

UMELO-VYTVORENÝ DNA SYSTÉM SO ZABUDOVANÝMI NEKANONICKÝMI ŠTRUKTÚRNÝMI MOTÍVMÍ

Adriana Varha¹

Školiteľ¹: doc. RNDr. Viktor Víglaský, PhD.

Konzultant¹: RNDr. Lukáš Trizna

¹Katedra biochémie, Ústav chemických vied, PF UPJŠ, Moyzesova 11, 040 04 Košice

DNA je významnou biomolekulou vyskytujúcou sa vo všetkých živých organizmoch. Nanotechnológie na báze DNA majú potenciál ich využitia ako biosenzory pre diagnostické a terapeutické účely. Pri tvorbe nankonjugátov sa často využíva štruktúrna variabilita rôznych topologických foriem DNA molekúl vrátane nekanonických štruktúr, ktorá je závislá od rôznych faktorov ako je napríklad koncentrácia a typ soli alebo pH. Medzi takéto nekanonické štruktúry patria G-kvadruplexy alebo i-motívy, s ktorými úzko súvisí mnoho významných biologických procesov [1,2]. Hlavným cieľom tejto práce je prezentácia makromolekulového systému umožňujúceho cieleňú tvorbu rôznych sekundárnych štruktúr DNA. Stavebnými prvkami takého systému sú úplne alebo čiastočne hybridizované vlákna molekúl DNA s voliteľnou dĺžkou, pričom prečnievajúce kohézne konce je možné vzájomne spájať. Spojením vznikajú komplexné kruhové systémy s rôznymi veľkosťami. V stavebnom bloku je možné na základe vhodne zvolených oligonukleotidových sekvencií zabezpečiť v tzv. variabilnom úseku tvorbu B-DNA, i-motívu, G-kvadruplexu alebo aj iného motívu. Variabilný úsek je krátka stredová časť stavebného prvku, v ktorom môžu byť vlákna vzájomne komplementárne ale aj nekomplementárne. V našej práci sme skúmali rôzne typy štruktúr. Pre tvorbu G-kvadruplexu bola vo variabilnom úseku využitá repetícia odvodená od ľudskej telomérskej repetície GGGTTA a pre tvorbu i-motívu bola využitá repetícia CCCTAA. Pre potvrdenie schopnosti tohto systému vytvárať spomínané štruktúry boli v práci použité spektrálne metódy (kruhový dichroizmus a UV/Vis spektroskopia) a polyakrylamidová gélová elektroforéza (PAGE). Tieto štruktúry sú zaujímavé pre štúdium vzájomnej dynamiky nekanonických štruktúr v rámci väčších dsDNA mimikujúcich napríklad chromozómy alebo plazmidy. Tvorba nekanonických štruktúr závislých od faktorov ako pH alebo koncentrácia soli je ako súčasť väčšieho systému vhodná aj pre ďalší výskum a aplikáciu v nanotechnológii.

Literatúra:

1. J.-L. Mergny, D. Sen: Chemical Reviews, 2019, 119 (10), 6290-6325.
2. H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto: Chem. Commun., 2020, 56 (16), 2379-2390.

NANOČASTICE CÉRU A CHOROBY SÚVISIACE S VEKOM A AMYLOIDNOU AGREGÁCIOU

Bc. Alexandra Balická

Ing. RNDr. Katarína Šipošová, PhD.

V biologických systémoch majú redoxné reakcie významné postavenie a vyskytujú sa v mnohých procesoch, ako je napr. dýchanie či skladovanie energie. Avšak, na druhej strane, redoxná nerovnováha v tele sa vyskytuje pri mnohých patologických stavoch, ako je rakovina, cukrovka, ale aj neurodegeneratívne ochorenia. Dnes je už známe prepojenie oxidačného stresu s mnohými neurodegeneratívnymi ochoreniami súvisiacimi s vekom a procesmi starnutia, pre ktoré je charakteristická amyloidná agregácia proteínov. Nanočastice oxidu ceričitého sú vďaka svojim pozoruhodným vlastnostiam sľubným nanomateriálom použiteľným na štúdium procesov u chorôb súvisiacich s oxidačným stresom a amyloidogenezou. V práci sme sa zamerali na štúdium vplyvu nanočastíc CeO₂ na procesy amyloidnej agregácie inzulínu a ich anti-oxidačný potenciál monitorovaním pseudo-katalytickej a pseudo-superoxid dismutázovej aktivity. Preukázali sme, že spôsob syntézy výrazne ovplyvňuje výsledné fyzikálno-chemické vlastnosti nanočastíc ako je veľkosť a pomer Ce³⁺/Ce⁴⁺ na ich povrchu a teda aj ich bioaktivitu. Najmenšie častice, ktoré majú súčasne najvyšší pomer Ce³⁺ iónov na povrchu vykazujú najvyššiu anti-amyloidnú aktivitu. Obsah Ce³⁺ iónov taktiež ovplyvňuje aj anti-oxidačný potenciál nanočastíc a pozorovali sme veľkostne/valenčne závislú pseudo-SOD a pseudo-katalázovú aktivitu. Dosiahnuté výsledky vykazujú veľkú perspektívu pre porozumenie vzájomného pôsobenia oxidačného stresu a amyloidogenézy a zároveň hľadanie efektívneho modelu modulácie amyloidnej agregácie proteínov a liečby neurodegeneratívnych ochorení.

