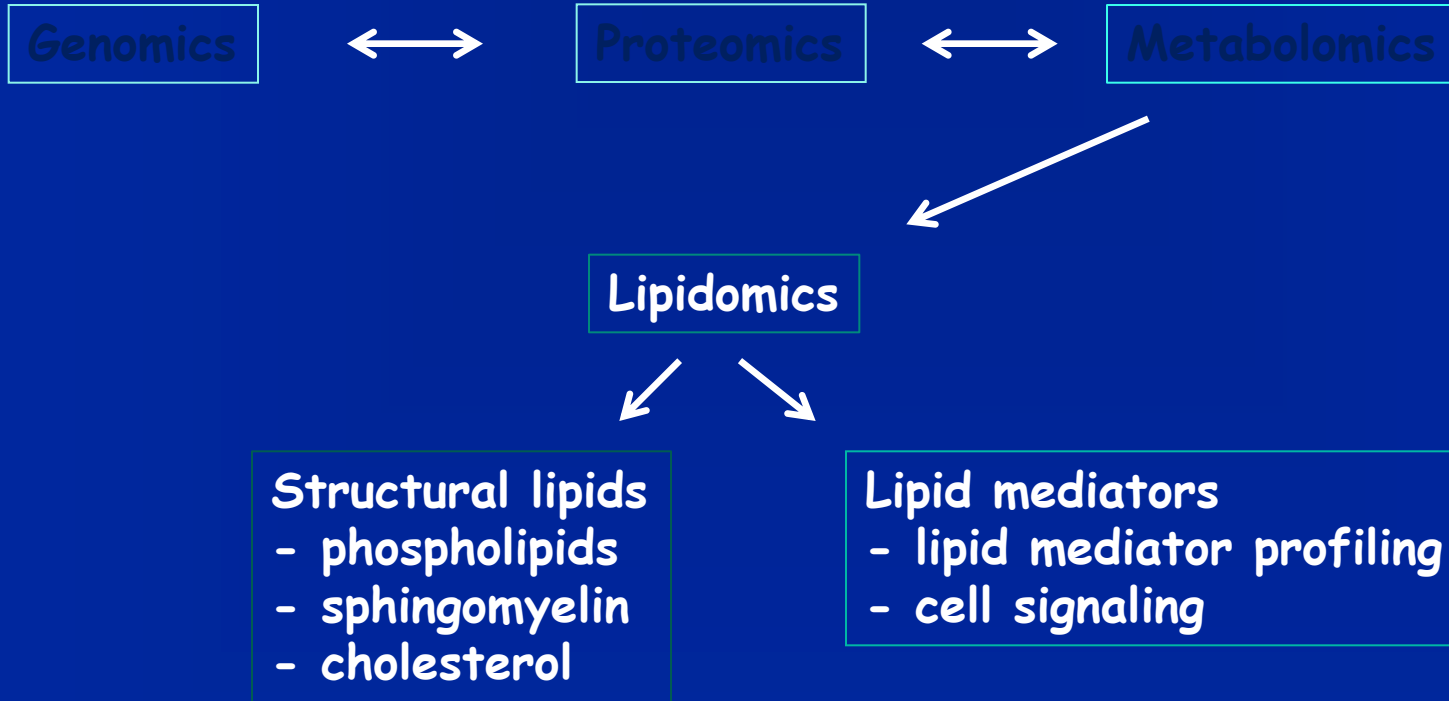


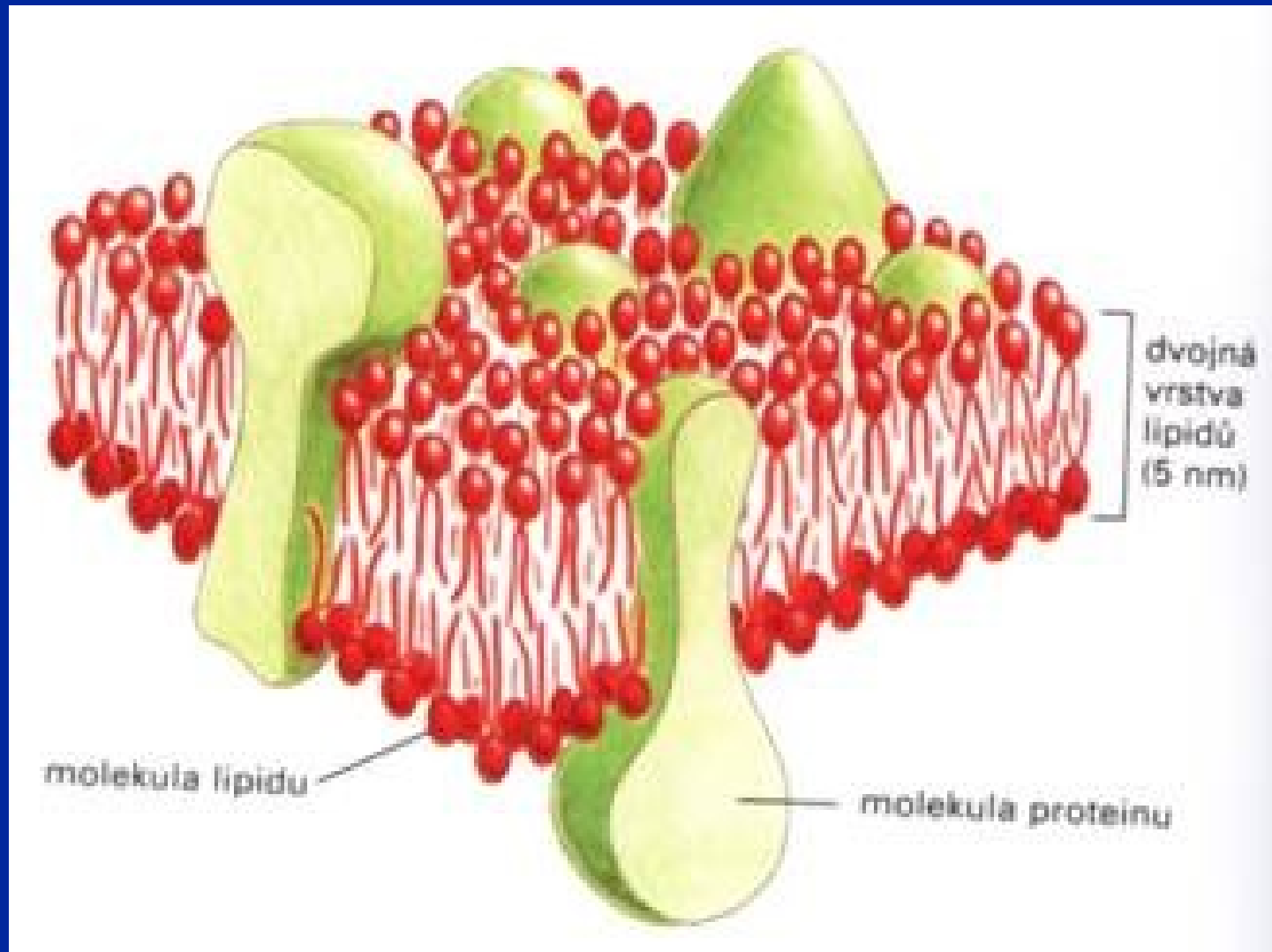
# LIPIDOMICS



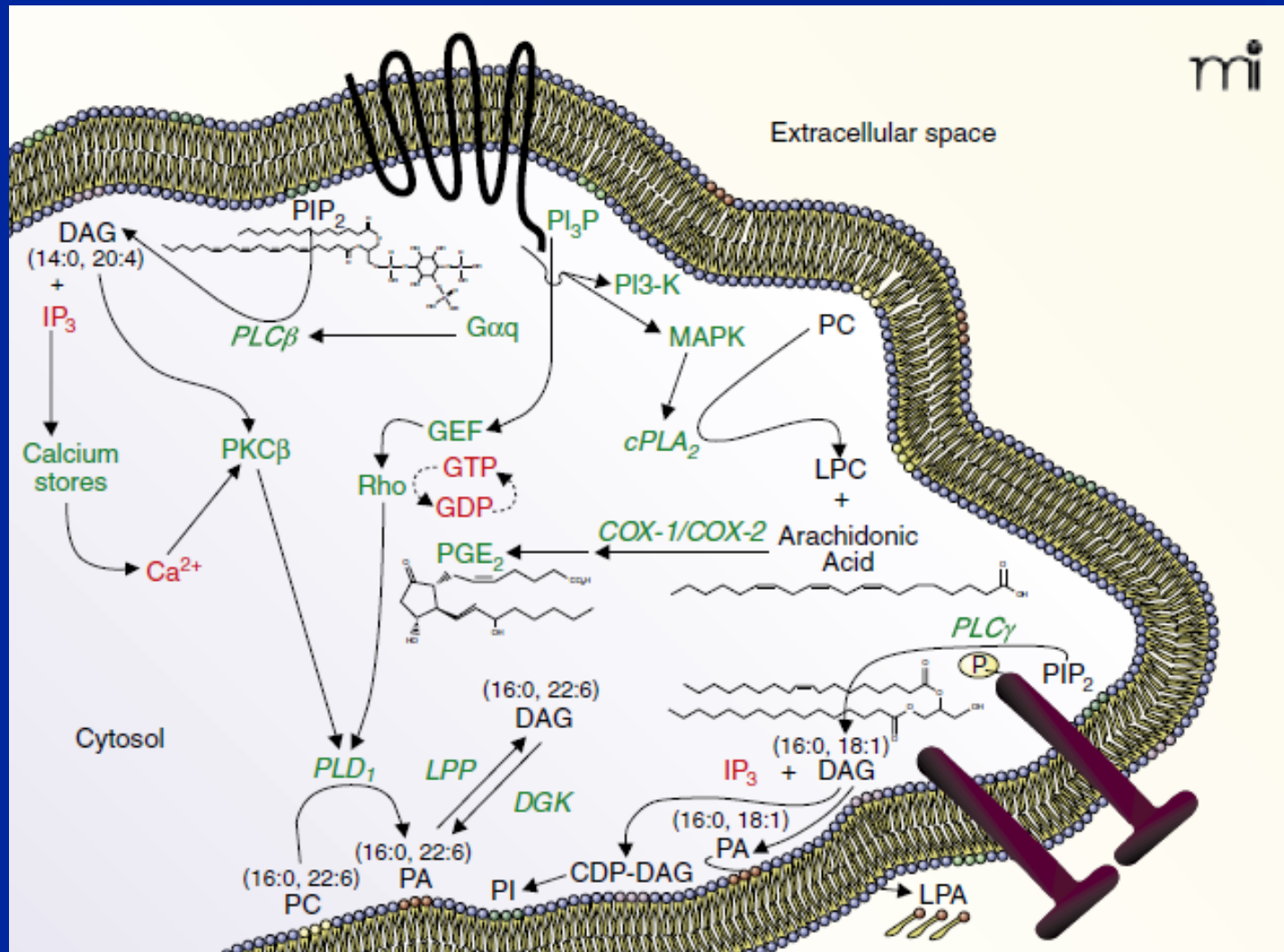
# LIPIDY: FUNKCE, IZOLACE, SEPARACE, DETEKCE A KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

- ◆ FOSFOLIPIDY - chemické složení a funkce v buněčných membránách; metody stanovení fosfolipidů - HPTLC, HPLC/MS
- ◆ SFINGOMYELINY, DIACYLGLYCEROL fosfolipázy (PI-PLC, PC-PLC,...) - produkty reakcí (ceramid, DAG = 2nd messengers) a stanovení enzymových aktivit lipáz - HPLC/MS, GC/MS
- ◆ MASTNÉ KYSELINY chemické složení mastných kyselin - GC/MS; mastné kyseliny = 2nd messengers a prekursory dalších lipidních signálních molekul
- ◆ EICOSANOIDY (PROSTAGLANDINY, LEUKOTRIENY) - stanovení hladin, stanovení aktivit LOX, COX, CYP, PG syntáz - HPLC/MS

