evolution during hyperthermia in order to prevent local heating and damage of normal tissues. SPIOs, therefore, are particularly suitable for hyperthermal therapy since MRI can be used to monitor both the tissue distribution as well as local temperature change owing to the temperature dependence of proton relaxation times.

These nanoparticles were efficient in delivering sufficient amount of the drug to tumor tissues with lower toxicity in non-target organs in vivo. The drug released faster under the mildly acidic conditions in the tumor microenvironment than at neutral pH of the vasculature. Such nanoparticles have a layer of PEG on their surface as well as the anti-cancer drug, doxorubicin, incorporated in the polymeric shell of SPIOs [17].

Literature.

- [1] S. Bucak, D. A. Jones, P. E. Laibinis, T. A. Hatton, *Biotechnol. Prog.* 2003, 19, 477–484.
- [2] Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003) R167–R181.
- [4] C. Berry, A.S.G. Curtis, *J. Phys. D Appl. Phys.* 36 (2003) R198–R206.
- [5] Chen, C.; Daniel, M.-C.; Quinkert, Z. T.; De, M.; Stein, B.; Bowman, V. D.; Chipman, P. R.; Rotello, V. M.; Kao, C. C.; Dragnea, B. *Nano Lett.* 2006, 6 (4), 611-615.
- [6] X. Hong, J. Li, M.J. Wang, J.J. Xu, W. Guo, J.H. Li, Y.B. Bai, T.J. Li, *Chem. Mater.* 16 (2004) 4022-4027.
- [7] L. Wang, S. Hong, L. Wang, L. Dong, G. Bian, T. Xia, H. Chen, *Spectrochimica Acta Part A* 65 (2006) 439–444.
- [8] M. Allen, D. Willits, J. Mosolf, M. Young, T. Douglas, *Adv. Mater.* 2002, 14, 1562–1565 [9] F.-H. Wang, T. Yoshitake, D.-K. Kim, M. Muhammed, B. Bjelke, Jan Kehr, *J. Nanopart. Res.* 2003, 5, 137–146.
- [10] S. Bucak, D. A. Jones, P. E. Laibinis, T. A. Hatton, *Biotechnol. Prog.* 2003, 19, 477–484.
- [11] J. Roger, J. N. Pons, R. Massart, A. Halbreich, J. C. Bacri, *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* 1999, 5, 321–325.
- [12] Wang, L.; Luo, J.; Maye, M. M.; Fan, Q.; Rendeng, Q.; Engelhard, M. H.; Wang, C.; Lin, Y.; Zhong, C.-J. *J. Mater. Chem.* 2005, 15, 1821-1832.
- [13] S. Sun, H. Zeng, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 8204–8205.
- [14] M. Chen, S. Yamamuro, D. Farrell, S. A. Majetich, *J. Appl. Phys.* 2003, 93, 7551–7553
- [15] T. Yoshino, T. Tanaka, H. Takeyama, T. Matsunaga, *Biosens. Bioelectron.* 2003, 18, 661–666
- [16] M.F. Bellin, L. Lebleu, J.B. Meric, *Abdom. Imaging* 28 (2) (2003) 155–163.
- [17] H.C. Huang, S. Barua, G. Sharma, S.K. Dey, K. Rege, *Journal of Controlled Release* 155 (2011) 344–357

Acknowledgements

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. Research was supported by the APVV-0125-11 project.

I. Capek¹, P. Capek²

¹*Polymer Institute, Institute of Chemistry, Institute of Measurement Science, Slovak Academy of Sciences Bratislava; Faculty of Industrial Technologies, TnUni, Púchov; Slovakia*

²*Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovak Republic*

Gold nanoparticles (AuNPs) have a long history of use. The Chinese have used red colloidal Au as a “drug of longevity” since 2500 B.C. In India, colloidal Au was used in Ayurvedic medicine for rejuvenation under the name of “Swarna Bhasma” (gold ash) during the Vedic age. Au compounds were adopted as a drug for vigor of youth and in the treatment of rheumatoid arthritis (e.g., Aurofin). Currently, AuNPs are employed in a wide range of products including cosmetics, hair tonics, conductive ink, and lubricant oil. AuNPs are also being developed for use as drug carriers. Other than industrial and biomedical applications, AuNPs have several advantages as a model NP for studying the biodistribution and health effects of engineered NPs. Au in bulk form is chemically inert compared to other metallic materials, hence, biologic effects of AuNPs is unlikely due to intrinsic toxicity of the metal. In addition, Au is generally insoluble and rarely present in biological tissues. Its detection therefore likely reflects actual presence of the metal in NP form, in that tissue.

Plasmonic gold nanoparticles demonstrate unique size-dependent optical and photothermal properties due to the collective oscillation of free electrons in their conduction bands. The intensity of absorption and scattering of gold nanoparticles is significantly higher than most absorbing and scattering organic molecular dyes, which makes them excellent candidates as contrast agents in imaging. Electron-phonon and phonon-phonon interactions in gold nanoparticles result in the generation of heat following exposure to near infrared (NIR) light (650–900 nm). NIR light penetrates human tissue from half a millimeter up to a few centimeters, due to minimal absorption by water and blood in this region of the wavelength spectrum. Gold nanoshells, nanocages and nanorods, synthesized using a variety of chemical, [and electrochemical syntheses methods, absorb light in the NIR region resulting in dissipation of heat to the surrounding tissue, and have been widely explored for tumor imaging and ablation [1].

Generally, gold nanoparticles are synthesized by the reduction of an aurate salt with reducing agents, such as sodium borohydride (NaBH₄), thiocyanate, phosphorus, citrate and ascorbate in solutions with and without micelles. The synthesized nanoparticles are of nanometer size, with colors varying from yellow-orange to red-purple to blue-green. Nanoparticles have to be surface modified to make them stable and compatible for preparation of bioconjugate and some functional groups, such as cyano (-CN), thiol (-SH) and amino (-NH₂) groups, are known to have high affinity for gold and the molecules having such functional groups can be used as capping agents for gold nanoparticles [1,2].

The gold nanoparticles synthesized by borohydride reduction of aurate salt are relatively monodisperse in colloidal solution, which is confirmed by a single peak in the absorbance spectra (Figure 1). The λ_{max} was observed at around 530 nm. The mean hydrodynamic size of the AuNP is in the range of 20-30 nm and after coupling to glutathione the approximate size was ca. 50 nm. As shown in Figure 1, the peak is shifted towards the higher wavelength after capping with glutathione and lipoic acid and the λ_{max} was observed around 540-580 nm for glutathione (GSH) capped and 560-620 nm for lipoic acid (LA) capped gold nanoparticles. The change in the color of the colloid was also seen before and after capping. The color of the gold colloid changed from wine red to blue for glutathione and dark blue for lipoic acid capped nanoparticles [3] G.K. Ahirwal, C.K. Mitra, *Sensors* 2009, 9, 881-894].

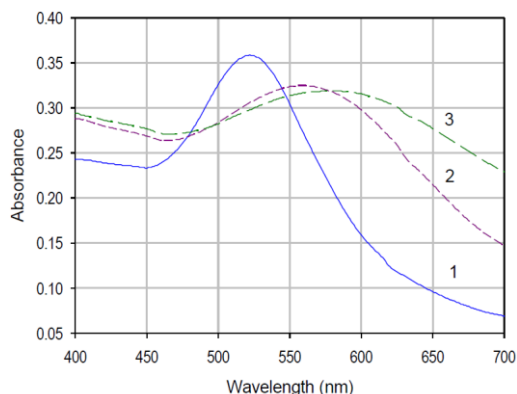


Figure 1. UV-Visible spectrum of (1) gold nanoparticles (AuNP), (2) glutathione capped AuNP and (3) lipoic acid capped AuNP [3]

The λ_{max} shift in the absorbance spectra was mainly due to the surface modification of the gold nanoparticles. The surface plasmon resonance, the major cause for the absorption, is affected by surface modification with covalent coupling. It may also be due to the increase in their size, which is due to the protective coating of the organic molecule. This precipitation of nanoparticles was seen in both the cases of GSH and LPA capped Au-NP. The precipitation is pH dependent. After borohydride reduction of aurate salt the pH of the solution increased (towards the alkaline side) and due to the negatively charged surface of the nanoparticles (because of the Cl^- ions adsorbed on the surface), the precipitation of the colloid was prevented after capping. The colloid behaved more likely as a hydrophilic macromolecule (like a protein). But as glutathione or lipoic acid is added to the colloidal solution there is a decrease in the pH (towards the acidic side). In the case of glutathione capped gold nanoparticles at pH 5.0 the spectra has shifted towards the higher wavelength and as the pH is increased the shift was seen towards the lower wavelength of the spectra. Glutathione is a tripeptide (glutamic acid, cysteine and glycine) and has many binding points for the gold nanoparticles. There are two carboxylic groups, one thiol group and three amino groups in glutathione. The thiol group is involved in the attachment with the AuNP. The covalent coupling can be extended either via the carboxylic or the amino groups (of glutathione/lipoic acid) [3].

In the case of lipoic acid capped nanoparticles, the disulfides are reduced by borohydride to two thiol groups ($-\text{S}-\text{S}- \rightarrow -\text{SH} + -\text{SH}$), which are involved in the binding of lipoic acid to gold nanoparticles. In this type of capping, pH dependent precipitation of nanoparticles was also observed. At pH 7.0 the NPs are well dispersed and with the increase in the acidity of the solution, the broadening of peak was seen, which indicates the precipitation of NP in the solution. This property of capped NP precipitation was utilized for the separation of NP from the unreacted organic molecule.

The polymers used to decorate AuNPs included the anionic poly(acrylic acid) (PAA), neutral poly(2,3-hydroxy-propylacrylamide) (PDHA), and cationic poly(2-aminoethylacrylamide) (PAEA). In addition, a thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) polymer (hydrophobic above and hydrophilic below its lower critical solution temperature of $\sim 32^\circ\text{C}$) and poly(ethylene glycol) (PEG) were also coated onto the 5-nm Au NPs. Following the coating process, these polymers formed a densely packed shell ($0.75\text{--}1.4$ chains/ nm^2) on the Au NP surface, excluding the gold core from undesirable cellular interaction.

From the cellular transport assays, approximately 11% of the neutral PEG- and PDHA-AuNPs transported across to the basolateral chamber at 37°C under physiological conditions. These results suggested high permeability rates of neutral nanoparticles in humans when compared to the non permeable control mannitol. The anionic PAA-Au NPs were slightly less permeable, whereas the hydrophobic PNIPAM- and cationic PAEA-Au NPs displayed little ability to transport through the cell monolayer, with high percentage binding to the cells. We next performed the Caco-2 cell assays at 4°C to block endocytic transcellular pathways. A significant decrease in the transport of neutral PDHA-, cationic PAEA-, and PEG-Au NPs to the basolateral chamber of the cell monolayer was observed, indicating a strong dependence on the endocytosis pathway. Blocking endocytic uptake will therefore lead to an increased level of nanoparticles in the top apical layer. Indeed, the amount of PAEAu NPs that remained in the top apical chamber increased from ~10% to ~30%, further supporting the strong contribution of endocytosis pathway. Interestingly, we observed only a minor reduction in the transport of the anionic PAA-Au NPs through cell monolayer at 4°C. This implied that the PAA-Au NPs mainly utilized the paracellular pathway. However, the permeability of the PNIPAM-Au NPs through the cell monolayer increased substantially at 4°C. These PNIPAM-Au NPs were neutral and hydrophilic at temperatures below their lower critical solution temperature. One would expect the neutral PNIPAM-Au NPs to have the same transport behavior as the neutral PEG- and PDHAu NPs at low temperatures because of their similar size and surface properties. However, unlike the PEG- and PDHA-Au NPs, which displayed no cellular transport at 4°C, PNIPAM-Au NPs transportation seems to be preferentially via the paracellular pathway. These results now strongly support that the surface chemistry plays a more significant role than originally thought in trafficking neutral nanoparticles [4].

There was negligible transport for neutral PEG-Au NPs and reduced cellular uptake of the hydrophobic PNIPAM-Au NPs into the cells. The reduced uptake of PNIPAM-Au NPs resulted in a 25–30% increased accumulation of these nanoparticles in the apical layer when compared to the standard 37°C cell assay, indicating strong contribution of microtubules for the endocytic uptake and transport of PNIPAM and PEG-Au NPs under physiological conditions. An interesting finding from the present study was that we observed both a microtubule-dependent (PEG-Au NPs) and nonmicrotubule-dependent (PDHA-Au NPs) endocytic mechanism for the transport of neutral nanoparticles across Caco-2 cells. This observation further supports that the surface chemistry on the nanoparticles plays a dominant role in the cellular trafficking of functional nanoparticles [4].

Photothermal activation of gold nanospheres using visible light (~520 nm) may be limited to superficial malignancies, due to restricted tissue penetration depth of visible light. However, radio frequency (RF) radiation, which has deeper penetration *in vivo*, has been used as an alternative source to excite gold nanospheres in order to induce thermal ablation of tumors. Gold nanoshells consist an ultrathin gold shell surrounding a dielectric core (e.g. silica) and demonstrate a tunable photothermal response to near infrared (NIR) light. Hirsch et al. [5] demonstrated successful irreversible thermal destruction of xenograft canine transmissible venereal tumor in female non-obese diabetic mice due to significant temperature increase upon exposure of interstitially injected PEGylated gold nanoshells to NIR laser (820 nm, 4 W/cm²). O'Neal et al. [6] demonstrated that female albino mice bearing murine colon carcinoma tumors were tumor-free for at least a month following laser irradiation (808 nm, 4W/cm²) of intravenously injected PEGylated gold nanoshells (20 µl/g). In a related study, PEGylated gold nanoshells (8.5 µl/g) were intravenously injected into PC3 tumor bearing athymic (nu/nu) mice and subjected to 3 min laser irradiation at 4 W/cm². This resulted in temperature elevation up to 65.4 °C and a 93% tumor regression after 3 weeks. Laser irradiation following passive delivery of PEGylated gold nanoshells to brain tumors resulted in selective elevation of tumor tissue temperature above 65 °C in an orthotopic canine model. In all these cases, gold nanoshell surfaces, coated with PEG, preferentially

accumulated at the tumor site due to the highly permeable and poorly organized vascular network in tumors (enhanced permeability and retention or EPR effect). Tumor targeting strategies (e.g. conjugation with antibodies against the epidermal growth factor receptor (EGFR) and bombesin (BBN) peptides) have been investigated in order to further increase the delivery to tumor sites, resulting in increased efficiencies of in vivo thermal ablation using gold nanoshells and nanospheres. A human clinical trial on gold nanoshells for photothermal ablation of recurrent (or refractory) head and neck cancer is currently in progress [7].

Cylindrical gold nanorods also demonstrate a tunable photothermal response to NIR light as a function of nanoparticle aspect ratio (length/diameter). The transverse absorption of gold nanorods is approximately at 520 nm wavelength, and the longitudinal peak can be tuned as a function of the nanorod length in the NIR region. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)-templated growth method is a popular approach for the synthesis of gold nanorods (AuNRs) in aqueous media. Several surface modification strategies have been employed in order to overcome the toxicity of CTAB coating leading to improved stability targeting and/or biocompatibility of AuNRs. Niidome et al. [8] modified gold nanorods with PEG, which led to reduced AuNR cytotoxicity while maintaining the stability of gold nanorods; approximately 54% of injected PEGylated gold nanorods remained in blood 30 min after intravenous injection in mice, while unmodified CTAB-GNRs accumulated in the liver. Photothermal therapy using laser irradiation of intratumorally injected PEGylated GNRs resulted in >96% decrease in average tumor growth of subcutaneous squamous cell carcinoma xenografts grown in nude (nu/nu) mice; intravenous injection and laser irradiation resulted in >74% decrease in average tumor growth. Importantly, heating efficiencies in the case of direct injection were similar to that observed with gold nanoshells. Human xenograft tumors in mice were successfully inhibited for at least 50 days by using computationally designed irradiation regimen (2 W/cm², 5 min) of intravenously injected PEGylated AuNRs. Studies on biodistribution of GNRs indicated that a PEG:gold molar ratio of 1.5 was optimum for both, increased persistence in circulation and for the enhanced permeability and retention (EPR) effect. The uptake in the liver was saturated at 19.5 μg of nanorod injection dose, in addition to distribution in the spleen and tumor [9]. Subsequent studies demonstrated that GNRs grafted with 5 kDa and 10 kDa PEG showed higher circulation stability in mice than those with 2 kDa or 20 kDa PEG. Suppression of tumor growth following NIR pulsed laser irradiation was more effective in the case of direct intratumoral injection of nanorods compared intravenous administration. This correlates well with the biodistribution study of PEGylated nanospheres in tumor bearing mice [10], in which 20 nm gold nanospheres coated with PEG (molecular weight 5 kDa) exhibited the lowest uptake by reticuloendothelial cells and the slowest clearance from the body. Photothermal therapy using PEGylated GNRs following intravenous injection in a murine colon cancer model resulted in the survival of approximately 44% of the mice 60 days after treatment. The mean survival time for the ‘GNR alone (no NIR irradiation)’ and ‘laser irradiation alone (no GNRs)’ groups were 9.5 and 9.7 days, respectively. Substantial accumulation of gold nanorods at liver, spleen and lymph nodes was observed 30 days post injection [7].

References:

- [1] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, *Adv. Mater.* 13 (18) (2001) 1389–1393.
- [3] G.K. Ahirwal, C.K. Mitra, *Sensors* 9 (2009) 881-894.
- [4] I.C. Lin, M. Liang, T.Y. Liu, M.J. Monteiro, I. Toth, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8 (2012) 8–11.

- [5] L.R. Hirsch, R.J. Stafford, J.A. Bankson, S.R. Sershen, B. Rivera, R.E. Price, J.D. Hazle, N.J. Halas, J.L. West, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (23) (2003) 13549–13554.
- [6] D.P. O'Neal, L.R. Hirsch, N.J. Halas, J.D. Payne, J.L. West, Cancer Lett. 209 (2004) 171–176.
- [7] H.C. Huang, S. Barua, G. Sharma, S.K. Dey, K. Rege, Journal of Controlled Release 155 (2011) 344–357.
- [8] T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, Y. Niidome, , J. Control. Release 114 (3) (2006) 343–347.
- [9] Y. Akiyama, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, , J. Control. Release 139 (1) (2009) 81–84. [10] G.D. Zhang, Z. Yang, W. Lu, R. Zhang, Q. Huang, M. Tian, L. Li, D. Liang, C. Li, Biomaterials 30 (10) (2009) 1928–1936.

Acknowledgements

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. Research was supported by the APVV-0125-11 project.

NANOTECHNOLOGY IN CANCER DIAGNOSIS AND TREATMENT

I. Capek¹, P. Capek²

¹*Polymer Institute, Institute of Chemistry, Institute of Measurement Science, Slovak Academy of Sciences Bratislava; Faculty of Industrial Technologies, TnUni, Púchov; Slovakia*

²*Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovak Republic*

Cancer is observed as the most dangerous class of disease categorized by uncontrolled cell growth. There is a marginal increase in cancer cases in the last few years, and most of the time, it ends up with taking life. In many types of cancer, we are yet to find a satisfactory medicine or carrier of medicine as in case of drug delivery to be used as a satisfactory chemotherapeutic agent. Nanotechnology, an interdisciplinary research field comprising chemistry, engineering, biology, and medicine, has great potential for early detection, accurate diagnosis, and tailored treatment of cancer. Nanoparticles are usually smaller than several hundred nanometers in size, comparable to large biological molecules such as enzymes, receptors, of a size about 100 to 10,000 times smaller than human cells. These nanoparticles can offer unprecedented interactions with biomolecules both on the surface and inside the body cells, which may bring revolution in cancer diagnosis and treatment. At nanometric scale, the physico-chemical and biological properties of materials differ fundamentally from their corresponding bulk counterpart because of the sizedependent quantum effect. The noble metal nanoparticles like gold nanoparticles (AuNP), especially surface functionalized represent smart and promising candidates in the drug delivery applications due to their unique dimensions, tunable functionalities on the surface, and controlled drug release [1]. Another essential aspect while working with AuNP in bio-applications is safety and biocompatibility. Biologically synthesized and functionalized, AuNPs provide many desirable attributes for use as carriers in drug delivery systems as the functionalized AuNP core is essentially inert and nontoxic. Monodispersed nanoparticles can be formed with a core size from <30 nm and also with metal–core–organic–shell morphology; the mono-metal layer can be tailored with a range of biological ligands, help in effective cellular uptake, controlled drug release, and targeted drug delivery [2]. These functionalized nanodelivery systems can be used directly as promising lead molecules in the detection of cancer cells. In this approach, we have deduced and detailed the use of synthesized bio-functional noble metal nanoparticles application as an anti-cancer drug and demonstrate the anti-cancer effect of these functionalized AuNPs. It gives a strong speculation, for the influence of free electrons generated by the surface of the functionalized AuNP has a lethal effect on the electronegative surface membrane of the cancer cells. These results confirm that functionalizing AuNP with the water-soluble organic moieties can show the synergic antiproliferative effect in various cancer cell lines, and thus prove to be useful in various types of anti-cancer control system. It is currently thought that the diameter of nanoparticle therapeutics for cancer should be in the range of 10–100 nm. The lower bound is based on the measurement of sieving coefficients for the glomerular capillary wall, as it is estimated that the threshold for first-pass elimination by the kidneys is 10 nm (diameter). The upper bound on size is not as well defined at this time. The vasculature in tumours is known to be leaky to macromolecules. The lymph system of tumours in mouse models is poorly operational and macromolecules leaking from the blood vessels accumulate - a phenomenon known as “enhanced permeability and retention (EPR) effect”. Numerous lines of evidence suggest that this phenomenon is also operational in humans. It has been shown that entities in the order of hundreds of nanometre in size can leak out of the blood vessels and accumulate within tumours. However, large macromolecules or nanoparticles could have limited diffusion in the extracellular space. Experiments from animal models suggest that sub-150 nm, neutral or slightly negatively charged entities can move through tumour tissue. Additionally, some data show that nanoparticles in the 50–100 nm size range that carry a very slight positive charge can penetrate throughout large tumours following systemic administration. Thus, well-designed nanoparticles in the 10–100 nm size range and with a surface charge

either slightly positive or slightly negative should have accessibility to and within disseminated tumours when dosed into the circulatory system. If this size range is correct, then these nanoparticles will be restricted from exiting normal vasculature (that requires sizes less than 1–2 nm); however they will still be able to access the liver, as entities up to 100–150 nm in diameter are able to do so [3].

Nanoparticles have high surface-to-volume ratios when compared with larger particles, and so control of their surface proper ties is crucial to their behaviour in humans. The ultimate fate of nanoparticles within the body can be determined by the interactions of nanoparticles with their local environment, which depends on a combination of size and surface properties. Nanoparticles that are sterically stabilized (for example by polyethylene glycol (PEG) polymers on their surface) and have surface charges that are either slightly negative or slightly positive tend to have minimal self–self and self–non-self interactions. Also, the inside surface of blood vessels and the surface of cells contain many negatively charged components, which would repel negatively charged nanoparticles. As the surface charge becomes larger (either positive or negative), macrophage scavenging is increased and can lead to greater clearance by the reticulo endothelial system. Thus, minimizing nonspecific interactions via steric stabilization and control of surface charge helps to prevent nanoparticle loss to undesired locations. However, the complete removal of nonspecific interactions is not currently possible, and so there is always some particle loss; the key is to minimize these interactions as much as possible [3].

The addition of targeting ligands that provide specific nanoparticle–cell surface interactions can play a vital role in the ultimate location of the nanoparticle. For example, nanoparticles can be targeted to cancer cells if their surfaces contain moieties such as small molecules, aptamers, peptides, proteins or antibodies. These moieties can bind with cancer cellsurface receptor proteins, such as transferrin receptors, that are known to be increased in number on a wide range of cancer cells [4]. These targeting ligands enable nanoparticles to bind to cell-surface receptors and enter cells by receptor-mediated endocytosis. Recent work comparing non-targeted and targeted nanoparticles or polymer-based has shown that the primary role of the targeting ligands is to enhance cellular uptake into cancer cells rather than increasing the accumulation in the tumour.

Nanoparticles can be tuned to provide long or short circulation times by careful control of size and surface properties. Targeted nanoparticles have at least five features that distinguish them from other therapeutic modalities for cancer. First, nanoparticles can carry a large payload of drug entity and protect it from degradation. Second, the nanoparticles are sufficiently large to contain multiple targeting ligands that can allow multivalent binding to cell-surface receptors. Third, nanoparticles are sufficiently large to accommodate multiple types of drug molecules. Fourth, the release kinetics of drug molecules from nanoparticles can be tuned to match the mechanism of action. Fifth, nanoparticles could have the potential to bypass multidrug resistance mechanisms that involve cell-surface protein pumps (for example, glycoprotein P), as they enter cells via endocytosis.

Nanoparticles (NPs) have been of significant interest over the last decade as they offer great benefits for drug delivery to overcome limitations in conventional chemotherapy [5]. They can not only be formed in a range of sizes (1-1000 nm) but also be made using a variety of materials including polymers (e.g. biodegradable polymeric nanoparticles, dendrimers), lipids (e.g. solid-lipid nanoparticles, liposomes), inorganic materials (e.g. metal nanoparticles, quantum dots), and biological materials (e.g. viral nanoparticles, albumin nanoparticles). In addition, they can be tailored to simultaneously carry both drugs and imaging probes and designed to specifically target molecules of diseased tissues. Nanoparticles for anti-cancer drug delivery had reached the first clinical trial in the mid-1980s, and the first nanoparticles (e.g. liposomal with encapsulated doxorubicin) had entered the pharmaceutical market in 1995. Since then, numerous new nanoparticles for cancer drug delivery have

been approved and/or are currently under development due to their many advantages. Their advantages include enhancing solubility of hydrophobic drugs, prolonging circulation time, minimizing non-specific uptake, preventing undesirable off-target and side effects, improving intracellular penetration, and allowing for specific cancer-targeting.

Using targeted nanoparticles to deliver chemotherapeutic agents in cancer therapy offers many advantages to improve drug/gene delivery and to overcome many problems associated with conventional chemotherapy [6]. For example, nanoparticles via either passive targeting or active targeting have been shown to enhance the intracellular concentration of drugs/genes in cancer cells while avoiding toxicity in normal cells. In addition, the targeted nanoparticles can also be designed as either pH-sensitive or temperature-sensitive carriers. The pH-sensitive drug delivery system can deliver and release drugs within the more acidic microenvironment of the cancer cells and/or components within cancer cells. The temperature-sensitive system can carry and release drugs with changes in temperature locally in the tumor region provided by sources such as magnetic fields, ultrasound waves, and so on so that combined therapy such as chemotherapy and hyperthermia can be applied. The targeting of nanoparticles to tumors via cancer-specific features/moieties has also been shown to minimize the effects of composition, size, and molecular mass of nanoparticles on their efficacy [7]. Targeted nanoparticles can be further modified or functionalized to reduce toxicity. For example, modifying nanoparticles surface chemistry could reduce their toxicity and immunotoxicity [8].

Targeted NPs for cancer therapy also face many challenges. One challenge of targeted NPs is that NPs might change the stability, solubility, and pharmacokinetic properties of the carried drugs. The shelf life, aggregation, leakage, and toxicity of materials used to make nanoparticles are other limitations for their use. Some materials used to make NPs such as poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) have low toxicity, but degrade quickly and do not circulate in tissues long enough for sustained drug/gene delivery. On the other hand, other materials such as carbon nanotubes and quantum dots are durable and can persist in the body for weeks, months, or even years, making them potentially toxic and limiting their use for repeated treatments [9]. New materials to make targeted nanoparticles such as silicon/silica (solid, porous, and hollow silicon nanoparticles) have been developed; however, their use for drug delivery to cancer patients has taken off slowly due to the potential health risks associated with introducing new materials in the human body.

Besides developing new materials and selecting appropriate materials for each specific treatment, other factors need to be optimally selected in order to design better targeted nanoparticles. These factors include the particles size, shape, sedimentation, drug encapsulation efficacy, desired drug release profiles, distribution in the body, circulation, and cost. For instance, in the case of particle size, it has been well-known that the clearance rate of very small nanoparticles might be high, and most of these nanoparticles might end up in the liver and spleen, thus making the use of targeted nanoparticles impractical and ineffective. On the other hand, larger nanoparticles might be too big to go through small capillaries for drug delivery. Thus selecting the right materials and particle size is another important aspect in targeted NPs for cancer therapy.

More specific drug targeting can be achieved by binding various ligands to the surface of nanoparticles, such as peptides, growth factors, transferrin, antibodies or antibody fragments such as a single-chain variable fragment (scFv), and small compounds such as folate that can recognize cancer cells. Among these biological signals, antibodies are most promising for their bifunctional properties: both the active targeting potential and anticancer effect by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The co-delivery of chemotherapeutic drugs and antibody may also sensitize aggressive tumor cells to chemotherapeutic drugs and achieve a synergistic anti-tumor effect [10].

Nanoparticles have two important advantages in controlled drug release. One is sustained drug release, which mainly results from the dissolution kinetics of nanoparticle core/shell structures and gradual diffusion of the drug localized in the core. Another advantage of nanoparticles is the on-site release, achieved by passive or active targeting strategies. Controlled release of loaded drugs from nanoparticles can maintain the therapeutic dose for an extended period of time and avoid the adverse effects induced by high drug concentration in systemic circulation that are frequent for conventional formulations.

For instance, Danhier et al. developed a PEGylated PLGA-based nanoparticle loaded with Cremophor® EL-free paclitaxel. The release behavior of paclitaxel exhibited a biphasic pattern characterized by an initial burst release followed by a slower and continuous release. Paclitaxel released in the first 4 h was equivalent to ca. 46.9% of the initial drug load of nanoparticles. After 11 days, the amount of accumulated paclitaxel release was ca. 75.3%. The burst release in the first 4 h may be due to the dissolution and diffusion of the drug that was poorly entrapped in the polymer matrix [11].

AuNPs of three sizes (4, 12 and 18 nm) were reported to pose no inherent toxicity to human K562 leukemia cells. In contrast, AuNPs of 1–2 nm were found to be highly toxic in 13 different healthy or cancer cell lines. Another study reported that 20-nm AuNPs induced oxidative damage in human embryonic lung fibroblasts and inhibited cell proliferation along with downregulation of cell cycle and DNA repair genes. It is important to distinguish between the effects of AuNPs, and that of contaminants during the manufacturing process, since some of the ‘toxic’ effects of AuNPs have been shown to be caused by contaminants [12].

Delivery of methotrexate (MTX), a dihydrofolate reductase inhibitor, by gold nanospheres suppressed Lewis lung carcinoma tumor growth in mice, while direct delivery of MTX at the same drug dose showed reduced effect [13]. AuNR-mediated hyperthermia facilitated the accumulation of doxorubicin (DOX)-loaded thermally sensitive micelles/liposome at xenografted MDA-MB-435 human tumor in mice and triggered the release of DOX molecules [14]. The combination of hyperthermia and DOX-loaded micelles/liposome resulted in higher tumor growth suppression comparing to “hyperthermia alone” and “hyperthermia+free DOX molecules” controls.

The rapid development of nanotechnology worldwide is accompanied by massive generation and usage of engineered nanomaterials (or nanoparticles, NPs) even though the potential health impacts of these materials are largely unknown. The increased industrial use of NPs can result in frequent exposure through inhalation, ingestion or dermal contact during manufacture, use and disposal; hence, studies are needed to understand the potential biological effects of exposure to NPs. Compared to fine particles, engineered NPs possess greater surface-to-volume ratio and functionalities on their surfaces which could result in greater biological activity if these are taken into the body, making them a potential health concern.

Nanoparticles provide opportunities for designing and tuning properties that are not possible with other types of therapeutics. At present, it remains unknown how nanoparticles move through tumour tissue once they have localized into the tumour area. Tumour penetration is important and especially so when the nanoparticles are designed to carry the drug molecules into the cancer cells before release. Second, there are valid concerns about nanoparticle toxicity, as little is known about how nanoscale entities behave in humans. The size and surface properties of nanoparticles can give them access to locations that are not available to larger particles. Surface properties also affect biodistribution through mechanisms such as nonspecific binding to proteins in the blood, removal by macrophages and by causing local disturbances in barriers that would otherwise limit their access. Third, there are

important commercial and regulatory challenges to be tackled with the emerging generation of more complex nanoparticles, in part owing to their multicomponent nature. Such nanoparticles are likely to be difficult and expensive to manufacture at large scale with appropriate quality. However, some highly complex nanoparticles have reached the clinic. There are also numerous efforts focused on combining imaging and therapeutic agents within the same particle. Although there are situations in which this combination might be useful, there are numerous others where this would not. There is no doubt that nanoparticle therapeutics with increasing multifunctionality will exist in the future. As newer and more complex nanoparticle systems appear, better methodologies to define biocompatibility will need to be created, especially those that can assess intracellular biocompatibility. Although many challenges exist for the translation of nanoparticles that are currently research tools into approved products for patients, their potential advantages should drive their successful development, and the continuing emergence of a new class of anticancer therapies [15].

References:

- [1] R.H. Datar, J.C. Richard, *Medical Innovation & Business* 2(3) (2010) 6–17.
- [2] P. Ghosha, G. Hana, M. Dea, C.K. Kima, V.M. Rotello *Adv Drug Deliv Rev* 60 (11) (2008) 1307–1315.
- [3] M.E. Davis, Z. Chen, D.M. Shin, *Nature Reviews, Drug Discovery*, 7 (2008) 771-782.
- [4] K.C. Gatter, et al. *J. Clin. Pathol.* 36 (1983) 539–545
- [5] R. Subbiah, M. Veerapandian, K.S. Yun *Curr Med Chem* 17 (2010) 4559-4577.
- [6] J.D. Heidel, M.E. Davis *Pharm Res* 28 (2011) 187-99.
- [7] M. Saad, O.B. Garbuzenko, E. Ber, P. Chandna, J.J. Khandare, *J Control Release* 130 (2008) 107-14.
- [8] R. Subbiah, M. Veerapandian, K.S. Yun, *Curr Med Chem* 17 (2010) 4559-4577.
- [9] A.K. Jain, M. Das, N.K. Swarnakar, S. Jain, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 28 (2011) 1-45.
- [10] A.L. Lee, Y. Wang, H.Y. Cheng, S. Pervaiz, Y.Y. Yang, *Biomaterials*, 30(5) (2009) 919-927.
- [11] F. Danhier, N. Lecouturier, B. Vroman, C. Jérôme, J. Marchand-Brynaert, O. Feron, V. Préat, *J. Control. Release*, 133(1) (2009) 11-7.
- [12] D. Raghunandan, B. Ravishankar, G. Sharanbasava, D.B. Mahesh, V. Harsoor, M.S. Yalagatti, M. Bhagawanraju, A. Venkataraman, *Cancer Nano* 2 (2011) 57–65.
- [13] Y.H. Chen, C.Y. Tsai, P.Y. Huang, M.Y. Chang, P.C. Cheng, C.H. Chou, D.H. Chen, C.R. Wang, A.L. Shiau, C.L. Wu, *Mol. Pharm.* 4 (5) (2007) 713–722.
- [14] J.H. Park, G. von Maltzahn, L.L. Ong, A. Centrone, T.A. Hatton, E. Ruoslahti, S.N. Bhatia, M.J. Sailor, *Adv. Mater.* 22 (8) (2010) 880–885.
- [15] M.E. Davis, Z. Chen, D.M. Shin, *Nature Reviews, Drug Discovery*, 7 (2008) 771-782.

Acknowledgements:

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. Research was supported by the APVV-0125-11 project.

Efficacies of pyridoindoles and flavonoids in modulation of functions and survival of BV-2 microglia

Lucia Račková¹, Nataša Mrvová¹, Štefan Bezek¹, Volkan Ergin², Elif Burcu Bali², Cimen Karasu²

¹*Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic*

²*Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey*

Abstract:

INTRODUCTION

Sustained microglial activation was extensively investigated in neurodegenerative diseases and, in addition, postulated to lead to neuronal cell loss under these conditions [1].

It was shown that activated microglia undergo apoptosis which is an essential self-regulatory mechanism governing immune and inflammatory responses in brain. On the other hand, since it is known that the brain has a relatively limited capacity to resupply these cells (playing also important roles in many physiological processes), it was suggested that premature depletion of microglia due to overactivation would probably handicap the ability of brain cells to cope with inflammation or dysregulation of protein homeostasis [2]. Therefore, it may be of merit to develop approaches in concurrent modulation of both survival and inflammatory functions of microglia.

Current evidence showed immunomodulatory efficacy of flavonoids in glial cells, suggesting their therapeutic potential for diseases in CNS [3]. Stobadine, the novel pyridoindole antioxidant reference, showed neuroprotective effects in several *in vivo* as well as *ex vivo* models.

In the present study, the effects of selected pyridoindole derivatives and flavonoid quercetin on activation as well as apoptosis of cultured BV-2 microglia were investigated.

METHODS

Levels of LPS-induced iNOS protein, amounts of NO and cytokine TNF- α in media, intracellular generation of oxidants, caspase 3 activity, changes of mitochondrial potential and viability assays were assessed in BV-2 microglial cells by using fluorometric and colorimetric assays, western blot analysis and application of fluorescent microscopy.

RESULTS

Unlike pyridoindole stobadine and its derivatives tested (carboxylated and nitrated analogues, SM1EC2 and SM1M2Nt3, respectively), only flavonoid quercetin showed a strong inhibitory effect on LPS-stimulated NO- and TNF- α -release and iNOS expression levels (Fig. 1). Furthermore, only quercetin effectively prevented LPS-stimulated cell size increase.

On the other hand, unlike quercetin, pyridoindole stobadine suppressed apoptosis of microglia, exposed to the toxic concentration of LPS, along with simultaneous prevention of cell number reduction and amelioration of stimulated production of reactive oxygen species.

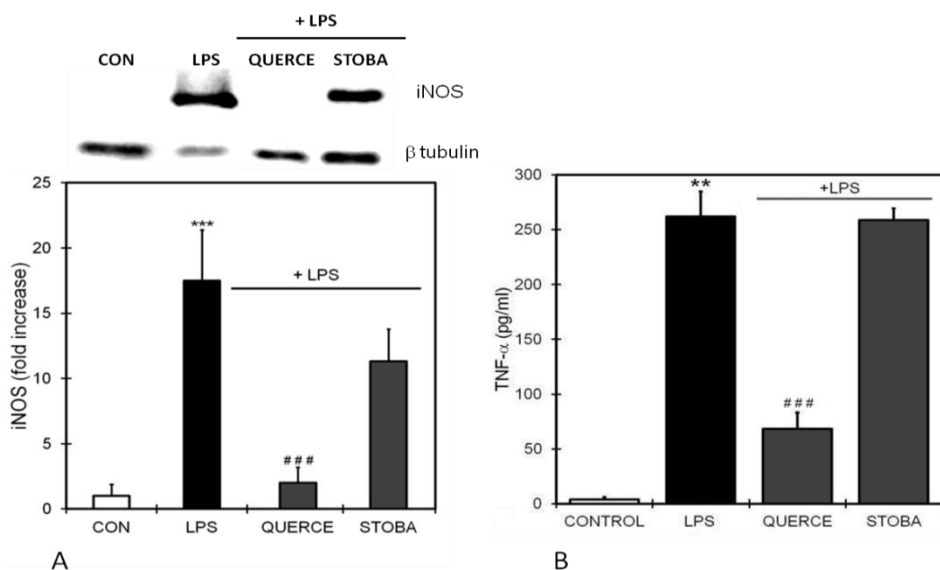


Fig. 1. Effect of quercetin and stobadine on A: iNOS induction and B: TNF- α release by BV-2 microglia stimulated with bacterial lipopolysaccharide (LPS). BV-2 cell were treated with LPS in the presence or absence of the compounds tested for 24 hours and then TNF- α production was evaluated by ELISA, iNOS expression was evaluated by Western blot analysis. Data are means \pm SD, **p<0.01, ***p<0.001 vs control, ###p<0.001 vs LPS

DISCUSSION

Heme oxygenase-1 upregulation has been proposed as an antiinflammatory mechanism for quercetin in inflammogen-stimulated microglia, apart from the down-regulation of MAPKs, Akt, Src, Janus kinase-1, Tyk2, signal transducer and activator of transcription-1, and NF- κ B [3]. However, studies of immunomodulatory effects of stobadine are missing and our previous data showed only a negligible antiinflammatory efficacy in RAW 264.7 macrophages. On the other hand, prominent antioxidant properties of stobadine (along with caspase-inhibitory efficacy confirmed in earlier studies) may be responsible for its effective protection of microglia against overactivation-induced damage. However, in view of its minute potency in lowering the microglia activation markers tested, these pro-survival effects may be indicative of rather a pro-inflammatory potency of this compound.

