

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

---

# **DROBNICOV MEMORIÁL**

## **13. ROČNÍK**

---

**Chata Trubárka, Trenčín - Kubrica**

**4. – 6. september 2024**



**Zborník príspevkov a program**

**Editori**

**Mária Balážová, Boris Lakatoš**



prof. Ing. Ľudovít DROBNICA, DrSc.

DROBNICOV MEMORIÁL

13. ročník

4. – 6. september 2024

Chata Trubárka, Trenčín - Kubrica

ISBN 978-80-974246-5-7

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

Vydal: Centrum biovied, Slovenská akadémia vied, Bratislava 2024

## **Spomienka na prof. Ing. Ľudovíta Drobnicu, DrSc.**

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



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

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

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

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

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

ORGANIZAČNÝ VÝBOR:

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

PRESEDA KOMISIE:

Mgr. Miroslav BALÁŽ, PhD.

ČLENOVIA KOMISIE:

Mgr. Mária BALAŽOVÁ, PhD.  
RNDr. Imrich BARÁK, DrSc.  
prof. Ing. Albert BREIER, DrSc.  
doc. Ing. Boris LAKATOŠ, PhD.  
doc. RNDr. Jan MALÍNSKÝ, PhD.  
prof. RNDr. Peter RAČAY, PhD.  
Ing. Zdena SULOVA, DrSc.  
RNDr. Dušan ŽITŇAN, DrSc.

## Obsah

<b>PROGRAM:</b> .....	9
<b>ZBORNÍK PRÍSPEVKOV</b> .....	13
<b>SPONZORI DROBNICOVHO MEMORIÁLU</b> .....	68



## PROGRAM:

### 1. Deň: 4. 9. 2024 (streda)

Registrácia účastníkov počas celého dňa (od 11:30)

12:30 – 14:00            **OBED (Lunch)**

14:00 – 14:45            Otvorenie + plenárna prednáška: **Miroslav Baláž: „Desať rokov výskumu hnedého tukového tkaniva človeka: kam sme sa posunuli?“**

### Súťaž mladých vedeckých pracovníkov

#### **Sekcia I    Xenobiotiká a vzťahy medzi štruktúrou a účinkom látok**

**Predseda:    Albert Breier, Zdenka Sulová**

15:00 – 15:15            **Martina Kšiňanová:** Vplyv izotiokyanátov na gény zapojené do regulačných dráh modulujúce expresiu a funkciu mucínov

15:15 – 15:30            **Jakub Strapec:** Účinky kvercetínu na srdce vystavené ischemicko-reperfúznemu poškodeniu u starnúcich potkanov

15:30 – 15:45            **Alberto Yoldi Vergara:** Phenetyl isothiocyanate inhibits viability and induces apoptosis in human leukemia cells

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

16:00 – 16:15            **Viktória Líšková:** Vplyv krátkodobej a dlhodobej expozície buniek HEK293 účinkom doxorubicínu na proteíny zapojené do autofágie

16:15 – 16:30            **Jana Špaldová:** Zosuquidar ako účinná molekula pre meranie intracelulárnych hladín vápnika v P-glykoproteín pozitívnych bunkách

**16:30 – 16:45 PRESTÁVKA NA KÁVU (Coffee break)**

#### **Sekcia I    Xenobiotiká a vzťahy medzi štruktúrou a účinkom látok**

(pokračovanie)

**Predseda:    Dušan Žitňan, Mária Balážová**

16:45 – 17:00            **Alžbeta Idunková:** Materská depresia a/alebo antidepresívum Mirtazapín mierne ovplyvňujú hipokampálnu excitabilitu potomstva

17:00 – 17:15            **Lucia Šofranková:** Vplyv fluorovaných 5-aminopyrazolov na bunkové procesy leukemických buniek

17:15 – 17:30            **Valeriia Husieva:** The role of extracellular vesicles in the development of resistance to hypomethylated agents

17:30 – 17:45            **Ľubomíra Takáčová:** Potenciálne liečivo v boji s myeloidnou leukémiou – kryptopleurín?

17:45 – 18:00 **Jaroslav Levík:** Testovanie hliníkových MOF nanočastíc na *ex ovo* modeli chorioalantoickej membrány embryí prepelice japonskej

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

## **2. Deň: 5. 9. 2024 (štvrtok)**

7:30 – 9:00 **RAŇAJKY (Breakfast)**

### **Súťaž mladých vedeckých pracovníkov**

#### **Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia**

**Predseda:** Imrich Barák, Mária Balážová

9:15 – 9:30 **Alžbeta Jančovičová:** Potlačenie expresie veľkých tumor-supresorových kináz vedie k zníženiu aktivity hnedých adipocytov

9:30 – 9:45 **Natália Pálešová:** Strata LATS kináz v hnedých tukových bunkách chráni myši pred rozvojom obezity a metabolických ochorení

9:45 – 10:00 **Ľuboš Hudák:** Vplyv inhibície mitochondriálnej proteázy LONP1 na odpoveď nezbalených bielkovín v mitochondriách a endoplazmatickom retikule v bunkách SH-SY5Y

10:00 – 10:15 **Lucia Štempelová:** Distribúcia baktérií na koži zdravých koní

10:15 – 10:30 **Jaroslava Gužíková:** Dôsledky inhibície enzymatickej aktivity synoviolínu na prežívanie a odozvu bunkových líní neuroblastómu, gioblastómu a astrocytov

10:30 – 10:45 **Maria Vittoria Cottini:** Identification of DNA G-quadruplex structures in Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*

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

#### **Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia (pokračovanie)**

**Predseda:** Jan Malínský, Peter Račay

11:00 – 11:15 **Lívia Karahutová:** Multirezistentné - biofilm tvoriace kmene rodu *Staphylococcus* izolované z bovinných mastitíd

11:15 – 11:30 **Emma Buchová:** Identification and expression of neuropeptides RYamides and FMRFamides and their receptors in the tick *Ixodes ricinus*

11:30 – 11:45 **Ivana Ďurišová:** Štúdium produkcie surfaktantu v krátkodobej a dlhodobej kultúre buniek A549 a ich odpoveď na zápal

11:45 – 12:00 **Rebecca Radič:** Vplyv manipulácie neurogenézy na variabilitu spevu dospelej pestúanky japonskej (*Lonchura striata domestica*)

12:00 – 12:15 **Vladimíra Hoďová:** Vzťah neurozápalu a neurogenézy u zebričky červenozobej

12:15 – 12:30 **Božena Omasta:** Targeting acetyl-CoA carboxylase: A strategy to inhibit lymphocytic choriomeningitis virus replication through lipid metabolism modulation

12:30 – 14:00 **OBED (Lunch)**

## **Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia** (pokračovanie)

**Predseda:** Boris Lakatoš, Miroslav Baláž

14:00 – 14:15 **Silvia Žarnovičanová:** Control of asymmetric septum positioning during sporulation in *Bacillus subtilis*

14:15 – 14:30 **Ingrid Zriniová:** Degradácia sfingolipidov a ich vplyv na mitochondriálnu respiráciu

14:30 – 14:45 **Katarína Benediková:** Mitochondrial metabolism of trypanosomatids

14:45 – 15:00 **Jana Komárová:** Štúdium exerkínov a extracelulárnych vezikúl z cirkulácie ako mediátorov protinádorového efektu cvičenia

15:00 – 15:15 **Lívia Petrisková:** Multi-omická analýza ako nástroj na odhalenie nových kandidátnych molekúl s potenciálom aktivovať tukové tkanivo

15:15 – 15:45 **Komerčná prezentácia**

15:45 - 16:00 **PRESTÁVKA NA KÁVU (Coffee break)**

## **Sekcia III Biotechnológia**

**Predseda:** Albert Breier, Zdenka Sulová

16:00 – 16:15 **Klaudia Žigová:** Fluorescenčné proteíny a ich aplikácia pri príprave rekombinantných štruktúr z koronavírusu

16:15 – 16:30 **Daniela Krajčiová:** Biotechnologický potenciál kvasinky *Rhodotorula toruloides* pre produkciu kyseliny punikovej pri použití technického glycerolu ako zdroja uhlíka

16:30 – 16:45 **Pavol Dobrovodský:** Xylanolytické enzýmy - enzýmy degradujúce lignocelulózové materiály

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

## **3. Deň: 6. 9. 2024 (piatok)**

7:30 – 9:00 **RAŇAJKY (Breakfast)**

9:30 – 10:30 **Zasadnutie poroty (Jury meeting)**

10:40 – 11:30 **Vyhlásenie výsledkov súťaže mladých vedeckých pracovníkov  
a ukončenie 13. ročníka Drobnicovho memoriálu**

11:30 – 13:00 **OBED (Lunch), Odchod (Departure)**

**ZBORNÍK PRÍSPEVKOV**  
**Prednášky**

## Plenárna prednáška

### Desať rokov výskumu hnedého tukového tkaniva človeka: kam sme sa posunuli?

Miroslav Baláž<sup>1</sup>, Natália Pálešová<sup>1</sup>, Alžbeta Jančovičová<sup>1</sup>, Lívia Petrisková<sup>1</sup>, Dominika Olešová<sup>1</sup>, Zuzana Kovaničová<sup>1</sup>, Adhiteb Ghosh<sup>2</sup>, Aleš Kvasnička<sup>3</sup>, Patrik Štefanička<sup>4,5</sup>, Miroslav Tedla<sup>5</sup>, Lukáš Varga<sup>5</sup>, Peter Makovický<sup>1</sup>, Dana Dobešová<sup>3</sup>, Jozef Ukropec<sup>1</sup>, David Friedecký<sup>3</sup>, Christian Wolfrum<sup>2</sup>, Lucia Balážová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika;*

<sup>2</sup> *Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zürich, Schwerzenbach, Švajčiarsko;*

<sup>3</sup> *Fakultná nemocnica Olomouc a Lekárska fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika;*

<sup>4</sup> *Nemocnica Bory, Bratislava, Slovenská republika;*

<sup>5</sup> *Lekárska fakulta a Univerzitná Nemocnica, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovenská republika*

Pohľad na tukové tkanivo sa za posledné desaťročia významne zmenil. Až donedávna bolo považované len za akúsi pasívnu zásobárňu lipidov, mechanickú a tepelnú izoláciu. Najmä vďaka objaveniu leptínu pred 30 rokmi dnes vieme, že tukové tkanivo je vysoko dynamický orgán, ktorý plní viacero dôležitých funkcií, vrátane produkcie hormónov ktoré kontrolujú našu chuť do jedla, regulácie metabolizmu lipidov a glukózy, či tvorby tepla. Okrem bielych tukových buniek ktorých primárnou úlohou je uskladňovať prebytočnú energiu v podobe tukových kvapôčok, sú v našom tele prítomné aj hnedé a béžové tukové bunky, ktoré uskladnenú energiu dokážu využívať na tvorbu tepla v procese známom ako netriašková termogenéza. Hnedé a béžové tukové bunky využívajú viacero nezávislých mechanizmov tvorby tepla. Tým najznámejším a najlepšie preskúmaným je odpojenie mitochondriálnej respirácie od tvorby ATP sprostredkované UCP1 proteínom. Práve charakterizácia Ucp1 deficientných myší odhalila existenciu ďalších „alternatívnych“ termogénnych mechanizmov. Keďže tvorba tepla je energeticky náročný proces, jeho aktivácia je považovaná za sľubnú stratégiu prevencie a liečby obezity a metabolických ochorení.

S cieľom identifikovať nové možnosti aktivácie termogenézy v tukových bunkách sme za posledných 10 rokov v spolupráci s klinickými partnermi vytvorili najväčšiu biobanku vzoriek ľudského hnedého a bieleho tukového tkaniva od viac ako 200 pacientov podstupujúcich chirurgický zákrok v oblasti krku, kde sa aktívne hnedé tukové tkanivo vyskytuje najčastejšie. Získané vzorky sme postupne podrobili podrobnej proteomickej, transkriptomickej, metabolomickej a lipidomickej analýze, vďaka čomu sme identifikovali nielen odlišne regulované proteíny, transkripty, metabolity a lipidy, ale aj nové populácie hnedých a béžových tukových buniek, a desiatky kandidátnych molekúl s potenciálom riadiť ich metabolickú aktivitu.

K tým najvýznamnejším kandidátnych molekulám patrí laktát, ktorý dosahuje výrazne vyššie koncentrácie v bielom ako v hnedom tukovom tkanive človeka, a jeho koncentrácie v krvi sa výrazne zvyšujú pri chlade. Naším cieľom preto bolo zistiť odkiaľ pochádza, kam smeruje a aká je jeho fyziologická úloha pri chlade. Pomocou genetických modelov myší (Ldhaf1/fl x Adip-CreERT2 a Ldhaf1/fl x Ucp1-CreERT2) sa nám podarilo zistiť, že laktát je pri chlade produkovaný najmä bielymi tukovými bunkami. Sledovali sme následne jeho osud v tele myší aklimatizovaných na chlad a zistili sme, že je vychytávaný predovšetkým pečeňou

a využívaný ako substrát pre glukoneogenézu. Keď zablokujeme produkciu laktátu v tukových bunkách pomocou vyradenia expresie laktát dehydrogenázy (Ldh $\alpha$ 1/fl x Adip-CreERT2), dochádza k zníženiu energetického výdaja a telesnej teploty u myši vystavených chladu, a rovnaké výsledky dosiahneme farmakologickou inhibíciou glukoneogenézy. Naše výsledky preto naznačujú, že laktát môže slúžiť ako mediátor medziorgánového substrátového cyklu, v ktorom biele tukové bunky produkujú laktát a ten následne pečeň premieňa späť na glukózu. Každé kolo tohto cyklu spotrebuje 4 molekuly ATP, ktorých energia je uvoľnená v podobe tepla. Identifikovali sme teda nový termogénny mechanizmus, ktorý prispieva k udržiavaniu teplotnej homeostázy pri chlade a má potenciál priniesť nové možnosti liečby obezity a metabolických ochorení.

**Podakovanie:** Táto práca vznikla s podporou grantov SASPRO2 1148/01/02, APVV-22-0291 a VEGA 2/0102/23.

## **Vplyv izotiokyanátov na gény zapojené do regulačných dráh modulujúce expresiu a funkciu mucínov**

Martina Kšiňanová<sup>1</sup>, Szilvia Kontár<sup>1</sup>, Anna Bertová<sup>1</sup>, Denisa Imrichová<sup>1,2</sup>, Albert Breier<sup>1,2</sup>, Zdena Sulová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika*

<sup>2</sup> *Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika*

Súčasný trend v diagnostike a liečbe hematologických malignít ale aj iných onkologických ochorení sa upriamuje na cieleňú terapiu s minimálnym zásahom do okolitého prostredia nádoru. Efektivita včasnej diagnostiky spočíva v identifikovaní biomarkerov karcinogenézy. Z tohto dôvodu sme sa v práci zamerali na mucíny, ktoré sa podieľajú na adhézii, imunitnej regulácii a chemorezistencii [1]. Podieľajú sa taktiež na transdukcii intracelulárnych signálov prostredníctvom interakcie s molekulami fyziologicky exprimovanými na bazolaterálnej membráne, ako sú receptorové tyrozínkinázy, čo môže mať za následok aktiváciu bunkových signálnych dráh vrátane PI3K/AKT, NF- $\kappa$ B resp. NRF2/KEAP. Úlohou spomenutých signálnych dráh je regulácia proliferácie, diferenciácie a aj prežívania pri normálnych aj patologických podmienkach [2].

V predloženej práci sme porovnávali vplyv dvoch prírodných izotiokyanátov (ITC) na expresiu vybraných mucínov, ako aj génov, u ktorých bolo popísané zapojenie do regulačných dráh modulujúcich ich expresiu a funkciu.

V experimentálnej časti sme použili dve parentálne ľudské leukemické bunkové línie SKM-1 a MOLM-13 a od nich odvodené rezistentné sublínie SKM/VCR a MOLM/VCR, v ktorých dochádza k nadmernej expresii P-glykoproteínu (P-gp) v cytoplazmatickej membráne, čo vedie je k fenotypu mnohonásobnej rezistencie. Koncentračný gradient benzylizotiokyanátu (BITC) a sulforafanu (SFN) na expresiu génu ABCB1 kódujúceho P-gp mal v bunkovej línii SKM/VCR inhibičný účinok u oboch použitých ITC. Na rozdiel od BITC, pri ktorom sme v prípade bunkovej línie MOLM/VCR nepozorovali výrazný efekt na expresiu génu ABCB1, prítomnosť SFN spôsobila výraznú indukciu tejto expresie. Ďalej sme sa zamerali na rodinu mucínov, ktorá zahŕňa niekoľko génov aberantne exprimovaných vo viacerých karcinómoch a sprostredkúva rôzne dráhy nevyhnutné pre onkogenézu v solídnych, aj v hematologických malignitách.

Výsledky preukázali, že BITC spôsobil výrazný pokles proteínových hladín skúmaných mucínov MUC1, MUC2 a MUC4, hoci na transkripčnej úrovni sa tento efekt výraznejšie prejavil len pre MUC1 v prípade bunkovej línie SKM/VCR. Expresia MUC2 vo všetkých bunkových líniiach na transkripčnej úrovni mala na rozdiel od proteínových hladín rastúci charakter. SFN pôsobil na MUC1 vo všetkých bunkových líniiach a na MUC4 v bunkách SKM/VCR inhibične, zatiaľ čo u MUC2 a MUC3A najmä v parentálnej bunkovej línii mal indukčný efekt. SFN výrazne inhiboval expresiu proteínu MUC4. Pri MUC1 vykazoval indukčný efekt v SKM-1 a silný inhibičný účinok v MOLM-13. Najvýraznejší indukčný efekt u MUC2 mal pri bunkovej línii MOLM/VCR. Analýza génov pre regulačné faktory modulujúce expresiu a funkciu mucínov odhalila inhibičný efekt BITC na všetky skúmané regulačné faktory. SFN výrazne ovplyvnil expresiu génov patriacich do NRF2/KEAP1 regulačnej dráhy a indukoval aj expresiu NF- $\kappa$ B/p65. Sledovanie zmien expresie transmembránového MUC4 na povrchu buniek SKM-1 v prítomnosti P-gp fenotypu, resp. vplyvom BITC (8 $\mu$ M) pomocou prietokovej cytometrie a konfokálnej mikroskopie nepriamou imunofluorescenciou nám



ukázalo zníženie intenzity expresie MUC4 na povrchu spomínaných buniek v porovnaní so senzitivnou bunkovou líniou SKM-1. Potenciál účinku sledovaných ITC závisí pravdepodobne od rozdielnej chemickej štruktúry zlúčenín – alifatická (SFN) vs. aromatická (BITC) a od modifikácie postranných reťazcov.

