



**SIGMA-ALDRICH**

---



**Sigma-Aldrich konference mladých chemiků,  
biochemiků a molekulárních biologů**

17. 5. až 19. 5. 2001  
Kamenné Žehrovice

sborník redigovali  
Martin Fusek, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

## VYUŽITÍ ZRYCHLENÉ EXTRAKCE ROZPOUŠTĚDLEM PRO STANOVENÍ ESTERŮ Kyseliny ftalové a polycyklických aromatických uhlovodíků v půdách a říčních sedimentech

**MARTIN ADAM, KAREL VENTURA**

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická,  
Univerzita Pardubice, n. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice,  
e-mail: Martin.Adam@upce.cz*

Při analytickém procesu hraje velmi významnou roli příprava vzorků pro analýzu. Tento krok je považován za časově nejnáročnější a je zdrojem mnoha chyb. Při analýze tuhých vzorků je často třeba analyt vhodným způsobem izolovat od původní matrice a současně jej co možná nejvíce nakonzentrovat.

Potřeba zvýšení produktivity, snížení spotřeby organických rozpouštědel, urychlení extrakce tuhých vzorků a v neposlední řadě i možnost automatizace vyžadovala vyvinout nové extrakční techniky.

Jako velmi perspektivní se jeví zrychlená extrakce rozpouštědlem, jejíž popis byl publikován jako U.S. EPA metoda 3545 – Accelerated Solvent Extraction. V principu se jedná o proces v systému tuhá látka–kapalina, který je prováděn při teplotách nad atmosférickým bodem varu použitých rozpouštědel a při vyšších tlacích, jejichž úkolem je udržet kapalný stav extrakčních činidel. Díky zachování kapalného stavu je tak možné použít prakticky libovolnou směs rozpouštědel. Celý extrakční proces trvá ve srovnání s klasickými extrakčními postupy jen několik minut při minimalizaci objemu rozpouštědel.

Možnost použití metody zrychlené extrakce rozpouštědlem pro analýzu vzorků životního prostředí byla prověřena na stanovení obsahu esterů kyseliny ftalové ze vzorků půd a říčních sedimentů a polycyklických aromatických uhlovodíků ze vzorků říčních sedimentů. Extrakce byly prováděny na přístroji FastEx 01, který byl ve spolupráci s Univerzitou Pardubice vyvinut na Ústavu analytické chemie v Brně a v roce 1998 vyroben v jeho dílnách.

Jako analytická koncovka byla zvolena metoda plynové chromatografie s hmotnostním detektorem. Analýza extraktů byla prováděna na přístroji GC 17A s detektorem QP 5050A (Shimadzu, Japonsko), který byl vybaven kapilární kolonou DB 5 (30 m × 0,25 μm, tloušťka filmu fenylmethylsilikonu 0,25 mm).

Při extrakci obou uvedených typů sloučenin (ftaláty a PAH) bylo dosaženo výsledků s nízkou hodnotou relativní směrodatné odchylky (do 5 %). U vzorků při stanovení PAH byly získány výsledky srovnatelné s certifikovaným obsahem sledovaných sloučenin. Uvedených výsledků bylo dosaženo s nízkou spotřebou organických rozpouštědel a současně při krátké době extrakce, což vyhovuje současným požadavkům na zpracování vzorků před vlastní analýzou.

*Práce byla provedena za podpory projektů MŠMT ČR (projekt VS-96058), MŽP ČR (projekt MR/14/95) a GA ČR (projekt 203/99/0044).*

## STRUKTURA A FUNKCE RECEPTORŮ SPŘAŽENÝCH S G PROTEINŮ, MAPOVÁNÍ KONTAKTNÍCH MÍST S Gα -PROTEINŮ

**JAROSLAV BLAHOŠ, MICHAELA HAVLIČKOVÁ**

*Laboratoř Molekulární Fyziologie, 3. LF UK a FgU AV ČR,  
Ke Karlovu 4, 120 00 Praha 2*

Přibližně 1 % savčího genomu kóduje receptory spřažené s G-proteiny (G-Protein Coupled Receptors – GPCR). Přes odlišnou primární strukturu různých GPCR existují společné charakteristické znaky jako je sedm α-helixů křížujících buněčnou stěnu. Jednotlivé GPCR se dají zařadit do několika rodin. Třetí rodinu tvoří metabotropní glutamátové receptory (mGluR), GABA<sub>B</sub> receptory, Ca-sensing receptory a další. Charakteristický je zde velký extracelulární N-terminus tvořící vazebné místo pro agonisty. Typická je také dimerizace. mGlu receptory a Ca-sensing receptory se vyskytují v homodimerické formě, GABA<sub>B</sub> receptor je heteromer tvořený proteiny GB1 a GB2.

Zmapovali jsme části G-proteinů které jsou rozlišovány mGlu a GABA<sub>B</sub> receptory. Jedním úsekem je karboxylový konec Gα-proteinu, především pak čtvrtá aminokyselina od konce<sup>1,2</sup>. Dále jsme popsali nové kontaktní místo s GPCR na Gα-proteinu, které se nachází poblíž N-terminu. Navíc jsme potvrdili, že stejně jako receptory z první a druhé rodiny GPCR, mGluR rozlišují oblast Gα-proteinu zvaný L9 loop (oblast mezi β4 a α6)<sup>4</sup>.

Projekty jež jsou zaměřené na studium aktivace GABA<sub>B</sub> receptorů popisují principy vazby ligandů extracelulární částí receptoru<sup>3</sup>. Dále jsme se podíleli na studiu procesu heterodimerizace<sup>5</sup> a aktivace G-proteinů GABA<sub>B</sub> receptory. Pomocí mutagenese a heterologní exprese s funkčními testy byla odhalena podjednotka GABA<sub>B</sub> receptoru rozlišující a aktivující G-proteiny<sup>6</sup>.

## LITERATURA

1. Blahoš J., Mary S., Perroy J., de Colle C., Brabet I., Bockaert J., Pin J-P.: *J. Biol. Chem.* 273, 25765 (1998).
2. Franek M., Pagano A., Kaupmann K., Bettler B., Pin J-P., Blahoš J.: *Neuropharm.* 38, 1657 (1999).
3. Galvez T., Prézeau L., Milioti G., Franek M., Joly C., Froestl W., Bettler B., Bertrand H-O., Blahoš J., Pin J-P.: *J. Biol. Chem.* 52, 41166 (2000).
4. Blahoš J., Fischer T., Brabet I., Stauffer D., Rovelli G., Bockaert J., Pin J-P.: *J. Biol. Chem.* 276, 3262 (2001).
5. Pagano A., et al.: *J. Neurosci.* 24, 1189 (2001).
6. Galvez T., Duthey B., Kniazeff J., Blahos J., Rovelli G., Bettler B., Prézeau L., Pin J-P.: *EMBO J.* (2001), in press.

## MODELOVÉ DIBLOKOVÉ KOPOLYMERY PEG S DEGRADOVATELNOU ESTEROVOU VAZBOU

**A. BRAUNOVÁ, M. PECHAR, K. ULBRICH**

*Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6*

Běžně používaná protirakovinná léčiva setrvávají v krevním řečišti v důsledku své nízké molární hmotnosti pouze krátkou dobu a jsou poměrně rychle vylučována z organismu glomerulární filtrací. Navázáním nízkomolekulárního léčiva na makromolekulární nosič je možné dosáhnout snížení rychlosti vylučování léčiva z organismu, snížení množství léčiva, potřebného k dosažení terapeutického efektu, a zároveň zvýšení rychlosti ukládání léčiva v řadě pevných nádorů v důsledku EPR (enhanced permeability and retention) efektu. Zvýšená koncentrace léčiva v nádoru vede ve svém důsledku ke zvýšení specifity a efektivity léčby. Námi studované diblokové kopolymery, obsahující hydrolyticky štěpitelné esterové a amidické vazby mezi bloky PEG, slouží jako modely pro přípravu vysokomolekulárních blokových kopolymerů na bázi PEG, umožňujících prodlouženou cirkulaci léčiva v organismu a jeho pronikání do nádorové tkáně na základě EPR efektu. Při přípravě diblokových kopolymerů byl monofunkční PEG ( $M = 2000$ ) modifikován alifatickými dikarboxylovými kyselinami (malonová, jantarová, glutarová, maleinová) na monokarboxylový polymer, obsahující esterovou vazbu, který poté kondenzací s diaminem vytvořil polymer o dvojnásobné molární hmotnosti ( $M = 4000$ ). Takto připravené polymery byly použity pro studium vztahu mezi strukturou a rychlostí hydrolytické degradace esterové vazby, která je součástí sekvence spojující dva bloky PEG. Bylo zjištěno, že rychlost hydrolyzy esterové vazby, vzniklé zabudováním nasycených kyselin do spojky mezi bloky, závisí na pH prostředí. V mírně alkalickém prostředí (pH 7,4 a 8,0) je rychlost hydrolyzy značná a se vzrůstajícím pH roste. Stejně významný je i vliv struktury spojky. Prodloužením původní kyseliny o jednu methylenovou skupinu se zpomaluje rychlost hydrolyzy esterové vazby přibližně třikrát. V oblasti pH 5,5 k hydrolyze esterové vazby prakticky nedochází. Bylo prokázáno, že přítomnost dvojné vazby v těsném sousedství vazby esterové silně zvyšuje její schopnost hydrolyzy nejen v alkalické, ale i v kyselé oblasti pH. Kopolymery na bázi PEG budou i nadále studovány jako vhodné degradabilní nosiče kancerostatik pro léčbu nádorových onemocnění v oblasti močových cest a zažívacího traktu.

*Tento projekt je financován Grantovou agenturou České republiky (grant č. 307/96/K226).*

## REGULACE VAZBY NÁDOROVÉHO SUPRESORU PROTEINU P53 K CÍLOVÝM SEKVENCÍM V SUPERHELIKÁLNÍ DNA

**VÁCLAV BRÁZDA, EVA JAGELSKÁ, LENKA KARLOVSKÁ, EMIL PALEČEK**

*Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, e-mail: vaclav@ibp.cz*

Normální funkcí proteinu p53 je udržování homeostasy kontrolou buněčné proliferace, ukončení diferenciace buněk a programové řízení buněčné smrti – apoptóza. Tyto regulační funkce proteinu p53 jsou způsobeny především sekvencně specifickou transkripční aktivací celé řady genů. Mutace genu *p53* je nejčastější somatickou mutací nalezenou ve zhoubných nádorech člověka. Protein p53 se váže na cílovou sekvenci 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' (p53CON) a jak jsme ukázali také na superhelikální DNA (scDNA). Identifikovaná přirozená vazebná místa pro p53 jsou značně heterogenní. Připravili jsme proto sadu plazmidových konstruktů lišících se pouze cílovými sekvencemi, které jsme vybrali z promotorů některých významných proteinem p53 regulovaných genů (RGC, p21, mdm2, GADD). Tyto konstrukty jsme podrobili analýze, při které jsme sledovali vazebné vlastnosti proteinu p53 izolovaného z bakteriálního a bakulovirového expresního systému na jeho cílové sekvence na plazmidech s negativním nadšroubovicovým vinutím a nativní nadšroubovicovou hustotou. Ukázalo se, že superhelicitu může významně ovlivňovat přístupnost cílových sekvencí k vazbě proteinu p53. Vazebná aktivita proteinu p53 může být regulována různými způsoby, například fosforylací kasein kinasou II, protein kinasou C či vazbou jiných proteinů a monoklonálních protilátek (Mab). Metodou snížení pohyblivosti komplexu p53/Mab/DNA v agaróзовém gelu jsme ukázali, že vazba proteinu na cílovou sekvenci v scDNA je aktivována Mab Bp53-6.1, Bp53-10.1, Bp53-30.1, zatímco jiné Mab – DO-1, DO-13, Ica 9 tuto vazbu neaktivují. Nicméně mohou způsobit změnu konformace proteinu p53 zabraňující jeho další aktivaci pro vazbu na cílové sekvence.

## PREFERENČNÍ VAZBA DOMÉN PROTEINU P53 NA SUPERHELIKÁLNÍ DNA

**M. BRÁZDOVÁ<sup>a</sup>, J. PALEČEK<sup>a</sup>, M. FOJTA<sup>a</sup>, S. BILLOVÁ<sup>a</sup>, V. SUBRAMANIAM<sup>b</sup>, T. M. JOVIN<sup>b</sup>, E. PALEČEK<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, 612 65 Brno, Česká republika, <sup>b</sup>Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, D-37018 Göttingen, Germany*

Funkce genu p53, často označovaného za strážce genomu<sup>1</sup>, je úzce spjata se specifickou vazbou jeho produktu, nádorového supresoru proteinu p53, na cílovou sekvenci (p53CON). Nedávno jsme ukázali, že celý lidský protein se silně váže na negativně nadšroubovicovou DNA (superhelikální, scDNA) obsahující či neobsahující cílovou sekvenci<sup>2,3</sup>. V přírodě nacházíme DNA, od malých bakteriálních plazmidů po ohromné

eukaryotické chromozomy, s nadšroubovicovou strukturou.

Naše výsledky<sup>2-5</sup> naznačily, že vazba celého proteinu p53 na scDNA představuje jeden z nových vazebných motivů označovaný za superhelikálně selektivní vazbu. Pomocí elektroforetických a imunochemických metod jsme porovnávali vazbu bakteriálně exprimovaných delečních mutantů na scDNA s vazbou celého lidského proteinu (flp53, aminokyseliny 1-393). Pro detekci superhelikálně selektivní vazby byl využit kompetiční experiment, při kterém se proteiny vázaly na plazmidovou scDNA v přítomnosti stejného množství jeho linearizované formy. Silná preferenční superhelikálně selektivní vazba byla pozorována kromě flp53 i u konstruktů aa44-393 a aa320-393. Delece posledních 30 aa zredukovala tuto vazbu na jen velmi slabě preferenční. Z porovnání chování jednotlivých konstruktů s flp53 vyplývá, že C-terminální část (aa320-393) je nezbytná pro superhelikálně selektivní vazbu flp53 na scDNA (cit.<sup>6</sup>). Poznání úlohy jednotlivých proteinyových domén při interakci s scDNA může přinést informace o úloze p53 při procesech transkripce a rekombinace.

#### LITERATURA

1. Hupp T. R.: *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 88 (1999).
2. Palecek E., et al.: *Oncogene* 15, 2201 (1997).
3. Palecek E., et al.: *Oncogene* 18, 3617 (1999).
4. Fojta M., et al.: *J. Biol. Chem.* 274, 25749 (1999).
5. Palecek E., et al.: *Eur. J. Biochem.* 268, 573 (2001).
6. Brazdová M., Paleček J., Fojta M., Billová S., Paleček E.: in preparation.

#### MODIFIED TFO (TRIPLEX FORMING OLIGONUCLEOTIDES): NEW APPROACH IN ANTIVIRAL GENE THERAPY

**MARTIN BUNČEK**

*Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Prague, Czech Republic*

Our project employs two novel technologies: targeting oligonucleotides to double-stranded (ds) DNA sequences capable of forming triplex structures (TFO's) and conjugating these to DNA-destruction molecules activated by red shifted wavelengths. This strategy is not limited to dsDNA viruses, circular or folded TFO's can be used to target single stranded nucleic acids. In this project we focused only to dsDNA viruses which are associated with human diseases. Conjugates of TFO and DNA-destruction molecules successful in antiviral therapy must specifically bind to the conserved DNA sequences and destroy them. The binding properties of TFO's are evaluated using electrophoretic mobility shift analyses and spectrophotometrically determined melting temperatures. This approach allows a  $K_D$  determination.

In the course of our project, we identified triplex target sites in the dsDNA viruses (HIV, HSV and HPV), constructed corresponding TFO's and tested their binding properties *in vitro*. Cleavage profile of dsDNA carrying these target sequences by TFO's conjugated to photoactivable DNA-destructing molecules is also determined.

