



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

METABOLOMICS & METABOLOMIC PROFILLING

Dr. Michal Oravec

Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

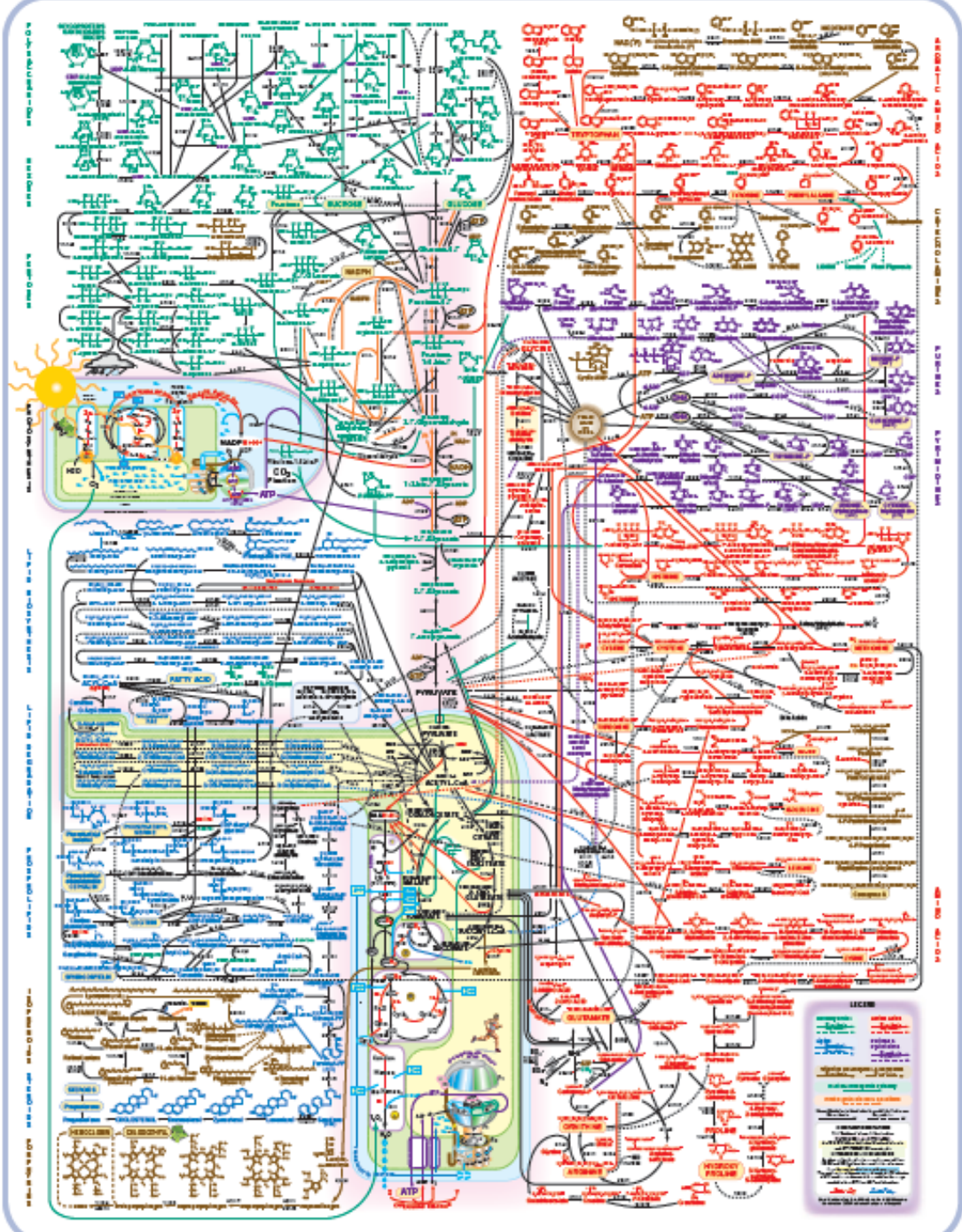


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Metabolomics: Is youngest an 'omics' approach that aims to analyse all metabolites in a biological sample comprehensively and is also focus to study of chemical processes involving metabolites. Metabolomics represents the exhaustive profiling of metabolites contained in organism.

Metabolom: The complete complement of small molecules present in an organism. Represents the collection of all metabolites in a biological cell, tissue, organ or organism, which are products of cellular processes.

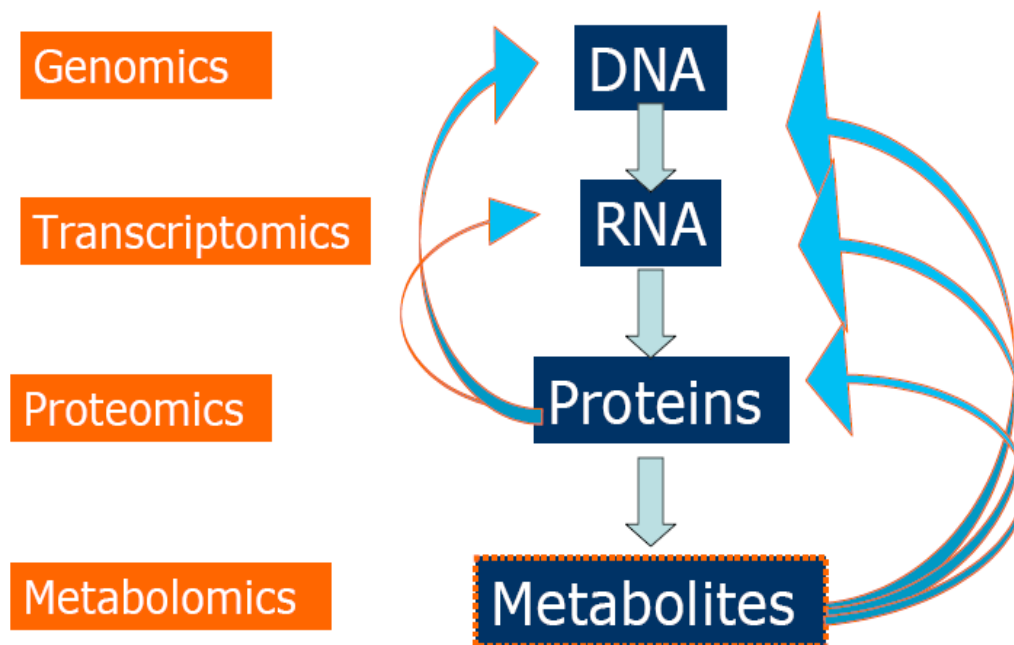
Metabolomic profiling: Identification and quantification of the metabolites present in an organism. Is a fast growing technology and is useful for phenotyping and diagnostic analyses of plants. The objective of 'non-targeted' metabolic profiling analysis is to describe metabolic events in plants by determining all detectable metabolites.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

