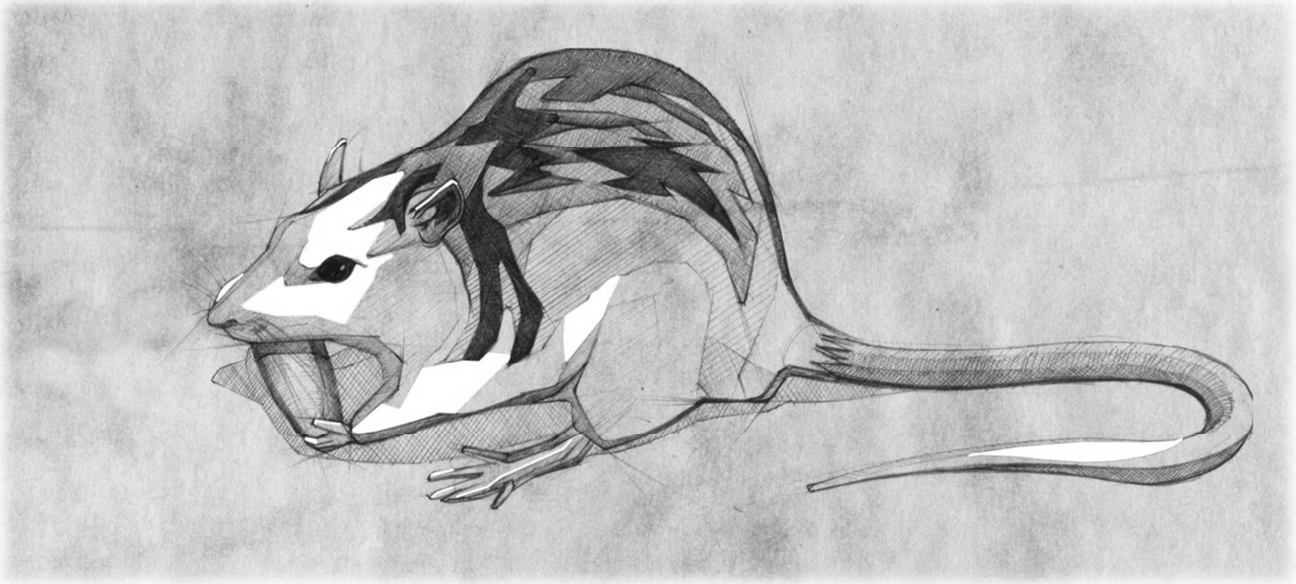
INTERAKTÍVNA KONFERENCIA MLADÝCH VEDCOV 2013

ZBORNÍK ABSTRAKTOV

ISBN 78-80-970712-5-7



Stabilizácia mitochondriálnej DNA kvasinky *Yarrowia lipolytica*

Jana Bakkaiová[1], Dana Lajdová[1], Jozef Nosek[2], Ľubomír Tomáška[1]

Katedry genetiky[1] a biochémie[2], Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina, Bratislava
petrovicova@fns.uniba.sk

Mitochondriálna DNA (mtDNA) bola objavená pred viac ako pol storočím. Komponenty mitochondriálnych nukleoidov (mt nukleoidov), nukleo−proteínových komplexov, do ktorých je mtDNA zbaľovaná, sa však začali študovať až v uplynulých rokoch. Hoci sa vie, že zbaľovanie mt nukleoidov je primárne zabezpečované proteínmi obsahujúcimi DNA väzobné domény HMG boxy [1], povaha ďalších komponentov zúčastnených v regulácii štruktúry a dynamiky mt nukleoidu je stále neznáma. Kvasinka *Yarrowia lipolytica* na rozdiel od *Saccharomyces cerevisiae* nie je schopná tolerovať stratu mtDNA a je od konvenčného kvasinkového modelového organizmu *S. cerevisiae* značne evolučne vzdialená [2]. MtDNA tejto kvasinky je taktiež zbaľovaná do mt nukleoidu, ktorého hlavnou súčasťou je nedávno objavený mitochondriálny HMG box obsahujúci proteín Mhb1 [3, 4].

