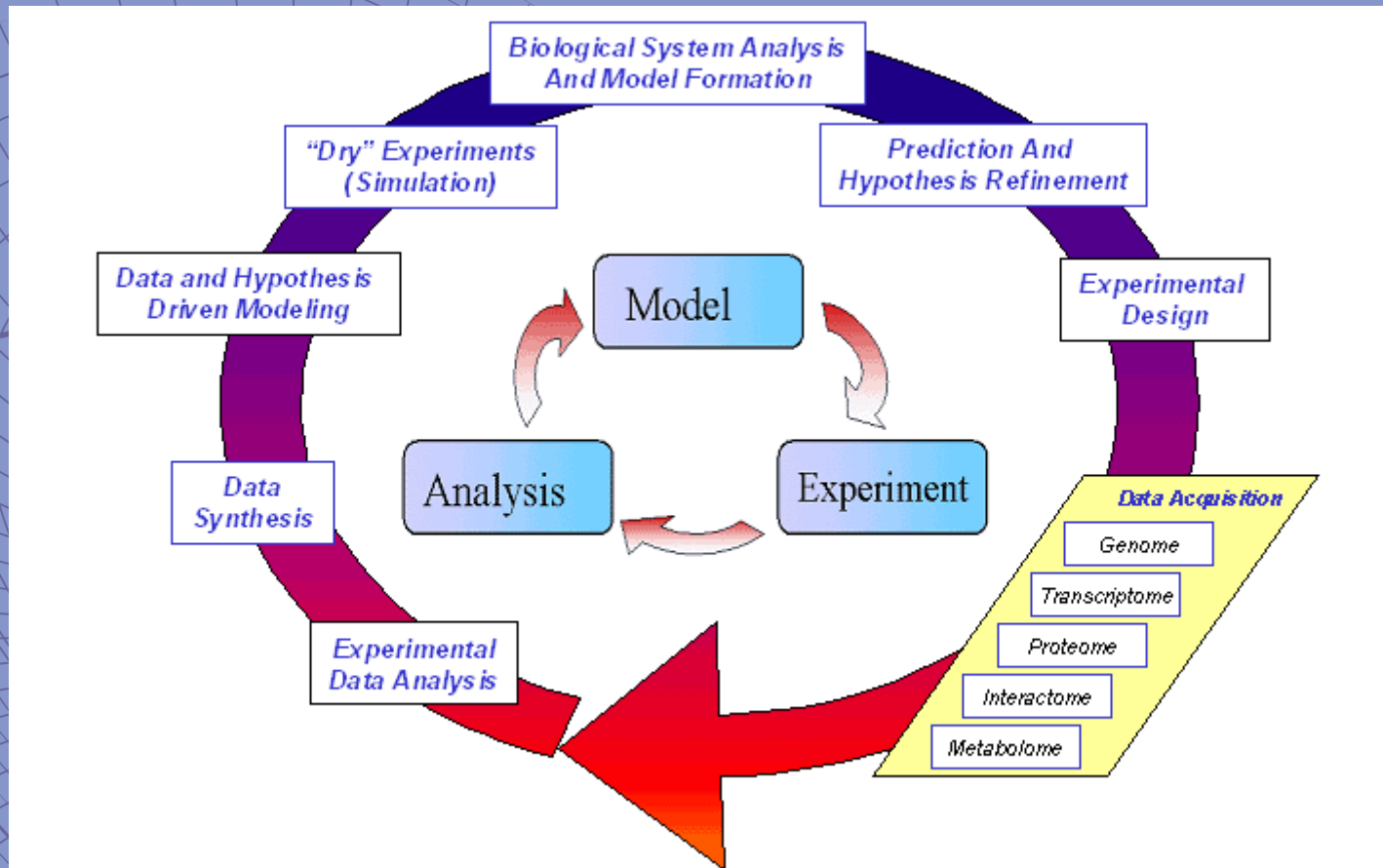


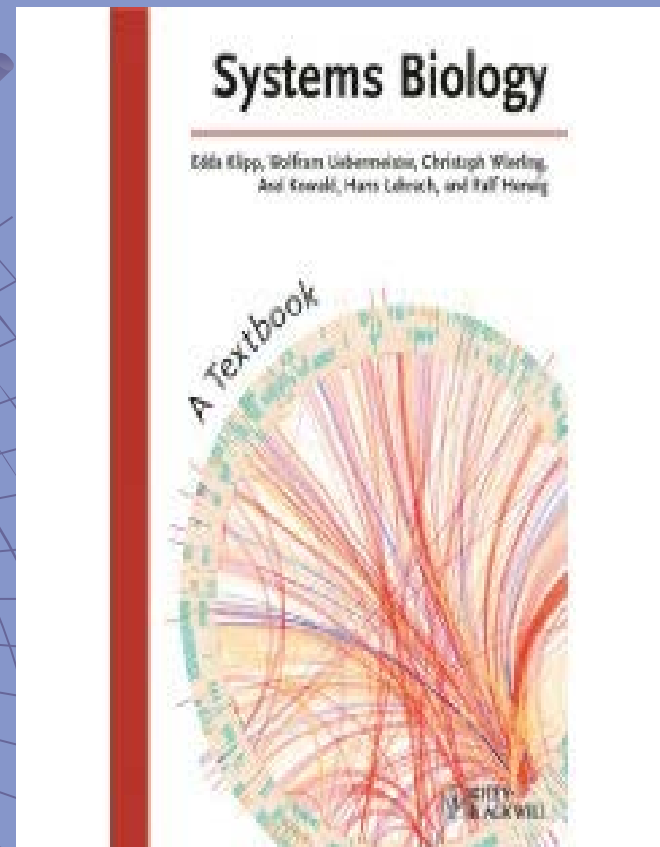
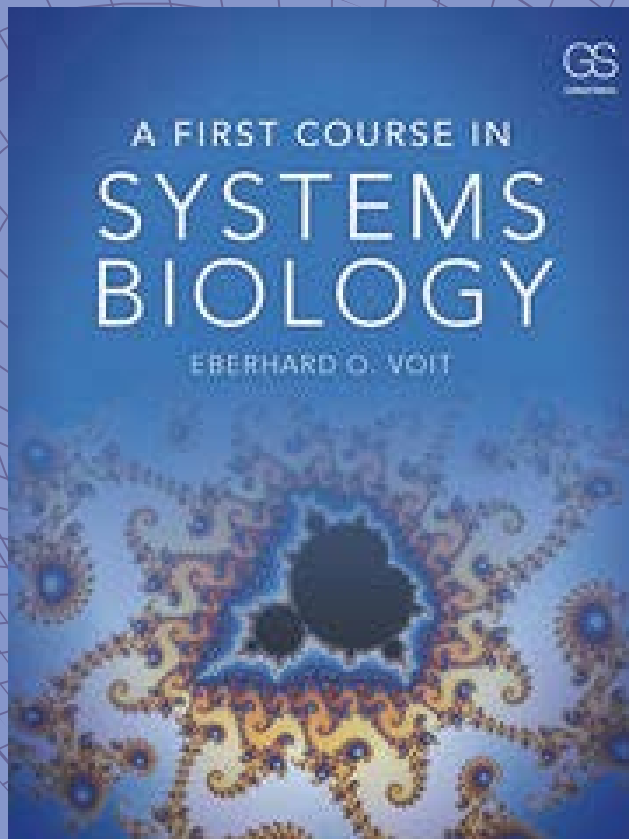
Role metabolomiky v systémové biologii



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Systemová biologie





Důležité pojmy

METABOLISMUS – látková přeměna

- ◆ soubor všech enzymových reakcí, při nichž dochází k přeměně látek a energií v buňkách a v živých organismech
- ◆ Primární
 - anabolismus – reakce spojené s biosyntézou
 - katabolismus – reakce spojené s degradací
- ◆ Sekundární
 - mohou zvyšovat schopnost růstu, reprodukce nebo rozšíření v určitém prostředí
 - mohou zvyšovat naději na přežití, poskytnout ochranu proti kompetitorům nebo predátorům.

Důležité pojmy

METABOLOMIKA

- ◆ vědní disciplína zaměřená na studium metabolomu
 - kompletní identifikace a kvantifikace všech metabolitů v daném organismu nebo v buňce za daného metabolického stavu.
- Rychlé zastavení metabolismu
- příprava vzorku nesmí vyloučit žádné metabolity
- vysoká účinnost a senzitivita analytických technik

Důležité pojmy

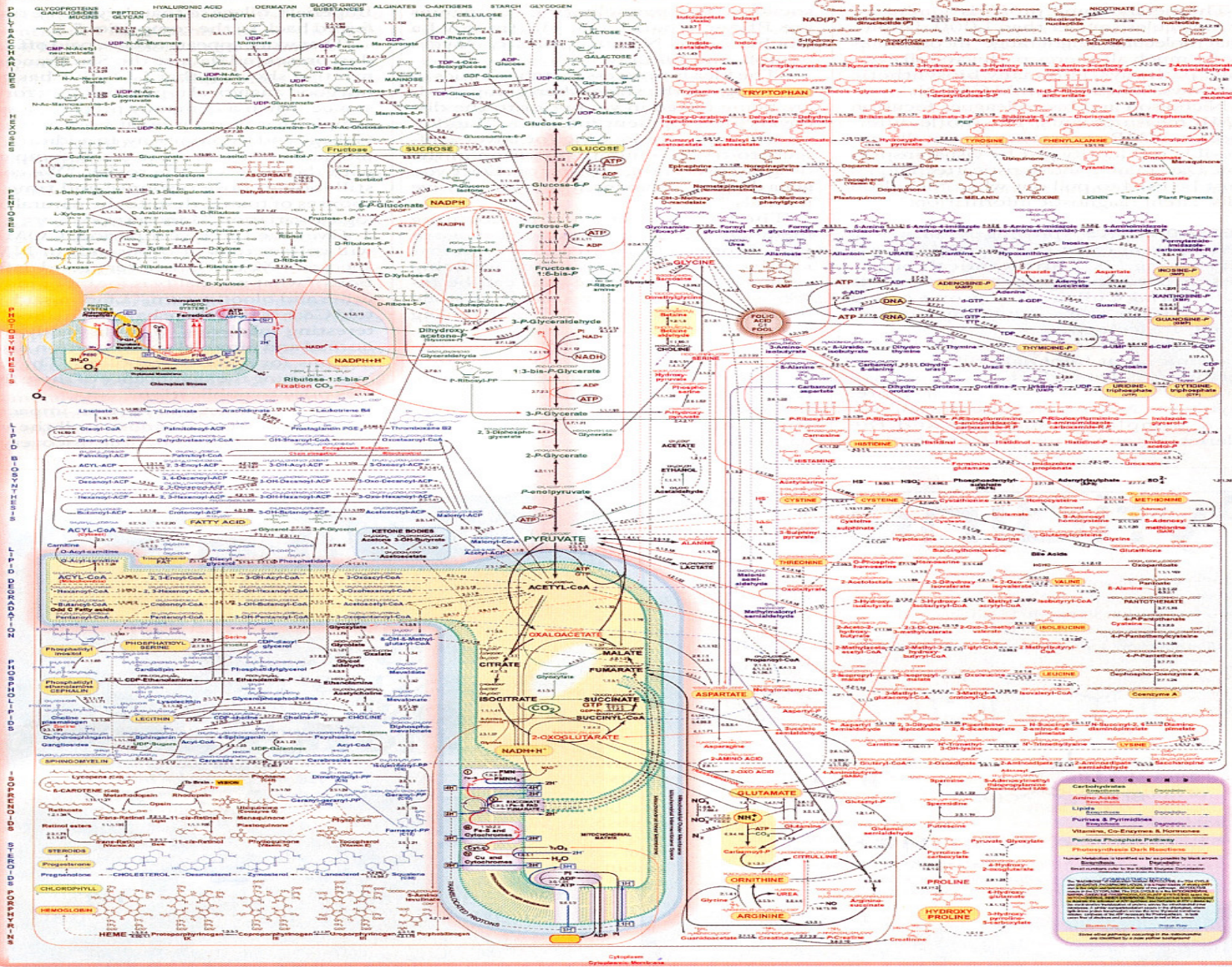
METABOLOM

- ◆ kompletní soubor metabolitů v buňce či biologickém systému v daném čase (Fiehn, 2002)

METABOLIT

- ◆ nízkomolekulární an- či organická sloučenina (< 1000 Da),
- ◆ produkt látkové přeměny

Chemická třída	Typické příklady
Aminokyseliny, aminy...	L-glutamát, L-aspartát
Karboxylové kyseliny	Kys. Pyrohroznová
Alkoholy	Glycerol
Aldehydy	Acetaldehyd, formaldehyd
Fosfátové estery, nukleotidy	D-glukosa-1-fosfát, ATP, ADP
Sacharidy	D-glukosa, D-fruktosa
Lipidy, steroidy a mastné kyseliny	Cholesterol
Vitamíny a koenzymy	NAD ⁺ , NADH
Anorganické ionty	Fosfáty, nitráty



LEARN

- Carbohydrates: Glycogen, Starch, Cellulose
- Amino Acids: Alanine, Aspartate, Glutamate, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Tyrosine, Valine
- Lipids: Triglycerides, Phospholipids, Steroids
- Purines & Pyrimidines: Adenine, Guanine, Cytosine, Uracil, Thymine, Cytidine
- Vitamins, Co-Enzymes & Hormones: Vitamin B12, Folate, Vitamin K, Vitamin E, Vitamin C, Vitamin D, Vitamin A, Vitamin B6, Vitamin B1, Vitamin B2, Vitamin B3, Vitamin B5, Vitamin B7, Vitamin B9, Vitamin B10, Vitamin B11, Vitamin B12, Vitamin B13, Vitamin B14, Vitamin B15, Vitamin B16, Vitamin B17, Vitamin B18, Vitamin B19, Vitamin B20, Vitamin B21, Vitamin B22, Vitamin B23, Vitamin B24, Vitamin B25, Vitamin B26, Vitamin B27, Vitamin B28, Vitamin B29, Vitamin B30, Vitamin B31, Vitamin B32, Vitamin B33, Vitamin B34, Vitamin B35, Vitamin B36, Vitamin B37, Vitamin B38, Vitamin B39, Vitamin B40, Vitamin B41, Vitamin B42, Vitamin B43, Vitamin B44, Vitamin B45, Vitamin B46, Vitamin B47, Vitamin B48, Vitamin B49, Vitamin B50, Vitamin B51, Vitamin B52, Vitamin B53, Vitamin B54, Vitamin B55, Vitamin B56, Vitamin B57, Vitamin B58, Vitamin B59, Vitamin B60, Vitamin B61, Vitamin B62, Vitamin B63, Vitamin B64, Vitamin B65, Vitamin B66, Vitamin B67, Vitamin B68, Vitamin B69, Vitamin B70, Vitamin B71, Vitamin B72, Vitamin B73, Vitamin B74, Vitamin B75, Vitamin B76, Vitamin B77, Vitamin B78, Vitamin B79, Vitamin B80, Vitamin B81, Vitamin B82, Vitamin B83, Vitamin B84, Vitamin B85, Vitamin B86, Vitamin B87, Vitamin B88, Vitamin B89, Vitamin B90, Vitamin B91, Vitamin B92, Vitamin B93, Vitamin B94, Vitamin B95, Vitamin B96, Vitamin B97, Vitamin B98, Vitamin B99, Vitamin B100
- Photosynthesis Dark Reactions: 3-PGA, PEP, RuBP, Glucose
- Heme: Heme synthesis pathway starting from Glycine and Succinyl-CoA
- Chlorophyll: Chlorophyll synthesis pathway starting from Glutamate

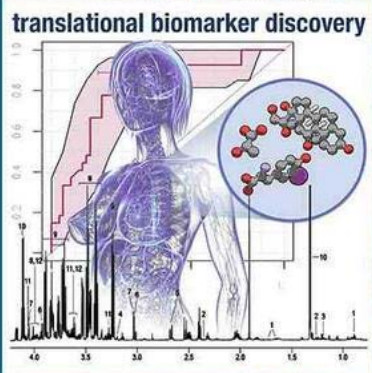
Some other factors depending on the individual and culture (e.g. for the synthesis of Vitamin B12)

Citric Acid Cycle Synthesis

METABOLOMICS

Volume 9 • Number 2

April 2013

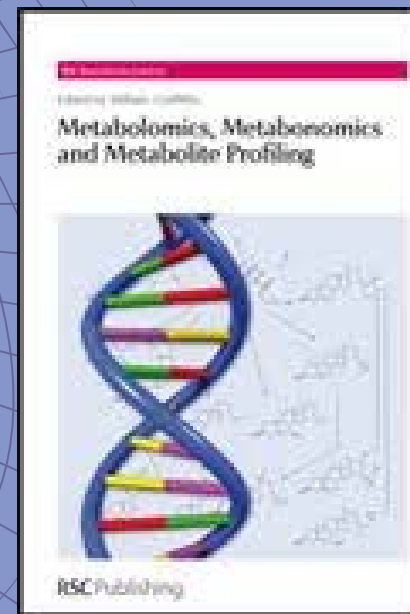
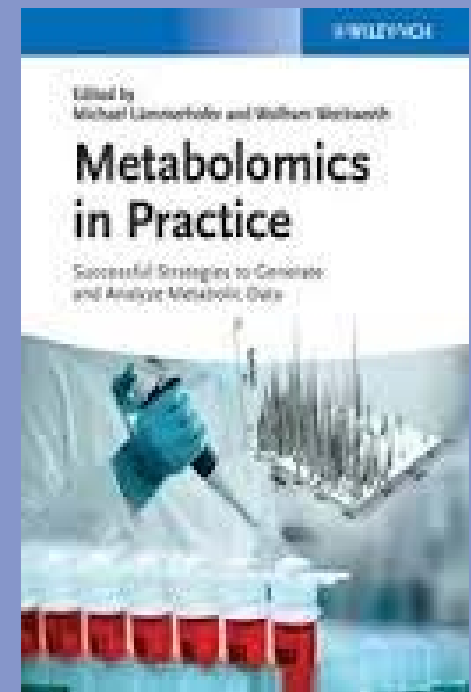
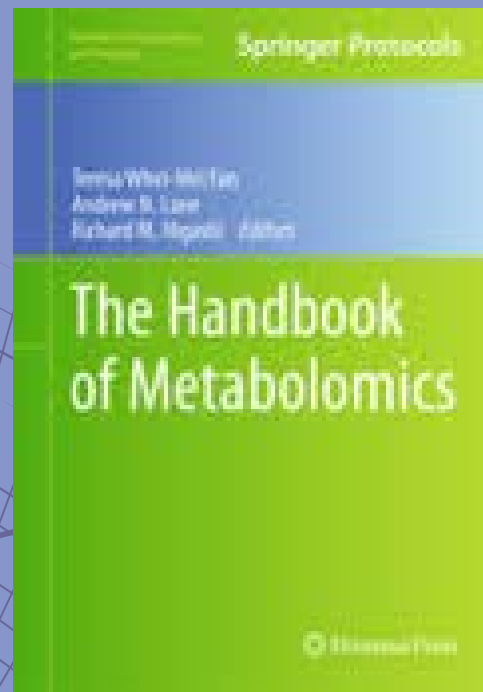
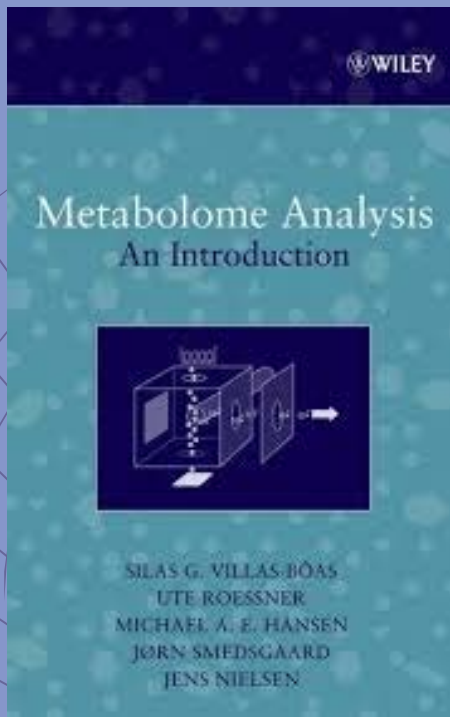


