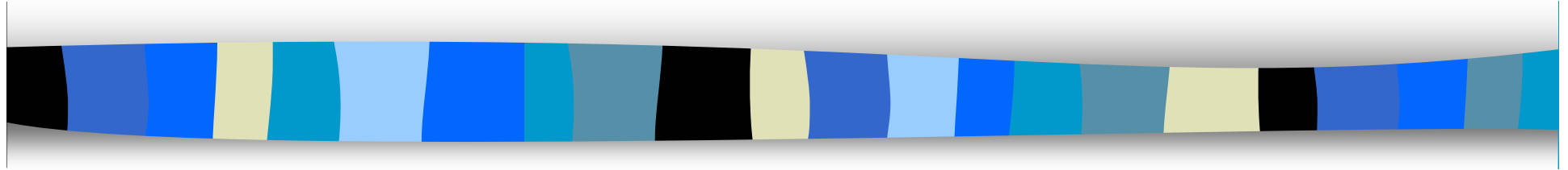


Metodické přístupy

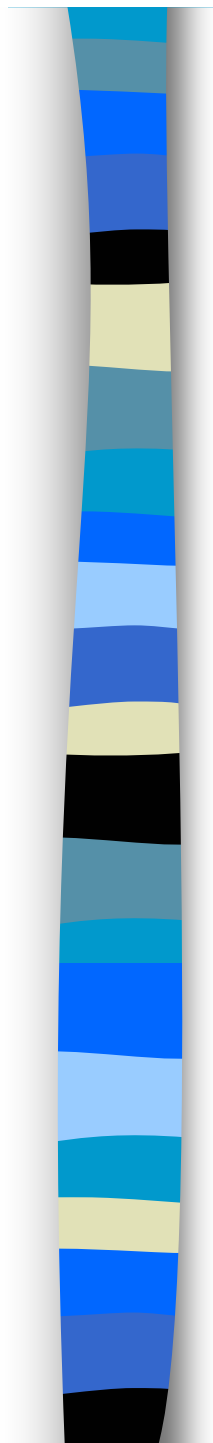


*ke studiu metabolismu
xenobiotik*



Mezidruhové rozdíly v metabolismu xenobiotik

- **cílové species - zemědělské plodiny**
- **experimentální species - *Arabidopsis thaliana*, *Tabaccum***



| rostlina | typ kultury | poč.koncentrace | | produkty (mg/l) | | | |
|-------------------------------------|----------------------|-----------------|--------|-----------------|-----|-------|-------|
| | | TNT | čas | TNT | TNB | 4ADNT | 2ADNT |
| <i>Solanum aviculare</i> | suspenzní kultura | 50 | 24hod | 0,0 | 0,0 | 4,5 | 1,7 |
| | | | 12dní | 0,0 | 0,0 | 2,8 | 1,1 |
| <i>Rheum palmatum</i> | suspenzní kultura | 50 | 24hod | 0,0 | 0,0 | 1,3 | 0,4 |
| <i>Saponaria officinalis</i> | suspenzní kultura | 100 | 7hod | 1,2 | 0,4 | 11,5 | 0,0 |
| | kalusová kultura | 100 | 48 hod | 9,5 | 8,5 | 6,3 | 3,0 |
| | | 50 | 48hod | 4,5 | 4,5 | 3,4 | 1,7 |
| | | 25 | 48 hod | 2,0 | 1,0 | 0,8 | 0,5 |
| <i>Helianthus annuus</i> | hydroponie | 100 | 13dní | 56,2 | 0,0 | 0,4 | 0,5 |
| <i>Populus nigra</i> | suspenzní kultura | 100 | 8hod | 1,5 | 0,0 | 3,8 | 0,9 |
| | sterilne kultiv. ros | 30 | 15dní | 0,0 | 1,8 | 1,2 | 0,7 |
| | | 60 | 15dní | 0,0 | 4,9 | 1,7 | 1,8 |
| <i>Populus tremula</i> | sterilne kultiv. ros | 30 | 15dní | 0,0 | 0,0 | 6,8 | 0,0 |
| | | 60 | 15dní | 0,0 | 0,0 | 12,4 | 0,0 |
| <i>Panax gingsen</i> | suspenzní kultura | 100 | 7hod | 18,9 | 0,0 | 1,5 | 1,8 |
| | | 100 | 24hod | 3,3 | 0,0 | 3,0 | 1,8 |
| <i>Armoracia rusticana</i> | kořenová kultura | 100 | 8 hod | 41,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | | 100 | 24 hod | 37,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Linum usitatissimum</i> | suspenzní kultura | 100 | 8hod | 15,8 | 0,0 | 0,7 | 5,7 |
| <i>Phragmites australis</i> | sterilne kultiv. ros | 100 | 7dní | 1,7 | 0,0 | 0,8 | 0,6 |
| <i>Juncus glaucus</i> | sterilne kultiv. ros | 100 | 7dní | 2,0 | 0,0 | 0,8 | 0,0 |
| <i>Typha platifolia</i> | sterilne kultiv. ros | 100 | 7dní | 14,6 | 0,0 | 1,6 | 0,0 |
| <i>Carex gracillis</i> | sterilne kultiv. ros | 100 | 7dní | 4,9 | 0,0 | 1,4 | 0,0 |



Mezidruhové rozdíly v zastoupení, aktivitě a vlastnostech enzymů

■ Příčina:

- Rozdíly v genetické výbavě
 - Rozdíly v aminokyselinovém složení
- Rozdíly v expresi genů

■ Důsledek:

- Rozdíly v biotransformaci xenobiotika
- Rozdíly v odpovědích na přítomnost induktoru, inhibitoru

■ Problematická extrapolace dat



Význam mezidruhového porovnání určité metabolické přeměny

- **výběr modelového systému pro predikci této biotransformace u cílové species (mechanismus, vliv faktorů)**
- **výběr biologického systému pro biosyntézu jinak nedostupných metabolitů**



Experimenty *In vivo* – postup

- **Výběr species**
- **Aplikace**
- **Odběr**
- **Dávka**
 - **Závisí na typu experimentu, toxicitě, rozpustnosti**
- **Časové intervaly odběrů**
- **Extrakce**
- **Analýza (HPLC, GC-MS, NMR)**
 - **Modifikace analytické metody**



Experimenty *In vivo* - využití

- stanovení metabolitů podaného xenobiotika
- studium indukčního nebo inhibičního vlivu xenobiotika na biotransformační enzymy