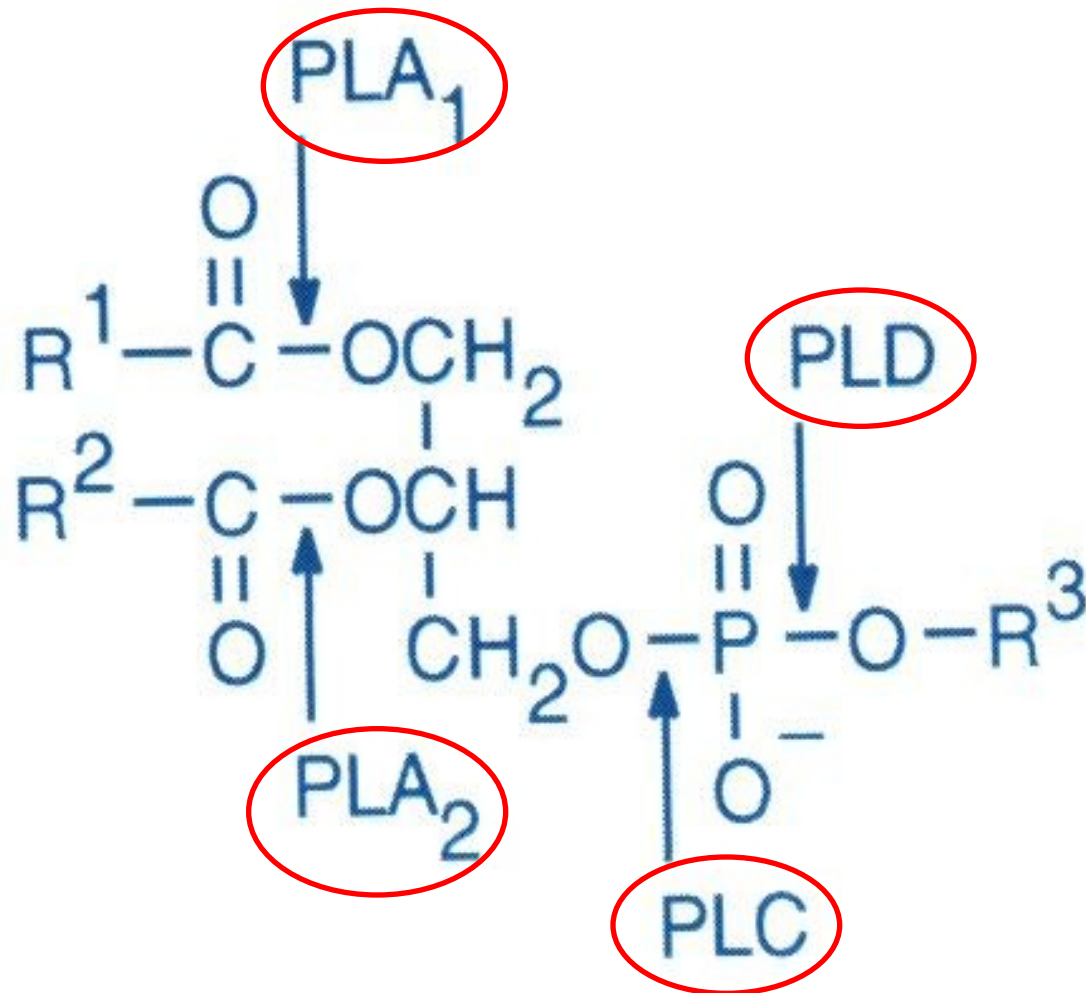
# Fosfolipidové membrány



# Intracelulární signalizace (černě lipidy, zeleně proteiny)



# SLOŽENÍ GLYCEROLFOSFOLIPIDŮ / FOSFOLIPÁZY

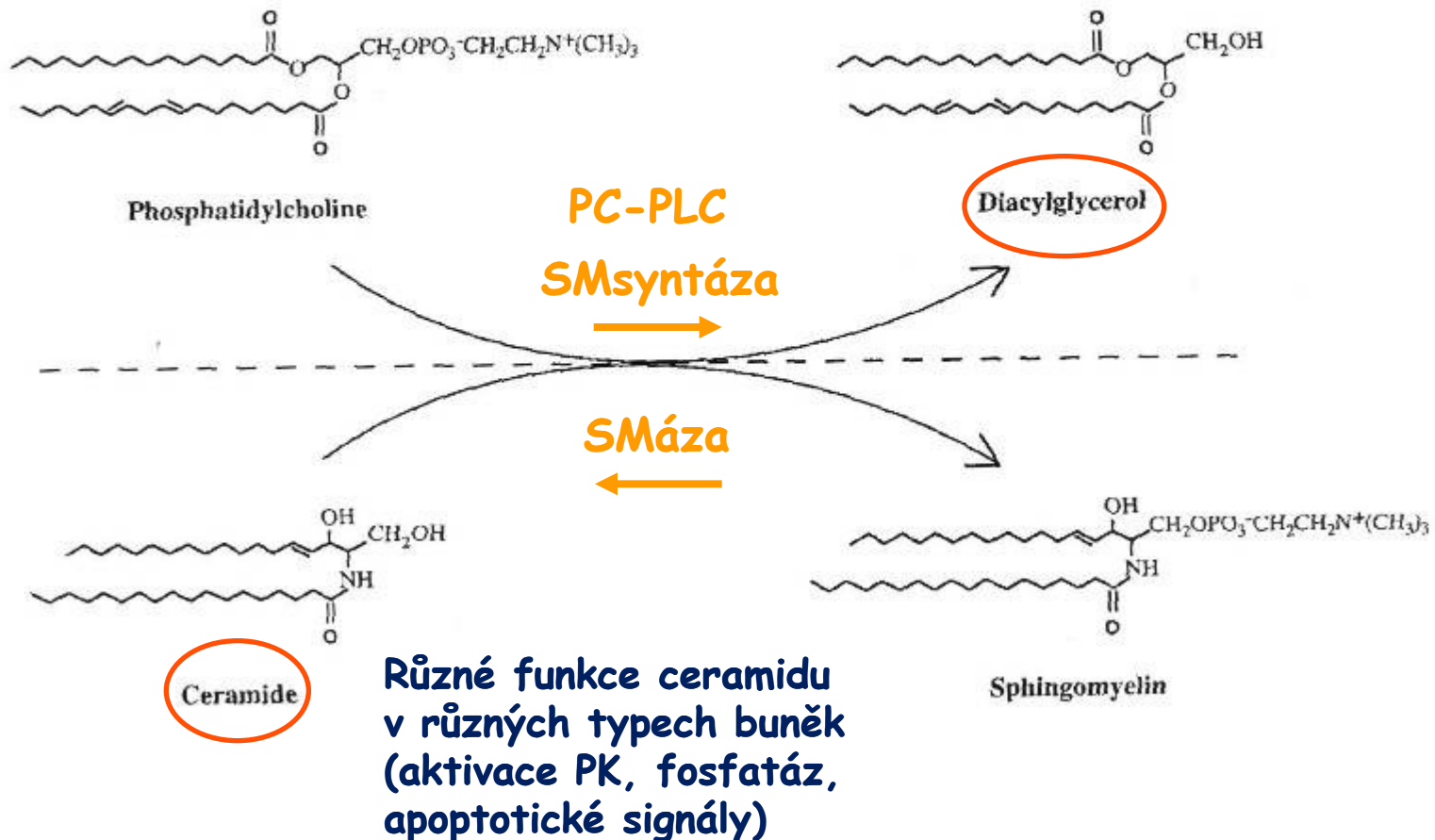


**R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>:**  
mastné kyseliny

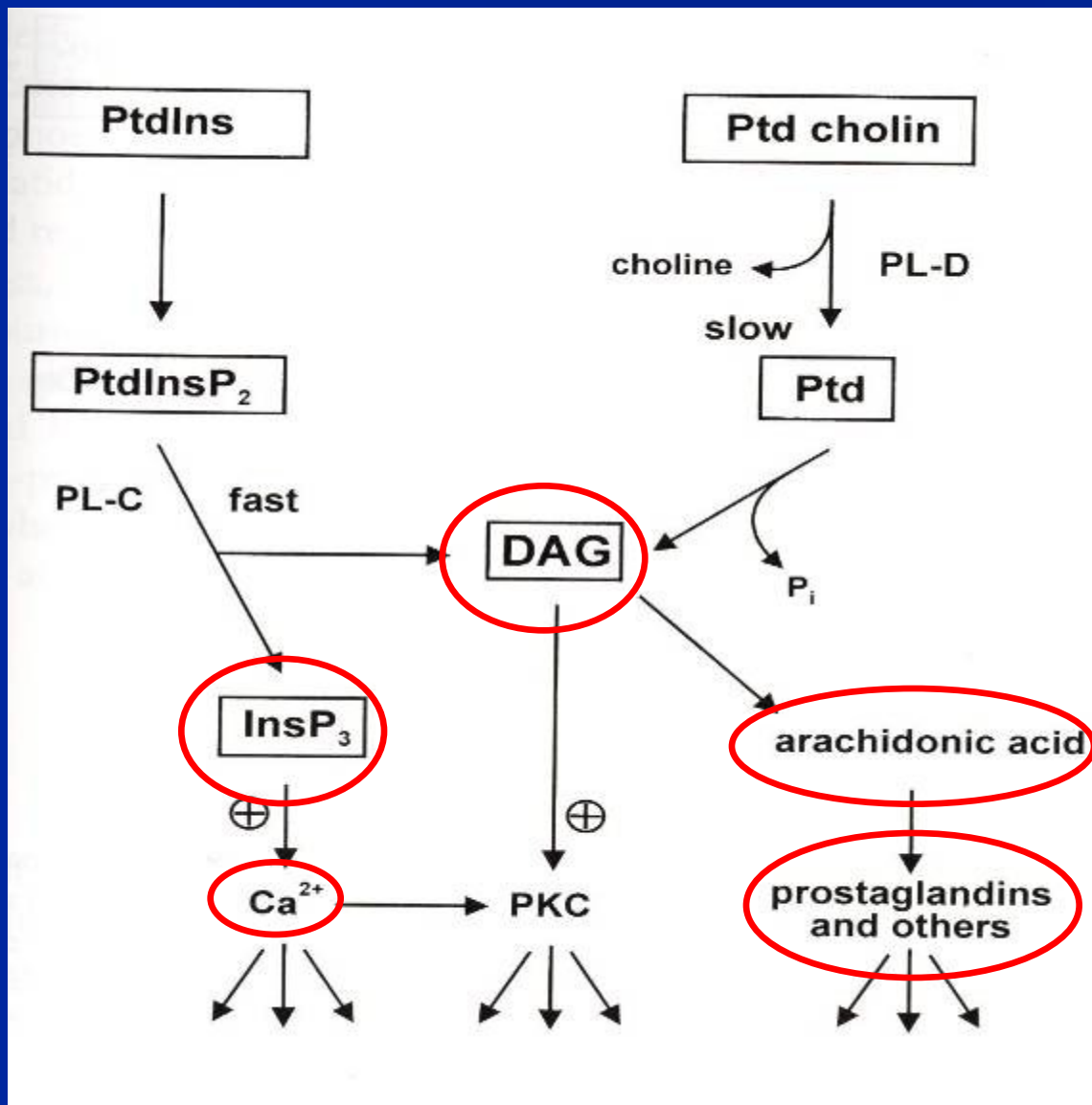
**R<sub>3</sub>:**  
cholin  
etanolamin  
serin  
inositol  
aj.

# SFINGOFOSFOLIPIDY a bioaktivní lipidy

**Funkce DAG:**  
(aktivace PKC,  
proliferační signály aj.)