The Official Journal of
The Metabolomics Society

 Springer

11306 • ISSN 1573-3882
9(2) 265–528 (2013)

Available
online
www.springerlink.com



Strategie pro výzkum metabolomiky

◆ FINGERPRINTING

- komplexní analýza **intracelulárních metabolitů** bez nutnosti kvantifikace a identifikace
- ⇒ screening: klasifikace vzorku na základě jeho původu a zdroje

◆ FOOTPRINTING

- komplexní analýza **extracelulárních metabolitů** bez nutnosti kvantifikace a identifikace
- ⇒ screening: klasifikace vzorku na základě jeho původu a zdroje

Strategie pro výzkum metabolomiky

◆ **PROFILOVÁNÍ METABOLITŮ** (metabolite profiling)

- analýza daného souboru metabolitů, např. souboru AMK, organických sloučenin
- často semikvantitativní analýza

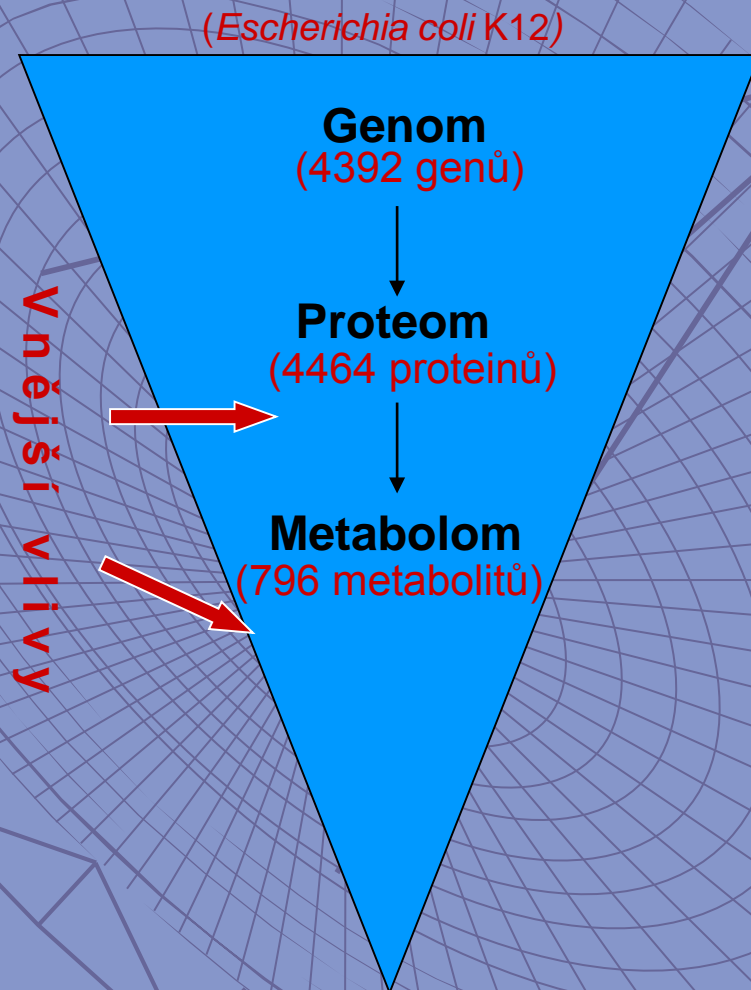
◆ **CÍLENÁ ANALÝZA METABOLITŮ** (metabolite target analysis)

- kvalitativní i kvantitativní analýza vybraných metabolitů související se specifickou metabolickou reakcí
- používána zejména když jsou požadovány nízké limity detekce

Strategie pro výzkum metabolomiky

- ◆ **METABONOMIKA (metabonomics)**
 - komplexní metabolické studie zejména v toxikologii a farmakologii
 - ohodnocení tkání a biologických tekutin na základě změn endogenních metabolitů (výsledek nemocí nebo terapeutického léčení)
 - bez potřeby specifické identifikace

Proč se zabývat metabolomikou?



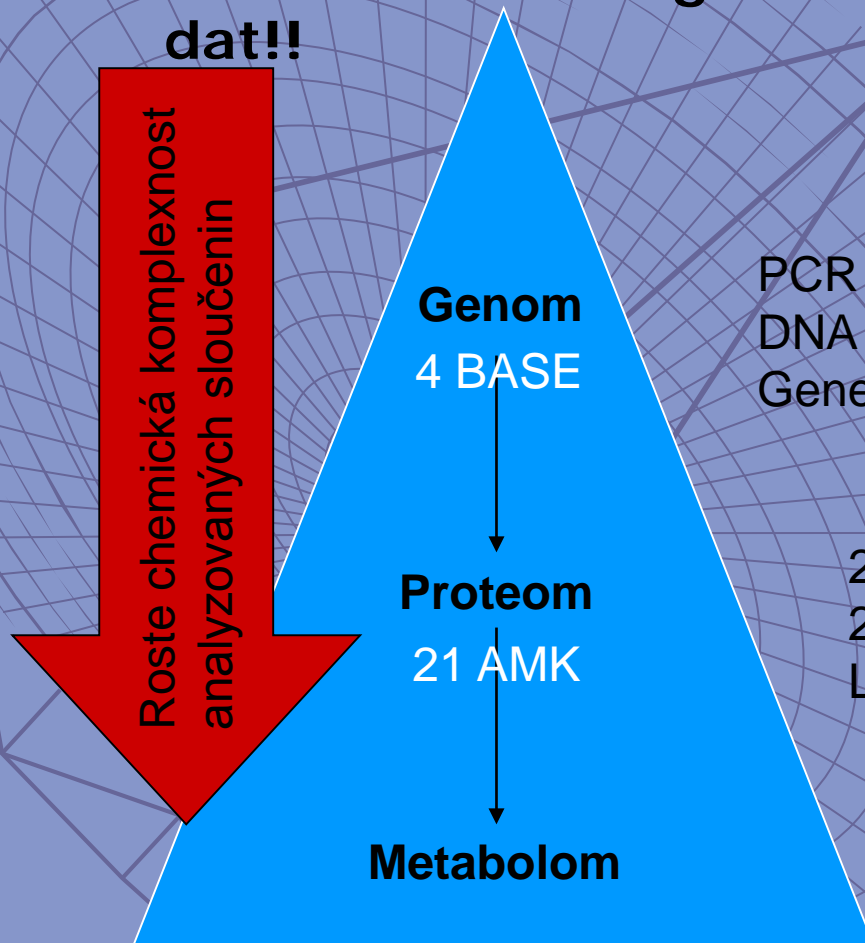
- ♦ Počet metabolitů v buňce může být až řádově nižší než počet genů a proteinů.
- ♦ Metabolom – nejnižší linie genové exprese - přímo odráží funkční úroveň buňky.
- ♦ Změny metabolitů v buňce nejsou regulovány pouze genovou expresí, ale i vlivy životního prostředí.
- ♦ Kvantifikace metabolitů nabízí přímý přístup ke zkoumání vnitřní kinetiky metabolismu (in vivo kinetics).
- ♦ Metabolomické experimenty vyžadují 2x – 3x méně času ve srovnání s proteomickými a transkriptomickými experimenty.

Problemy s metabolity

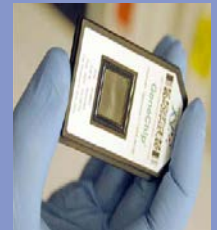
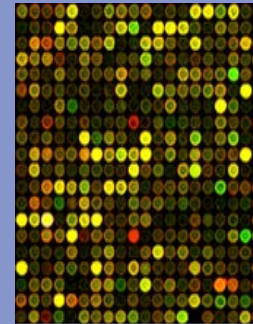
1. **Počet metabolitů**
2. **Strukturní, fyzikálně chemická diverzita**
3. **Koncentrační diverzita**
4. **Proměnnost a stabilita**

Nevýhoda oproti jiným omickým přístupům

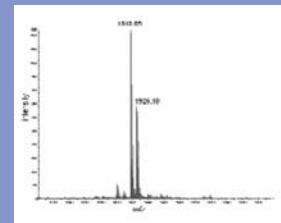
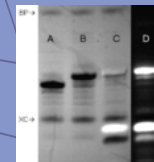
- ◆ Obtížné technologie – obtížné měření, dostupnost dat!!



PCR a RT-PCR,
DNA Microarrays,
Gene Chips



2D-PAGE MALDI-TOF,
2D-LC,
LC-MS



NMR, MS
GC-MS, LC-MS, CE-MS

Aplikace výzkumu metabolomu

- ◆ Sledování fyziologického stavu buňky
 - ◆ adaptace na prostředí,
 - ◆ odhad toxicity xenobiotika, vývoj nových léčiv
 - ◆ přítomnost metabolických biomarkerů
 - ◆ stanovení diagnózy a odhad stupně nemocí
 - ◆ průběh terapie
 - ◆ zvýšení výtěžků fermentace, ...
- ◆ Charakterizace buňky – savčí, rostlinné, mikrobiální, GMO, ...
- ◆ Ohodnocení kvality úrody některých rostlin

Příprava vzorku

- ♦ Významně ovlivňuje přesnost, správnost a reprodukovatelnost výsledků
- ♦ Závislost na typu buněčných struktur a extrahovaných metabolitů

Zhášení
buněčného
metabolismu

- rychlá změna teploty
- rychlá změna pH

Extrakce
metabolitů
z buňky

Zakoncentrování
vzorku

- vakuové odpařování
- lyofilizace

VZOREK

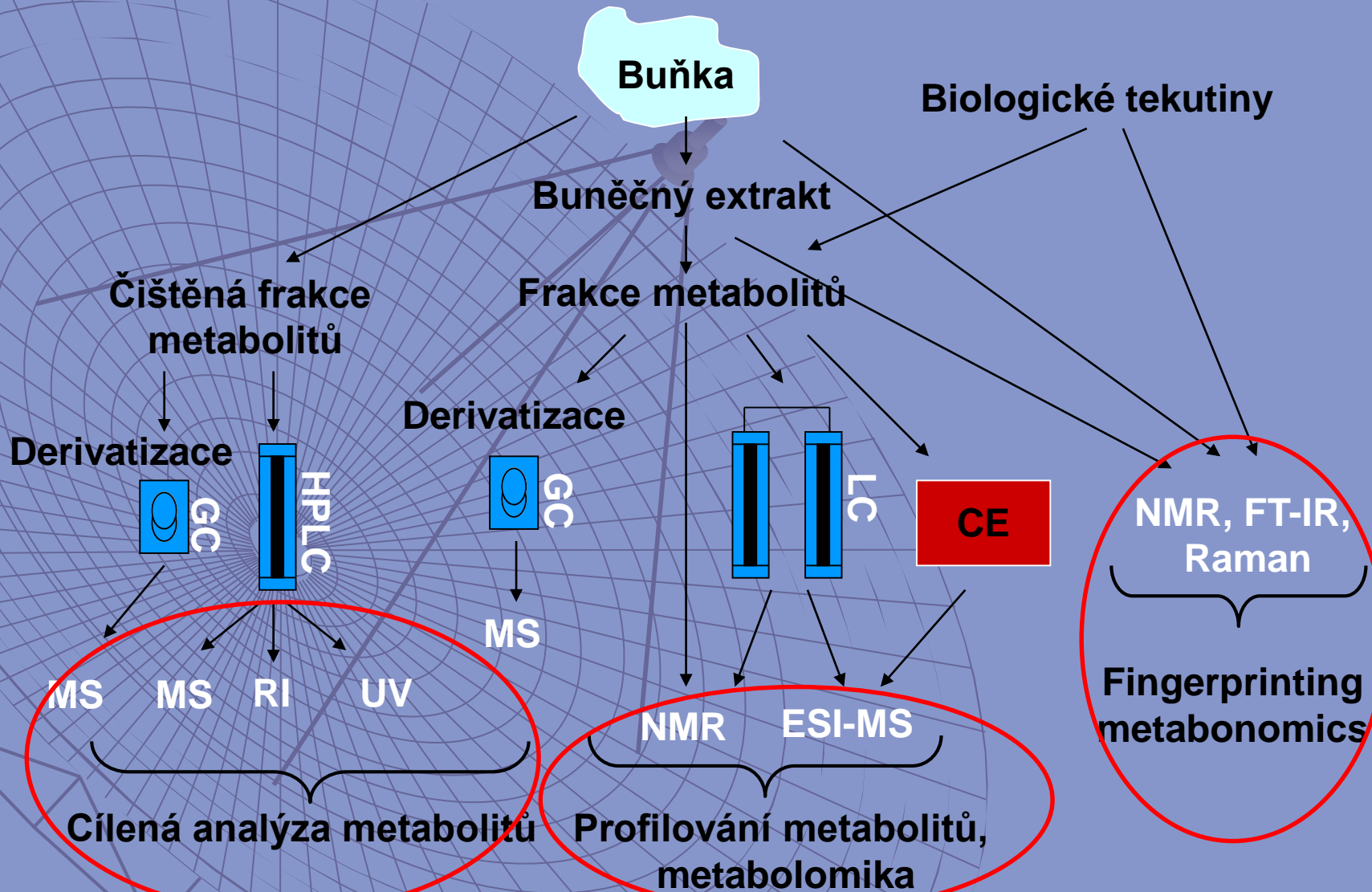
- analýza
- uskladnění

Separace
metabolitů
z biomasy

VZOREK

- analýza
- uskladnění

Analytické metody





CE

HPLC

MS

GS

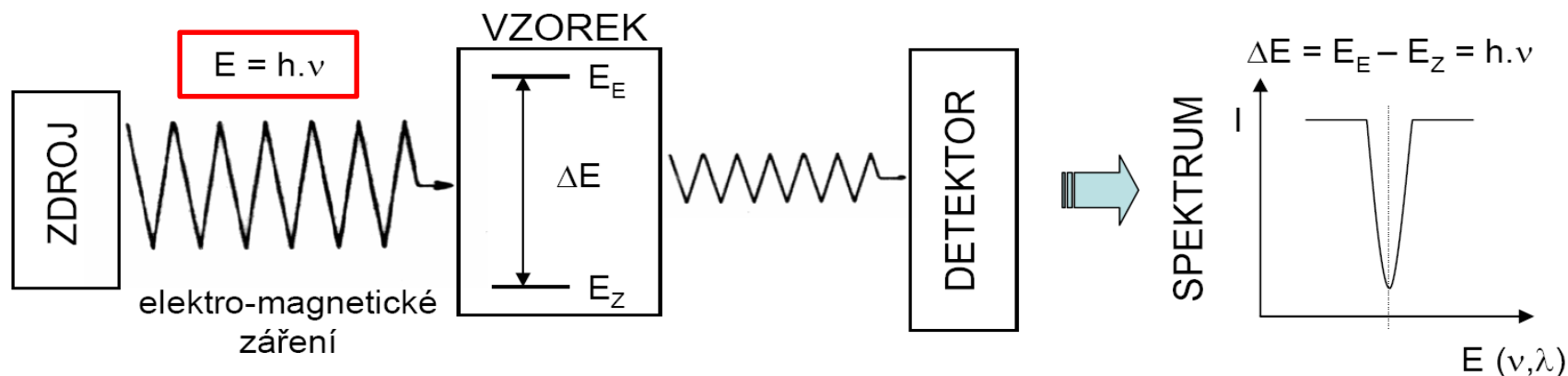


Metody metabolomiky



Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Spektrometrie



E – energie záření
 h – Plankova konstanta
 ν – frekvence záření

E_Z – energie vzorku v základním stavu
 E_E – energie vzorku v excitovaném stavu

Spektroskopie	E [eV]	záření	typ excitace
Mössbauerova	10^5	γ -záření	atomová jádra
elektronová (UV-VIS)	1	viditelné a ultrafialové	elektrony
NMR	10^{-6}	rádiové a televizní vlny	orientace jaderných spinů

Podstata

- ◆ založena na sledování odezvy jader s nenulovým magnetickým momentem umístěných v silném magnetickém poli a jejich interakci s vysokofrekvenčním elektromagnetickým vlněním.

Podstata

- ◆ Je detekována absorpce radiofrekvenčního záření (RFR) jádru atomů v molekule – RFR jsou schopny absorbovat pouze látky s nenulovým spinovým kvantovým číslem I :

- atomy s lichým hmotovým číslem:

$$I = n\frac{1}{2} \quad ({}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}, {}^{15}\text{N}, {}^{31}\text{P})$$

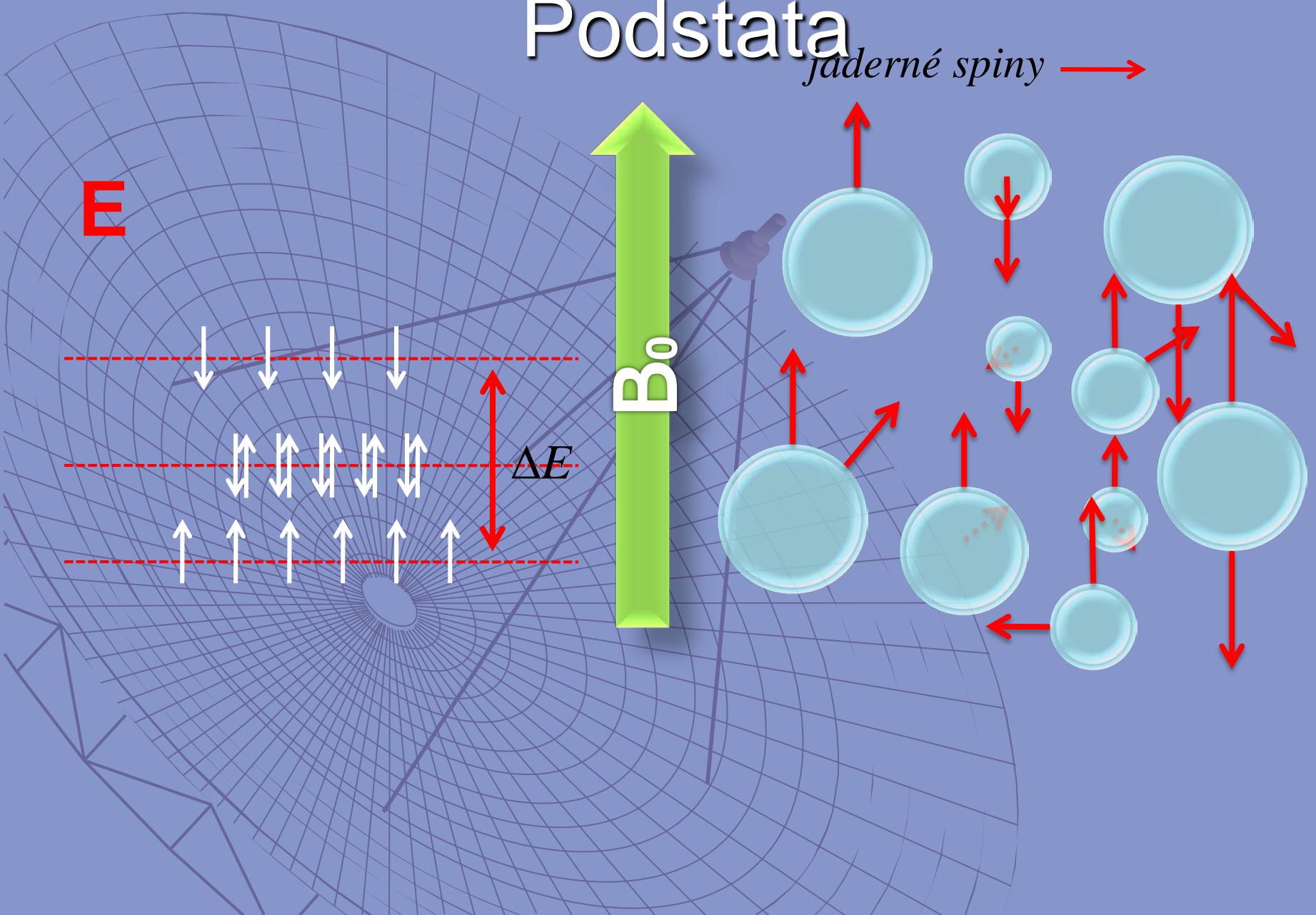
Podstata

jaderné spiny →

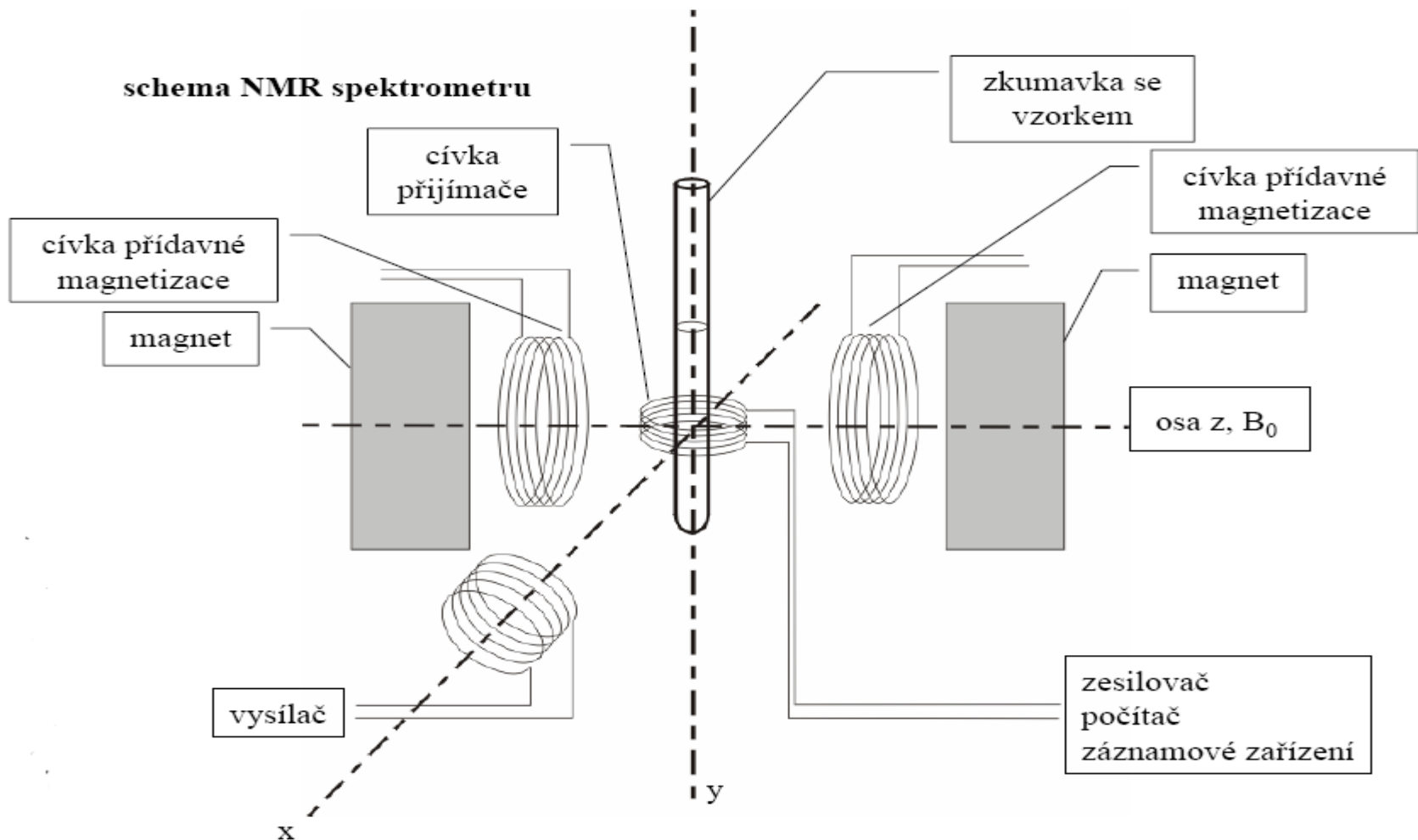
E

B₀

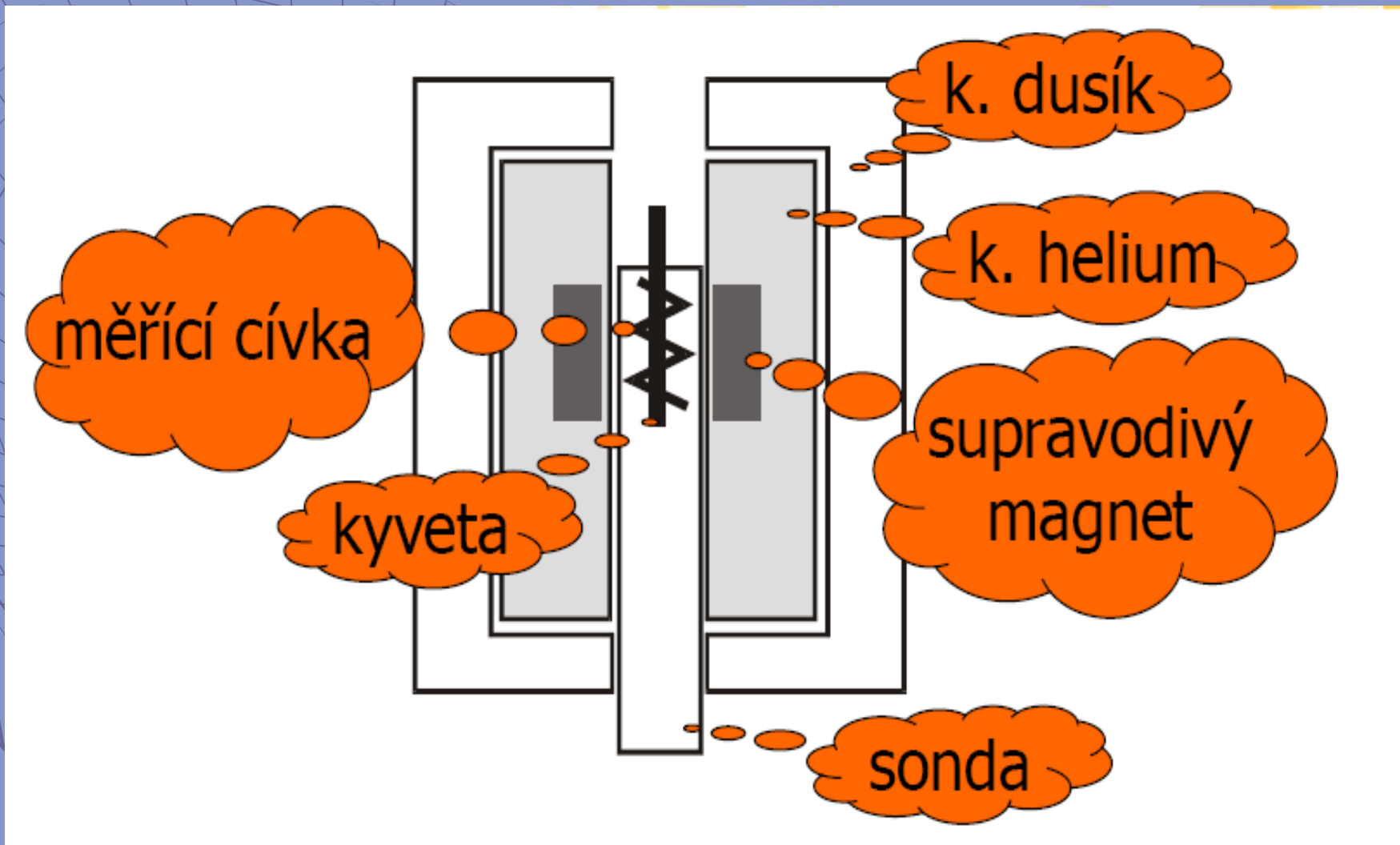
ΔE



Blokové schéma



Blokové schéma

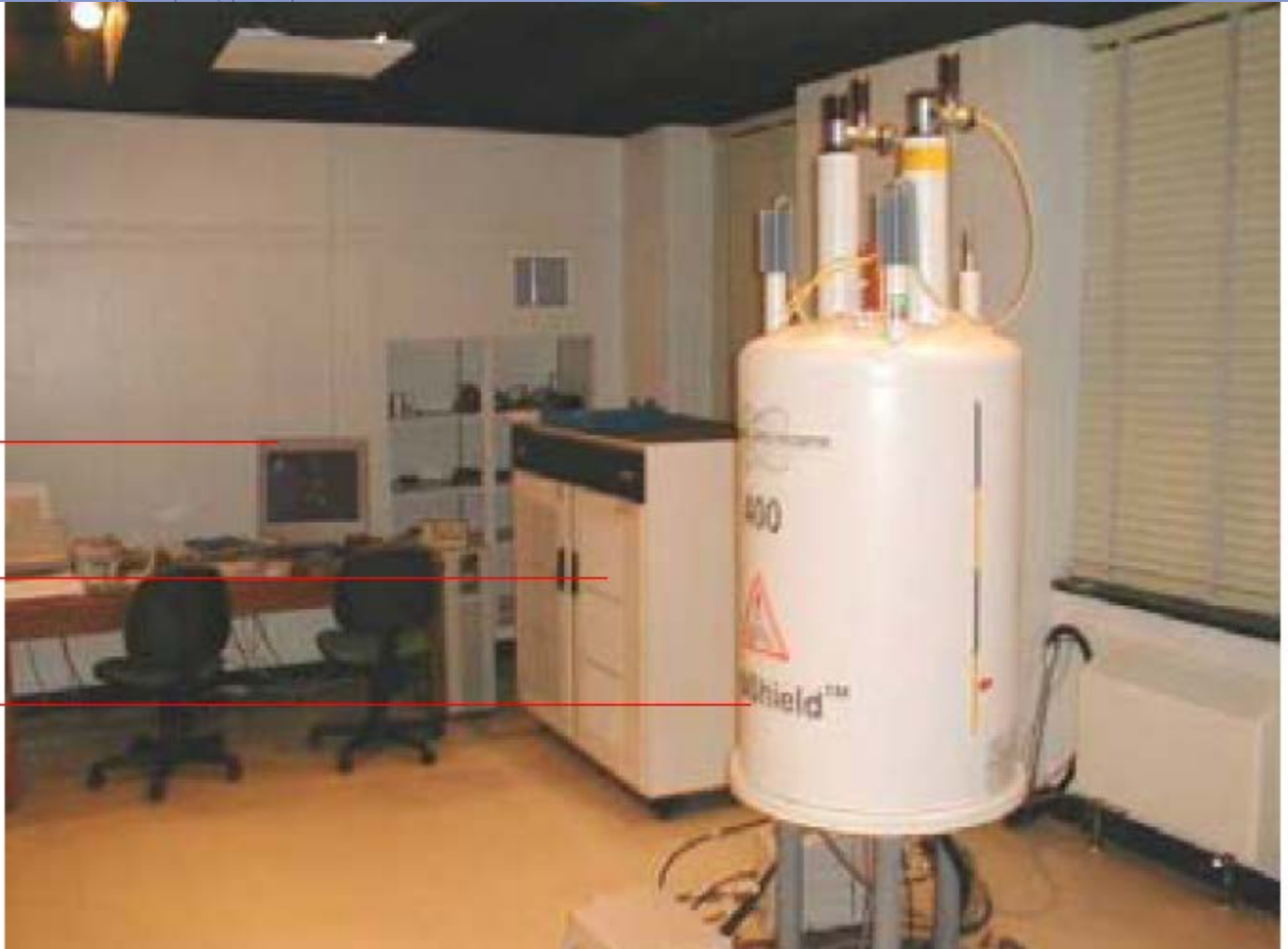


Bruker 400 MHz

počítač

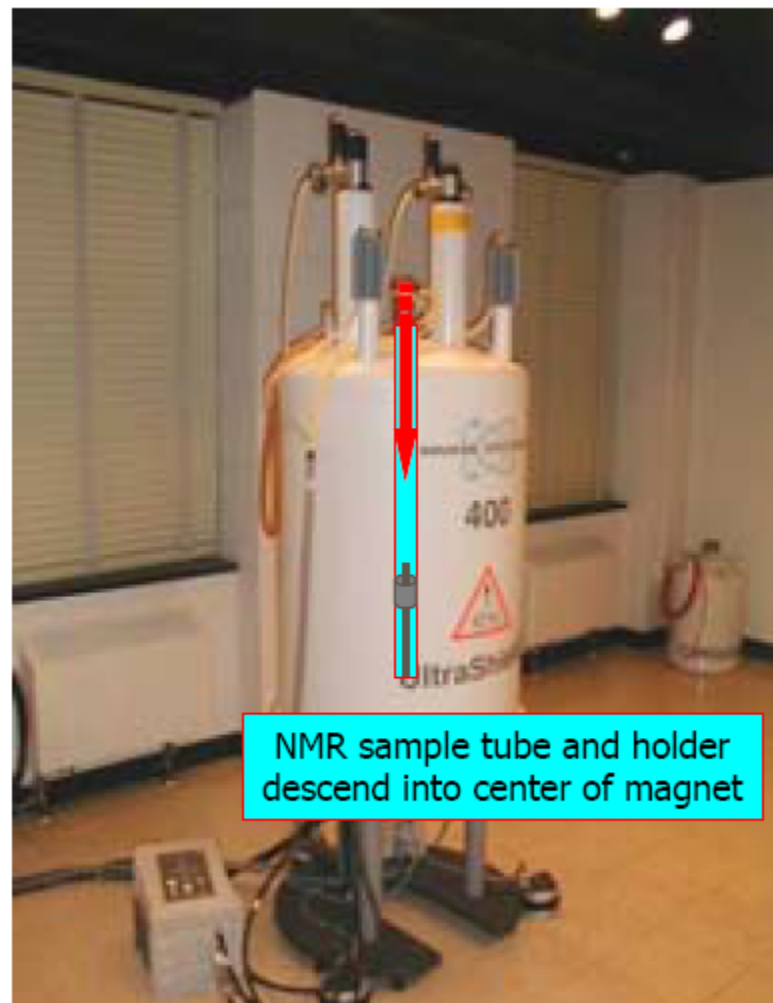
elektronika

supra-
vodivý
magnet



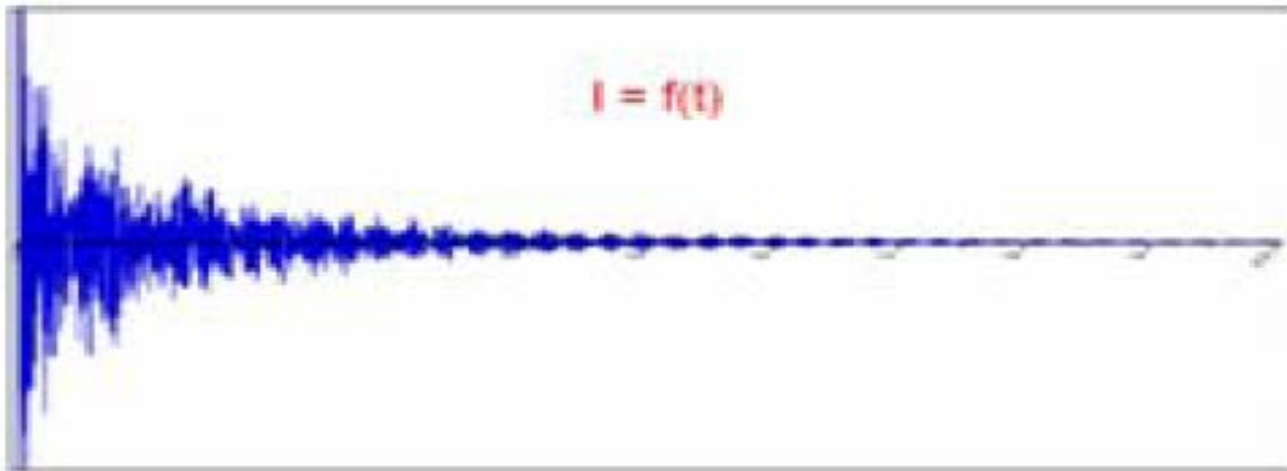
Bruker 400 MHz

- síla magnetického pole 9.4 Tesla (94,000 gauss)
- 400 MHz je použitá frekvence pro detekci protonů v tomto poli

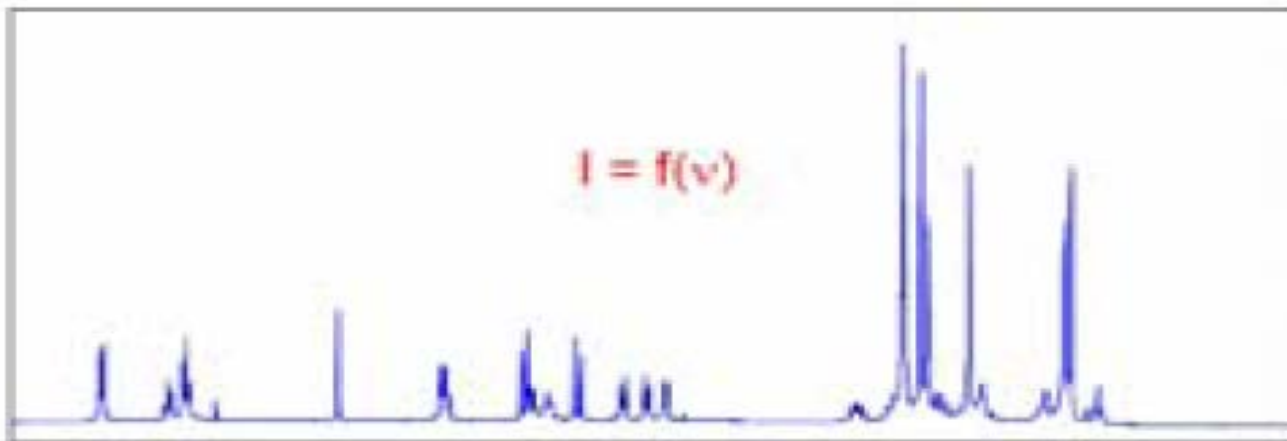


NMR sample tube and holder descend into center of magnet

NMR Spektrum



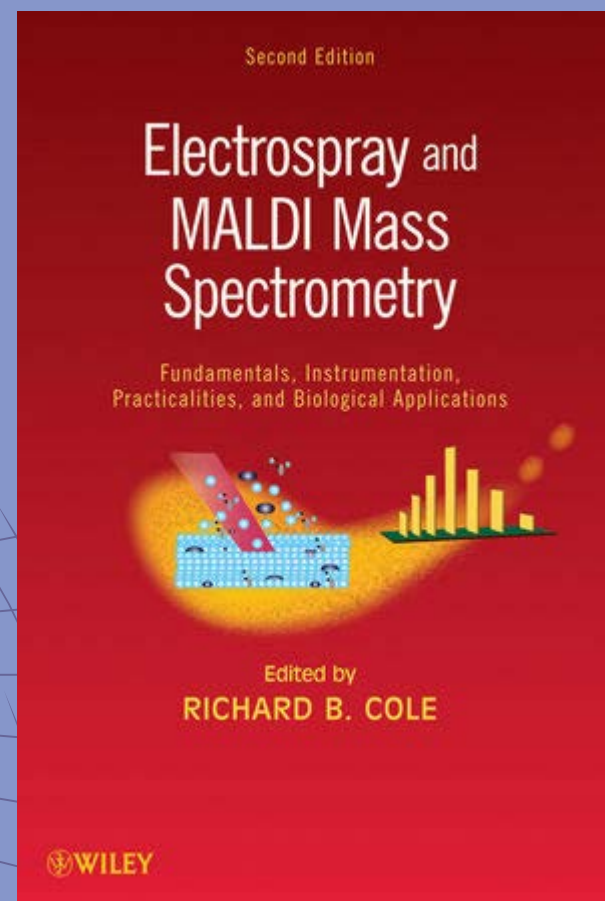
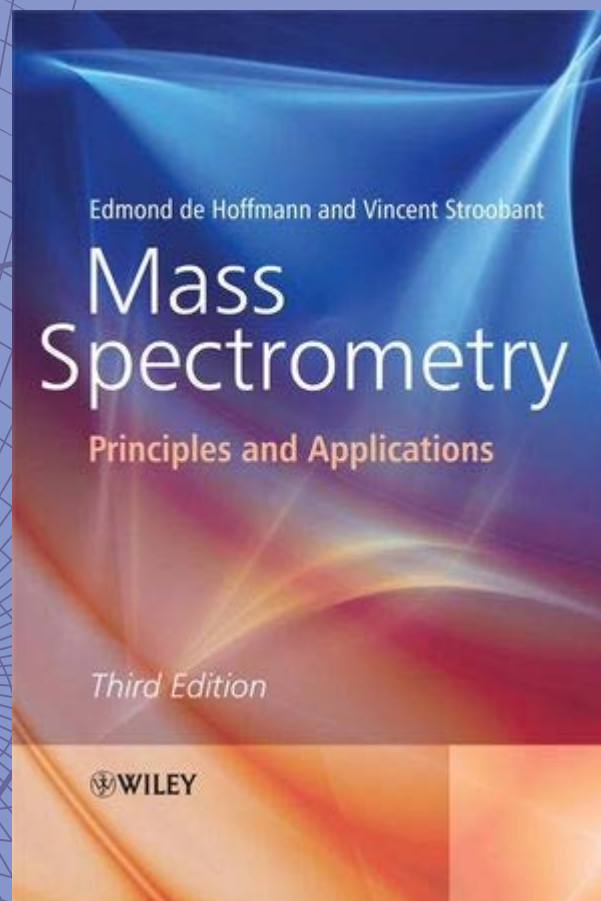
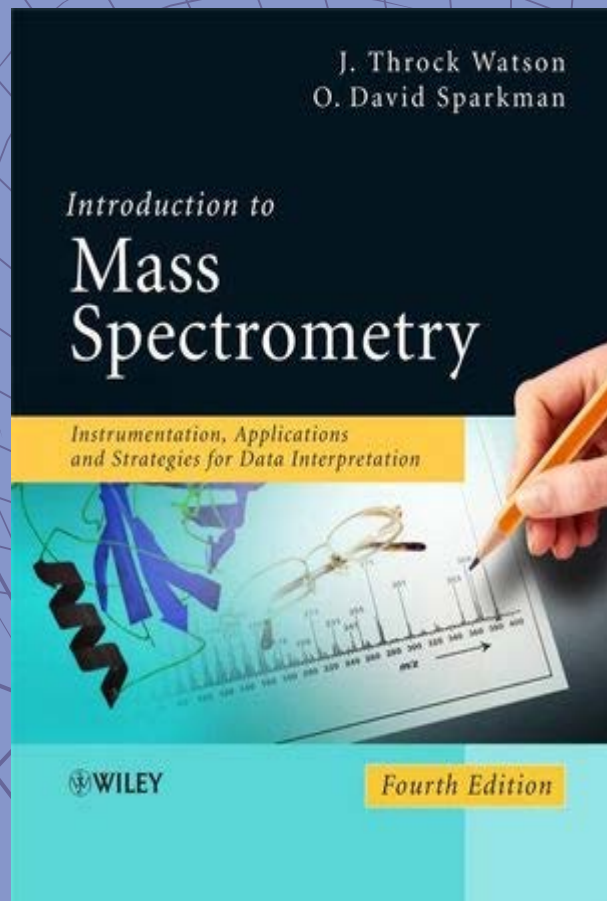
Po zpracování Fourierovou transformací dostaneme:





Hmotnostní spektrometrie

Literatura



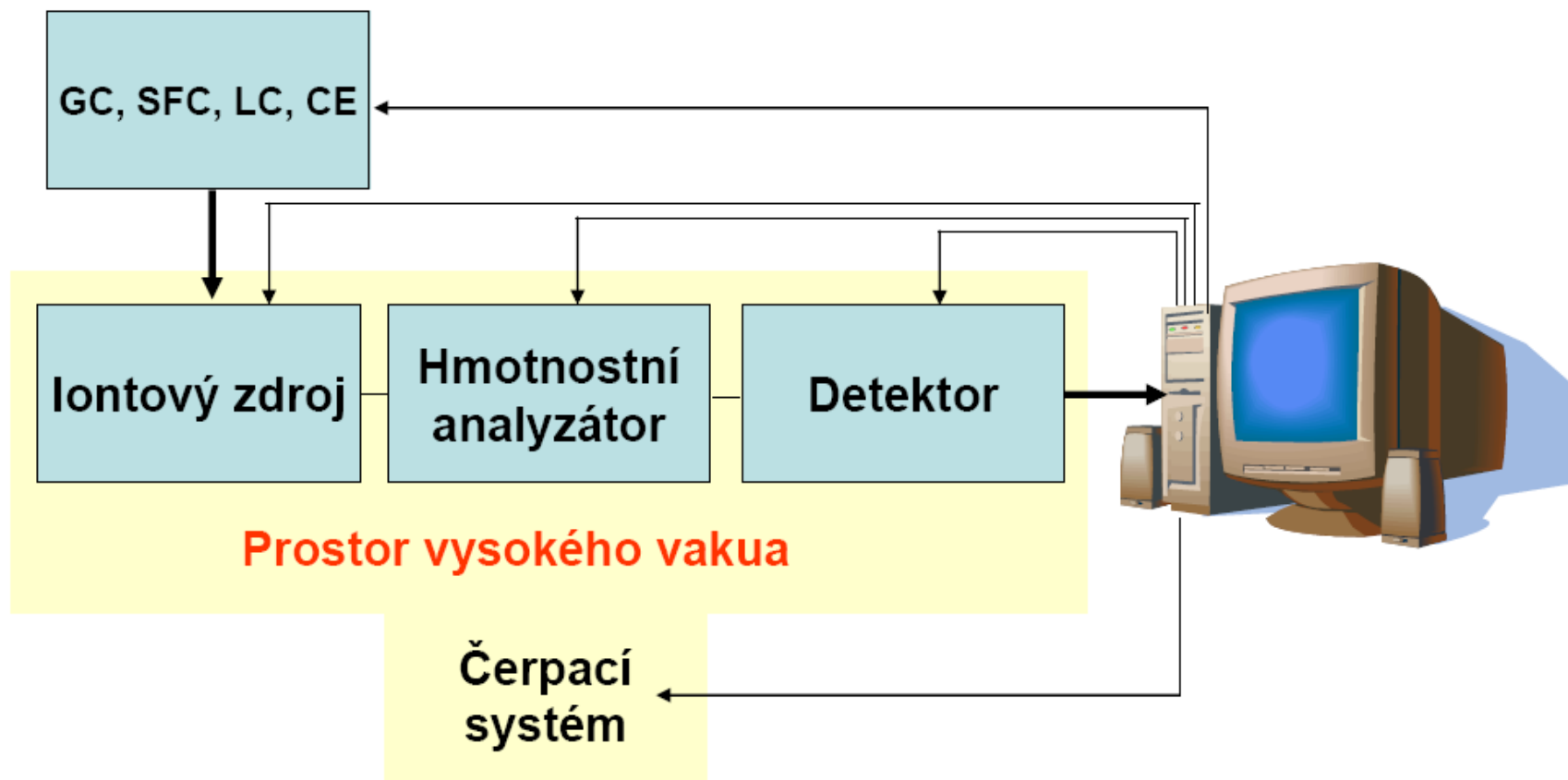
Hmotnostní spektrometrie

- MS - mimořádně citlivá metoda,
- destruktivní metoda,
 - minimální spotřeba vzorku,
 - určení MW a dalších
strukturních informací.

Podstata

- ◆ analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty
- ◆ rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)
- ◆ záznam relativních intenzit jednotlivých iontů

Blokové schéma





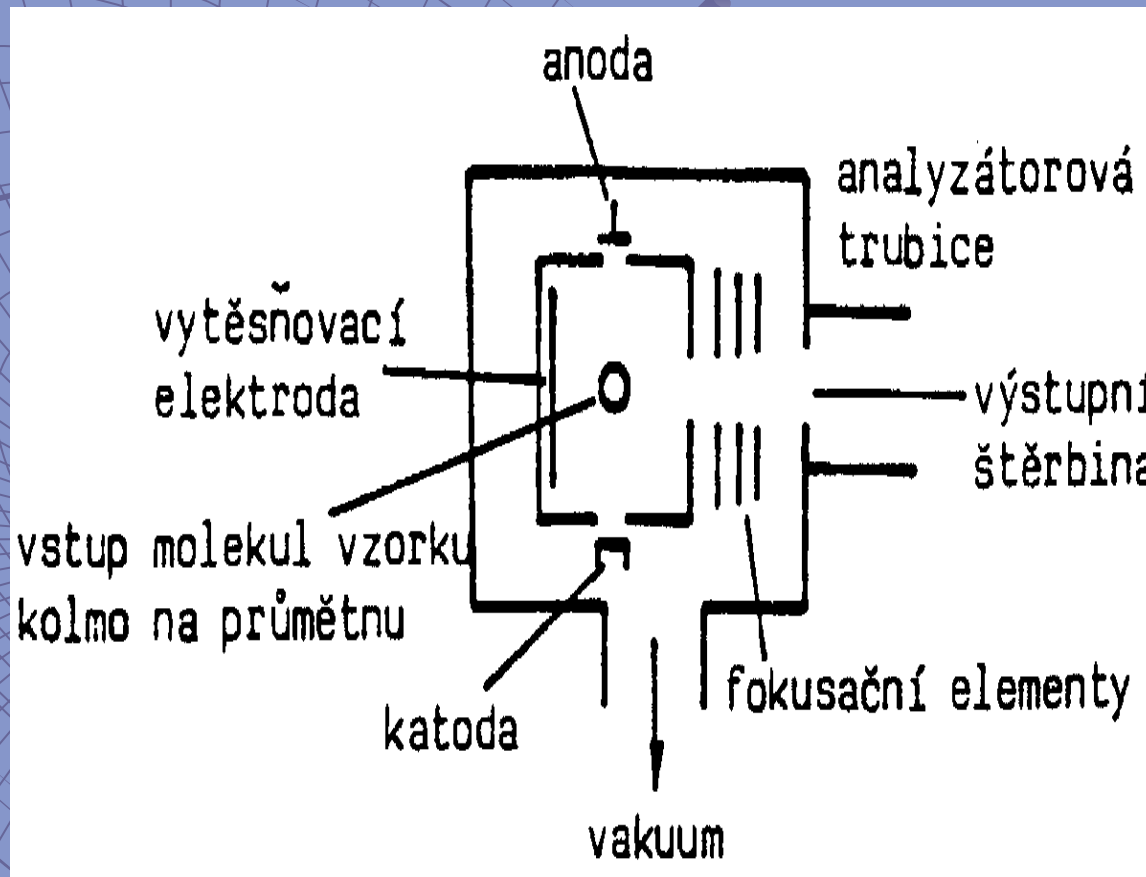
Ionizační techniky

Ionizační techniky

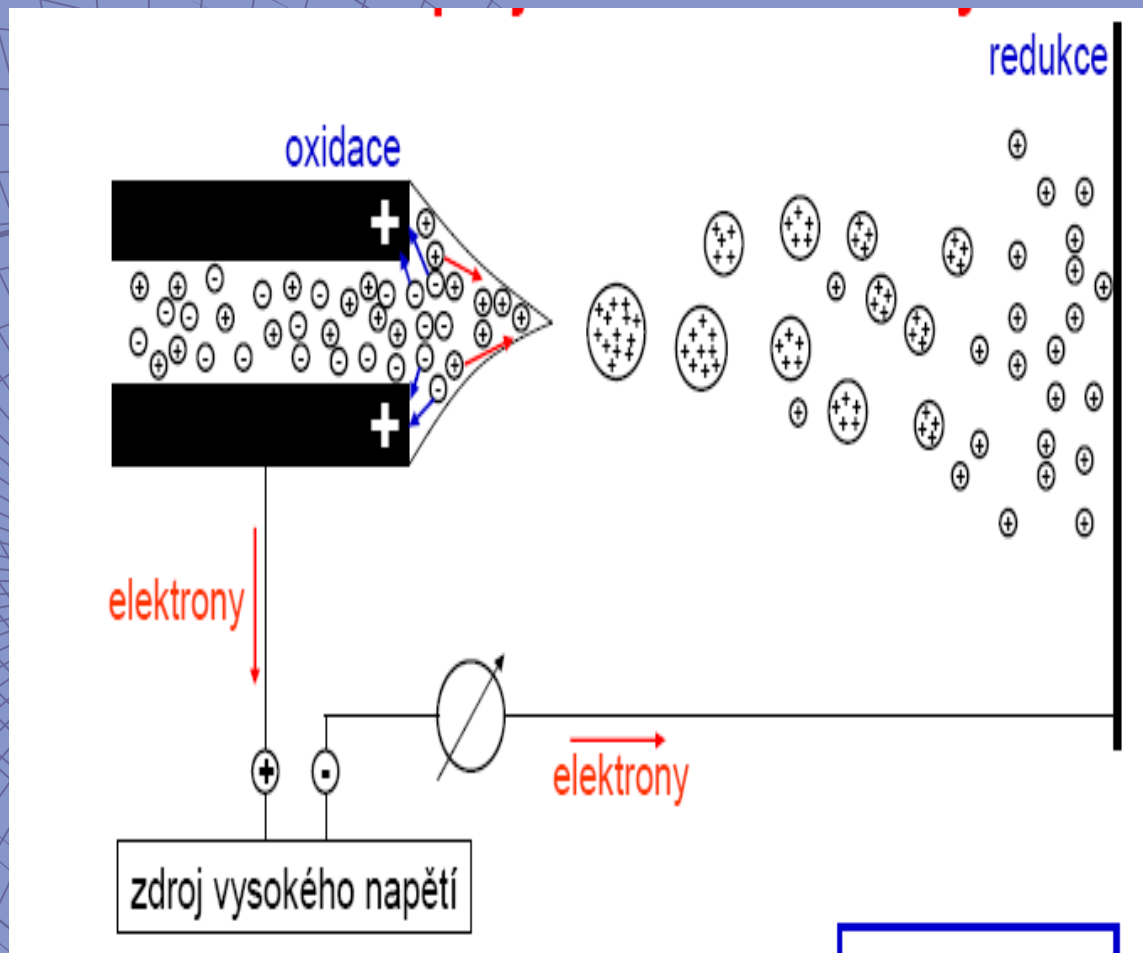


- ◆ Tvrdé ionizační techniky
 - EI
- ◆ Jemné ionizační techniky
 - ESI
 - MALDI

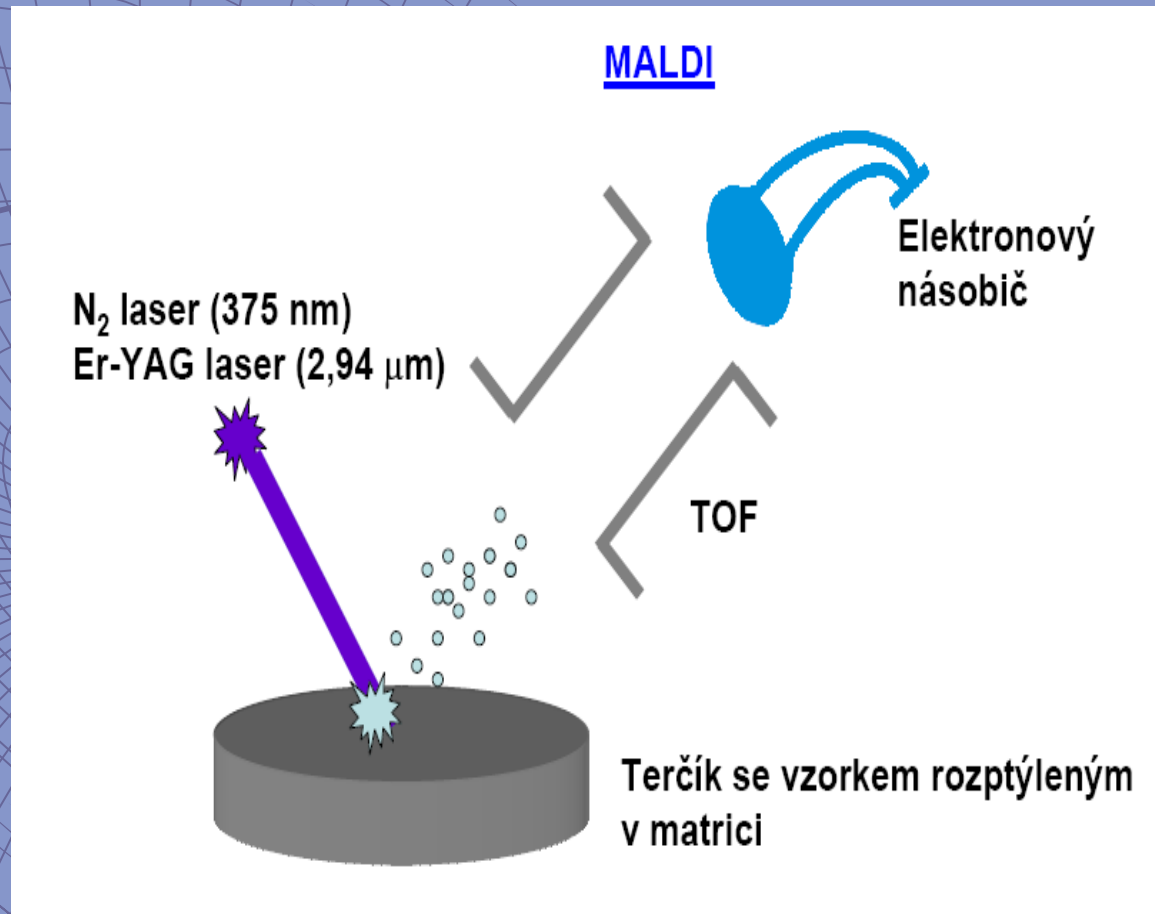
Electron impact (EI)



Electrospray (ESI)



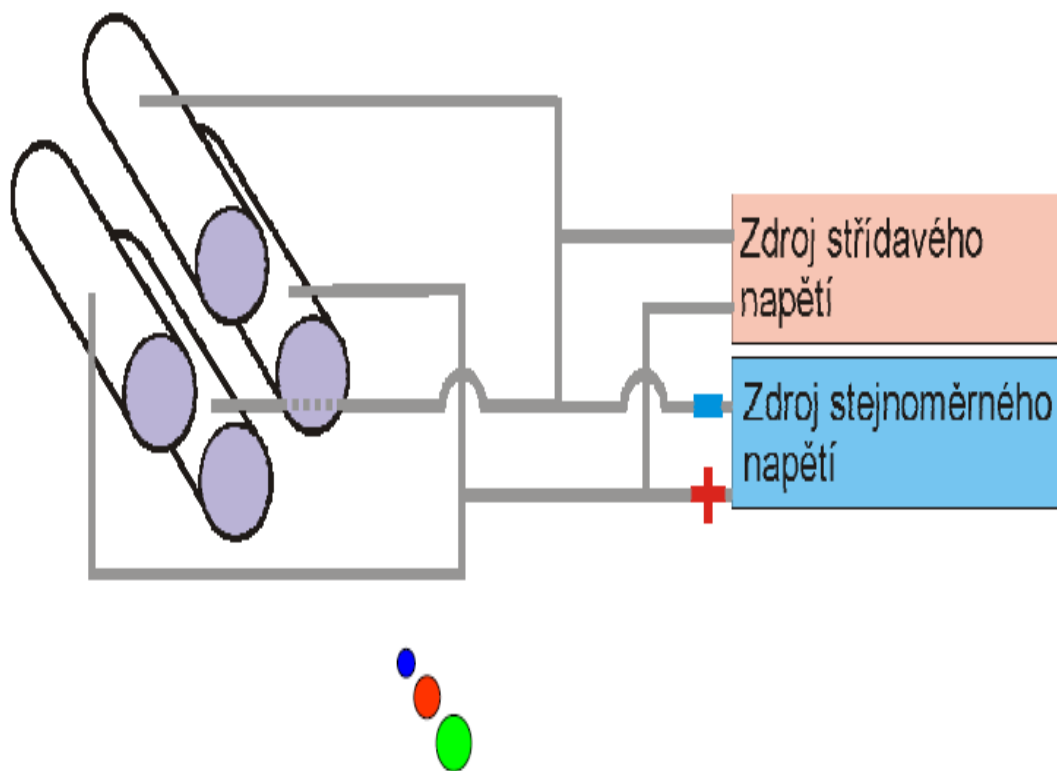
Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)



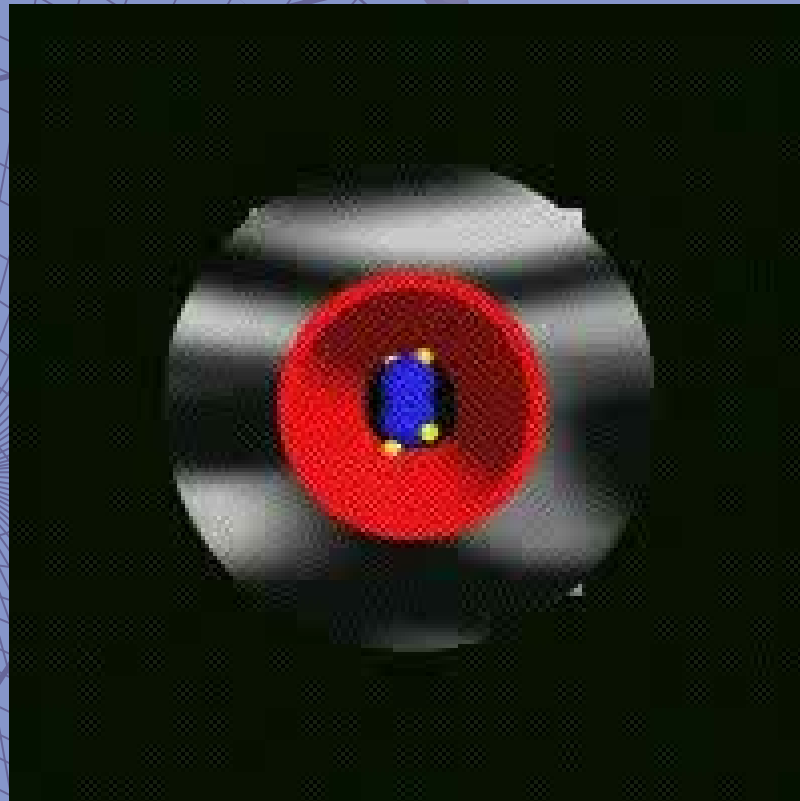


Hmotnostní analyzátořy

Kvadrupol



Kvadrupol

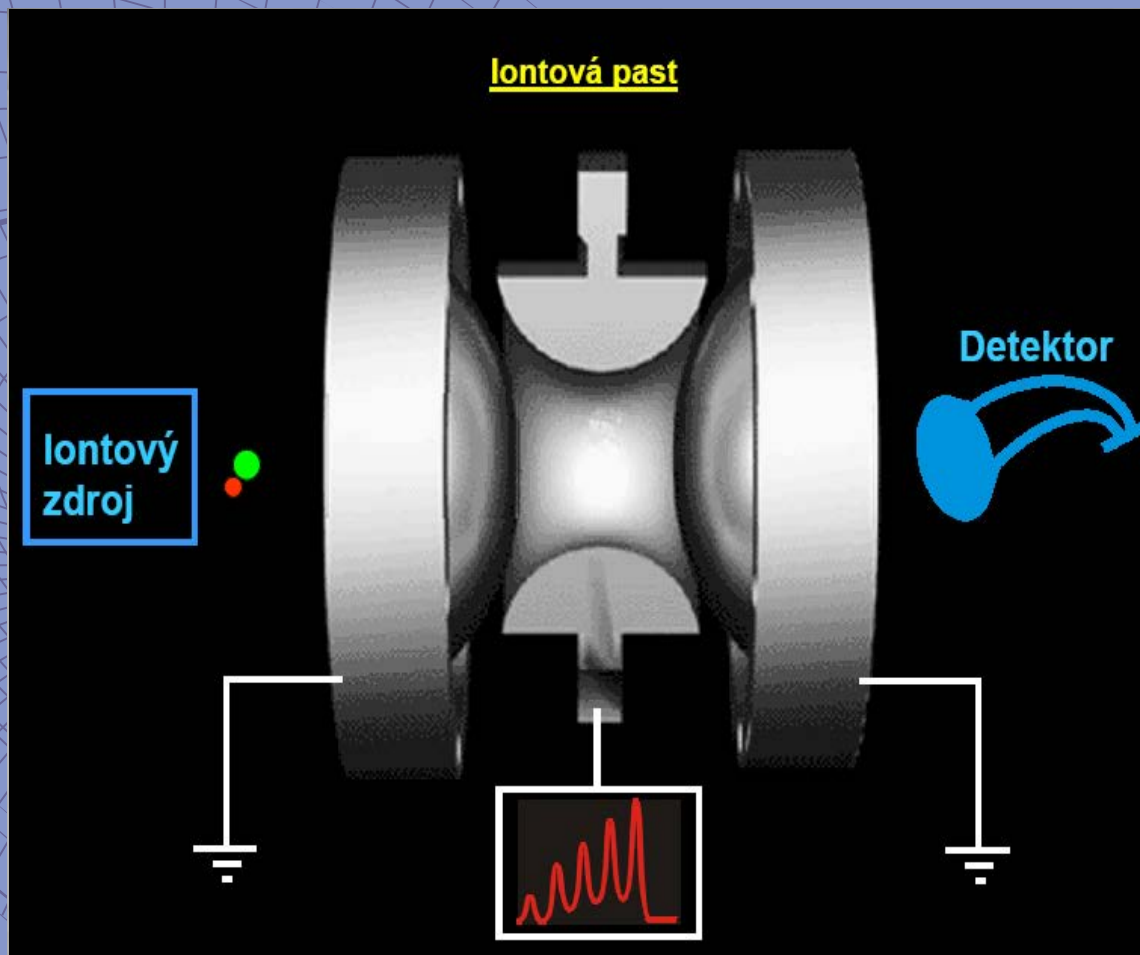


Kvadrupol

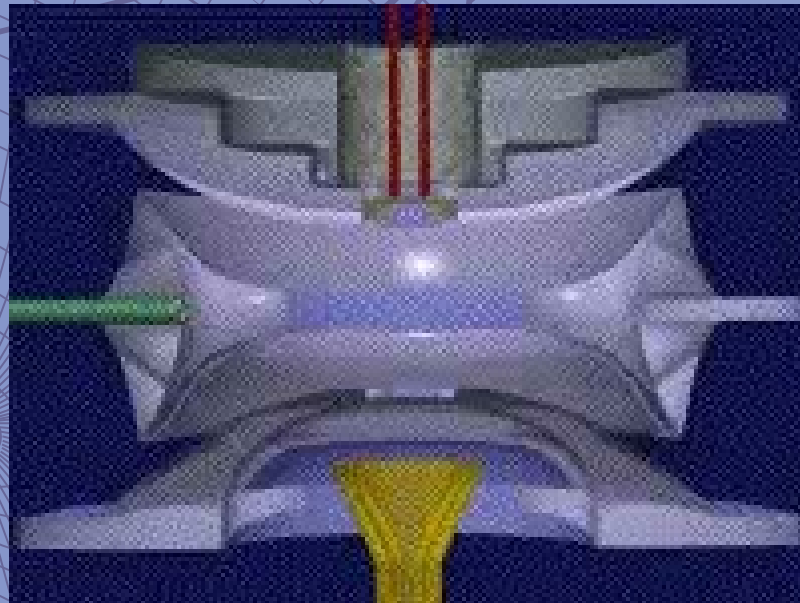


Hexapole, 9.5 mm Quadrupoles and 19 mm Quadrupoles

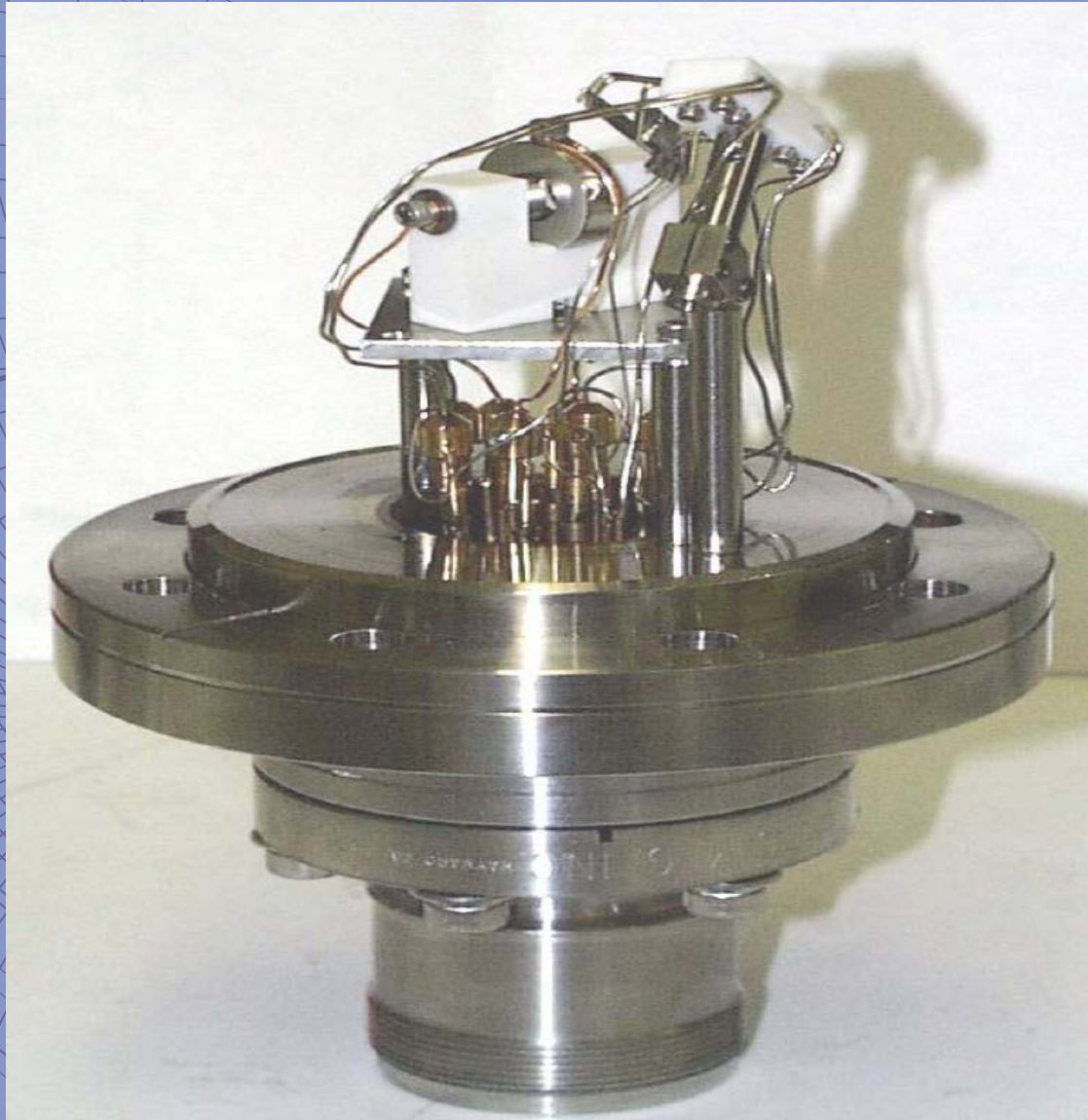
Iontová past (Ion Trap)



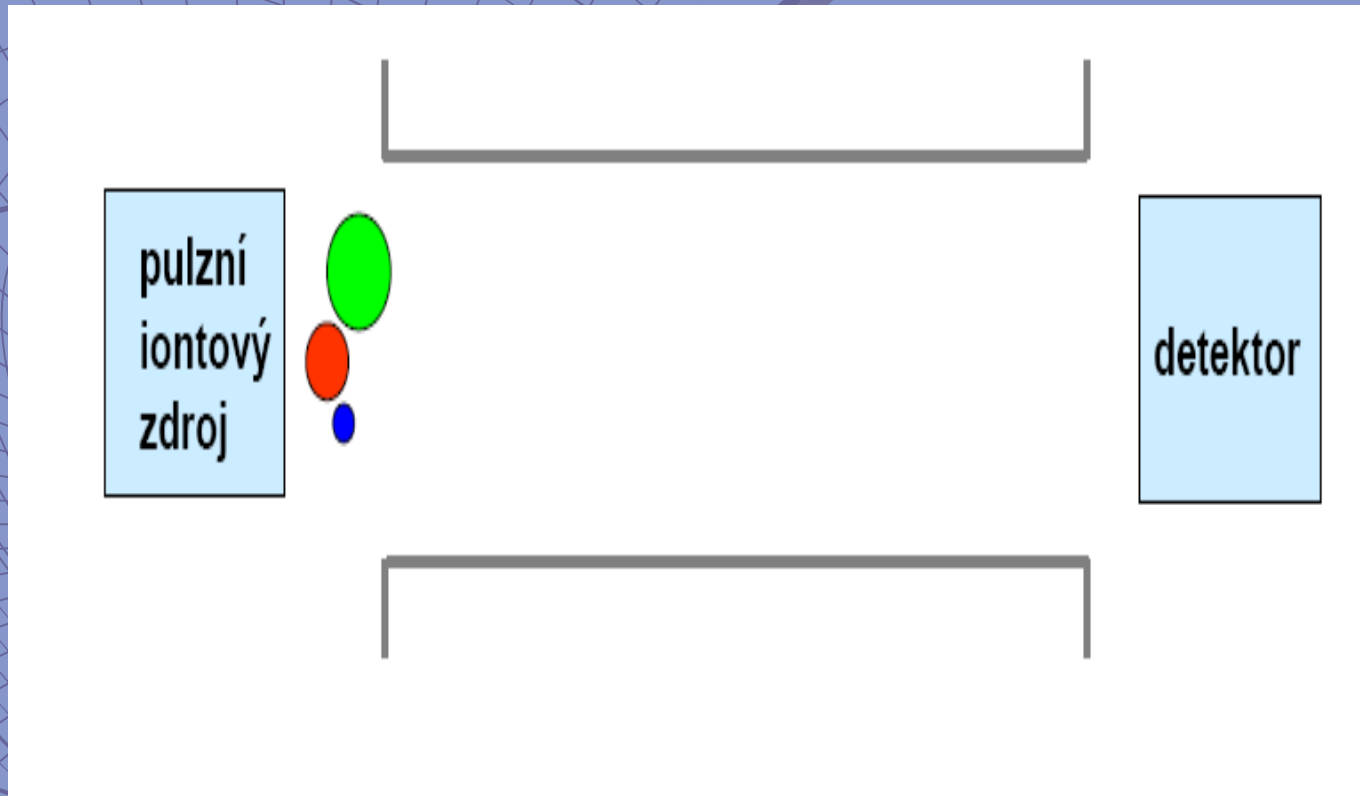
Ion Trap

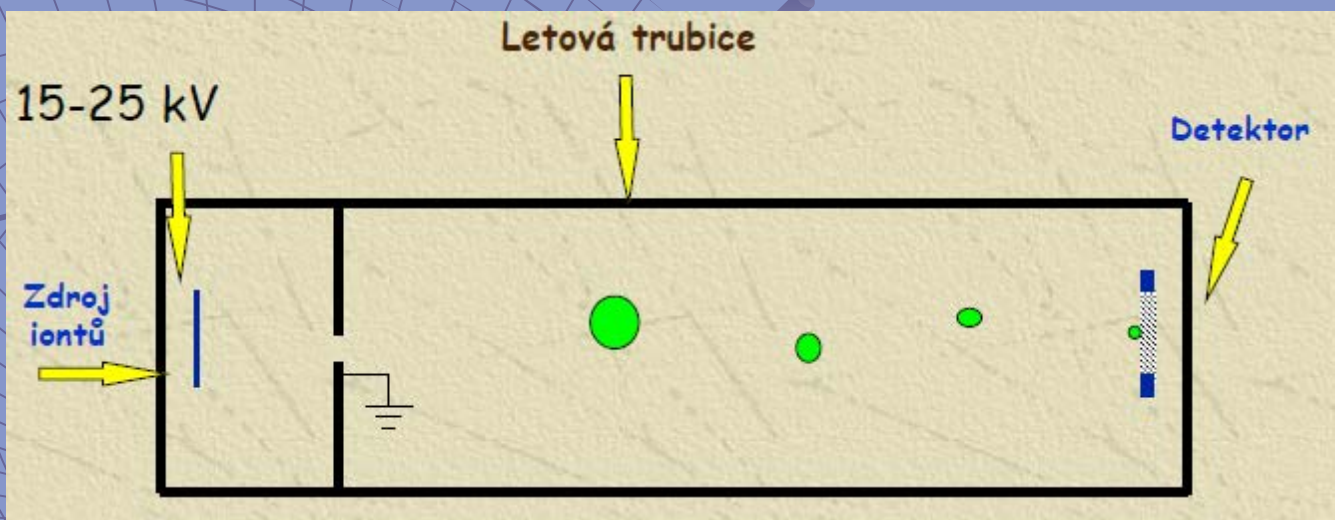


Ion Trap



Analyzátor doby letu (TOF)





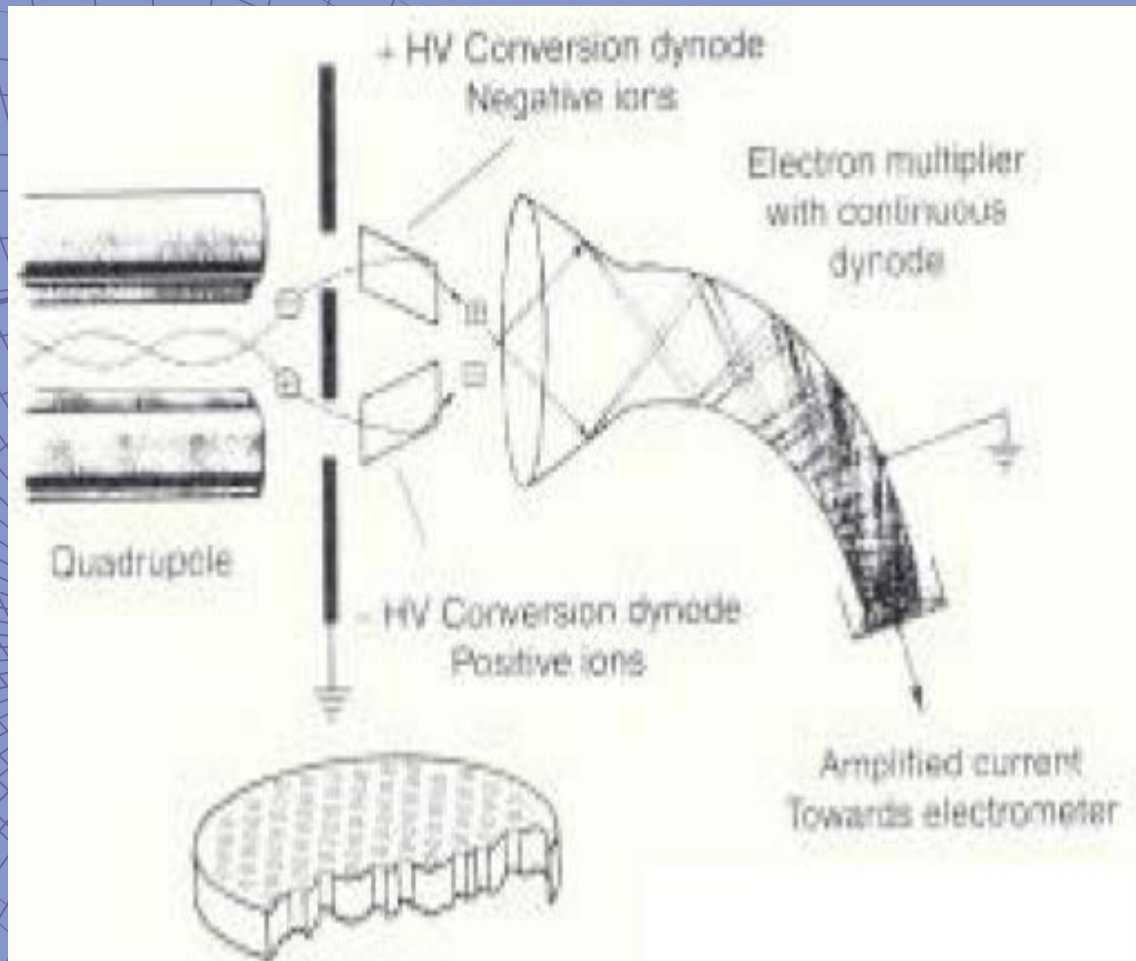
Analyzátor doby letu (TOF)



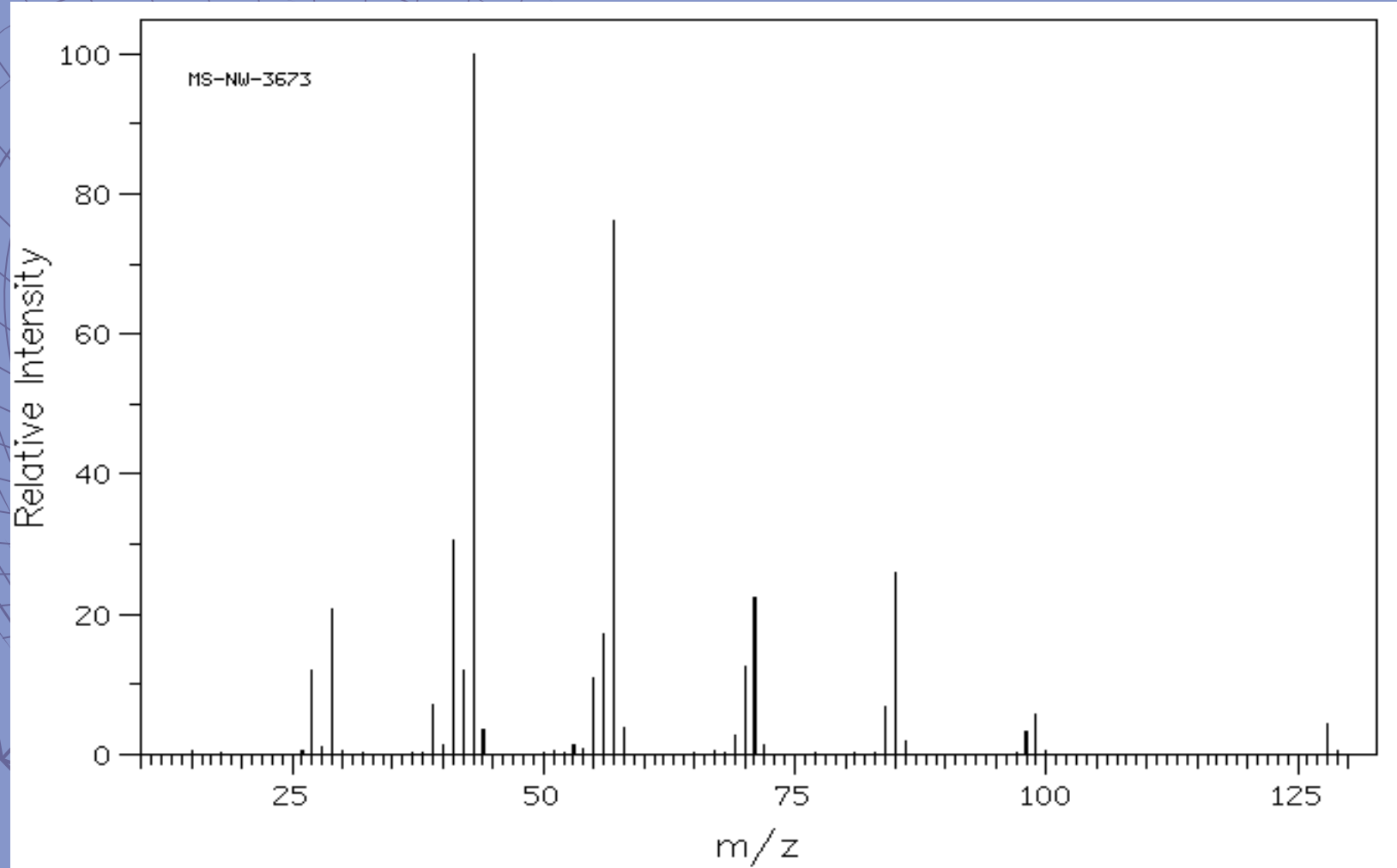
A stylized wireframe illustration of a satellite dish antenna, rendered in a light blue color against a darker blue background. The dish is shown from a perspective that emphasizes its curved, parabolic shape. The grid lines of the dish are clearly visible, and a central feed horn is positioned at the focal point. The overall aesthetic is clean and technical.

Detektory

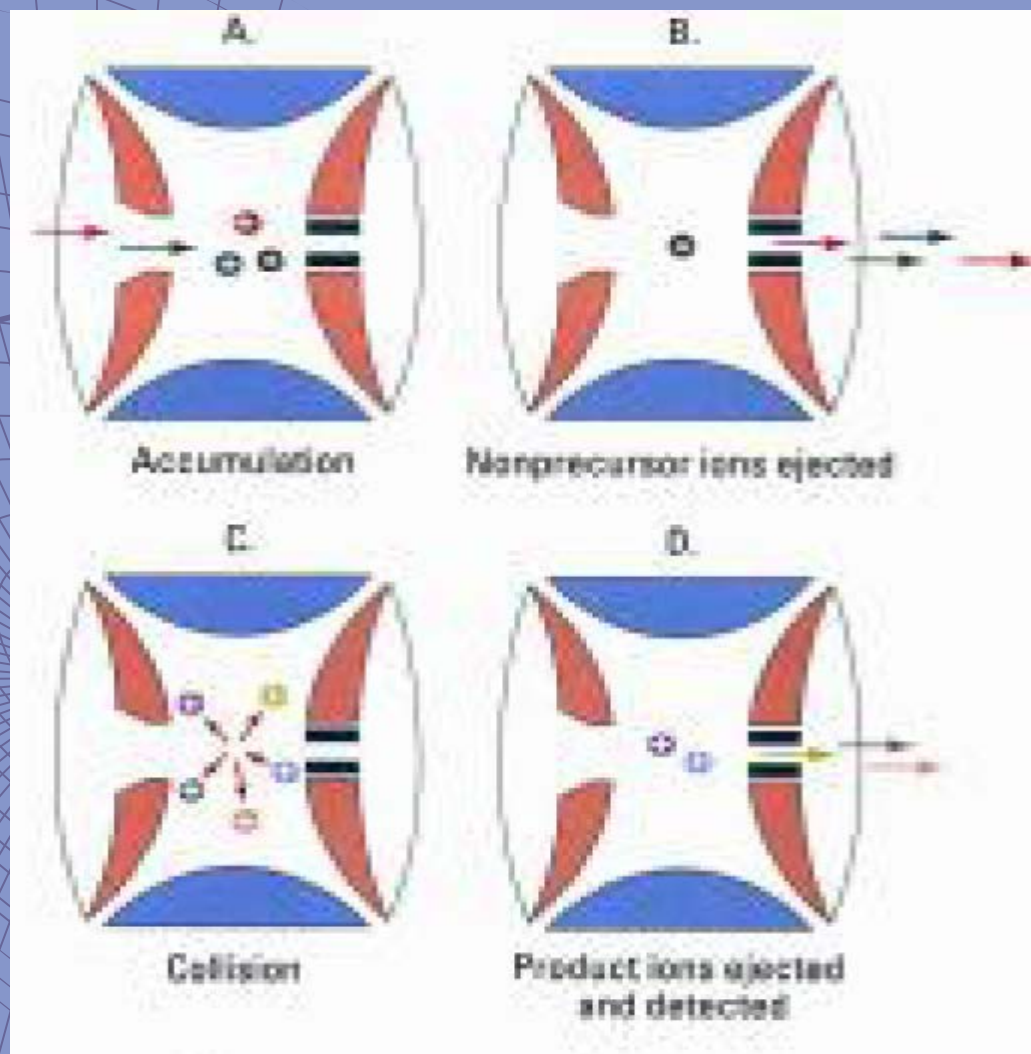
Elektronový násobič



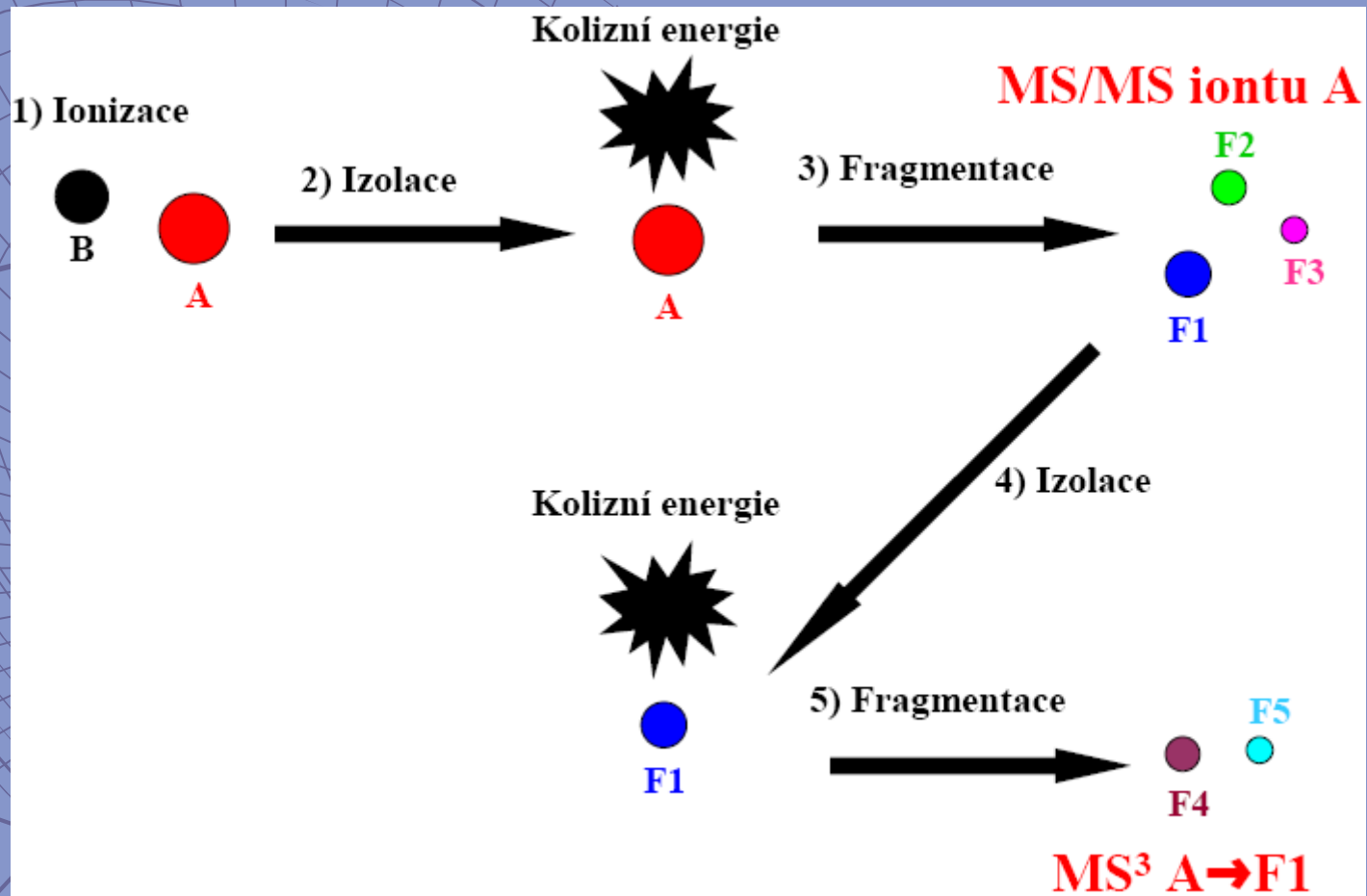
MS spektrum



MSⁿ

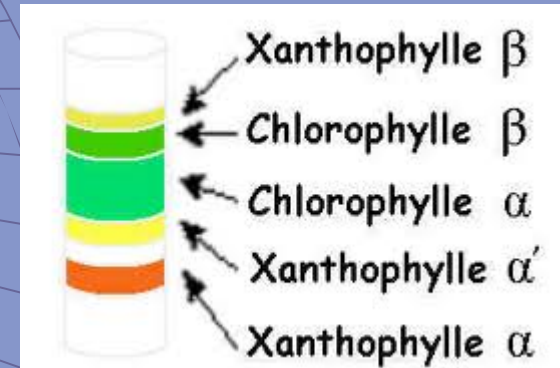
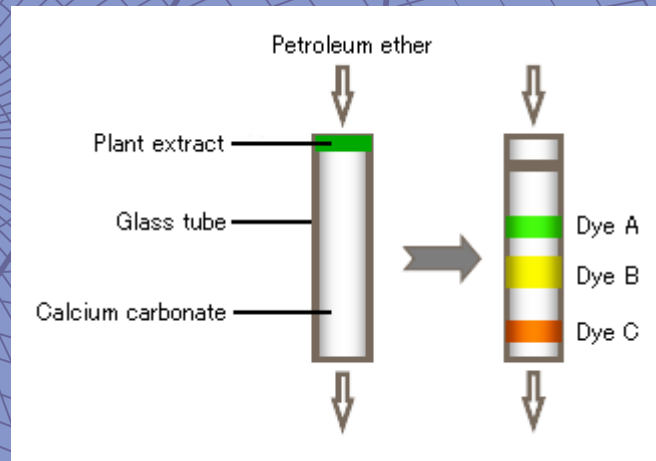
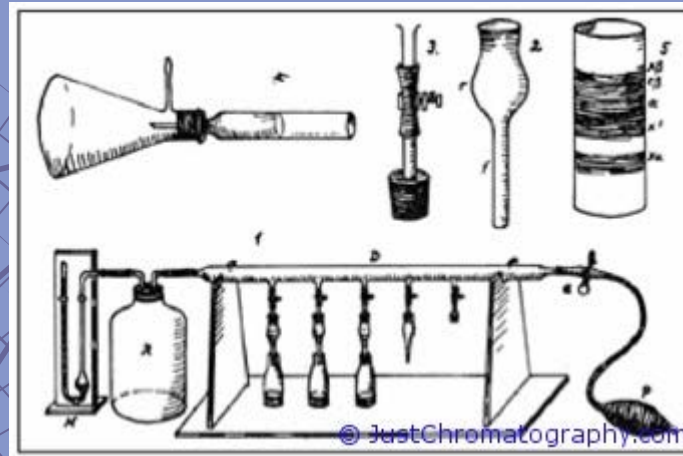


MSⁿ

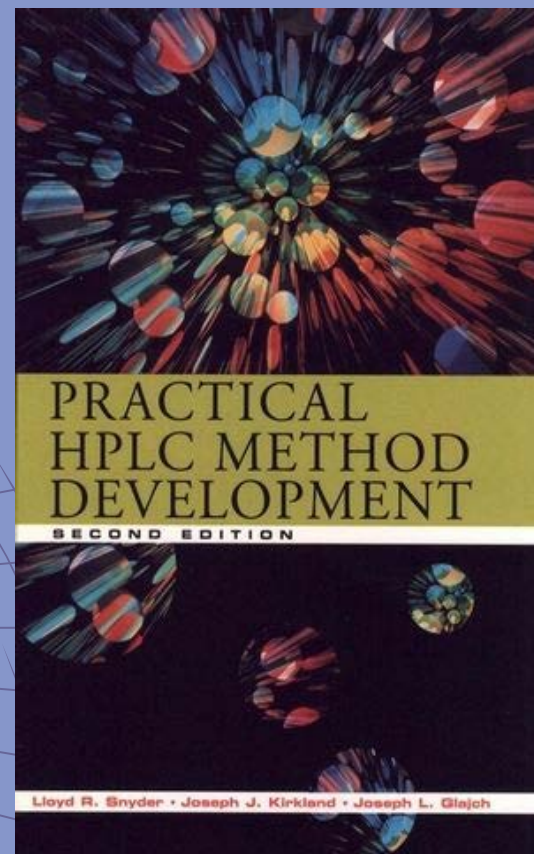
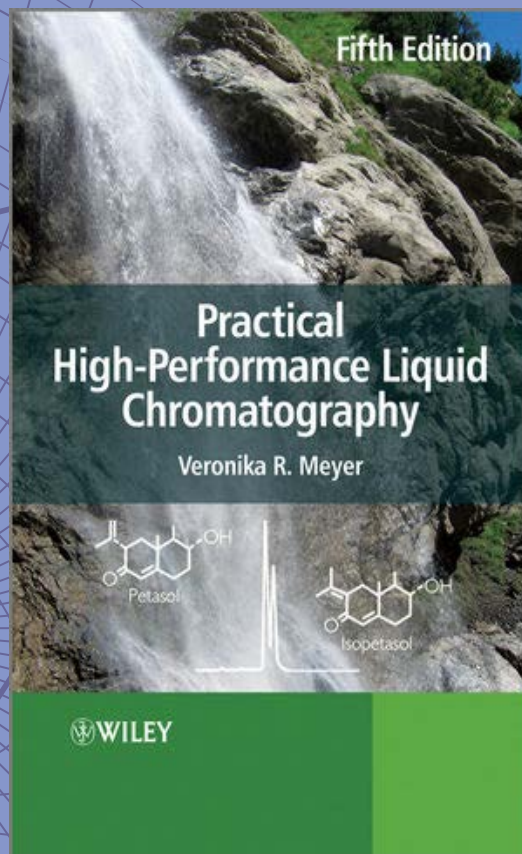
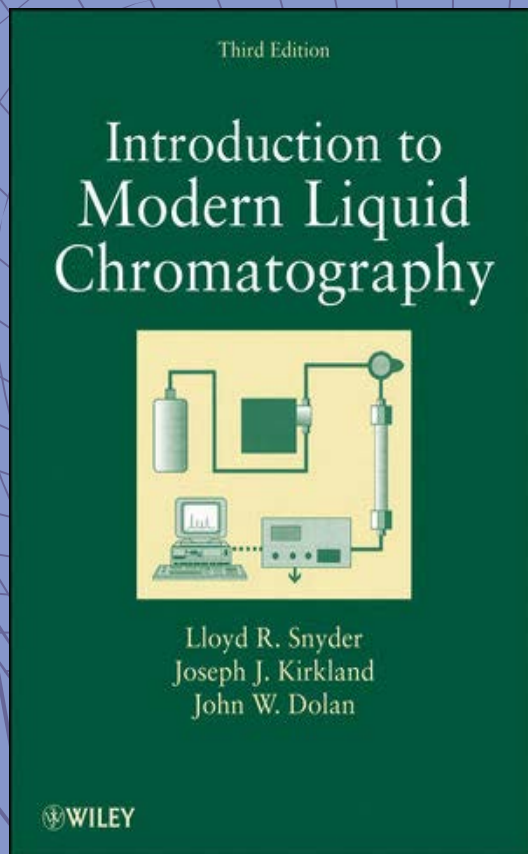


Mikhail Semyonovich Tsvet

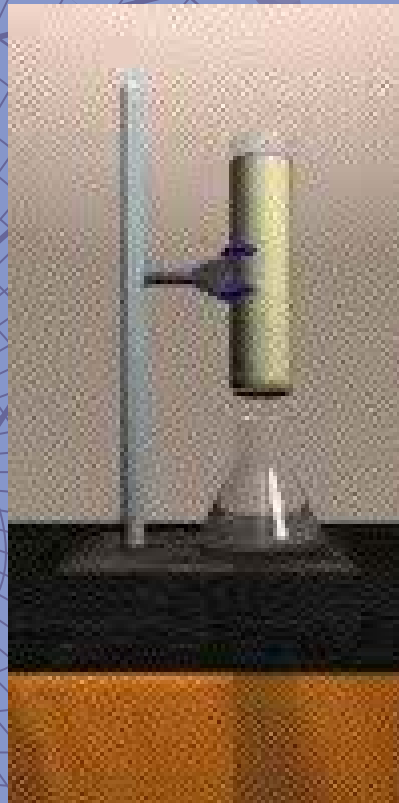
Chromatographia 1906



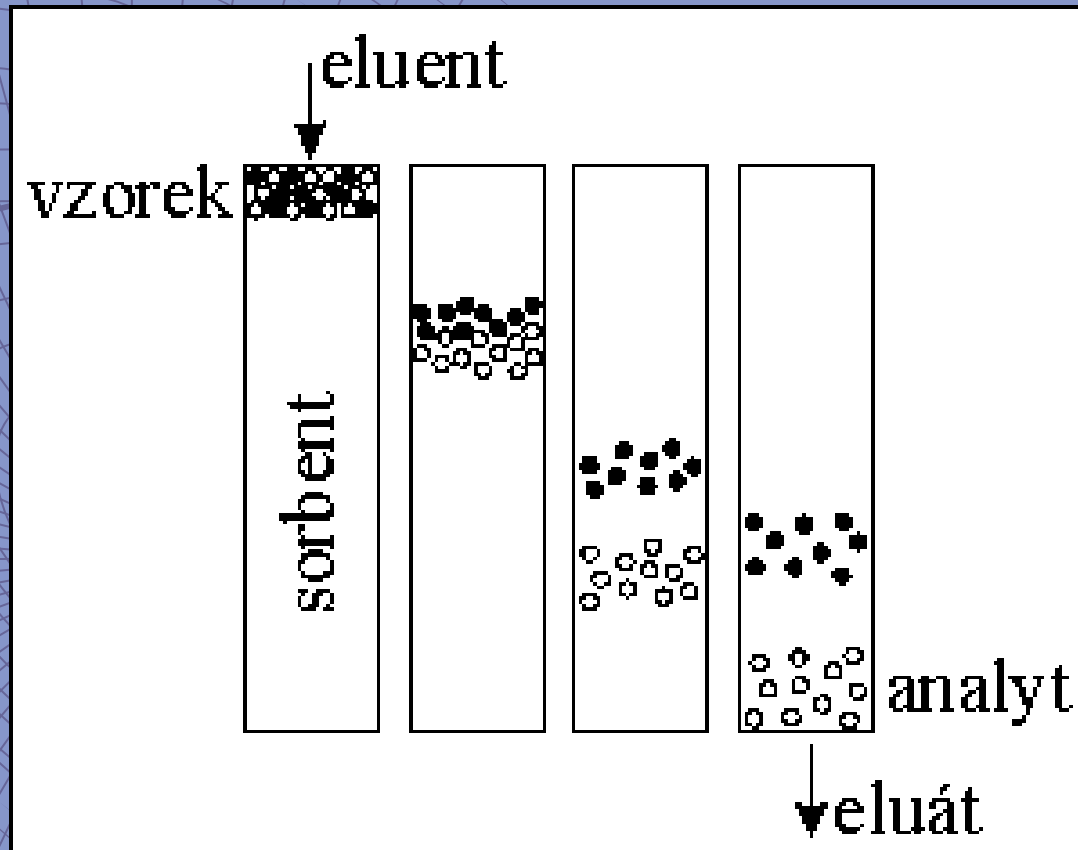
Literatura



Chromatografie



Chromatografie



Kapalinová chromatografie LC


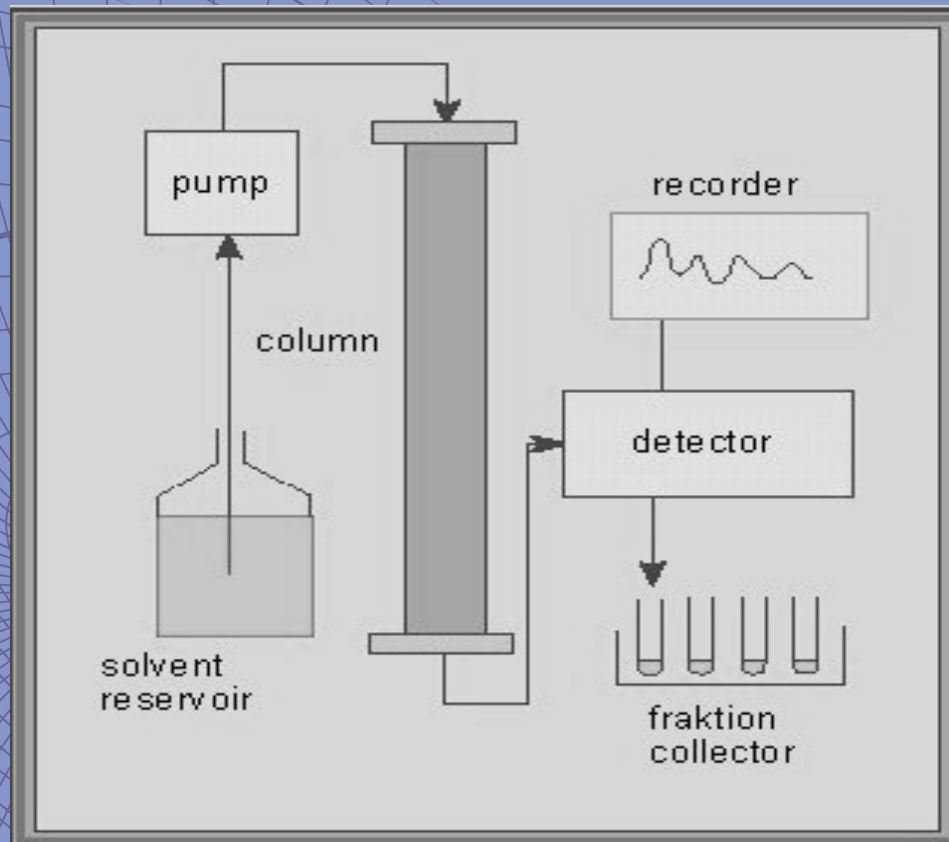
- ◆ Mobilní fáze - kapalina
 - ◆ Stacionární fáze -
fáze, kapalina pevná
- 

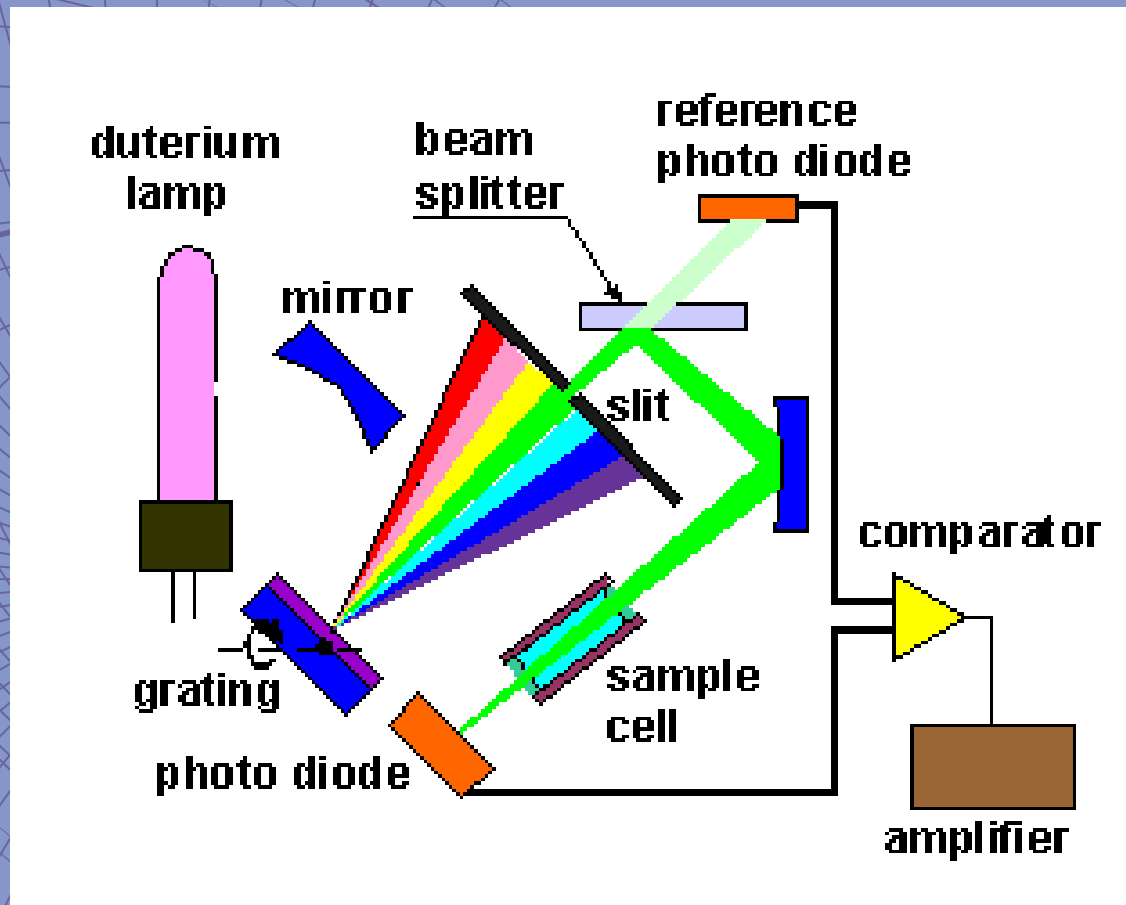
Schéma chromatografu



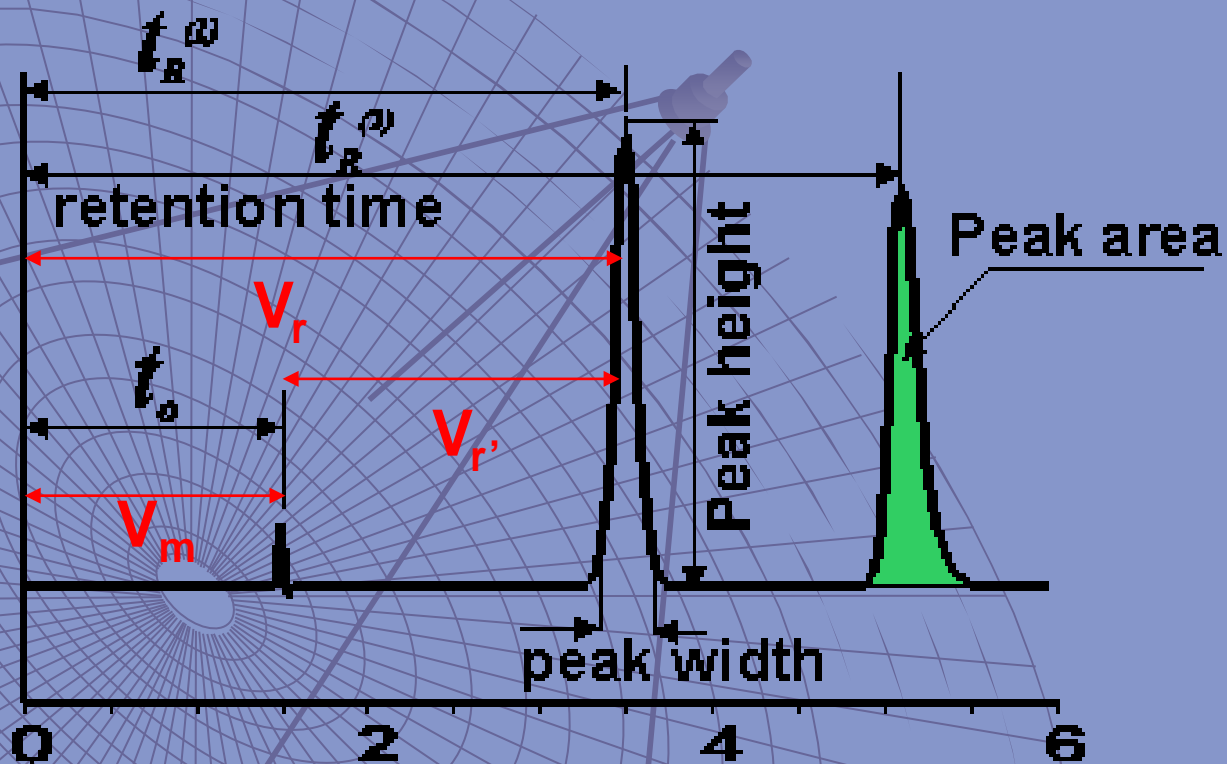
Zařízení pro HPLC



UV – VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou



Chromatogram



Analýza kvalitativní

- ◆ Srovnání retenčních časů píků u vzorku a standardů
- ◆ „spiking“ – přidání standardu do vzoru → nárůst výšky píků
- ◆ MS

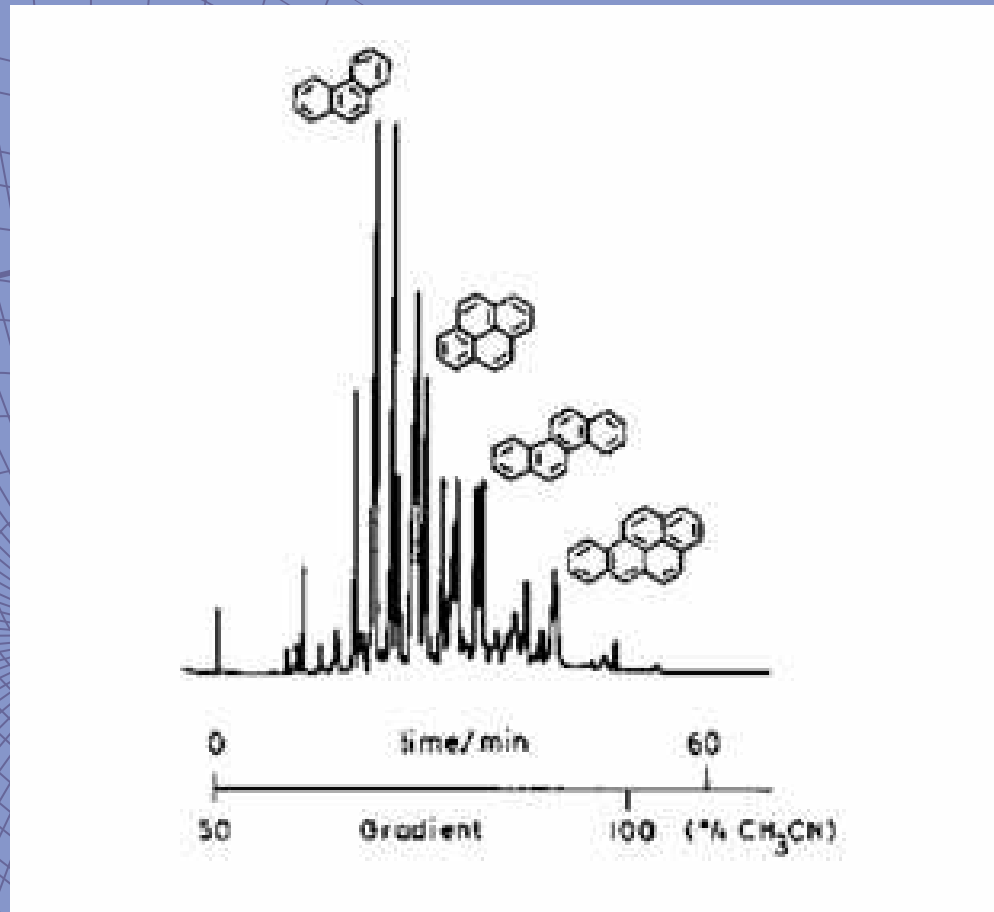
Analýza kvantitativní



Plocha (výška) píku

- ◆ Metoda externího standardu
- ◆ Metoda standardního přídavku

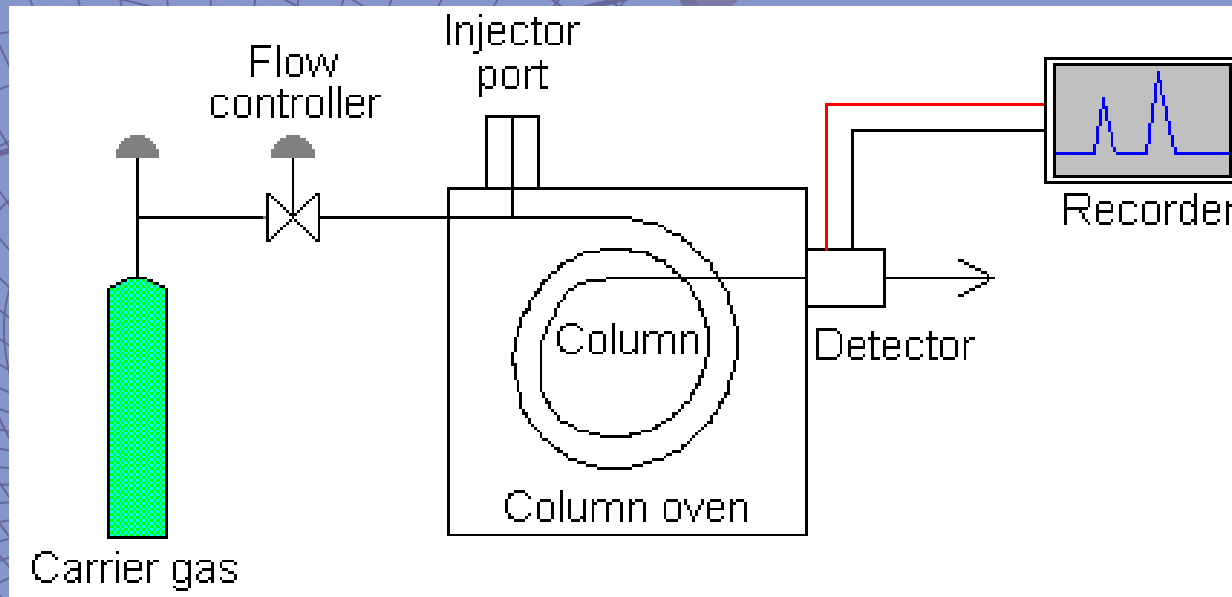
LC analýza



Plynová chromatografie

- ◆ Mobilní fáze - plyn
- ◆ Stacionární fáze - pevná fáze, kapalina

Schéma plynového chromatografu



Plynový chromatograf



Nosné plyny

Plyn	Výhody	Nevýhody
N_2	levný, bezpečná práce	nízká tepelná vodivost
H_2	vysoká tepelná vodivost	explosivní
He	inertní	drahý
Ar	inertní	drahý

Příprava vzorků pro GC

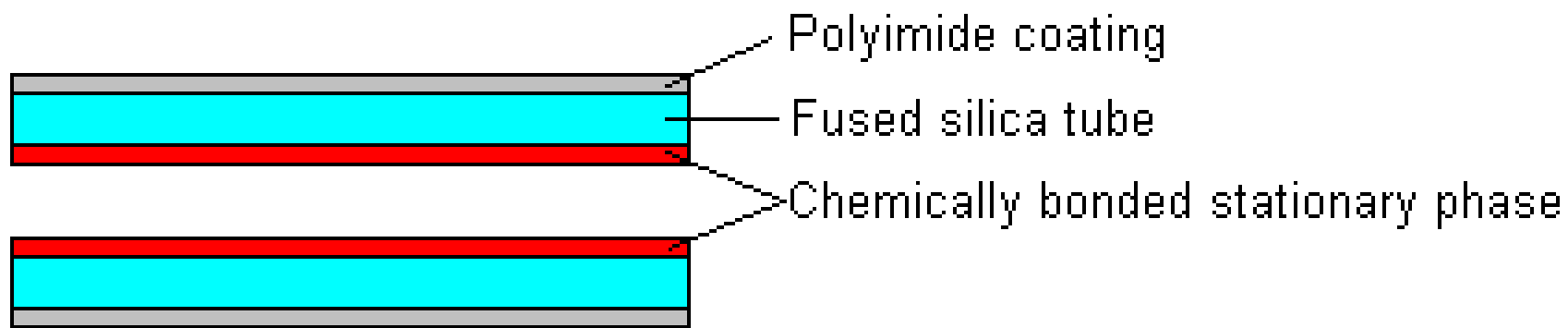
- ◆ Plyny, kapaliny - přímo
- ◆ Pevné látky - po derivatizaci