Naším cieľom bolo odhaliť (1) funkciu proteínu Mhb1 a (2) záložné mechanizmy, ktoré dokážu absenciu Mhb1p kompenzovať. Za týmto účelom bol skonštruovaný delečný mutant *Y. lipolytica* Δ*mhb1*. Prekvapivo, tento kmeň nevykazuje rastový defekt na štandardných kultivačných médiách a má zachovanú respiračnú kapacitu. Podľa predbežných výsledkov ostáva nezmenená aj hladina expresie vybraných mitochondriálnych génov, čo naznačuje existenciu zatiaľ neznámeho záchranného mechanizmu. Na druhej strane, analýzy prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie odhalili, že kmeň bez funkčného proteínu Mhb1 má mt nukleoidy s výrazne zmenenou morfológiou. Zároveň sa mtDNA stáva náchylnejšia na pôsobenie látok interagujúcich s mtDNA, čo bolo potvrdené zníženou životaschopnosťou delečného kmeňa Δ*mhb1* na médiách s obsahom etídium bromidu. Metódou pulznej gélovej elektroforézy sme separovali intaktné molekuly mtDNA v géle, pričom sme odhalili zmenené množstvo a mobilitu mtDNA u delečného kmeňa v porovnaní so štandardným typom. To by mohlo byť vysvetlené zvýšeným množstvom rekombinačných intermediátov mtDNA a/alebo zníženým počtom kópií mtDNA. Zatiaľ čo dvojrozmerná (2D) agarózová elektroforéza mtDNA nepotvrdila žiadne rozdiely v množstve rekombinačných intermediátov, metóda kvantitatívnej RT-PCR nám zatiaľ nepriniesla jednoznačnú odpoveď o počte kópií mtDNA. Naše výsledky však potvrdzujú, že proteín *Y*Mhb1, podobne ako jeho funkčné homológy z kvasiniek *S. cerevisiae* (*Sc*Abf2p) [5] a *Candida albicans* (*Ca*Gcf1p) [6], je pravdepodobne zahrnutý v zbaľovaní a stabilizácii mitochondriálneho genómu tejto kvasinky.

Práca bola podporená grantami National Institutes of Health Grants 2R01ES013773-06A, APVV 0035-11, VEGA 1/0311/12 a Grant UK 239/2012.

[1] Chen, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 815−825.
[2] Gaillardin, *FEMS Yeast Res.* **2012**, *12*, 317−331.
[3] Nosek, *FEMS Yeast Res.* **2006**, *6*, 356−370.
[4] Petrovičová, *The XXXXth annual conference on yeast*, **2012**, Smolenice.
[5] Diffley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7864−7868.
[6] Višacká, *Microbiology-SGM* **2009**, *155*, 1226−1240.

Anaplasma phagoctophilum v severnom Taliansku

Ivana Baráková[1,2], Annapaola Rizzoli[2], Giovanna Carpi[2], Markéta Derdáková[1,3]

[1]Ústav zoológie SAV Bratislava- Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, [2]Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach, 1 38010 S. Michele all'Adige (TN), Italy, [3]Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice
va.barakova@gmail.com

Anaplasma phagocytophilum je pôvodcom granulocytárnej anaplazmózy ľudí a zvierat. V Európe je prenášaná kliešťami z rodu *Ixodes* a to najmä druhom *Ixodes ricinus*. Rezervoárovými hostiteľmi sú viaceré druhy stavovcov, ktoré sú špecificky viazané na určité genotypy tejto vnútrobunkovej baktérie. Vzhľadom na väčšiu genetickú heterogenitu *A. phagocytophilum* v Európe je jej ekologická asociácia s rezervoárovými hostiteľmi nie úplne objasnená. Na lepšie pochopenie potenciálneho risku prenosu *A. phagocytophilum* na ľudí a domáce zvieratá je potrebné objasniť cirkuláciu rôznych genotypov tejto baktérie a jej asociáciu s rôznymi rezervoárovými hostiteľmi. Našim cieľom bolo určiť vnútrodruhovú variabilitu kmeňov *A. phagocytophilum* cirkulujúcich v severnom Taliansku (provincia Trentino) u kliešťov cicajúcich na širokom spektre hostiteľov ako napríklad na psoch, ovciach, vtákoch, hlodavcoch, vysokej lesnej zvery a tiež kliešťoch cicajúcich na ľuďoch. Celkom 821 kliešťov *I. ricinus* z vegetácie, 284 kliešťov cicajúcich

