

Centrum biovied, Slovenská akadémia vied, v. v. i.
Občianske združenie Veda a život

DNI MLADÝCH BIOLÓGOV 12. ROČNÍK

Ústav biochémie a genetiky živočíchov

11. jún 2025 Bratislava

Zborník príspevkov

Editori

Mária Balážová, Martin Valachovič

DNI MLADÝCH BIOLÓGOV

12. ročník

11. jún 2025

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Bratislava

ISBN 978-80-974246-7-1

Redakčná úprava: Mária Balážová

© Vydal: Centrum biovied Slovenská akadémia vied, v.v.i - Ústav biochémie
a genetiky živočíchov, Bratislava 2025

ORGANIZAČNÝ VÝBOR:

Mgr. Balážová Mária, PhD.

RNDr. Bilčík Boris, PhD.

PhDr. Klimešová Zuzana

Mgr. Valachovič Martin, PhD.

ČLENOVIA ODBORNEJ KOMISIE:

Mgr. Baláž Miroslav, PhD.

Mgr. Balážová Mária, PhD.

doc. RNDr. Korduláková Jana, PhD.

Mgr. Niederová-Kubíková Ľubica, PhD.

doc. Ing. Olejníková Petra, PhD.

doc. Ing. Rebroš Martin, PhD.

Obsah

PROGRAM:	7
ABSTRAKTY PRÍSPEVKOV	9
SPONZORI PODUJATIA DNI MLADÝCH BIOLÓGOV	43

PROGRAM:

11.6. 2025 (streda)

Registrácia účastníkov od 8:00

8:30 – 8:45 **Martin Valachovič:** Privítanie účastníkov

Sekcia I Biochémia a bunková biológia

Predseda: Jana Korduláková, Mária Balážová

08:45 – 09:00 **Babulic Patrik:** Laktoferín ako spojenec proti nákaze SARS-CoV-2

09:00 – 09:15 **Babulicová Jana:** MikroRNA 133b ako regulátor metabolizmu a proliferácie HCT 116 buniek karcinómu hrubého čreva

09:15 – 09:30 **Dostáľková Natália:** Štúdium potenciálnych zmien v bunkových procesoch po ovplyvnení novosyntetizovanými zlúčeninami na leukemických bunkových líniiach s rôznou expresiou P-glykoproteínu

09:30 – 09:45 **Ďurišová Ivana:** Vplyv kyseliny valproovej na biosyntézu fosfatidylglycerolu v bunkách A549

09:45– 10:00 **Hromádková Terézia:** The effect of mutations in the N-terminal region on the stability and structure of the human ryanodine receptor 2 and their association with cardiac arrhythmias

10:00 – 10:30 PRESTÁVKA NA KÁVU

10:30 – 10:45 **Krepop Jakub:** Vplyv cisplatiny na viabilitu myších leukemických buniek exprimujúcich a neexprimujúcich P-glykoproteín

10:45– 11:00 **Labuda Martin:** Ako fosforylácia ovplyvňuje vlastnosti mitochondriálneho šaperónu Trap1

11:00– 11:15 **Takáčová Ľubomíra:** Chinolizidínový alkaloid – kryptopleurín, a jeho vplyv na leukemické bunky

11:15 – 11:30 **Husieva Valeriia:** Úloha extracelulárnych vezikúl pri vzniku rezistencie na hypometylačné látky

Sekcia II Fyziológia živočíchov a človeka

Predseda: Niederová-Kubíková Ľubica, Baláž Miroslav

11:30 – 11:45 **Buchová Emma:** Neuropeptidy a ich receptory u kliešťov *Ixodes ricinus*

11:45 – 12:00 **Jančovičová Alžbeta:** LATS2 je dôležitý regulátor funkcie hnedých adipocytov, ktorý moduluje aktivitu PPAR γ

12:00 – 13:30 **OBED - PIZZA**

13:30 – 13:45 **Petrisková Livia:** Multi-omika ako nástroj na hľadanie nových molekúl ovplyvňujúcich aktivitu tukového tkaniva

13:45 – 14:00 **Koblišková Andrea:** Molecular analysis and bionomy of specific groups of butterflies

14:00 – 14:15 **Hod'ová Vladimíra:** Úloha neurozápalu v regenerácii striatalneho mozgového tkaniva po neurotoxickej lézii u zebričky červenozobej

14:15 – 14:30 **Plšková Lenka:** Neurogenéza ako indikátor welfaru hydiny

14:30 – 15:00 **Strapec Jakub:** Štúdium účinkov kvercetínu na oxidačný stres, apoptózu, RISK dráhu a ischemicko-reperfúzne poškodenie srdca u starnúcich potkanov

15:00 – 15:30 **PRESTÁVKA NA KÁVU**

Sekcia III Mikrobiológia a biotechnológia

Predseda: Olejníková Petra, Rebroš Martin

15:30 – 15:45 **Kubala Bohuš:** Nový karpatský variant nešpecifickej peroxygenázy produkovaný v *E. coli*

15:45 – 16:00 **Maisto Francesca:** Study of the microbiome and the effects of cleaning and biocidal treatments on granite historical buildings using MinION technology

16:00 – 16:15 **Zriniová Ingrid:** The impact of the eisosomal protein Lsp1 and long-chain base degradation as regulators of mitochondrial functions

16:15 – 16:30 **Lúčan Marek:** Targeting of post-squalene steps of ergosterol biosynthetic pathway to boost squalene accumulation in *Rhodotorula toruloides*

16:30 – 16:45 **Alföldiová Kristína:** Vplyv antifungálnych látok na viabilitu a lipidový profil patogénnej kvasinky *Magnusiomyces capitatus*

17:00 - 18:00 **Zasadnutie poroty**

18:00 – 20:00 **Vyhlasenie výsledkov súťaže a ukončenie 12. ročníka Dni mladých biológov neformálnym posedením**

ABSTRAKTY PRÍSPEVKOV

Laktoferín ako spojenec proti nákaze SARS-CoV-2

Babulic Patrik¹, Ondrovičová Gabriela¹, Pevala Vladimír¹, Bauer Jacob¹, Škrabana Rostislav², Leksa Vladimír¹

¹Ústav molekulárnej biológie SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 21, 84551 Bratislava, Slovensko

²Neuroimunologický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 84510 Bratislava, Slovensko

Koronavírus SARS-CoV-2 spôsobil globálnu pandémiu Covidu-19 [1]. Dnes napriek dostupnej vakcinácii stále predstavuje potenciálne nebezpečenstvo pre vybrané skupiny ľudí. Práve preto pokračuje snaha nájsť vhodné doplnkové molekuly s terapeutickým účinkom. Virión SARS-CoV-2 sa viaže pomocou Spike proteínu na receptor ACE2 hostiteľskej bunky. Následne je Spike proteín štiepený serínovými proteázami hostiteľskej bunky na dve podjednotky S1 a S2. Podjednotka S1 je zodpovedná za väzbu na ACE2 a S2 je zodpovedná za fúziu s membránou hostiteľskej bunky. Inhibíciou TMPRSS2, hlavnou serínovou proteázou štiepiacou Spike proteín, došlo k poklesu infekcie SARS-CoV-2 do hostiteľských buniek [2].

Jednou zo sľubných kandidátnych terapeutických molekúl je laktoferín (LF). Ide o glykoproteín nachádzajúci sa predovšetkým v materskom mlieku a iných telových tekutinách [3]. Laktoferín a laktofericín (LFC), bioaktívny peptid, ktorý sa prirodzene odštiepuje z N-konca LF, znižujú mieru infekcie do hostiteľských buniek. Inhibíciou serínovej proteázy TMPRSS2, LFC znížil mieru infekcie hostiteľských buniek. Samotný LF neinhiboval TMPRSS2, no napriek tomu znížil mieru infekcie [4]. V in silico experimentoch bola navrhnutá možnosť priamej interakcie medzi LF a Spike proteínom [5].

Cieľom našej práce bolo overiť túto možnú priamu interakciu. Pomocou proteín-proteínových väzobných analýz sme potvrdili, že po pridaní LF k Spike proteínu, ako aj k receptor viažucej doméne (RBD) spike proteínu dochádza k inhibícii väzby na receptor ACE2, na heparán sulfát proteoglykány a na albumín z ľudského séra. Testovali sme účinok ľudského a boviného LF, pričom sme pozorovali rozdiely v intenzite ich účinku. Následne sme pomocou peptidov odvodených zo sekvencie LF zistili, že najsignifikantnejší pokles signálu zo Spike proteínu bol pri použití peptidu z N-konca proteínu LF. Pomocou dvojrozmernej BN/SDS PAGE elektroforézy sme pozorovali nové proteínové signály vo vzorkách komplexu RBD:LF (molárny pomer 2:1). Tento komplex sme v druhom rozmere rozdelili na jednotlivé proteíny, pričom oba proteínové signály sa nachádzali pod sebou, čo potvrdzuje tvorbu komplexu [6]. Presné interakčné miesto sme sa rozhodli zistiť pomocou proteínovej kryštalizácie a následnej röntgenovej difrakčnej analýzy.

V kryštalizácii proteínového komplexu pokračujeme, doposiaľ sme boli schopní vykryštalizovať ľudský rekombinantný LF exprimovaný v ryži, ktorého štruktúra ešte nebola stanovená. Pomocou softwarového balíka CCP4 sme definovali a vyriešili štruktúru, ktorú sme použili ako základ pre molekulové simulácie využitím softwaru ClusPro. Z proteínovej databázy PDB sme vybrali 3 štruktúry Spike proteínu (6VSB; 6VYB; 6VXX) a vygenerovali sme 10 predikcií pre každú kombináciu. Okrem toho sme vygenerovali predikcie pre ďalších 12 štruktúr LF zahrňujúcich aj LF z rôznych druhov zvierat, dosahujúc celkový počet 390 predikcií. Pomocou softwaru PyMol sme vizualizovali tieto predikcie a vyselektovali tie, ktoré

spĺňali vopred stanovené podmienky. Následne sme tieto predikcie analyzovali v softwari PDBePISA, aby sme zistili, ktoré aminokyseliny sa nachádzajú v interakčnom mieste. Väčšina predikcií ukázala, že LF interaguje pomocou N-terminálnej domény s S1 podjednotkou Spike proteínu. Tento výsledok je v súlade s našimi výsledkami v in vitro experimentoch.

V budúcnosti sa zameriame na peptidy LFC z rôznych druhov zvierat a na ich vzájomné odlišnosti v schopnosti inhibície väzby Spike proteínu s receptorom ACE2, vďaka čomu chceme navrhnúť optimálny/e peptid/y, ktoré by boli využité v in vitro experimentoch.

