

PROJEKT PODPORY VEDECKÝCH POBYTOV V  
ORGANIZÁCIÁCH UNIVERSITY OF OSLO,  
(DEPARTMENT OF NUTRITION) A MEDICAL  
UNIVERSITY IN WIEN PRE UCHÁDZAČOV  
PÔSOBIACICH NA KATEDRE GENETIKY -  
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY  
KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

podaný na základe oznámenia Ministerstva školstva Slovenskej republiky o poskytovaní dotácií na rozvoj vedy a techniky č. CD-2009-35521/37347-1:11 na podporu vedeckých pobytov v organizáciách alebo centrách výskumu a vývoja vo väzbe na Európsku výskumnú infraštruktúru (ERI).

## ZÁMERY A CIELE PROJEKTU

Riešitelia boli počas riešenia projektu študentami tretieho stupňa vysokoškolského štúdia (doktorandi) a ich projekty v plnej miere nadväzujú na témy ich dizertačných prác.

Výskumné cesty jednotlivých uchádzačov mali slúžiť ako podklad k napísaniu dizertačnej práce, pre publikačnú činnosť, prípravu príspevkov na vedecké konferencie, napísanie vedeckých článkov a prispieť k riešeniu problematiky v daných oblastiach výskumu. Všetci traja uchádzači z Univerzity Komenského v Bratislave žiadali o dotáciu v rámci oblasti biomedicíny a biotechnológií. Dva predkladané projekty sú súčasťou štruktúry EATRIS (European Advanced Translational Research Infrastructure in Medicine) a jeden projekt je súčasťou štruktúry ECRIN (European Clinical Research Infrastructures Network).

- Doba riešenia projektu: 1.12.2009 – 31.10.2010
- Zodpovední riešitelia: Mgr. Katarína Hašplová  
Mgr. Alexandra Hudecová  
Mgr. Ines Kováčiková
- Žiadateľ o dotáciu: *Univerzita Komenského  
Šafárikovo námestie 6,  
818 06 Bratislava,  
[www.uniba.sk](http://www.uniba.sk)*



# Rozpis finančných prostriedkov pre výskum a vývoj

## ZMLUVA 1253/2009

Položka/Uchádzač	Plánovaný rozpočet projektu				Skutočné výdavky projektu				ROZDIEL
	celkový	individuálny			individuálne			celkové	
		Kováčiková	Hašplová	Hudecová	Kováčiková	Hašplová	Hudecová		
Mzdové náklady	0,00	0,00	0,00	0,00				0,00	0,00
Náklady na stravné a ubytovanie	44 466,00	14 466,00	15 000,00	15 000,00	13 866,00	14 911,60	14 911,59	43 689,19	776,81
Zdravotné a sociálne poistenie	0,00	0,00	0,00	0,00				0,00	0,00
Cestovné výdavky na zahraničné a tuzemské pracovné cesty súvisiace s vedeckým pobytom uchádzača	1 260,00	360,00	450,00	450,00	522,40	741,13	707,56	1 971,09	-711,09
Náklady na návštevu odborných seminárov, konferencií a sprievodných podujatí súvisiacich s výskumnou problematikou	60,00	20,00	20,00	20,00	239,00			239,00	-179,00
Náklady na drobný spotrebný materiál súvisiace s vedeckým pobytom uchádzača	150,00	50,00	50,00	50,00	306,64			306,64	-156,64
Bežné nepriame náklady	150,00	50,00	50,00	50,00				0,00	150,00
	<b>46 086,00</b>	<b>14 946,00</b>	<b>15 570,00</b>	<b>15 570,00</b>	<b>14 934,04</b>	<b>15 652,73</b>	<b>15 619,15</b>	<b>46 205,92</b>	<b>-119,92</b>

Plánovaný rozpočet projektu, ktorý bol krytý dotáciou, bol prekročený o 119,92 eura. Táto čiastka bola hradená z iných prostriedkov mimo dotácie.

# Ciele a dosiahnuté výsledky

# Mgr. Katarína Hašplová

## **Prijímacia organizácia (pracovisko/laboratórium)**

Department of Nutrition, School of Medicine, University of Oslo, P.O.Box.  
1046 Blindern, N-0316, Oslo, Norway.

Tel.: +4722851360, Fax: +47 22851341, e-mail:[a.r.collins@medisin.uio.no](mailto:a.r.collins@medisin.uio.no)

# Ciele práce

- Stanovenie biologickej aktivity rastlinného extraktu z *Papaver rhoeas*
  - Cytotoxický, genotoxický potenciál extraktu
  - Protektívny účinok extraktu (antioxidačný, antimutagénny, antikarcinogénny)
- Hodnotenie genotoxického účinku nanočastíc
  - Charakteristika vybraných nanočastíc
  - Získanie vhodného disperzného protokolu
  - Stanovenie vplyvu nanočastíc na bunkové línie



# *Papaver rhoeas*

## Mak vlčí

Čeľad': *Papaveraceac*

Liečba kašlu, protizápalové  
účinky, redukcia hyperaktivity –  
kvety sú analgetiká, sedatíva.



[www.botanical.com](http://www.botanical.com)

Extrakt z kvetov

0,025 %; 0,05 %; 0,25 %; 0,5 %; 2,5 %;

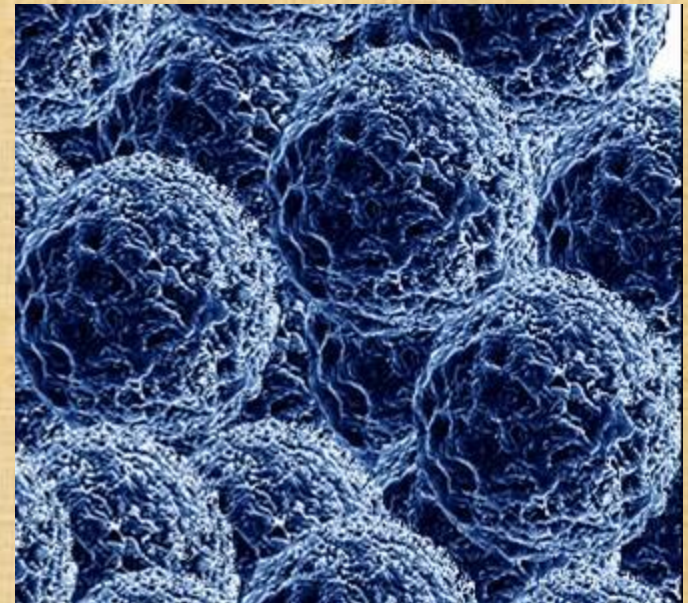
# Látky obsiahnuté v rastlinnom extrakte

- Flavonoidy
  - Kaempferol
  - Quercetín
  - Luteolín
- Alkaloidy:
  - Papaverín
  - Morfín
  - Rhoeadín



# Nanočastice

- Minimálne 1 rozmer menej ako 200 nm
- Využitie:
  - Nanomedicína
  - Priemysel
- Nanočastice a toxicita



# Titánium dioxid

- Komerčne vyrábaný pre pigmentačné vlastnosti
- Potvrdenie aj vyvrátenie toxicity nanočastice  $\text{TiO}_2$ .



# Je TiO<sub>2</sub> toxický alebo netoxický?



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Toxicology 213 (2005) 66–73

TOXICOLOGY

[www.elsevier.com/locate/toxicol](http://www.elsevier.com/locate/toxicol)

## Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells

Jia-Ran Gurr<sup>a,\*</sup>, Alexander S.S. Wang<sup>b</sup>, Chien-Hung Chen<sup>b</sup>, Kun-Yan Jan<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Tourism, Hsing Wu College, No. 11-2 Fen-Liao Road, Linkou, Taipei, Taiwan 24452, ROC

<sup>b</sup> Institute of Cellular and Organismic Biology, Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan 11529, ROC

Received 4 February 2005; received in revised form 1 April 2005; accepted 12 May 2005

Available online 20 June 2005

# Negenotoxocký, necytotoxický TiO<sub>2</sub>

JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE 15 (2004) 321–325

---

## **Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function *in vitro*: Studies on viability, proliferation and inflammation**

KIRSTEN PETERS\*, RONALD E. UNGER, C. JAMES KIRKPATRICK  
*Institute of Pathology, Johannes Gutenberg University, Langenbeckstr. 1, 55101 Mainz, Germany*  
E-mail: [peters@pathologie.klinik.uni-mainz.de](mailto:peters@pathologie.klinik.uni-mainz.de)

ANTONIETTA M. GATTI, EMANUELA MONARI  
*INFM, Laboratory of Biomaterials, Department of Neurosciences, University of Modena and Reggio Emilia, Via del Pozzo 71, 41100 Modena, Italy*

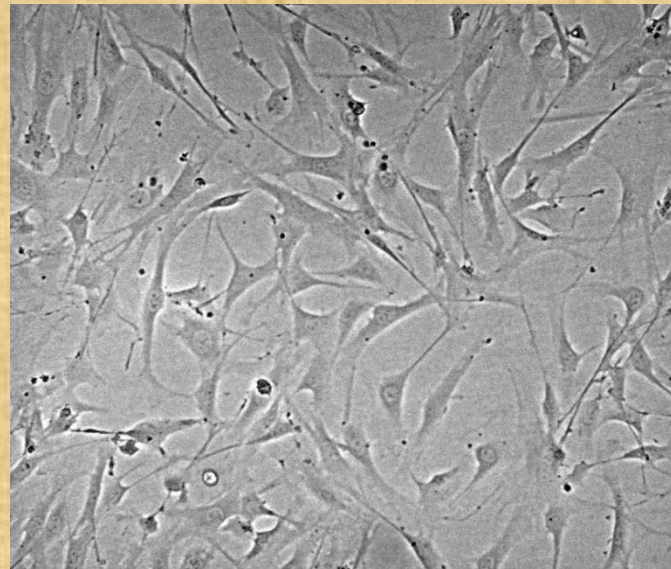
---

# Metódy

- Cytotoxicita
  - growth activity
  - plaiting efficiency
- Genotoxicita
  - Comet assay
- Antioxidačný efekt
  - Scavenger – DPPH assay
  - Chelatačný – DNA topology assay
- Indukcia reparácie:
  - Comet assay s využitím reparačných enzýmov

# Bunkové línie

- HepG2 – nádorové bunky pečene
- Cos1 – opičie obličkové bunky
- Caco2 – nádorové bunky hrubého čreva
- TK6 – lymfoblastoidné bunky





# Extrakt - Nanočastica

- Antioxidačná aktivita
  - Scavenger, chelatačná
- Stimulácia reparácie
  - Aktivácia enzýmov
- Oxidačný stres
  - Zvýšenie koncentrácie ROS, vytváranie Fe<sup>2+</sup> iónov
- Poškodenie DNA
  - Modifikácia báz (8oxoG), zlomy DNA
- Proliferácia buniek

