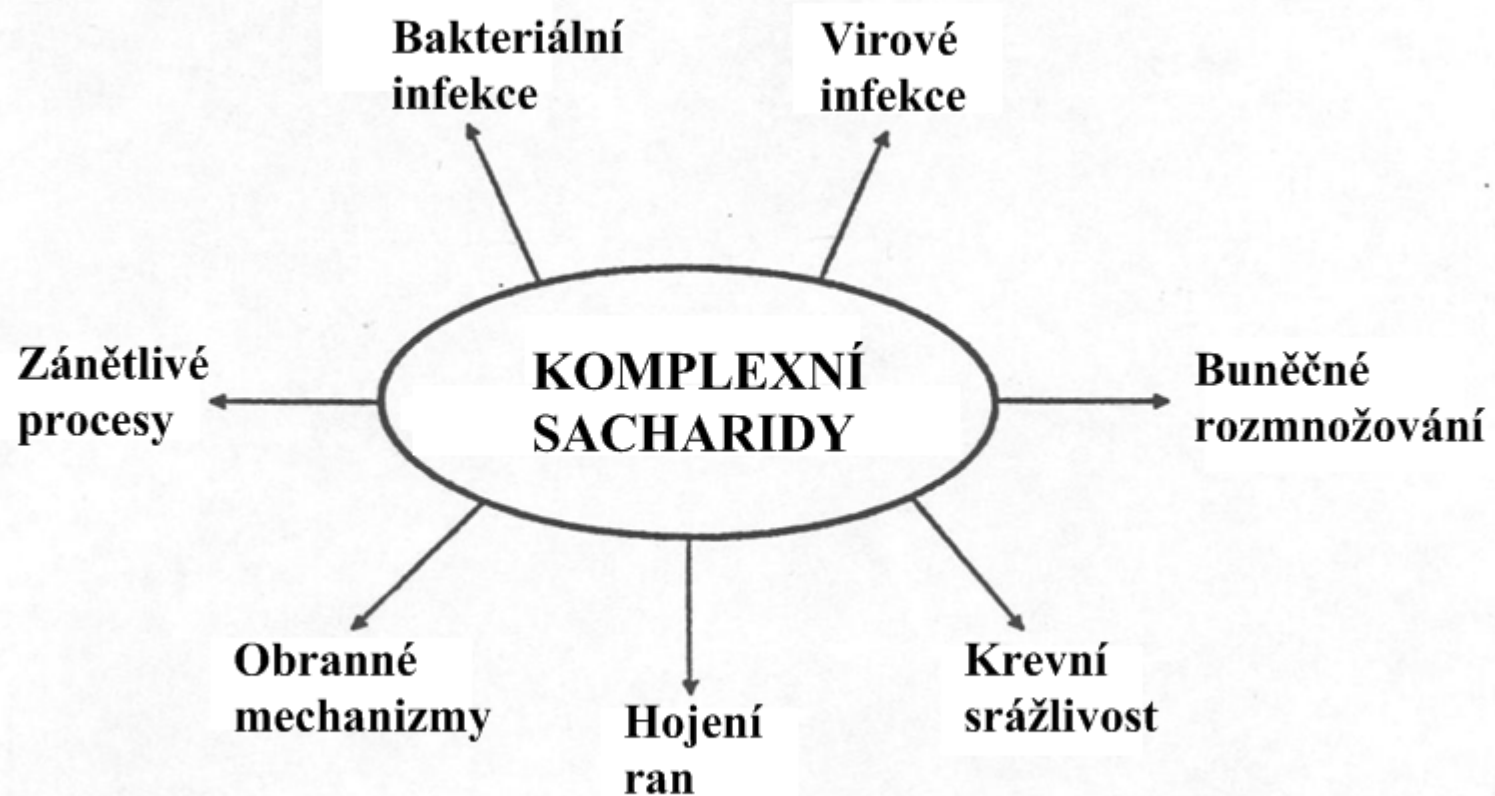


CO JE ANALYTICKÁ GLYKOBIOLOGIE?

- - Relativně nová vědní oblast integrující nové přístupy k měření základních biologických procesů na buněčné a molekulární úrovni. Staví na znalosti úlohy konjugátů důležitých látek jako jsou bílkoviny (proteiny) a lipidy, ve spojení s cukernými složkami biologické hmoty, takzvanými oligosacharidy (nebo glykany). Zde hovoříme o takzvaných glykoproteinech, glykolipidech a proteoglykanech.
- - I když význam těchto cukerných látek (glykonjugátů) pro selektivní regulaci důležitých buněčných procesů je zřejmý po více než dvě desetiletí, do nedávné doby nebylo možné tyto biologicky důležité procesy kvantitativně vyhodnotit.

ROLE MODERNÍ ANALYTICKÉ CHEMIE

- Nové metody a přístrojová technika otevírají značné možnosti biologického a lékařského významu.
- Jedním z hlavních úkolů je velice citlivá a strukturálně detailní analýza biologických maticí v malých objemech a stopových množstvích biologicky důležitých látek. Hmotnostní spektrometrie je klíčovou detekční metodou v glykobiologii.
- Použití nových separačních přístupů chromatografie a elektroforezy je rovněž žádoucí.
- Kvůli komplexnosti analytických dat je rovněž nutné využít počítačové techniky a bioinformatiky.