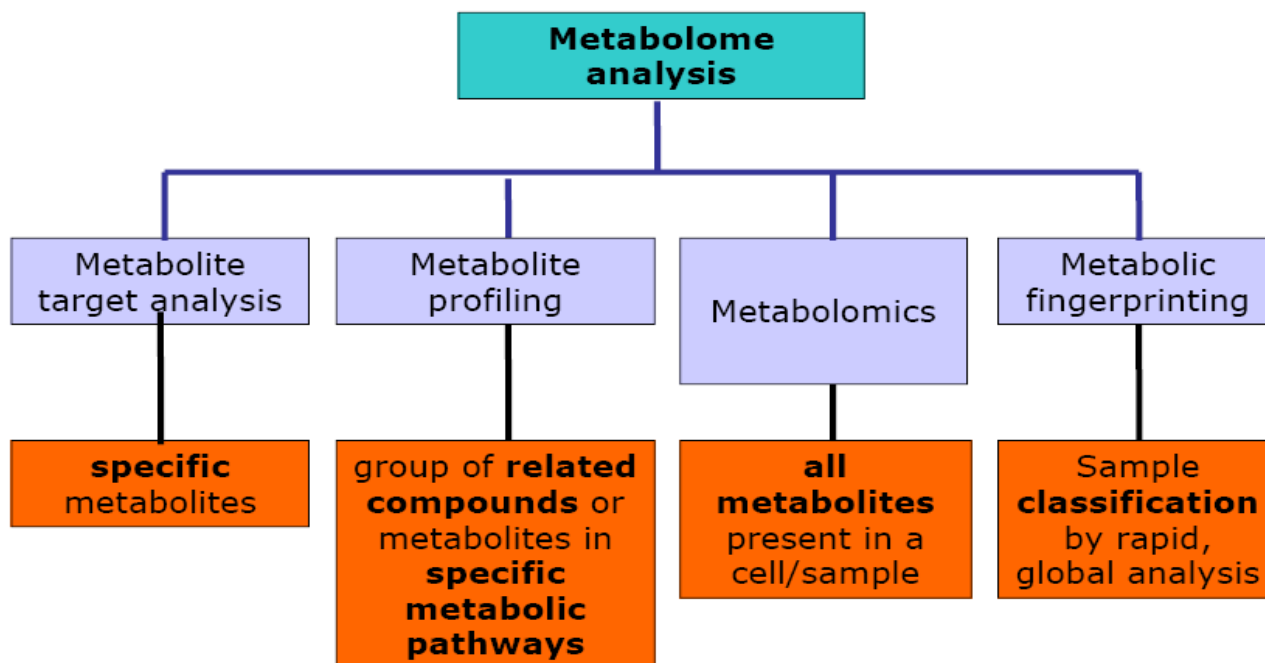
METABOLOMICS

Information Flow in Biology



METABOLOMICS & METABOLOMIC PROFILLING

Classification of Endogenous Metabolite Analysis



O. Fiehn *Comp. Funct. Genom.* **2** (155- 168) 2001, *Plant Mol. Biol.* **48** (155- 171) 2002

METABOLOMICS & METABOLOMIC PROFILLING

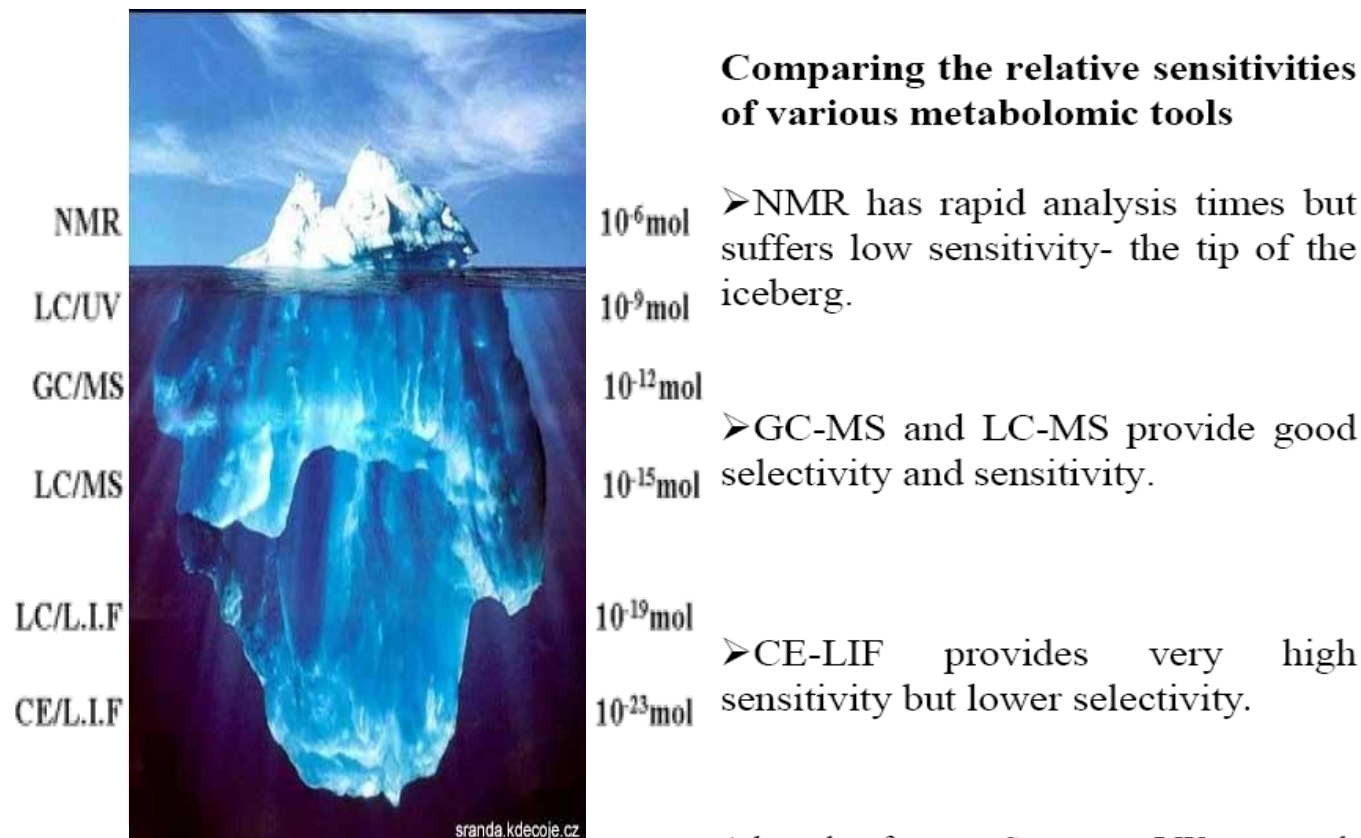
Extraction and analysis of metabolites

- Major components present at mM conc.
 - Salts, sugars
- Minor components present at nM conc or less
 - Vitamins, metabolic intermediates

← More non-polar		More polar →		
Lipids fatty acids	Carotenoids Steroids	Phenolics alcohols	Alkaloids Organic acids Organic amines	Sugars Nucleotides
Waxes Terpenes volatiles	flavenoids	Catecholamines Polar organics	Nucleosides Amino acids	Metals Salts Ionic

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

METABOLOMICS & METABOLOMIC PROFILLING



Adapted from: Sumner LW et al. *Phytochemistry* 2003, 62: 817-836



Sampling



Transport and storage of samples

Preparation of samples: lyophilization, homogenization

Extraction, fractionation of samples

Polar fraction

Non-polar fraction

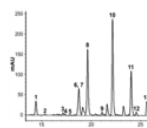
Derivatization

LC/MS(orbitrap) analysis of samples

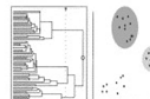
GC/MS analysis of samples



← More non-polar			More polar →	
Lipids fatty acids	Carotenoids Steroids	Phenolics alcohols	Alkaloids Organic acids Organic amines	Sugars Nucleotides
Waxes Terpenes volatiles	flavenoids	Catecholamines Polar organics	Nucleosides Amino acids	Metals Salts Ionic



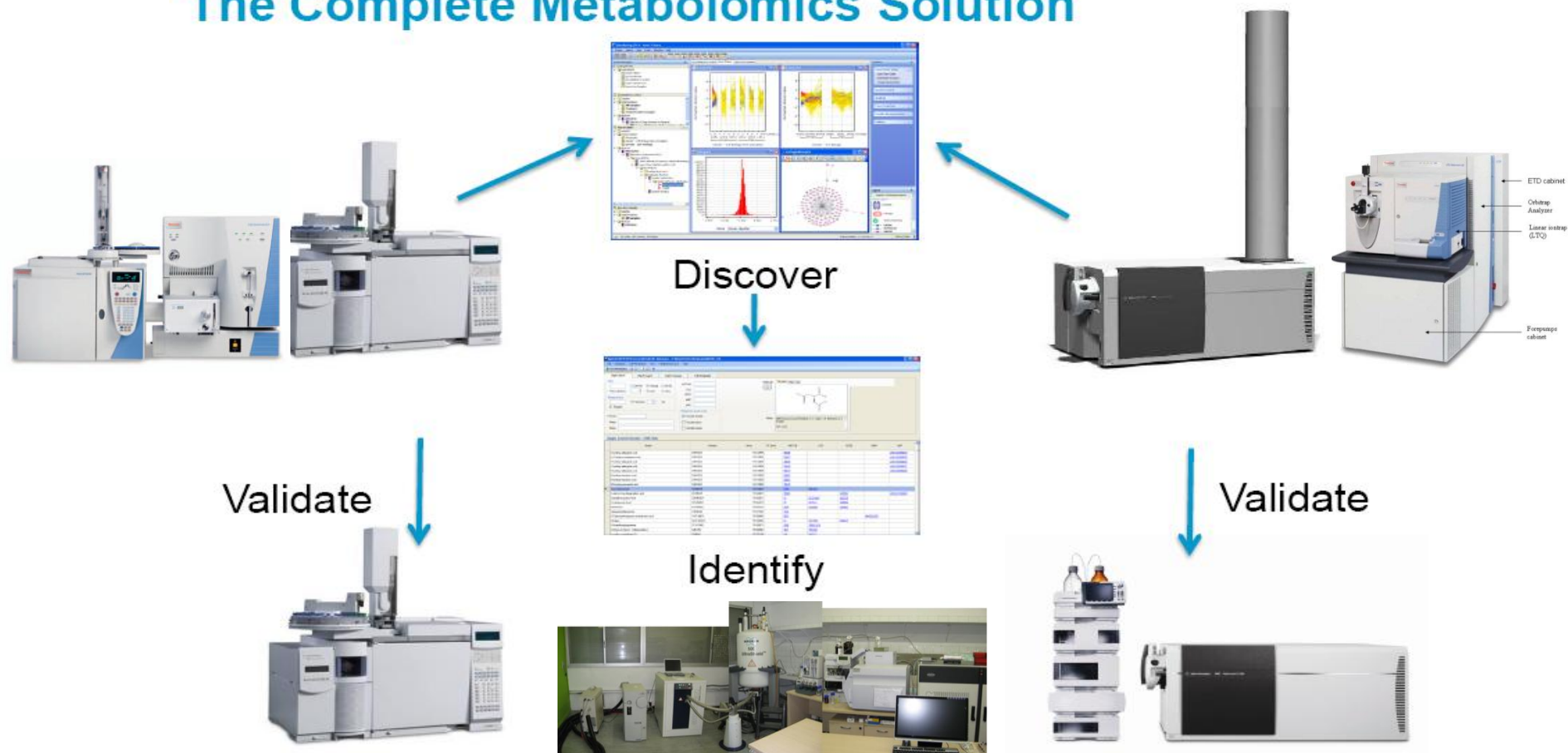
Data evaluation, interpretation of results and statistical analysis of the results





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

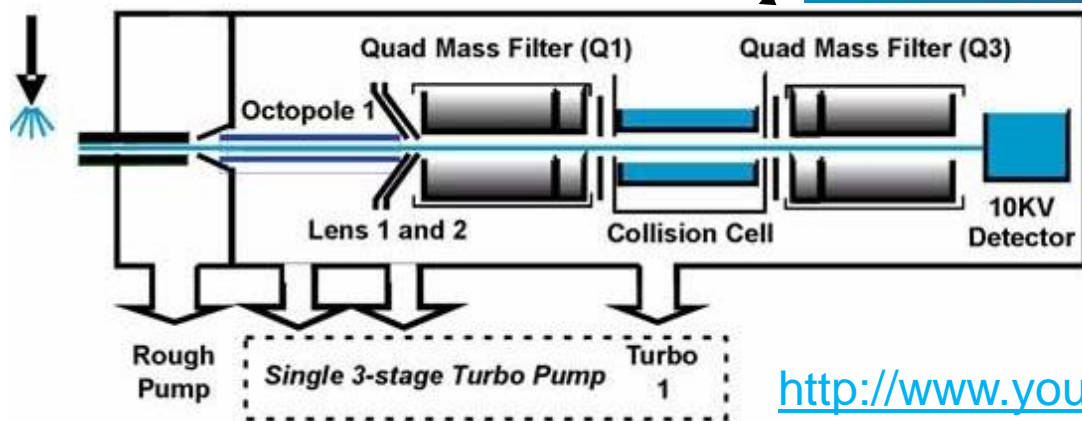
The Complete Metabolomics Solution



Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Triple Quadrupole



<http://www.youtube.com/watch?v=-iLtW6XQMmw>

Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Triple Quadrupole

Mods of MS:

SCAN-full scan

SIM-selected ion monitoring

PI-product ion

MRM-multiple reaction monitoring

etc.