na rôznych hostiteľoch (psy, ovce, vtáky, hlodavce, vysoká lesná zver, ľudia) a 1295 vzoriek krvi z hlodavcov bolo pomocou PCR a Real-time PCR analyzovaných na prítomnosť baktérie *A. phagocytophilum.* Vnútrodruhová variabilita a fylogenetické stromy boli zostrojené pomocou analýzy sekvencii (*msp4*, *groEL*) z pozitívnych kliešťov z vegetácie, z pozitívnych kliešťov z hostiteľov a krvných vzoriek z hlodavcov. Následne fylogenetické stromy poukázali na dve hlavne skupiny genotypov *A. phagocytophilum* cirkulujúcich v severnom Taliansku. Prvá skupina pozostávala z kmeňov nájdených u vysokej lesnej zvery, oviec, psov, ľudí a kmeňov nájdených u kliešťov z vegetácie a druhá skupina genotypov pozostávala len z kmeňov nájdených v krvných vzorkách u hlodavcov. Tieto genotypy z hlodavcov boli identické s genotypmi nájdenými u kliešťov *I. trianguliceps* na Slovensku a UK [1]. Naša štúdia sa prikláňa k hypotéze o existencii dvoch separovaných enzootických cykloch *A. phagocytophilum* cirkulujúcich v Európe a taktiež objasňuje pôvod kmeňov ohrozujúcich ľudí ako aj domáce zvieratá.

Výskum a vývoj bol financovaný z VEGA − 2/0055 a APVV-0267-10 a EU grantom FP7-261504 EDENext.

[1] Bown, K.J. – Lambin, X. – , N.H. – Begon, M. – Telford, G. – Woldehiwet, Z. – Birtles. R.J. In Emerging Infectious Diseases. **2009**, *15*, 1948−1954.

Identifikácia promótorov a expresia vybraných neuropeptidov priadky morušovej

Branislav Bednár, Ivana Daubnerová, Dušan Žitňan

Slovenská akadémia vied, Ústav Zoológie SAV, odd. Molekulárnej fyziológie, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava
bedn.bran@gmail.com

Priadka morušová sa za posledných desať rokov dostala do centra záujmu. Kompletné sekvenovanie jej genómu v roku 2004 umožnilo aplikáciu moderných molekulárnych a genetických metód na štúdium rôznych biologických procesov. Priadka svojou veľkosťou predstavuje ideálny modelový organizmus pre štúdium fyziologických dejov. Zvliekanie hmyzu je hormonálne regulovaný biologický proces, ktorý umožňuje sledovať množstvo zložitých pochodov od génovej expresie, cez vylučovanie rôznych bioaktívnych látok až po presne definované správanie a rôzne fyziologické funkcie. Behaviorálne prejavy sprevádzajúce jednotlivé fázy zvliekania sú riadené ekdyziotropnými hormónami (ETH) z periférnych Inka buniek a množstvom neuropeptidov zo špecializovaných neurónov centrálneho nervového systému(CNS). V prípravnej fáze prebehne v týchto neurónoch expresia ETH receptorov (ETHR-A a ETHR-B). Počas ekdyziálnej sekvencie (behaviorálna fáza) ETH aktivuje špecifické neuróny, L_1/IN-704, pričom dochádza k presne načasovanej produkcii cGMP a vylučovaniu neuropeptidov riadiacich prechod jedinca do ďalšieho vývinového štádia. V našej práci sme pomocou imunohistochémie v týchto neurónoch sledovali zvyšovanie hladín cGMP a pomocou *in-situ* hybridizácie a imunohistochémie sme opísali priebeh expresie vybraných neuropeptidov, allatostatínu CC a burzikónu. Zároveň sme použili rekombinantné bakulovírusy na identifikáciu promótorov pre oba tieto neuropeptidy. Identifikované promótorové regulačné oblasti spolu s ETHR-A sme ďalej použili na prípravu stabilných transgénnych línií priadky morušovej pomocou vektora obsahujúceho piggyBac traspozomálny element. Identifikácia promótorov a príprava transgénnych línií predstavujú výborný nástroj pre pochopenie endokrinnej regulácie zvliekania a iných komplexných biologických procesov, ktoré sú súčasťou mnohých živých organizmov vrátane človeka.

Práca bola podporená grantmi NIH USA GM67310, APVV-0827-11 a VEGA 2/0132/09.