# GLYCEROLFOSFOLIPIDY a bioaktivní lipidy



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.)

# 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 jednotlivých tříd na kolonce SPE + analýza LC/MS



# TLC STANOVENÍ LIPIDŮ (výběr mobilních fází)

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	s <sup>*</sup>	s <sup>*</sup>				
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				

\* s<sup>f</sup> - 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

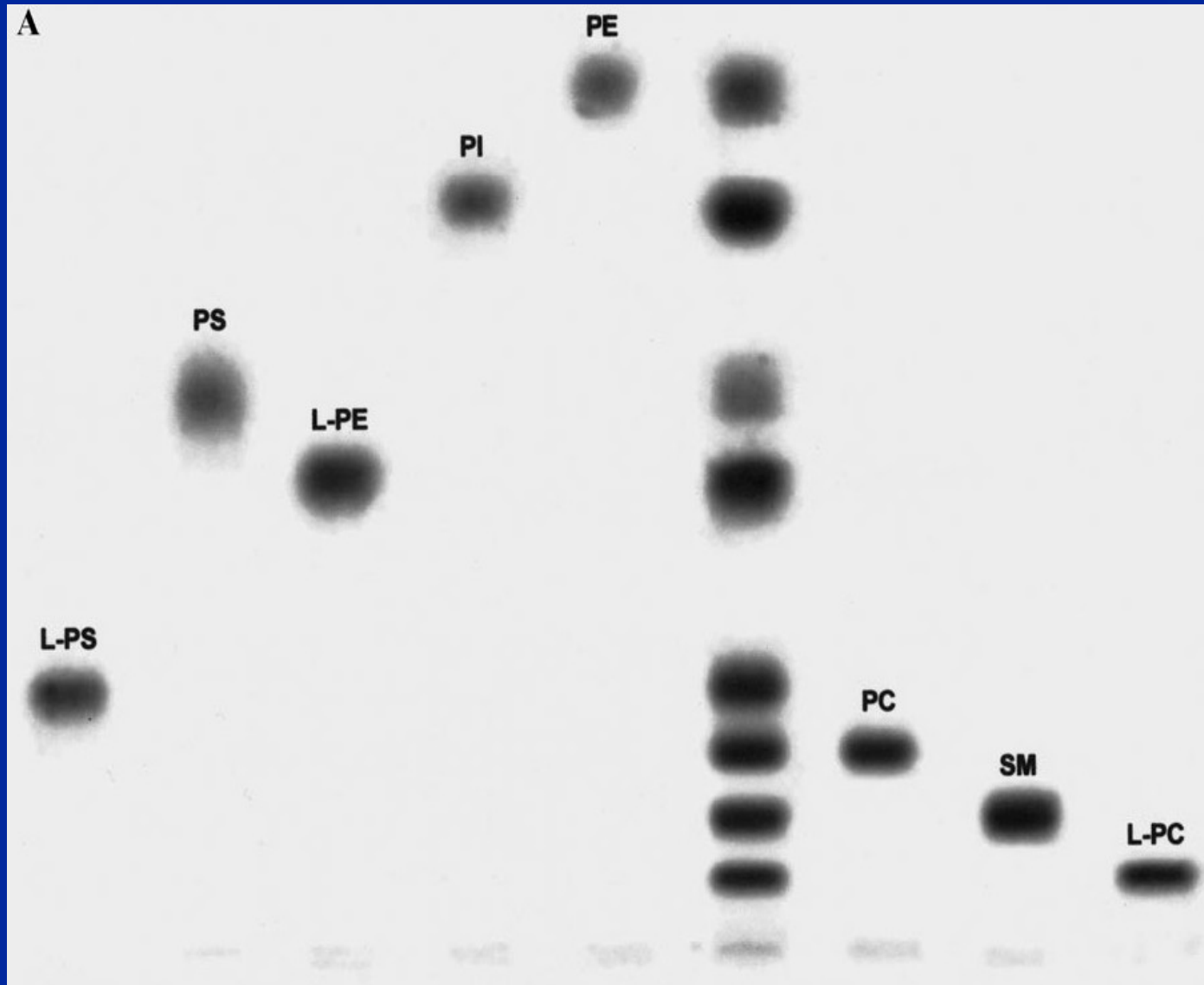
Proč stanovujeme fosfolipidy:

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

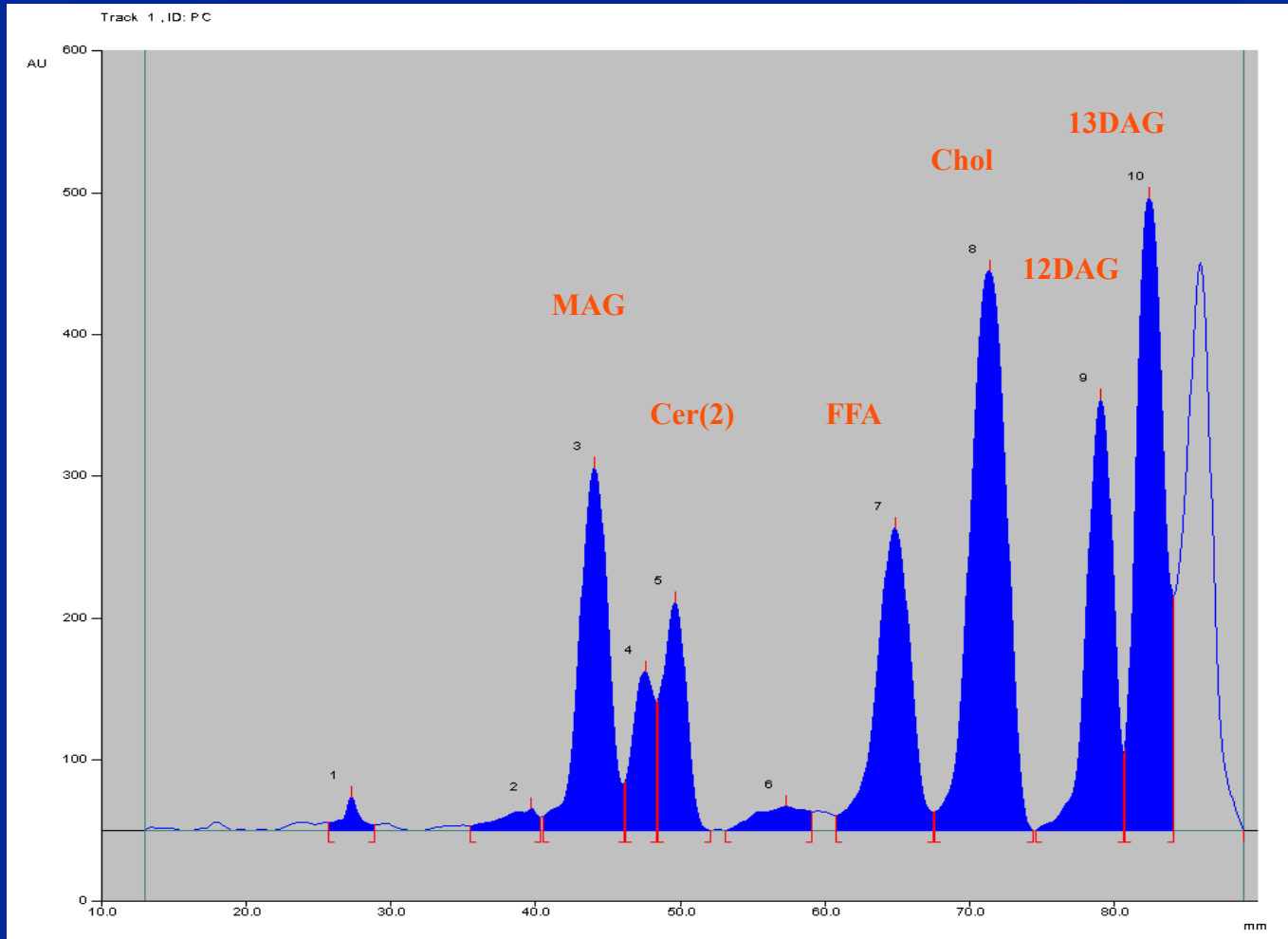
Příklad stanovení PC-PLC:

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

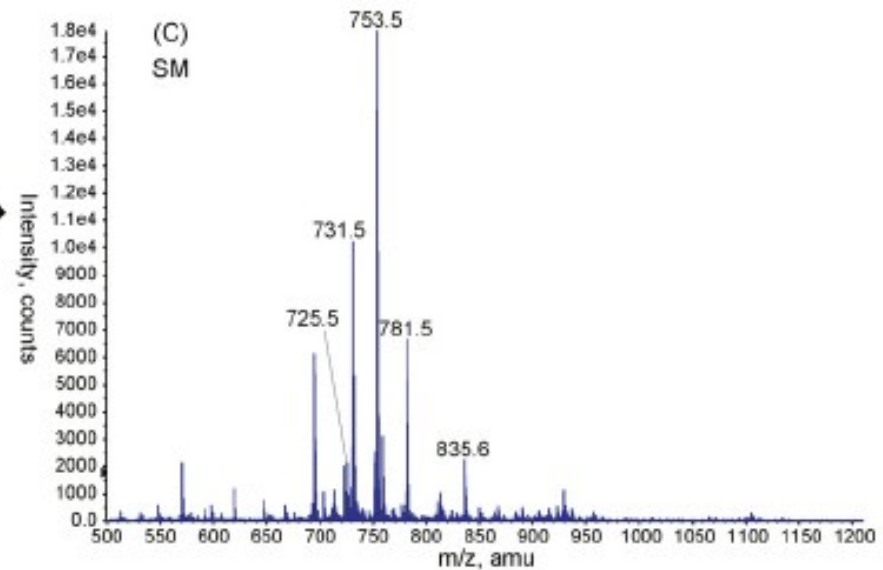
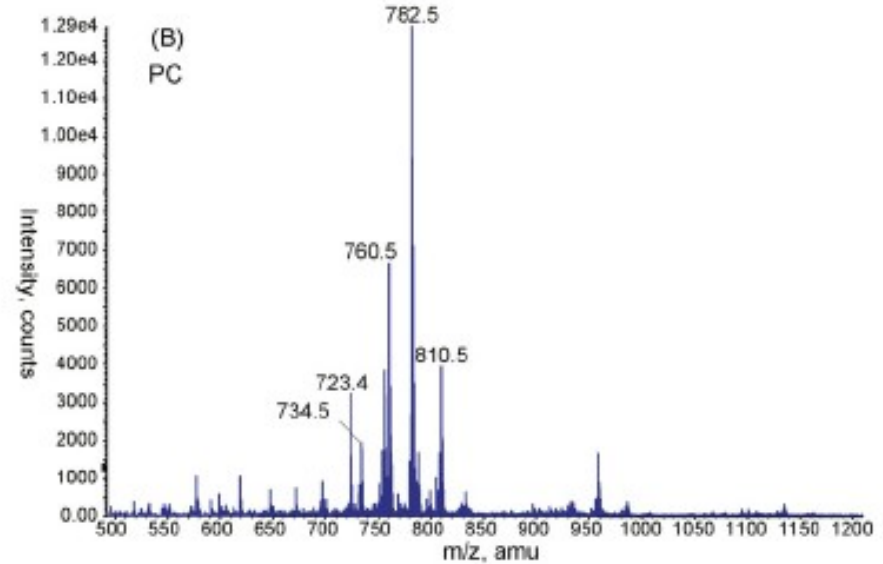
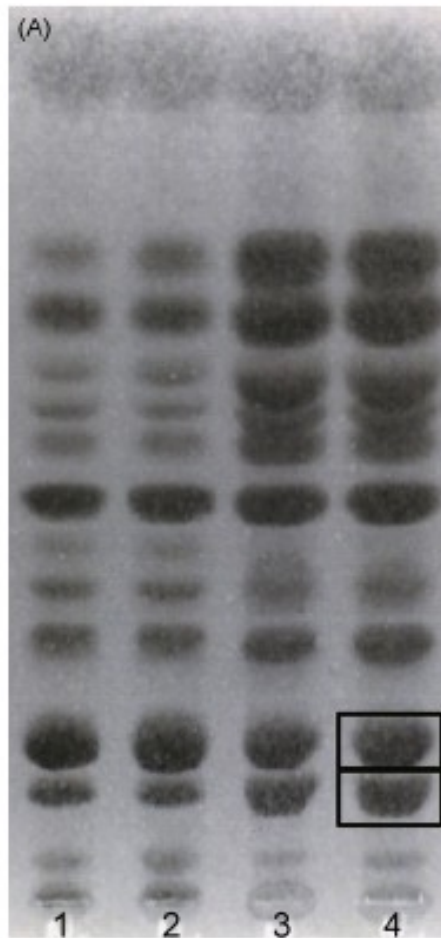
# „PHOSPHOLIPIDOMICS“ (HPTLC)