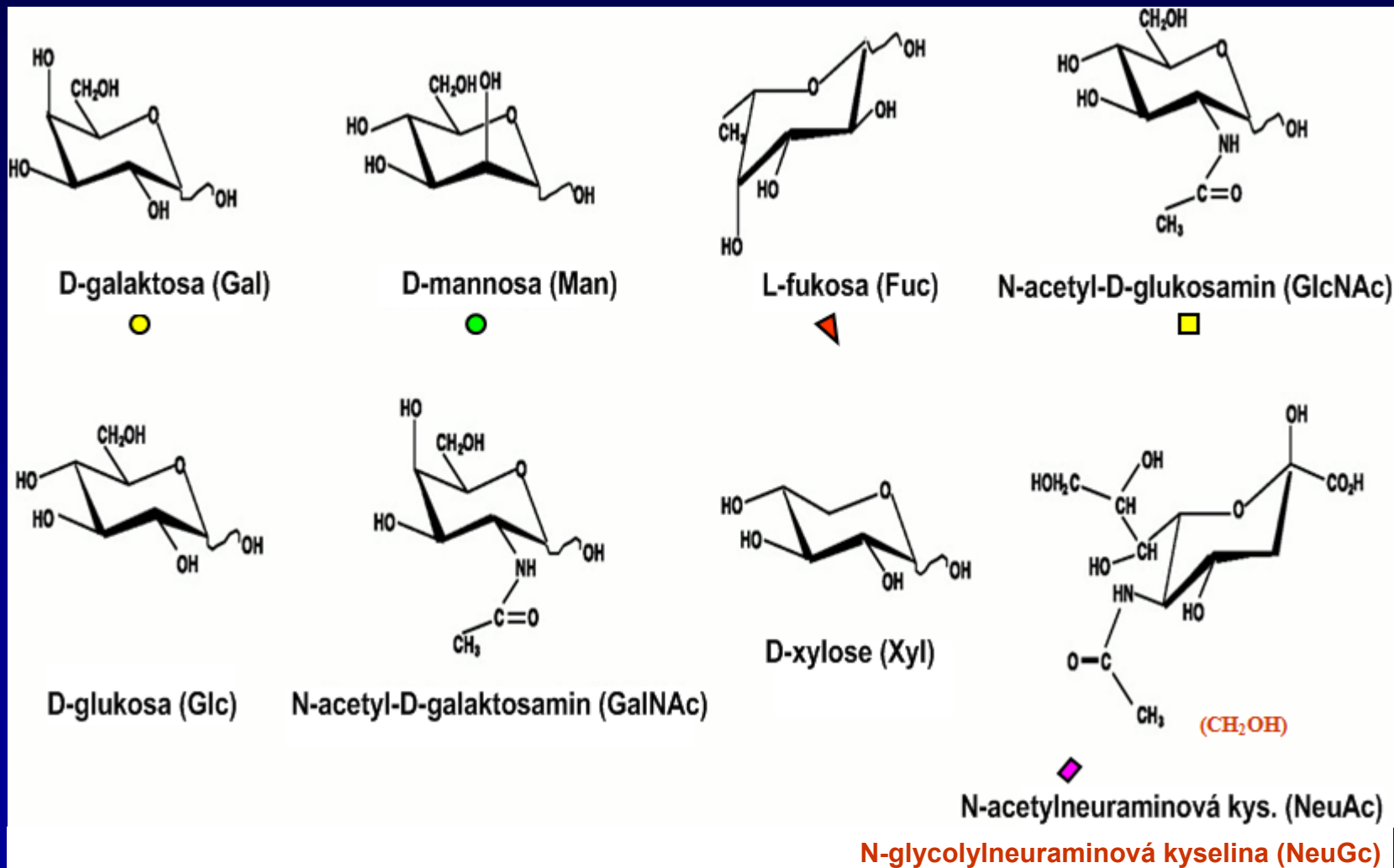


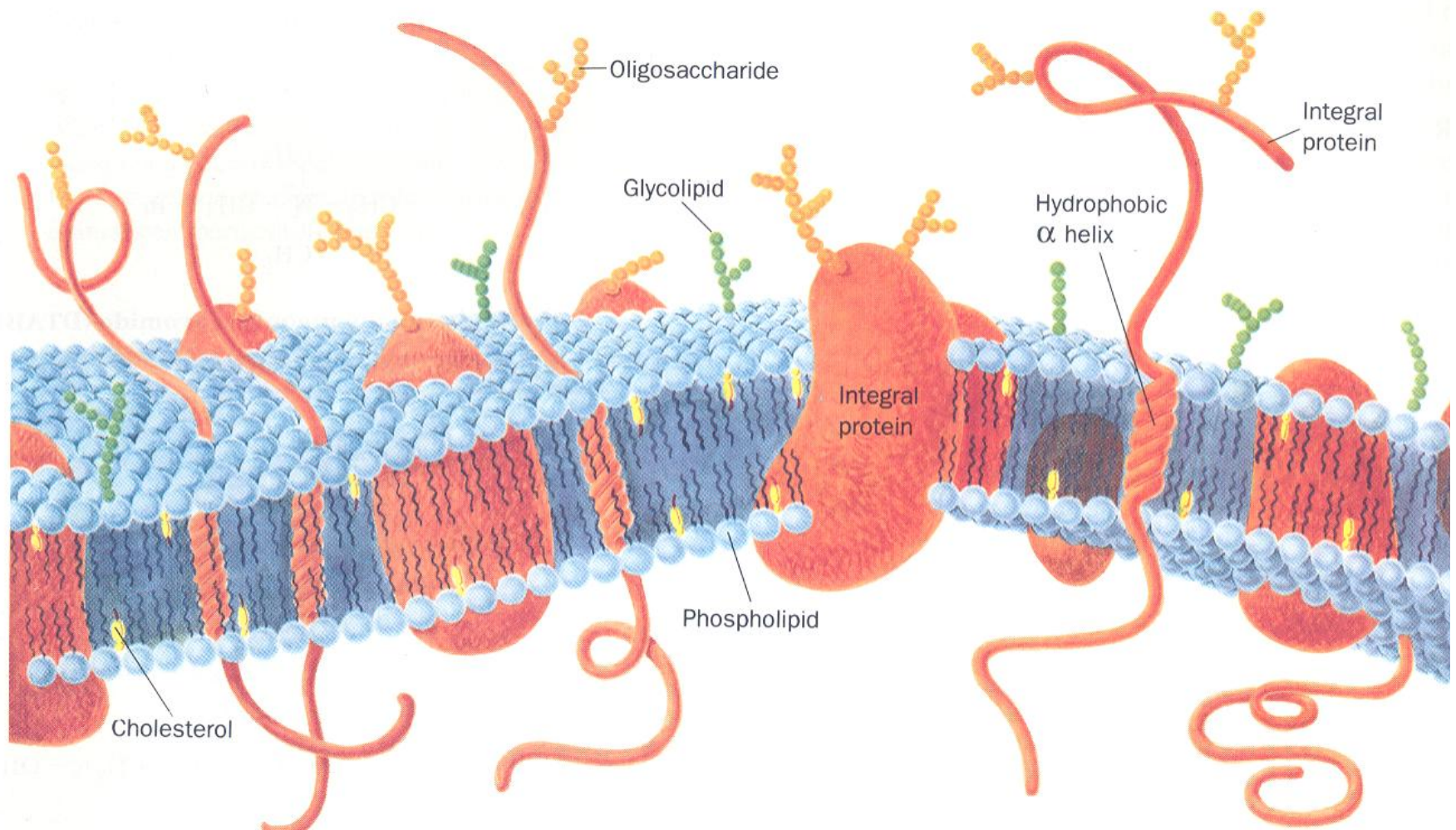
Emil Fischer

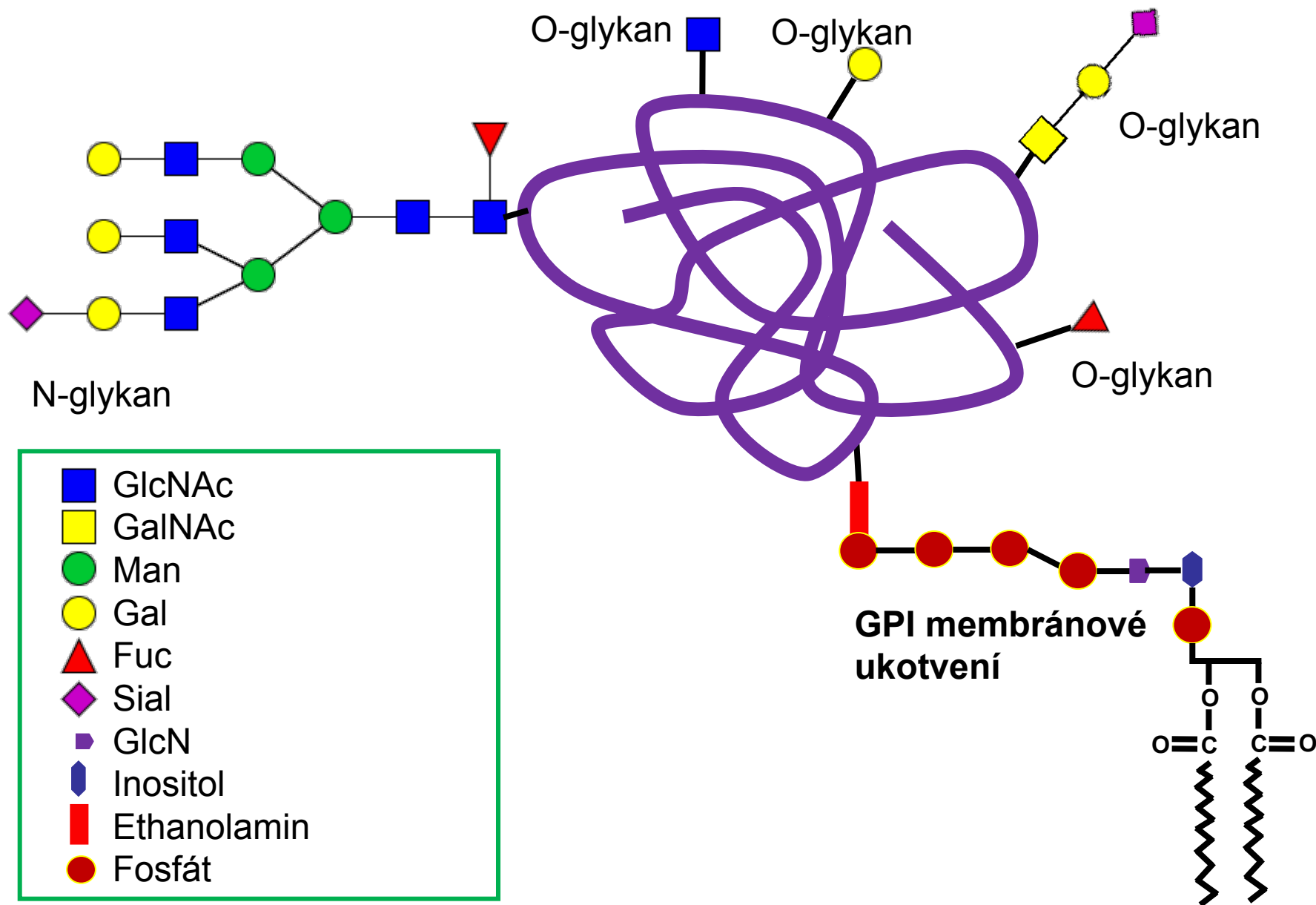
Laureát Nobelovy ceny za chemii

1902

Monosacharidové strukturní jednotky glykánů

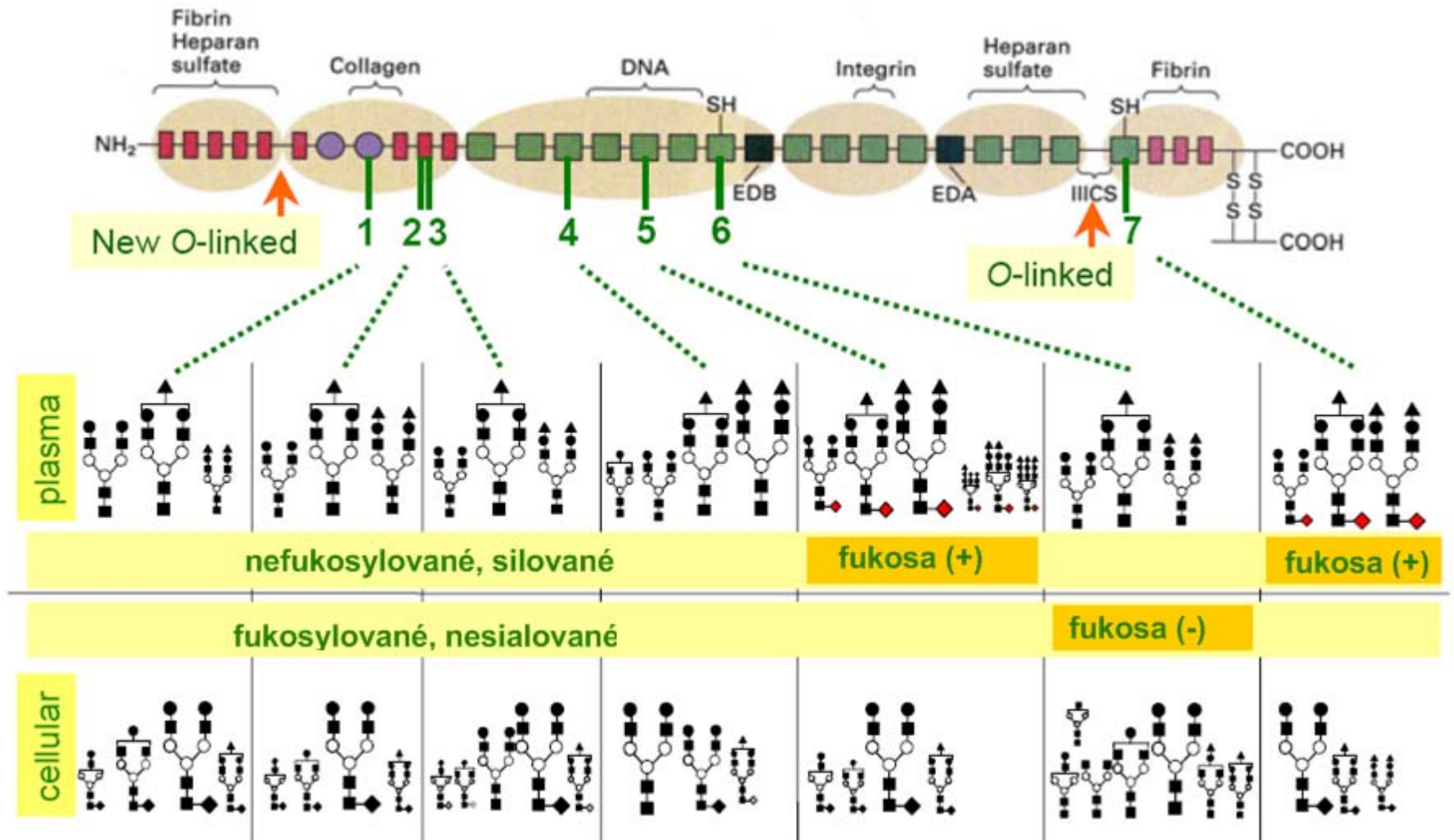






Heterogenita N-glykosylace na glykosylačních místech fibronektinů z buněk a plazmy

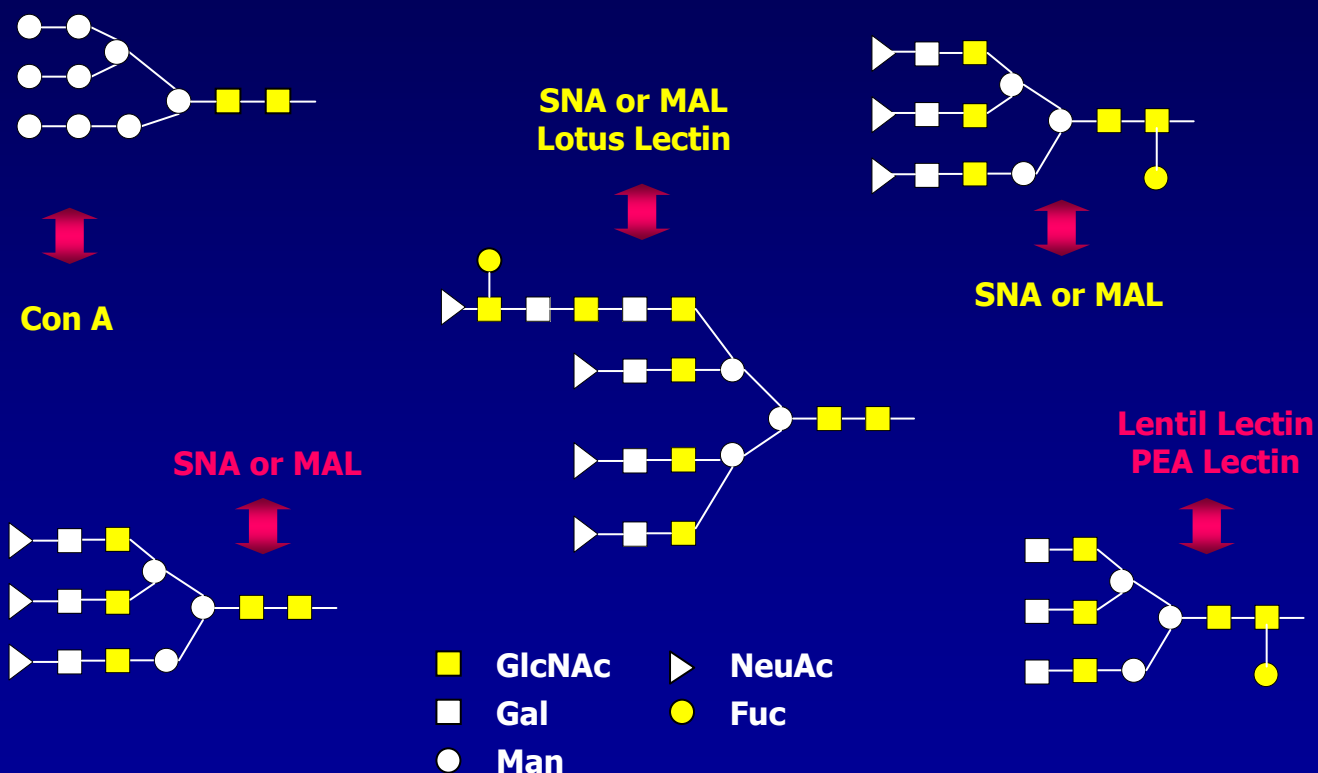
(2350 zbytků a sedm N-glykosylačních míst)



LEKTINY

- Jsou specializované proteiny rostlinného i živočišného původu, které rozpoznávají určité motivy sacharidové struktury. Jsou známy již více než 100 let a empiricky využity po mnoho let jako histologická kontrastní činidla pro rozpoznávání různých buněčných seskupení
- Lektiny jsou dále využívány pro izolaci a přečištění biologických vzorků
- V poslední době je těchto proteinů také využito v řadě analytických aplikací

Specifická vybraných lektinů



Lektiny

Con A – *Canavalia ensiformis*

Lotus Lectin – *Tetragonolobus purpureas*

SNA – *Sambucus nigra*

PEA Lectin – *Phaseolus vulgaris*

MAL – *Maackia amurensis*

Lentil Lectin – *Lens culinaris*

Povrch buňky je hustě obsazen oligosacharidy ukotvenými k proteinům nebo lipidům v buněčné membráně. Tyto oligosacharidy pak zprostředkovávají mezibuněčné interakce a interakce buněk s mimobuněčnými subjekty.

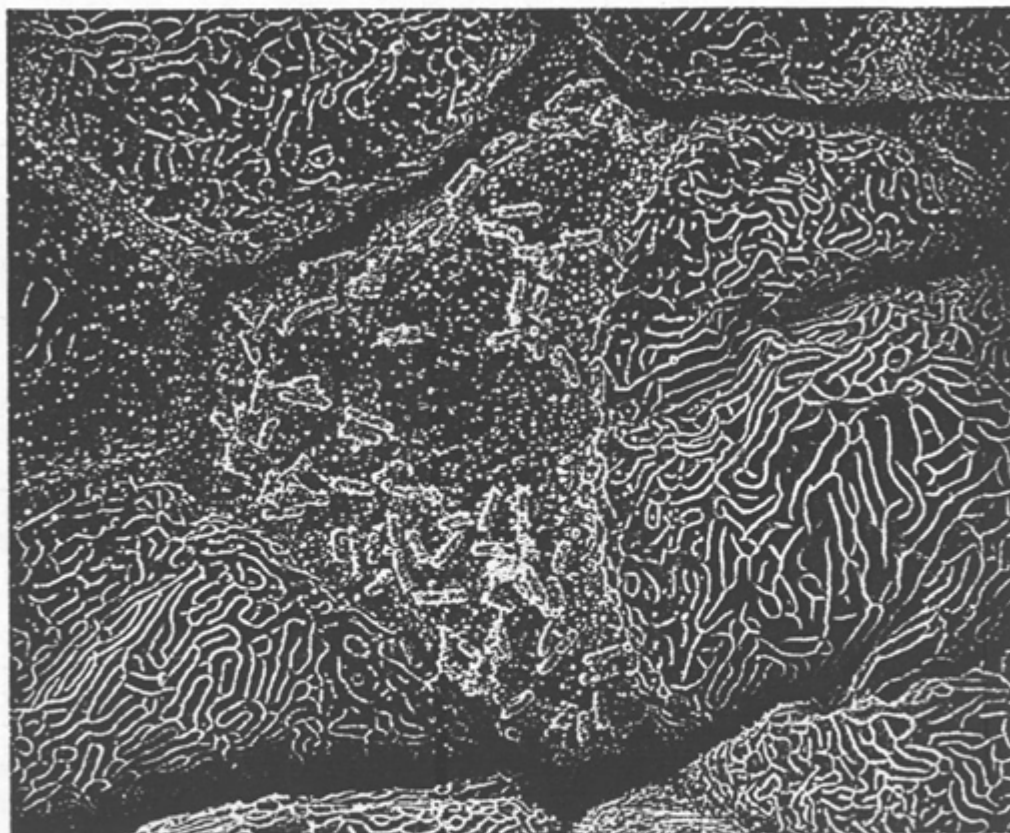
Důležitá role, kterou sacharidy zastávají v biologických systémech, výrazně přispěla k rychlému rozvoji oboru glykobiologie.



23. březen 2001

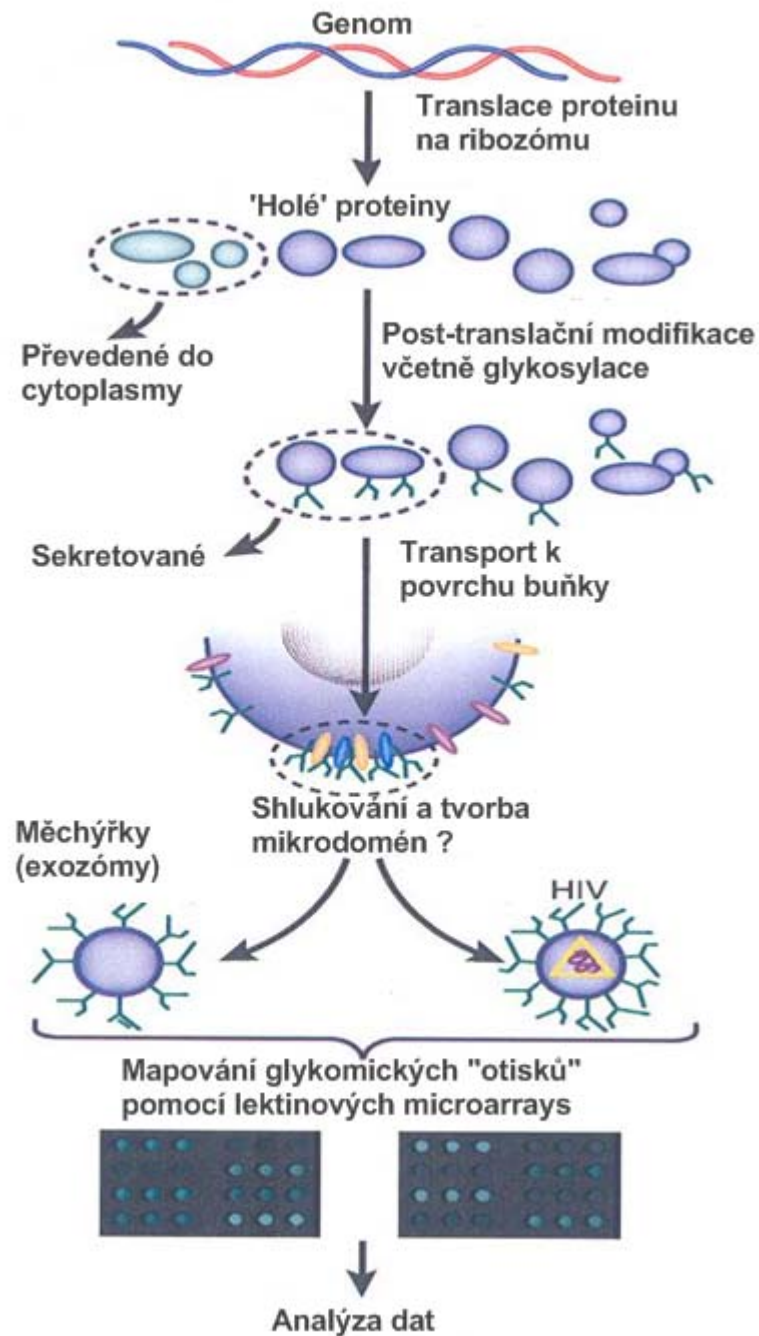
"Carbohydrates and Glycobiology"

