

Analýza biologicky aktivních látek

VOJTĚCH ADAM

Mendelova
univerzita
v Brně



Agromická
fakulta

I. Nízkomolekulární biologicky aktivní thioly

II. Metalothionein

III. Nukleové kyseliny

I. Nízkomolekulární biologicky aktivní thioly

II. Metalothionein

III. Nukleové kyseliny

Těžké kovy

Těžké kovy jsou chemické prvky, mezi které patří zejména přechodné kovy, některé polokovy, lanthanoidy a aktinoidy. Existuje mnoho různých definic, některé vyčleňují těžké kovy podle hustoty, jiné podle protonového čísla nebo atomové hmotnosti či podle toxicity.

Definice z pohledu efektu na organismus

Toxické (olovo, kadmium, rtuť atd.)

Esenciální (zinek, měď, železo atd.)

Těžké kovy

- Těžké kovy a jejich sloučeniny jsou jednou z nejvíce toxických látek znečišťujících životní prostředí včetně zemědělských produktů.
- Vyskytují se přirozeně a nemohou být degradovány.
- Vyšší koncentrace jak esenciálních, tak toxických těžkých kovů vedou k otravám.
- Těžké kovy jsou dále nebezpečné z pohledu jejich schopnosti se bioakumulovat.

Těžké kovy – minulost a přítomnost

Kadmium



Rtuť



Olovo



Stříbro

Těžké kovy – přítomnost a budoucnost?

Platina



Paladium



Rhodium



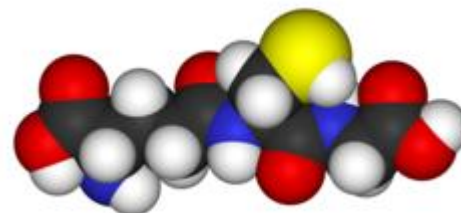
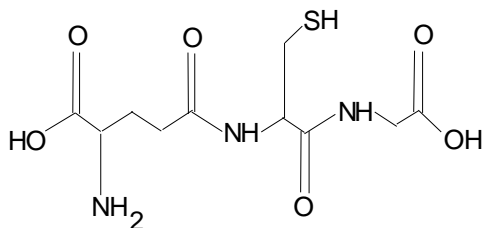
Rostliny

- Rostliny jsou schopny produkovat nízkomolekulární thioly, jako je glutathion a fytochelatiny jako obranné látky proti působení těžkých kovů.



Glutathion

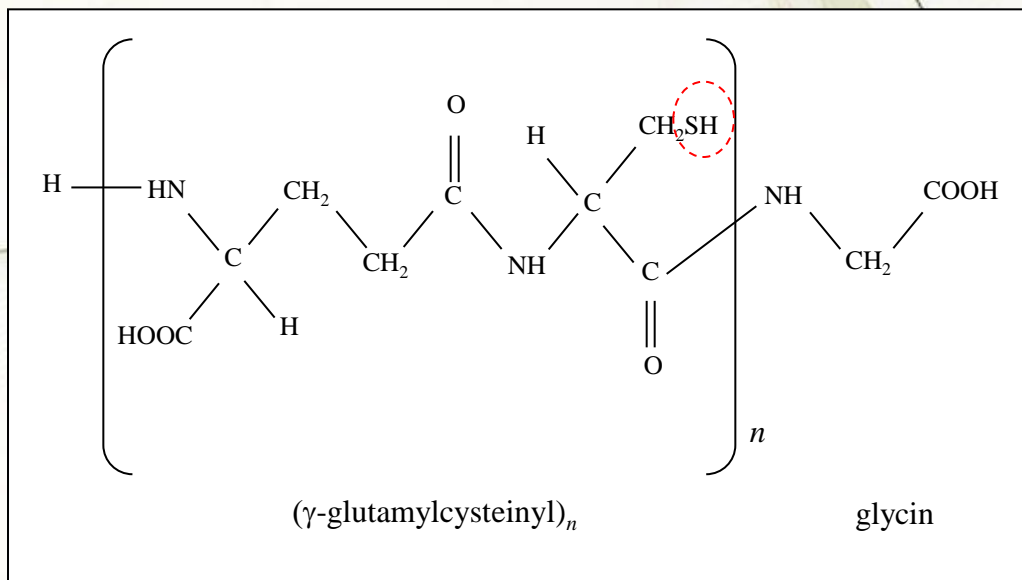
- Glutathion (GSH) je tripeptid složený z aminokyselin kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu



- Účastní se detoxifikace exogenních a endogenních sloučenin, jako jsou reaktivní kyslíkové radikály, ionty těžkých kovů, perzistentní organické polutanty.
- Je schopen redukovat disulfidické vazby proteinů, kdy udržuje tyto látky v redukovaném funkčním stavu.
- Slouží jako zdroj cysteinu.
- Hraje důležitou roli v redukci ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy.

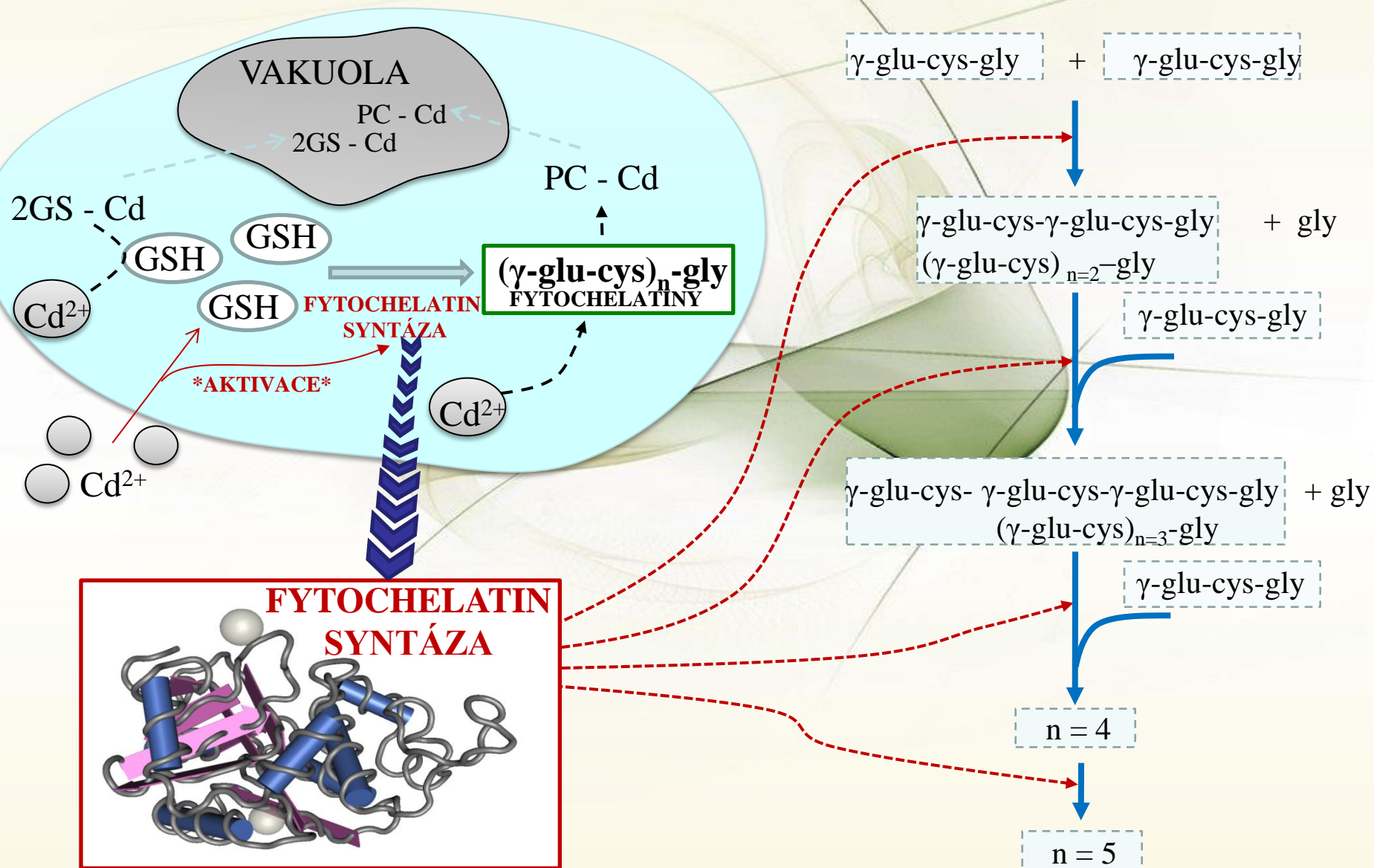
Fytochelatiny

- Významný rostlinný peptid, který má základní strukturu $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$.
- Dipeptidická repetice glutamové kyseliny a cysteinu ($\gamma\text{-Glu-Cys}$) se může opakovat 2 až 11krát.



- Molekula glutathionu ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) je substrátem pro syntézu fytochelatinů.
- Hlavní funkce této skupiny peptidů je detoxikace těžkých kovů, která probíhá vazbou na thiolové skupiny peptidu ➡ *schopnost interakce*.