Experimenty *In vivo* – výhody, nevýhody

■ Výhody:

- Nezastupitelnost- řada získaných informací a výsledků není nahraditelná experimenty *in vitro*

■ Nevýhody:

- vysoké nároky na čas, počasí, prostory..
- Náročná manipulace, zpracování
- Omezené provedení u cílových species



Typy *in vitro* modelových systémů

Volba závisí na:

- studované problematice**
- technickém vybavení a finančních možnostech pracoviště**



Explantátové kultury

- tkáňové kultury
- buněčné kultury
- *in vitro* semenáčky, regeneranty

Totipotence

– schopnost obnovit v průběhu
diferenciačních procesů
specializované funkce a postupně
regenerovat ve fertilní rostlinu



Kultivace (pěstování) TK

- Sterilní prostředí
- Živná média
- Pasážování
- Typy kultur
- Způsoby kultivace



Kultivační media

- **Makroelementy**
- **Mikroelementy**
- **Růstové regulátory – auxiny**
 - cytokoniny
 - kys.abscisová
 - ethylén
 - gibereliny
- **Vitamíny**
- **Cukry**

Složení kultivačního média MS pro in vitro kultivace.

| | | |
|--|---|--------|
| Makroživiny [mg.dm ⁻³ media] | NH ₄ NO ₃ | 1650 |
| | KNO ₃ | 1900 |
| | KH ₂ PO ₄ | 170 |
| | CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 332 |
| | MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 74 |
| Mikroživiny [mg.dm ⁻³ media] | | |
| | H ₃ BO ₄ | 6.200 |
| | KI | 0.830 |
| | Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0.250 |
| | CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 0.025 |
| | MnSO ₄ x 5 H ₂ O | 24.000 |
| | ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 8.600 |
| | CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 0.025 |
| | Na ₂ EDTA | 37.300 |
| | FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 27.800 |
| Vitaminy [mg.dm ⁻³ media] | | |
| | inositol | 100.0 |
| | thiamin | 0.4 |
| Cukr [g.dm ⁻³ media] | | |
| | sacharosa | 30.0 |
| | pH | 5.7 |

Kultivace *in vitro* (semenáčky, regeneranty)



Kořenové kultury



Kalusové kultury



Suspenzní (buněčné) kultury



Bioreaktor (fermentor)

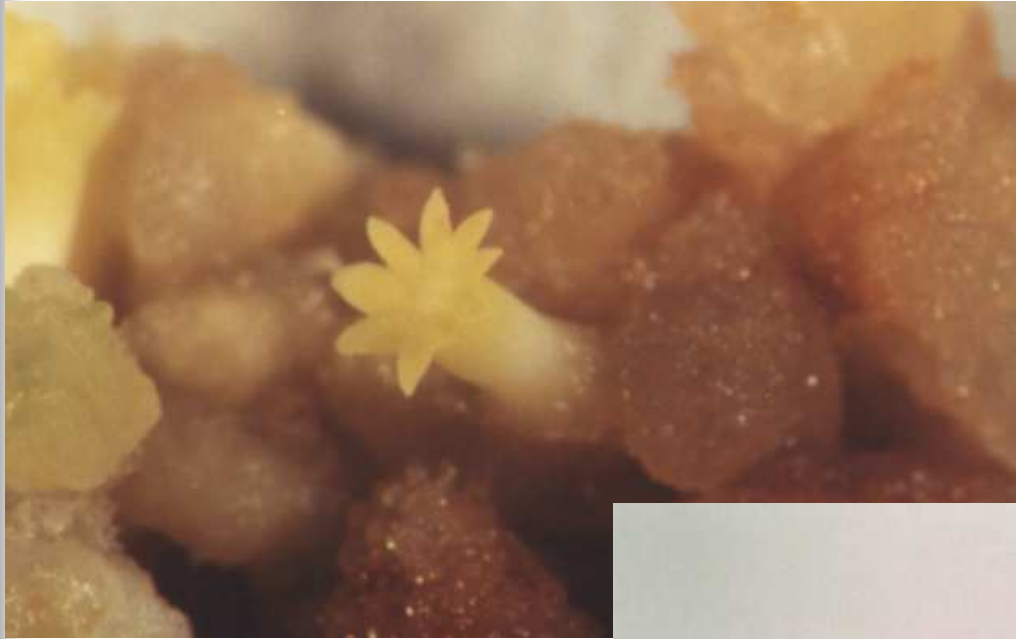




Využití

- **Mikropropagace**
- **Přenos genů**
- **Produkce přírodních látek**
- **Biotransformace xenobiotik**
- **Modelový systém**

Mikropropagace



Somatická
embryogeneze



Smrk ztepilý (*Picea abies*)



Produkce

- **Předpoklad produkce stejných látek jako u výchozí rostliny**
- **Nezávislost na klimatických podmínkách**
- **Možnost nadprodukce**
- **Rychlý nárůst biomasy ve fermentorech**



Primární metabolity

nepostradatelné pro všechny druhy vyšších rostlin

- **Sacharidy**
- **Mastné kyseliny**
- **Lipidy**
- **Aminokyseliny**
- **Některé proteiny**
- **Kyselina šikimová**
- **Kyselina skořicová**



Sekundární metabolity

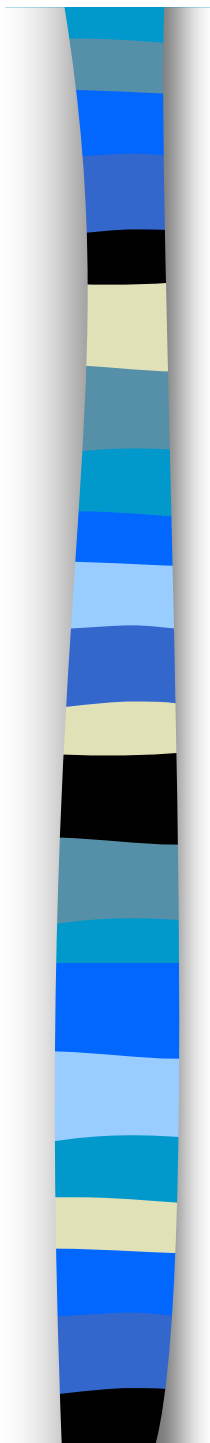
velké množství, často specifické pro jednotlivé druhy