*This work is supported by: MŠMT ČR project nr.: LN00B125; IGA MZ CR grant nr.: NI/6180-3; Charles University internal grant nr.: 112/2000/B BIO /FaF; Generi Biotech s.r.o.*

#### AMIDICKÉ LIGANDY A JEJICH KOMPLEXY S ANIONY

**MICHAL ČAJAN**

*Národní centrum pro výzkum biomolekul a Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: cajan@chemi.muni.cz*

Chemii receptorů pro selektivní vazbu anionů je v posledních letech věnováno značné úsilí. Do kategorie neutrálních ligandů schopných komplexovat aniony bezesporu patří také molekuly obsahující amidickou funkční skupinu –NHCO–. Kromě stále se rozšiřujícího uplatnění komplexačních vlastností tohoto strukturního motivu ve všech oblastech aplikované chemie je známa také řada biologicky významných funkcí. Příkladem mohou být amidické vodíkové můstky nezbytné pro specifickou vazbu anionů v aktivních místech proteinů či enzymatické reakce zahrnující selektivní přeměny anionů<sup>1,2</sup>.

Obecným záměrem našeho projektu je studium vlastností amidických ligandů, a především pochopení strukturních a elektronických aspektů ovlivňujících jejich schopnost interagovat s aniony. Experimentální i teoretický popis interakcí v komplexu prokázal přítomnost vodíkové vazby vznikající mezi anionem a amidickým vodíkem<sup>3</sup>. Je nasnadě, že vhodným výběrem substituentů lze komplexační vlastnosti amidické skupiny modifikovat, a tedy i ovlivňovat sílu této interakce. Kombinací experimentálních strukturně analytických metod s metodami teoretickými byly studovány vlastnosti sady neutrálních ligandů na bázi aromatických amidů a možnosti aktivace jejich amidické skupiny pro interakci s aniony<sup>3</sup>. Následné studie věnované komplexům umožnily nalezení a vysvětlení řady souvislostí mezi jejich vlastnostmi a vlastnostmi ligandů<sup>4</sup>. Finálním produktem je několik typů modelů umožňujících predikci strukturních vlastností i stability těchto komplexních sloučenin<sup>4,5</sup>. Značnou výhodou tohoto přístupu je použití relativně málo náročných metod umožňujících částečně eliminovat komplikované a mnohdy málo úspěšné experimentální testy. Praktická aplikace získaných poznatků je potom orientována na řešení problémů souvisejících s vývojem nových, komplikovanějších ligandů se specifickými vlastnostmi a cílovým určením.

*Projekt je podporován grantem 203/00/1011 GA ČR.*

#### LITERATURA

1. Luecke H., Quioco F. A.: *Nature* 347, 402 (1990).
2. Schmidtchen F. P., Berger M.: *Chem. Rev.* 97, 1609 (1997).
3. Stibor I., Haffed D. S. M., Lhoták P., Hodačová J., Koča J., Čajan M.: *Gazz. Chim. Ital.* 197, 673 (1997).
4. Čajan M., Stibor I., Koča J.: *J. Phys. Chem., A* 103, 3778 (1999).
5. Čajan M., Damborský J., Stibor I., Koča J.: *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* 40, 1151 (2000).

## KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE NITRODERIVÁTŮ NAFTALENU A BIFENYLU

JOSEF CVAČKA, JIŘÍ BAREK, JIŘÍ ZIMA

Katedra analytické chemie, PřF UK, Hlavova 2030, 128 43  
Praha 2

Nitroderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků jsou biologicky aktivní sloučeniny, jejichž přítomnost v životním prostředí byla prokázána teprve v posledních letech. Tyto sloučeniny, přítomné v komplexních maticích ve stopových množstvích lze analyzovat kapalinovou chromatografií. Pro analýzu subnanogramových množství 1-nitronaftalenu, 2-nitronaftalenu, 2-nitrobifenyly, 3-nitrobifenyly a 4-nitrobifenyly byla navržena metoda, využívající předřazenou redukci na příslušné aminoderiváty. Výhody tohoto postupu spočívají zejména v detekci, neboť aminoderiváty lze detegovat s podstatně nižší mezí detekce než výchozí nitroderiváty. Pro redukci nitronaftalenu a nitrobifenyly bylo testováno několik postupů, z nichž nejvýhodnější se ukázala být redukce chloridem titanitým v prostředí citronanu sodného. Ke kvantitativní redukci dochází okamžitě po smísení methanolickeho roztoku analytu ( $5 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.dm<sup>-3</sup>) s redukčním činidlem. Směs aminosloučenin vzniklých při redukci se podařilo separovat na chirální koloně Chiradex v ternární mobilní fázi methanol/acetonitril/voda, doba analýzy byla zhruba 30 min. K detekci redukovaných analytů byl využit amperometrický tenkovrstvý i tubulární detektor, chemiluminiscenční detektor a hmotnostní detektor. Tenkovrstvý amperometrický detektor s diamantovou pracovní elektrodou umožňoval detegovat aminosloučeniny až do koncentrace  $1 \cdot 10^{-7}$  mol.dm<sup>-3</sup>, amperometrický detektor s tubulární platinovou elektrodou do koncentrace  $2 \cdot 10^{-8}$  mol.dm<sup>-3</sup>. Vhodnost hmotnostní detekce je diskutabilní, neboť spektra jednotlivých izomerů jsou téměř identická, navíc mez detekce pro studované sloučeniny je pouze  $1 \cdot 10^{-6}$  mol.dm<sup>-3</sup> v APCI modu. Chemiluminiscenční detekce je zhruba stejně citlivá jako detekce fluorescenční.

## IZOLACE A IDENTIFIKACE NOVÝCH DERIVÁTŮ 6-BENZYLAMINOPURINU Z BUNĚK FOTOAUTOTROFNÍ KULTURY *Chenopodium rubrum*

KAREL DOLEŽAL<sup>a,b</sup>, CRISTER ÅSTOT<sup>b</sup>,  
JAN HANUŠ<sup>c</sup>, GÖRAN SANDBERG<sup>b</sup>,  
MIROSLAV STRNAD<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoř růstových regulátorů PřF UP a UEB AV ČR, Šlechtitelů 11, 783 79 Olomouc, <sup>b</sup>Katedra lesnické genetiky a rostlinné fyziologie SLU 901 83 Umeå, Švédsko, <sup>c</sup>Isotopová laboratoř UEB AV ČR Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Ve spolupráci s pracovníky Švédské zemědělské univerzity byl vypracován originální postup derivatizace cytokininů<sup>1</sup>. To umožnilo vyvinout dostatečně citlivou metodu izolace, purifikace a identifikace nových látek cytokininové povahy z buněk fotoautotrofní kultury *Chenopodium rubrum* pomocí kapilární HPLC-frit/FAB-MS. S využitím této metody byly

identifikovány ze studované buněčné kultury 6-[2-(β-D-glukopyranosyloxy)benzylamino]purin a 6-[2-(β-D-glukopyranosyloxy)benzylamino]-2-methylthio-purin. Standardy identifikovaných sloučenin byly připraveny metodami organické syntézy. Srovnáním výsledků fyzikálně-chemického studia izolovaných látek se standardy byla dokončena jejich identifikace. Nově vyvinutá metoda pro identifikaci a kvantifikaci cytokininů pomocí kapilární HPLC-frit/FAB-MS se také ukázala být vhodnou pro kvantitativní sledování biosyntézy cytokininů prostřednictvím *in vivo* inkorporace deuteria z D<sub>2</sub>O do cytokininů a jejich konjugátů<sup>2,3</sup>. Tímto originálním postupem se také podařilo kvantifikovat rychlost biosyntézy nově objevených sloučenin a prokázat jejich endogenní původ.

## LITERATURA

1. Åstot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G.: J. Mass Spectrom. 33, 892 (1998).
2. Åstot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G.: J. Mass Spectrom. 35, 13 (2000).
3. Åstot C., Doležal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N. H., Sandberg G.: PNAS 97, 14778 (2000).

## SYNTEZA (3S)-1-JOD-3-METHYLHEPTAN-3-OLU

KATEŘINA DUDOVÁ, VÁCLAV KOZMÍK

Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, n. Čs.  
Legii 565, 532 10 Pardubice

Požadovaný (3S)-1-jod-3-methyl-heptan-3-ol je prekurzorem biologicky aktivního enantiomeru methylesteru (+/-)-15-deoxy-16-hydroxy-16-methyl-prostaglandinu E<sub>1</sub>, který je účinnou látkou v klinické praxi zavedeného preparátu s generickým názvem „Misoprostol (dosud používaný ve formě racemátu). Biologické testy ale prokázaly, že účinnou složkou racemického Misoprostolu je pouze enantiomer konfigurace (11R,16S), jehož stereogenní centra mají konfiguraci totožnou s přírodními prostaglandiny řady E<sub>1</sub>. Ve světě, v souladu s doporučením světové zdravotnické organizace WHO, však narůstá trend důsledně používat u nově zaváděných léčiv jen jejich účinné enantiomery.

V této práci byly ověřeny nové metody přípravy racemického 1-jod-3-methyl-heptan-3-olu z ekonomicky dostupných surovin. Pro získání požadovaného (S)-enantiomeru titulní sloučeniny byly studovány možnosti štěpení racemických meziproduktů těchto syntéz:

1. Enzymatické resoluce klíčových intermediátů 2-methylhexan-1,2-diolu a 3-methylheptan-1,3-diolu dostupnými lipasami a proteasami.
2. Štěpení 2-hydroxy-2-methylhexanové kyseliny a 3-hydroxy-3-methyl-heptanové kyseliny krystalizací s dostupnými opticky aktivními bázemi.

Sharplessovou oxidací 2-butyprop-2-en-1-olu byl připraven opticky aktivní (2S)-2-methylhexan-1,2-diol jehož transformací byl získán požadovaný (3S)-1-jod-3-methyl-heptan-3-ol.

## EFFECT OF COLCHICEINE ON HUMAN HEPATOCYTE: PROMISING RESULTS FOR ITS THERAPEUTIC USE

**ZDENĚK DVOŘÁK**

*Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty of Palacky University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc*

The development of new drugs to protect the liver against damage of various aetiology remains an important issue for biochemical and toxicological research. Colchicine (EIN) was recently reported to be a hepatoprotective agent against carbon tetrachloride in rats. Besides the *in vivo* experiments, however, there is little information about the biological activity of EIN. EIN forms complexes with divalent cations and its antimetabolic activity is negligible in comparison with that of colchicine. Recently, we published that EIN increases the levels of CYP2C9, 2E1 and 3A4 proteins in human hepatocytes, but had no effect on the levels CYP1A2, 2A6 and 2C19 (ref.<sup>1</sup>).

In the present work, we examined the effect of EIN on CYP protein expression in primary human hepatocyte cultures. CYP mRNAs, protein levels and specific activities of CYP2C9, 2C19 and 3A4 were determined in hepatocyte cultures exposed to EIN (10  $\mu$ M). The toxicity of EIN (up to 100  $\mu$ M) was evaluated in parallel.

Based on *in vitro* experiments, we can conclude that: 1/EIN was not cytotoxic at concentration up to 10  $\mu$ M, 2/ EIN did not induce CYP2C9, 2C19 and 3A4 mRNAs, 3/EIN did not increase the catalytic activities of CYP2C9, 2C19 and 3A4 as well, 4/EIN had no effect on CYP2C19 protein level; it increased slightly the level of CYP2C9 protein. This increase can be explained by protein stabilisation and its mechanism is presently being investigated.

These data imply that the use of EIN in human medicine may be generally safe at potential therapeutic doses with CYP-induced drug-drug interactions unlikely.

*This work was supported by projects GA CR 303/99/P002 and MSM 151100003.*

### REFERENCES

1. Dvořák Z., Ulrichová J., Modrianský M., Maurel P.: Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Med. 143, 47 (2000).

## BIODEGRADACE FENOLU BAKTERIÍ *Rhodococcus erythropolis* A KVASINKOU *Candida maltosa*

**ARIANA FIALOVÁ, ALENA ČEJKOVÁ, JAN MASÁK**

*Vysoká škola chemicko-technologická, ÚKCHB, Technická 5, 166 28 Praha 6*

Produkce fenolických sloučenin jako odpadních látek z průmyslových procesů způsobuje vážné zatížení životního prostředí. Fenolickými látkami znečištěné lokality je možno de-

kontaminovat tradičními fyzikálně-chemickými technikami, ale nynější biodegradční metody nabízejí relativně nízké náklady a také možnost úplné mineralizace těchto toxických sloučenin. Porozumění mechanismům enzymové katalýzy v degradční dráze fenolu je tudíž důležitou součástí komplexního studia biodegradace fenolu.

Tato práce je zaměřena na biodegradční procesy u mikroorganismů využívajících fenol (*Rhodococcus erythropolis* a *Candida maltosa*).

Půdní bakterie *R. erythropolis* a kvasinka *C. maltosa* hydroxylují fenol v reakci katalyzované nikotinamid adenin dinukleotid fosfát FAD – dependentní monooxygenasou. Tato reakce je první v metabolické sekvenci utilizace dané aromatické sloučeniny jako jediného zdroje uhlíku a energie. Fenolhydroxylasa hydroxyluje fenol na katechol a katechol 1,2-dioxygenasa poté katalyzuje reakci katecholu na *cis,cis*-mukonát.

Biodegradční schopnost daných mikroorganismů byla testována ve vztahu k podmínkám vnějšího prostředí (typ média, teplota) a ve vztahu k prvním enzymům degradční dráhy fenolu (fenolhydroxylasa EC 1.14.13.7, katechol 1,2-dioxygenasa EC 1.13.11.1). Byla sledována účinnost dezintegrace a vliv použitého typu procesu dezintegrace na dané enzymové aktivity. Také byla studována závislost koncentrace fenolu a fáze růstu mikroorganismů na aktivitu fenolhydroxylasy, která byla měřena během kultivace.

Naměřené výsledky jsou jednak podkladem pro další výzkumy v oblasti enzymového vybavení kvasinky *C. maltosa* a bakterie *R. erythropolis* a jednak pro potenciální praktické využití těchto mikroorganismů pro dekontaminaci fenolickými látkami znečištěných lokalit.

## SUBSTRATE SPECIFICITY OF $\beta$ -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES OF VARIOUS ORIGIN

**P. FIALOVÁ, L. HUŠÁKOVÁ, Z. HUNKOVÁ, M. KUZMA, L. WEIGNEROVÁ, V. KRÉN**

*Institute of Microbiology, Laboratory of Biotransformation, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic, e-mail: fialovap@biomed.cas.cz*

Glycosyltransferases and also glycosidases are able to use various unnatural (modified) substrates. We have recently demonstrated that some  $\beta$ -N-acetylhexosaminidases accept 6-O-acylated glycosyl donors and even catalyse their transglycosylation giving yield to modified oligosaccharides<sup>1</sup>.

We are just investigating the influence of N-acyl modification on the activity of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidases concerning the affinity to the modified structures and possibly the transglycosylation potential. Some scarce information on this topic has also appeared in the literature.<sup>2</sup> For the aim of this project, we synthesised *p*-nitrophenyl 2-(trifluoroacetyl)amido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside starting from GlcNH<sub>2</sub>.HCl. The synthesis route includes several steps *via* 3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl chloride rearranged to 1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-amino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside hydrochloride, which was selectively N-trifluoroacetylated,

converted to a bromide and consequently to a *p*-nitrophenyl glycoside ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ , lutidine).

A wide enzymatic screening comprising our enzymatic library of fungal glycosidases and several animal and plant enzymes for the possible cleavage and activation or inhibition effects of this substrate was performed. With some enzymes (esp.  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase from bovine epididymis and from jack beans) this substrate caused a significant increase in the affinity to the standard substrate (*p*-NP- $\beta$ -GlcNAc). Furthermore,  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum* was able to hydrolyze it slightly. Our proposed mechanism for this behaviour is that  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase willingly accepts this substrate into its active site but is unable to split its glycosidic bond effectively enough and, therefore, exhibits a certain level of inhibition.

These results indicate that although the substrate specificity of  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidases is low enough to accept and even transglycosylate some significantly modified substrates, the replacement of an *N*-acetyl group by a sterically similar *N*-trifluoroacetyl group is unacceptable. However, glycosyl fluorides are widely used in enzymatic reactions for the study of reaction mechanisms and in glycosylations.