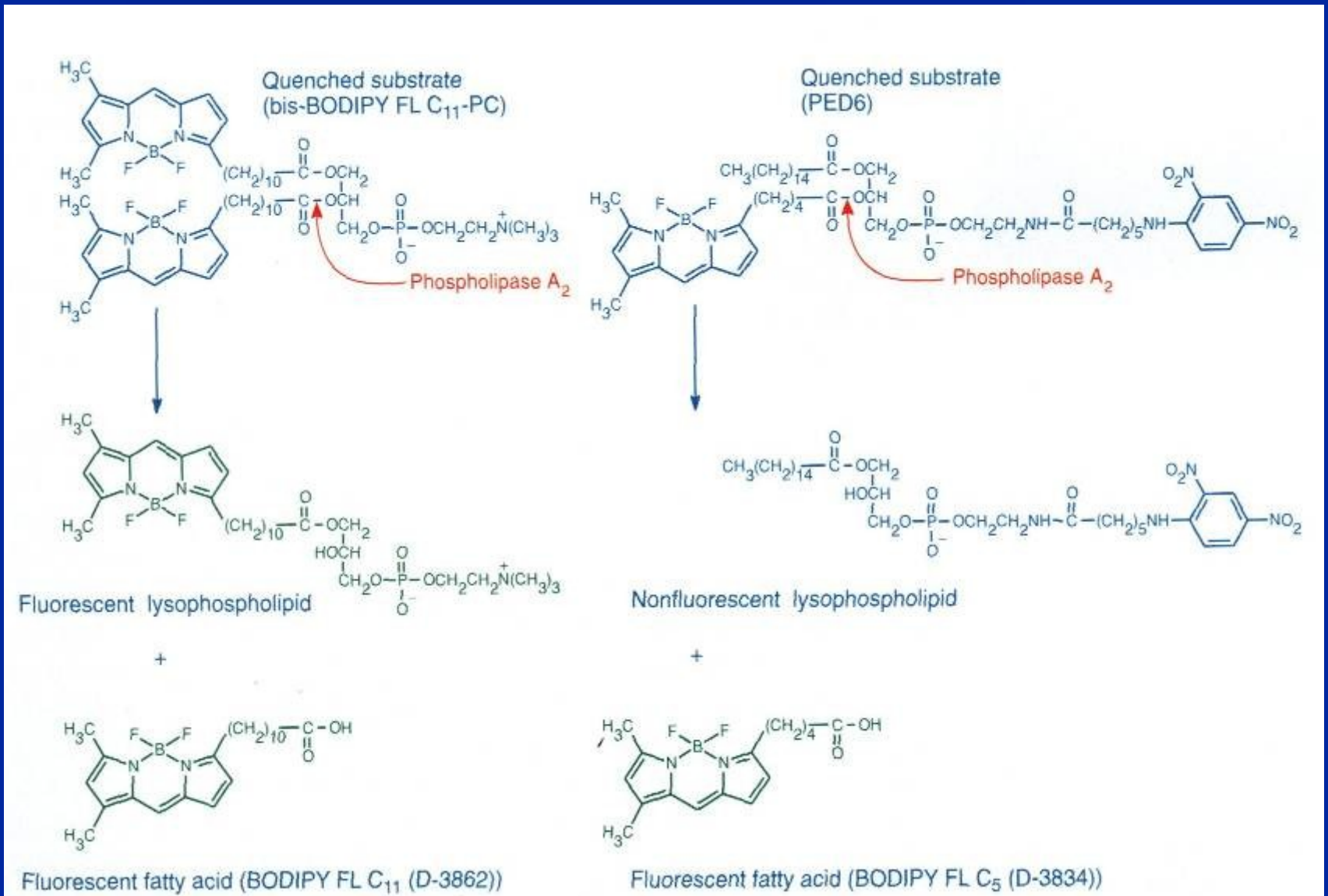
# STANOVENÍ CERAMIDŮ A DAG METODOU HPTLC (detekce densitometricky)



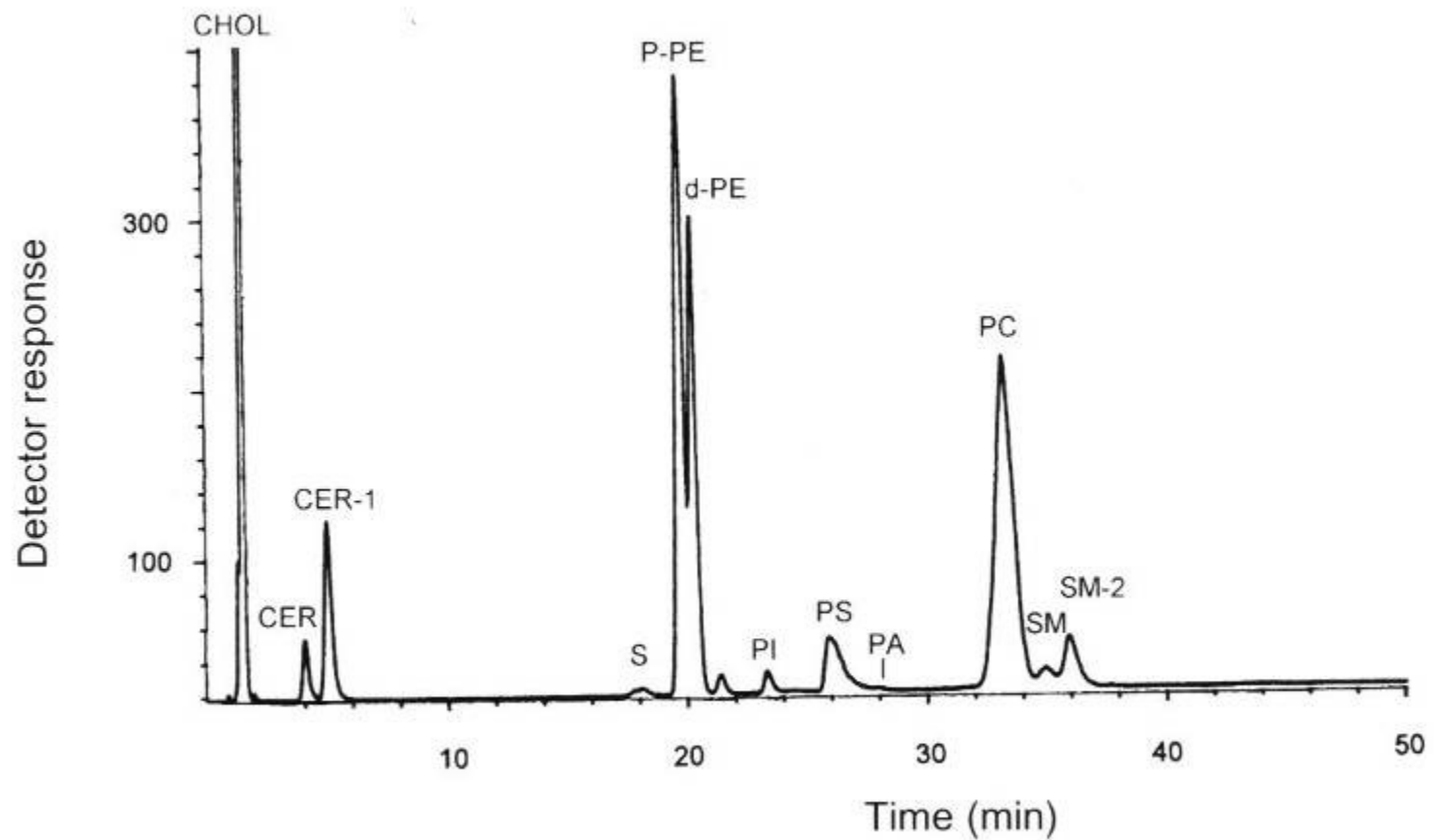
# „PHOSPHOLIPIDOMICS“ (TLC + LC/MS)