- **Glykoproteiny**
- **Alkaloidy**
- **Isoprenoidy**
- **Flavonoidy**



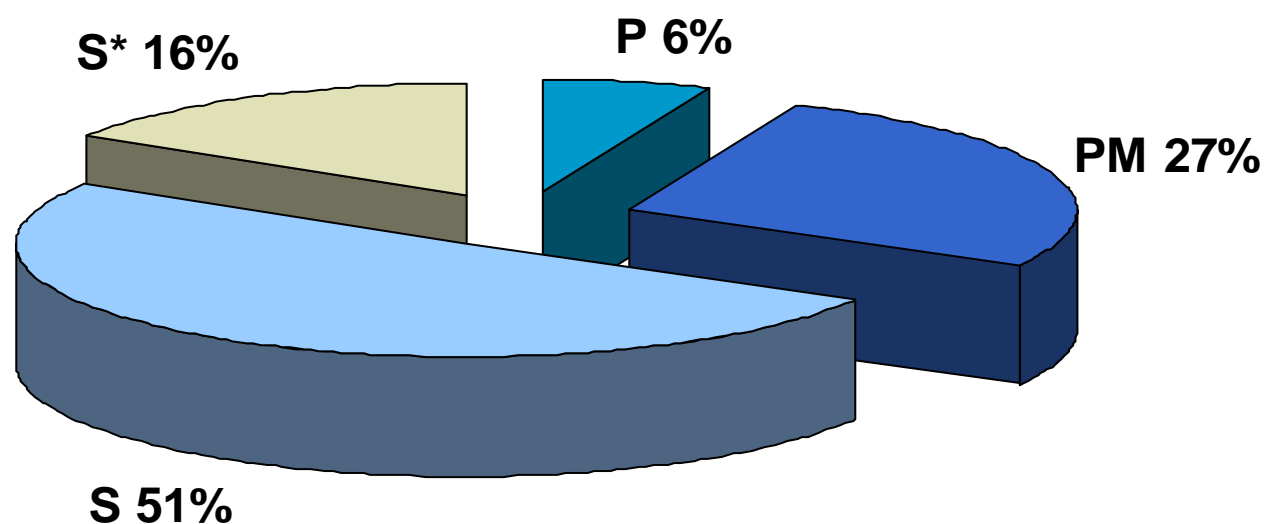
Funkce sekundárních metabolitů

- **Růstové inhibitory**
- **Insekticidy**
- **Antivirální sloučeniny**
- **Bakteriocidní a fungicidní sloučeniny**
- **Antitumorové sl.**
- **„anti-feedant“**



| Skupina látek | Počet známých zástupců (1984) | Rozšíření v biosféře | | |
|--|----------------------------------|----------------------|----------|-------------|
| | | mikroorganismy | rostliny | živočichové |
| A. Látky odvoditelné od sacharidů | | | | |
| Polysacharidy | 300 | + | + | + |
| heteroglykosidy | 110 | + | + | + |
| B. Deriváty kyseliny octové | | | | |
| deriváty acetylenu | 750 | + | + | - |
| polyketidy | 500 | + | + | - |
| C. Isoprenoidy | | | | |
| monoterpeny | 1 000 | + | + | + |
| seskviterpeny | 1 000 | + | + | + |
| diterpeny | 1 000 | + | + | + |
| karotenoidy | 600 | + | + | - |
| steroidy | 1 000 | + | + | + |
| D. Látky odvozené od dehydrochinové, šikimové a chorismové kyseliny | | | | |
| naftochinony | 3 000 | + | + | - |
| antrachinony | | + | + | - |
| fenoxyaziny | | + | + | - |
| chinoliny | | + | + | - |
| akridiny | | + | + | - |
| benzodiazepiny | | + | + | - |
| flavonoidy | | + | + | - |
| E. Deriváty aminokyselin | | | | |
| nekódované | | | | |
| aminokyseliny | 700 | + | + | + |
| aminy | 30 | + | + | + |
| kyanogenní glykosidy | 30 | - | + | + |
| glukosinoláty | 80 | - | + | - |
| kumariny | 800 | - | + | - |
| lignany | 50 | - | + | + |
| F. Alkaloidy | 7 000 | - | + | - |
| G. Antibiotika | 6 000 | + | - | - |