Tento projekt bol podporený grantami: Plán obnovy 09I03-03-V02-00047; Doktogrant APP0655; APVV-20-0513 VEGA 01/0426/24

- [1] Wu F, Zhao S, Yu B, et al. Nature. 2020 Apr;580(7803):E7
- [2] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al.. Cell. 2020;181(2):271-280.e8
- [3] Ohradanova-Repic A, Praženicová R, Gebetsberger L, et al. Pharmaceutics. 2023;15(4):1056
- [4] Ohradanova-Repic A, Skrabana R, Gebetsberger L, et al. Front Immunol. 2022;13:958581
- [5] Campione E, Lanna C, Cosio T, et al. 2021;12:666600
- [6] Babulic P, Cehlar O, Ondrovičová G, et al. Pharmaceutics (Basel). 2024;17(8):1021

MikroRNA 133b ako regulátor metabolizmu a proliferácie HCT 116 buniek karcinómu hrubého čreva

Babulicová Jana¹, Baláž Miroslav¹, Ukropec Jozef¹, Ukropcová Barbara^{1,2}, Kurdiová Tímea¹

¹Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko

²Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovensko

MikroRNA 133b (miR-133b) je svalovo-špecifická mikroRNA, ktorá sa podieľa na diferenciácii a regenerácii kostrového svalstva. Okrem fyziologických funkcií zohráva miR-133b úlohu aj v progresii nádorových ochorení, vrátane kolorektálneho karcinómu, kde je znížená v porovnaní s okolitým zdravým epitelom [1]. Zníženie miR-133b je asociované so zvýšenou invazivitou a metastatickým potenciálom buniek [2]. V našich experimentoch sme skúmali účinok miR-133b na nádorovú líniu HCT 116 s cieľom objasniť jej funkciu v regulácii proliferácie a bunkového metabolizmu.

Nádorové bunky HCT 116 sme transfekovali s miR-133b mimikom (30nM), inhibítorom (50nM) alebo s ich príslušnými negatívnymi kontrolami. Stanovili sme mieru bunkovej proliferácie využitím BrdU a MTT esejí v čase 0h, 24h, 48h a 72h po transfekcii. Metabolické parametre glykolýzy a mitochondriálnej respirácie boli stanovené pomocou Seahorse XF Analyzéry. Spotreba glukózy a tvorba laktátu bola stanovená z bunkového média 48h po transfekcii. Expresia vybraných génov zapojených do proliferácie a apoptózy (HDAC4, IL-6, IL-8, LIF, SIRT1, SRF, TIMP1, TP53), metabolizmu (CS, PRKAA1) a angiogenézy (VEGF), bola stanovená pomocou qPCR.

Proliferácia buniek HCT 116 sa po pridaní miR-133b znížila po 72 h od transfekcie (BrdU, MTT, $p < 0.01$). Tento efekt bol sprevádzaný zníženým vychytávaním glukózy z média ($p < 0.001$) bez zmeny tvorby laktátu. Pozorovali sme aj pokles bazálnej glykolýzy, sprevádzaný zvýšením glykolytickej rezervy ($p < 0.001$). Zníženie sme zaznamenali aj pri bazálnej spotrebe kyslíka, ako aj pri respirácii spojenej s tvorbou ATP ($p < 0.05$), za súčasného zvýšenia maximálnej respirácie ($p < 0.01$) a rezervy respiračnej kapacity ($p < 0.001$). Expresia génov sa znížila pre SIRT1 a TP53 ($p < 0.01$), zatiaľ čo expresia HDAC4, LIF a SRF bola zvýšená ($p < 0.001$). V prípade IL-6, IL-8, TIMP1, CS, PRKAA1 a VEGF mRNA sme nepozorovali žiadne zmeny.

Inhibícia miR-133b neovplyvnila proliferáciu buniek, pravdepodobne v dôsledku jej nízkej bazálnej hladiny v HCT 116. Mierne zvýšenie glukózovej spotreby z média ($p < 0.05$) bolo sprevádzané zvýšenou maximálnou respiráciou, ako aj vyššou rezervou respiračnej kapacity ($p < 0.01$). Génová expresia odhalila zvýšenie TP53, SRF a VEGF mRNA ($p < 0.05$).

Získané výsledky naznačujú, že miR-133b funguje ako supresor proliferácie nádorových buniek karcinómu hrubého čreva a ovplyvňuje ich metabolický profil, najmä znížením bazálneho metabolizmu bez ovplyvnenia ich metabolickej rezervy. Tento efekt môže byť

sprostredkovaný reguláciou transkripčných faktorov (SRF), deacetyláz (SIRT1, HDAC4) a génov spojených s proliferáciou a apoptózou (p53, LIF).

Tento projekt bol podporený grantmi VEGA-2/0144/23, APVV 19-0411 a APVV 23-0604.

[1] Lv L.; Zhou J.; Lin C. *Oncol. Lett.* 2015, 10:907-912.

[2] Wang X.; Bu J.; Liu X. *Oncotarget.* 2017, 8:63935-63948.

Štúdium potenciálnych zmien v bunkových procesoch po ovplyvnení novosyntetizovanými zlúčeninami na leukemických bunkových líniiach s rôznou expresiou P-glykoproteínu

Dostáľková Natália

FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Akútna myeloidná leukémia (AML) je závažné ochorenie krvi postihujúce najmä starších dospelých, charakteristické vysokou biologickou variabilitou. Významnou prekážkou v liečbe AML je viaclieková rezistencia, často sprostredkovaná nadexpresiou P-glykoproteínu (P-gp), ktorý znižuje účinnosť chemoterapie aktívnym vylučovaním cytotoxických látok z buniek. Klinické využitie inhibítorov P-gp je však obmedzené pre ich nežiadúce účinky. V posledných rokoch sa preto pozornosť sústreďuje na prírodné látky a známe liečivá s potenciálom modulovať túto rezistenciu. Jedným zo sľubných kandidátov je amantadín – lipofilná zlúčenina pôvodne určená na liečbu chrípky a Parkinsonovej choroby. Táto práca skúma účinok jeho derivátov na viacliekovú rezistenciu pri AML.

V experimentálnej časti bola hodnotená cytotoxicita dvoch derivátov amantadínu (E-A1 a E-A2) na AML bunkových líniiach (leukémie (SKM-1, SKM-1/VCR, MOLM-13, MOLM-13/VCR) a zdravých embryonálnych kardiomyocytoch potkana (H9C2) pomocou testu MTT. E-A1 nevykazoval významnú cytotoxicitu, čo sa pripisuje jeho slabej rozpustnosti (overenej pomocou fluorescenčnej mikroskopie), nízkej bunkovej priepustnosti a nepolárnej štruktúre. Oproti tomu E-A2 preukázal výrazný cytotoxický účinok, najmä pri vyšších koncentráciách, pričom jeho účinnosť súvisela s lepšou rozpustnosťou a možnou tvorbou aktívnych metabolitov. Derivát E-A2 vykazoval špecifickejší účinok na AML bunky, dravé kardiomyocyty boli ovplyvnené minimálne.

Cytometrická analýza ukázala, že E-A2 indukuje najmä nekrózu leukemických buniek, čo poukazuje na nevratné poškodenie bunkových štruktúr. Najvýraznejší efekt bol pozorovaný pri rezistentnej línii SKM-1/VCR. Analýza retencie kalceínu preukázala, že E-A2 neinhibuje P-gp a pravdepodobne nie je jeho substrátom, keďže fluorescenčný signál zostával stabilný vo všetkých líniiach, na rozdiel od pozitívnej kontroly tariquidaru.

Western blot analýza potvrdila expresiu P-gp výhradne v rezistentných líniiach, s vyššou hladinou u SKM-1/VCR. Derivát E-A2 zároveň indukoval expresiu LC3B a lipidovaného LC3-II, čo poukazuje na aktiváciu autofágie, najmä v nerezistentných bunkách. Dominantný výskyt nekrózy však naznačuje, že ide skôr o neúplný alebo narušený proces autofágie, spojený so stresom a poškodením bunkových membrán a mitochondrií.

Pomocou real-time PCR bola zaznamenaná zvýšená expresia génu TP53, najmä v rezistentných líniiach, čo poukazuje na bunkovú stresovú odpoveď. Paralelne došlo aj k zvýšeniu expresie anti-apoptotického génu BCL-2, pričom v SKM-1/VCR stúpila aj expresia BAX. Výsledný pomer BAX/BCL-2 potvrdil prevahu anti-apoptotických mechanizmov v rezistentných bunkách a pro-apoptotických dráh v nerezistentných. V prípade MOLM-13 boli

výsledky variabilnejšie. Miernе zvýšenie expresie ABCB1 pri nižších koncentráciách E-A2 v nerezistentných líniiach naznačuje adaptívnu odpoveď na prítomnosť cudzej látky.

Táto záverečná práca vznikla s podporou projektov: grant VEGA-2/0030/23 a VEGA2/0046/24.

(1) Wachter, F. a Pikman, Y., 2024. Pathophysiology of Acute Myeloid Leukemia. *Acta Haematologica*, 147(2), pp.229–246. doi:10.1159/000536152.

(2) Pilotto Heming, C., Muriithi, W., Wanjiku Macharia, L., Niemeyer Filho, P., Moura-Neto, V., Aran, V., 2022. P-glycoprotein and cancer: What do we currently know? *Heliyon*. 8(10), e11171. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e11171

(3) U.S. National Library of Medicine, n.d. Amantadine. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database.

Vplyv kyseliny valproovej na biosyntézu fosfatidylglycerolu v bunkách A549

Đurišová Ivana, Balážová Mária

Centrum biovied SAV v.v.i., Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Oddelenie biomembrán,
Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika

Pľúcny surfaktant sa podieľa na výmene plynov znižovaním povrchového napätia počas nádychu a zabráňovaním alveolárnemu kolapsu počas výdychu. Okrem svojej mechanickej úlohy má aj imunoregulačné vlastnosti. Dokáže potláčať nadmernú zápalovú odpoveď v pľúcach, ktorá vedie k rôznym fyziologickým poruchám. Jednou zo zložiek tejto obrannej reakcie je fosfolipid známy ako fosfatidylglycerol (PG). Pomáha predchádzať neadekvátne silným zápalovým stavom, ktoré zhoršujú alveolárnu výmenu plynov. Počas bakteriálnych infekcií PG súťaží s lipopolysacharidom (LPS) o väzbové miesto na receptore TLR4, čím narúša LPS-sprostredkovanú aktiváciu tohto receptorového systému. Týmto mechanizmom zohráva PG zásadnú úlohu v bunkovej odpovedi na patogény, pretože bráni tvorbe zápalových cytokínov ako tumor nekrotizujúci faktor α (TNF α) alebo interleukín 8 (IL-8), a tým tlmí zápal. Tento protizápalový efekt je sľubný najmä pre pacientov trpiacich syndrómom akútnej respiračnej tiesne (ARDS), ktorý vzniká ako dôsledok nadmernej imunitnej reakcie. Zvýšené koncentrácie cytokínov môžu spôsobiť tzv. cytokínovú búrku, ktorá výrazne zvyšuje riziko zlyhania viacerých orgánov a následnej smrti.