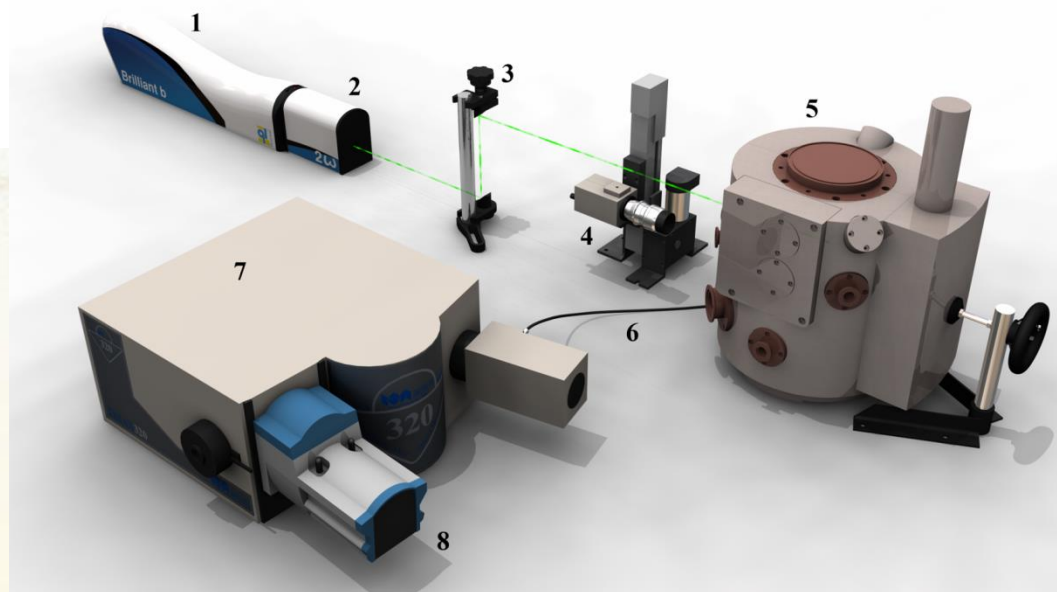
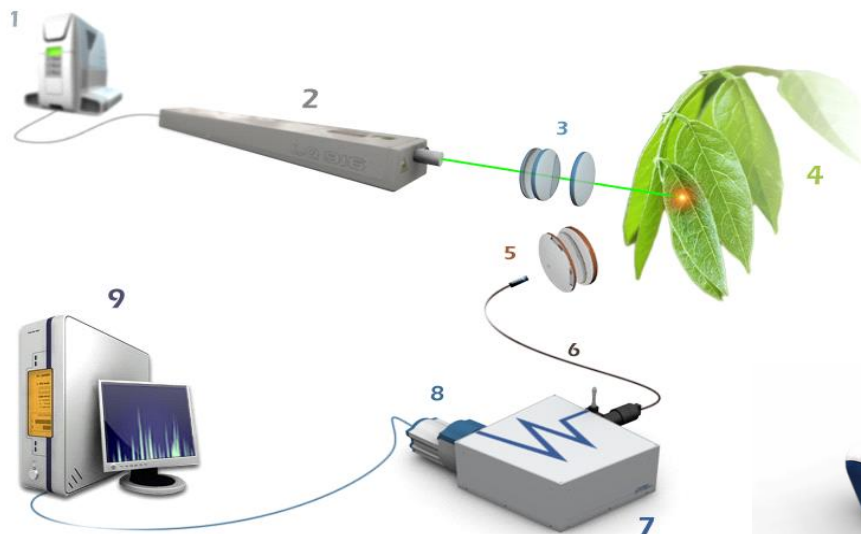
Fytochelatin syntáza



Jak komplexně hodnotit reakci rostliny na přítomnost těžkého kovu?