Přírodní látky jako zdroje nových léčiv v období 1981-2002



P - přírodní látka

PM - semisynteticky modifikovaná přírodní látka

S - syntetická látka

S* - syntetická látka připravená na podle vzoru přírodní látky

Přírodní cytostatika

Sekundární metabolity rostlin



Colchicum autumnale
kolchicin



Vinca minor
vinka alkaloidy



Viscum album
viscotoxiny

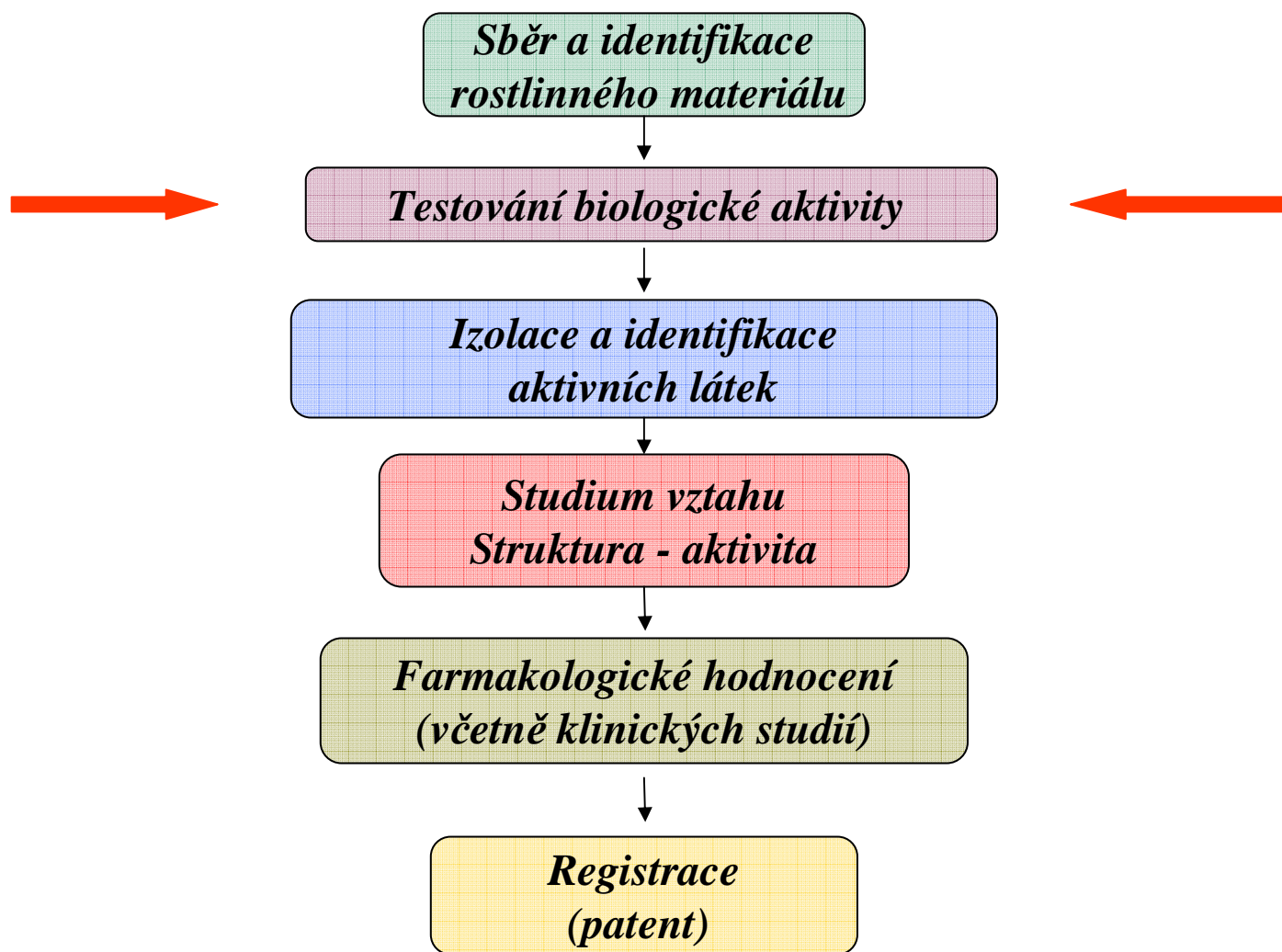


Camptotheca acuminata
camptotecin



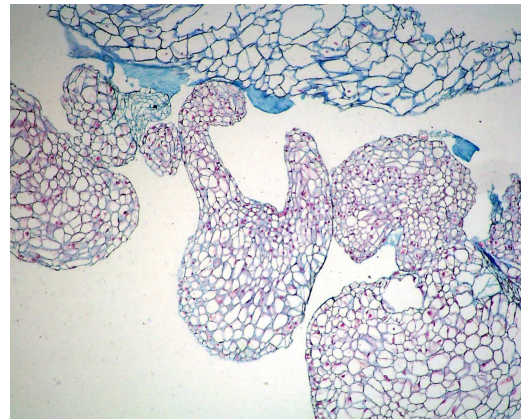
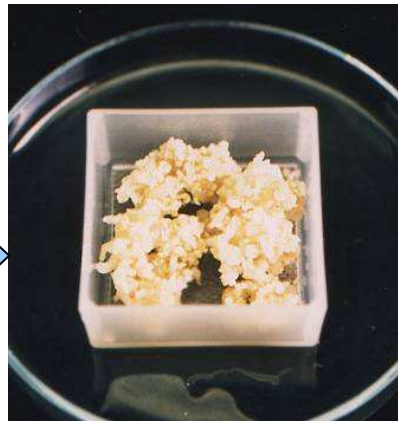
Taxus brevifolia
taxol

Postup při hledání léčiv z rostlin



Žeňšen (*Panax ginseng*)

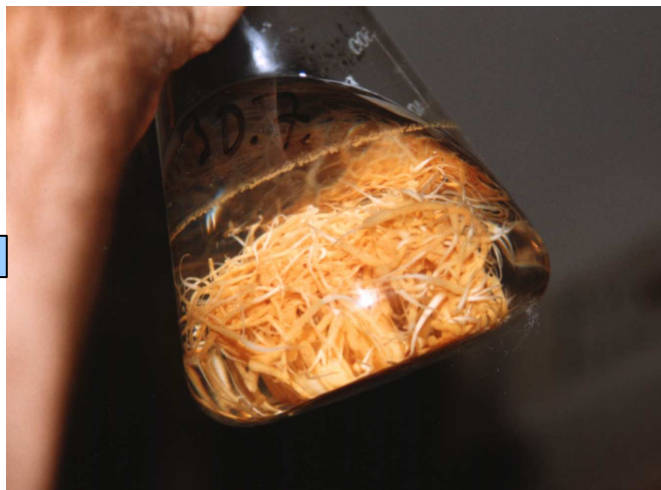




**Initiation of
adventitious root
culture**



**Bioreactor
system**





Biotransformace

- chemické reakce, kterým podléhají organické látky působením enzymů nebo enzymových systémů živých organismů
- přeměny se většinou týkají jen některých částí molekuly, velmi často se nemění její skelet