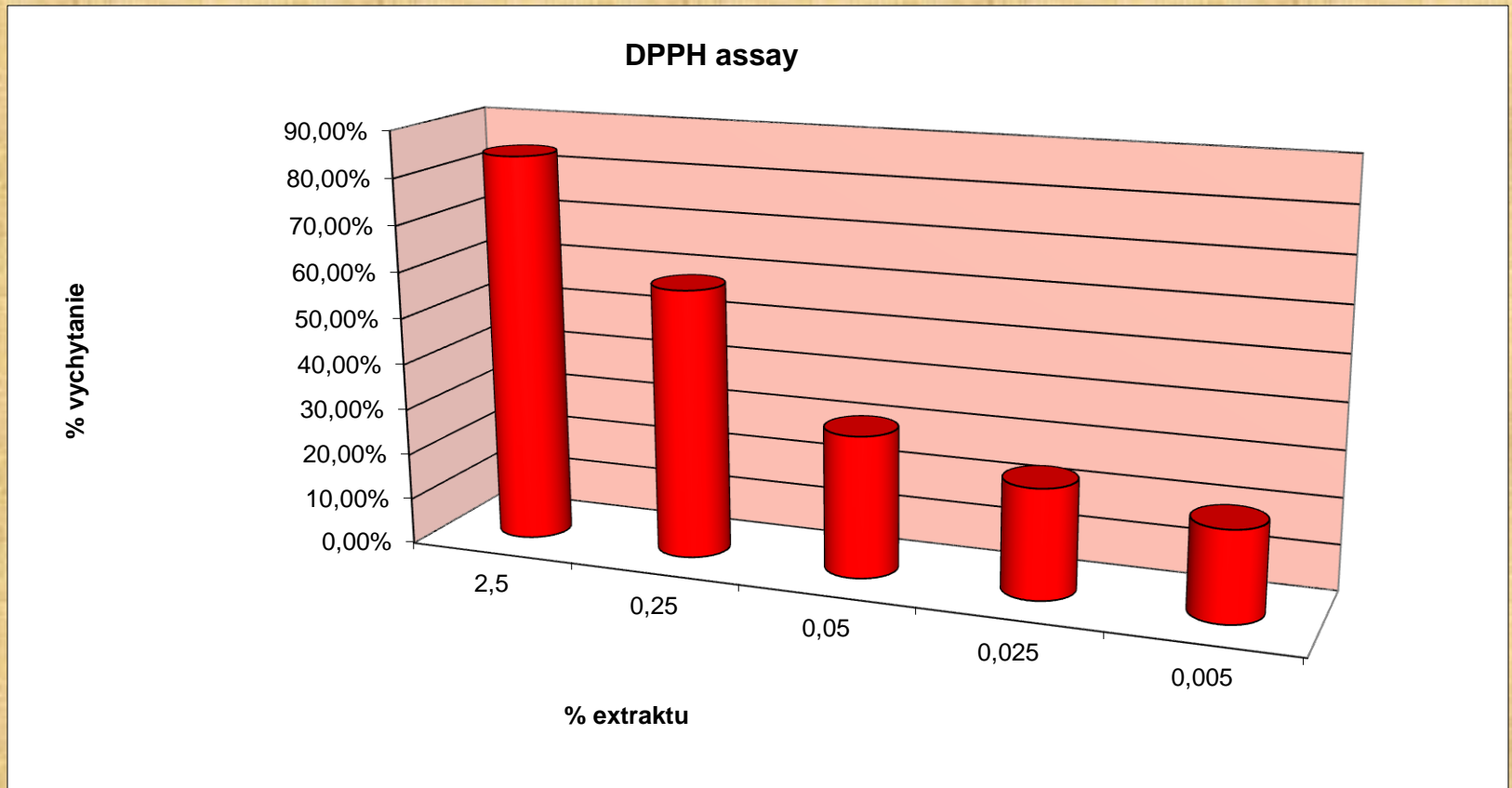
Neutrálny účinok

Antagonistický účinok

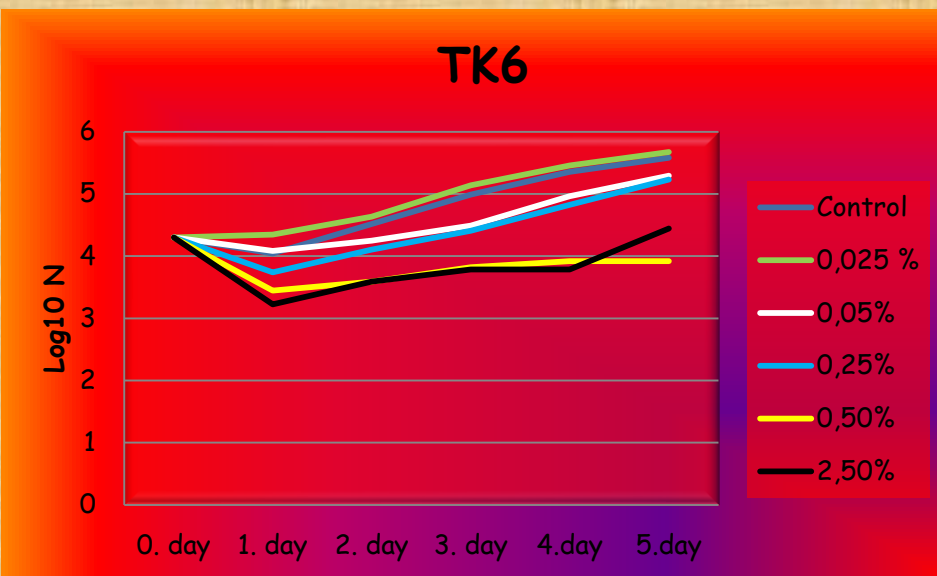
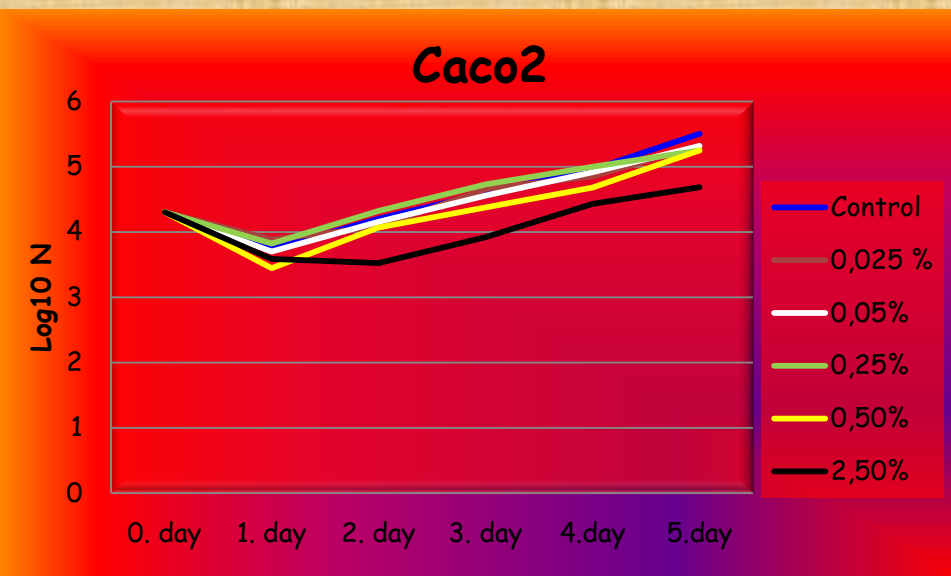
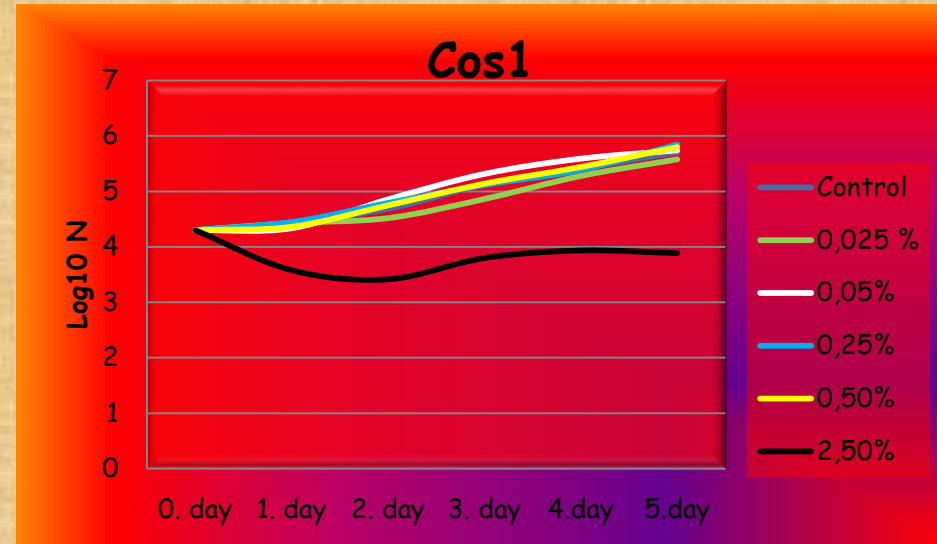
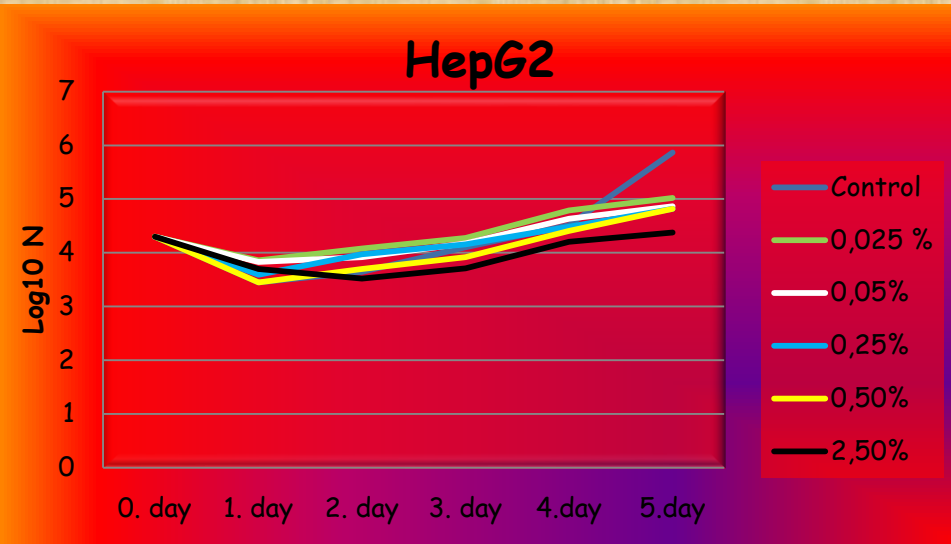
Synergický účinok

Aditívny účinok

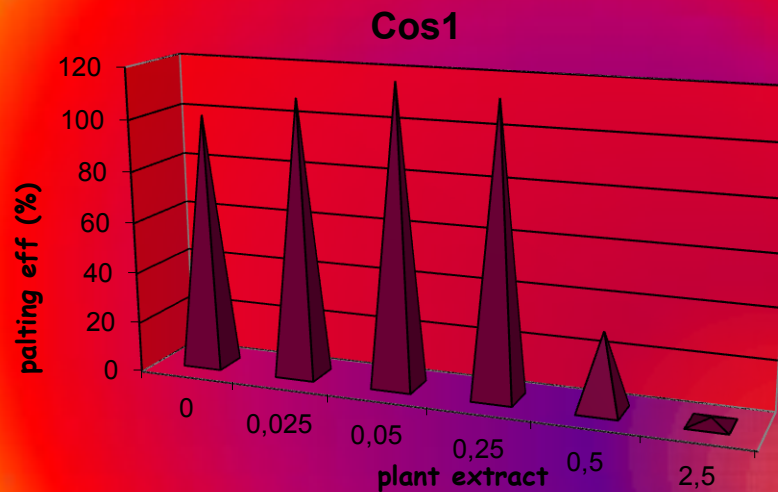
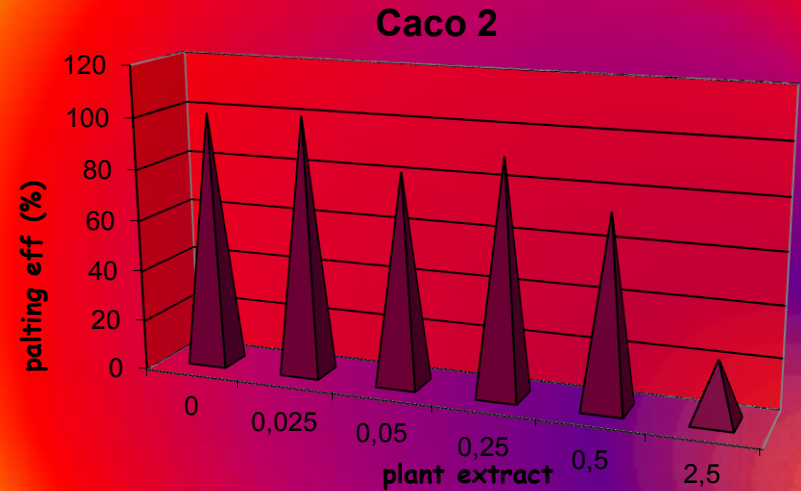
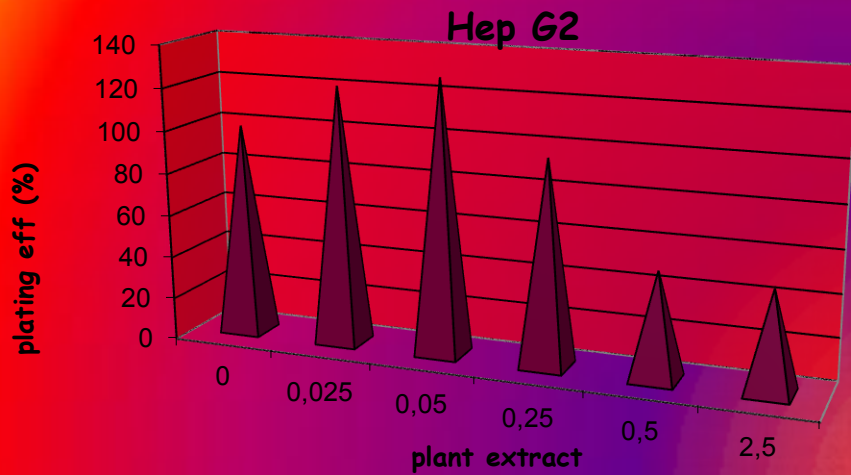
# Výsledky – DPPH assay