CONCLUSION

Our results suggest that either pyridoindole antioxidants or flavonoids (represented by quercetin) did not show notable efficacy in simultaneous immunomodulation and protection of microglia. These outcomes can establish needs for rational design of novel polyphenolic or pyridoindole substances with optimal multilevel efficacy against neuroinflammation.

Literatúra

- [1] Eikelenboom, P. and Veerhuis, R. (1996) *Neurobiol. Aging* 17, 673
- [2] Kao, T.-K., Ou, Y.-Ch., Raung, S.-L., Lai, Ch.-Y., Liao, S.-L. and Chen, Ch.-J. (2010) *Life Sci.* 86, 315
- [3] Liu, B., Wang, K., Gao, H.M., Mandavilli, B., Wang, J.Y. and Hong, J.S. (2001) *J. Neurochem.* 77, 182

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. This work was also supported by the grant VEGA No. 2/0031/12.

Glucotoxicity and oxidative stress in HT-22 mouse hippocampal cells

Lucia Račková¹, Nataša Mrvová¹, Štefan Bezek¹, Milan Štefek¹, Tobias Jung²

¹*Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic*

²*Friedrich-Schiller-University Jena, Jena, Thuringia, Germany*

Abstract:

INTRODUCTION

Oxidative stress has been widely considered as a key player in the adverse effects of hyperglycaemia to various tissues, including neuronal cells. Besides the retina, kidney and vascular tissue, neuronal tissue is one of the major targets of diabetic complications caused by chronically elevated glucose level. The peripheral neuropathies represent the most common diabetic complication triggered by the injurious effect of hyperglycaemia on neuronal cells. However, broad evidence suggests that the central nervous system is also susceptible to long-term complications associated with diabetes [1].

This study examined the participation of oxidative stress in injurious effects of high glucose on neuron-like HT22 cells along with the activity of 20S proteasome, a proteolytic system responsible for degradation of oxidized proteins.

METHODS

Intracellular oxidants generation along with cell viability, activity of 20S proteasome and oxidative protein modifications (carbonylation and glycation) were assessed in neuron-like HT22 cell line under high glucose (HG) conditions by using fluorometric and colorimetric assays, ELISA, immunostaining analyses and application of fluorescent microscopy.

RESULTS

Although HG conditions caused non-significant changes of viability, a considerable reduction of cell proliferation was observed. Moreover, the cell morphology was also altered (shown by an increase of cell size). These changes were followed by an enhancement of intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) (Fig. 1). Although the total levels of protein carbonyls as well as of advanced glycation end products (AGEs) were increased in HG cells, the relative levels of oxidized aminoacid residues per proteins were not changed. Correspondingly, only a slight decline in the 20S proteasome activity was found in HG-treated cells. Regardless, HG caused significant alteration in subcellular distribution of both oxidized proteins and proteasome shown as a shift of both proteasome and carbonylated proteins toward nuclear region (Fig. 1). Finally, substances interfering with glucose metabolism partially preserved the oxidative stress in HG treated cells and ameliorated changes in cell size and proliferation.

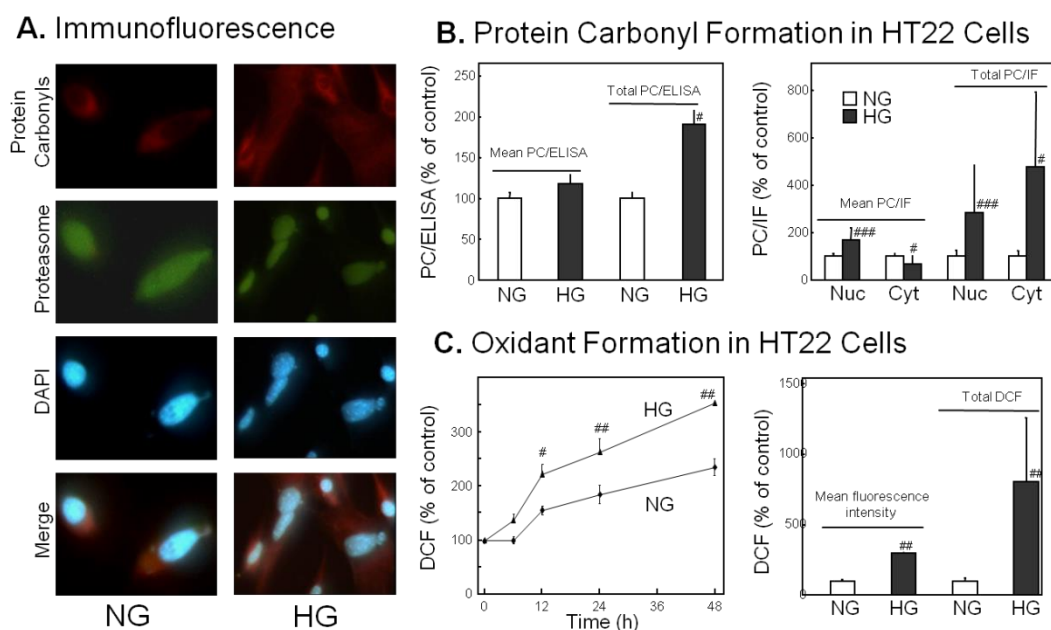


Figure 1. Oxidative modification of proteins and generation of oxidants in HT22 cells following high glucose treatment. HG treated cells were immunostained for protein carbonyls, proteasome and DNA (DAPI) (A). Cells were cultured on glass bottom dishes; (B) The formation of protein carbonyls was quantified by ELISA (PC/ELISA) or quantitative immunostaining (PC/IF). Immunofluorescent quantification was performed separately for the nucleus ('Nuc') and the cytosol ('Cyt'). Time-dependent oxidant production in HT22 cells is shown in (C) (left part). The right part of (C) demonstrates the values after 48 h, again as measured 'Mean fluorescence intensity' and calculated 'Total DCF'. Results are the means \pm SEM of at least three independent determinations, # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001 vs NG (NG_normal glucose, HG_high glucose).

DISCUSSION

In analogy with our present observations, high glucose conditions were shown to induce both proliferation and morphological changes in neurons and glial cells of diabetic animals. Interestingly, a limited proliferation was also found in mesangial cells exposed to high glucose, followed by cell cycle arrest and persistent and progressive hypertrophy [2].

A range of biochemical pathways underlying toxicity of glucose (involving non-enzymic glycation of proteins) have been illustrated in non-neuronal cells [3]. All these pathways have in common the formation of ROS that, in excess and over time, cause chronic oxidative stress. In both diabetic humans and rats, oxidative stress was shown to play a central role in brain damage. On the other hand, proteasome might represent an early defence system in removal of oxidized proteins in brain exposed to hyperglycaemia (thus preventing accumulation of oxidized non-degradable protein material with likely lethal effects in the neuronal cells). As shown by earlier studies [4], nuclear accumulation of proteasome might represent an adaptive response of the cells to glycoxidative injury in the nuclei. Furthermore, our studies with glycolysis inhibitors underscore a role of accelerated glucose metabolism in the ROS production in neuronal cells exposed to hyperglycaemia.

CONCLUSION

Our results support the propositions that oxidative stress may have an important role of in the toxic effect of glucose to neuronal cells in diabetes. In addition, enhanced metabolism of glucose during hyperglycaemia may be an important mediator of over-production of ROS and their harmful effects to the neuronal cells.

References:

- [1] McCall, A.L. (1992) The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* 41, 557.
- [2] Wolf, G., Schroeder, R., Zahner, G., Stahl, R.A.K. and Shankland, S.J. (2001) *Am. J. Pathol.* 158, 1091.
- [3] Robertson, R.P. and Harmon, J.S. (2006) *Free Radic Biol Med* 41, 177.
- [4] Cervantes-Laurean, D., Roberts, M.J., Jacobson, E.L., Jacobson, M.K. (2005) *Free Radic. Biol. Med.* 38, 786.

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.

Protective efficacy of pyridoindole SMe1EC2 against H₂O₂ damage in INS-1E β cells

Lucia Račková¹, Štefan Bezek¹, Ahmet Cumaoglu², Milan Štefek¹, Çimen Karasu²

¹Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

²Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey

Abstract:

INTRODUCTION

Accelerated death of pancreatic β-cells represents the main cause of type 1 diabetes mellitus, and contributes also to the reduction of β-cell mass in type 2 diabetes. In this regard, it was shown that apoptosis represents the main mode of β-cell death in both types of diabetes.

Although apoptosis may be induced by many stimuli, overproduction of reactive oxygen species (ROS) plays apparently a crucial role in β-cell death. In type 1 diabetes, infiltrating T and B cells and macrophages produce excessive ROS resulting in damage to vulnerable β cells [1]. On the other hand, chronic hyperglycemia in type 2 diabetes leads to chronic oxidative stress in all tissues, including β cells as one of its principal targets [2].

In our study, the potential protective effect of novel pyridoindole SMe1EC2 (II) was assessed against hydrogen peroxide (H₂O₂)-damage to rat pancreatic INS-1E β cells and compared with the effect of the lead pyridoindole molecule, stobadine (I), a novel indole antioxidant reference (Fig. 1) [3].

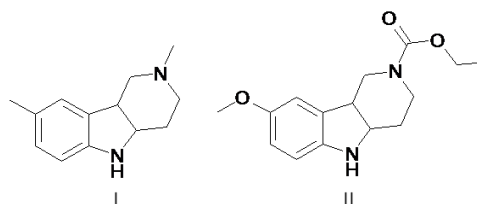


Figure 1. Structures of the compounds tested, stobadine (I), (-)-cis-2,8-dimethyl-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole, and SMe1EC2, (±)-8-methoxy-1,3,4,4a,5,9b-hexahydro-pyrido[4,3-b]indole-2-carboxylic acid ethyl ester (II).

METHODS

Intracellular oxidants generation along with cell viability, insulin secretion, caspase activation, apoptotic and necrotic changes and activity of catalase were assessed in pancreatic β cell line INS-1E exposed to H_2O_2 -damage in the presence or the absence of the compounds tested. Fluorometric and colorimetric assays (DCF, MTT, chromogen-substrate cleavage assay), ELISA and fluorescent microscopy were used.

RESULTS

Only pre-treatment with SMe1EC2 (II) led to a significant preservation of the metabolic function and insulin secretion of the INS-1E cells exposed to H_2O_2 (**Fig. 2**). The activities of caspase-9 and -3, as well as the phosphatidylserine exposure on the external leaflet of the plasma membrane, were suppressed similarly in the cells pre-incubated with both compounds tested. However, only pyridoindole (II) inhibited profoundly late apoptotic changes in the INS-1E cells (**Fig. 2**). Furthermore, SMe1EC2 showed better efficacy in down-regulation of ROS levels and up-regulation of catalase activity.

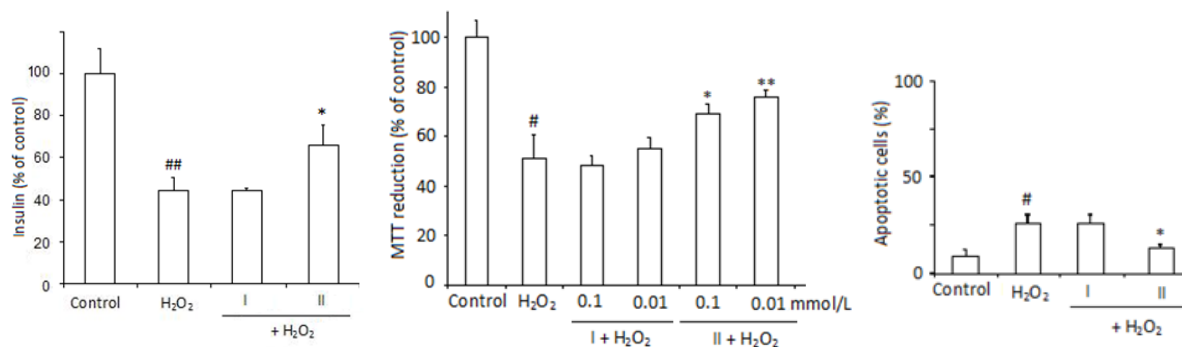


Figure 2. Effect of stobadine (I) and SMe1EC2 (II) on H_2O_2 -induced injury of insulin secretion, viability decrease and apoptosis of INS-1E β cells followed by ELISA, MTT assay and staining with ethidium bromide/acridine orange, respectively. Results are presented as percentage of control \pm SD, $n = 3$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. H_2O_2 group.

DISCUSSION

The improved anti-apoptotic, viability- and insulin-release-protection efficacy of SMe1EC2 is in line with its better normalizing effect on the induced levels of intracellular oxidants. This might be related to its superior free radical scavenging capabilities. The electron-donating aromatic substituent $-OCH_3$ at position C6 in compound (II) is likely responsible for its elevated antiradical activity compared to stobadine (I) (as confirmed by DPPH assay). Moreover, the ethoxycarbonyl substituent on piperidinic nitrogen of II can profoundly decrease pyridoindole protonation ($pK_{a2} -3.7$), thus ensuring better intracellular availability of compound (II) (represented by $\log D = 1.79$) compared to stobadine ($\log D = -0.05$). The antioxidant action of II in INS-1E cells can involve most likely both direct ROS scavenging mechanism and the modulatory effect on catalase, as H_2O_2 -detoxifying enzyme.

CONCLUSIONS

Our results suggest that pyridoindole SMe1EC2 (II) characterized by enhanced intrinsic antioxidant activity, may be efficient in protection of pancreatic β cells against cytotoxic challenge of H_2O_2 , a reactive metabolite involved in both type 1 and type 2 diabetes.

Literatúra:

- [1] Mandrup-Poulsen, T., Helqvist, S., Wogensen, L.D., Molvig, J., Pociot, F., Johannesen, J., Nerup, J. (1990) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 164, 169
- [2] Robertson, R. P., Harmon, S. J. (2006) *Free Radic. Biol. Med.* 41, 177
- [3] Juránek, I., Račková, L. and Štefek, M. (2012) In: *Biochemistry* (Ekinci, D., ed.) chapter 19, pp. 443, InTech, Rijeka

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.

Analýza obsahu mastných kyselín v extrakte materskej kašičky pomocou GC-MC

Mária Šedivá, Silvia Vlčková, Jaroslav Klaudiny

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava; Jaroslav.Klaudiny@savba.sk

Úvod

Materská kašička obsahuje veľký podiel mastných kyselín s krátkymi reťazcami zloženými z 8-12 uhlíkov. Najčastejšie sa pritom vyskytujú ako hydroxy- alebo dikarboxylové mastné kyseliny. Najviac zastúpenou mastnou kyselinou je kyselina 10-hydroxy-2-decénová (10-HDA). Ďalšími, relatívne hojne zastúpenými mastnými kyselinami sú kyselina 8-hydroxyoktánová, 10-hydroxydekánová, 3,10-dihydroxydekánová, 2-decéndiová a sebaková [1-3]. Bolo zistené, že niektoré mastné kyseliny sú aktívne voči niektorým testovaným Gram pozitívnym aj Gram negatívnym bakteriálnym kmeňom [1, 4, 5]. Predmetom nášho záujmu sú mastné kyseliny, ktoré by mohli mať aktivitu voči včelieho patogénu *Paenibacillus larvae*, ktorý spôsobuje závažnú chorobu včelích lariev, mor včelieho plodu (MVP). Predpokladáme, že takéto mastné kyseliny sa nachádzajú v kašičke, nakoľko sme zistili, že dietyléterový extrakt lyofilizovanej MK je aktívny voči *P. larvae*. Cieľom tejto práce bolo analyzovať obsah mastných kyselín v dietyléterovom extrakte MK plynovou chromatografiou kombinovanou s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS).

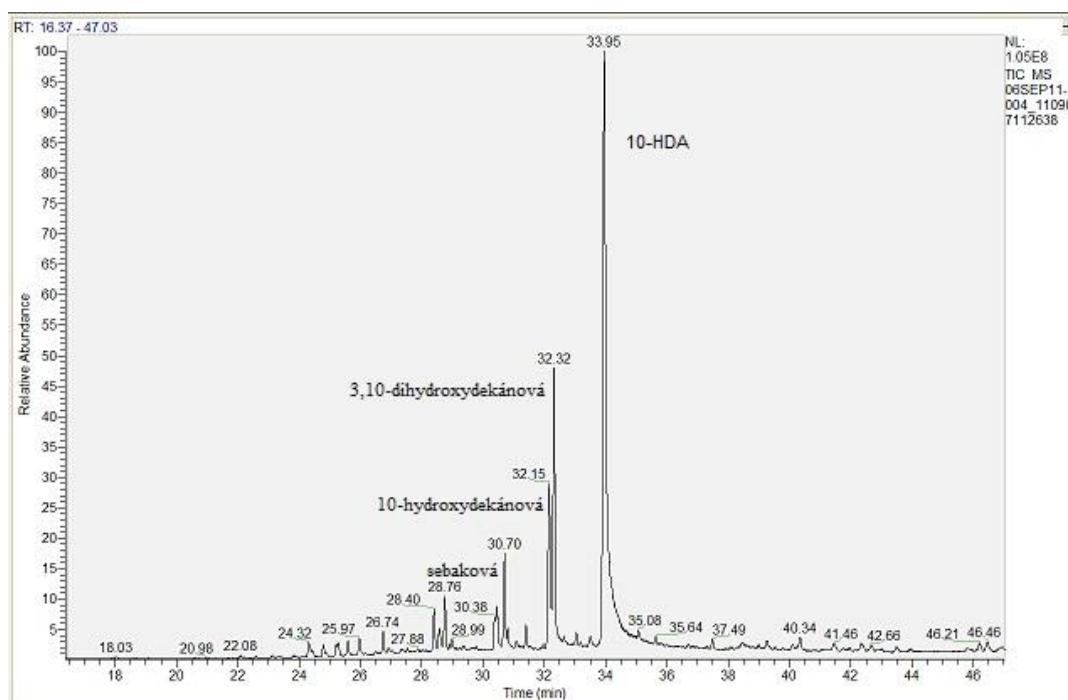
Materiál a metódy

Na analýzu bola použitá materská kašička získaná od včelára Alexandra Kissa zo Šiah. MK (140 mg) bola lyofilizovaná v 2 mikroskúmavkách, lyofilizáty rozdrvené na prášok a extrahované 3 x s 0,5 ml dietyléteru. Dietyléter bol odparený na centrifugačnom vákuovom koncentrátore tak, aby sme finálne získali vzorku v jednej mikroskúmavke. Pripravenú vzorku sme metylovali s roztokom 1% H_2SO_4 v metanole, pričom derivatizácia prebiehala pri 50°C cez noc. Následne sme pridali do vzorky hydrogénuhličitan sodný a analyzovali ju pomocou GC-MS (GC – Trace GC Ultra, MS – ITQ 900; Thermo Scientific) s použitím kolóny TG-SQC 30m x 0,25mm, 0,25 μ m (Thermo Scientific).

Výsledky

Pomocou metódy GC-MS sme z analyzovaného extraktu získali profil mastných kyselín nachádzajúcich sa v testovanej materskej kašičke. Po separácii zložiek extraktu plynovou chromatografiou boli zmerané hmotnostné spektrá jednotlivých komponentov. Porovnaním nameraných výsledkov s databázou NIST MS Search 2.0 sme identifikovali 4 najväčšie píky (Obr. 1). Identifikovali sme 10-HDA, ktorej zodpovedá najvyšší pík s retenčným časom RT = 33,95 min a ďalej v zostupnom poradí podľa veľkosti píkov kyselinu 3,10-dihydroxydekanovú RT = 32,32 min, 10-hydroxydekanovú RT = 32,15 min a kyselinu sebakovú RT = 30,70 min. Nepodarilo sa nám identifikovať výrazné píky, ktoré by zodpovedali mastným kyselinám, ktoré boli identifikované ako tiež hojne zastúpené Isidorovom a kol. [3] - kyselinu 8-hydroxyoktánovú a 2-decendiovú.

Získané výsledky poukazujú na to, že MK by sa mohli líšiť v obsahu niektorých mastných kyselín, ako aj na to, že za aktivitu dietyléterového extraktu MK voči *P. larvae* by mohla zodpovedať niektorá, alebo viaceré z mastných kyselín hojne sa vyskytujúcich v analyzovanom preparáte.



Obr.1: Profil mastných kyselín extrahovaných dietyléterom z materskej kašičky na plynovom chromatografe. Píky boli identifikované hmotnostnou spektrometriou (záznamy nie sú uvedené).

Použitá literatúra

1. Melliou, E., Chinou, I. 2005. Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8987-8992.
2. Noda, N., Umebayashi, K., Nakatani, T., Miyahara K., Ishiyama, K. 2005. Isolation and characterization of some hydroxy fatty and phosphoric acid esters of 10-hydroxy-2-decenoic acid from the royal jelly of honeybees. *Lipids*, 40, no.8. Isidorov, V.A., Bakier, S., Grzech, I. 2012.
3. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of volatile and extractable compounds of crude royal jelly. *J. Chromatogr. B* 885-886, 109-116.

4. Blum, M. S., Novak, A. F., Taber S. 1959. 10-hydroxy- Δ^2 -decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. *Science* 130, 452-453.
5. Yatsunami, K. Echigo, T. 1985. Antibacterial action of royal jelly. *Bull. Fac. Agr. Tamagawa Univ.* 25, 13

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.

Modification of antibacterial bee peptide defensin1 in manuka honey

Juraj Majtan¹, Jana Bohova¹, Lenka Kohutova², Maria Dzurova², Maria Sediva², Peter Takac¹ and Jaroslav Klaudiny²

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

²*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dubravska cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia*

Introduction

Besides three well-characterized major antibacterial factors in honey, hydrogen peroxide, low pH and high osmolarity, a 1,2-dicarbonyl compound methylglyoxal (MGO) and the cationic antibacterial peptide honeybee defensin1 were also identified as antibacterial substances in some types of honey. Manuka honey is a type of medical-grade honey that is most frequently studied in human clinical trials. It has been documented that the pronounced antibacterial activity of manuka honey directly originates from MGO [1, 2]. The MGO in manuka honey is derived from the non-enzymatic conversion of dihydroxyacetone, which occurs at high levels in the nectar of manuka trees (*Leptospermum scoparium*) [3]. MGO is a highly reactive dicarbonyl that induces rapid non-enzymatic modification of the free amino groups of lysine and arginine residues of proteins and peptides, leading to the generation of advanced glycation end products (AGEs).

Recently, it was published that manuka honey does not contain bee defensin1 and hydrogen peroxide, and that its antibacterial activity was mainly attributed to MGO, whereas bee defensin1 and hydrogen peroxide were found to be the major antibacterial factors of another medical-grade honey – Revamil[®], a honey produced under standardized conditions in greenhouses

The aim of this study was to investigate the influence of intrinsically present reactive MGO on bee defensin1 in manuka honey as well as of experimentally added MGO on purified bee defensin1.

Materials and Methods

Commercially available active manuka honey (UMF 15+), imported from New Zealand, was purchased from Nature's Nectar (Surrey, UK).

Purification of honeybee defensin1

Defensin1 was partially purified from royal jelly by gel filtration on Sephadex G-100 column (GE Healthcare, UK) using the procedure described by Fujiwara et al. (1990) [4]. The antibacterially active column fractions were collected and lyophilized.

Determination of antibacterial activity

The antibacterial efficacy of defensin1 samples was evaluated by the radial diffusion assay using *Micrococcus luteus*, a model Gram-positive bacterium frequently used for testing antibacterial properties [5].

Detection of defensin1 in honey extracts by immunoblotting

Defensin1 samples were electrophoresed on 16.5% Tricine-SDS-PAGE gel [6] 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 [7] 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.

Treatment of purified defensin1 with MGO

The partially purified defensin1 was dissolved in deionized water and the concentration of protein in the solution was determined spectrophotometrically at 205 nm [8]. Two 90 µl samples were prepared for monitoring of the time-dependent effect of MGO (Sigma-Aldrich, UK) on defensin1. The experimental sample contained 0.4 µg/µl protein, 1 µg/µl bovine serum albumin (BSA) Fraction V (stabilizing agent) (SERVA, Heidelberg, Germany) and 0.7 µg/mg MGO. The control sample had the same composition as the experimental one but did not contain MGO. The samples were incubated at 35 °C and after 12, 21 and 51 h of incubation 30 µl aliquots were collected. The aliquots were used for immunoblot analysis (10 µl) and for the determination of antibacterial activity, as described above.

Results and Discussion

We assessed *in vitro* the effect of MGO on bee defensin1 that was prepared from royal jelly. Partially purified defensin1 was treated with 0.7 mg/ml of MGO in a solution containing 1 mg/ml of BSA (included as an anti-aggregation additive) for a period of 12, 21 and 51 h. The identical defensin1 sample without MGO was used as a control. MGO significantly reduced the antibacterial activity of defensin 1 and the level of reduction was found to be time-dependent. After 51 h of incubation, the activity of bee defensin1 was completely abolished. The activity of defensin1 in the samples without MGO remained constant during incubation (Fig. 1A). This indicates that MGO modifies defensin1 and abrogates its antibacterial property. In order to illustrate defensin1 reactions with MGO we performed an immunoblot analysis of samples from these treatments. The decrease in the amount of the native 5.5 kDa form of defensin1 in the samples treated with MGO was observed and it depended on the duration of treatment (Fig. 1B).

The amount of native defensin1 decreased during the incubation, but we did not observe a size shift in the MW of the modified defensin1. The explanation for this could be that (i) the concentration of peptide

adducts was too low to be detected in the amount of purified defensin1 used in our assay and/or that the peptide adducts showed a greater variation in MW than those created at increased saccharide concentrations during the processing of nectar and the storage of natural manuka honey and (ii) defensin1 may form higher MW adduct with specific protein(s) and/or its degradation product(s) present only in manuka honey and we could not see size-shift in the MW of purified defensin1.

Taken together, MGO is a component of manuka honey that has, besides its proven positive antibacterial properties, an obvious detrimental effect, at least on some protein/peptide functions, in manuka honey

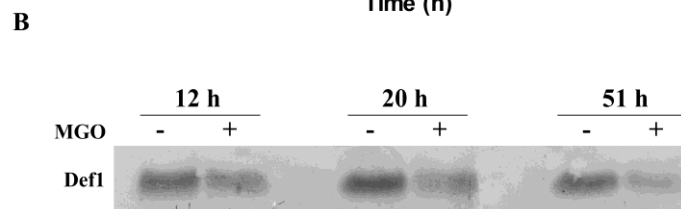
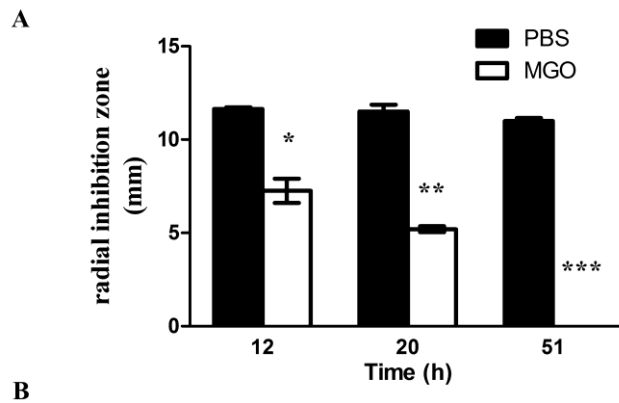


Fig. 1 MGO-mediated defensin1 preparation (ad) different incubation aliquots of the tr

The values of the inhibition zones are mean \pm SEM of three independent assays. The data were statistically analysed by the Student's t-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (B) Detection of defensin1 in aliquots of control and treated samples (8 μ l) by immunoblotting using Tricine-SDS-PAGE gels and a polyclonal antibody against defensin1.

ally purified defensin1 7 μ g/mg of MGO for activity of defensin1 in formed with *M. luteus*.

References

1. C.J. Adams, C.H. Boulton, B.J. Deadman, J.M. Farr, M.N.C. Grainger, M. Manley-Harris, et al., Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey, *Carbohydr. Res.* 343 (2008) 651-659.
2. E. Mavric, S. Wittmann, G. Barth, T. Henle, Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand, *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (2008) 483-489.
3. C.J. Adams, M. Manley-Harris, P.C. Molan, The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey, *Carbohydr. Res.* 344 (2009) 1050-1053.
4. S. Fujiwara, J. Imai, M. Fujiwara, T. Yaeshima, T. Kawashima, K. Kobayashi, A potent antibacterial protein in royal jelly, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 11333-11337.
5. R.I. Lehrer, M. Roseman, S.S. Harwing, R. Jackson, P. Eisenhauer, Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides, *J. Immunol. Methods.* 137 (1991) 167-173.
6. H. Schägger, G. von Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal Biochem.* 166 (1987) 368-379.
7. J. Kloudiny, K. Bachanova, L. Kohutova, M. Dzurova, J. Kopernický, J. Majtan, Expression of larval jelly antimicrobial peptide defensin1 in *Apis mellifera* colonies, *Biologia* 67 (2012) 200-211.

8. C.M. Stoscheck, Quantitation of protein, in: Deutscher, MP (Ed.), Methods Enzymol., Academic Press, Inc. , 1990, pp. 50-67.

Acknowledgements

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

Antibakteriálna aktivita extraktu materskej kašičky voči včeliemu patogénu

Mária Šedivá a Jaroslav Klaudiny

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

Úvod

Materská kašička (MK) je jedinečná potrava larvy včelej kráľovnej a samotnej kráľovnej, ktorú produkujú 7-15 dní staré včely nazývané dojčičky. V MK sa našlo niekoľko antimikrobiálnych látok [1-6]. K nim patria aj mastné kyseliny, z ktorých je najviac zastúpená v kašičke 10-hydroxy-2-decénová kyselina (10-HDA). Boli skúmané antibakteriálne aktivity 10-HDA a niektorých ďalších mastných kyselín MK voči niektorým Gram pozitívnym aj Gram negatívnym baktériám [7, 8, 9]. Doteraz však nebolo skúmané či 10-HDA a iné mastné kyseliny pôsobia voči včeliemu patogénu *Paenibacillus larvae*. Tento patogén spôsobuje najzávažnejšiu chorobu včelieho plodu, mor včelieho plodu (MVP), ktorá spôsobuje veľké ekonomické straty včelárom aj poľnohospodárom, ktorých produkcia je závislá od opeľovania. Patogén infikuje mladé larvy (plod) prostredníctvom svojich spór, ktoré kontaminujú larválnu potravu. Vegetatívne bunky sa po vyklíčení spór rozmnožia najskôr v čreve larvy a neskôr v celom tele, čím ju zabijú a nakoniec rozložia. Predpokladáme, že niektoré z antimikrobiálnych látok, ktoré včely dojčičky produkujú do larválnej potravy, tak do MK ako aj do včelej kašičky (potrava mladých lariev včiel majúca podobné zloženie ako MK) by mohli zabraňovať rozmnoženiu patogénu v črevách lariev. Preto je zaujímavé identifikovať tie látky v MK, ktoré sú toho schopné. Cieľom tejto práce bolo zistiť, či dietyléterový extrakt MK, ktorý by mal obsahovať mastné kyseliny je aktívny voči *P. larvae*.

Materiál a metódy

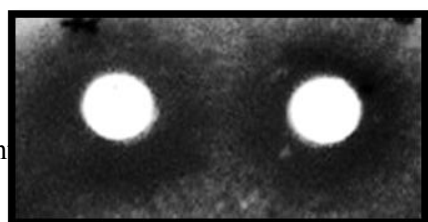
Materská kašička bola získaná od pána Alexandra Kissa na včelnici v Šahách. Bakteriálne kmene *P. larvae* CCM 4486 a *Bacillus subtilis* CCM 2216 boli kúpené z Českej zbierky mikroorganizmov v Brne. MK (70 mg) bola lyofilizovaná, lyofilizát rozdrvený na prášok a extrahovaný 3x s 500 µl dietyléteru. Dietyléterove frakcie boli spojené, dietyléter odparený na centrifugačnom vákuovom koncentrátore a získaný preparát rozpustený v 250 µl metanolu. Metanolový extrakt (15 µl) bol nanesený na 5,1 mm papierové disky Whatman 3MM. Tie boli umiestnené na petriho misku s MYPGP agarom (*P. larvae*) a MP agar (*B. subtilis*) a nechané kultivovať 24 hod pri 35°C.

Výsledky a diskusia

Testovanie antibakteriálnej aktivity pripraveného dietyléterového extraktu MK za podmienok popísaných vyššie ukázalo, že je aktívny voči *P. larvae* ako aj modelovému kmeňu Gram pozitívnej baktérii *B. subtilis* (Obr.1). Podobná veľkosť inhibičných zón naznačuje, že jeho účinnosť na obe baktérie je podobná. Získané výsledky poukazujú na to, že niektorá, -é mastné kyseliny vyextrahované do testovaného preprátu sú aktívne voči včeliemu patogénu *P. larvae*.

Paenibacillus larvae

Bacillus subtilis



Obr.1: Antibakteriálna aktivita extraktu materskej kašičky voči *Paenibacillus larvae* a *Bacillus subtilis*.

patogénu *P. larvae* a modelovej Gram pozitívnej baktérii *B. subtilis*.

Literatúra

9. 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.
10. Klaudiny, J., Albert, Š., Bachanová, K., Kopernický, 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.
11. Bíliková, K., Gusui, W., Šimúth, J., 2001. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie* 32, 275-283.
12. Bachanová, K., Klaudiny, J., Kopernický, J., Šimúth, J., 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae* larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* 33, 259-269.
13. Bíliková, K., Mirgorodskaya, E., Bukovská, G., Gobom, J., Lehrach, H., Šimúth, J., 2009. Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin2. *Proteomics* 9, 2131-2138.
14. Fontana R., Mendes, M.A., de Souza, B.M., Konno, K., César, L.M.M., Malaspina, O., Palma, M.S., 2004. Jelleines: a family of antibacterial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*), *Peptides* 25, 919-928.
15. Blum, M. S., Novak, A. F., Taber S., 1959. 10-hydroxy- Δ^2 -decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. *Science* 130, 452-453.
16. Yatsunami, K. Echigo, T., 1985. Antibacterial action of royal jelly. *Bull. Fac. Agr. Tamagawa Univ.* 25, 13-22.
17. Melliou, E., Chinou, I., 2005. Chemistry and Bioactivity of Royal Jelly from Greece. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8987-8992.

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.

Porovnanie expresie *defenzín1* mRNA a defenzín1 peptidu vo včelstvách

Lenka Kohútová^a, Jaroslav Klaudiny^a, Katarína Bachanová^a, Mária Dzürová^a, Ján Kopernický^b, Juraj Majtán^c

^a Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko; Jaroslav.Klaudiny@savba.sk

^b Výskumný ústav živočíšnej výroby, Ústav včelárstva, Gašperikova 599, 03308 Liptovský Hrádok, Slovensko

^c Ústav zoológie SAV, Dúbravská cesta 9, 84506 Bratislava, Slovensko

Úvod

Jedným z najzávažnejších ochorení včelstiev je mor včelieho plodu, spôsobovaný spórmi baktérie *Paenibacillus larvae*. Antimikrobiálny peptid defenzín1 má potenciál byť ochranným faktorom lariev pred týmto ochorením: (1) *in vitro* inhibuje rast *P. larvae* (Bíliková a kol. 2001, Bachanová a kol. 2002), (2) je stálou zložkou larválnej kašičky (potravy lariev, ktorá je produkovaná v hlavových žľazách včiel robotníč starých 5 až 15 dní – tzv. dojčičiek), (3) je konštitutívne exprimovaný u lariev (Evans 2004). Cieľom tejto práce bolo porovnať expresiu *defenzín1* mRNA v súboroch hláv dojčičiek v rôznych včelstvách a porovnať ju s obsahom defenzín1 peptidu vo včelích kašičkách (VK). VK je jeden z druhov larválnej kašičky, sú ňou kŕmené larvy robotníč.

Materiál a metódy

Včely dojčičky určitého veku, 10- a 14-dňové, sme získali zo šiestich včelstiev včely medonosnej (*Apis mellifera carnica* Pollman) z včelnice Ústavu včelárstva (Liptovský Hrádok, Slovensko) pomocou farebného označenia včiel po ich vyliahnutí. Boli odobraté z plástov obsahujúcich väčší počet buniek s mladým plodom (1-3 dňové larvy), zamrazené v tekutom dusíku a skladované pri -70 °C. Súčasne so zberom 10-dňových včiel boli z týchto včelstiev odobraté aj VK (40-50 µl) z viacerých buniek obsahujúcich 2-3 dni staré larvy. VK boli skladované pri -20 °C.

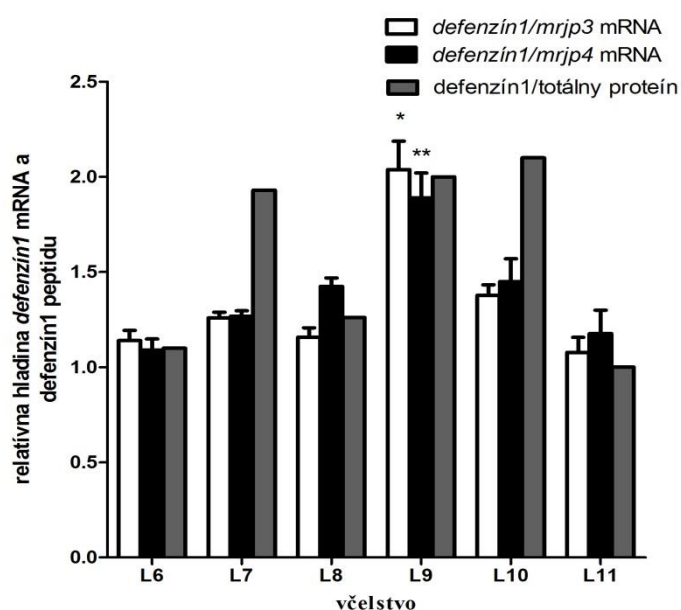
Vzorky hláv dojčičiek (každá vzorka obsahovala 20 hláv) sme rozdrvili v tekutom dusíku v trecej miske a celkovú RNA sme izolovali guanidín tiokyanát – fenolovou metódou (Chomczynsky a Sacchi 1987). Na kvantifikáciu jednotlivých mRNA sme použili metódu hybridizácie po RNA dot blote: vzorky celkovej RNA sme naniesli na membránu pomocou dot-blotovej aparatury, hybridizovali s digoxigenínom značenou DNA sondou a detekciu signálov sme robili imuno-chemiluminiscenčnou metódou. Röntgenové filmy s primeranými intenzitami chemiluminiscenčných signálov vo vzorkách sme pomocou skenovania digitalizovali a signály sme kvantifikovali s 1D Image Analysis Software (Kodak). Množstvá mRNA zodpovedajúce signálom sme určili podľa kalibračnej krivky získanej z kvantitatívneho markera. Získané dáta sme analyzovali metódou jednosmernej ANOVA a zodpovedajúce grafy sme vytvorili v programe GraphPad Prism (GraphPad Software). Dáta uvádzame ako hodnoty aritmetického priemeru ± stredná chyba priemeru. Dáta s P-hodnotou menšou než 0,05 sme považovali za štatisticky významné.