**Literatúra:**

[1] Sun L, Zhang Y, Li W, Zhang J, Zhang. (2023) Molecules. 28(20):7033.

[2] Supruniuk K., Radziejewska I. (2021). J. Oncol., 59(3), s. 68

**PodĎakovanie:** Práca vznikla s finančnou podporou grantov VEGA 2/0130/21, APVV-22-0383 a APD0122.

## **Účinky kvercetínu na srdce vystavené ischemicko-reperfúznemu poškodeniu u starnúcich potkanov**

Jakub Strapec<sup>1</sup>, Kristína Ferenczyová<sup>1,2</sup>, Lucia Kindernay<sup>1,2,3</sup>, Ulrika Duřová<sup>1</sup>, Ľubomíra Tóthová<sup>2</sup>, Monika Barteková<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Ústav pre výskum srdca, Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, Bratislava 841 04, Slovensko

<sup>2</sup> Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Sasinkova 4, Bratislava 811 08, Slovensko

<sup>3</sup> Fyziologický Ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Sasinkova 2, Bratislava 813 72, Slovensko

**Úvod:** Kvercetín (QCT) je prírodný flavonoid známy svojím pozitívnym vplyvom na kardiovaskulárny systém. Predchádzajúce štúdie preukázali jeho kardioprotektívne účinky pri ischemicko-reperfúznom (I/R) poškodení srdca u mladých zvierat. Vzhľadom na frekvenciu I/R poškodenia srdca u starších pacientov sme sa zamerali na skúmanie účinkov QCT na I/R poškodenie srdca u starnúcich 24-mesačných potkanov kmeňa Wistar.

**Metodiky:** QCT sme podávali počas 6 týždňov (20mg/kg/deň perorálne) a na týždennej báze sme zaznamenávali biometrické parametre experimentálnych zvierat. Po uplynutí doby 6 týždňov boli zvieratá uvedené do hlbokoj anestézie. Srdcia boli vyňaté, umiestnené na Langendorffovu aparáturu a následne boli vystavené 30 min ischemii/120 min. reperfúzii. Pomocou TTC farbenia sme stanovili veľkosť infarktového ložiska a počas prvých 40 minút reperfúzie sme sledovali obnovu funkčných parametrov srdca. Účinok QCT na molekulárne dráhy kardioprotekcie sme pozorovali pomocou metódy Western blotting, pričom sme sa zamerali na stanovenie expresie proteínov zapojených do RISK signálnej dráhy (Akt, PKC- $\epsilon$ , eNOS a GSK-3 $\beta$ ), antioxidantné enzýmy (SOD1 a SOD2) a markery apoptózy (Bax/Bcl-2). Tiež sme sledovali vplyv QCT na oxidačný status potkanov so zameraním na marker peroxidácie lipidov TBARS, marker oxidácie proteínov AOPP, marker antioxidantnej kapacity FRAP, marker úrovne glykozylácie proteínov fruktozamin a marker karbonylového stresu AGEs v krvnej plazme.

**Výsledky:** Naše výsledky preukázali, že chronická aplikácia QCT nepriniesla priaznivý kardioprotektívny účinok na obnovu funkcie srdca po ischemii, naopak, pozorovali sme trend zhoršenia obnovy funkčných parametrov srdca po ischemii vplyvom QCT. Signifikantne zvýšené hladiny parametrov FRAP a AOPP naznačujú pro-oxidačné pôsobenie QCT v starnúcom animálnom modeli. Zároveň sme však zaznamenali trend znižovania TBARS po podaní QCT, čo poukazuje na antioxidantné pôsobenie QCT. Podávanie QCT starnúcim jedincom významne znížilo expresiu PKC- $\epsilon$ , avšak neovplyvnilo expresiu ostatných proteínov zapojených do RISK signálnej dráhy a nemal vplyv ani na expresiu antioxidantných enzýmov SOD1 a SOD2. Avšak naše výsledky odhalili významný pokles pomeru Bax/Bcl-2, čo poukazuje na zníženie miery apoptózy u starších jedincov.

**Záver:** Na základe našich zistení QCT nevykazuje kardioprotektívny potenciál na I/R poškodenie srdca u starnúcich jedincov. Tento fakt pripisujeme nedostatočnej aktivácii RISK signálnej dráhy a obmedzenému antioxidantnému potenciálu. Aj napriek jeho prejavujúcej sa schopnosti pôsobiť anti-apoptoticky sa jeho využitie vo vyššom veku javí ako menej efektívne než u mladých jedincov.

**Kľúčové slová:** kvercetín, srdce, I/R poškodenie, starnutie

**Podakovanie:** Výskum bol podporený grantmi: APVV-21-0194, VEGA 2/0104/20 a VEGA 2/0159/24.

## **Phenethyl isothiocyanate inhibits viability and induces apoptosis in human leukemia cells**

Yoldi Vergara Alberto<sup>1</sup>, Imrichová Denisa<sup>1,2</sup>, Bertová Anna<sup>1</sup>, Kontár Szilvia<sup>1</sup>, Sulová Zdena<sup>1</sup>, Breier Albert<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Molecular Physiology and Genetics, Centre of Biosciences, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia*

<sup>2</sup> *Institute of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Slovakia*

Oncological diseases remain one of the leading causes of death in the world and despite advances in treatment with chemically synthesized drugs, overall patient survival has not been significantly improved in recent decades. Phytochemicals, natural compounds found in plants, are an important resource for the development of new anticancer drugs due to their effect on molecular pathways associated with cancer growth and progression. Phenethyl isothiocyanate (PEITC), a compound found in plants from the family *Brassicaceae*, belongs to the isothiocyanate group of organosulfur compounds. PEITC exerts its anticancer effects by modulating key signalling pathways such as induction of apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of angiogenesis, and enhancement of the effect of other antiproliferative agents. These signalling pathways also include the PI3K/Akt phosphorylation pathway, which is dysregulated in 30-50% of different types of human tumours and is the subject of this study.

The experimental part focused on investigating the cytotoxic effect of PEITC on two human leukemic cell lines, SKM-1 and MOLM-13, as well as on their sublines with a P-gp positive phenotype, SKM/VCR and MOLM/VCR. We monitored the inhibitory effect of PEITC on their viability and metabolic activity. The results confirmed that PEITC inhibited cell growth in a concentration-dependent manner. PEITC effectively suppressed the metabolic activity of all tested lines, however, sublines with a P-gp positive phenotype showed a lower sensitivity to its effects. PEITC efficiently induced apoptotic cell death, with the P-gp phenotype conferring greater resistance to apoptosis in the SKM/VCR and MOLM/VCR sublines. PI3K pathway regulates diverse cellular processes, including metabolism, survival, proliferation, apoptosis, growth. We confirmed the ability of PEITC to modulate the expression of specific factors of PI3K/AKT pathway, Akt1 and PI3KAC, which probably explains its cytotoxic effect on the investigated cell lines. The observed reduction in the activity of the PI3K/AKT regulatory pathway was associated with the inhibition of the expression of the gene coding nuclear receptor PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor gamma) and RXR (Retinoid X Receptor) in all tested cell lines except MOLM/VCR. Their reduced expression has been described in some types of tumour cells to lead to a decrease in Akt1 activity and affect the proliferation and survival of cancer cells.

**Acknowledgement:** This project was supported by VEGA 2/0130/21 grant and APVV-22-0383 grant.

## **Protirakovinové účinky fingolimodu na bunky akútnej myeloidnej leukémie**

Pavol Štefík, Denisa Nechajová, Kamila Ďurišová, Boris Lakatoš

*Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37, Bratislava, Slovensko*

Sfingolipidy patria medzi hlavné typy komplexných lipidov, ktoré sú prítomné v eukaryotických bunkách. Výskum v posledných rokoch preukázal, že sfingolipidy plnia okrem štruktúrnej funkcie aj úlohu tzv. bioaktívnych lipidov, tzn. že slúžia ako signálne molekuly alebo mediátory bunkovej signalizácie [1]. Je známe, že sa sfingolipidy podieľajú na regulácii mnohých bunkových procesov, akými sú napríklad adhézia, migrácia, proliferácia, starnutie, smrť alebo diferenciácia [1,2]. U rôznych typov malígnych buniek bola pozorovaná dysregulácia metabolizmu sfingolipidov alebo sfingolipidmi sprostredkovanvej bunkovej signalizácie, ktorá súvisí s nekontrolovateľnou proliferáciou nádorových buniek, tvorbou metastáz, rezistenciou neoplastických buniek voči chemoterapeutikám, potláčaním imunitných odpovedí alebo nádorovými bunkami indukovanou angiogenezou [1–3]. Z tohto dôvodu predstavuje perspektívnu oblasť výskumu zameraného na liečbu onkologických ochorení vývoj liečiv, ktoré ovplyvňujú metabolizmus sfingolipidov alebo sfingolipidmi sprostredkovanú signalizáciu [4].

Fingolimod (známy aj ako FTY720) je po chemickej stránke syntetický analóg prirodzene sa vyskytujúcej sfingoidnej bázy – sfingozínu. V klinickej praxi je využívaný ako imunosupresívum na liečbu relaps remitujúcej formy sclerosis multiplex [5]. Okrem toho sa fingolimod skúma ako potenciálna antineoplastická látka [6], keďže je schopný ovplyvňovať metabolizmus alebo signálne dráhy nádorových buniek. Tento účinok fingolimodu je podmienený jeho pôsobením na rôzne intracelulárne ciele alebo receptory pre sfingozín-1-fosfát, ktoré patria do rodiny receptorov spriahnutých s G-proteínmi [3,4].

V rámci práce bol testovaný účinok fingolimodu na bunky akútnej myeloidnej leukémie SKM-1 a MOLM-13 a ich sublínií SKM-1/VCR a MOLM-13/VCR, ktoré boli získané selekčným tlakom vinkristínu a vykazujú fenotyp viaccliekovej rezistencie v dôsledku expsie P glykoproteínu [7]. Najväčšia pozornosť bola venovaná vplyvu fingolimodu na viabilitu buniek, bunkový cyklus a zmeny vo fenotype viaccliekovej rezistencie, vrátane objasnenia ich mechanizmov, nakoľko ide o procesy priamo súvisiace s potenciálom fingolimodu ako antineoplastickej látky. Naše výsledky poukazujú na schopnosť fingolimodu indukovať apoptózu leukemických buniek, ktorá je regulovaná prostredníctvom aktivity JNK, p38/MAPK a lyzozomálnych proteáz a je sprevádzaná zvýšenou tvorbou reaktívnych foriem kyslíka, poklesom mitochondriálneho membránového potenciálu a prechodným zvýšením intracelulárnej koncentrácie vápnika. Ďalej sme dokázali, že fingolimod zastavuje bunkový

cyklus v G0/G1 fáze, avšak tento jav nesúvisí s diferenciáciou leukemických buniek. Napriek tomu, že vplyv fingolimodu na aktivitu P-glykoproteínu bol zanedbateľný, naše výsledky poukazujú na vynikajúce vlastnosti fingolimodu, ktoré môžu byť využité pri liečbe akútnej myeloidnej leukémie.

**Literatúra:**

- [1] Hannun, Y. A; Obeid, L. M. Nat Rev Mol Cell Biol 2018, 19, 175-191.
- [2] Ogretmen, B. Nat Rev Cancer 2018, 18, 33-50.
- [3] Wang, P. et al. Cancer Cell Int 2019, 19, 295.
- [4] Companioni, O. et al. Front Oncol 2021, 11, 745092.
- [5] Brinkmann, V. et al. Nat Rev Drug Discov 2010, 9, 883-897.
- [6] Singh, S. K.; Spiegel, S. Adv Biol Regul 2022, 75, 100670.
- [7] Imrichova, D. et al. Eur J Pharm Sci 2015, 77, 29-39.

**Podakovanie:** Táto práca bola podporená grantmi APVV-19-0094, VEGA 2/0030/23, VEGA 2/0016/22, VEGA 2/0046/24 a grantom v rámci Programu na podporu mladých výskumníkov udeľovaným STU v Bratislave.

## **Vplyv krátkodobej a dlhodobej expozície buniek HEK293 účinkom doxorubicínu na proteíny zapojené do autofágie**

Líšková Viktória<sup>1</sup>, Barančík Miroslav<sup>1</sup>, Svetláková Barbora<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Ústav pre výskum srdca, Centrum experimentálnej medicíny SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava*

**Úvod:** Doxorubicín (DOX) je protirakovinové liečivo s toxickými účinkami na normálne bunky. V cytotoxicite vyvolanej pôsobením DOX má dôležitú úlohu zvýšená produkcia reaktívnych foriem kyslíka (RFK) a oxidačný stres. Zvýšená produkcia RFK môže tiež indukovať autofágiu, proces ktorý má dôležitú úlohu pri udržiavaní normálnej bunkovej homeostázy prostredníctvom degradácie makromolekúl. Autofágia môže mať dvojitú úlohu v bunkových odpovediach na patologické stavy. Môže predstavovať prospešnú adaptívnu reakciu na stres, ale môže tiež viesť k maladaptívnym reakciám, ktoré sú spojené s patogenézou ochorenia a indukciou bunkovej smrti. Zistilo sa, že nadmerná autofágia môže viesť k bunkovej smrti. Niekoľko proteínov, ako napríklad Beclin-1, p62 a Atg, majú zásadnú úlohu pri regulácii tvorby autofagozómov a správnom fungovaní autofágie. Dôležitú úlohu v bunkových reakciách na stresové podnety zohrávajú aj proteíny tepelného šoku (HSP). Tie sa aktivujú v reakcii na stresové podmienky a môžu slúžiť aj ako ko-chaperóny pri autofágii sprostredkovanej chaperónmi.

**Cieľ:** Skúmať vplyv krátkodobej a dlhodobej expozície buniek HEK293 účinkom DOX na proteíny priamo zapojené do regulácie autofágie a proteínov tepelného šoku.

**Metódy:** V štúdiách boli použité ľudské embryonálne obličkové bunky HEK293. Bunky boli vystavené účinkom DOX počas 3 hodín, 6 hodín a 21 hodín. Vzorky proteínov získané po lýze buniek sa použili na stanovenie hladín špecifických proteínov pomocou Western blot analýzy.

**Výsledky:** Zistili sme, že DOX indukoval časovo závislé zmeny hladín proteínov študovaných markerov autofágie. Predĺžená expozícia buniek HEK293 účinkom DOX bola spojená s významnou nadreguláciou všetkých študovaných markerov autofágie (Atg5, Atg12 a Beclin-1). Krátkodobá expozícia buniek DOX viedla k rozdielnej modulácii jednotlivých markerov autofágie. Vplyvom DOX dochádzalo tiež k rozdielnej a časovo závislej modulácii proteínových hladín HSP.

**Podakovanie:** Podporené grantmi VEGA 2/0169/24 a APVV-18-0548.

## **Zosuquidar ako účinná molekula pre meranie intracelulárnych hladín vápnika v P-glykoproteín pozitívnych bunkách**

Špaldová Jana<sup>1</sup>, Šofranková Lucia<sup>1</sup>, Pelegrinová Lívia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ústav biochémie a mikrobiológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

<sup>2</sup> Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko

Vápniková homeostáza hrá kľúčovú úlohu v udržiavaní normálnych bunkových funkcií, vrátane regulácie bunkového cyklu, apoptózy, expresie génov, posttranslačnej modifikácie, chemotaxie, regulácie svalovej kontrakcie, regulácie uvoľňovania neurotransmiterov alebo inzulínu. Narúšanie tejto rovnováhy spojené so zmenami v expresii vápnikových kanálov a transportérov, ako aj v signálnych dráhach závislých na vápniku, je často spojené s patogenézou malignít, kde zmenené hladiny intracelulárneho vápnika môžu podporovať proliferáciu nádorových buniek, zvyšovať ich invazívny potenciál a znižovať ich citlivosť na apoptózu. Rozvoj viaccliekovej rezistencie v neoplastických bunkách je úzko spojený so schopnosťou buniek uniknúť programovanej bunkovej smrti, pričom dysregulácia hladín intracelulárneho vápnika hrá kľúčovú úlohu v tomto procese (1). Jednou z hlavných príčin rezistencie je tiež nadmerná expresia P-glykoproteínu (P-gp). Tento transportér môže aktívne odstraňovať intracelulárne indikátory vápnika (napr. Fluo-3/AM alebo Fura-2/AM), čo sťažuje monitorovanie hladín vápnika (2).

V tejto práci sme stanovili účinok inhibítorov P-gp tretej generácie, Zosuquidaru (ZSQ) a Tariquidaru (TQR). Medzi mechanizmom účinku ZSQ a TQR existujú zásadné rozdiely. TQR sa považuje za vysoko špecifický, nekompetitívny inhibítor P-gp. Jeho účinok môže byť odvodený buď z inhibície väzby substrátu (v dôsledku oklúzie väzobného miesta), blokovania hydrolýzy ATP (v dôsledku zastavenia reakčného cyklu P-gp), alebo z kombinácie oboch (3). Naproti tomu ZSQ ako kompetitívny inhibítor P-gp priamo obsadzuje oblasť viazania substrátu a zabraňuje aktívnemu transportu (4). Charakter kompetitívnej inhibície znamená, že zvýšená koncentrácia liečiva voči substrátu znižuje väzbu ZSQ. Pri experimentoch sme použili oba inhibítory P-gp na detekciu hladín cytosolického vápnika v P-gp pozitívnych leukemických bunkách (R, T, SKM-1/vcr a MOLM-13/vcr) a získané výsledky sa porovnali s výsledkami parentálnych línií, ktoré neexprimujú P-gp (S, SKM-1 a MOLM-13).