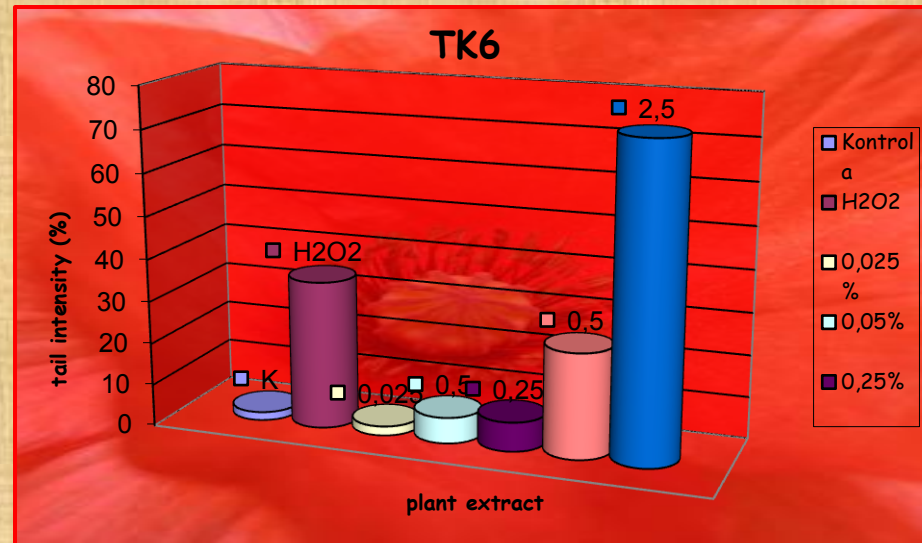
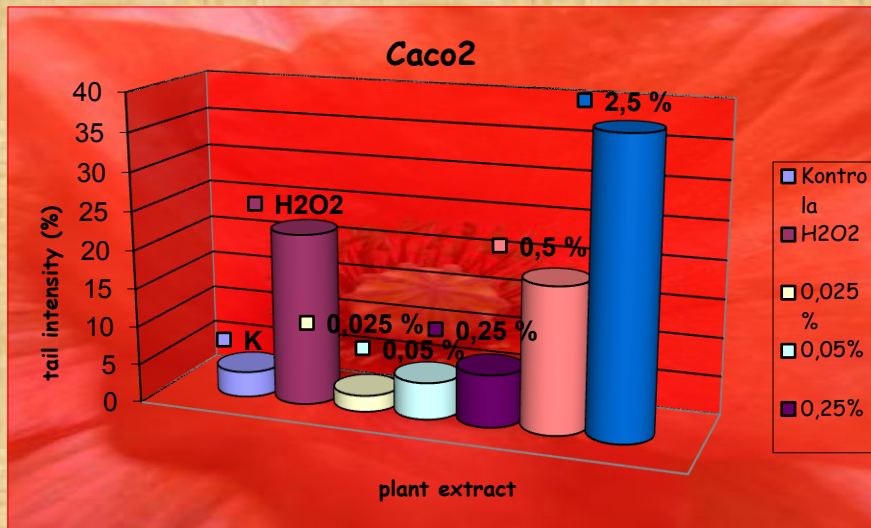
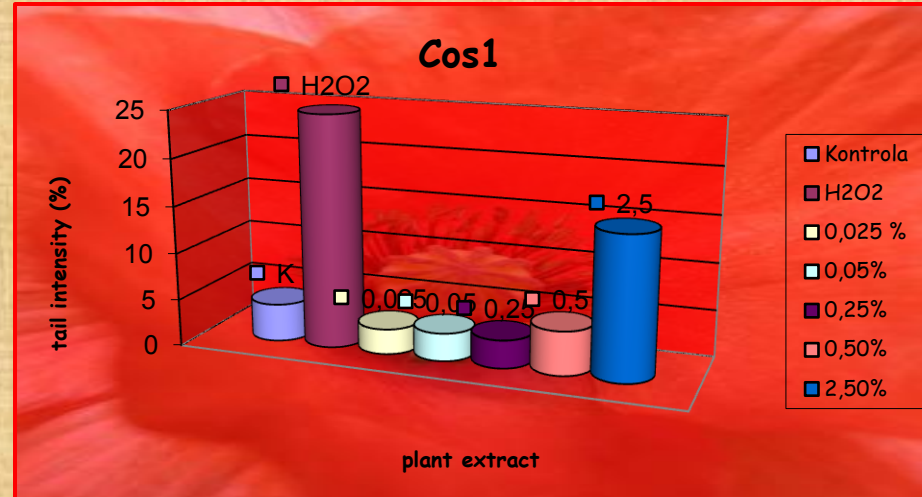
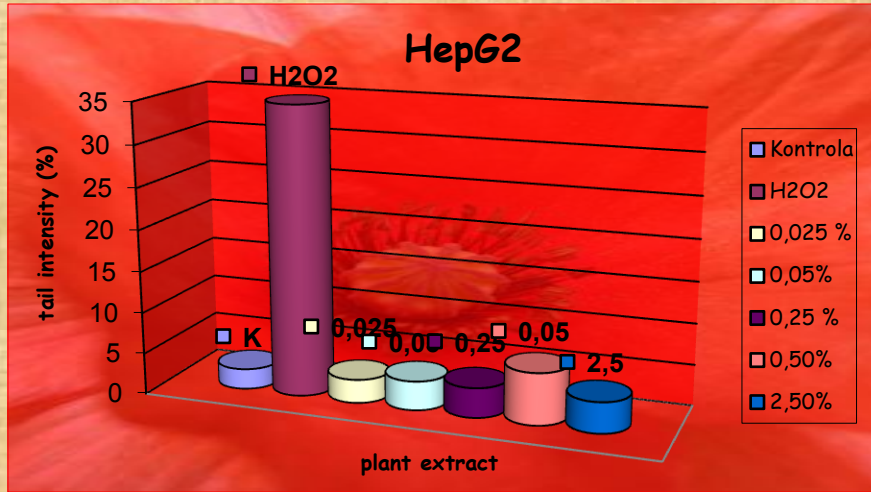
# Growth activity



# Plating efficiency



# Comet assay



# Záver

- Určenie mechanizmu účinku rastlinného extraktu
- Charakteristika vplyvu nanočastíc na bunkové línie
- Prípadné spolupôsobenie nanočastíc a rastlinného extraktu

# Mgr. Alexandra Hudecová

## **Prijímacia organizácia (pracovisko/laboratórium)**

Department of Nutrition, School of Medicine, University of Oslo, P.O.Box.  
1046 Blindern, N-0316, Oslo, Norway.

Tel.: +4722851360, Fax: +47 22851341, e-mail:[a.r.collins@medisin.uio.no](mailto:a.r.collins@medisin.uio.no)

# Ciele

1. Stanovenie biologickej aktivity výt'ážku z rastliny *Gentiana asclepiadea*.
2. Štúdium vplyvu vybraných nanočastíc.
3. Stanovenie spolupôsobenia vybraných nanočastíc s rastlinným extraktom z *Gentiana asclepiadea*.



# *Gentiana asclepiadea* (Horec luskáčovitý)



- Rod: *Gentiana* – cca 400 druhov  
Gentisa, 500 p. n. l.)
- Tradičná čínska medicína: *G. scabra*, *G. rigescens*, *G. triflora*  
(inhibícia rastu tumorov u myší; Matsukawa a kol., 2006):
  - stimulovanie apetítu a podpora pri trávení
  - fungicídny účinok
  - v niekt. príp. – pri liečení ženských ochorení

# Zložky extraktu *G. asclepiadea*

- Sekoiridoid-glykozidy (gentiopikrozid, swerozid, swertiamarín)
- Acylované sekoiridoid-glykozidy (amarogentín)
- Xantóny
- Hydroxyxantóny (Gentizín, Izogentizín)
- Alkaloid (Gentianín)
- Gentiopikrín
- Delfinidín
- Izoorientín
- Izovitexín

## Gentiopikrozid – 1 zo zákl. „horkých“ zložiek

- Liečba: reumatoidná artritída, hepatitída, horúčka, poruchy tráviaceho traktu
- Hep3B:
  - nemá cytotoxický účinok
  - nemá vplyv na bunkový cyklus
  - nespôsoboval apoptózu
  - inhibuje tvorbu tumor nekrozných faktorov
  - antioxidačný účinok

## Gentizín a Izogentizín – dokázaná mutagenita v Amesovom teste na *Salmonella typhimurium*

Delfinidín - preventívny účinok voči bunkovej smrti (prísna kontrola  $Ca^{2+}$  homeostázy a inhibícia uvoľňovania cytochrómu c z mitochondrií)

# Nanočastice

- Častice s jednou či viacerými dimenziami v rozmedzí 100 (200) nm a menej.
- Aplikácia: medicína, potravinárstvo, odevný priemysel, kozmetika (opaľovacie krémy), maliarske nátery, zubné pasty, pneumatiky,...

# Vlastnosti dôležité pre účinky na zdravie

- Malé rozmery
- Chemická štruktúra a povrchové vlastnosti
- Tvar
- Náboj
- Hydrofóbnosť
- Agregácia
- Kompozícia povrchu (Obal)
- Fotokatalytická aktivita

- Bunkové línie: - COS 1
  - Caco 2
  - Hep G2
  - TK6
  - Lymfocyty
  - HEK 293

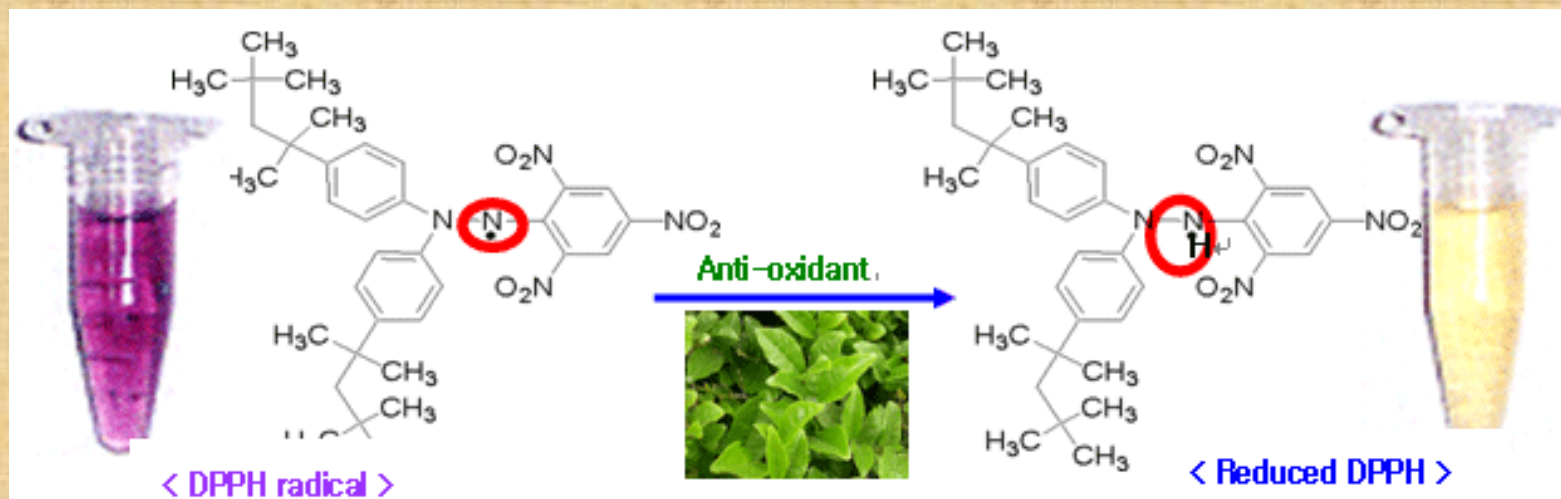


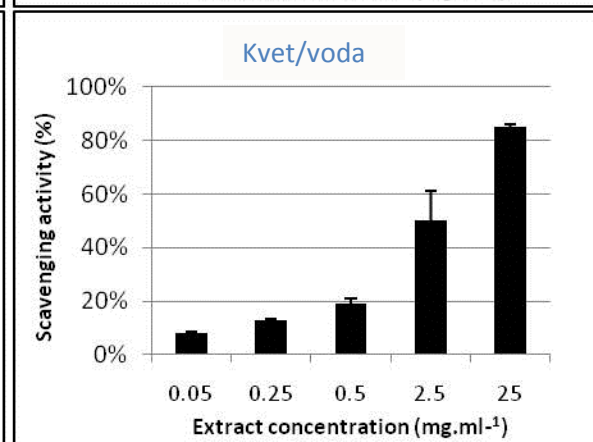
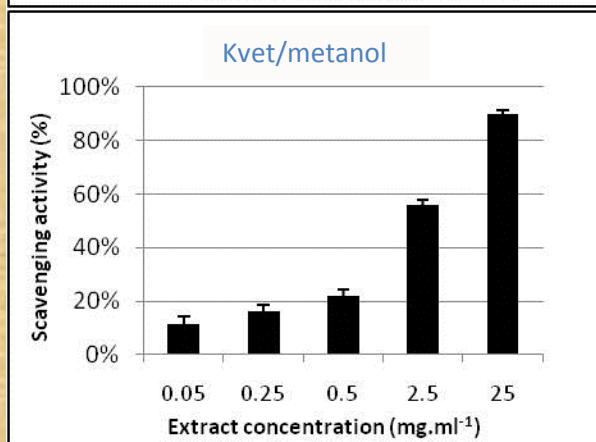
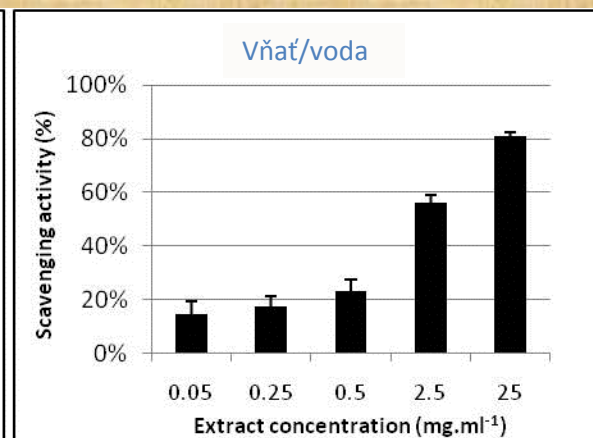
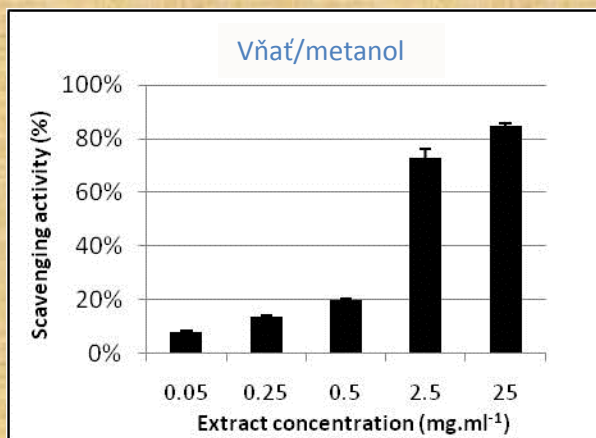
- Metódy:
  - antioxidačný účinok:
    - DPPH assay
    - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge
  - cytotoxicita:
    - Growth activity
    - Plating efficiency
  - genotoxicita:
    - Comet assay

# DPPH assay

- DPPH = 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

DPPH assay je metóda na stanovenie antioxidačného účinku látok, pri ktorej sledujeme schopnosť priameho vychytávania voľných radikálov.

