

ROČNÍK 30 (2002), ČÍSLO 2

Bulletin



2

**ČESKÁ SPOLEČNOST PRO
BIOCHEMII A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII**



ISSN 1211-2526

BULLETIN

ČESKÉ SPOLEČNOSTI PRO BIOCHEMII A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII

<http://CSBMB.img.cas.cz>

TOMISLAV BARTH - VÝKONNÝ REDAKTOR

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
<barth@uochb.cas.cz>

IRENA KRUMLOVÁ- ZÁSTUPCE VÝKONNÉHO REDAKTORA

Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii, Kladenská 48,
160 00 Praha 6, tel. (02) 35 36 00 57

nebo Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT, 166 28 Praha 6, Technická 5
tel.: (02) 24 35 51 66, fax: (02) 24 35 51 67, e-mail <irena.krumlova@vscht.cz>

REDAKČNÍ RADA

T. Barth, J. Barthová, J. Duchoň, I. Krumlová, V. Kašička

Příspěvky na disketě 3,5", zpracované v textovém procesoru Word či WordPerfect, zasílejte, spolu s vytištěným textem, kterémukoli z redaktorů nebo do sekretariátu společnosti. Prosíme, abyste do textu nemontovali ani obrázky, ani tabulky. Připojte je v originále, případně na disketě ve zvláštních souborech, v textu označte, prosím, jen jejich umístění.

**Adresa ČSBMB: Kladenská 48, 160 00 Praha 6
tel.: 02/35 36 00 57 – záznamník**

ISSN 1211-2526

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

<http://CSBMB.img.cas.cz>

ODBORNÉ ČLÁNKY

V. Kadlčík, M. Kodíček, M. Hassman: Využití hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF pro studium prostorové struktury proteinů 56

ZPRÁVY ZE SEKČÍ

Peptidová sekce

J. Slaninová: 3rd Hellenic Forum on Bioactive Peptides. 65

I. Krejčí: Památce Ing. Evžena Kasafírka, CSc. 67

Sekce separačních metod

V. Kašíčka: Zpráva o sympoziu HPCE 2002. 69

RŮZNÉ

I. oznámení 72

Činnost Patentových a licenčních služeb SSČ AV ČR 74

International Max-Planck Research School. 75

VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE NA PRICIPU MALDI-TOF PRO STUDIUM PROSTOROVÉ STRUKTURY PROTEINŮ

Vojtěch Kadlčík, Milan Kodíček a Martin Hassman

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, I 6628 Praha 6,
e-mail: kadlcikv@email.cz, milan.kodicek@vscht.cz, martin.hassman@vscht.cz

OBSAH:

1. Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF
2. Charakterizace proteinů proteolytickým štěpením
3. Výměna vodíkových a deuteriových iontů
4. Specifické modifikace aminokyselinových zbytků
5. Identifikace posttranslačních modifikací
6. Disulfidová struktura proteinů
7. Přímá detekce nekovalentních komplexů
8. Závěr

1. Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF

V současné době dochází k prudkému nárůstu využití nových metod hmotnostní spektrometrie v oblasti biochemie. Jednou z nejvýznamnějších je v tomto směru metoda na principu MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight, dále MALDI-TOF MS).

Vzorek pro MALDI-TOF hmotnostní analýzu se připravuje smícháním analytu s přebytkem matrice, což je obvykle slabá organická kyselina. Směs se pak nanese na desku, která se po vysušení vzorku zasune do vakuovaného MALDI-TOF přístroje (obr. 1). K desorpci a ionizaci vzorku dochází ozářením krystalů směsi laserovým pulsem. Význam matrice spočívá v tom, že silně absorbuje laserové záření; teplotní relaxace excitovaných molekul matrice vede k jejímu vypařování, čímž dochází i k přechodu netěkavých molekul analytu do plynné fáze. Zá-

roveň matrice působí jako ionizační činidlo, jelikož protonuje nebo deprotonuje analyt; nejčastěji přitom vznikají molekuly analytu s jednotkovým nábojem. Matrice i intenzita laserového záblesku jsou voleny tak, aby nedocházelo k fragmentaci molekul analytu.

Hmotnost iontu může být obecně určena změřením jeho rychlosti po urychlení v elektrickém poli. V TOF spektrometru se měří čas letu iontu převážně v oblasti s nulovým elektrickým polem po dodání definované kinetické energie. Pulsní laser používaný v MALDI je přitom ideální pro spojení s TOF spektrometrem, neboť přesně určuje okamžik vzniku iontu. Detektor umístěný na konci separátoru pak měří čas letu každého iontu. Vzhledem k tomu, že částicím se stejným nábojem je urychlením v elektrickém poli dodána stejná kinetická energie, pohybují se lehké ionty rychleji než těžké. Vztah mezi dobou letu a hmotností iontu je popsán v rov. 1, kde t je doba letu, U urychlovací napětí, z náboj iontu a m hmotnost ion-

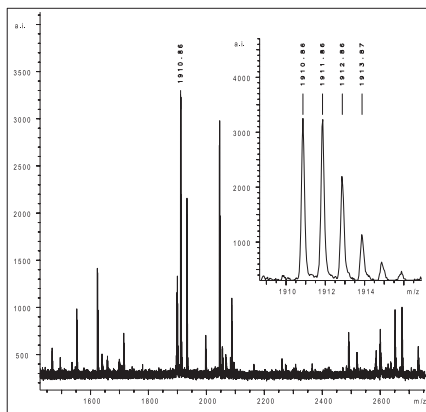
tu. Ze vztahu vyplývá, že skutečně měřenou veličinou není hmotnost, ale poměr hmotnost/náboj pro každý iont. Konstanta v rov. 1 je pro každé měření určena kalibrací.

$$t = \text{konst.} \times \sqrt{\frac{m/z}{U}} \quad (1)$$

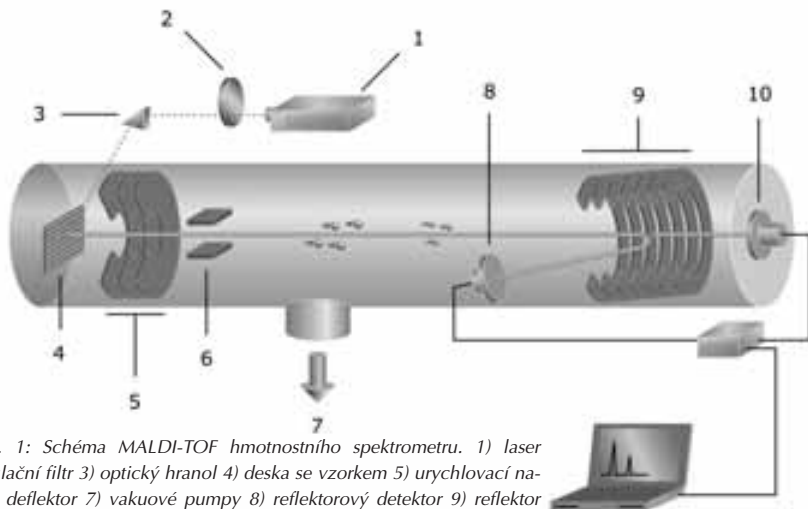
Současné MALDI-TOF spektrometry obsahují další prvky, které významně zvětšují rozlišení přístroje: zpožděnou extrakci iontů (delayed ion extraction) a reflektor. Zpožděná extrakce iontů, která spočívá v malém časovém posunu mezi desorpčí vzorku (zábleskem laseru) a aplikací urychlovacího napětí, do značné míry vyrovnává rozdíly v původních rychlostech iontů, které vznikají v průběhu desorpce. Optimální časový posun ovšem závisí na hmotnosti iontu, proto nelze celý hmotnostní rozsah měřit najednou s maximálním rozlišením.

Reflektor využívá elektrostatického pole pro odrazení iontů na druhý detektor v malém úhlu k původnímu směru letu. Rozlišení se zvyšuje jednak prodloužením dráhy letu, jednak zaostřovacím efektem, neboť ionty se stejným poměrem hmotnost/náboj, ale vyšší kinetickou energií, proniknou hlouběji do reflektoru, čímž se prodlouží doba

letu vůči iontům s nižší kinetickou energií. Měření v reflektorovém módu je velmi vhodné zejména pro detekci peptidů s molekulovou hmotností menší než 5000 Da. Dosahuje se zde fascinujících přesností, dovolujících bezpečně rozlišit molekuly lišící se např. o jeden neutron (izotopové rozlišení, obr. 2).