Jedným z potenciálnych regulátorov hladiny PG v bunkách je kyselina valproová (VPA). Ide o liečivo, ktoré sa už viac než polstoročie používa pri terapii epilepsie a bipolárnej poruchy. VPA vykazuje široké spektrum účinkov na bunkové procesy, pričom jeho presný molekulárny mechanizmus pôsobenia zostáva stále neúplne objasnený. Medzi jeho známe účinky patrí aj nepriamy zásah do biosyntézy fosfolipidov v kvasinkách. Podávanie VPA vedie k zníženiu intracelulárnej koncentrácie inozitolu prostredníctvom inhibície enzýmu myo-inozitolsyntázy (MIPS), ktorý predstavuje limitujúci krok v dráhe de novo syntézy inozitolu. Zníženie hladiny inozitolu následne vedie k aktivácii syntázy Pgs1 prostredníctvom jej defosforylácie, čo spôsobuje nárast PG v bunke. Napriek týmto poznatkom zatiaľ nie je preskúmaný účinok VPA na syntézu PG v ľudských bunkách.

Zvýšenie koncentrácie PG v pľúcnom surfaktante by malo zamedziť neprimeranej imunitnej reakcie buniek. Jednou z možností, ako navýšiť množstvo PG, je aplikácia surfaktantu priamo do alveol pacientov, čo však predstavuje technicky náročný zásah. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli otestovať alternatívny prístup, ovplyvniť biosyntézu PG pomocou podania VPA do ľudskej nádorovej línie buniek A549.

Naším prvotným cieľom bolo študovať schopnosť VPA zvýšiť hladinu PG v bunkách a v médiu. Zároveň sme skúmali vplyv VPA na zloženie molekulárnych druhov fosfolipidov nachádzajúcich sa v kultivačnom médiu. Nakoniec sme sledovali ako médium z ovplyvnených buniek A549 tlmí zápal v makrofágoch U937.

Táto práca vznikla s podporou VEGA 2/0030/22, SAS-NSTC/JRP/2023/773/LipAI, APVV-20-0129 a DOKTOGRANT APP0506.

The effect of mutations in the N-terminal region on the stability and structure of the human ryanodine receptor 2 and their association with cardiac arrhythmias

Hromádková Terézia^{1,2}, Vladena Bauerová Hlinková¹, Jacob Bauer¹

¹Ústav molekulárnej biológie SAV, v.v.i., Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika, ²Prírodovedecká fakulta, Katedra gentiky, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika

The regulation in human cardiac muscle cells is primarily mediated by the human ryanodine receptor 2 (hRyR2). hRyR2 is a large Ca²⁺ channel that mediates the transfer of Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum to the cytosol of cardiomyocytes. hRyR2 consists of four monomers, each composed of 10 domains. In the N-terminal domain (NTD), where approximately 70 point mutations associated with arrhythmias have been identified. Mutations in the NTD cause several cardiologic disorders, primarily CPVT1 and ARVC/D2. In our study, we focused on the biophysical characterization of hRyR2 NTD in its wild-type and mutant forms. We successfully expressed and purified wild-type and M81L and L433P mutant fragments of the hRyR2 NTD. We also verified their fold by CD spectroscopy and determined their thermal stability by nanoDSF. We found that the M81L mutation increases the thermal stability and the L433P mutation reduces the solubility of hRyR2 NTD, affects its oligomeric state, and alters the structure of this domain.

VEGA 2/0081/24

- [1] Inui M., Saito A., Fleischer S. (1987) J Biol Chem. 262(32), p. 15637
- [2] Peng W., Shen H., Wu J., et al. (2016) Science. 354(6310), p. 5324
- [3] Eisner D. A., Caldwell J. L., Kistamás K., et al. (2017) Circ. Res. 121(2), p. 181
- [4] Bauerová-Hlinková V., Bauer J., Hostinová E., et al. (2011) Bioinformatics Domain Structure Prediction and Homology Modeling of Human Ryanodine Receptor 2. In: Mahmood A. M. (ed.) Bioinformatics-Trends and Methodologies. IntechOpen, Spojené Kráľovstvo, p. 325
- [5] Landstrom A. P., Dobrev D., Xander H. T. W. (2017) Circ Res. 120(12), p. 1969
- [6] Bezzerides V. J., Caballero A., Wang S., et al. (2019) Circ. Res. 140, p. 405
- [7] Romero J., Mejia/Lopez E., Manrique C., et al. (2013) Clin. Med. Insights Cardiol. 7, p.97
- [8] Bauerová-Hlinková V., Hostinová E., Gašperík J. (2010) Protein Expr Purif. 71(1-3), p. 33
- [9] Borko L., Bauerová-Hlinková V., Hostinová E., Gašperík J., Beck K., Lai F.A., Zahradníková A., Ševčík J. (2014) Acta Cryst. D70, p. 2897-2921.

Vplyv cisplatiny na viabilitu myších leukemických buniek exprimujúcich a neexprimujúcich P-glykoproteín

Krepop Jakub¹, Mário Šereš¹, Zdena Sulová¹, Albert Breier², Lucia Pavlíková¹

¹Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied, Slovenská akadémia vied, Dúbravská Cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovensko

²Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Viacieková rezistencia (MDR) je jednou z hlavných prekážok pri chemoterapeutickej liečbe nádorových ochorení. Nádorové bunky s viaciekovo rezistentným fenotypom nereagujú na široké spektrum chemoterapeutík, ktoré sa líšia molekulárnou štruktúrou a mechanizmom účinku. MDR fenotyp je súhrou mnohých mechanizmov, medzi najčastejšie pozorované patria nadmerná expresia membránových efluxných púmp z rodiny ABC transportérov, zmeny v metabolických dráhach, zmeny v expresii regulačných proteínov bunkového cyklu, autofágia a apoptózy. V práci sme sa zamerali na sledovanie vplyv chemoterapeutika prvej generácie-cisplatiny na viabilitu a spôsob bunkovej smrti leukemických buniek. Ako model sme použili myšiu leukemickú bunkovú líniu L1210, materské bunky neexprimujúce P-gp (S) a z nich odvodené bunky exprimujúce P-gp: rezistentné na vinkristín (R), imatininb (Sima) a docetaxel (Sdoce). R a Sima bunky majú zvýšenú senzitivitu voči cisplatine v porovnaní s S a Sdoce bunkami. Zvýšená senzitivita R a Sima buniek je pravdepodobne spojená so zníženou expresiou antiapoptického proteínu Bcl-XL v týchto bunkách. Čo potvrdila aj kultivácia S a Sdoce buniek v prítomnosti inhibítora Bcl-XL, ktorý zvýšil senzitivitu týchto buniek voči cisplatine.

Kľúčové slová: viacieková rezistencia, anti- a pro-apoptické proteíny, autofágia, ALL

Podakovanie: Táto práca vznikla s podporou grantov VEGA-2/0141/22, VEGA-2/0030/23 a VEGA-2/0046/24

1. Villedieu, M., Louis, M-H., Dutoit S., Brotin E., Lincet H., Duigou F., Staedel, C., Gauduchon, P., Poulain, L. (2007). Absence of Bcl-xL down-regulation in response to cisplatin is associated with chemoresistance in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol.* 105(1):31-44
2. Maji, S., Panda, S., Samal, S. K., Shriwas, O., Rath, R., Pellicchia, M., Emdad, L., Das, S., K., Fisher, P. B., Dash, R. (2018). Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. *Advances in cancer research*, 137, 37–75

Ako fosforylácia ovplyvňuje vlastnosti mitochondriálneho šaperónu Trap1

Labuda Martin, Henrieta Havalová, Gabriela Ondrovičová, Lucia Martináková, Nina Kunová, Eva Kutejová, Vladimír Pevala

Slovenská akadémia vied, v. v. i., Ústav molekulárnej biológie, Oddelenie biochémie a štruktúry proteínov, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika

Úvod a formulácia cieľa

Mitochondriálny šaperón Trap1 je významným regulátorom mitochondriálnej a tým aj bunkovej homeostázy. Svojou aktivitou Trap1 pomáha skladať klientske proteíny do aktívnej formy a ochraňuje ich pred denaturáciou a agregáciou. Trap1 tak ovplyvňuje činnosť desiatok rôznych druhov proteínov, ktoré sú súčasťou energetického metabolizmu, integrity mitochondriálnej membrány, apoptózy, ochrany pred stresovými faktormi a iných biologických procesov [1 – 3].

V prípade deregulácie jeho aktivity sa Trap1 podieľa aj na patologických procesoch. Nadmerná aktivita tohto šaperónu bola pozorovaná vo viacerých typoch nádorových buniek, ktoré jeho cytoprotektívne schopnosti využívajú na prispôsobenie sa nehostinným podmienkam hostiteľského organizmu a na vyhýbanie sa apoptóze. Zvýšenú aktivitu Trap1 môžu nádorové bunky dosahovať aj posttranslačnými modifikáciami, ktoré menia vlastnosti cieľových proteínov. Z posttranslačných úprav proteínov je najčastejšou fosforylácia, schopná rýchlo, efektívne a reverzibilne modulovať vlastnosti proteínov. Aj v prípade Trap1 boli pozorované posttranslačne modifikované, a to najmä fosforylované verzie tohto proteínu vo viacerých druhoch nádorových buniek [4 – 6].

V rámci tejto štúdie sme sa preto zamerali na analýzu vplyvu fosforylácie na vlastnosti Trap1, pričom predmetom nášho skúmania sa stali fosfo-verzie Trap1 vyskytujúce sa vo vzorkách nádorových buniek.

Výsledky a diskusia

Pomocou metódy ortogonálneho translačného systému (OTS) sa nám podarilo pripraviť a izolovať všetky tri fosforylované verzie proteínu Trap1, vrátane dvoch fosfo–serínových mutantov pS511 a pS568 a jednej fosfo–mimikujúcej verzie pCMF-Y498 v dostatočnom množstve potrebnom na ďalšie analýzy [7 – 8].