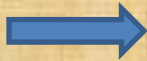




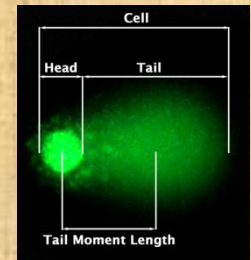
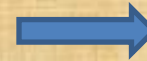
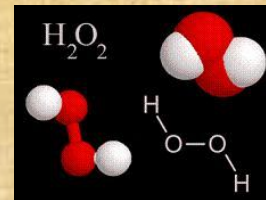
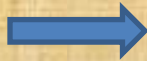


# H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge

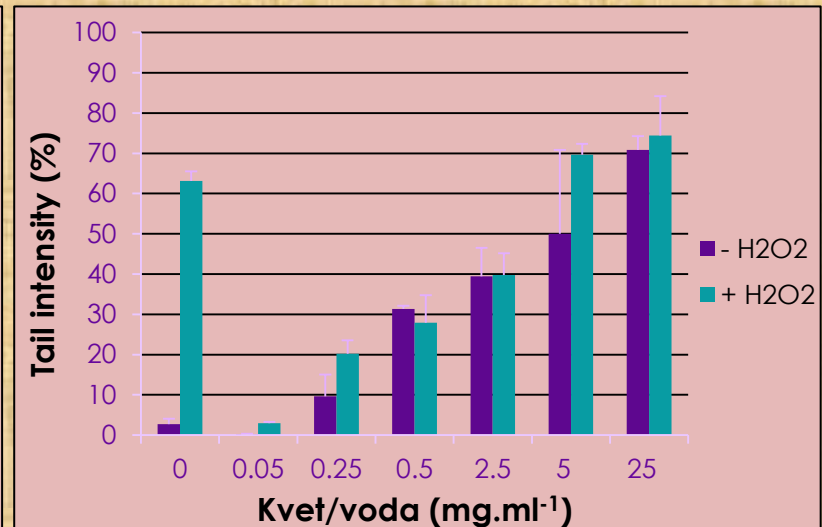
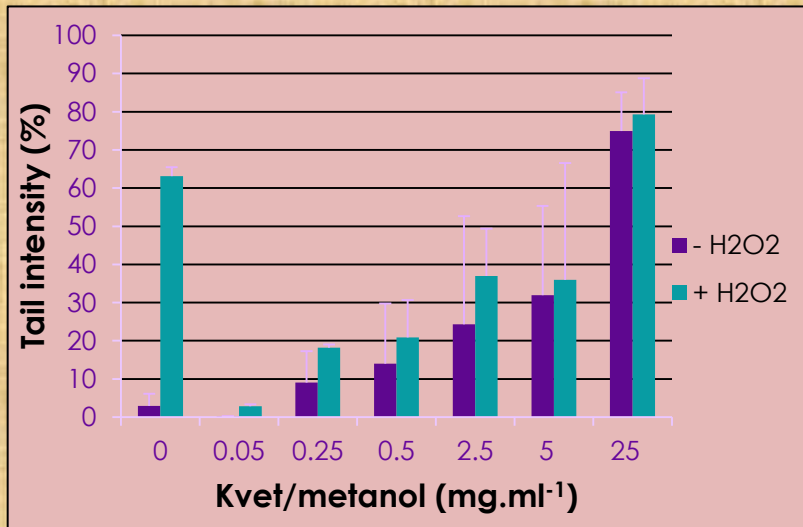
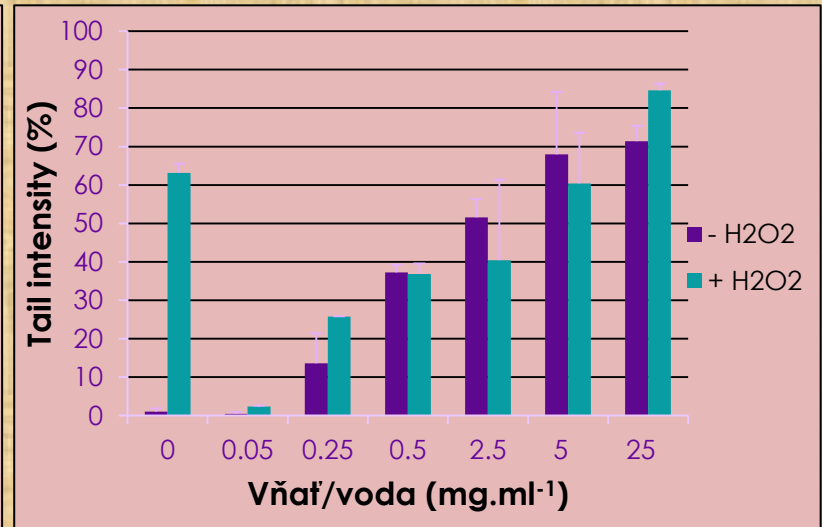
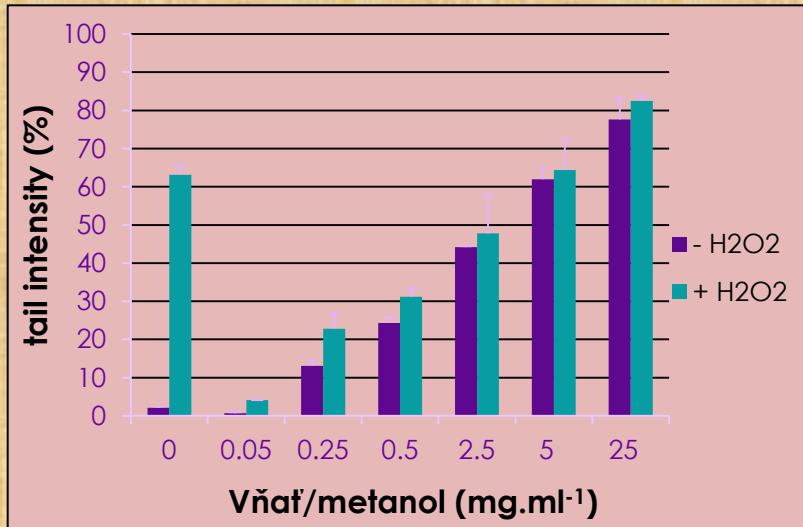
(Nepriame sledovanie antioxidantnej kapacity)



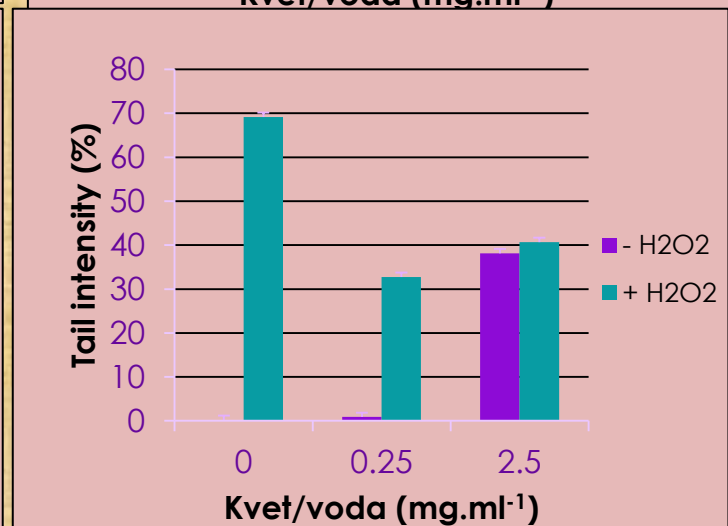
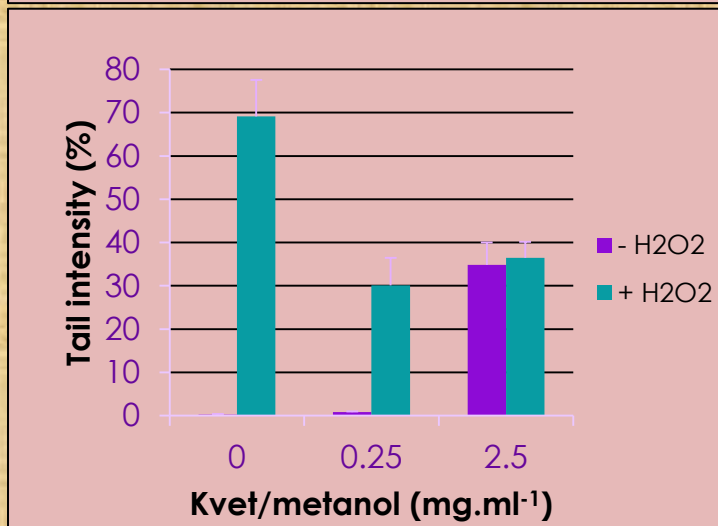
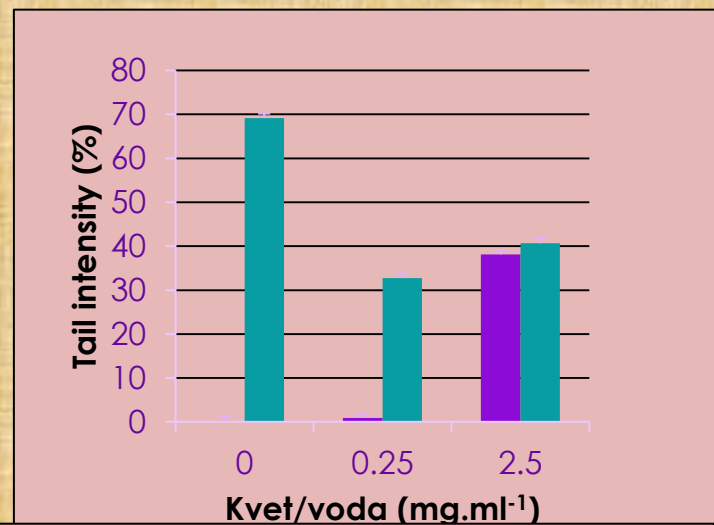
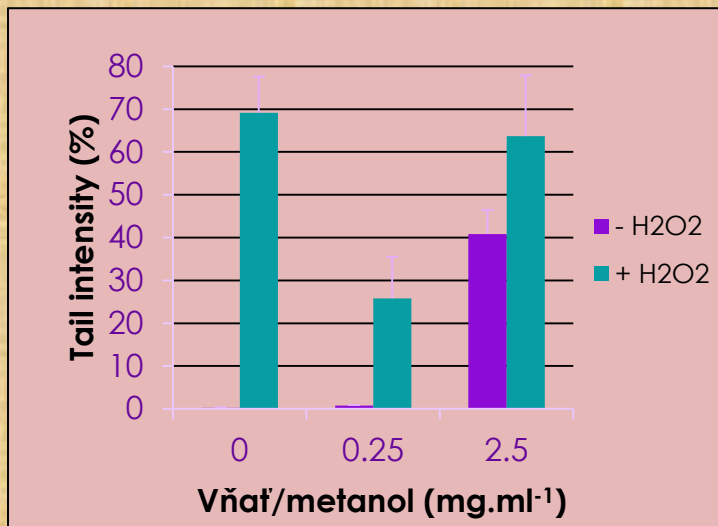
5 min



# H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge (lymfocyty)

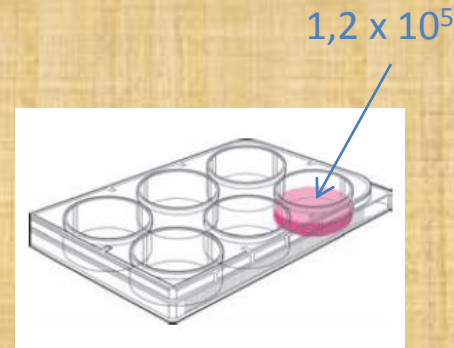
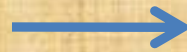
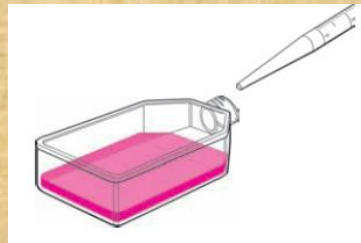


# H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge (HEK 293)

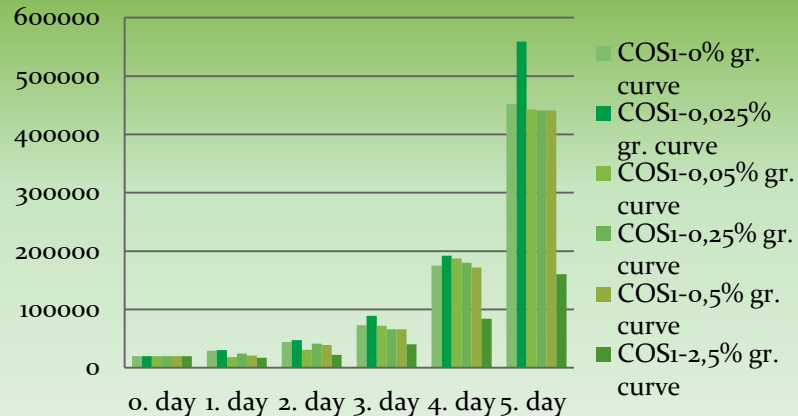


# Growth activity

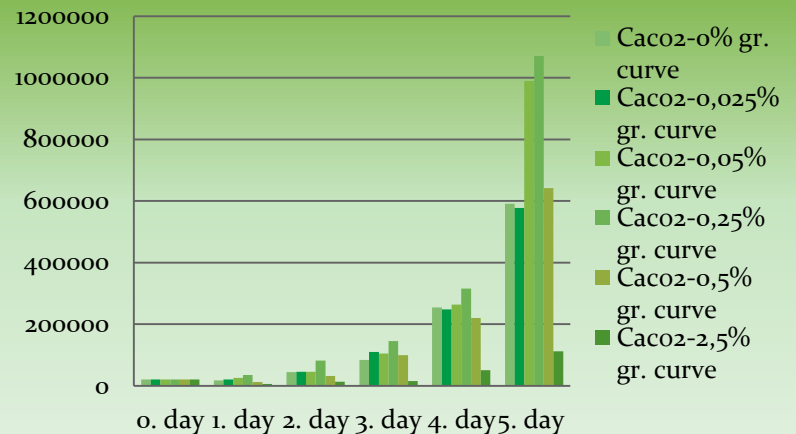
Test rastovej aktivity buniek umožňuje zistiť cytotoxický účinok extraktov na bunky, ktorý môže viesť k letalite alebo k redukcii rastovej aktivity, k predĺženiu generačnej doby a k ovplyvneniu bunkového delenia. V tomto teste sledujeme rastovú aktivitu buniek v bunkovej populácii.