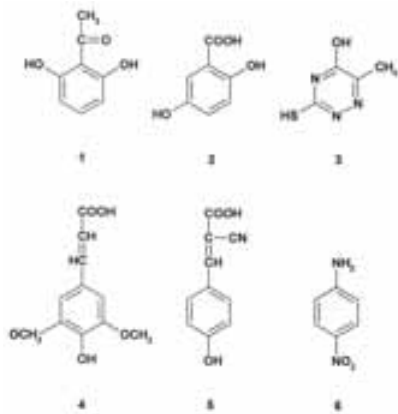


Obr. 2: Příklad MALDI-TOF hmotnostního spektra. Lidský sérový albumin po redukcí disulfidových můstků, zablokování thiolových skupin jodacetamidem a štěpení trypsinem. Ve výřezu izotopové rozlišení peptidového iontu (MH⁺) o hmotnosti 1910,86 Da.



Obr. 1: Schéma MALDI-TOF hmotnostního spektrometru. 1) laser 2) regulační filtr 3) optický hranol 4) deska se vzorkem 5) urychlovací napětí 6) deflektor 7) vakuové pumpy 8) reflektorový detektor 9) reflektor 10) lineární detektor

Zrod techniky MALDI-TOF MS lze datovat do roku 1989, kdy spojení ionizátoru MALDI a hmotnostního separátoru TOF poprvé použili R. Beavis a B. Chait. Historie obou komponent je ale mnohem delší. Spektrometry TOF se začaly používat v 50. letech, ale kvůli špatnému rozlišení nebyly dále rozvíjeny, a na vývoji techniky MALDI začali její autoři F. Hillenkamp a M. Karas pracovat v roce 1971¹. Jejich snaha byla motivována cílem vytvořit hmotnostní spektrometr pro měření spekter proteinů. Původní návrh, vypařování plasmu organického vzorku vysoce výkonným laserem, byl opuštěn. V roce 1980 ale autoři poprvé zpozorovali vliv matrice, když se podařilo současně zaznamenat spektrum alaninu a tryptofanu za podmínek, kdy očekávali pouze desorpci tryptofanu. Ten v dané směsi ovšem fungoval jako matrice pro alanin. Další vývoj šel cestou hledání nejvhodnější kombinace frekvence laseru a matricí, přičemž dnes nejpoužívanější dusíkový laser s vlnovou délkou 337 nm se v přístrojích objevil až po roce 1989; struktury matric, o nichž je zmínka v tomto přehledu, jsou uvedeny na obr. 3.



Obr. 3: Strukturální vzorce matricí zmiňovaných v tomto článku. 1) 2,6-dihydroxyacetofenon 2) 2,5-dihydroxybenzoová kyselina 3) 6-aza-2-thiothymin 4) 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-skořičová kyselina 5) α-kyano-4-hydroxyskořičová kyselina 6) p-nitroanilin

Zvyšování rozlišení separátoru TOF bylo umožněno rozvojem digitální techniky, přelomovým okamžikem pak bylo znovuobjevení a využití zpožděné extrakce iontů v roce 1995.

V oblasti biologických věd je MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie v současné době využívána především k detekci a identifikaci proteinů², sekvenaci DNA³, identifikaci bodových mutací⁴, sekvenaci peptidů⁵ a identifikaci bakteriálních kmenů⁶.

Ke studiu prostorové struktury proteinů byla zpočátku technika MALDI-TOF MS využívána pouze ojediněle, avšak postupně bylo vyvinuto několik metod, přičemž téměř každou lze použít ke studiu několika úrovní jejich struktury (např. struktura aktivního místa enzymu nebo vazebného místa proteinu, posttranslační modifikace, stabilita proteinů, odhad prostorové struktury, tvorba nekovalentních komplexů). Z tohoto důvodu je následující přehled tříděn převážně podle principu metody s příklady jednotlivých použití.

2. Charakterizace proteinů proteolytickým štěpením

Základem pro identifikaci bílkoviny nebo získání podrobnějších informací o její struktuře pomocí MALDI-TOF MS je specifické enzymové nebo chemické štěpení proteinu a měření hmotnostních spekter proteolytických štěpů. Jednotlivým pikům ve spektru pak lze přiřadit sekvence peptidů, a to porovnáním hmotností štěpů získaných experimentálně s hmotnostmi odvozenými na základě znalosti primární struktury proteinů a štěpících míst. Z tohoto důvodu je proteolytické štěpení součástí téměř všech dále uvedených metod. Nicméně už z průběhu samotného štěpení lze získat – vzhledem k jednoduchosti postupu – velmi zajímavé poznatky o stabilitě a konformaci proteinů. Nativní bílkoviny jsou obvykle odolné proti proteolyse, ale odolnost významně klesá již při částečném rozbalení molekuly.^{7,8} Studium časové závislosti prote-

olysy lysozymu a cytochromu c v různých koncentracích guanidinhydrochloridu bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací denaturačního činidla se nejen urychluje proteolýza, ale mění se také složení uvolňovaných fragmentů.⁹ To umožňuje zřetelné rozlišení denaturačních stavů i při malých změnách koncentrace denaturačního činidla.

Obdobná metoda byla využita pro studium konformace Cdk inhibitoru p21,¹⁰ kdy bylo zjištěno, že koncentrace denaturačního činidla nemá vliv na průběh proteolýsy a protein tudíž nemá rigidní strukturu. Omezením popsanych metod je samozřejmě stabilita proteolytického enzymu při denaturačních podmínkách, případně je nutné zohlednit pokles jeho aktivity.

Metody proteolytického štěpení bylo také využito při detekci konformačních změn UDP-N-acetylglukosaminolpyruvyltransferasy při vazbě substrátu,¹¹ kdy dochází ke zvýšení odolnosti vůči štěpení způsobené snížením flexibility proteinu.

Poněkud odlišnou aplikací této metody je mapování epitopu antigenu limitovanou proteolýsou komplexu antigen-protilátka.¹² Protilátka blokuje přístup k epitopu, peptid tvořící epitop proto není na rozdíl od zbytku molekuly štěpen. Po odstranění proteolytických fragmentů a disociaci komplexu lze peptidy, účastníci se na výstavbě antigenní determinanty, s výhodou analyzovat technikou MALDI-TOF MS.

3. Výměna vodíkových a deuteriových iontů

Izotopová výměna se běžně používá při získávání informací o struktuře peptidů a bílkovin. Principem této metody je skutečnost, že amidové protony proteinu se mohou vyměňovat s protony rozpouštědla. Pokud rozpouštědlo obsahuje deuteriové ionty, dochází k izotopové výměně, ta je přitom rychlejší v povrchových amidových skupinách. Kromě NMR je hlavní detekční technikou výměny hmotnostní spektrometrie na principu elektropray ionizace (ESI MS). MALDI-

TOF MS byla pro detekci výměny vodíkových iontů za deuteriové použita poprvé v roce 1998, modelovým proteinem byla cAMP-dependentní proteinkinasa.¹³ Deuterace byla provedena přidavkem D₂O a po oksylení roztoku byl protein štěpen pepsinem. V kyselém prostředí je omezena zpětná výměna izotopů, která snižuje reprodukovatelnost experimentu, a díky tomu se podařilo detekovat zastoupení deuteria v jednotlivých proteolytických fragmentech a tím odhadnout intezitu kontaktu jednotlivých částí molekuly proteinu s rozpouštědlem. Jiným přístupem pro omezení zpětné výměny je použití deuterované matrice.¹⁴ Metody H/D výměny bylo také použito pro detekci konformačních změn peptidů bradykininu, melittinu a α -melanocyty stimulujícího hormonu při přidavku D₂O do různých organických rozpouštědel obsahujících uvedené peptidy.¹⁵ S rostoucí polaritou rozpouštědla docházelo k rozvolňování struktury peptidů a tím i intenzivnější izotopové výměně.