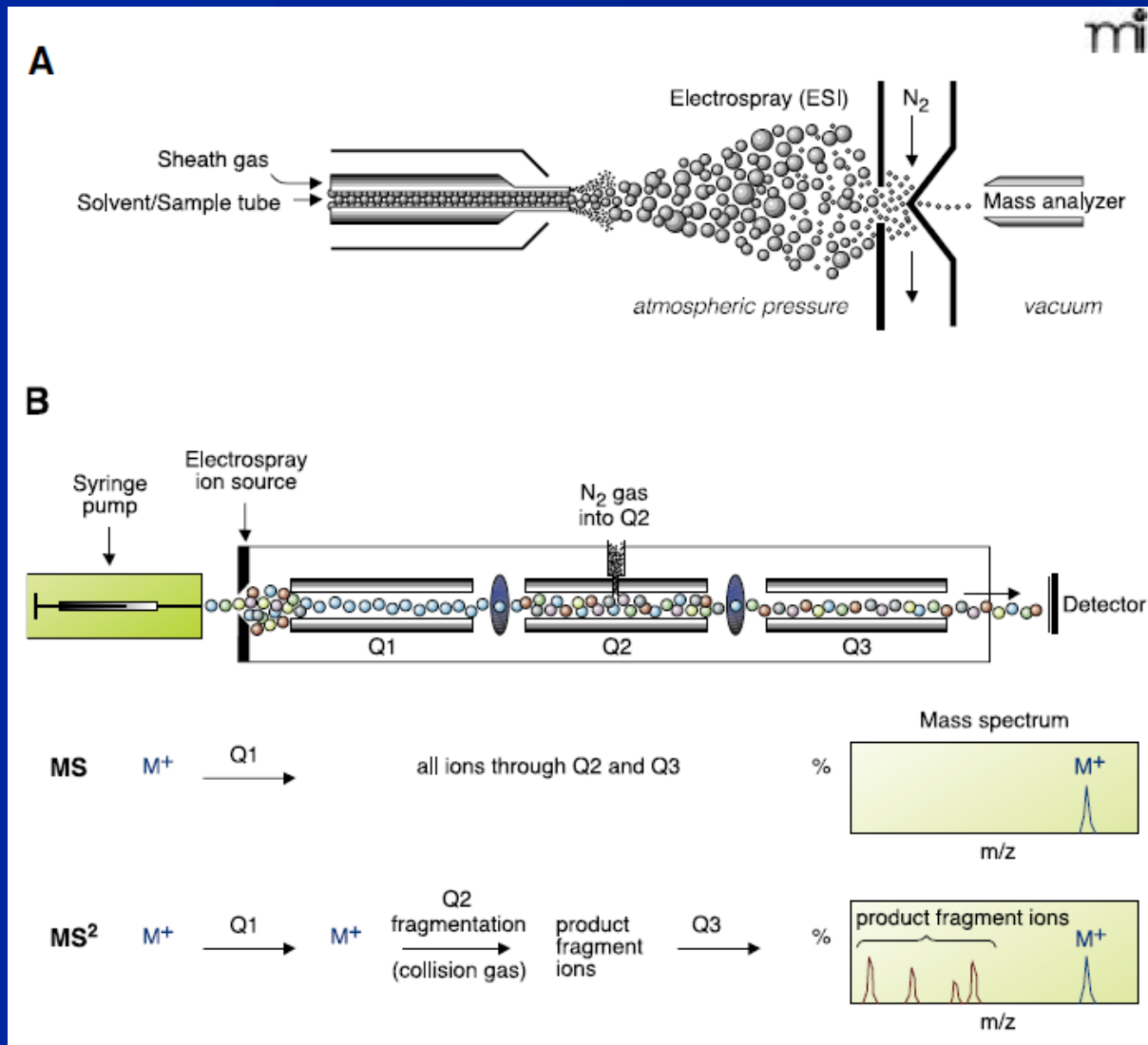
# FLUORIMETRICKÉ/HPTLC STANOVENÍ PLA<sub>2</sub>



# HPLC (SKUPINOVÉ) STANOVENÍ FOSFOLIPIDŮ



# Electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometer (ESI-MS)



molekulární ionty

fragmentační spektrum

# MASTNÉ KYSELINY

## NASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY („SFA“):

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

## METODY STANOVENÍ:

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

## NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY („MUFA“, „PUFA“):

- olejová (18:1)
- linolová (18:2, příklad n-6 kyseliny)
- linolenová (18:3)
- arachidonová (20:4)
- eikosapentaenová (20:5)
- dokosahexaenová (22:6)

HPLC / fluorimetrická detekce  
nebo HRGC/MS



# DERIVATIZACE MASTNÝCH KYSELIN

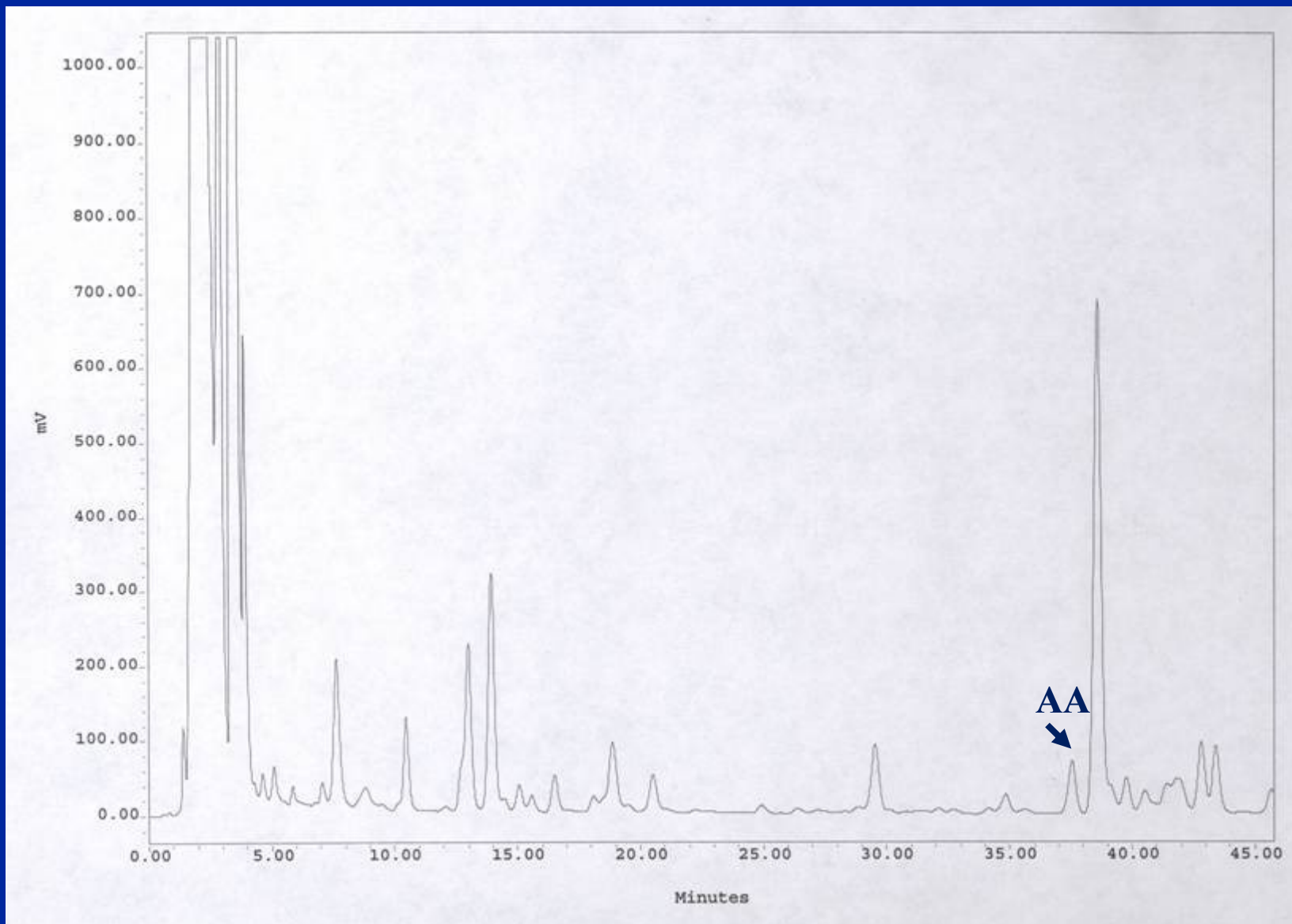
Derivatizace v HPLC se používá z následujících důvodů:

- zvýšení citlivosti nebo umožnění detekce vůbec
- zvýšení rozlišení nebo umožnění separace vůbec
- zamezení nežádoucí sorpce látek na koloně.