Hľadanie mutácií v exónoch 2, 3 génu SNCA (alfa-synukleín) u slovenských pacientov postihnutých Parkinsonovou chorobou

Csaba Bognár[1], Marian Baldovič[1], Ľudovít Kádasi[1,2], Andrea Zaťková[1,2]

[1]Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Bratislava 4, 842 15,
[2]Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied, Vlárska 5, Bratislava 833 34
bogeecs@gmail.com

Parkinsonova choroba (Parkinson disease, PD) je po Alzheimerovej chorobe druhé najčastejšie neurodegeneratívne ochorenie. Ide o progresívne ochorenie s veľmi variabilným vekom nástupu (priemer 60 rokov). Podľa odhadov je na svete postihnutých touto chorobou asi 4 milión obyvateľov. Napriek tomu, že rozsiahle štúdie pokúšali nájsť environmentálne rizikové faktory pre vznik choroby, genetické varianty sa považujú dnes za hlavný kauzatívny faktor [1, 2]. Mutácie v siedmych už známych génoch, *SNCA*, *UCH-L1*, *LRRK2*, *GIGYF2*, *HTRA2/Omi*, *VPS35*, *EIF4G1* a dvoch mapovaných úsekoch (PARK3 a PARK10) spôsobujú autozomálne dominantnú formu ochorenia. Mutácie v šiestich iných génoch, *parkin*, *PINK1*, *DJ-1*, *ATP13A2*, *PLA2G6* a *FBXO7* majú za následok autozomálne recesívnu formu. V roku 1996 bol popísaný prvý lokus pre PD − PARK1. V tomto lokuse našli v jednej rodine s autozomálne dominantnou (AD) formou PD prvú bodovú mutáciu A53T v géne *SCNA*. Gén bol mapovaní na chromozómovú pozíciu 4q21−q23. Produktom génu je alfa-synukleín, čo je hlavnou zložkou obsahu Lewyho teliesok [2, 3]. Proteín SCNA pozostáva zo 140 aminokyselinových zvyškov [4]. Kruger a kol. identifikovali ako prví mutáciu c.88G>C (A30P) u jedného pacienta s familiárnou formou PD [5]. Mutácia c.136G>A (E46K) v géne *SNCA* spôsobuje ľahšiu tvorbu fibríl [6], ktoré sú prítomné takisto aj pri poruchách odbúravania alfa-synukleínu v ubikvitín−proteazómovom systéme a v lyzozómoch [7]. Tieto tri mutácie sú doteraz jediné potvrdené patogénne bodové mutácie v géne *SNCA* a nachádzajú sa v druhom (A30P) a v treťom exóne (E46K, A53T).

Pomocou sekvenovania 2. a 3. exónu génu *SNCA* u 160 nepríbuzných PD pacientoch sme našli rôzne sekvenčné varianty. Dve doteraz nepopísané tiché mutácie: c.45T>C (p.V15V) − podľa predikčných software-ov táto zmena neovplyvní mechanizmus splicingu; a druhú tichú mutáciu c.96G>A (p.K32K) − ktorá podľa spomenutých programov potenciálne môže negatívne ovplyvniť zostrih, zničením oblasti ESRS (exonic splicing regulatory element). Našli sme aj jeden už popísaný intronický polymorfizmus: c.121+11C>T (IVS3+11C>T, rs35135226) v exóne 2 génu *SNCA*. V treťom exóne génu *SNCA* sme nenašli žiadnu sekvenčnú zmenu.

Chceme sa poďakovať všetkým pacientom a ich rodinám. Tento projekt bol financovaný grantom GUK/494/2013.

[1] Benetin J. et al. (**2007**) Ako žiť s Parkinsonovou chorobou. Lundbeck Slovensko s.r.o., Bratislava, p. 7.
[2] Polymeropoulos M. H., Higgins J. J., Golbe L. I., et al. (**1996**) Science. *274*, 1197.
[3] Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, et al. (2007) Neuropathology. **2007**, *27*, 494.
[4] Uversky V. N., Li J., Fink P. et al. (**2001**) J Biol Chem. *276*, 10734.
[5] Kruger R., Kuhn W., Muller T., et al. (**1998**) Nat Genet. *18*, 106.
[6] Greenbaum E. A., Graves C. L.et al. (**2005**) J Biol Chem. *280*, 7800.
[7] Vogiatzi T., Xilouri M., Vekrellis F. et al. (**2008**) J Biol Chem. *283*, 23542.