Stejně výsledky jako H/D výměna poskytuje postup opačný, kdy je protein plně deuterován za denaturačních podmínek a po renaturaci dochází k D/H výměně. Výhodou této metody je, že zpětná výměna neovlivňuje negativně výsledek, ale na druhou stranu je omezena na proteiny s vratnou denaturací.¹⁴ D/H výměny bylo využito k identifikaci vazebných míst pro ATP a inhibitor cAMP-dependentní proteinkinasy.¹⁶ Protein je deuterován, zpětná výměna probíhá za přítomnosti ligandů. Po oksylení je protein štěpen pepsinem a proteolytické fragmenty analyzovány MALDI-TOF MS. Části peptidového řetězce, které se účastní vazby, jsou méně přístupné rozpouštědlu, zpětná výměna probíhá pomaleji a obsah deuteria v nich zůstane vyšší.

4. Specifické modifikace aminokyselinových zbytků

Použití MALDI-TOF MS pro detekci chemických reakcí představuje rychlou a efektivní metodu pro určování prostorové

struktury proteinů. Obecný postup lze popsat následujícími kroky:¹⁷ chemická modifikace proteinů, odstranění přebytku modifikačního činidla, štěpení proteinu specifickou proteasou, měření hmotnostních spekter proteolytických fragmentů a určení míst modifikace, interpretace dat ve vztahu k prostorové struktuře proteinu.

Modifikace histidinových zbytků v rhM-CSF- β (Recombinant Human Macrophage Colony-Stimulating Factor β) pomocí diethylpyrokarbonátu bylo použito pro zjištění úlohy histidinů v interakci ligand-receptor.¹⁸ Tryptické štěpy rhM-CSF- β byly identifikovány MALDI-TOF MS, správnost identifikace byla ověřena Edmanovým odbouráváním po rozdělení na HPLC. Modifikace histidinových zbytků byla doprovázena 80-90% ztrátou vazebné aktivity, což dokázalo účast histidinových zbytků ve vazebné interakci. Reaktivita jednotlivých histidinových zbytků s modifikačním činidlem se zvyšovala s jejich povrchovou dostupností vypočtenou na základě krystalografických údajů. Modifikační specifita diethylpyrokarbonátu a vliv reakčních podmínek pak byly testovány na insulinu a angiotensinu II.¹⁹ Studie ukázala, že již v malé molekule insulinu jsou významné rozdíly v reaktivitě histidinových zbytků, které lze vysvětlit rozdílnými strukturálními povrchovými rysy. K detekci modifikací byla kromě MALDI-TOF MS použita ESI MS.

Chemické modifikace lysinových zbytků pomocí anhydridu kyseliny jantarové a jejich detekce MALDI-TOF MS bylo využito pro rozlišení konformačních stavů nativního a ve vodě rozpuštěného porinu *Rhodobacter capsulatus*.^{20,21} Bylo zjištěno, že při modifikaci nativního porinu dochází k sukcinylaci tří lysinových zbytků na vnitřní straně kanálu, zatímco modifikace ve vodě rozpuštěného porinu vede k sukcinylaci tří jiných lysinových zbytků, které jsou v nativním proteinu nepřístupné. Rentgenovou krystalografií bylo ověřeno, že modifikace nezpůsobuje změnu prostorové struktury porinů.

MALDI-TOF MS byla také testována pro detekci peptidů obsahujících nitrovaný tyrosin.²² Předchozí výzkumy ukázaly, že hladina nitrovaných proteinů se zvyšuje při některých onemocněních, např. Alzheimerově chorobě a aterosklerose. Modelové peptidy byly vytvořeny tryptickým štěpením hovězího sérového albuminu nitrovaného tetranitromethanem. Ukázalo se, že nitrované peptidy poskytují při měření specifickou sérii iontů, jejichž vznik je dán chemickými přeměnami nitrofenolu během desorpce a ionizace.

Informaci o vzájemných vzdálenostech povrchových aminokyselin lze získat použitím bifunkčních činidel, která vedou k prokřížení aminokyselinových zbytků. Bifunkční činidla pro lysin byla použita např. pro získání informací o struktuře CMP-NeuAc syntetasy, HIV-1 integrasy¹⁷ a acetylcholinového receptoru.²³ Jako bifunkční činidlo byl použit bissulfosukcinimidylsberát, respektive dimethylsberimát. Bifunkční činidla mohou vytvářet i mezimolekulové vazby, přítomnost náhodně spojených peptidů by ovšem ztěžovala hmotnostní analýzu. Proto byla po modifikaci reakční směs přečištěna gelovou chromatografií.²³

Jako bifunkční činidla pro cysteinové zbytky byly testovány deriváty arsenitých kyselin²⁴ (melarsen oxid, 4-aminofenylarsenitá kyselina a pyridinyl-3-arsenitá kyselina) a to na redukovaném hovězím pankreatickým inhibitoru trypsinu a redukovaném peptidu oxytocinu. Proteolytické štěpení po modifikaci bylo provedeno přímo na MALDI-TOF terčí přidáním roztoku enzymu. Nejlepším z použitých činidel se ukázal být melarsen oxid z důvodů vysoké rozpustnosti a také poměrně vysoké molekulové hmotnosti.

Obdobně lze MALDI-TOF MS použít pro určení míst modifikace u proteinů, které byly stabilizovány prokřížením pro další použití. Příkladem je identifikace míst modifikace oxyhemoglobinu, ve kterém byly lysinové zbytky prokříženy bis(3,5-dibromosalicyl)

sukcinátem.²⁵ Význam takto upravených hemoglobinů spočívá v možném využití jako krevní náhrady.

Metodu detekce chemických modifikací pomocí MALDI-TOF MS lze, podobně jako metodu proteolytického štěpení, využít k mapování epitopů.²⁶ Výhodou metody modifikačních reakcí však je, že umožňují charakterizaci konformačních epitopů, nikoliv pouze lineárních. Jako modelový systém byl použit lysozym vaječného bílku a odpovídající monoklonální protilátka typu IgM. Použitými modifikačními reakcemi byla jodace tyrosinu, acetylace lysinu a modifikace argininu 1,2-cyklohexandionem. Epitop byl identifikován na základě rozdílů mezi modifikací komplexu antigen-protilátka, ve kterém jsou aminokyselinové zbytky epitopu proti modifikaci chráněny protilátkou, a modifikací samotného lysozymu. Přesnost vymezení epitopu je dána hustotou modifikovaných aminokyselin na povrchu proteinu a počtem provedených modifikací.

5. Identifikace posttranslačních modifikací

MALDI-TOF MS je také využívána k detektování proteinů modifikovaných *in vivo*, tedy k identifikaci posttranslačních modifikací. Určení míst posttranslačních modifikací pak přispívá k poznatkům o prostorové struktuře proteinů. Nutnou podmínkou je opět znalost primární struktury proteinů. MALDI-TOF MS a ESI MS byly použity k určení míst fosforylace a glykosylace hovězího chromograninu A z dřeneň nadledvinek²⁷ na základě porovnání hmotností proteolytických štěpů nativního a defosforylovaného nebo deglykosylovaného chromograninu A. Směs tryptických štěpů proteinu byla vzhledem k velkému počtu štěpicích míst příliš složitá pro jednoznačnou identifikaci peptidů, proto bylo nejprve provedeno štěpení bromkyanem, rozdělení na koloně s reverzní fází a poté tryptické štěpení. Takto zjednodušené směsi bylo již možné přímo analyzovat hmotnostní spektrometrií.

Fosforylační místa kaseinomakropeptidu byla identifikována MALDI-PSD-MS (PSD = post source decay).²⁸ Ukázalo se, že fosforylované serinové zbytky jsou během PSD nestabilní, ztrácejí fosfátovou skupinu a fosfoserin se mění na dehydroalanin, který je ve spektru detekován. To je rozdíl oproti fosfotyrosinu, který je při PSD stabilní. Jiným příkladem je porovnání *in vivo* a *in vitro* fosforylace parafosinu peptidovým mapováním proteinu pomocí MALDI-TOF MS.²⁹

Jako příklad využití MALDI-TOF MS pro studium glykosylace lze uvést určení míst N-glykosylace a velikosti oligosacharidů kvasničné invertasy³⁰ nebo studium heterogenity glykosylace lidského interferonu γ .³¹

6. Disulfidová struktura proteinů

Disulfidová struktura proteinů je součástí jejich kovalentní struktury, ale zároveň vypoovídá o prostorovém uspořádání proteinů, zejména u proteinů s velkým počtem disulfidových můstků. Disulfidovou strukturu proteinů s malým počtem cysteinových zbytků lze pomocí MALDI-TOF MS určit na základě analýsy proteolytických štěpů. Takto byly například identifikovány tři disulfidové můstky lidské β -hexosaminidasy B.³² Při vyhodnocování spekter proteolytických štěpů je ovšem nutné brát v úvahu zvláštní chování disulfidových vazeb během ionizace. Při použití maticí γ -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny a 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny a vyšších intenzit laseru totiž dochází ke štěpení disulfidových vazeb a příslušné peptidy pak svými hmotnostmi odpovídají redukováným.³³

Pro proteiny s velkým počtem disulfidových vazeb lze k jejich identifikaci využít kombinaci MALDI-TOF MS a N-koncové sekvence peptidů. Touto metodou byla určena disulfidová struktura extracelulární domény lidského epidermálního receptoru pro růstový faktor, která obsahuje 25 disulfidových vazeb.³⁴ Izolovaná doména byla štěpena bromkyanem a sérií proteas, po každém ště-

pení byly fragmenty izolovány pomocí HPLC a identifikovány hmotnostní spektrometrií a sekvenováním. Znalost disulfidové struktury umožnila navrhnout prostorový model domény.