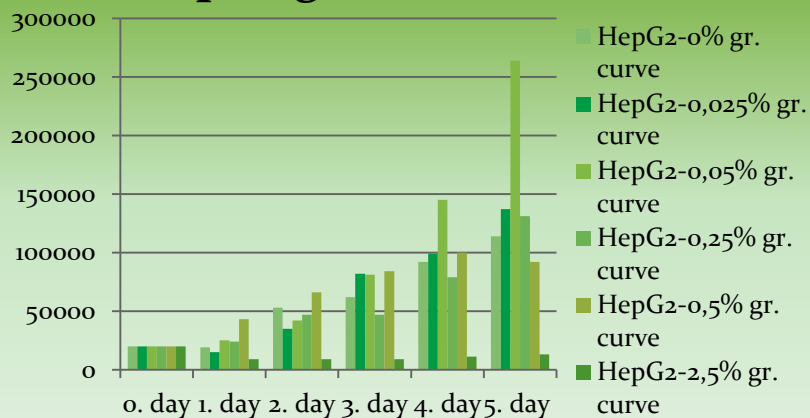
## COS1 growth



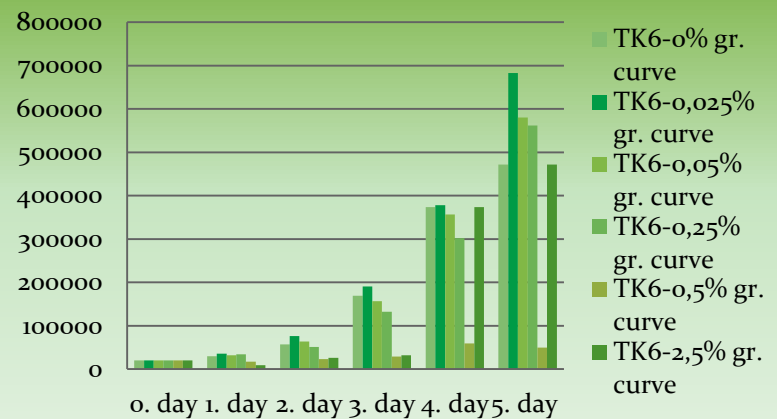
## Caco2 growth



## HepG2 growth

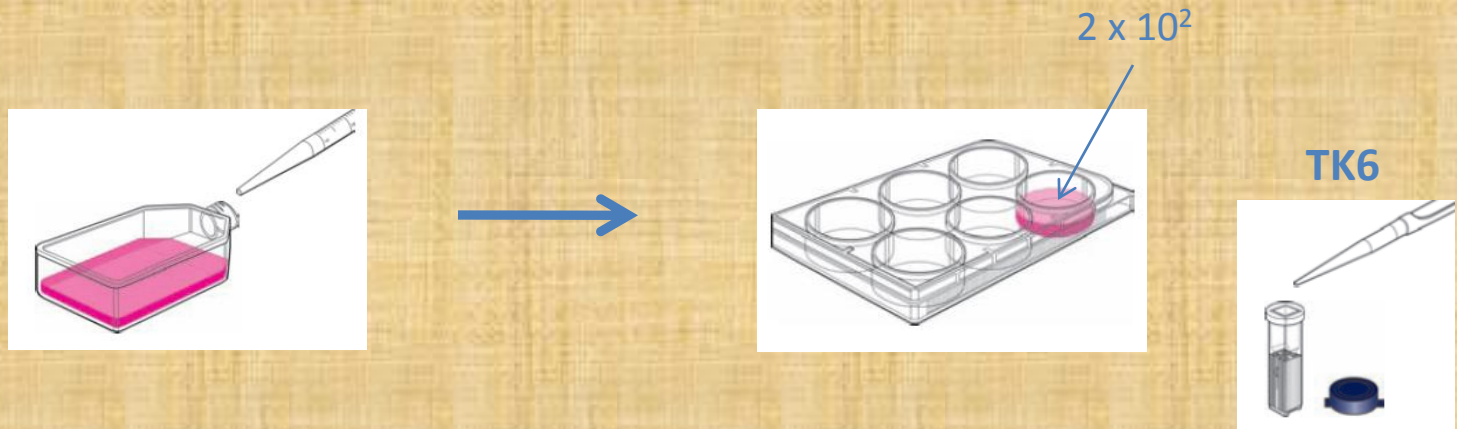


## TK6 growth

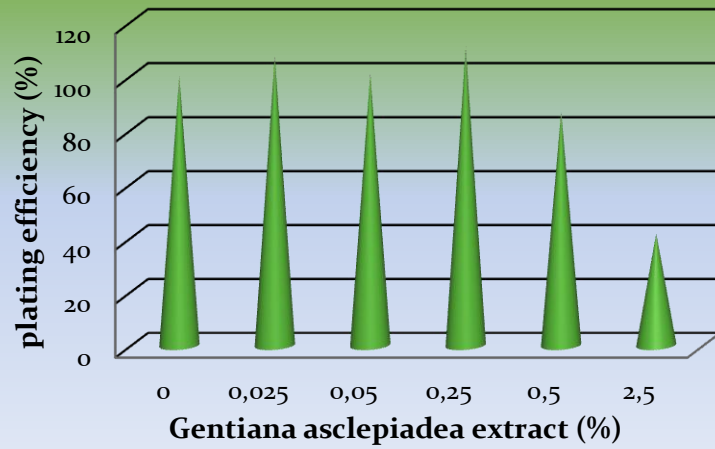


# Plating efficiency

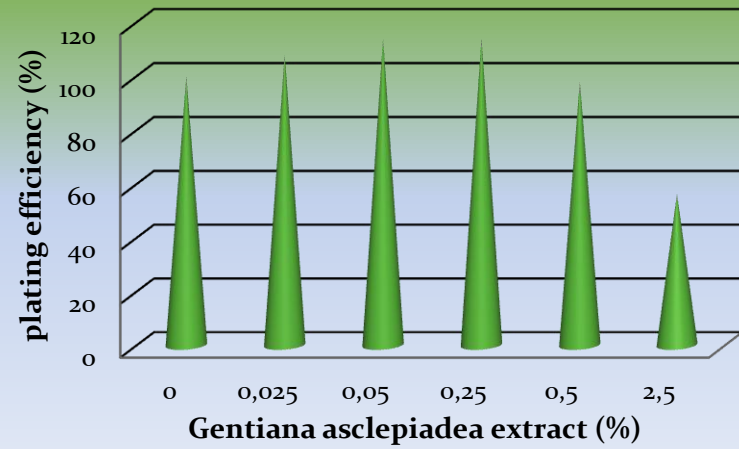
Pri testovaní klonovacej schopnosti buniek zisťujeme cytotoxický efekt testovanej látky na jednotlivé bunky, ich schopnosť prichytiť sa na pevný podklad a deliť sa. Každá životaschopná bunka, ktorá sa delí, vytvorí kolóniu.



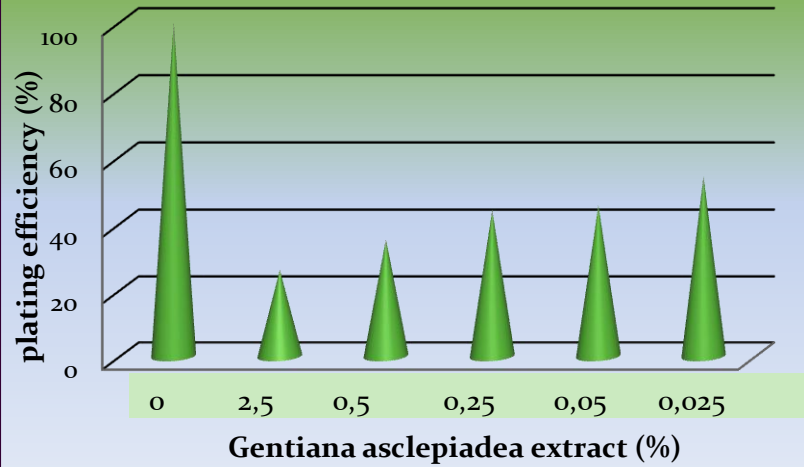
## Caco 2



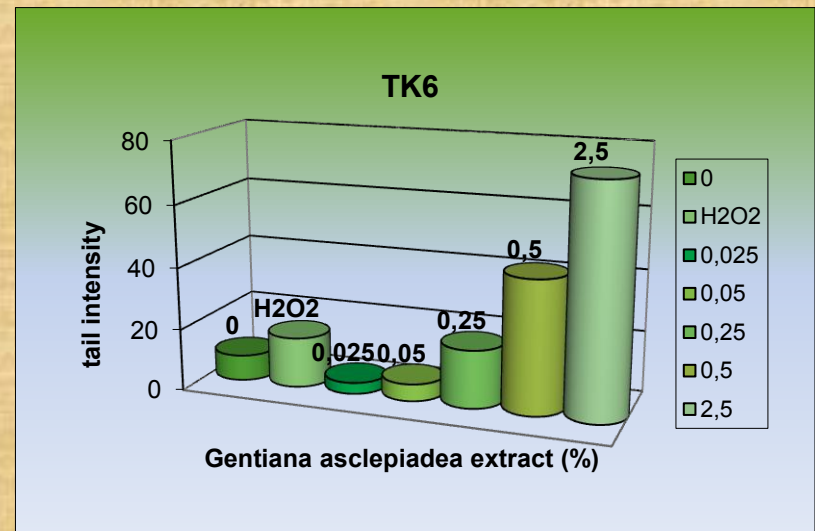
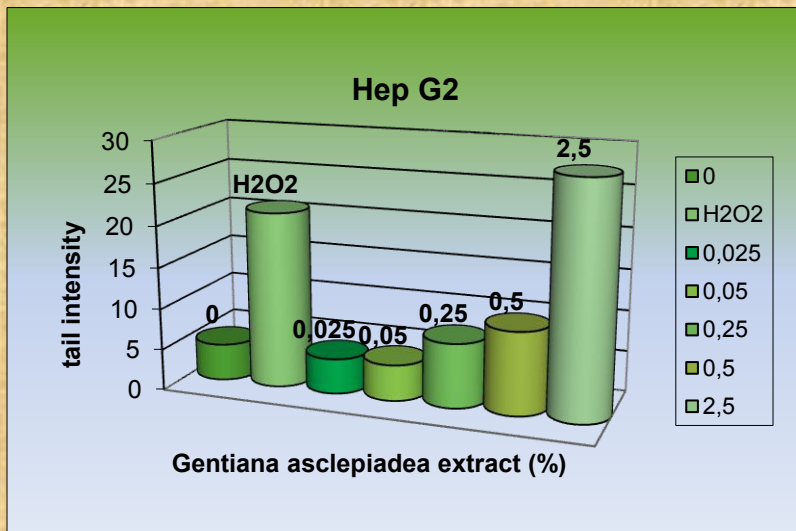
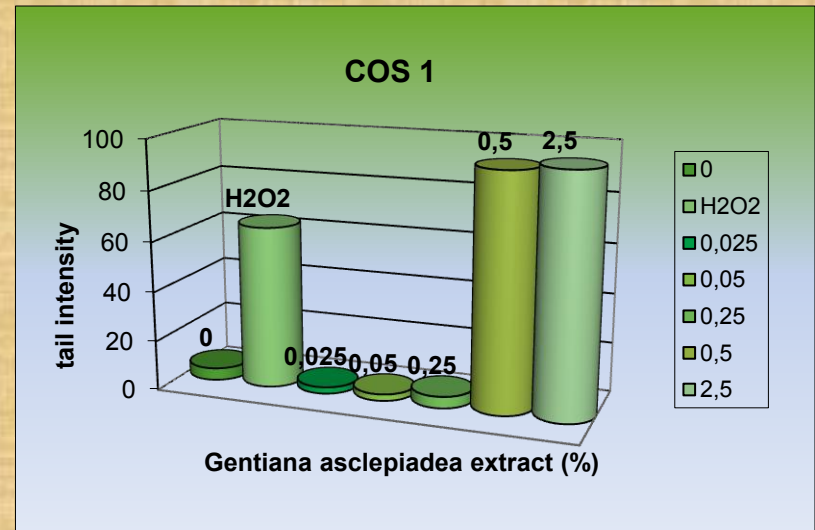
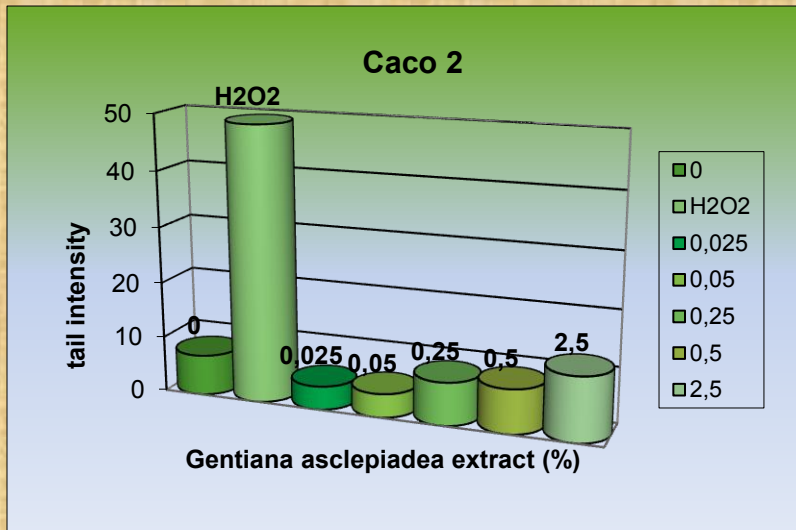
## COS 1