Taktiež sme evaluovali vplyv inhibítorov na životaschopnosť buniek, expresiu génu kódujúceho ABCB1, schopnosť inhibítorov inhibovať transportnú aktivitu P-gp v koncentráciách 250 - 500 nM. Vyvinuli sme spoľahlivý postup na meranie intracelulárnej hladiny vápnika pomocou fluorescenčnej prietokovej cytometrie, ktorý umožňuje stabilné zadržiavanie Fluo-3 v bunkách s funkčnou efluxnou pumpou P-gp (5).

### **Literatúra:**

- [1] Bittremieux, M.; Parys, J.B.; Pinton, P.; Bultynck, G. ER Functions of Oncogenes and Tumor Suppressors: Modulators of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2016, 1863, 1364–137
- [2] Romito, O.; Guéguinou, M.; Raoul, W.; Champion, O.; Robert, A.; Trebak, M.; Goupille, C.; Potier-Cartreau, M. Calcium Signaling: A Therapeutic Target to Overcome Resistance to Therapies in Cancer. *Cell Calcium* 2022, 108, 102673
- [3] Fox, E.; Bates, S.E. Tariquidar (XR9576): A P-Glycoprotein Drug Efflux Pump Inhibitor. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2007, 7, 447–459

- [4] Alam, A.; Kowal, J.; Broude, E.; Roninson, I.; Locher, K.P. Structural Insight into Substrate and Inhibitor Discrimination by Human P-Glycoprotein. *Science* 2019, 363, 753–756
- [5] Pelegrinova, L.; Sofrankova, L.; Spaldova, J.; Stefik, P.; Sulova, Z.; Breier, A.; Elefantova, K. Zosuquidar: An Effective Molecule for Intracellular Ca<sup>2+</sup> Measurement in P-gp Positive Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 3107

**PodĎakovanie:** Práca bola podporená z grantov APVV-19-0093 a APVV-19-0094, VEGA 2/0171/21 a VEGA 2/0030/23 a z internému grantu STU v Bratislave na podporu mladých výskumníkov.



## **Materská depresia a/alebo antidepresívum Mirtazapín mierne ovplyvňujú hipokampálnu excitabilitu potomstva**

Idunková Alžbeta<sup>1</sup>, Dubiel-Hoppanová Lucia<sup>1</sup>, Ondáčová Katarína<sup>1</sup>, Tomko Matúš<sup>1</sup>, Jurkovičová-Tarabová Bohumila<sup>1</sup>, Bukatová Stanislava<sup>2</sup>, Dubovický Michal<sup>2</sup>, Lacinová Ľubica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko*

<sup>2</sup> *Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie, Centrum experimentálnej medicíny Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 84005 Bratislava, Slovensko*

Materská depresia predstavuje významné riziko pre vývoj plodu aj dieťaťa. Liečba depresie antidepresívami počas tehotenstva síce môže toto riziko zmierniť, ale zároveň môže ovplyvňovať aj vývoj potomka. Cieľom našej práce je preskúmať vplyv depresie matky a/alebo prenatálnej liečby antidepresívami na neuronálnu excitabilitu potomkov.

Použili sme zavedený zvierací model depresie vyvolanej trojtýždňovým chronickým nepredvídateľným stresom. Experimentálnymi zvieratami boli samice potkana kmeňa Wistar. Ako vybrané antidepresívum slúžil mirtazapín aplikovaný od 10. gestačného dňa. Vytvorili sme štyri experimentálne skupiny: bez stresu s vehikulom, stres s vehikulom, bez stresu s mirtazapínom a stres s mirtazapínom. Excitabilitu sme analyzovali v primárnych hipokampálnych kultúrach a v akútnych rezoch. Primárne hipokampálne kultúry boli pripravené z mozgov mláďat v deň ich narodenia (P0). Akútne hipokampálne rezy sme získali medzi 11. a 13. postnatálnym dňom (P11 – P13). Na meranie excitability sme použili metódu patch clamp v konfigurácii "z celej bunky".

Sledovali sme pasívne membránové parametre, parametre súvisiace s generovaním akčných potenciálov (AP), sérií AP a spontánnu aktivitu. V primárnych kultúrach mal stres štatisticky významný hyperpolarizačný vplyv na pokojový membránový potenciál a tento účinok sa liečbou s mirtazapínom nezmiernil. Vstupný odpor sa medzi experimentálnymi skupinami významne nelíšil. V akútnych hipokampálnych rezoch stres ani mirtazapín neovplyvnili pasívne membránové parametre. V akútnych rezoch aj kultúrach samotný stres alebo v kombinácii s mirtazapínom vyvolal štatisticky významné zmeny v časti parametrov jednotlivých AP a sérií AP. Stres významne zvýšil prah generovania AP v primárnych kultúrach, ale znížil ho v hipokampálnych rezoch. V primárnych kultúrach, ale nie v rezoch, bola táto zmena kompenzovaná mirtazapínom. Kým v primárnych kultúrach stres a/alebo mirtazapín zvyšovali niektoré a znižovali iné parametre excitability, v rezoch výrazne prevažovalo zvýšenie excitability. Spontánnu aktivitu sme merali iba v akútnych rezoch. Nezaznamenali sme žiadne zmeny v priemernom počte AP v hipokampálnych neurónoch, ani vo frekvencii ich generovania, avšak stres zvýšil percento neurónov vykazujúcich spontánnu aktivitu.

Celkovo sme pozorovali viaceré mierne zmeny v elektrickej aktivite hipokampálnych neurónov potomstva vo včasnom postnatálnom období spôsobené pregestačným stresom matky. Tieto zmeny neboli dostatočne kompenzované mirtazapínom. Samotný mirtazapín tiež mierne ovplyvnil neuronálnu aktivitu potomkov.

**PodĎakovanie:** Táto práca bola podporená grantami: APVV-19-0435 a DoktoGrant APP0534

## **Vplyv fluorovaných 5-aminopyrazolov na bunkové procesy leukemických buniek**

Šofranková Lucia<sup>1</sup>, Špaldová Jana<sup>1</sup>, Breier Albert<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Ústav biochémie a mikrobiológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko*

<sup>2</sup> *Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko*

Onkologické ochorenia sa vyznačujú nekontrolovaným rastom abnormálnych buniek. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie boli malígne ochorenia zodpovedné v roku 2020 za približne 10 miliónov úmrtí na celom svete (1). V neoplastických bunkách dochádza k významným zmenám v signálnych dráhach. Tieto zmeny ovplyvňujú rôzne funkcie buniek, od rastu a množenia po programovanú bunkovú smrť, inváziu a tvorbu metastáz. Existuje tesná vzájomná interakcia medzi metabolickými a signálnymi dráhami, ktorá zabezpečuje potreby neoplastických buniek nevyhnutné pre ich nekontrolovaný rast a odolnosť voči programovanej bunkovej smrti (2).

Leukémia je relatívne vzácny druh malignity krvi, pri ktorej biele krvinky nekontrolovateľne proliferaujú, pričom vytlačujú zdravé krv tvoriace elementy kostnej drene. U detí predstavuje najčastejší druh malignity a tvorí 25,4 % (3). Predpokladá sa, že za vznik leukémie môže poškodenie buniek v dôsledku žiarenia, chemoterapie, vystavenia určitým chemickým látkam, vírusom, ale aj niektorých genetických predpokladov, ako napríklad Downov syndróm či Li-Fraumeni syndróm. Riziko vzniku leukémie sa zvyšuje v prípade výskytu malignít v rodinnej anamnéze (4).

Pri riešení aktuálnej situácie spojenjej s onkologickými ochoreniami sa stala významným problémom viaclieková rezistencia. Viaclieková rezistencia (MDR) sa definuje ako odolnosť neoplastických buniek voči štruktúrne odlišným chemoterapeutickým látkam s rôznym mechanizmom účinku. Zníženie koncentrácie liečiva v bunke a jeho zvýšený export, spôsobený bunkovými transportérmi, prispievajú k neúspechu chemoterapie. Za tento export sú najčastejšie zodpovedné transportéry z rodiny ABC, pričom kľúčovým z nich je P-glykoproteín (P-gp). Skúmanie potenciálnych inhibítorov P-gp je preto významným faktorom pri riešení otázok týkajúcich sa chemorezistencie a liečby malignít (5)

Neustále sa hľadajú zlúčeniny, či už prírodného alebo syntetického pôvodu, ktoré by boli schopné prekonať MDR. Heterocyklické zlúčeniny priťahujú pozornosť pre svoju širokú škálu aplikácií, najmä pre svoje biologické aktivity a význam vo farmaceutickom priemysle. Sú prítomné v mnohých prírodných látkach, ako sú vitamíny, hormóny, antibiotiká a farbivá. Do triedy aromatických heterocyklov obsahujúcich dusík patria 5-aminopyrazoly, ktoré si v poslednom čase získali širokú pozornosť a dôležité postavenie nie len vďaka svojim biologickým a medicínskym vlastnostiam, ale aj vďaka syntetickej univerzálnosti. Práve vďaka svojej flexibilnej povahe a prítomnosti -NH<sub>2</sub> funkčnej skupiny ponúkajú významný syntetický potenciál na navrhovanie rozmanitých nových zlúčenín, ktorých biologický potenciál je nutné preskúmať (6).

V tejto práci nadväzujeme na prácu z roku 2023. Cieľom tejto časti výskumu bolo študovať vplyv fluorovaných 5-aminopyrazolov na tvorbu reaktívnych foriem kyslíka, zmeny

intracelulárnych hladín vápnika, a tiež na expresiu vybraných génov a proteínov v rôznych bunkových líniiach. Ako modelové organizmy sme použili bunky myšacej akútnej lymfoblastovej leukémie L1210, ako aj bunky ľudskej akútnej myeloidnej leukémie SKM-1 a MOLM-13. Okrem pôvodných (parentálnych) línii sme zahrnuli aj varianty exprimujúce P-gp, konkrétne vinkristínom selektované sublínie SKM-1/vcr, MOLM-13/vcr a R (L1210). Pracovali sme tiež so sublíniou T, ktorá vznikla transfekciou línie L1210 a exprimuje ľudský P-gp.

#### **Literatúra:**

- [1] Cancer [online]. [Citované 12. 8. 2024]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [2] Vaghari-Tabari et al. Signaling, Metabolism, and Cancer: An Important Relationship for Therapeutic Intervention. *Journal of cellular physiology*, 2021, 236(8), 5512–5532.
- [3] Childhood Leukemia — Cancer Stat Facts [online]. [Citované 13. 08. 2024]. Dostupné z: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/childleuk.html>.
- [4] Sabath, D. E. Leukemia. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*; Elsevier Inc., 2013; pp. 226–227.
- [5] Suo, X. et al. P-Glycoprotein-Targeted Photothermal Therapy of Drug-Resistant Cancer Cells Using Antibody-Conjugated Carbon Nanotubes. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2018, 10(39), 33464–33473.
- [6] Shaabani, A. 5-Amino-Pyrazoles: Potent Reagents in Organic and Medicinal Synthesis. *Molecular Diversity* 2018 23:3, 2018, 23(3), 751–807.

**Pod'akovanie:** Táto práca vznikla s podporou projektov: VEGA 2/0030/23, VEGA 2/0016/22, VEGA 2/0046/24 APVV-19-0093, APVV-19-0094, APVV-20-0129, Grant STU pre podporu mladých vedeckých pracovníkov Šofranková 2024.

## **The role of extracellular vesicles in the development of resistance to hypomethylated agents**

Valeriia Husieva<sup>1</sup>, Kristína Šimoničová<sup>1</sup>, Helena Kavcová<sup>1</sup>, Zuzana Kozovská<sup>3</sup>, Andreas Nicodemou<sup>4</sup>, Albert Breier<sup>1,2</sup>, Lucia Messingerová<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Molecular Physiology and Genetics, Centre of Biosciences, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia*

<sup>2</sup> *Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Biochemistry and Microbiology, Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava, Slovakia*

<sup>3</sup> *Cancer Research Institute, Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia*

<sup>4</sup> *Faculty of Medicine, Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Comenius University in Bratislava, Bratislava, Slovakia*

The resistance to hypomethylating agents (5-azacytidine, 5-aza-2'-deoxycytidine) in AML is a significant clinical challenge, as these agents are commonly used in the treatment of older patients and those unfit for intensive chemotherapy [1]. However, the mechanisms underlying resistance to HMAs are complex and multifactorial, with recent evidence suggesting that EVs play a role in this process. In recent years, more emphasis has been placed on the role of extracellular vesicles (EVs) in the horizontal transfer of drug resistance in cancer [2]. These small, membrane-bound particles, secreted by all cell types, facilitate cell-to-cell communication by transporting a variety of molecular cargo, including DNA, RNA, proteins, lipids, and metabolites, which are transferred to other cells. They are increasingly recognized as regulators of anti-cancer drug resistance, altering interactions within the tumor microenvironment (TME) [3]. Moreover, EVs are emerging as potential biomarkers for therapy monitoring and prognostic assessment due to their presence in biofluids of cancer patients. They also hold promise as targeted drug delivery vehicles to circumvent drug resistance mechanisms [4].

The aim of this work is to investigate the role of EVs in the development of resistance to hypomethylating agents. Understanding the mechanisms by which EVs influence HMA resistance could pave the way for novel strategies to overcome resistance and enhance the efficacy of AML treatments.

As an experimental model in this study, we used the human acute myeloid leukemia cell line SKM-1, from which 5-azacytidine (AZA)-resistant and 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC)-resistant cell sublines were established in our laboratory by long-term cultivation in the presence of AZA and DAC, respectively. In the first part of this work, we focused on the comparison of different methods for the isolation of extracellular vesicles, comparing the isolation of EVs using 1. the commercially available Total Exosome Isolation Reagent, 2. PEG (polyethylene glycol), 3. Amicon (MERCK), and 4. exoEASY kit (QIAGEN). A nanoparticle size analyzer was used to assess the size and number of isolated EVs, phenotypic characterization of isolated particles was performed using MACSPlex, and Western Blot analysis was used to monitor selected EV markers. Subsequently, we focused on monitoring the impact of EVs from resistant cells on the viability of the sensitive cell line SKM-1 using three different culture methods: culture using inserts, culture in conditioned medium, and culture with the addition of isolated EVs. The viability of SKM-1 cells after 72 hours of culture with different concentrations of AZA and DAC was determined as a percentage of the viability of control cells using the CellTiter 96® Aqueous one solution cell proliferation assay (MTS assay). Based on the preliminary data obtained, it is evident that the selection of appropriate methods for the

isolation of EVs is critical for their subsequent applications. The use of Amicon filters has been shown to yield a sufficient quantity of EVs that are appropriate for downstream analytical procedures. However, it is important to note that Amicon filters are not sterile, rendering the isolated EVs unsuitable for use in cell culture experiments. In contrast, preliminary results indicate that the Total Exosome Isolation Reagent kit offers a more suitable approach for isolating EVs intended for use in cultivation experiments.

**References:**

- [1] Šimoničová K, Janotka L, Kavcová H, Sulová Z, Breier A, Messingerova L. Different mechanisms of drug resistance to hypomethylating agents in the treatment of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. Vol. 61, Drug Resistance Updates. Churchill Livingstone; 2022.
- [2] Xavier CPR, Belisario DC, Rebelo R, Assaraf YG, Giovannetti E, Kopecka J, et al. The role of extracellular vesicles in the transfer of drug resistance competences to cancer cells. Vol. 62, Drug Resistance Updates. Churchill Livingstone; 2022.
- [3] Cheng HY, Su GL, Wu YX, Chen G, Yu ZL. Extracellular vesicles in anti-tumor drug resistance: Mechanisms and therapeutic prospects. Vol. 14, Journal of Pharmaceutical Analysis. Xi'an Jiaotong University; 2024.
- [4] Yang Q, Xu J, Gu J, Shi H, Zhang J, Zhang J, et al. Extracellular Vesicles in Cancer Drug Resistance: Roles, Mechanisms, and Implications. Vol. 9, Advanced Science. John Wiley and Sons Inc; 2022.

**Acknowledgments:** Valeriia Husieva is funded by the EU NextGenerationEU through the Recovery and Resilience Plan for Slovakia under project No. 09I03-03-V02-00020. This research was funded by the Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (VEGA2/0016/22).

## **Potenciálne liečivo v boji s myeloidnou leukémiou – kryptopleurín?**

Ľubomíra Takáčová, Lucia Šofranková a Jana Špaldová

*Ústav biochémie a mikrobiológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika*

Leukémia je zhubné ochorenie, postihujúce deti a dospelých, ku ktorému dochádza pri chybe v regulačných procesov v krvotvorných bunkách. Následkom tejto poruchy je ich nesprávna diferenciácia a nekontrolovateľná proliferácia. Hoci stále úplne nerozumieme rozvoju tohto ochorenia, predpokladá sa, že pochádza z onkogénnej transformácie hematopoetických kmeňových buniek alebo progenitorov, ktoré znovu získali vlastnosti podobné kmeňovým bunkám. Klinické štúdie sa viac a viac zameriavajú na aplikáciu personalizovanej terapie pre pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (AML) a identifikáciou molekulárnych cieľov so špecifickými rizikovými faktormi. V súčasnosti sa odborné tímy taktiež snažia hľadať a vyvíjať nové stratégie a terapeutiká v boji s AML [1], [2]. Kryptopleurín upútal pozornosť svojimi potenciálnymi terapeutickými účinkami na neoplastické bunky, vrátane buniek s rozvinutou viacliekovou rezistenciou (MDR). Tento prírodný fenantrochinolizidínový alkaloid sa primárne nachádza v rodinách rastlín *Asclepiadaceae* a *Moracea* [3]. Presný mechanizmus účinku kryptopleurínu nie je doposiaľ pochopený, ale predpokladá sa, že pôsobí inhibične na syntézu proteínov, taktiež inhibuje HIF-1, tymidylátsyntázy a dihydrofolát reduktázy. V súvislosti s kryptopleurínom bol popísaný aj útlm signálnych dráh, ako napr. NF- $\kappa$ B, ako aj regulačných proteínov bunkového cyklu [3], [4], [5].