7. Přímá detekce nekovalentních komplexů

MALDI-TOF MS byla dlouhou dobu považována za nevhodnou techniku pro detekci nekovalentních komplexů, a proto byla k tomuto účelu použita až v roce 1995.³⁵ Postupně se však metoda podařilo aplikovat k detekci komplexů protein-sulfonové barvivo,^{36,37} protein-kovový iont,³⁵ protein-peptid^{35,38} a protein-protein.^{38,39} Hlavním problémem je zajistit, aby komplexy, které se tvoří v roztoku, byly zachovány i po vykryštalizování směsi vzorek-matrice na terči. Jak bude blíže popsáno dále, nejdůležitější změnou standardního postupu přípravy vzorku je použití neutrální matrice nebo kyselé matrice neutralizované přidáním vzorku. Pro úspěšnou detekci specifických komplexů protein-protein a protein-peptid je předpokladem zachování terciární struktury proteinu.

Komplexy několika modelových peptidů a proteinů se sulfonovými barvivy (Cibacron blue F3GA a Direct Yellow 50) byly detektovány pomocí MALDI-TOF MS za použití *p*-nitroanilinu jako matrice.³⁶ Bylo dokázáno, že v komplexu interagují sulfonátový anion a kladně nabitě (bazické) postranní řetězce aminokyselin. Počet navázaných molekul barviva odpovídal počtu dostupných bazických skupin modelových molekul a metodu je proto možno využít ke zjištění počtu povrchových bazických skupin proteinů. V návazné studii byla testována celá řada dalších sulfonátů.³⁷ Zajímavé byly jednodušší sulfonáty (např. naftalen-1,5-disulfonová kyselina), které se vážaly pouze k argininu a kterých je tedy možné použít jako specifických „modifikačních“ činidel.

Neutrální roztok α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny byl použit jako matrice

pro detekci komplexu zinečnatých iontů a zinek vázajících peptidů (zinc finger peptides).³⁵ V kyselém prostředí totiž dochází k vytěsnění zinečnatého iontu z komplexu protony rozpouštědla. Ve stejné studii bylo použito neutrálního roztoku 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicové kyseliny jako matrice pro detekci komplexu enzym-substrát (aminopeptidasa I a peptid).

Další možností je použití matrice 6-aza-2-thiothyminu bez dalších organických rozpouštědel,³⁸ pomocí níž byly detektovány nekovalentní komplexy RNasy S a dimerů některých peptidů (leucine zipper polypeptides).

Možnosti MALDI-TOF MS pro měření nekovalentních komplexů protein-protein byly studovány u proteinů tvořících v roztoku homooligomery (streptavidin, kvasničná alkoholdehydrogenasa a hovězí jaterní katalasa).³⁹ Jako nevhodnější matrice se v tomto případě ukázal být 2,6-dihydroxyacetofenon rozpuštěný v tetrahydrofuranu (byl ale použit laser o vlnové délce 355 nm). Podařilo se detektovat tetramery všech tří proteinů, přičemž intenzita píku komplexu byla vždy větší než intenzita píku monomerů. Právě poměr intenzit je důležitý pro odlišení přirozených komplexů a aduktů, které běžně vznikají při měření. Intenzita píků těchto aduktů totiž bývá daleko menší než intenzita píku monomeru. Velmi zajímavou, ale těžko vysvětlitelnou skutečností byla závislost charakteru spektra na způsobu měření. Pík komplexu byl totiž intenzivní jen při první střele laseru do jednoho místa, při dalších střelách jeho intenzita významně klesala. Přes úspěšnost detekce uvedených komplexů nelze popsaný postup považovat za univerzálně použitelný, což lze ilustrovat skutečností, že se autorům nepodařilo detektovat velmi silný komplex streptavidin-biotin.

MALDI-TOF MS je také využívána k detekci komplexů protein-DNA. Jako matrice byly použity např. 6-aza-2-thiothymin⁴⁰ a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina.⁴¹ Vzhledem k iontové povaze interakce protein-DNA je

pro tvorbu komplexů opět určující zvolené pH.⁴¹

8. Závěr

Z uvedených příkladů vyplývá, že MALDI-TOF MS lze využít pro řešení širokého spektra problémů prostorové struktury proteinů. Výhodou těchto metod je zejména jejich rychlost a jednoduchost. Na druhé straně byly popsány metody často použity pouze pro omezený počet modelových proteinů a aplikace na reálné problémy, případně spojení jednotlivých metod pro komplexní charakterizaci proteinů s neznámou strukturou, stále zůstává zajímavou výzvou.

Práce vznikla s podporou grantu Grantové agentury České republiky 203/02/0922.

Souhrn:

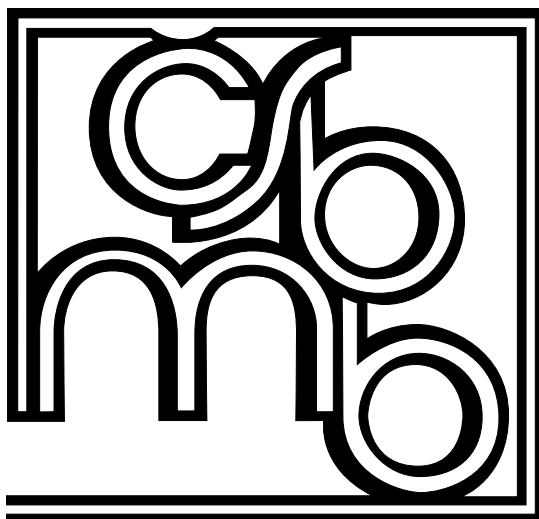
MALDI-TOF MS, technika vyvinutá na konci 80. let, dnes představuje rutinní metodu pro detekci a identifikaci proteinů. Stále častější je nicméně i její využití pro studium prostorové struktury proteinů. Hlavními přístupy jsou v tomto směru detekce chemických a posttranslačních modifikací proteinů, charakterizace struktury proteinů proteolytickým štěpením, detekce výměny deuteriových a vodíkových iontů, charakterizace disulfidové struktury proteinů a přímá detekce nekovalentních komplexů. MALDI-TOF MS tak představuje techniku, která může nahradit některé časově a experimentálně mnohem náročnější metody, může však také poskytnout informace jinými metodami nezjistitelné.