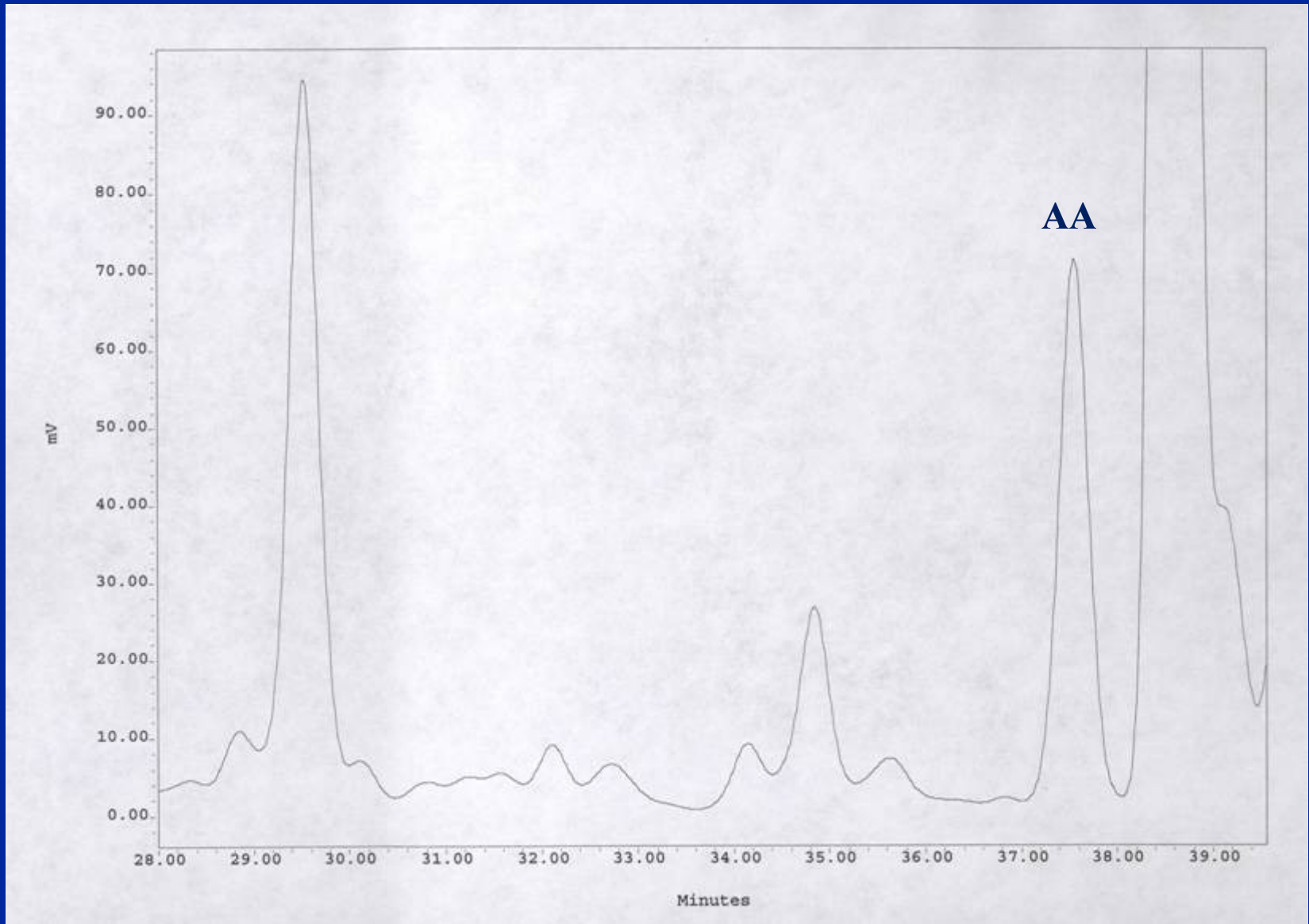
Způsoby derivatizace:

- Předkolonová derivatizace (pre-column chromatography); chemická reakce probíhá před kolonou
- Postkolonová derivatizace (post-column chromatography); chemická reakce probíhá za kolonou
- Derivatizace na koloně; chemická reakce probíhá přímo v koloně

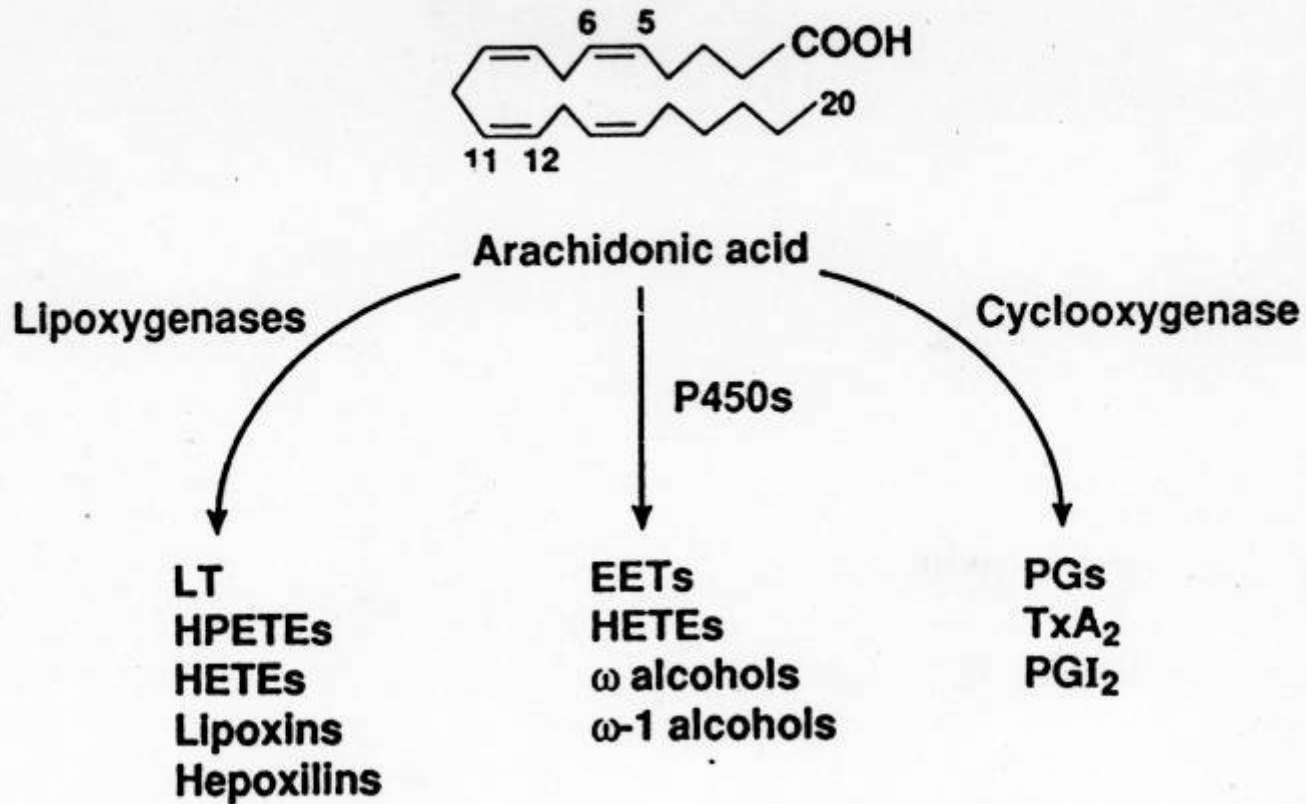
# HPLC analýza karboxylových kyselin po derivatizaci pyrenyldiazomethanem