Biotransformační reakce

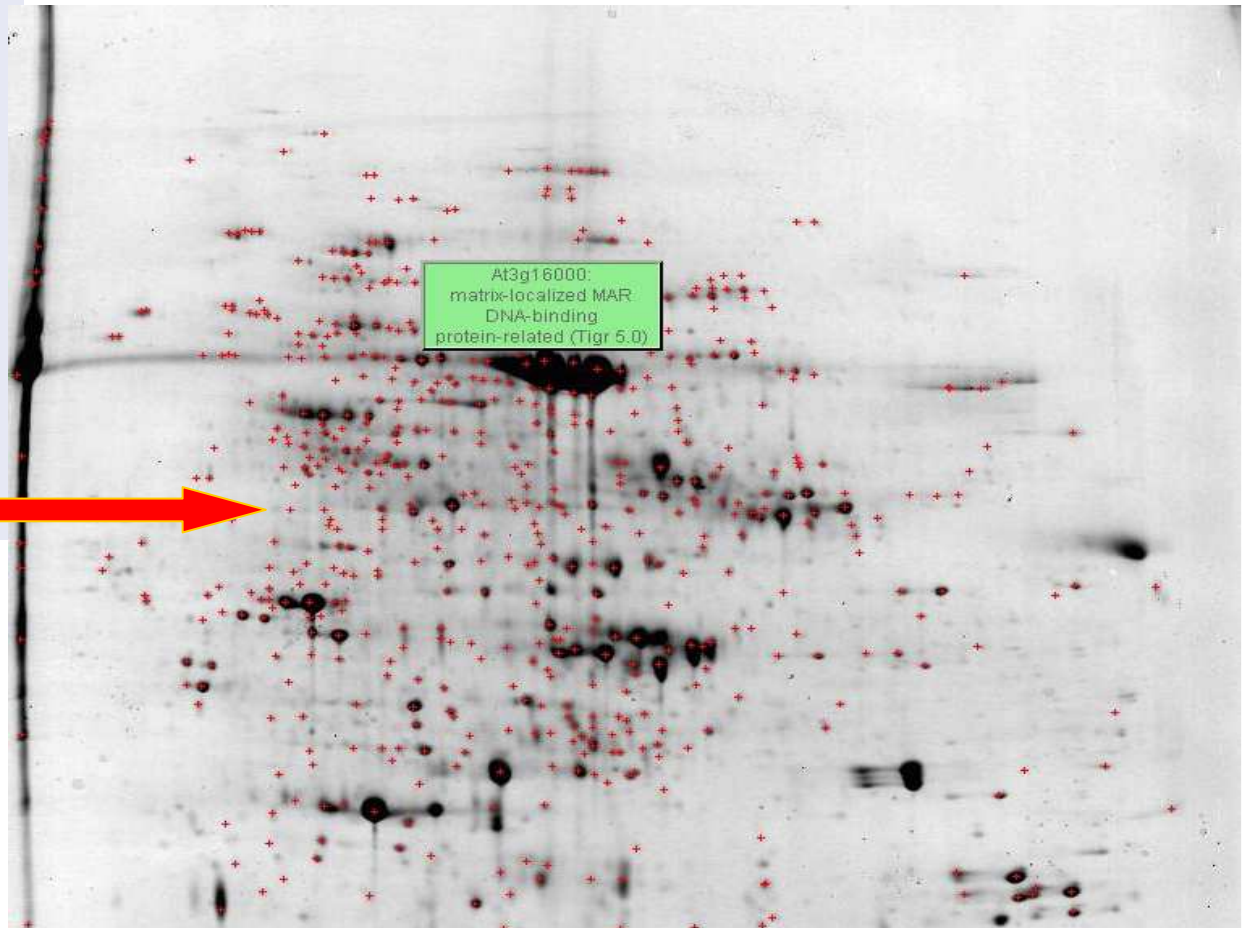
- **Hydroxylace**
- **Oxidační a redukční**
- **Redukce dvojné vazby C=C**
- **Glykosylace**
- **Hydrolýza**
- **Esterifikace**
- **Epoxidace**
- **Isomerizace**
- **Methylace**



Substráty

- **Xenobiotika** (syntetické látky, chemická analoga, sekundární metabolity jiných rostlin nebo živočichů)-detoxikační reakce, neznámý produkt
- **Přirozený s.-** produkt známý (neplatí u TK)

Proteomika



Proteom

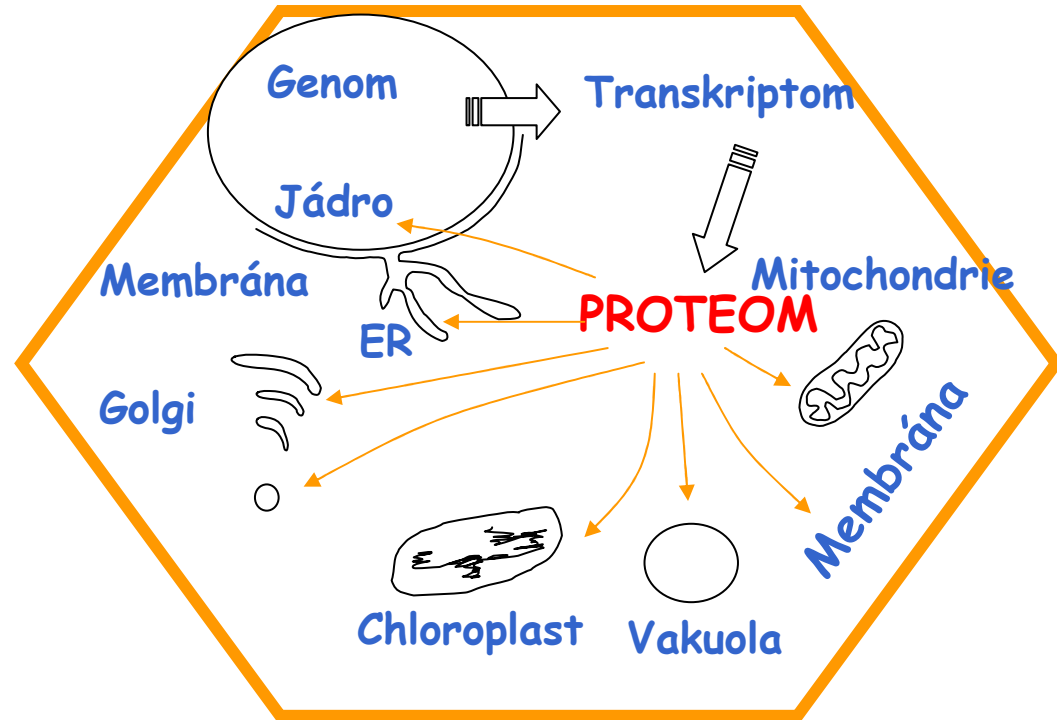
= soubor všech proteinů určitého systému