Literatura:

- Hillenkamp F., Karas M.: *Int. J. of Mass Spectrom. Ion Processes* 200, 71 (2000).
- Lamer S., Jungblut P. R.: *J. Chromatogr. B* 752, 311 (2001).
- Wang B. H., Hopkins C. E., Belenky A. B., Cohen A. S.: *Int. J. of Mass Spectrom. Ion Processes* 169/170, 331 (1997).
- Griffin T. J., Smith L. M.: *Trends Biotechnol.* 18, 77 (2000).
- Franzen J., Frey R., Holle A., Krauter K.: *Int. J. of Mass Spectrom. Ion Processes* 206, 275 (2001).
- Baar B.: *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 193 (2000).
- Yang H. J., Tsou C. L.: *Biochem. J.* 305, 379 (1995).
- Fontana A., Zamboni M., Laureto P. P., Filippis V., Clementi A., Scaramella E.: *J. Mol. Biol.* 266, 223 (1997).
- Yang H. H., Li X. C., Amft M., Grote-meyer J.: *Anal. Biochem.* 258, 118 (1998).
- Kriwacki R. W., Wu J., Tennant L., Wright P. E., Siuzdak G.: *J. Chromatogr. A* 777, 23 (1997).
- Krekel F., Oecking C., Amrhein N., Machero P.: *Biochemistry* 38, 8864 (1999).
- Water J., Deininger S. O., Macht M., Przybylski M., Gersgwin M. E.: *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 85, 229 (1997).
- Mandell J. G., Falick A. M., Komives E. A.: *Anal. Chem.* 70, 3987 (1998).
- Villanueva J., Canals F., Villegas V., Querol E., Avilés F. X.: *FEBS Lett.* 472, 27 (2000).
- Figueroa I. D., Russell D. H.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 719 (1999).
- Mandell J. G., Falick A. M., Komives E. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14705 (1998).
- Gibson B. W., Kuntz I. D., Tang N., Dollinger G., Oshiro C. M., Hempel J. C., Taylor E.: *PCT Int. Appl. WO 2000072004 A2*, *Chem. Abstr.* 134, 27293 (2001).
- Gocker M. O., Kalkum M., Yamamoto R., Schreurs J.: *Biochemistry* 35, 14625 (1996).
- Kalkum M., Przybylski M., Glocker M. O.: *Bioconjugate Chem.* 9, 226 (1998).
- Buhler S., Schnaible V., Glocker M. O., Michels J., Zeth K., Walte W., Przybylski M.: *Adv. Mass Spectrom.* 14, C017030/1-C017030/13 (1998).
- Walte W., Diederchs K., Przybylski M., Glocker M. O., Benz R., Breed J.: *NATO ASI Ser., Ser. C* 510, 239 (1998).

22. Sarver A., Scheffler N. K., Shetlar M. D., Gibson B. W.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 439 (2001).
23. Watty A., Weise C., Dreger M., Franke P., Hucho F.: *Eur. J. Biochem.* 252, 222 (1998).
24. Happersberger H. P., Przybylski M., Glocker M. O.: *Anal. Biochem.* 264, 237 (1998).
25. Yang T., Horejsh D. R., Mahan K. J., Zaluzec E. J., Throck J. W., Gage D. A.: *Anal. Biochem.* 242, 55 (1996).
26. Fiedler W., Borchers C., Macht M., Deininger S. O., Przybylski M.: *Bioconjugate Chem.* 9, 236 (1998).
27. Bauer S. H. J., Zhang X., Dongen W., Clayes M., Przybylski M.: *Anal. Biochem.* 274, 69 (1998).
28. Talbo G. H., Suckau D., Malkoski M., Reynolds E. C.: *Peptides* 22, 1093 (2001).
29. Kussmann M., Hauser K., Kissmehl R., Brees J., Plattner H., Roepstorff P.: *Biochemistry* 38, 7780 (1999).
30. Zeng C., Biemann K.: *J. Mass Spectrom.* 34, 311 (1999).
31. Harmon B. J., Gu X., Wang D. I.: *Anal. Chem.* 68, 1465 (1996).
32. Schuette C. G., Weisgerber J., Sandhoff K.: *Glycobiology* 11, 549 (2001).
33. Patterson S. D., Katta V.: *Anal. Chem.* 66, 3727 (1994).
34. Abe Y., Odaka M., Inagaki F., Schlessinger J., Kohda D.: *J. Biol. Chem.* 273, 11150 (1998).
35. Woods A. S., Buchsbaum J. C., Worrall T. A., Berg J. M., Cotter R. J.: *Anal. Chem.* 67, 4462 (1995).
36. Salih B., Zenobi R.: *Anal. Chem.* 70, 1536 (1998).
37. Friess S. D., Zenobi R.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 810 (2001).
38. Glocker M. O., Bauer S. H. J., Kast J., Volz J., Przybylski M.: *J. Mass Spectrom.* 31, 1221 (1996).
39. Cohen L. R. H., Strupart K., Hillenkamp F.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8, 1046 (1997).
40. Lin S., Cotter R. J., Woods A. S.: *Proteins Suppl.* 2, 12 (1998).
41. Tang X., Callahan J. H., Zhou P., Vertes A.: *Anal. Chem.* 67, 4542 (1995).

Článek byl převzat z *Chem. listů* (č. 7), (2002) se souhlasem šéfredaktora.



Sekce PEPTIDOVÁ

Biologicky aktivní peptidy

3RD HELENIC FORUM ON BIOACTIVE PEPTIDES

Representativní setkání řeckých peptidů – 3rd Hellenic Forum on Bioactive Peptides se konalo ve dnech 11. – 14. dubna t.r. opět ve městě Patras 210 km od Atén na Peloponésském poloostrově v Konferenčním a kulturním centru tamní university. Bylo organizováno prof. Cordopatisem, vůdčí osobností peptidového výzkumu v Řecku (zvoleného zástupce Řecka v EPS pro příští 4 roky) stejně jako předcházející 2 setkání. Zatímco prvního Fora (v roce 1997 tamtéž) se účastnilo asi 70 účastníků, letos se tu sešlo a diskutovalo už přes 200 účastníků různé aspekty výzkumu peptidů, z toho více než 50 procent studentů a mladých vědců ze všech hlavních univerzitních center (Atény, Patras, Ioannina, Soluň, Herakleion) a dalších státních výzkumných ústavů.

Jednání fora zahájil předseda organizačního výboru Prof. Pavlos Cordopatis a úvodní zdravotici pronesl předseda Evropské peptidářské společnosti Prof. R. Rocchi z Padovy. Poté nestor peptidářského výzkumu v Řecku, předseda „Leonidas Zervas“ Foundation, Prof. Dimitrios Theodoropoulos, předal ocenění 3 mladým řeckým vědeckým pracovníkům. Úvodní plenární přednášku s názvem „Peptide and Peptide Mimetic Drug Design: New Paradigms, New Opportunities, New Ethical Concerns“ pak pronesl Prof. V. J. Hruby z Arizony. Slavnostní zaháje-

ní Fora bylo ukončeno 20ti minutovým koncertem smyčcového kvarteta a recepcí. V dalších dvou dnech pak bylo proneseno 27 přednášek a presentováno 56 plakátů. Přes polovinu plenárních přednášek pronesli zahraniční hosté (Prof. F. Albericio, Prof. E. Giralt a Prof. D. Andreu, Barcelona, Prof. J. Martinez a Dr. J.-A. Fehrentz, Montpellier, Prof. C. Gilon, Jerusalem, Prof. F. Hudecz, Budapest, Prof. C. Toniolo, Padova, Prof. E. Benedetti, Neapol, Dr. J. Slaninová, Praha a Prof. A. Eberle, Curych). Jednání fora probíhalo v řečtině a pro neřecky mluvící účastníky byl zajištěn kvalifikovaný simultánní překlad do angličtiny (pro účastníky nezběhlé v angličtině pak také překlad do řečtiny). Plakáty byly vystaveny po celou dobu konání fora ve vzdušném a prostorném foaje, kde také probíhala výstavka firem (např. ANTI-SEL, SELIDIS Bros, N. ASTERIADIS, Bioline Scientific, Discover – Papassotiriou, Hellamco a dalších). Šíře záberu peptidového výzkumu v Řecku je obrovská namátkou jmenujme: základní výzkum týkající se metodiky syntézy na pevné fázi a v roztoku (C. Zikos, Atény), syntéza malých peptidů a peptidomimetik za účelem vývoje léčiv či diagnostických kitů (např. detekce autoprotiláttek, studium pathogenese autoimunitní odpovědi, H.M. Moutsopoulos, Atény, epitopy autoantigenů v případě Sklerosy Multiplex, J. Matsoukas, Atény, T. Tselios,

Patras), syntéza modelových peptidů potřebných k teoretickému studiu konformace (V. Tsikaris, Ioannina, A. G. Tzakos, Ioannina, A. S. Galanis, Patras, V. Magafa, Patras a další), tak epitopů pro přípravu protilátek (M. N. Alexis, Atény), tak syntetických vakcín, tak nových značených substrátů a inhibitorů enzymů (A. Yiotakis, C. Tzougraki, Atény) či syntetických proteinů a polyaminových skeletů (N. Tsikopoulos, Patras). Forum bylo ukončeno výletem všech účastníků k archeologickým vykopávkám v Olympii a návštěvou tamního nádherného musea. Zajímavou epizodou byla návštěva malého zcela nového podniku založeného prof. Barlosem na výrobu tzv. „Barlosovy pryskyřice“ k syntéze peptidů. Továrnička vznikla během 7 měsíců na zelené louce na okraji Patrasu a zájem o její produkt – tritylovanou

pryskyřici je mimořádný. Takovýto úspěch peptidového výzkumu samozřejmě táhne mladé lidi do této oblasti výzkumu. Vřelost Řeků a jejich pohostinnost udělala z tohoto náročného vědeckého setkání velice příjemnou záležitost.