## Hep G2



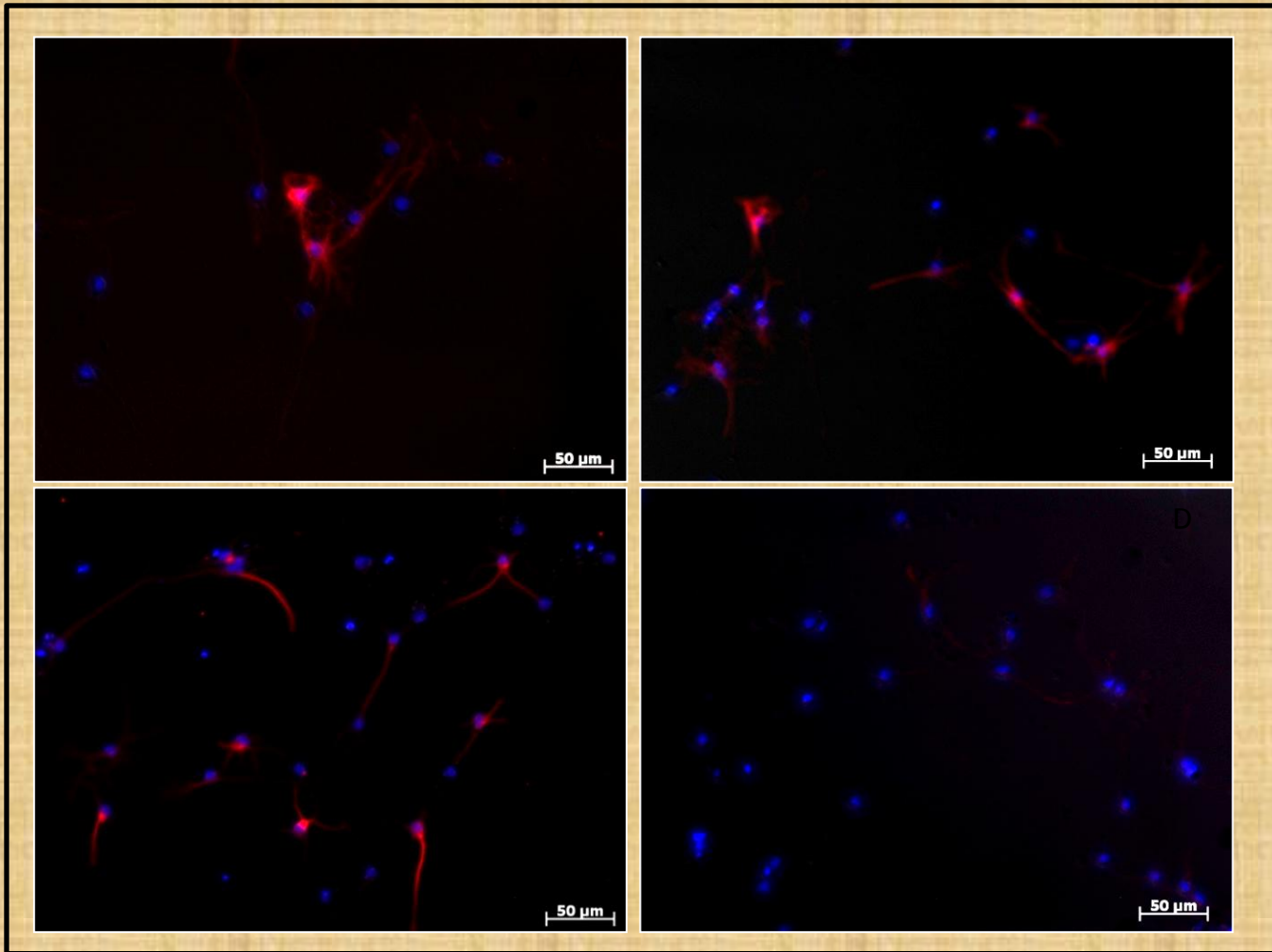
# Comet assay





# Neurosféry + extrakt

## Diferenciácia

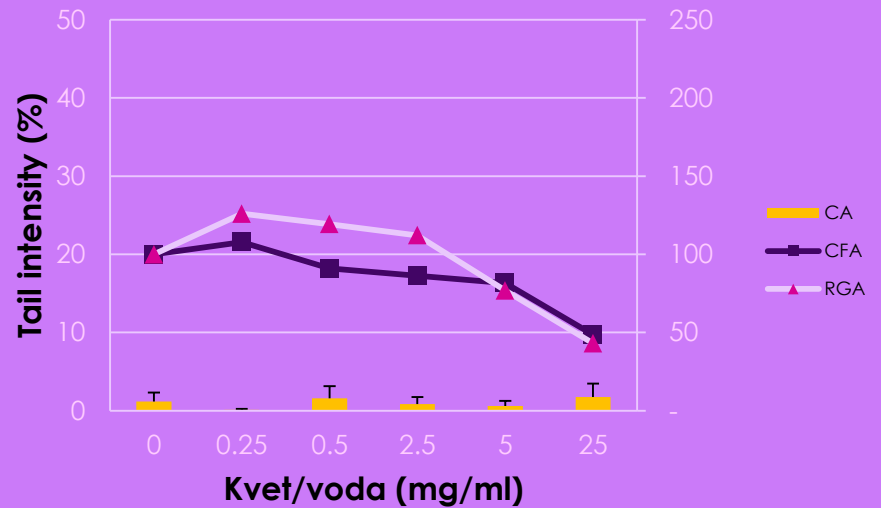
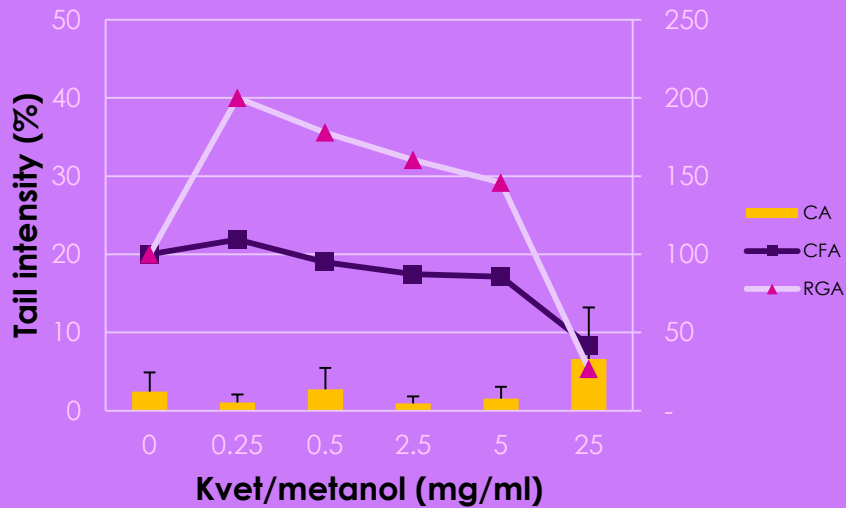
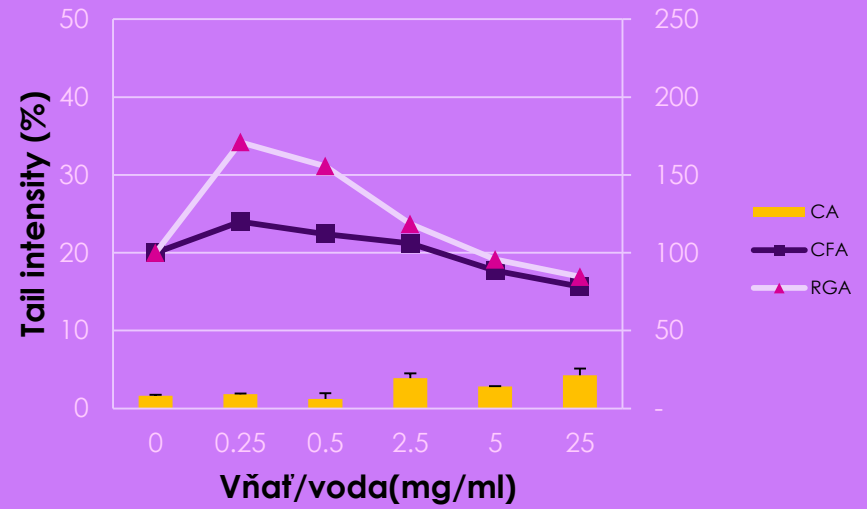
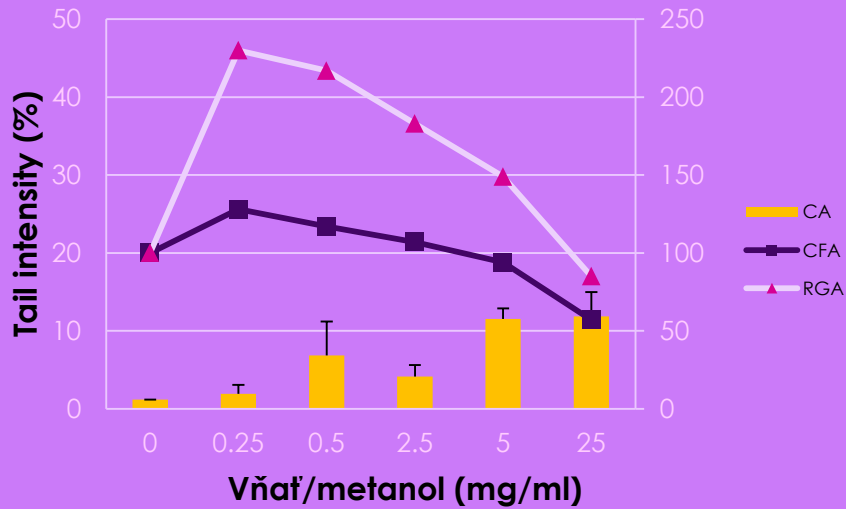


**Experimenty s nanočasticami  
a extraktami z *G. asclepiadea***

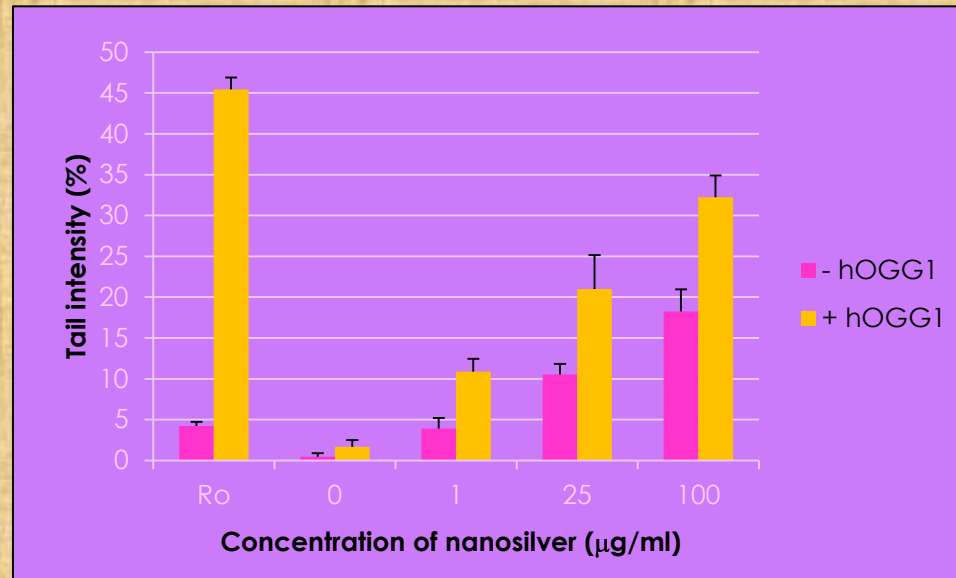
Bunkové línie: - HEK 293  
- TK6

Metódy: - Growth activity (GA)  
- Plating efficiency (PE)  
- Comet assay (CA)