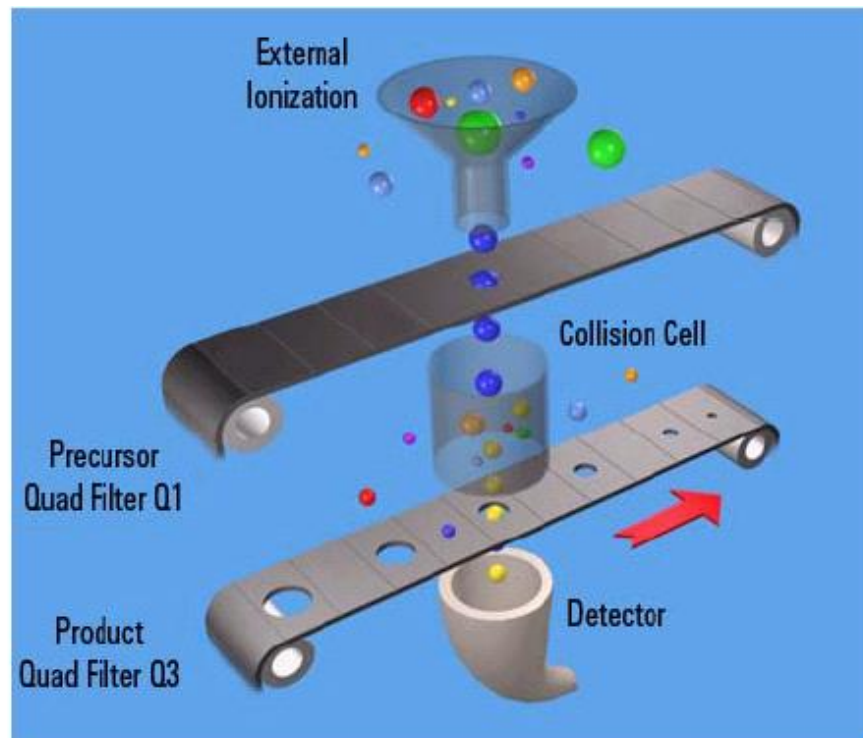


Figure 8 Conceptual model of a triple quadrupole mass spectrometer: With SIM, MS1 (Q1) and MS2 (Q3) are set at a single m/z , while with Full Scan MS/MS, MS1 (Q1) is set at a single m/z and MS2 (Q3) is scanned.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

The pros and cons of Triple Quadrupole

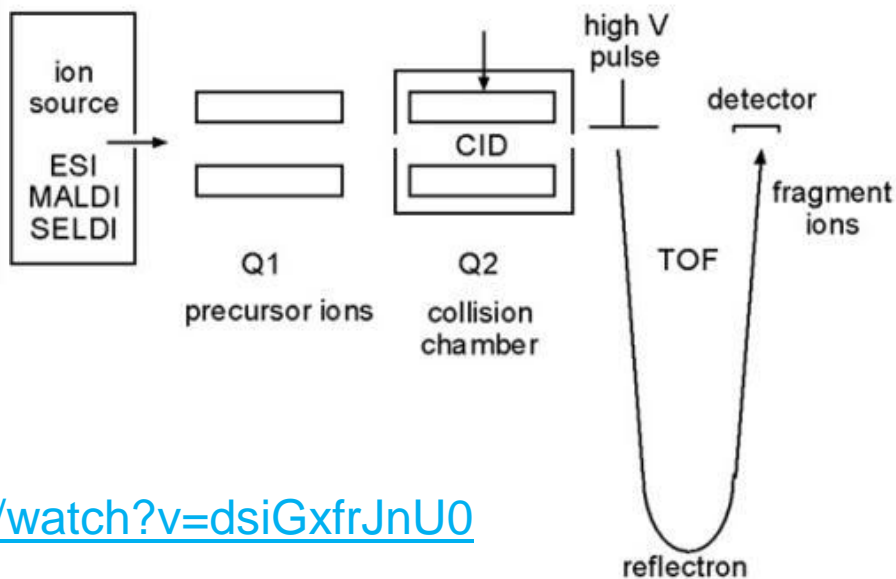
- | | | | |
|---|-----------------------------|---|------------------------------------|
| + | sensitivity | - | low resolution |
| + | good for validation | | (selectivity) |
| + | low backgrounds in MRM mode | - | not useful for non-target analysis |
| + | good for target analysis | | |

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

QTOF



Quadrupole – TOF Mass Spectrometer (MS/MS)



<http://www.youtube.com/watch?v=dsiGxfrJnU0>



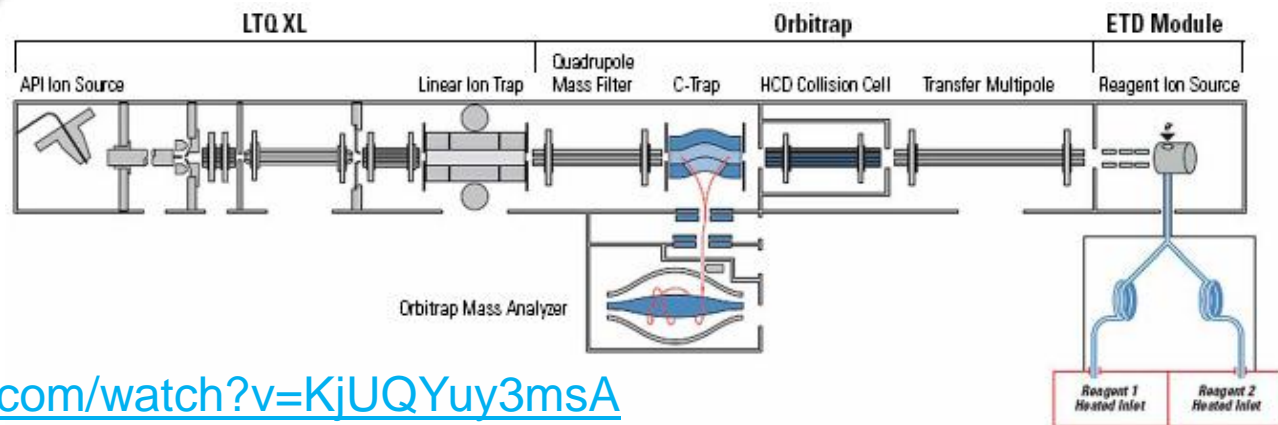
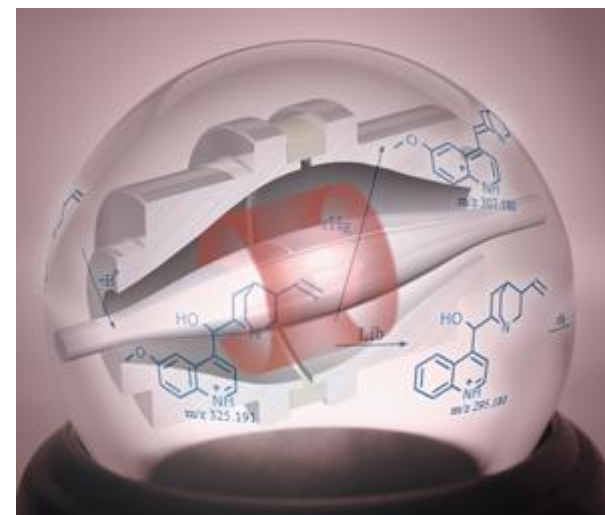
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

The pros and cons of QTOF

- + higher resolution than triple quad (higher selectivity)
- + useful for fast chromatography (UHPLC)
- + faster SCAN time than orbitrap
- + useful for non-target analysis
- + more mass libraries compare to mass libraries for orbitrap
- sensitivity is lower than triple quad
- low temperature stability (dilatation of time of flight tubes) lose resolution
- MS/MS/MS isn't possible
- lower resolution than orbitrap
- lower resolution for low m/z

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Orbitrap



<http://www.youtube.com/watch?v=KjUQYuy3msA>

Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

The pros and cons of orbitrap

- + higher resolution than triple quad and QTOF (higher selectivity) for lower m/z
- + robustness and stability
- + useful for non-target
- + MS/MS/MS
- sensitivity is lower than triple quad
- slower SCAN with high resolution (combination with fast chromatography UHPLC is not suitable)
- lower resolution than QTOF for higher m/z



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

LABORATORY of METABOLOMICS of CZECHGLOBE

- **Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)**
 - for broad-spectrum screening of volatile (terpenes and essential oils) or easily derivatisable metabolites (e.g. free fatty acids, phenolics, steroids, alkaloids, most amino acids, mono-, di- and trisacharides, sugar and alcohols)
- **HPLC coupled to mass spectrometry (HPLC-MS, UHPLC with DAD and HRMS)**
 - non-volatile metabolites (amino acids, sugars, organic acids, alkaloides, phytosteroids, organic amines, nucleosides etc.)
- **Elemental analyzer for determination of C/N/S content**
- **Weight isotope detector for the assessment of stable isotope ratio (irMS)**
- **Thermogravimetric analyzer (connected to GC)**
 - studies of dynamics and structure of soil-organic-matters (SOM),
- **Raman spectrometer + FT-IR**
 - spatial distribution of organic substances in leaves, wood parts of plants (e.g. pigments, alkaloids, sugars, protein fractions, etc.),



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

The Center for Ecological Research and Forestry Applications (CREAF)

Permanent sites



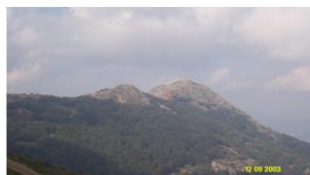
a. Garraf, Mediterranean shrubland



b. Prades, Mediterranean forest



c. Montseny, Wet temperate beech forest



d. Meranges, Alpine forest



Data bases

Labs



HPLC, GC, PTR, NMR...



NMR laboratory



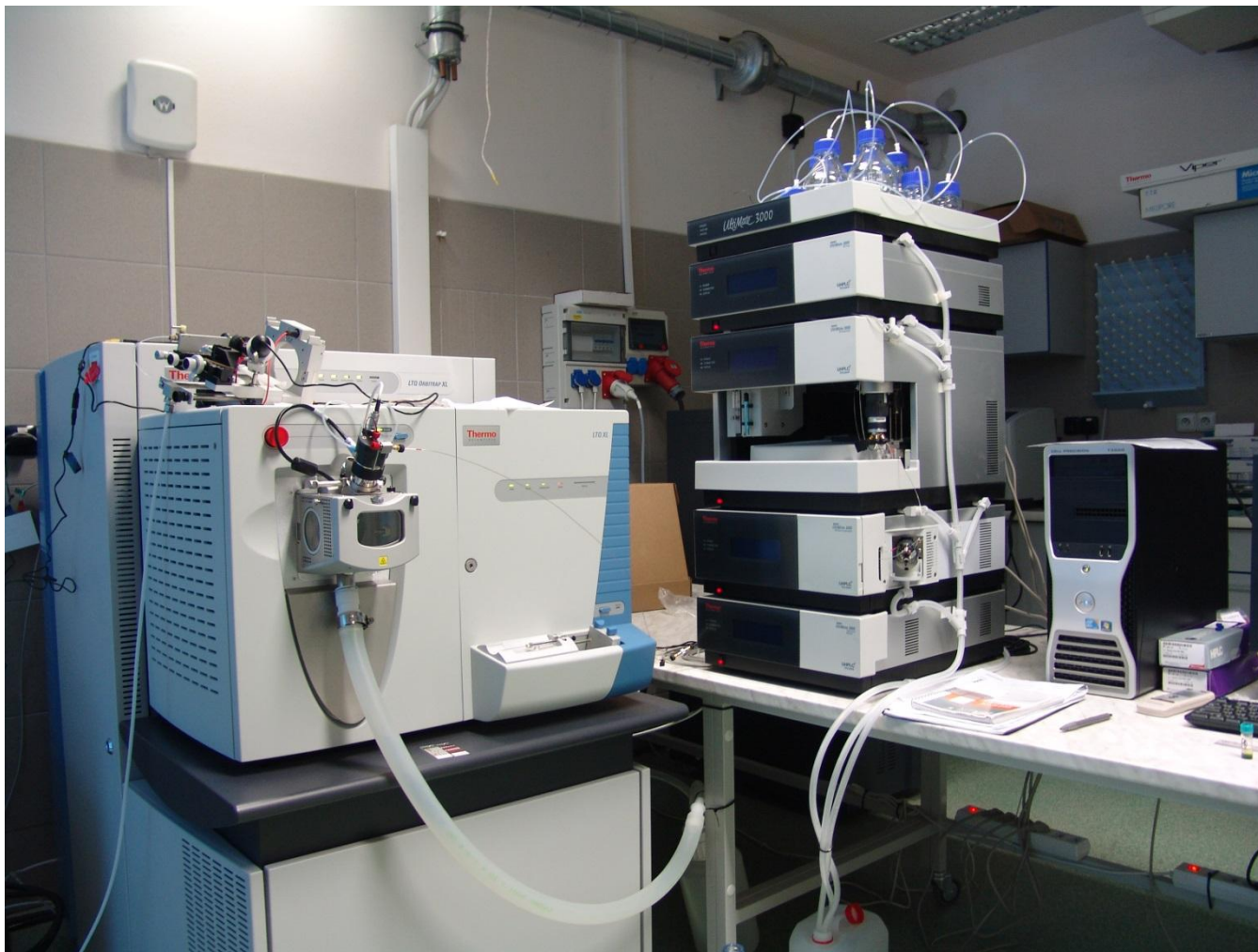
Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