Na kvantifikáciu defenzín1 peptidu vo včelej kašičke sme použili metódu western blot: proteíny včelej kašičky sme separovali tricín-SDS-polyakrylamidovou gélovou elektroforézou (Schägger a Jagow 1987), preniesli na membránu a defenzín1 sme detegovali imuno-chromogénnou metódou s použitím králičieho antiséra voči defenzínu1. Membrány po imunodetekcii sme pomocou skenovania digitalizovali a signály sme kvantifikovali s 1D Image Analysis Software (Kodak). Množstvá defenzínu1 zodpovedajúce signálom sme určili podľa kalibračnej krivky získanej z kvantitatívneho markera.

Totálny obsah proteínov vo vzorkách včelej kašičky sme stanovili prepočtom z totálneho obsahu dusíka, pričom na prepočet sme použili univerzálny faktor 6,25. Totálny dusík bol stanovený v lyofilizovaných vzorkách na elementárnom analyzátore (Fisons Instruments EA 1108).

Výsledky a diskusia

Vo vzorkách celkovej RNA izolovaných z hláv včiel dojčičiek sme porovnali expresiu *defenzín1* mRNA normalizovanú voči dvom referenčným génom *mrjp3* (kóduje hlavný proteín materskej kašičky 3) a *mrjp4* (kóduje hlavný proteín materskej kašičky 4) (Obr. 1). Z každého včelstva sme analyzovali 5 vzoriek - tri vzorky sme izolovali z 10-dňových a dve vzorky zo 14-dňových včiel. Každá vzorka obsahovala RNA vyizolovanú zo súboru 20 včelích hláv. Zistili sme, že expresné hladiny *defenzín1* mRNA v hlavách dojčičiek sú odlišné v rôznych včelstvách a aj medzi vzorkami v tom istom včelstve. Väčšie rozdiely v hladinách boli medzi včelstvami ako v rámci jedného včelstva. Štatisticky významný rozdiel bol zistený medzi včelstvom L9 a ostatnými včelstvami ($P < 0,001$ pri použití referenčného génu *mrjp3* a $P < 0,05$ pri použití referenčného génu *mrjp4*) (Obr. 1).



Obr. 1: Relatívne expresné hladiny *defenzín1* mRNA v súboroch hláv dojčičiek a defensín1 peptidu vo včelích kašičkách v skúmaných včelstvách. Relatívne množstvá *defenzín1* mRNA normalizované voči *mrjp3* a *mrjp4* mRNA boli získané analýzou piatich RNA vzoriek pripravených z každého včelstva. Štatisticky významný rozdiel v expresných hladinách *defenzín1* mRNA existoval medzi včelstvom L9 a ostatnými včelstvami (* $P < 0,001$ pri použití referenčného génu *mrjp3* a ** $P < 0,05$ pri použití referenčného génu *mrjp4*). Hladiny defensín1 peptidu v kašičkách boli normalizované voči celkovému množstvu proteínov v kašičkách.

Relatívne hladiny *defenzín1* mRNA v hlavách dojčičiek sme porovnali s relatívnymi hladinami defensín1 peptidu vo VK odobratých z tých istých včelstiev. Hladiny defensín1 peptidu boli normalizované voči celkovému množstvu proteínov vo VK. V štyroch včelstvách boli relatívne hladiny mRNA a peptidu podobné, v dvoch včelstvách (L7 a L10) boli relatívne hladiny peptidu vyššie ako hladiny mRNA (Obr. 1).

Získané výsledky naznačujú, že expresia defensínu1 v dojčičkách by mohla byť kontrolovaná na úrovni expresie mRNA a aj peptidu.

Literatúra

1. Bachanová K., Klauđiny J., Kopernický J., Šimúth J. 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* 33: 259-269.
2. Bíliková K., Gusui W., Šimúth J. 2001. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie* 32: 275-283.
3. Chomczynsky P. & Sacchi N. 1987. Single-step RNA isolation from cultured cells or tissues. *Anal. Biochem.* 162: 156–159.
4. Evans J.D. 2004. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 85: 105-111.
5. Schägger H. & von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368–379.

Pod'akovanie

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

P. Capek

Chemický ústav, Oddelenie glykomateriálov, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, Bratislava

Sladkovodné *cyanobaktérie a riasy* predstavujú obrovskú skupinu mikroskopických organizmov, ktoré sú schopné kolonizovať všetky biotopy a teritória našej planéty. *Cyanobaktérie* reprezentujú vývojové štádium mikroskopických organizmov medzi baktériami a riasami, majú teda charakteristické črty oboch skupín. *Riasy* sú najnižšie rastlinné organizmy, ktoré môžu existovať ako jednobunkové formy, kolónie alebo zložité stielky. Líšia sa obsahom fytopigmentov, zložením bunkovej steny, typom zásobného polysacharidu a pod. Zatiaľ čo morské cyanobaktérie a riasy sa už dlhšiu dobu intenzívne študujú zo všetkých aspektov, sladkovodná mikroflóra je z hľadiska produkcie extracelulárnych slizov - biopolymérov pomerne málo preskúmaná oblasť. Významnou vlastnosťou sladkovodných rias a cyanobaktérií je ich schopnosť produkovať do okolia nízkomolekulové aktívne metabolity (toxíny) s antibakteriálnymi, antifungálnymi a inými doposiaľ neidentifikovateľnými účinkami a látky polymérneho charakteru - *viskózne slizy*.

Slizy sú zložené z homo - alebo heteropolysacharidov (obsahujú 6 až 10 rôznych monosacharidov), ktoré tvoria proteoglykánové resp. glykoproteínové komplexy v závislosti od konkrétneho druhu organizmu. Extracelulárne biopolyméry: rozdielne molekulové hmotností, štruktúry ako i fyzikálno-chemické vlastností [1,2]. Hrajú ochrannú, transportnú a zásobnú úlohu pre tieto organizmy. Zohrávajú dôležitú úlohu aj pri remediácii prostredia, pretože sú schopné viazať a tým eliminovať ionizované formy ťažkých kovov z vodného prostredia. Veľká variabilita monosacharidového zloženia ako i funkčných účinky skupín im dáva unikátne fyzikálno-chemické, reologické a biotechnologické vlastnosti so širokým rozsahom ich aplikácií.

Cieľom práce bola izolácia extracelulárnych polysacharidov resp. glykoproteínov z kultivačných médií sladkovodných rias a cyanobaktérií, ich charakterizácia z hľadiska výťažku, monosacharidového zloženia, obsahu urónových kyselín a proteínov.

Literatúra:

[1] RAY, B. BANDYOPADHYAY, S.S., CAPEK, P., KOPECKÝ, J., HINDÁK, F., LUKAVSKÝ, J. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48, 553-557.

[2] CAPEK, P., MATULOVÁ, M., COMBOURIEU, B. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 43, 390-393.

PodĎakovanie

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.*

NEW PHARMACODYNAMIC ACTIVITIES OF A. MONTANA GLYCOCONJUGATE

Arnica montana L. (Asteraceae) is an herbaceous perennial plant, which grows on mountain to alpine meadows, pastures and in light forests up to the alpine level. Arnica roots and particularly the dried flowers have been used for thousands of years in folk medicine for several purposes (Shenefelt, 2011). The extract of root had been used externally to treat of bruises and sprains, rheumatic pain, phlebitis, inflammation of the skin and as homeopathic preparations have been shown to be stimulant of immune system (Kouzi and Nuzum, 2007; Kawakami et al., 2011). In veterinary phytotherapy, *A. montana* is strongly recommended topically for the treatment of acute inflammations of tendons and joints, but also for cleaning and treatment of wounds of skin and mucous membranes, eczema and skin inflammations in several liquid preparations (tinctures, fluids) and ointments (Lans et al., 2007).

The influence of glycoconjugate isolated from medicinal plant *A. montana* (AM) in peroral doses 50, 75 and 100 mg.kg⁻¹ b.w. was investigated on cough reflex experimentally induced by chemical tussigen. It was shown that administration of AM conjugate in all tested doses resulted in statistically significant cough-suppressive effects (Fig. 1). The onset of antitussive effect was surprisingly slower when higher doses of AM (75 and 100 mg.kg⁻¹) were applied to guinea pigs. However, the cough suppression effect of AM was lower than that of codeine, control drug from group of centrally acting antitussives.

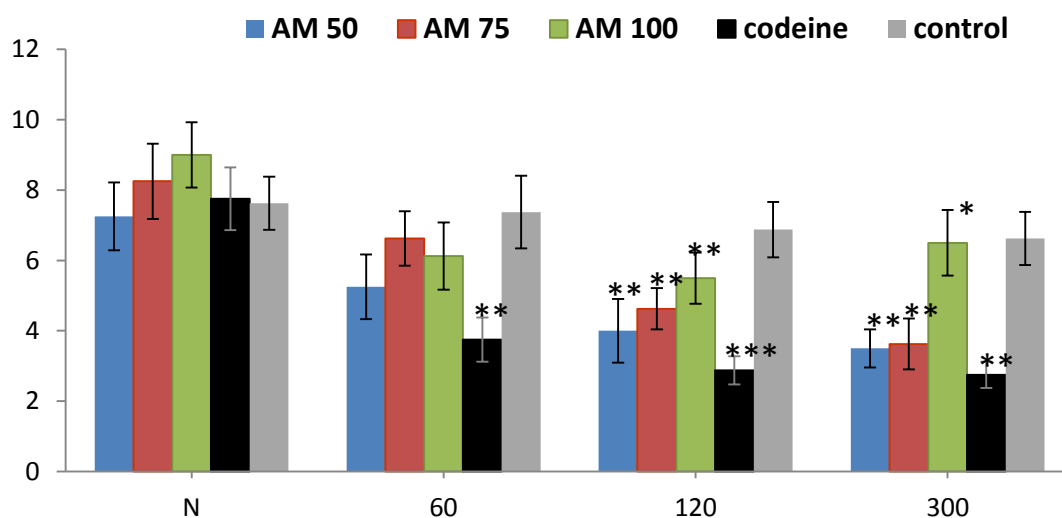


Fig. 1. The changes in number of coughing (NE) on administration of *A. montana* complex in three different doses (50, 75 and 100 mg/kg b.w.; AM 50, 75 and 100) compared to centrally acting antitussive drug codeine (10 mg/kg b.w.) measured in conscious guinea pigs. N represents baseline value before any agent administration. *p < 0.05; **p < 0.01 and ***p < 0.001 (t-test).

References

Kawakami AP, Sato C, Cardoso TN, Bonamin LV. Evid Based Complement Alternat Med. 2011; 2011:917541.

Kouzi SA, Nuzum DS. Am J Health Syst Pharm. 2007; 64(23): 2434-43.

Lans C, Turner N, Khan T, Brauer G, Boepple W. J Ethnobiol Ethnomed. 2007; 3:11.

Shenefelt PD. Herbal Treatment for Dermatologic Disorders. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011. Chapter 18.

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.

CHARACTERIZATION OF MATRICARIA CHAMOMILLA CONJUGATE

I. Pawlaczyk¹, P. Capek²

*¹Organic and Pharmaceutical Technology Group, Chemistry Department, Wrocław University of Technology,
Wybrzeże Wyspiańskiego 29, 50-370 Wrocław, Poland*

Matricaria chamomilla L. (Mc) is an annual herbaceous plant that belong to wide family of vascular plant, Asteraceae. It is known also as German chamomile, Hungarian chamomile, mayweed or wild chamomile. Although *Matricaria* is indigenous to Europe and northwest Asia it is nowadays naturalized in eastern Australia, North and South America and to a lesser extent in Africa [1-3]. Despite it is hard to cultivate its popularity reaches back to antiquity when Egyptians called it the “Flower of the Sun God”. In the past *Matricaria* was supposed by mankind to be different gods’ gift because of its medical properties [4].

Extract from *M. chamomilla* is traditionally use in the form of teas to treat a wide range of affection and diseases. Folks medicine recommends *Matricaria* extract in case of problems with sleeping, stress, stomach each, gastrointestinal disorders, pharyngitis, chicken pox and many others ailments. The oils performed from *Matricaria* are applied to cure acne, rashes, cuts, burns, insect bites and skin inflammations [6]. Modern medicine confirmed some healing properties of *Matricaria*.

The aim of this work was to isolate and characterize the glycoconjugate from flowering parts of medicinal plant *Matricaria chamomilla*. The glycoconjugate was isolated by alkaline extraction, followed by neutralization and multi-step extractions with organic solvents, dialysis and freeze-drying in multi-step processes. Dark brown *Matricaria* comjugate was composed of phenolics (36%) and carbohydrates (40-45%), and its molecular mass was estimated to be over million. Compositional analysis showed 21% of neutral saccharides and about 22-23% of uronic acids. Analysis of neutral carbohydrate part indicated the presence of arabinose (18.6%), xylose (29%), glucose (22%), galactose (19%), ribose (6.7%), mannose (3%), and lower amounts of fucose (0.3%) and rhamnose (0.5%) residues.

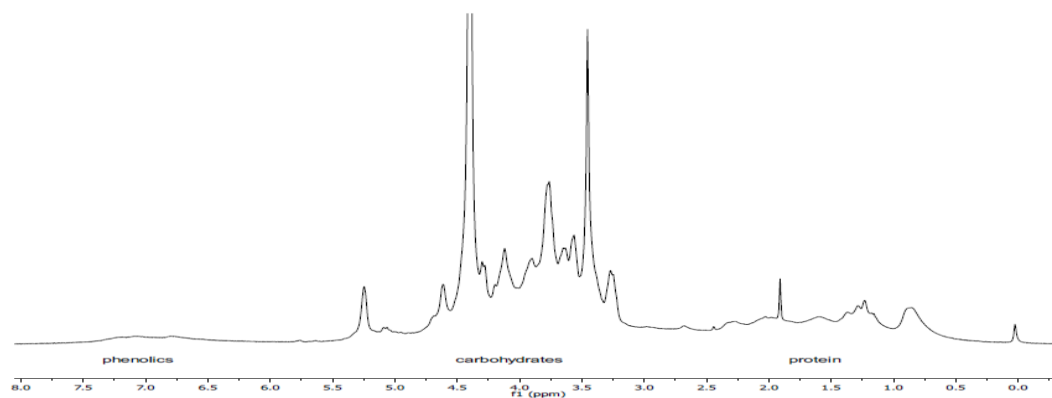


Fig.1. ¹H NMR spectrum of *Matricaria* glycoconjugate.

Chemical and spectroscopic (NMR and FT-IR) indicated a complex structure of *Matricaria* glycoconjugate. It was composed of phenolics, protein and carbohydrates (Fig.1).

References

- [1] McKay DL, Blumberg JB. *Phytotherapy research*. 2006; 20: 519-530
- [2] Petronilhoa S, Maraschinb M, Coimbraa MA, Rocha SM. *Industrial Crops and Products*. 2012; 40: 1-12.
- [3] Ross IA. *Medicinal Plants of the World*. New Jersey: Humana Press. 2001; 2: 285-308,
- [4] Hoffmann FW, Manning M. *Herbal Medicine and Botanical Medical Fads*. New York:

The Haworth Press. 2002; 44-45.

[5] Marleme J. Creating oils, soaps, creams, and herbal gels for your mind and body: Chamimile (Anthemis Nobilis, Matricaria chamomilla). Ocala: Atlantic Publishing Company. 2010.

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.

ANTICOAGULANT ACTIVITY AND CHEMICAL STUDIES OF FRAGARIA VESCA CONJUGATES

I. Pawlaczyk¹, P. Capek²

¹Organic and Pharmaceutical Technology Group, Chemistry Department, Wrocław University of Technology, Wybrzeże Wyspiańskiego 29, 50-370 Wrocław, Poland

The medicinal plant *Fragaria vesca* L. is commonly known as the Woodland strawberry or Wild strawberry. Woodland strawberry fruit is strongly flavored, and is cultivated and collected for domestic use as well as commercially as an ingredient into jams, sauces, liqueurs, cosmetics and components of natural medicines. Various beneficial biological effects of strawberry fruits consumption have been documented, such as an increase of the serum antioxidant capacity in humans [1,2], anticarcinogenic activity and antithrombotic effects [3,4]. Moreover, the water extract of leaves is a direct endothelium-dependent vasodilator [4]. These beneficial effects have been mostly attributed to the polyphenolic compounds found in large quantities in strawberry fruits [5]. Furthermore, dried and milled leaves are regularly distributed by herbal pharmacies and are commonly used in the general population for the preparation of a strawberry tea. However, strawberry leaves, as a source of bioactive compounds with potentially beneficial biological effects, have been largely overlooked by researchers.

The aim of this work was to isolate glycoconjugates from leaves of *Fragaria vesca* L. using different extraction steps and agents, to characterize their compositions in term of carbohydrates, phenolics and proteins contents. Further, their possible anticoagulant/ procoagulant activities on human blood plasma were investigated.

From the leaves of medicinal plant *F. vesca* by different extraction steps and agents followed by multi-steps two-phases organic extractions, dialysis and freeze-drying five glycoconjugates have been isolated. *Fragaria* fractions (Fv I-V) were recovered in 3.9–8.4% yields of starting air-dried material and on HPLC they showed relative broad molecule-mass distribution patterns with dominance of lower molecule-mass conjugates 9–14 000 (Table 1).

Table 1. Characterization of *Fragaria* conjugates Fv 1-5.

Fraction	Yield (wt %)	Carbohydr content (wt %)	Protein content (wt %)	Monosaccharide composition (%)								Uronic acid content (wt %)	GAE ± S.D. [μM]
				Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc		
Fv 1	8.4	21.1	1.1	15.2	0.4	n.d.	10.3	4.8	0.7	8.7	3.0	56.9	3 292
Fv 2	5.3	28.5	0.5	14.5	n.d.	n.d.	25.0	7.3	n.d.	16.9	12.1	24.2	1 166
Fv 3	4.5	31.7	1.3	17.8	0.4	n.d.	11.6	3.6	0.5	8.6	3.3	54.2	3 540
Fv 4	3.9	28.6	1.0	6.0	0.3	n.d.	10	3.0	1.0	8.0	2.0	70.2	2 791
Fv 5	4.1	29.0	1.0	Tr.	Tr.	-	12	Tr.	Tr.	13	2.0	72	2 300

Individual conjugates Fv I-V were composed of carbohydrates (21-32%), phenolics (1.2-3.5 mM) and protein (0.5-1.3%) indicating thus their complex structures. Compositional analyses of carbohydrate parts revealed the predominance of uronic acids (24-70%), arabinose (10-25%), galactose (9-17%) and rhamnose (3-18%) residues indicating thus the presence of rhamnogalacturonans/galacturonans associated with arabinogalactans in *Fragaria* glycoconjugates. Besides, the presence of glucose (3-

12%), xylose (4-7%) and mannose (1-4%) residues derived from other types of cell wall polymers have been determined in some conjugates, however, in lower amounts (Table 1).

Preliminary anticoagulant tests showed that all *Fragaria* isolates displayed a promising anticoagulant activity. Their anticoagulant activities were determined in the order Fv I > Fv III > Fv II > Fv IV. It has been found that all conjugates were active, however, the most active were shown to be Fv I and Fv III. Both most active conjugates showed the highest phenolic contents and similar amounts of uronic acids in carbohydrate parts. However, their anticoagulant activity was lower than that of heparin, the strongest anticoagulant agent widely used in a clinical practice.

References

- [1] Cao, G., Russell, R. M., Lischner, N., & Prior, R. L. *Journal of Nutrition*, 128, 2383–2390.
- [2] Carlton, P.S., Kresty, L.A., Siglin, J.C., Morse, M.A., Lu, J., Morgan, C., & Stoner, G.D. *Carcinogenesis*, 22, 441–446.
- [3] Naemura, A., Mitani, T., Ijiri, Y., Tamura, Y., Yamashita, T., Okimura, M., & Yamamoto, J. *Blood Coagulation Fibrinolysis*, 16, 501–509.
- [4] Mudnic, I., Modun, D., Brizic, I., Vukovic, J., Generalic, I., Katalinic, V., Bilusic, T., Ljubenkovic, I., & Boban, M. *Phytomedicine*, 16, 462-469.
- [5] Hannum, S.M. (2004). Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 1–17.

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.

Acetylácia alditolov

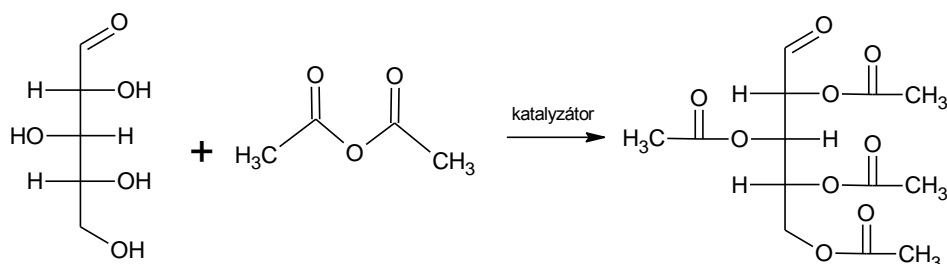
Bystrický S., Bystrický P., Vlčková S.

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

Priama analýza cukrov pomocou metód plynovej chromatografie nie je možná kvôli polárnym skupinám, neprchavosti a tepelnej nestabilite týchto látok. Vzorky sa teda musia prioritne upraviť – derivatizovať. Jednou z možností je acetylácia. Pri acetylácii monosacharidov, resp. oligo- a polysacharidov po hydrolyze, je vhodné použiť najprv redukciu. Ináč by na chromatografe figurovalo pomerne veľké množstvo pík (v rovnovážnom stave sa monosacharidy vyskytujú v rôznych cyklických a acyklických štruktúrach), avšak treba prihliadnuť aj nato, že redukciou môžeme aj stratiť informácie, prípadne výsledky budú skreslené. Napríklad redukciou fruktózy dostávame manitol a glucitol, redukciou glukózy rovnako ako gulózy dostaneme glucitol, ktorý môže byť tiež prítomný v spracovávanej vzorke. Metóda je vhodná aj na stanovenie umelých sladidiel v nápojoch, resp. potravinách po predchádzajúcej extrakcii. Výhodou acetylácie ako derivatizačnej techniky je stabilita vznikajúcich produktov a menšia citlivosť metódy na prítomnosť malého množstva vody.

Acetylácia sa najčastejšie robí pomocou anhydridu kyseliny octovej, ktorý reaguje s hydroxy- alebo amino- skupinami monosacharidov a výsledkom je ester, resp. amid. Reakcia býva katalyzovaná pyridínom, octanom sodným, alebo metylimidazolom. Problémom môže byť hneďnutie vzoriek, spôsobené reakciou medzi anhydridom a pyridínom za tepla v prítomnosti cukru, a výsledkom sú interferenčné chromatografické píky.

Pri chromatografickom delení alditol acetátov sa prejavujú okrem teploty topenia aj polárne interakcie so zvolenou stacionárnou fázou. Vhodnejšia je voľba polárnejších kolón, avšak tieto sú zase obmedzené teplotami (Maximálna teplota pre DB-5 je 350°C, zatiaľčo pre SP-2330 iba 250°C). Na polárnejších kolónach získame dobré rozdelenie pík, na nepolárnych sa však dajú vidieť aj acetylované di-, prípadne trisacharidy.



Pracovný postup

Hydrolyza → Redukcia → Acetylácia

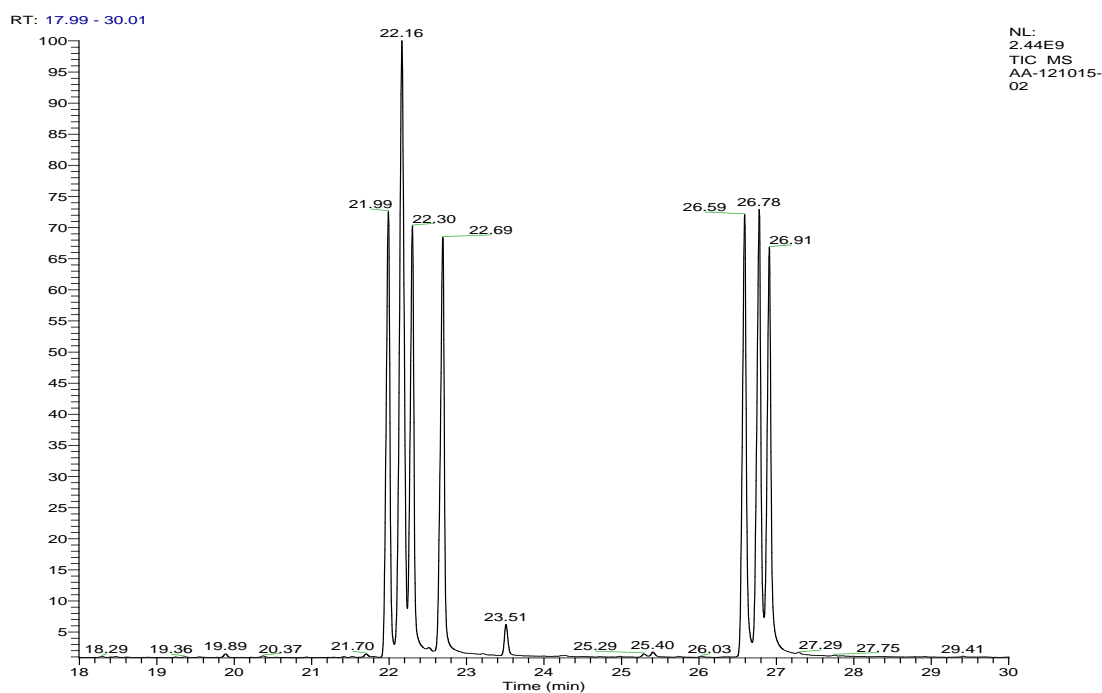
Chemikálie

Kyselina trifluoroctová (TFA), 0.5 alebo 2 M, Metanol, Bórhydrid sodný, 0.25 M v 1 M NH₄OH
 Amoniak 1 M, Kyselina octová 10% v metanole, Anhydrid kyseliny octovej (Ac₂O), Pyridín, Toluén,
 Voda, Chloroform (Etylacetát)

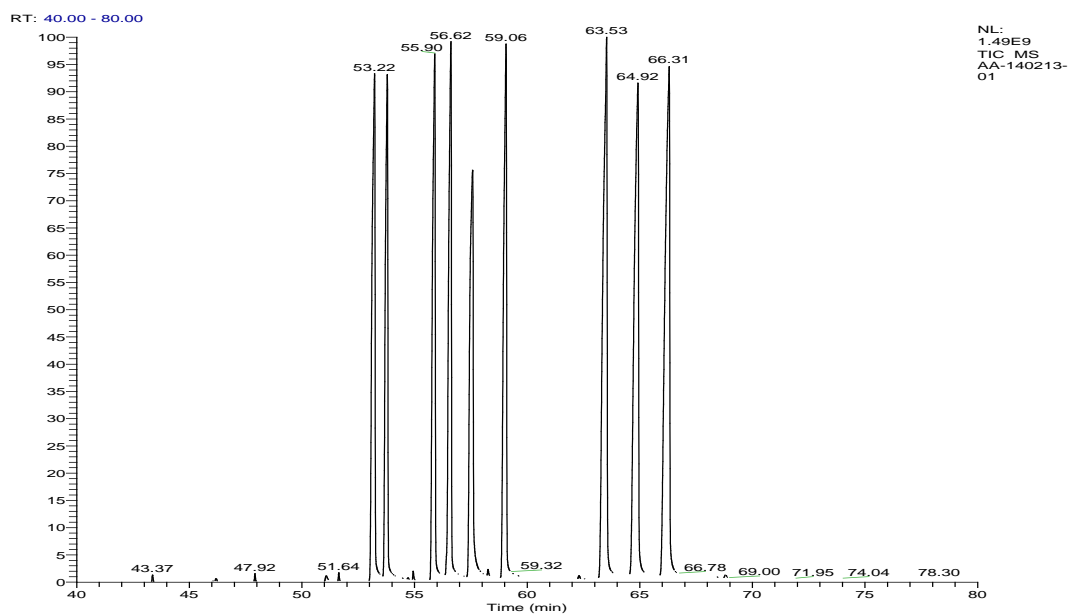
Postup

1. Navážiť 1-2 mg vzorky a rozpustiť ju v 1 mL vody. Odpipetovať 0.2 mg, ~1 μmol vzorky do 13 x 100 mm uzatvárateľnej skúmavky.
 Je možné pridať 50 μg interného štandardu napríklad xylózy alebo iného vhodného cukru.
2. Hydrolyzovať v cca 0.3 mL 2M TFA pri 120°C 2h alebo v 0.5M TFA pri 100° 12-16 h. (Príliš málo tekutiny bude vytvárať kvapky na stene a nie na spodku skúmavky, preto radšej pipetovať > 0.3 mL)

3. Odpariť dosucha v prúde stlačeného vzduchu alebo N₂, pridať 0.5mL MeOH, a odpariť. Ešte raz zopakovať. (Malé množstvo TFA sa neodparí, ale nemá vplyv na ďalšie kroky.)
4. Na redukciu použiť 0.3 mL čerstvo pripraveného roztoku NaBH₄ v NH₃ a nechať reagovať 30 min pri 20°C. (Tvorí sa bublinky na spodku za normálnych okolností, spôsobuje nadbytok NaBH₄, avšak v NH₃ nebývajú vidieť. Roztok NaBH₄ v NH₃ je stabilný asi týždeň. Nedostatočné množstvo BH₄⁻ indikujú píky s dominantnými m/z 115 a 157, ktoré odpovedajú cyklickým acetátom.)
5. Redukciu zastaviť pridaním 0.5 mL 10% kyseliny octovej v MeOH a odpariť dosucha. Pridať 0.5 mL 10% kyseliny octovej v MeOH a odpariť do sucha. Zopakovať 1-2 krát. Nakoniec pridať 0.5mL MeOH a odpariť do sucha. Zopakovať 1-2 krát. (Kyselina octová vytvára s NaBH₄ kyselinu boritú, ktorú treba odstraňovať zo zmesi kyslým metanolom vo forme metylesterov alebo metylborátov. Zvyšková kyselina boritá môže vytvárať s alditolmi rôzne formy komplexov a obsádzať reakčné miesta pre acetyláciu. V niektorých prípadoch je vhodné zvážiť použitie NaBD₄.)
6. Na acetyláciu pridať 0.1 mL Ac₂O a 0.1 mL pyridínu, zohrievať na 100°C. Reakcia prebieha 20 min. Ak sa vyskytne problém, treba pridať 50 µL vody.
7. Acetylovanú zmes odpariť dosucha a pridať 0.5 mL toluénu, následne znovu odpariť a 1 krát zopakovať.
8. Nasleduje extrakcia s chloroformom alebo etyl acetátom : Pridať 1ml vody a nechať stáť cca 30 minút. Pridať 2 ml chloroformu alebo etyl acetátu. Silne zamiešať a následne centrifugovať pri 2,500 x g, 4°C po dobu 5 minút. Odobrať spodnú organickú vrstvu do čistej skúmavky a vysušiť v prúde dusíka.
9. Nariediť v chloroforme a nastreknúť do plynového chromatografu.



Obr č.1: Chromatogram alditol acetátov na kolóne TG-SQC, 30mx0,32mm, 0,10µm: Poradie píkov: Rha, Fuc, Ara, Xyl, Man, Gal, Glu. Chromatogram nameraný na GC Trace GC Ultra s MS ITQ 900 (Thermo Scientific).



Obr č.2: Chromatogram alditol acetátov na kolóne RT-2330, 105mx0,32mm, 0,10 μ m: Poradie píkov: Rha, Fuc, Rib, Ara, Xyl, Man, Gal, Glu. Chromatogram nameraný na GC Trace GC Ultra s MS TSQ Quantum XLS (Thermo Scientific).

Pod'akovanie

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

Hmotnostná spektrometria alditol acetátov

Bystrický S., Bystrický P., Vlčková S.

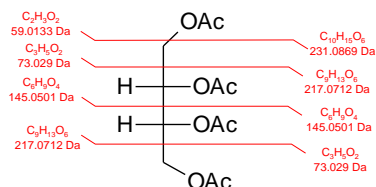
Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

Alditol acetáty sa primárne merajú plynovou chromatografiou. Najčastejším typom ionizácie pri spojení GC a MS je EI (electron impact). V spektrách obvykle absentuje molekulový pík. Nárast m/z oproti alditolom je 42 na každú OH skupinu. Pre full scan je vhodné použiť rozsah m/z 40-500. Charakteristická je strata acetylového fragmentu m/z 43 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}^+$). Základné EI fragmenty vo full scane vznikajú neutrálnymi stratami CH_3CO_2 (m/z 59), CH_3COOH (m/z 60), CH_2CH_2 (m/z 42), alebo dochádza k štiepeniu medzi C-C uhlíkmi v reťazci alditolu. Typické m/z píky štiepenia pozdĺž uhlíkového reťazca sú 145, 217, 289, 361, ...

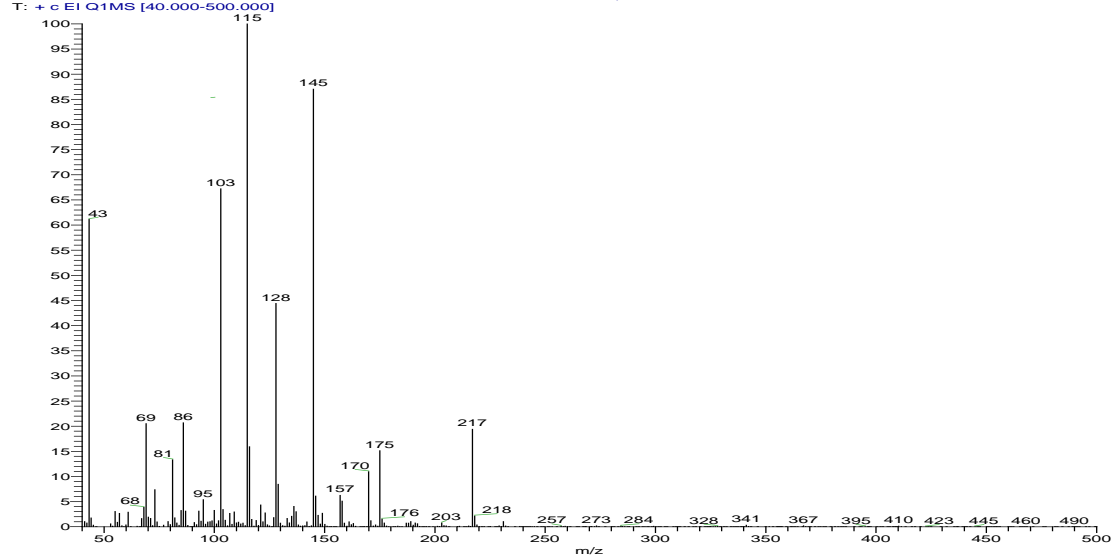
Spektá alditolov s rovnakým počtom uhlíkov vyzerajú podobne, líšia sa iba mierne v intenzitách.

Všetky spektrá boli merané na hmotnostnom spektrometri typu trojitého kvadrupólu s EI ionizáciou TSQ Quantum XLS (Thermo Scientific).

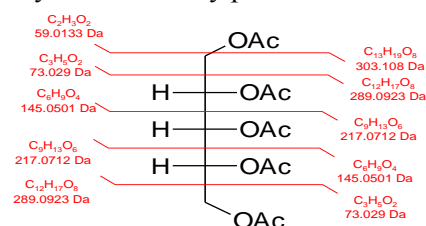
Acetylované alditoly tetróz



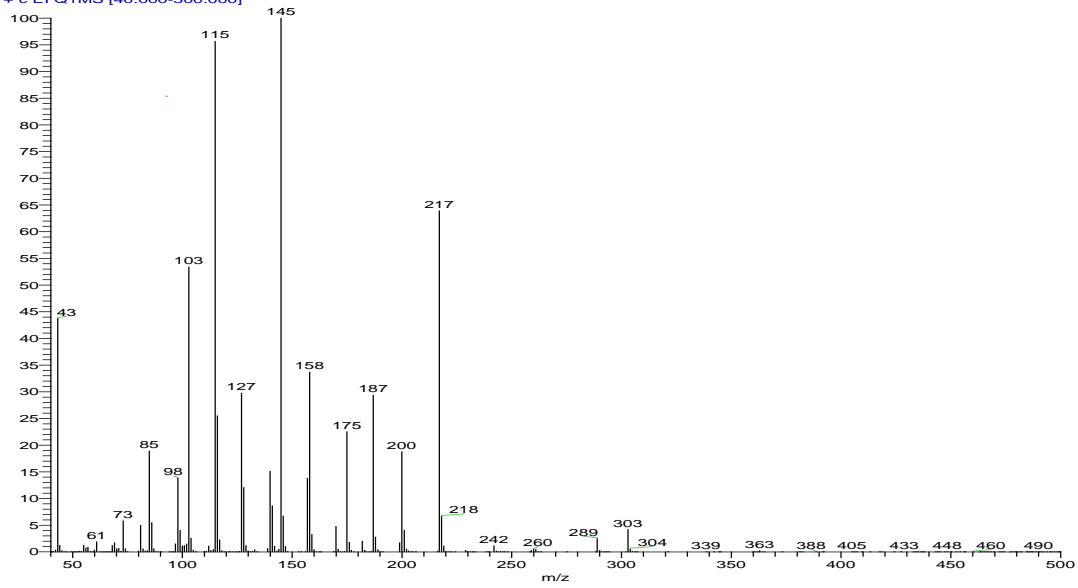
AA-140213-02 #5466-5494 RT: 50.30-50.40 AV: 29 SB: 76 50.42-50.55 , 50.14-50.28 NL: 6.72E6



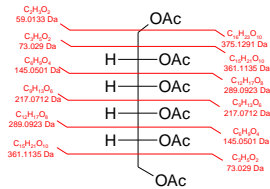
Acetylované alditoly pentóz



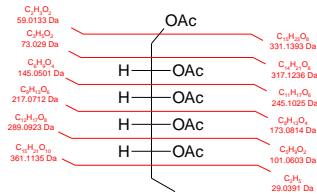
AA-140213-01 #6930-6981 RT: 55.73-55.92 AV: 52 SB: 221 55.95-56.20 , 55.16-55.71 NL: 1.35E8
T: + c EI Q1MS [40.000-500.000]



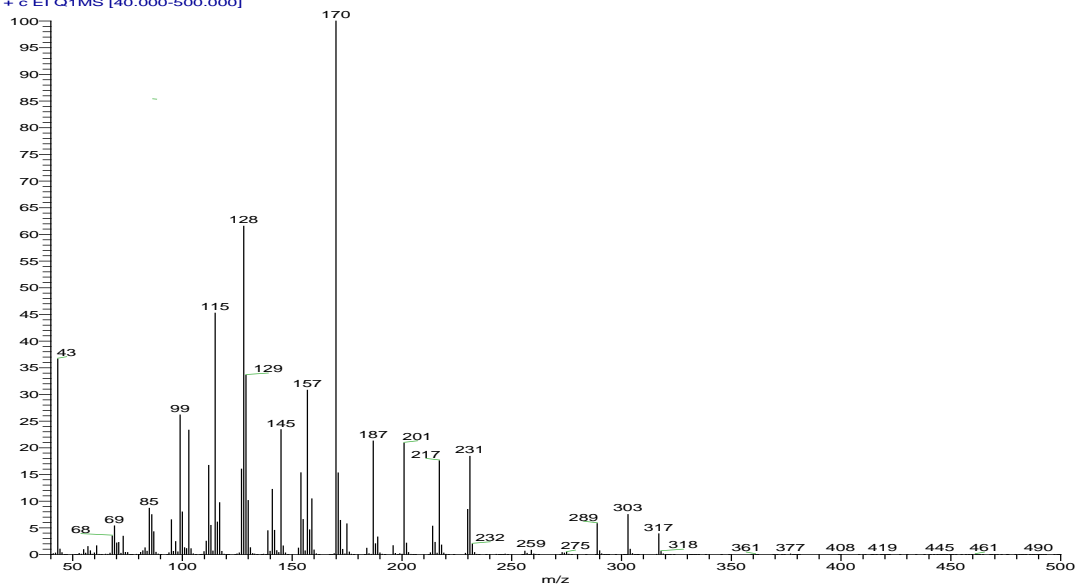
Acetylované alditoly hexóz



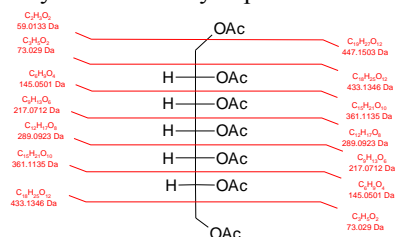
Acetylované alditoly deoxyhexóz



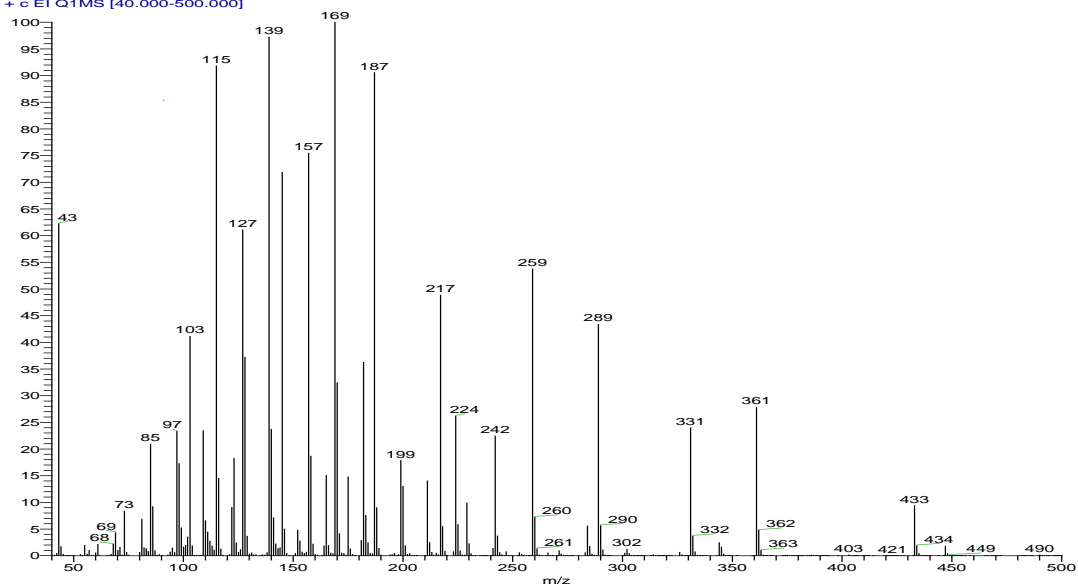
AA-140213-01 #6197-6263 RT: 53.01-53.25 AV: 67 SB: 188 53.25-53.48 , 52.57-53.03 NL: 1.07E8
T: + c EI Q1MS [40.000-500.000]



Acetylované alditoly heptóz



AA_140123-01 #20781-20947 RT: 77.11-77.72 AV: 167 SB: 1029 77.76-79.29 , 74.62-76.90 NL: 2.85E7
 T: + c EI Q1MS [40.000-500.000]



PodĎakovanie

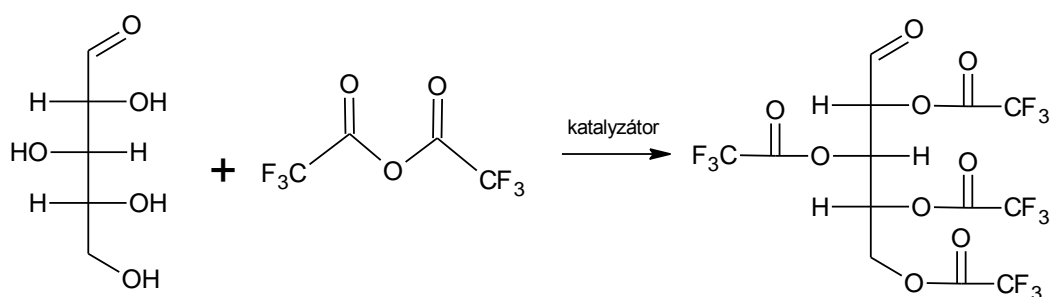
Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Trifluóracetylácia alditolov

Bystrický S., Bystrický P., Vlčková S.