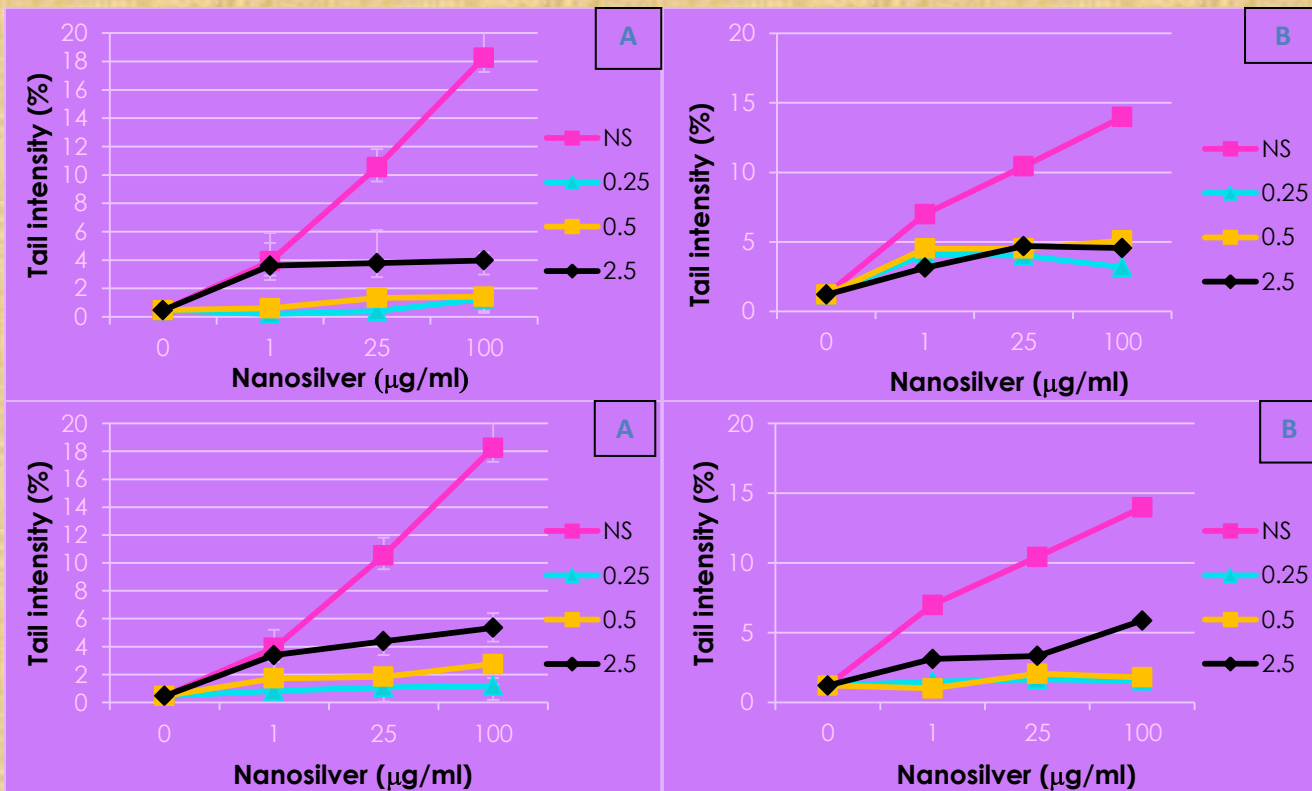
# CA + GA + PE

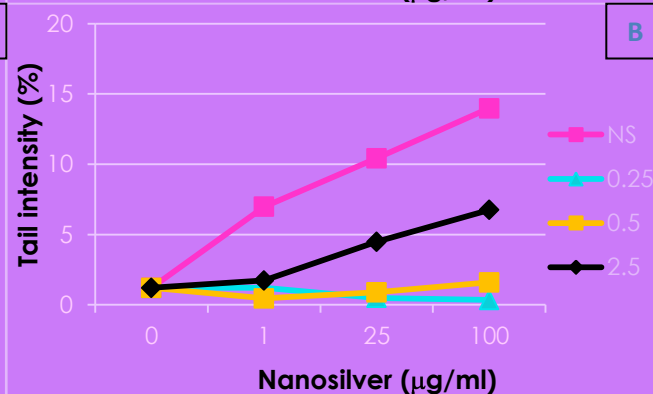
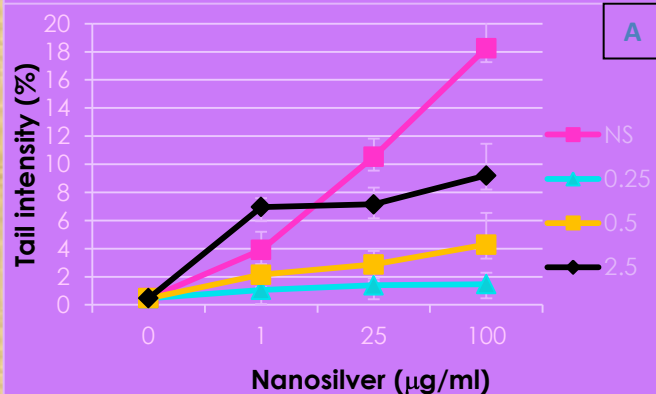
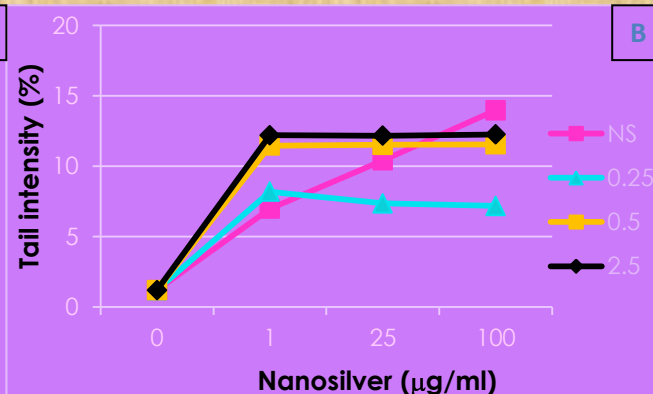
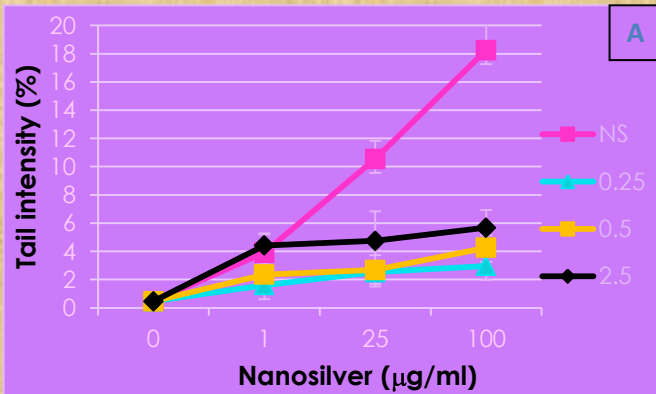


# Nanosilver (nanočastice striebra)



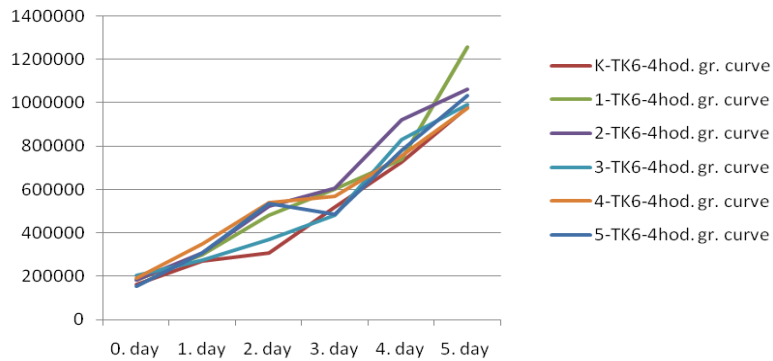
# Nanosilver + rastlinné extrakty



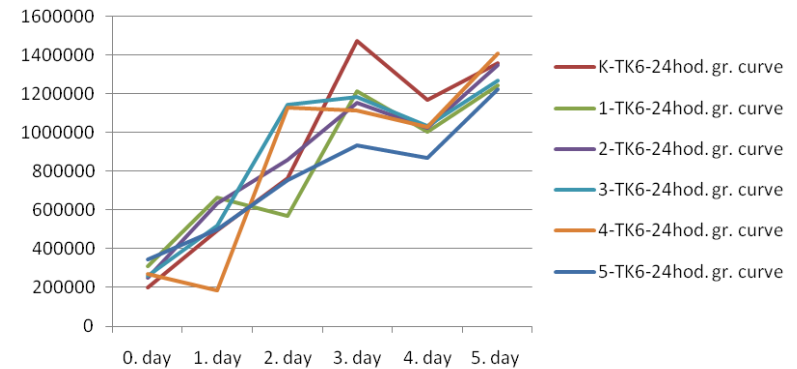


# TK6 s TiO<sub>2</sub> Growth activity

TK6 - 4hod. ovplyvnenie TiO<sub>2</sub>

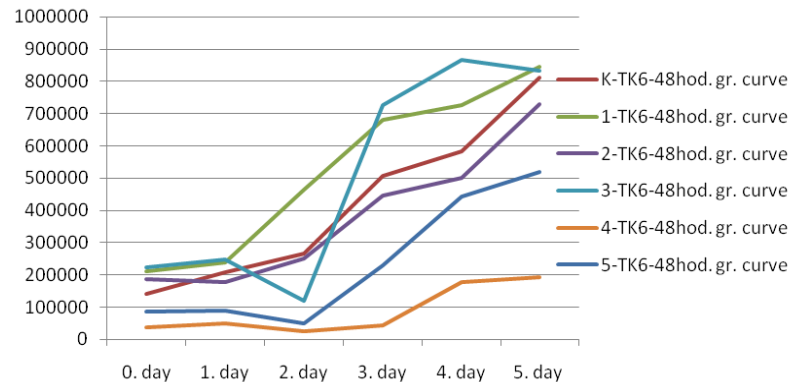


TK6 - 24hod. ovplyvnenie TiO<sub>2</sub>



1. 75 µg/ml
2. 15 µg/ml
3. 3 µg/ml
4. 0,6 µg/ml
5. 0,12 µg/ml

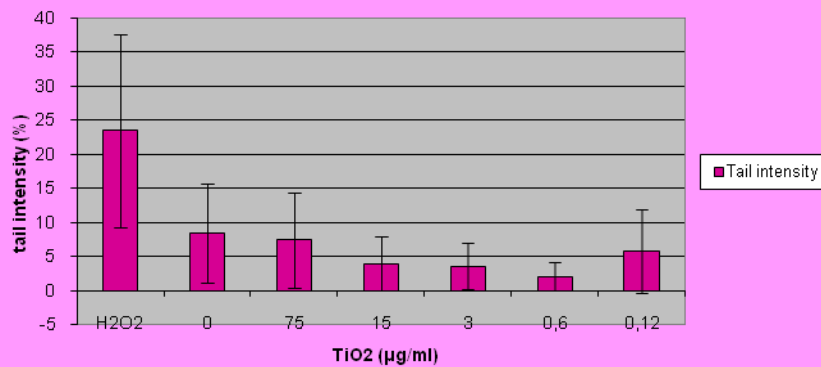
TK6 - 48hod. ovplyvnenie TiO<sub>2</sub>



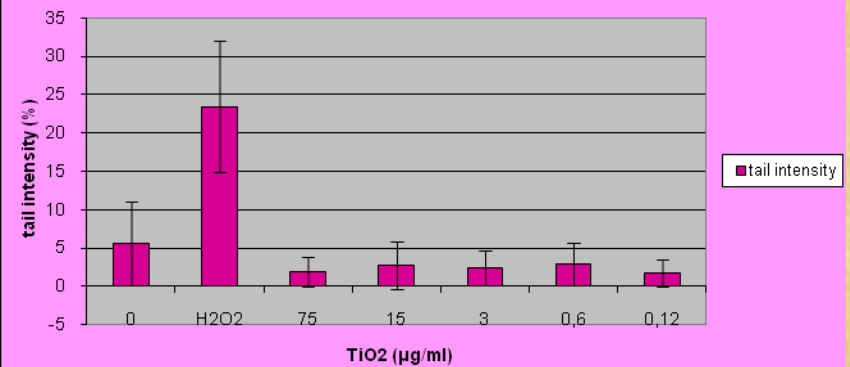


# TK6 s TiO<sub>2</sub> Comet assay

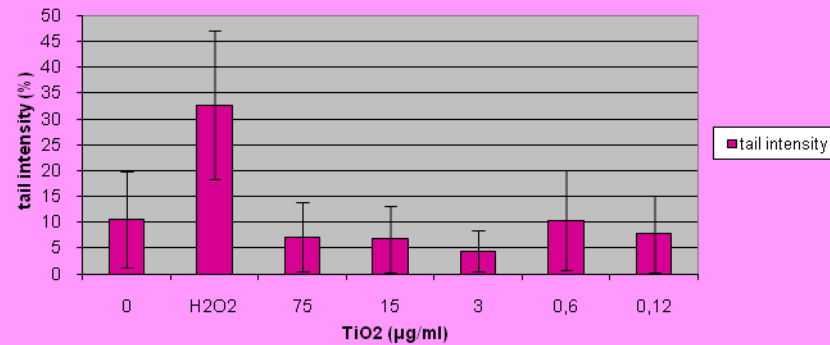
TK6 + TiO<sub>2</sub> (4 h)

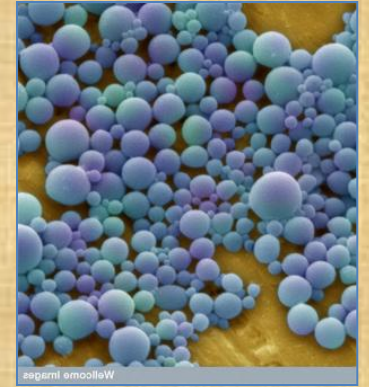
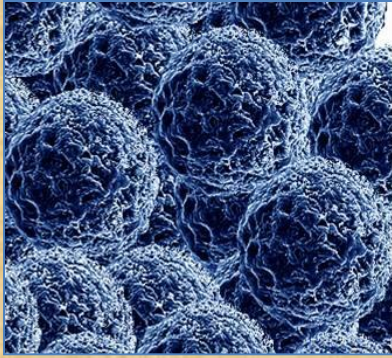
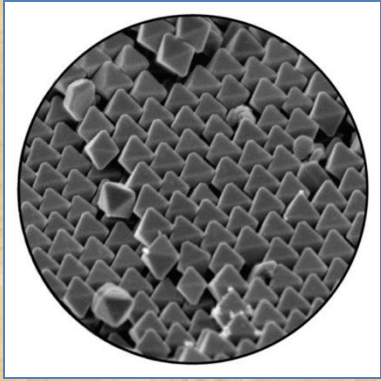
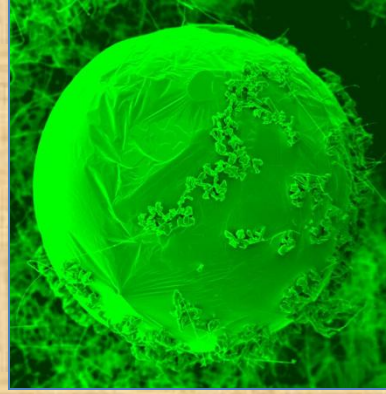


TK6 + TiO<sub>2</sub> (24 h)



TK6 + TiO<sub>2</sub> (48 h)





# Mgr. Ines Kováčiková

## **Prijímacia organizácia (pracovisko/laboratórium)**

Department of Chromosome Biology, Max F. Perutz Laboratories, Medical University of Wien, Dr. Bohr-Gasse 1, 1030, Wien, Austria.

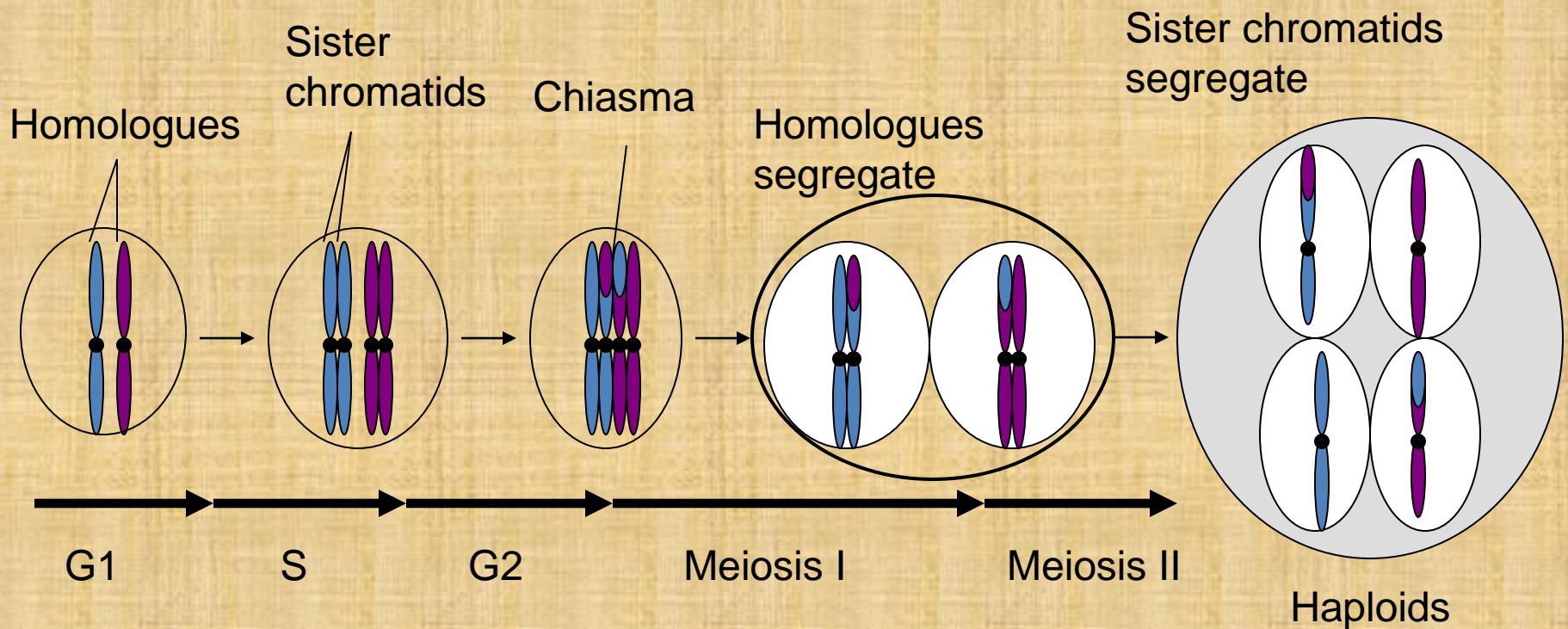
Tel.: +43(1)4277 74470, Fax: +43(1)4277 9562,

e-mail:[juraj.gregan@univie.ac.at](mailto:juraj.gregan@univie.ac.at)

# Ciele projektu

- Analyzovať rozchádzanie sa chromozómov počas meiotického delenia konštrukciou kvasinkového homotalického kmeňa h90.
- Určiť konkrétny defekt v rozchádzaní sa chromozómov v meióze u kvasiniek *Schizosaccharomyces pombe* s mutantnou formou proteín kinázy *ppk34-*.
- Odhaliť funkciu ďalších proteín kináz, ktoré by mohli mať dôležitú funkciu pri rozchádzaní sa chromozómov v meoitickom delení bunky.