Pri našich experimentoch sme použili bunkový model AML a to ľudské bunkové línie SKM-1 a MOLM-13 a ich dcérske sublínie SKM- 1/VCR a MOLM-13/VCR, ktoré sú rezistentné voči chemoterapeutiku vinkristín. Bunky boli kultivované v prítomnosti kryptopleurínu v rozpätí koncentrácií od 0,25 do 2,5 ng/ml počas 24 a 48 hodín. Práci sme sa venovali stanoveniu typu bunkovej smrti pomocou prietokového cytometra s použitím fluorescenčných sond Annexin-V a propídium jodidu. Na overenie typu bunkovej smrti sme izolovali DNA, (pozorovali sme vznik typických apoptotických rebríkov) a stanovovali sme aj aktivitu kaspáz pomocou kaspázového kit-u. Prostredníctvom prietokovej cytometrie sme sledovali zmenu aktivity P-glykoproteínu pomocou fluorescenčnej sondy Kalceín AM a zmeny v pomere buniek v jednotlivých fázach bunkového cyklu značením pomocou propídium jodidu. Na záver sme sa v práci venovali sledovaniu expresie vybraných génov s využitím RT-PCR reakcie.

Pri stanovení bunkovej smrti prietokovou cytometriou sa ukázalo, že väčšina bunkovej populácie podliehala apoptóze alebo nekróze. Výrazný pokles životaschopnosti buniek sme zistili s rastúcim časom kultivácie a aj s rastúcou koncentráciou kryptopleurínu. Vplyvom kryptopleurínu sme pozorovali aj jeden z biochemických znakov apoptózy a to fragmentáciu

vyizolovanej DNA. Pomocou súpravy na stanovenie aktivity kaspáz sa nám podarilo zistiť, že v bunkách ovplyvnených kryptopleurínom došlo po 24 hodinovej kultivácii k zvýšeniu aktivity kaspáz-3/7 a kaspáz-8 v závislosti od koncentrácie. Pri RT-PCR reakciách sme pozorovali zvýšená expresia pro-apoptotických génov so zvyšujúcou sa koncentráciou kryptopleurínu a s jeho dobou kultivácie. Naopak expresia anti-apoptotických génov klesala alebo sa výrazne nemenila. Najvýraznejšie výsledky sme pozorovali pri rezistentných sublíniách SKM-1/VCR a MOLM-13/VCR..

**Literatúra:**

- [1] N. J. Short, M. E. Rytting, and J. E. Cortes, 'Acute myeloid leukaemia', 2018.
- [2] M. M. K. Aung, M. L. Mills, J. Bittencourt-Silvestre, and K. Keeshan, 'Insights into the molecular profiles of adult and paediatric acute myeloid leukaemia', 2021.
- [3] X. Yang et al., J Med Chem, vol. 55, no. 15, 2012
- [4] E. H. Kim et al., Food and Chemical Toxicology, vol. 50, no. 3–4, 2012
- [5] W. Gao, W. Lam, S. Zhong, C. Kaczmarek, D. C. Baker, and Y. C. Cheng, Cancer Res, vol. 64, no. 2, 2004

**Podakovanie:** Táto práca vznikla s podporou grantov VEGA 2/0171/21, VEGA 2/0030/23, VEGA 2/0046/24, APVV-19-0093 a APVV-19-0094.

## **Testovanie hliníkových MOF nanočastíc na ex ovo modeli chorioalantoickej membrány embryí prepelice japonskej**

Jaroslav Levík<sup>1</sup>, Ingrid Zriniová<sup>1</sup>, Majlinda Meta<sup>1</sup>, Ivan Čavarga<sup>1</sup>, Veronika Huntošová<sup>2</sup>, Miroslav Almáši<sup>3</sup>, Ľuboš Zauška<sup>3</sup>, Boris Bilčík<sup>1</sup>, Mariana Máčajová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Centrum biovied Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika; jaroslav.levik@savba.sk*

<sup>2</sup> *Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Centrum interdisciplinárnych biovied, Technologický a inovačný park, Trieda SNP 457/1, 040 11 Košice, Slovenská republika*

<sup>3</sup> *Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie, Moyzesova 11, 041 54 Košice, Slovenská republika*

Kovovo-organické nanočastice (MOF) majú pre svoje jedinečné vlastnosti potenciálne využitie aj v medicíne, najmä v oblasti antibakteriálnych aplikácií a terapeutických prístupov. MOF sa ukázali ako ideálne materiály kvôli ich riadenému rozkladu, silnej interakcii s bakteriálnymi membránami, produkcii reaktívnych foriem kyslíka (ROS) pri ožiarení. Ako model pre štúdium testovania biokompatibility MOF častíc sme použili chorioalantoickú membránu prepelice japonskej (CAM). Táto štruktúra je dobrým modelom na testovanie liečiv, predovšetkým je to jednoduchý, lacný, nenáročný na údržbu a dobre dostupný in vivo zvierací model.

Počas ôsmeho dňa embryonálneho vývinu (ED8) sme na povrch CAM umiestnili silikónové krúžky, do ktorých sme aplikovali štyri varianty MOF častíc s Al v koncentráciách 2 mg/ml a 0,2 mg/ml v objeme 80 µl na embryo. Testovali sme samotné častice (MOF1), častice s inkorporovaným hypericínom (MOF2), penicilínom (MOF3) a s oboma látkami spoločne (MOF4). V priebehu ED8 a ED9 sme tkanivo odfotografovali a z fotografií sme vyhodnocovali fluorescenciu a pomocou programu IKOSA parametre vaskulatúry. Na ED9 sme odobrali tkanivo CAM na zistenie génovej expresie zápalových a proangiogénnych faktorov. Z tkaniva CAM sme zhotovili histologické preparáty na určenie poškodenia tkaniva po aplikácii MOF častíc.

Pokusy na modeli chorioalantoickej membrány u prepelíc preukázali, že MOF štruktúry sa rýchlo rozkladajú a nevyvolávajú toxické účinky. Aplikácia MOF častíc nemala významný vplyv na expresiu sledovaných interleukínov, ale potvrdili sme, že zvýšila relatívnu expresiu IFN $\alpha$ . Takisto sme zaznamenali zmeny v relatívnej expresii VEGF-A po podaní častíc MOF, kedy expresia klesla na polovicu, ale pri MOF3 s hypericínom, tieto hodnoty v porovnaní s kontrolou zostali nezmenené. Náš výskum tiež naznačil, že MOF častice môžu ovplyvniť aj vaskulatúru vplyvom na vaskulárnu permeabilitu, znížením prenikania tekutiny do tkanív a redukciou edému. Na štruktúre tkaniva sme nepozorovali výrazné zmeny medzi jednotlivými skupinami MOF častíc.

Tieto zistenia zdôrazňujú potenciál MOF častíc v liečbe infekcií a zápalových ochorení. Napriek ich účinnosti však tieto materiály stále majú limity, ako napr. krátkodobosť účinku a



možnosť nečakaného poškodenia normálnych buniek v dôsledku rýchleho uvoľňovania kovových iónov. Na *ex ovo* modeli prepeličej CAM sme ukázali, že sledované koncentrácie MOF konštruktov sú pre embryo netoxické, rýchlo degradovateľné a vykazujú protizápalový efekt.

**Literatúra:**

- [1] Zhang X., Peng, F., Wang D. (2022) *J. Funct. Biomater.* 13(4), p. 215
- [2] Zhong X., Zhang Y., Tanet L., et al. (2019) *J. Control. Release.* 300(81), p. 92
- [3] Ni W., Zhu W., Wu W., et al. (2022) *Mater. Des.* 222, p. 111068
- [4] Kundeková B., Máčajová M., Meta M., et al. (2021) *Biology* 10(4), p. 301
- [5] Richardson M., Singh G. ( 2003) *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* 3(2), p. 155
- [6] Auerbach R., Kubai L., Knighton D., et al. (1974) *Dev. Biol.* 41, p. 391

**Pod'akovanie:** Práca bola podporená grantami VEGA 2/0042/21 a APVV 20-0129.

## **Potlačenie expresie veľkých tumor-supresorových kináz vedie k zníženiu aktivity hnedých adipocytov**

Alžbeta Jančovičová<sup>1</sup>, Roman Urminský<sup>1</sup>, Natália Pálešová<sup>1</sup>, Lívia Petrisková<sup>1</sup>, Peter Makovický<sup>2</sup>, Lucia Balážová<sup>1</sup>, Miroslav Baláž<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie výskumu porúch metabolizmu, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika*

<sup>2</sup> *Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav experimentálnej onkológie, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika;*

Tukový orgán pozostáva z dvoch funkčne a morfológicky odlišných tkanív, bieleho a hnedého tukového tkaniva. Zatiaľ čo biele tukové tkanivo je najväčšou zásobárňou energie v tele, hnedé tukové tkanivo využíva uskladnenú energiu na tvorbu tepla v procese nazývanom netriašková termogenéza. Donedávna sme si mysleli že hnedý tuk je prítomný len u mláďat cicavcov a hibernujúcich hlodavcov, no dnes vieme, že sa vyskytuje aj u dospelého človeka. Je tvorený najmä hnedými adipocytmi, ktoré majú multilokulárnu morfológiu a sú bohaté na mitochondrie obsahujúce Odpájací proteín 1 (UCP1) [1]. Keďže množstvo a aktivita hnedého tuku sa spája s vyšším výdajom energie, s nižšou adipozitou a s nižším rizikom rozvoja inzulinovej rezistencie, jeho aktivácia je považovaná za veľmi sľubnú stratégiu prevencie a liečby obezity [2]. V našom predchádzajúcom výskume sme ukázali, že dôležitú úlohu v kontrole aktivity hnedých tukových buniek zohráva Hippo signálna dráha [3]. Keď je aktívna, veľké tumor-supresorové kinázy (LATS) fosforylujú transkripčné regulátory YAP1 a TAZ, v dôsledku čoho dochádza k ich inaktivácii a následnej degradácii. Naopak, keď je Hippo signálna dráha neaktívna, LATS kinázy nefosforylujú YAP1 a TAZ, vďaka čomu zostávajú aktívne, translokujú sa do jadra a podieľajú na regulácii expresie cieľových génov [4]. Nedávny výskum ukázal, že TAZ funguje ako represor jadrového receptora PPAR $\gamma$ , ktorý zohráva kľúčovú úlohu v regulácii procesu adipogenézy a aktivácie hnedých adipocytov [5], avšak úloha LATS kináz v kontrole aktivity hnedého tukového tkaniva doposiaľ preskúmaná nebola. Preto cieľom nášho projektu je skúmať úlohu LATS kináz v regulácii funkcie hnedých adipocytov. Zaviedli sme preto metódu inhibície ich expresie v zreých imortalizovaných myších hnedých adipocytoch pomocou transfekcie špecifických siRNA voči Lats1, Lats2 a ich kombinácii (Lats1&2), pričom sme sledovali vplyv na expresiu markerov hnedých adipocytov, množstvo UCP1 proteínu, lipolytickú aktivitu, akumuláciu lipidov a funkčnosť mitochondrií. Súčasne sme vytvorili model Lats1&2<sup>fl/fl</sup> x Ucp1-CreERT2 myší, ktorý nám umožňuje zablokovať expresiu LATS kináz špecificky v hnedých adipocytoch a skúmali sme ich úlohu v kontrole aktivity hnedého tukového tkaniva in vivo.

Pomocou in vitro experimentov na imortalizovaných myších adipocytoch sme zistili, že potlačenie expresie Lats2 a oboch Lats1&2 kináz súčasne vedie k zníženiu expresie markerov hnedých adipocytov, množstva UCP1 proteínu, fosforylácie hormón-senzitívnej lipázy (HSL), akumulácie neutrálnych lipidov v tukových kvapôčkach a mitochondriálnej respirácie, avšak bez vplyvu na celkové množstvo mitochondrií a aktivitu proteínkinázy A (PKA), ktorá je kľúčovým regulátorom aktivity hnedých adipocytov. Naopak, potlačenie expresie Lats1 nemalo vplyv na sledované parametre aktivity hnedých adipocytov. Zablokovanie expresie oboch Lats1&2 kináz v hnedých adipocytoch myší in vivo viedlo k významnému zníženiu hmotnosti interskapulárneho hnedého tukového tkaniva a expresie markera zreých adipocytov Pparg, zatiaľ čo expresia Ucp1, Cox7a1 a Cpt1b, markerov hnedých adipocytov, bola nezmenená. Pozorovali sme však zníženie množstva UCP1 a Perilipínu 1 v hnedom tukovom tkanive.

Podrobná metabolická fenotypizácia odhalila signifikantné zníženie výdaja energie u *Lats1<sup>&2fl/fl</sup> x Ucp1-CreERT2* myší in vivo. Naše výsledky naznačujú, že Hippo signálna dráha zohráva dôležitú úlohu v kontrole aktivity hnedých adipocytov, pričom jej kľúčovým efektorom v hnedých tukových bunkách je LATS2..

**Literatúra:**

- [1] Pfeifer A., Hoffmann L.S. (2015) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55, p. 207
- [2] Yoneshiro T., Saito M. (2015) *Ann. Med.* 47(2), p.133
- [3] Balaz M., Becker A.S., Balazova L., et al. (2019) *Cell Metab.* 29(4), p. 901
- [4] Pocaterra A., Romani P., Dupont S. (2020) *J. cell Sci.* 133(2), jsc230425
- [5] Shen H., Huang X., Zhao Y., et al. (2022) *Nat. Commun.* 13(1), p. 6030

**PodĎakovanie:** Práca vznikla vďaka finančnej podpore APVV-22-0291 a VEGA 2/0102/23..

## **Strata LATS kináz v hnedých tukových bunkách chráni myši pred rozvojom obezity a metabolických ochorení**

Natália Pálešová<sup>1</sup>, Alžbeta Jančovičová<sup>1</sup>, Anne Goergen<sup>2</sup>, Lívia Petrisková<sup>1</sup>, Peter Makovický<sup>1</sup>, Tongtong Wang<sup>2</sup>, Lianggong Ding<sup>2</sup>, Adhideb Gosh<sup>2</sup>, Christian Wolfrum<sup>2</sup>, Lucia Balážová<sup>1</sup>, Miroslav Baláž<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05, Bratislava, Slovensko*

<sup>2</sup> *Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zürich, Schorenstrasse 16, Schwerzenbach, 8603, Switzerland*

Hnedé tukové tkanivo je považované za hlavný termogénny orgán u mláďat cicavcov a hibernujúcich hlodavcov a taktiež aj u novorodencov ľudí. Avšak vekom sa množstvo a aktivita hnedého tukového tkaniva u ľudí znižuje (1). Hnedé tukové tkanivo dokáže rýchlo a efektívne vytvárať teplo prostredníctvom netriaškovej termogenézy, čo je energeticky náročný proces, a preto je jeho aktivácia považovaná za sľubnú stratégiu pri boji proti obezite a pridruženým metabolickým ochoreniam (2).

V našom predchádzajúcom výskume sme identifikovali transkripčné koregulátory YAP1 a TAZ ako dôležité regulátory funkcie hnedého tuku (3). Tieto koregulátory sú zapojené v Hippo signálnej dráhe, ktorá reguluje proliferáciu a rast buniek. Pri aktívnej Hippo dráhe kinázy LATS1 a LATS2 fosforylujú YAP1 a TAZ, čím podporujú ich degradáciu. Naopak, keď je Hippo dráha neaktívna, LATS kinázy sú neaktívne, vďaka čomu sa YAP1 a TAZ dostávajú do jadra, kde sa podieľajú na regulácii transkripcie génov zapojených v kontrole bunkovej proliferácie, migrácie a apoptózy (4).

Pri porovnávaní transkriptómu ľudského hnedého a bieleho tukového tkaniva sme zistili vyššiu expresiu LATS kináz, YAP1 a TAZ v bielom tukovom tkanive. Na objasnenie funkcie LATS kináz v tukovom tkanive sme vytvorili model myši s indukovateľným vyradením LATS1 a LATS2 kináz špecificky v zreloch adipocytoch (Lats1<sup>fl/fl</sup> x Lats2<sup>fl/fl</sup> x Adip-CreERT2). U týchto myší sme 5 týždňov po vyradení expresie LATS kináz podaním tamoxifenu zaznamenali závažnú lipodystrofiu a zvýšenú mortalitu, avšak bez vzniku nádorov. Následne sme vytvorili myši s indukovateľným vyradením LATS1 a LATS2 kináz špecificky v hnedých a béžových adipocytoch (Lats1<sup>fl/fl</sup> x Lats2<sup>fl/fl</sup> x UCP1-CreERT2), ktoré nevykazujú zvýšenú mortalitu. Tieto myši majú menej interskapulárneho hnedého tuku bez zmeny množstva bieleho tukového tkaniva v tele. Zaujímavé je zistenie, že myši s vyradenou expresiou oboch LATS kináz v hnedých tukových bunkách sú rezistentné na obezitu nevedenú diétou s vysokým obsahom tukov a zachovávajú si metabolické zdravie, a to ak sú chované pri izbovej teplote aj pri termoneutralite, čo naznačuje že pozorovaný fenotyp nesúvisí s termogénnou aktivitou hnedého tukového tkaniva. U myší s vyradenou expresiou LATS kináz v hnedých tukových bunkách sme pozorovali výrazný pokles príjmu potravy, čo poukazuje na možnú interakciu

hnedého tuku s centrálnym nervovým systémom regulujúcim príjem potravy. Nezaznamenali sme však žiadnu zmenu v cirkulujúcich koncentráciách leptínu, hormónu produkovaného tukovými bunkami, ktorý je kľúčovým regulátorom príjmu potravy. Transkriptomická analýza hnedého tuku myší s vyradenou expresiou LATS kináz odhalila zmeny v expresii 191 génov, pričom viaceré z nich kódujú sekretované proteíny, ktoré aktuálne ďalej skúmame s cieľom identifikovať proteín ktorý sprostredkúva inhibičný vplyv straty LATS kináz na príjem potravy. Naša štúdia odhalila, že LATS kinázy sú dôležité pre správne fungovanie tukových buniek a ovplyvňujú sekrečnú aktivitu a komunikáciu hnedého tuku s mozgom.