INTERAKCIE NOVÝCH KOMPLEXNÝCH ZLÚČENÍN GÁLIA S DNA A HOVÄDZÍM SÉROVÝM ALBUMÍNOM

Bc. Ľudmila Timuľáková

RNDr. Danica Sabolová, PhD.

Katedra biochémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Moyzesova 11, 040 01 Košice

V tejto práci sme sa zaoberali štúdiom interakcií nových komplexných zlúčenín gália s DNA z teľacieho týmusu a hovädzím sérovým albumínom. Na štúdium skúmaných látok sme použili rôzne techniky ako sú UV-Vis spektroskopia, fluorescenčná spektroskopia a elektroforéza. Pomocou agarózovej gélovej elektroforézy sme skúmali, či naše komplexy gália sú schopné štiepiť plazmidovú DNA. Elektrofereticky bola tiež preskúmaná inhibičná aktivita komplexov voči TOPO I. Z procesu zhášania fluorescence BSA komplexami gália sme zistili, že s rastúcou teplotou sa nám zvyšovala hodnota Stern-Volmerových konštánt [1], čo nám poskytuje dôkaz o dynamickom type zhášania intenzity fluorescence BSA [2].

Literatúra:

1. Saeidifar, M. et al. Multi-spectroscopic and electrochemical approaches of the interaction between in *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* [online], 2016
2. Wani, TA. et al. Study of Interactions of an Anticancer Drug Neratinib With Bovine Serum Albumin: Spectroscopic and Molecular Docking Approach in *National Library of Medicine* [online], 2018

VÝVOJ METÓDY PRE TESTOVANIE AKTIVITY VARIANTOV STAFYLOKINÁZY SELEKTOVANÝCH RIBOZÓMOVÝM DISPLEJOM

Bc. Michaela Salaková

Školiteľ: Mgr. Mária Tomková, PhD.

*Katedra biofyziky, Ústav fyzikálnych vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ,
04001 Košice*

Jesenná 5,

Kardiovaskulárne ochorenia postihujú každý rok čoraz viac ľudí. Zhoršenie kvality životného štýlu obyvateľstva vyspelých krajín, sedavé zamestnanie a iné negatívne vplyvy prostredia môžu viesť k častému vzniku krvných zrazenín a nimi spôsobených ochorení. Pred pár rokmi bolo jedinou možnosťou akútnej liečby trombózy podanie tkanivového plazminového aktivátora (tPA), avšak od vtedy boli vyvinuté nové trombolýtiká. Ich vlastnosti sa však líšia a aj ich účinnosť môže byť obmedzená. Stafylokináza je v niektorých krajinách už klinicky používané trombolýtikum bakteriálneho pôvodu a je rovnako efektívna v liečbe infarktu myokardu ako t-PA. Navyše má vyššiu špecifickosť k fibrínu než t-PA, avšak s relatívne nízkou afinitou k fibrínu. Stafylokináza je vhodným adeptom na experimentálne štúdie, nakoľko disponuje mnohými vyhľadávanými vlastnosťami trombolýtik. Tieto vlastnosti je ďalej možné modifikovať pomocou evolučných techník proteínového inžinierstva, akou je aj ribozómový displej. Cieľom práce je analýza a optimalizácia krokov predchádzajúcich ribozómovému displeju stafylokinázy, s úmyslom využiť experimentálnu techniku na určenie aktivity variantov génu. Táto esej by mala v budúcnosti uľahčiť výber vylepšených variantov stafylokinázy z ribozómového displeja pre ďalšie experimenty.

Kľúčové slová: trombolýtiká, stafylokináza, proteínové inžinierstvo, riadená evolúcia, enzýmová aktivita

Literatúra:

1. Mican, Jan; Toul, Martin; Bednar, David; et al. Structural Biology and Protein Engineering of Thrombolytics. Computational and structural biotechnology journal. 2019; Volume: 1. Pages: 917-938.
2. Galan, Asier; Comor, Lubos; Horvatic, Anita; et al. Library-based display technologies: where do we stand? Molecular biosystems. 2016; Volume: 12. Issue: 8. Pages: 2342-2358.
3. Lane, Michael D.; Seelig, Burkhard. Advances in the directed evolution of proteins current opinion in chemical biology. 2014, Oct; Volume: 22. Pages: 129-136.
4. Nikitin, Dmitri; Choi, Seungbum; Mican, Jan; et al. Development and Testing of Thrombolytics in Stroke. Journal of stroke. 2021 Jan; Volume: 23. Issue: 1. Pages. 12-36.