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

Na analýzu cukrov pomocou metód plynovej chromatografie je potrebné zvýšiť ich prchavosť. Najzákladnejšie polárne skupiny cukrov sú hydroxyly, ktoré vytvárajú vodíkové väzby medzi sebou a spôsobujú nízku prchavosť. Trifluóracetyláciou sacharidov získavame trifluóracetyly cukrov, ktoré sú jednými s najprchavejších derivátov cukrov. Zároveň sa však na kolóne delia nielen na základe teplôt varu, ale aj interagujú s fázou na kolóne a obzvlášť na veľmi polárnych kolónach možno dosiahnuť ich dobrú separáciu. Tieto deriváty sú oproti trimetylsilylovým derivátom stabilnejšie. Nevýhodou je vysoká reaktivita derivatizačných činidiel a uvoľňujúcej sa kyseliny trifluóroctovej. Prítomnosť akýchkoľvek nečistôt sa prejaví píkmí navyše. Zároveň pri analýze je potrebné vyhnúť sa korozívnym materiálom (vrátane inletu do GC kolóny a použitých tesnení pre kolónu) a prístroj bude vyžadovať častejšie kontroly a údržbu. Po derivatizácii je nutné zvyškový anhydrid odstrániť a prípadne aj extrahovať vzniknuté deriváty dichlórmetánom s vodou.



Pracovný postup

Hydrolyzá —> Redukcia —> Trifluóracetylácia

Chemikálie:

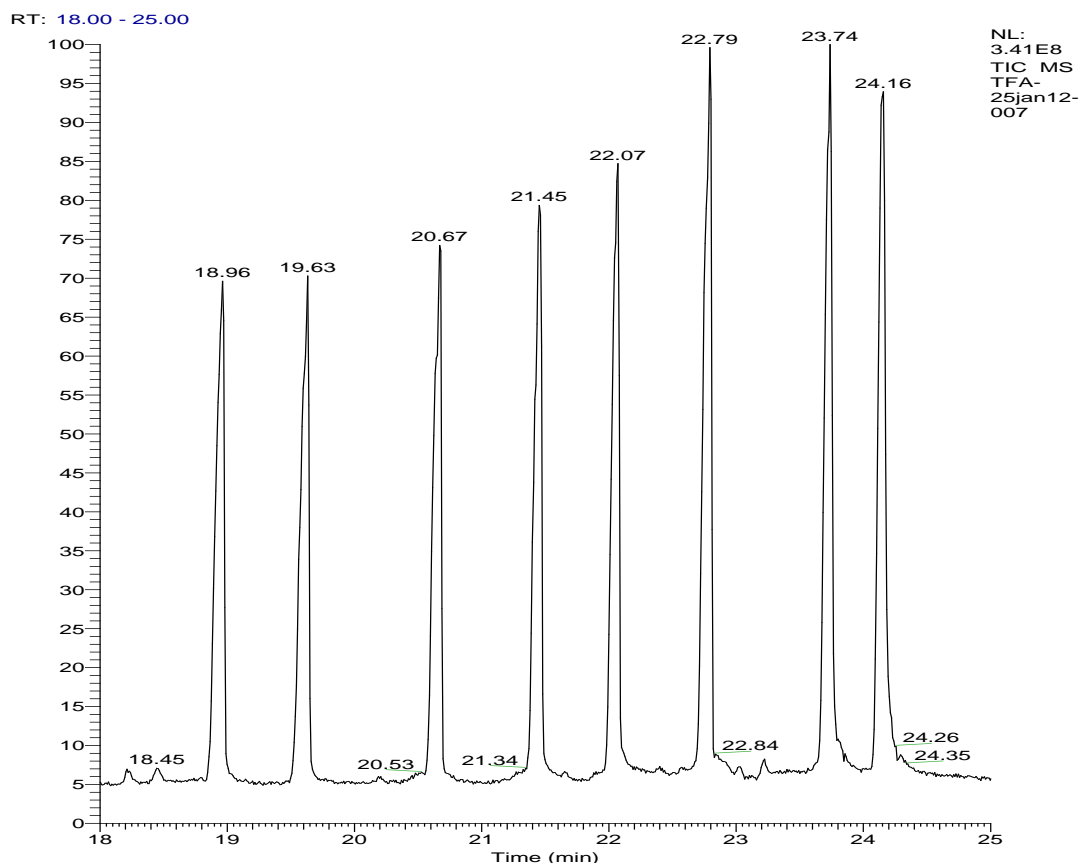
Kyselina trifluóroctová (TFA), 0.5 alebo 2 M, Metanol, Bórhydrid sodný, 0.25 M v 1 M NH₄OH, Amoniak 1 M, Kyselina octová 10% v metanole, Anhydrid kyseliny trifluóroctovej, Pyridín, Acetonitril, Voda, Chloroform (Etylacetát)

Postup

1. Navážiť 1-2 mg vzorky a rozpustiť ju v 1 mL vody. Odpipetovať 0.2 mg, ~1 μmol vzorky do 13 x 100 mm uzatvárateľnej skúmavky. Je možné pridať 50 μg interného štandardu napríklad xylózy alebo iného vhodného cukru.
2. Hydrolyzovať v cca 0.3 mL 2M TFA pri 120° po dobu 2h alebo v 0.5M TFA pri 100° 12-16 h. (Príliš málo tekutiny bude vytvárať kvapky na stene a nie na spodku skúmavky, preto radšej pipetovať > 0.3 mL)
3. Odpariť dosucha v prúde stlačeného vzduchu alebo N₂, pridať 0.5mL MeOH, a odpariť. Ešte raz zopakovať. (Malé množstvo TFA sa neodparí, ale nemá vplyv na ďalšie kroky.)
4. Na redukciu použiť 0.3 mL čerstvo pripraveného roztoku NaBH₄ v NH₃ a nechať reagovať 30 min pri 20°C.
5. Redukciu zastaviť pridaním 0.5 mL 10% kyseliny octovej v MeOH a odpariť dosucha. Pridať 0.5 mL 10% kyseliny octovej v MeOH a odpariť do sucha. Zopakovať 1-2 krát. Nakoniec pridať 0.5mL MeOH a odpariť do sucha. Zopakovať 1-2 krát. (Kyselina octová vytvára s NaBH₄ kyselinu boritú, ktorú treba

odstraňovať zo zmesi kyslým metanolom vo forme metylesterov alebo metylborátov. Zvyšková kyselina boritá môže vytvárať s alditolmi rôzne formy komplexov a obsádzať reakčné miesta pre následnú derivatizáciu. V niektorých prípadoch je vhodné zvážiť použitie NaBD₄.)

6. Derivatizovať s 50 µL anhydridu kyseliny trifluóroctovej a 50 µL acetonitrilu, pridať katalyzátor a reakcia beží pri 80 °C a 4 min. Nechať vychladnúť na 10 minút a odpariť dosucha v prúde dusíka.
7. Nariediť do chloroformu a nastreknúť 1µL do GC.



Obr. č.1: Chromatogram alditol trifluóracetátov na kolóne CYCLOSIL-B, 30m x 0.25mm, 0.25µm: Poradie píkov: Rha, Fuc, Rib, Ara, Xyl, Man, Glu, Gal. Chromatogram nameraný na GC Trace GC Ultra s MS ITQ 900 (Thermo Scientific).

Podakovanie

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

Hmotnostná spektrometria trifluóracetátov alditolov

Bystrický S., Bystrický P., Vlčková S.

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

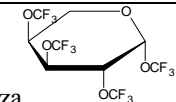
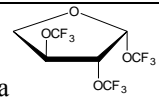
Hmotnostná spektrometria je dôležitým nástrojom štúdia štruktúry sacharidov. Umožňuje merať a identifikovať aj jednotlivé izoméry a anoméry cukrov. Výhoda použitia trifluóracetylácie ako derivatizačnej techniky pre GC/MS aplikáciu je existencia molekulových pík v EI spektrách (narozdiel od alditol acetátov), relatívna jednoduchosť EI spektier (narozdiel od trimetylsilyl derivátov) a kvôli prítomnosti fluóru aj vysoká citlivosť.

Nárast m/z oproti alditolom je pomerne veľký, 96 jednotiek na každú derivatizovanú skupinu. Pre full scan je vhodné použiť rozsah m/z 50-800 (ktorý nemusí byť dosiahnuteľný na každom prístroji).

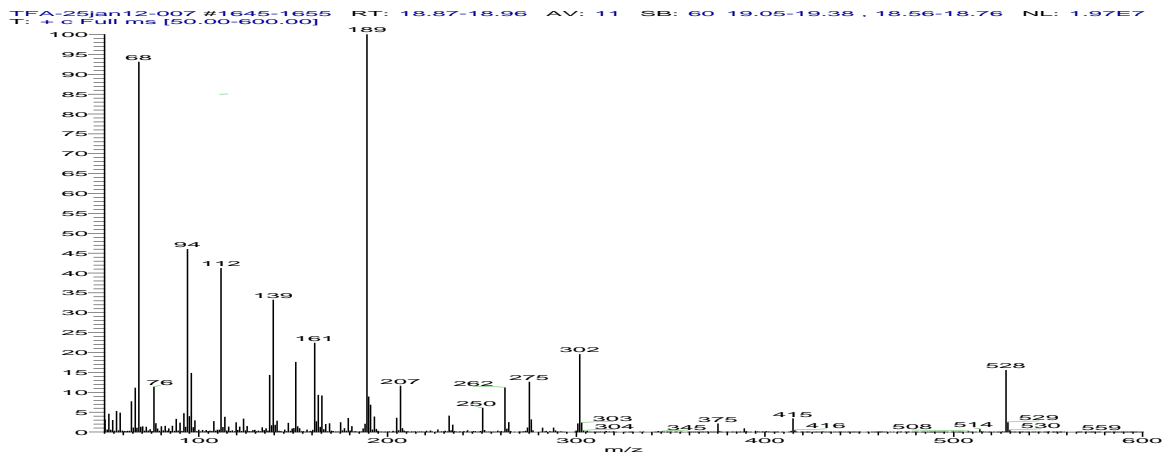
Charakteristická je strata fluóru M-19 (F), trifluómetylu M-69 (CF₃), trifluóracetylového fragmentu m/z 97 (CF₃C=O⁺), strata kyseliny trifluórooctovej ako iónu (CF₃COO⁺) M-113, resp. ako neutrálana strata M-114 (CF₃COOH) a štiepenie pozdĺž reťazca M- 127 (CF₃COOCH₂).

Výhodou je použitie trifluóracetylácie pri štúdiu priestorového usporiadania sacharidu. Napríklad fragmentačné mechanizmy aldohexóz sú v nasledujúcej tabuľke:

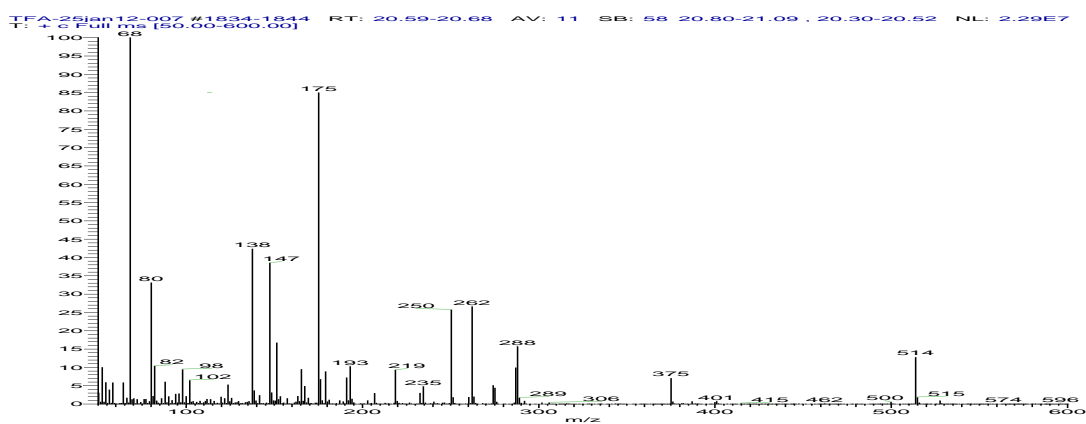
Tabuľka č.1: Typické fragmenty aldohexóz vo forme pyranóz a furanóz

 Pyranóza		 Furanóza	
Fragment	m/z	Fragment	m/z
M-F	641		
M-CF ₃ CO	563		
M-CF ₃ COO	547	M-CF ₃ COO	547
M-CF ₃ COOCH ₂	533		
547-CF ₃ COOH	433	547-CF ₃ COOH	433
M-2CF ₃ COOH	432	M-2CF ₃ COOH	432
M-CF ₃ COOH-CF ₃ COOCH ₂	419		
432-F	413	432-F	413
		M-CF ₃ COOCH ₂ -CH-OOCCF ₃	407
M-CF ₃ COOH-CF ₃ COOCHO	404		
M-CF ₃ COOH-CF ₃ COOCH ₂ CHO	390		
		407-CO	379
432-CF ₃ COOH	319	432-CF ₃ COOH	319
432-CF ₃ COOCH ₂	305	432-CF ₃ COOCH ₂	305
		407-CF ₃ COOCH ₂	293
432-CF ₃ COOCHO	290		
404-CF ₃ COOCH ₂	277		
CF ₃ COO-CH=CH-CH=OOCCF ₃	265	CF ₃ COO-CH=CH-CH=OOCCF ₃	265
		CF ₃ COO-CH ₂ -CH=OOCCF ₃	253

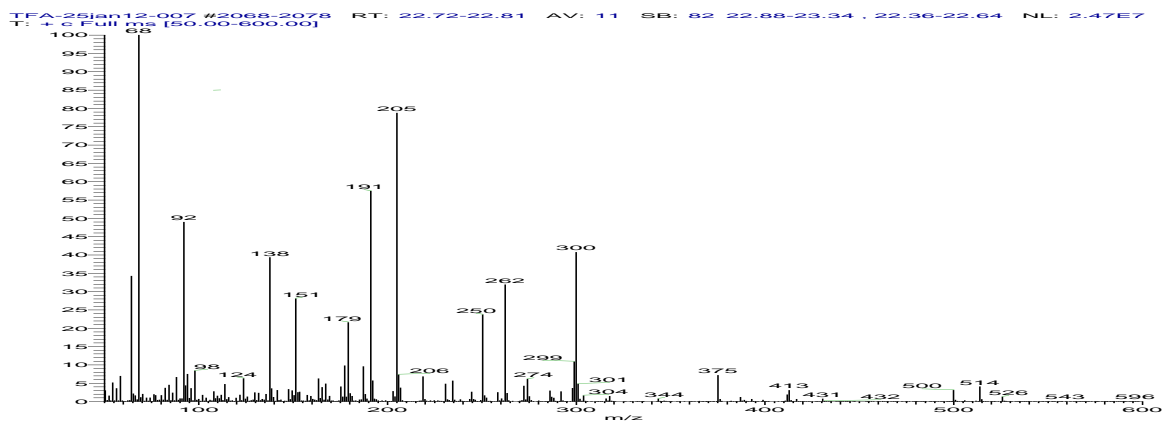
Všetky spektrá boli merané na hmotnostnom spektrometri typu iónovej pasce s EI ionizáciou ITQ 900 (Thermo Scientific).



Obr. č.1: Spektrum trifluóracetátu ramnitolu



Obr. č.2: Spektrum trifluóracetátu xylitolu



Obr. č.3: Spektrum trifluóracetátu galaktitolu

Pod'akovanie

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

Metylačná analýza sacharidov pomocou GC

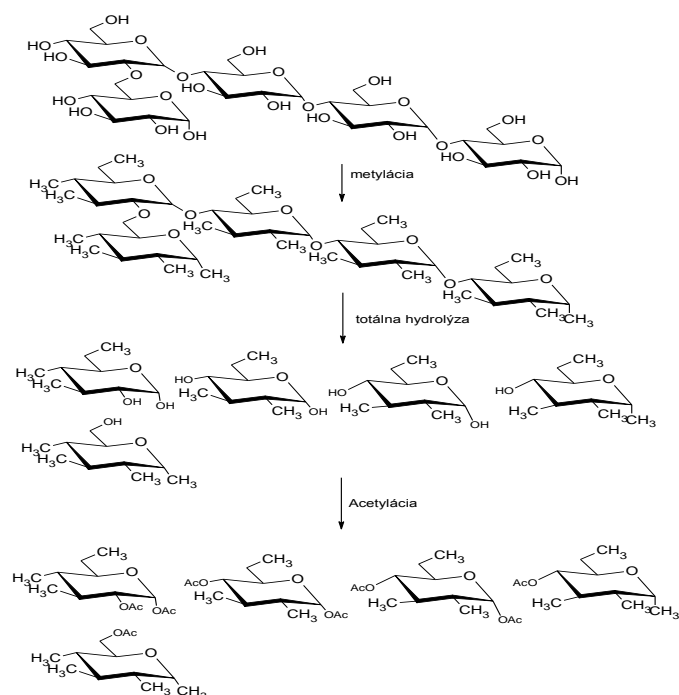
Bystrický S., Bystrický P., Vlčková S.

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

Sacharidy sa vyskytujú v živých organizmoch v najrôznejších podobách a zastávajú v nich rôzne funkcie. Sú jednou zo základných zložiek potravy, slúžia ako zdroj energie biologických procesov, slúžia ako informačné molekuly pri regulácii bunkových procesov, sú stavebnými jednotkami rastlín, ... Molekuly, v ktorých je sacharid naviazaný na proteín sa nazývajú glykoproteíny, podobne pri lipidoch sú to glykolipidy. Rôznorodot' funkcie sacharidov súvisí so schopnosťou monosacharidov viazať sa do reťazcov pomocou glykozidických väzieb. Sacharidy môžu existovať v rôznych veľkostiach (monosacharidy až polysacharidy s veľkosťou 1MDa), môžu vytvárať lineárne reťazce, ale aj sa vetviť a vytvárať dokonca trojdimenzionálne štruktúry. Monosacharidy tvoriace polysacharid alebo oligosacharid sa môžu vyskytovať vo viacerých usporiadaniach (pyranóza, furanóza, α -, β -, acyklické štruktúry) a môžu obsahovať okrem hydroxylových skupín aj iné (aminosacharidy, urónové, aldónové, či aldarové kyseliny, sialové kyseliny).

Základným krokom k pochopeniu štruktúr je pochopenie väzieb medzi jednotlivými jednotkami – tzv. linkage analýza. Princípom tejto metódy je permetylácia sacharidu, teda nahradenie vodíkov na voľných hydroxyloch v reťazci metylmi. Následne sa prevedie hydrolyza glykozidických väzieb v sacharide a dostávame monosacharidy. (alebo podľa potreby oligosacharidy). Uvoľnené –OH skupiny, ktoré tvorili glykozidickú väzbu sa následne derivatizujú, najčastejšie acetylujú. Tento postup sa používa hlavne v spojení GCMS. Kvôli anomérii a zjednodušeniu vyhodnocovania je vhodné monosacharidy pred derivatizáciou najprv redukovať na príslušné alditoly.

Výber kolóny na plynovú chromatografiu závisí od typu derivatizácie. Pri permetylovaných alditol acetátoch, resp. trifluóracetátoch sú výhodnejšie stredne až silne polárne kolóny. Pri permetylovaných trimetylsilylovaných alditoloch sa naopak, používajú nepolárne kolóny. Pri veľmi komplikovaných zmesiach sacharidov sa môžu píky (a spektrá) prekrývať a je niekedy výhodné použiť viac druhov derivatizácií a výsledky skombinovať.



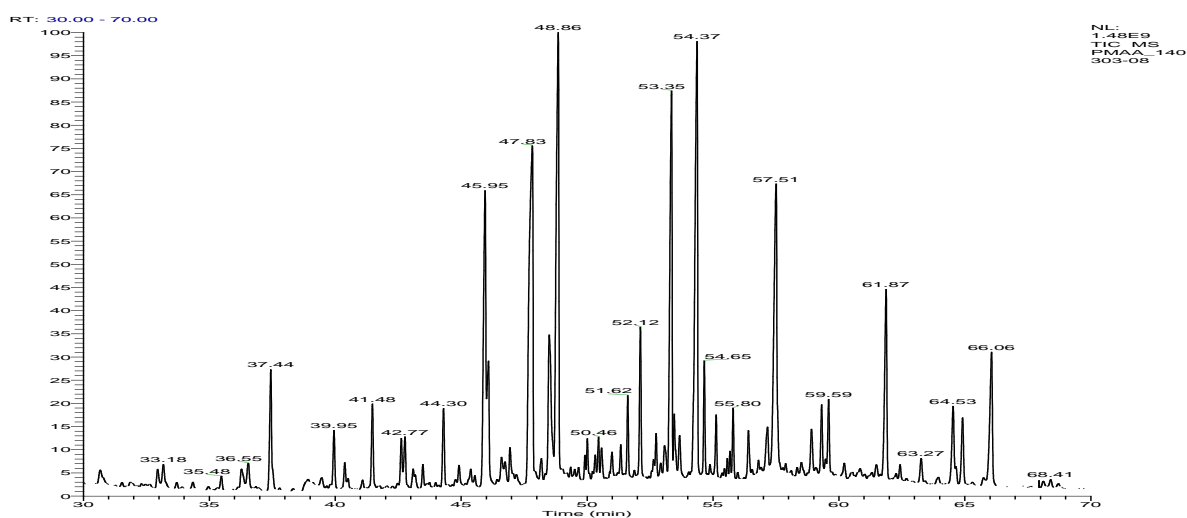
Nasledujúci postup je vhodný na permetyláciu v malých množstvách (<50 µg).

Chemikálie: Metyl jodid, Dimetylsulfoxid (DMSO), Hydroxid sodný, Kyselina chlorovodíková 1%

Postup

1. Potrebné množstvo roztoku monosacharidov (cca 50µg) premiestniť do malej, ideálne kónickej, sklenenej skúmavky a odpariť do sucha.
2. Malé množstvo NaOH s DMSO rozomlieť v achátovej miske. Je vhodné pridať cca 1% destilovanej vody. Prídavok vody do reakčnej zmesi potláča vznik oxidačných biproduktov.
3. Odpipetovať cca 50 µL reakčnej zmesi z bodu 2. Do skúmavky s monosacharidmi. Je vhodné na pipetovanie použiť väčší priemer špičky pipety, alebo odstrihnúť/zrezať kúsok zo špičky.
4. Pridať 50 µL metyl jodidu.
5. Skúmavku dobre uzavrieť a miešať 15 minút pri vysokých otáčkach (napr. na vortexe) pri laboratórnej teplote. Treba počkať minimálne 15 minút aj napriek zbeleniu vzorky.
6. K reakčnej zmesi pomaly pridať 1 ml 1% HCl a zmes prečistiť pomocou SPE na náplniach Sep-Pak C-18 (50 mg, syringe type:1 cc). V prípade použitia SPE, treba skontrolovať, prípadne upraviť pH roztoku. Malo by byť medzi 4 a 7. Alkalický roztok by eluoval aj C18 skupiny z náplňovej kolónky.
7. Premyť SPE 3ml destilovanej vody a následne eluovať 80% acetonitrilom. Eluent odpariť dosucha.

Poznámka: Pri reakcii používajte ochranné pomôcky. Metyl jodid je jedovatý. Nepoužívajte latexové rukavice, cez ktoré metyl jodid prechádza. Vhodnejšie sú nitrilové alebo polychloroprénové.



Obr č.1: Chromatogram zmesi permetylovaných alditol acetátov na kolóne RT-2330, 105mx0,32mm, 0,10µm. Chromatogram nameraný na GC Trace GC Ultra s MS TSQ Quantum XLS (Thermo Scientific).

Podakovanie

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

Metylačná analýza sacharidov pomocou MALDI MS

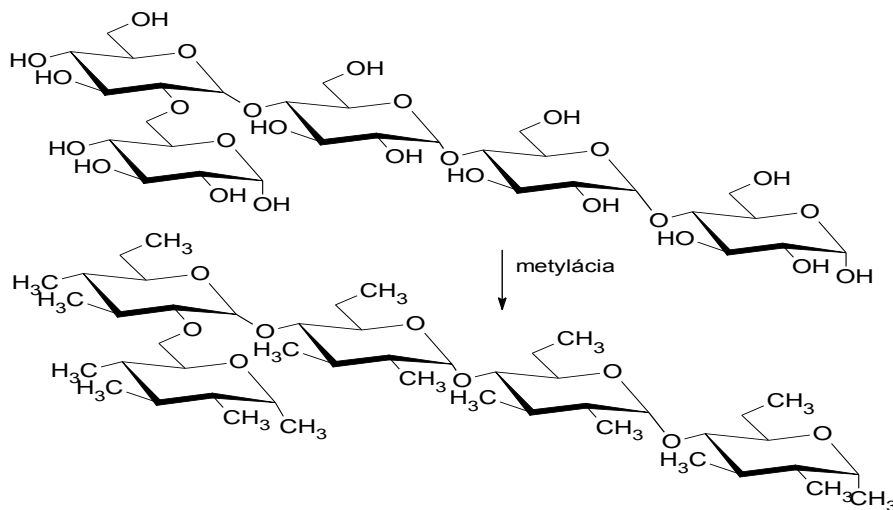
Bystrický S., Bystrický P., Vlčková S.

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

MALDI MS (matrix assisted laser/desorption ionization mass spectrometry) je jednou z novodobějších techník, ktorá si tiež našla významné miesto v analýze sacharidov. Napriek tomu, že GC/MS analýzy vedené rôznymi spôsobmi solvolýzy, derivatizácie atď. poskytujú pomerne dobré informácie, stále však neriešia všetko. Tieto metódy sú pomerne pracné a nie sú univerzálne pre každý skúmaný cukor. Napr. hydrolyza materiálu so stromov bude vyžadovať iné podmienky ako hydrolyza sacharidov z ľudských tkanív. Existencia amino- a karboxylových skupín vo vzorke vyžaduje špeciálnejší prístup (napríklad chránenie týchto skupín) derivatizácie. EI spektrá týchto derivátov silne fragmentujú a môžu byť komplikované, a navyše často v nich absentuje molekulový pík.

Uprednostniť jednu alebo druhú techniku však nemá zmysel, pretože oblasť skúmania sacharidov je veľmi komplexná a iba kritickým pohľadom na výsledky jednotlivých metód (nielen týchto dvoch) a kombinovaním výsledkov získaných jednotlivými metódami, sa dá dospieť k poznaniu štruktúry sacharidov.

MALDI MS je oproti týmto pracovným analýzám pomerne jednoduchá technika. V spojení s tandemovým zariadením môžeme takto veľmi ľahko získať ďalšie informácie. Fragmentami v tandemových prístrojoch sú obvykle B,Y cez glykozidickú väzbu. Problémom býva neochota sacharidov ionizovať a spektrá bývajú málo intenzívne. Vyššie sacharidy už obvykle bez naviazania dobre ionizujúcej skupiny ani nevidíme.



Chemikálie

Metyl jodid

Dimetylsulfoxid (DMSO)

Hydroxid sodný

Voda

Chloroform

Acetonitril

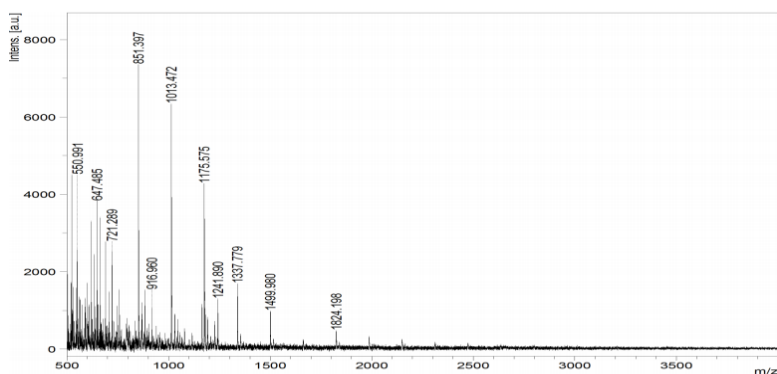
Voda

2,5- dihydroxybezoová kyselina (DHB matrica) nasýtený roztok : 10mg DHB/1ml ACN:H₂O, 30:70, v/v

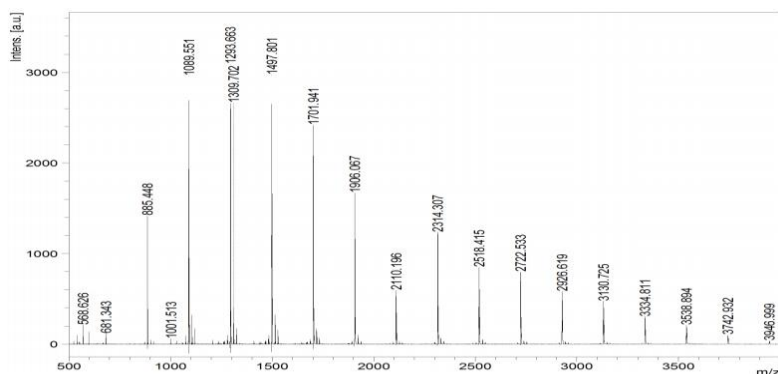
Postup

1. Cca 1mg vzorky sacharidov navážiť do sklenenej vialky.
2. Pridať 200 μ L DMSO a vzorku rozpustiť.
3. Rozomlieť malá množstvo NaOH (1 peleta) v achátovej miske a pridať ku vzorke
4. Pridať pomocou pipety 150 μ L metyl jodidu.
5. Do skúmavky vložiť magnetické miešadlo a pri laboratórnej teplote miešať do zmeny farby (cca 20 minút). Či je vzorka dobre nametylovaná sa dá zistiť z IČ spektier.
6. Reakcia sa zastaví pridaním vody. Podľa požiadaviek ďalších analýz, bude možno nutné upraviť pH.
7. Vzniknuté produkty sa následne extrahujú chloroformom a odparia do sucha.
8. Pridá sa 1ml roztoku ACN:H₂O, 30:70, v/v a zmieša sa s DHB matricou 1:1
9. Spotuje sa 0.5 ml na ground steel platničku.

Poznámka: Pri reakcii používajte ochranné pomôcky. Metyl jodid je jedovatý. Nepoužívajte latexové rukavice, cez ktoré metyl jodid prechádza. Vhodnejšie sú nitrilové alebo polychloroprénové.



Obr č.1: Hmotnostné spektrum hexaoligosacharidov namerané na MALDI TOF/TOF UltrafleXTreme, Bruker.



Obr č.2: Hmotnostné spektrum permetylovaných hexaoligosacharidov namerané na MALDI TOF/TOF UltrafleXTreme, Bruker.

Podakovanie

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

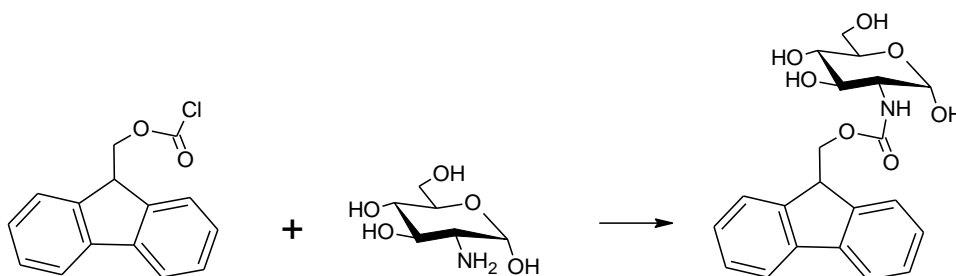
Derivatizácia aminosacharidov pre HPLC s UV detekciou

Bystrický S., Bystrický P., Vlčková S.

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

Sacharidy môžu existovať vo veľmi rôznorodých štruktúrach, či už z hľadiska izomérie, vetvenia, veľkosti alebo existencie rôznych funkčných skupín naviazaných na sacharidoch. Z hľadiska analytiky týchto látok je problémom absencia chromofórov, resp. fluorescenčných skupín, často slabá ionizovateľnosť, neprchavosť, atď. Preto najčastejším spôsobom analýzy týchto látok je ich chemická modifikácia, či už hydrolyza alebo derivatizácia jednotlivých funkčných skupín.

9-Fluorenylmetyloxykarbonyl chlorid (FMOC-Cl) je so skupiny esterov chloroformátov. Reakciou s amino skupinou cukru vznikajú tzv. FMOC karbamáty, ktoré dávajú odozvu na UV žiarenie s vlnovou dĺžkou 265 nm a separujú sa aj na C18 RP- HPLC kolónach bez nutnosti použiť ióno-výmennú chromatografiu, ktorá kvôli puffom predstavuje určitú komplikáciu v spojení s MS detektorom. Zároveň táto reakcia môže slúžiť na ochranie aminoskupiny.



Chemikálie:

9-Fluorenylmetyloxykarbonyl chlorid (FMOC-Cl)

Voda

Acetonitril

n-hexán

Kyselina trifluóroctová (TFA)

n-hexán

Kyselina trihydrogénboritá

Hydroxid sodný

Pracovný postup:

Príprava mobilných fáz:

A: 0.1% TFA vo vode

B: 0.1% TFA v acetonitrile

Príprava roztokov:

- 1M NaOH: Navážiť 1g NaOH do 25ml odmernej banky, rozpustiť vo vode a doplniť po značku.
- 0,25M roztok H₃BO₃ s pH 8,5: Navážiť 0,773g H₃BO₃ do 50ml odmernej banky, rozpustiť vo vode a doplniť po značku. Upraviť pH s 1M NaOH na hodnotu 8,5.
- FMOC-Cl: Navážiť 250mg FMOC-Cl do 25ml odmernej banky, rozpustiť vo acetonitrile a doplniť po značku.

Príprava vzoriek:

Príprava kalibračných roztokov: Navážiť 1, 2, 5, 7.5, 10 mg štandardu aminosacharidu do 1ml odmerných baniek, rozpustiť 0,25M roztoku H₃BO₃ s pH 8,5 a doplniť po značku. Roztok treba pripraviť tesne pred derivatizáciou, kvôli mutarotácii. Do 10ml uzatvárateľnej skelnnej skúmavky odpipetovať 3 ml FMOC-Cl roztoku, pridať 0,5 ml roztoku štandardu a vortexovať 10 sekúnd. Reakcia prebieha 2 hodiny pri izbovej teplote. Po ukončení extrahovať 2 krát 1 ml hexánu. Do HPLC vialky odobrať 0,1 ml, pridať 0,4 ml vody a 0,5 ml acetonitrilu.

Príprava vzorky: Navážiť cca 5mg vzorky aminosacharidu do 1ml odmernej banky, rozpustiť 0,25M roztoku H₃BO₃ s pH 8,5 a doplniť po značku. Roztok treba pripraviť tesne pred derivatizáciou, kvôli mutarotácii. Do 10ml uzatvárateľnej skelnnej skúmavky odpipetovať 3 ml FMOC-Cl roztoku, pridať 0,5 ml roztoku vzorky a vortexovať 10 sekúnd. Reakcia prebieha 2 hodiny pri izbovej teplote. Po ukončení extrahovať 2 krát 1 ml hexánu. Do HPLC vialky odobrať 0,1 ml vzorky, pridať 0,4 ml vody a 0,5 ml acetonitrilu.

Príprava blanku: Do 10ml uzatvárateľnej skelnnej skúmavky odpipetovať 3 ml FMOC-Cl roztoku, pridať 0,5 ml 0,25M roztoku H₃BO₃ s pH 8,5 a vortexovať 10 sekúnd. Reakcia prebieha 2 hodiny pri izbovej teplote. Po ukončení extrahovať 2 krát 1 ml hexánu. Do HPLC vialky odobrať 0,1 ml, pridať 0,4 ml vody a 0,5 ml acetonitrilu.

Podmienky UHPLC merania:

Kolóna: HypersilGOLD 50 x 2.1mm, 1.9µm, alebo alternatívna C18

Prietok mobilnej fázy: 0.55 ml/min

Detektor: UV s vlnovou dĺžkou 265 nm

Nastrekovaný objem: 5µL

Mobilné fázy:

A: 0.1% TFA vo vode

B: 0.1% TFA v acetonitrile

Gradient:

Čas (min)	%A
0	60
3	20
3.8	20
4	60
6	60

Podľa štruktúry stanovovaných aminocukrov je možné podmienky optimalizovať, napr. predĺžiť gradientovú metódu, prípadne zvoliť dlhšiu kolónu. FMOC karbamáty cukrov sa dajú dobre stanoviť aj MS detektorom s ESI ionizáciou, avšak výhodnejšia je APPI. Ionizáciou týchto látok dostávame [M+H]⁺ ako hlavný pík.