# Rozchádzanie sa chromozómov počas meiotického delenia buniek



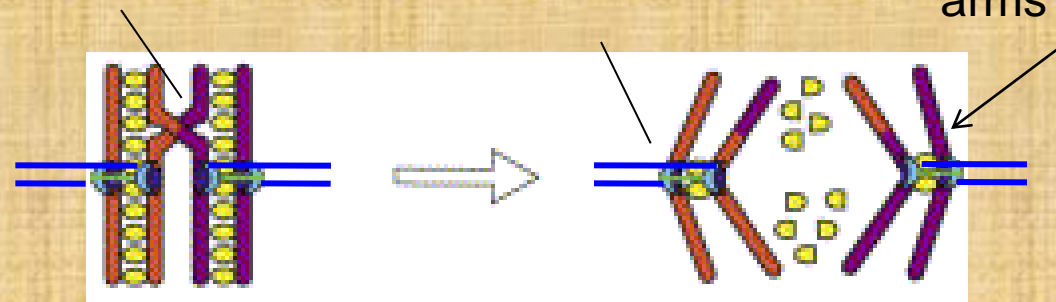
# Dôležité kroky v rozchádzaní sa chormozómov v meiotickom delení buniek

1. Formation of chiasmata

2. Mono-orientation of sister kinetochores

3. Cohesion loss from chromosome arms

Meiosis I

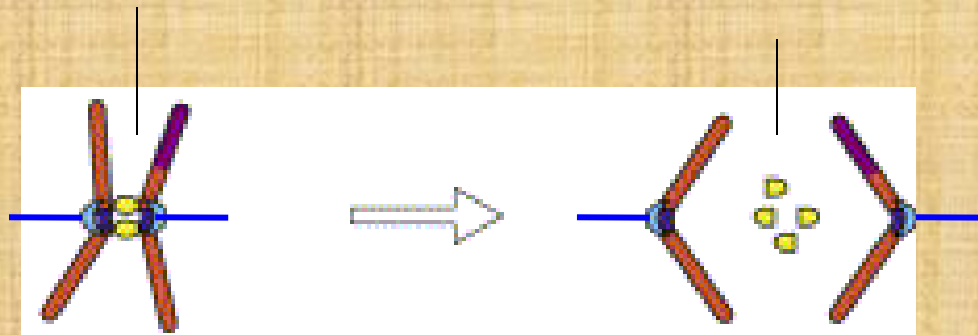


Bi-orientation of sister kinetochores



Cohesion loss from centromeres

Meiosis II

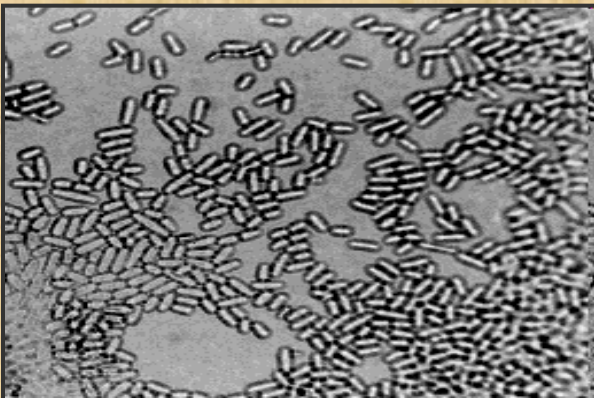


# *Schizosaccharomyces pombe* ako modelový organizmus



Obr. 1: *S. pombe* stained with DAPI  
(<http://yeast.lab.nig.ac.jp/cgi-bin/nig/top.cgi?eng=1>)

- jednobunkové organizmy patriace do triedy húb
- prvýkrát boli popísané P. Lindnerom roku 1893
- genóm bol úplne osekvenovaný:  
~ 14 Mb, ~ 5,000 genes
- predstavujú excelentný modelový organizmus pre štúdium bunkového delenia ako je meióza



Obr. 2: Wildtype cells on a plate  
(<http://wwwrcf.usc.edu/~forsburg/pictures.html>)

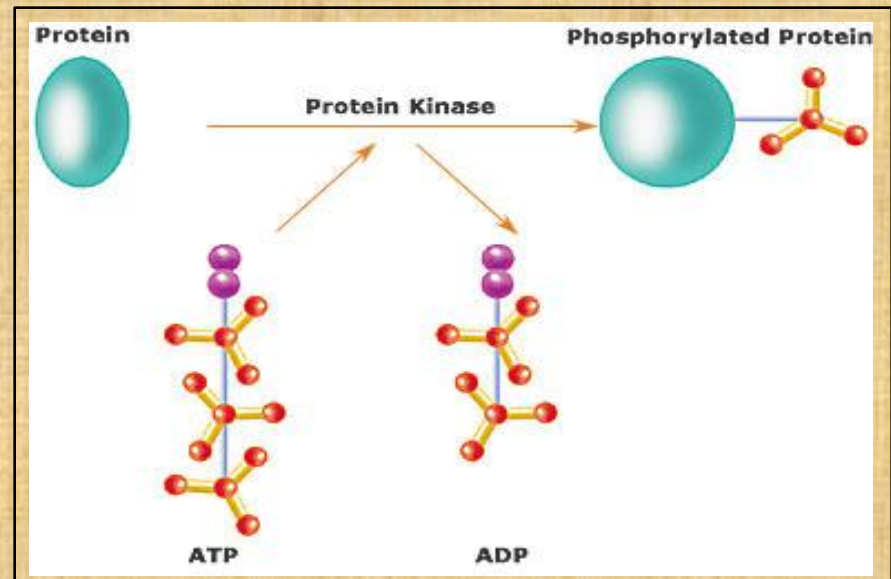
# Úloha proteín kináz počas meiotického delenia u kvasiniek *Schizosaccharomyces pombe*

**Proteín kinázy** - hrajú dôležitú úlohu v regulácii rôznych biologických procesov, vrátane bunkového cyklu, bunkového delenia, morfogénzy buniek, ako aj v bunkovej odpovedi na zmeny vonkajšieho prostredia.

Celkové množstvo proteín kináz u kvasiniek *S. pombe* : 106

17 esenciálnych pre bunkový rast

89 neesenciálnych pre rast buniek

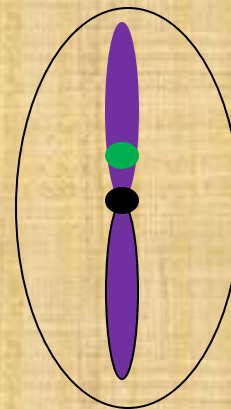


Obr. 3 Úloha proteín kináz v biologických procesoch

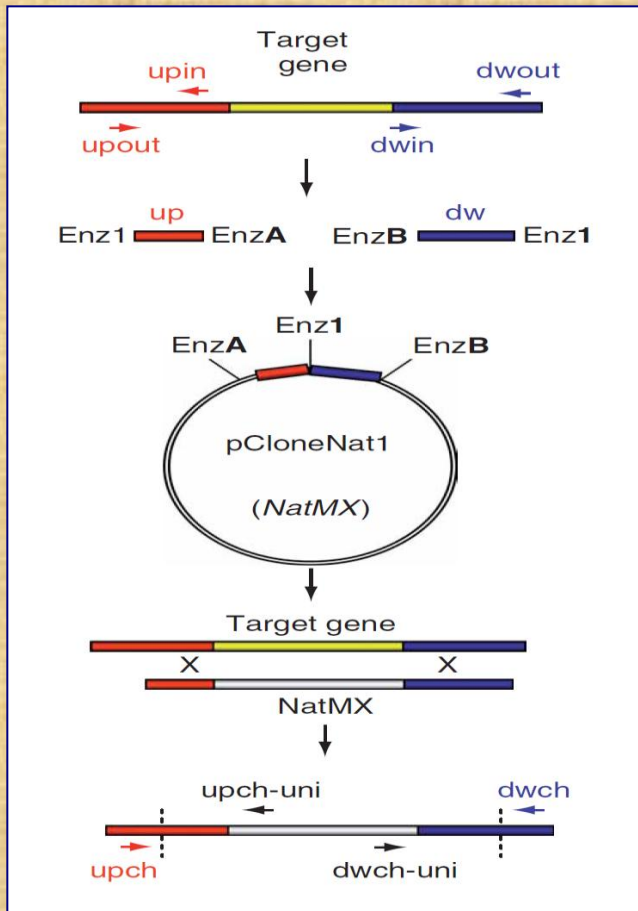


# Experimentálne metodiky použité v projekte

- Delécia génov kódujúcich proteín kinázy alebo proteíny potrebné pre bunkové delenie ako je meióza
- Analýza rozchádzania sa chromozómov počas meiotického delenia použitím GFP-značených chromozómov pomocou fluorescenčného mikroskopu



# Stratégia delécie génov u kvasiniek *Schizosaccharomyces pombe*



Obr. 4: Stratégia delécie génov u kvasiniek *S.pombe*

## Postup metodiky:

1. Amplifikácia regiónov ohraničujúcich gén kódujúci proteín kinázy (resp. proteíny) potrebné pre meiotické delenie buniek pomocou PCR reakcie
2. Ligácia získaných PCR produktov do vektora a amplifikácia plasmidu pomocou baktérií
3. Linearizácia plasmidu and transformácia do kvasiniek *S. pombe*
4. Výmena genomického lokusu v bunkách *S. pombe* homologickou rekombináciou
5. Verifikácia delécie génov pomocou PCR reakcie

# Záver 1

- Analýza rozchádzania sa chromozómov počas meiózy u kvasinkových buniek *Schizosaccharomyces pombe* konštrukciou homotalického kmeňa h90 nepotvrdila výskyt predpokladaného defektu, akým je fragmentácia jadier
- Na základe tejto analýzy nebolo možné výsledky publikovať, preto som pokračovala v analýze ďalších proteín kináz potrebných v procese rozchádzania sa chromozómov v meióze

## Záver 2

- Konštrukciou homotalického kmeňa h90 som zistila dôležitú úlohu Mph1 proteín kinázy v rozchádzaní sa homologických chromozómov počas anafázy I v meiotickom delení, konkrétne som pozorovala defekt s názvom non-disjunkcia homologických chromozómov
- Defekt som pozorovala v 10% meiotických buniek
- Ďalší typický defekt v rozchádzaní sa chromozómov je výskyt lagging chromozómov, ktorý som v *mph1* mutantných bunkách pozorovala v 5% meiotických buniek

**Výstupy v podobě publikací**

**Systematic analysis of *Schizosaccharomyces pombe* protein kinases in regulation of chromosome segregation during meiosis**

Ines Kováčiková<sup>1,2</sup>, Juraj Gregáň<sup>2</sup>, Eva Miadoková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Science, Department of Genetics, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovakia*

<sup>2</sup>*Max F. Perutz Laboratories, Department of Chromosome Biology, University of Vienna, Vienna, Austria; ines.kovacikova@gmail.com*

Študentská vedecká konferencia, Prírodovedecká fakulta UK  
Zborník recenzovaných príspevkov, ISBN 978-80-223-2819-7

# High-throughput knockout screen in *Schizosaccharomyces pombe* identifies a novel gene required for efficient homolog disjunction during meiosis I

---

Cornelia Rumpf,<sup>1</sup> Lubos Cipak,<sup>1</sup> Maria Novatchkova,<sup>2</sup> Zhang Li,<sup>1</sup> Silvia Polakova,<sup>1</sup> Andrej Dudas,<sup>1</sup> Ines Kovacikova,<sup>3</sup> Eva Miadokova,<sup>3</sup> Gustav Ammerer<sup>1</sup> and Juraj Gregan<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Max F. Perutz Laboratories; Department of Chromosome Biology; University of Vienna; Vienna, Austria; <sup>2</sup>Research Institute of Molecular Pathology; Vienna, Austria;

<sup>3</sup>Department of Genetics; Comenius University; Bratislava, Slovakia

# Pokračovanie projektu v budúcnosti

- delečná analýza ďalších neesenciálnych proteín kináz
- určenie úlohy identifikovaných kináz v meiotickom delení:
  - hľadanie ich substrátu
  - zistenie fosforylačných miest na nájdených substrátov



**„Projekt podpory vedeckých pobytov v organizáciách  
University of Oslo, (Department of Nutrition) a Medical  
University in Wien“**

**poskytnutím dotácie na zahraničné vedecké pobyty  
v organizáciách alebo centrách výskumu a vývoja vo  
väzbe na Európsku výskumnú infraštruktúru, v ktorých  
je Slovenská republika členom, alebo má významné  
zastúpenie na výskume a vývoji podporuje  
Ministerstvo školstva, vedy, výskumu a športu  
Slovenskej republiky**