OPTIMALIZÁCIA PRODUKCIE A PURIFIKÁCIE FLAVODOXÍNU *D. DESULFURICANS*

Tomáš Rodziňák

Školiteľ: Nataša Tomášková, konzultant: Ľuboš Ambro

Katedra biochémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Moyzesova 11, 040 01 Košice

Študentská vedecká práca je zameraná na optimalizáciu izolácie a purifikácie flavodoxínu z *Desulfovibrio desulfuricans*. Flavodoxíny sú malé proteíny, ktoré sa nachádzajú u baktérií, klostríí a u niektorých eukaryotických rias [1]. Obsahujú jeden nekovalentne naviazaný kofaktor FMN, ktorý výrazne stabilizuje komplex holoproteínu a umožňuje flavodoxínom ich funkciu prenášať elektróny [2]. Ich štruktúra je α/β -paralelná topológia obsahujúca centrálny päťvláknový β -skladaný list obklopený α -helixami. Rozdeľujú sa na krátke a dlhé flavodoxíny. Dlhé obsahujú približne 20 zvyškovú slučku, ktorá rozdeľuje piate β -vláknó na 2 časti. Flavodoxín-podobnú štruktúru má 9 super rodín proteínov napríklad lipázy, esterázy alebo katalázy [3]. Flavodoxín z *D. desulfuricans* sme izolovali pomocou afinítnej chromatografie (IMAC) prostredníctvom zabudovanej hexahistidínovej kotvy v aminokyselinovom reťazci proteínu. Následne bol proteín dočistený vysokotlakovou kvapalnou chromatografiou (HPLC). Izolovali sme 2 rôzne rekombinantné varianty s hexahistidínovou kotvou na opačnom konci polypeptidového reťazca. Podobne sme porovnali podmienky izolácie, použitím dvoch pH 5,2 a pH 8,0. Z nameraných výtazkov vypurifikovaného flavodoxínu sme vybrali optimálnejšie podmienky izolácie.

Literatúra:

1. Simonsen, R. P., & Tollin, G. (1980). Structure-function relations in flavodoxins. *Molecular and cellular biochemistry*, 33(1-2), 13–24
2. López-Llano, J., Maldonado, S., Bueno, M., Lostao, A., Angeles-Jiménez, M., Lillo, M. P., & Sancho, J. (2004). The long and short flavodoxins: I. The role of the differentiating loop in apoflavodoxin structure and FMN binding. *The Journal of biological chemistry*, 279(45), 47177–47183
3. Houwman, J. A., & van Mierlo, C. P. M. (2017). Folding of proteins with a flavodoxin-like architecture. *The FEBS journal*, 284(19), 3145–3167

IZOLÁCIA A ŠTÚDIUM NADH OXIDÁZY

Bc. Ivana Kostková

Školiteľ: doc. RNDr. Rastislav Varhač, PhD.

Katedra Biochémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Šrobárová 2, 04 154 Košice

NADH oxidáza z *Thermus thermophilus* je homodimér, ktorý patrí do skupiny flavoenzýmov obsahujúcich FMN alebo FAD ako kofaktor.^[1] V našej práci sme sa venovali izolácii NADH oxidázy a následnému štúdiu špecifickej aktivity a štruktúrnej stability enzýmu. Enzým sme izolovali v dostatočnej čistote a s molekulovou hmotnosťou 25 kDa (monomér). Stanovenie špecifickej aktivity a štruktúrnej stability je dôležité nielen pre základný výskum, ale aj pri ďalšom praktickom využití NADH oxidázy. Merania v rôznych podmienkach prostredia ako pH, teplota a denaturant nám umožnili sledovať konformačný prechod proteínu z natívnej do denaturovanej štruktúry. Pozorovali sme zmeny fluorescenčného signálu pomocou prirodzených fluorescenčných sond Trp a FAD. Meraniami denaturácie vplyvom pH, teploty a GdnHCl sme zistili, že spôsob rozbaľovania enzýmu poukazuje na zložitosť zmien v štruktúre spôsobených meniacimi sa podmienkami prostredia.

Literatúra:

^[1] H. J. Park, CH. O. A. Reiser, S. Kondruweit, H. Erdmann, R. D. Schmid, M. Sprinzl: Purification and characterization of NADH oxidase from the thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *European Journal of Biochemistry* 205 (1992) 881-885