LC-MS Accela Fleet



Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

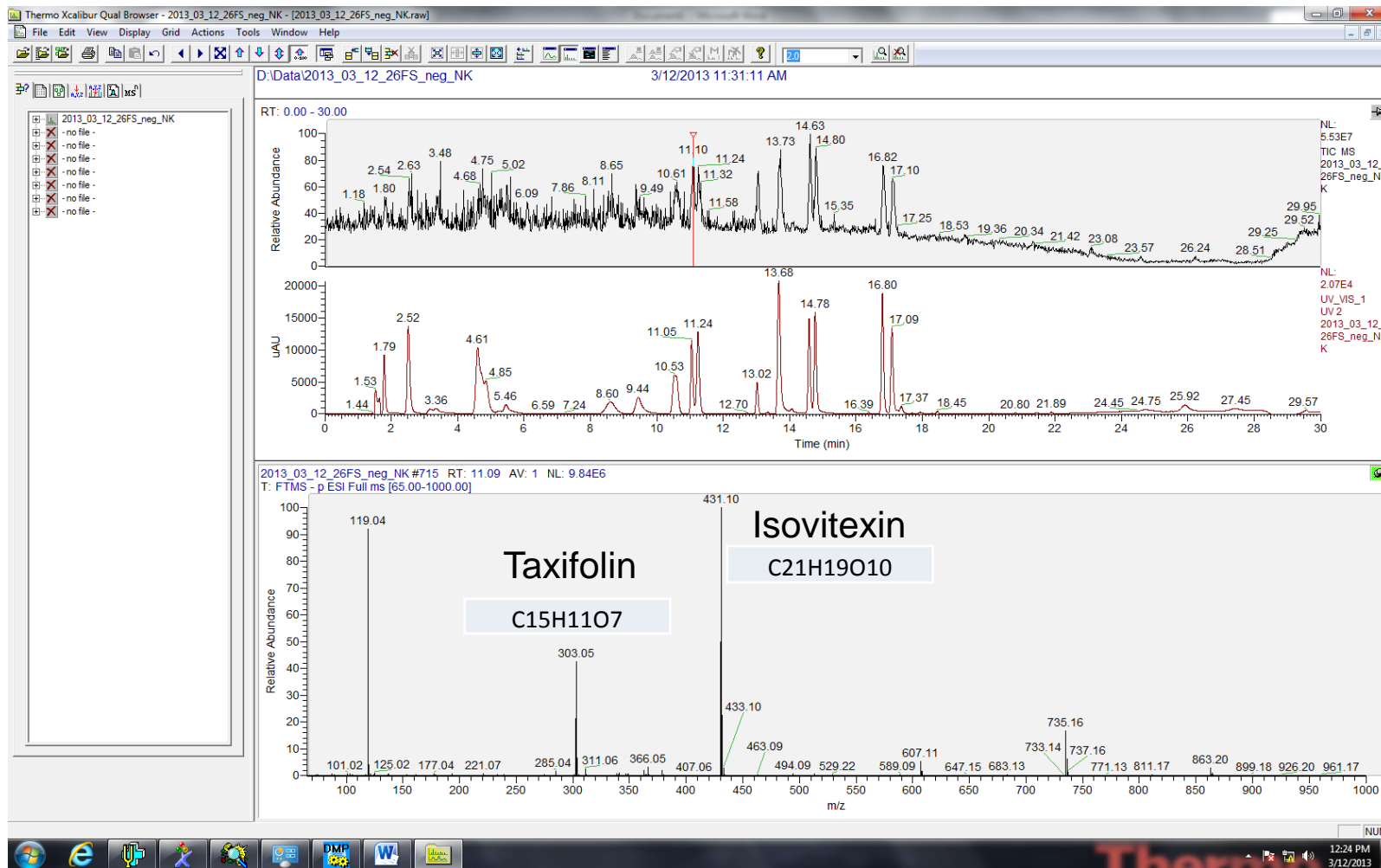


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Methods

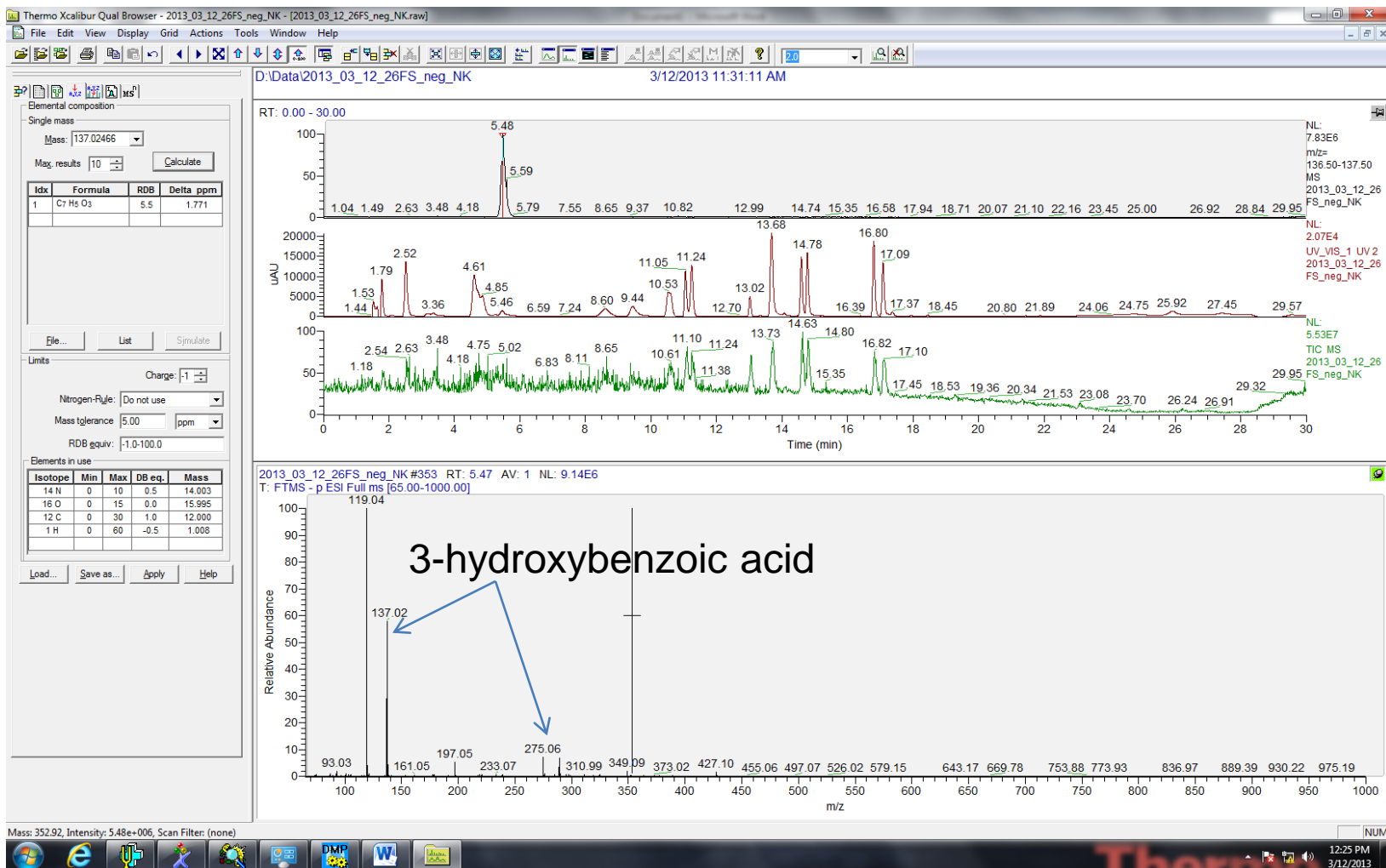
- Saccharides (spectrophotometry)
- Chlorophylls (spectrophotometry)
- Ergosterols (GC/MS)
- FA: fatty acids (GC/MS)
- Terpens (GC/MS)
- Metabolomic profiling (GC/MS)
- Drugs, Cytostatic on nanoparticles (HPLC/HRMS)
- PANHs, Pigments (HPLC/HRMS)
- Metabolomic profiling (amino acid, sugars, phenolic compounds, etc.) (HPLC/HRMS)
- Mass Library (300 standards)