Podpora, která je v Řecku peptidovému výzkumu věnována je veliká. Je to vidět z výčtu institucí, kterým organizátoři děkují za příspěvek k organizaci Fora. Výzkum peptidů je podporován nejen státem, městy a farmaceutickým průmyslem, ale také z fondů Evropské Unie. Řecký peptidový výzkum má do budoucna o následovníky postaráno. Mnoho vlivných osobností zastává názor, že peptidy jsou léky budoucnosti, což je ta největší deviza do budoucnosti. Čtvrté forum řeckých peptidářů by se mělo konat za 3 roky tamtéž.

Jiřina Slaninová

PAMÁTKY ING. EVŽENA KASAFÍRKA, CSc.

Dne 12.5. 2001 zemřel tragicky při neuvěřitelně nešťastné shodě náhod Ing. Evžen Kasafírek, CSc.. Odešel jeden z významných reprezentantů farmaceutické chemie uplynulých několika desítek let dnes již minulého století. Krutá tečka za životem vzácného člověka, kolegy kdykoli ochotného přispět radou a také – tam kde to bylo možné – praktickou pomocí ze zásob látek, meziproductů, substrátů pro stanovení aktivity proteáz, nebo z úctyhodných zdrojů literatury.

Celá jeho profesní kariéra byla spojena s Výzkumným ústavem pro farmacii a biochemii – VÚFB. Chemie zaměřená k vývoji léčiv vyhovovala jeho životnímu vyznání. Vytvořit látky, které by pomáhaly léčit bylo cílem, který uspokojoval jeho potřebu po smyslu lidského konání. Patřil k tomu typu vědce, který se svému povolání věnuje s veškerou energií a nasazením; nutno dodat, že také s radostí. V ústavu byl znám svými časnými příchody, kdy se v klidu a tichu dosud liduprázdné knihovny probíral nově došlými časopisy. Okno jeho laboratoře svítilo do pozdního večera, často do noci.

Bůhví kde, snad v genetické výbavě, vznikají naše afinity, náklonnosti, zaujetí pro nějaký, často vysoce specifický obor činnosti. Pak může stačit jedna jiskra. U Evžena Kasafírka to bylo něco jako láska na první pohled: chemie peptidů. Tu jiskru zaujetí zažehly – podle jeho slov – přednáška a setkání s Prof. Josefem Rudergerem. Ten se pak stal jeho učitelem, spolupracovníkem a přítelem; nepřestal na něj s vděčností vzpomínat. Díky této orientaci zažil rozmach peptidářské chemie v oblasti neurohypofysárních hormonů na ÚOCHB a také se na něm podílel se svým obvyklým zaujetím. Jím syntetizovaný triglycyl-vasopresin je dodnes používaným léčivem uvnitř i vně našich hranic. Peptidům zůstal věrný doslova celý život. Přitahovala ho možnost zasahovat do pochodu živočišného organismu jeho vlastními

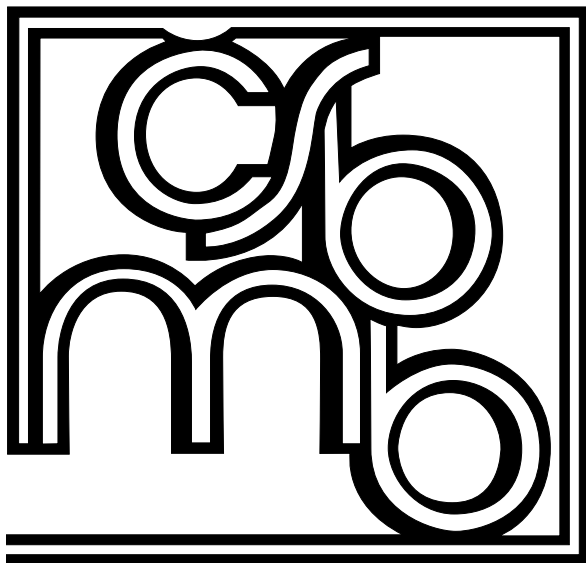
regulačními látkami na úrovni hormonů a působků nebo enzymatických systémů a obměnami molekuly cílit jejich účinky žádoucím směrem. To bylo z hlediska omezených možností syntézy velkých peptidických molekul možné např. přípravou hypotalamických liberinů, jako byl uvolňující faktor gonadotropinů – gonadorelin, nebo thyreotropního hormonu. V obou případech vypracoval nejen jejich syntézu, ale připravil i řadu obměn, jako byly superaktivní analogy gonadoliberinu. Do této etapy patřila také příprava somatostatinu. Z různých důvodů, specifických pro tehdejší dobu, uvázly tyto a další peptidické látky, které připravil, někde na cestě k realizaci. Směr přípravy malých peptidických molekul navržených cíleně pro specifický zásah sledoval po celou dobu své činnosti. Rozsáhlé znalosti biologie mu umožňovaly využívat rychle se rozvíjejících nových přístupů k tomuto typu léčiv. V osmdesátých letech se zaměřil na imunomodulační peptidy thymu a fragment molekuly thymopoetinu – pentapeptid, opět se sérií analogů. Velkým tématem tohoto období byl pokus o vývoj inhibitorů elastázy pro léčbu akutní pankreatitidy. On a Prof. MUDr. Přemysl Frič se spolupracovníky, kteří prováděli biologické hodnocení těchto originálních látek na zvířecích modelech, věnovali tomu projektu značné úsilí. Výsledkem byly látky se slibnými účinky. To však už se změnila doba a s ní i mnohé priority, stoupala finanční a časová náročnost především vývoje a zavádění nového původního preparátu, a další vývoj byl zastaven. Podobný osud potkal i spirocyklický dipeptid nazvaný pracovním alaptid, látku s nootropním účinkem, u níž však byly nalezeny také významné účinky hojivé. Okolnost, že látky vyvinuté jako potenciální léčiva skončí svou kariéru pouze jako součást patentů nebo publikací přes svou nespornou účinnost, patří k tomuto typu výzkumu, nikterak to však nesnižuje jeho úroveň.

Díky šíří zájmů a pozoruhodné produktivitě navázal Ing. Kasafírek spolupráci a často přátelství s řadou pracovníků vysokých škol, akademie, klinik, doslova po celém tehdejší Československu. Tak vznikly četné společné publikace, patenty, jeho látky poskytly témata několika disertacím. Častá byla také setkání v jeho až ke stropu vyplněné laboratoři, kde vždy vládla přátelská a inspirativní atmosféra, a kde se návštěvníci ochotně tísnilo na nepatrném prostoru.

Mezi odkazy těch, kteří nás opustili, patří mimo výčet dosažených výsledků práce a jejich ocenění také morální a charakte-

rové vlastnosti, které rovněž vždy zdobily osobnosti vědy. Není jednoduché vystihnout dostatečně takové vlastnosti v krátkosti těchto řádků, nehledě na malou výstižnost slov u takového pokusu. Kromě vlastnosti jako zanícení, vytrvalost, a na druhé straně nezištnost, velkorysost, nutno vyzdvihnout neochotu uhýbat, podřizovat se, což nevyvolávalo vždy příznivou odezvu. Vliv a odkaz Ing. Evžena Kasafírka přetrvává u všech těch, kdo ho poznali jako vědce i jako člověka. Lidí jeho ražení bude ve vědě – a nejen tam – vždy potřeba mimo jiné i jako příkladu. Važme si jich a mějme je v úctě.