PodĎakovanie

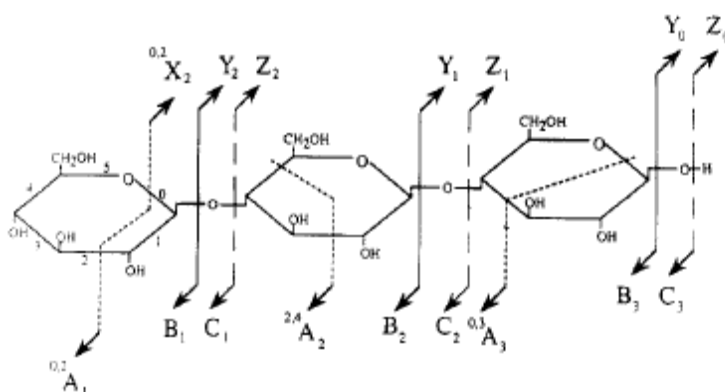
Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Fragmentácie sacharidov - Akarbóza

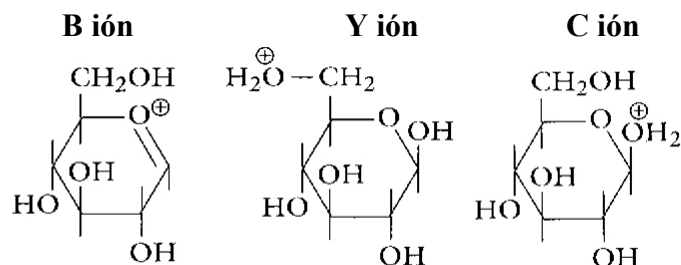
Mucha J., Bystrický P., Vlčková S.

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

Ióny fragmentov, ktoré obsahujú neredukujúci koniec sa označujú veľkými písmenami A,B,C a ióny, ktoré obsahujú redukujúci koniec oligosacharidu sa označujú písmenami X,Y,Z. Dolný index označuje číslo cukru od neredukujúceho konca. B ióny sú oxóniové ióny a Y ióny sú protónované ióny, ktoré zahŕňajú transfer protónov. C ako protónované molekulové ióny a Z ióny sú následkom štiepenia glykozidickej väzby (väzby O-C). Z fragmenty sú zriedka pozorované na MALDI spektrách (pozri obr. 2).



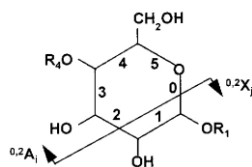
Obrázok 1. Štruktúra celotriózy Glc(β1->4)Glc(β 1-4)Glc (molekulová hmotnosť 504 Da) ilustrujúca nomenklatúru fragmentácie iónov.



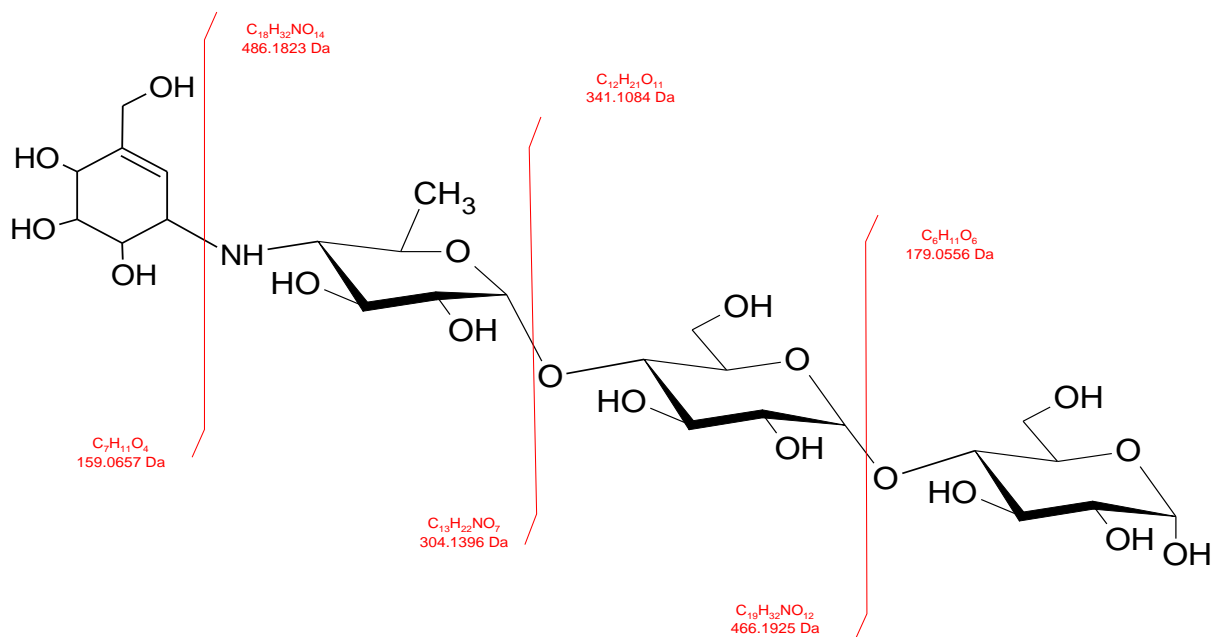
Obrázok 2. Štruktúra B, Y a C iónov

Fragmentácia kruhu

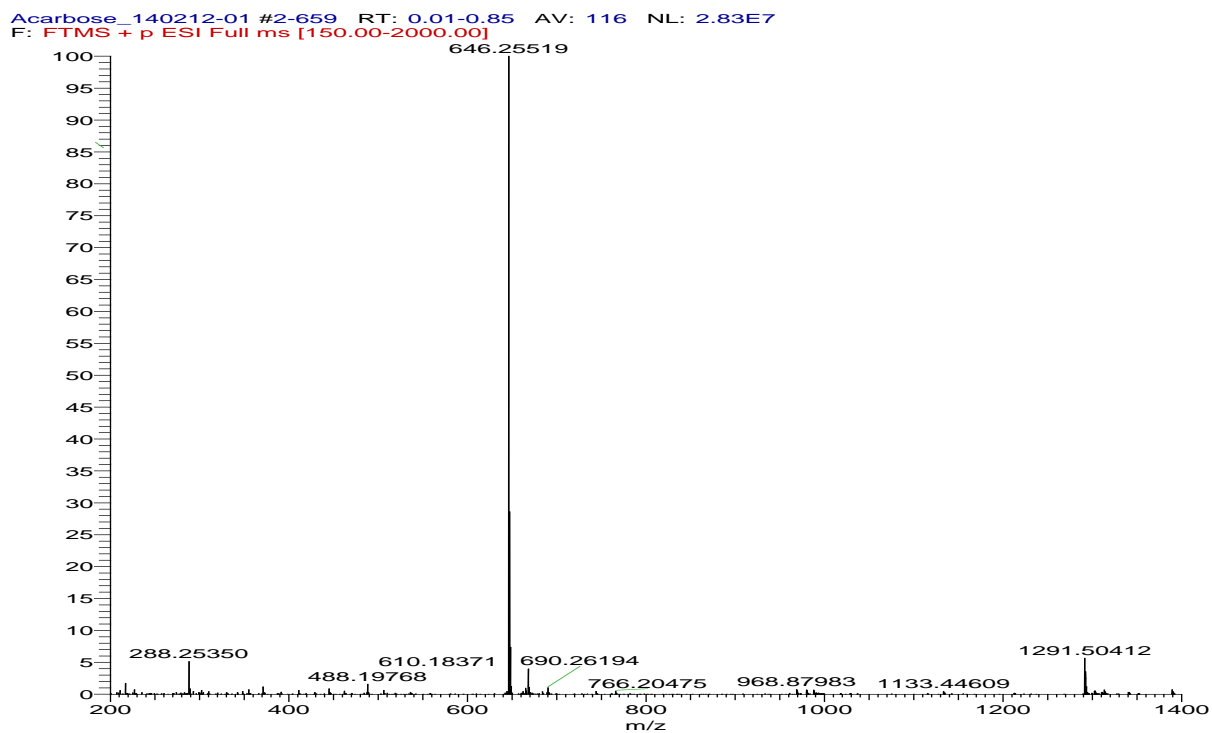
Ióny A a X sú vytvorené štiepením glykozidického kruhu a sú označené pomocou priradenia čísla štiepenej väzby v smere hodinových ručičiek. Na obr. 3 je príklad. r,sA, r,sX sú vytvorené štiepením kruhu cez r a s väzby. Oba ióny si pomechajú náboj molekulového iónu.



Obrázok 3. Príklad fragmentácie kruhu.

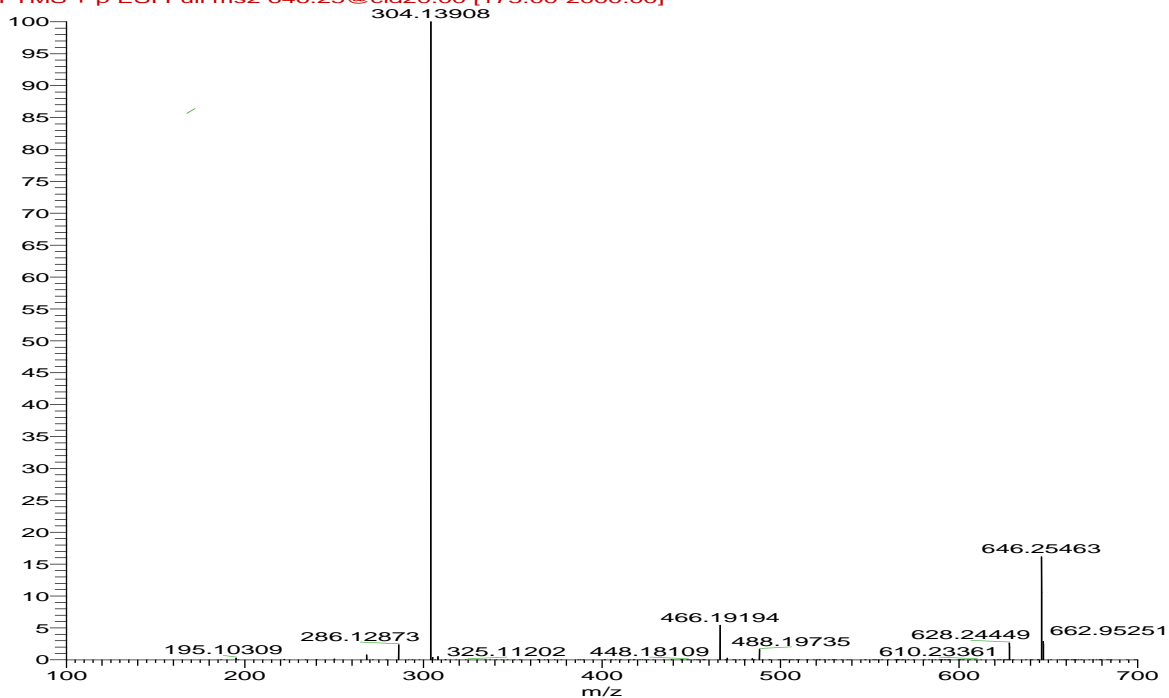


Obrázok 4. Štruktúra akarbózy



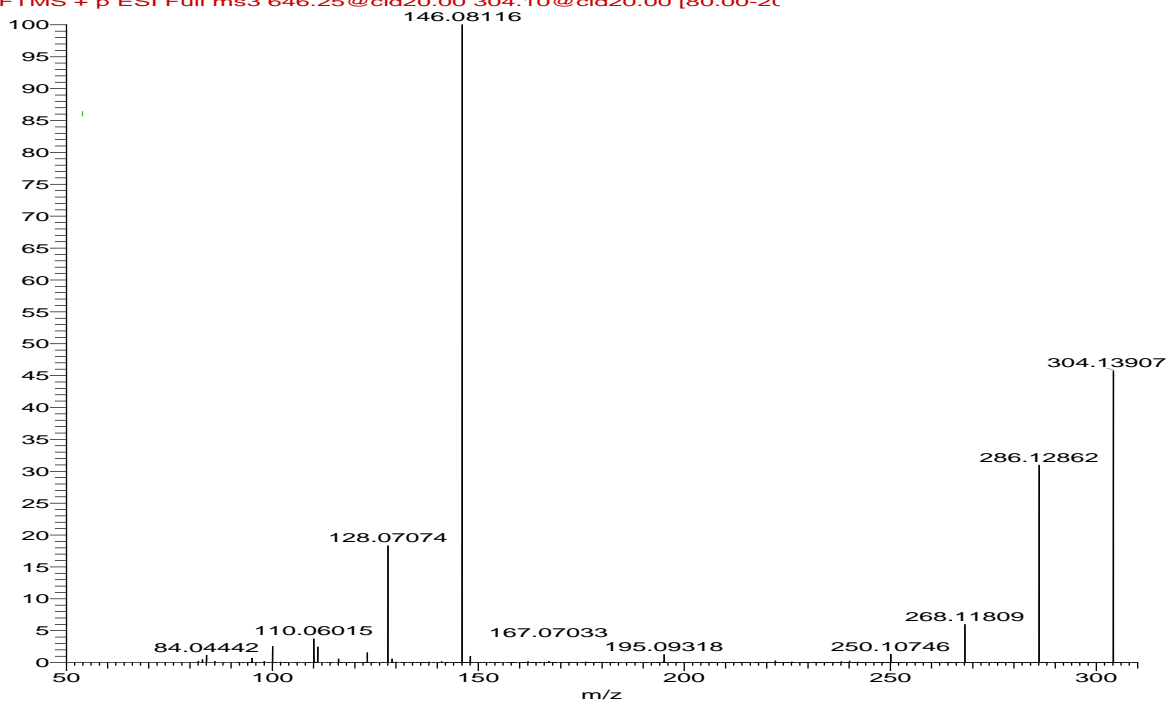
Obrázok 5. Full scan HRMS spektrum akarbózy namerané na Orbitrap Velos PRO, Thermo Scientific

Acarbose_140212-01 #2-659 RT: 1.13-6.86 AV: 251 NL: 1.38E7
F: FTMS + p ESI Full ms2 646.25@cid20.00 [175.00-2000.00]



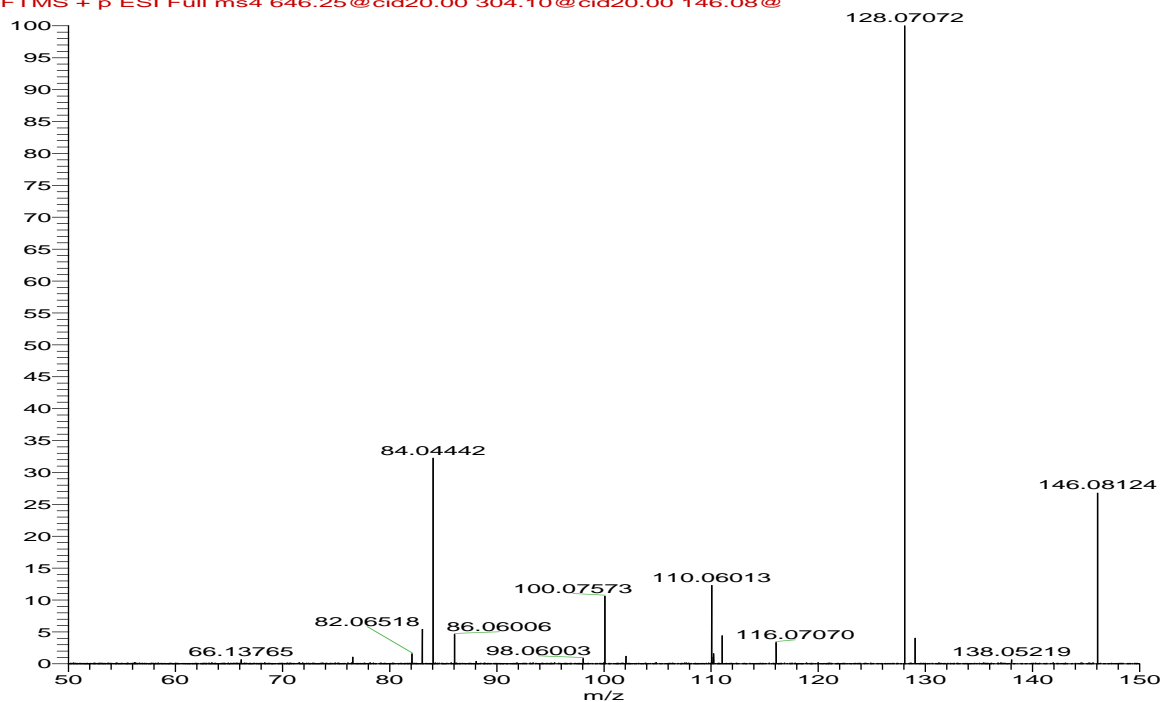
Obrázok 6. MS2 HRMS spektrum akarbózy namerané na Orbitrap Velos PRO, Thermo Scientific

Acarbose_140212-01 #2-659 RT: 3.30-4.33 AV: 97 NL: 3.38E6
F: FTMS + p ESI Full ms3 646.25@cid20.00 304.10@cid20.00 [80.00-2000.00]



Obrázok 7. MS3 HRMS spektrum akarbózy namerané na Orbitrap Velos PRO, Thermo Scientific

Acarbose_140212-01 #2-659 RT: 4.48-4.93 AV: 38 NL: 5.22E5
F: FTMS + p ESI Full ms4 646.25@cid20.00 304.10@cid20.00 146.08@



Obrázok 8. MS4 HRMS spektrum akarbózy namerané na Orbitrap Velos PRO, Thermo Scientific

Pod'akovanie:

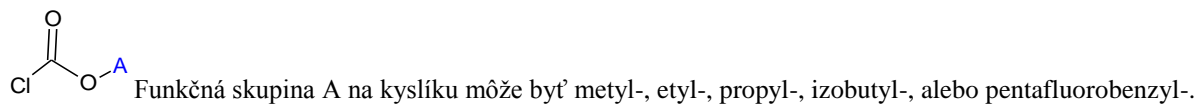
Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Chloroformáty a derivatizácia sacharidov

Mucha J., Bystrický P., Vlčková S.

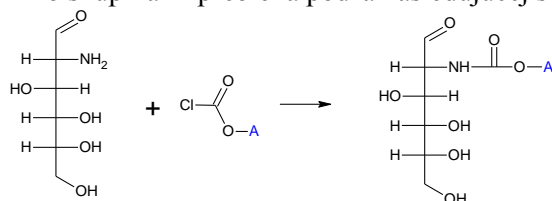
Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

Chloroformáty sú skupina látok, ktorá v chemickom zmysle predstavuje estery chloroformových kyselín. Štruktúra chloroformátov je na nasledujúcom obrázku.

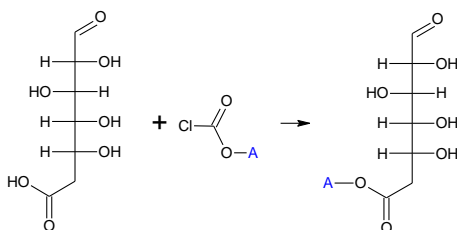


Z pohľadu plynovej chromatografie sacharidov je derivatizácia pomocou chloroformiátov veľmi zaujímavou metódou. Vzorok, ktoré chceme analyzovať pomocou GCMS metód často obsahujú vodu. Či už je to analýza fyziologických roztokov (krv, moč), potravín (víno, pivo, mlieko, ovocné džúsy) alebo rastlinné materiály po hydrolýze, vo všetkých týchto prípadoch je v reakčnej zmesi prítomná voda, ktorú treba pred derivatizáciou pracne odstraňovať. Chloroformáty sú veľmi reaktívne, takže derivatizácia prebieha rýchlo a navyše, na rozdiel od iných derivatizačných metód, prebieha aj za prítomnosti vody. Z hľadiska hmotnostnej spektrometrie je veľmi zaujímavá derivatizácia pomocou pentafluorobenzyl chloroformátu, ktorý podstatne zvýši ionizovateľnosť derivatizovaného sacharidu.

Reakcia chloroformátov s amino skupinami prebieha podľa nasledujúcej schémy:

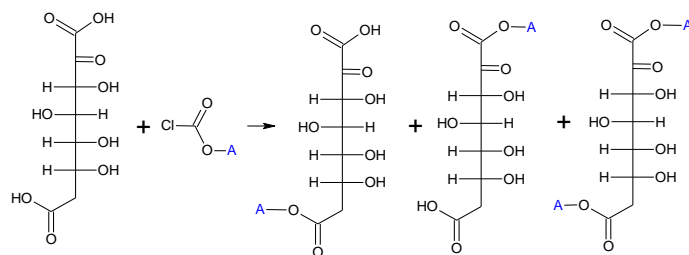


Reakcia chloroformátov s karboxylovými skupinami kyslých sacharidov prebieha podľa nasledujúcej schémy:



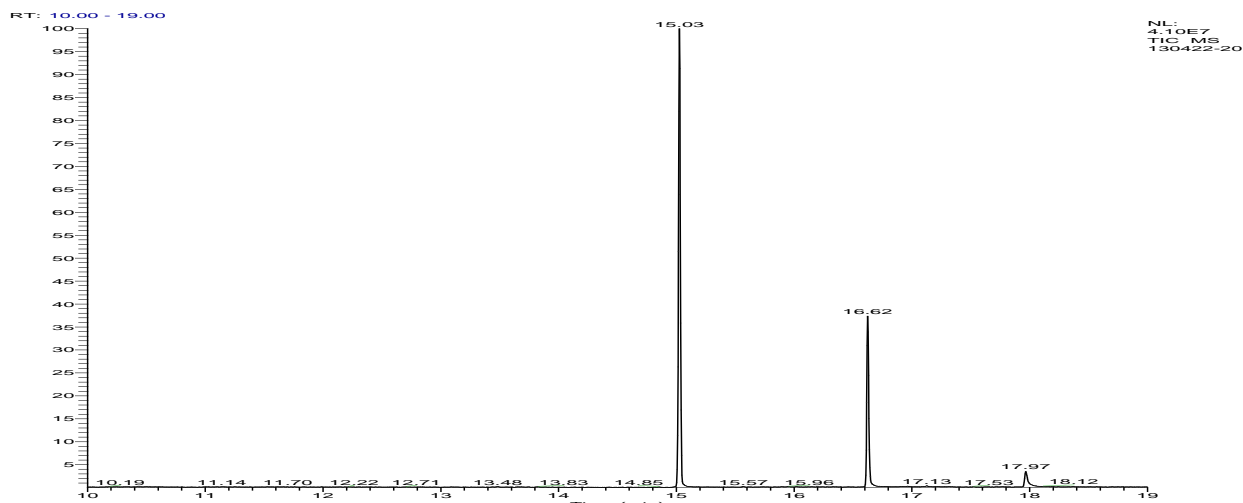
Vznikajúce deriváty sú pomerne stabilné v kyslom aj zásaditom prostredí, takže táto reakcia je vhodná aj na chránenie labilnejších funkčných skupín sacharidov pred hydrolýzou.

Pri derivatizácii dvojsýtnych kyselín sacharidov – aldarových kyselín je častým problémom vznik viacerých derivatizačných produktov. Tento problém sa dá riešiť optimalizáciou pH pri reakcii. Cieľom tejto optimalizácie je maximalizovať pomer vzniku jedného produktu oproti ostatným.

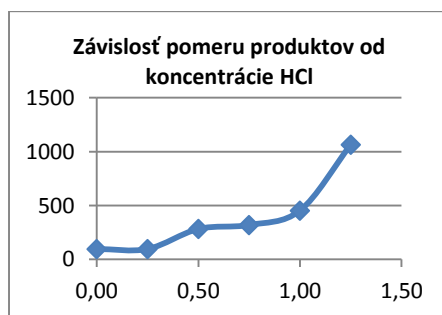


Pracovný postup:

- 1) 2.5 mg štandardu kyseliny glukárovej sa rozpustilo v 1ml vody, 0,25M HCl, 0,5M HCl, 0,75M HCl, 1M HCl, 1,25M HCl
- 2) Následne sa pipetovalo 400 μ l roztoku kyseliny glukárovej, pridalo sa 200 μ l etanolu, 50 μ l pyridínu a 50 μ l ECF
- 3) Zmes sa ultrazvukovala 1 min
- 4) Extrakcia s 250 μ l n-hexánu
- 5) Pridalo sa ďalších 50 μ l ECF
- 6) pH upravené pridaním 50 μ l NaOH o koncentrácii 7 mol/l
- 7) Vortexovanie 30 s, centrifugácia (5 min/1.400x g)
- 8) Odber supernatantu
- 9) Acetylácia s anhydridom kyseliny octovej



Chromatogram kyseliny glukárovej po derivatizácii etylchloroformátom na kolóne RT-2330, 30m x 0,32mm, 0,10 μ m. Chromatogram nameraný na GC Trace GC Ultra s MS TSQ Quantum XLS (Thermo Scientific).



PodĎakovanie:

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

Analýza glykánov pomocou priradenia MALDI MSⁿ spektier

Bystrický P., Vlčková S., Mucha J.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod: Štruktúra a identita analyzovaných glykánov môže byť s istotou odhadnutá porovnaním ich nameraných spektier so spektrami rôznych známych glykánov z Glycan Mass Spectral Database (GMDB). Namerané MSⁿ spektrá môžu byť porovnané podľa nasledujúceho protokolu.

Činidlá

kyselina 2,5-Dihydroxybenzoová, proteomics grade
10 mg/mL kyseliny 2,5-dihydroxybenzoovej v 30% etanole
ultrapurifikovaná voda pre LC/MS
99.5% etanol pre HPLC

Prístroje

MALDI-QIT-TOF hmotnostný spectrometer vybavený Ultra Cooling Kit-om
Prístup k GMDB databáze (URL: http://riodbdev.ibase.aist.go.jp/rcmg/glycodb/Ms_ResultSearch)

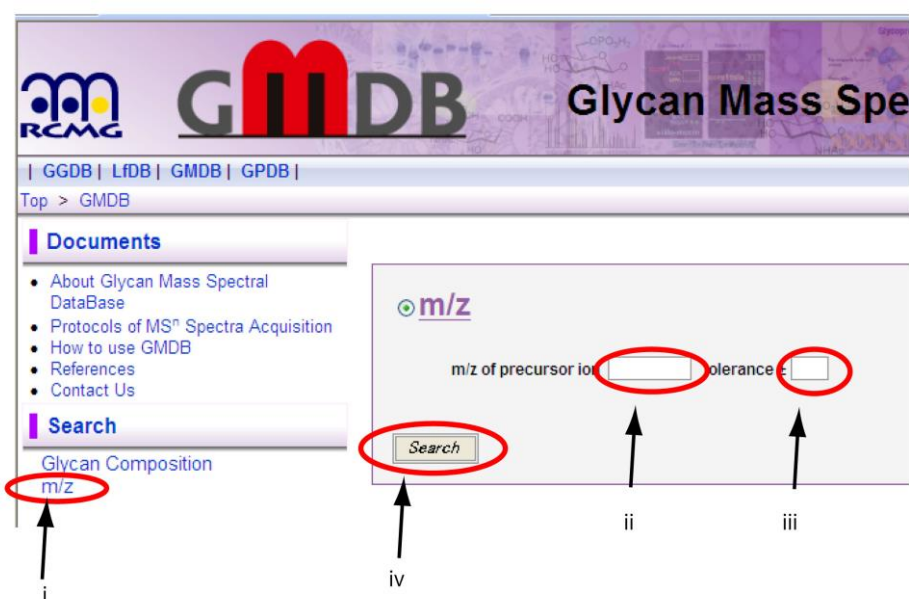
Metódy

- I. Protokol pre odmeranie spektier MSⁿ
 1. Kvapnite 0.5 µL roztoku vzorky na MALDI terčik (leštený povrch z nerezovej ocele, 2mm v priemere) a nechajte vyschnúť. Aby ste dostali spoľahlivé data, roztok vzorky by mal obsahovať glykány analytu v koncentrácii 0.5-2.0 pmol/µL. Navyše analyt musí byť zbavený solí.
 2. Prikvapnite k vysušenému analytu na terčiku 0.5 µL roztoku matrice (10 mg/mL kyseliny 2,5-dihydroxybenzoovej v 30% etanole) a nechajte úplne vysušiť.
 3. Rekryštalizujte vysušený materiál pridaním 0.15 µL of 99.5% etanolu k zmesi analytu a matrice na terčiku.
 4. Odmerajte MS spektrum analytu v pozitívnom móde.
 5. Odmerajte MS² spektrá iónov sodných aduktov odvodených od glykánových analytov. Ak sú predominantné protónové adukty je možné pridať 0.5 µL roztoku 10 mM NaCl k vysušenému analytu. Pre odmeranie CID spektier, upravte CID energiu tak, aby signál z iónu prekursora skoro vymizol. Ak je intenzita ióna prekursora v spektre viac než 15% intenzity základného píku, spektrum nie je dobré a musí byť premerané s vyššou CID energiou. Použite automatickú funkciu namerania spektier s pravidelným rastrom, ktorý ovláda vzory pohybu laserového lúča. Toto automatické nastavenie je veľmi dôležité pre získanie spoľahlivých dát.
 6. Vyhľadajte pravdepodobné štruktúry glykánových analytov pomocou GMDB.
 7. Porovnajete spektrá glykánových analytov a rôznych pravdepodobných štruktúr.
 8. Niekedy pomôže zobrazenie viacerých MS² spektier naraz a ich priame porovnanie. V týchto prípadoch je dobré manuálne nájsť signály, ktoré môžu byť rozlíšené pomocou porovnania ich MS³ spektier.
 9. Odmerajte MS³ spektrá signálov v MS² spektrách pomocou rovnakého postupu ako v bode 5) pre odmeranie MS² spektier.
 10. Porovnajete MS³ spektrá glykánových analytov a ich pravdepodobných štruktúr.
- II. Ako použiť GMDB databázu
 1. Kliknite na linku pre „m/z“ v stĺpci na ľavej strane na vrchu stránky
 2. Vložte hodnotu m/z prekursorového iónu z MS² spektra a vložte vhodnú hodnotu do políčka „tolerance“. Vhodné hodnoty sú väčšinou od 0.5 do 1.0.
 3. Kliknite na “Search” gombík (Obr. 1).

- Okienko s výsledkami “Search Result” sa otvorí. Zobrazia sa relevantné štruktúry glykánov s stromovitým zoznamom hodnôt m/z prekurzorových iónov v ktorých relevantné prekurzorové ióny sú vyznačené žltou.
- Kliknite na hodnoty m/z MS² prekurzorov v stromovitom zozname.
- Kliknite na gombík “Show Spectra”. (Obr. 2)
- Otvorí sa obrázok so spektrom spolu s korešpondujúcou štruktúrou glykánu v okienku “Spectrum“ (Obr. 3)
- Tam, kde viacasobné spektrá ukazujú podobnosť s analyzovanými MS² spektrami, vráťte sa späť do okienka “Search Result” a kliknite hodnoty m/z MS³ prekurzora v stromovitom zozname pravdepodobných štruktúr. Nájdite prekurzorové ióny, ktoré môžu byť použité na rozlíšenie spektier pri porovnaní ich MS³ spektier.
- Kliknite na gombík “Show Spectra”.

Poznámky

V ideálnom prípade analyzované glykány boli vyizolované pred odmeraním MSⁿ spektier. Konkrétne ich izoméry musia byť odseparované. Analyzované glykány by mali byť derivatizované vo vhodných formách, takých aké sú v databáze GMDB. N-glykány by mali byť značené s 2-aminopyridínom (PA). O-glykány sú skonvertované na prislúchajúce alditoly. Pre ostatné typy glykánov sa treba pozrieť do GMBD databázy. Avšak GMDB databáza nie je úplný zdroj informácií a preto treba mať na zreteli to, že vaše analyzované glykány nemusia byť v GMDB obsiahnuté. V takýchto prípadoch iné metódy ako napr. Rozštiepenie glykozidázami alebo mapovanie pomocou 2D-HPLC by malo byť skombinované s touto metodológiou.



Obrázky a popisy

Fig. 1. Okienko pre hľadanie m/z v GMDB databáze. Ak kliknete “m/z” v ľavom stĺpci (i) otvorí sa m/z okienko na pravej strane. Vpíšte hodnotu m/z (ii) a toleranciu (iii) vašeho prekurzorového iónu do príslušných políček. Potom stlačte gombík “Search”.

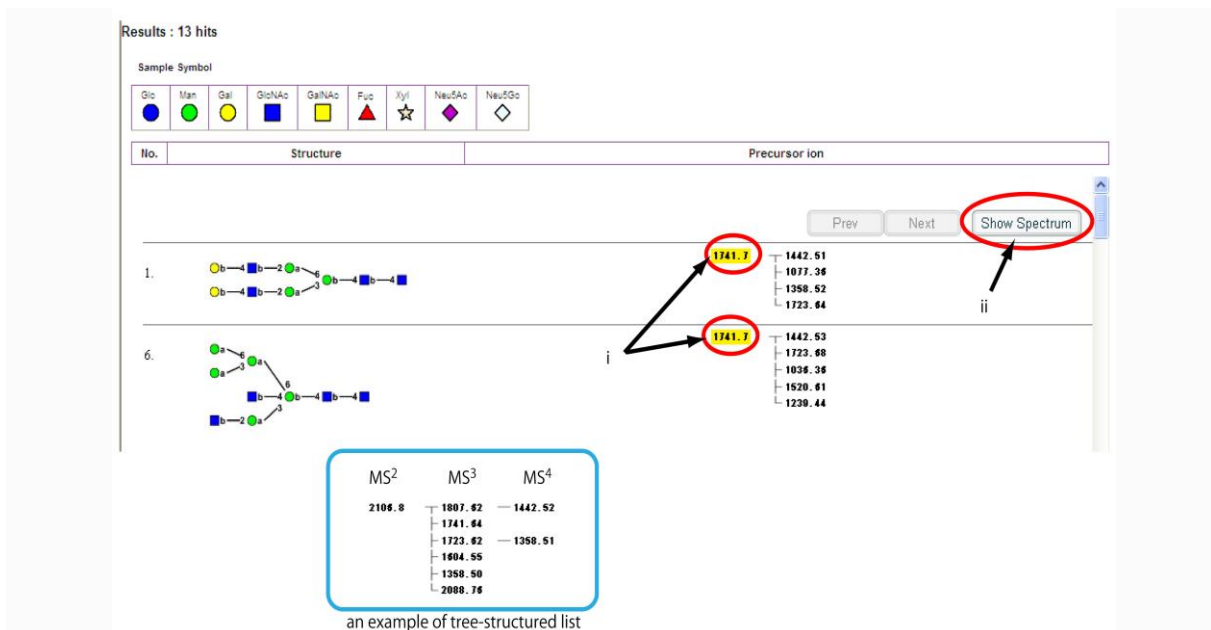


Fig. 2. Príklad výsledkov vyhľadávania.

Zoznam glykánov, ktoré majú MSⁿ spektra vyhľadávanej hodnoty m/z je zobrazené v okienku. Prekurzorové ióny uchovaných MSⁿ spektier pre každý glykán sú usporiadané do stromovitého zoznamu. Kliknite na prekurzorové ióny MSⁿ spektier, ktoré si chcete prezrieť. Ich čísla sú vyznačené žltou (i). Potom stlačte gombík “Show Spectrum”.

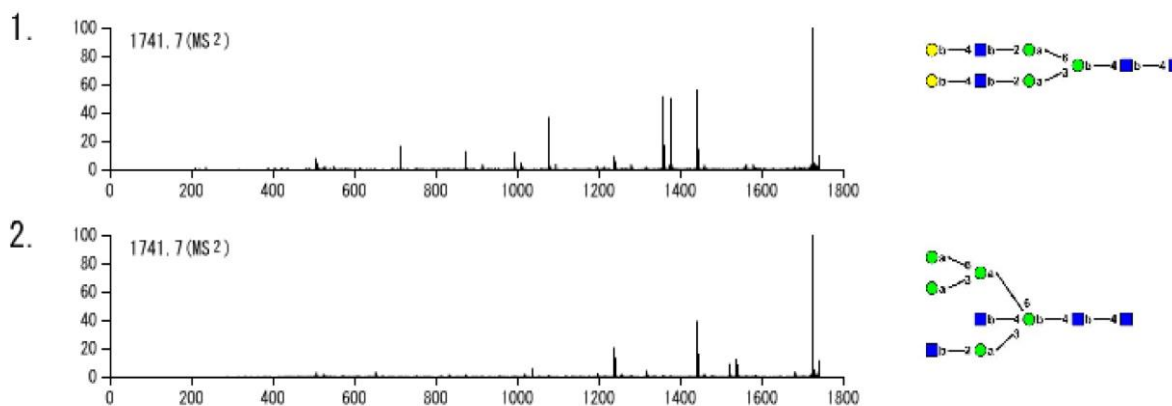


Fig. 3. Príklady okienok so spektrami.

MSⁿ spektra, ktoré ste zvolili sú zobrazené spolu s ich príslušnými glykánovými štruktúrami. Môžete ľahko porovnať tieto spektra v tomto okienku.

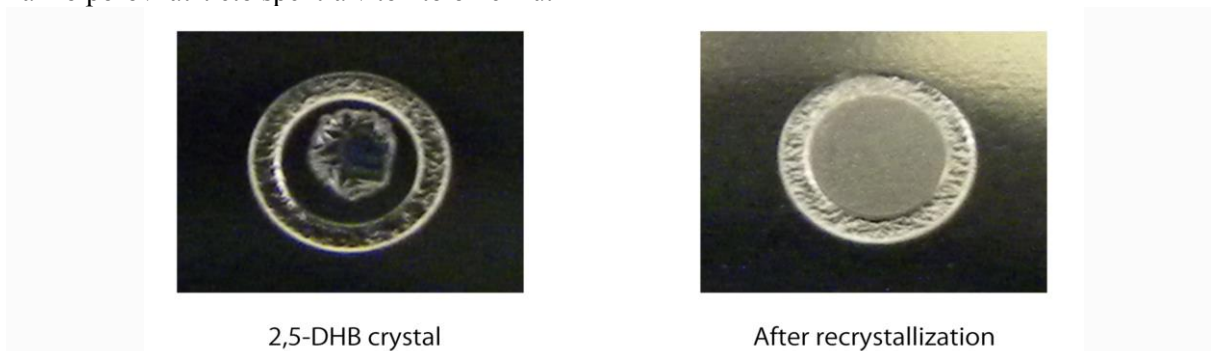


Fig. 4. Obrázok rekryštalizovaného 2,5-DHB na MALDI terčiku.

Ihlicový kryštál 2,5-DHB (vľavo) je zmenený na malý granulovitý kryštál (vpravo) pridaním etanolu. Rekryštalizovaný 2,5-DHB je dostatočne homogenny na odmeranie MS spektier pomocou automatického merania.

Literatúra:

1. Kameyama, A., Kikuchi, N., Nakaya, S., Ito, H., Sato, T., Shikanai, T., Takahashi, Y., Takahashi, K., and Narimatsu, H. (2005) A strategy for identification of oligosaccharide structures using observational multistage mass spectral library. *Anal. Chem.* **77**: 4719-4725
2. Kameyama, A., Nakaya, S., Ito, H., Kikuchi, N., Angata, T., Nakamura, M., Ishida, H., Narimatsu, H. (2006) Strategy for simulation of CID spectra of N-linked oligosaccharides toward glycomics. *J. Proteome Res.* **5**: 808-814

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.