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



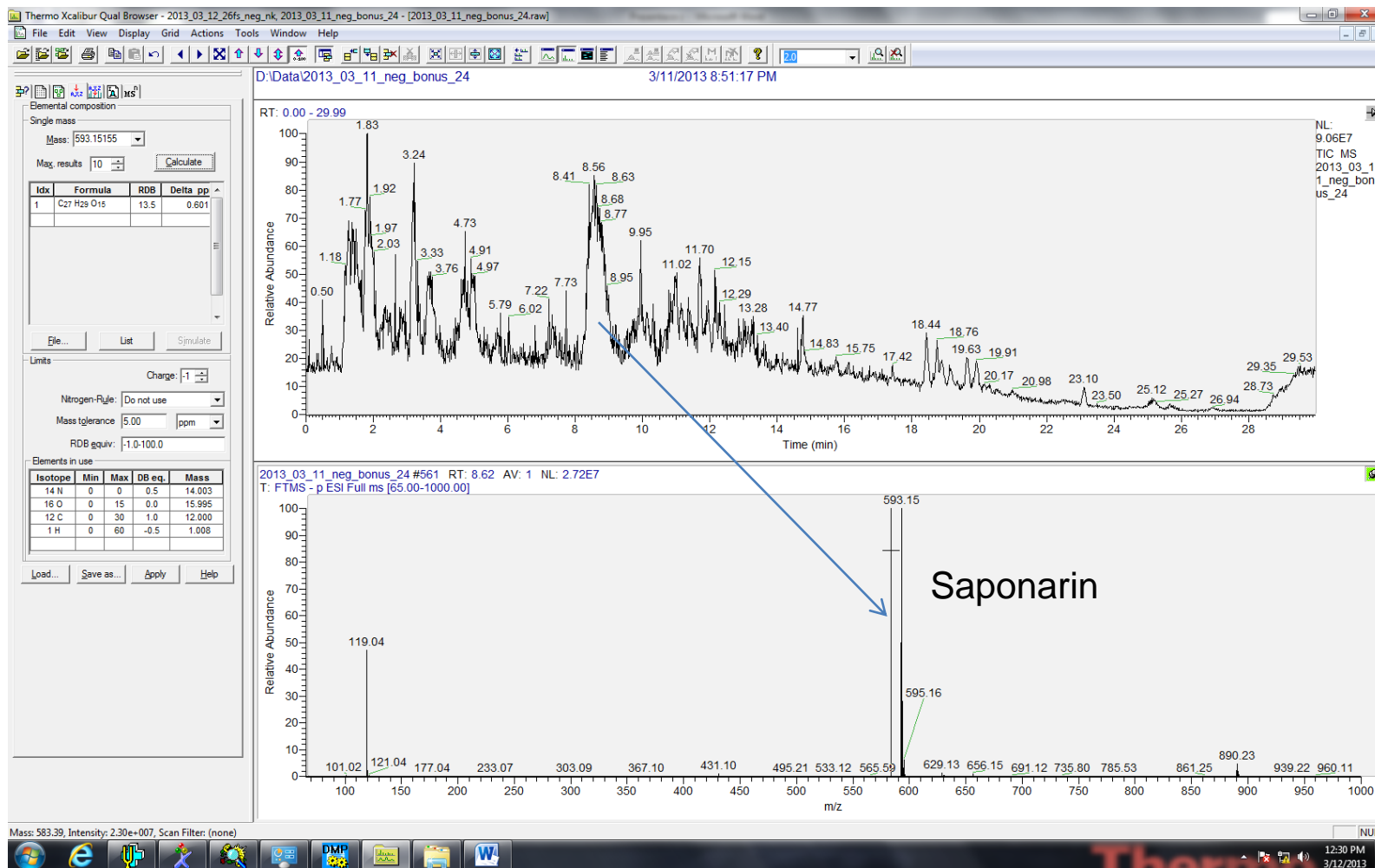
Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



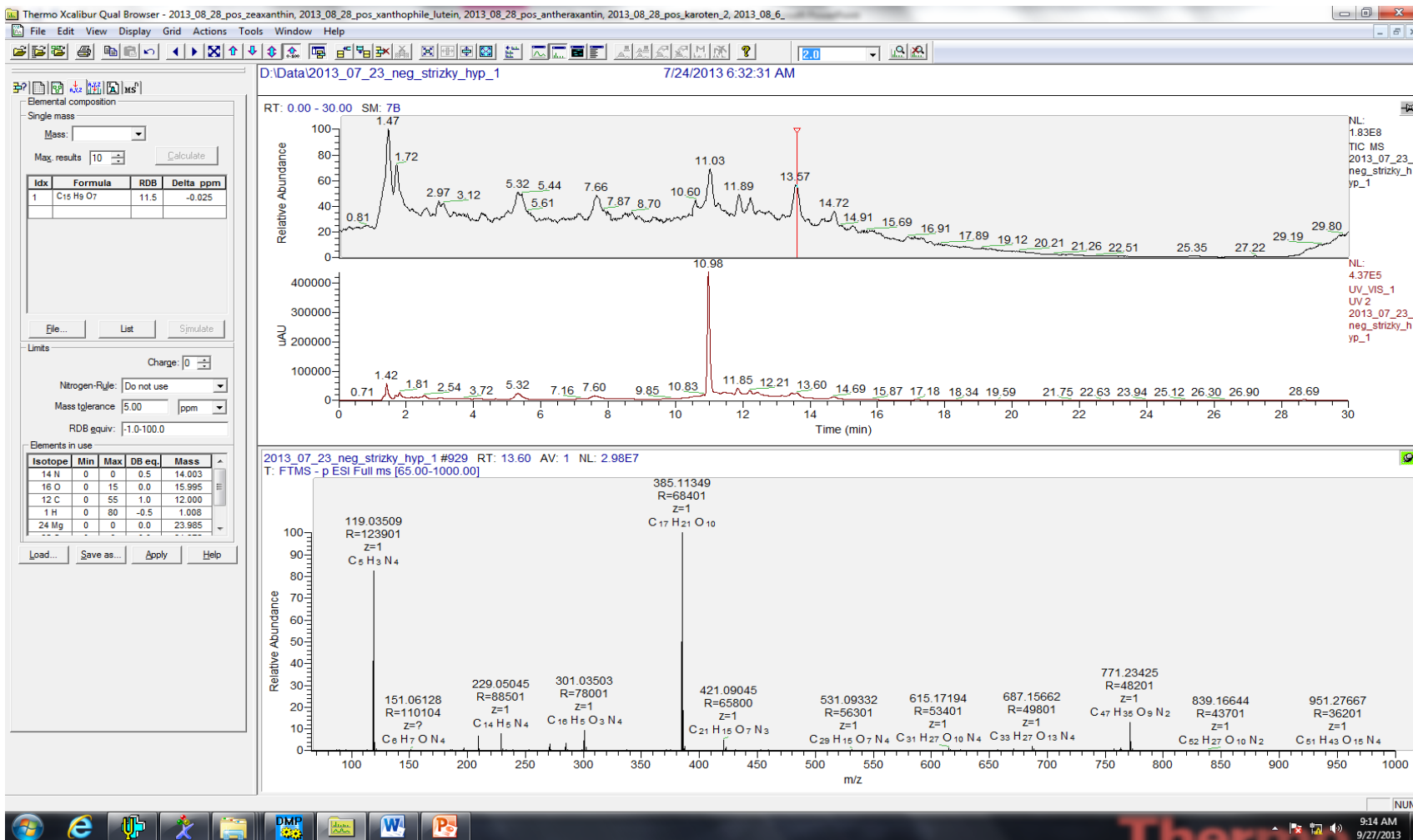
Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



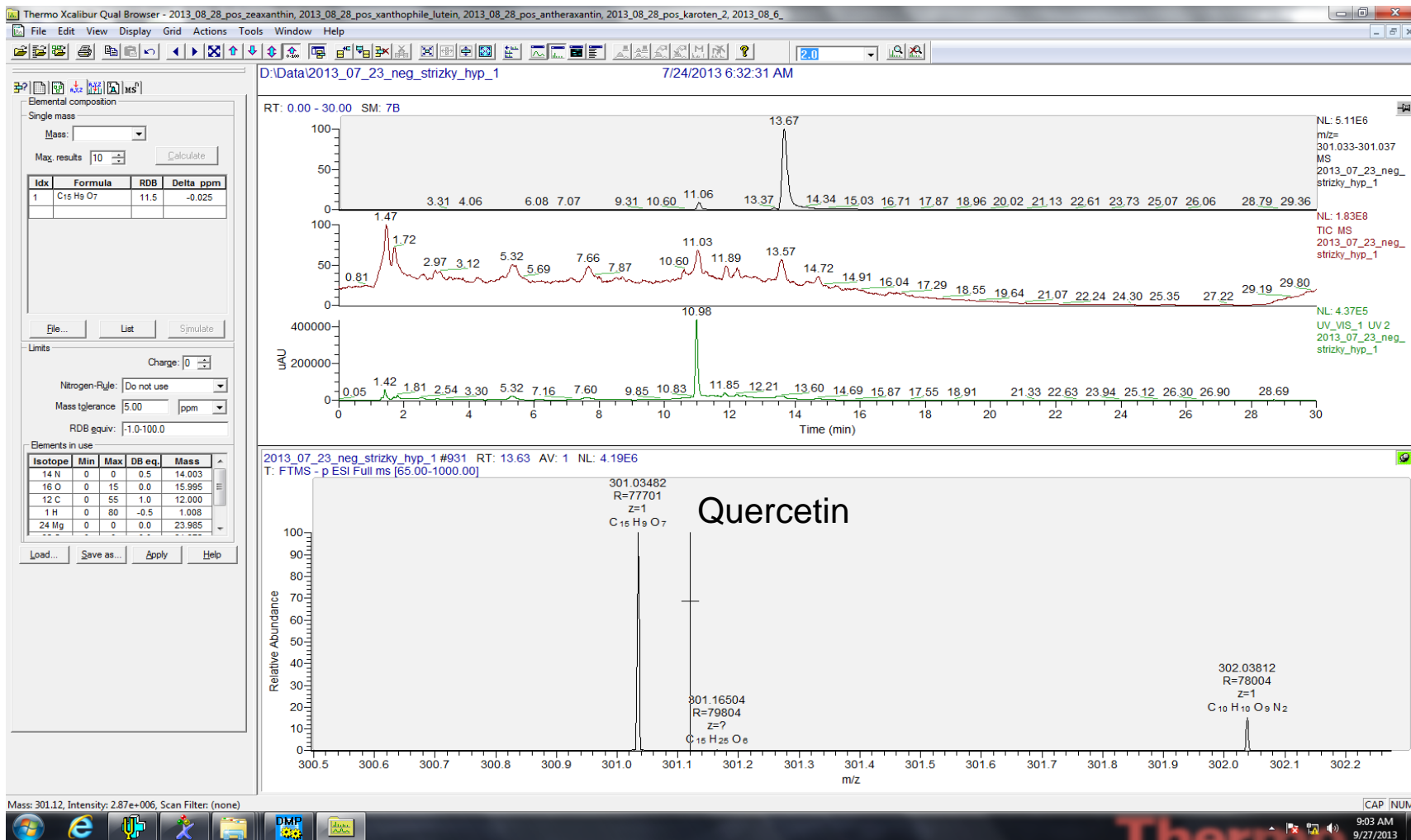
Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Processing of results