*Support by the grant 303/99/1382 from the Grant agency of the Czech Republic is highly acknowledged.*

#### REFERENCES

1. Hušáková L., et al.: Carbohydr. Res., in press (2001).
2. Mariam G., et al.: Carbohydr. Res. 47, 188 (1976).

#### FOTOAFINITNÍ ZNAČENÍ AKTIVNÍHO CENTRA CYP2E1 FLUORONITROANISOLY

**TOMÁŠ FRONĚK, PETR HODEK,  
MARIE STIBOROVÁ**

*Přírodovědecká fakulta UK, katedra biochemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2*

Cytochromy P450 (CYP) jsou majoritní enzymy biotransformující xenobiotika. Poznání architektury aktivního centra CYP umožňuje předpovídat, jakým způsobem bude xenobiotikum v organismu CYP přeměňováno. To je stěžejní pro předpovězení jeho potenciální toxicity, karcinogenity či mutagenity. Umožňuje rovněž konstrukci léčiv s protražovaným účinkem nebo léčiv inhibujících CYP.

Jedna z účinných metod vhodných pro studium aktivního centra CYP je metoda fotoafinitního značení. Ta umožňuje pomocí tzv. fotoafinitní sondy identifikovat aminokyseliny aktivního centra izoformy CYP, pro něž je sonda substrátem.

Poznání fotoafinitních sond CYP2E1 je středem zájmu řady laboratoří, jelikož *i*) CYP2E1 je jeden z nejdůležitějších CYP, který se účastní chemické kancerogenese a *ii*) dosud nebyly nalezeny žádné vhodné sondy pro značení tohoto CYP.

Na základě metabolických studií s nitroanisoly, jenž jsou specifické substráty pro CYP2E1, jsme jako fotoafinitní sondy navrhli 2-fluoro-4-nitroanisol (2FNA) a 4-fluoro-2-nitroanisol (4FNA), které jsou potenciálně fotolabilní.

V prvním kroku byly prováděny metabolické studie za účelem zjištění, zda jsou 2FNA a 4FNA skutečně substráty CYP2E1 nebo jiné izoformy CYP. Neefektivněji byly 2FNA a 4FNA metabolizovány, v souladu s našimi předpoklady, mikrosomy izolovanými z jater potkana či králíka obsahujícími CYP2E1, dále pak mikrosomy obsahujícími CYP2B. Tyto výsledky byly potvrzeny inhibičními experimenty se specifickými inhibitory jednotlivých izoformem CYP a též sledováním ovlivnění přeměny specifických substrátů jednotlivých izoformem CYP testovanými fluoronitroanisoly. Dále byly testovány fotochemické vlastnosti studovaných fluoronitroanisolů. 2FNA se projevil jako látka vysoce fotolabilní, která již po velmi krátké expozici UV zářením poskytuje fotosubstituční produkt s nukleofily (proteiny). Naopak 4FNA vykazuje podstatně horší fotochemické vlastnosti.

Z výsledků vyplývá, že 2FNA je unikátní sonda potenciálně velmi vhodná pro modifikaci aktivního centra CYP2E1, popř. CYP2B. Poznání aminokyselin katalytické domény těchto enzymů modifikovaných nalezenou selektivní sondou, je stěžejní pro vyřešení architektury aktivního centra obou cytochromů P450.

*Podporováno GAUK (246/1999) a MŠMT ČR (MSM 1131 00001).*

#### POUŽITÍ METODY LFER K CHARAKTERIZACI INTERAKČNÍCH MECHANISMŮ V ELEKTROMIGRAČNÍCH SEPARAČNÍCH METODÁCH

**KATEŘINA GOGO VÁ**

*Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, PřF UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2*

Kapilární elektroforéza je již řadu let stěžejní separační metodou v oblasti ionogenních látek (rutinně pro klinické aplikace, analýzy DNA, chirální analýzy a analýzy kovů). Její použití se nadále významně rozšířilo s vývojem elektrochromatografických metod, kde jsou výhodně kombinovány elektro-migrační principy s chromatografickými (vysoká účinnost elektro-migračních metod s vysokou selektivitou stacionárních nebo nabitých látek mezi volný roztok a micely využívá micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Dalším slibným směrem se zdá být použití nabitých lineárních polymerů, které mohou ovlivňovat migraci analytů i tehdy, nejsou-li zesíťovány či přítomny ve formě micel.

Zaměřili jsme se na srovnání selektivity separace v systémech s nabitým lineárním polymerem (poly(diallyldimethylamonium chlorid), PDA) a monomery podobného chemického složení (trimethylamonium chlorid, TMA, triethylamonium chlorid, TEA, dimethylpyrolidinium chlorid, DMP). Z experimentálně získaných retenčních faktorů plyne, že ačkoliv i monomerní aditiva vnášejí do systému retenci, polymerní struktura je rozhodujícím faktorem při separaci. Pro srovnání selektivity separace v systému s nabitým lineárním polymerem (Polybrene) a micelárním systémem (oktyltrimethylamonium bromide, OTMA, pod i nad krickou micelární

koncentrací) jsme použili model „linear free energy relationship“ (LFER). Model vychází z korelace experimentálně získaných výsledků (zde retenční faktor, nebo enzymová aktivita apod.) a solvatačních parametrů jednotlivých analytů (dostupné v literatuře). Výsledkem jsou pak parametry charakterizující vlastnosti pseudostacionární fáze (hydrofobicitu a další typy možných interakcí). Pro polymerní systém je významná  $\pi$ - $\pi$  interakce a interakce  $n$ - $n$  elektronů, v případě micelárního systému přistupuje ještě parametr charakterizující hydrofobicitu a schopnost tvorby kavity, což je v souladu s micelární teorií.

### 7-HYDROXYLOVANÉ EPIMERY DEHYDROEPIANDROSTERONU V LIDSKÉM SÉRU A VE SLINÁCH: SROVNÁNÍ GC/MS A RADIOIMUNOANALÝZY

H. HAVLÍKOVÁ<sup>a</sup>, M. HILL<sup>a</sup>, O. LAPČÍK<sup>a</sup>,  
R. MORFIN<sup>b</sup>, R. HAMPL<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Endocrinology, 116 98 Praha 1, <sup>b</sup>Conservatoire National des Arts et Metiers, Paris

Citlivá a přesná metoda stanovení 7-hydroxylovaných epimerů dehydroepiandrosteronu (7-OH-DHEA) je předpokladem ke studiu jejich biologických funkcí zahrnujících antiglukokortikoidní a imunomodulační účinky, nebo aktivační účinky jejich 7-oxo metabolitů v respiračním řetězci. Hladina těchto steroidů v lidském séru vykazuje pohlavní a věkovou závislost. Zvýšená hladina 7 $\alpha$ -OH-DHEA byla nalezena v séru pacientů trpících Alzheimerovou chorobou. V této souvislosti se nabízí studium role těchto steroidů v centrálním nervovém systému a u pacientů s autoimunitním onemocněním.

Byla tedy vytvořena a ověřena nová metodika GC/MS stanovení 7-OH-DHEA, a ta byla porovnána s dříve popsanou

metodou radioimunoanalytickou. Hladiny 7 $\alpha$ -OH-DHEA a 7 $\beta$ -OH-DHEA byly měřeny nejen v lidském séru, ale také ve slinách, kde byly nalezeny asi pětikrát nižší koncentrace. V obou tělních tekutinách byla prokázána silná korelace mezi hladinami epimerů 7-OH-DHEA. Ve slinách mužů byly naměřeny vyšší hladiny obou epimerů než u žen analogicky k vyšším hladinám jejich steroidního prekurzoru DHEA v séru. V této souvislosti se nabízí neinvazivní stanovení 7 $\alpha$ -OH-DHEA a 7 $\beta$ -OH-DHEA ve slinách při hodnocení imunitní odpovědi organismu jako vhodná alternativa ke stanovení v séru.

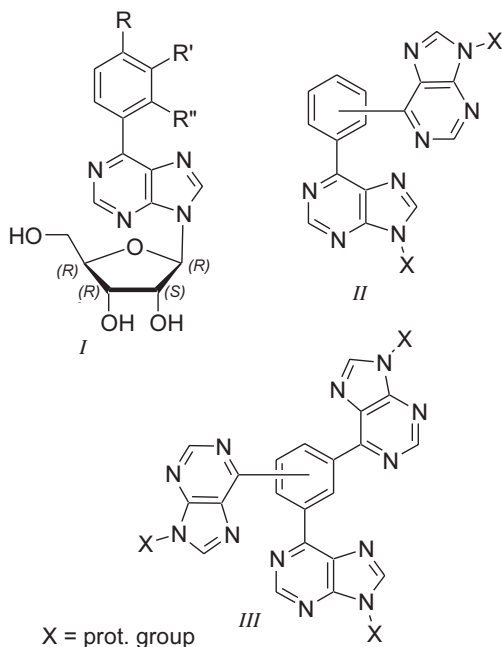
### ANALÝZA PLAZMIDOVÉ DNA BAKTERIÁLNÍHO KMENE *Alcaligenes* sp. a8

VĚRA HEJKALOVÁ, PAVEL ULBRICH,  
HYNEK STRNAD, VÁCLAV PAČES

Centrum molekulární genetiky, Ústav molekulární genetiky,  
VŠCHT AV ČR, Praha

Polychlorované bifenylly (PCBs) jsou závažnými xenobiotiky životního prostředí. Při jejich bakteriálním odbourávání vznikají limitní meziproducty – chlorbenzoáty (CBs). Bakteriální kmen rodu *Alcaligenes* sp. A8 byl izolován pro svou schopnost degradovat chlorbenzoáty, konkrétně 2,5-dichlorobenzoát. Bylo prokázáno, že geny kódující proteiny podílející se na degradaci CBs jsou lokalizovány na plazmidové DNA. Jedná se o geny dolní metabolické dráhy odbourávání PCBs (tzv. „ortho cleavage pathway“), kdy dochází ke štěpení aromatického jádra a odbourání CBs až na trikarboxylové kyseliny. Získání úplné genetické informace uložené v plazmidové DNA a charakterizace degradační dráhy by mohlo přispět k osvětlení mechanismu regulace těchto genů a umožnit další cílené manipulace vedoucí ke zlepšení degradability i jiných vlastností tohoto kmene.

Pro získání úplné sekvence plazmidové DNA je třeba vycházet z dostatečného množství čisté DNA. Byla optimalizována metoda izolace a purifikace megaplazmidu. Čistá plazmidová DNA byla získána metodou izolace pomocí CTAB a purifikace centrifugací v CsCl gradientu. Pro získání nukleotidové sekvence plazmidové DNA byly zvoleny dvě vzájemně se doplňující strategie. První spočívá ve vytvoření plazmidové (pUC19) knihovny (SacI, HindIII.) o velikosti fragmentů 4–15 kb. Tyto plazmidové klony jsou dále sekvencovány metodou shotgunového sekvenování. V druhé strategii je celkově izolovaná DNA parciálně štěpena restrikcími endonukleasami (Sau 3A, Hin PI) a fragmenty o vhodné velikosti (1–2 kb) jsou ligovány do linearizovaných (Bam HI, Acc I) sekvenčních vektorů pUC19 a M13mp18. Sekvence je prováděna Sangerovou dideoxy metodou s použitím fluorescenčně značených primerů a automatického sekvenátoru A.L.F. Express sequencer (Pharmacia). Sekvenční data jsou dále editována, skládána do kontigů a analyzována. Nyní je projekt ve fázi skládání jednotlivých kontigů a jejich následné analýzy (vyhledávání ORFů, porovnání jejich aminokyselinové sekvence s aktuální databankou všech proteinů.). Byl identifikován klastr genů tzv. „ortho cleavage pathway“, které jsou zodpovědné za biodegradační schopnosti kmene *Alcaligenes* sp. A8.





**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF 6-ARYLPURINES: NUCLEOSIDES AND ANALOGUES OF BASE-PAIRS OR TRIPLETS**

**MICHAL HOCEK<sup>a\*</sup>, DALIMIL DVOŘÁK<sup>b</sup>, MARTINA HAVELKOVÁ<sup>b</sup>, ANTONÍN HOLÝ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 166 10 Prague 6, e-mail: hocek@uochb.cas.cz,* <sup>b</sup>*Prague Institute of Chemical Technology, 166 28 Prague 6*

Structural modifications of biogenic purine bases and nucleosides very often lead to their antimetabolites displaying diverse types of biological activity (antiviral, antitumor etc.). Within the framework of our systematic investigation<sup>1</sup> of purine derivatives bearing carbon substituents in the position 6 we have developed a new facile and efficient method for the synthesis<sup>2</sup> of 6-arylpurines based on the Suzuki-Miyaura reactions of 6-halopurines with arylboronic acids. A significant cytostatic activity has been discovered<sup>3</sup> in several substituted 6-phenylpurine ribonucleosides 1. The series of nucleosides of this type has recently been extended to sugar- (deoxy- and acyclonucleosides)<sup>4</sup> and base-modified (6-aryl-, 6-hetaryl- and 6-benzylpurine derivatives) analogues. Synthesis and structure-activity relationship of this class of compounds will be discussed in the first part of the presentation. In another direction of our current research we focus on the synthesis of novel covalently linked analogues of Watson-Crick base pairs or Hoogsteen triplets consisting of two or three purine and/or pyrimidine rings linked by diverse types of carbon linkers (e.g. phenylene, alkylidene etc.) as shown in two very recent examples: syntheses of bis(purin-6-yl)benzenes 2 and tris(purin-6-yl)benzenes 3 making use of double Stille coupling of bis(tri-alkylstannyl)benzenes with 6-halopurines or cyclotrimerizations<sup>5</sup> of 6-alkynylpurines, respectively. Synthetic approaches to these and many other types of base-pairs/triplets analogues will be the subject of the second part of the presentation.

*This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grants No. 203/98/P027, 203/00/0036 and 203/96/K001). It was performed within the framework of the Research Project Z4 055 905.*

**REFERENCES**

1. Hocek M: Chem. Listy 94, 978 (2000).
2. Havelková M., Hocek M., Česnek M., Dvořák D.: Synlett 1999, 1145.
3. Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: J. Med. Chem. 43, 1817 (2000).
4. Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: Collect. Czech. Chem. Commun. 65, 1683 (2000).
5. Hocek M., Starý I., Stará I. G., Dvořáková H.: Tetrahedron Lett. 42, 519 (2001).

**KOMBINATORICKÁ CESTA K PIKOMOLÁRNÍMU INHIBITORU LÉKOVÉ REZISTENTNÍCH HIV-1 PROTEAS**

**MARTIN HRADÍLEK, CYRIL BAŘINKA, MARKÉTA RINNOVÁ, JAN WEBER, MILAN SOUČEK, JAN KONVALINKA**

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

Navrhli, a s využitím Fmoc/*terc*.Bu orthogonálního chránění, jsme na Rink-Amid MBHA pryskyřici syntetizovali knihovnu pseudopeptidů s obecným vzorcem Cbz-izoster-Aaa-Xxx-NH<sub>2</sub>. Použili jsme celkem šest izosterů a v pozicích Aaa a Xxx 48 různých  $\alpha$ -aminokyselin (Aaa = jednotlivé aminokyseliny; Xxx = ekvimolární směs všech 48 aminokyselin). Bylo tak připraveno celkem 6 podknihoven, přičemž každá obsahovala 48 směsí 48 různých pseudopeptidů.

U jednotlivých směsí pak byla zjišťována inhibiční aktivita k čtyřem HIV-1 proteasám: Přirozené (wild type) HIV-1 PR<sup>WT</sup>, a dále k proteasám rezistentním vůči používaným léčivům: Saquinaviru HIV-1 PR<sup>SAQ</sup> (mutace G98V, L90M); Indinaviru HIV-1 PR<sup>IND</sup> (mutace V82A); Ritonaviru HIV-1 PR<sup>RIT</sup> (mutace A71V, V82T, I84V).

Po vyhodnocení výsledků byly syntetizovány jednotlivé složky těch směsí, které vykazovaly inhibiční aktivitu k jednotlivým proteasám. S využitím stejných syntetických metod, jako v případě směsí, bylo připraveno šest řad pseudopeptidů, celkem 288 jednotlivých látek.

Syntetizované pseudopeptidy byly jednotlivě podrobeny testování se čtyřmi zmíněnými proteasami.