Signifikančný vplyv fosforylácie na vlastnosti Trap1 sme zaznamenali najmä pri analýze šaperónovej udržiavacej aktivity, pomocou ktorej šaperón zachováva klientske proteíny v aktívnej forme a chráni ich pred agregáciou aj v čiastočne denaturačných podmienkach. Účinok fosforylácie na vlastnosti Trap1 sa líšil v prípade interakcií s rôznymi klientskymi proteínmi, no vo všeobecnosti sme pozorovali zvýšenú aktivitu fosfoserínových mutantov pS568 a pS511 v porovnaní s divým typom, zatiaľ čo fosfotyrozínová verzia pCMF-Y498, vykazovala podobnú šaperónovú aktivitu v porovnaní s divým typom cieľového proteínu.

V prípade efektu Trap1 na enzýmovú aktivitu glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (G6PDH) sme pozorovali až trojnásobnú mieru aktivity fosfo-verzie pS568 a dvojnásobnú mieru aktivity pS511 v porovnaní s divým typom.

Ďalším krokom v rámci predmetnej štúdie bude analýza refoldázovej a ATP-ázovej aktivity Trap1 ako aj analýza vplyvu vybraných inhibítorov na funkciu tohto proteínu.

Záver

V rámci tejto štúdie sa nám podarilo úspešne pripraviť tri fosforylované verzie mitochondriálneho šaperónu Trap1, ktoré sa podľa databázy PhosphoSitePlus vyskytujú v ľudských nádoroch, a u ktorých sa na základe doterajších poznatkov predpokladala zvýšená aktivita predmetného proteínu. Pripravené fosfo-mutanty proteínu Trap1 sa nám podarilo izolovať a purifikovať v dostatočnom množstve a čistote na analýzu ich vlastností. Na základe porovnania vlastností spomenutých fosfoserínových verzií s divým typom Trap1 sme potvrdili hypotézu o ich zvýšenej šaperónovej aktivite. Potvrdili sme tak zásadný vplyv fosforylácie na vlastnosti proteínov, ako aj významný vplyv miesta fosforylácie v rámci cieľového proteínu.

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaM SR a SAV (VEGA 2-0069-23).

- [1] Yoshida S., Tsutsumi S., Muhlebach G, et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 110(17), p. 1604
- [2] Sciacovelli M., Guzzo G., Morello V., et al. (2013) Cell metab., 17(6), p. 988
- [3] Cannino G., Urbani A., Gaspari M., et al. (2022) Cell death differ., 29(12), p. 2335
- [4] Joshi A., Ito T., Picard D., et al. (2022) Biomolecules, 12(7), p. 880
- [5] Masgras I., Laquatra C., Cannino G., et al. (2021) Semin. cancer biol., 76, p. 45
- [6] Rasola A., Neckers L., Picard D. (2014) Trends cell biol., 24(8), p. 455
- [7] Rogerson D. T., Sachdeva A., Wang K., et al. (2015) Nat. Chem. biol, 11(7), p. 496
- [8] Xie J., Supekova L., Schultz P. G. (2007) ACS chem. Biol., 2(7), p. 474

Chinolizidínový alkaloid – kryptopleurín, a jeho vplyv na leukemické bunky

Takáčová Ľubomíra, Špaldová Jana, Šofranková Lucia

FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Chinolizidíny sú prírodné alkaloidy, vyskytujúce sa prevažne v rámci čeľade Leguminosae a v rode *Lupinus* a *Sophora*(1). Ich charakteristická štruktúra pozostáva z dvoch kondenzovaných šesťčlánkov, ktoré zdieľajú atóm dusíku a majú rozmanité spektrum bočných substituentov(2). Medzi fenantrochinolizidíny patrí aj kryptopleurín. O tento prírodný alkaloid vzrástol záujem po objavení pre jeho anti-amebicídne, anti-vírusové a protizápalové účinky. 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- κ B, ako aj regulačných proteínov bunkového cyklu(3,4). Vďaka týmto vlastnostiam je to sľubná látka pri terapii akútnej myeloidnej leukémii (AML) aj pri bunkách s viacliekovou rezistenciou (MDR)(5). AML je malígne ochorenie, postihujúce deti a dospelých, ku ktorému dochádza pri chybe v regulačných procesoch v myeloidnej vetve krvotvorných buniek. Následkom tejto poruchy je ich nesprávna diferenciácia a nekontrolovateľná proliferácia(6).

Preto sme pri našej práci ako experimentálny model využili ľudské bunkové línie SKM-1 a MOLM-13 a myšiacu malígnu bunkovú líniu akútnej lymfocytovej leukémie L1210. Taktiež sme využili aj ich sublínie SKM-1/VCR a MOLM-13/VCR, R a T vyznačujúce sa expresiou P-glykoproteínu. Všetky línie sme inkubovali s kryptopleurínom v koncentračnom rozpätí od 0,25 až 2,5 ng/ml počas 24 a 48 hodín. V práci sme sa venovali aj vplyvu kryptopleurínu na nerakovinové bunkové línie. Jeho cytotoxicitu sme zisťovali pomocou MTT metódy, pričom na jej overenie sme využili elektroforézu DNA (pozorovali sme vznik typických apoptotických rebríkov). Následne sme sa v práci venovali aj sledovaniu expresie vybraných génov zapojených do apoptózy po ovplyvnení kryptopleurínom s využitím RT-PCR reakcie a zároveň na sme pozorovali zmenu expresie génov pomocou qPCR a Western blotu.

Pri sledovaní typu bunkovej smrti sme zistili, že väčšia časť populácie bunkovej línie SKM-1, MOLM-13 a L1210 spadala medzi apoptotické alebo nekrotické, pričom sme našli závislosť medzi zvyšujúcou sa koncentráciou kryptopleurínu a viabilitou buniek. Pri RT-PCR reakciách sme pozorovali zvýšenú expresiu pro-apoptotických génov so zvyšujúcou sa koncentráciou kryptopleurínu a s jeho dobou inkubácie. Naopak, expresia anti-apoptotických génov klesala alebo sa výrazne nemenila. Kaspázy, ktoré sú zapojené v apoptotických dráhach menovite casp-3, -8 a -9, sme ďalej sledovali aj pomocou qPCR a Western blot analýzy na bunkových liniách L1210, kde sme zistili najvýraznejšie zmeny expresie génov kaspáz-8 a -9 a to hlavne po ovplyvnení najvyššími koncentraciami kryptopleurínu (1 a 2,5 ng/ml).

Táto práca vznikla s podporou grantov VEGA 2/0171/21, VEGA 2/0030/23, VEGA2/0046/24, APVV-19-0093 a APVV-19-0094.

1. Frick, K. M., Kamphuis, L. G., Siddique, K. H. M., Singh, K. B. & Foley, R. C. Quinolizidine alkaloid biosynthesis in lupins and prospects for grain quality improvement. *Frontiers in Plant Science* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00087> (2017)
2. Cely-Veloza, W., Kato, M. J. & Coy-Barrera, E. Quinolizidine-Type Alkaloids: Chemodiversity, Occurrence, and Bioactivity. *ACS Omega* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c02179> (2023)
3. Jin, H. R. et al. Cryptopleurine targets NF- κ B pathway, leading to inhibition of gene products associated with cell survival, proliferation, invasion, and angiogenesis. *PLoS One* 7, (2012).
4. Kolosova, O. et al. Structural characterization of cephaeline binding to the eukaryotic ribosome using Cryo-Electron Microscopy. *Biopolym Cell* 39, (2023)
5. Yang, X. et al. Antitumor agents 288: Design, synthesis, SAR, and biological studies of novel heteroatom-incorporated antofine and cryptopleurine analogues as potent and selective antitumor agents. *J Med Chem* 54, (2011)
6. Aung, M. M. K., Mills, M. L., Bittencourt-Silvestre, J. & Keeshan, K. Insights into the molecular profiles of adult and paediatric acute myeloid leukaemia. *Molecular Oncology* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12899> (2021)

Úloha extracelulárnych vezikúl pri vzniku rezistencie na hypometylačné látky

Husieva Valeriia¹, Kristina Simonovicova¹, Zuzana Kozovska³, Andreas Nicodemou⁴,
Helena Kavcova¹, Albert Breier^{1,2}, Lucia Messingerova^{1,2}

¹Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied, Slovenská akadémia vied,
Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovensko

²Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav biochémie a mikrobiológie, Slovenská
technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko, ³Ústav
vyskumu rakoviny, Centrum biomedicínskeho vyskumu, Slovenská akadémia vied, Dúbravská
cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovensko

⁴Lekárska fakulta, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Univerzita
Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovensko

Extracelulárne vezikuly (EVs) sú membránov obalené častice uvoľňované všetkými bunkami, ktoré uľahčujú komunikáciu. EVs prenášajú rôzne molekulárne cargo vrátane DNA, RNA, proteínov, lipidov a metabolitov, ktoré sa prenášajú do iných buniek. Sú čoraz viac uznávané ako regulátory rezistencie na protinádorové liečivá, ktoré môžu meniť interakcie v rámci nádorového mikroprostredia (TME) [1]. Okrem toho sa EV vďaka svojej prítomnosti v biologických tekutinách pacientov s rakovinou stávajú potenciálnymi biomarkermi na monitorovanie liečby a hodnotenie prognózy. Sú tiež sľubným nástrojom na cielené podávanie liečiv, ktorý umožňuje obísť mechanizmy rezistencie [2].

Rezistencia na hypometylačné látky (HMAs), ako sú 5-azacitidín (AZA) a 5-aza-2'-deoxycytidín (DAC), predstavuje významný problém pri liečbe hematologických malignít vrátane myelodysplastických syndrómov a akútnej myeloidnej leukémie (AML). Tieto látky pôsobia tak, že inhibujú metyltransferázy DNA, čo vedie k hypometylácii DNA, ktorá reaktivuje umlčané tumor supresorové gény a indukuje smrť nádorových buniek [3].

Cieľom tejto práce je preskúmať úlohu EVs pri vzniku rezistencie na hypometylačné látky. Ako experimentálny model sme v tejto štúdii použili ľudskú bunkovú líniu akútnej myeloidnej leukémie SKM-1, z ktorej boli v našom laboratóriu dlhodobou kultiváciou v prítomnosti AZA a DAC vytvorené bunkové sublinie rezistentné voči AZA respektíve DAC.