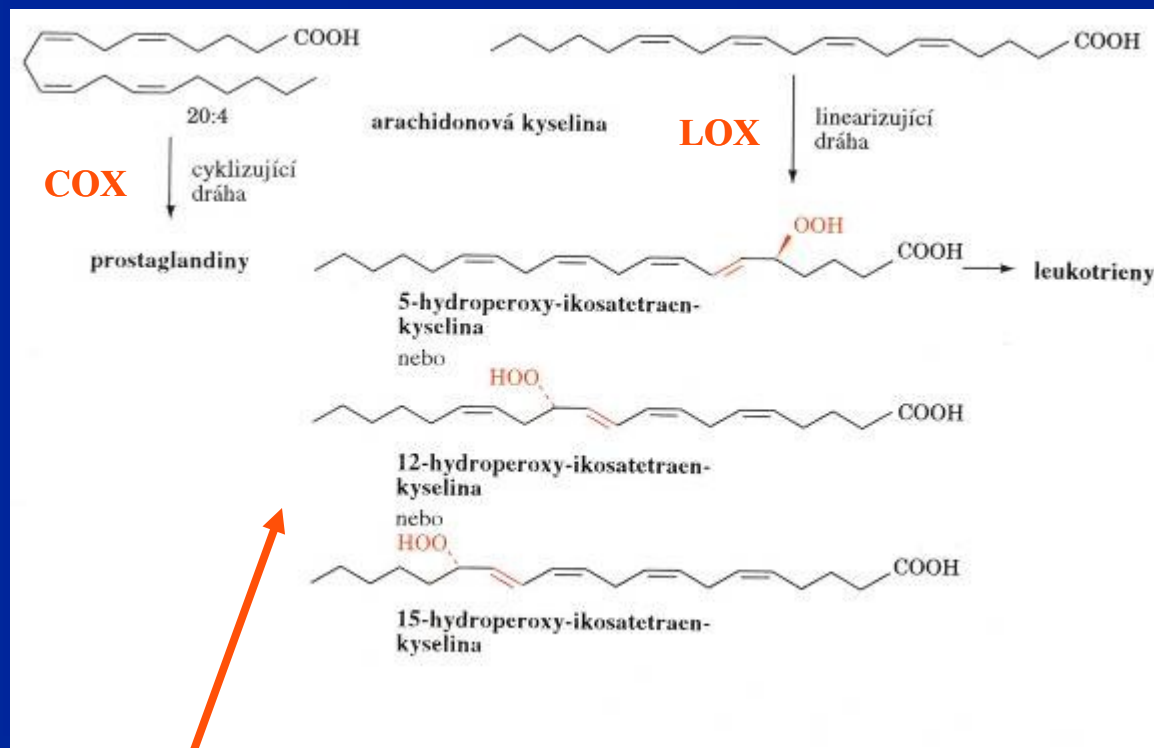
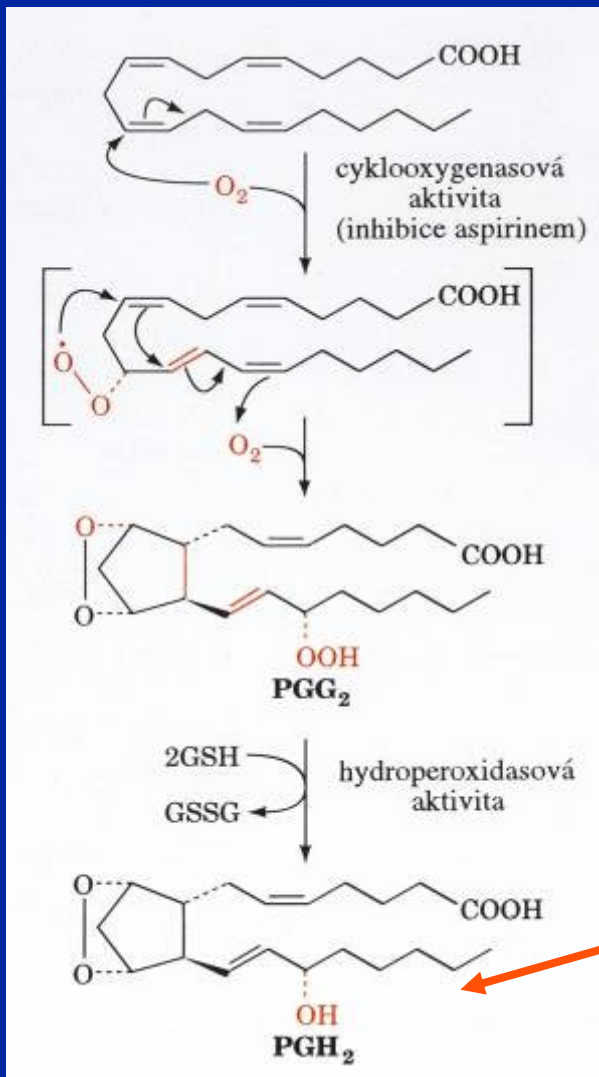
# HPLC analýza karboxylových kyselin po derivatizaci PDAM (fluor. detekce)



# EIKOSANOIDY

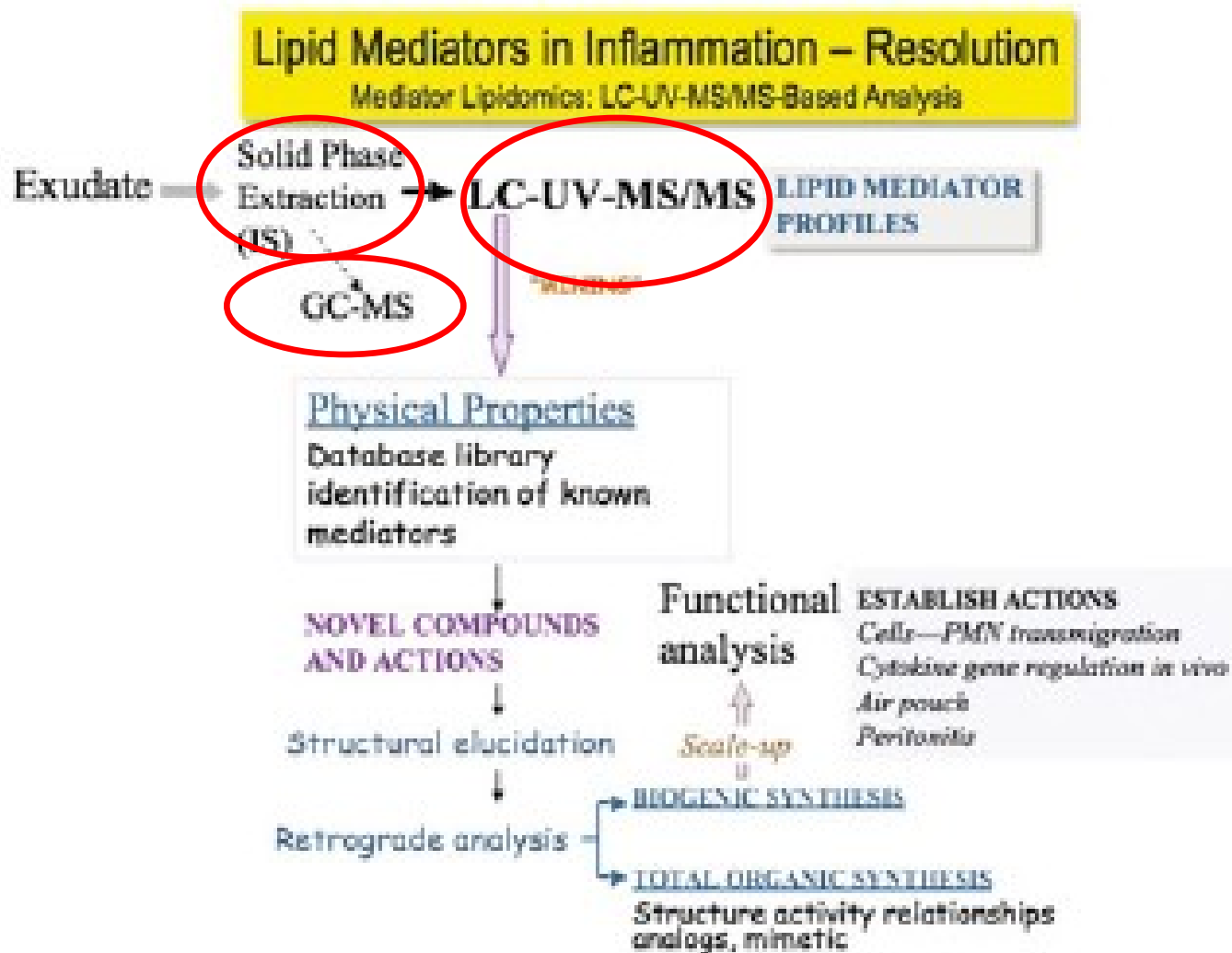


# KYSELINA ARACHIDONOVÁ = PREKURSOR



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

# STANOVENÍ MEDIÁTOROVÝCH LIPIDNÍCH MOLEKUL



# KONTEXT LIPIDOMICKÝCH ANALÝZ

# SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS

# CELLULAR EVENTS (SPECIFIC PROTEIN TARGETS)

Membrane Receptors

Ras, Rho, PLA<sub>2</sub>, PLC

Arachidonic Acid, Reactive Oxygen Species, Ca<sup>2+</sup>, DNA Damage, Sphingolipids, PGs, LTs

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

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

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)



# STRATEGIE DETEKCE KLÍČOVÝCH SIGNÁLNÍCH DRAH MECHANISMŮ TOXICITY XENOBIOTIK

**EXPOZICE TESTOVANÝMI LÁTKAMI**

specifické inhibitory, gene expression silencing, ..

Specifické inhibitory CYP, COX, LOX, PLA2, PI-PLC, PC-PLC, a MAPK; antioxidant; suprese gen. exprese TF nebo individuálního genu)

**AKTIVACE ENZYMŮ**

**MODULACE SIGNÁLNÍ TRANSDUKCE A GEN. EXPRESE**

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