Tři neaktivnější sloučeniny byly vyčištěny HPLC a byla přesně stanovena jejich inhibiční aktivita k přirozené i k mutantním proteasám. Všechny tři látky jsou subnanomolárními inhibitory HIV-1 PR<sup>WT</sup> při pH 4,7 a vykazují značnou inhibiční aktivitu i vůči rezistentním mutantním proteasám. Neaktivnější sloučenina Cbz-Pst-Glu-Hph-NH<sub>2</sub> je pikomolárním inhibítorem přirozené HIV proteasy a subnanomolárním inhibítorem všech testovaných rezistentních proteas.

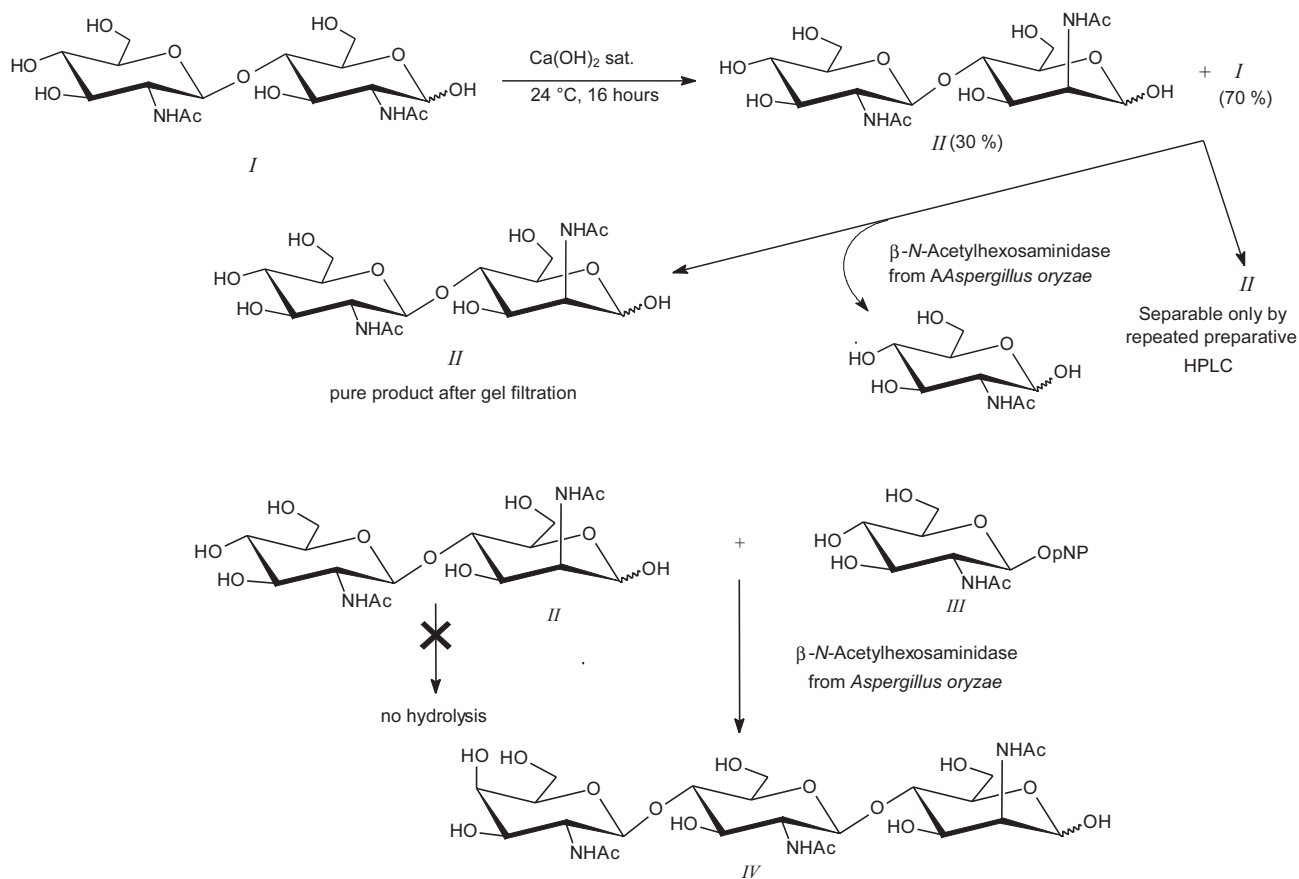
*Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.*

**ENZYMATIC SYNTHESIS OF N-ACETYLMANNOSAMINE CONTAINING OLIGOSACCHARIDES AND THEIR IMMUNOACTIVITY**

**L. HUŠÁKOVÁ<sup>a</sup>, V. KŘEN<sup>a</sup>, M. KUZMA<sup>a</sup>, E. HERKOMEROVÁ<sup>a</sup>, K. BEZOUŠKA<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Microbiology, Laboratory of Biotransformation, 142 20 Prague 4,* <sup>b</sup>*Faculty of Science, Charles University Prague, 128 40 Prague 2, e-mail: husakova@biomed.cas.cz*

ManNAc containing oligosaccharides are important immunodeterminants of some pathogenic bacteria. Occurrence of ManNAc is often linked to virulence and evading from the immunity surveillance.



GlcNAcβ1→4ManNAc (II) was prepared from chitobiose (I) by Lobry de Bruyn – Alberda van Ekenstein rearrangement under catalysis of Ca(OH)<sub>2</sub>. Resulting mixture is separable with difficulty only by analytical HPLC. Chitobiose in reaction mixture was selectively removed by hydrolysis by β-N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*; GlcNAcβ1→4ManNAc is resistant to the enzyme hydrolysis. Resulting disaccharide can be easily isolated by gel filtration. Analogous epimerization of GalNAcβ1→4GlcNAc is possible as well.

Trisaccharide GalNAcβ1→4GlcNAcβ1→4ManNAc (IV) was prepared by enzymatic transglycosylation of pNP-GalNAc (III) onto GlcNAcβ1→4ManNAc (II) catalyzed by β-N-acetylhexosaminidase from *A. oryzae*. Hybrid linear trisaccharide was identified as one of the strongest oligosaccharidic ligands of NK-cell activating receptor NKR-P1.

### VYUŽITÍ KOMPATIVNÍ PCR PŘI MONITOROVÁNÍ B-LYMFOPROLIFERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ

**R. IVÁNEK, J. ČERNÝ, A. SLAVÍČKOVÁ**

1. Interní klinika VFN a 1. LF UK, Praha

Přítomnost molekulárních markerů u mnohých hematologických onemocnění umožňuje využití vysoce citlivé metody PCR k sledování léčby a detekci minimální reziduální choro-

by. Avšak vzhledem k možnému přetrvávání pozitivitu, která může být nadto způsobena např. rezidui buněk po chemoterapii, je vhodnější použít některou z metod kvantitativní PCR (Q-PCR), a tak včas odhalit možnou klonální expanzi. K metodám Q-PCR dobře aplikovatelným na klinických pracovištích patří komparativní PCR, což je koamplifikace sekvence specifické pro chorobu a sekvence interního standardu systémem rozdílných primerů, nazývanou též multiplex PCR.

Touto prací prezentujeme možnost kvantifikace klonálního přeskupení genů pro těžký imunoglobulinový řetězec (IgH) jakožto markeru B-lymfoproliferativního onemocnění a srovnávacího markeru – 61. exon H-ras (Harvyho ras) protoonkogeny. Metoda vychází z porovnávání dvou nebo více diagnostických vzorků z různých období léčby pacienta v jedné PCR. Množství produktů amplifikace jsou kvantifikována softwarovou analýzou digitalizovaného záznamu elektroforetického gelu, přičemž je možno dojít buď k relativním výsledkům popisujícím vzestup nebo pokles markeru maligních buněk v porovnávaných vzorcích nebo i k absolutním výsledkům odečteným z kalibrační křivky, která je získána amplifikací DNA linie nesoucí stejný specifický marker v téže PCR. Pro ověření klinického významu byly výsledky komparativní PCR IgH/ras porovnávány s ostatními konvenčními laboratorními vyšetřeními a korelovány s klinickým stavem pacientů. Z našich pozorování vyplývá, že tato metoda by mohla najít uplatnění při terapeutických rozhodnutích.

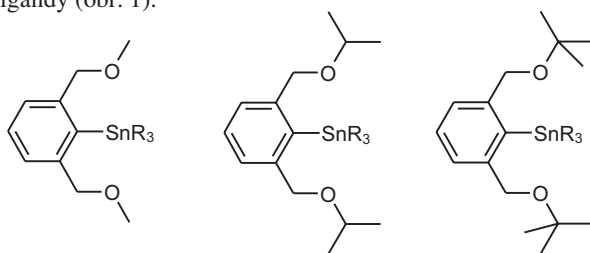
Tato práce je podporována grantem MŠMT CEZ: J13/98: 1111/00004.

## STUDIUM STRUKTURY ORGANOCÍNIČITÝCH SLOUČENIN OBSAHUJÍCÍCH O, C, O-,PINCER“ LIGANDY

ROMAN JAMBOR, ALEŠ RŮŽIČKA,  
LIBOR DOSTÁL, JAROSLAV HOLEČEK

Katedra obecné a anorganické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, n. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, e-mail: roman.jambor@upce.cz

V současné době je naše studium zaměřeno na strukturní vlastnosti organocíničitých součenin obsahujících potenciační terdentální Y, C, Y-chelátující ligandy (Y = N, O, P). Velmi málo výsledků je známo v naší zkoumané oblasti organocíničitých sloučenin obsahujících O, C, O-,pincer“ ligandy (obr. 1).



R = aryl, halogen

Obr. 1. Studované organocíničité sloučeniny

Studované sloučeniny vykazují řadu velice zajímavých vlastností, zejména strukturních a fyzikálních. Strukturní vlastnosti byly studovány zejména pomocí RTG difrakce na monokrystalickém materiálu, NMR v roztocích a tuhé fázi a některých dalších metodik.

### LITERATURA

- Mehring M., Schürmann M., Jurkschat K.: *Organometallics* 17, 1227 (1998).
- Císařová I., Jambor R., Růžička A., Holeček J.: *Acta Cryst., Sect. C*, v tisku.
- Jambor R., Růžička A., Brus J., Císařová I., Holeček J.: *Inorg. Chem. Commun.*, v redakci.

### SERINE PROTEINASE INHIBITORS IN AGGREGATED FORMS OF BOAR SEMINAL PLASMA PROTEINS

P. JELÍNKOVÁ<sup>a</sup>, P. MAŇÁSKOVÁ<sup>a</sup>, M. TICHÁ<sup>b</sup>,  
V. JONÁKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, <sup>b</sup>Department of Biochemistry, Charles University, Prague, Czech Republic

Under physiological conditions most boar seminal plasma proteins are present as aggregates (Jonáková et al., 2000). Only a small portion of proteins was found in the low molecular

weight fraction corresponding to monomers or dimers. Study of the composition of protein-aggregated forms containing serine proteinase inhibitors is the subject of the present communication. Boar seminal plasma proteins were separated by gel chromatography into five fractions. Most inhibitors were found in fraction V ( $M_r \sim 5\ 000\text{--}20\ 000$ ), less in fraction I ( $M_r > 150\ 000$ ). Fraction V was further separated by RP HPLC. Isolated proteins were characterized by SDS-PAGE and immunoblotting, N-terminal amino acid sequencing and the determination of proteinase inhibition activity. The following protein components were identified:

Fraction V	$M_r$	N-terminal sequence	Immuno-detection
$\beta$ -Micro-seminoprotein	10 000	ZCYFIP ...	–
Proteinase inhibitor	7 500	KKTRKEPD...	–
AQN 1 spermadhesin	13 000	AQNKGPBK...	anti-AQN 1
Lactoferrin	70 000	.....	anti-lactoferrin

To study the possible complexes of proteinase inhibitors, fraction V was separated by gel chromatography. Proteinase inhibitor ( $M_r \sim 7\ 500$ ) was eluted either alone or with the spermadhesin AQN 1. This fact might indicate the formation of an associated form of these two components.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grants Nos. 303/99/0357 and 524/96/K162; grant No. MSM 113100001.

### FUNKČNÍ ANALÝZA C-KONCE PROTEINU NHA1 Z KVASINKY *Saccharomyces cerevisiae*

OLGA KINCLOVÁ

Fyziologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, kinclova@biomed.cas.cz

Pro všechny živé organismy je nezbytné zachovávat stále hladiny iontů uvnitř buněk. Jedním z nejdůležitějších kationtů buněčné cytoplazmy kvasinek je  $K^+$ , který se účastní mnoha fyziologických procesů (např. regulace buněčného objemu a vnitrobuněčného pH). Naopak vysoká koncentrace  $Na^+$  či  $Li^+$  je pro většinu buněk toxická.  $Na^+/H^+$  antiportery patří mezi transportní systémy, které antiportním mechanismem využívajícím gradient protonů přes membránu efektivně eliminují toxické kationty z buněk. Gen *NHA1* kvasinky *S. cerevisiae* kóduje  $Na^+/H^+$  antiporter plazmatické membrány dlouhý 985 aa. Na rozdíl od homologních  $Na^+/H^+$  antiporterů z jiných kvasinek, protein *Nha1* má extrémně dlouhý hydrofilní C-konec (554 aa, 56,2 % z celého proteinu) a transportuje přes membránu kromě  $Na^+$  a  $Li^+$  také  $K^+$  a  $Rb^+$ . Pro zjištění funkce C-konce *Nha1p* a jeho vlivu na aktivitu a substrátovou specifitu přenašeče bylo zkonstruováno 13 postupně zkracovaných verzí genu *NHA1*, od kompletního (2955 nt, 985 aa) po nejkratší (1416 nt, 472 aa) končící pouze 41 aminokyselinových zbytků za poslední transmembránovou oblastí, které byly

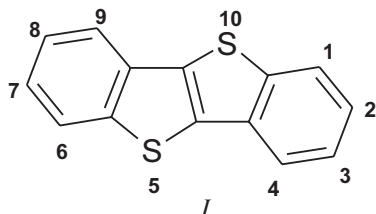
funkčně exprimovány v kmeni *S. cerevisiae* citlivém k alkalickým kationtům (B31, genotyp *nha1Δenal-4Δ*). Pomocí fluorescenčního značení GFP (green fluorescent protein) byly příslušné proteiny lokalizovány v plazmatické membráně. Testováním buněk nesoucích různé verze Nha1p na toleranci k vysokým koncentracím alkalických kationtů a měřením výstupu kationtů z buněk byla identifikována oblast C-konce Nha1p důležitá pro zachování maximální transportní aktivity Nha1p pro ionty Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> a Rb<sup>+</sup>. Na druhou stranu bylo zjištěno, že C-konec proteinu Nha1 není důležitý pro toleranci buněk k vysokým vnějším koncentracím K<sup>+</sup>. Hraje však významnou roli 1) v regulaci obsahu vnitrobuněčného K<sup>+</sup>, čímž přenašeč přispívá k zachování objemu a cytoplazmatického pH buňky, a 2) v buněčné odpovědi k náhlým změnám osmolarity prostředí.

## SYNTÉZA, REAKTIVITA A APLIKACE [1]BENZOTHIENO[3,2-*b*][1]BENZOTHIOFENU

**BEDŘICH KOŠATA, VÁCLAV KOZMÍK,  
JÍŘÍ SVOBODA**

*Ústav organické chemie, VŠCHT, 166 28 Praha 6, e-mail: kosatab@vscht.cz*

Systematický výzkum v oblasti kondenzovaných heteropentalenů<sup>1-3</sup> vedl k návrhu [1]benzothieno[3,2-*b*][1]benzothiofenu (*I*) jako potenciálního jádra látek s kapalně krystalickými vlastnostmi. V této práci shrnujeme výsledky studia jak syntézy tak reaktivity heterocyklu *I*.



Prokázali jsme, že elektrofilní substituce probíhají v látce *I* do poloh 2 a 4. Regioselektivitu substituce lze řídit reakčními podmínkami za tvorby 2-substituovaných derivátů. Substituce do druhého stupně pak vedou přednostně k 2,7-disubstituovaným sloučeninám. Nitroderiváty byly využity k syntéze alkoxy substituovaných derivátů heterocyklu *I* nukleofilními substitucemi. Metalace látky *I* následovaná reakcí s vhodným elektrofilem je cestou pro selektivní přípravu 1-substituovaných derivátů.