Degradácia glykolipidov pomocou endoglykoceramidázy (EGCázy)

Bystrický P., Vlčková S., Mucha J.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod:

Endoglykoceramidáza (EGCáza, EC 3.2.1. 123) je schopná hydrolyzy glykozidickej väzby medzi oligosacharidom a ceramidom v rôznych glykosfingolipidoch (GSL-och; Obr. 1). Tri izoformy EGCázy sa líšia vo špecificite. Všetky boli nájdené v *Rhodococcus equi*¹ a naklonované.^{2, 3} EGCáza I a II hydrolyzujú všetky typy GSL-ov okrem cerebrozidov, sulfatidov a 6-gala-sérií GSL-ov.¹ Globo-série GSL-ov a fukozyl GM1a sú hydrolyzované EGCázou I oveľa rýchlejšie ako EGCázou II.¹ V porovnaní s EGCázou I a II, EGCáza III (endogalaktozylceramidáza, EGALC) hydrolyzuje 6-gala-série GSL-ov a digalaktozyl-diacylglycerol (DGDG).^{3,4} Špecificita EGCázy je zosumarizovaná v tabuľke 1. Použitím EGCázy, intaktné oligosacharidy a ceramid môžeme získať z rôznych GSL-ov ale predtým by mal človek zvážiť, že ktorá EGCáza je vhodná pre experiment.

EGCáza je vhodná pre analýzu štruktúry rôznych GSL-ov. Napr. uvoľnené oligosacharidy môžu byť fluorescenčne značené aromatickými činidlami na základe amínov⁵⁻⁹ a kvantifikované pomocou HPLC, TLC a kapilárnej elektroforézy (CE) s vysokou citlivosťou. Nedávno bola vyvinutá citlivá, rýchla a kvantitatívna analýza GSL glykómu, pri ktorej GSLy boli hydrolyzované EGCázou a uvoľnené oligosacharidy boli podrobené glykoblótingu a nakoniec určené na MALDI-TOF MS.¹⁰ Ceramidové časti 6-gala sérií GSL-ov sú vymenené s fluorescenčným ceramidom, rôznymi alkanolmi a neionickými detergentmi ako napr. Triton X-100 transglykozylačnou reakciou EGALC, generovaním fluorescenčných GSL-ov, alkyloligosacharidov alebo Triton-oligosacharidov.¹¹

Činidlá

Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

Predom-pokryté TLC platničky silika géloom 60 (Merck Millipore)

Orcinol-H₂SO₄ reagent

Pufor octanu sodného, pH 5.5

Chloroform

Metanol

EGCáza II (rekombinantný enzým exprimovaný v *E. coli* je komerčne dostupný od Takara Bio)

EGCáza I* (pozri poznámky)

EGALC* (pozri poznámky)

Prístroje

Shimadzu CS-9300 TLC chromataskener

SpeedVac koncentrátor (Thermo Fisher Scientific)

Komora na vyvolanie TLC platničiek

Platnička na ohrev

Metódy

I. Degradácia GSL-ov pomocou EGCázy

1. Odparte 2 nmol z každého GSL v epinke na SpeedVac koncentratore ak je/sú vzorka/ky rozpustené v organickom rozpúšťadle.
2. Rozpusťte vzorku v 50 mM pufri octanu sodného, 5.5 obsahujúcom 0.1% (w/v) Triton X-100 a sonikujte 10 sek.
3. Pridajte 0.5 mU EGCázy I alebo EGCázy II pre lakto- a ganglio-série GSL-ov, 10 mU EGCázy pre globo-série GSL-ov a 1 mU EGALC pre 6-gala sériu GSL-ov. Objem extrahovanej zmesi by mal byť 10-50 µL. Jedna milijednotka enzýmu je definovaná ako schopná katalyzovať hydrolyzu 1 nmol GM1 za minútu.
4. Inkubujte reakčnú zmes pri 37 °C 1 hod. pre hydrolyzu ganglio- a 6-gala sérií GSL-ov a 10 hod. pre hydrolyzu lakto- a globo- sérií GSL-ov. Zastavte reakciu zahriatím vo vrejúcej vode na 5 min.

5. Odparte reakčnú zmes na SpeedVac koncentrátore. Rozpusťte vzorku v 10 μL metanole a naneste na TLC platničku.
6. Vyvolajte TLC platničku s chloroform/methanol/0.02% CaCl_2 (5/4/1, v/v/v) pre globo-, ganglio- a lakto- série GSL-ov a chloroform/methanol/0.02% CaCl_2 (2/3/1, v/v/v) for 6-gala-série GSL-ov.

II. Detekcia produktov pomocou TLC chromatoscenera.

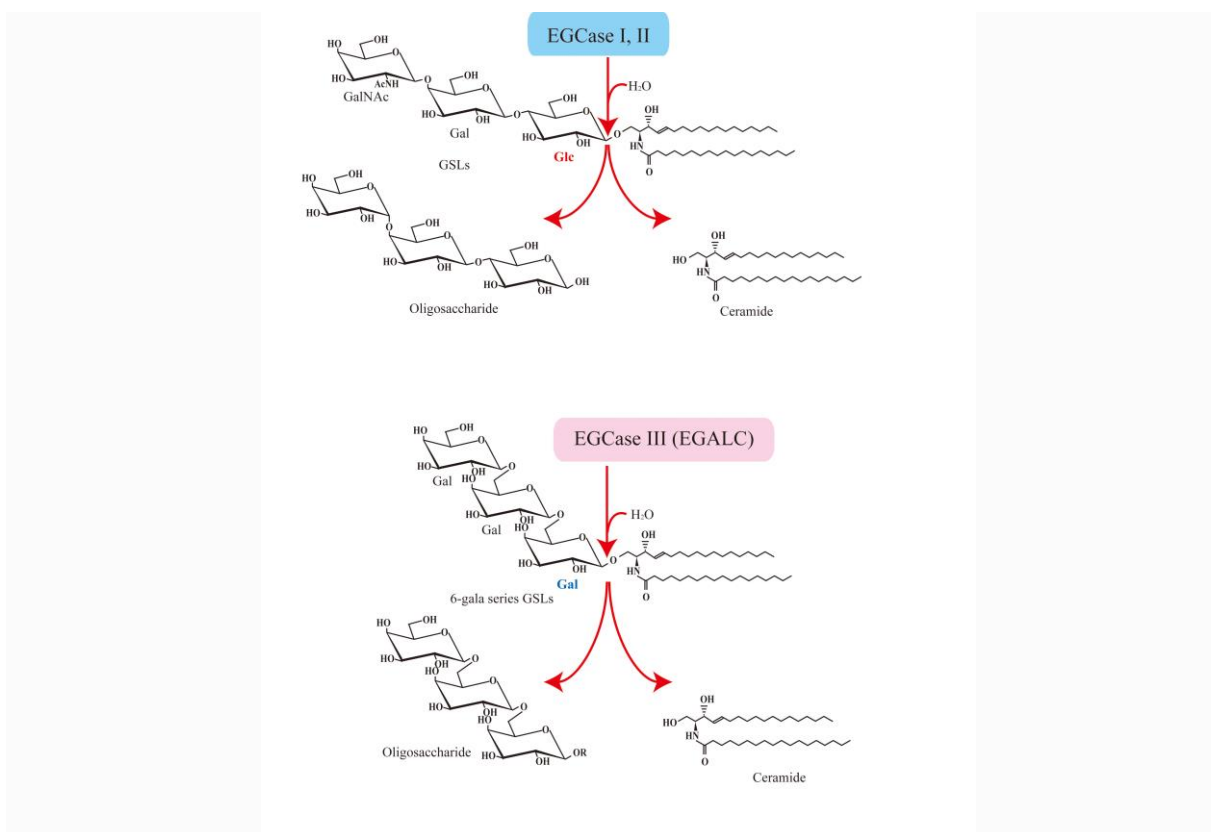
1. Zviditeľnite ostávajúce GSL a vygenerované oligosacharidy pomocou vysprejovania TLC platničky s orcinol- H_2SO_4 .
2. Zoskenujte intenzity TLC pásov pomocou Shimadzu CS-9300 chromatoscenera s nastaveným reflekným módom na 540 nm.
3. Vypočítajte účinnosť hydrolyzy nasledovne:

$$\text{hydrolyza (\%)} = \frac{\text{plocha píku oligosacharidu} \times 100}{\text{plocha píku oligosacharidu} + \text{plocha píku ostávajúceho substrátu}}$$

Poznámky

Špecificita EGCázy I je trochu iná v porovnaní s EGCázou II ako je ukázané v tabuľke I. Kinetické štúdie ukázali, že Michaelisova konštanta (K_m) pre GM1a (ganglio série) a Gb3Cer (globo série) pre EGCázu I je skoro rovnaká ako EGCázy II (0.4 mM). Na druhej strane, rýchlosť (K_{cat}) EGCázy I pre GM1a a Gb3Cer je 22- a 1209-násobne vyššia ako pri EGCáze II. Neiónový detergent Triton X-100 zdokonaľuje aktivitu EGCázy I, II a EGALC pri koncentrácii 0.1%. Pre reakcie týchto enzýmov nie sú potrebné žiadne kovové ióny. Nielen 6-gala série GSL-ov ale aj DGDG môžu byť hydrolyzované pomocou EGALC

Obrázky, tabuľky a popisy



Obr. 1. Hlavné kroky katalýzy EGCázy I, II a III (EGALC) na GSL-och.

Tabuľka 1. Špecificita substrátu EGCázy I, II a III (EGALC).

Substrate		Hydrolysis (%)		
Class and name	Structure	EGCase I	EGCase II	EGALC
Ganglio series				
GD1a	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	100	100	0
GD1b	Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	100	100	*n.d.
GD3	NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	100	100	n.d.
GM1a	Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	100	100	0
Fucosyl-GM1a	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	100	19.0	n.d.
GM3	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	100	100	n.d.
GM4	NeuAc α 2-3Gal β 1-1'Cer	0	0	0
Globo series				
Gb3	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	72.9 (100)	23.7	0
Gb4	GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	33.9 (100)	7.2	n.d.
Forssman	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	25.2 (47.5)	6.5	0
LacCer	Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	29.9	49.4	0
GlcCer	Glc β 1-1'Cer	6.7	0	0
Gala series				
TGC	Gal β 1-6Gal β 1-6Gal β 1-1'Cer	0	0	65.9
Sulfatide	HSO ₃ -3Gal β 1-1'Cer	0	0	0
Sphingomyelin				
	Choline phosphate -'Cer	0	0	0

*n.d., not determined.

Rôzne GSLy (2 nmol) boli inkubované 12 hod. pri 37 °C s 1 mU (10 mU) enzýmu v 20 mL 50 mM pufru octanu sodného, pH5.5, obsahujúcom 0.1% Tritonu X-100.

Odkazy

1. Ito, M., and Yamagata, T. (1989) Purification and characterization of glycosphingolipid-specific endoglycosidases (endoglycoceramidas) from a mutant strain of *Rhodococcus* sp. Evidence for three molecular species of endoglycoceramidase with different specificities. *J Biol Chem.* **264**, 9510-9519
2. Izu, H., Izumi, Y., Kurome, Y., Sano, M., Kondo, A., Kato, I., and Ito, M. (1997) Molecular cloning, expression, and sequence analysis of the endoglycoceramidase II gene from *Rhodococcus* species strain M-777. *J Biol Chem.* **272**, 19846-19850
3. Ishibashi, Y., Nakasone, T., Kiyohara, M., Horibata, Y., Sakaguchi, K., Hijikata, A., Ichinose, S., Omori, A., Yasui, Y., Imamura, A., Ishida, H., Kiso, M., Okino, N., and Ito, M. (2007) A novel endoglycoceramidase hydrolyzes oligogalactosylceramides to produce galactooligosaccharides and ceramides. *J Biol Chem.* **282**, 11386-11396
4. Ishibashi, Y., Nagamatsu, Y., Meyer, S., Imamura, A., Ishida, H., Kiso, M., Okino, N., Geyer, R., and Ito, M. (2009) Transglycosylation-based fluorescent labeling of 6-gala series glycolipids by endogalactosylceramidase. *Glycobiology* **19**, 797-807
5. Higashi, H., Ito, M., Fukaya, N., Yamagata, S., and Yamagata, T. (1990) Two-dimensional mapping by the high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released from glycosphingolipids by endoglycoceramidase. *Anal Biochem.* **186**, 355-362
6. Ohara, K., Sano, M., Kondo, A., and Kato, I. (1991) Two-dimensional mapping by high-performance liquid chromatography of pyridylamino oligosaccharides from various glycosphingolipids. *J Chromatogr.* **586**, 35-41
7. Basu, S. S., Dastgheibhosseini, S., Hoover, G., Li, Z. X., and Basu, S. (1994) Analysis of glycosphingolipids by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis using ceramide glycanase from *Mercenaria mercenaria*. *Anal Biochem.* **222**, 270-274

8. Wing, D. R., Garner, B., Hunnam, V., Reinkensmeier, G., Andersson, U., Harvey, D. J., Dwek, R. A., Platt, F. M., and Butters, T. D. (2001) High-performance liquid chromatography analysis of ganglioside carbohydrates at the picomole level after ceramide glycanase digestion and fluorescent labeling with 2-aminobenzamide. *Anal Biochem.* **298**, 207-217
9. Neville, D. C., Coquard, V., Priestman, D. A., te Vruchte, D. J., Sillence, D. J., Dwek, R. A., Platt, F. M., and Butters, T. D. (2004) Analysis of fluorescently labeled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labeling. *Anal Biochem.* **331**, 275-282
10. Fujitani, N., Takegawa, Y., Ishibashi, Y., Araki, K., Furukawa, J., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Ito, M., and Shinohara, Y. (2011) Qualitative and quantitative cellular glycomics of glycosphingolipids based on rhodococcal endoglycosylceramidase-assisted glycan cleavage, glycoblotting-assisted sample preparation, and matrix-assisted laser desorption ionization tandem time-of-flight mass spectrometry analysis. *J Biol Chem.* **286**, 41669-41679
11. Ishibashi, Y., Kiyohara, M., Okino, N., and Ito, M. (2007) Synthesis of fluorescent glycosphingolipids and neoglycoconjugates which contain 6-gala oligosaccharides using the transglycosylation reaction of a novel endoglycoceramidase (EGALC). *J Biochem.* **142**, 239-246

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.

Extrakcia glykolipidov

Bystrický P., Vlčková S., Mucha J.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod

Všetky lipidy sú extrahované zo vzoriek zmesou chloroformu, metanolu a vody. Aby sa odstránili glycerolipidy, je prevedená saponifikácia s hydroxidom sodným. Neutrálne glykosfingolipidy (GSLy) sú oddelené od kyslých GSL-ov pomocou aniónovo-výmennej chromatografie.

Činidlá

chloroform

methanol

zmes CHCl_3 -MeOH 2:1 (obj.)

zmes CHCl_3 -MeOH-dest. voda 1:2:0.8 (obj.)

4 M hydroxid sodný vo vode

4 M kyselina octová vo vode

zmes MeOH-voda 1:1 (obj.)

zmes MeOH-0.2 M octan amónny 1:1 (obj.)

Prístroje

kolónka OASIS HLB 1 cm^3 /30 mg (reverse-phase cartridge, Waters)

kolónka OASIS MAX 1 cm^3 /30 mg (anion exchange cartridge, Waters)

sonikátor

SpeedVac koncentrátor (Thermo)

trepáčka

Metódy

I. Extrakcia glykosfingolipidov (GSL-ov) z tkanív

1. Zhomogenizujte vzorku s 4 objemami 1 °C vody (približne 0.25 g/ mL).
2. Preneste 200 μL vzorky (cca 50 mg tkaniva) do sklenenej vialky.
3. Pridajte 1.2 mL 1 °C metanolu a dobre zamiešajte.
4. Pridajte 2 mL chloroformu a dobre zamiešajte.
5. Inkubujte pri 37 °C 1 hod. pri neustálom trepaní.
6. Pridajte 1 mL metanolu a dobre zamiešajte.
7. Stočte pri 1000g 10 min.
8. Opatrne zlejte alebo vysajte pipetou supernatant do sklenenej vialky.
9. Pridajte 2mL zmesi CHCl_3 -MeOH-dest. voda k peletu z bodu 7).
10. Inkubujte pri 37 °C 2 hod. pri neustálom trepaní.
11. Stočte pri 1000g 10 min.
12. Vysajte supernatant pipetou a pridajte k extraktu z bodu 8).
13. Vysušte na SpeedVac koncentrátore.

II. Extrakcia GSL-ov z bunkových kultúr

1. Zozbierajte bunky ($\sim 1 \times 10^6$ buniek).
2. Pridajte 2 mL zmesi CHCl_3 -MeOH.
3. Sonikujte v sonikátore 5 min.
4. Inkubujte pri 37 °C 1 hod. pri neustálom trepaní.
5. Stočte pri 1000g 10 min.
6. Vysajte supernatant pipetou do sklenenej vialky.
7. Pridajte 1 mL zmesi CHCl_3 -MeOH-dest. voda k peletu získaného v bode 5).
8. Stočte pri 1000g 10 min.
9. Vysajte pipetou supernatant a pridajte k extraktu získaného v bode 6).
10. Vysušte v SpeedVac koncentrátore.

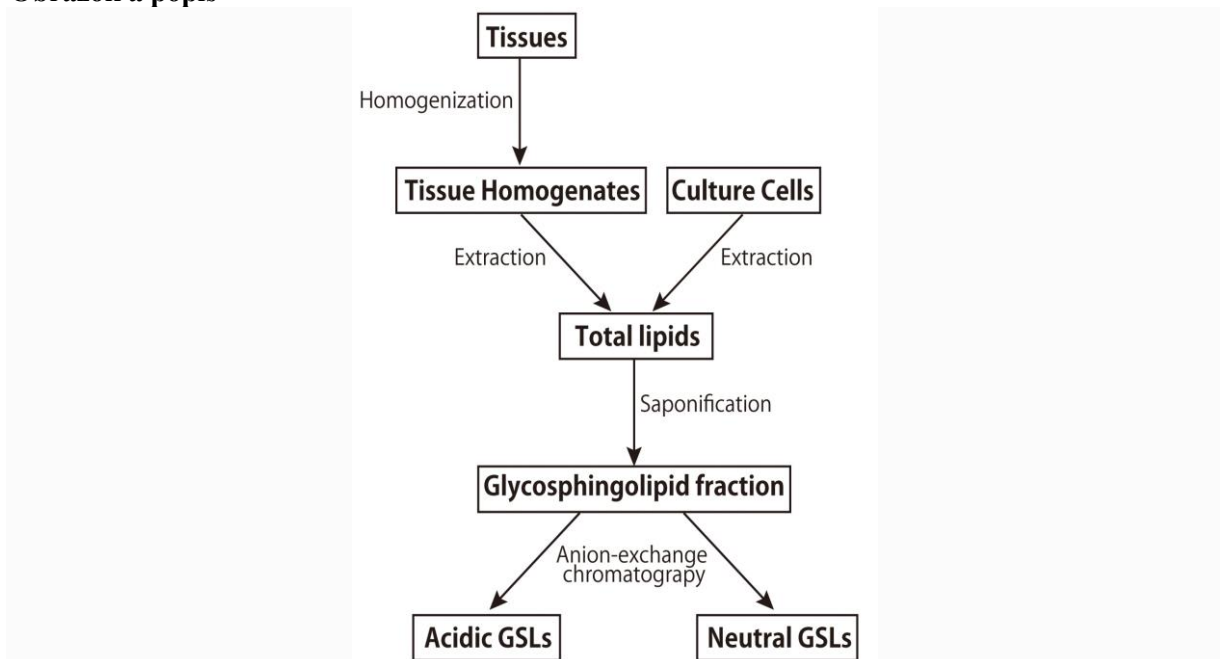
III. Saponifikácia a odsolenie

1. Rozpustite vzorku v 2 mL metanolu.
2. Pridajte 25 μ L 4 M hydroxidu sodného.
3. Inkubujte pri 37 °C 2 hod.
4. Pridajte 25 μ L 4 M kyseliny octovej.
5. Pridajte 2 mL vody.
6. Naneste vzorky na OASIS HLB kolónku.
7. Vymyjte s 1 mL zmesi MeOH-voda 1:1
8. Vymyjte kolónku s 1 mL vody.
9. Vymyjte GSLy s 1 mL metanolu.
10. Vysušte vymyté GSLy na SpeedVac koncentrátore.

4. Oddelenie neutrálnych a kyslých GSL-ov

1. Rozpustite vzorku v 2 mL metanolu.
2. Pridajte 2 mL vody.
3. Naneste vzorku na OASIS MAX kolónku.
4. Vymyjte s 1 mL zmesi MeOH-voda 1:1.
5. Vymyjte s 1 mL vody.
6. Vymyjte neutrálne GSLy s 1 mL metanolu.
7. Vysušte na SpeedVac koncentrátore (frakcia neutrálnych GSL-ov).
8. Vymyjte kyslé GSLy s 1 mL zmesi metanolu-0.2 M octanu amónneho (frakcia kyslých GSL-ov)
9. Pridajte 1 mL vody k 1 mL frakcie kyslých GSL-ov
10. Naneste na OASIS HLB kolónku
11. Vymyjte s 1 mL zmesi MeOH-voda 1:1.
12. Vymyjte s 1 mL vody.
13. Vymyjte kyslé GSLy s 1 mL metanolu.
14. Vysušte na SpeedVac koncentrátore (frakcia kyslých GSL-ov).

Obrázok a popis



Obr.1. Schéma extrakcie a oddelenia GSL-ov z biologických vzoriek.

Literatúra:

Waki, H., Kon, K., Tanaka, Y., and Ando, S. (1994) Facile methods for isolation and determination of gangliosides in a small scale: age-related changes of gangliosides in mouse brain synaptic plasma membranes. *Anal Biochem.* **222**, 156-162

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.

Kvantifikácia glykánov pomocou externých štandardov

Bystrický P., Vlčková S., Mucha J.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod: Hmotnostná spektrometria bola obmedzená len na relatívnu kvantifikáciu pri ktorej je príspevok detekovanej intenzity signálu jednotlivých glykánov vyjadrený ako percento intenzity signálu sčítaného z celého glykánového profilu (%celého profilu/prevaha). Glykomika na základe MS je prístupná normalizovanej kvantifikácii pomocou zavedenia externých štandardov, ktoré sú ^{13}C metylované a pridané do vzoriek glykánov pred MS analýzou. Zreferencovanie intenzít signálov známych množstiev purifikovaných glykánových štandardov pre dobre ocharakterizované oligosacharidové štandardy dovoľuje štandardizáciu a zmyslupné porovnanie rôznych vzoriek v rôznych časoch.

Činidlá

Kit malto oligosacharidov (Dp3 ~ Dp7), (Supelco/Sigma-Aldrich) alebo iné dobre ocharakterizované oligosacharidové štandardy

metanol, 99.8%, bezvodý (Sigma-Aldrich)

metanol, HPLC kvality, (Sigma-Aldrich)

50% hydroxid sodný (Fisher Scientific)

Deionizovaná voda

jódometán- ^{13}C , 99% ^{13}C , ^{13}C -MeI (Sigma-Aldrich)

bezvodý dimetyl sulfoxid, $\geq 99.9\%$ (Sigma-Aldrich)

pufor pre nástrek, 1mM NaOH v 50% MeOH

Prístroje

prístroj na miešanie skúmaviek/epiniek

sklenené skúmavky so závitom a viečkom

stolná centrifúga

sklenené Pasteurove pipety

dusíková odparka

LTQ-Orbitrap (Thermo) alebo iný hmotnostný spektrometer

Metódy

I. Príprava štandardov

1. Permetylujte zmes oligosacharidových štandardov (teda Dp3 a Dp4) s ^{13}C -MeI a vysušte prúdom dusíka podľa metódy Anumula a Taylora.
2. Resuspendujte zmes permetylovaných oligosacharidových štandardov v MeOH a uchovajte pri 20 °C v sklenenej skúmavke so závitom a do ďalšieho použitia.
3. Pridajte alikvot o známej koncentrácii permetylovaného oligosacharidového štandardu do pufra pre nástrek.

II. Štandardná krivka

1. Na to aby ste určili koncentrácie lineárnej kalibračnej krivky pre váš prístroj, zmes permetylovaných oligosacharidových štandardov je postupne riedená a niekoľko koncentrácií štandardu je nastreknutých do hmotnostného spektrometra.
2. Intenzity signálov sú potom použité na zostrojenie kalibračnej krivky.
3. Použite iba koncentrácie, ktoré vykazujú lineárnu regresiu.

III. Analýza vzorky

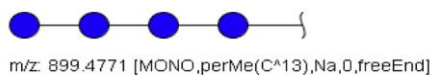
1. Najprv treba odmerať kompletný MS profil neznámej koncentrácie permetylovaného glykánu aby sa určilo vhodné množstvo štandardu na pridanie.
2. Zmiešajte známe množstvo štandardu so vzorkou glykánu.
3. Zanalyzujte túto zmes štandardu a vzorky glykánu pomocou MS.
4. Uveďte všetky intenzity relatívne k pridanému externému štandardu.

Poznámky

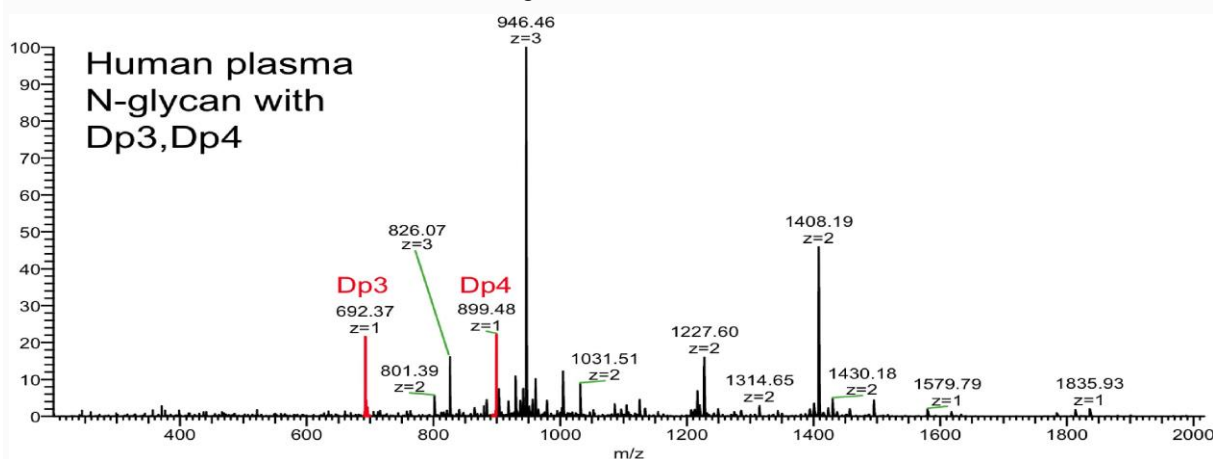
Zvolené štandardy by nemali mať rovnakú hmotnosť ako akýkoľvek pík v neznámej vzorke. A preto kompletný MS profil vašej vzorky musí byť známy (odmeraný) pred touto kvantitatívnou analýzou, aby sa vhodne zvolili štandardy na prídanie.

Štandardy sú intenzívne permetylované pomocou ^{13}C -MeI, deuterovaného jódometánu (CD_3I) alebo $^{13}\text{CD}_3\text{I}$, aby sa predišlo konfliktu s hmotnosťami hexóзовého rebríka, ktorý môže byť prítomný v neznámych vzorkách.

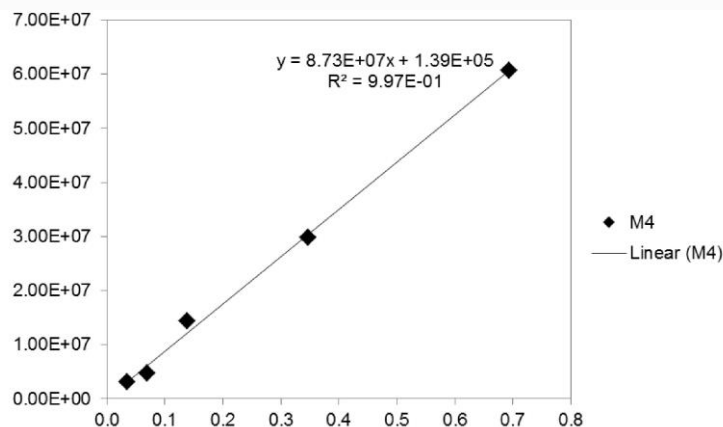
Obrázky a popisy



Obr. 1. Štruktúra a hmotnosť ^{13}C -značeného Dp4



Obr. 2. Kompletný MS profil permetylovaného N-glykánu z ľudskej plazmy analyzovaného s ^{13}C -značenými Dp3 and Dp4 štandardmi.



Obr. 3. Kalibračná krivka permetylovaného Dp4 ukazuje lineárnu regresiu v meranej oblasti.

Literatúra

Anumula, K.R., and Taylor, P.B. (1992) A comprehensive procedure for preparation of partially methylated alditol acetates from glycoprotein carbohydrates. *Anal Biochem.* 203, 101-108

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.

Metódy pre mapovanie miest O-glykozylácie

Bystrický P., Vlčková S., Mucha J.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod

Hmotnostná spektrometria sa stala neoceniteľnou metódou, pokiaľ ide o identifikáciu proteínov. Súčasťou MS výskum je zameraný nielen na identifikáciu proteínov ale aj na získanie informácií o post-translačných modifikáciách, ktoré sa nachádzajú na jednotlivých sub-skupinách a skupinách proteínov. V poslednej dobe je zvýšený záujem o mapovanie miest O-glykozylácie. V porovnaní s identifikáciou miest N-glykozylácie, mapovanie miest O-glykozylácie sa ukázalo ako náročnejšie a momentálne ešte nie je zadefinovaná všeobecne platná sekvencia na identifikáciu miest modifikácie. Navyše O-glykány sa ukazujú, že modifikujú oba seríny aj treoníny, ktoré sú často hneď vedľa seba na dlhých úsekoch v proteínovej sekvencii a nie každý serín alebo treonín je modifikovaný. Snáď jeden z náročnejších aspektov pri mapovaní týchto miest je pre stratu informácie o O-glykáne ak sa požíva disociácia indukovanámi kolíziami - collision induced dissociation (CID). A teda rôzne metódy fragmentácie ako napr. disociácia pomocou elektrónového transferu - electron transfer dissociation (ETD) bola aplikovaná pri mapovaní miest O-glykozylácie.

ETD dovoľuje retenciu modifikujúceho O-glykátu pri fragmentácii a napomáha tým určení miesta modifikácie. Avšak ETD a len prednedávnom popísaná HCD- aktivovaná ETD nie je vždy k dispozícii. A tak boli vyvinuté metódy beta-eliminácie/Michaelovej adície pre mapovanie miest, kde labilná modifikácia je nahradená so stabilnejšou modifikáciou pre CID experimenty. Jedna nevýhoda pri týchto prístupoch je keďže pôvodný modifikujúci glukán je odstránený, nie je možné presne identifikovať druh glykátu, ktorý bol pôvodne napojený na amino kyselinu. Pre vzorky o malých množstvách, kde výsledok mnohých krokov prečistenia vzorky je nízky alebo žiadny výťažok, začali sme používať jednoduchú jednokrokovú metódu, ktorá používa prchavý pufor (hydroxid amónny) ako zásadu ako aj nukleofil.¹

Činidlá

40 mM NH₄HCO₃ vo vode

1 M ditiotreitól (DTT) vo vode

55 mM jódoacetamid (1 mg/mL v 40 mM NH₄HCO₃)

trypsín, sequence grade (Promega)

1% kyselina trifluoroctová (TFA) vo vode

C-18 MicroSpin kolónka (The Nest Group)

pufor A: 0.1% kyselina mravčia vo vode

pufor B: 80% acetonitril, 0.1% kyseliny mravej vo vode

hydroxid amónny vo vode

(použitá voda by mala mať min. odpor 18 mega Ω)

Prístroje

Orbitrap LTQ mass spektrometer (Thermo)

SpeedVac koncentrátor (Thermo)

Metódy

I.. Degradácia zmesi glykoproteínov trypsínom

1. Zmerajte objem každej vzorky pipetou.
2. Pridajte dostatočné množstvo 40 mM NH₄HCO₃ aby pH hodnota roztoku bola 7.0-7.5 a zvýšte objem vzorky na 200 μ L (vodou).
3. Pridajte 2 μ L 1 M DTT, takže koncentrácia DTT vo vzorke bude 10 mM DTT
4. Inkubujte vzorku pri 56 °C 1 hod.
5. Nechajte vychladnúť na laboratórnu teplotu.

6. Pridajte 100 mL 55 mM jódoacetamidu (C₂H₄INO, IA, 10 mg/mL v 40 mM NH₄HCO₃).
7. Inkubujte pri laboratórnej teplote v tme 45 min., pri pretrepávaní v 15 min. intervaloch
8. Resuspendujte 20 µg trypsínu v 100 µL 40 mM NH₄HCO₃
9. Pridajte 50 µL trypsínu kulaždej vzorky (10 µg trypsínu, v pomer od 1:50 do 1:10).
10. Inkubujte cez noc pri 37 °C (14-16 hod).
11. Pridajte 150 µL 1 % TFA aby ste zastavili reakciu.

II.. Prečistenie trypsinom degradovaných glykoproteínov pomocou reverznej fázy

1. Pridajte 250 µL pufru B na kolónku. Stočte pri 2000 ot./min. 4 min. Vylejte to, čo pretieklo.
2. Pridajte 250 µL pufru A na kolónku. Stočte pri 2000 ot./min. 4 min. Vylejte to, čo pretieklo. Zopakujte toto este 2x.
3. Pridajte 250 µL vzorky, stočte pri 2000 ot./min. 4 min. To, čo pretieklo vráťte späť na vrch kolónky a stočte znova. Potom vylejte to, čo pretieklo. Toto zopakujte so zvyškom vzorky (ak ostal).
4. Vymyjte kolónku 2x s 250 µL pufru A. Vylejte to, čo pretieklo.
5. Pridajte 150 µL pufru B na kolónku na vymytie. Stočte pri 2000 ot./min. 4 min. Uchovajte to, čo pretieklo - obsahuje glykopeptidy. Zopakujte ešte raz a slejte spolu s predošlým. Konečný objem by mal byť ~300 µL.
6. Vysušte vzorku na SpeedVac-u.

III. β-eliminácia/Michaelova adičná reakcia glykopeptidov s hydroxidom amónnym (pozri pozn.)

1. Pridajte 500 µL hydroxidu amónneho k vysušenej zmesi glykopeptidov/peptidov.
2. Inkubujte pri 45 °C cez noc.
3. Vysušte vzorku na SpeedVac-u.
4. Pridajte 500 µL 18 megaΩ vody, Zopakujte 2x.
5. Zanalyzujte zmes glykopeptidov/peptidov pomocou LC-MS/MS Orbitrap-u (očakávaný posun -1 Daltona pre modifikované Ser/Thr aminokyseliny).

Poznámky

Jedna z alternatív, ak niekto chce obohatiť svoje peptidy po β-eliminácii/konjugačnej adičnej reakcii alebo zaviesť do vzorky izotopy pre komparatívnu proteomiku, môže použiť BEMAD protokol z odkazov 2 a 3.

Literatúra:

1. Rademaker, G. J., Pergantis, S. A., Blok-Tip, L., Langridge, J. I., Kleen, A., and Thomas-Oates, J. E. (1998) Mass spectrometric determination of the sites of O-glycan attachment with low picomolar sensitivity. *Anal Biochem* **257**, 149-160
2. Wells, L., Vosseller, K., Cole, R. N., Cronshaw, J. M., Matunis, M. J., and Hart, G. W. (2002) Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics* **1**, 791-804
3. Vosseler, K., Hansen, K. C., Chalkley, R. J., Trinidad, J. C., Wells, L., Hart, G. W., and Burlingame, A. L. (2005) Quantitative analysis of both protein expression and serine / threonine post-translational modifications through stable isotope labeling with dithiothreitol. *Proteomics* **5**, 388-398

PodĎakovanie: 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.

Mliečne oligosacharidy – príprava oligosacharidov z materského mlieka

Bystrický P., Vlčková S., Mucha J.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod

Materské mlieko je známe tým, že obsahuje veľké oligosacharidy rôznych typov. V porovnaní, kravské mlieko obsahuje menšie oligosacharidy. Oligosacharidy v materskom mlieku sú odvodené z rôznych oligosacharidov, ktoré sú sialyzované cez α 2-3 alebo α 2-6 glykozidické väzby a taktiež môžu byť fukozylované cez α 1-2, α 1-3 or α 1-4 väzby. Exprimujú rôzne antigény ako napr. antigény krvnej skupiny. Bol publikovaný dôkaz, že virulentné enterické baktérie a vírusy iniciujú infekciu tak, že sa naviažu na určité oligosacharidové reťazce na glykolipidoch a glykoproteínoch na povrchu ich cieľových buniek. Kvôli štrukturálnej mimikre glykánov na glykoproteínoch mukózne membrány, má sa za to, že oligosacharidy z materského mlieka chránia kojené dojčatá proti infekciám blokovaním týchto adhézných patogénov. Preto sú prospešné ako nástroj glykobiologického vývoja a výskumu v medicíne.

Činidlá

metanol

chloroform

kolóna Sephadex G-25 (medium grade, 5.0 cm ID \times 67 cm)

kolóna pre aniónovú výmenu (anion-exchange; napr. Super Q-Toyopearl 650M, 1.6 cm ID \times 10 cm)

5% vodný roztok fenolu

konc. H₂SO₄

100, 200, 300, 400, 500 mM pufru octanu pyridiniového, pH 5.0

10 mg/ml kyseliny 2,5-dihydroxybenzoovej v 40 obj.% acetonitril-voda (ak sa použije MALDI-TOF MS)

Milli-Q voda

Prístroje

UV-Vis spektrofotometer, centrifuga, Speed Vac koncentrátor, MALDI-TOF hmotnostný spektrometer

Metódy

1. Odstránenie tukov a proteínov

- 1) Stočte materské mlieko (10–20 mL) 15 min. pri 5000g a 4°C.
- 2) Opatrne vylejte supernatant po 5 mL do skúmaviek.
- 3) Ku každej pridajte 10 mL metanolu a 15 mL chloroformu.
- 4) Dobre pretrepte a nechajte chvíľu stáť pri 4 °C.
- 5) Stočte 5 min. pri 5000g a 4°C.
- 6) Pipetou opatrne odsajte hornú vrstvu.
- 7) Túto hornú vrstvu vysušte na koncentrátoře dosucha a rozpustite vo vode (tzv. surová frakcia oligosacharidov).

2. Gélová filtrácia

- 1) Naneste surovú frakciu oligosacharidov na Sephadex G-25 kolónu
- 2) Vymývajte vodou a zberajte frakcie po 20 mL
- 3) Odoberte alikvóty z každej frakcie a zriedte na 100 μ L.
- 4) Pridajte 100 μ L of 5% vodného roztoku fenolu a 0.5 mL konc. H₂SO₄.
- 5) Nechajte stáť 20 min. pri laboratórnej teplote
- 6) Odmerajte OD pri 490nm (na detekciu hexózu).
- 7) Zlejte dokopy frakcie obsahujúce oligosacharidy (väčšie než laktóza).

3. Oddelenie neutrálnych a kyslých oligosacharidov

- 1) Naneste vzorku na kolónu pre aniónovú výmenu.
- 2) Vymyte vodou a zberajte frakcie obsahujúce neutrálne oligosacharidy.
- 3) Potom vymyte postupne s 100, 200, 300, 400 a 500 mM pufru octanu pyridiniového a zberajte

frakcie obsahujúce kyslé oligosacharidy.

4. Oddelenie oligosacharidov podľa veľkosti pomocou gélovej filtrácie

- 1) Naneste frakciu s neutrálnymi oligosacharidmi na kolónu Sephadex G-25
- 2) Vymyte vodou a zozbierajte frakcie.
- 3) Odoberte alikvoty z každej frakcie a naneste na MALDI terčik.
- 4) Pridajte ku každej kvapke roztok kyseliny 2,5-dihydroxybenzoovej ako matrice
- 5) Nechajte vysušiť.
- 6) Odmerajte MALDI spektrum na MALDI-TOF hmotnostnom spektrometri.
- 7) Zlejte frakcie ktoré obsahujú molekuly rovnakej veľkosti.