V prvej časti sme sa zamerali na porovnanie rôznych metód izolácie extracelulárnych vezikúl, pričom sme porovnávali izoláciu EV pomocou 1. komerčne dostupného Total Exosome Isolation Reagent, 2. PEG (polyetylén glykol), 3. Amicon (MERCK) a 4. exoEASY kit (QIAGEN). Na posúdenie veľkosti a počtu izolovaných EV sa použil analyzátor veľkosti nanočastíc, fenotypová charakterizácia izolovaných častíc sa vykonala pomocou MACSPlex a na sledovanie vybraných markerov EV sa použila Western Blot analýza.

Následne sme sa zamerali na sledovanie vplyvu EV z rezistentných buniek na viabilitu senzitivity bunkovej línie SKM-1 pomocou troch rôznych kultivačných metód: kultivácia s použitím Millicell® hanging cell culture inserts, kultivácia v kondicionovanom médiu a kultivácia s prídavkom izolovaných EVs. Viabilita buniek SKM-1 po 72 hodinách kultivácie s rôznymi

koncentraciami AZA a DAC sa stanovila ako percento viability kontrolných buniek pomocou testu bunkovej proliferácie CellTiter 96® AQueous one solution (MTS test).

Táto práca bola financovaná EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V02-00020 a podporená grantami vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, výskumu, vývoja a mládeže Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (VEGA2/0016/22).

Zoznam literatúry

- [1] H. Y. Cheng, G. L. Su, Y. X. Wu, G. Chen, and Z. L. Yu, "Extracellular vesicles in anti-tumor drug resistance: Mechanisms and therapeutic prospects," Jul. 01, 2024, Xi'an Jiaotong University. doi: 10.1016/j.jpha.2023.12.010.
- [2] Q. Yang et al., "Extracellular Vesicles in Cancer Drug Resistance: Roles, Mechanisms, and Implications," Dec. 08, 2022, John Wiley and Sons Inc. doi: 10.1002/advs.202201609.
- [3] J. Stomper, J. C. Rotondo, G. Greve, and M. Lübbert, "Hypomethylating agents (HMA) for the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: mechanisms of resistance and novel HMA-based therapies," Jul. 01, 2021, Springer Nature. doi: 10.1038/s41375-021-01218-0

Neuropeptidy a ich receptory u kliešťov *Ixodes ricinus*

Buchová Emma, Dušan Žitňan, Ivana Daubnerová, Vanda Klöcklerová, Matej Medla

Ústav zoológie SAV, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovensko

Kliešte patria k najdôležitejším prenášačom rôznych patogénov vrátane vírusov, baktérií a prvokov, ktoré predstavujú vážne hrozby pre zdravie ľudí a zvierat na celom svete. So stále sa zvyšujúcim výskytom kliešťov a ich šírením do nových oblastí sa očakáva aj nárast počtu ochorení prenášaných kliešťami. Pochopenie mechanizmov, ktoré riadia fyziológiu kliešťov a prenos patogénov, je preto kľúčové pre vývoj nových stratégií proti chorobám prenášaným kliešťami.

Neuropeptidy sú bioaktívne látky rozšírené v celej živočíšnej ríši a predstavujú jednu z najrozmanitejších skupín signálnych molekúl z hľadiska štruktúry a funkcie. Sú nevyhnutnou súčasťou regulácie mnohých procesov vrátane rastu, vývoja, rozmnožovania, metabolizmu alebo trávenia u hmyzu. Napriek rozsiahlemu výskumu však stále nemáme dostatok informácií o funkcii týchto neuropeptidov u prenášačov patogénov, ako sú kliešte. V tejto práci sa zameriavame na identifikáciu a funkčnú analýzu vybraných neuropeptidov a ich receptorov u kliešťa *Ixodes ricinus* s využitím rôznych metód, ako je molekulárne klonovanie, bioanalýza receptorov na báze aequorínu, imunohistochemické farbenie, in situ hybridizácia, RT-qPCR a RNA interferencia.

Ďakujeme slovenským grantovým agentúram za finančnú podporu projektov: VEGA-2/0037/23, APVV-21-0431 a APVV-23-0168

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. Dautel, H., Dippel, C., Kämmer, D., Werkhausen, A., & Kahl, O. (2008). Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 50-54.
3. Estrada-Peña, A., Venzal, J. M., Kocan, K. M., & Sonenshine, D. E. (2008). Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals.

LATS2 je dôležitý regulátor funkcie hnedých adipocytov, ktorý moduluje aktivitu PPAR γ

Jančovičová Alžbeta¹, Urminsky Roman¹, Pálešová Natália¹, Petrisková Lívia¹,
Makovicky Peter¹, Balážová Lucia¹, Wolfrum Christian², Baláž Miroslav^{1,3}

¹Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie vyskumu porúch metabolizmu, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

²Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zürich, Schorenstrasse 16, 8603, Schwerzenbach, Švajčiarsko

³Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Ilkovičova 6, 842 15, Bratislava, Slovenská republika

Tukové tkanivo cicavcov pozostáva z dvoch morfológicky a funkčne odlišných typov – bieleho a hnedého tukového tkaniva. Zatiaľ čo biele tukové tkanivo predstavuje hlavné energetické depo, hnedé tukové tkanivo premieňa uloženú energiu na teplo prostredníctvom netriaškovej termogenézy. Vzhľadom na jeho schopnosť zvyšovať energetický výdaj je hnedé tukové tkanivo považované za perspektívny terapeutický cieľ v boji proti metabolickým ochoreniam [1]. V našom predchádzajúcom výskume sme ukázali, že Hippo signálna dráha zohráva dôležitú úlohu v kontrole aktivity hnedých tukových buniek [2]. Aktivácia tejto dráhy vedie k fosforylácii transkripčných koregulatorov YAP1 a TAZ prostredníctvom Veľkých tumorsupresorových kináz LATS1 a LATS2, čo vedie k ich inaktivácii a degradácii. Naopak, inhibícia Hippo dráhy umožňuje akumuláciu nefosforylovaných foriem YAP1/TAZ v jadre, kde ovplyvňujú expresiu cieľových génov [3]. Zatiaľ čo funkcia TAZ ako represora PPAR γ , kľúčového transkripčného faktora regulujúceho funkciu hnedého tuku, už bola preukázaná, úloha LATS kináz zostáva neobjasnená. Cieľom našej štúdie je preto skúmať funkčný význam LATS kináz v kontexte regulácie termogénnej aktivity hnedého tuku [4].

Na štúdium úlohy kináz LATS1 a LATS2 v regulácii funkcie hnedých adipocytov sme využili in vitro model imortalizovaných myších hnedých adipocytov, v ktorom sme cielene potlačili expresiu Lats1, Lats2 a ich kombináciu (Lats1&2) pomocou transfekcie špecifických siRNA, pričom sme sledovali vplyv na expresiu špecifických markerov hnedých adipocytov, a všeobecných markerov zreých adipocytov, lipolytickú aktivitu buniek, akumuláciu lipidov a funkčnosť mitochondrií. Súčasne sme vytvorili model Lats1&2fl/fl x Ucp1-CreERT2 myší, ktorý nám umožňuje zablokovať expresiu oboch LATS kináz špecificky v hnedých adipocytoch a skúmali sme ich úlohu v kontrole aktivity hnedého tukového tkaniva in vivo.

Pomocou in vitro experimentov na myších adipocytoch sme zistili, že inhibícia Lats2 a Lats1&2 viedla k zníženiu expresie markerov hnedých adipocytov - Ucp1, Cidea a Cpt1b, redukcii hladín proteínov UCP1, PPAR γ 1 a fosforylovanej formy HSL, ako aj k poklesu mitochondriálnej respirácie. Napriek zníženej fosforylácii HSL a nezmenenej hladine ATGL, bolo po utlmení Lats2 a Lats1&2 pozorované zvýšené uvoľňovanie voľných mastných kyselín. Zablokovanie expresie oboch Lats1&2 kináz v hnedých adipocytoch myší viedlo k významnému zníženiu hmotnosti hnedého tukového tkaniva a expresie Ppar γ , zatiaľ čo

expresia markerov hnedých adipocytov bola nezmenená. V hnedom tukovom tkanive myší aklimatizovaných na chlad sme pozorovali zníženie množstva UCP1 a Perilipínu 1. Podrobná metabolická fenotypizácia odhalila signifikantné zníženie výdaja energie u *Lats1^{&2}fl/fl x Ucp1-CreERT2* myší in vivo. Potlačenie expresie LATS kináz viedlo k stabilizácii proteínov YAP1 a TAZ. Keďže je známe, že TAZ pôsobí ako korepresor PPAR γ , skúmali sme či YAP1 a TAZ s týmto jadrovým receptorom interagujú. Efektívna imunoprecipitácia bola pozorovaná len pre TAZ, ktorý precipitoval spolu s PPAR γ , čo potvrdzuje ich vzájomnú interakciu v hnedých adipocytoch.

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 kináza, ktorá potláča aktivitu transkripčných koregulátorov YAP1 a TAZ, čím podporuje transkripčnú aktivitu PPAR γ .

Práca vznikla vďaka finančnej podpore SASPRO2, APVV-22-0291 a VEGA 2/0102/23.

[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

Multi-omika ako nástroj na hľadanie nových molekúl ovplyvňujúcich aktivitu tukového tkaniva

Petrisková Lívia¹, Olešová Dominika¹, Ghosh Adhideb², Kvasnička Aleš³, Pálešová Natália¹, Štefanička Patrik⁴, Varga Lukáš⁵, Tedla Miroslav⁵, Jančovičová Alžbeta¹, Makovicky Peter¹, Dobešová Dana³, Balážová Lucia¹, Friedecký David³, Wolfrum Christian², Baláž Miroslav^{1,6}, Štefanička Patrik^{4,5}

¹Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05, Bratislava, Slovenská republika

²Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zürich, Schorenstrasse 16, Schwerzenbach, 8603, Švajčiarsko

³Fakultná nemocnica Olomouc a Lekárska fakulta, Univerzita Palackého, Zdravotníku 248/7, 779 00, Olomouc, Česká republika

⁴Nemocnica Bory, Ivana Kadlečíka 2, 841 03, Bratislava, Slovenská republika

⁵Lekárska fakulta a Univerzitná Nemocnica, Univerzita Komenského, Špitálska 24, 813 72, Bratislava, Slovenská republika

⁶Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Ilkovičova 6, 842 15, Bratislava, Slovenská republika

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 najsľubnejších 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 bieleho tukového tkaniva.