Výsledky studia reaktivity [1]benzothieno[3,2-*b*][1]benzothiofenu jsme aplikovali na přípravu série 2,7-diacyl- a 2,7-dialkylderivátů. Bylo zjištěno, že v této sérii tvoří některé deriváty jednu a více kapalně krystalických mezofází<sup>4</sup>.

## LITERATURA

1. Váchal P., Pihera P., Svoboda J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 62, 1468 (1997).
2. Pihera P., Svoboda J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 65, 58 (2000).

3. Pihera P., Paleček J., Svoboda J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 63, 681 (1998).
4. Košata B., Kozmík V., Svoboda J., Novotná V., Vaněk P., Glogarová M.: 6<sup>th</sup> European Conference on Liquid Crystals, March 25–30, 2001, Halle, Germany.

## OPTIMALIZACE SYNTÉZY PREKURZORŮ ANALOGŮ HMYZÍCH JUVENILNÍCH HORMONŮ<sup>1</sup>

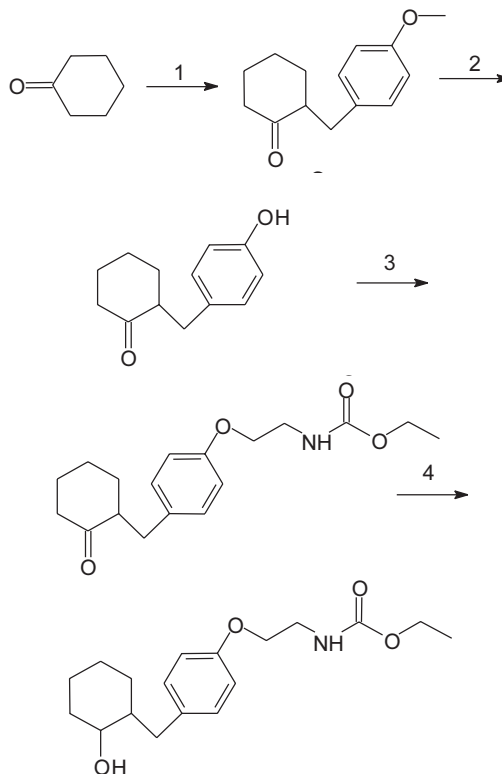
**P. KRATINA<sup>a</sup>, J. MORAVCOVÁ<sup>a</sup>, Z. WIMMER<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>VŠCHT, Technická 5, 160 28 Praha 6, <sup>b</sup>ÚOCHB AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Juvenilní hormony i jejich syntetické analogy hrají důležitou úlohu při vývoji a rozmnožování hmyzu. Pro tuto vlastnost v současné době zastupují skupinu účinných novodobých insekticidů<sup>2</sup>.

Příprava jedné ze základních struktur je znázorněna ve schématu. Reakce 2, ochránění fenolové skupiny, probíhala<sup>3</sup> s malou výtěžností (do 50 %) a produkt byl obtížně izolovatelný. Hydrolyza etherické vazby se prováděla působením konc. HBr v prostředí acetanhydridu. Produkt se zpracovával přidáním vody a CaCO<sub>3</sub> a extrahoval se do diethyl etheru. Extrakce byla znepříjemněna přítomností suspenze anorganických solí ve vodné i organické fázi. Při optimalizaci syntézy jsme navrhli použití PTC (Phase Transfer Catalyst) pro usnadnění kontaktu reaktantů. Vybrali jsme tributylamonium sulfát a tetrabutylfosfonium bromid. Reakce<sup>4</sup> probíhaly bez rozpouštědla, výtěžek vzrostl nad 80 %.

Následující cíle jsou ověřit reakce 3 a 4 a dále navrhnout přípravu alkyl-*O*-glykosidů.



*Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.*

#### LITERATURA

1. Projekt COST D10/0005/98 (D10.10).
2. Hrdý I., Kuldová J., Wimmer Z.: *Vesmír* 79, 636 (2000).
3. Wimmer Z., Romaňuk M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 46, 2573 (1981).
4. Hwang K., Park S.: *Syn. Commun.* 1993, 2845.

#### KONSTRUKCE A EVALUACE MODELU SAVČÍHO CYTOCHROMU P450 2B4

**B. KUBÍČKOVÁ, L. ANTONOVIČ, B. SOPKO, P. HODEK**

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2*

Cytochromy P450 (CYP) jsou hemoproteiny účastníci se metabolismu např. hormonů, léčiv, polutantů, kancerogenů. Přeměna těchto látek cytochromy P450 vede k exkreci z organismu nebo jejich toxifikaci či aktivaci na mutageny. Proto jsou tyto enzymy předmětem intenzivního výzkumu. Odhalení struktury jejich aktivního centra, kde dochází k metabolické přeměně substrátů, má zásadní význam pro pochopení vztahu struktury a funkce CYP v procesu aktivace kancerogenů a metabolismu léčiv. Naš výzkum je proto zaměřen na konstrukce 3D modelu aktivního centra CYP 2B4 a jeho validace metodou fotoafinitního značení.

Technika homologního modelování je založena na předpokladu podobnosti globální struktury námi studovaných savčích a mikrobiálních CYP, jejichž struktura je díky X-paprskové krystalografii známa. Jako templát pro modelování byl tedy použit mikrobiální CYP 102, který je považován za strukturně nejbližší savčím CYP. Po predikci sekundární struktury CYP 2B4 bylo provedeno vzájemné přiřazení sekvencí s CYP 102 (zohledňující globální podobnosti). S použitím strukturálního templátu (CYP 102) byl konstruován 3D model CYP 2B4 a „dokován“ hem. Energetickou optimalizací byl získán homologní 3D model CYP 2B4.

Model CYP 2B4 byl ověřován dokováním specifického substrátu CYP 2B4, diamantanu. Nalezená orientace diamantanu v aktivním centru (vzhledem k hemu) je v souladu s experimentálně prokázanou hydroxylací této látky v poloze 3. K dalšímu potvrzení modelu byly využity výsledky získané z fotoafinitního značení aktivního centra CYP 2B4 pomocí tří sond: *N*-(*p*-azidobenzyl)-*N*-methyl-*p*-aminobenzylamin (I), *N*-(*p*-azidobenzyl)-*N*-methyl-*p*-aminophenethylamin (II) a *N*-(*p*-azidophenethyl)-*N*-methyl-*p*-aminophenethylamin (III). Vzhledem k tomu, že lze předpokládat vazbu těchto sond na hem CYP, je možno identifikovat aminokyselinové zbytky ve vzdálenosti dané délkou molekuly sondy od atomu železa hemu. Pomocí sondy II se podařilo identifikovat Arg 197 nacházející se v helixu F ve správné vzdálenosti od hemu. Neschopnost sond I a III označit aminokyselinové zbytky je v souladu s nepřítomností určujících aminokyselin v exponované oblasti aktivního centra. Získané experimentální výsledky potvrzují správnost modelu CYP 2B4.

#### NH<sub>3</sub> SIGNALIZACE: ÚLOHA AMINOKYSELIN A JEJICH PERMEAS

**MARTIN KUTHAN**

*Katedra genetiky a mikrobiologie, PŘF UK, Viničná 5, 128 44 Praha 2*

Role amoniaku jako signální molekuly je zatím málo prozkoumána, ale již nyní je známo, že hraje úlohu v důležitých biologických procesech (např. při diferenciaci hlenky *Dictyostelium discoideum* či dokonce při přenosu signálů v nervové tkáni).

V naší laboratoři byla objevena a popsána signalizace mezi kvasinkovými koloniemi, využívajícími plynou signální molekulu NH<sub>3</sub>. Amoniak je produkován v pulzech a jeho produkce je výrazně zesílena u sousedících kolonií, které se navíc asymetricky inhibují v růstu. Narozdíl od komplexního média, nedochází při růstu kvasinkových kolonií na minimálním médiu k produkci amoniaku ani k asymetrické inhibici růstu. Oba efekty byly obnoveny po přidání směsi aminokyselin do minimálního média. Navíc mutant kvasinky *Saccharomyces cerevisiae shr3*, defektní v permeasách transportujících aminokyselin, amoniak neprodukuje. Dalším potvrzením role aminokyselin bylo zjištění, že kmen *S. cerevisiae* defektní v nízkoafinitní permease aminokyselin (*Gap1*), má výrazně sníženou produkci amoniaku. Tato zjištění naznačovala, že v procesu NH<sub>3</sub> signalizace hrají nějakou úlohu aminokyseliny. Sledovali jsme proto vliv přítomnosti jednotlivých aminokyselin v minimálním médiu na produkci amoniaku koloniemi *Candida mogii*. Na základě našich experimentů jsme byli schopni rozdělit aminokyseliny na ty, jejichž přítomnost v minimálním médiu vede k vysoké produkci amoniaku (Asn, Pro, Asp, Ala, Glu, Arg, Gly a Ser) a aminokyseliny, v jejichž přítomnosti kolonie *C. mogii* amoniak téměř neprodukuje. Produkce resp. absence produkce amoniaku výrazně ovlivňuje morfologii kolonií a asymetrickou inhibici růstu. Kolonie „produkující“ amoniak jsou tvořeny pseudohyfy i kvasinkovými buňkami, přičemž kvasinkové buňky převládají zejména v části kolonie rostoucí směrem k partnerské kolonii, tedy v oblasti, kde by mělo docházet k maximální indukci produkce amoniaku. Kolonie „neprodukující“ amoniak, jsou tvořeny převážně pseudohyfy a hyfy.

#### VYUŽITÍ VLASTNÍ MODIFIKACE ANALÝZY KATECHOLAMINŮ POMOCÍ HPLC PŘI DIAGNOSTICE FEOCHROMOCYTOMU U PACIENTŮ SE SEKUNDÁRNÍ HYPERTENZÍ

**HANA LENOBELOVÁ<sup>a</sup>, RENÉ LENOBEL<sup>b</sup>, SYLVA DOSTÁLOVÁ<sup>a</sup>, RENATA JURÁKOVÁ<sup>a</sup>, DAVID STEJSKAL<sup>a,c</sup>, IVO ORAL<sup>c</sup>**

*<sup>a</sup>Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk, <sup>b</sup>Laboratoř růstových regulátorů UP Olomouc, <sup>c</sup>Interní oddělení Nemocnice Šternberk*

Fechromocytom je malý tumor dřeně nadledvin, který se klinicky manifestuje řadou rozdílných symptomů (malig-

ní hypertenzí, ortostatickou hypotenzí, hypermetabolismem a neuropsychickou labilitou). Příčinou těchto symptomů je nadprodukce katecholaminů a jejich prekurzorů. Diagnostický algoritmus u pacientů s podezřením na feochromocytom spočívá v klinickém vyšetření (se zaměřením na typické symptomy), zobrazovací diagnostice (CT, NMR, scintigrafie) a laboratorní analýze (katecholaminy a jejich metabolity v plazmě i moči, neuron specifická enolasa v séru). Protože feochromocytom může být uložen také extraadrenálně a laboratorní vyšetření se v běžné klinické praxi velice zobecňují (běžně se stanovuje pouze kyselina vanilmandlová v moči), zůstává podle některých autorů až 75 % pacientů s feochromocytomem nediodagnostikováno.

Na našem oddělení jsme z tohoto důvodu zavedli vlastní modifikaci stanovení katecholaminů a jejich metabolitů (adrenalin, noradrenalin, dopamin, normetanefrin, metanefrin, kyselina vanilmandlová, kyselina homovanilinová). Analýzy provádíme v plazmě nebo moči vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s fluorescenční detekcí (RP-HPLC-FD) po vhodné úpravě vzorku. Izolace noradrenalinu, adrenalinu a dopaminu v moči i plazmě se provádí extrakcí na oxidu hlinitém s následnou derivatizací fluorescenční značkou. Získané fluorescenční deriváty se dělí na RP-HPLC-FD. Izolace metanefrinu a normetanefrinu v moči se provádí dvoustupeňovou ionexovou chromatografií s následnou kvantifikací pomocí nativní fluorescence na RP-HPLC-FD. Izolace kyseliny vanilmandlové a homovanilinové v moči probíhá jedностupňovou ionexovou chromatografií s následnou kvantifikací pomocí nativní fluorescence metodou RP-HPLC-FD. U pacientů s podezřením na feochromocytom používáme následující „biochemický“ algoritmus:

- při nízkém klinickém podezření nebo jako screening vyšetřujeme metanefrin a kyselinu vanilmandlovou v moči (diagnostická specifita i senzitivita této kombinace se pohybuje kolem 99 %),
- při vysokém klinickém suspiciu, patologických nálezech metabolitů v moči, nebo při normálním screeningu a vysokém klinickém suspiciu provádíme stanovení dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu v moči i plazmě za hospitalizace, stanovení kyseliny homovanilinové v moči, event. provádíme clonidinový test (100 % diagnostická specifita i senzitivita).

Za poslední dva roky jsme na našem oddělení vyšetřili 289 pacientů z celého regionu Severní Moravy s podezřením na feochromocytom (na jiných pracovištích této oblasti se t.č. rutinní stanovení katecholaminů neprovádí). U 11 probandů tohoto souboru (4 %) jsme diagnostikovali feochromocytom, který byl následně operačně odstraněn; u všech probandů došlo k ústupu klinických obtíží. Prokázali jsme poměrně nízkou senzitivitu i specifitu kyseliny vanilmandlové (senzitivita 90 %, specifita 79 %), vysokou senzitivitu i specifitu metanefrinu (97 % senzitivita, 100 % specifita) a absolutní specifitu i senzitivitu komplexního vyšetření vč. clonidinového testu.

V současné době provádíme výše uvedená vyšetření pro zdravotnická zařízení celé severní Moravy; analýzy provádějí 3 vysokoškolsky vzdělaní pracovníci. Výsledky vydáváme 1x měsíčně.

## STRUKTURNÍ A DYNAMICKÁ POČÍTAČOVÁ ANALÝZA VAZBY INHIBITORŮ K PROTEASE VIRU HIV-1

**MARTIN LEPSŠÍK**

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

Inhibitory HIV proteasy jsou látky, které jsou součástí směsi používaných k léčbě AIDS. Jejich použití ovšem komplikuje fakt, že proteasa v průběhu terapie mutuje a získává k léčivu rezistenci. Fenomén rezistence je proto nutné ze strukturního i dynamického hlediska dobře prozkoumat, aby bylo možné přikročit k návrhu nových účinnějších léků.

Jedním z velice vhodných nástrojů pro takovou analýzu je použití molekulové mechaniky a dynamiky. Jedná se o výpočetní metody, které s pomocí sady parametrů (potenciálu) dokáží minimalizovat energii chemického systému, resp. sledovat jeho časový vývoj.

V této práci jsme vycházeli z modelů komplexů proteasy s různými inhibitory založených na krystalových strukturách. Rezistentní mutanty byly modelovány pomocí molekulové dynamiky. Rozpouštědlo bylo simulováno použitím dielektrika závislého na vzdálenosti. Ze strukturních charakteristik byla sledována přítomnost vodíkových můstků a van der Waalsovských kontaktů mezi inhibitory a proteasou. Z dynamických vlastností jsme se zabývali zanikáním a znovuvytvářením vodíkových můstků a stálostí, resp. nestálostí van der Waalsovských kontaktů.

Porovnání uvedených charakteristik u komplexů jednotlivých inhibitorů nám umožňuje vysvětlit účinek určitého inhibitoru jak na proteasu divokého typu, tak i na její mutanty. Tímto způsobem se tato práce snaží přispět k vysvětlení mechanismů rezistence.

*Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.*

## POTKANÍ HYPODAKTYLNÍ MUTACE – GENETICKÉ MAPOVÁNÍ A CHARAKTERIZACE KONGENNÍCH KMENŮ

**FRANTIŠEK LIŠKA**

*Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 4, 120 00 Praha 2*

V současné době se u savců předpokládá až 4000 genů, jejichž zárodečné mutace mohou vést k autosomálně recesivně dědičné samčí infertilitě. Tyto mutace mají často pleiotropní efekt i na další orgánové systémy. Jedna z těchto mutací je předmětem našeho výzkumu. Potkaní hypodaktylie (Hd) je autosomálně recesivní postižení vývoje končetin a spermatogeneze. Projevuje se variabilní redukcí počtu prstů a článků prstů na preaxiální straně předních i zadních končetin. Postižení končetin samců a samic je stejné. Všichni homozygotní samci jsou infertilní. Mají zmenšená varlata a nadvarlata a zmenšené množství morfologicky abnormálních a nepohyblivých spermií. Mutovaný gen byl lokalizován na potkaní

chromozom 10 pomocí 152 zpětných kříženců (samice originálního kmene Wistar Hd (WHD) a samec F1 (WHDxBrown Norway)). Jemnější mapování provádíme pomocí populace F2 hybridů WHDxBN (Brown Norway). Kritický segment chromosomu 10, kde se nachází Hd mutace, se tak podařilo zúžit na cca 1,7 cm mezi mikrosatelitními markery D10Rat116 a D10Rat160. Zároveň byla pozorována úplná vazba Hd se skupinou markerů D10Mit8 (v genu pro synaptobrevin 2), D10Wox12 (v genu pro sex hormone binding globulin), D10Wox14 (v genu pro asialoglykoproteinový receptor) a s dvěma anonymními markery. Kritický segment však zřejmě obsahuje i další geny, které mohou být poziciálními kandidáty Hd. Přenesením alely Hd na genetické pozadí inbredních kmenů SHR (spontaneously hypertensive rat) a BN jsme vyvinuli kongenní kmene SHR-Hd a BN-Hd. U SHR-Hd je snížena penetrance a expresivita postižení končetin, zatímco u kmene BN-Hd je těžké postižení končetin, dokonce větší než u kmene WHD. Homozygotní samci obou kongenních kmenů jsou sterilní, avšak hmotnost varlat, nadvarlat i počet spermií je významně vyšší než u kmene WHD. Tato pozorování svědčí pro vliv modifikujících genů na expresi Hd. Naše další práce bude směřovat k identifikaci mutantního genu, případně i k mapování modifikujících minor genů.

#### OXIDACE ALKOHOLŮ ENZYMOVÝM SYSTÉMEM FEROMONOVÉ ŽLÁZY LIŠAJE TABÁKOVÉHO

**ANNA LUXOVÁ, ALEŠ SVATOŠ**

*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, luxova@uochb.cas.cz*

Využití enzymatické katalýzy v organické syntéze patří mezi standardní postupy organické chemie. Dosud nebyl popsán enzym katalyzující oxidaci alkoholů na aldehydy. Konečným krokem biosyntézy sexuálního feromonu u samic lišaje tabákového (*Manduca sexta*) je oxidace hexadec-11-en-1-olu a hexadeca-10,12-dien-1-olu na odpovídající aldehydy. Tato přeměna je katalyzována enzymovým oxidačním systémem lokalizovaným ve feromonové žláze motýla na spodní části abdomenu. Z předběžných výsledků bylo patrné, že vypreparovaný abdomen jak v intaktní, tak v homogenizované formě, katalyzuje oxidaci dalších strukturálních typů alkoholů, které nejsou přirozeným prekurzorem feromonu. Na základě tohoto zjištění jsme začali studovat vlastnosti enzymu týkající se jeho využití v organické syntéze. A to především substrátovou specifitu a stabilitu za různých podmínek. Studovaný enzymatický systém je za *in vitro* podmínek (hexan/fosfátový pufr) velmi robustní s tepelnou stabilitou do 50 °C (teplotní optimum 30 °C) a je možné jej recyklovat (5×). Jeho substrátová specifita byla určena na různých alkoholech: 1) s lineárním nerozvětveným řetězcem, 2) nenasycené, 3) s aromatickým jádrem v postranním řetězci, 4) sekundární. Zjištěné pořadí reaktivity je 3>1>2>>4. Primární alkoholy 1, 2, 3 lze selektivně oxidovat ve směsi se sekundárními alkoholy. Dalším zajímavým zjištěním je profil výtěžků oxidace homologické řady primárních nasyčených alkoholů od šesti do dvaceti uhlíků. Nejmenší konverze přeměny alkohol–aldehyd byla zjištěna u hexadekanolu. U enzymového systému nyní určujeme jeho základní biochemické charakteristiky a pokusíme

se o izolaci a podrobnější strukturální charakterizaci. Budoucnost však spatřujeme v produkci oxidasy geneticky modifikovaných mikroorganismy, do kterých bude vnesen gen kódující proteosyntézu našeho enzymu.

*Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.*

#### SELEKTIVITA OXIDACE KARCINOGENNÍHO 1-FENYLAZO-2-HYDROXYNAFTALENU (SUDAN I, C.I. SOLVENT YELLOW 14) CYTOCHROMEM P450 1A1

**VÁCLAV MARTÍNEK, MARIE STIBOROVÁ**

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2*

Sudan I je karcinogenem jater a močového měchýře studovaným jako modelové karcinogenní azobarvivo, které neobsahuje aminoskupiny ve své molekule. Je metabolizován cytochromy P450 (CYP), které jej oxidují na C-hydroxy a C-dihydroxyderiváty nebo oxidačně štěpí na benzendiazoniový ion (BDI). BDI je reaktivním intermediátem vázajícím se kovalentně na DNA. Majoritní adukt tvořený v DNA z BDI byl identifikován jako 8-(fenyloazo)guanin<sup>1</sup>.

V práci identifikujeme CYP oxidující Sudan I. Nejlépe Sudan I oxidují CYP1A mikrosomů indukovaných β-naftoflavonem (β-NF) (82 %), méně pak CYP2B PB mikrosomů a enzymy mikrosomů indukovaných etanolem či mikrosomů neindukovaných zvířat (všechny – 15 %). Přitom je tato oxidace efektivně inhibována inhibitorem CYP1A1/2 α-NF, zatímco inhibitorem CYP1A2 furafyllinem ovlivněna není. Přeměna Sudanu I CYP1A1 byla potvrzena použitím potkaního rekombinantního enzymu (CYP1A1) rekonstituovaného s NADPH:CYP reduktasou. Studovaný karcinogen je rovněž oxidován v rekonstituovaném systému obsahujícím lidský rekombinantní CYP1A2, ale účinnost oxidace je asi dvacetiprocentní oproti CYP1A1. Vzhledem k tomu, že CYP experimentálních zvířat nemusí být vždy vhodným modelem simulující katalytické vlastnosti lidských enzymů, potvrzujeme výsledky i s enzymy lidskými. Použity byly mikrosomy obsahující lidské rekombinantní CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 a CYP3A4 s cytochromem b<sub>5</sub>, tzv. Supersomes<sup>TM</sup>. Sudan I je opět neúčinněji oxidován lidským CYP1A1. K charakterizaci oxidace Sudanu I CYP1A1 bylo rovněž použito kinetických studií.

V práci prokazujeme, že lidský CYP1A1 je nejefektivnějším cytochromem P450 oxidujícím karcinogenní azobarvivo Sudan I. Výsledky jsou interpretovány z hlediska potenciálního rizika vystavení lidské populace studovanému karcinogenu.

*Podporováno granty MŠMT ČR (MSM 1131 00001) a GA ČR (203/99/1003 a 203/99/1628).*

#### LITERATURA

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

**POZNÁNÍ MECHANISMU KARCINOGENITY  
o-ANISIDINU, KANCEROGENU S DOSUD  
NEVYJASNĚNÝMI PRINCIPY ÚČINKU**

**MARKĚTA MIKŠANOVÁ, MARIE STIBOROVÁ**

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2*

*o*-Anisidin (2-methoxyanilin) je intenzivně používán jako intermediát při výrobě azobarviv. Jde o silný karcinogen močového měchýře. Studium mechanismu jeho karcinogenity je středem zájmu řady laboratoří. Je tomu tak proto, že se jedná nejen o nebezpečný polutant pracovního prostředí chemických provozů, ale navíc, že principy jeho účinku zůstávají dosud neodhaleny. K vysvětlení karcinogenního účinku *o*-anisidinu je nezbytné *i*) poznání enzymů, kterými je metabolizován, *ii*) identifikace struktury reakčních metabolitů a *iii*) poznání, zda metabolity zasahují do iniciační a progresní fáze kancerogeneze, tedy zda tvoří adukty v DNA.

Metabolismus studovaného karcinogenu je zprostředkován hydroxylačními reakcemi katalyzovanými cytochromy P450 a v močovém měchýři i jedno-elektronovými radikálovými oxidacemi peroxidas, jež jsou v močovém měchýři bohatě zastoupeny. Majoritním produktem oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450, izolovaným pomocí HPLC a určeným MS-MS spektrometrií, je derivát *N*-hydroxy-2-methoxyanilin. Efektivněji než cytochromy P450 je *o*-anisidin oxidován laktoperoxidasou, křenovou peroxidasou a prostaglandin H syntasou. Unikátním výsledkem je identifikace produktů oxidace *o*-anisidinu peroxidasami. Pomocí MS-MS spektrometrie bylo poprvé přímo zjištěno, že primárně tvořený radikál *o*-anisidinu poskytuje čtyři majoritní barevné produkty diimin, chinonimin, azodimer a sloučeninu obsahující tři methoxybenzenové kruhy, jejíž přesná struktura dosud nebyla určena.

Výsledky přinášejí i odpověď na otázku mechanismu karcinogenního působení *o*-anisidinu. V průběhu oxidace *o*-anisidinu peroxidasami dochází k vazbě reaktivních metabolitů na DNA. Analýzou pomocí metody „<sup>32</sup>P-postlabellingu“ byla prokázána tvorba kovalentních aduktů v DNA, přičemž cílovými deoxynukleosidy jsou zbytky deoxyguanosinu. Diimin generovaný z primárně tvořeného N-centrovaného radikálu *o*-anisidinu peroxidasou je právě tím metabolitem, který kovalentně modifikuje deoxyguanosin v DNA. Výsledky jasně prokazují, že *o*-anisidin je genotoxickým karcinogenem zasahujícím do iniciační fáze kancerogeneze.

*Autorky děkují za podporu MŠMT ČR (MSM 1131 00001) a GA ČR (grant 203/99/1003).*

**VLIV ACETYLACE HISTONŮ NA DIFERENCIACI  
MONOBLASTŮ TRANSFORMOVANÝCH  
ONKOGENEM *v-myb***

**A. NEMAJEROVÁ<sup>a,b</sup>, J. ŠMARDA<sup>b</sup>, J. ŠMARDOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Masarykův onkologický ústav, Oddělení buněčné a molekulární onkologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, <sup>b</sup>Katedra genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Protein CBP (CREB-binding protein) je koaktivátor transkripce, který je schopen interagovat s mnoha transkripčními

faktory (*c-fos*, Myb, CREB, *c-Fos*, *c-fos*-Jun, p53, jadernými receptory a dalšími proteiny). CBP je histon-acetyltransferasa a acetylací histonů aktivně zasahuje do procesu transkripce. cDNA kódující lidský protein CBP jsme klonovali do expresního vektoru pMT-IRES-CD4, který umožňuje inducibilní expresi genu CBP z metalothioneinového promotoru v hostitelských buňkách a zároveň jejich účinnou purifikaci prostřednictvím dicistronicky exprimovaného markerového genu CD4. Po stabilní transfekci buněk BM2 plazmidem pMT-CBP-IRES-CD4 technikou lipofekce jsme selektovali stabilní transfektanty.

V buňkách BM2CBP jsme ověřili expresi genu CBP na úrovni RNA a proteinů a potvrdili jsme tvorbu komplexu mezi proteiny CBP a *v-Myb*. Samotná indukce exprese CBP sice nezměnila morfologii buněk BM2 ani proliferační rychlost, ale ovlivnila jejich reakci na některé vnější inductory diferenciace jako je forbolový ester TPA a inhibitor histon-deacetylasy trichostatin A (TSA). Ukázali jsme, že působení TSA vede v buňkách BM2 i BM2CBP k hyperacetylaci histonů a k zastavení buněčného cyklu ve fázi G1. Buňky BM2CBP (v menší míře i BM2) tvoří působením TSA mnohojaderné buňky, které svou morfologií významně připomínají osteoklasty. Proto jsme v buňkách BM2CBP po působení TSA testovali některé pro osteoklasty specifické markery. Prokázali jsme, že se nejedná ani o osteoklasty ani o osteoklastům podobné buňky. TSA indukuje diferenciaci buněk BM2 a BM2CBP na makrofágové polykaryony, které se účastní zánětlivých procesů.

*Tato práce byla podporována granty IGA MZ ČR č. NM-16/3 a MZ0002980501*

**TESTOVACÍ SYSTÉM PRO STUDIUM ODEZVY  
ROSTLIN NA STRES**

**PETRA NEŠNĚROVÁ, ALEŠ SVATOŠ,  
TOMÁŠ MACEK**

*ÚOCHB AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6, e-mail: Petra\_Nesnerova@yahoo.com*

Zkoumání vztahů mezi vnějším prostředím a stresem v rostlinách je v poslední době věnována stále větší pozornost, stejně tak, jako studiu mechanismů, které jsou odezvou na stresový faktor a pomocí nichž se rostlina proti vzniklému stresu brání. Metody používané ke studiu stresových reakcí většinou neumožňují získání výsledků bez poranění rostlin. Proto se snažíme navrhnout nový testovací model, při jehož využití je možné pracovat s intaktními rostlinami a získat objektivnější a reprodukovatelné výsledky (na pozadí se neprojeví vliv mechanického poranění). Stresovou reakcí lze u rostlin navodit mj. aplikací jasmonové kyseliny (JA) nebo jejího methyl-esteru (MJ), která slouží při studiu obranných mechanismů jako endogenní signál vyvolávající u rostlin reakce velmi podobné reakcím vyvolaným mechanickým poraněním, býložravci nebo hmyzem. Jako modelovou rostlinu používáme netransformované rostliny *Nicotiana tabacum* (L). K porovnání odezvy a optimalizaci byly používány celé rostliny nebo jednotlivé listy rostlin (*in vitro* nebo *in vivo*), malé rostliny



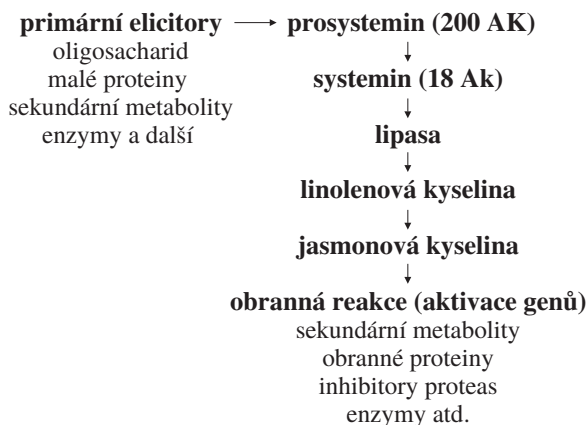


Schéma 1. Signální kaskáda u rostlin

(stáří 2–9 týdnů) pěstované ze semínka, kalusu a buněčná suspenze. Jako elicitor stresu je používán racemický MJ a JA v intervalu koncentrací, jehož spodní mez je srovnatelná s koncentrací těchto látek produkovaných poraněnou rostlinou v přírodních podmínkách. Těkavé látky (ocimen, elemen, drimadien) vylučované poraněnými rostlinami do ovzduší jsou uvnitř měřicí aparatury extrahovány přímo ze vzorku pomocí mikroextrakce na pevnou fázi (SPME) na vlákno potažené polymethylsilikonovou fází. Látky jsou analyzovány pomocí plynové chromatografie a identifikovány hmotnostní spektrometrií. Optimalizací podmínek byly jako nejvhodnější pro použití malých rostlin a indukci MJ stanoveny tyto podmínky: stáří rostlin – 6 týdnů, koncentrace MJ – 5 µg na jednu rostlinu, měření na GC – 20–24 hodin od začátku indukce. Daný modelový systém je možné využít v základním i aplikovaném výzkumu (při studiu vlivu různých látek na rostliny, např. fytohormony a jim podobné látky).

Tato práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.

## PŘÍPRAVA FENYL-HYDROXYETHYL DERIVÁTŮ GUANINU JAKO STANDARDŮ PRO DIAGNOSTIKU POŠKOZENÍ DNA

**JAN NOVÁK, IGOR LINHART**

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Poškození DNA alkylujícími látkami lze diagnostikovat detekcí příslušných derivátů purinových basí v moči a nukleotidových derivátů v leukocytech vysoce citlivými analytickými metodami.