**Start with the most complete
dataset**

Isolate what's of interest

Identify *all* metabolites

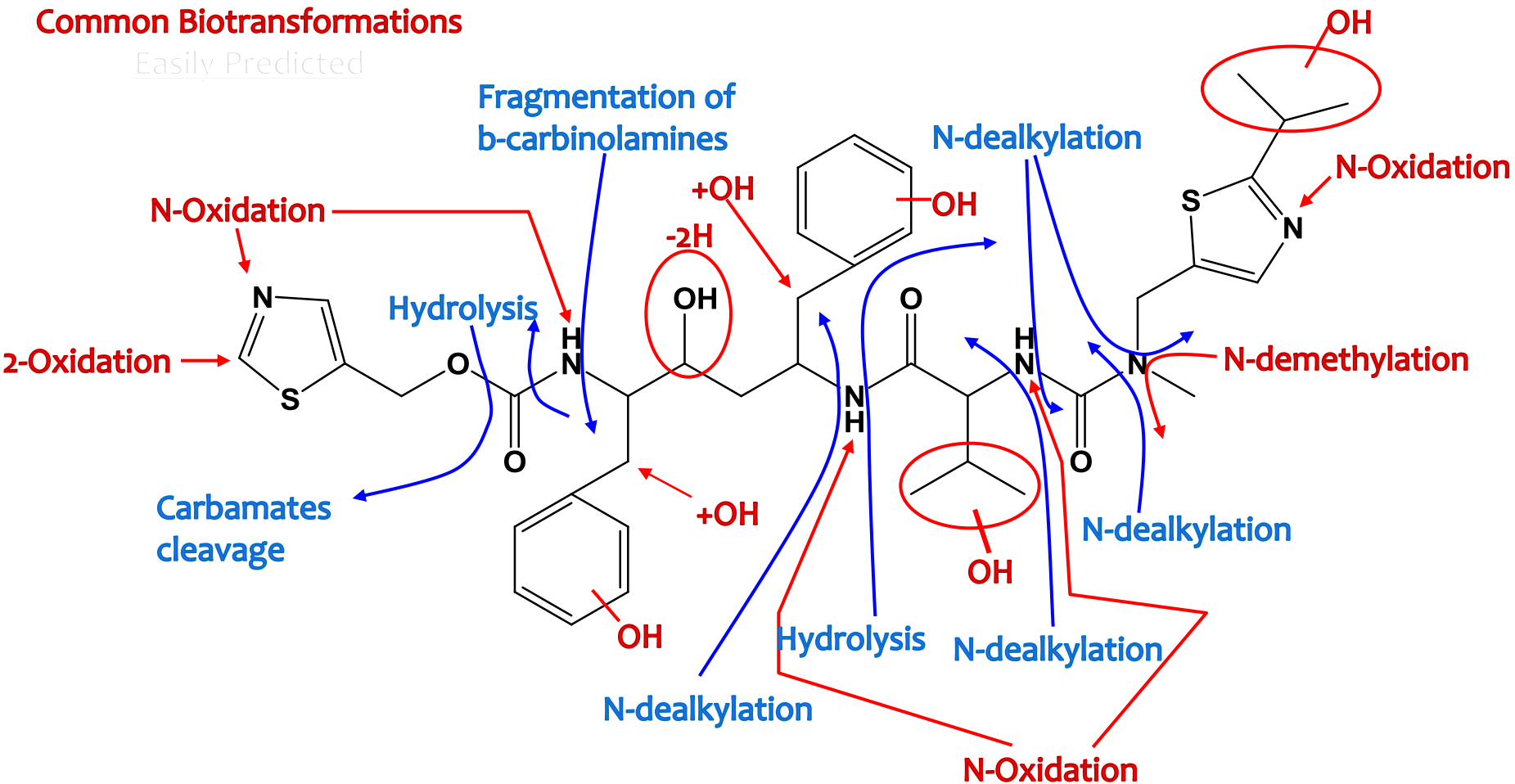
**Automatically localize the site of
metabolism**

Generate reports

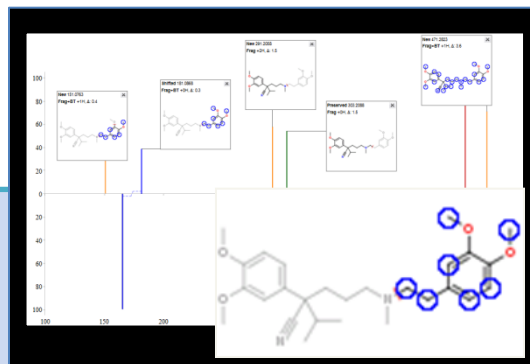
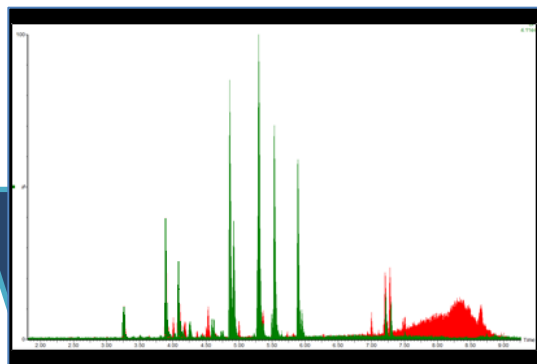
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Common Biotransformations

Easily Predicted



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

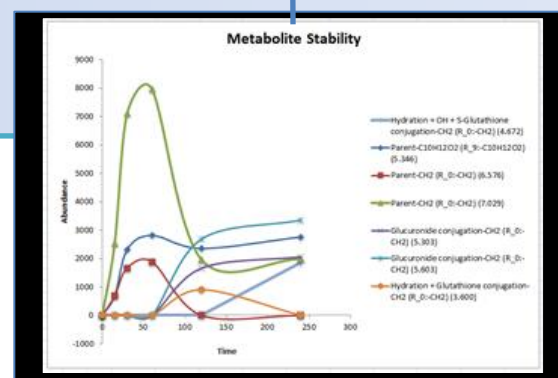
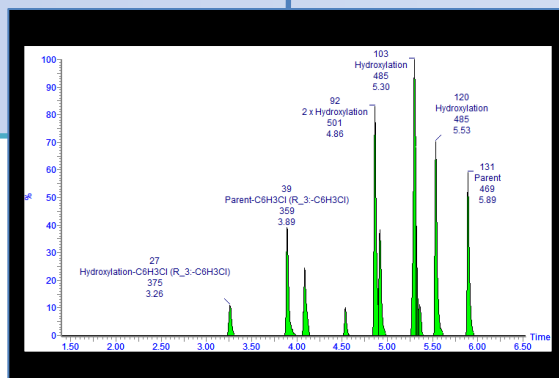


Isolate

Identify

Localize

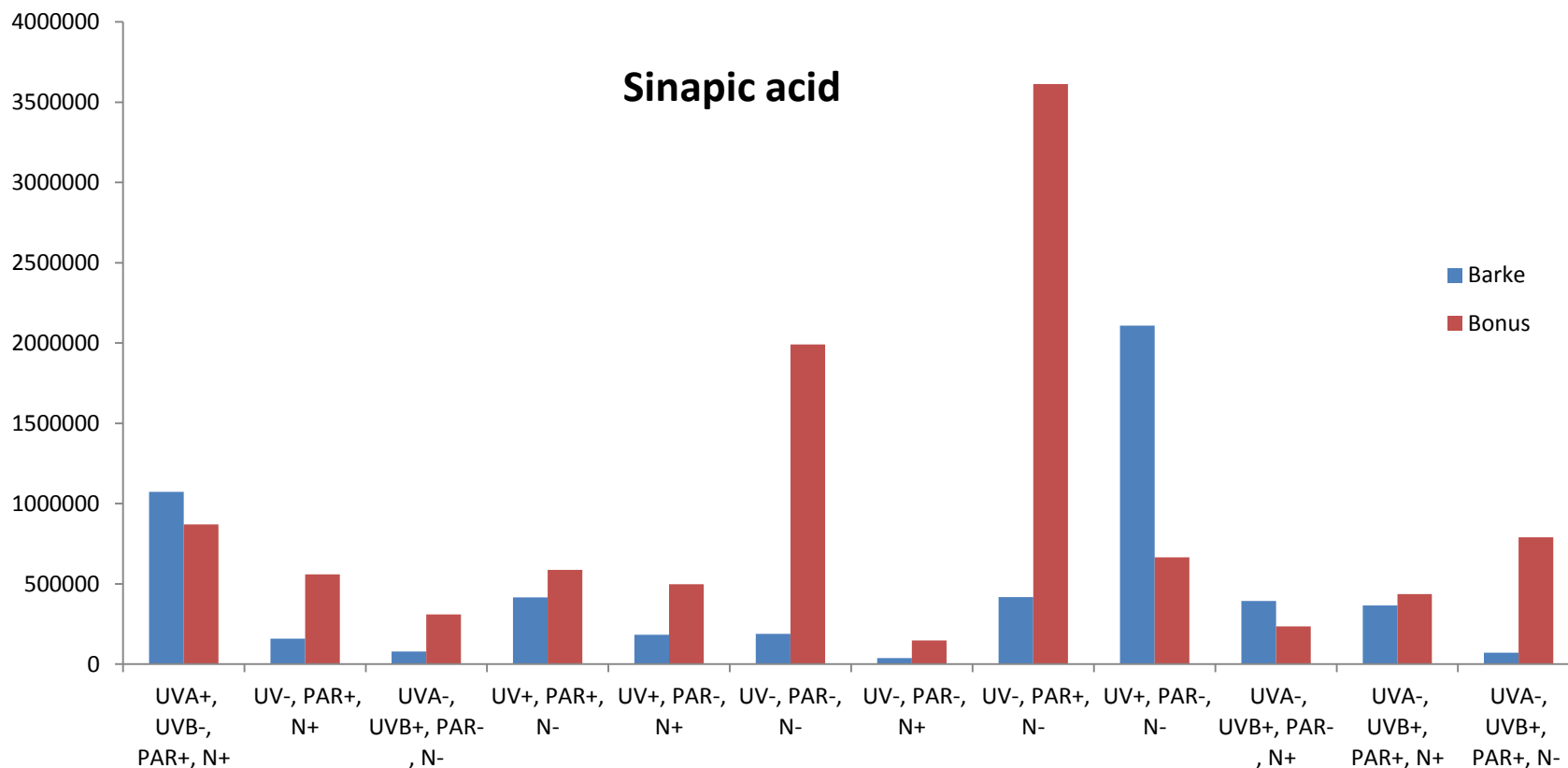
Report



Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

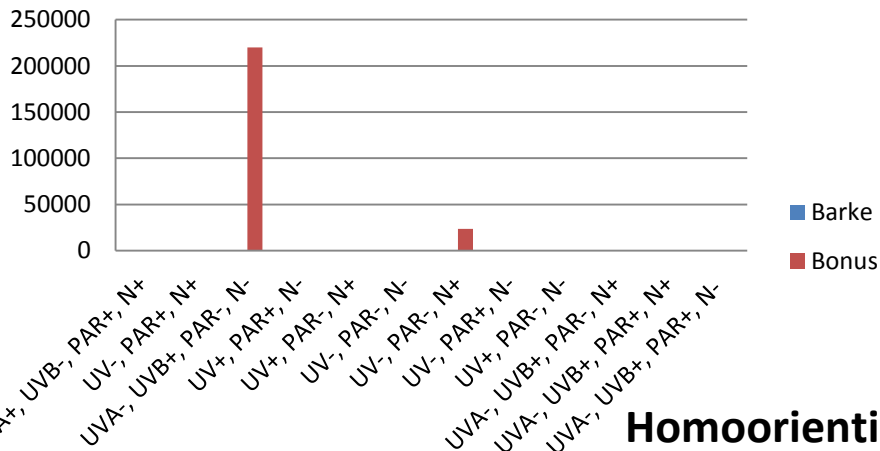
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Effect of UV radiation and nitrogen content to metabolic profile of barley