Vzorky hnedého tukového tkaniva z krku, ktoré vykazujú obohatenie UCP1 mRNA a morfológiu multilokulárnych lipidových kvapiek, spolu s príslušnými biopsiami bieleho podkožného tukového tkaniva od 15 pacientov, ktorí podstúpili operáciu štítnej žľazy, boli podrobené transkriptomickému (RNA sekvenovanie novej generácie), metabolickému a lipidickému (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). Okrem toho bol uskutočnený funkčný skrining génov identifikovaných pomocou BioPAN analýzy.

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 mastné 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, PTDSS2, CHPT1 a PEMT. Funkčná validácia vybraných génov (PTDSS1 a PTDSS2) ukázala, že môžu zohrávať významnú úlohu v regulácii aktivity hnedých adipocytov – ovplyvňujú najmä mitochondriálnu respiráciu, lipolýzu a expresiu génov spojených s lipidovým metabolizmom.

Okrem toho, multi-omická faktorová analýza ktorá integruje omické 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. Doterajšie funkčné analýzy poukazujú na potenciálnu úlohu génov PTDSS1 a PTDSS2 v regulácii funkcie tukového tkaniva.

Táto práca vznikla s podporou grantov SASPRO2, APVV-22-0291, VEGA 2/0102/23, PostDokGrant APD0063, VV-MVP-24-0335.

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.

Molecular analysis and bionomy of specific groups of butterflies

Koblišková Andrea

Ústav zoológie SAV, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava

Several groups of butterflies represent complex assemblies of similar (cryptic) or extremely variable species which are difficult to identify based on morphological markers. This study focuses specifically on the genera *Lysandra* and *Melitaea*. In Europe and Middle East, the genus *Lysandra* is represented by several sympatric and closely related species, which may cross hybridize and produce viable offspring. On the other hand, the genus *Melitaea* constitutes numerous cryptic and locally variable species that are distributed in North Africa, Europe and Asia. To better understand their taxonomy, evolution and bionomy, we combined field observations and rearing of larvae with molecular analyses in the laboratory. For molecular analysis of the extracted DNA, we used fragments of mitochondrial, ribosomal, and nuclear genes (CO-I, Rps5, EF-1 α , MDH, wingless), or Next-Generation Sequencing. Obtained data have been used to construct phylogenetic trees to clarify the position of selected taxons. Bionomic studies of the monitored species have been conducted both in the laboratory and in the field across various localities in Europe and Asia.

VEGA-2/0037/23, APPV-21-0431, APPV-23-0168

Tóth J. P., Varga Z., Verovnik R., Wahlberg N., Váradi A. & Bereczki J. 2017. Mito-nuclear discordance helps to reveal the phylogeographic patterns of *Melitaea ornata* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 121: 267–281.

Wahlberg N., Weingartner E. & Nylin S. 2003. Towards a better understanding of the higher systematics of Nymphalidae (Lepidoptera: Papilionoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 473–484.

Úloha neurozápalu v regenerácii striatalneho mozgového tkaniva po neurotoxickej lézii u zebričky červenozobej

Hodňová Vladimíra, Kubáňová Nikola, Radič Rebecca, Pavuková Eva, Niederová-Kubíková Ľubica

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

Neurogenéza u dospelých je ovplyvňovaná rôznymi faktormi, medzi ktoré patria aj ochorenia centrálneho nervového systému (CNS). Poškodenie CNS a neurodegeneratívne ochorenia často vedú k zápalovej odpovedi, pričom vzniknutý neurozápal môže, v závislosti od jeho trvania a závažnosti, neurogenézu podporovať alebo tlmiť. Neurozápal zasahuje do všetkých fáz procesu neurogenézy, vrátane bunkovej proliferácie. Zaujímavé je, že mozog dospelých spevavcov si na rozdiel od cicavcov zachováva schopnosť regenerácie aj po neurotoxickom poškodení, vďaka čomu predstavujú vhodný model pre štúdium mechanizmov neurozápalu pri procese obnovy mozgu. Cieľom tejto štúdie je charakterizovať priebeh neurozápalu prostredníctvom sledovania časových zmien v génovej expresii cytokínov a trofických faktorov, a zároveň vyhodnotiť proliferáciu buniek v neurogénnej oblasti po lézii indukovanej v striatalnej oblasti mozgu.

V experimente bolo použitých 39 samcov zebričky červenozobej (*Taeniopygia guttata*). Samce boli rozdelené do troch časových skupín podľa dĺžky prežívania po lézii – 2 dni (2D), 2 týždne (2W) a 3 mesiace (3M). Každý časový bod zahŕňal 13 jedincov rozdelených do kontrolnej ($n=5$) a ledovanej ($n=8$) skupiny. Ledovanej skupine bola do striatalnej vokálnej oblasti AreaX bilaterálne aplikovaná 1% kyselina iboténová, kontrolnej skupine bol aplikovaný sterilný fyziologický roztok. Dve hodiny pred usmrtením bol podaný exogénny marker proliferácie, 5-etinyl-2'-deoxyuridín EdU. Mozgy boli rozdelené na hemisféry, z ľavej hemisféry boli pripravené 20 μm hrubé rezy na kvantifikáciu EdU-pozitívnych buniek vo ventrikulárnej zóne (VZ) a z pravej hemisféry boli pripravené 500 μm hrubé rezy na vypichnutie striata s ledovanou oblasťou AreaX. Expresia mRNA z dvoch výpichov o priemere 1 mm od každého jedinca bola analyzovaná pomocou real-time PCR, pričom sme sa zamerali na expresiu prozápalových cytokínov (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α) a rastových faktorov (IGF, FGF, TGF, BDNF).

Štatistická analýza odhalila, že faktor ovplyvnenia mal významný vplyv na expresiu génov IL-1 β a IGF, pričom pri obidvoch génoch ledované zvieratá ukazovali vyššiu expresiu než kontrola. Na expresiu génov BDNF a IGF mal významný vplyv faktor času uplynutého od operácie, pričom pri géne IGF mala skupina 2W signifikantne vyššiu expresiu ako skupina 2D, a pri géne BDNF bola signifikantne najvyššia expresia v skupine 3M v porovnaní s ostatnými skupinami. Interakcia faktorov ukázala, že ledované zvieratá zo skupiny 2W mali signifikantne vyššiu génovú expresiu IL-12 v porovnaní s kontrolou 2W, a taktiež s ledovanými zvieratami zo skupiny 2D a 3M. Ďalej sme zistili, že génová expresia TNF- α u ledovaných zvierat zo skupiny 2D a 2W bola signifikantne vyššia ako u ledovaných jedincov zo skupiny 3M. Čo sa týka bunkovej proliferácie, jedince z ledovanej skupiny 2D mali signifikantne vyšší počet EdU+ buniek v porovnaní s kontrolnou skupinou 2D, a taktiež v porovnaní s ledovanými zvieratami zo skupiny 2W a 3M.

Na základe týchto výsledkov sa zdá, že neurozápal je najsilnejší dva dni po vytvorení lézie, kedy sú najvyššie hodnoty expresie prozápalových cytokínov. V tomto čase je tiež stimulovaná bunková proliferácia v neurogénnej zóne. Naše výsledky naznačujú, že akútny zápal môže podporovať bunkovú proliferáciu a neskoršie štádiá zápalu prispievajú k regenerácii poškodenej striatalnej oblasti mozgu spevavcov.

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

1. 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.
2. 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.

Neurogenéza ako indikátor welfaru hydiny

Plšková Lenka, Košťál Ľubor, Pichová Katarína, Niederová Ľubica

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

Pre posúdenie welfaru zvierat sa v praxi používa viacero indikátorov, ktoré prihlasujú na parametre prostredia, v ktorom zviera žije, alebo na zvieratách založené ukazovatele, akými sú napríklad fyzický stav zvieraťa. Takéto indikátory však nie sú vždy úplne presné a často závisia od subjektívneho posúdenia. Preto pokračuje snaha o objavenie a validáciu nových, presnejších a objektívnejších indikátorov welfaru zvierat. Jedným z takýchto indikátorov by mohla byť neurogenéza.

Neurogenéza u dospelých vtákov prebieha vo ventrikulárnej zóne (VZ) v stene laterálnej mozgovej komory. Novovzniknuté bunky migrujú do viacerých oblastí predného mozgu. Medzi tieto oblasti patrí aj hipokampus, ktorý zohráva úlohu pri spracovaní spomienok a emócií, pamäti a učení. Jedným z faktorov, ktoré neurogenézu pravdepodobne ovplyvňujú, je chronický stres.

Ako model depresie a úzkosti u experimentálnych zvierat, predovšetkým hlodavcov, je model nepredvídateľného chronického mierneho stresu (UCMS). Je založený na predpoklade, že depresia sa skôr vyvinie po sérii čiastkových nepredvídateľných denných stresorov, ako po jednej traumatickej skúsenosti. Experimentálne zvieratá sú preto vystavené dlhšiu dobu každodenne rôznym stresorom.

Cieľom tejto štúdie bolo validovať neurogenézu ako indikátor welfaru hydiny s využitím UCMS ako modelu zhoršeného welfaru nosníc a posúdením jeho vplyvu na neurogenézu. Dospelé nosnice plemena Dominant Leghorn (vek 53 týždňov) boli rozdelené na kontrolnú skupinu ($n = 6$) chovanú v bežnom režime a skupinu vystavenú UCMS počas 9 týždňov ($n = 8$). Neurogenéza bola posudzovaná ako počet nových buniek vzniknutých vo VZ (značených 5-etinyl-2'-deoxyuridínom [EdU]) a počet nových buniek a neurónov (značených 5-bromo-2'-deoxyuridínom [BrdU] spoločne s neuronálnym markerom (Fox3) inkorporovaných do hipokampu. V počte EdU+ buniek prepočítanom na dĺžku (v mm) VZ sme zaznamenali trend k zníženiu proliferácie buniek vo VZ priľahlej k hipokampu ($F_{1,121} = 3,20$; $P = 0,076$) a páliu ($F_{1,122} = 3,20$; $P = 0,076$), zatiaľ čo vo VZ priľahlej striatu sme rozdiely nezistili ($F_{1,110} = 0,84$; $P = 0,362$). Nepreukázali sme významný vplyv UCMS na počet BrdU+ buniek ($F_{1,123} = 0,32$; $P = 0,570$) a BrdU+/Fox3+ ($F_{1,123} = 0,78$; $P = 0,378$) neurónov prepočítaných na plochu hipokampu (v mm²), t.j. UCMS významne neznížil mieru inkorporácie nových buniek resp. neurónov do hipokampu. Protokol UCMS použitý v tejto štúdii teda ovplyvnil mieru neurogenézy u nosníc iba čiastočne. Nepodarilo sa nám jednoznačne validovať mieru neurogenézy v hipokampe resp. vo VZ, ako indikátor welfaru hydiny. Možným vysvetlením je nedostatočná intenzita chronického stresu spôsobená naším protokolom UCMS, resp. odolnosť nosníc voči stresu.