**Literatúra:**

1. Zoico, E. et al. Brown and Beige Adipose Tissue and Aging. *Front. Endocrinol.* 10, (2019).
2. Liu, X., Zhang, Z., Song, Y., Xie, H. & Dong, M. An update on brown adipose tissue and obesity intervention: Function, regulation and therapeutic implications. *Front. Endocrinol.* 13, (2023).
3. Balaz, M. et al. Inhibition of Mevalonate Pathway Prevents Adipocyte Browning in Mice and Men by Affecting Protein Prenylation. *Cell Metab.* 29, 901-916.e8 (2019).
4. Ma, S., Meng, Z., Chen, R. & Guan, K.-L. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annu. Rev. Biochem.* 88, 577–604 (2019).

**Pod'akovanie:** Práca vznikla vďaka finančnej podpore APVV-22-0291 a VEGA 2/0102/23.

## **Vplyv inhibície mitochondriálnej proteázy LONP1 na odpoveď nezbalených bielkovín v mitochondriách a endoplazmatickom retikule v bunkách SH-SY5Y**

Hudák Ľuboš<sup>1</sup>, Brodňanová Mária<sup>2</sup>, Evinová Andrea<sup>2</sup>, Gužiková Jaroslava<sup>1</sup>, Líšková Monika<sup>1</sup>, Račay Peter<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Komenského Univerzita v Bratislave, Malá Hora 4, 036 01, Martin, Slovensko*

<sup>2</sup> *Martinské centrum pre biomedicínu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Komenského Univerzita v Bratislave, Malá Hora 4, 036 01, Martin, Slovensko*

Neurodegeneratívne ochorenia ako Alzheimerova, Parkinsonova, Huntingtonova choroba a ochorenia spojené s prionmi sa označujú aj ako ochorenia nesprávne zbalených bielkovín. Ich spoločným znakom je agregácia bielkovín vedúca k dysfunkcii či smrti neurónov. Hoci k akumulácii nezbalených bielkovín a ich agregátov dochádza v cytoplazme, poškodené bielkoviny mitochondrií či endoplazmatického retikula môžu taktiež významne prispieť k patobiochemickým mechanizmom spomínaných ochorení a ich kvalita je kontrolovaná niekoľkými nezávislými mechanizmami. Kvalitu bielkovín v mitochondriách kontroluje najmä ATP-závislá proteáza LONP1. Akumulácia nesprávne zbalených bielkovín v mitochondriách spúšťa adaptívnu dráhu, ktorá sa nazýva odpoveď nezbalených bielkovín (Unfolded Protein Response, UPRmt). Výsledkom aktivácie tejto dráhy býva indukcia expresie mitochondriálneho šaperónu HSP60, vedúca k zvýšeniu šaperónovej kapacity mitochondrií, ako aj proteázy LONP1, ktorej úlohou je degradácia nezbalených bielkovín. Chronické či ťažké poškodenie mitochondriálnych bielkovín však môže vyústiť do bunkovej smrti. Mitochondrie spolu s endoplazmatickým retikulom (ER) vytvárajú kontaktné miesta, ktoré tieto organely využívajú pri výmene fosfolipidov a Ca<sup>2+</sup>. Následkom fyzickej a funkčnej interakcie medzi ER a mitochondriou je, že funkcia mitochondrií je citlivá na patologické poškodenie indukované stresom ER, ktorý býva kompenzovaný UPR špecifickou pre ER (UPRER) a degradáciou bielkovín spojených s ER (ERAD). Ako sme ukázali aj v našom laboratóriu môže, v závislosti od rozsahu bunkového stresu, viesť stresová signalizácia z ER do mitochondrie k dysfunkcií mitochondrií prípadne až k smrti buniek.

Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv inhibície LONP1 na prežívanie buniek, indukciu UPRmt ako aj indukciu UPRER, a teda či dochádza aj k opačnej komunikácii z mitochondrií do ER. Ako model sme využili neuroblastómovú bunkovú líniu SH-SY5Y, ktorá sa často využíva v neurobiológii ako in vitro model na štúdium neurotoxicity v dopaminergných neurónoch. Bunky boli ošetrované CDDO metyl esterom (CDDO-Me) inhibítorom proteázy LONP1. MTT testom sme zistili signifikantný pokles vo viabilite buniek ovplyvnených 2,5 a 5  $\mu$ M CDDO-Me. Následne sme pomocou Western blot analýzy sledovali expresiu bielkovín zapojených do oboch dráh UPR. Markery UPRER (SEL1L a HRD1) ako aj UPRmt (HSP60) neboli signifikantne zvýšené. Výrazne zvýšené bolo množstvo šaperónov GRP78, ktorý napomáha správne zbalovaniu bielkovín v ER a HSP70, ktorý napomáha zbalovaniu cytoplazmatických bielkovín a môže inhibovať mitochondriálnu apoptózu. Rovnako bolo v bunkách ovplyvnených 5  $\mu$ M CDDO-Me zvýšené aj množstvo aktivačného transkripčného faktora 4 (ATF4), ktorý je opísaný ako induktor jednej z dráh UPRmt. Pomocou respirometrie sme pozorovali zníženie nami sledovaných parametrov mitochondriálnej respirácie, pri oboch koncentráciách CDDO-Me. Fluorescenčným farbením mitochondrií sme pozorovali rozpad mitochondriálnych sietí ako aj tvorbu prstencových útvarov, ktoré sú spájané s

mitochondriálnou dysfunkciou, čo potvrdzuje meranie respirometrie. Naše predbežné zistenia potrebujú ďalšie experimenty na lepšie pochopenie mechanizmu vplyvu inhibície LONP1 na štruktúru a funkciu mitochondrií a ER.

**Podakovanie:** Práca bola podporená grantom VEGA 1/0183/23.

## Distribúcia baktérií na koži zdravých koní

Štempelová Lucia<sup>1</sup>, Stropfová Viola<sup>1</sup>, Kol'vek Filip<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centrum biovied SAV, v.v.i., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice

<sup>2</sup> Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Klinika koní, Komenského 73, 040 01 Košice

Komplexný súbor mikroorganizmov na koži tvoria baktérie, huby, vírusy, mikroeukaryota (roztoče), archaea a fágy. Komenzálny mikroorganizmy majú viacero dôležitých úloh. Podieľajú sa napríklad na rozklade kožných produktov a spolu s bunkami imunity a kožnými bunkami majú tiež nezastupiteľnú úlohu pri obrane organizmu. Je známe, že kožný mikrobióm je ovplyvnený vnútornými faktormi (vek, pohlavie, hormóny), ale výrazne na neho vplyvajú aj vonkajšie činitele (hygiena, používaná kozmetika), keďže je v neustálom kontakte s prostredím [1]

Využitím nových metódik na detekciu mikrobiómu ako je 16S sRNA sekvenovanie bolo zistené, že mikrobiálne spoločenstvá sú u ľudí a zvierat tvorené predovšetkým bakteriálnymi kmeňmi ako sú *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroides*, pričom rozdiely sú u ľudí a jednotlivých druhov zvierat zistené v početnosti jednotlivých kmeňov [2, 3]

Cieľom našej štúdie bolo zmapovať bakteriálne zloženie na piatich oblastiach kože zdravých koní (oblasť papule, krku, chrbta, brucha a sponky). Sekvenovaniu 16S rRNA (región V3-V4) boli podrobené vzorky získané zo šiestich koní (30 vzoriek) nachádzajúcich sa v lokalite mesta Košice (Kavečany, Slovensko). Platforma MicrobiomeAnalyst bola použitá na vykonanie štatistickej analýzy a vizualizáciu dát [4]. Kultivačným vyšetrením bolo zistené bakteriálne zloženie na piatich miestach kože u 30 koní (150 vzoriek). Získané bakteriálne izoláty boli identifikované pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrofotometrie. Kone zahrnuté do štúdie boli klinicky zdravé a nemali v anamnéze antibiotickú liečbu za uplynulé tri mesiace.

Metódou sekvenovania bolo zistené, že kožný mikrobióm zdravých koní je veľmi rôznorodý zastúpený mnohými bakteriálnymi rodmi. Spomedzi 229 identifikovaných rodov, bol rod *Corynebacterium* ( $7,4 \pm 6,5$  %) najpočetnejší na zdravej koži koní. Nasledovali kmene ako *Deinococcus* ( $7,1 \pm 14,9$  %) a *Macrococcus* ( $5,0 \pm 8,2$  %). Analýza distribúcie bakteriálnych rodov na koži koní odhalila, že *Macrococcus* prevládal v oblasti krku ( $8,1 \pm 7,1$  %). Rod *Deinococcus* bol najpočetnejší v oblasti chrbta ( $26,5 \pm 24,5$  %), rod *Corynebacterium* prevládal v oblasti sponky ( $9,9 \pm 6,4$  %), papule ( $10,3 \pm 5,8$  %) a brucha. Analýzou alfa diverzity kožného mikrobiómu medzi piatimi oblasťami kože boli zistené signifikantné rozdiely (Shannon, p-value: 0,0049) s maximom v oblasti krku a minimom v oblasti chrbta (p-value: 0,0453), signifikantné rozdiely boli pozorované aj medzi oblasťou chrbta a papule (p-value:



0,0472). V rámci kultivačného vyšetrenia vzoriek boli najčastejšie identifikované baktérie z rodov *Staphylococcus* a *Bacillus*. *Staphylococcus succinus* bol najbežnejšie identifikovaný bakteriálny druh, pričom dominoval na všetkých oblastiach kože s výnimkou sponky.

**Literatúra:**

- [1] Flowers, L. - Grice, E. A. Cell host & microbe. 2020, 28(2), 190–200.
- [2] Grice, E. A. et al. Science (New York, N.Y.), 2009, 324(5931), 1190–1192.
- [3] Rodrigues Hoffmann, A. et al. PloS one, 2014, 9(1), e83197.
- [4] Chong J et al. Nature Protocols, 2020, 15:799–821.

**PodĎakovanie:** Práca vznikla s podporou projektov APVV-23-0005, VEGA 2/0004/24 a APD0011.

## **Dôsledky inhibície enzymatickej aktivity synoviolínu na prežívanie a odozvu bunkových línií neuroblastómu, glioblastómu a astrocytov**

Jaroslava Gužiková, Monika Líšková, Ľuboš Hudák, Peter Račay

*Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4A, 036 01 Martin*

Rakovina je druhou najčastejšou príčinou úmrtí celosvetovo. Jednou z najbežnejších vlastností rakovinových buniek je schopnosť šíriť sa alebo metastázovať do iných tkanív so špecifickými podmienkami - hypoxia, nízka hladina glukózy a oxidačný stres, ktoré ovplyvňujú aj skladanie proteínov v endoplazmatickom retikule (ER). Degradácia spojená s ER (ERAD) a odpoveď nezbalených proteínov (UPR) sú dva kľúčové mechanizmy kontroly kvality proteínov v bunke. ERAD systém je dôležitý determinant normálnej fyziológie buniek a je dôležitým mechanizmom patogenézy rôznych chorôb. Porušenie funkcií ER vedie k stresu ER spojenému s akumuláciou nezbalených proteínov, ktoré musí ERAD eliminovať aby bolo zachované prežívanie buniek.

Dráha IRE1 $\alpha$ -XBP1 UPR je aktivovaná v nádorových bunkách. Jedným z výsledkov zvýšenej aktivity dráhy je zvýšená expresia synoviolínu (SYVN1), ktorý je nevyhnutnou súčasťou ERAD. Aktivita IRE1 $\alpha$  je dôležitá pri tumorigenéze a agresivite u väčšiny druhov rakoviny ako je napr. leukémia, glioblastóm, myelóm, rakovina obličiek, prsníka a spája sa so zlou prognózou.

Hlavným cieľom tejto práce bolo analyzovať vplyv inhibície SYVN1 na prežívanie a odpoveď bunkových línií mozgových nádorov - SH-SY5Y, T98G, U87 a astrocytov NHA a K1884. Použili sme špecifický inhibítor enzymatickej aktivity synoviolínu LS-102.

Zistili sme, že inhibícia SYVN1 vedie k zníženiu relatívneho prežívania všetkých skúmaných bunkových línií. Astrocyty K1884 vykazujú najvyššiu citlivosť na LS-102, zatiaľ čo bunky glioblastómu T98G boli najodolnejšie voči LS-102. Pozorovali sme významné zvýšenie expresie SYVN1 v bunkách T98G a U87. Ošetrovanie buniek T98G vedie k aktivácii dráhy IRE1 $\alpha$ -XBP1 a následnej aktivácii ribonukleázovej aktivity IRE1 $\alpha$  vedúcej k zostrihu XBP1 na XBP1u, ktorý je prekladaný do funkčného transkripčného faktora XBP1s. Týmto možno vysvetliť zvýšenú expresiu SYVN1 po ošetrovaní T98G buniek inhibítorom SYVN1, pretože XBP1s indukuje expresiu SYVN1 avšak v bunkách U87 ošetrovaných LS-102 bol SYVN1 nadmerne exprimovaný, ale dráha IRE1 $\alpha$ -XBP1 nebola aktivovaná. Okrem zvýšenej expresie SYVN1 sme v glioblastómových bunkách pozorovali aj zvýšenú expresiu GRP78, kľúčového proteínu stresu ER ako aj zvýšenú expresiu SEL1L proteínu, ktorý vytvára so SYVN1 funkčný komplex. Expresia proteínov typických pre odozvu na stres mitochondrií nebola významne zmenená.

Naše výsledky ukázali, že bunky T98G a U87 reagujú na inhibíciu SYVN1 prostredníctvom zvýšenej expresie SYVN1. Predpokladáme, že zvýšená expresia SYVN1 ako esenciálneho proteínu ERAD predstavuje určitý kompenzačný mechanizmus, ktorým sa glioblastómové bunky snažia vyrovnáť s inhibíciou aktivity SYVN1.

**PodĎakovanie:** Táto práca bola podporená grantmi UK/60/22, UK/3085/2024 a VEGA 1/0183/23.

## **Identification of DNA G-quadruplex structures in Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis***

Maria Vittoria Cottini, Polina Marchenko, Lucia Nemčovičová, Ján Jamroškovič\*

*Institute of Molecular Biology, Slovak academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 84551 Bratislava, Slovakia*

\* Corresponding author: jan.jamroskovic@savba.sk

DNA G-quadruplexes (G4) are non-canonical DNA structures that have been extensively studied *in vitro* and *in vivo*, particularly in eukaryotic models, due to their biological significance and potential as anti-cancer targets. Unlike classical double-stranded DNA, G4 structures are highly stable, formed by the stacking of planar G-quartets formed via Hoogsteen hydrogen bonding between guanine residues.

Recent bioinformatics analyses and advancements in genomics and transcriptomics have highlighted the enrichment of G4 sequences in regulatory regions of genes, as well as in ribosomal and telomeric DNA (1). Due to their stability, unresolved G4 structures can impede DNA and RNA metabolism, and thus their formation must be strictly regulated by specialized proteins (2). G4s have also been implicated as binding signals for transcription factors in highly transcribed genes (3), and several G4-binding proteins have been identified in human cells, underscoring their role in gene regulation (4).

Although G4 formation has been confirmed in bacterial DNA sequences, including *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Mycobacterium tuberculosis* (5,6), the understanding of G4 structures in bacterial genomes remains limited. These structures have been proposed to function as genetic switches (7) and as potential drug targets against bacterial pathogens (8). However, a significant knowledge gap persists regarding their formation and function in bacteria.

Our research aims to address this gap by identifying and characterizing G4 structures in the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Using bioinformatics tools, we predict potential G4-forming sequences, and through *in vitro* experiments, we study the folding and stability of these predicted structures. Our main goal is to uncover the role of G4 structures in DNA replication and gene expression in *B. subtilis*.

### **References:**

- [1] Marsico, G., Chambers, V.S., Sahakyan, A.B., McCauley, P., Boutell, J.M., Di Antonio, M. and Balasubramanian, S. (2019) Whole genome experimental maps of DNA G-quadruplexes in multiple species. *Nucleic Acids Research*, 47, 3862-3874.
- [2] Sabouri, N. (2017) The functions of the multi-tasking Pfh1(Pif1) helicase. *Curr Genet*, 63, 621-626.
- [3] Spiegel, J., Cuesta, S.M., Adhikari, S., Hansel-Hertsch, R., Tannahill, D. and Balasubramanian, S. (2021) G-quadruplexes are transcription factor binding hubs in human chromatin. *Genome Biol*, 22.

- [4] Lago, S., Nadai, M., Cernilogar, F.M., Kazerani, M., Moreno, H.D., Schotta, G. and Richter, S.N. (2021) Promoter G-quadruplexes and transcription factors cooperate to shape the cell type-specific transcriptome. *Nature Communications*, 12.
- [5] Saranathan, N. and Vivekanandan, P. (2019) G-Quadruplexes: More Than Just a Kink in Microbial Genomes. *Trends Microbiol*, 27, 148-163.
- [6] Evans, L., Kotar, A., Valentini, M., Filloux, A., Jamshidi, S., Plavec, J., Rahman, K.M. and Vilar, R. (2023) Identification and characterisation of G-quadruplex DNA-forming sequences in the *Pseudomonas aeruginosa* genome. *Rsc Chem Biol*, 4, 94-100.
- [7] Herbert, A. (2020) Simple Repeats as Building Blocks for Genetic Computers. *Trends Genet*, 36, 739-750.
- [8] Yadav, P., Kim, N., Kumari, M., Verma, S., Sharma, T.K., Yadav, V. and Kumar, A. (2021) G-Quadruplex Structures in Bacteria: Biological Relevance and Potential as an Antimicrobial Target. *J Bacteriol*, 203.

**Acknowledgement:** This work was supported by Impulz grant number IM-2022-62 from the Slovak Academy of Sciences.

## **Multirezistentné - biofilm tvoriace kmene rodu *Staphylococcus* izolované z boviných mastitíd**

Lívia Karahutová, Dobroslava Bujňáková

Centrum Biovied SAV v.v.i., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Šoltésovej 4-6, Košice 040 01

Mastitídy hovädzieho dobytku patria medzi ochorenia spôsobujúce celosvetovo vysoké ekonomické a produkčné straty [1] a taktiež ovplyvňujú aj samotný welfare zvierat. Za etiologický agens tohto ochorenia sa považujú rôzne patogény (napr. *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp.) [2] a veľmi dôležitými pôvodcami z čeľade *Staphylococcaceae* sú *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a *Staphylococcus haemolyticus* (*S. haemolyticus*) [3].