U lidí exponovaných styrenu jsou fenyl-hydroxyethyl deriváty guaninu významnými indikátory poškození<sup>1</sup>. V práci je popsána příprava *O*<sup>6</sup>-derivátů guaninu metodou aktivace 2-amino-6-chlor purinu 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanem<sup>2</sup>. Vzniklý 2-amino-6-(1-azonia-4-azabicyklo[2.2.2]-1-oktyl)purin („DABCO-purin“) reaguje snadno s natrium 1-fenylethan-1,2-diolátem za vzniku dvou regiosomerních produktů, *O*<sup>6</sup>-(1-fenyl-2-

-hydroxyethyl)-guaninu ( $\alpha$ -adukt) a *O*<sup>6</sup>-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)guaninu ( $\beta$ -adukt). Jako majoritní byl získán  $\beta$ -adukt. Dále byly zkoumány alkylační reakce 2-amino-6-chlorpurinu s 2-brom-2-fenylethanolem a s 2-brom-1-fenylethanolem s cílem připravit deriváty substituované v poloze 7. Struktura připravených látek byla ověřena pomocí NMR, UV a hmotnostními spektry.

Práce byla podporována granty MSM 223100001 ministerstva školství ČR a 313/99/1460 GA ČR.

## LITERATURA

1. Vodička P., Vodičková L., Trejblová K., Šrám R. J., Hemminki K.: *Carcinogenesis* 15, 1949 (1994).
2. Linn J. A., McLean Ed W., Kelley J. L.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 8, 913 (1994).

## A METHODOLOGY TO ASSESS RISK OF ORGANIC COMPOUNDS IN THE UNDERGROUND ENVIRONMENT

**JAROSLAV NOVÁK<sup>a</sup>, RICHARD TYKVA<sup>a</sup>,  
 VĚRA VLASÁKOVÁ<sup>b</sup>, STANISLAV FORMAN<sup>c</sup>,  
 TOMÁŠ RUML<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Science of the Czech Republic, <sup>b</sup>Institute of Experimental Botany, Academy of Science of the Czech Republic, <sup>c</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic

Organic compounds used in modern industry and agriculture represent a serious environmental risk. Therefore, it is necessary to observe the toxicity of such compounds in the underground environment (e.g., uptake by plant roots, pollution of groundwater, etc.). The complex environmental toxicity of such a compound consists of two components, namely that of the analyzed compound and another one of its soil degradation products.

Our methodology includes isolation of microbial strains from the sites where the investigated organic compound(s) should be used, biodegradation analyses and measurement of the toxicity of the parent compound and its biodegradation products.

The described methodology was tested using a carbamate juvenile with oostatic activity after application to flies *Sarcophaga bullata*. Microbial strains from soil samples were isolated and those which degraded the tested compound were selected. Biodegradation experiments consist of incubation of the radiolabeled juvenile with the selected microorganisms in liquid media followed by radio-HPLC where four radioactive peaks were isolated. The main degradation product was identified, and two other fractions represent mixtures of degradation products. In relation to the parent compound, we found lower toxicity for all three fractions representing biodegradation products.

Another application of the developed methodology is in preparation for commercially available pesticides, in which we will extend the method with experiments on soil columns in

cooperation with Germany (GSF, Neuherberg) including identification of degradation products by radio-HPLC/MS.

*This work was performed under the Research Project Z4 055 905.*

## JE „DNA ŽEBŘÍČEK“ SPOLEHLIVOU ZNÁMKOU APOPTÓZY?

**JAN PEYCHL, EMIL RUDOLF, JAN NOVÁK,  
JIRÍ HUSÁK**

*Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Šimkova 870, 500 01 Hradec Králové*

Internukleosomová fragmentace DNA je považována za jednu z charakteristických známek programované buněčné smrti – apoptózy. Lze ji detekovat pomocí metody horizontální elektroforézy v agarózovém gelu jako tzv. DNA žebříček (DNA ladder assay). Proto jsme tuto metodu zařadili do našich studií buněčné smrti indukované *in vitro*. Jako model jsme zvolili buňky stabilizované buněčné linie Hep 2 odvozené z lidského karcinomu laryngu a buňky stabilizované buněčné linie HL 60 odvozené z lidské promyelocytární leukémie. K indukci apoptózy jsme použili 24 hodinové ovlivnění buněk etoposidem (inhibitor topoisomerasy II) v koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Po izolaci a elektroforéze DNA z ovlivněných buněk jsme typický DNA žebříček našli pouze u DNA buněk linie HL 60. U buněk linie Hep 2 jsme tento typ fragmentace DNA nezachytili. Pomocí mikroskopických metod jsme však u ovlivněných buněk obou buněčných linií prokázali typické morfologické projevy apoptózy: pohyb výběžků cytoplazmatické membrány, svrštění buněk, kondenzaci a fragmentaci chromatinu. Etoposidem ovlivněné buňky linie Hep 2 vykázaly rovněž pozitivitu v imunohistochemických vyšetřeních na přítomnost kaspasy 3, která je součástí apoptotické kaskády. Naše výsledky naznačují, že internukleosomová fragmentace DNA není zcela spolehlivou známkou apoptózy indukované *in vitro* u buněk různého původu.

*Práce vznikla za podpory Výzkumných záměrů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy FD MSM 111500002 a FD MSM 111500004*

## MECHANISMY REGULUJÍCÍ AKTIVITU NÁDOROVÉHO SUPRESORU PROTEINU P53 A MOŽNOSTI AKTIVACE JEHO NEFUNKČNÍCH FOREM V NÁDOROVÉ BUŇCE

**ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ<sup>a</sup>, VÁCLAV BRÁZDA<sup>b</sup>,  
PETR MÜLLER<sup>a</sup>, EMIL PALEČEK<sup>b</sup>,  
BOŘIVOJ VOJTĚŠEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno,

<sup>b</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Procesy buněčné proliferace a diferenciace jsou v buňce přesně regulovány řadou extracelulárních i intracelulárních

mechanismů, jejichž narušení má zpravidla za následek maligní transformaci buňky. K nejvýznamnějším faktorům podílejícím se na regulaci buněčného cyklu patří protein p53, nádorový supresor indukovaný buněčným stresem, který v závislosti na míře poškození genetické informace indukuje buď zastavení buněčného cyklu v G<sub>1</sub> fázi, které umožní reparaci poškozené DNA před její další syntézou, a nebo spouští mechanismy vedoucí k programované smrti buňky – apoptóze. Mutace v genu pro p53 byly nalezeny u více než 50 % lidských malignit, což dokazuje jeho nepostradatelnou úlohu v regulaci buněčného cyklu a ochraně buňky proti nádorovému bujení. Z tohoto důvodu je protein p53 nazýván jako „strážce genu“.

Lidský protein p53 je jaderný fosfoprotein o velikosti 393 aminokyselin, jehož mechanismus působení je realizován jeho schopností vázat se na specifické sekvence DNA (tzv. p53 consensus sekvence) a fungovat jako sekvencně specifický transkripční faktor. Za fyziologických podmínek se protein p53 nachází v buňkách převážně v latentní konformaci (nevykazuje DNA-vazebnou aktivitu) a jeho hladina je velmi nízká a teprve při odpovědi buňky na stresové podmínky (např. expozici buňky faktorům poškozujícím DNA) dochází k jeho aktivaci a stabilizaci. Aktivace latentního proteinu p53 k vazbě na DNA je zpravidla zprostředkovávána alosterickou modifikací jeho C-koncové regulační domény a může se při ní uplatnit několik mechanismů, např. vazba monoklonálních protilátek rozpoznávajících epitopy v C-koncové doméně proteinu. Významným fyziologickým mechanismem aktivace latentního proteinu p53 jsou jeho post-translační modifikace, především fosforylace na specifických Ser a Thr, které zprostředkovávají odpověď buňky na extracelulární nebo intracelulární stresové faktory. V naší práci jsme se zabývali vlivem jednotlivých post-translačních modifikací na DNA-vazebnou aktivitu proteinu a podařilo se nám prokázat, že fosforylace proteinu cdk2/cyklin A na Ser 315, Protein kinasou C na Ser 378 a Casein kinasou II na Ser 392 mají na rozdíl od modifikací N-koncové domény proteinu schopnost indukovat přechod p53 z latentní do aktivní konformace, což se projeví výrazným zvýšením vazby p53 na promotorové sekvence DNA. Přítomnost těchto post-translačních modifikací jsme prokázali také *in vivo*, přičemž míra modifikace se u různých nádorových buněčných linií výrazně liší a může být indukována poškozením DNA.

Post-translační modifikace se tedy jeví být jedním ze základních regulačních mechanismů aktivity p53, přičemž fosforylace Ser 315, 378 a 392 pravděpodobně patří mezi klíčové regulační signály zprostředkovávající reakci na poškození DNA a buněčný stres. Z těchto poznatků vyplývá, že nejen mutace v genu pro p53, ale také narušení biochemických drah zprostředkovávající jeho post-translační modifikace, mají zásadní vliv na aktivitu proteinu p53 a musí být zohledněny v případné protinádorové terapii založené na obnově funkčního proteinu p53.

*Tato práce byla financována z grantových projektů GA ČR 301/00/P094 a 312/99/1550 a IGA MZ ČR 4783-3.*

## NOSIČE GENOVÉ INFORMACE NA BÁZI POLYELEKTROLYTOVÝCH KOMPLEXŮ POLYKATIONT/DNA

**T. RESCHEL<sup>a</sup>, Č. KOŇÁK<sup>a</sup>, K. ULBRICH<sup>a</sup>,  
D. OUPICKÝ<sup>a</sup>, L. W. SEYMOUR<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6, <sup>b</sup>CRC Institute for Cancer Studies, University of Birmingham B15 2TA, Birmingham

Genová terapie, jejímž hlavním úkolem je doprava specifického genu do vybraných buněk nebo tkání a zajištění jeho transkripce a tím i terapeutického účinku, byla navržena jako jedna z možností léčby řady onemocnění. V současné době se výzkum soustřeďuje na vývoj tří typů vektorů vhodných pro dopravu genů – virální nosiče DNA, komplexy DNA s kationtovými liposomy a komplexy se syntetickými polykationty. Aby tyto systémy byly aktivní *in vivo*, je nutné zajistit jejich stabilitu v krevním řečišti, eliminovat interakci s komponentami retikuloendotelálního systému, zajistit prodlouženou cirkulaci, dostatečně malý rozměr pro účinnou extravasaci, umožnit cílené směřování a transport přes buněčnou membránu, ochránit DNA před degradací lysosomálními enzymy a zajistit účinný přepis genetického materiálu v jádře buňky. Námi studovaný systém, který by měl splňovat výše uvedené požadavky, vychází z použití komplexů plazmidové DNA s polykationty povrchově modifikovanými hydrofilními polymery nesoucími funkční molekuly (směřovatelné jednotky, fusogenní skupiny atd.).

Pro všechny typy studovaných polykationtů byla fluorescenční metodou ověřena jejich schopnost tvořit polyelektrolytové komplexy s DNA (PEC) a byl studován vliv podmínek přípravy na vlastnosti PEC (poměr +/- náboje, pH pufru, rychlost míchání, teplota).

Biofyzikální vlastnosti komplexů polykationt/DNA jsou ovlivněny typem a molekulovou vahou použitého polykationtu. Bylo prokázáno, že stabilita komplexů vůči disociaci v roztoku NaCl vzrůstá v řadě od kvarterních bazí přes terciární aminy k aminům primárním. Dalším faktorem, který přispívá ke zvýšené stabilitě komplexů, je zvýšení molekulové hmotnosti polykationtu použitého pro přípravu PEC. Ve stejné řadě také vzrůstá *in vitro* transfekční aktivita komplexů polykationtů s plazmidovou DNA.

Tento projekt je financován GA ČR (grant č. 307/96/K226) a European Union Biotechnology Program (IC20CT97005).

## STRUCTURAL BASIS OF THE HIV-1 AND HIV-2 PROTEASE INHIBITION BY A MONOCLONAL ANTIBODY

**PAVLÍNA ŘEZÁČOVÁ<sup>a</sup>, JULIEN LESCAR<sup>b</sup>,  
JÍŘÍ BRYNDA<sup>a</sup>, MILAN FÁBRY<sup>a</sup>,  
MAGDA HOŘEJŠÍ<sup>a</sup>, RENATA ŠTOURAČOVÁ<sup>a</sup>,  
GRAHAM BENTLEY<sup>a</sup>, JURAJ SEDLÁČEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Department of Gene Manipulation, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences, 166 37 Prague 6, Czech Republic, <sup>b</sup>ESRF, BP220, 38043 Grenoble, <sup>c</sup>Unité d'Immunologie Structurale, Dept. d'Immunologie, Institut Pasteur, 75724 Paris, France

The HIV protease (HIV PR) is a homodimeric enzyme belonging to the family of aspartyl proteases. This enzyme plays an essential role in the HIV life cycle, and is thus one of the most attractive targets for design of specific inhibitors. The murine monoclonal antibody (mAb) 1696, produced by immunisation with the HIV-1 protease, inhibits the catalytic activity of the enzyme of both the HIV-1 and HIV-2 isolates, with inhibition constants in the low nanomolar range. This antibody cross-reacts with peptides that include the N-terminus of the enzyme (residues 1–7), a region which is highly conserved in sequence among different viral strains and which, furthermore, is crucial for homodimerization to the active enzymatic form.

We report here the crystal structure of a recombinant single-chain Fv fragment of mAb 1696, expressed in *E. coli*, as a complex with a cross-reactive peptide from the HIV-1 protease at 2.7 Å resolution.

The antibody-antigen interactions observed in this complex provide a structural basis for understanding the origin of the broad reactivity observed between mAb 1696 with the HIV-1 and HIV-2 proteases and their respective N-terminal peptides. In addition, a possible mechanism of HIV protease inhibition by mAb 1696 is proposed that could help the design of inhibitors aimed at binding inactive monomeric species.

## STUDIUM KUMULACE TĚŽKÝCH KOVŮ V ROSTLINÁCH

**IVANA ŠPIROCHOVÁ<sup>a</sup>, TOMÁŠ VANĚK<sup>b</sup>,  
PETR SOUDEK<sup>b</sup>, ZDENĚK KAFKA<sup>a</sup>,  
JANA PUNČOCHÁŘOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Fakulta technologie ochrany prostředí, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup>Oddělení explantátových kultur, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Díky intenzivní činnosti člověka se do životního prostředí dostávají stále vyšší koncentrace škodlivých látek, které se v přírodě běžně nevyskytovaly. Důsledkem toho je znečištěná půda, voda i vzduch s dopadem na živé organismy včetně člověka. Ve snaze zvrátit tento trend hledá člověk metody remediací (ozdravení) založené na fyzikálních, chemických i biologických principech. V některých případech se ukazuje, že i rostliny mohou být, díky svým specifickým vlastnostem,

při tomto procesu užitečné. Těchto jejich vlastností by bylo možno využít pro remediaci půd znečištěných těmito nebezpečnými kontaminanty, ať už organickými či anorganickými.

Cílem této práce je sledování podmínek kumulace těžkých kovů konkrétně  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ . Sledování je prováděno na intaktních rostlinách *in vitro* kultury hybridu osiky (*Populus tremula* x *tremuloidaes*). Předběžné výsledky ukazují, že kultura osiky kumuluje olovnaté ionty, aniž by se projevil negativní dopad kontaminace na růst rostlin. Měření dokonce prokázala progresivní nárůst biomasy.

Vedle těchto pokusů byly realizovány experimenty na lokalitě kontaminované těžkými kovy (konkrétně Pb, Zn). Zde byly použity rostliny slunečnice a kukuřice, které byly vysázeny na kontaminovanou lokalitu a za 4 měsíce sklizeny separovány a analyzovány. Výsledky tohoto experimentu byly překvapivé a naznačily, že koncentrace kontaminujícího kovu v zemině (nebo půdní vodě) nemusí být základním faktorem ovlivňující intenzitu kumulace kovu v rostlině.