- orgány, buňky, pletiva, orgánu, organismu

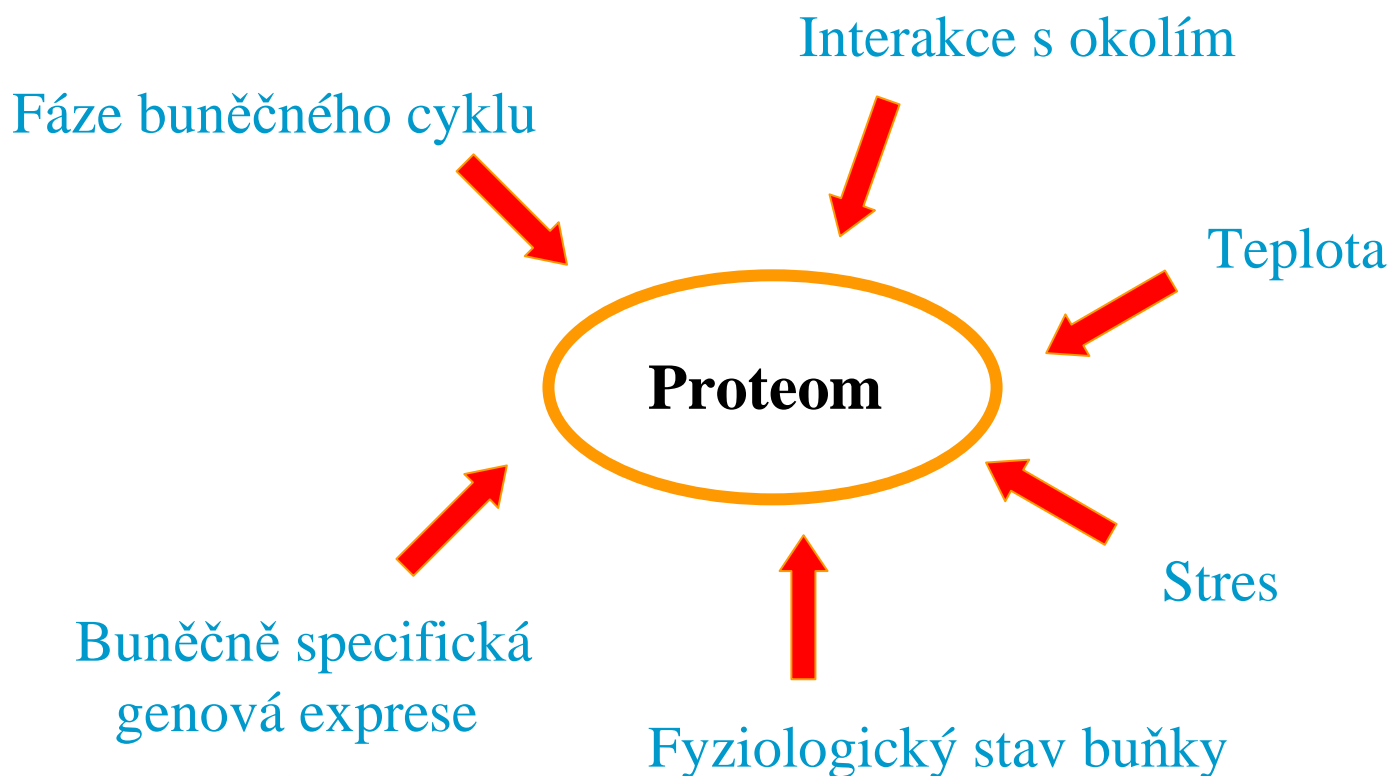
- zahrnuje i všechny stavy proteinů (posttranslační modifikace = protein kódovaný jedním genem je přítomen ve více funkčně odlišných formách)

- *Arabidopsis thaliana* ~ 25 500 genů, ~ 100 tis. proteinů
(Arabidopsis Genome Initiative, 2000)

(člověk cca 30 tis. genů a cca 500 tis. proteinů)



Faktory ovlivňující proteom buňky



Genom

Proteom se dynamicky mění v průběhu buněčného cyklu, vývoje, v reakci na změny v metabolismu, prostředí, ...



Cíle proteomiky

Identifikace všech proteinů produkovaných určitou buňkou, tkání nebo organismem, s následným stanovením:

a) jejich exprese v různých buňkách daného organismu

expresní proteomika

b) jejich subcelulární lokalizace v různých organelách

c) jejich posttranslačních modifikací

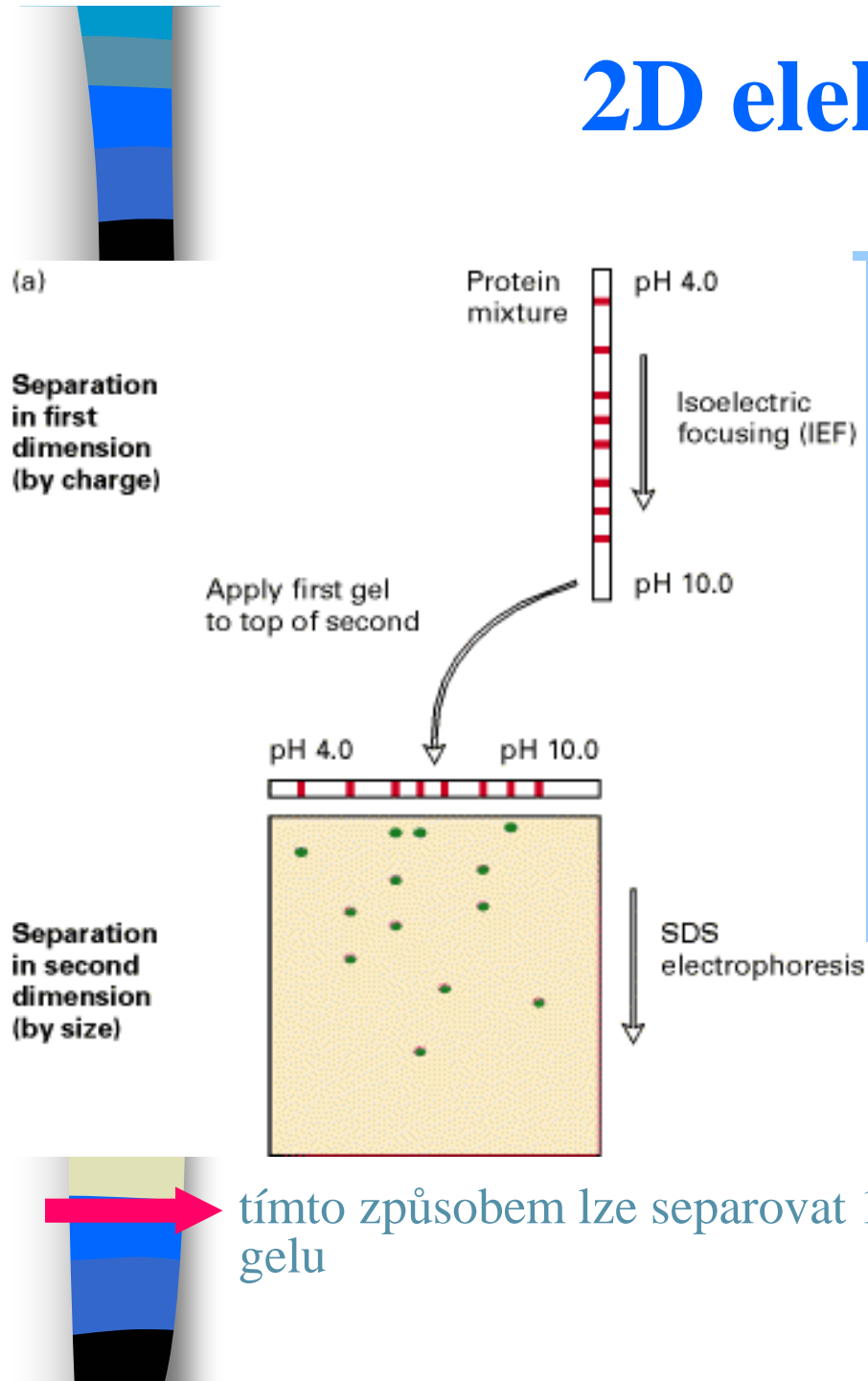
d) jejich vzájemných interakcí

strukturní proteomika

e) vztahu mezi strukturou a funkcí

funkční proteomika

2D elektroforéza

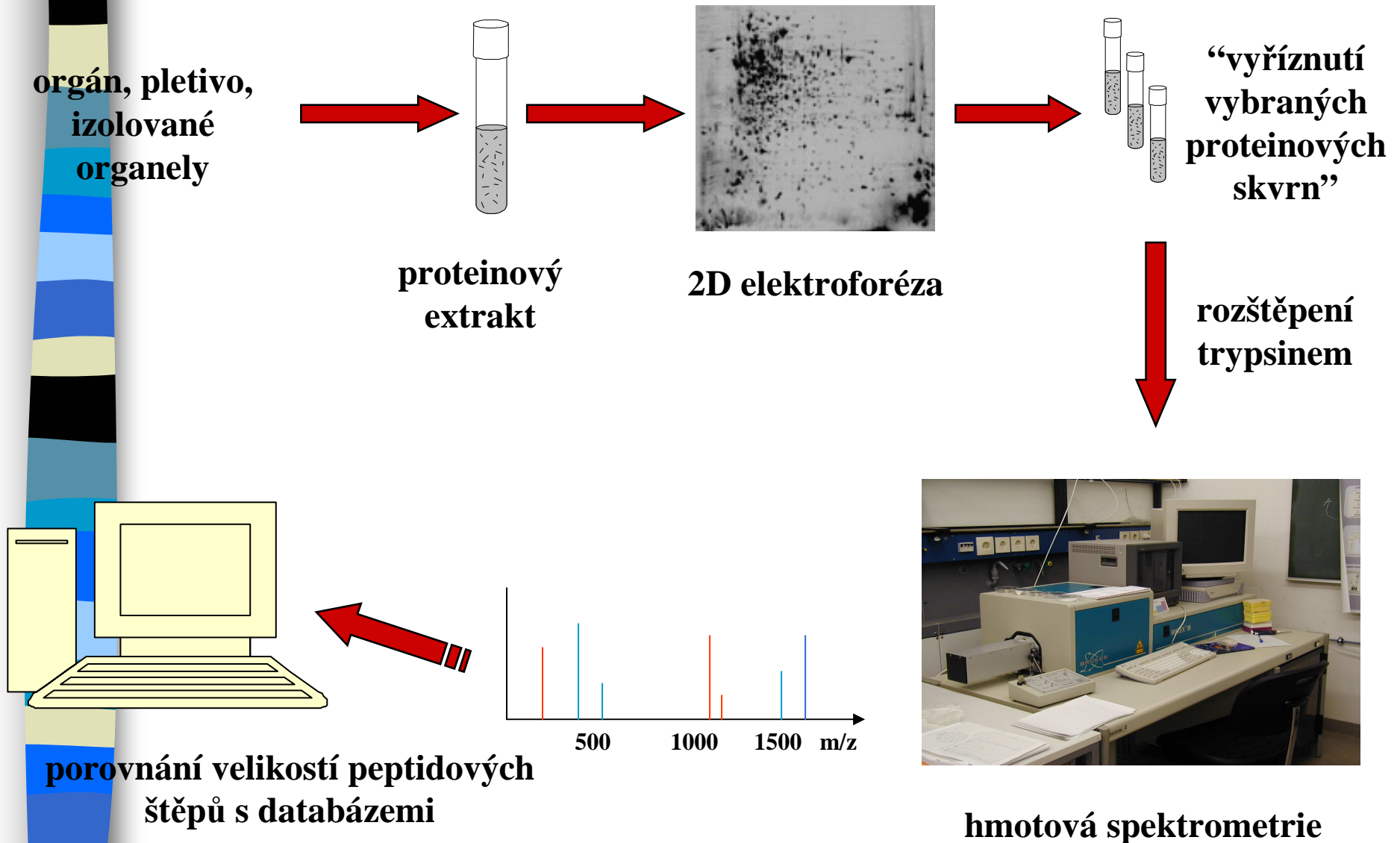


- kombinuje použití IEF a SDS-PAGE
- dodnes nepřekonaný komplexní způsob separace proteinů

směs proteinů nejprve separována IEF v přítomnosti močoviny na tzv. stripu
IEF gel je přenesen na plochý gel pro SDS-PAGE elektroforéza

tímto způsobem lze separovat 1000 - 2000 proteinů v závislosti na formátu gelu

Schéma proteomického experimentu



Experimentální uspořádání pro DIGE

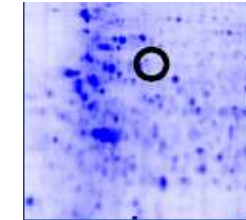
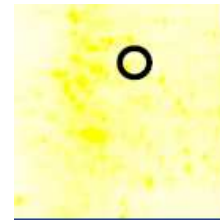
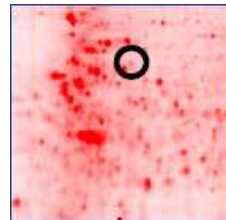
Značení a
míchání
vzorků



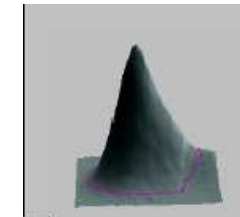
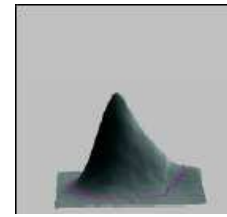
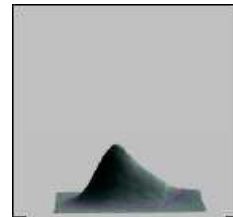
2 DE
separace