Vol. 291 Pages 2263-2502

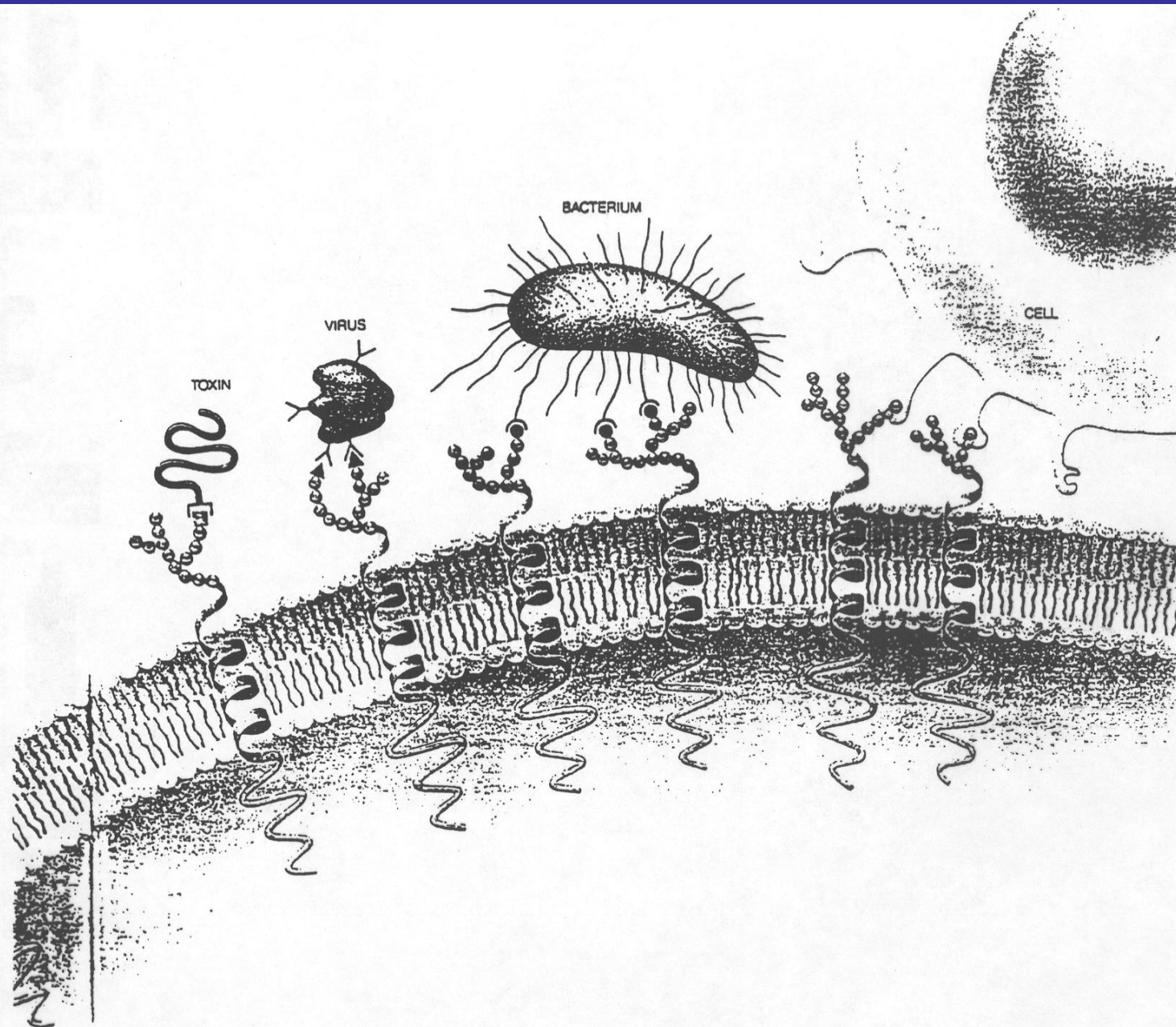


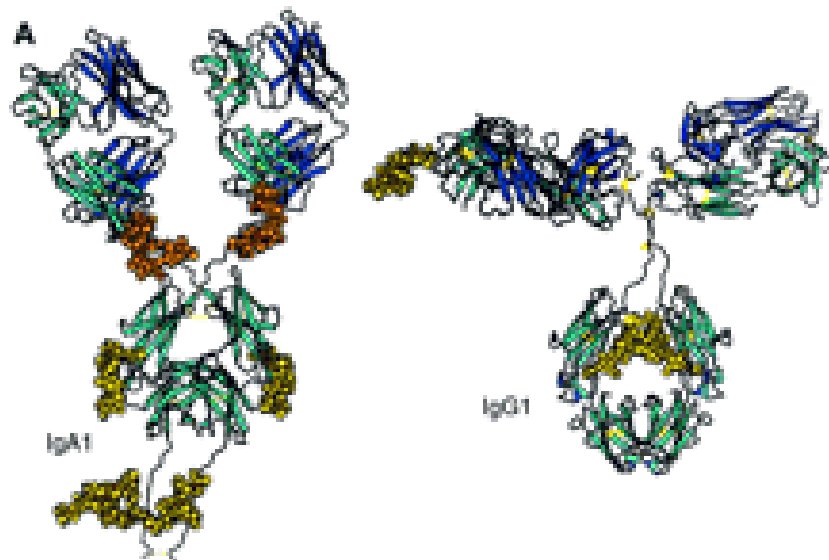
Bakterie selektivně lnou ke tkáňovým buňkám. Drobné výčnělky na povrchu bakterií zvané fimbriae interagují pouze s některými buněčnými sacharidy, a proto určité bakterie napadají jen některé typy buněk. Obrázek znázorňuje bakterie *Escherichia coli* ve tvaru prutu přilnuté ke tkáni močového traktu.

N. Sharon and H. Lis, Scientific American, January 1993



Jun Hirabayashi
 Nature Chemical Biology
 5(2009)198-199

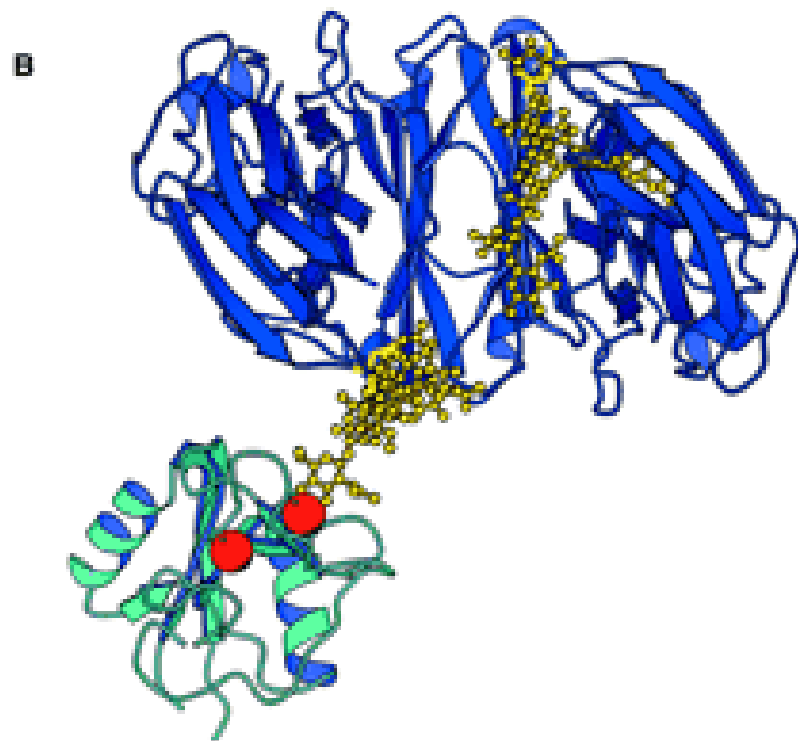




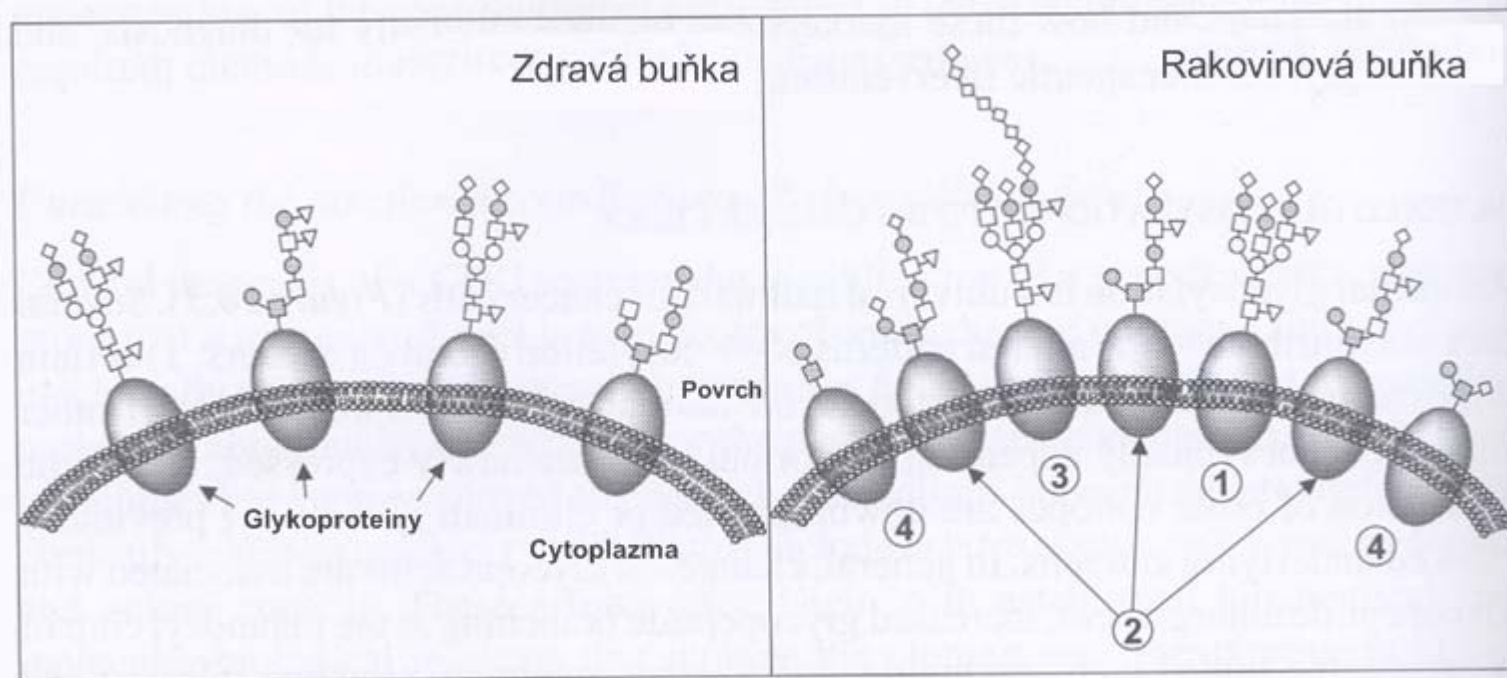
Žlutá barva = N-glykány

Oranžová barva = O-glykány

**Model interakce IgA1
s jiným proteinem,
který má místo pro
rozpoznání sacharidu**

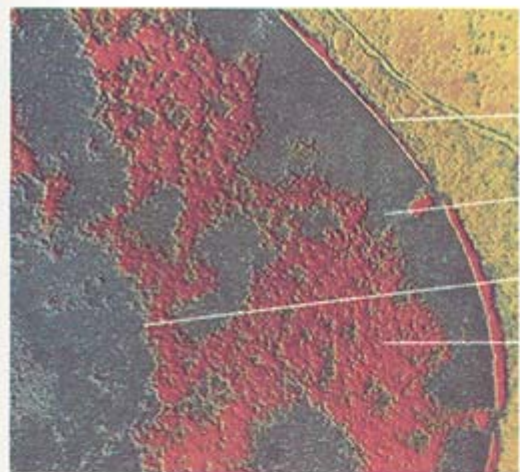


P.M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell,
I.A. Wilson and R.A. Dwek, *Science*
291, 2370 (2001)



Souvislost glykosylace s různými nemocemi

- Imunita proti infekčním onemocněním, včetně HIV
- Revmatická artritida (změny IgG a hladiny mannosu vázajících proteinů v séru)
- Nemoci prionů
- Vrozené poruchy glykosylace (vzácné, obvykle se projeví poruchami CNS)
- Nemoci ústní dutiny
- Cystická fibróza
- Srdeční poruchy
- Rakovina

