

## ÚLOHA PROTEÍNOV RODINY ERM V REGULÁCII EXPRESIE PROTEÍNU BCRP A INTRACELULÁRNEHO OBSAHU HYPERICÍNU V NÁDOROVÝCH BUNKÁCH

**Bc. Gabriela Blašková**

*Školiteľ: doc. RNDr. Rastislav Jendželovský, PhD.*

*Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Šrobárova 2, 041 54 Košice*

ABC transportné proteíny asociované s mnohopočetnou liekovou rezistenciou (MDR) sú prítomné vo väčšine tkanív, kde okrem liečiv prenášajú tiež živiny a metabolity, a preto ich úplná supresia nie je najideálnejším riešením. Tú navyše sťažuje prekryvajúca sa špecificita transportérov k prenášaným substrátom a nežiadúce účinky inhibítorov. Hľadané sú preto iné molekuly, ktoré regulujú ABC transportéry a súčasne sú tkanivovo špecifickejšími. Príkladom sú proteíny rodiny ERM, kam radíme ezrín, radixín a moezín, ktoré zabezpečujú membránovú lokalizáciu a funkčnosť transportérov. Bola dokázaná aj ich asociácia s adhezívnymi molekulami, čo otvára príležitosť terapii voči metastatickým nádorom so súčasným potlačením MDR. Cieľom uvedenej práce bolo preskúmať vplyv utišenia expresie proteínov rodiny ERM prostredníctvom siRNA na reguláciu expresie a aktivity ABC transportného proteínu BCRP. Efluxná činnosť bola analyzovaná intracelulárnou akumuláciou hypericínu, ktorý je substrátom študovaného proteínu. Na základe pozorovania tvorby bunkových zhlukov pri práci so suspenznými líniami, ktoré sa vyznačujú zvýšenou expresiou BCRP, práca overuje taktiež hypotézu existencie interakcie medzi proteínom BCRP a E-kadherínom (CDH1), ktorú reguluje proteínová rodina ERM. Pre transfekciu boli vyselektované bunkové línie ľudského kolorektálneho adenokarcinómu HT-29, pľúcneho adenokarcinómu A549 a suspenzné bunky ľudského myelómu RPMI-8226 a RPMI-8226/MR20. Zistili sme, že všetky tri proteíny rodiny ERM regulujú membránovú expresiu a aktivitu BCRP v bunkách A549, čo sa odzrkadlilo na jeho zníženej aktivite a zvýšených hladinách substrátu v bunkách. Zaujímavým zistením našej práce je, že samotný hypericín znížil hladiny fosforylovaných proteínov ERM v bunkách A549 a súčasne zvýšil hladinu BCRP. Na základe dosiahnutých výsledkov konštatujeme, že na regulácii proteínu BCRP sa v bunkovej línii A549 okrem proteínov ERM podieľajú aj iné signálne dráhy, ktoré v prípade potreby účinne zastupujú ich funkciu s cieľom zabezpečenia ochrany buniek voči účinkom xenobiotík. Práca navyše prispieva k rozšíreniu poznatkov o odlišnej expresii proteínov ERM v nádorových bunkových líniiach rôzneho histologického pôvodu a podporuje myšlienku, že práve proteínová rodina ERM môže predstavovať sľubnú cestu vedúcu k prekonaniu MDR.

**Kľúčové slová:** hypericín, BCRP, kadherín, ezrín, radixín, moezín

### Literatúra:

1. OGIHARA, T. a kol. Physiological Roles of ERM Proteins and Transcriptional Regulators in Supporting Membrane Expression of Efflux Transporters as Factors of Drug Resistance in Cancer. *Cancers*. 2020, **12**(11), 3352.

## ANALÝZA ÚLOHY KASPÁZY-3 V APOPTOTICKÝCH A NEAPOPTOTICKÝCH PROCESOH BUNIEK MIECHY POTKANA V POSTNATÁLNOM OBDOBÍ.

Bc. Ladislav Pačut<sup>1</sup>

Školiteľ: doc. RNDr. Juraj Ševc, PhD.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Šrobárova 2, 04154 Košice<sup>1</sup>