Získávání
proteínové
mapy



Analýza
proteínových
map

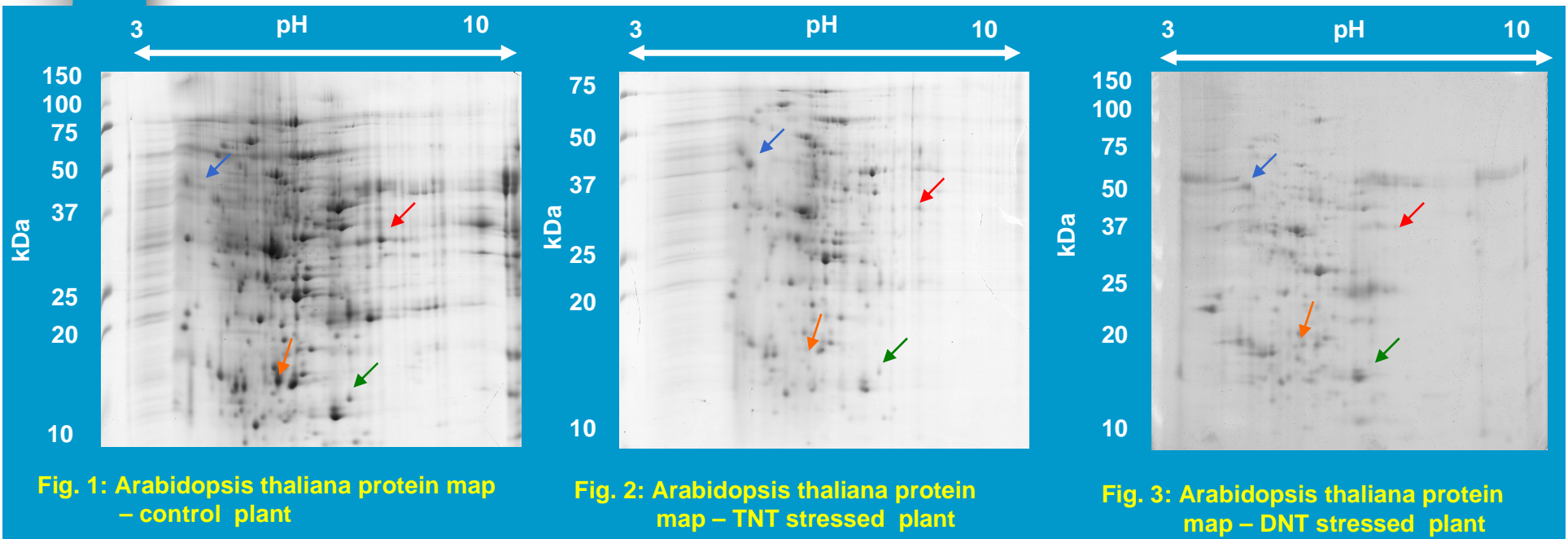




Využití proteomiky v praxi

- ověření změny v poloze nebo expresi proteinů
- porovnání standardních organismů (wild-type) s mutanty
- porovnání vyšlechtěných odrůd
- hodnocení stresu
- příprava transformovaných rostlin s požadovanými vlastnostmi
- studium fytořemediace – nalezení a identifikace proteinů účastnících se procesu fytořemediace

Porovnání získaných proteinových map stresovaných rostlin





Subcelulární frakce

■ Diferenční centrifugace

- 1 000g –zbytky buněčné membrány, jádra
- 20 000g –mitochondrie
- 105 000g –mikrosomy
- zbytek –cytosol

- Základní detekce metabolitů
- Lokalizace a charakterizace metabolické přeměny
- Nepřímá identifikace enzymu katalyzujícího metabolickou přeměnu
 - Specifický induktor, substrát, inhibitor
- Inhibiční studie
- Nepřímé stanovení aktivit biotransformačních enzymů
 - Specifický substrát



Izolované enzymy

■ Izolace

- Klasická z rostlinné tkáně
- Exprese příslušného genu v bakteriích, kvasinkách buněčných liniích a následná izolace z kultury – příprava rekombinantních enzymů

■ Inkubace

- Izolovaný enzym s xenobiotikem
- Rekonstituovaný systém s xenobiotikem

■ Extrakce, analýza



Izolované enzymy

- **Určení struktury biotransformačních enzymů**
- **Studium vazebného a katalytického místa**
- **Sledování interakce xenobiotika s enzymem**
- **Přímý důkaz účasti určitého enzymu na metabolické přeměně xenobiotika**
- **Příprava protilátek**



Western blot

= umožňuje detekovat určitý protein ve směsi proteinů

Princip a postup

1. Elektroforéza:

nejčastěji SDS-PAGE, vzorek může obsahovat buď přímo směs proteinů anebo se může jednat o vzorek tkáně či buněčné kultury

2. Blotování:

přenášení proteinů na membránu - nejčastěji na nitrocelulosovou, popř. na PVDF-membránu. Přístroj ("blotátor") je realizován jako soustavy anoda (spodní díl) a katody (horní díl = víko). Na anodu se položí papír namočený do pufru, na papír membrána, pak gel a nakonec zase namočený papír. Vznikne sendvič a po zaklapnutí víkem a spuštění se záporně nabitě proteiny účinkem el. pole přenesou z gelu na membránu umístěnou pod gelem (přitahuje je kladně nabitá anoda tvořící dno přístroje).

3. Reakce proteinů s protilátkou:

Po přenosu proteinů na membránu se membrána nechá inkubovat s něčím, co blokuje nespecifické navázání protilátky na membránu. Poté se přidá primární protilátka, která s našim proteinem specificky interaguje. Po promytí se přidá sekundární protilátka, tj. která je nějakým způsobem značena

Klady a zápory:

+ poměrně jednoznačná identifikace proteinu ve směsi

- nutnost mít primární protilátku, jinak je WB neuskutečnitelný

Dot (Slot)-Blot



Product Name:

Minifold I Dot-Blot, Spot-Blot and Slot-Blot Systems

Product Description:

The Minifold I Systems consist of manifold devices for nucleic acid and protein dot and slot-blotting. The original 96-well dot-blot format generates even, uniform dots and features an O-ring design which eliminates sample cross-talk. The 96-well spot-blot format offers a very small size, making it ideal for small sample amounts. The 48-well slot-blot is compatible with densitometric scanning. All three formats can be used with multi-channel pipettors.



Izolované enzymy-

výhody, nevýhody

■ Výhody

- Experimenty s jediným enzymem
- Nezastupitelný modelový systém

■ Nevýhody

- Technická náročnost izolačního postupu
- Při klasické izolaci velká spotřeba materiálu
- Rekombinantně připravený enzym nemusí mít stejné vlastnosti jako „nativní“
- Nalezené údaje nemusí odpovídat situaci *in vivo*



Děkuji za pozornost