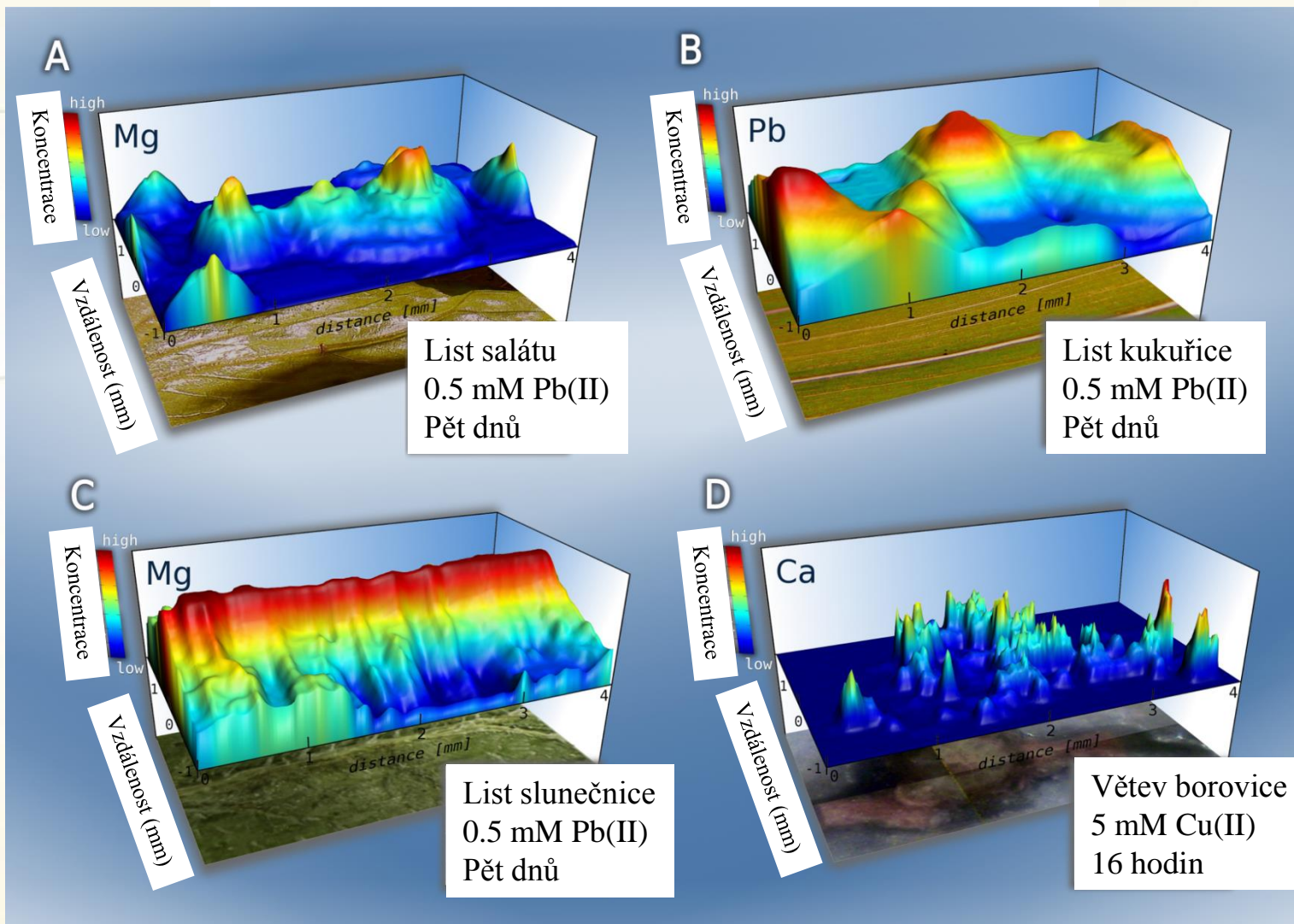
Distribuce kovů

Laserem indukovaná ablační spektrometrie



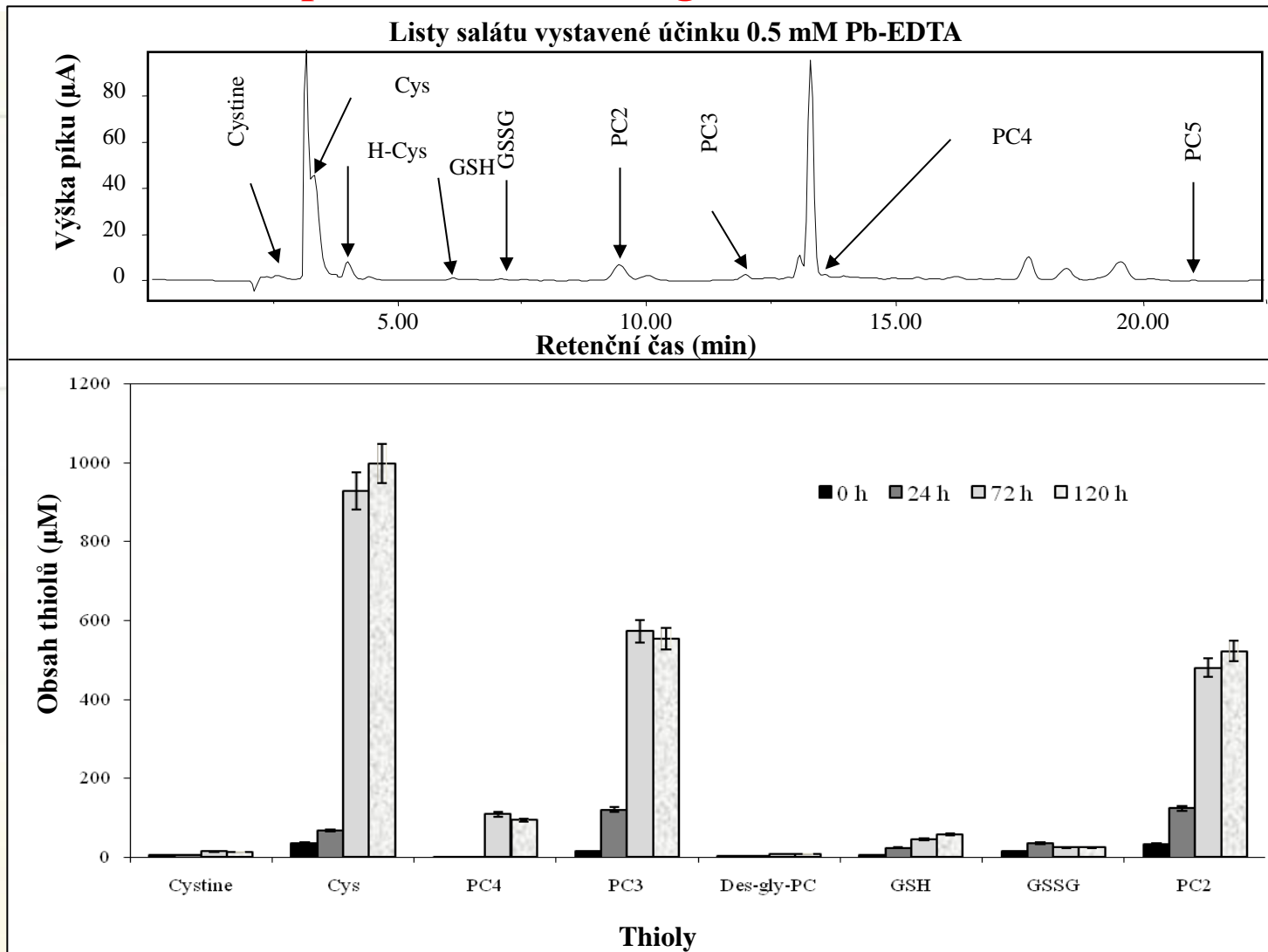
Distribuce kovů

Laserem indukovaná ablační spektrometrie



Obsah thiolů

Vysoce účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí



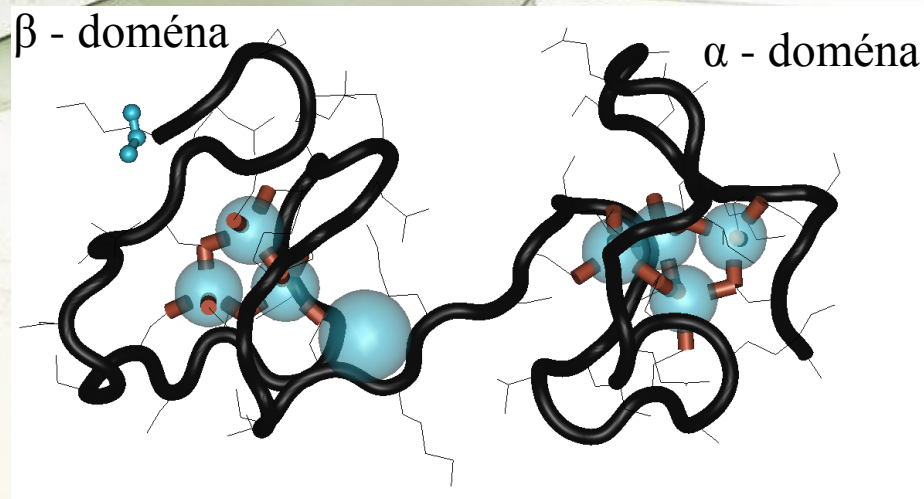
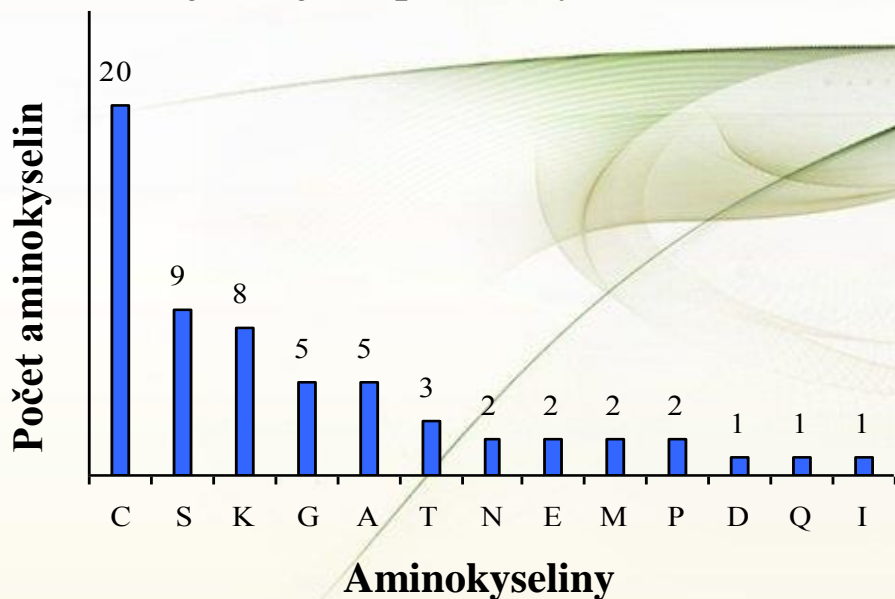
I. Nízkomolekulární biologicky aktivní thioly

II. Metalothionein

III. Nukleové kyseliny

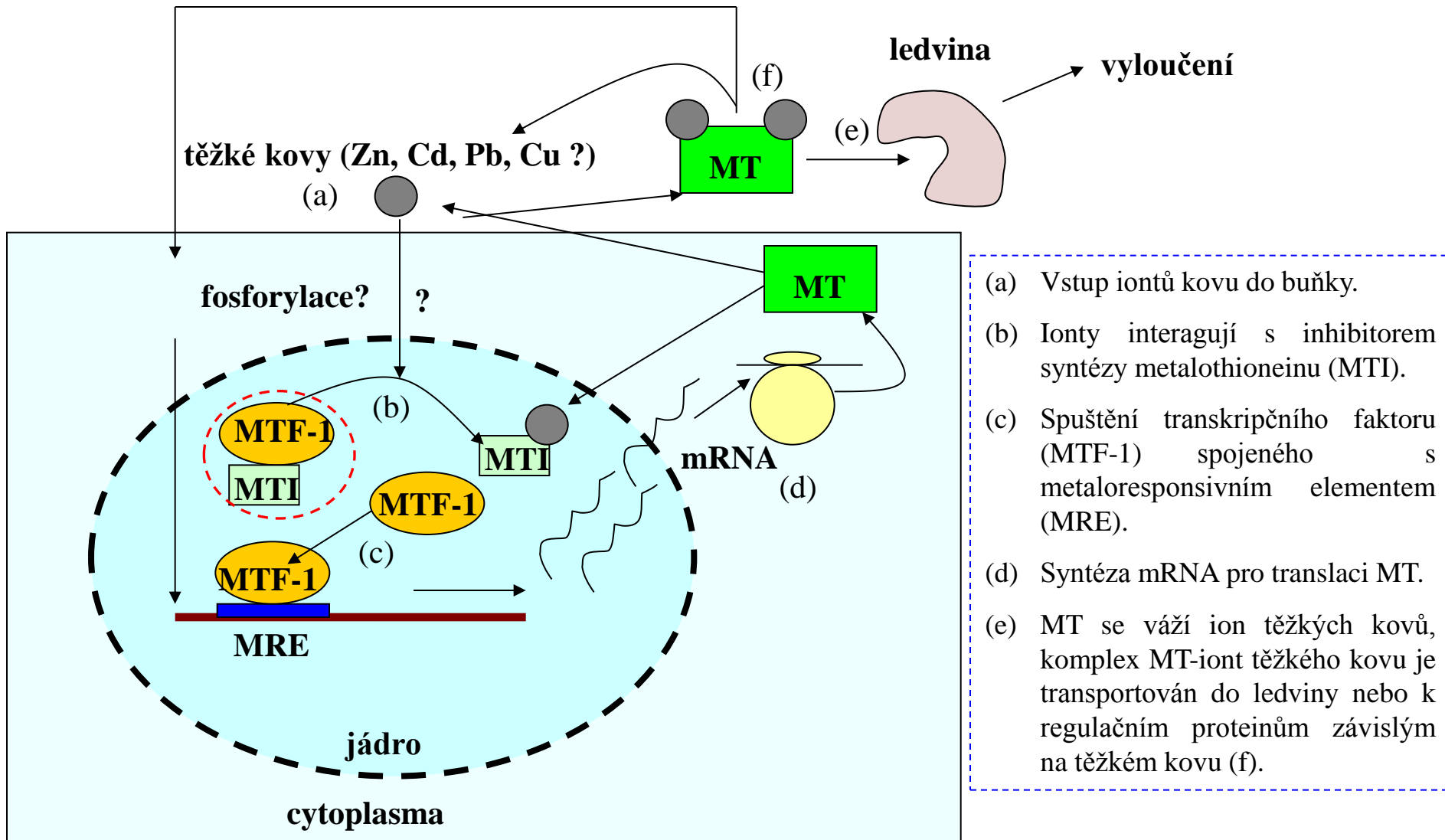
Metalothionein – protein

- Intracelulární, nízkomolekulární, na cystein velmi bohatý protein (6 – 10 kDa).
- Metalothionein se skládá ze dvou vazebných domén – α a β .
- N-terminální část peptidu – β -doména; tři vazebná místa pro dvojmocné ionty.
- C-terminální část peptidu – α -doména; čtyři vazebná místa pro dvojmocné ionty kovů.
- Nejčastější repetice: cystein(C)–serin(S)–cystein(C).

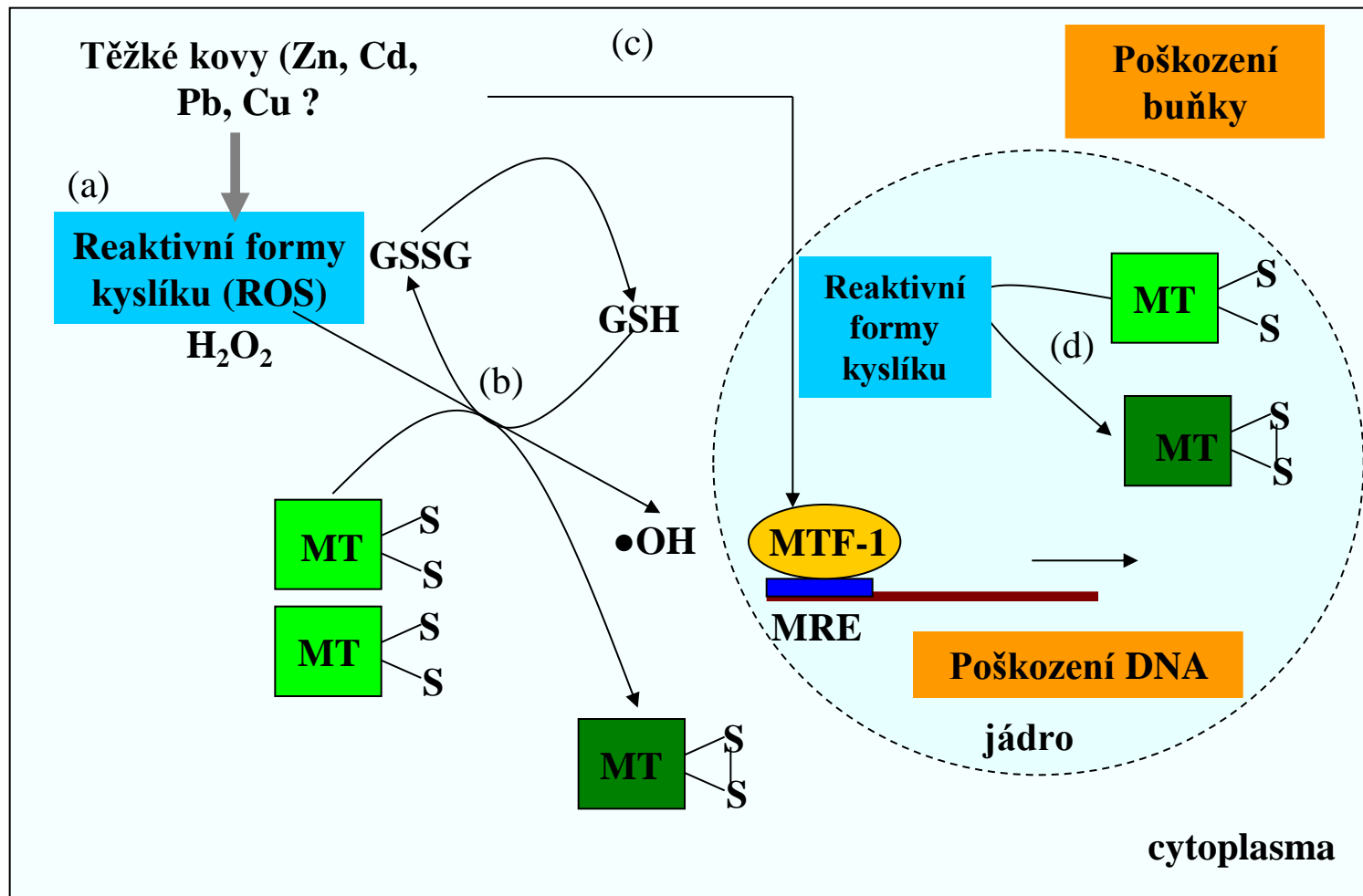


(C – cystein, S – serin, K – lysin, G – glycin, A – alanin, T – threonin, N – asparagin, E – kyselina glutamová, M – methionin, P – prolin, D – kyselina asparagová, Q – glutamin, I – isoleucin)