Kaspázy predstavujú proteázy spájané najmä s procesom apoptózy – fyziologickým odumieraním buniek. Zapojenie kaspáz do apoptotických dejov je dokumentované aj v nervovej sústave najmä počas vývinu, no aj počas patologických procesov zahŕňajúcich poranenia, ischemiu CNS či neurodegeneratívne ochorenia. Zároveň však existujú viaceré práce popisujúce aktivitu kaspáz aj v neapoptotických procesoch nervového systému. V minulosti bola na našom pracovisku v tkanive miechy potkana pozorovaná početná populácia buniek s aktivovanou kaspázu-3. Prítomnosť týchto buniek vyvolala viacero otázok ohľadom úlohy kaspázy-3 a apoptózy v správnom fungovaní CNS. Rozhodli sme sa preto vytvoriť *in vitro* model, pomocou ktorého by sme mohli študovať aktivitu kaspázy-3 počas apoptózy nervových buniek, pričom model by taktiež slúžil ako nástroj pre správnu interpretáciu našich pozorovaní. Pre tieto účely sme využili primárnu bunkovú kultúru pripravenú z tkaniva miechy P8 potkanov, v ktorej sme indukovali apoptózu pridaním apoptotického induktora – staurosporínu. V prvom kroku sme skúmali vplyv staurosporínu na nervové bunky. Zistili sme, že vo väčšine buniek nášho modelu dochádza k indukcii apoptózy a k aktivácii efektorových kaspáz-3/-7 (aC3/7) po 4 hodinách. Po 7 hodinách sme v porovnaní s aC3/7<sup>+</sup> populáciou pozorovali signifikantný nárast annexinV<sup>+</sup> buniek. Ten mohol byť spôsobený prítomnosťou iných foriem bunkovej smrti, počas ktorých je možné pozorovať falošne pozitívny signál pre tento apoptotický marker. V ďalších analýzach aktivity kaspázy-3 sme sa preto rozhodli pracovať s intervalmi 0 až 7 hodín po indukciu apoptózy. Prítomnosť aC3 počas apoptózy sme v našom modeli porovnali s poštiepenou formou proteínu PARP-1 (cPARP), ktorý sme vybrali po selekcii z viacerých apoptotických markerov. Zistili sme, že k signifikantnému nárastu početnosti aC3<sup>+</sup> a cPARP<sup>+</sup> populácií dochádza v rovnakom intervale – 4 hodiny od indukcie apoptózy. Predpokladáme teda, že v apoptotickej populácii by mali byť v bunkách prítomné oba markery súčasne, a preto by sme mali pozorovať rovnaké zastúpenie aC3<sup>+</sup> a cPARP<sup>+</sup> buniek. Zaujímavé ale je, že v tkanive miechy sme pozorovali disproporciu počas selekcie vhodných markerov medzi masívnou aC3<sup>+</sup> populáciou, a len veľmi nízkym zastúpením cPARP<sup>+</sup> buniek. Predpokladáme preto, že aC3 v mieche môže participovať aj v neapoptotických procesoch, alebo jej aktivita môže byť výrazne regulovaná. Ako ukazuje naša analýza expresie génov kódujúcich inhibítory apoptózy, aktivita kaspázy-3 v tkanive miechy je pravdepodobne regulovaná proteínmi z rodiny IAP, najmä produktom *Birc4* génu – XIAP. Pre lepšie pochopenie úlohy aC3 v CNS je však aj do budúcnosti potrebný ďalší výskum.

### Literatúra:

1. SHI, Yigong. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell*, 2002, 9.3: 459-470.
2. D'AMELIO, M.; CAVALLUCCI, V.; CECCONI, F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death & Differentiation*, 2010, 17.7: 1104-1114.

## CHARAKTERIZÁCIA REISSNEROVHO VLÁKNA A SUBKOMISURÁLNEHO ORGÁNU V KOMOROVOM SYSTÉME MOZGU A V MIECHE HLODAVCOV

**Bc. Lukáš Malčický**

*Školiteľ: RNDr. Anna Alexovič Matiašová, PhD.*

*Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Šrobárova 2, 041 54 Košice*

Reissnerovo vlákno predstavuje glykoproteínovú štruktúru, ktorá je produkovaná bunkami subkomisurálneho orgánu tretej mozgovej komory. Táto štruktúra prechádza naprieč komorovým systémom mozgu až do koncovej oblasti centrálného kanála miechy, kde dochádza k jeho odbúraniu. V poslednom období sa Reissnerovmu vláknu a subkomisurálnemu orgánu venuje čoraz väčšia pozornosť, keďže abnormality vo vývine týchto štruktúr a v sekrécii zložiek Reissnerovo vlákna môžu byť spojené s rôznymi ochoreniami, medzi ktoré patrí napríklad hydrocefalus. Naše predchádzajúce experimenty naznačujú, že jednou zo zložiek Reissnerovho vlákna by mohol byť aj glykoproteín CD31, typický pre bunky ciev, ktorý v týchto štruktúrach doteraz pozorovaný nebol. V tejto práci sme sa preto zamerali na identifikáciu a charakterizáciu Reissnerovho vlákna a buniek subkomisurálneho orgánu u hlodavcov s využitím techník skenovacej elektrónovej mikroskopie, imunoznačenia a následných analýz génovej expresie. Subkomisurálny orgán tvorený bunkami, ktoré mali na apikálnom povrchu krátke a málo denzné riasinky bol lokalizovaný dorzokaudálne v tretej mozgovej komore. Z tejto oblasti odstupovala vláknitá štruktúra, morfológicky zodpovedajúca Reissnerovmu vláknu, ktorú sme následne identifikovali aj v lúmene centrálného kanála miechy, ako CD31<sup>+</sup> štruktúru. Produkcia glykoproteínu CD31 bunkami subkomisurálneho orgánu bola overená technikou imunoznačenia. V radiálne usporiadaných bunkách subkomisurálneho orgánu bol glykoproteín CD31 identifikovaný v ich apikálnej cytoplazme, čo naznačuje, že bunky by sa mohli podieľať na jeho syntéze. Pre overenie našej hypotézy sme izolovali oblasť subkomisurálneho orgánu pomocou laserovej mikrodisekcie a analyzovali expresiu génu kódujúceho CD31 technikou RT-PCR, ktorá potvrdila, že CD31 je v bunkách subkomisurálneho orgánu exprimovaný vo zvýšenej miere v porovnaní s inými oblasťami mozgu. V porovnaní s potkanom sme CD31 neidentifikovali v Reissnerovom vlákne, ani v bunkách subkomisurálneho orgánu myši, čo naznačuje, že by sa mohlo jednať o štruktúry, ktorých zloženie môže byť odlišné aj medzi blízko príbuznými druhmi hlodavcov.