Táto práca bola podporená grantmi APVV-20-0344 a VEGA 2/0129/23.

Štúdium účinkov kvercetínu na oxidačný stres, apoptózu, RISK dráhu a ischemicko-reperfúzne poškodenie srdca u starnúcich potkanov

Strapec Jakub¹, Kristína Ferenczyová^{1,2}, Lucia Kindernay¹, Ulrika Duřová¹,
Ľubomíra Tóthová³, Monika Barteková^{1,4}

¹Ústav pre výskum srdca, Centrum experimentálnej medicíny SAV, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

²Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, oddelenie farmakológie a toxikológie, Odbojárov 10, 832 32, Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav molekulárnej biomedicíny, Sasinkova 4, 811 08, Bratislava, Slovenská republika

⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Fyziologický ústav, Sasinkova 2, 811 08, Bratislava, Slovenská republika

Úvod: Kvercetín (QCT) je bioaktívna zlúčenina s preukázanými priaznivými účinkami na kardiovaskulárne zdravie. Predchádzajúce štúdie potvrdili jeho kardioprotektívny účinok na ischemicko-reperfúzne (I/R) poškodenie myokardu, najmä u mladých zvierat. Keďže I/R poškodenie je závažným problémom najmä u starších jedincov, táto štúdia hodnotila vplyv QCT na I/R poškodenie myokardu u 24-mesačných potkanov kmeňa Wistar.

Metodiky: Počas šesťtyždňového experimentu sme potkanom kmeňa Wistar každý deň podávali QCT v dávke 20 mg/kg telesnej hmotnosti. Po ukončení podávania boli zvieratá usmrtené a z nich vybrané izolované srdcia boli perfundované Langendorffovou metódou. Srdcia boli následne vystavené globálnemu I/R poškodeniu, pozostávajúcemu z 30 minút ischemie a 120 minút reperfúzie. Rozsah infarktu bol hodnotený pomocou TTC farbenia. Na analýzu účinkov QCT na molekulárne signalizačné dráhy v myokarde bol použitý Western blotting, pričom sme sa sústredili na RISK dráhu (Akt, PKC- ϵ , eNOS a GSK-3 β), endogénne antioxidačné enzýmy (SOD1 a SOD2) a apoptotické markery (Bax/Bcl-2). Celkový oxidačný stres bol stanovený meraním TBARS, AOPP a FRAP v krvnej plazme.

Výsledky: Naše výsledky ukázali, že dlhodobé podávanie QCT neprinieslo očakávaný kardioprotektívny efekt na obnovu funkcie srdca po ischemii. Naopak, pozorovali sme tendenciu zhoršenia obnovy niektorých funkčných parametrov. Výrazne zvýšené hladiny FRAP a AOPP indikujú pro-oxidačné účinky QCT v modeli starnúcich zvierat. Súčasne sme však zaznamenali pokles TBARS, čo naznačuje čiastočný antioxidačný účinok QCT. Podávanie QCT u starších jedincov významne znížilo expresiu PKC- ϵ , zatiaľ čo expresia ostatných proteínov RISK dráhy a antioxidačných enzýmov SOD1 a SOD2 zostala nezmenená. Dôležitým zistením bol tiež výrazný pokles pomeru Bax/Bcl-2, čo poukazuje na zníženú apoptózu u starších jedincov vplyvom QCT.

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 antioxidačnému potenciálu. Aj napriek jeho prejavujúcej sa schopnosti pôsobiť anti-apoptoticky sa využitie QCT vo vyššom veku javí ako menej efektívne než u mladých jedincov.

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

Nový karpatský variant nešpecifickej peroxygenázy produkovaný v *E. coli*

Kubala Bohuš¹, Viktória Rusnáková², Katarína Chovanová¹, Lucia Bocánová³, Jana Harichová¹, Katarína Semešová¹, Marcel Zámocký^{1,4}

¹Ústav molekulárnej biológie, Pracovná skupina fylogenomické ekológie SAV, v. v. i.,
Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej
biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

³Ústav molekulárnej biológie, Oddelenie genetiky a biotechnológií SAV, v. v. i., Dúbravská
cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovenská republika

⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra anorganickej chémie,
Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

V tejto práci sa venujeme produkcii nového karpatského variantu nešpecifickej peroxygenázy, pochádzajúcej z ektomycoríznej huby *Suillus* sp., ktorá bola identifikovaná vo fungálnej plodnici odobratej z pohoria Vtáčnik, ale aj vo vzorke pôdy odobratej z územia Badínského pralesa [1]. Na sprostredkovanie katalytickej reakcie využívajú nešpecifické peroxygenázy, ale aj ich náprotivky, monooxygenázy P450, zlúčeninu I (Cpd1 = compound I), ktorá je formovaná zo zlúčeniny 0 (Cpd0 = compound 0). Monooxygenázy P450 využívajú na tvorbu Cpd0 dva kroky, počas ktorých dochádza k prenosu elektrónov a väzby kyslíka na napoly redukovaný komplex hemu. Pritom sú potrebné rôzne drahé kofaktory, čo robí katalýzu sprostredkovanú týmito enzýmami nákladovú. Nešpecifické peroxygenázy sú schopné vytvoriť Cpd0 priamo z pokojového stavu a H₂O₂ a preto sú pre priemyselné využitie výhodnejšie [2]. Väčšina UPO sú považované za sekretované fungálne proteíny a *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) je ideálnym expresným systémom na ich produkciu [3]. *SspUPO4* je pravdepodobne intracelulárny proteín a je možné ju produkovať aj v bakteriálnych expresných systémoch [1]. UPO z askomycétnych húb už boli úspešne produkované v expresnom systéme *Escherichia coli* [4].

Cieľom tejto práce bolo optimalizovať heterológnu expresiu nešpecifickej peroxygenázy *SspUPO4* v expresnom systéme *Escherichia coli*. Konštruktom pET28a(+)-*SspUPO4* sme úspešne transformovali rôzne produkčné kmene *E. coli*: C41(DE3), BL21(DE3), ArcticExpress(DE3), SHuffle T7. V bunkách *E. coli* C41(DE3) bola expresia *SspUPO4* nedostatočná, preto sme pokračovali len s ďalšími 3 kmeňmi. Pri všetkých ostatných produkčných kmeňoch sa nám ukázala ako najvhodnejšia koncentrácia IPTG 0,1 mmol.dm⁻³, spomedzi všetkých optimalizácií koncentrácie induktora (0,1; 0,25; 0,5 a 1 mmol.dm⁻³). Podľa výstupov z Western blot analýzy sa nám pri tejto koncentrácii podarilo dosiahnuť najvyšší podiel solubilnej frakcie *SspUPO4* voči nesolubilnej. Prídavok MgSO₄·7H₂O ku kultúram buniek sa pozitívne prejavil len pri bunkách *E. coli* ArcticExpress(DE3). S narastajúcou koncentráciou MgSO₄·7H₂O v médiu (1; 2,5; 5 a 10 mmol.dm⁻³) sa zvyšoval podiel solubilnej frakcie proteínu voči nesolubilnej. Z hľadiska pomeru solubilnej frakcie

cieľového proteínu voči nesolubilnej frakcii sa ako najlepšia optimalizácia pre produkciu SspUPO4 ukázala v *E. coli* ArcticExpress(DE3) s prídavkom 0,1 mmol.dm⁻³ IPTG a 10 mmol.dm⁻³ MgSO₄.7H₂O.

Po purifikácii cez IMAC kolónu sme však pozorovali veľké proteínové pruhy na SDS-PAGE géloch v oblasti medzi 63 kDa a 75 kDa. Ide pravdepodobne o chaperón Cpn60, ktoré sú v kmeni *E. coli* ArcticExpress(DE3) nadexprimované za účelom zvýšenia solubility cieľového proteínu. Nedokázali sme ich odseparovať ani afinitnou ani gélovou chromatografiou. Preto sme sa rozhodli ďalej optimalizovať heterológnu expresiu SspUPO4 v bunkách *E. coli* BL21(DE3), nakoľko sa ukázali ako druhý najvhodnejší kmeň, po *E. coli* ArcticExpress(DE3), na získanie solubilného proteínu. Tu sme ďalej znížili koncentráciu induktora až na 0,05 a 0,025 mmol.dm⁻³. Okrem toho sme znížili otáčky na trepačke na 160 rpm, pričom ako najvhodnejšia teplota sa ukázalo 16 °C. Celkový čas heterológnej expresie bol 20 h. Takto sa nám podarilo získať dostatočné množstvo SspUPO4 v solubilnej frakcii, pričom v solubilnej frakcii sa nachádzala väčšina z celkového vyprodukovaného množstva cieľového proteínu, ktorý bude následne podrobený purifikácii a charakterizácii.

Náš výskum podporila Slovenská grantová agentúra s projektom VEGA 2/0012/22 a Slovenská výskumná a vývojová agentúra s projektom APVV-20-0284.

- [1] Kubala B., Ferianc P., Chovanová K., et al. (2024) *Biologia* 79(7), p. 2253
- [2] Ma, Y., Liang, H., Zhao, Z., et al. (2022). *Mol. Catal.*, 531, 112707.
- [3] Ebner K., Pfeifenberger L. J., Rinnoferner C., et al. (2023) *Catalysts* 13(1), p. 206
- [4] Linde D., Olmedo A., González-Benjumea A., et al. (2020) *Appl. Environ. Microbiol.* 86(7), e02899-19

Study of the microbiome and the effects of cleaning and biocidal treatments on granite historical buildings using MinION technology

Maisto Francesca¹, Nikola Klištincová¹, Dominika Galová¹, Jelena Pavlovic¹,
Pierluca Nuccetelli², Domenico Pangallo¹

¹Ústav molekulárnej biológie, v.v.i. Dúbravská cesta 5777/21, 841 04 Karlova Ves,
Bratislava, Slovakia

²Ústav polymérov SAV, v. v. i. Dúbravská cesta 5798/9 845 41 Bratislava mestská časť
Karlova Ves, Bratislava, Slovakia

In the field of cultural heritage conservation, growing attention is being paid to the impact of cleaning procedures and biocidal treatments on the microbiome colonizing historic surfaces. Chemical treatments, while aimed at protecting materials, can significantly alter the microbial communities present, potentially influencing degradation dynamics and material stability. This study explores the long-term effects of such interventions on the microbiome of two 18th-century monuments built with fine-grained alkaline two-mica granite. The research was carried out in Santiago de Compostela (Spain), a UNESCO World Heritage city, where historic stone architecture is particularly exposed to biological colonization by bacteria, fungi, and algae. The investigation compared previously treated areas of granite surfaces with untreated ones to assess differences in microbial composition. The treated sections had undergone cleaning with ammonium bicarbonate and applications of quaternary ammonium-based biocides, specifically Biotin R® and New Des® 50. Additionally, the study considered the presence or absence of visible biological greening, an indicator of the stone's bioreceptivity—its tendency to be recolonized by microorganisms. To achieve a high-resolution analysis, the research employed whole genome sequencing through metabarcoding using Oxford Nanopore's MinION platform. This allowed for the detailed identification of microbial taxa present on the stone surfaces. Beyond taxonomic profiling, the study also quantified the relative abundance of genes associated with antibiotic resistance (ARGs) and biocide resistance (BRGs), providing insights into how past chemical interventions may contribute to the emergence or persistence of resistant microbial strains in the built environment. The findings suggest that previous biocidal treatments may influence the structure and resilience of microbial communities, potentially increasing the material's susceptibility to recolonization—a phenomenon referred to as quaternary bioreceptivity. These insights offer valuable knowledge for heritage professionals, supporting the development of more sustainable and targeted conservation strategies that take into account both the effectiveness of biological control and the long-term ecological impacts on historic materials.