Detoxikace těžkých kovů



Metalothionein jako zhášec reaktivních forem kyslíku



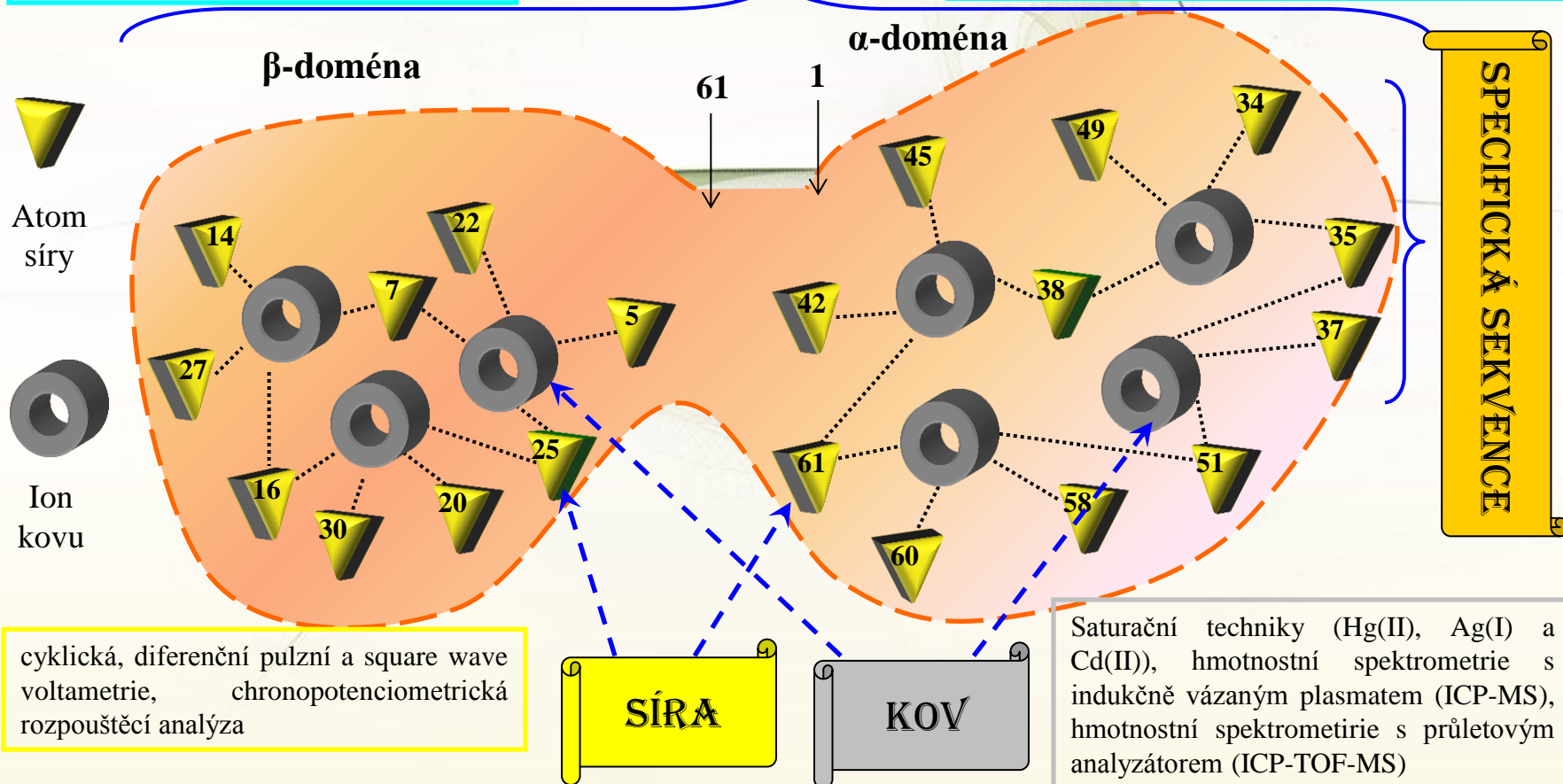
- (a) Přítomnost těžkých kovů v buňce může produkovat reaktivní formy kyslíku (ROS).
- (b) Pro odbourání ROS může být použit glutathion a MT.
- (c) Přítomnost volných iontů těžkých kovů vede k aktivaci MTF-1 → syntéza MT.
- (d) MT může vázat ionty kovů a odbourávat ROS.

Metody používané pro studium metalothioneinu

Množství: hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem a ionizací s laserovou desorpcí v přítomnosti matrice (MALDI-TOF-MS), hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS)

CELÝ PROTEIN

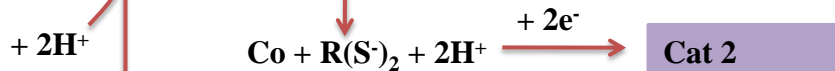
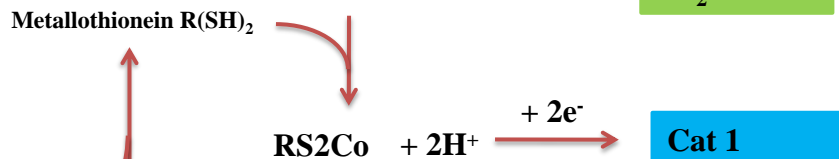
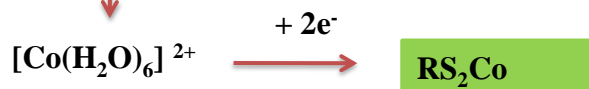
Struktura: nukleární magnetická rezonance, elektronová paramagnetická rezonance (EPR), Ramanova spektroskopie, cirkulární dichroismus (CD), magnetický cirkulární dichroismus, Mossbauerova spektroskopie a rentgenové techniky



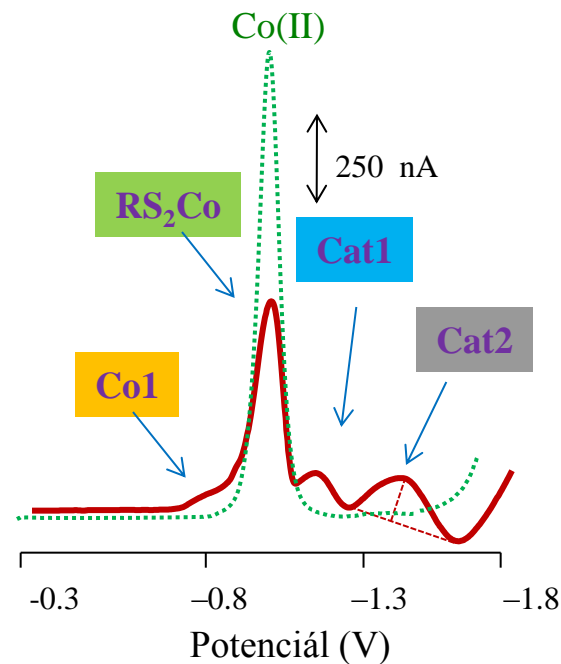
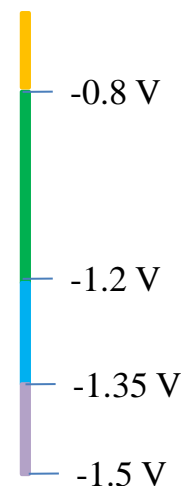
enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), Western blotting

Brdičkova reakce

Metallothionein + $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}^{3+}$



Potenciál



Brdičkova reakce – Příprava vzorku



zmražení

homogenizace kapalným
dusíkem – tissues

denaturace



centrifugace



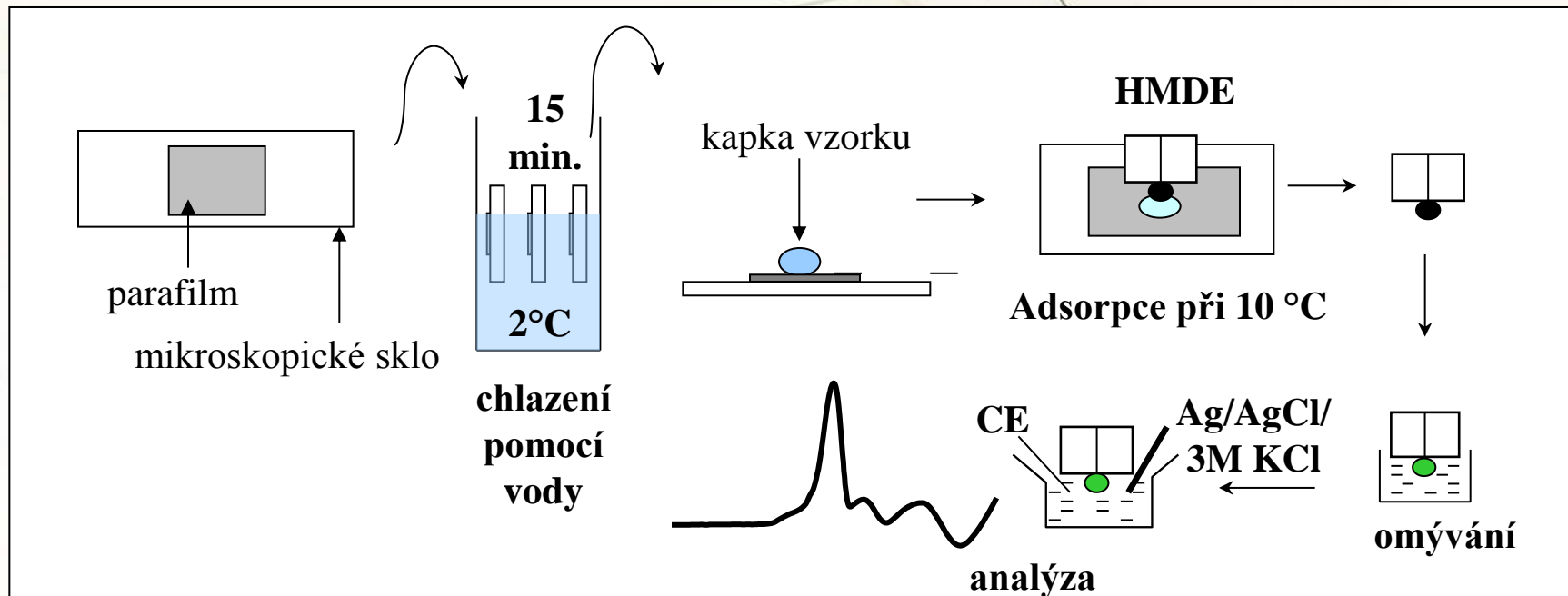
zředění

odebrání
supernatantu

ANALÝZA

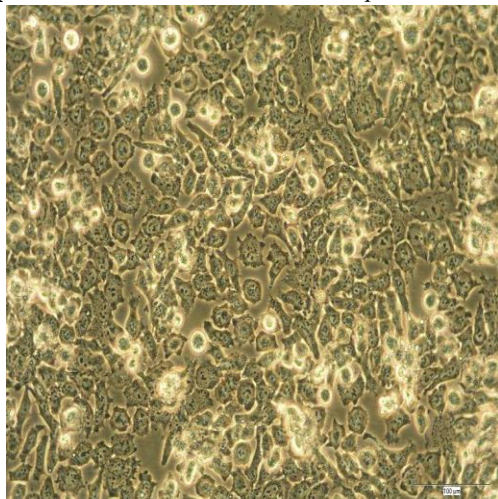
- Ze získaných vzorků krevních sér nebo homogenizátů tkání bylo odebráno 100 μl a umístěno na 15 min. při 99 $^{\circ}\text{C}$ do termobloku (Eppendorf 5430, USA) pro denaturaci termolabilních proteinů. Směs byla ochlazena na 4 $^{\circ}\text{C}$ a metalothionein jako termostabilní protein byl následně oddělen centrifugací při 4 $^{\circ}\text{C}$, 16 000 g po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, USA).