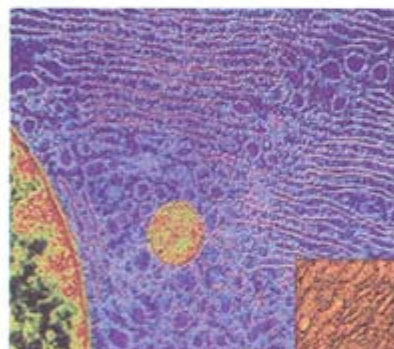


Jaderná membrána

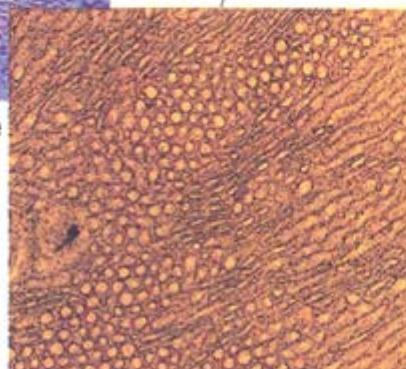
Jádro

Jadérko

Chromatin



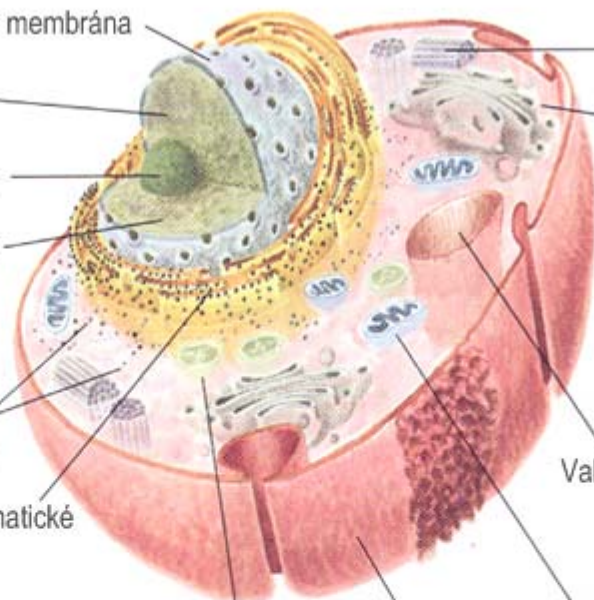
Hrubé endoplasmatické retikulum



Jemné endoplasmatické retikulum

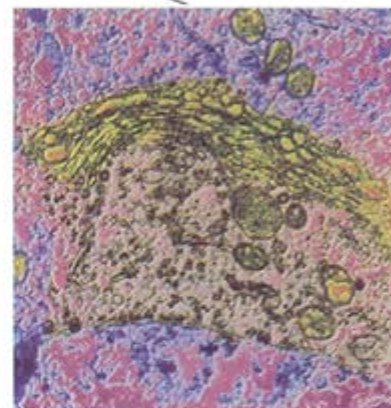
Volné ribozómy

Endoplasmatické retikulum



Centrioly

Golgiho aparát



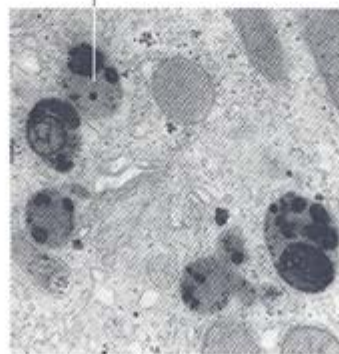
Vakuola

Mitochondrie

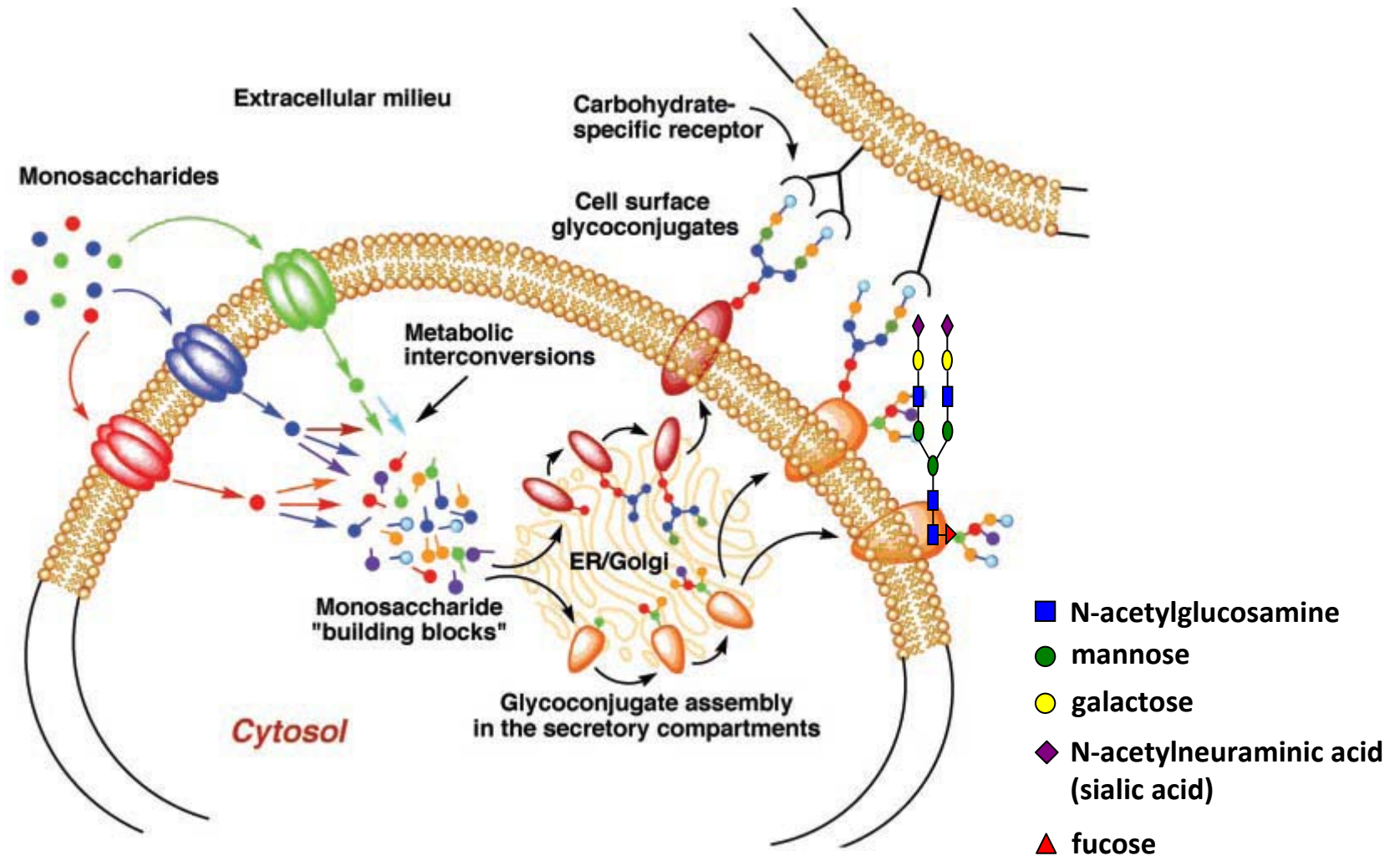


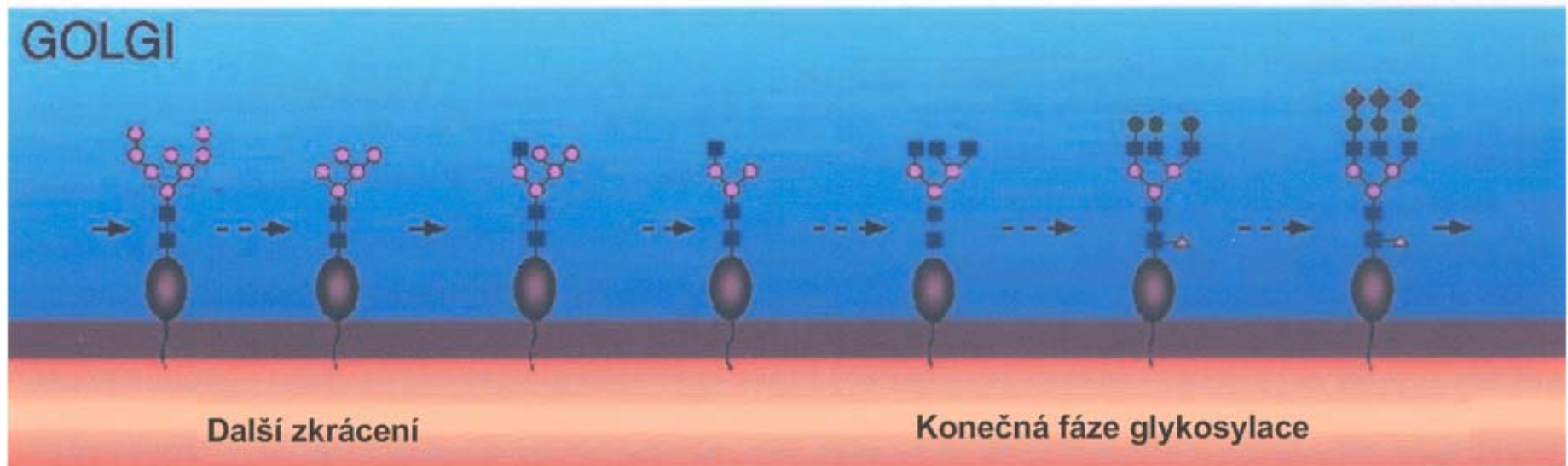
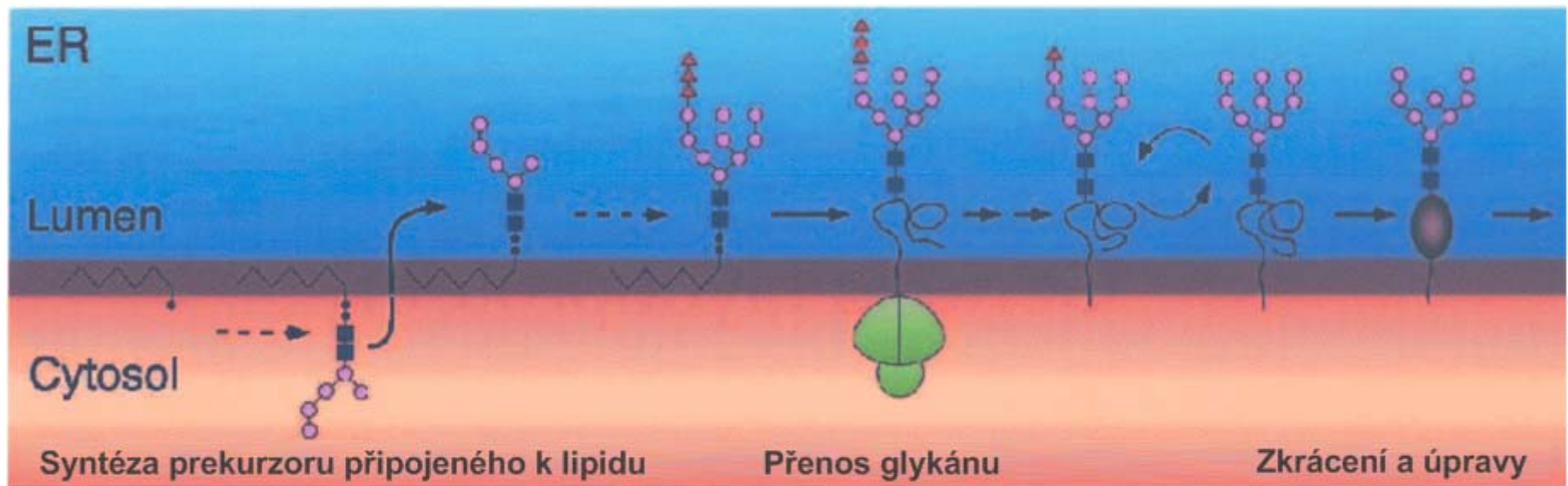
Lysozómy

Buněčná membrána

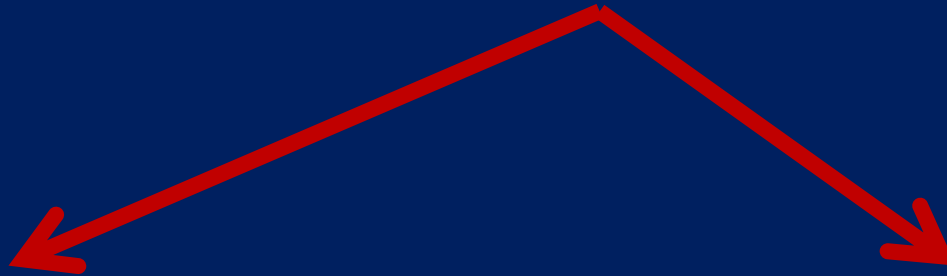


Glycosylation





ANALYTICKÁ GLYKOBIOLOGIE



Glykomika

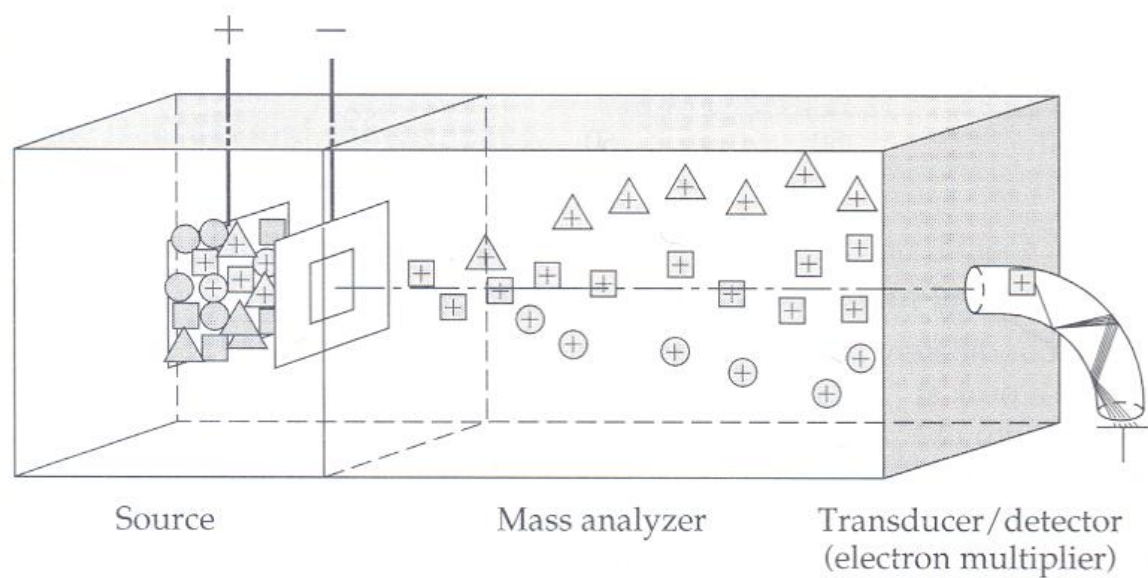
se zabývá studiem
oligosacharidových složek
glykokonjugátů