We acknowledge the grants VEGA 2/099/ 2021, APVV-23-0235 and the European Regional Development Fund project (313011V578) which financed this study.

Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K. M., Pal, C., Thorell, K., Larsson, D.G.J., Nilsson, R. H., 2015. METAXA2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Molecular Ecology Resources*, 15(6), 1403-1414

Bonazza, A., & Sabbioni, C. (2016). Composition and chemistry of crusts on stone, in: Brimblecombe, P. (Ed), *Urban pollution and changes to materials and building surfaces*. Imperial College Press, London, UK, pp. 103-123

Bore, E., Hebraud, M., Chafsey, I., Chambon, C., Skjæret, C., Moen, B., Møretrø, T., Langsrud, Ø., Rudi, K., Langsrud, S. (2007). Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology*, 153(4), 935-946.

Brimblecombe, P., 2016. Past, present and future damage to materials and building surfaces in the polluted urban environment, in: Brimblecombe, P. (Ed), *Urban pollution and changes to materials and building surfaces*. Imperial College Press, London, UK, pp. 127-141.

Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H., 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*, 12(1), 59-60.

Büdel, B., Friedl, T. 2021. *Life at Rock Surfaces. Life in Extreme Environments*. Edited by Burkhard Büdel and Thomas Friedl. Berlin/Boston.

Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A. (2012). Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review. *International journal of antimicrobial agents*, 39(5), 381-389.

The impact of the eisosomal protein Lsp1 and long-chain base degradation as regulators of mitochondrial functions

Zriniová Ingrid, Lenka Bábelová, Mária Balážová

Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Centre of Biosciences SAS v. v. i., Dúbravská cesta 9, 841 04, Bratislava, Slovakia

Eisosomes are specialized domains of the plasma membrane that play a crucial role in lipid organization and the yeast stress response (1). Lsp1 is a key structural protein of eisosomes, and its function is tightly connected to sphingolipid metabolism (2). Dpl1 catalyzes the degradation of phosphorylated long-chain bases (LCBs), producing intermediates that enter into the Kennedy pathway for phosphatidylethanolamine (PE) synthesis (3). In this study, we investigated how impaired function of Lsp1 and Dpl1 affects mitochondrial physiology.

Respiratory analysis revealed that the double mutant $dpl1\Delta lsp1\Delta$ showed a pronounced reduction in both oxidative phosphorylation and electron transport system capacity, indicative of mitochondrial dysfunction. Phospholipid profiling uncovered decreased levels of cardiolipin and PE - two essential lipids for mitochondrial membrane integrity. Interestingly, the $dpl1\Delta$ mutant displayed reduced activity of Lsc1, leading to the accumulation of complex sphingolipids. Conversely, $lsp1\Delta$ and $dpl1\Delta lsp1\Delta$ mutants exhibited increased Lsc1 activity compared to the wild type, possibly reflecting a compensatory upregulation of sphingolipid turnover in response to altered membrane organization or stress.

These results suggest that Lsp1, beyond its architectural role in eisosomes, may influence sphingolipid metabolism via its interplay with Dpl1 and Lsc1. The combined disruption of these proteins alters mitochondrial lipid composition and impairs organelle function. Together, our findings reveal a previously underappreciated regulatory axis linking the plasma membrane, sphingolipid metabolism, and mitochondrial bioenergetics - critical elements for maintaining cellular homeostasis.

Work was supported by grants VEGA 2-0030-22, APVV 20-0129, CAS-SAS-2024-04, SAS-NSTC/JRP/2023/773/LipAI. Funded by NextGenerationEU through Slovak Rep. Recovery and Resilience Plan no.09I03-03-V02-00020.

Targeting of post-squalene steps of ergosterol biosynthetic pathway to boost squalene accumulation in *Rhodotorula toruloides*

Marek Lúčan, Patrik Lúčan, Daniela Krajčiová, Martina Garaiová, Roman Holíč

Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Centre of Biosciences, Dúbravská cesta 9,
Bratislava, Slovakia

Rhodotorula toruloides is a nonconventional yeast species receiving growing interest in the field of biotechnological lipid production [1]. Despite this, its capacity to produce squalene has not been thoroughly investigated. In this work, we aimed to enhance squalene biosynthesis by overexpressing a truncated HMG1 gene (cHMG1), which encodes the cytosolic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (Hmg1p) - a key enzyme in the mevalonate pathway [2]. To further increase squalene accumulation, we targeted next steps of the ergosterol biosynthetic pathway following squalene synthesis using specific chemical inhibitors. Strains overexpressing cHMG1 were treated with terbinafine, miconazole, and abafungin, which inhibit Erg1p, Erg11p, and Erg6p, respectively. Both terbinafine and miconazole treatments elevated squalene levels, with terbinafine having the most significant effect. Abafungin alone had no clear impact on squalene accumulation but enhanced the effect of miconazole when used in combination. These results highlight Erg1p inhibition as the most promising approach for improving squalene yields in *R. toruloides* and contribute important knowledge for the metabolic engineering of yeast-based systems for sustainable squalene production.

References

- [1] Zhao Y, Song B, Li J, Zhang J. *Rhodotorula toruloides*: an ideal microbial cell factory to produce oleochemicals, carotenoids, and other products. *World J Microbiol Biotechnol*. 2021 Dec 7;38(1):13.
- [2] Polakowski T, Stahl U, Lang C. Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998 Jan;49(1):66-71.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-20-0166 and by Scientific Grant Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic under the contract No. 2/0036/22.

Vplyv antifungálnych látok na viabilitu a lipidový profil patogénnej kvasinky *Magnusiomyces capitatus*

Kristína Alföldiová¹, Igor Zeman², Martina Garaiová¹, Roman Holič¹, Jozef Nosek²

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

² Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra biochémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Magnusiomyces capitatus je patogénna kvasinka spôsobujúca povrchové aj invazívne formy mykóz [1]. U imunokompetentných pacientov je incidencia týchto ochorení veľmi nízka, avšak u pacientov so zníženou imunitou sú invazívne mykózy život ohrozujúce s mortalitou až do 90 %, pričom v mnohých prípadoch dochádza k náhlemu multiorgánovému zlyhaniu, šoku a následnému úmrtiu aj napriek systémovej antifungálnej liečbe [2]. Klinické izoláty *M. capitatus* sú rezistentné na rutinne využívané antimykotiká, čo poukazuje na naliehavú potrebu vývoja nových terapeutických stratégií. Biosyntéza sterolov predstavuje hlavný terapeutický cieľ viacerých antimykotík, pričom zmeny v zložení sterolov ovplyvňujú membránovú fluiditu, permeabilitu, signálne dráhy zodpovedné za virulenciu a taktiež schopnosť imunitného systému rozpoznať patogén. Skúmanie vplyvu antimykotík na viabilitu, rovnako ako aj lipidový profil patogénnych kvasiniek poskytnú kľúčové poznatky, ktoré môžu byť základom pre implementáciu inovatívnych prístupov v terapii mykotických infekcií.

V našej práci sme sa zamerali na analýzu účinku dvoch antifungálnych látok na viabilitu a lipidový profil kvasinky *M. capitatus*. Mechanizmus účinku testovaných antimykotík je založený na inhibícii biosyntetickej dráhy ergosterolu, ktorý predstavuje esenciálnu zložku bunkovej membrány kvasiniek. Prvým testovaným antimykotikom bol itraconazol, patriaci do skupiny azolov, ktorý inhibuje lanosterol-14 α -demetylázu. Ďalšou testovanou antifungálnou látkou bol terbinafín zo skupiny alylamínov, ktorý blokuje aktivitu skvalén monooxygenázy.

V práci sme stanovili polovičnú inhibičnú koncentráciu (IC 50) pre obidve testované antimykotiká. Bunky kvasiniek sme kultivovali 24 hod. v médiách obsahujúcich uvedené antimykotiká s koncentraciami IC 50 a následne použili pre ďalšie analýzy. Skúmali sme viabilitu buniek a charakterizovali ich lipidové profily. Zistili sme, že po opracovaní buniek terbinafínom dochádza k zníženiu viability a akumulácii skvalénu. V prípade opracovania buniek itraconazolom sme naopak pozorovali vyššiu mieru prežívania buniek v prítomnosti antimykotika. Analýza lipidového zloženia ukázala zvýšené hladiny voľných sterolov a triacylglycerolov u buniek kultivovaných s itraconazolom.

Práca vznikla vďaka finančnej podpore grantov APVV-20-0166 a VEGA 2/0036/22.

[1] Bouza E. & Munoz P. Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10 (Suppl. 1):76–85.

[2] Lo S. H. et al. *Magnusiomyces capitatus* lung nodule in a patient with nasopharyngeal and hepatocellular carcinoma. *Mycopathologia.* 2023;188(5): 841–843.

Sponzori podujatia Dni mladých biológov



DNI MLADÝCH BIOLÓGOV 12. ročník
11. jún 2025 Bratislava
Ústav biochémie a genetiky živočíchov

Redakčná úprava: Mária Balážová

© Vydal: Centrum biovied Slovenská akadémia vied, v.v.i - Ústav biochémie a genetiky
živočíchov, Bratislava 2025

ISBN 978-80-974246-7-1