Tepelná denaturace a přenosová technika

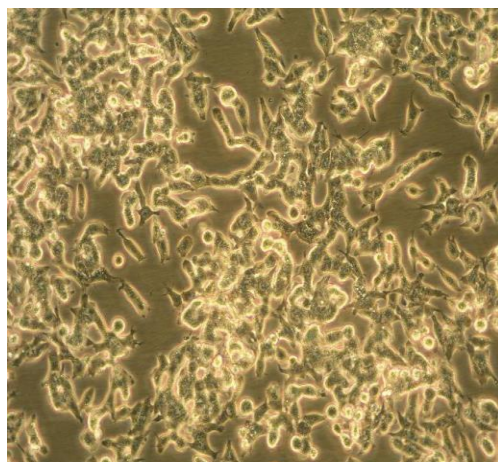


Tepelná denaturace a přenosová technika

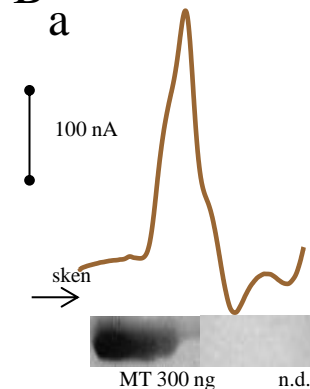
A UKF-NB4 – *sensitivní k cisplatině*



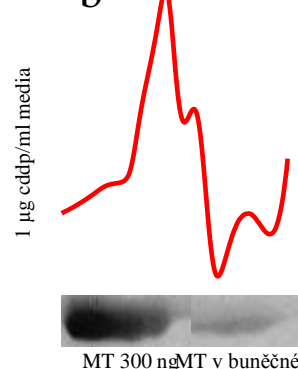
UKF-NB4 – *rezistentní k cisplatině*



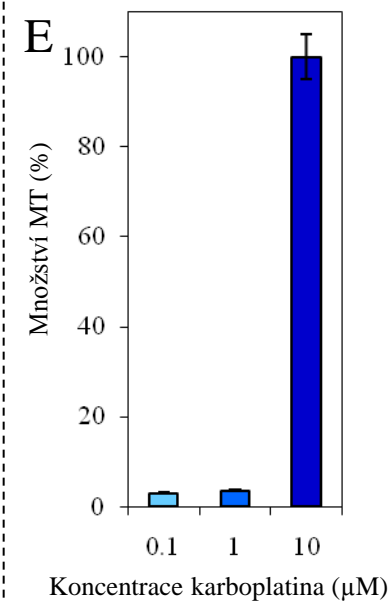
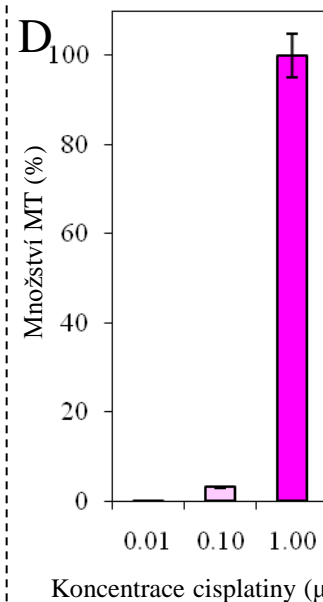
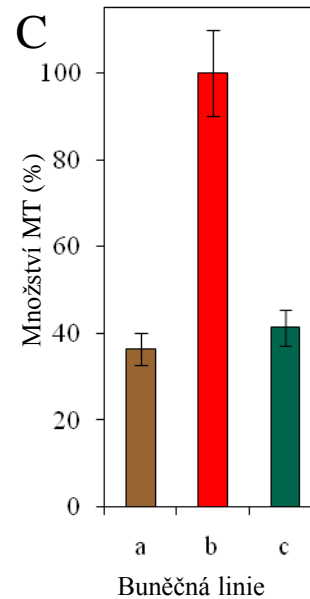
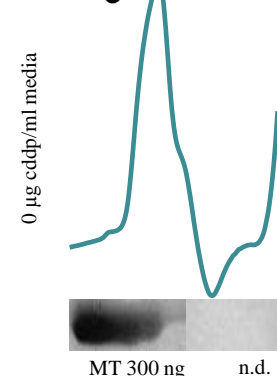
B *Mateřská linie*