**Kľúčové slová:** Reissnerovo vlákno, hlodavce, subkomisurálny orgán, ventrikulárny systém

### **Literatúra:**

1. Sepúlveda, V., Maurelia, F., González, M., Aguayo, J., Caprile, T. (2021). SCO-spondin, a giant multicellular protein that regulates cerebrospinal fluid activity. *Fluids and barriers of the CNS*, 18(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12987-021-00277-w>

## APOPTÓZA NEURÓNŮV V REAKCII NA PATOLOGICKÝ STIMUL POČAS VÝVINU A V DOSPELOSTI

Ivan Bukhun

Školiteľ: doc. RNDr. Juraj Ševc, PhD

*Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ,  
Šrobárova 2, 04154 Košice*

Apoptóza hrá dôležitú úlohu v regulácii mnohých procesov v organizme počas embryogenézy a v postnatálnom období. Počas svojho vývoja prebehnú v nervovom systéme dve obdobia s vysokou mierou apoptózy: obdobia tzv. proliferačnej a neurotrofickej bunkovej smrti. Prvou významnou apoptotickou etapou je proliferačná bunková smrť, keď dochádza k odumieraniu neuronálnych prekursorových buniek v čase proliferácie v germinálnej zóne. Počas neskoršieho vývinu apoptotická aktivita ešte raz stúpne, a to v čase, keď už postmitotické neuróny inervujú svalové vlákna a receptory, vtedy nastáva fáza tzv. neurotrofickej bunkovej smrti. V tomto období existuje krehká rovnováha medzi proapoptotickými a antiapoptotickými stimulmi, ktorá vo výsledku rozhodne, či neurón spustí programovanú smrť, alebo nie. Cieľom práce bolo spracovať problematiku postnatálneho vývinu miechy so zameraním sa na apoptózu neurónov. Na základe experimentu s použitím modelu minimálneho poranenia miechy bolo cieľom overiť, či sú neuróny počas skorého postnatálneho života náchylnejšie na odumieranie prostredníctvom apoptózy v porovnaní s neskorším vývinom a dospelosťou v prípade patologického stimulu. Po aplikácii modelu minimálneho poškodenia miechy sme porovnali počty prežívajúcich neurónov v zadných rohoch miechy u troch vekových skupín potkanov (7-dňové, 29-dňové a dospelé), ktoré preživali 24 hodín, resp. 28 dní po operácii. Taktiež sme stanovili sme množstvo odumierajúcich buniek v akútnej (24 hodín) a subakútnej fáze (4 dni) po poranení. Počas výskumu boli tiež testované metódy automatickej kvantifikácie a segmentácie neurónov. Z kvantifikačných metód bol vybraný StarDist, lebo umožňuje efektívne segmentovať sa prekrývajúce neuróny. Naše výsledky preukázali postupné odumieranie neurónov a buniek glie u neonatálnych mláďat v akútnej a subakútnej fáze poranenia v porovnaní s dospelými zvieratami, u ktorých odumreli neuróny počas prvých 24 hodín od poranenia. Avšak 28 dní po poranení bol počet odumretých neurónov rovnaký vo všetkých vekových skupinách. Naše výsledky preto nepotvrdili teóriu o zväčšenom úbytku neurónov po poranení u neonatálnych potkanov v dôsledku narušenia rovnováhy proapoptotických a antiapoptotických stimulov.

Kľúčové slová: poranenie miechy, apoptóza, neuróny, reakcia nervového tkaniva v neonatálnom období