*Tato práce je podporována projektem COST 837.10. Byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.*

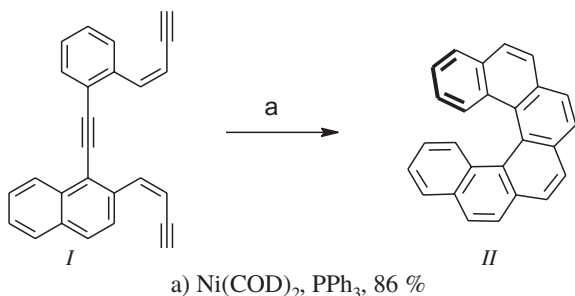
### HELICENY – PŘÍMÁ SYNTÉZA IZOMERACÍ AROMATICKÝCH *cis,cis*-DIENTRIINŮ

FILIP TEPLÝ, IRENA G. STARÁ,  
ADRIAN KOLLÁROVIČ, IVO STARÝ,  
DAVID ŠAMAN

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: fteply@uochb.cas.cz

Vyvinuli jsme nový syntetický přístup k [5]-, [6]- a [7]helicenu, které reprezentují unikátní  $\pi$ -konjugované inherentně chirální molekuly. Klíčovým stupněm přípravy je intramolekulární [2+2+2] cykloizomerace aromatických *cis,cis*-dienetriinů v přítomnosti  $Ni(COD)_2$  nebo  $CpCo(CO)_2$ . Při této reakci, která zahrnuje posun 6  $\pi$ -elektronů, dochází k simultánnímu uzavření tří aromatických kruhů (pro [5]helicenu  $\Delta H = -136$  kcal.mol<sup>-1</sup>, AM1 výpočet) a vybudování úplného helicenového skeletu. V přítomnosti  $Ni(COD)_2$  byl [5]-, [6]- a [7]helicenu izolován ve výtěžku 83 % ([5]), 86 % ([6], 1→2) a 60 % ([7]).

Konvergentní syntéza *cis,cis*-dienetriinu 1 vychází ze známého (Z)- $\beta$ , $\alpha$ -dibromstyrenu<sup>1</sup> a 1-brom-2-naftaldehydu<sup>2</sup>. Obecné využití tohoto postupu, který odpovídá principu atomové ekonomie a při němž vzrůstá komplexita molekuly v posledním stupni syntézy, je předmětem dalšího studia stejně jako enantioselektivní verze klíčové cykloizomerace.



*Tato práce byla podporována GA ČR (grant č. 203/99/1448). Byla vypracována v rámci výzkumného záměru Z4 055 905.*

### LITERATURA

1. Yasuike S., Shiratori S., Kurita J., Tsuchiya T.: Chem. Pharm. Bull. 47, 1108 (1999).
2. Weber E., Csöregy I., Stensland B., Czugler M.: J. Am. Chem. Soc. 106, 3297 (1984).

### PURIFIKACE, KRYSTALIZACE A RENTGENOVÁ STRUKTURNÍ ANALÝZA KUKUŘIČNÉ CYTOKININ-GLUKOSID-SPECIFICKÉ $\beta$ -GLUKOSIDASY

#### JITKA VÉVODOVÁ

Národní centrum pro výzkum biomolekul a Laboratoř funkční genomiky a proteomiky rostlin, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: vevod@chemi.muni.cz

Kukuřičná cytokinin-glukosid-specifická  $\beta$ -glukosidasa, Zm-p60.1, náleží do třídy  $\beta$ -glukosidas, které jsou součástí rodiny I glykosyl hydrolas.  $\beta$ -glukosidasy jsou důležitou skupinou enzymů, které štěpí glykosidickou vazbu disacharidů, oligosacharidů nebo konjugovaných glykosidů.  $\beta$ -Glukosidasa Zm-p60.1 je považována za jeden z klíčových enzymů podílejících se na regulaci růstu a vývoje rostlin díky své schopnosti štěpit biologicky aktivní cytokiny z jejich zásobních a transportních forem. Enzym Zm-p60.1 se v rostlinách vyskytuje jako homodimer lokalizovaný v plastidech (chloroplastech).

Pro pochopení katalytické aktivity, specificity a obecně i funkce enzymů v biologickém systému je zcela nezbytná znalost jejich třídimenzionální struktury. V současné době je k řešení tohoto problému zpravidla používána proteinová krystalografie. Tato moderní metoda umožňuje pomocí rentgenové strukturní analýzy velmi přesně určit prostorovou strukturu makromolekulárních systémů, jejichž molekulová hmotnost může dosahovat několika desítek až stovek kD.

Postup analýzy třídimenzionální struktury enzymu lze rozdělit do několika fází. Prvním krokem byla nadprodukce proteinu v *E. coli* a jeho purifikace pomocí afinitní chromatografie a gelové filtrace. Následovalo hledání a optimalizace podmínek vhodných pro přípravu krystalů proteinu. Po získání a zpracování difrakčních dat<sup>1</sup> byla struktura enzymu určena metodou molekulárního nahrazení. Jako model byla použita  $\beta$ -glukosidasa z *T. repens*<sup>2</sup>. Strukturu Zm-p60.1 tvoří jednodoménový ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barel s aktivním centrem v podobě solvovaného kapsy, uvnitř které se váží pravděpodobně 2–3 molekuly glycerolu. V souladu se „zádržným“ mechanismem enzymatické hydrolyzy glykosidické vazby se v aktivním centru vyskytují residua tvořící katalytický pár – donor protonu Glu186 a nukleofil Glu401 (cit.<sup>3</sup>).

### LITERATURA

1. Vévodová J., Marek J., Zouhar J., Brzobohatý B., Su X.-D.: Acta Cryst. D 57, 140 (2001).

- Barett T., Suresh C. G., Tolley S. P., Dodson E. J., Hughes M. A.: *Structure* 3, 951 (1995).
- Vévodová J., et al.: připraveno k publikaci.

### CARCINOGENIC AND NEPHROTOXIC ALKALOIDS ARISTOLOCHIC ACIDS ARE ACTIVATED BY D,T-DIAPHORASE: <sup>32</sup>P-POSTLABELING ANALYSIS OF DNA ADDUCT FORMATION

**HANA VOŠMIKOVÁ, MARIE STIBOROVÁ**

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

Aristolochic acid (AA), a naturally occurring nephrotoxin and carcinogen, is implicated in a unique type of renal fibrosis, designated Chinese herbs nephropathy (CHN) (Ref.1). We identified the AA-DNA adducts in kidneys and in a ureter obtained after renal transplantation. One major DNA-adduct of AA, 7-(deoxyadenosin-*N*<sup>6</sup>-yl)-aristolactam I and two minor adducts, 7-(deoxyguanosin-*N*<sup>2</sup>-yl)-aristolactam I and 7-(deoxyadenosin-*N*<sup>6</sup>-yl)-aristolactam II were detected<sup>1</sup>. Understanding which enzymes are involved in AA activation and/or detoxication is important in the assessment of an individual susceptibility to this natural carcinogen. We have identified xanthine oxidase and CYP1A1, CYP1A2 as well as NADPH: CYP reductase as activating systems capable of reductively activating AA to the same DNA adducts observed in CHN patients. Here we examine the ability of another enzyme, D,T-diaphorase, to activate AA to metabolites forming DNA adducts with the nuclease P1 version of the <sup>32</sup>P-postlabeling assay.

Hepatic cytosols of rats generated AA-DNA adduct patterns reproducing those found in renal tissue in CHN patients. The efficiency of cytosols to form AA-DNA adducts was increased by pretreatment of rats with inducers of D,T-diaphorase, and what is more interesting, also with AA. Dicumarol, an inhibitor of D,T-diaphorase, significantly decreased the amounts of adducts formed by cytosols. Likewise, cofactors of D,T-diaphorase, NADH and NADPH, supported the DNA adduct formation of AA. These results demonstrate an important role of this enzyme in activation of AA in the cytosolic system and were corroborated with purified enzyme that we isolated from rat hepatic cytosol. Using a structural modeling of AA binding to active center of D,T-diaphorase, we contribute to explanation of the mechanism of AA activation by this enzyme. The results are the first report demonstrating AA activation by D,T-diaphorase.

*Supported by GA CR (303/99/0893) and MECR (MSM 1131 00001).*

#### REFERENCES

- Bieler C. A., Stiborová M., Wiessler M., Cosyns J.-P., van Ypersele de Strihou C., Schmeiser H. H.: *Carcinogenesis* 18, 1063 (1997).

### FOTOCYKLIZACE 2-AMINOAZOBENZENU KATALYZOVANÁ ROZTOKEM HgI<sub>2</sub>

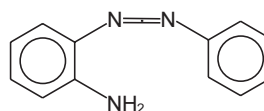
**MARTIN ZEMAN**

*KTFCH PřF MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: zemanm@chemi.muni.cz*

Při zkoumání fotokatalytických účinků práškových polovodičů v alkoholu se ukázalo, že jodid rtuťnatý, který je v ethanolu značně rozpustný, katalyzuje cyklizaci 2-aminoazobenzenu i v případě, že je zfiltrován. Roztoky byly analyzovány hlavně pomocí HPLC a DP polarografie. Dosavadní závěry jsou následující:

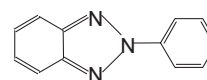
Reakce je roztoková a je ovlivněna koncentrací jodidu rtuťnatého. Koncentrace katalyzátoru má vliv nejen na reakční rychlost, ale i na zastoupení produktů. Reakce neprobíhá ve vodně-alkoholickém roztoku na práškovém HgI<sub>2</sub>, který je v přítomnosti vody nerozpustný. Osvětlením nevrátí mění vlastnosti HgI<sub>2</sub> na HPLC koloně. Nadměrná koncentrace reaktantu zbrzdí fotokatalyzovanou reakci, patrně z důvodu absorpce světla.

Reaktant:

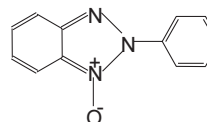


2-aminoazobenzen

Produkty:



2-fenylbenzotriazol



2-fenylbenzotriazol-*N*-oxid

### POUŽITELNOST DAPSONU A CISAPRIDU JAKO LIGANDŮ PŘI IZOLACI CYTOCHROMŮ P450 AFINITNÍ CHROMATOGRAFIÍ

**ROMAN ZUBER<sup>a</sup>, EVA ANZENBACHEROVÁ<sup>b</sup>, PAVEL ANZENBACHER<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav farmakologie a <sup>b</sup>Lékařské chemie LF UP, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Jaterní cytochromy P450 u savců jsou nejdůležitějšími enzymy metabolismu cizorodých látek. V lidských játrech je přítomno několik forem P450; přítomná forma 3A4 se podílí na biotransformaci téměř poloviny všech používaných léčiv. Po-

dobná forma P450 3A je přítomna i u miniprasat, potenciálních dárců jater/hepatocytů pro xenotransplantace nebo konstrukci bioarteficiálních jaterních náhrad. Cílem bylo izolovat tuto formu z miniprasečích jater a charakterizovat ji z hlediska substrátové selektivity a struktury aktivního místa.

Izolace forem P450 je vzhledem k jejich počtu a podobným vlastnostem nesnadná. Proto bylo využito možností afinitní chromatografie. Byly připraveny dva typy afinitních nosičů s ligandy dapsonem a cisapridem (substráty formy 3A4, navíc pro přítomnost aminoskupiny vhodné pro navázání na epoxy-aktivovanou sepharosu CL-6B).

Nosič s navázaným cisapridem je schopen selektivně zadržovat formu P450 3A, jak bylo prokázáno pomocí SDS-PAGE a Western blotu. V případě nosiče s navázaným dapsonem naproti tomu nedošlo k vazbě P450 3A, vázaly se však jiné formy P450.

Oba nosiče mají tedy afinitu k cytochromům P450, ale odlišnou selektivitu. Cisaprid se zdá být vhodný jako afinitní ligand při purifikaci cytochromu P450 3A z jater miniprasat.

*Autoři děkují GA ČR za finanční podporu grantu č. 203/99/0277.*

**REJSTŘÍK AUTORŮ (podtrženi jsou přednášející)**

<u>Adam</u> M.	318	<u>Hušáková</u> L.	322, 325	<u>Pospíšilová</u> Š.	334
Antonovič L.	329			<u>Punčochářová</u> J.	335
Anzenbacher P.	337	<u>Ivánek</u> R.	326		
Anzenbacherová E.	337			<u>Reschel</u> T.	335
Ástot C.	321	Jagelská E.	319	Rinnová M.	325
		<u>Jambor</u> R.	327	Rudolf E.	334
Barek J.	321	<u>Jelínková</u> P.	327	Ruml T.	333
Bařinka C.	325	Jonáková V.	327	Růžička A.	327
Bentley G.	335	Jovin T. M.	319		
Bezouška K.	325	Juráková R.	329	<u>Řezáčová</u> P.	335
Billová S.	319				
<u>Blahoš</u> J.	318	Kafka Z.	335	Sandberg G.	321
<u>Braunová</u> A.	319	Karlovska L.	319	Sedláček J.	335
<u>Brázda</u> V.	319, 334	<u>Kinclová</u> O.	327	Seymour L. W.	335
<u>Brázdová</u> M.	319	Kollárovič A.	336	Slavičková A.	326
Brynda J.	335	Koňák Č.	335	Sopko B.	329
<u>Bunčec</u> M.	320	Konvalinka J.	325	Souček M.	325
		<u>Košata</u> B.	328	Soudek P.	335
<u>Cvačka</u> J.	321	Kozmík V.	321, 328	Stará I. G.	336
		<u>Kratina</u> P.	328	Starý I.	336
<u>Čajan</u> M.	320	Křen V.	322, 325	Stejskal D.	329
Čejková A.	322	<u>Kubíčková</u> B.	329	Stiborová M.	323, 331, 332, 337
Černý J.	326	<u>Kuthan</u> M.	329	Strnad M.	321
		Kuzma M.	322, 325	Strnad H.	324
<u>Doležal</u> K.	321			Subramaniam V.	319
Dostál L.	327	Lapčík O.	324	Svatoš A.	321, 322
Dostálová S.	329	Lenobel R.	329	Svoboda J.	328
Dudová K.	321	<u>Lenobelová</u> H.	329		
<u>Dvořák</u> Z.	322	<u>Lepšík</u> M.	330	Šaman D.	336
Dvořák D.	325	Lescar J.	335	Šmarda J.	332
		Linhart I.	333	Šmardová J.	332
Fábry M.	335	<u>Liška</u> F.	330	<u>Špirochová</u> I.	335
Fialová A.	322	<u>Luxová</u> A.	331	Štouračová R.	335
<u>Fialová</u> P.	332				
Fojta M.	319	Macek T.	332	<u>Teplý</u> F.	336
Forman S.	333	Maňásková P.	327	Tichá M.	327
<u>Froněk</u> T.	323	<u>Martínek</u> V.	331	Tykva R.	333
		Masák J.	322		
<u>Gogová</u> K.	323	<u>Mikšanová</u> M.	332	Ulbrich K.	319, 335
		Moravcová J.	328	Ulbrich P.	324
Hampl R.	324	Morfin R.	324		
Hanuš J.	321	Müller P.	334	Vaněk T.	335
Havelková M.	325			Ventura K.	318
Havličková M.	318	<u>Nemajerová</u> A.	332	<u>Vévodová</u> J.	336
<u>Havlíková</u> H.	324	<u>Nešněrová</u> P.	332	Vlasáková V.	333
<u>Hejkalová</u> V.	324	<u>Novák</u> J.	333, 334	Vojtěšek B.	334
Herkomerová E.	325	<u>Novák</u> J.	334	<u>Vošmiková</u> H.	337
Hill M.	324				
<u>Hocek</u> M.	325	Oral I.	329	Weber J.	325
Hodek P.	323, 329	Oupický D.	335	Weignerová L.	322
Holeček J.	327			Wimmer Z.	328
Holý A.	325	Pačes V.	324		
Hořejší M.	335	Paleček E.	319, 334	<u>Zeman</u> M.	337
<u>Hradílek</u> M.	325	Paleček J.	319	Zima J.	321
Hunková Z.	322	Pechar M.	319	<u>Zuber</u> R.	337
Husák J.	334	<u>Peychl</u> J.	334		