Ivan Krejčí



Sekce

SEPARAČNÍCH METOD

ZPRÁVA O SYMPOSIU HPCE 2002

15. Mezinárodní symposium o separacích a analýze v mikroměřítku, (15th International Symposium on Microscale Separations and Analysis, HPCE 2002) se konalo ve dnech 14 – 18. dubna ve Stockholmu. Ačkoli v celkovém pořadí již patnácté, teprve počtvrté se toto symposium konalo v Evropě a poprvé ve Švédsku, které je spolu s Nizozemím, Československem a Japonskem považováno za jednu z kolébek kapilárních elektromigračních metod, neboť specialisté právě v těchto zemích se nejvíce zasloužili o rozvoj první elektromigrační separační metody realizované v kapilárním formátu, kapilární izotachoforézy. Spolupředsedou organizačního výboru symposia byl prof. Stellan Hjertén z University Uppsala, dnes již „živá legenda“ elektromigračních metod, jehož pionýrské práce s elektroforézou prováděnou v (rotujících) skleněných a křemenných trubicích, jsou považovány za základ pro pozdější vysokoúčinné separace v kapilárách.

Symposia se zúčastnilo více než 500 účastníků ze 40 zemí čtyř kontinentů, specialistů v elektroseparačních metodách, ale i uživatelů těchto metod v různých oblastech chemie, biochemie, molekulární biologie, medicíny, ve farmaceutickém průmyslu, v biotechnologii a při analýze životního prostředí.

Vědecký program symposia byl velmi bohatý, zahrnoval 6 plenárních přednášek, 19 hlavních a 56 dalších přednášek jednotlivých sekcí, 2 seminární přednášky a 274 plakátových sdělení. Potěšitelné bylo, že se mezi účastníky neztratili ani zástupci z České republiky a čeští krajané, kteří do programu symposia přispěli pěti přednáškami a několika plakátovými sděleními.

Plenární přednášky byly prezentovány v úvodní a závěrečné plenární sekci a byly zaměřeny na pokroky a užití kapilárních a čipových elektromigračních separačních metod v proteomice, genomice, biomedicíně a v neurověděch. V úvodní plenární přednášce „Large scale proteomics in medicine“ prof. D. Hochstrasser (Univ. of Geneva) demonstroval masivní, paralelní nasazení až 90 HPLC analyzátorů a 50 hmotnostních spektrometrů pro identifikaci bílkovin v komplexních směsích buněčných lysátů a tkáňových extraktů a při vyhledávání biomarkerů nádorových i jiných onemocnění. Podobné tematické zaměření měla i přednáška prof. M. Uhléna (Royal Inst. Technol., Stockholm) „Genomics and proteomics in human diseases“. Biomedicinální aplikace kapilární elektroforézy v neurověděch, založené na on-line spojení kapilární elektroforézy s mikrodialyzačními sondami do mozku resp. do míchy, shrnul ve své přednášce

prof. R.T. Kennedy (Univ. of Florida). O využití spřažených technik, kapalinové chromatografie – hmotnostní spektrometrie, kapilární elektrochromatografie – hmotnostní spektrometrie, jakožto základu pro analytické screeningové technologie při vyhledávání a testování nových léčiv referoval prof. H. Irth (Vrije Univ. of Amsterdam). Ve zbývajících dvou plenárních přednáškách prof. A. van den Berg (Univ. of Twente) a prof. J. Henion (Cornell Univ., Ithaca), prezentovali pokroky v konstrukci mikro- a nanofluidních zařízení pro tzv. totální analytické mikrosystémy (micro Total Analytical Systems – μ TAS) neboli laboratoře na čipu (lab-on-a-chip), a nové, na čipech založené strategie pro dosažení vysoké propustnosti bioanalýz automatizovanou hmotnostní spektrometrií s ionizací nanoelektrosprejem. Cílem seminárních přednášek prof. E. Yeunga (Iowa State Univ., Ames) a prof. E. Jelluma (Rikshospitalitet Univ., Oslo), jež byly do programu symposia zařazeny poprvé, bylo podat úvodní přehled o kombinatorickém přístupu při výběru puf-rů pro optimalizaci elektroforetických separací biomolekul a o využití kapilární elektroforézy a jejího spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií při řešení problémů klinické analytické chemie.

Ostatní přednášky byly rozděleny do 19 sekcí, jejichž názvy odrážejí hlavní tématické okruhy symposia: základy elektroseparačních metod (3 sekce), metodika jednotlivých kapilárních elektromigračních metod – micelární elektrokinetické chromatografie a elektrochromatografie (2 sekce), pokroky v instrumentaci a čipové technologie (2 sekce), aplikace elektroseparačních metod v proteomice (3 sekce), v genomice (1 sekce), v biomedicině (4 sekce) při analýze bílkovin a peptidů (2 sekce), ve farmaceutické analýze (1 sekce) a při separaci enantiomerů (1 sekce). Každá sekce byla uvedena hlavní přednáškou (keynote lecture), která shrnovala hlavní pokroky příslušné oblasti a poté následovaly 3-4 další přednášky,

ve kterých byly ukázány další významné novinky v metodice elektromigračních metod i v jejich aplikacích.

Velký prostor, časový i objemový, byl věnován plakátovým sdělením, která pokrývala tématicky stejné oblasti jako sekce přednáškové. Časově byla tato sdělení rozdělena do čtyř sekcí, avšak díky tomu, že byla vyvěšena po celou dobu symposia, bylo dostatek příležitostí seznámit se se všemi zajímavými příspěvky a podiskutovat s jejich autory.

Průběh symposia potvrdil, že kapilární a čipové elektroseparační metody jsou i nadále předmětem intenzivního výzkumu a vývoje. Významného pokroku bylo dosaženo v rozvoji jejich teorie, metodiky, instrumentace i v jejich využití. Teoretické modely a počítačové simulace umožňují detailní studium průběhu elektromigračních separací a významně též napomáhají při optimalizaci separačních podmínek pro praktické aplikace. V oblasti instrumentace pokračuje proces další miniaturizace elektroseparačních metod, z klasických kapilár o průměru 50-100 μ m se přechází na submikrometrové až nanometrové rozměry kanálků v mikročipech, ve kterých dochází k separaci a charakterizaci látek na molekulární úrovni a jež jsou součástí nové generace tzv. nanotechnologií. Dalším trendem je integrace celého analytického procesu, příprava vzorku, separace, detekce, do výše uvedených totálních analytických mikrosystémů (μ TAS).

Neustále se rozšiřují i aplikační možnosti kapilárních elektromigračních metod. Díky kapilární elektroforéze v multikapilárním uspořádání, kdy separace sekvenačních fragmentů DNA probíhá simultánně v 8, 96 a dokonce až 384 kapilárách, bylo podstatně urychleno řešení projektu lidského genomu. V současnosti se předpokládá, že kapilární a čipové uspořádání elektroseparací se ve spojení s hmotnostní spektrometrií stane i základní technologií v proteomice, kde nahradí dosud nejvíce využívanou, klasickou dvoudimenzionální elektroforézu.

Symposium probíhalo v přátelské pracovní atmosféře v nové Velké aule University of Stockholm. Rovněž společenský a kulturní program symposia byl bohatý a pestrý, jeho vrcholem bylo přijetí všech účastníků symposia na stockholmské radnici, speciálně v jejím Modrém sále, ve kterém se každoročně udělují Nobelovy ceny. Snem mnoha účastníků jistě bylo někdy se tam při této příležitosti vrátit...

Splnitelnějším přáním bude zúčastnit se příštích HPCE symposií: nejbližší se bude konat již v lednu (18-23.) 2003 v San Diegu a další pak i v pro české zájemce dostupném Salcburku (8-12.2.2004).

Václav Kašička, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha

1. OZNÁMENÍ

**KATEDRA GENETIKY BIOLOGICKÉ FAKULTY JIHOČESKÉ UNIVERZITY
V ŔESKÝCH BUDĚJOVICÍCH,
A ŔESKÁ KOMISE PRO NAKLÁDÁNÍ S GENETICKY MODIFIKOVANÝMI
ORGANISMY A PRODUKTY
PŘI MINISTERSTVU ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ ŔR
POŘÁDAJÍ KURZ:**

TRANSGENNÍ ROSTLINY

Kurz je určen pro doktorandy, ale je otevřen všem zájemcům.
Pro doktorandy BF JU bude kurz dle programu přednášek zakončen zkouškou.
Bude současně pořádán v rámci projektu (UNEF-GEP) Naional Biosafety Framework.

Termín: 2.9. 2002 – 6.9. 2002.