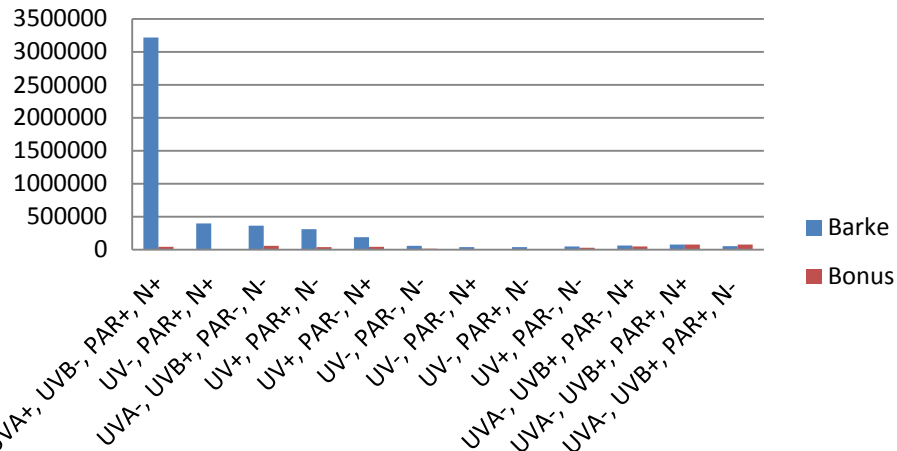


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

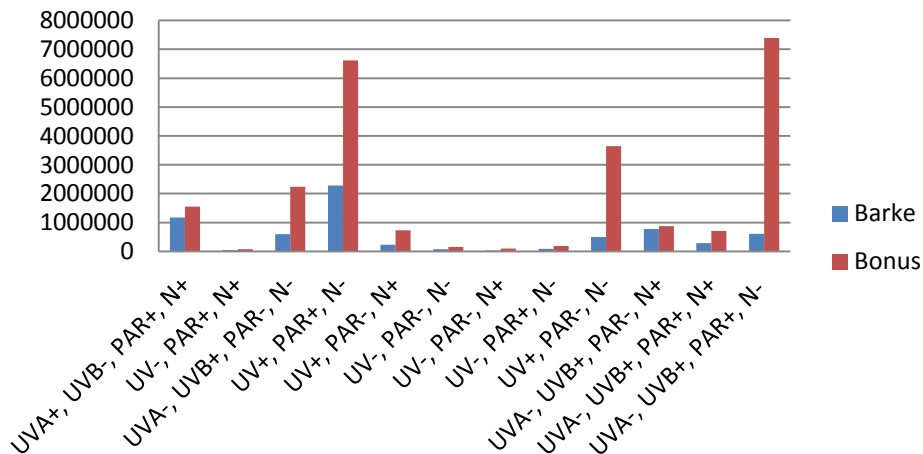
3-hydroxybenzoic acid



Galangin

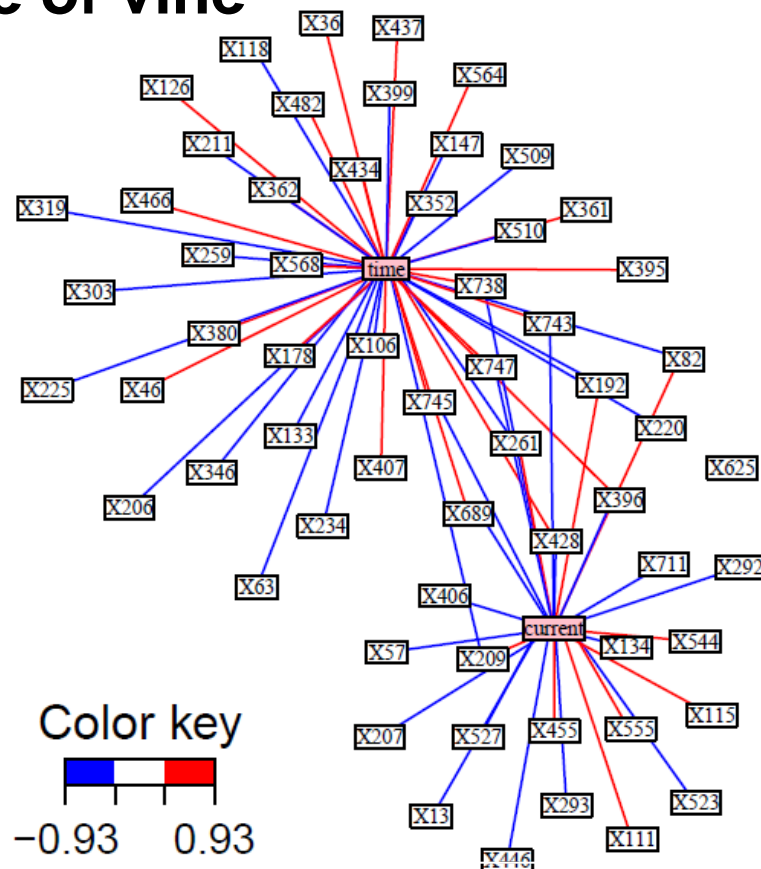
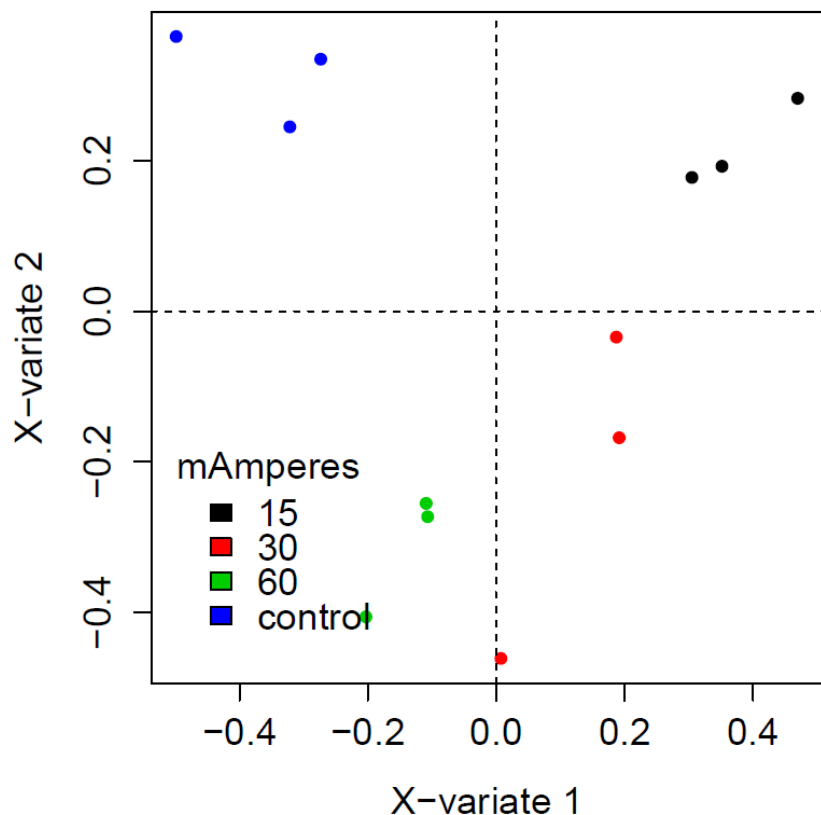


Homoorientin



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Effect of intensity of electric current and operate time to metabolic profile of vine

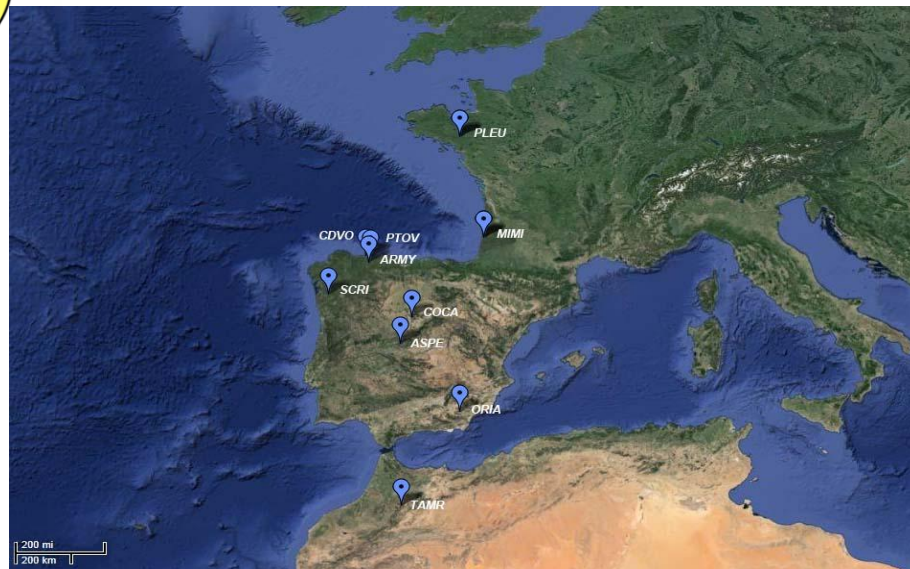
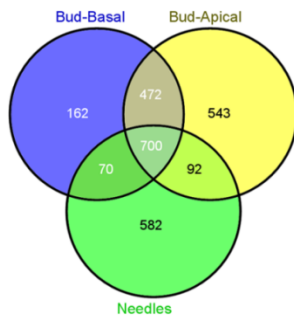
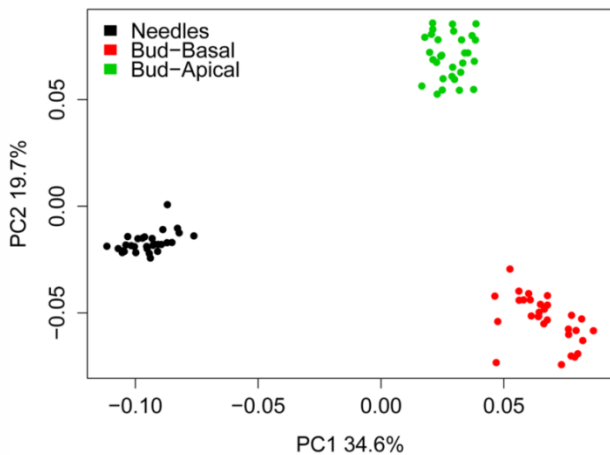


Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

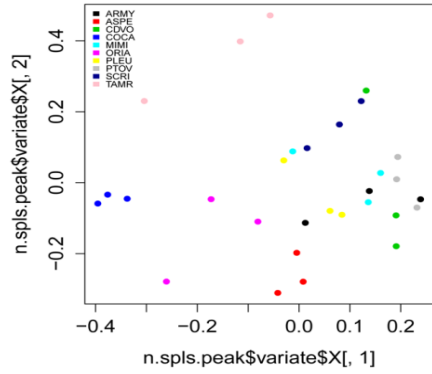
Effect of draught to metabolic profile of pinus pinaster

PCA Positive and Negative

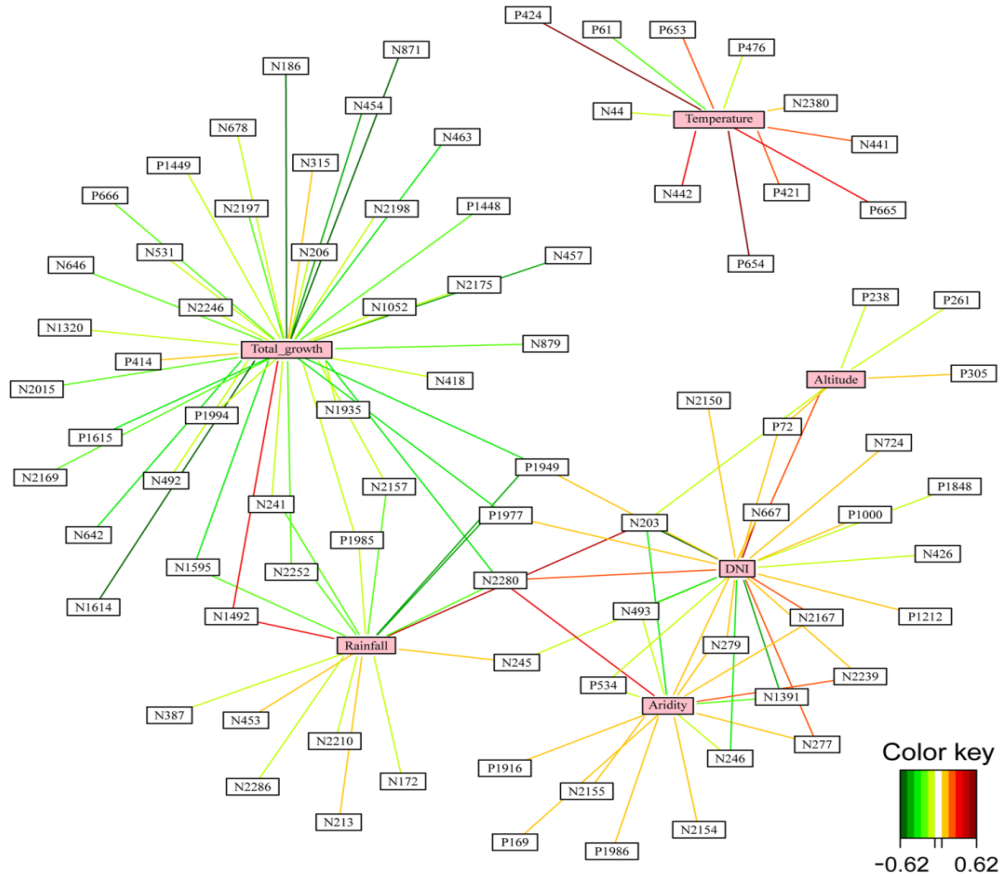
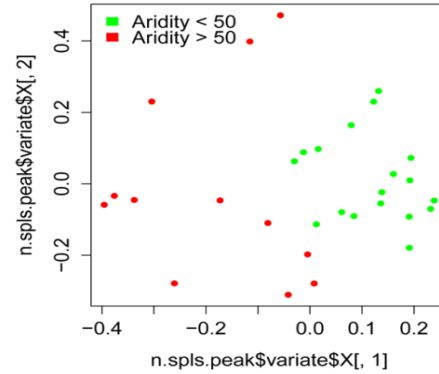


Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.

sPLS Positive and Negative. Needles



sPLS Positive and Negative. Needles





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

The screenshot shows the Sciforum website interface. At the top, there is a navigation bar with 'Home', 'Login', and 'Register' links. Below this is a sidebar with 'Topical Sections' including: A. General Organic Synthesis, B. Bioorganic, Medicinal and Natural Products, C. Microwave Assisted Synthesis, D. Polymer and Supramolecular Chemistry (highlighted), and E. Computational Chemistry. A 'back to e-Conferences' link is also present. The main content area features a banner for 'The 16th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry' held on 1-30 November 2012. It lists 'Time Schedule & Deadlines': Abstract Submission (5 October 2012), Notification of Acceptance (10 October 2012), and Submission of Full Paper (20 October 2012). A 'Presentation' section is visible with options for 'Abstract & Citation', 'Usage Statistics', and 'Rate of this Paper - 0 (0 votes)'. The article title is 'Preparation and Biological Properties of Ring-Substituted 3-Hydroxynaphthalene-2-carboxaniides'. The authors listed are: Jiri Kos¹, Iveta Zadrzilova^{1,2}, Matus Pesko³, Jiri Pavlica¹, Tomas Gonec¹, Pavel Bobal¹, Michal Oravec⁴, Alois Cizek², Katarina Kralova⁵, and Josef Jampilek^{1,6}. Contact information for Josef Jampilek is provided. Footnotes at the bottom identify the departments: 1 Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1/3, 61242 Brno, Czech Republic; 2 Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic; 3 Department of Ecosozology and Physiotactics, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynska dolina Ch-2, 84215.

- 1 Quercus ilex (Drought-Herbivorism)
- 2 Rivas-Ubach, A., Gargallo-Garriga, A., Sardans, J., Oravec, M., Pérez-Trujillo, M.,
- 3 Ogaya, R., Urban, O., Peñuelas, J. (ORDRE DELS AUTORS (I POTSER NOMS)
- 4 ENCARA PER DETERMINAR)
- 5
- 6 Abstract.
- 7
- 8 Introduction
- 9 Drought, one of the most important factors promoting climate change, which is
- 10 predicted to increase in the following decades in several regions of the world such as the
- 11 Mediterranean basin (IPCC, 2007), is a potential driver of shifts the elemental C:N:P:K
- 12 stoichiometries of different plant organs and ecosystems (Sardans et al., 2012 PEES,
- 13 Rivas-Ubach et al., 2012 PNAS, Sardans et al., 2012 Functional Ecology) and this way
- 14 end up affecting ecological processes and finally the ecosystem structure and function
- 15 (Elser et al., 1996 BioScience; Sterner and Elser 2002; Sardans et al., 2011
- 16 Biogeochemistry). Even though N and P have been the most studied elements in the
- 17 ecological stoichiometry context (Sterner and Elser 2002), several studies have

Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

KOS, Jiří and ZADRAŽILOVÁ, Iveta and PEŠKO, Matúš and KELTOŠOVÁ, Stanislava and TENGLER, Jan and GONĚC, Tomáš and BOBÁL, Pavel and KAUFEROVÁ, Tereza and ORAVEC, Michal and KOLLÁR, Peter and ČÍŽEK, Alois and KRÁĽOVÁ, Katarína and JAMPÍLEK, Josef. Antibacterial and Herbicidal Activity of Ring-Substituted 3-Hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Molecules* 2013, vol. 18, no. 7, 7977-7997, <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/7/7977/pdf>. [ISSN 1420-3049, IF₂₀₁₂ = 2.428]

TENGLER, Jan and KAPUSTÍKOVÁ, Iva and STROPNICKÝ, Ondřej and MOKRÝ, Petr and ORAVEC, Michal and CSÖLLEI, Jozef and JAMPÍLEK, Josef. Synthesis of New (Arylcabonyloxy)aminopropanol Derivatives and the Determination of Their Physico-Chemical Properties. *Cent. Eur. J. Chem.* 2013, vol. 11, no. 11, 1757-1767. [ISSN 1895-1066, IF₂₀₁₂ = 1.167]

KOS, Jiří and ZADRAŽILOVÁ, Iveta and PEŠKO, Matúš and PAVLICA, Jiří and GONĚC, Tomáš and BOBÁL, Pavel and ORAVEC, Michal and ČÍŽEK, Alois and KRÁĽOVÁ, Katarína and JAMPÍLEK, Josef. Preparation and Biological Properties of Ring-Substituted 3-Hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. Proceedings: *The 16th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-16)*, November 1-30, 2012, B1009, <http://www.sciforum.net/presentation/1009>. Editors: Julio A. Seijas, M. Pilar Vázquez Tato, Shu-Kun Lin, CD-ROM edition. Published in 2013 by MDPI, Basel, Switzerland. [ISBN 3-906980-26-X]

KOS, Jiří and GONĚC, Tomáš and TENGLER, Jan and ZADRAŽILOVÁ, Iveta and PEŠKO, Matúš and ORAVEC, Michal and KRÁĽOVÁ, Katarína and ČÍŽEK, Alois and JAMPÍLEK, Josef: Synthesis of amides of hydroxynaphthoic acids as biologically active compounds. Book of Abstracts: *The International Student Scientific Conference of Faculty of Natural Sciences of Comenius University 2013*, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovakia, April 24, 2013, p. 1044-1047, <http://2013.svkprifuk.info/prispevok/?id=266>. [ISBN 978-80-223-3392-4]

ORAVEC, Michal and JAMPÍLEK, Josef and ZÁRUBA, Kamil and OPATŘILOVÁ, Radka and SUCHÝ, Pavel. Determination of Drugs in Silica Gel-Based Nanocarriers in Tissues. Book of Abstracts: *The XVII euroANALYSIS*, Warsaw, Poland, August 25–29, 2013, p. 183. [ISBN 978-83-7798-089-7]

Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Thank you for your attention

Tato akce se koná v rámci realizace projektu COPPICE - Výmladkové lesy jako produkční a biologická alternativa budoucnosti – CZ.1.07/2.3.00/20.0267. Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR.