

LIPIDY: FUNKCE, IZOLACE, SEPARACE, DETEKCE

◆ FOSFOLIPIDY

chemické složení a funkce v buněčných membránách; metody stanovení fosfolipidů
fosfolipázy - produkty reakcí (ceramid, DAG = 2nd messengers) a stanovení enzymových aktivit lipáz

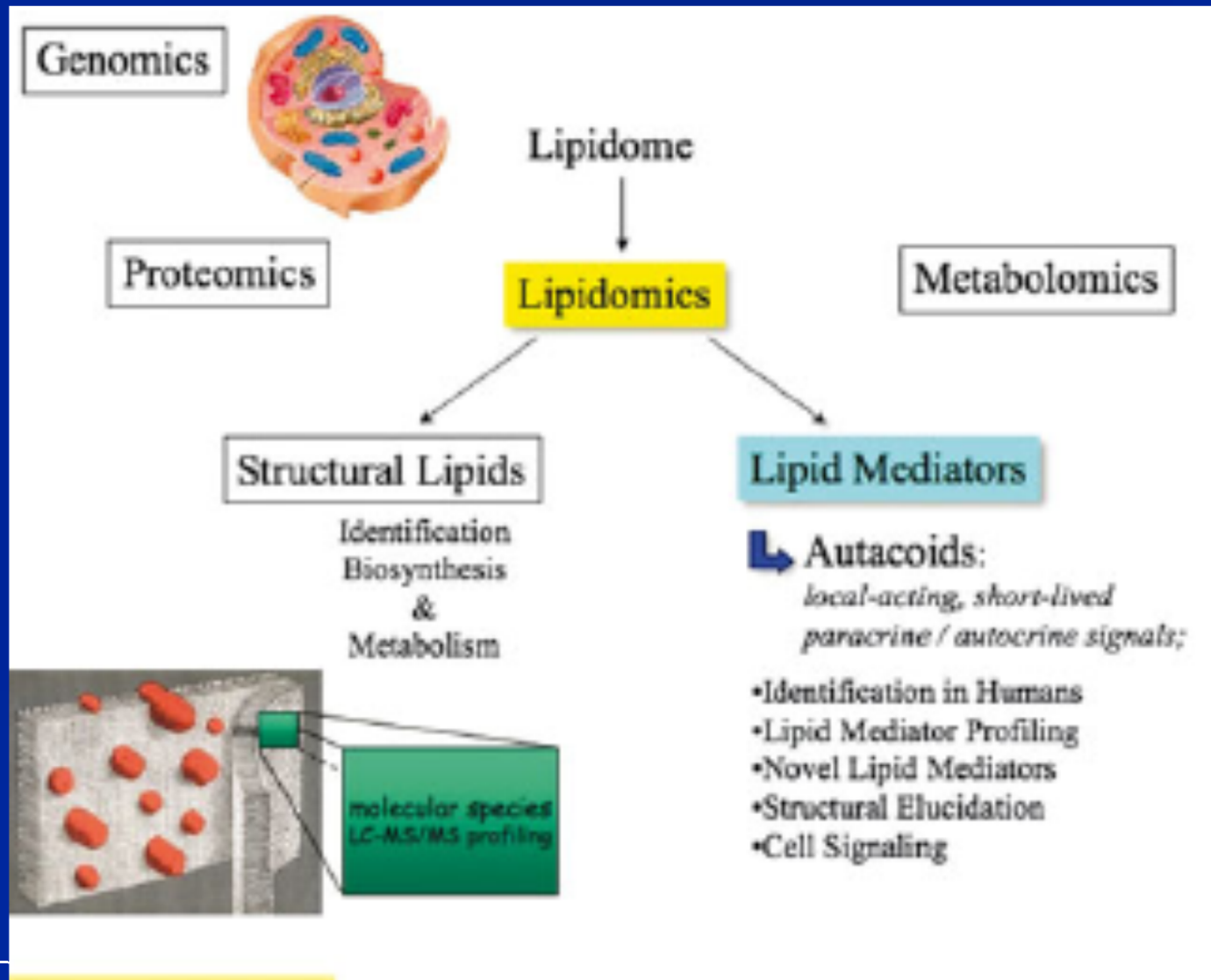
◆ MASTNÉ KYSELINY

chemické struktury mastných kyselin;
mastné kyseliny - 2nd messengers a prekursory dalších lipidních signálních molekul
stanovení aktivity LOX, COX, CYP

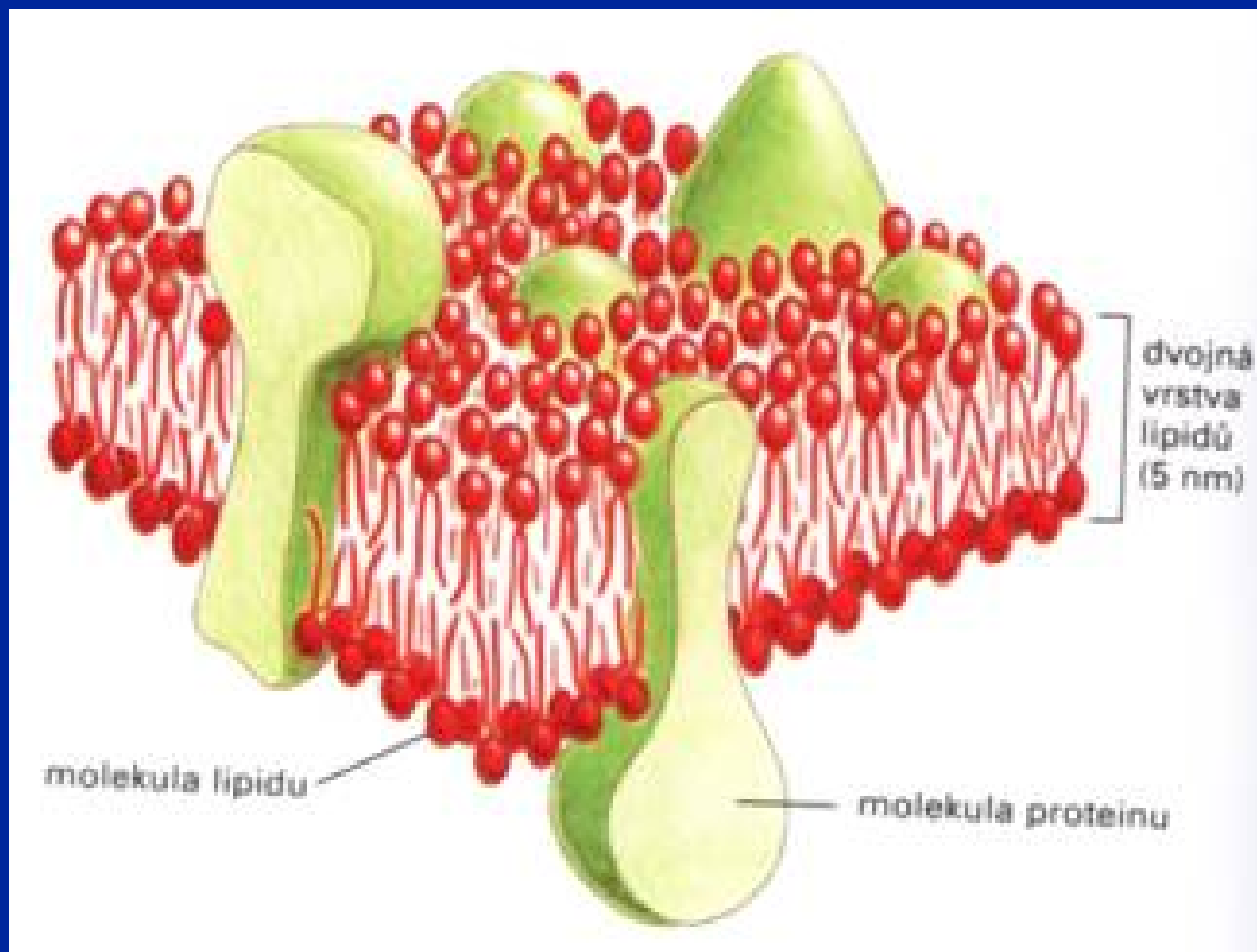
◆ POUŽITÍ INHIBITORŮ SIGNÁLNÍ TRANSDUKCE

PLA₂, PI-PLC, PC-PLC, DAG-lipáza;
inhibitory LOX, COX, CYP

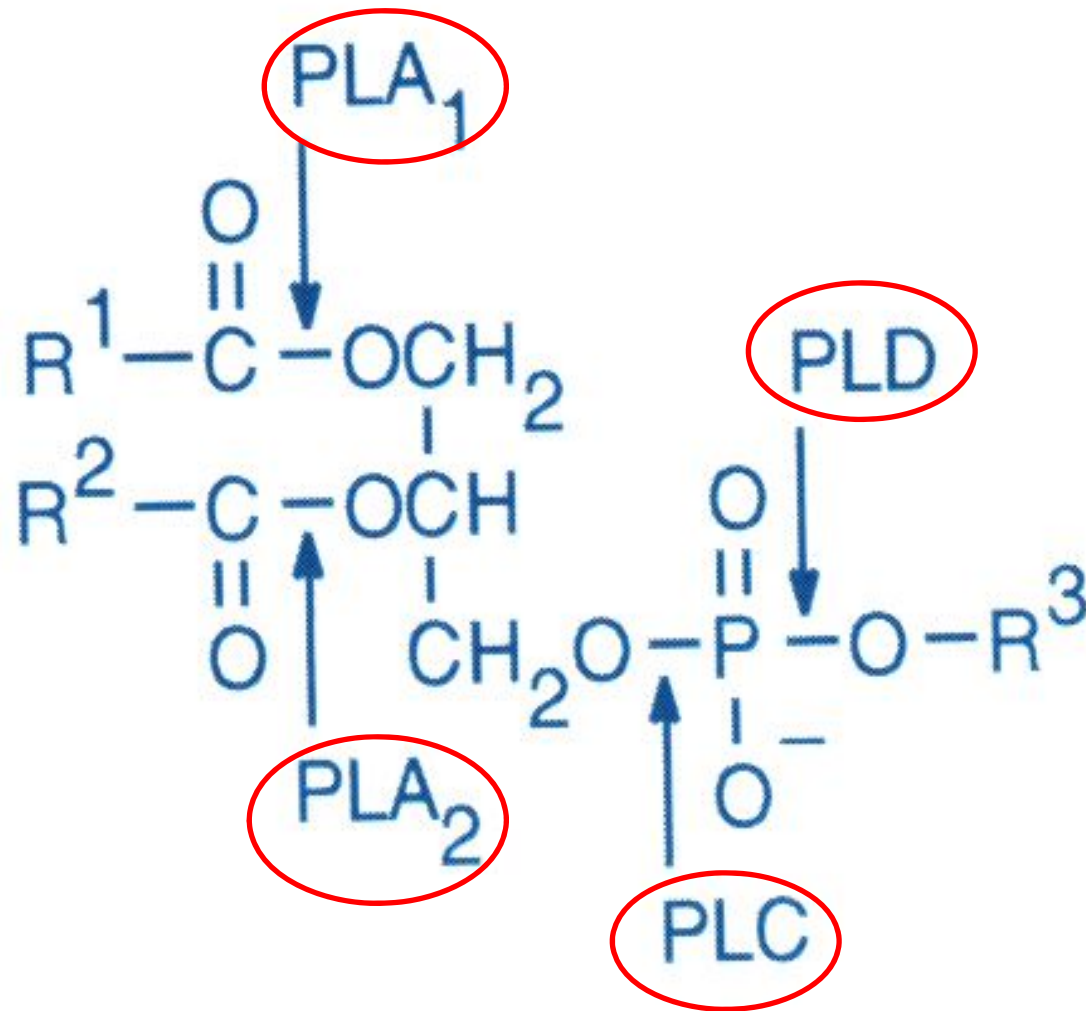
LIPIDOMICS



Fosfolipidové membrány



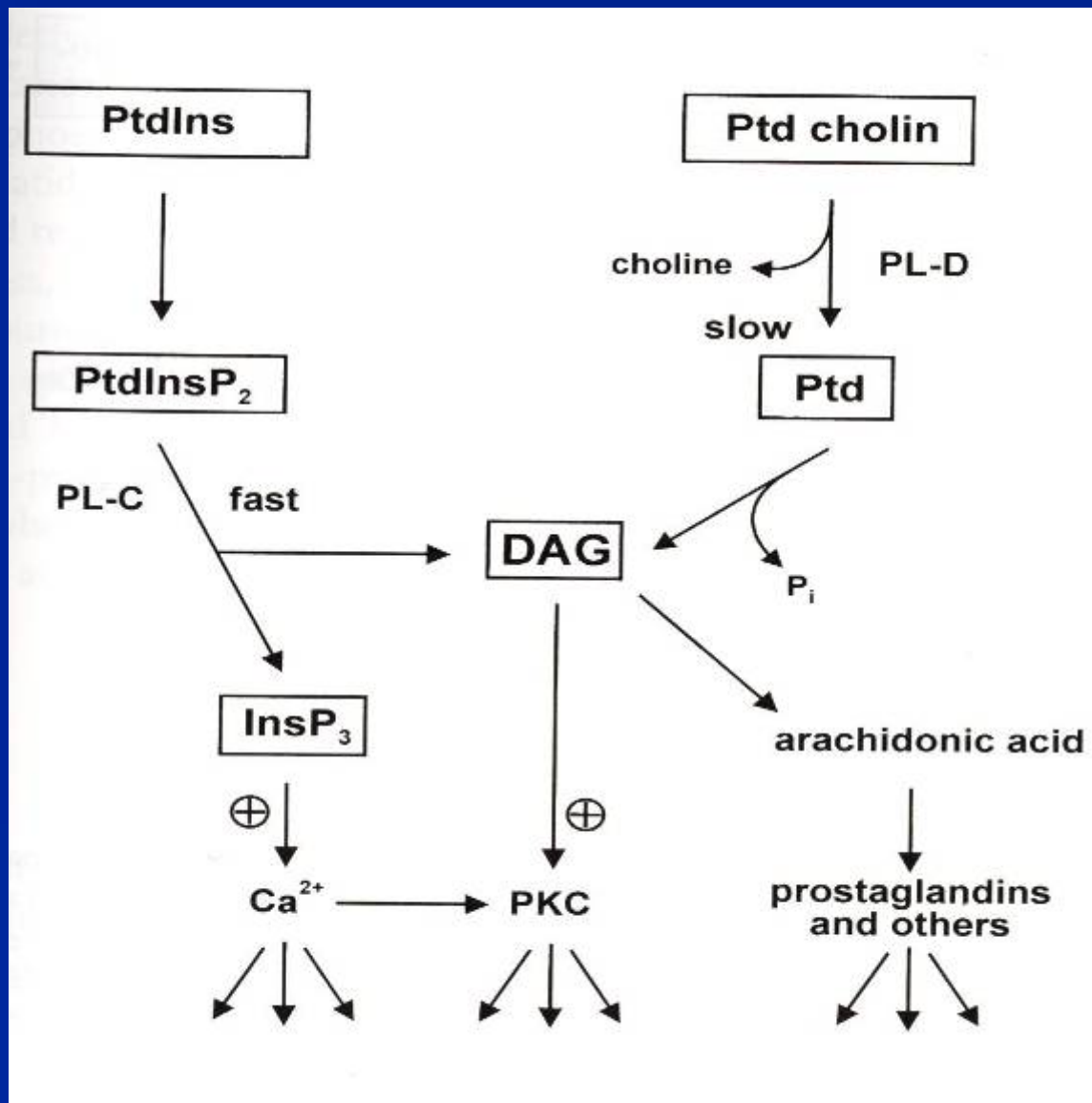
GLYCEROLFOSFOLIPIDY / FOSFOLIPÁZY



R₁, R₂:
mastné kyseliny

R₃:
cholin
etanolamin
serin
inositol
aj.

GLYCEROLFOSFOLIPIDY

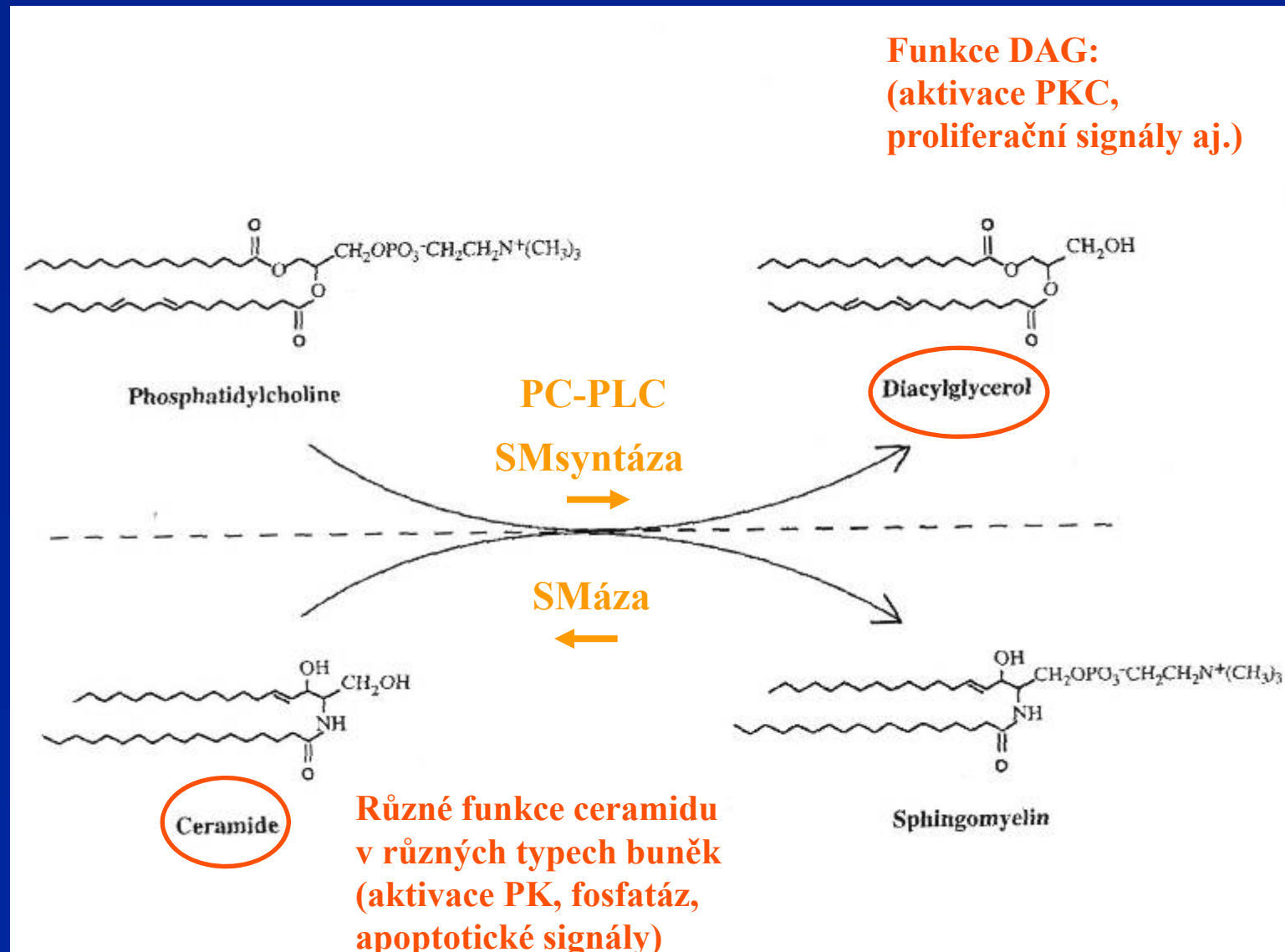


Fosfatidylinositol-
specifická fosfolipáza C
a fosfolipáza D
(reakce fosfatidylcholin-
specifické fosfolipázy C
není znázorněna)

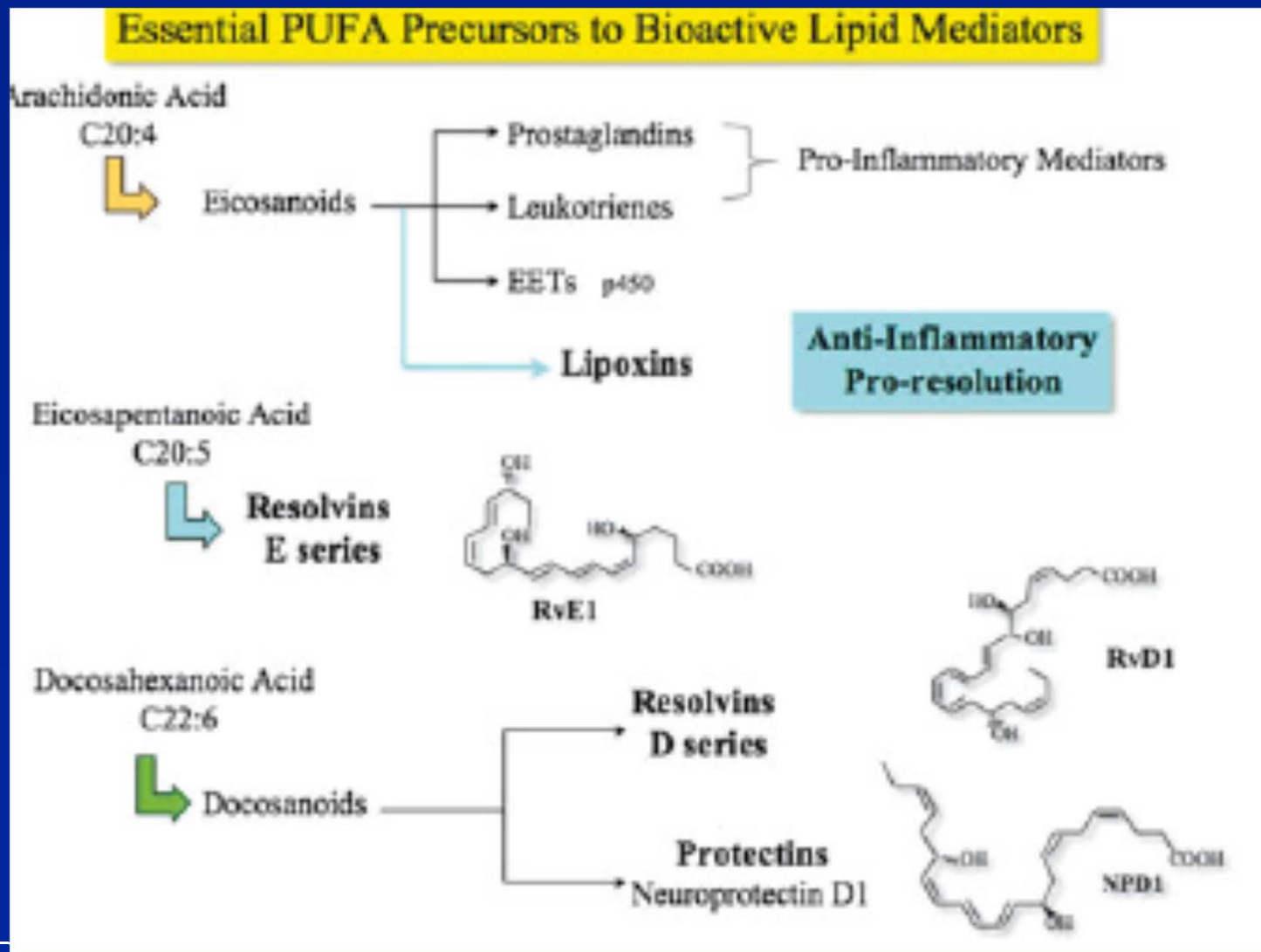
Co stanovujeme:

- složení fosfolipidů;
- hladiny DAG, ceramidu..;
- produkci mastných kys.
a metabolitů mastných
kys. (AA, prostaglandinů,
leukotrienů aj.)

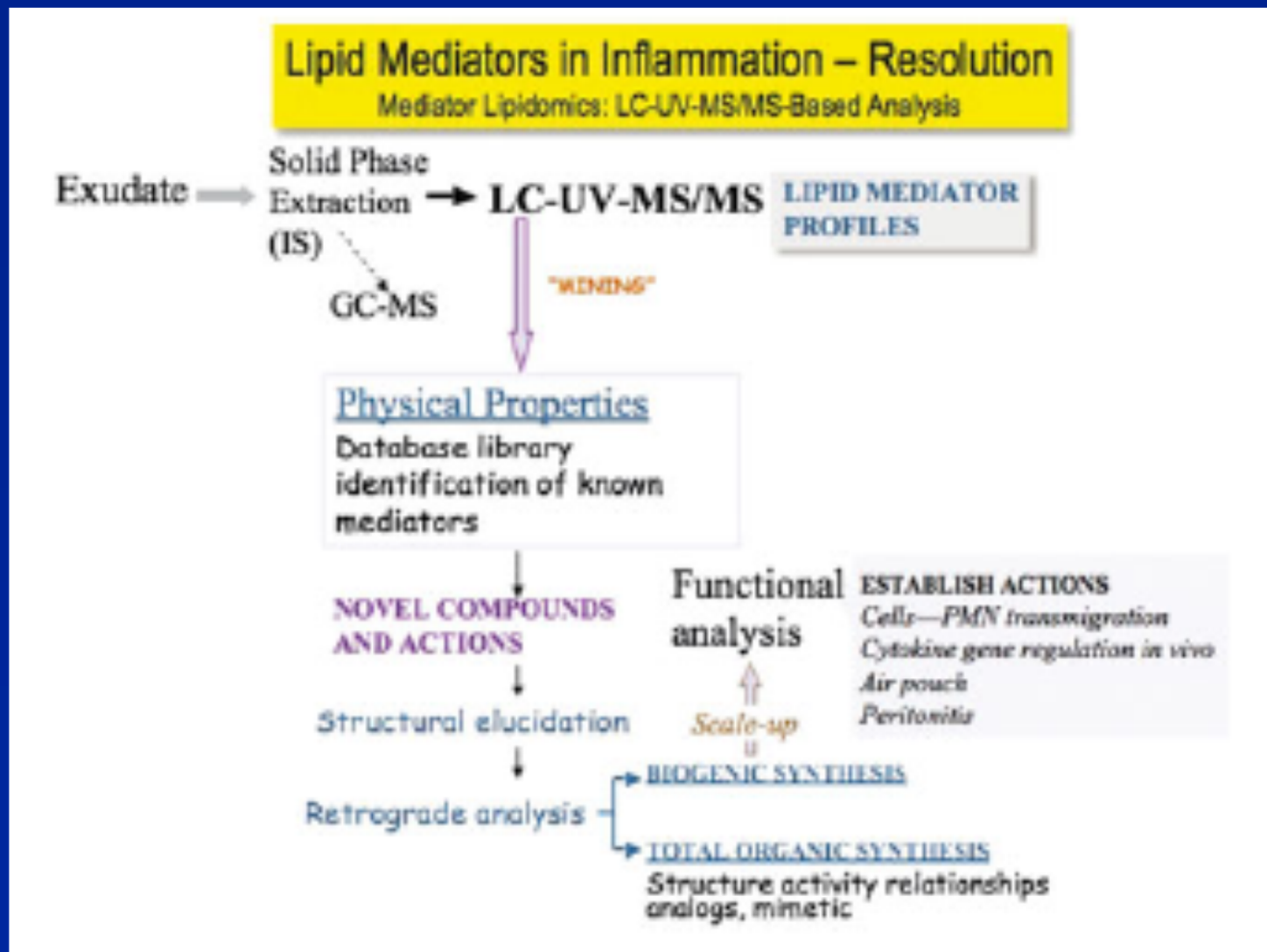
SFINGOFOSFOLIPIDY



PREKURSORY A BIOAKTIVNÍ MOLEKULY – CÍL ANALÝZY



STANOVENÍ MEDIÁTOROVÝCH LIPIDNÍCH MOLEKUL



STANOVENÍ FOSFOLIPIDŮ

HPTLC:

Fosfolipidy odvozené od glycerolu – skupinová analýza;

Sfingomyeliny – skupinová analýza;

Izolace skupiny pro další analýzu (LC/MS)

LC/MS:

Stanovení jednotlivých fosfolipidů

- analýza celého vzorku (lyzátu buněk, liposomů apod.);
- izolace HPTLC – analýza LC/MS;
- separace skupin na kolonce SPE – analýza LC/MS

TLC STANOVENÍ FOSFOLIPIDŮ A LIPIDOVÝCH METABOLITŮ

LIPIDS	Solvent System (Rf)					
	1	2	3	4	5	6
Triglycerides					0.70	0.96
Free Fatty Acid					0.51	0.16
Diglycerides 1,2					0.70	0.24
Diglycerides 1,3						0.32
Monoglycerides						
Phosphatidylethanolamine	0.79	0.55		0.43		
Phosphatidyl (Monomethylethanolamine)	0.71	0.41		0.33		
Cardiolipin	0.67	0.56	0.38			
Phosphatidylglycerol	0.60	0.50	0.31	0.36		
Phosphatidyl (Dimethylethanolamine)	0.58	0.56		0.27		
Phosphatidic Acid	0.55	0.05	0.58			
Phosphatidylinositol	0.39	0.10				
Phosphatidylcholine	0.34	0.30		0.17		
Phosphatidylserine	0.33	0.12				
Cerebrosides	0.94	0.55				
Ceramides	sf*	sf*				
Sphingosine	0.28	0.75				
Sphingomyelin	0.28	0.13				
Lyso-Phosphatidylglycerol	0.54	0.20				
Lyso-Phosphatidylethanolamine	0.45	0.20				
Monolysocardiolipin	0.45	0.34				
Lyso-Phosphatidic Acid	0.40	0.01				
Dilysocardiolipin	0.32	0.21				
Lyso-Phosphatidylinositol	0.29	0.03				
Lyso-Phosphatidylcholine	0.22	0.08				
Lyso-Phosphatidylserine	0.18	0.02				

* sf - solvent front.

SOLVENT SYSTEMS	Ratio (V:V)
Chloroform : Methanol : Water	65 : 25 : 4
Chloroform : Methanol : Ammonium Hydroxide	65 : 25 : 4
Chloroform : Hexane : Methanol : Acetic Acid	50 : 30 : 10 : 5
Toluene : Pyridine : Water	60 : 60 : 10
Cyclohexane : Ethyl Acetate	3 : 2
Toluene : Chloroform : Methanol	85 : 15 : 5

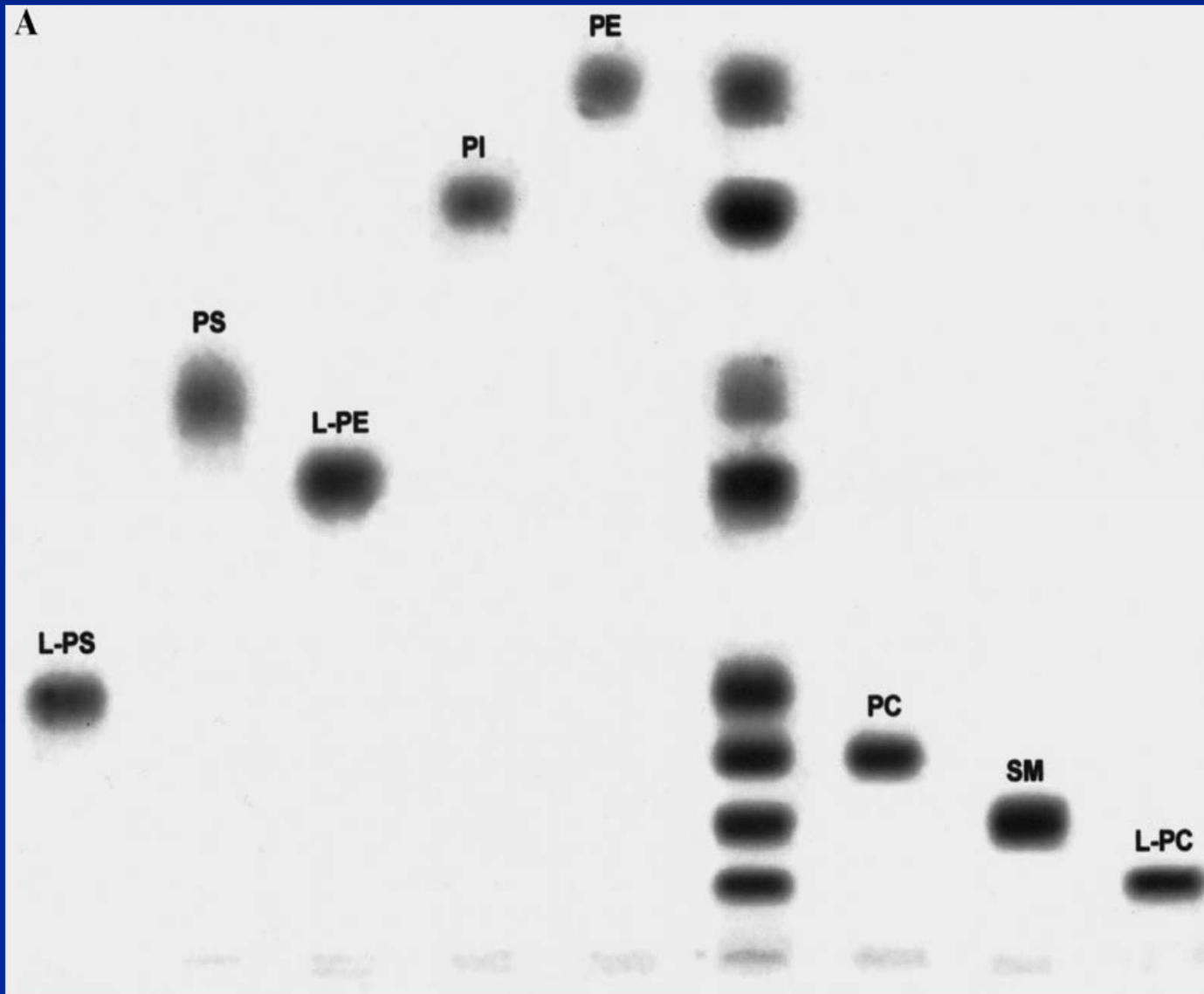
Proč stanovujeme fosfolipidy:

- složení buněčných membrán
- složení fosfolipidů v liposomech
- kontrola čistoty izolovaných fosfolipidů
- stanovení enzymových aktivit (PLA₂, PI-PLC, PC-PLC, PLD)

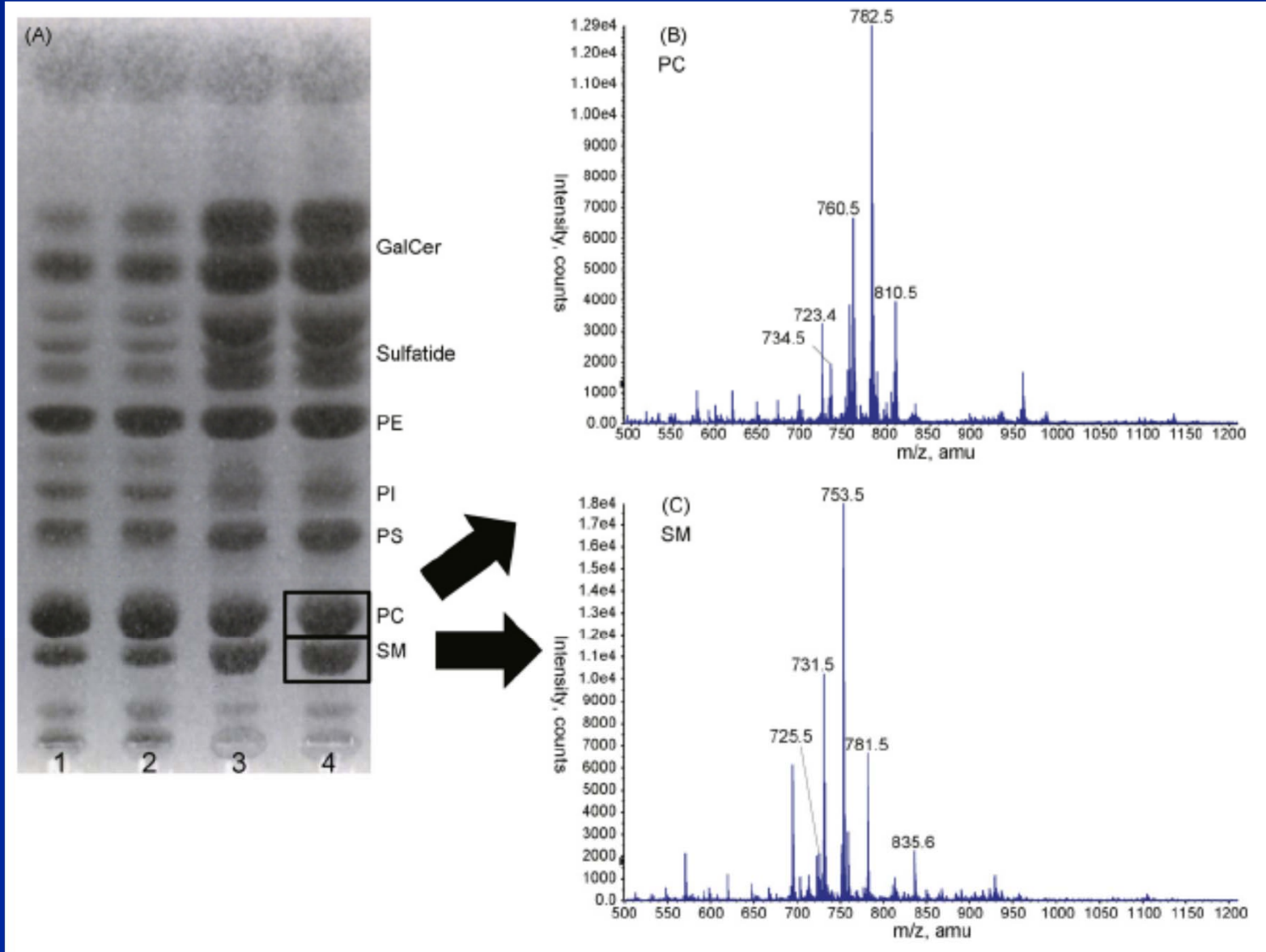
Příklad stanovení PC-PLC:

- buňky značeny [¹⁴C] cholinem a [³H] kyselinou myristovou (inkorporace do PC)
- extrakce lipidů (CHCl₃:MeOH)
- separace TLC
- spray s barvičkou (primulin)
- separace TLC v 2. mobilní fázi

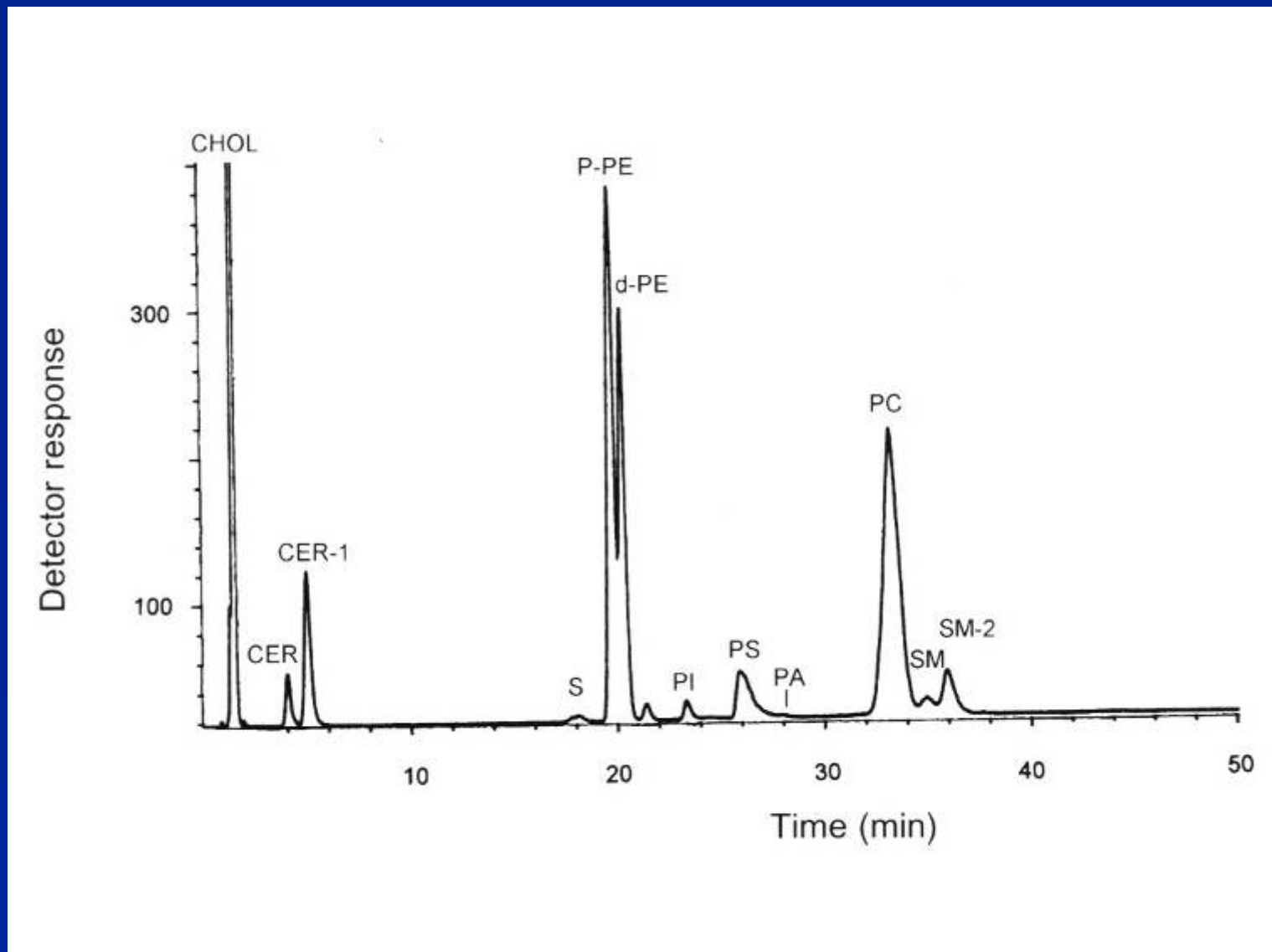
„PHOSPHOLIPIDOMICS“ (HPTLC)



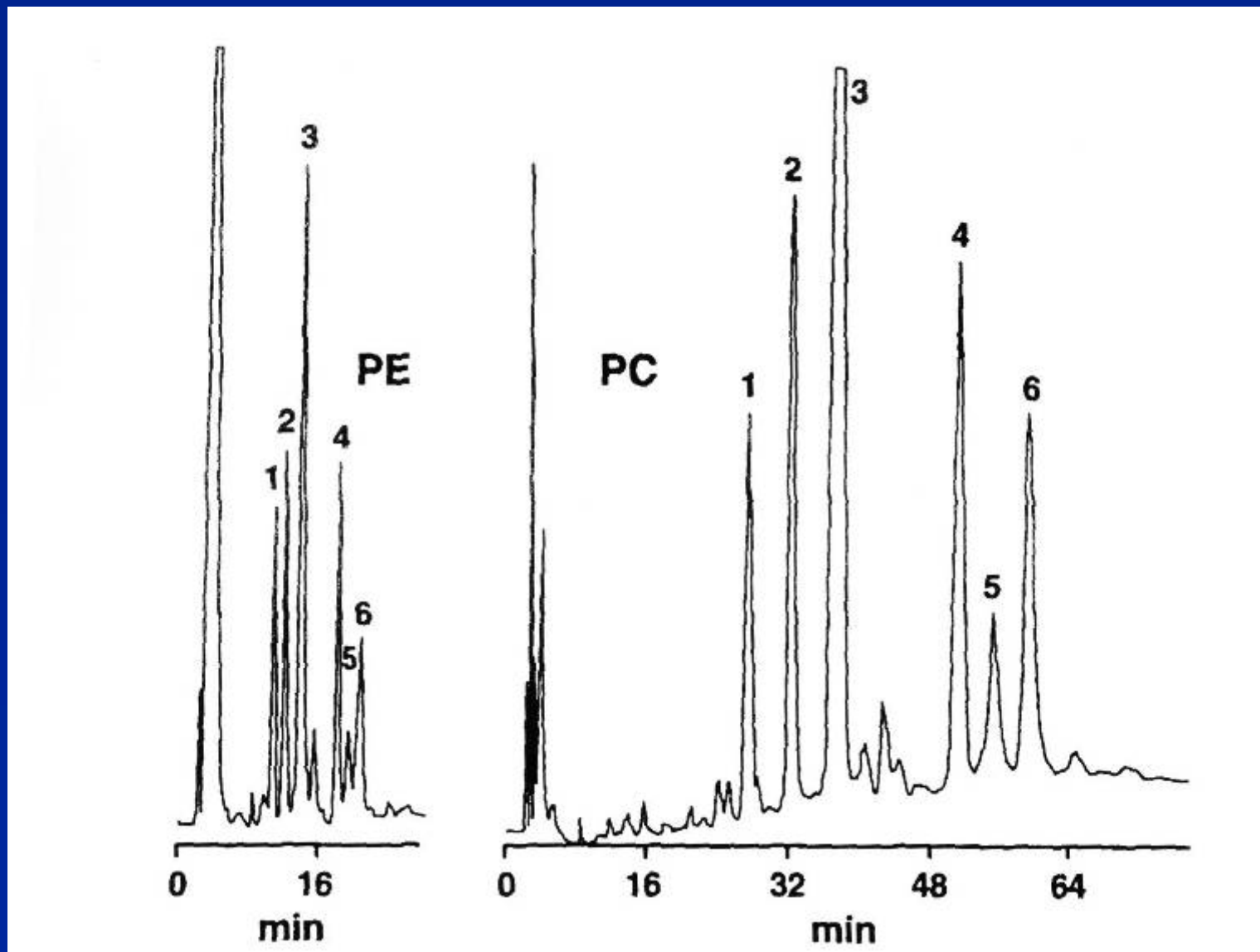
„PHOSPHOLIPIDOMICS“ (TLC + LC/MS)



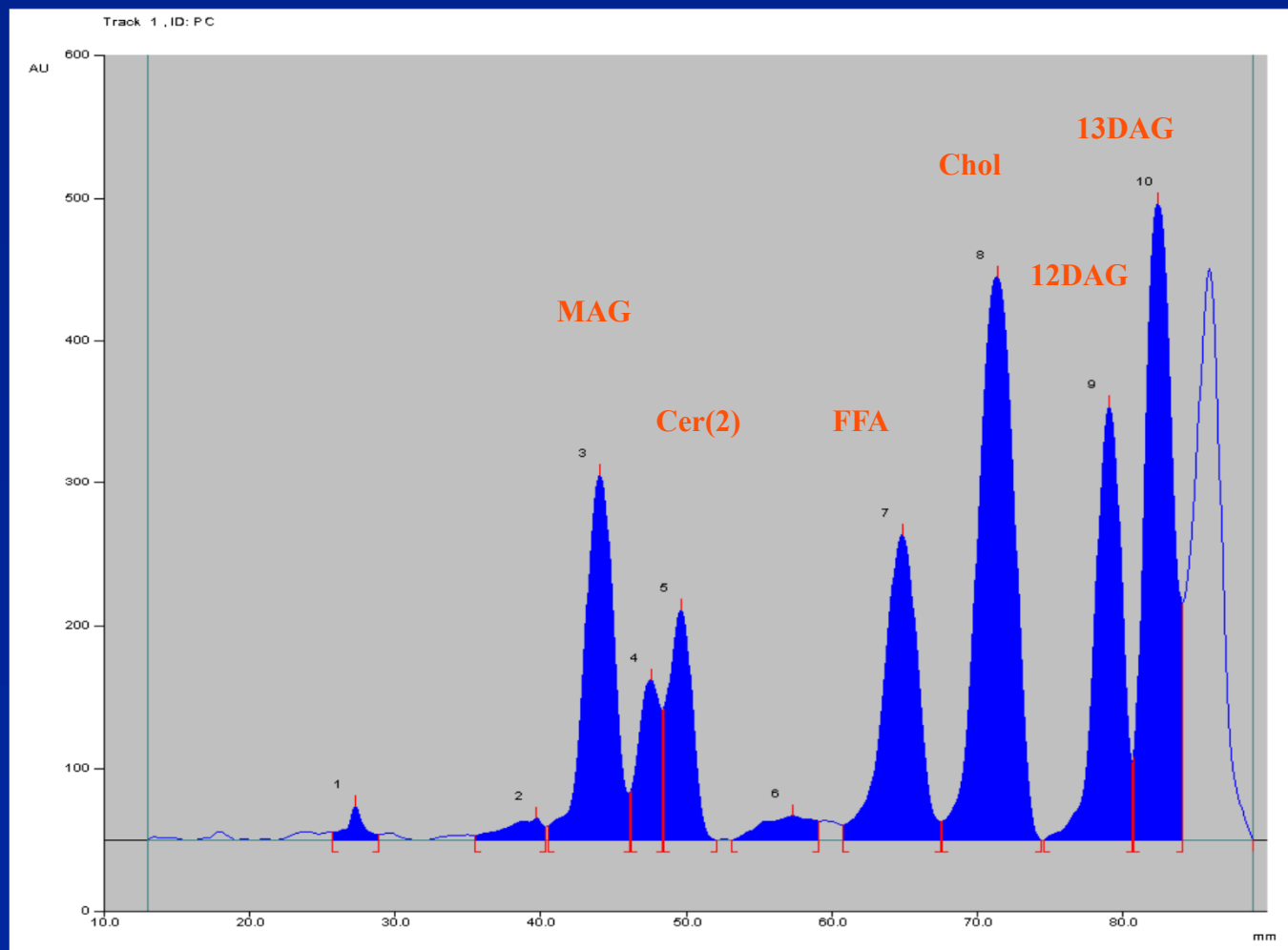
HPLC STANOVENÍ FOSFOLIPIDŮ



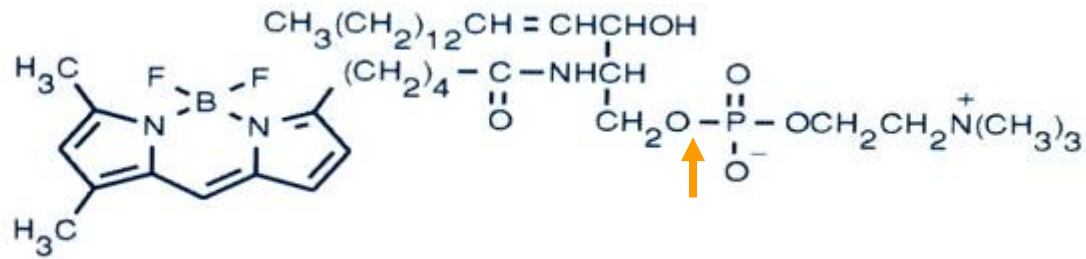
HPLC STANOVENÍ FOSFOLIPIDŮ



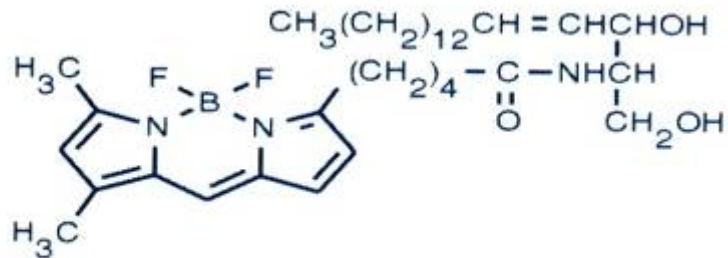
STANOVENÍ CERAMIDŮ A DAG METODOU HPTLC



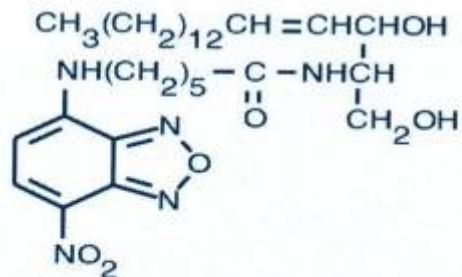
FLUOROGENNÍ ANALOGA LIPIDŮ



BODIPY FL C₅-sphingomyelin.



BODIPY FL C₅-ceramide.

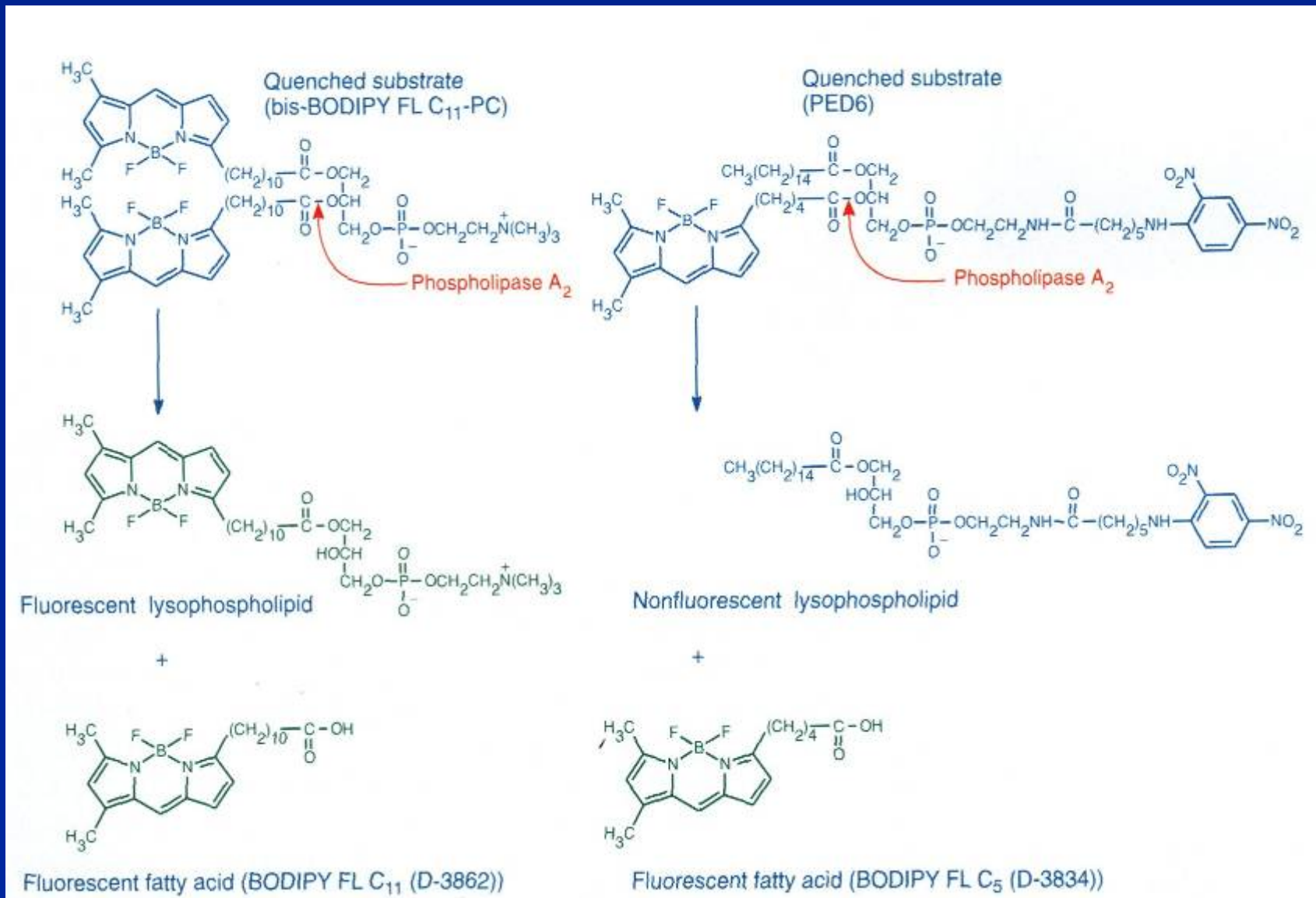


NBD C₆-ceramide.

Příklad užití:

- stanovení enzymových aktivit SMázy, SMsyntázy

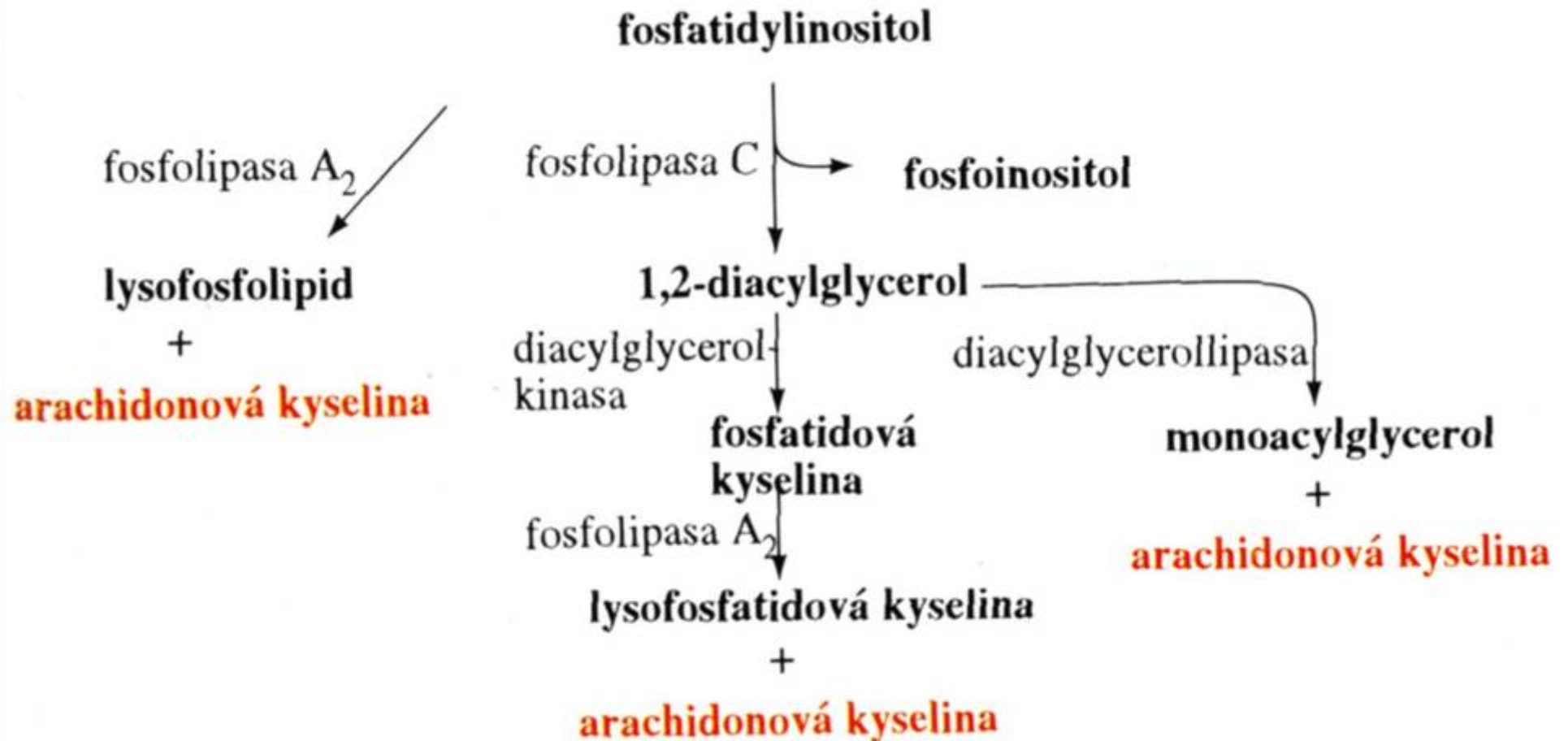
FLUORIMETRICKÉ STANOVENÍ PLA₂



STANOVENÍ AKTIVITY PI-PLC POMOCÍ WESTERN BLOTU

- ◆ **Stimulace buněk, lyze**
- ◆ **Imunoprecipitace (protilátka proti PI-PLC + protein A - Sepharose)**
- ◆ **PAGE a transfer proteinů na membránu**
- ◆ **Protilátka proti PI-PLC nebo proti fosforylovanému tyrosinu (detekce aktivované formy enzymu)**
- ◆ **Vizualizace proteinu (ECL)**

VZNIK MASTNÝCH KYSELIN



MASTNÉ KYSELINY

NASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY:

- máselná (4:0)
- laurová (12:0)
- myristová (14:0)
- palmitová (16:0)
- stearová (16:0)

METODA STANOVENÍ:

HPLC, fluorimetrická derivatizace
HPLC / radiometrická nebo
refraktometrická detekce
GC po derivatizaci (methylaci)

NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY:

olejová (18:1)

linolová (18:2, příklad n-6 kyseliny) HPLC / fluorimetrická detekce

linolenová (18:3)