Súčasná liečba stafylokokových mastitíd je závislá hlavne od antibiotík. Ich rozšírené a nekontrolované užívanie však viedlo k zníženej odpovedi na antibiotickú terapiu [4]. Ďalším problémom pri liečbe mastitíd je tvorba biofilmu zvyčajne spojená s produkciou rôznych virulentných faktorov (napr. adhezíny, clumping faktory,...) [5] a expresiou extracelulárnych toxínov (ako sú hemolyzíny, enterotoxíny) [6].

Cieľom tejto štúdie bolo zdokumentovať výskyt kmeňov *S. aureus* a *S. haemolyticus* v mlieku kráv s mastitídou. Výskum bol následne zameraný na detekciu fenotypovej rezistencie a na základe výsledku bola skúmaná genotypová rezistencia pomocou polymerázových reťazových reakcií (PCR). Schopnosť tvorby biofilmu sa skúmala pomocou kvantitatívneho testu s kryštál-violetou v mikrotitračných platničkách a gény spájané s produkciou biofilmu (MSCRAMM), génov kódujúcich enterotoxíny A-E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) a alfa hemolyzín (*hla*) sa detegovali pomocou PCR.

Z celkového počtu 191 vzoriek mlieka boli identifikované ako *S. aureus* – 12 % (22 izolátov) a *S. haemolyticus* – 6 % (12 izolátov). Interpretované odčítanie antibiogramu poukázalo u 12 izolátov na možný výskyt metilín-rezistentných *S. aureus* (MRSA) a metilín-rezistentných koaguláza-negatívnych stafylokokov. Genotypicky boli izoláty pozitívne na *blaZ* a negatívne na *mecA* a *mecC*. Ďalším dôležitým zisteným mechanizmom rezistencie bola indukovateľná rezistencia na makrolid-linkozamid-streptogramín B (iMLS<sub>B</sub>) s prítomnosťou génov *msrA*, *ermC*, *vgaA*.

Najčastejšie detegované gény spojené s biofilmom a toxínmi boli *clfA*, *sdrD*, *sdrE*, *fnbpB*, *bbp*, *isdA*, *isdB*, *hla* a *see*. Izoláty *S. aureus* boli podrobené spa typizácii. Ukázalo sa, že aj napriek kmeňom pochádzajúcim z rôznych fariem s rôznym antibiotickým profilom, všetky spadali do rovnakého spa typu (t10035).

Napriek vyššiemu záchytu génov MSCRAMM u kmeňov *S. aureus*, väčšina z nich vykazovala nižšiu schopnosť (absorbancia pri A<sub>570</sub> < 0,1) vytvárať biofilmy (8 izolátov) na

abiotickom povrchu, s výnimkou 12 izolátov (A570 medzi 0,1 a 0,2), ktoré vykazovali strednú schopnosť tvorby a dva izoláty (A570 > 0,2) silnú. Naopak, izoláty *S. haemolyticus* boli veľmi dobrými producentmi biofilmu (A570 = 0,395 ± 0,067 - 0,844 ± 0,125).

Testy testovania rezistencie odhalili prítomnosť iMLSB, ktoré podľa našich najlepších vedomostí u slovenských bovinných stafylokokov sú popísané zriedkavo. Väčšina izolátov bola rezistentná voči viacerým antibiotikám a niesli viaceré gény virulencie, čo predstavuje potenciálne riziko pre verejné zdravie.

**Literatúra:**

- [1] Li L et al. BMC Veterinary Research 11(1):168 (2015)
- [2] Krishnamoorthy P et al. Pathogens 10(5):545 (2021)
- [3] Leroy F et al. Journal of Dairy Science 98(11):7893–7898 (2015)
- [4] Sharun K et al. Veterinary Quarterly 41(1):107–36 (2021)
- [5] Foster T.J. Microbiology Spectrum 7(4):7.4.2 (2019)
- [6] Cheung GYC et al. Virulence 12(1):547–569 (2021)

**PodĎakovanie:** Táto práca bola podporená grantom APVV-22-0457.

## **Identification and expression of neuropeptides RYamides and FMRFamides and their receptors in the tick *Ixodes ricinus***

Emma Buchová, Dušan Žitňan, Ivana Daubnerová

*Slovak Academy of Sciences, Institute of Zoology, Dúbravská cesta 9, 84506 Bratislava*

Ticks are very important vectors of dangerous pathogens, including bacteria, viruses and parasites that pose significant threats to human and animal health worldwide. Understanding the complex mechanisms governing tick physiology and transmission of pathogens is crucial for the development of effective strategies to combat tick-borne diseases. In recent years, neuropeptides have emerged as key regulators of a diverse physiological processes. In ticks and other arthropods neuropeptides are known to regulate important organ functions, including those of the digestive tract and central nervous system. This study focuses on identification and characterization of two neuropeptides, FMRFamides and RYamides, which are known to regulate feeding in insects. We identified the RYamide and FMRFamide gene transcript and predicted two candidates for G protein-coupled receptors in the *Ixodes ricinus* genome. Using in situ hybridization and immunohistochemistry we stained enteroendocrine cells of the midgut, as well as a number of peptidergic neurons in the tick's central nervous system producing FMRFa and RYa. To validate that both identified receptors are specific and sensitive to FMRFa or RYa we utilized an aequorin-based functional assay in mammalian CHO cells. The function of these peptides and their potential roles in the regulation of feeding and digestion will be further studied by using injection of dsRNA in vivo and various in vitro bioassays.

### **References:**

- [1] Apanaskevich, D. A., Oliver, J. H., Sonenshine, D. E., & Roe, R. M. (2014). Life cycles and natural history of ticks. *Biology of ticks*, 1, 59-73.
- [2] Nässel, D. R., & Zandawala, M. (2019). Recent advances in neuropeptide signaling in *Drosophila*, from genes to physiology and behavior. *Progress in neurobiology*, 179, 101607.

**Acknowledgement:** This work was supported by Slovak Grant agencies: Agentúra na podporu výskumu a vývoja (APVV-18-0201, APVV-21-0431) and Vedecká grantová agentúra (VEGA-2/0070/23, VEGA-2/0037/23, VEGA-2/0040/23)..

## **Štúdium produkcie surfaktantu v krátkodobej a dlhodobej kultúre buniek A549 a ich odpoveď na zápal**

Ďurišová Ivana<sup>1</sup>, Aleš Kvasnička<sup>2</sup>, David Friedecký<sup>2</sup>, Balážová Mária<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> *Fakultná nemocnica a Univerzita Palackého v Olomouci, Křížkovského 511/8 779 00 Olomouc, Česká republika*

Pľúcny surfaktant hrá kľúčovú úlohu pri výmene plynov tým, že znižuje povrchové napätie počas nádychu a zabraňuje alveolárnemu kolapsu pri výdychu. Okrem svojej mechanickej funkcie tlmí nadmernú prozápalovú odpoveď v pľúcach, ktorá môže viesť k fyziologickým zlyhaniu [1]. Dôležitou zložkou tejto imunitnej odpovede je fosfolipid fosfatidylglycerol (PG), ktorý moduluje činnosť makrofágov a pomáha predchádzať zápalom, ktoré znižujú efektívnosť výmeny plynov v alveolách. Počas bakteriálnej infekcie PG súťaží s lipopolysacharidom (LPS) o väzbu na receptor TLR4, čím brzdí LPS-závislú aktiváciu tohto receptora, ktorý je zásadný pre bunkovú odpoveď na patogény. Naviazaním na TLR4 blokuje signálnu dráhu a znižuje produkciu cytokínov, ako sú TNF $\alpha$  a IL-8, čo vedie k potlačeniu zápalovej reakcie [2]. Toto potlačenie imunitnej odpovede má potenciál pre liečbu pacientov so syndrómom akútnej respiračnej tiesne (ARDS), spôsobeným nadmernou imunitnou reakciou, ktorá je najčastejšou príčinou úmrtí pri ochorení COVID-19. Vysoké hladiny cytokínov môžu vyvolať cytokínovú búrku, ktorá zvyšuje riziko multiorgánového zlyhania a smrti [3]. Pľúcny surfaktant je produkovaný alveolárnymi bunkami typu II (ATII) [1]. Ako model pre štúdium ATII buniek sa používa ľudská epiteliálna bunková línia A549, odvodená z pľúcneho adenokarcinómu.

Naším cieľom bolo skúmať podmienky tvorby pľúcneho surfaktantu v bunkách A549, aby sme určili optimálny čas pre jeho vylučovanie. Porovnali sme životaschopnosť krátkodobo a dlhodobo kultivovaných buniek pomocou prietokovej cytometrie. Stanovili sme tiež hladiny PG a iných lipidov v kultivačnom médiu pomocou kvapalinovej chromatografie spojenou s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS). Okrem toho sme sledovali zmeny v množstve surfaktantového proteínu A (SP-A) v čase, ktorý reflektuje množstvo vylučovaného surfaktantu do média. Nakoniec sme vyvolali zápal v bunkách pomocou LPS, aby sme porovnali imunitnú odpoveď v krátkodobých a dlhodobých kultúrach. Na základe výsledkov sme zistili, že 10-dňové kultúry buniek A549 sú najvhodnejšie pre štúdium vylučovania pľúcneho surfaktantu.

### **Literatúra:**

[1] Voelker D. R., Numata M. (2019). *J. Biol. Chem.* 294(12), p. 4282–4289

[2] Kuronuma K., Mitsuzawa H., Takeda K., et al. (2009). *J. Biol. Chem.* 284(38), p. 25488–25500

[3] Parasher A. (2021). *Postgrad Med J* 97(1147), p. 312–320.

**PodĎakovanie:** Táto práca bola podporená grantom VEGA 2/0030/22, SAS-NSTC-JRP-2023-04 a APVV-20-0129.



## **Vplyv manipulácie neurogenézy na variabilitu spevu dospelých samcov pestúanky japonskej (*Lonchura striata domestica*)**

Radič Rebecca, Hodřová Vladimíra, Kubíková Ľubica

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

Nové neuróny sa tvoria procesom nazývaným neurogenéza, ktorý zabezpečuje správny vývoj, funkciu a plasticitu mozgu, a prebieha aj v dospelosti. U spevavcov nové neuróny vznikajú vo ventrikulárnej zóne (VZ) susednej bočnej komory, odkiaľ migrujú do celého predného mozgu vrátane oblastí zodpovedných za učenie a produkciu spevu. U pestúanky japonskej (*Lonchura striata domestica*) je vyššia miera včleňovania nových neurónov do mozgovej oblasti zodpovednej za produkciu spevu spojená s vyššou variabilitou jej piesne. Cieľom našej štúdie je zistiť či medzi neurogenézou a variabilitou spevu existuje funkčný vzťah, a teda či manipulácia neurogenézy bude mať vplyv na variabilitu naučenej piesne dospelých samcov pestúanky japonskej.

Samcov sme rozdelili do 3 skupín po 3 jedincov a podali sme im fyziologický roztok (FYZ, kontrola), memantín (MEM, 15 mg/kg) alebo temozolomid (TMZ, 25 mg/kg). Látky sme im podávali do prsného svalu 1 raz denne prvých 3 dní týždňa. Na 4. deň sme zvieratám podali 5-bromo-2'-deoxyuridín (BrdU, tymidínový analóg) pre označenie nových buniek. Ďalšie 3 dni sme zvieratám nič nepodávali a tento postup sme zopakovali počas 4 týždňov. V posledný deň experimentu sme vtákom podali 5-etinyl-2'-deoxyuridín (EdU, tymidínový analóg) a po 2 h sme ich usmrtili. Počas celej doby experimentu (pred a po podávaní látok) bol spev nahrávaný a neskôr aj vyhodnocovaný v programe Sound Analysis Pro. V mozgových rezoch sme zafarbili EdU+ bunky azidovou reakciou pomocou kitu Azide-Eterneon-Red 645. Vytvorili sme mikrofotografie VZ na 4 úrovniach obsahujúcich ďalšie oblasti ako anatomické značky – vokálnu oblasť Area X (VZ-Area X), tractus septomesencephalicus (VZ-TSM), commissura anterior (VZ-CA) a motorické jadro HVC (VZ-HVC). Pomocou programu Photoshop CS6 sme z mikrofotografií kvantifikovali počet EdU+ buniek pre každú úroveň VZ zvlášť a vypočítali sme tiež priemer z týchto 4 úrovní VZ. Následne sme počet EdU+ buniek prepočítali na 1 mm dĺžky komory. T-testom sme porovnali počty EdU+ buniek v MEM a TMZ skupinách v porovnaní s FYZ. Spev bol analyzovaný v prvých 20 piesňach zaspievaných v daný deň. Variabilitu spevu sme analyzovali 2-faktorovou ANOVOU s opakovaním, kde faktory boli skupina a čas. V analýze sme sa zamerali: na počet slabík, tranzícií a motívov v piesni, na prevalenciu slabík a motívov, a na linearitu a konzistentnosť piesne.

Zistili sme, že počet EdU+ buniek sa zvýšil na úrovniach VZ-TSM, VZ-HVC a v celej VZ v skupine MEM v porovnaní s FYZ. Naopak, počet EdU+ buniek klesol na úrovniach VZ-Area X a VZ-TSM v skupine TMZ v porovnaní s FYZ. Z analýzy variability spevu sme zistili, že počet slabík a tranzícií v piesni a počet typických tranzícií v piesni sa významne zmenili po podávaní MEM a TMZ v porovnaní s piesňami pred podávaním týchto látok, ale nezmenili sa po podaní FYZ.

Výsledky experimentu naznačujú, že TMZ tlmí tvorbu nových neurónov vo VZ, zatiaľ čo MEM ju podporuje. V prípade analýzy spevu sa ukázalo, že počet nových buniek ovplyvnených MEM a TMZ má vplyv na variabilitu piesne dospelých samcov pestúanky japonskej. Výsledky našej štúdie sú zatiaľ predbežné, keďže počet jedincov v každej experimentálnej skupine bude

vyšší. Ďalej budeme kvantifikovať počet nových neurónov vo vokálnych jadrách Area X a HVC po migrácii z VZ. Nakoniec sa zameriame na spektrálnu analýzu variability piesne.

**Literatúra:**

- [1] Cuartero M. I., Parra J., Pérez-Ruiz A., et al. (2019) J. Clin. Invest. 129, p. 1536
- [2] Ishikawa R., Fukushima H., Frankland P. W., et al. (2016) eLife 5, e17464
- [3] Mañas-Padilla M. C., Melgar-Locatelli S., Vicente L., et al. (2023) J. Comp. Neurol. 531, p. 548
- [4] Polomova J., Lukacova K., Bilcik B., et al. (2019) Proc. R. Soc. B: Biol. Sci. 286, p. 20182872
- [5] Rahman A. A., Amruta N., Pinteaux E., et al. (2021) Transl. Stroke Res. 12, p. 1

**PodĎakovanie:** Práca bola podporená grantami APVV-20-0344, VEGA 2/0150/24 a APP0532.

## **Vzťah neurozápalu a neurogenézy u zebričky červenozobej**

Hoďová Vladimíra, Kubáňová Nikola, Radič Rebecca, Kubíková Ľubica

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

Medzi hlavné príčiny smrti a invalidity na celom svete patria poranenia mozgu a neurodegeneratívne ochorenia, ktoré postihujú stále väčší počet ľudí. Neurozápal, ktorý často sprevádza tieto ochorenia, môže mať rôzne účinky v závislosti od jeho dĺžky trvania a intenzity. Zatiaľ čo dlhodobý a silný neurozápal môže byť škodlivý, súčasné poznatky naznačujú, že v určitých prípadoch môže podporovať neurogenézu a mať aj pozitívny ochranný vplyv. Akútna reakcia na poranenie a poškodenie je uvoľnenie prozápalových cytokínov a aktivácia imunitných buniek, ktoré neskôr ďalej sprostredkujú uvoľnenie protizápalových cytokínov. Cicavce majú obmedzenú schopnosť regenerácie centrálného nervového systému, ich využitie v štúdiách zameraných na neurozápal je preto limitujúce. Naopak mozog spevavcov po neurotoxickom poškodení v dospelosti regeneruje.

Cieľom tejto štúdie je popísať léziu indukovaný neurozápal a neuroregeneráciu striatalnej oblasti. Popíšeme časový priebeh génovej expresie pro- a protizápalových cytokínov vo vzťahu k regenerácii po lézii.

V experimente bolo použitých 39 samcov zebričky červenozobej (*Taeniopygia guttata*), ktoré boli rozdelené do 3 skupín podľa dĺžky prežívania po vytvorení lézie – 2 dni (2D, n=13), 2 týždne (2W, n=13) a 3 mesiace (3M, n=13). Každá skupina bola tvorená 2 podskupinami, a to kontrolnou (n=5) a experimentálnou (n=8). Experimentálnej skupine bola vytvorená bilaterálna lézia oblasti AreaX v striate prostredníctvom 1% kyseliny iboténovej a kontrolnej skupine bol do rovnakej oblasti aplikovaný 0,9% sterilný fyziologický roztok. Jedinca boli odvážené a 2 hodiny pred usmrtením im bol intramuskulárne podaný exogénny marker neurogenézy, tymidínový analóg 5-etinyl-2'-deoxyuridín (EdU). Vybraté mozgy boli rozdelené na 2 hemisféry. Ľavá hemisféra bola narezaná na 20 µm hrubé sagitálne rezy, na ktorých boli zafarbené EdU-pozitívne bunky a kvantifikované vo ventrikulárnej zóne (VZ). Pravá hemisféra bola narezaná na 500 µm hrubé sagitálne rezy, z ktorých bolo vypichnuté striatum s oblasťou AreaX. Dva striatalne výpichy o priemere 1mm od každého jedinca boli pomocou real-time PCR použité na analýzu génovej expresie neuronálneho markera (NeuN), prozápalových (IL-1β, IL-6, TNF-α) a protizápalových cytokínov (IL-4, IL-10).