Místo konání: *Areál biologických ústavů AVČR a Biologické fakulty JU.*

Ubytování: *Koleje JU tamtéž*

Obědy: *Jídelna AVČR. Cena oběda: 53 Kč*

Vložné: *Není*

PROGRAM:

2.9.: Ubytování, individuální návštěva výstavy Země živitelka,
odpoledne **od 13.00 seminář v areálu výstavy Geneticky modifikované organismy**
s následujícím programem:

Doc. Dr. J. Petr: Geneticky modifikovaná zvířata

Doc. Dr. M. Ondřej: Geneticky modifikované odrůdy rostlin

Ing. K. Říha, (Ing. J. Souček) : Praxe polních pokusů s GMO

Prof. Dr. J. Drobník : Legislativa geneticky modifikovaných organismů

Ing. Z. Doubková: Zákon č. 153/2000 Sb.

Prof. Dr. H. Renckl: Etika transgenozy

3.9. – 6.9.

Přenášky v budově B Biologické fakulty JU Č. Budějovice, Branišovská 31

Program přednášek kurzu:

- Dr. J. Vlasák, CSc.: *Vektory pro transformaci rostlin*
Dr. M. Ondřej: *Nová generace selektovatelných a reporterných transgenů*
Dr. J. Bříza, CSc.: *Transformace chloroplastů*
Dr. J. Matoušek, CSc.: *Antisense RNA, dsRNA a umlčování transgenů*
Prof. Dr. F. Sehnal, CSc.: *Geny pro enterotoxin v transgenních rostlinách*
Dr. K. Angelis, CSc.: *Reparace DNA*
Doc. Dr. M. Ondřej, DrSc.: *Nové perspektivní transgeny v rostlinách*
Dr. Š. Šebestiánová, PhD.: *Manipulace hladiny etylénu v rostlinách*
Dr. O. Navrátil: *Historie transgenů: bakteriální gen pro fosfofruktokinazu*
Dr. J. Ovesná, CSc.: *Detekce komponent geneticky modifikovaných rostlin v surovinách a potravinách*
Prof. Dr. J. Drobník: *Vývoj a stav legislativy pro práci s GMO*
Ing. M. Singer: *Transgenní odrůdy a politika firmy Monsanto*
Dr. S. Rakouský: *Dlouhodobé monitorování transgenních odrůd*

Prosíme zájemce o vyplnění předběžné přihlášky a její odeslání do 15. 5. na níže uvedenou adresu. Přihlášku je také možno zaslat elektronicky. Další informace budou zasílány na adresy předběžně přihlášených. V případě příliš vysokého počtu zájemců budou mít přednost zájemci, kteří se přihlásili dříve.

Doc. RNDr. M. Ondřej, DrSc.

Katedra genetiky BF JU,

Braňšovská 31,

České Budějovice

370 05

milos.ondrej@bf.jcu.cz

PŘÍPRAVNÝ VÝBOR:

Předseda: M. Ondřej

Členové: Prof. Dr. J. Drobník, DrSc., Doc. Ing. J. Špak, DrSc., Dr. J. Bříza, CSc.,
mgr. D. Pavingerová, CSc., Dr. S. Rakouský, CSc., Dr. J. Vlasák, CSc

Zde odstříhnete nebo zašlete mailem vyplněné zpět:

PŘEDBĚŽNÁ PŘIHLÁŠKA

*Přihlašuji se na kurz **Transgenní rostliny***

V Č. Budějovicích 2. 9. – 6. 9. 2001

Jméno, tituly:

e-mail:

Adresa:

ČINNOST PATENTOVÝCH A LICENČNÍCH SLUŽEB SSČ AV ČR

Patentové a licenční služby SSČ AV ČR jsou jako servisní pracoviště součástí organizační struktury Střediska společných činností AV ČR.

Vědeckým pracovištím AV ČR poskytují bezplatně služby související s ochranou duševního vlastnictví, zejména zpracování přihlášek vynálezů, užitných vzorů a ochranných známek a jejich zastupování při řízení před Úřadem průmyslového vlastnictví ČR a zahraničními patentovými úřady (v zahraničí prostřednictvím zahraničních patentových zástupců), vyřizování výměrů úřadů, sledování lhůt k placení udržovacích poplatků u přihlášek vynálezů a patentů v tuzemsku i v zahraničí, vedení evidence patentových případů, patentopravní konzultace.

KONTAKT: Patentové a licenční služby SSČ AV ČR
Politických vězňů 7
111 21 Praha 1

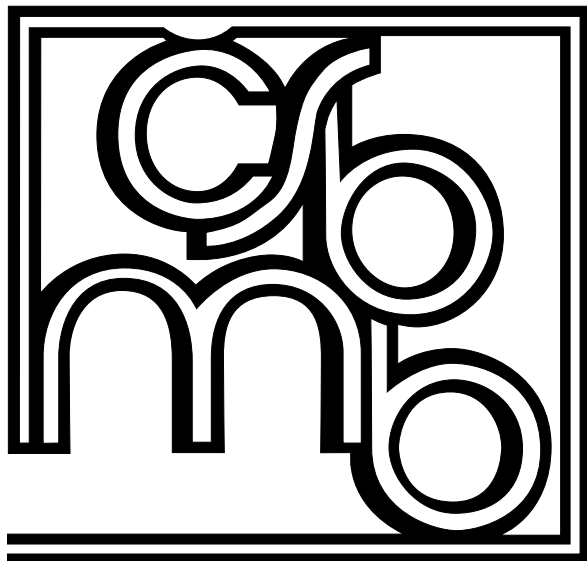
tel: 24 00 52 31 ,po – pá 8.00 – 16.00 (Ing. Dana Šemberová)

E-mail : PLS@KAV.CAS.CZ, SEMBEROVA@KAV.CAS.CZ

**INTERNATIONAL MAX-PLANCK
RESEARCH SCHOOL:
"THE MOLECULAR BASIS OF PLANT
DEVELOPMENT AND ENVIRONMENTAL
INTERACTIONS"**

Ph. D. Studentships

The Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research together with its partner institutions the University of Cologne, the Institute of Bioorganic Chemistry (Poznan, Poland), the Institute for Plant Sciences (Gif sur Yvette, France) and the Biological Research Centre (Szeged, Hungary) invite applications for Ph.D. fellowships as part of the International Max Planck Research School (IMPRS) on "The molecular basis of plant development and environmental interactions". The constellation of participating institutions provides excellent conditions and expertise in plant genetics, structural biology/biochemistry and cell biology. The program seeks to provide an interdisciplinary education for highly motivated students. Individual projects will include: *structural and functional aspects of plant enzymes and regulatory proteins, intra- and intercellular signalling, exogenous signals for cell division and differentiation, determinants of plant-microbe development, molecular genetics of plant evolution, symbiotic and pathogenic plant/microbe interactions, resistance/tolerance to abiotic stress factors*. The training includes biweekly seminars, experimental work under the supervision of two senior faculty of the research school, and practical courses on e.g. reverse genetics, gene isolation, advanced microscopy, 3-D-structural analysis of proteins, bioinformatics, and novel mass spectrometry-based protein biochemistry at the participating institutions. The program is in English and open for students from all countries. Applicants must hold a Master's degree, comparable to the German diploma, as required by the enrolling University of Cologne. The application should be in English and must include: a cover letter, a detailed CV including complete address with email, the grades of the Master's degree, and a one page thesis summary; candidates from countries with another official language should provide a proof of efficiency in English as a second language such as a certificate of TOEFL or IELTS. In addition two letters of reference should be mailed independently to the IMPRS coordinator. The fellowship application should be mailed to: IMPRS – Molecular Basis of Plant Development, Scientific Coordinator, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Carl-von-Linné Weg 10, 50829 Köln/Germany. For further information about the application and the Ph.D. program please visit www.mpiz-koeln.mpg.de and follow the link to the IMPRS or contact the scientific coordinator under: imprscs@mpiz-koeln.mpg.de.



Určeno pro vnitřní potřebu ČSBMB
Výkonný redaktor: Tomislav Barth ÚOCHB, AV ČR
tel.: (02) 20 183 268
Vychází 3 x ročně
Sazba a tisk: grafické studio Venice Praha s.r.o.
Bulletin č. 2/2002 ze dne 10. 6. 2002
Evid. číslo: MK ČR E 10260
Toto číslo je hrazeno
Českou společností pro biochemii a molekulární biologii
ISSN 1211-2526

EMBL: <http://www.embl-heidelberg.de/>

EMBO: <http://www.embo.org/>

FEBS: <http://www.febs.unibe.ch/>

ČSBMB: <http://CSBMB.img.cas.cz/>