5. Derivatizácia oligosacharidov s pyrénom hydrazidu kyseliny butánovej (PBH)2

Derivatizácia oligosacharidov s citlivým flouorescenčným derivátom je užitočná pre ďalšie separácie a štruktúrnu analýzu aj preto lebo každá z vyprodukovaných frakcií obsahuje niekoľko oligosacharidov.

- 1) Zahrejte vzorky oligosacharidov (približne 1 nmol) a PBH (100 nmol) v 20 μ L 0.1 N kyseliny octovej v metanole v sklenenej fľaštičke (vialke) s natesno utiahnutým viečkom pri 80 °C for 20 min.
- 2) Neutralizujte pridaním zriedeného NaOH roztoku.
- 3) Pridajte 30 μ L 1.7 M NaBH₄ roztoku.
- 4) Inkubujte pri 40 °C 20 min.
- 5) Neutralizujte pridaním zriedeného roztoku kyseliny octovej.
- 6) Pridajte vodu a rovnaký objem chloroformu.
- 7) Dobre premiešajte/potraste.
- 8) Stočte pri 5000 ot./min. 5 min.
- 9) Pipetou odsajte spodnú vrstvu chloroformu.
- 10) Pridajte rovnaké množstvo chloroformu a zopakujte extrakciu.
- 11) Prelejte hornú vodnú fázu obsahujúcu PBH-derivatizovaný/é oligosaccharid/y.
- 12) Vysušte na SpeedVac koncentrátore.
- 13) Rozpusťte vo vode.
- 14) Naneste na Sep-Pak light C18 kolónku.
- 15) Vymyte vodou piatimi objemami kolónky – eluát vylejte.
- 16) Vymyte vodu : acetonitrilom = 6:4 (obj.) tiež piatimi objemami kolónky – eluát zachyťte.
- 17) Vysušte na SpeedVac koncentrátore.
- 18) Uchovajte pri -30 °C až do použitia.

Poznámky

PBH derivatizované oligosacharidy môžu byť ďalej separované/požité pri HPLC a afinitnej chromatografii s imobilizovanými lektínmi.

Táto metóda je praktická pri použití 10–20 mL mlieka. Ak je k dispozícii viac (napr. 1 liter) odporúča sa použiť metódu Kobatu.³

Odkazy

1. Amano J., Osanai, M., Orita, T., Sugahara, D., and Osumi, K. (2009) Structural determination by negative-ion MALDI-QIT-TOFMSⁿ after pyrene derivatization of variously fucosylated oligosaccharides with branched decaose cores from human milk. *Glycobiology*. **19**, 601–14
2. Amano, J., Sugahara, D., Osumi, K., and Tanaka, K. (2009) Negative-ion MALDI-QIT-TOF MSⁿ for structural determination of fucosylated and sialylated oligosaccharides labeled with a pyrene derivative. *Glycobiology* **19**, 592–600
3. Kobata, A. (1972) Isolation of oligosaccharides from human milk. *Methods Enzymol.* **28**, 262–271

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.

Použitie bakteriálnych lyáz glykozaminoglykánov na depolymerizáciu hyaluronanu

Bystrický P., Vlčková S., Mucha J.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod

Bakteriálne lyázy sa používajú pre depolymerizáciu hyaluronanu (HA) kvôli ich silným enzymatickým aktivitám. Päť bakteriálnych lyáz glykozaminoglykánov, ktoré sú komerčne dostupné, je schopných štiepiť HA (tabuľka 1). Aj keď všetky sú schopné štiepiť reťazce HA, líšia sa aktivitou a špecifitou.

Činidlá

preparát HA o molekulovej hmotnosti okolo 35 kDa vyprodukovaný mikrobiálnou fermentáciou

Streptococcus pyogenes (R & D Systems)

hyaluronidáza zo *Streptomyces hyalurolyticus* (Seikagaku Biobusiness Corp.)

hyaluronidáza SD zo *Streptococcus dysgalactiae* (Seikagaku Biobusiness Corp.)

chondroitináza ABC (konvenčný preparát) zo *Proteus vulgaris* (Seikagaku Biobusiness Corp.)

chondroitináza AC-I zo *Flavobacterium heparinum* (Seikagaku Biobusiness Corp.)

chondroitináza AC-II zo *Arthrobacter aurescens* (Seikagaku Biobusiness Corp.)

Prístroje

derivatizovaná amínová kolóna z oxidu kremičitého PA-03

kolóna YMC-Pack PA-03 (4.6 mm ID x 250mm) (YMC Co.)

HPLC systém (napr. LC-20 Series; Shimadzu Corp.)

Ultrafree-MC (Merck Millipore)

Metódy

1. Použitie bakteriálnych glykozaminoglykánových lyáz na depolymerizáciu hyaluronanu

1. Enzymatická degradácia HA

a) Inkubujte HA (2 µg) s hyaluronidázou zo *Streptomyces hyalurolyticus* (0.5 TRU) v konečnom objeme 20 µL 20 mM sodno-octanového pufru, pH 6.0 obsahujúcom 150 mM chloridu sodného pri 60 °C 75 min alebo s hyaluronidázou SD zo *Streptococcus dysgalactiae* (5 mIU) v konečnom objeme 20 µL 40 mM sodno-fosfátového pufru, pH 6.2, pri 37 °C 30 min.

b) Inkubujte HA (2 µg) s chondroitinázou (5 mIU each) v konečnom objeme 20 µL 50 mM Tris-HCl pufru, pH 8.0, obsahujúcom 60 mM octanu sodného (chondroitinase ABC), 50 mM Tris-HCl pufru, pH 7.3 (chondroitináza AC-I) alebo 50 mM sodno-octanového pufru, pH 6.0 (chondroitináza AC-II) pri 37 °C 30 min.

2. Ukončíte reakciu zahriatím na 100 °C na 1 min.

3. Zriedte reakčnú zmes na 200 µL destilovanou vodou.

4. Analyzujte alikvot (100 µL) na HPLC na naderivatizovanej amínovej kolóne z oxidu kremičitého PA-03 použitím lineárneho gradientu NaH₂PO₄ od 16 do 530 mM pri toku 1 mL/min a monitorujú UV absorbanciou pri 232 nm.

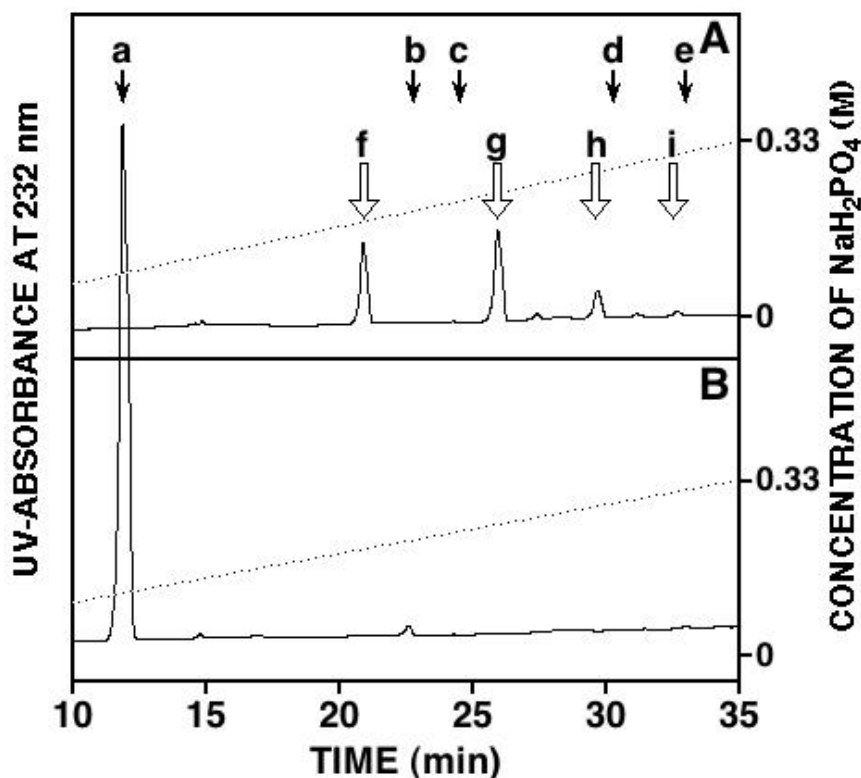
5. Identifikujte a kvantifikujte získané píky porovnaním s pozíciami autentických štandardov (obr. 1 a 2).

Tabuľky, obrázky a popisy

Tabuľka 1. Komerčne dostupné bakteriálne hyaluronidázy a chondroitinázy

Enzým	Substrátová špecificita	Hlavné konečné produkty
Hyaluronidáza zo <i>Streptomyces hyalurolyticus</i>	Tento enzým je dosť špecifický pre HA a nereaguje ani s chondroitín sulfátom (CS) ani s chondroitínom.	Nesaturované tetrasacharidy a hexasacharidy
Hyaluronidáza SD zo <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Tento enzým nereaguje iba s HA ale aj s chondroitínom. Avšak nedepolymerizuje ho. Rýchlosť degradácie chondroitínu je oveľa nižšia ako pri HA.	Nesaturované disacharidy
Chondroitináza ABC zo <i>Proteus vulgaris</i>	HA sa prakticky týmto enzýmom neštiepi. Reaguje s obomi CS aj chondroitínom ale rýchlosť depolymerizácie chondroitínu je nižšia ako pri CS.	Nesaturované disacharidy
Chondroitináza AC-I zo <i>Flavobacterium heparinum</i>	Tento enzým depolymerizuje CS aj chondroitín pri podobných rýchlostiach. Tiež degraduje HA ale o niečo pomalšie ako CS/chondroitín.	Nesaturované disacharidy
Chondroitináza AC-II zo <i>Arthrobacter aureescens</i>	Tento enzým reaguje nielen s CS/ chondroitínom ale aj s HA exolytickým spôsobom.	Nesaturované disacharidy

Reakcia bakteriálnych elimináz skonvertuje pôvodnú uronovú kyselinu v polysacharide na umelú štruktúru, teda 4,5-nesaturovanú uronovú kyselinu, 4-deoxy- α -L-threo-hex-4-enopyranosyluronovú kyselinu.



Obr. 1. HPLC profily výsledkov pôsobenia hyaluronidázy na HA.

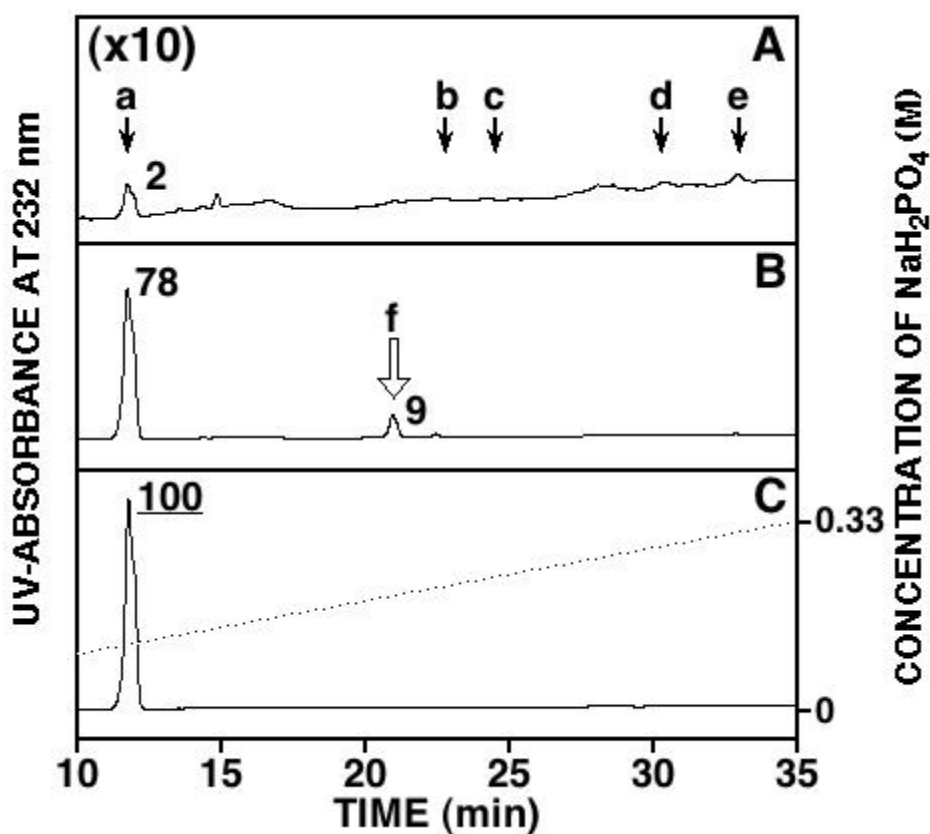
Preparát HA (2 µg, približne 5 nmol ako disacharidu) bol kompletne zreagovaný s hyaluronidázou zo *Streptomyces hyalurolyticus* (A) alebo hyaluronidázou SD zo *Streptococcus dysgalactiae* (B). Zmes produktov bola analyzovaná pomocou HPLC s kolónou na výmenu aniónov (amino derivatizovaný oxid kremičitý) použitím lineárneho gradientu NaH₂PO₄ od 16 mM do 530 mM počas 60 min. Eluát bol monitorovaný UV absorbanciou pri 232 nm. Šípky indikujú elučné pozície autentických nesaturovaných disacharidov:

- a: ΔHexA-GlcNAc a ΔHexA-GalNAc
- b: ΔHexA-GalNAc(6-sulfát)
- c: ΔHexA-GalNAc(4- sulfát)
- d: ΔHexA(2-sulfate)-GalNAc(6- sulfát)
- e: ΔHexA-GalNAc(4,6-disulfát).

ΔHexA, GalNAc a GlcNAc znamenajú v poradí 4,5-nesaturovanú urónovú kyselinu, N-acetylgalaktozámín a N-acetylglukozámín.

Pravdepodobné pozície nesaturovaných oligosacharidov sú znázornené prázdnyimi šípkami:

- f: nesaturovaný tetrasacharid
- g: nesaturovaný hexasacharid
- h: nesaturovaný oktasacharid
- i: nesaturovaný dekasacharid



Obr. 2. HPLC profily výsledkov pôsobenia chondroitinázy na HA

Preparát HA (2 µg, približne 5 nmol ako disacharidu) bol kompletne zreagovaný s 5 mIU chondroitinázy ABC (A), AC-I (B) alebo AC-II (C) pri 37 °C 30 min. Zmes produktov bola analyzovaná pomocou HPLC s kolónou na výmenu aniónov (amino derivatizovaný oxid kremičitý) Eluát bol monitorovaný UV absorbanciou pri 232 nm. Šípky nad chromatogramom A indikujú elučné pozície autentických nesaturovaných disacharidov (pozri popis v obr. 1). Prázdna šípka nad chromatogramom B indikuje pravdepodobnú pozíciu nesaturovaného tetrasacharidu. Chromatogram A bol zvýšený 10x v porovnaní s B a C. Pomer hlavných nesaturovaných oligosacharidov

generovaných enzymatickou reakciou bol vypočítaný na základe plochy píku a je indikovaný relatívne k reakcii chondroitinázy AC-II ako 100.

Odkazy

1. Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O., and Suzuki, S. (1968) Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *J. Biol. Chem.* **243**, 1523-1535
2. Ohya, T., and Kaneko, Y. (1970) Novel hyaluronidase from *Streptomyces*. *Biochim. Biophys. Acta* **198**, 607-609
3. Hiyama, K., and Okada, S. (1975) Crystallization and some properties of chondroitinase from *Arthrobacter aurescens*. *J. Biol. Chem.* **250**, 1824-1828
4. Jandik, K.A., Gu, K., Linhardt, R.J. (1994) Action pattern of polysaccharide lyases on glycosaminoglycans. *Glycobiology* **4**, 289-296

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.

Použitie N-Glykanázy

Bystrický P., Vlčková S., Mucha J.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod

N-glykanáza [peptid-N⁴-(N-acetyl-β-D-glukóزامinyl) asparagín amidáza, EC 3.5.1.52], taktiež sa volá peptid N-glykanáza, PNGáza, glykopeptidáza alebo glykoamidáza, je druh amidázy, ktorá reaguje na glykozyamidových väzbách medzi GlcNAc a Asn aminokyselinou na vysokomanóзовých, hybridných a komplexných (bi-, tri- alebo tetra-antenárnych) oligosacharidových reťazcoch z N-naviazaných glykoproteínov (pozri obr. 1).

Predpokladá sa, že N-glykanáza F (alebo PNGáza F; Plummer et al. 1984) zo *Flavobacterium meningosepticum* hydrolyzuje glykozylaminové väzby mechanizmom, ktorý je podobný analogickému enzýmu z mandlí - glycopeptidáze A (Takahashi a Nishibe, 1978) a aspartylglykozylamin amidohydrolyze (EC3.5.1.26; Makino et al., 1966). Posledný menovaný enzým bol prvý krát najdený v krvnom sére a v tkanivách. Tam degraduje väzbu iba v malých molekulách pozostávajúcich iba z jedného Asn a jednej GlcNAc.

Činidlá

PNGáza F (zo *Flavobacterium meningosepticum*, molekulová hmotnosť 35.5 kDa) je komerčne k dispozícii z niekoľkých zdrojov. Enzým je spravidla purifikovaný z filtratu z bunkovej kultúry, od England BioLabs Inc., Sigma-Aldrich (kvalita pre proteomiku) atď. Rekombinantné enzýmy (exprimované v *E. coli*) od Roche Diagnostics GmbH (N-glycozidáza F), Sigma-Aldrich, Takara-Bio Inc. atď.

glykopeptidáza A (z emulzie mandlí), tiež sa volá glykoamidáza A je k dispozícii od Seikagaku Biobusiness Corp., Sigma-Aldrich a Roche Diagnostics GmbH.

1% SDS

7.5% Nonidet P-40 (NP-40)

0.2 M sodno-fosfátový pufoer alebo 0.2 M Tris-HCl pufoer, pH 7.5–8.5

1% PMSF rozpustené v 2-propyl alkohole

ditioerytreitol

jóoacetamid

50% acetonitril

50 mM-100mM hydrouhličitanovo-amónny pufoer, pH 8.5

kolóna C18 Sep-Pak (Waters Corp.)

pepsín (prípadne trypsín alebo chymotrypsín)

Prístroje: reakčný inkubátor alebo vodný kupel' (na 37 °C a 100 °C)

Metódy

1. Deglykozylácia N-viazaného glykoproteínu s PNGázou F v roztoku.

- 1) Zahrejte vzorku glykoproteínu (10–50 μL, 1–2 mg/mL) in 0.2 M sodno-fosfátovom pufoeri alebo 0.2 M Tris-HCl pufoeri, pH 7.5–8.5, ktorý obsahuje 0.5% SDS, 50 mM 2-merkptoethanol na 100 °C for 3 min.
- 2) Odoberte 10 μL vzorky denaturovaného glykoproteínu do mikroepinky.
- 3) Pridajte 10 μL 0.2 M sodno-fosfátového pufoera alebo 0.2 M Tris-HCl pufoera, pH 7.5, obsahujúceho 2 mM EDTA a 0.03% PMSF.
- 4) Pridajte 5 μL of 7.5% NP-40 (koncentrácia NP-40 je 7-násobná koncentrácii SDS v reakčnej zmesi).
- 5) Pridajte 5 μL roztoku PNGase F, tak aby konečná koncentrácia enzýmu bola 0.5-10 U (IU) /mL.
- 6) Inkubujte pri 37 °C 18 hod.
- 7) Zastavte reakciu povarením reakčnej zmesi na 5 min.
- 8) Analyzujte alikvóty reakčných produktov pomocou SDS-PAGE, lektínového blotingu atď.
- 9) Pridajte 3 objemy 0 °C etanolu, stočte pri 5000 g 10 min. a odlejte/odpípetujte supernatant na

analýzu uvoľnených oligosacharidov

2. Uvoľnenie N-glykánov z glykopeptidov pomocou PNGázy F (Kawasaki N et al., 2009).
 - 1) Rozpusťte vzorku/vzorky glykopeptid/ov (cca 100 µg) v 200 µL 50 mM hydrouhlčitanovo-amónneho pufru, pH 8.5.
 - 2) Pridajte 2 µL of PNGázy F (2 mU).
 - 3) Inkubujte pri 37 °C cez noc (14 hod.).
 - 4) Oddel'te N-glykány od de-N-glykozylovaných peptidov tak, že ich zmes nastreknete na kolónku s reverznou fázou C18 Sep-Pak (objem náplne cca 1 mL).
 - 5) Vymyjte kolónku s 5% kyselinou octovou.
 - 6) Potom vymyjte kolónku s 3 mL 20% a 3 mL 40% propanolu v 5% kyseline octovej (tretia 60% propanolová frakcia sa tiež môže zozbierať, ale zvyčajne peptidy eluujú skôr. Ako alternatívu možno použiť systém voda/acetonitril.
 - 7) To, čo ste vymyli z kolónky v kroku 5) - N-glykány analyzujte na MS atď.
 - 8) To, čo ste vymyli z kolónky v kroku 6) – de-N-glykozylované peptidy, identifikujte príslušné miesta glykozylácie v de-N-glykozylovaných peptidoch pomocou automatickej nanoLC-ESI-MS/MS analýzy atď. (pri reakcii glykopeptidov s PNGázou F, Asn v pôvodných glykozylovaných peptidoch sa mení na Asp v de-N-glykozylovaných peptidoch (pozri obr.1).
3. Deglykozylácia N-viazaných glykoproteínov s PNGázou F v géloch (Kawasaki N et al., 2009).
 - 1) Naneste vzorku glykoproteínu (alebo vzorku obsahujúcu glykoproteín/y, viac než 2-10 µg cieľového proteínu) na SDS-PAGE.
 - 2) Ofarbite proteínové pásiky rozsuspendovaným farbivom Coomassie brilliant blue.
 - 3) Vyrežte cieľový pásik z gélu.
 - 4) Zredukujte vyrezaný pásik so 100 µL of 50 mM dithioerythritol.
 - 5) Nalkylujte vyrezaný pásik z gélu so 100 µL 65 mM jódoacetamidov v 100 mM hydrogenuhlčitanovo-amónnom pufri, pH 8.5.
 - 6) Odfarbite gél s 100 µL 50% acetonitrilom v 50 mM hydrogenuhlčitanovo-amónnom pufri, pH 8.5, este raz zopakujte.
 - 7) Inkubujte gél pri 37 °C cez noc (14 hod.) s PNGázou F (1 mU) v 30 µL 50 mM hydrogenuhlčitanovo-amónneho pufru, pH 8.5
 - 8) Extrahujte gél niekoľko krát destilovanou vodou.
 - 9) Zlejte extrakty spolu ako uvoľnené N-glykány z gélu.
 - 10) Analyzujte na MS.
4. Uvoľnenie N-glykánov s glykopeptidázou A v roztoku (Takahashi N et al., 2008).

Ako príklad vzorky sa môže požiť komerčne dostupný ľudský IgG

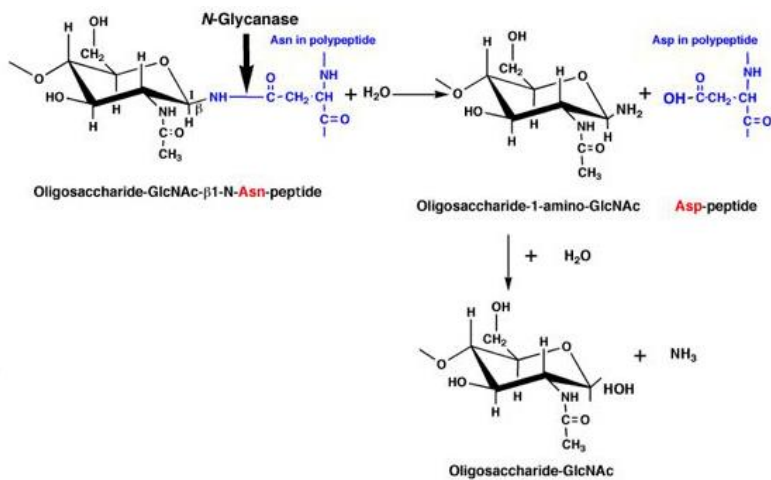
 - 1) Rozpusťte 15 mg IgG (odpovedajúce 200 nmol N-glykánov) v 60 µL destilovanej vody.
 - 2) Zahrejte na 100 °C 10 min., aby ste denaturovali proteín.
 - 3) Upravte pH reakčnej zmesi na 4.0 so zriedenou HCl.
 - 4) Pridajte pepsín (150 µg) a 2 mU glykopeptidázy A.
 - 5) Inkubujte pri 37 °C cez noc (14 hod.) pre kompletnú proteolýzu a uvoľnenie N-glykánov.

Poznámky

Dve rôzne N-glykanázy: PNGáza F a glykopeptidáza A sa v súčasnosti používajú ako nástroj na uvoľnenie N-glykánov z pôvodného glykoproteínu. Špecifita PNGázy F je dobre známa a enzým hydrolyzuje glykány naviazané na Asn, ktoré reprezentujú všetky hlavné triedy oligosacharidov. Obe, amino aj carboxylová skupina z Asn musia byť však zapojené v peptidovej väzbe. PNGáza F preferuje tripeptidy alebo dlhšie reťazce aminokyselín (Fan JQ, Lee YC. 1997). Oligosacharidy naviazané na Asn, ktoré obsahujú $\alpha(1\rightarrow6)$ naviazanú fukózu na GlcNAc hneď pri Asn sú ľahko hydrolyzovateľné pomocou PNGázy F ale príslušná nasubstituovaná $\alpha(1\rightarrow3)$ -fukóza, ktorá sa nachádza v glykoproteínoch rastlín, hmyzu a iných nižších zvierat kompletne blokuje deglykozyláciu. Toto sa zdá byť jediná prekážka pri naviazaných oligosacharidoch, ktorá odoláva PNGáze F. V porovnaní glykopeptidáza A

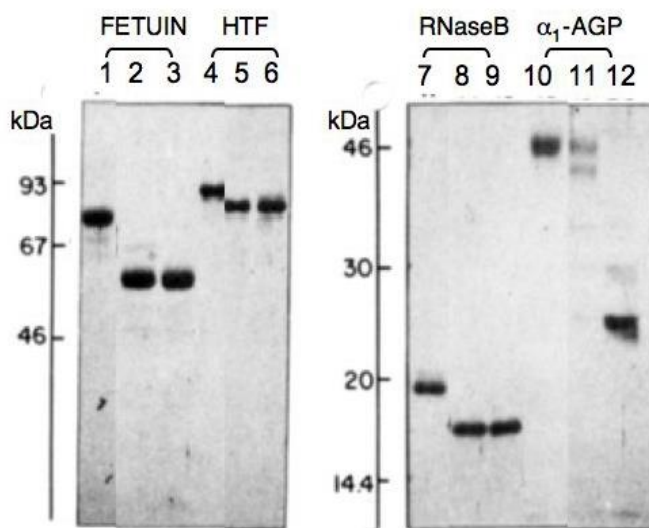
môže hydrolyzovať oligosacharidy naviazane na Asn, ktoré obsahujú nasubstituovanú $\alpha(1\rightarrow3)$ - ako aj $\alpha(1\rightarrow6)$ -fukózu na GlcNAc hneď pri Asn. Avšak, aby glykopeptidáza A fungovala dobre, veľkosť peptidov musí byť v rozmedzí 3-40 aminokyselín a teda je potrebná degradácia glykoproteínu pomocou proteázy.

Obrázky a Popisy



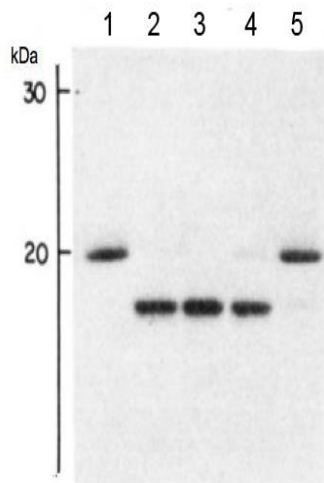
Obr. 1. Reakčný mechanizmus peptid-N-glykanázy (PNGázy F a glykopeptidázy A).

N-glykanáza hydrolyzuje aminidkú väzbu β-aspartylglykozylamínu a produkuje glykozylamín, ktorý je následne hydrolyzovaný neenzymaticky.



Obr. 2. Porovnanie deklykozylačnej efektivity PNGázy F na vybraných N-viazaných glykoproteínoch.

Deglykozylácie boli prevedené podľa protokolu 1. Kontroly (bez reakcie) sú v dráhach 1,4,7 a 10. PNGase F reakcia na natívnych glykoproteínoch, dráhy 2, 5, 8 a 11. PNGase F reakcia na denaturovaných glykoproteínoch, dráhy 3,6,9 a 12. Fetuín and ľudský transferín (HTF) boli zbehnuté na 10% SDS-PAGE géli; ribonukleáza B (RNáza B) a α1-kyslý glykoproteín (α₁-AGP), boli zbehnuté na 12.5% SDS-PAGE géli. Na gél bolo nanášané približne 2 μg proteínu.



Obr. 3. Deglykozylácia deneturovanej Rnázy B ako funkcia pridanej PNGázy F.

Sériové riedenie zásobného roztoku PNGázy F (1200 mU/mL) bolo prevedené v 0.1 M fosfátu sodného, pH 8.6 a pridané k 50 µg denaturovanej RnaseB ako je udané:

dráha 1: kontrola (bez enzýmu)

dráha 2: 120 mU/mL,

dráha 3: 12 mU/mL,

dráha 4: 0.6 mU/mL,

dráha 5: 0.06mU/mL.

Inkubačná doba bola 1 hod. Podmienky SDS-PAGE tak ako v obr. 2

* Tieto obrázky boli pôvodne publikované v "Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F" Tarentino et al. [Biochemistry. 24(17):4665-71], 1985

Odkazy

1. Fan JQ, Lee YC (1997) Detailed studies on substrate structure requirements of glycoamidases A and F. J Biol Chem. 24:272(43):27058-27064
2. Kawasaki N, Lin CW, Inoue R, Khoo KH, Kawasaki N, Ma BY, Oka S, Ishiguro M, Sawada T, Ishida H, Hashimoto T, Kawasaki T (2009) Highly fucosylated N-glycan ligands for mannan-binding protein expressed specifically on CD26 (DPPVI) isolated from a human colorectal carcinoma cell line, SW1116. Glycobiology 19: 437-450
3. Makino M, Kojima T, Yamashina I (1966) Enzymatic cleavage of glycopeptides. Biochem Biophys Res Commun 24: 961-966
4. Plummer TH Jr, Elder JH, Alexander S, Phelan AW, Tarentino AL (1984) Demonstration of peptide:N-glycosidase F activity in endo-β-N-acetyl- glucosaminidase F preparations. J Biol Chem 259: 10700-10704
5. Takahashi N, Nishibe H (1978) Some characteristics of a new glycopeptidase acting on aspartylglycosylamine linkage. J Biochem: 84:1467-1473
6. Takahashi N, Yagi K, Kato K (2008) Release of N-glycans by enzymatic methods: In Experimental Glycoscience: Glycochemistry, Taniguchi N. et al (eds): pp.7-11, Springer Japan
7. Tarentino AL, Plummer, TH. Jr (1994) Enzymatic deglycosylation of asparagine- linked glycans; purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from Flavobacterium meningosepticum. Methods Enzymol 230: 44-57
8. Tarentino AL, Gomez CM, Plummer, TH. Jr (1985) Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. Biochemistry 24: 4665-4671

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.

Rýchla a citlivá analýza O-glykánov použitím priamotokového systému na ich uvoľnenie

Bystrický P., Vlčková S., Mucha J.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod

Priamotokový systém na uvoľnenie glykánov "AutoGlycoCutter (AGC)" dovoľuje rýchle uvoľnenie reaktívnych redukujúcich O-glykánov z proteínu. Uvoľnené O-glykány sú následne značené vysoko citlivými fluorescenčnými činidlami ako napr. kyselinou 2-aminobenzoovou. Potom môžu byť analyzované na HPLC a/alebo CE s vysokou citlivosťou. Nižšie popísané metódy sú aplikovateľné na biologické vzorky ako napr. bunkové kultúry, tkanivá a vzorky séra.

Činidlá

pronáza (zo *Streptomyces griseus*; Calbiochem)

2- kyseliny aminobenzoovej (2-AA; Tokyo Chemical Industry Co.)

borohydrid sodný (NaBH₄; Sigma-Aldrich)

kianoborohydrid sodný (NaCNBH₃; Sigma-Aldrich)

kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB; Sigma-Aldrich)

koncentrovaná kyselina octová

čerstvý roztok 2-AA a kianoborohydridu sodného sa pripraví zmiešaním 15 mg z každého v 1 mL metanolu obsahujúcom 4% octanu sodného a 2% kyseliny bórovej

Prístroje

AutoGlycoCutter (AGC; Shimadzu Corp.)

Voyager DE-Pro hmotnostný spektrometer (Applied Biosystems-Life Technologies)

SpeedVac koncentrátor (Thermo Fisher Scientific Inc.)

ultrafiltračná membrána Ultrafree-MC (MWCO 5000, Merck-Millipore)

kolóna Sephadex LH-20 (1 x 30 cm; GE Healthcare)

Metódy

1. Príprava zmesi glykopeptidov z biologických vzoriek.

Pred samotnou reakciou uvoľnenia O-viazaných glykánov, biologické vzorky ako napr. bunkové kultúry, tkanivá alebo sérum sú najprv degradované proteázami. Pri použití už purifikovaných rozpustených glykoproteínov sa môže nasledujúca procedúra vynechať.

- 1) Resuspendujte bunková kultúra (~1.0 x 10⁷ buniek) alebo vzorku tkaniva (~50 mg – mokrá hmotnosť) v 500 µL 5 mM Tris-HCl pufru, pH 8.0 a zmiešajte s 500 µL 2% Tritonu-X 100 v 5 mM Tris-HCl pufri, pH 8.0 vo vodnom kúpeli s ľadom (pri 0 °C).
- 2) Zhomogenizujte bunky 7 min. v sklenenom homogenizátore a stočte túto zmes pri 8000g 30 min.
- 3) Odpipetujte supernatant a povarte 7 min. pri 100 °C a odparte do sucha na SpeedVac koncentrátore.
- 4) Resuspendujte zlyofilizovaný materiál v zmesi 200 µL vody a 800 µL etanolu v epinke
- 5) Oddel'te pelet od supernatantu stočením na stolnej centrifúge, supernatant odpipetujte.
- 6) Umyjte pelet etanolom 3x á 1 mL a potom acetónom 2x á 1 mL.
- 7) Odparte umytý pelet dosucha na SpeedVac koncentrátore
- 8) Pridajte k odparenému peletu 50 µg pronázy v 200 µL 5 mM Tris-HCl pufru, pH 8.0

a inkubujte 24 hod. pri 37°C.

- 9) Povarte reakčnú zmes 10 min. a stočte.
- 10) Odpipetujte supernatant.
- 11) K supernatantu pridajte 500 µL 2 M vodného roztoku borohydridu sodného a inkubujte pri laboratórnej teplote 30 min.
- 12) Opatrne prilejte koncentrovanú kyselinu octovú aby sa nadbytočný NaBH₄ zdegradoval.
- 13) Zmes naneste na ultrafiltračnú membránu a stočte pri 10000g.
- 14) Rozpusťte zmes glykopeptidov na membráne 250 µL vody, tým je vzorka pripravená na uvoľnenie O-glykánov.

2. Uvoľnenie redukujúcich O-viazaných glykánov pomocou AGC

- 1) Naplňte reakčnú cievku (0.25 mm vnútorný priemer, 10 m dĺžka) s 0.5 M hydroxidom lítym a naplňte kationovo-výmennú vložku vodou a počkajte pokiaľ sa ustáli jej teplota.
- 2) Nastavte tempotu reakčnej cievky na 60°C a počkajte pokiaľ sa ustáli jej teplota (obr. 1).
- 3) Nastreknite vodný roztok glykoproteínov alebo glykopeptidov do AGC.
- 4) Vymyjte vzorku 0.5 M LiOH pri prietoku 1.0 mL/min (0.7 min pre reakciu uvoľnenia).
- 5) Zbierajte eluát z vložky pomocou zberača frakcií a monitorujte UV absorbanciu pri 230 nm.
- 6) Po zbehnutí celej vzorky, zregenerujte kationovo-výmennú náplň s 0.25 M H₂SO₄ prietokom 1.2 mL/min 5 min.
- 7) Poom ju prepláchnite vodou pri 1.2 mL/min 5 min.
- 8) Vysušte zozbierané vzorky (cca 900 µL) obsahujúce uvoľnené O-glykány dosucha na SpeedVac koncentrátore

3. Fluorescenčné značenie redukujúcich oligosacharidov s 2-AA

- 1) Rozpusťte vysušený materiál získaný z predošlého v 100 µL roztoku 2-AA a kyanoborohydridu sodného
- 2) Inkubujte zmes pri 80 °C 1 hod.
- 3) Po vychladení pridajte 100 µL vody.
- 4) Naneste zmes na kolónu Sephadex LH-20, ktorú ste ustálili s 50% metanolom vo vode.
- 5) Zbierajte eluované fluorescenčné frakcie, zlejte ich dokopy a odparte dosucha na SpeedVac koncentrátore
- 6) Vzorku rozpusťte v 100 µL vody a alikvot (10 µL) analyzujte pomocou HPLC s normálnou fázou, MALDI-TOF MS alebo kapilárnej elektroforézy.

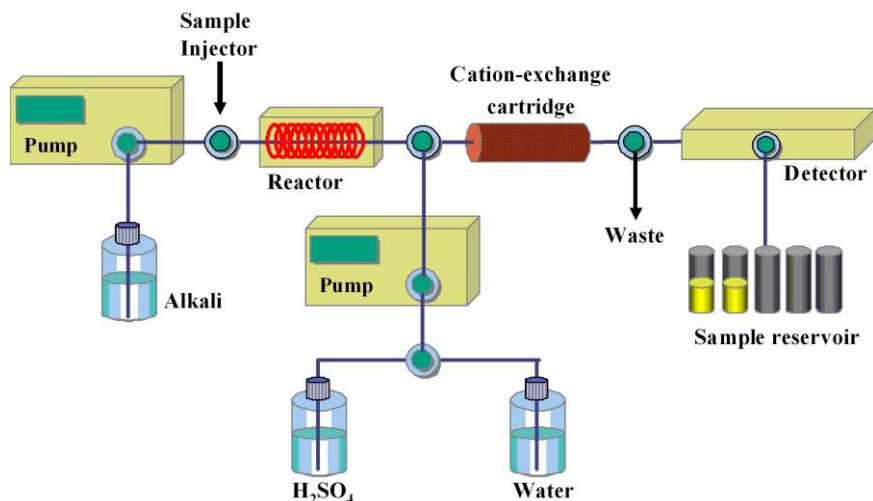
Poznámky

Touto procedúrou môžeme analyzovať O-viazané glykány z glykopeptidov, ktoré sme získali najmenej z 2.0×10^6 buniek. Pretože môžeme dostať O-glykány v reaktívnej redukujúcej forme pomocou tohto priamotokového systému, môžeme ich označiť fluorescenčnými značkami na vysoko citlivú a vysoko rozlíšenú analýzu. Typická analýza O-glykánov z bunkovej kultúry je na obr. 2. Jej výsledky sú zosumarizované v tabuľke 1. Všetky bunky okrem HL-60 dávajú relatívne jednoduché chromatogramy. Píky z chromatogramu sú zozbierané ako frakcie a zanalyzované na MALDI-QIT-TOF MS. Všetky leukemické bunky spoločne obsahujú mono- a di-sialyzované glykány na T-bunkách. Jurkatove bunky obsahujú niektoré ostatné glykány ako napr. sialylovaný-Tn (J2) a disialylovaný hexasaccharid core2 typu (J4).