Na začiatku tejto štúdie sme optimalizovali a validovali techniku vypichovania striata z mozgových rezov bez aj s léziou. Dáta z génovej expresie sú v procese vyhodnocovania. Čo sa týka regenerácie mozgu, zistili sme, že medzi kontrolnými skupinami 2D a 2W nebol rozdiel. V skupine 2D však jedinca s ležaným striatom mali signifikantne vyšší počet EdU+ buniek v porovnaní s kontrolou. Zvieratá s léziou v skupine 2D mali vyšší počet EdU+ buniek aj

v porovnaní s ledovanými zvieratami zo skupiny 2W. V skupine 2W nebol rozdiel medzi podskupinami v počte EdU+ buniek.

Naše výsledky naznačujú, že k intenzívnej proliferácii nových buniek dochádza relatívne veľmi rýchlo po vytvorení lézie. Po uplynutí dvoch týždňov po lézii sa proces proliferácie výrazne spomalil a dostal sa na úroveň proliferácie pozorovanej v kontrolnej skupine. Zdá sa, že akútny zápal môže mať pozitívny vplyv na neuroregeneráciu danej poškodenej oblasti mozgu.

**Literatúra:**

- [1] Kubikova, L., Bosikova, E., Cvikova, M., Lukacova, K., Scharff, C., & Jarvis, E. D. (2014). Basal ganglia function, stuttering, sequencing and repair in adult songbirds. *Scientific reports*, 4(1), 6590.
- [2] Amanollahi, M., Jameie, M., Heidari, A., & Rezaei, N. (2023). The dialogue between neuroinflammation and adult neurogenesis: mechanisms involved and alterations in neurological diseases. *Molecular neurobiology*, 60(2), 923-959.

**PodĎakovanie:** Táto práca je podporená grantami APVV-20-0344 a VEGA 2/0150/24.

## **Targeting acetyl-CoA carboxylase: A strategy to inhibit lymphocytic choriomeningitis virus replication through lipid metabolism modulation**

Božena Omasta, Tereza Goliaš, Viktória Piatriková, Ingrid Ovečková, Jana Tomášková

*Institute of Virology, Biomedical Research Center of Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak Republic*

In the past two decades, research on virus-host interactions has uncovered how different viral families induce metabolic changes during replication. Viruses depend on host cells for building blocks to produce new virions, as they lack metabolic machinery.

Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), a representative of the *Arenaviridae* family, is commonly used to study the pathogenesis of related viruses that cause hemorrhagic fever. Given the crucial role lipids play in viral infections, our research focuses on how LCMV affects host cell lipid metabolism, specifically investigating the role of acetyl-CoA carboxylase (ACC), a key enzyme in fatty acid synthesis, during LCMV replication.

ACC catalyzes the conversion of citrate-derived acetyl-CoA to malonyl-CoA, which is further used to produce palmitate. Palmitate, the simplest fatty acid, can be elongated to form complex lipids essential for energy storage, membrane construction, and protein modification—processes vital to the viral life cycle.

We first analyzed ACC in MRC-5 cells, a human lung-derived primary cell line. ACC gene expression showed a slight increase at various times post-infection. Notably, a 24-hour pharmacological inhibition of ACC led to a 95% reduction in infectious LCMV virion production, underscoring the enzyme's importance in viral replication. A time-of-drug addition assay revealed that ACC is crucial during the early stages of LCMV infection. However, ACC gene expression remained unchanged during this period, indicating that LCMV influences ACC activity rather than its transcription. Further analysis showed that inhibiting ACC reduced LCMV nucleoprotein and matrix protein levels, underscoring the enzyme's necessity for viral replication. We also observed decreased levels of phosphorylated (inactive) ACC in LCMV-infected cells at later stages, suggesting post-translational regulation of ACC during infection.

To further verify ACC's role in LCMV infection, we employed the CRISPR/Cas9 system to delete the ACC gene in A549 cells (derived from lung cancer) since MRC-5 cells did not survive ACC knockout. ACC expression in A549 cells mirrored that in MRC-5 cells, and phosphorylation levels decreased similarly during LCMV infection. The knockout resulted in a 75% reduction in LCMV propagation, reaffirming the necessity of ACC-catalyzed reactions for successful viral replication.

We also examined the activity of sterol-regulated element binding protein (SREBP), a transcription factor that regulates lipogenic enzymes like ACC. SREBP activity increased in LCMV-infected A549 cells at later infection stages, aligning with the rise in ACC gene expression.

In conclusion, targeting acetyl-CoA carboxylase may effectively disrupt LCMV replication, as the virus depends on ACC-driven lipid metabolism, particularly in the early stages of infection. This suggests ACC could be a promising therapeutic target for LCMV and related viruses.

**Acknowledgement:** This project was supported by VEGA 2/0078/23 and VEGA 2/099/23 grants.

## **Control of asymmetric septum positioning during sporulation in *Bacillus subtilis***

Silvia Žarnovičanová<sup>1</sup>, Katarína Muchová<sup>1</sup>, Evelína Kaloscaiová<sup>1</sup>, Jiří Pospíšil<sup>2</sup>, Zuzana Chromiková<sup>1</sup>, Libor Krásny<sup>2</sup>, Imrich Barák<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbial Genetics, Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava

<sup>2</sup> Laboratory of Microbial Genetics and Gene Expression, Institute of Molecular Biology, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

*Bacillus subtilis* is gram-positive, rod-shaped, spore-forming bacterium that normally divides by binary fission, where the division septum is located between two replicated nucleoids in the middle of the cell and divides the cell in two identical daughter cells. The division at mid-cell site is initiated by localization and polymerization of tubulin homologue FtsZ protein. FtsZ protein polymerizes into a structure known as Z ring that defines the future division site. In response to environmental and nutrient stresses *Bacillus* is capable of differentiation into a dormant cell type – spore [1,2]. Sporulation commences with an asymmetric cell division event, where the septum is formed at 1/6th of the cell length and give rise to two unequal cells, larger mother cell and smaller forespore [3]. Asymmetric positioning of the septum is linked to the membrane, where FtsZ protein together with specific sporulation protein SpoIIIE form Z ring and E ring, respectively. These rings serve as a scaffold for other cell division proteins that are needed for building this septum [4]. SpoIIIE is crucial for precise asymmetric septation together with negative regulators of cell division like RefZ and Min system proteins. Here, we examined and characterized interaction between SpoIIIE and RefZ proteins by using bacterial two hybrid system (BACTH) and size exclusion chromatography assay (SEC). In addition, we followed localization and co-localization of these proteins by fluorescence and structured illumination microscopy (SIM) during early stages of sporulation. Importantly, the nucleoid in the stage I is in the form of axial filament, which is stretched from one pole of the cell to another [5,6]. We hypothesize that nucleoid itself serves as a measuring device of the cell that helps to find the asymmetric division site. As RefZ specifically binds to DNA and interacts with SpoIIIE, we believe that SpoIIIE-RefZ-DNA complex may dictate the position of the asymmetric septum.

### **References:**

- [1] Higgins D., Dworkin J. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. FEMS Microbiol. Rev. 36, p. 131-148 (2012).
- [2] Tan I. S., Ramamurthi K. S. Spore formation in *Bacillus subtilis*. Environ. Microbiol. Rep. 6, p. 212-225 (2014).
- [3] Barák I., Muchová K., The positioning of the asymmetric septum during sporulation in *Bacillus subtilis*. PLoS ONE 13(8), 1-15 (2018).
- [4] Ben-Yehuda S., Losick R. Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. Cell 109, p. 257-266 (2002).

- [5] Bylund J.E., Haines M.A., Piggot P.J., Higgins M.L. Axial filament formation in *Bacillus subtilis*: induction of nucleoids of increasing lengths after addition of chloramphenicol to exponential-phase cultures approaching stationary phase. *J. Bacteriol.* 175, 1886-1890 (1993).
- [6] Ben-Yehuda S., Fujita M., Liu X.S., Gorbatyuk B., Skoko D., Yan J. et al. Defining a centromere-like element in *Bacillus subtilis* by identifying the binding sites for the chromosome-anchoring protein RacA. *Mol. Cell.* 17, 773-782 (2005).

**Acknowledgement:** This work was supported by VEGA Grant No. 2/0001/21 from the Slovak Academy of Sciences, and Grants from the Slovak Research and Development Agency under contracts APVV-18-0104 and APVV-22-0303



## Degradácia sfingolipidov a ich vplyv na mitochondriálnu respiráciu

Zriniová Ingrid, Jan Malínský, Balážová Mária

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

Plazmatická membrána a jej komponenty, ako eizozómy, hrajú kľúčovú úlohu v odpovedi na environmentálne zmeny prostredníctvom regulácie syntézy sfingolipidov. Eizozómy stabilizujú membránové domény bohaté na ergosterol (MCC) a zahŕňajú proteín Pil1, ktorý pri delícii vedie k rozpadu MCC a stimulácii syntézy dlhých sfingolipidových báz (LCB). Proteín Dpl1 degraduje fosforylované LCB na etanolamínfosfát (EtN-P), ktorý sa využíva na syntézu fosfatidyletanolamínu (PE) v Kennedyho dráhe. PE je druhý najčastejší fosfolipid v mitochondriách a je nevyhnutný pre ich štruktúru a produkciu ATP počas oxidatívnej fosforylácie (OXPHOS). Táto štúdia skúma vplyv degradácie sfingolipidov na mitochondriálnu funkciu pri zachovanej de novo syntéze PE v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*.

Naše výsledky ukazujú, že delécia génu *DPL1* výrazne znižuje OXPHOS kapacitu o 61 % čo nebolo pozorované pri deléciách iných génov Kennedyho dráhy. Na základe našich výsledkov sme zistili že, delécia génu *PIL1* nedokáže zachrániť respiračný deficit *dp11Δ* mutanta, pričom delécia génu *NCE102* tento proces opravuje. Možným dôvodom zníženej respirácie v kmeni *dp11Δ* je pravdepodobne nadmerná akumulácia LCB, ktorá by mohla byť toxická. Naša štúdia zdôrazňuje význam interakcie medzi sfingolipidmi a syntézou PE pre optimálnu funkciu mitochondrií.

**PodĎakovanie:** Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V02-00020 a podporená grantami VEGA 2-0030-22, APVV 20-0129 a SAS-NSTC/JRP/2023/773/LipAI.

## **Mitochondrial metabolism of trypanosomatids**

Benediková Katarína, Horváth Anton, Novotná Natália

*Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4, Slovak republic*

The family of trypanosomatids contains exclusively obligate parasites. Based on the type of life cycle, trypanosomatids are subdivided into two non-taxonomic groups - monoxenous and dixenous. Monoxenous species infect single host (mostly insects) and are a significantly more numerous and diverse group compared to the second one. On the other hand, dixenous species switch between two hosts, of which one facilitates their transmission (usually insect or another invertebrate) and second is vertebrate or plant host [1]. Most of the research in the past has dealt with dixenous trypanosomatids cause important human (and animals) diseases. Typical examples of medically relevant genera are *Trypanosoma* spp. causing sleeping sickness in Africa and Chagas disease in South America, and *Leishmania* spp. causing several types of leishmaniasis [2]. Change of hosts and the energy sources affects their bioenergetic metabolism which has been particularly in human pathogens well studied, e.g. oxidative phosphorylation (OXPHOS) enzymes have been biochemically characterized. *T. brucei* is characterized by unusual metabolism, e.g., the Krebs cycle (KC) does not run as a cycle, even though all the coding genes are present [3]. Trypanosomatids have developed unique cellular and molecular mechanisms that are not among the typical textbook examples [1]. For example, an unusual polycistronic arrangement of nuclear genes; a single mitochondrion with all DNA comprised in one place called a kinetoplast; unique arrangement of kinetoplast DNA into a network composed of thousands of minicircles and tens of maxicircles; RNA editing; specific organelles, glycosomes, in which part of glycolysis takes place; the unusual redox system of trypanothione [4]. The number of new non-pathogenic strains available for laboratory studies has increased significantly in recent years [5, 6, 7]. Analysis of their DNA has already yielded unexpected results, for example genome of *Obscuromonas modryi* has the highest content of repetitive elements; the highest proportion of unique DNA is found in the genomes of *Wallacemonas* spp., all three stop codons in nuclear genome of *Blastocrithidia* nonstop are reassigned [7, 8]. Their study may provide insights that will help in the fight against pathogenic species.

In our laboratory, we study the bioenergetic metabolism of trypanosomatids. Here we present the biochemical characterization of the largest group of trypanosomatids to date, which cover all known subgroups of the family. We focus on in vitro measurement of enzyme activities of two important metabolic pathways - the respiratory chain and the Krebs cycle. We present measured activities of selected enzymes of both pathways, and we monitor their connection

by following the oxygen consumption of digitonin-permeabilized cells with substrates entering the Krebs cycle.

**References:**

- [1] Kostygov, A Y et al. OPEN BIOL, (2021) 200407
- [2] Rodrigues, J C F et al. Sub-cellular biochemistry, 74 (2014) 1-42
- [3] Michels, P A M et al. EXP PARASITOL, 224 (2021) 108102
- [4] Lopes, A H et al. OPEN PARASITOL J, 4 (2010), 30-59
- [5] Lukeš, J et al. EUR J PROTISTOL, (2021) 125778
- [6] Kaufer, A et al. PARASITE VECTOR, 10 (2017) 287
- [7] Albanaz, A T S et al. BMC GENOMICS, 24 (2023) 471
- [8] Afonin, D A et al. NUCLEIC ACIDS RES (2024) 3870–3885

**Acknowledgement:** This work was supported by grant agency VEGA 1/0553/21.

## **Štúdium exerkinov a extracelulárnych vezikul z cirkulácie ako mediátorov tumor-supresívneho efektu cvičenia**

**Komárová Jana<sup>1</sup>, Slobodová Lucia<sup>1</sup>, Fialová Ľubica<sup>2</sup>, Ukropec Jozef<sup>1</sup>, Ukropcová Barbara<sup>3</sup>, Kurdiová Tímea<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko*

<sup>2</sup> *Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava, Slovensko*

<sup>3</sup> *Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovensko*

Pravidelná fyzická aktivita je efektívnou prevenciou viacerých chronických ochorení, vrátane niekoľkých typov rakoviny. Pozitívny efekt cvičenia môže byť sprostredkovaný exerkinmi, látkami vylučovanými z buniek rôznych tkanív počas fyzickej aktivity do obehu buď priamo alebo vo väzbe na nosiče. K týmto nosičom môžeme zaradiť aj extracelulárne vezikuly (EV) a ich subtyp exozómy, ktorých koncentrácia v cirkulácii sa zvyšuje práve vplyvom cvičenia. Môžu teda zohrávať dôležitú úlohu ako mediátori inhibičného účinku fyzickej aktivity a cvičenia na vznik a progresiu nádorového ochorenia, vrátane kolorektálneho karcinómu.

Cieľom našej práce bolo (i) sledovať efekt cvičením-kondiciovanej ľudskej plazmy na proliferáciu buniek kolorektálneho karcinómu, a (ii) overiť prítomnosť EV vo vzorkách izolovaných z plazmy a ich schopnosť prechádzať do nádorových buniek.

V experimentoch sme pracovali s bunkovou líniou ľudskeho kolorektálneho karcinómu HCT116. Cvičením-kondiciovanú plazmu sme získali od netrénovaných žien s obezitou (vek: 31,6±1,3 rokov, BMI: 35,4±4,4 kg/m<sup>2</sup>). Na ovplyvnenie buniek sme použili plazmu odobranú nalačno pred, tesne po a 60 min po ukončení jednorazovej fyzickej záťaže (40 min na stacionárnom bicykli pri 65 – 70 % maximálnej srdcovej frekvencii). Proliferácia nádorových buniek bola stanovená metódou BrdU – ELISA. EV z plazmy boli izolované metódou veľkostnej chromatografie a ich prítomnosť sa overovala analýzou trajektórií nanočastíc (NTA) a Western blotom. Schopnosť nádorových buniek prijať vyizolované EV bola stanovená prietokovou cytometriou (FACS) a imunocytochemicky.

Cvičením kondiciovaná ľudská plazma znížila proliferáciu nádorových buniek, a to signifikantne, pri ovplyvnení plazmou získanou 60 min po docvičení ( $p < 0,01$ ;  $n = 14$ ). Metódou NTA sme nepriamo dokázali prítomnosť nanočastíc v nami vyizolovaných vzorkách, vo veľkosti exozómov (EV od 30 do 150 nm), kde sme pozorovali ich zvýšenú koncentráciu vo frakciách S3:  $1,75 \times 10^9$  častíc/ml, v S4:  $1,72 \times 10^9$  častíc/ml a v S5:  $1,4 \times 10^9$  častíc/ml. Priamy dôkaz prítomnosti EV sme získali metódou Western blot použitím protilátky proti tetraspanínu CD63, štandardne využívanému markeru EV. Signál zodpovedajúci flourescenčne, s PKH26 značeným EV, pri meraní pomocou FACS bol 16x zvýšený v nádorových bunkách, ktoré boli 24 h inkubované so značenými EV, ako v bunkách inkubovaných s PBS + PKH26 (kontrola). Vychytávanie EV nádorovými bunkami sme vizualizovali imunocytochemicky na konfokálnom mikroskope. Pri inkubácii s kontrolnou vzorkou (PBS + PKH26) sme nepozorovali prítomnosť EV v bunkách, kým po inkubácii so značenými EV sme videli jasný červený signál v cytoplazme bunky.

Zistili sme, že cvičením-kondiciovaná ľudská plazma má kapacitu znížiť proliferáciu nádorových buniek. Ukázali sme, že dokážeme efektívne izolovať EV/exozómy z ľudskej plazmy, ktoré sú následne schopné prechádzať do nádorových buniek. V ďalšom kroku plánujeme sledovať efekt EV izolovaných z cvičením-kondiciovanej plazmy na proliferačnú kapacitu nádorových buniek.