b *Rezistentní linie*



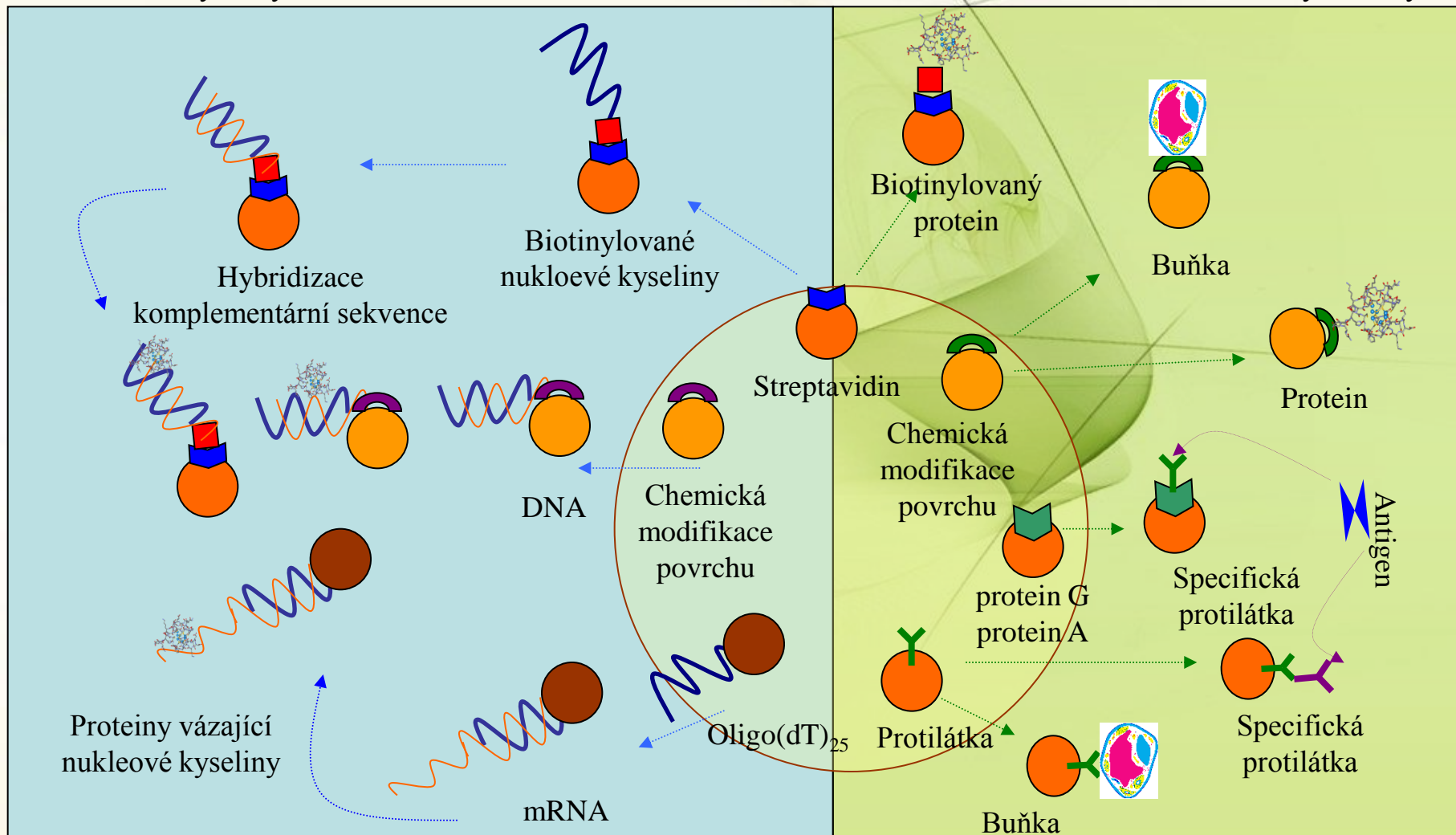
c



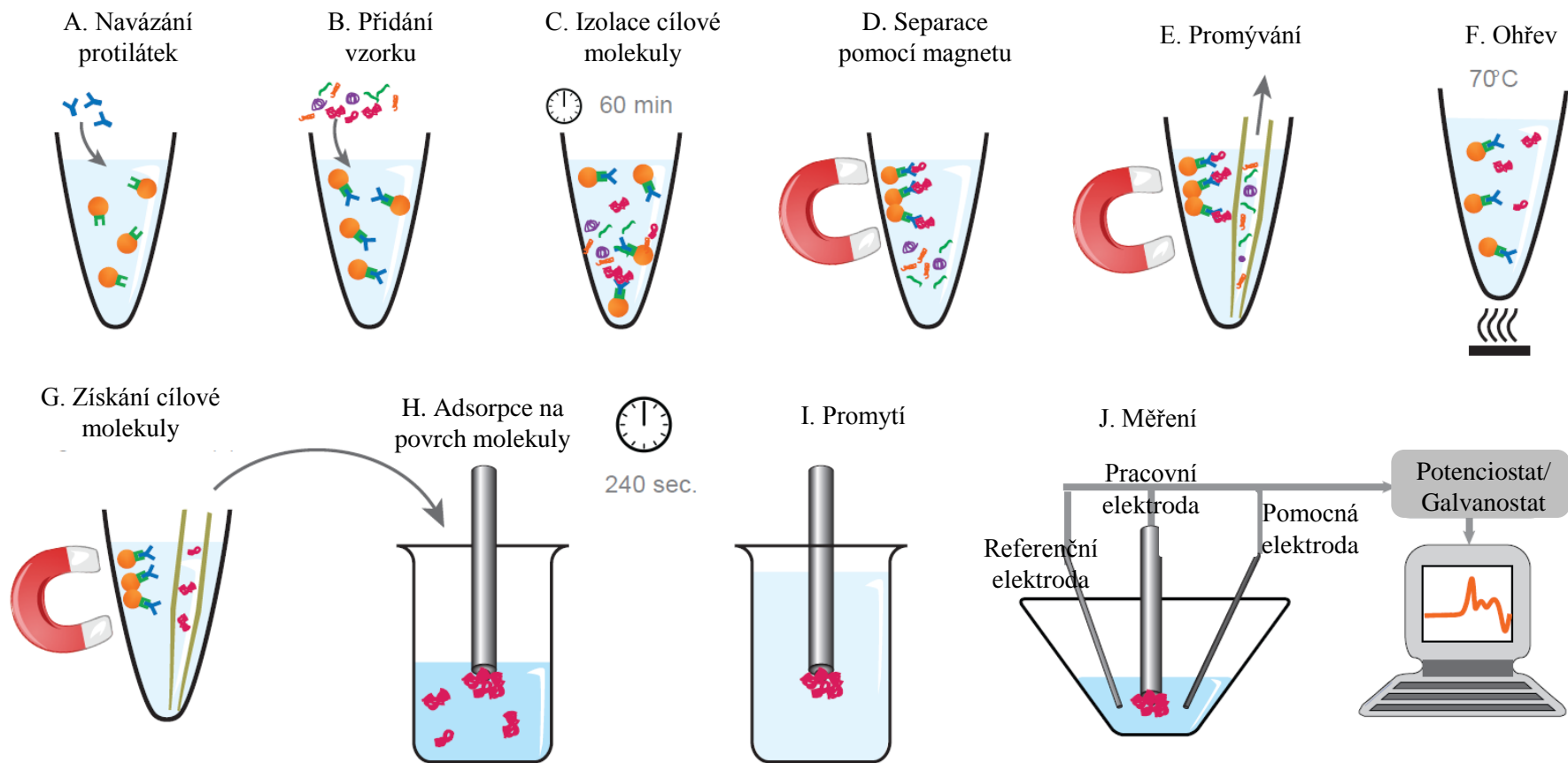
Izolace na bázi paramagnetických částic

Nukleové kyseliny

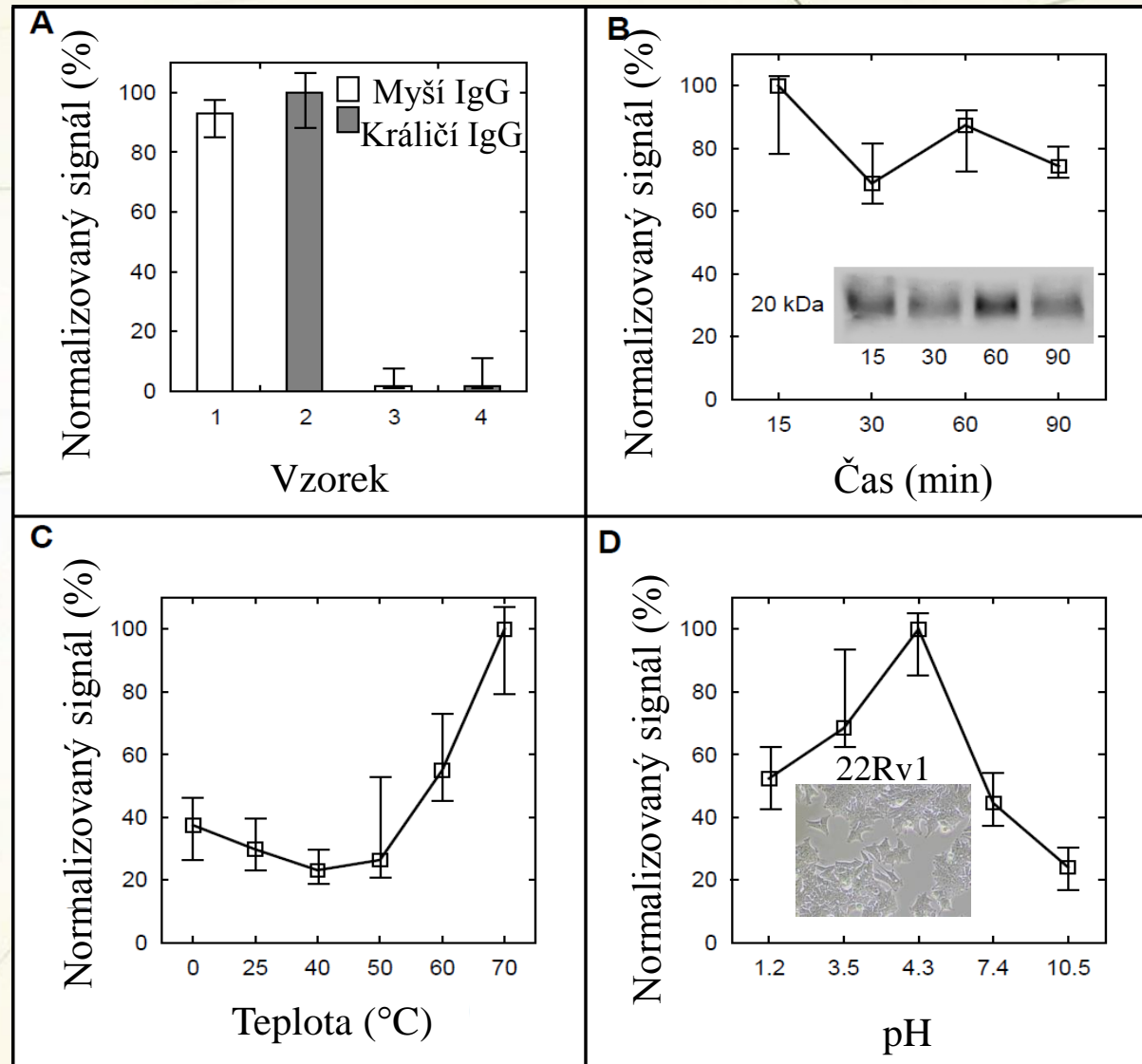
Proteiny a buňky



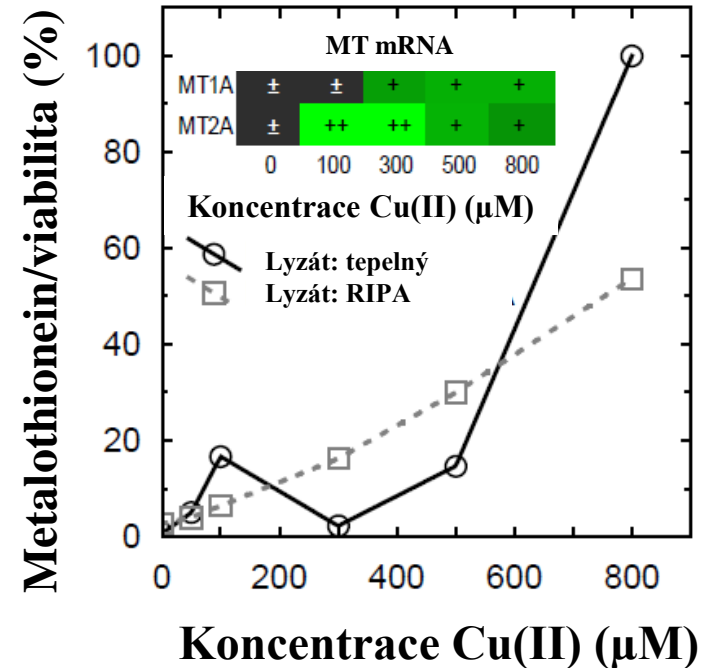
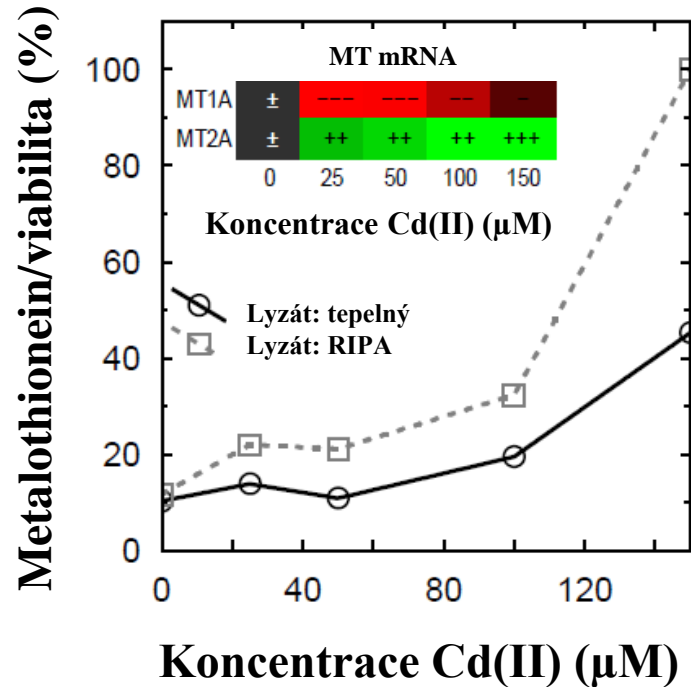
Pokročilé materiály v izolaci metalothioneinu