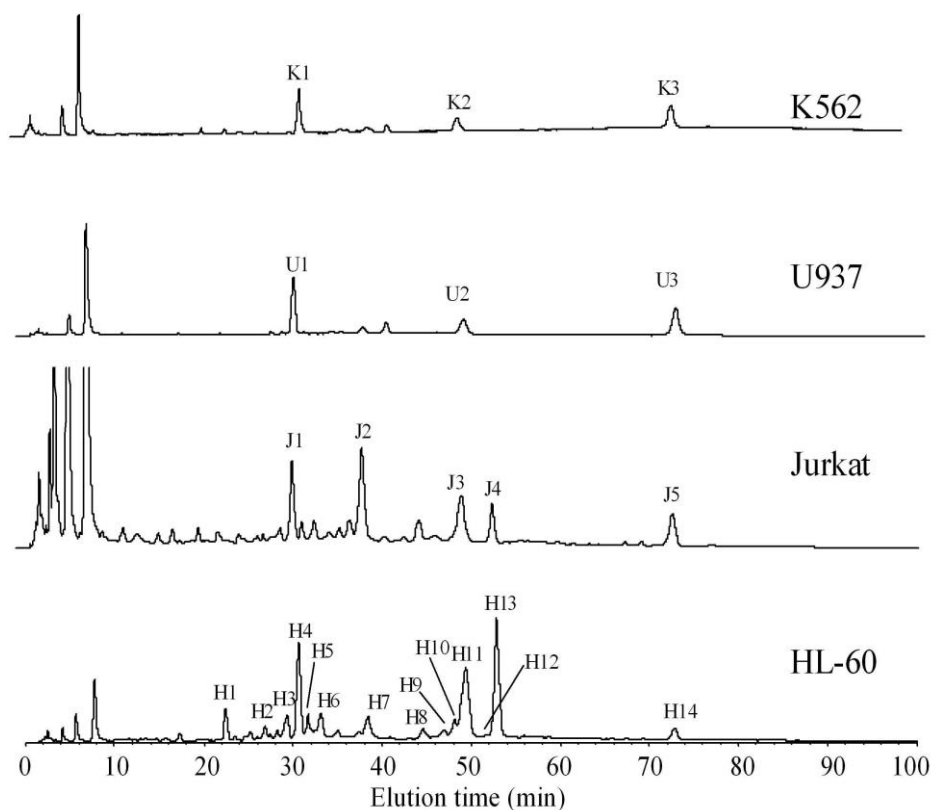
Touto procedúrou môžeme analyzovať takisto glykosaminoglykány ako skupinu proteoglykánov. Po degradácii aggrecanu (hlavný proteoglykán v chrupavke kĺbov) chondroitinázou ABC, oligosacharidy vo vazobnom regióne sú úspešne uvoľnené z jadra proteínu ako je ukázané na obr. 3. CE elektroferogram obsahuje dva hlavné oligosacharidy. Tieto dva oligosacharidy však nie sú degradované s chondro-4-

sulfatázou anis zásaditou fosfatázou. A teda pík 1 je hexasacharid, ktorý má sulfátovú skupinu na pozícii C6 GalNAc a pík 2 je nesulfátovaný hexasacharid. Štruktúry hexasacharidov vo väzobnom regióne v aggrekane súhlasia s tými už publikovanými.

Obrázky a popisy

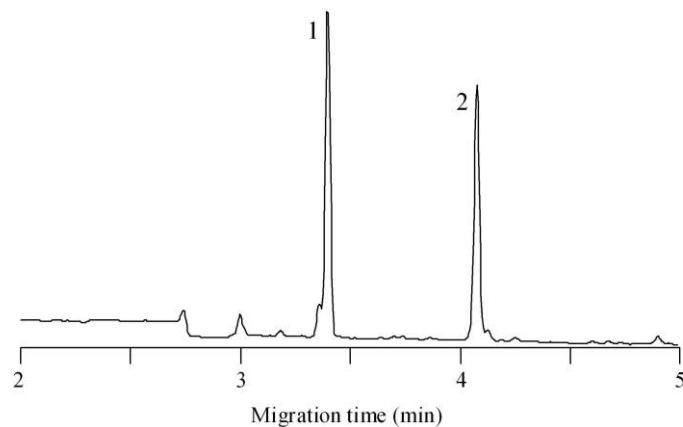


Obr. 1. Schéma zariadenia AutoGlycoCutter (AGC) na uvoľnenie O-viazaných glykánov z proteínu.



Obr. 2. NP-HPLC analýza 2-AA značených O-viazaných glykánov získaných z leukemických buniek.

Tento obrázok a tabuľka 1 sú z "Comparative studies on the structural features of O-glycans between leukemia and epithelial cell lines" Yamada K, Kinoshita M. et al. [J Proteome Res. 8(2):521-37, 2009.



	6-O-sulfate
1	$\Delta\text{HexA}\alpha 1\text{-3GalNAc}\beta 1\text{-4GlcA}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Xyl-2AA}$
2	$\Delta\text{HexA}\alpha 1\text{-3GalNAc}\beta 1\text{-4GlcA}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Xyl-2AA}$

Obr. 3. CE analysis of 2-AA labeled linkage oligosaccharides derived from aggrecan

Tento obrázok je z „Development of an apparatus for rapid release of oligosaccharides at the glycosaminoglycan-protein linkage region in chondroitin sulfate-type proteoglycans“, Matsuno YK, Kinoshita M, Kakehi K. et al., *Anal Biochem.*, 362(2), 245-57, 2007.

Structure and compositions	Peak ID	Relative abundances(%)			
		K562	U937	Jurkat	HL-60
Asialo glycan Gal β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]GalNAc-2AA	H1				4.44
Monosialo glycan NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc-2AA	K1,U1,J1,H4	32.3	36.6	20.5	15.2
NeuAc α 2-6GalNAc-2AA	H7,J2		28.9		1.16
NeuAc α 2-3Gal β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc-2AA	H3				4.24
Gal β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]GalNAc-2AA+NeuAc	H6				4.26
NeuAc α 2-3Gal β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc-2AA+Fuc	H2				2.08
Gal β 1-3[Gal-(Fuc-)GlcNAc β 1-6]GalNAc-2AA+NeuAc	H5				2.26
Disialo glycan NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc α 2-6]GalNAc-2AA	K3,U3,J5,H14	30.7	30.1	12.9	2.97
NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]GalNAc-2AA	J4,H13		10.7		25.9
NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6]GalNAc-2AA	H12				0.14
NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]GalNAc-2AA	H10				1.49
NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6]GalNAc-2AA	H10				1.49
NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]GalNAc-2AA	H9				1.11
NeuAc α 2-3Gal β 1-3[NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₃ -Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]GalNAc-2AA	H8				2.13
Degradation product NeuAc α 2-3Gal-2AA	K2,U2,J3,H11	17.3	21.2	20.6	23.7

Tabuľka 1. O-viazané glykány v leukemických bunkách.

Literatúra

1. Yamada, K., Watanabe, S., Kita, S., Kinoshita, M., Hayakawa, T., and Kakehi, K. (2010) Determination of Tn antigen released from cultured cancer cells by capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* **396**, 161-163
2. Yamada, K., Kinoshita, M., Hayakawa, T., Nakaya, S., and Kakehi, K. (2009) Comparative studies on the structural features of O-glycans between leukemia and epithelial cell lines. *J.*

Proteome Res. **8**, 521-537

3. Yamada, K., Hyodo, S., Matsuno, Y.K., Kinoshita, M., Maruyama, S.Z., Osaka, Y.S., Casal, E., Lee, Y.C., and Kakehi, K. (2007) Rapid and sensitive analysis of mucin-type glycans using an in-line flow glycan-releasing apparatus. *Anal. Biochem.* **371**, 52-61
4. Matsuno, Y.K., Yamada, K., Tanabe, A., Kinoshita, M., Maruyama, S.Z., Osaka, Y.S., Masuko, T., Kakehi, K. (2007) Development of an apparatus for rapid release of oligosaccharides at the glycosaminoglycan-protein linkage region in chondroitin sulfate-type proteoglycans. *Anal. Biochem.* **362**, 245-257

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.

Uvoľnenie N-glykánov pomocou hydrazinolýzy

Bystrický P., Vlčková S., Mucha J.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod

Hydrazinolýza, na rozdiel od enzymatických postupov na uvoľnenie glykánov z glykoproteínov, nie je v podstate ovplyvnená chemickou štruktúrou glykoproteínu a preto je spoľahlivejšia. Navyše bezvodý hydrazín je výborné rozpušťačadlo.

Činidlá

bezvodý hydrazín (Tokyo Chemical Industry Co.)

hydrogenuhličitan sodný (Wako Pure Chemical Industries Ltd.)

anhydrid octanu (Wako Pure Chemical Industries Ltd.)

Prístroje

SpeedVac koncentrátor (Thermo Fisher Scientific)

blockový inkubátor (Astec Co.)

náplň Dowex 50 W-X2 v H⁺ forme (Dow Chemical Company)

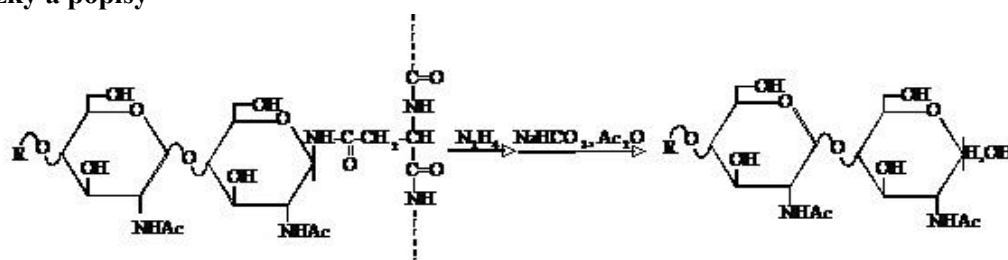
lyofilizátor

Metódy

1. Uvoľnenie N-glykánov pomocou hydrazinolýzy

- 1) Zlyofilizujte vzorku (glykoproteínu alebo tkaniva).
- 2) Odvážte 2 mg vzorky do vialky s závitom.
- 3) Pridajte 200 μ L bezvodého hydrazínu a zatvorte viečkom.
- 4) Pretrepte a inkubujte pri 100 °C cez noc (10 hod).
- 5) Vysušte hydrazín na SpeedVac koncentrátore.
- 6) Pridajte 200 μ L nasýteného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 16 μ L anhydrid octanu pri 0 °C a premiešajte.
- 7) Inkubujte pri 0 °C 30 min.
- 8) Pridajte 1 g Dowex 50 W-X2 v H⁺ forme a premiešajte.
- 9) Prelejte roztok do malej sklenenej kolónky.
- 10) Vymyte 5 objemami vody.
- 11) Zlejte spolu všetok eluát a vysušte dosucha na SpeedVac koncentrátore.

Obrázky a popisy



Obr. 1. Chemické uvoľnenie N-viazaných glykánov z glykoproteínov pomocou hydrazinolýzy

Tento obrázok bol publikovaný v "Mirai wo Hiraku Tousei Kagaku" edited by Nagai K, Kawasaki T. Kinpodo. 2005, pp.3 (Section 1.1, Nakakita S.).

Literatúra:

1. Yoshizawa, Z., Sato, T., and Schmid, K. *Biochim. Biophys. Acta.* 1966;121: 417-420
2. Takasaki, S., Mizuochi, T. and Kobata, A. (1982) Ginsburg, V. (ed) *Methods in Enzymology*, vol 83. *Academic Press, New York*, 263-268

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.

Zistenie N-glykánového profilu pomocou LC-MS

Bystrický P., Vlčková S., Mucha J.

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod

Glykoproteíny majú naviazané rôzne oligosacharidy líšiac sa v zložení monosacharidoch, sekvenciách, vo vetvení a modifikáciách. Kombinácia kvapalinovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie je veľmi účinný nástroj na separáciu a charakterizáciu glykánov (Ruhaak et al. 2009; Morelle et al. 2006; Zaia 2004). Metóda na získanie profilu N-glykánov pomocou LC-MS je nižšie.

Činidlá

peptid-N-glycozidáza F (PNGáza F; Roche Diagnostics GmbH)

tetrahydroborát sodný (NaBH_4 ; Wako Pure Chemical Industries)

ultračistá MilliQ voda (Merck Millipore)

acetonitril (Sigma-Aldrich)

0.5 M Tris-HCl pufo, pH 8.6 obsahujúci 8 M guanidín-HCl

1 M monojódoacetát sodný

kolóna Sephadex G-25 (napr. kolóna PD-10, GE Healthcare)

50 μM fosfátový pufo, pH 8.0 obsahujúci 10 mM EDTA

etanol

zriedená kyselina octová

pipetová špička s tuhou fázou (napr. ENVI carb C cartridge, Supelco/Sigma-Aldrich)

kolóna z grafitizovaného uhlíka (napr. HyperCarb 0.075 - 0.2 mm ID \times 150 mM, 5 μm častice; Thermo Fisher Scientific)

mobilná fáza A: 5 mM NH_4HCO_3 v 2% acetonitrile

mobilná fáza B: 5 mM NH_4HCO_3 v 80% acetonitrile

Prístroje

HPLC chromatograf napr. Paradigm MS4 (Bruker-Michrom) zapojený na hmotnostný spektrometer napr. LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific Inc.)

SpeedVac koncentrátor

stolná centrifúga

Metódy

1. Príprava vzorky

- 1) Rozpustíte 12 μg glykoproteínu v 50 μL 0.5 M Tris-HCl pufru, pH 8.6 obsahujúceho 8 M guanidín-HCl
- 2) Pridajte 4.8 μL 1 M monojódoacetátu sodného a inkubujte zmes pri 25 °C 40 min. v tme.
- 3) Zbavte sa prebytočného monojódoacetátu gélovou filtráciou na kolóne Sephadex G-25 a zlyofilizujte eluát na SpeedVac koncentrátore.
- 4) Rozpustíte glykoproteín v 50 μL 50 μM fosfátového pufru, pH 8.0 obsahujúceho 10 mM EDTA
- 5) Pridajte 5 jednotiek peptid-N-glykanázy F a inkubujte vzorku pri 37 °C 24 hod.
- 6) Pridajte studený etanol (na konečnú koncentráciu 60%) aby sa deglykozylovaný proteín vyzrážal a inkubujte pri -20°C 2 hod.
- 7) Stočte vzorku pri 15000 g 15 min. a vysušte vzorku na SpeedVac koncentrátore dosucha
- 8) Rozpustíte oligosacharidy v 250 μL 0.5 M NaBH_4 a inkubujte pri 25°C 16 hod.
- 9) Ukončíte reakciu pridaním zriedenej kyseliny octovej.
- 10) Extrahujte zredukované oligosacharidy borohydrátom pomocou pipetovej špičky s tuhú fázou
- 11) Vysušte eluát na SpeedVac koncentrátore dosucha a rozpustite zredukované oligosacharidy v 30 μL vody

2. LC-MS postup

- 1) Vymyjte kolónu z grafitizovaného uhlíka s 95% mobilnou fázou A pri prietoku (0.2-3.0 mL/min) 20-30 min. prípadne do ustálenia zákl. čiary na UV detektore HPLC.
- 2) Pripojte nanospejovú špičku na vývod z kolóny a nastavte ju na x-y-z translačný stupeň (AMR Inc.).
- 3) Nastavte napätie na špičke na 2.5 kV a skontrolujte ustálený stav spreja.
- 4) Nastreknite 2 μ L stočenej vzorky cez autosampler do LC nástrekového ventilu/sľučky a začinite gradient na chromatografe a zároveň zber dát na hmotnostnom spektrometri. Nastavený gradient by mal byť: 8-50% mobilnej fázy B za 60 min., lineárne. Nastavte hmotnostné spektrá v rozsahu m/z 800–2000 a MS/MS spektrá v závislosti na dátach, kolízna energia 25%.

Obrázky a popisy

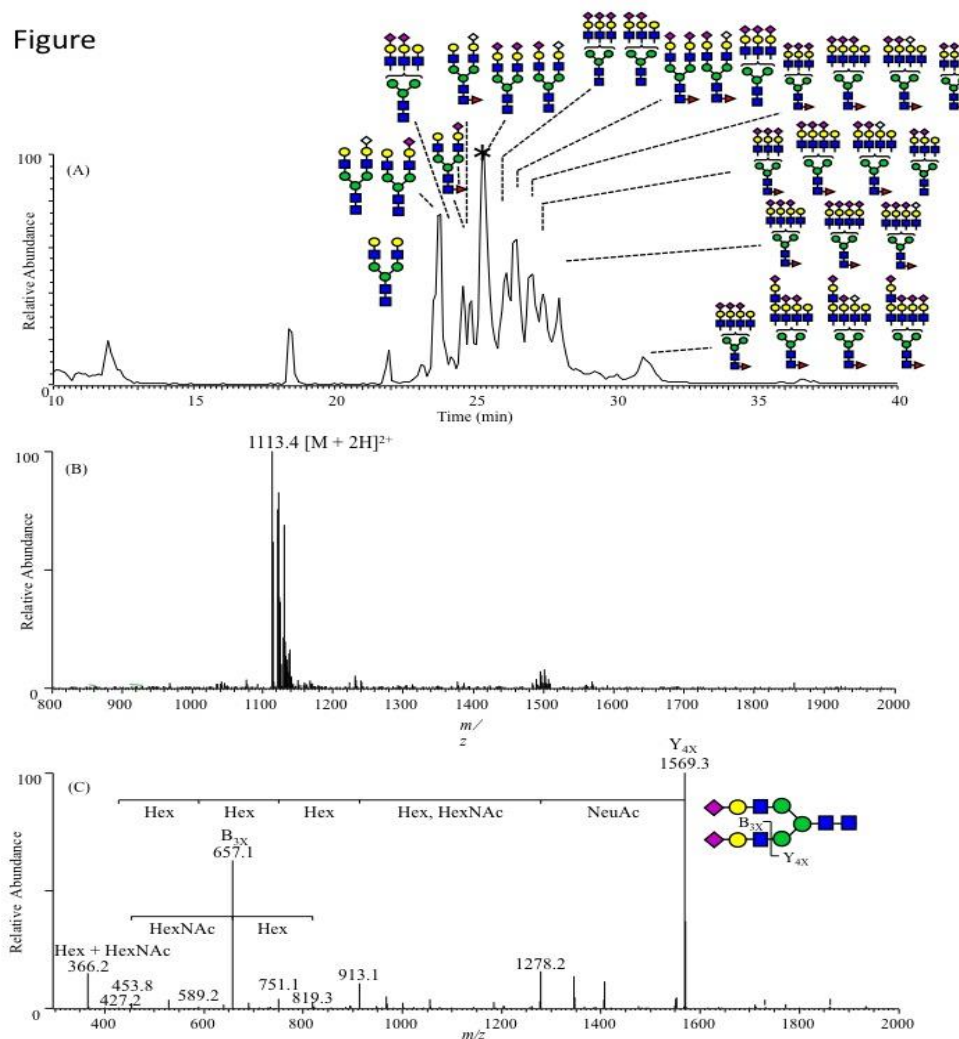


Fig. 1 LC/MS of *N*-linked oligosacchride.

(A), Total ion current chromatogram of *N*-glycans released from recombinant human follicle stimulating hormone (FSH). (B), A representative mass spectrum acquired at 25.4 min (peak *). (C), Product ion spectrum acquired from m/z 1113.4 as a precursor.

LC: HPLC, Paradigm MS4 (Michrom BioResources, Auburn, CA, USA); column, 0.1×150 mm; flow rate, 500 nL/min. MS: mass spectrometer, LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

); nano-ESI probe, (AMR, Tokyo, Japan)

● mannose; ● galactose; ■ N-acetylglucosamine; ▲ fucose; ◆ N-acetyl neuraminic acid;
◇ N-glycolyl neuraminic acid

Obr. 1 :

- (A) Sčítaný iónový chromatogram N-glykánov uvoľnených z rekombinantného ľudského hormónu, ktorý stimuluje folikuly (FSH)
- (B) Charakteristické hmotnostné spektrum namerané v 25.4 min. (pík označený *).
- (C) MS/MS spektrum odvodené zo spektra o m/z 1113.4 ako precursorového iónu.

LC: HPLC, Paradigm MS4 (Bruker-Michrom); kolóna HyperCarb 0.1 mm ID × 150 mm, 5µm častice; prietok 500 nL/min.

MS: hmotnostný spektrometer, LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific Inc.); hlavica nano-ESI, (AMR Inc.)

Literatúra

1. Ruhaak, LR., Deelder, AM., and Wührer, M. (2009) Oligosaccharide analysis by graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* **394**: 163-74
2. Morelle, W., Canis, K., Chirat, F., Faïd, V., and Michalski, JC. (2006) The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. *Proteomics.* **6**: 3993–4015
3. Zaia, J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev.* **23**: 161-227

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.

Polyfosfátkinázy organizmu *Ruegeria pomeroyi*

Lucia Achbergerová, Jozef Nahálka

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

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

Kľúčové slová

Polyfosfátkináza, *Ruegeria pomeroyi*, polyfosfát, ATP, ADP

Úvod

Polyfosfát (polyP) pozostáva z desiatok až stoviek fosfátových zvyškov pospájaných makroergickými väzbami (Kulaev, 1975). PolyP mohol byť hlavný zdroj energie už v prebiotickéj evolúcii a z toho dôvodu ho viacero autorov nazýva „bioenergetickou fosíliou“ (Kornberg, 1995; Achbergerová and Nahálka, 2011). Hlavnými enzýmami zapojenými do metabolizmu polyP sú polyfosfátkinázy (Ppk). Ich fylogenetická analýza ukázala, že Ppk2 je staršia ako Ppk1 (Achbergerová and Nahálka, 2014). Katalyzujú polymerizáciu a degradáciu polyP vlákna za súčasnej tvorby alebo degradácie NTP (Kornberg et al., 1956; Kuroda and Kornberg, 1997).

Použitím programu pBLAST sme identifikovali viac ako 500 homológov Ppk2 (*PA0141*) organizmu *Pseudomonas aeruginosa*. Homológy sa vyskytujú od 1 po 6 v jednotlivých druhoch, hlavne u morských α -proteobaktérií. Napríklad organizmus *Ruegeria pomeroyi* obsahuje 3 homológy Ppk2. Prvý Ppk2 homológ (*SPO0224*) vykazoval podobnosť s *Escherichia coli* Ppk1, druhý Ppk2 (*SPO1256*) homológ bol podobný s *P. aeruginosa* Ppk2 a tretí Ppk2 homológ (*SPO1727*) vykazoval selektivitu pre pyrimidíny. Tento Ppk2 homológ (*SPO1727*) sme pomenovali polyfosfátkináza 3 (Ppk3) (Nahálka and Patoprsty, 2009).

V náväznosti na predošlú prácu sme klonovali a biochemicky charakterizovali *SPO0224* (*PPK1*), *SPO1256* (*PPK2*), *SPO1727* (*PPK3*) *R. pomeroyi*. Rekombinantný enzým bol exprimovaný a klonovaný ako Strep-tag fúzny proteín a purifikovaný na Strep-Tactin kolónke. Pre biochemickú charakterizáciu enzýmov Ppk bol použitý kit MicroMolar Polyphosphate Assay Kit (ProFoldin) založený na detekcii polyP v reakcii.

Materiál a metódy

Strep-Tag fúzne proteíny Ppk1, Ppk2, Ppk3 sme pripravili ligáciou inzertu vzniknutého z PCR reakcie, v ktorej bola ako templát použitá genomická DNA *R. pomeroyi* (American Type Culture Collection) a plazmidu pET-51b(+) Ek/LIC (Novagen). Vzniknuté konštrukty boli transformované do chemicky kompetentných buniek *E. coli* BL21(DE3)-T1 (Sigma-Aldrich) a následne sekvenované. Kmene boli následne kultivované v LB médiu s prídavkom ampicilínu (100 $\mu\text{g/ml}$) do $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,8-1,0. Nadexpresia proteínu bola dosiahnutá prídavkom 400 μM isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranozid. Strep-tag fúzny proteín bol izolovaný na Strep-Tactin kolónku (Novagen).

Optimálne pH, preferencia pre NDP a kovy u jednotlivých polyfosfátkináz bola zisťovaná pri 30°C použitím enzymatickej assaye, pri ktorej bola sledovaná degradácia polyP kitom MicroMolar Polyphosphate Assay Kit (ProFoldin), kedy klesala fluorescencia oproti kontrole bez enzýmu. Enzymatická assay pozostávala z NDP, polyP, kovu, pufru určitého pH a 5 μl riedeného enzýmu (proteínová koncentrácia okolo 0,05 $\text{mg}/\mu\text{l}$). Reakcia bola zmiešaná s 30 μl 100 x riedeného MicroMolar Polyphosphate Assay Kit. Vzorky boli analyzované vo fluorescenčnej mikrotitračnej platničke (Brand) na

fluorometre Infinite M200 (TECAN). Fluorescencia bola detegovaná pri excitácii 415 nm a emisii 550 nm každých 20 min. Medzi každým meraním boli vzorky inkubované 30°C za stáleho miešania 300 rpm.

Výsledky a diskusia

Úspešne sa nám podarilo pripraviť fúzne Strep-tag proteíny génov *PPK1 SPO0224*, *PPK2 SPO1256*, *PPK3 SPO1727* organizmu *R. pomeroyi*. Sekvenovanie potvrdilo zhodu s GenBank. Proteín sa nám podarilo nadexprimovať použitím 400 µM YPTG. Následne sme ich izolovali a purifikovali. SDS Page potvrdilo jeho obsah vo vzorkách v akceptovateľnej čistote.

Pri zisťovaní NDP preferencie jednotlivých enzýmov sme zistili, že Ppk1 preferuje NDP v poradí GDP > UDP > CDP > ADP, Ppk2 v poradí ADP > CDP > UDP > GDP a Ppk3 v poradí UDP > ADP > GDP > CDP. Keďže všetky 3 Ppk sú homológy Ppk2 (PA0141), dokážu používať GTP a ATP (Ishige et al., 2002). Značná preferencia UDP u Ppk3 potvrdzuje skôr publikované informácie o preferencii pyrimidínov (Nahálka and Patoprsty, 2009).

Efekt jednotlivých iónov kovu na aktivitu Ppk bol sledovaný pri podmienkach 30°C a pH 8. Z iónov kovu Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Co²⁺ mal enzým Ppk1 optimum pri Ca²⁺ o koncentrácii 0,1 mM; Ppk2 pri 0,1 Mg²⁺ a Ppk3 pri Ca²⁺ o koncentrácii 0,04 mM. Ióny Co²⁺ kompletne inhibovali enzymatickú assay a 5 mM EDTA nemala efekt na enzymatickú aktivitu polyfosfátkináz.

Fakt, že Ca²⁺ bol optimálny kov pre Ppk1 a Ppk2 len dokazuje, aké sú mikroorganizmy efektívne. Mikroorganizmy v prebiotckej evolúcii pravdepodobne používali polyP ako bioenergetickú molekulu. PolyP sa vždy vyskytuje spolu s Ca²⁺. To znamená, že enzým mal dva v jednom- substrát a kofaktor zároveň. Napríklad kalcium pyrofosfát bol nájdený v New Jersey (Yamagata et al., 1991). Takisto dnes žijúce mikroorganizmy konzumujú kalcium ortofosfát vzniknutý zo štruktúr exoskeletu odumretého planktónu (Gower, 2008).

Sledovaním pH profilu uvedených polyfosfátkináz sme stanovili optimálne pH pre Ppk1 na 8,0; Ppk2 na 8,5 a pre Ppk3 na 7,5.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Achbergerová, L., Nahálka, J. (2011). *Microbial Cell Factories* 10, 63.
Achbergerová L., Nahálka J. (2014) *Biologia (Bratisl.)* 69, 263-269
Gower L. B. (2008) *Chem Rev* 108, 4551-627
Ishige K., Zhang H., Kornberg A. (2002) *Proc Natl Acad Sci Usa* 99, 16684-8
Kornberg, A. (1995). *J Bacteriol* 177, 491 – 496.
Kornberg, A., Kornberg, S.R., and Simms, E.S. (1956). *Biochim Biophys Acta* 20, 215 – 227.
Kulaev, I.S. (1975). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 73, 131 – 158.
Kuroda, A., Kornberg, A. (1997). *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 439 – 442.
Nahálka J., Patoprsty V. (2009) *Org Biomol Chem* 7, 1778-80
Yamagata Y., Watanabe H., Saitoh M., et al. (1991) *Nature* 352, 516-9

Využitie systémovej biokatalýzy v syntéze substrátu pre sialyltransferázové reakcie

Klaudia Talafová, Eva Hrabárová a Jozef Nahálka*

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

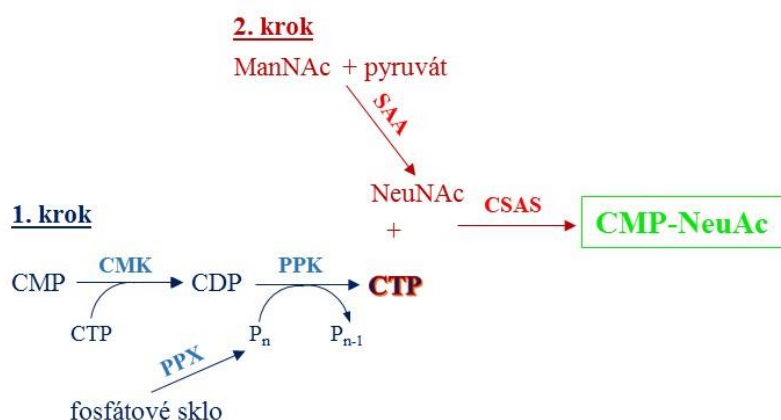
Chemický ústav SAV, Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

Kľúčové slová

kyselina CMP-sialová, systémovej biokatalýza, inklúzne telieska, recyklácia enzýmov

Úvod

Systémovej biokatalýza predstavuje nový prístup v oblasti syntézy. Je založená na organizovaní enzýmov do umelých metabolických dráh *in vitro*. Enzýmy sa v priebehu evolúcie vyvinuli na účinné katalyzátory vyznačujúce sa vysokou selektivitou a aktivitou aj pri miernych podmienkach. To z nich robí vhodných kandidátov na široké využitie v syntéze rozličných produktov, najmä tých, ktorých chemická syntéza vyžaduje extrémne podmienky (napr. vysoká teplota, tlak, toxické kovy) (Ran a kol., 2008; Yu a kol., 2012). Veľký potenciál pre biokatalytické využitie majú enzýmy vo forme inklúzných teliesok (IB), keďže predstavujú prirodzene imobilizované, ľahko izolovateľné a stabilné proteíny s dobrými procesnými vlastnosťami (García-Fruitós a kol., 2005; Nahálka a Pätoprstý, 2009). V súčasnosti je snaha o využitie systémovej biokatalýzy v syntéze medicínsky významných látok, napríklad sialylovaných oligosacharidov. Sialové kyseliny (Sias) zakončujú oligosacharidy pripojené k povrchu buniek alebo k proteínom a lipidom stavovcov a vyšších bezstavovcov. Sprostredkujú a regulujú viaceré normálne aj patologické procesy v ľudskom organizme (Schauer, 2009; Talafová a Nahálka, 2012). Vďaka svojim špecifickým vlastnostiam môžu byť Sias veľkým prínosom pre farmaceutický priemysel a medicínu (Talafová a Nahálka, 2012). Kľúčovým enzýmom sú sialyltransferázy, ktoré využívajú ako substrát CMP-*N*-acetylneuramínovú kyselinu (CMP-NeuAc) (Marchal a kol., 2001). Keďže tento substrát je nákladný, predstavujeme metódu prípravy CMP-NeuAc *in vitro* z lacného fosfátového skla. Pozostáva z dvoch krokov, a to syntézy CTP a syntézy samotnej CMP-NeuAc (Obr. 1).



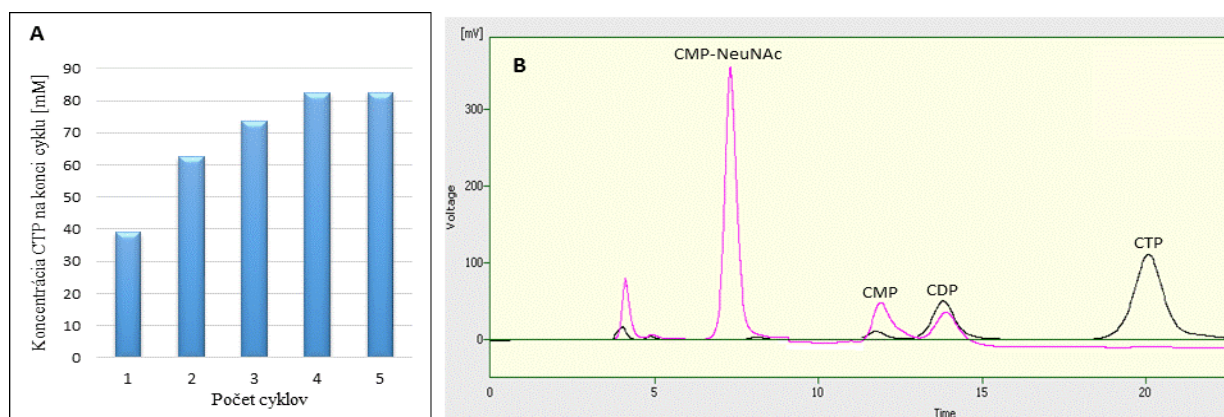
Obr. 1: Schéma syntézy CMP-NeuAc využitím systémovej biokatalýzy. 1. krok: syntéza CTP kaskádou reakcií katalyzovaných solubilnou polyfosfatázou (PPX) a cytidylátkinázou (CMK) a polyfosfatkinázou 3 (PPK) agregovanými do formy inklúzných teliesok. 2. krok: syntéza CMP-NeuAc pomocou celých buniek produkujúcich aldolázu kyseliny sialovej (SAA) a syntetázu CMP-NeuAc (CSAS).

Materiál a metódy

Gén pre polyfosfatázu (PPX) z *Ruegeria pomeroyi* naklonovaný do vektora pET-51Ek/LIC a gény pre cytidylátkinázu (CMK) z *Escherichia coli* K12 a polyfosfátkinázu 3 z *Ruegeria pomeroyi* naklonované do vektora pET-34b(+) boli exprimované v hostiteľskom kmeni *E.coli* BL21 (DE3). Postup prípravy buniek, ich propagácie a expresie proteínov opísali Nahálka a Pätoprstý (2009). Enzýmy boli izolované neiónovým lytickým detergentom. Prvou fázou reakcie bola akumulácia rozpustného polyfosfátu štiepením fosfátového skla činnosťou PPX [50 mM MgCl₂, pH 7,8 (KOH), 30°C, 12 hod.]. Potom sa pridala reakčná zmes (15 mM CMP, 5 mM CTP, 15 mM MgCl₂). Po 2; 5 a 8 h sa pridával 15 mM CMP a 15 mM MgCl₂. Jeden cyklus prebiehal 24 hodín pri 30°C a udržiavalo sa pH 7,8-8 (KOH). Na konci cyklu sa po centrifugácii (32000 g, 20 min., 4°C) odobrala polovica objemu supernatantu a k peletu so zvyšným supernatantom sa pridala nová reakčná zmes (15 mM CMP, 15 mM MgCl₂). CTP bol syntetizovaný v 5 cykloch. K produktu tejto reakcie obsahujúcej CTP sa pridalo 75 mM *N*-acetyl-*D*-manózamín (ManNAc), 150 mM pyruvát a 30 mM MgCl₂ [pH 7,8 (KOH)], pričom prebiehali dve nezávislé reakcie. Reakcia bola katalyzovaná lyofilizovanými bunkami *E. coli* BL21 (DE3) s exprimovanými enzýmami SAA a CSAS (10 mg/ml DCW). SAA/CSAS z *E. coli* K12 a K1 boli vnesené do kompetentných buniek *E. coli* na vektore pET-15b. Reakcia prebiehala 5 hod. pri 30°C. Výsledky boli získané analýzou vzoriek pomocou HPLC s elučným roztokom zloženým z 50 mM H₃PO₄ a 10 mM MgCl₂ [pH 6,4 (trietylamin)], pri prietoku 0,3 ml/min.

Výsledky a diskusia

Prezentovaná metóda syntézy CMP-NeuAc pozostáva z dvoch krokov. Prvým je syntéza CTP spriahnutím reakcií katalyzovaných tromi enzýmami (PPX, CMK a PPK), ktoré tak vytvorili umelú metabolickú dráhu *in vitro*. PPX hydrolyzuje fosfátové sklo na kratšie solubilné reťazce, ktoré potom využíva ako donor fosfátu enzým PPK na syntézu CTP z CDP. CDP vzniká z CMP a CTP katalytickou činnosťou CMK (Obr. 1). Enzýmy boli použité vo viacerých cykloch reakcie. CMK a PPK boli vo forme IB, teda v nerozpustnej forme a rozpustná PPX zostala pravdepodobne naviazaná na svojom nerozpustnom substráte – fosfátovom skle. To umožnilo všetky tri enzýmy „recyklovať“ až do získania dostatočného množstva CTP. Zmiešaním produktov všetkých piatich cyklov reakcie sme získali koncentráciu CTP 70,4 mM. Koncentrácia CTP na konci každého z piatich cyklov je znázornená na Obr. 2A.



Obr. 2: **A.** Graf znázorňujúci koncentrácie CTP získané na konci jednotlivých cyklov. **B.** Záznam priebehu reakcie syntézy CMP-NeuAc získaný analýzou pomocou HPLC. Čiernou farbou je záznam zo začiatku reakcie (v čase 0), ružovou farbou je koniec reakcie (po 5 hodinách).

Druhý krok predstavuje syntéza CMP-NeuAc katalyzovaná celými bunkami produkujúcimi súčasne SAA a CSAS. Katalytickou činnosťou SAA je syntetizovaná kyselina sialová z ManNAc a pyruvátu. Kyselina sialová a CTP sú substrátmi pre CSAS v reakcii, ktorej produktom je samotná CMP-NeuAc (Obr. 1). V dvoch nezávislých reakciách sme získali CMP-NeuAc v koncentrácii 51,4 mM a 54,2 mM, čo vzhľadom na počiatkové množstvo CTP predstavuje úroveň konverzie 73%, resp. 78%. Záznam priebehu reakcie získaný analýzou pomocou HPLC predstavuje Obr. 2B.

Využitím systémovej biokatalýzy sa nám podarilo efektívne a finančne nenáročne pripraviť CMP-NeuAc. Najskôr bol syntetizovaný CTP z lacného fosfátového skla a CMP, pričom enzýmy boli opakovane použité vo viacerých cykloch tejto reakcie. Katalytickou činnosťou celých buniek bola potom pripravená samotná CMP-NeuAc, a to v koncentrácii viac ako 50 mM. Takto pripravená CMP-NeuAc bude použitá ako substrát pre sialyltransferázy. Sialylácia má veľký potenciálny prínos pre farmaceutický priemysel a medicínu pri zlepšovaní farmakokinetických vlastností proteínových liečiv, pri liečbe zápalových autoimunitných ochorení a v imunoterapii rakoviny (Talafová a Nahálka, 2012).

PodĎakovanie:

Prezentované výsledky boli získané vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. García-Fruitós, E., González-Montalbán, N., Morell, M., Vera, A., Ferraz, R.M., Arís, A., Ventura, S., Villaverde, A. (2005) *Microb. Cell Fact.*, 4, 27
2. Marchal, I., Cerutti, M., Mir, A.-M., Juliant, S., Devauchelle, G., Cacan, R. & Verbet, A. (2001). *Glycobiology*, 11, 593-603.
3. Nahálka, J. & Pätoprstý, V. (2009). *Org. Biomol. Chem.*, 7, 1778-1780.
4. Ran, N., Zhao, L., Chen, Z., Tao., J. (2008) *Green Chem.*, 10, 361-372.
5. Schauer, R. (2009). *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 19, 507-514.
6. Talafová, K. & Nahálka, J. (2012). *Cent. Eur. J. Biol.*, 7, 777-793.
7. Yu, P., Tai, Y.-S., Woodruff, A.P., Xiong, M., Zhang., K. (2012) *Curr. Opin. Chem. Eng.*, 1, 373-379.