Glykoproteomika

se zabývá detaily spojení
oligosacharidových složek s
bílkovinami

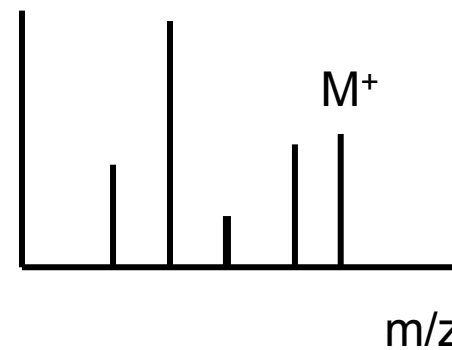


GLYKOBIOLOGIE
GLYKOPROTEOMIKA
FUNKČNÍ GLYKOMIKA



fragmenty

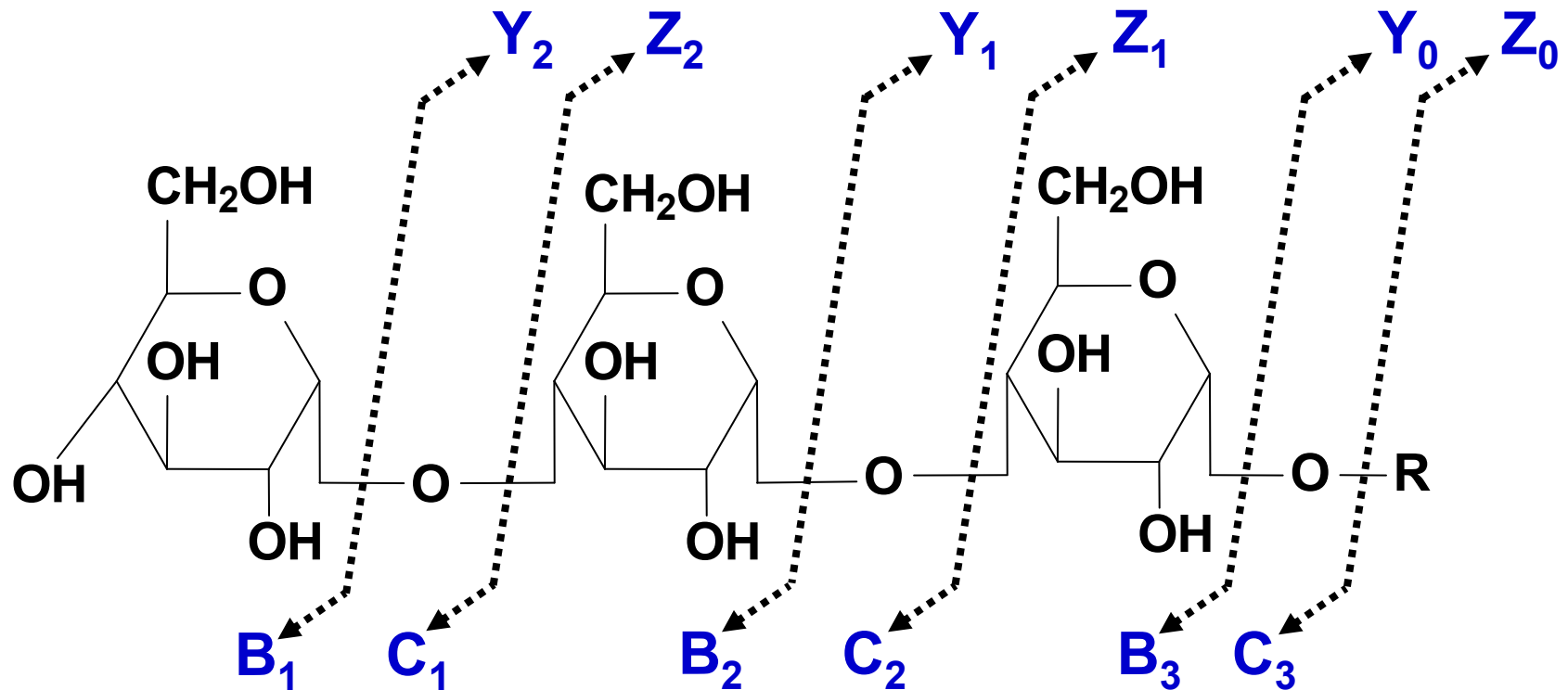
% intenzita



Glykomická analýza

Fragmentace glykánů pomocí MALDI-MS

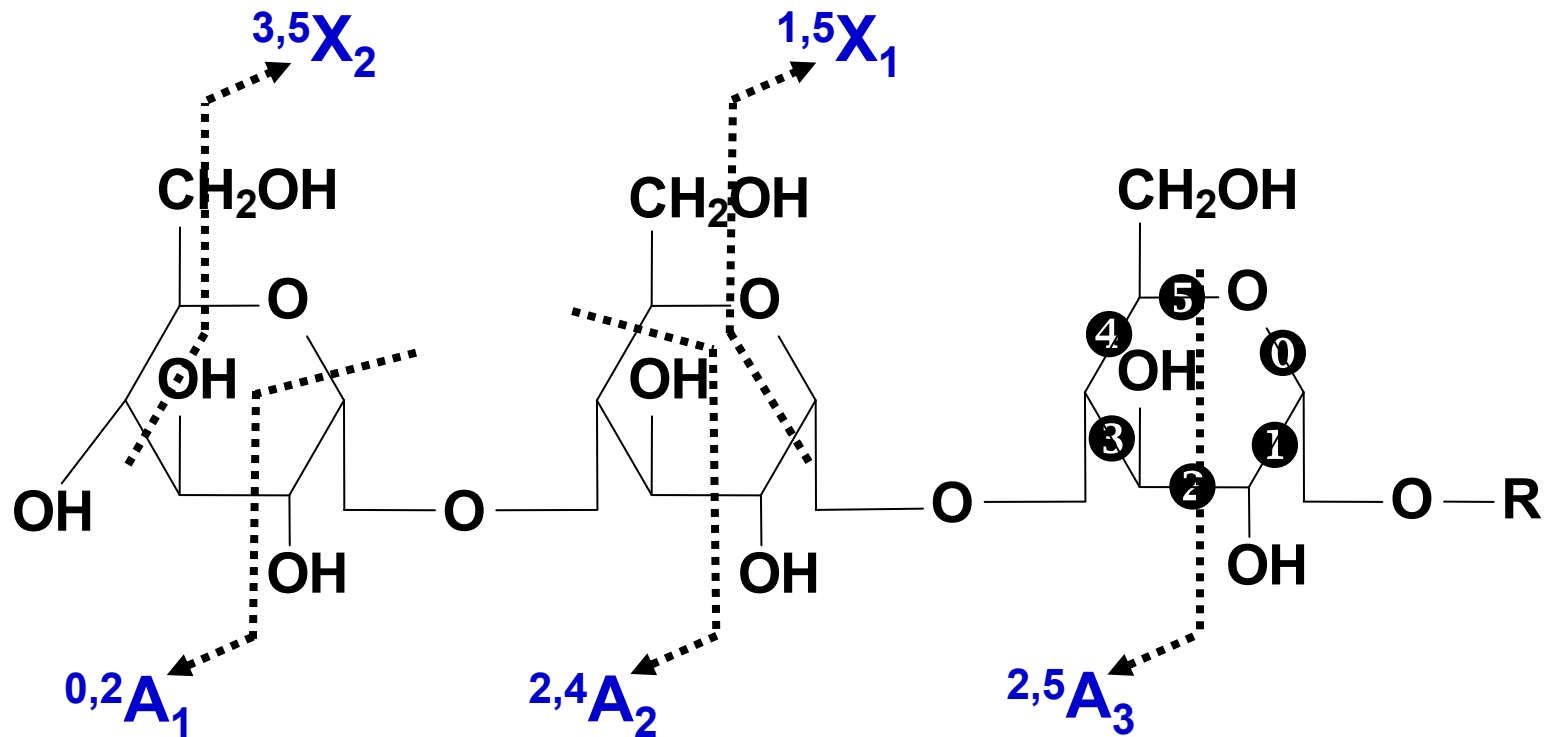
A. Štěpení glykosidických vazeb



Glykomická analýza

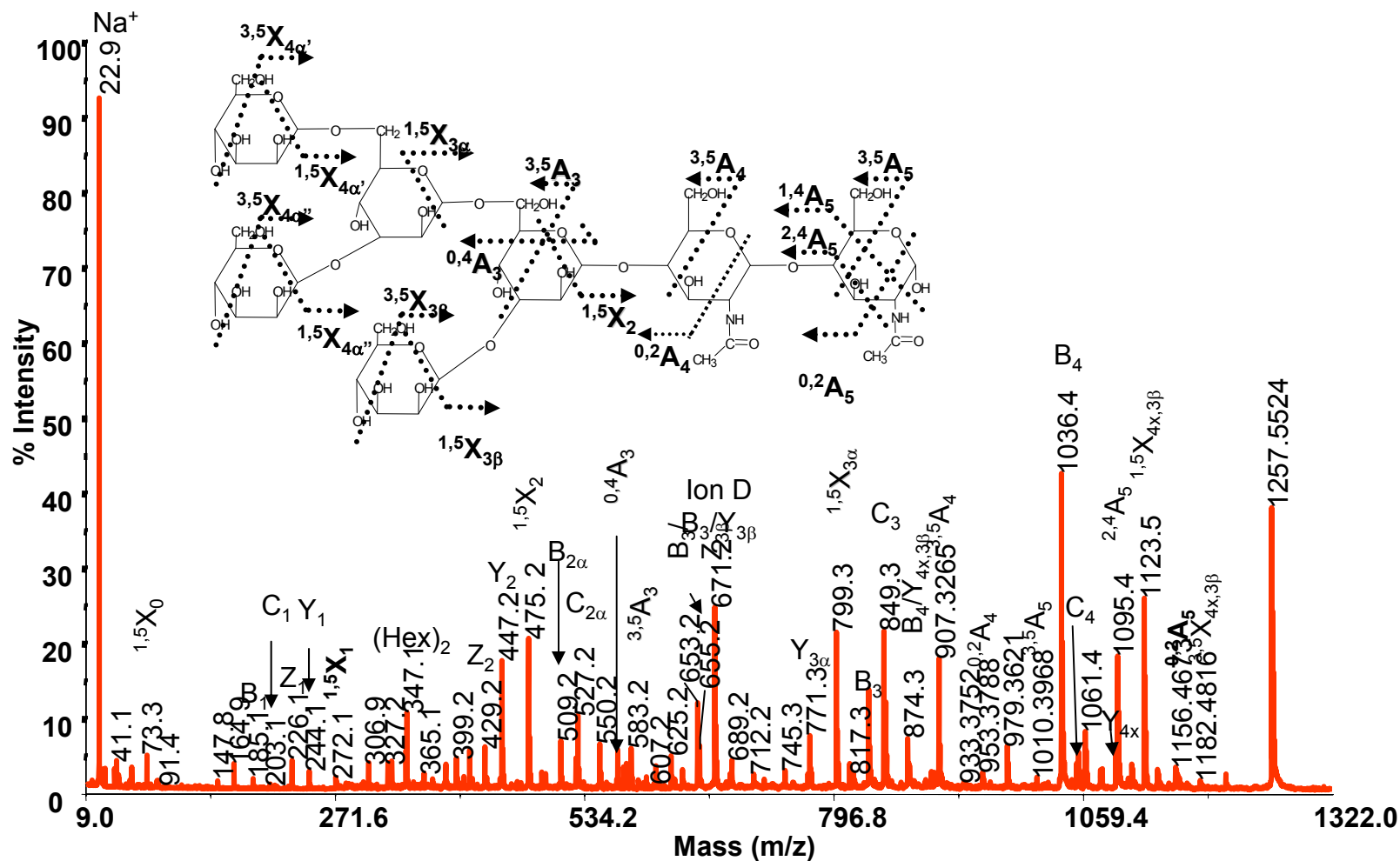
Fragmentace glykánů pomocí MALDI-MS

B. Cross-ring fragmentace

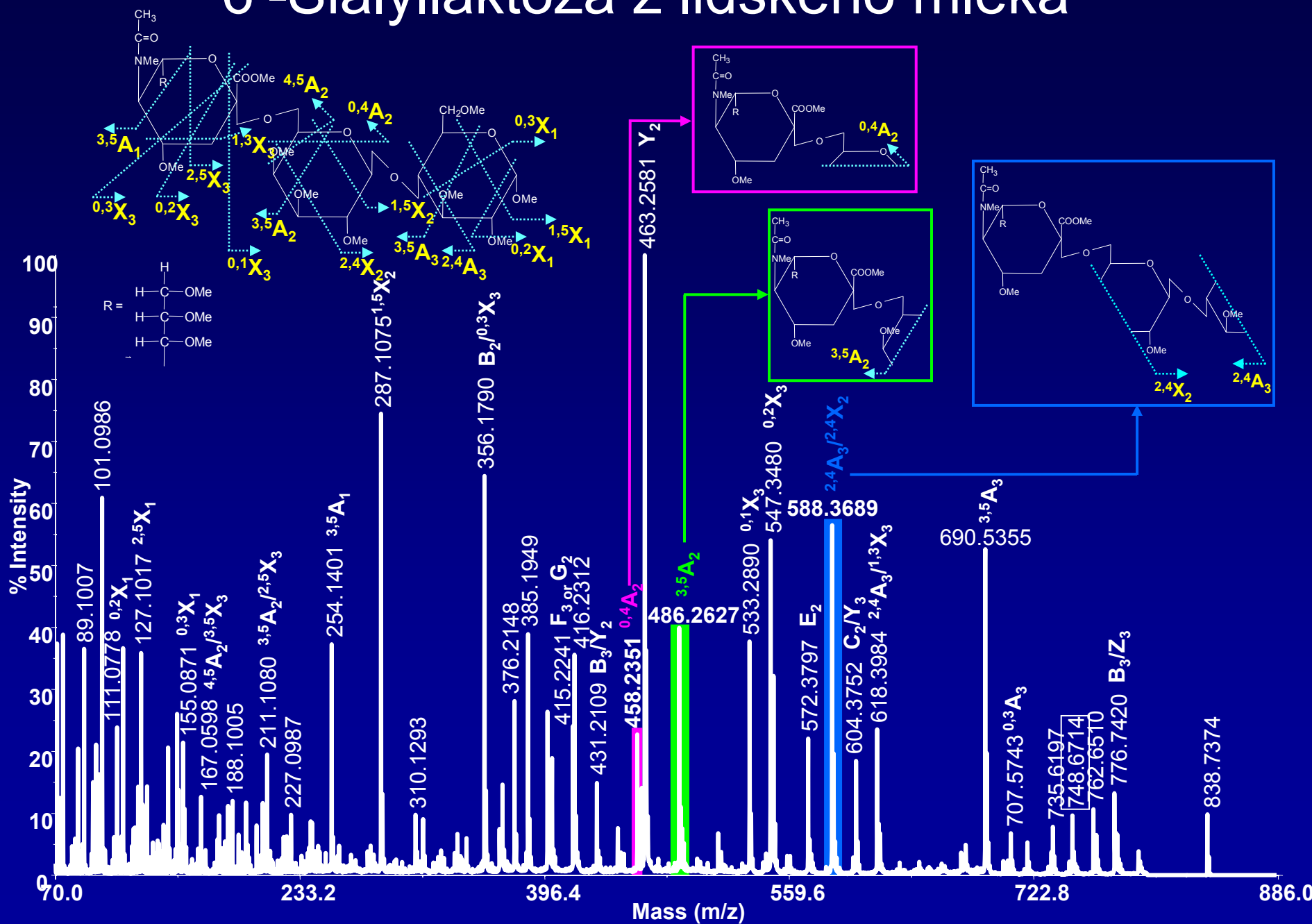


Glykomická analýza

Fragmentace glykánů pomocí MALDI-MS



6'-Sialyllaktóza z lidského mléka



MALDI TOF-TOF (ABI 4800)

Zdroje vysokého
napětí

Ovládaní
iontové optiky

Detektor pro
reflektron mód

Řídící
elektronika

Reflektron

Detektor pro
lineární mód

TOF 2

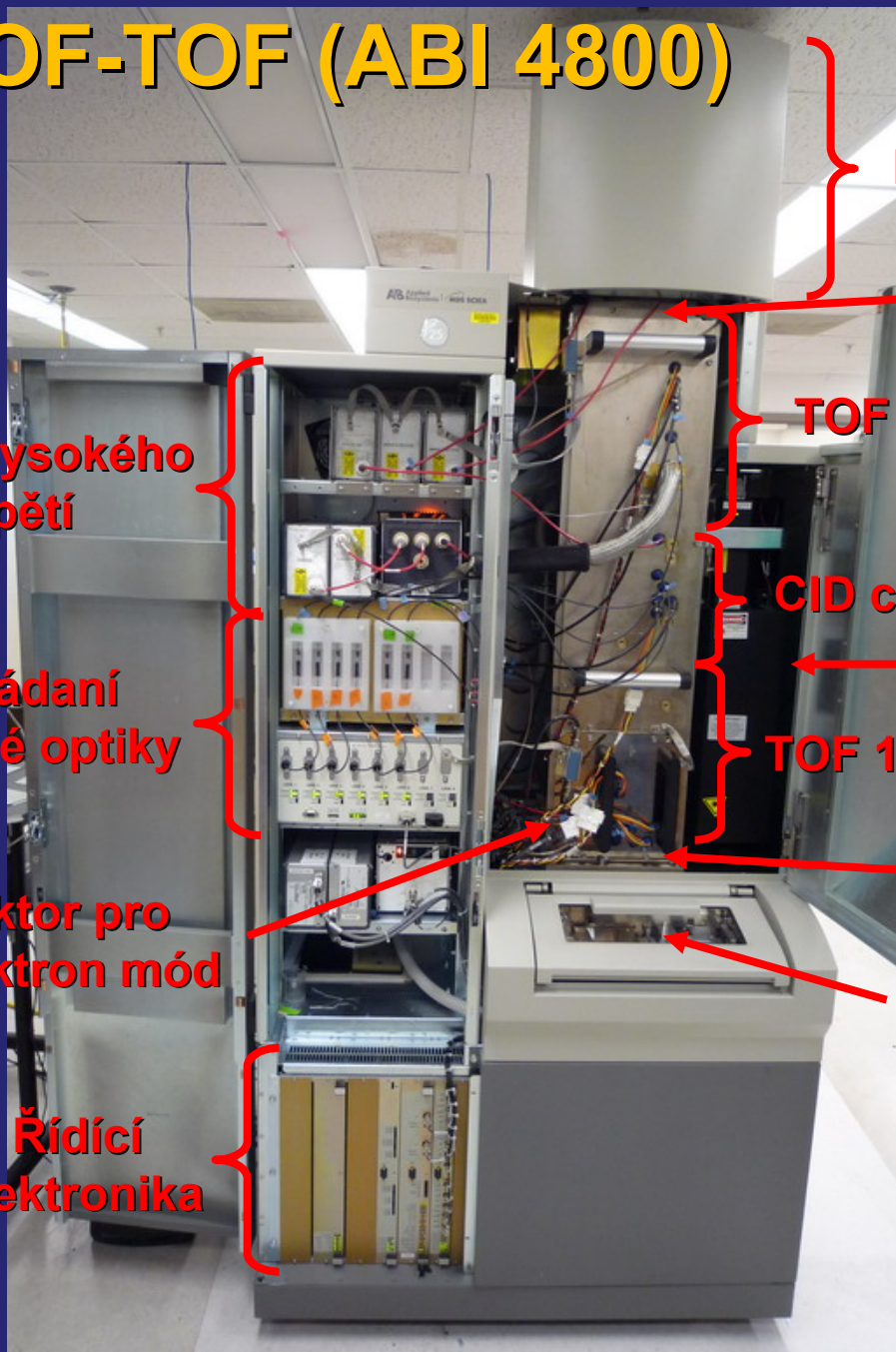
CID cela

Laser (355 nm)

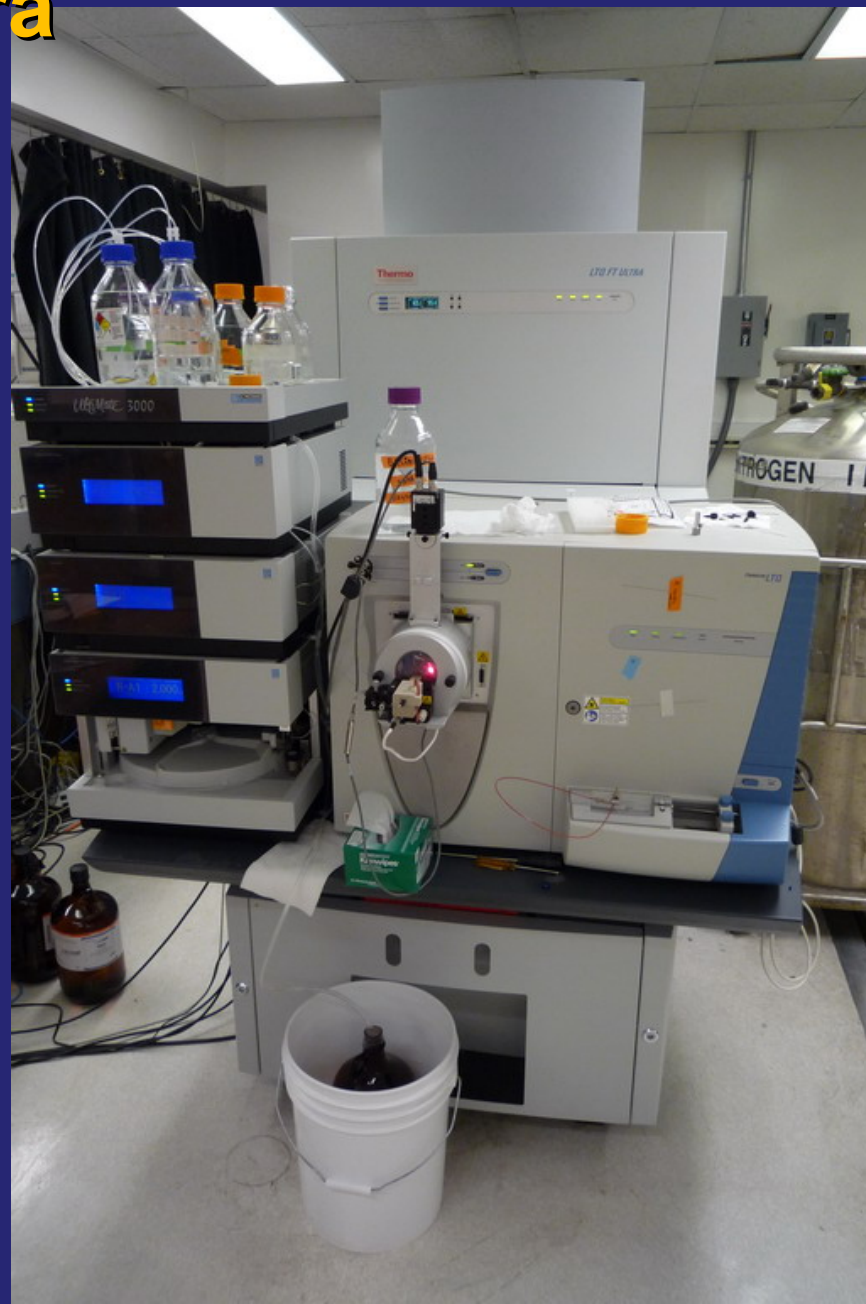
TOF 1

Ionizační zdroj

Vstup pro platíčko



LTQ-FT Ultra



Platforma na analýzu glykoproteinů

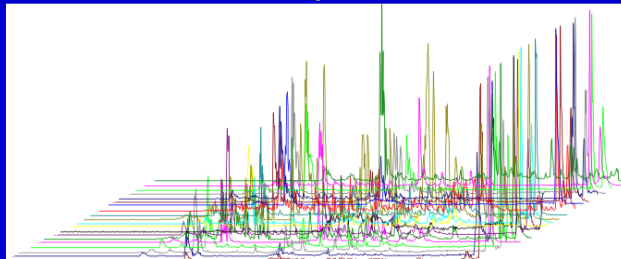
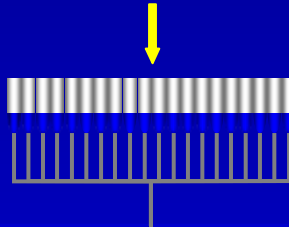
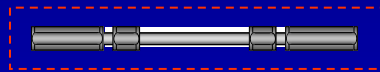
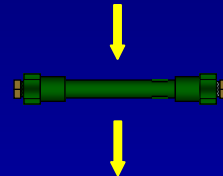
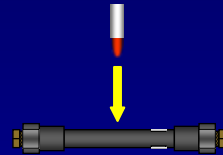
Vzorek

MARS kolona

Lektinová afinitní chromatografie

mRP (70°C)
chromatografie

Sběr frakcí a
Trypsinová digestce



Nano LC-MS/MS

M. Madera, Y. Mechref, I. Klouckova, M. V. Novotny
J. Proteome Res., 2006; 5(9); 2348-2363. .

Hledání v databázi

Výsledek

**Specifické biologické
problémy a předpoklady**

**Molekulární profilování a –omické
postupy
(genomika, transkriptomika,
proteomika, glykomika,
metabolomika, atd.)**

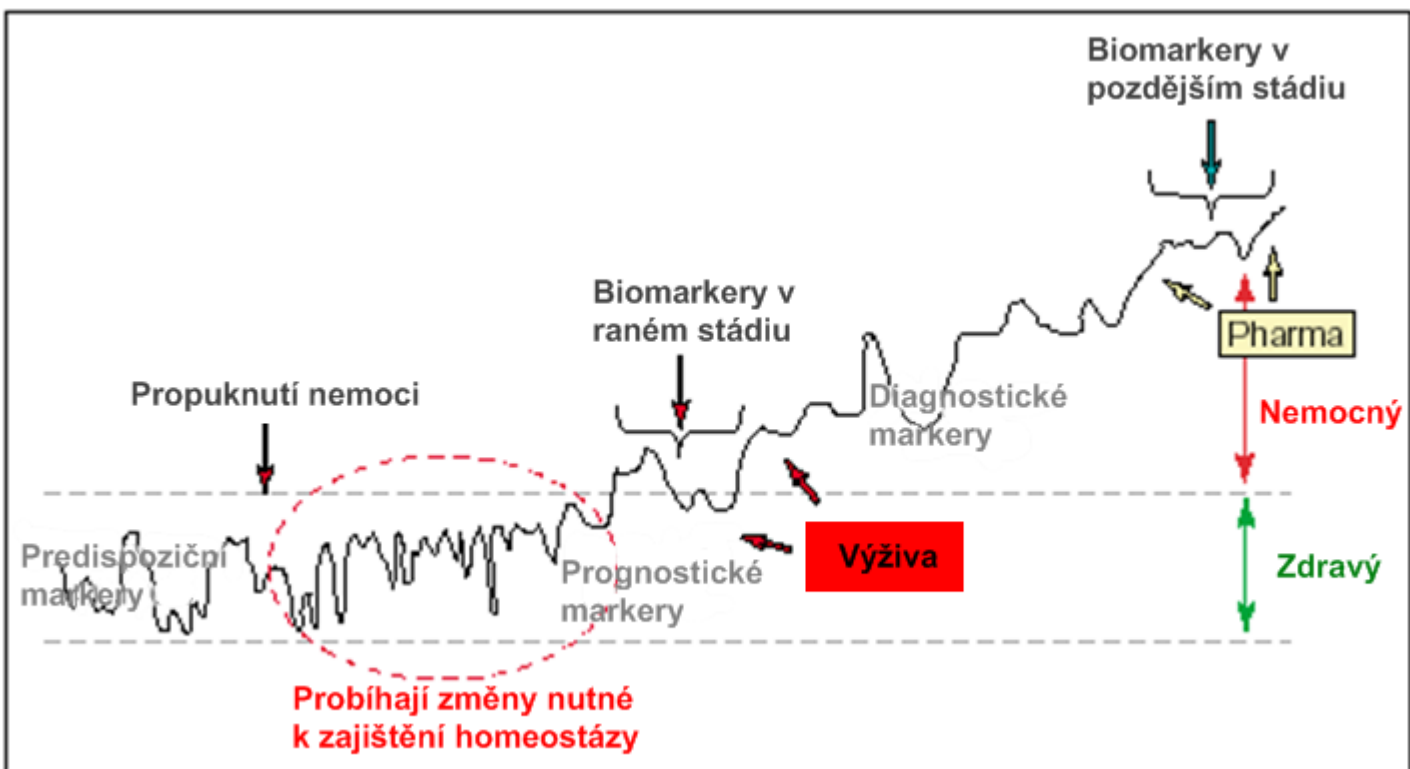


**Biologická manipulace
s využitím zvířecích modelů**



**Počítačová simulace
a vyvození obecných
závěrů**





van der Greef, et al., *Curr Opin Chem Biol* 8,560 (2004).

Odhad počtu nových případů

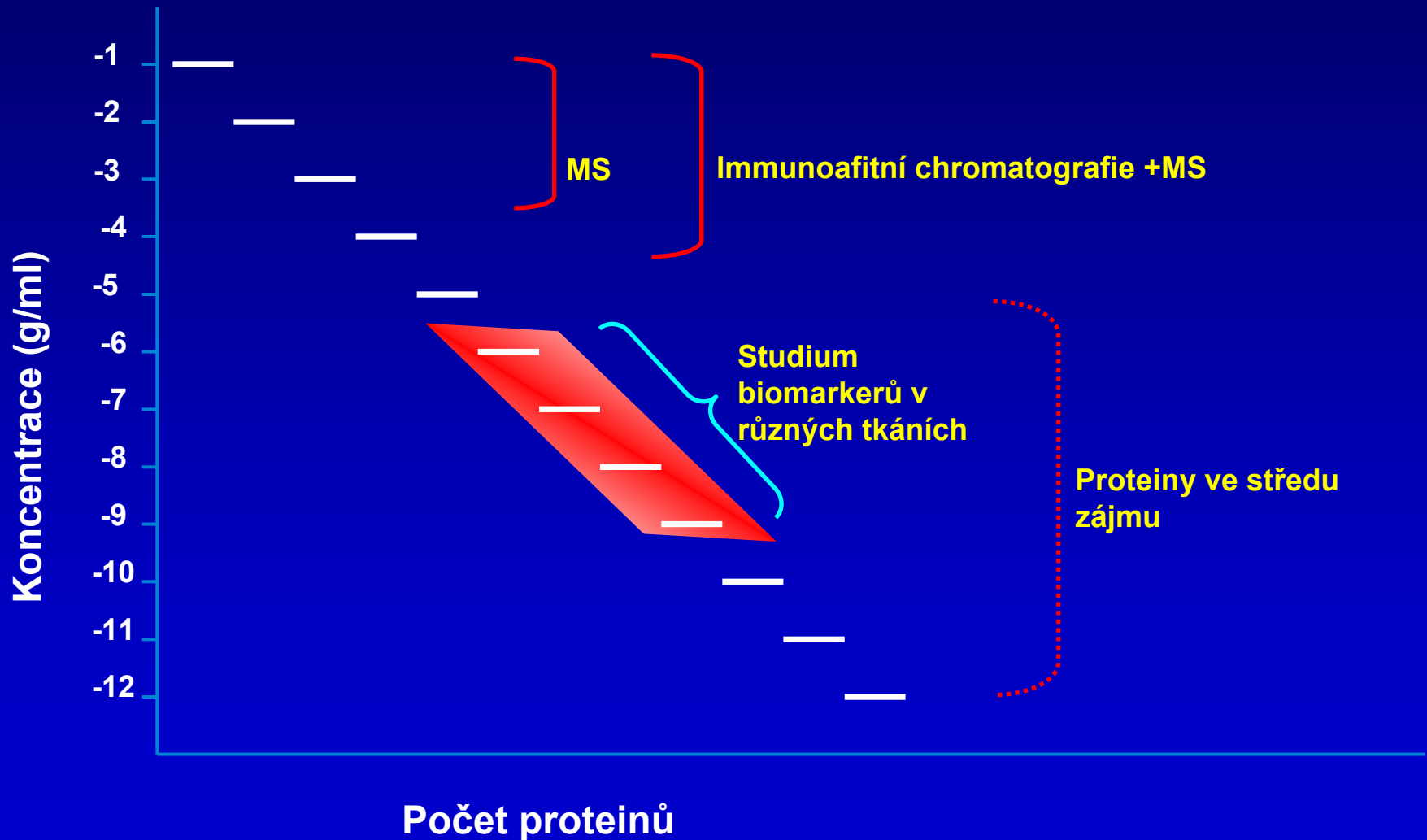
			Muži	Ženy			
Prostata	218,890	29%			Prsa	178,480	26%
Plíce a průdušky	114,760	15%			Plíce a průdušky	98,620	15%
Konečník a tračník	79,130	10%			Konečník a tračník	74,630	11%
Močový měchýř	50,040	7%			Děloha	39,080	6%
Non-Hodgkin lymphom	34,200	4%			Non-Hodgkin lymphom	28,990	4%
Kožní melanom	33,910	4%			Kožní melanom	26,030	4%
Ledviny a ledvinová pánev	31,590	4%			Štitná žláza	25,480	4%
Leukémie	24,800	3%			Vaječník	22,430	3%
Ústní dutina a hltan	24,180	3%			Ledviny a ledvinová pánev	19,600	3%
Slinivka břišní	18,830	2%			Leukémie	19,440	3%
Celkem	766,860	100%			Celkem	678,060	100%

Odhad počtu úmrtí

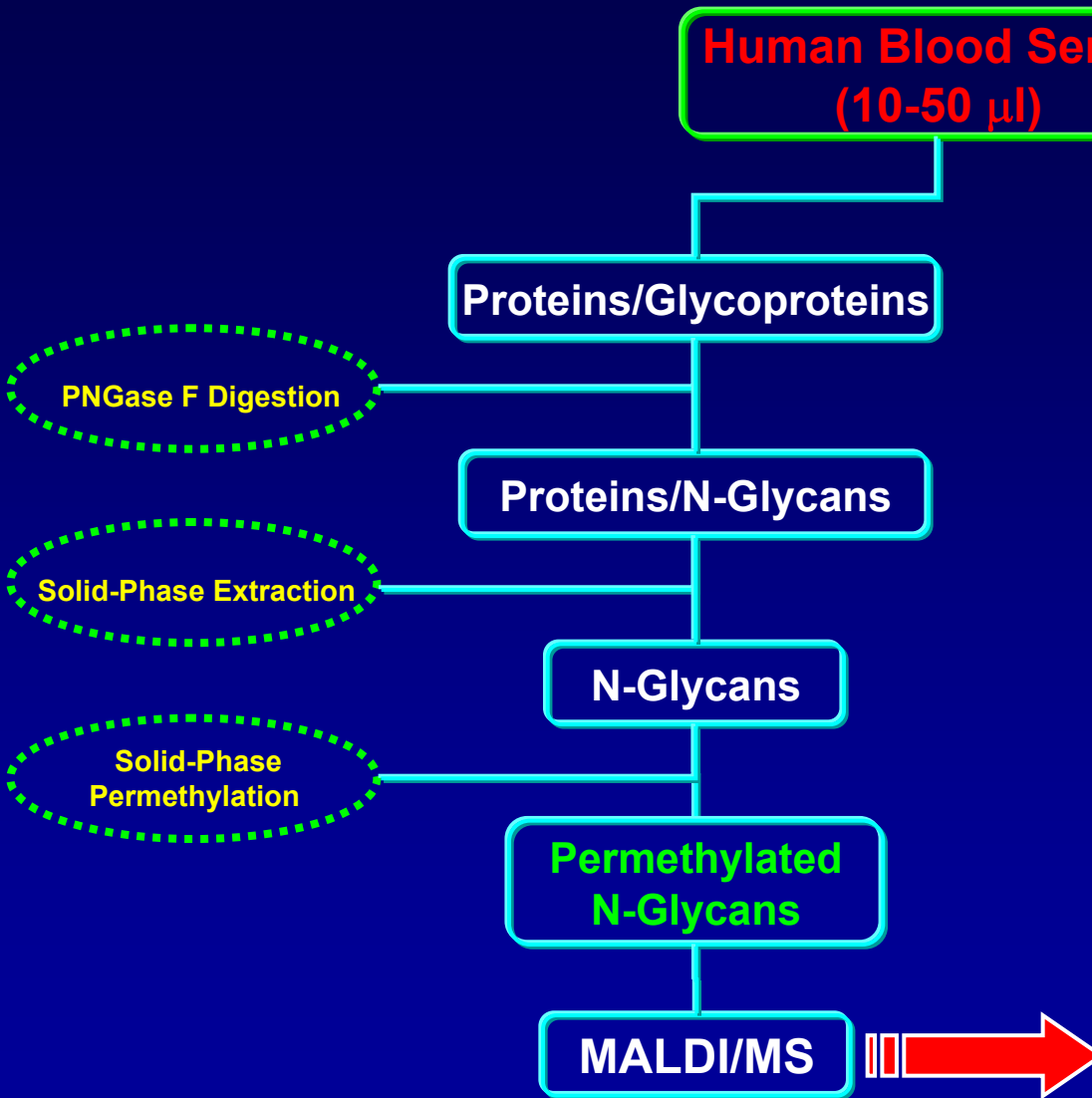
			Muži	Ženy			
Plíce a průdušky	89,510	31%			Plíce a průdušky	70,880	26%
Prostata	27,050	9%			Prsa	40,460	15%
Konečník a tračník	26,000	9%			Konečník a tračník	26,180	10%
Slinivka břišní	16,840	6%			Slinivka břišní	16,530	6%
Leukémie	12,320	4%			Vaječník	15,280	6%
Játra a žlučník	11,280	4%			Leukémie	9,470	4%
Jícen	10,900	4%			Non-Hodgkin lymphom	9,060	3%
Močový měchýř	9,630	3%			Děloha	7,400	3%
Non-Hodgkin lymphom	9,600	3%			Mozek a centrální nervová soustava	5,590	2%
Ledviny a ledvinová pánev	8,080	3%			Játra a žlučník	5,500	2%
Celkem	289,550	100%			Celkem	270,100	100%



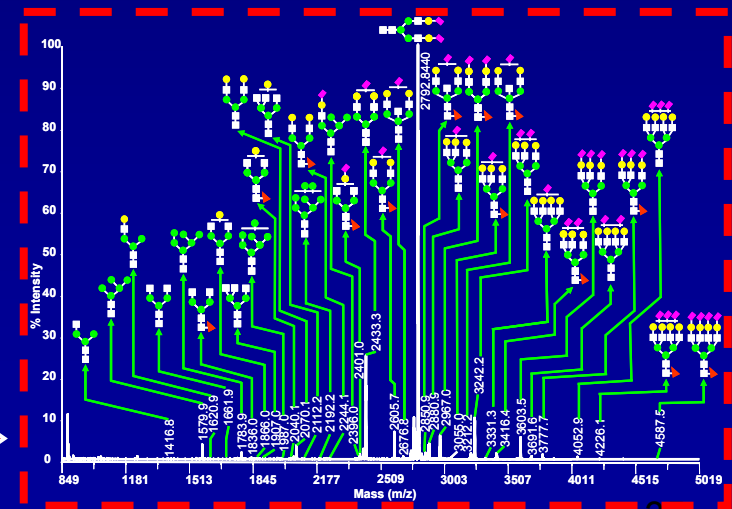
Komplikovanost analýzy proteinů v krevním séru



Glycomic Profiling of Human Blood Serum

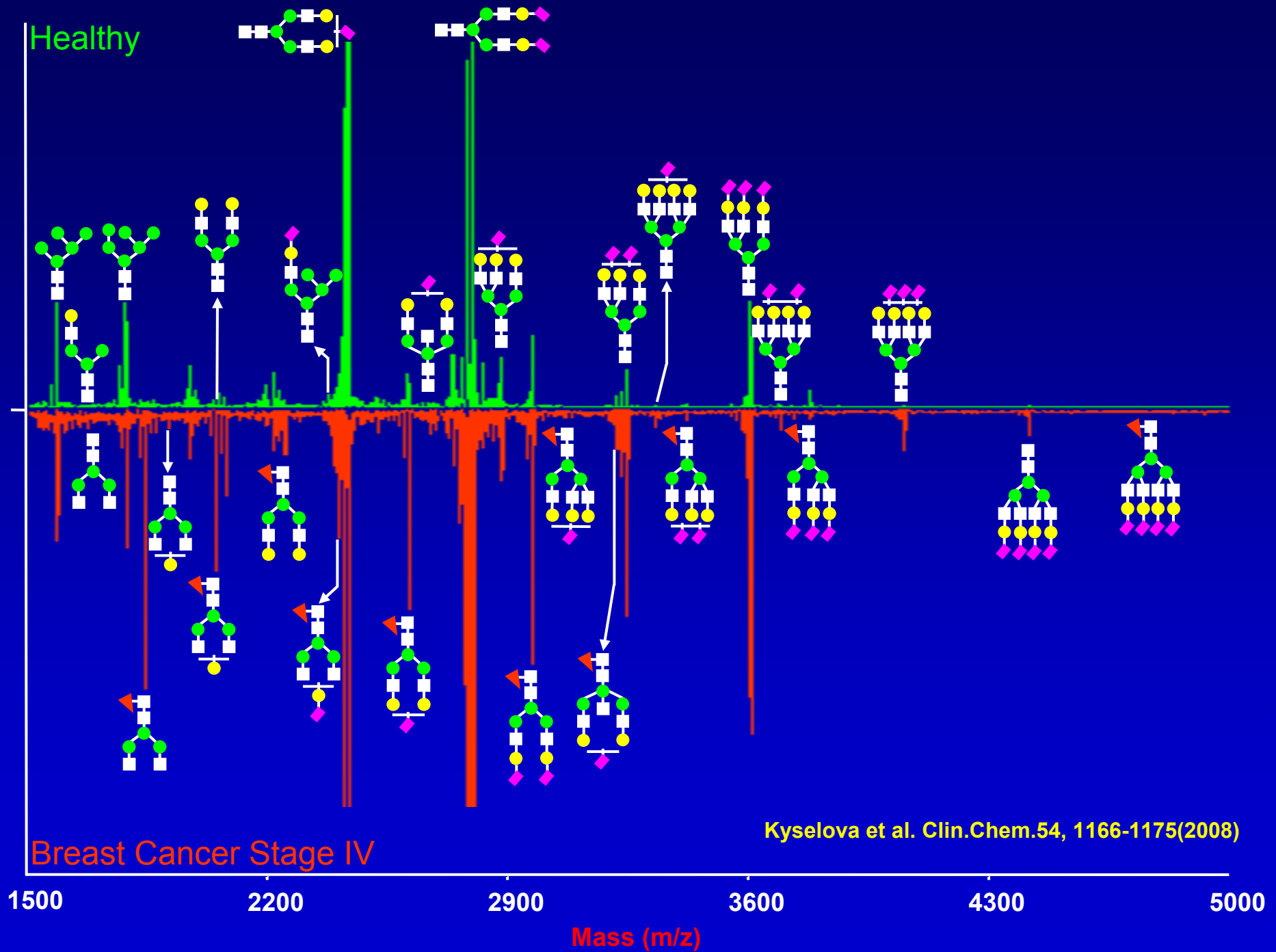


Kyselova, Z.; Mechref, Y.; Al Bataineh, M.; Dobrolecki, L.; Hickey, R.; Vinson, J.; Sweeney, C.; Novotny, M.V. *J. Proteome Res.*, 6 (2007) 1822-1832.

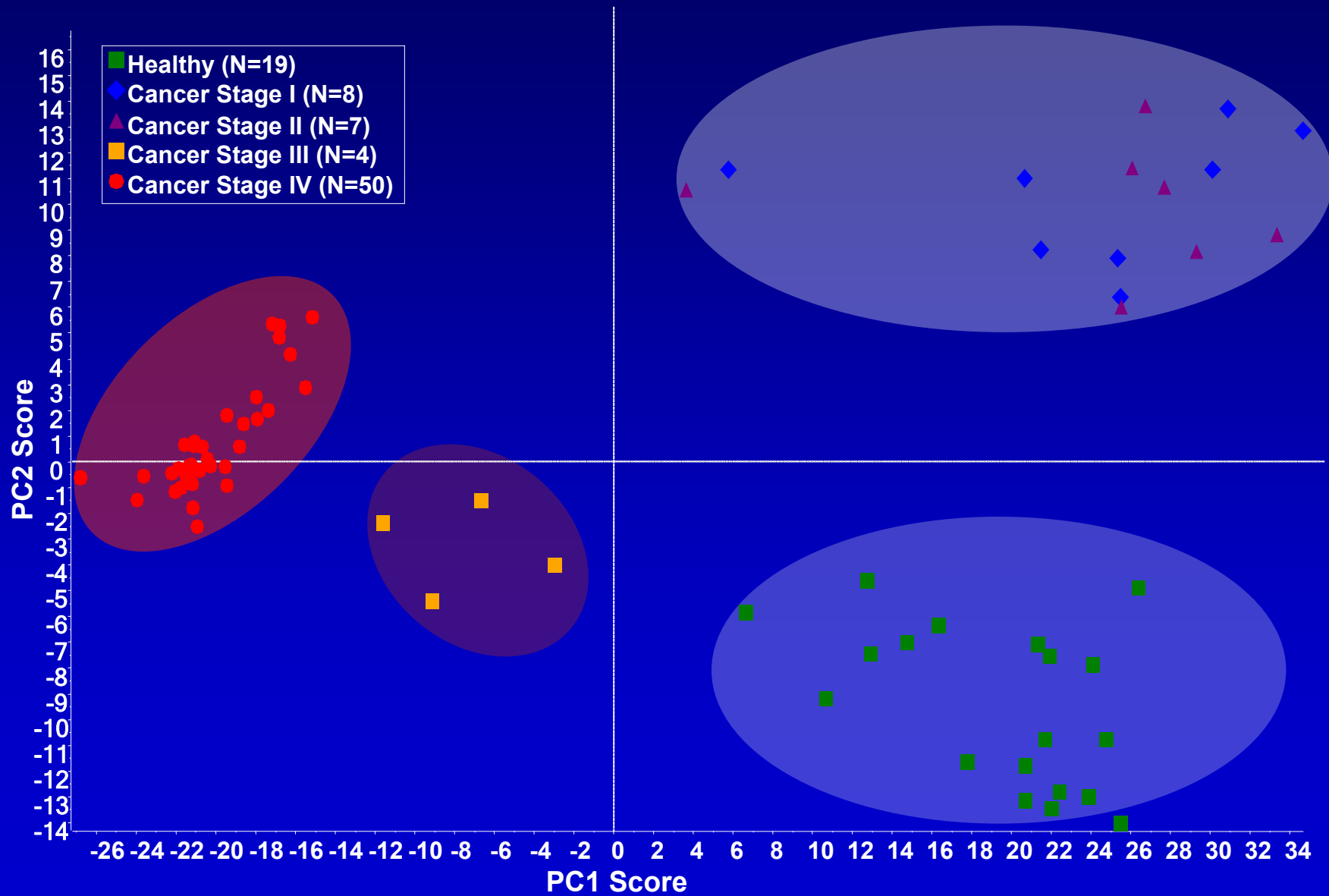


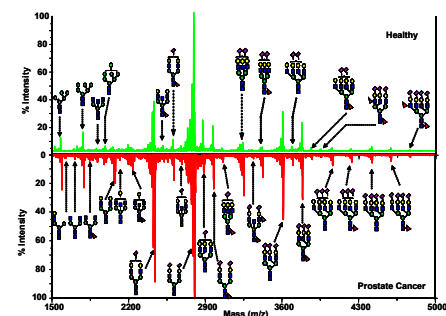
GLYCOMIC MAPS



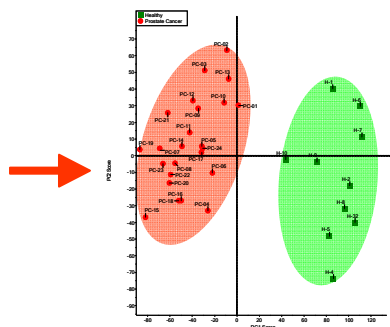


PCA of MALDI/MS Profiling of Glycans Derived from Blood Sera of Healthy Individuals and Breast Cancer Patients

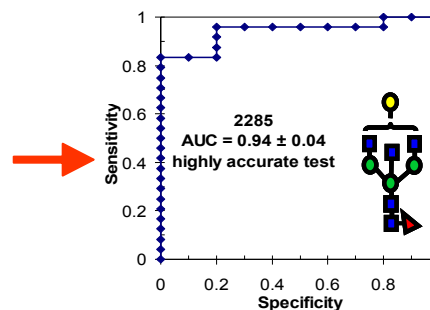




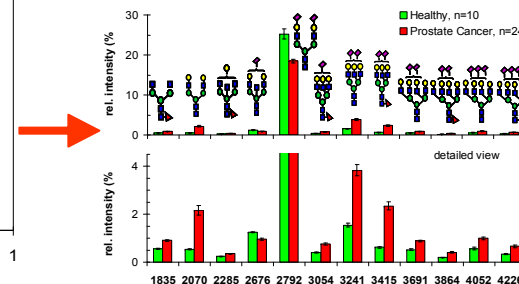
MALDI-MS



PCA



ROC



Potenciální glykánové
biomarkery

Postup směřující k možné diagnostice a prognostice rakoviny prostaty, který je založen na profilování permethylovaných glykánů pomocí MALDI-MS. Výsledky z této metodiky ukazují statisticky významné rozdíly mezi glykomickými profily 10 zdravých jedinců a 24 pacientů s rakovinou prostaty. Potenciální glykánové biomarkery pro rakovinu prostaty jsou poté stanoveny pomocí statistických testů jako PCA, ROC a ANOVA.

Kyselova, Z.; Mechref, Y.; Al Bataineh, M.; Dobrolecki, L.; Hickey, R.; Vinson, J.; Sweeney, C.; Novotny, M.V. *J. Proteome Res.*, 6 (2007) 1822-1832.



PCA of MALDI/MS Profiling of Glycans Derived from Sera of Cancer Free Individuals (n= 77), Liver Cancer Patients (n= 73), and Cirrhosis Patients (n= 53)

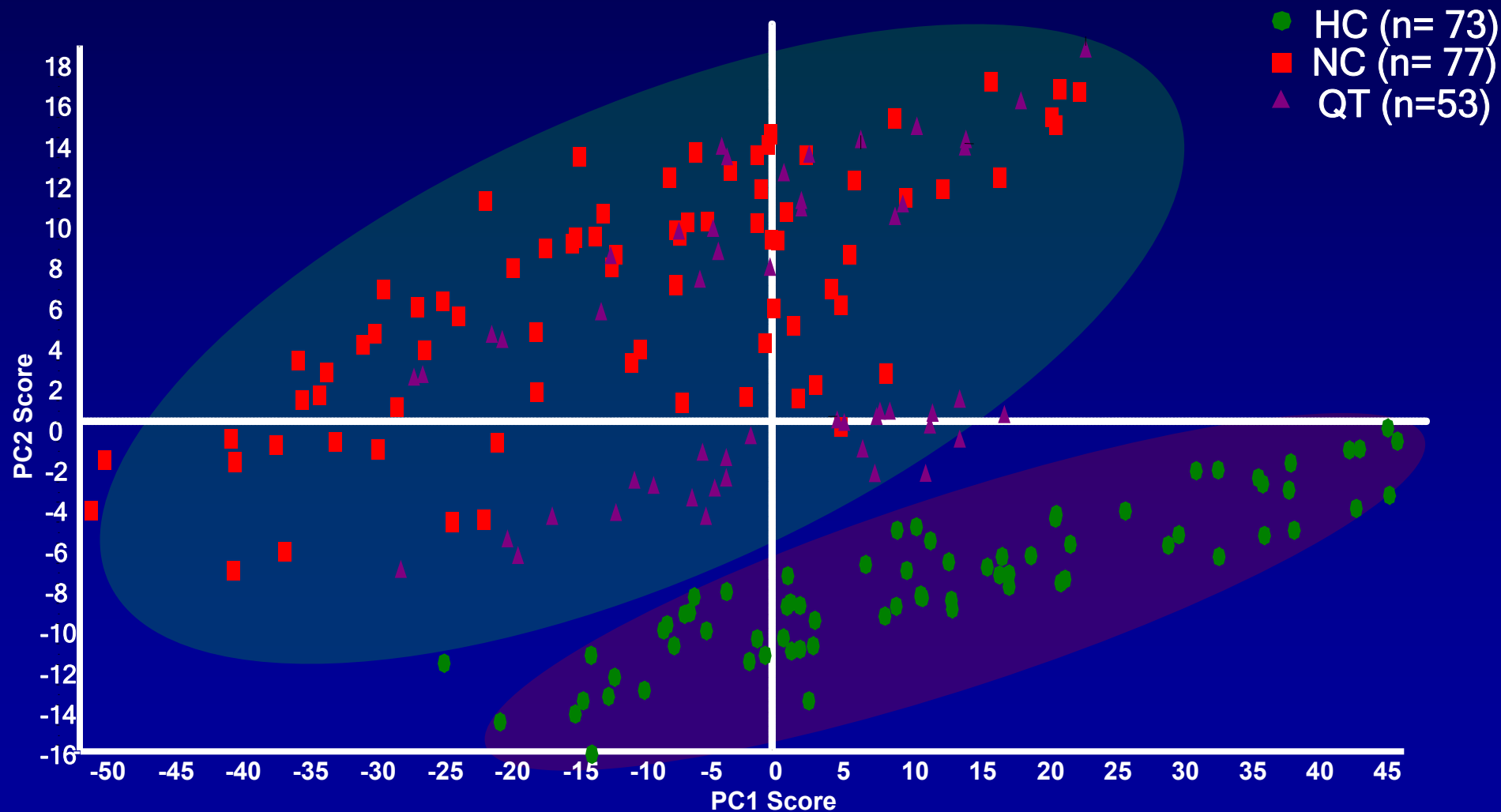


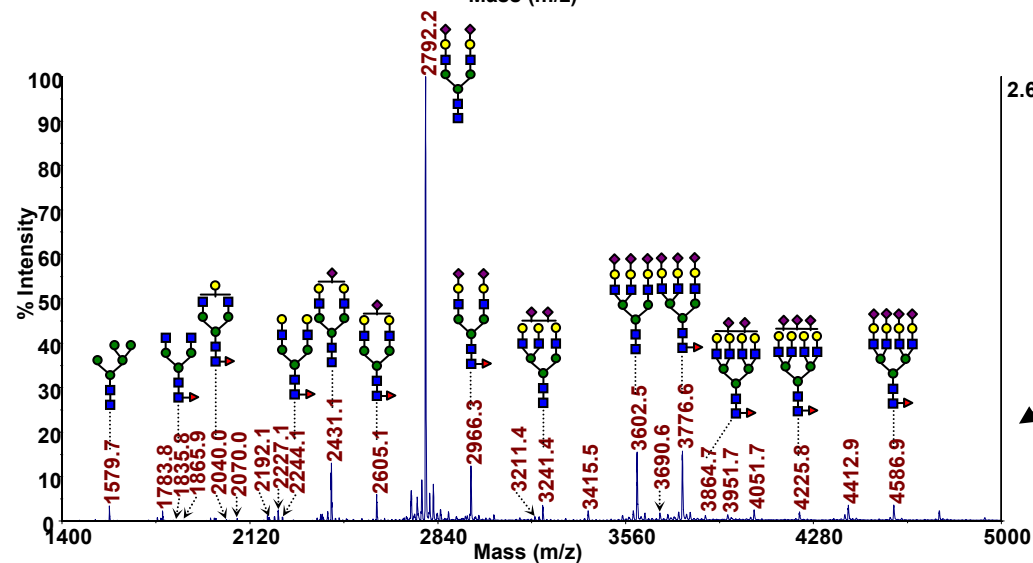
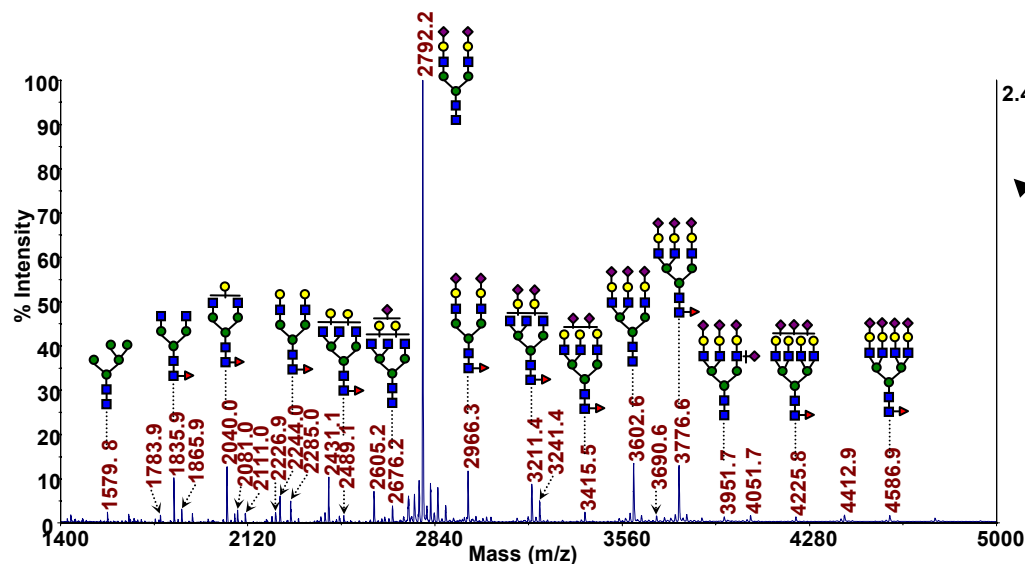
Table 2. Association of glycans with HCC

	Mass (Da)	Structure	OR (95% CI)	P
Glycan 1	3,241.9		0.03 (0.01-0.16)	<0.0001
Glycan 2	1,981.6		3.65 (1.35-9.81)	0.0105
Glycan 3	2,069.7		0.4 (0.2-0.9)	0.0223
Glycan 4	2,185.8		3.2 (1.2-8.5)	0.0169
Glycan 5	2,472.9		12.3 (4-37.8)	<0.0001
Glycan 6	4,052.2		0.03 (0.01-0.1)	<0.0001

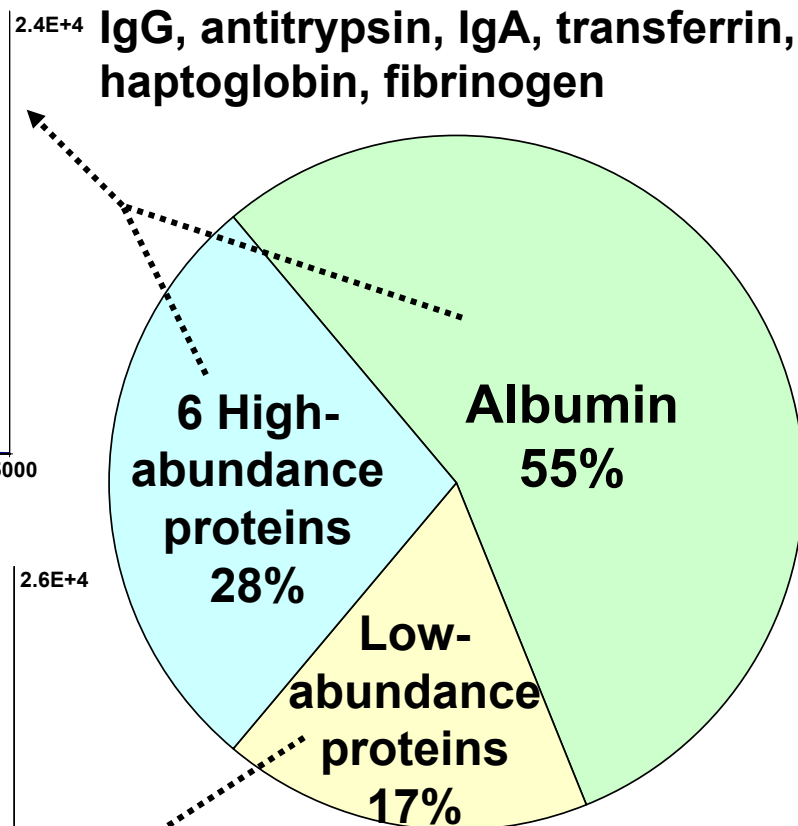
NOTE: Multivariate logistic regression controlled for age, gender, and HCV antibodies; 73 HCC cases and 77 population controls. Symbols: blue squares, *N*-acetylglucosamine; green circles, mannose; yellow circles, galactose; red triangles, fucose; purple rhomboid, *N*-acetylneuraminic acid.

Abbreviations: OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

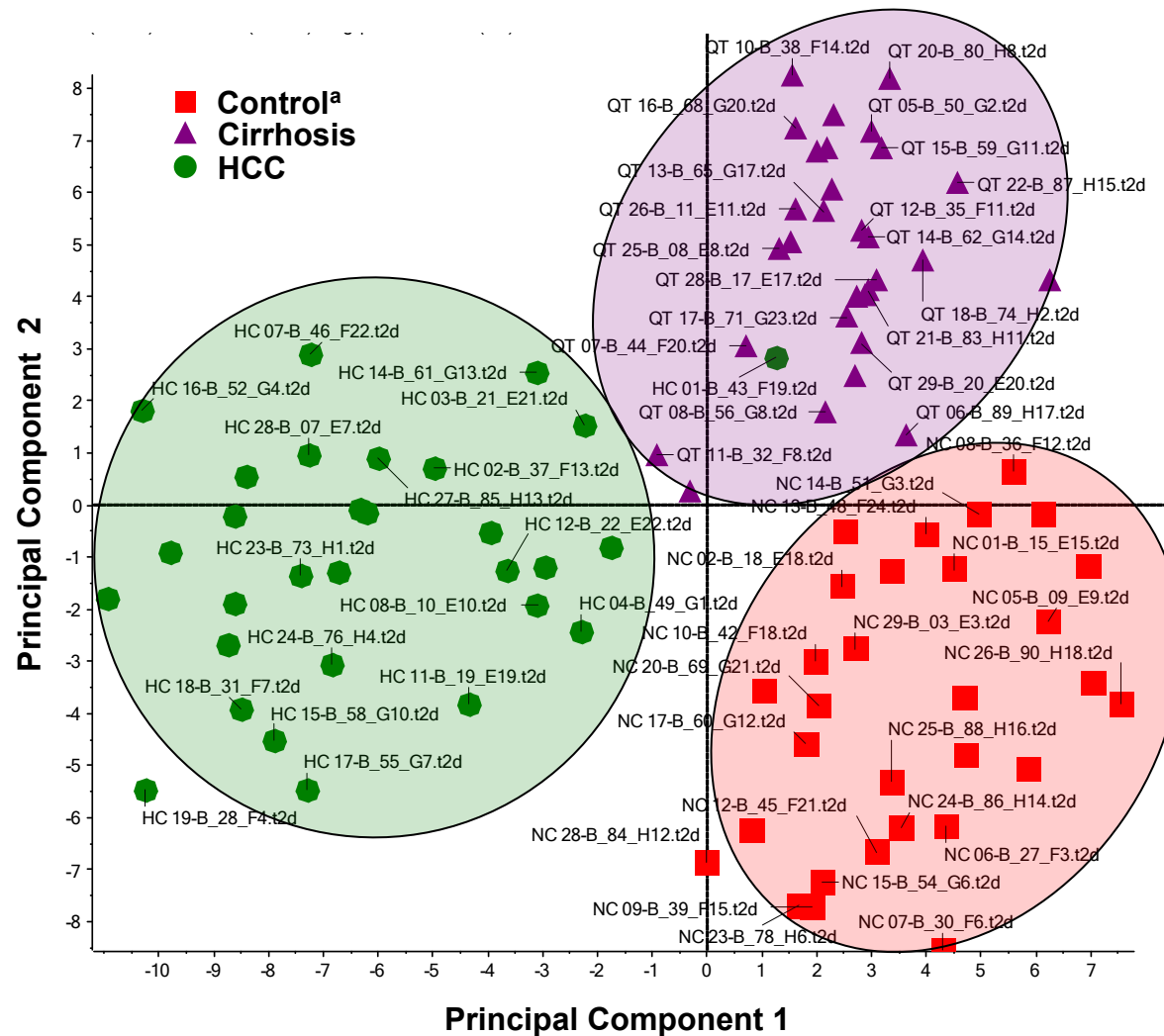
Immunoaffinity separation



6 High-abundance Proteins:
IgG, antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobin, fibrinogen

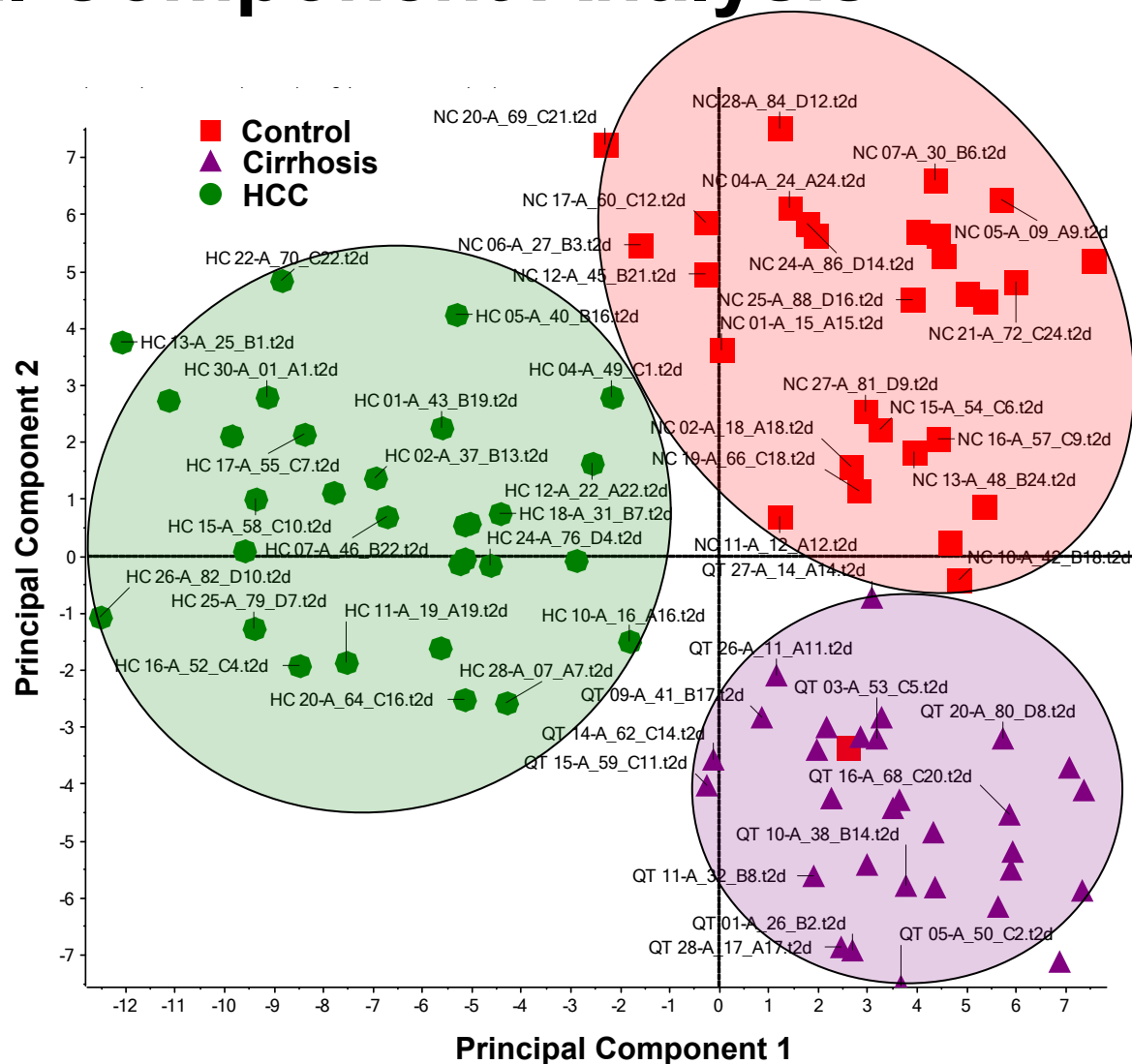


Principal Component Analysis



Major proteins

Principal Component Analysis



Minor proteins

ZÁVĚR

- **Glykobiologie se rapidně stává důležitou složkou veškerého výzkumu v oblasti moderní biologie a medicíny**
- **Glykomika a glykoproteomika využívá nových možností instrumentace v bioanalytické chemii a informační technologii**
- **Lze očekávat pokrok v klinické diagnóze a prognostických měřeních založených na objasnění otázek struktury a funkce glykánů**