**Podakovanie:** Realizácia projektu bola finančne podporená grantmi VEGA-2/0144/23, APVV 20-0466, APVV 19-0411 a VEGA-2/0076/22.

## **Multi-omická analýza ako nástroj na odhalenie nových kandidátnych molekúl s potenciálom aktivovať tukové tkanivo**

Lívia Petrisková<sup>1</sup>, Dominika Olešová<sup>1</sup>, Adhideb Ghosh<sup>2</sup>, Aleš Kvasnička<sup>3</sup>, Natália Pálešová<sup>1</sup>, Patrik Štefanička<sup>4</sup>, Lukáš Varga<sup>5</sup>, Alžbeta Jančovičová<sup>1</sup>, Peter Makovický<sup>1</sup>, Dana Dobešová<sup>3</sup>, Lucia Balážová<sup>1</sup>, David Friedecký<sup>3</sup>, Christian Wolfrum<sup>2</sup>, Miroslav Baláž<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biomedicínske centrum SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko

<sup>2</sup> Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zürich, Schorenstrasse 16, 8603 Schwerzenbach, Švajčiarsko

<sup>3</sup> Fakultná nemocnica Olomouc a Lekárska fakulta, Univerzita Palackého, Křížkovského 511/8, 779 00 Olomouc, Česká republika

<sup>4</sup> Nemocnica Bory, Ivana Kadlečíka 2, 841 03 Bratislava, Slovensko

<sup>5</sup> Univerzitná Nemocnica a Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Špitálska 24, 813 72 Bratislava, Slovensko

Obezita je ochorenie charakterizované nadmerným hromadením telesného tuku, ktoré zvyčajne vzniká v dôsledku kombinácie genetických, environmentálnych a behaviorálnych faktorov. Prevalencia obezity v posledných desaťročiach neustále rastie a predstavuje vážny celosvetový zdravotný problém (1). V súčasnosti je zvýšenie metabolickej aktivity tukového tkaniva považované za jednu z najslubnejších stratégií boja proti obezite. Termogénna aktivácia tukového tkaniva predstavuje zaujímavý terapeutický prístup, pretože v dôsledku aktivácie termogenézy dochádza k zvýšeniu energetického výdaja (2). Napriek tomu, že bolo identifikovaných niekoľko bioaktívnych molekúl s potenciálom aktivovať termogenézu tukového tkaniva, žiadna z nich sa v klinických štúdiách neukázala ako účinná (3).

Naším cieľom je identifikácia nových kandidátov s potenciálom zvýšiť metabolickú aktivitu tuku pomocou multi-omickej analýzy párových biopsií ľudského hnedého a bieleného tukového tkaniva.

Vzorky hnedého tukového tkaniva z krku, ktoré vykazujú obohatenie UCP1 mRNA a morfológiu multilokulárnych lipidových kvapiek, spolu s príslušnými biopsiami bieleného podkožného tukového tkaniva od 15 pacientov, ktorí podstúpili operáciu štítnej žľazy, boli podrobené transkriptomikkej (sekvenovanie RNA novej generácie), metabolomickej a lipidomickej (hmotnostná spektrometria) analýze. Po týchto analýzach nasledovala rozsiahla bioinformatická analýza vrátane analýzy aktivity biologických dráh s využitím GO (Gene Ontology), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) a BioPAN analýzy (Bioinformatics Methodology for Pathway Analysis).

Pomocou tohto prístupu sme identifikovali 4174 transkriptov (FDR<0,01), 59 metabolitov (p<0,05) a 240 druhov lipidov (p<0,05), ktoré sú rozdielne regulované medzi ľudským hnedým a bielym tukom. Naše dáta ukazujú obohatenie membránových a mitochondriálnych lipidov v hnedom tuku, zatiaľ čo v bielom tukovom tkanive prevládajú neutrálne glycerolipidy a masné kyseliny. Analýza dráh vychádzajúca z lipidomických dát (BioPAN) identifikovala zvýšenú syntézu fosfatidylserínu a reesterifikáciu triglyceridov v hnedom tuku. Táto analýza zároveň identifikovala gény zodpovedné za rozdiely v lipidomickom zložení a aktivite dráh metabolizmu lipidov, konkrétne DGAT2, PISD, PTDSS1, CHPT1 a PEMT. Okrem toho, multi-omická faktorová analýza ktorá integruje omics dáta a znižuje ich komplexnosť, identifikovala dva faktory, ktoré vysvetľujú takmer 60 % variability medzi hnedým a bielym tukovým tkanivom. Zaujímavé je tiež zistenie, že metabolity a lipidy prispievajú k predikčnej sile identifikovaných

faktorov výrazne viac ako transkripty. Spomedzi metabolitov sú hlavnými znakmi identifikovaných faktorov najmä purínové metabolity.

Naša štúdia poskytuje prvú komplexnú multi-omickú analýzu vzoriek ľudského hnedého a bieleho tukového tkaniva. Zároveň, identifikovala niekoľko nových kandidátnych transkriptov, metabolitov a lipidov s potenciálom riadiť termogénnu aktivitu tukového tkaniva. Na odhalenie úlohy týchto kandidátnych molekúl v kontrole metabolickej aktivity tukového tkaniva sú potrebné ďalšie funkčné štúdie.

**Literatúra:**

1. Phelps, N.H., Singleton, R.K., Zhou, B., Heap, R.A., Mishra A. a kol. (2024). The Lancet. 403(10431):1027–50.
2. Zhu, Y., Liu, W., Qi, Z. (2024). The Journal of Physiology. 602(1):23–48.
3. Choi, Y., Yu, L. (2021). Pharm Res. 38(4):549–67.

**PodĎakovanie:** Táto práca vznikla s podporou grantov SASPRO2 1148/01/02, APVV-22-0291 a VEGA 2/0102/23.

## **Fluorescenčné proteíny a ich aplikácia pri príprave rekombinantných štruktúr z koronavírusu**

Žigová Klaudia<sup>1</sup>, Marčeková Zuzana<sup>1</sup>, Boháčová Viktória<sup>1</sup>, Rebroš Martin<sup>1</sup>, Ďurišová Kamila<sup>2</sup>, Breier Albert<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav biotechnológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

<sup>2</sup> Ústav biochémie a mikrobiológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

Prepuknutie pandémie ochorenia COVID-19 viedlo k zvýšenému záujmu o produkciu rekombinantných proteínov kľúčových pri diagnostike, vývoji vakcín a antivirov. Hrotový proteín vírusu SARS-CoV-2, pomocou svojej receptor viažucej domény (RBD), sprostredkúva interakciu s receptorom angiotenzín-konvertujúci enzým (ACE2) lokalizovaným na povrchu hostiteľských buniek [1]. Práve táto interakcia sa stala jednou z hlavných cieľov vývoja širokospektrálnych antivirov zamedzujúcich vstup vírusu do buniek. Vďaka vysokej konzervovanosti sekvencie RBD sa na ňu zameriava rekombinantná produkcia [2]. Dostupnosť rekombinantnej RBD vo fúznej forme s fluorescenčnými proteínmi uľahčí biochemickú analýzu jej úlohy pri vstupe vírusu do bunky a vizualizáciu mechanizmu interakcie s ACE2 receptorom.

Fluorescenčné proteíny (FP) ako nástroj modernej biológie umožňujú priame pozorovanie molekulárnych procesov v živých systémoch [3]. Jednou z najpopulárnejších aplikácií fluorescenčných proteínov je fúzia s inými proteínmi umožňujúca ich vizualizáciu, lokalizáciu, interakciu či degradáciu v živých systémoch ako aj sledovanie interakcie s inými proteínmi [4]. Ako fúzna značka je používaný zelený fluorescenčný proteín (GFP) vďaka svojej stabilite, neovplyvňuje funkciu ani lokalizáciu fúzneho partnera v organizme alebo bunke. Fluorescenčné proteíny chromofór generujú autokatalyticky postranslačnou modifikáciou ich primárnej aminokyselinovej sekvencie [4], [5]. Červený fluorescenčný proteín (RFP), štrukturálny príbuzný GFP, dopĺňa ostatné spektrálne varianty FP vo viacfarebných aplikáciách. Mechanizmus tvorby červených chromofórov je komplikovanejší ako u GFP-podobných chromofórov. Medzi hlavné výhody RFP patrí nižšia autofluorescencia a menší rozptyl svetla [6].

Cieľom tejto práce je produkcia a intenzifikácia produkcie rekombinantných konštruktov RBD SARS-CoV-2, ktorej gén bol klonovaný v plazmide pET21b-RBD-JA1, ktorý bol darom od Davida Margulies (Addgene plasmid #167126) [7] vo fúzii s GFP alebo RFP v hostiteľskom kmeni *Escherichia coli* BL21(DE3). Intracelulárne naprodukováný proteín je následne izolovaný vo forme inklúzných teliesok a odsolený pre následné aplikácie testovania interakcie s ACE2 receptorom. Zároveň bola uskutočnená extracelulárna produkcia konštruktu RFP-RBD v hostiteľskom kmeni *Pichia pastoris* KM71H-MutS.

### **Literatúra:**

- [1] A. Glasgow et al., "Engineered ACE2 receptor traps potently neutralize SARS-CoV-2", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., roč. 117, č. 45, s. 28046–28055, nov. 2020, doi: 10.1073/pnas.2016093117.
- [2] Y. Dong, T. Dai, Y. Wei, L. Zhang, M. Zheng, a F. Zhou, "A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates", Sig Transduct Target Ther, roč. 5, č. 1, s. 237, okt. 2020, doi: 10.1038/s41392-020-00352-y.
- [3] A. S. Mishin, V. V. Belousov, K. M. Solntsev, a K. A. Lukyanov, "Novel uses of fluorescent proteins", Current Opinion in Chemical Biology, roč. 27, s. 1–9, aug. 2015, doi: 10.1016/j.cbpa.2015.05.002.

- [4] D. M. Chudakov, M. V. Matz, S. Lukyanov, a K. A. Lukyanov, "Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues", *Physiological Reviews*, roč. 90, č. 3, s. 1103–1163, júl. 2010, doi: 10.1152/physrev.00038.2009.
- [5] R. H. Newman, M. D. Fosbrink, a J. Zhang, "Genetically Encodable Fluorescent Biosensors for Tracking Signaling Dynamics in Living Cells", *Chem. Rev.*, roč. 111, č. 5, s. 3614–3666, máj. 2011, doi: 10.1021/cr100002u.
- [6] D. M. Shcherbakova, O. M. Subach, a V. V. Verkhusha, "Red Fluorescent Proteins: Advanced Imaging Applications and Future Design", *Angew Chem Int Ed*, roč. 51, č. 43, s. 10724–10738, okt. 2012, doi: 10.1002/anie.201200408.
- [7] J. Ahmad, J. Jiang, L. F. Boyd, K. Natarajan, a D. H. Margulies, "Synthetic nanobody–SARS-CoV-2 receptor-binding domain structures identify distinct epitopes", 27. január 2021. doi: 10.1101/2021.01.27.428466.

**PodĎakovanie:** Táto práca bola podporená výzvou pre doktorandov a mladých výskumných pracovníkov STU na naštartovanie výskumnej kariéry (Grant 23-04-07-A).



## **Biotechnologický potenciál kvasinky *Rhodotorula toruloides* v produkcii kyseliny punikovej z priemyselného odpadu**

Krajčiová Daniela, Holič Roman

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Centrum biovied SAV, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava

Kyselina puniková je izomér konjugovanej kyseliny linolénovej, ktorý sa prirodzene nachádza v oleji zo semien granátovníka (*Punica granatum*). Vďaka svojim pozitívnym bioaktívnym účinkom má široké možnosti využitia v medicíne a priemysle [1]. Vzhľadom na nízky výťažok oleja zo semien granátovníka sa v posledných rokoch intenzívne skúmajú alternatívne zdroje tejto mastnej kyseliny, najmä možnosti produkcie geneticky upravenými tukotvornými mikroorganizmami [2, 3].

V našej práci sme sa zamerali na štúdium heterológnej produkcie kyseliny punikovej v červenej tukotvornej kvasinke *Rhodotorula toruloides*. Na expresiu génu PgFADX, ktorý je kľúčový pre biosyntézu tejto mastnej kyseliny, sme použili tri rôzne promotory. Skríningom 36 transformantov s náhodne integrovaným génom PgFADX do génomu, sme identifikovali promotorovú sekvenciu H<sup>+</sup>-ATPázy plazmatickej membrány (PMA1) ako najefektívnejšiu. Vybrané kmene sme následne kultivovali na rôznych zdrojoch uhlíka, vrátane priemyselných odpadových produktov, pričom najvyššia produkcia kyseliny punikovej bola dosiahnutá na glukóze (105,77 mg/L) po 72 hodinách a na technickom glycerole (72,81 mg/L) po 168 hodinách kultivácie. Naše výsledky poukazujú na značný biotechnologický potenciál kvasinky *R. toruloides* pre produkciu tejto zriedkavo sa vyskytujúcej mastnej kyseliny v prírode z odpadových substrátov, čo by mohlo predstavovať udržateľnú a ekonomicky výhodnú alternatívu k jej tradičným prírodným zdrojom.

### **Literatúra:**

- [1] Holic R., Xu Y., Caldo K. M. P., et al. (2018) Appl. Microbiol. Biotechnol. 102(8), p. 3537
- [2] Urbanikova V., Park Y.-K., Krajciova D., et al. (2023) Int. J. Mol. Sci. 24(10), p. 8823
- [3] Wang K., Zhou Y., Cao L., et al. (2024) J. Agric. Food. Chem. 72(6), p. 3088

**Pod'akovanie:** Práca vznikla vďaka finančnej podpore grantov APVV-20-0166 a APP0521.

## **Xylanolytické enzýmy – enzýmy degradujúce lignocelulózové materiály**

Dobrovodský Pavol<sup>1</sup>, Ivona Haluzová<sup>1</sup>, Marčeková Zuzana<sup>1</sup>, Šuchová Katarína<sup>2</sup>, Martin Rebroš<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav biotechnológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

<sup>2</sup> Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 5807/9, 845 38, Bratislava, Slovenská republika

Lignocelulózové materiály predstavujú významný udržateľný zdroj na výrobu energie, palív, farmaceutík a iných zlúčenín s pridanou hodnotou v zmysle „BioBased Economy“. Hlavné tri zložky lignocelulózovej biomasy sú celulóza, hemicelulóza a lignín. Dominantná časť hemicelulózy je tvorená rastlinným polysacharidom xylánom, ktorého hlavný reťazec pozostáva z D-xylopyranozidových zvyškov spojených  $\beta$ -1,4-glykozidickými väzbami, pričom na hlavný reťazec môžu byť naviazané rôzne substituenty, ako sú arabinóza, kyselina glukurónová, kyselina ferulová, alebo kyselina p-kumarová, v závislosti od rastlinného pôvodu. [2, 3, 4]

Vzhľadom na heterogenitu a komplexnú chemickú povahu rastlinného xylánu si jeho úplná degradácia na monosacharidové zložky vyžaduje synergické pôsobenie komplexu niekoľkých xylanolytických enzýmov. Xylanolytické enzýmy patria do skupiny glykozid hydroláz, ktoré hydrolyticky štiepia  $\beta$ -1,4-glykozidické väzby medzi dvoma alebo viacerými sacharidickými jednotkami, či väzby medzi sacharidickou zložkou a substituentom nesacharidickej povahy. Na celkovej depolymerizácii xylánu sa spoločne podieľajú  $\beta$ -D-xylozidázy, endo-1,4- $\beta$ -D-xylanázy,  $\alpha$ -L-arabinofuranozidázy,  $\alpha$ -glukuronidázy, acetylxylánesterázy, feruloylesteráza a kumaroylesteráza. [1, 4, 5]

Cieľom práce je rekombinantná produkcia xylanolytických enzýmov s rôznou biologickou aktivitou pochádzajúcich z kvasinkového natívneho zdroja, purifikácia rekombinantných xylanolytických enzýmov a ich enzýmová charakterizácia. V prvom štádiu práce bola úspešne uskutočnená produkcia rekombinantnej  $\beta$ -D-xylozidázy v expresnom hosťiteľskom organizme *Pichia pastoris*. Katalytická aktivita rekombinantnej  $\beta$ -D-xylozidázy bola verifikovaná a kvantifikovaná reakciou s chromogénnym substrátom. Rekombinantná  $\beta$ -D-xylozidáza bola následne čiastočne purifikovaná metódou iónovo-výmennej chromatografie a bolo stanovené teplotné optimum, pH optimum a teplotná stabilita rekombinantnej  $\beta$ -D-xylozidázy.

### **Literatúra:**

- [1] BAJPAI P. 2014. Microbial Xylanolytic Enzyme Systems and Their Properties. Microbial Xylanolytic Enzymes. s. 19-36, Academic Press
- [2] BHARDWAJ N., KUMAR B., VERMA P. 2019. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. Bioresour Bioprocess. 6, s. 1-36

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

## Odborná komisia - kontakty

1.	Mgr. Miroslav Baláž, PhD.	miroslav.balaz@savba.sk
2.	Mgr. Mária Balážová, PhD.	maria.balazova@savba.sk
3.	RNDr. Imrich Barák, DrSc.	imrich.barak@savba.sk
4.	prof. Ing. Albert Breier, DrSc.	albert.breier@stuba.sk
5.	doc. Ing. Boris Lakatoš, PhD.	boris.lakatos@stuba.sk
6.	doc. RNDr. Jan Malínský, Ph.D.	jan.malinsky@iem.cas.cz
7.	prof. RNDr. Peter Račay, CSc.	racay@jfmed.uniba.sk
8.	Ing. Zdena Sulová, DrSc.	zdena.sulova@savba.sk
9.	RNDr. Dušan Žitňan, DrSc.	dusan.zitnan@savba.sk

## Sponzori Drobnicovho memoriálu

	
 <p>Integrované riešenia pre vedecko-výskumné laboratóriá</p>	
	
	
	

DROBNICOV MEMORIÁL 13. ročník  
4. – 6. september 2024  
Chata Trubárka, Trenčín - Kubrica

ISBN 978-80-974246-5-7

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

© Vydal: Centrum biovied, Slovenská akadémia vied, Bratislava 2024