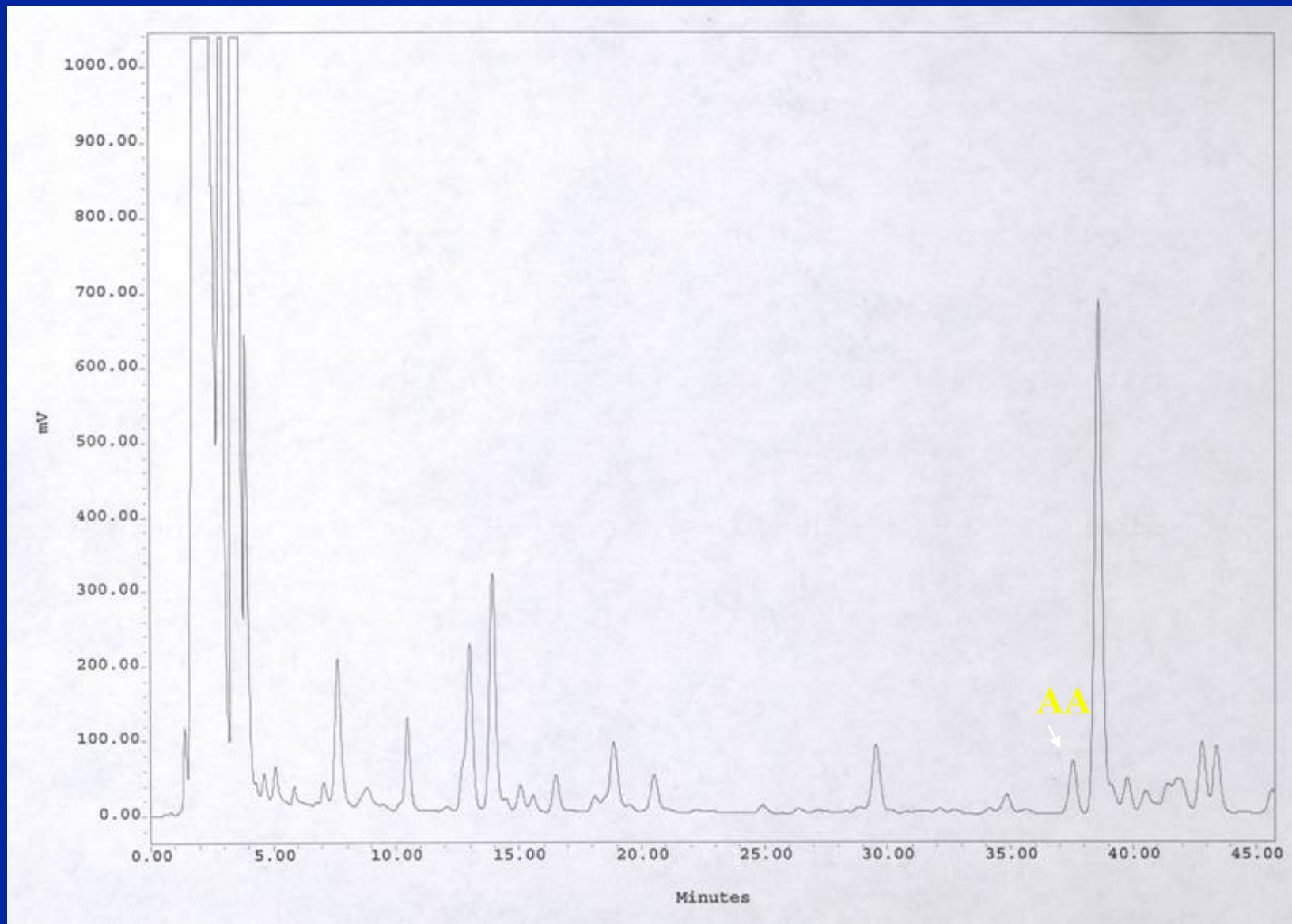
nebo HRGC/MS

arachidonová (20:4)

eikosapentaenová (20:5)

dokosaheptaenová (22:6)

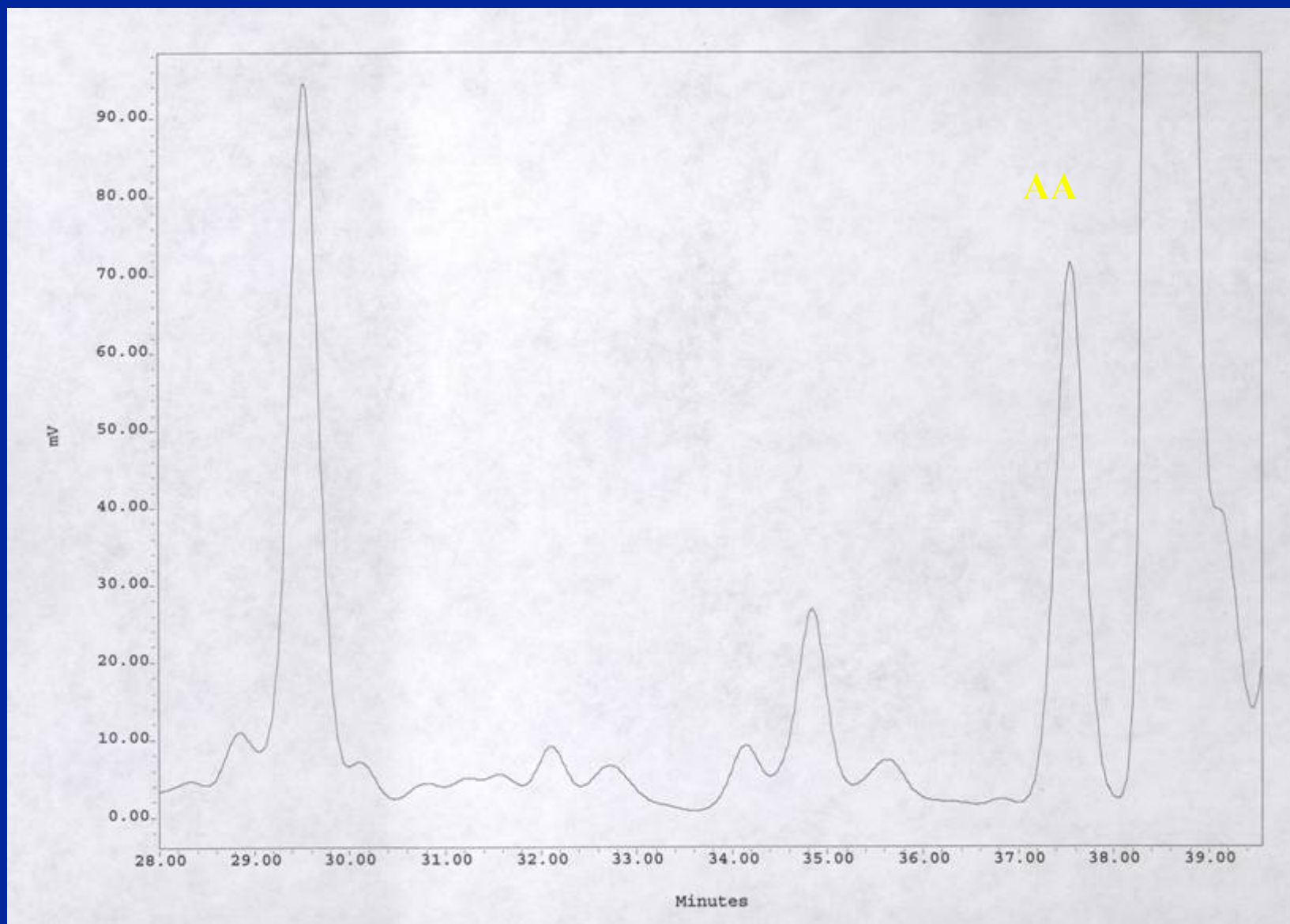
HPLC analýza karboxylových kyselin po derivatizaci pyrenyldiazomethanem



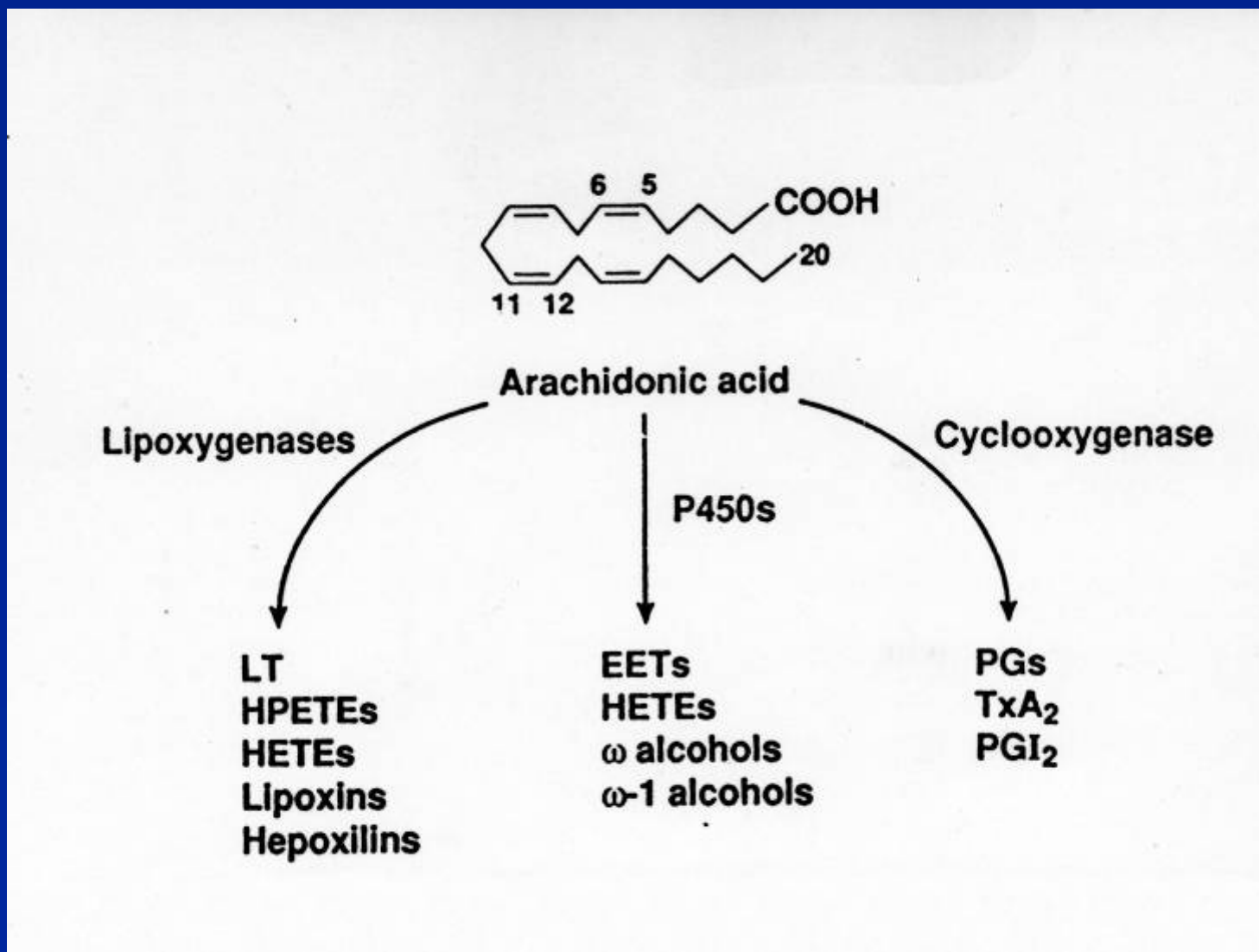
Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně



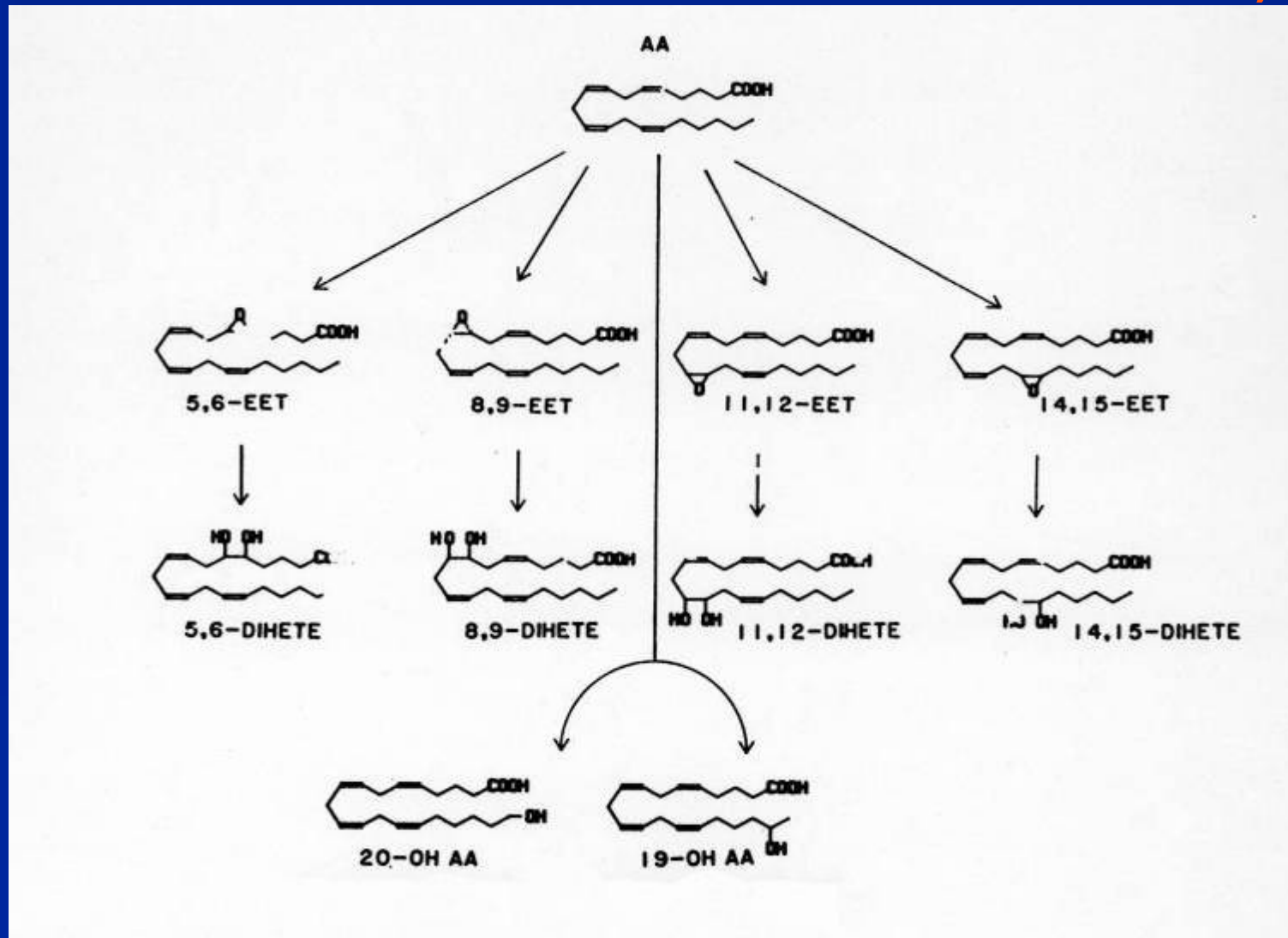
HPLC analýza karboxylových kyselin po derivatizaci PDAM (fluor. detekce)



METABOLISMUS MASTNÝCH KYSELINY

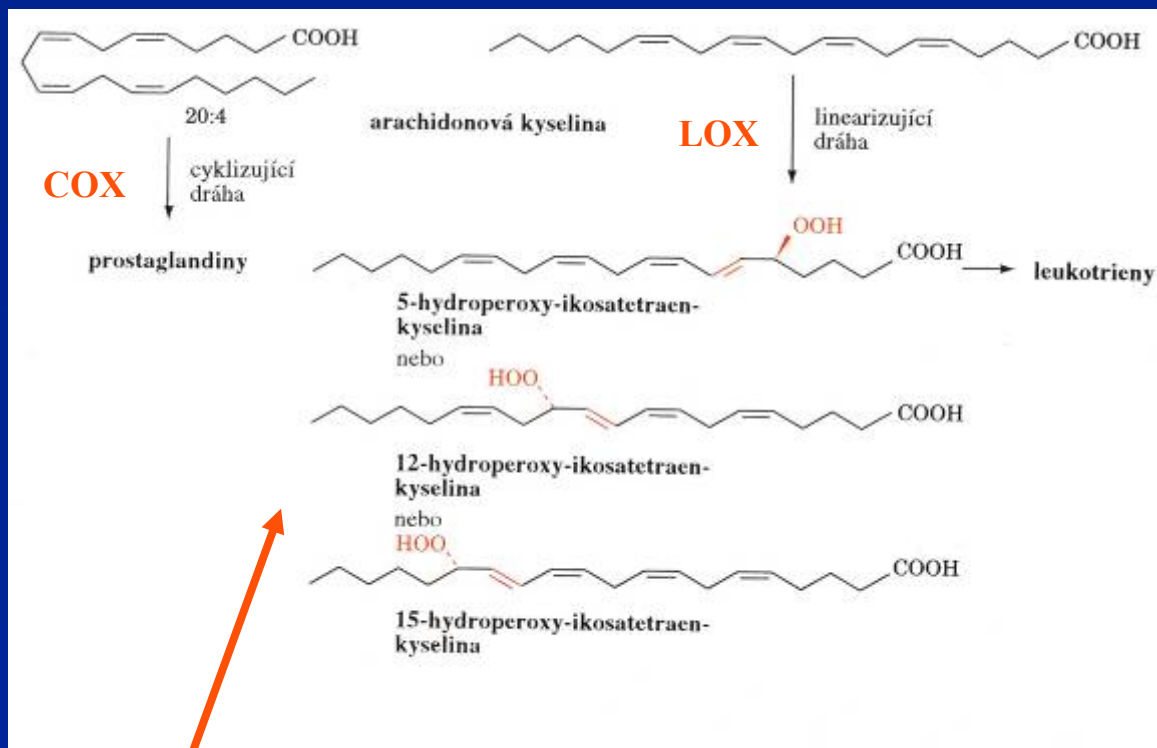
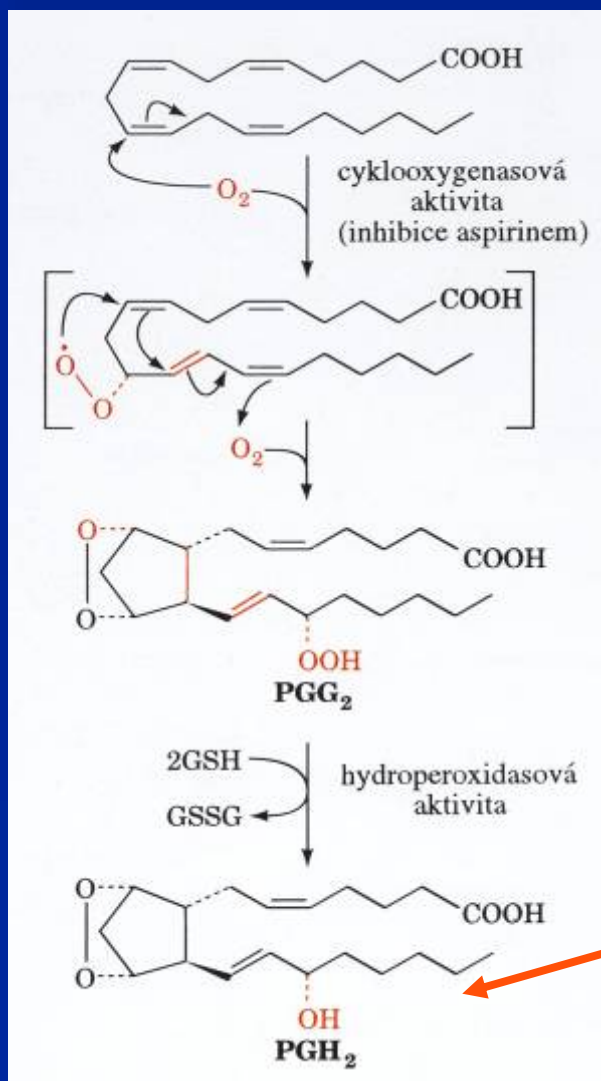


MASTNÉ KYSELINY (CYP ENZYMY ZODPOVĚDNÉ ZA OXYGENÁZOVÝ METABOLISMUS)



Detekce a kvantifikace metabolitů pomocí HPLC nebo GC/MS

KYSELINA ARACHIDONOVÁ - PREKURSOR



Stanovení aktivit COX a LOX:
GC/MS nebo HPLC metabolitů AA

STRATEGIE DETEKCE KLÍČOVÝCH SIGNÁLNÍCH DRAH MECHANISMŮ TOXICITY XENOBIOTIK

EXPOZICE TESTOVANÝMI LÁTKAMI

**SPECIFICKÉ
INHIBITORY**

AKTIVACE ENZYMŮ

Specifické inhibitory
CYP, COX, LOX,
PLA2, PI-PLC, PC-PLC,
a MAPK; antioxidanty

**MODULACE SIGNÁLNÍ
TRANSDUKCE A
GEN. EXPRESE**

**MODULACE BUN.
CYKLU, PROLIFERACE,
MEZIBUNĚČNÝCH
SPOJENÍ**

SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS

Membrane Receptors

Ras, Rho, PLA₂, PLC

Arachidonic Acid, Reactive Oxygen Species, Ca²⁺, DNA Damage

Protein Kinases (ERK1/2, JNK, p38, PKB/Akt, PKC, PKA, c-Src)
Protein Phosphatases

Transcription Factors, Modulators of Gene Expression (AhR, ERs, CAR, NK κ B, AP-1, c-Jun, c-Fos, c-Myc, p53)

CELLULAR EVENTS (SPECIFIC PROTEIN TARGETS)

Mitogenic signal transduction
(e.g. ERK1/2, ERs, c-Myc)

Cell cycle modulation
(p53, p21, pRb, CDKs, GADDs)

Regulation of apoptosis
(TNFR, Fas, p53, Bax, Bcl-2, Casp)

Modulation of intercellular communication
(Cx 43, Cx32)