Optimalizace postupu izolace



Analýza prostatické buněčné linie 22Rv1



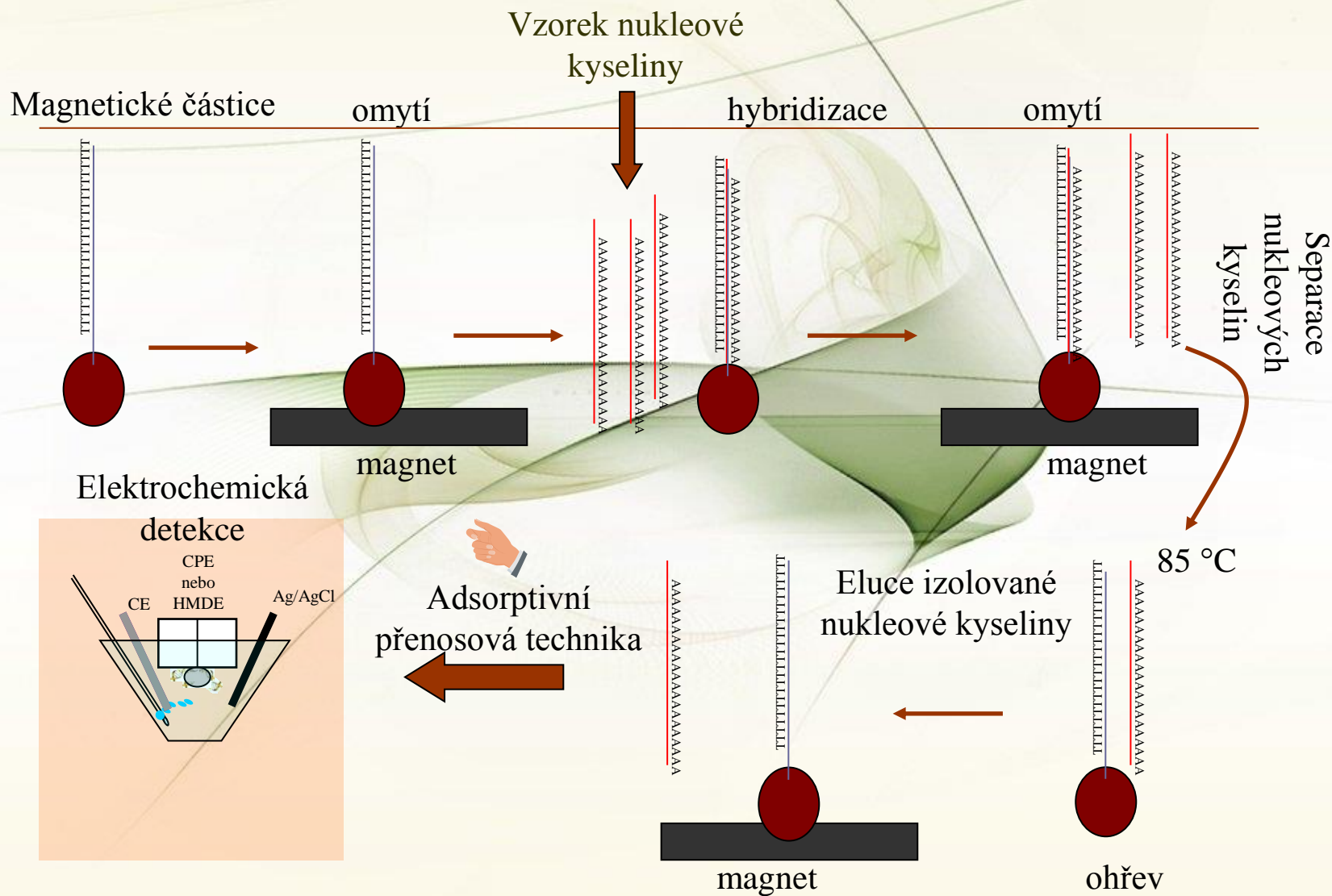
Obsah

I. Nízkomolekulární biologicky aktivní thioly

II. Metalothionein

III. Nukleové kyseliny

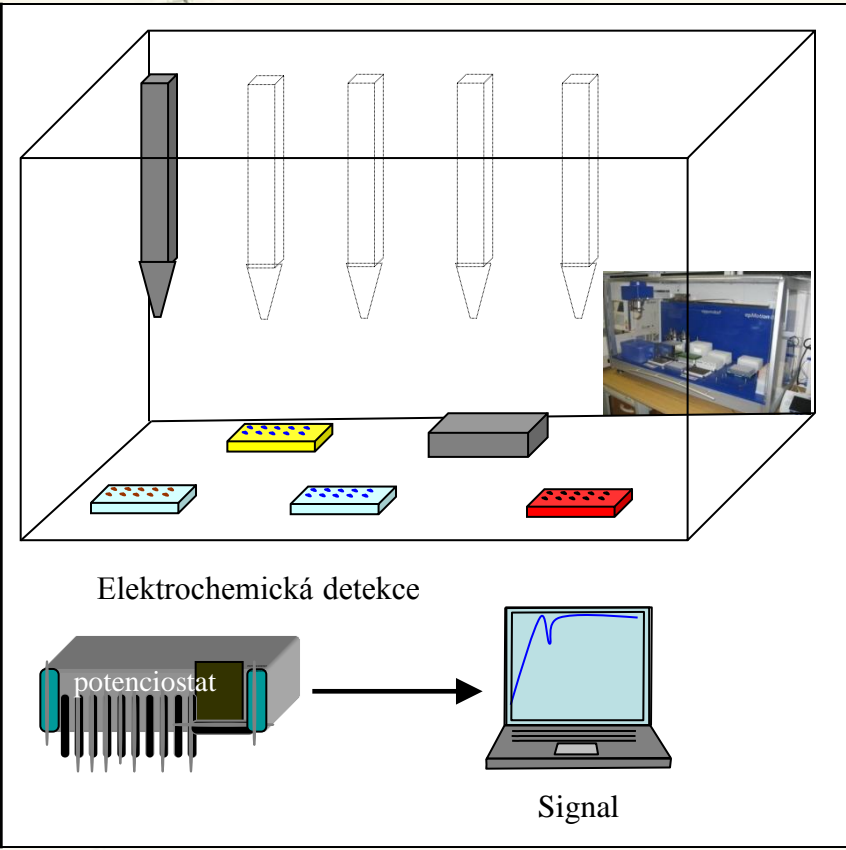
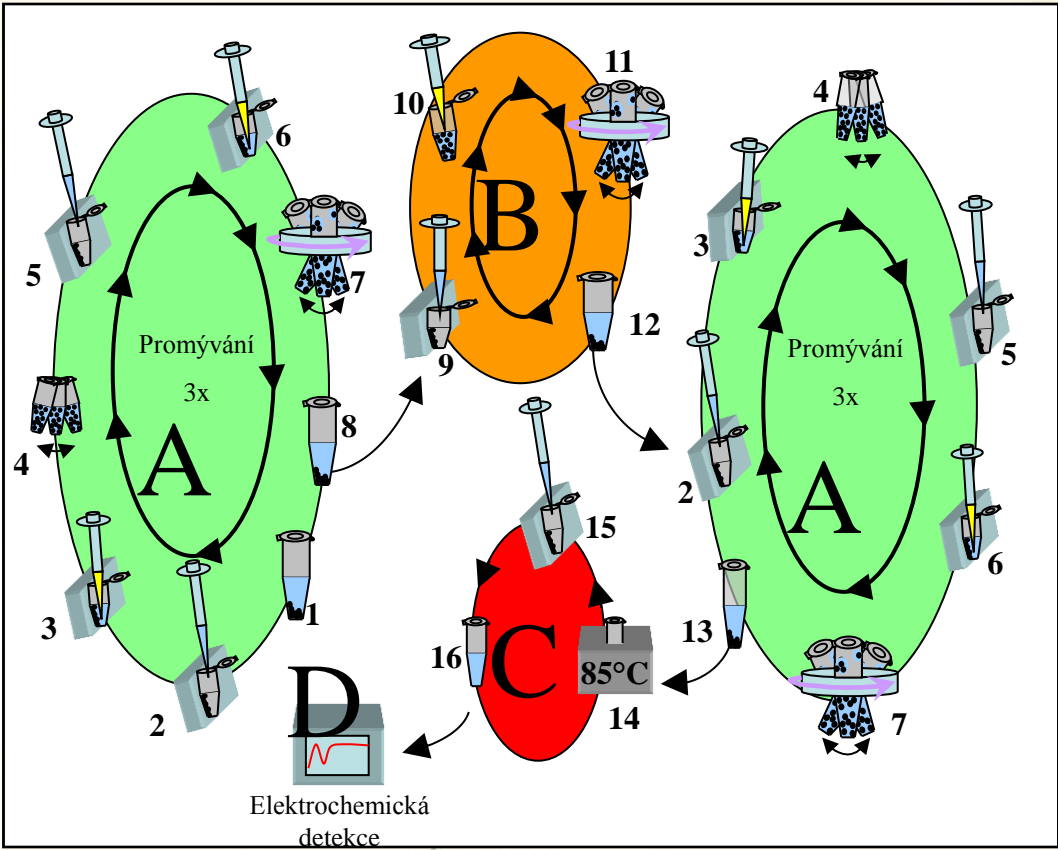
Izolace nukleových kyselin



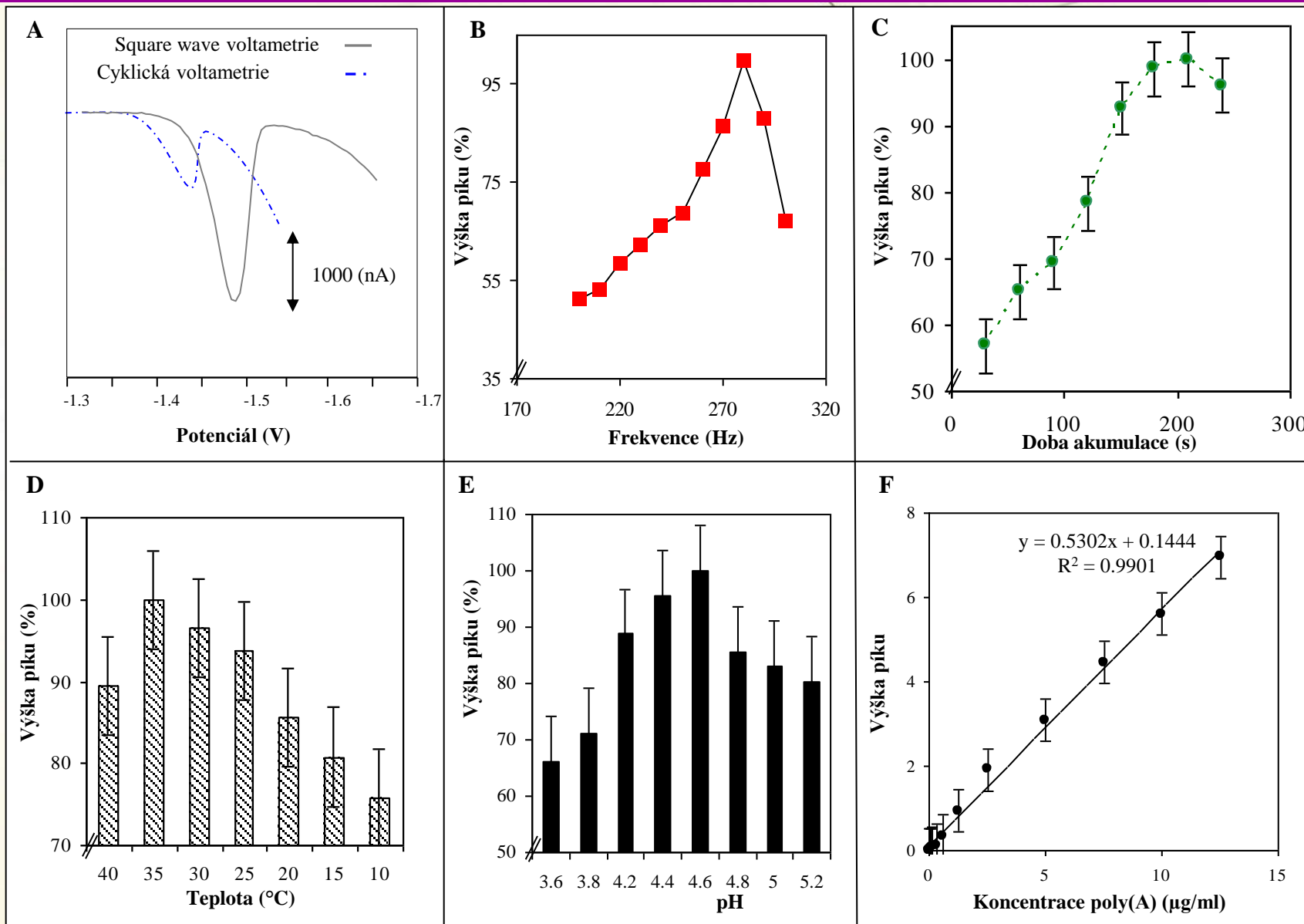
Izolace nukleových kyselin

Poloautomatická

Automatická



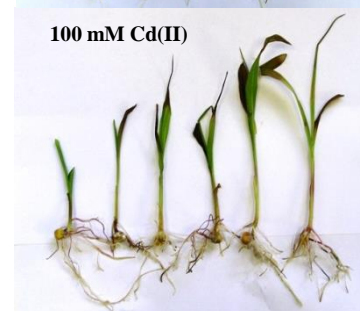
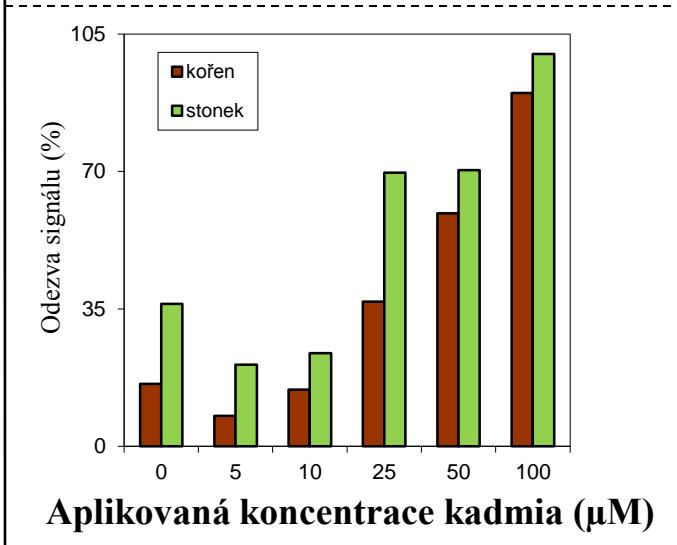
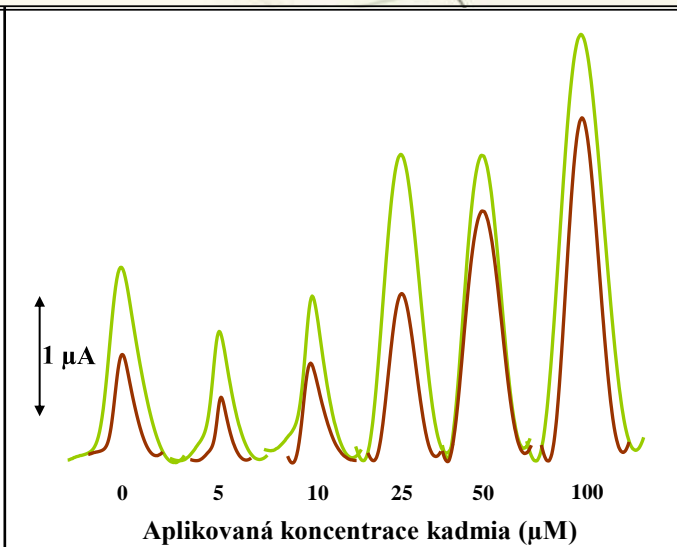
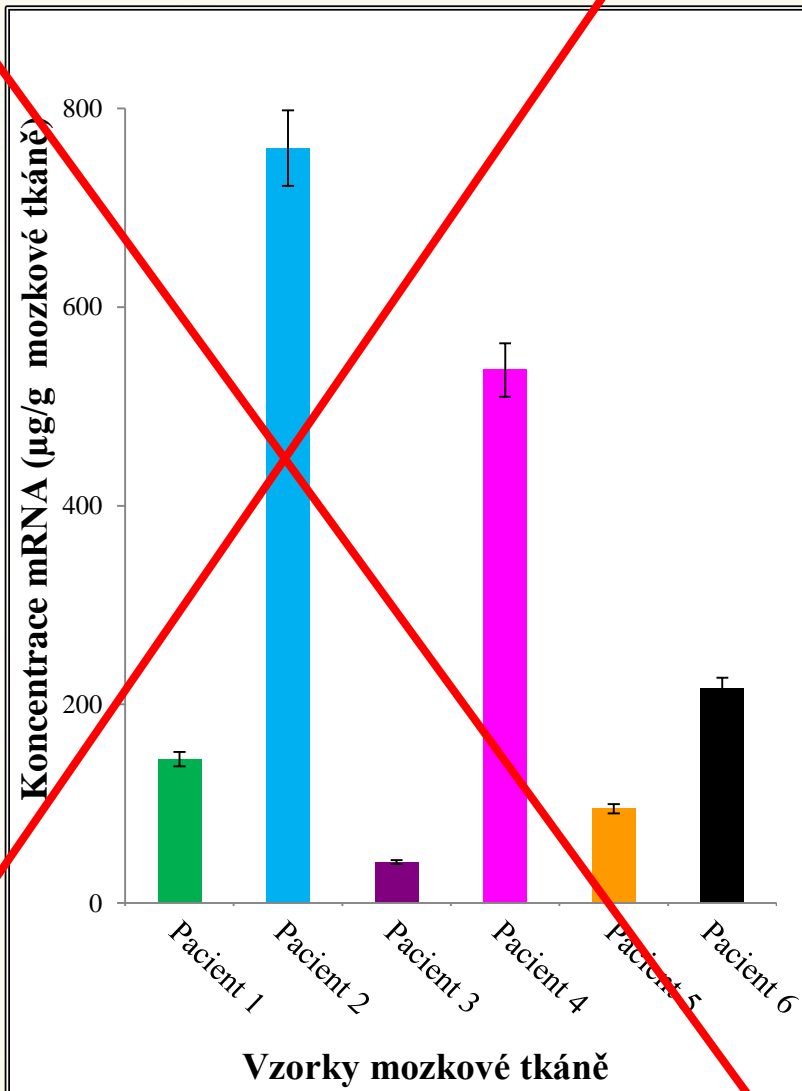
Optimalizace elektrochemické detekce nukleových kyselin



Izolace mRNA z reálného vzorku

Tkáň

Pletiva



0 24 48 72 96 120
Doba kultivace (hod)

SHRNUTÍ

Pedagogický rozvoj oborů vyučovaných na Agronomické fakultě

- ✓ Využití moderní a robustní analytické, biochemické a biologické instrumentace v základní výuce Anorganické a Analytické chemie a Biochemie.
- ✓ Unikátní přístroje ve specializovaných chemických a biochemických předmětech (Bioanalytické chemie, Biotechnologie životního prostředí, Biosenzory, Biochemické pokročilé praktikum).
- ✓ Bakalářské a diplomové práce.

Pedagogický rozvoj oboru Zemědělská chemie na Agronomické fakultě

Výchova mladých vědeckých pracovníků

- ✓ Rozvoj izolačních a separačních postupů založených na pokročilých materiálech.
- ✓ Lab-on-chip technologie, aplikace *in situ*.
- ✓ Praktická aplikace, studium procesů v organismech všech úrovních.

Pedagogický a vědecký rozvoj oboru Zemědělská
chemie na Agronomické fakultě
In vivo technologie

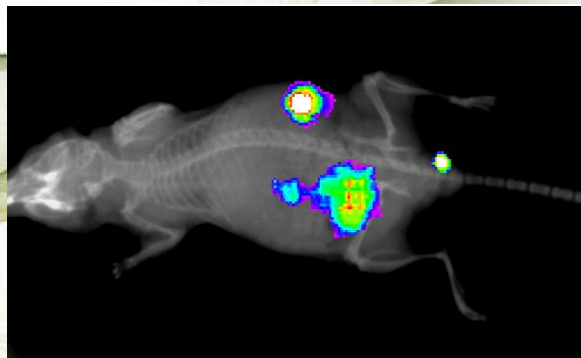
Chemotherapy... fundoscopic examination...
dealing with medievalism here!

Leonard „Bones“ McCoy
Star Trek IV – Voyage Home

Pedagogický a vědecký rozvoj oboru Zemědělská chemie na Agronomické fakultě

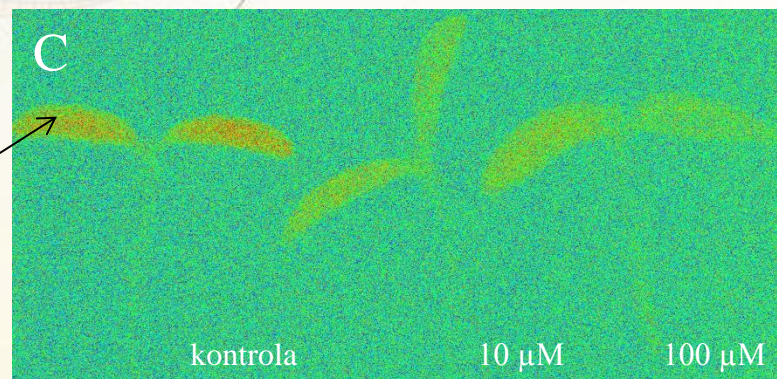
In vivo zobrazovací technologie

Kvantová tečka – quantum dot, ohraničená oblast polovodiče o průměru kolem 30 nm a výšce 8 nm, schopná v důsledku nižší energie ve srovnání s energií vodivostního pásu okolního polovodiče vázat elektrony. **Důležitou vlastností je také optická schopnost teček se zabarvovat.**



Vyměnit

Intenzita signálu ~ 200 → pozadí
Excitace (730 nm), Emise (830 nm)



PODĚKOVÁNÍ



Agronomická
fakulta



PODĚKOVÁNÍ

Laboratoř metalomiky a nanotechnologií

Prosinec 2005



Červen 2007



Duben 2008



Duben 2006



Listopad 2007



Září 2010



Květen 2011



Březen 2009



Děkuji Vám za Vaši pozornost