Kolony

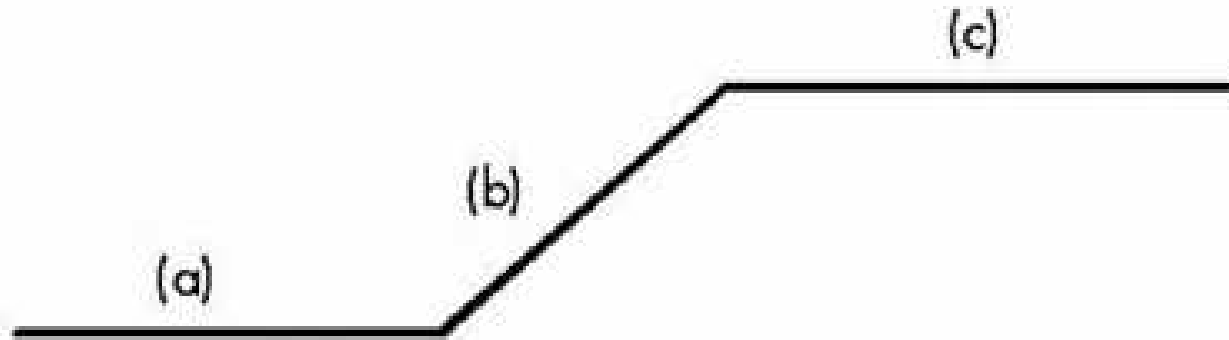
- ◆ Kapilární – 0.1 – 0.5 mm ID -
křemen, 10 - 100 metrů - délka



Kapilární kolona



Eluce

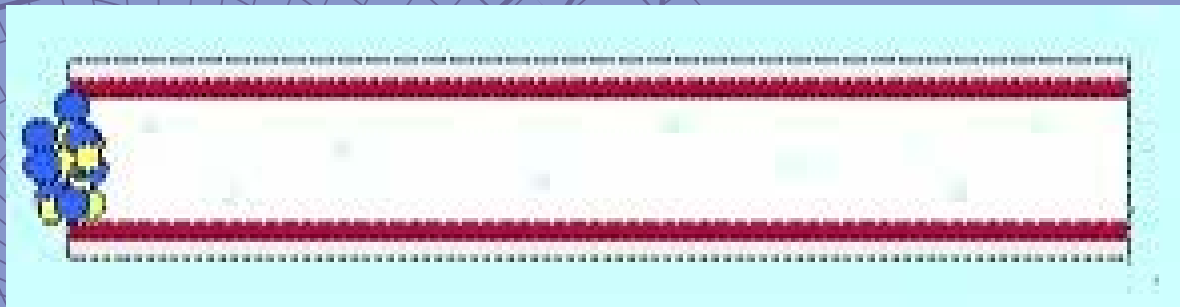


a - initial temperature and time

b - ramp ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

c - final hold time and temperature

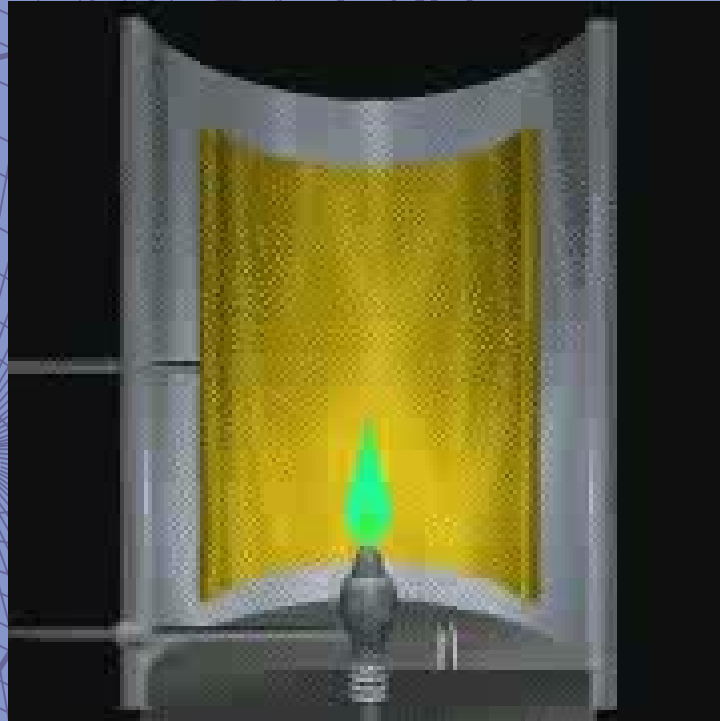
Eluce



Plamenově ionizační detektor FID

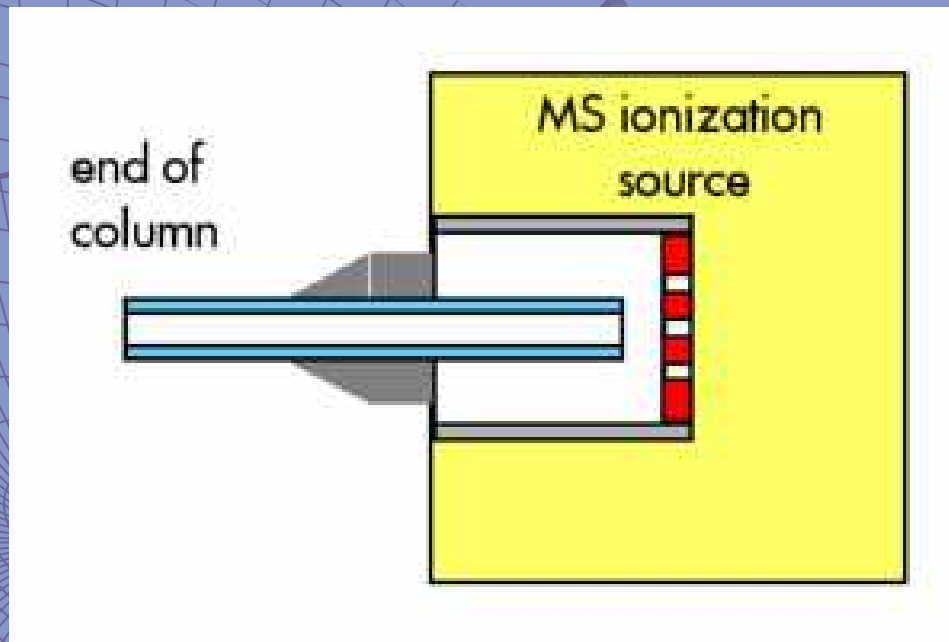
- ◆ Destruktivní
- ◆ Princip – ionty vznikající spalováním vzorku vyvolávají nárůst proudu

Plamenově ionizační detektor FID

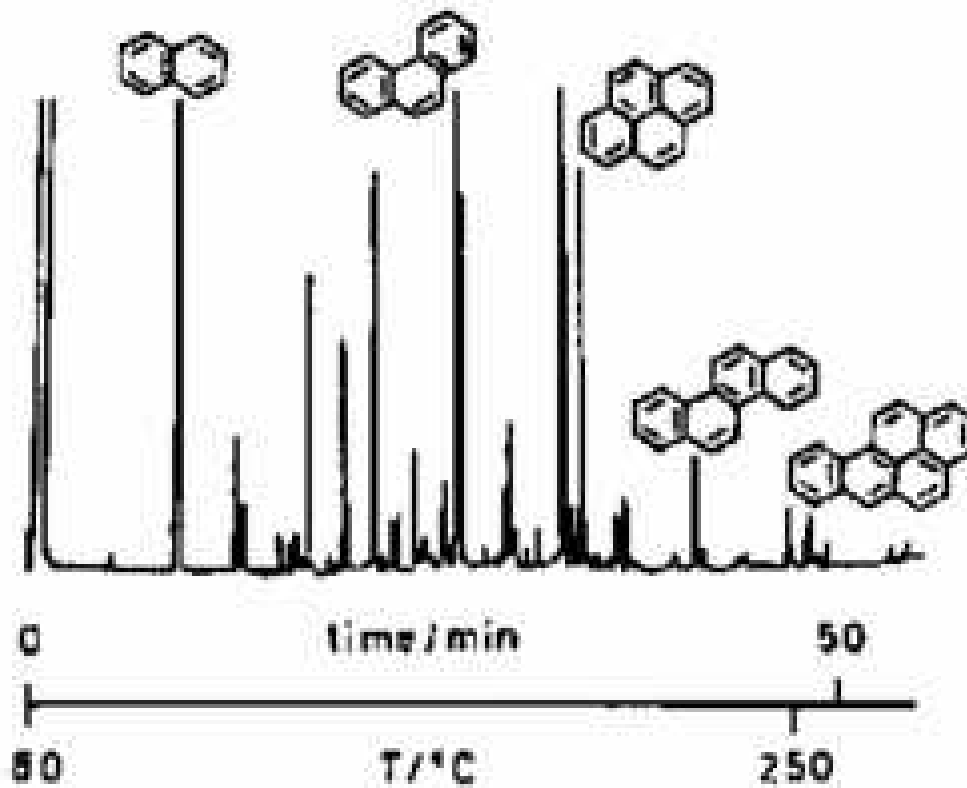


GC MS

přímé spojení



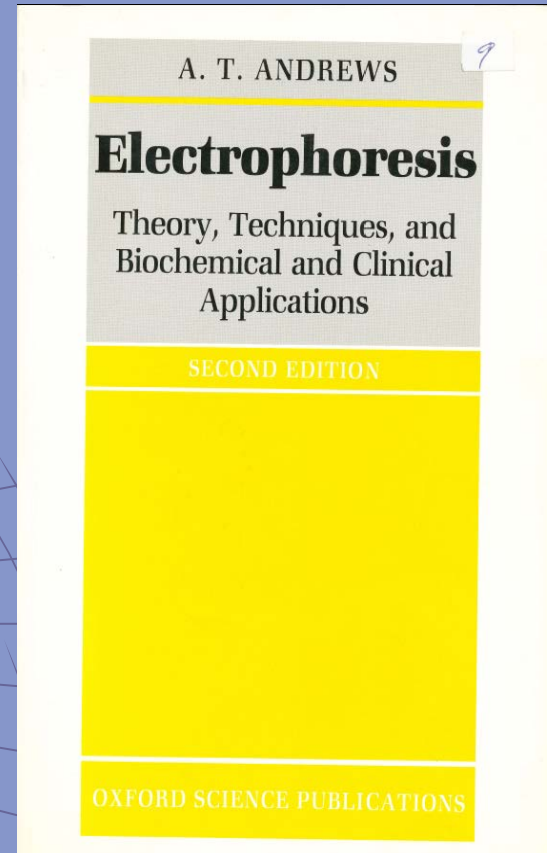
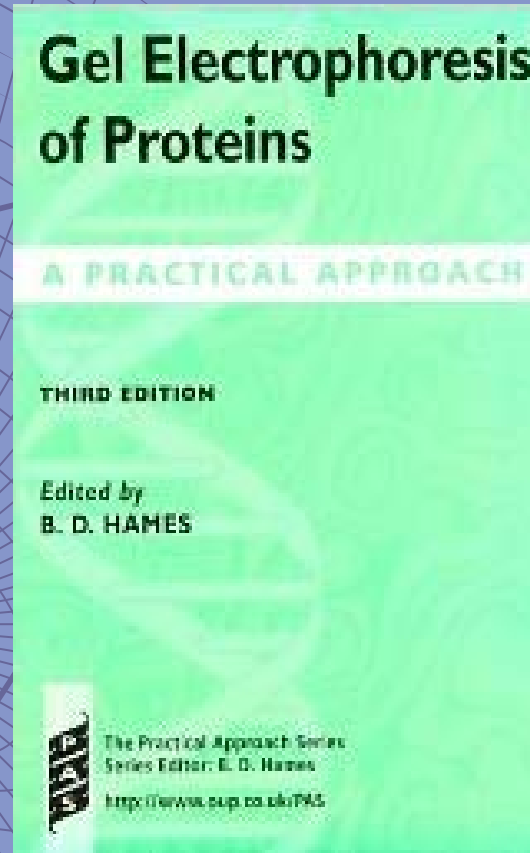
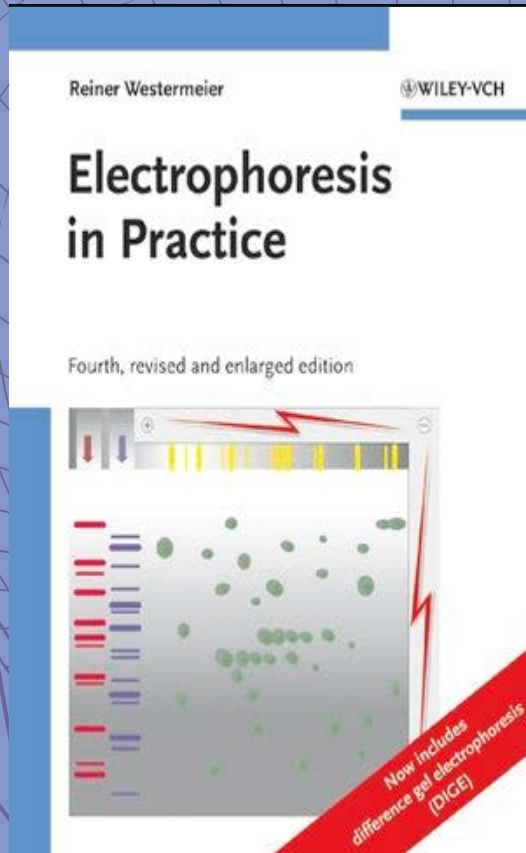
GC analysa





Elektromigrační metody

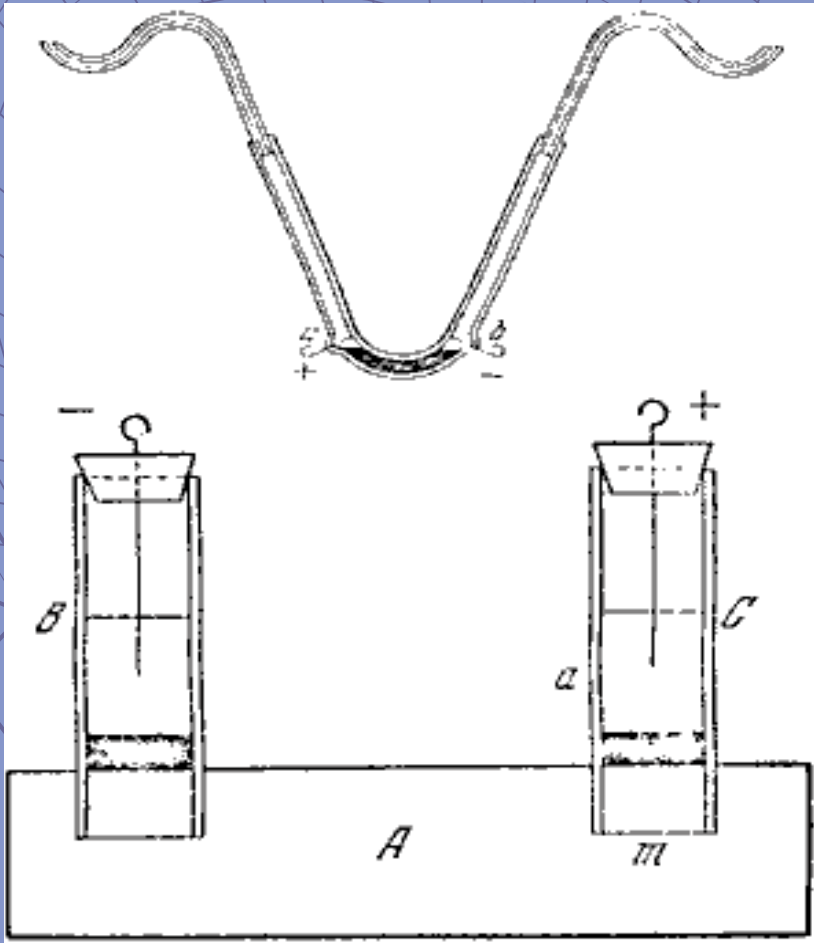
Literatura



Frederic Reuss

(1807)

Katoforéza



Podstata

*„Pohyb elektricky nabitých
částic v elektrickém poli“*

The background features a light blue grid of curved lines representing an electric field. The lines are concentric and radiate from a central point, becoming more densely packed as they approach the center. A small, dark, cylindrical object is suspended from a point above by several thin lines, positioned within the field.

Elektromigrační metody

- ◆ Elektroforéza
 - ◆ Izoelektrická fokusace
 - ◆ Izotachoforéza
- 
- The background of the slide features a complex grid pattern representing an isoelectric focusing gel. The grid consists of concentric circles and radial lines, creating a polar coordinate system. A central circular region is highlighted, and several lines radiate from a point on the right side of the grid towards the center, likely representing the migration paths of different protein species during the process.

Dvojměrná elektroforéza

pI



The background features a light blue grid pattern that is curved and perspective-distorted, resembling a dome or a large-scale technical drawing. A thin, dark line representing a capillary tube is positioned diagonally across the grid, with a small, dark, cylindrical component at its upper right end. The overall aesthetic is clean and technical.

Kapilární elektroforéza

1981 - Jorgenson Lukacsová



CLIN. CHEM. 27/9, 1551-1553 (1981)

Free-Zone Electrophoresis in Glass Capillaries

James W. Jorgenson and Krynn DeArman Lukacs

A simple theory of zone electrophoresis in open-tubular capillaries is developed. According to this theory, to achieve the highest resolution of zones, tubes with as small an inside diameter as possible should be used in combination with as high an applied voltage as feasible. To test this approach, we performed electrophoresis in glass capillaries with an internal diameter of $75\ \mu\text{m}$ and a length of 100 cm. A special fluorescence detector was used to detect fluorescent zones while they migrated inside the capillary. With the application of 30 kV potentials to this system, rapid and efficient separations of amino acids, peptides, and urinary amines were demonstrated. In all cases fluorescent derivatives were necessary for detection. Preliminary results are encouraging, and with further development of sensitive detection devices, applications in clinical analyses may be feasible.

small diameter simultaneously facilitates heat transfer as well as stabilizes the medium. Regardless of the diameter, some radial temperature gradient will persist. However, this temperature gradient is undesirable only to the extent that a significant fraction of the solute molecules making up a zone spend longer than average times migrating within "cool" or "hot" regions of the tube radius. Here a more subtle effect of reduced tube diameters comes into play. If the diameter is small enough that solute molecules diffuse back and forth across the tube many times during their migration, then the probability that a significant fraction of molecules will spend excessive amounts of time in any one portion of the tube radius is greatly reduced. Thus the solute molecules have an excellent chance of traveling throughout all portions of the tube radius, and any variations in migration velocity will tend to average out.

To summarize, the possible advantages of performing zone electrophoresis in open tubes of small diameter are:

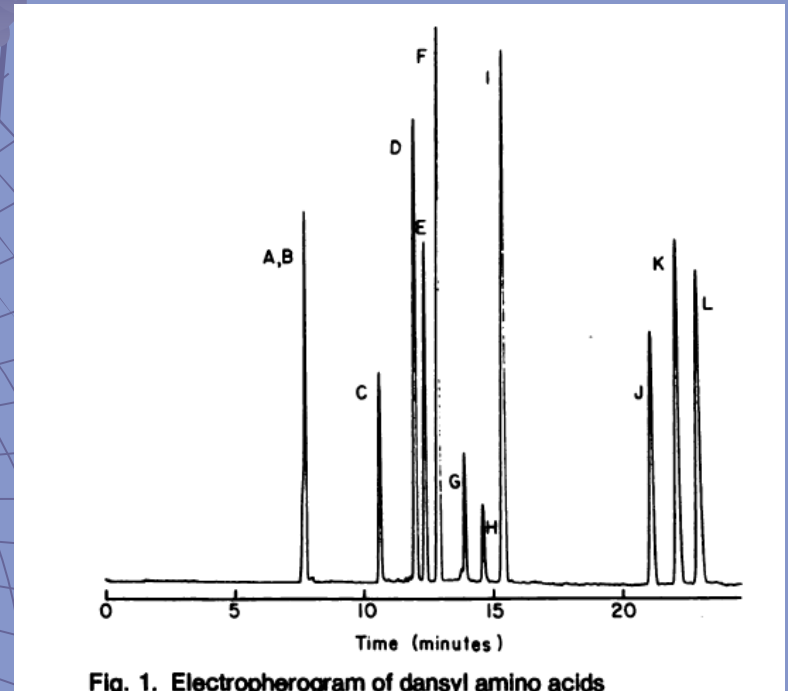
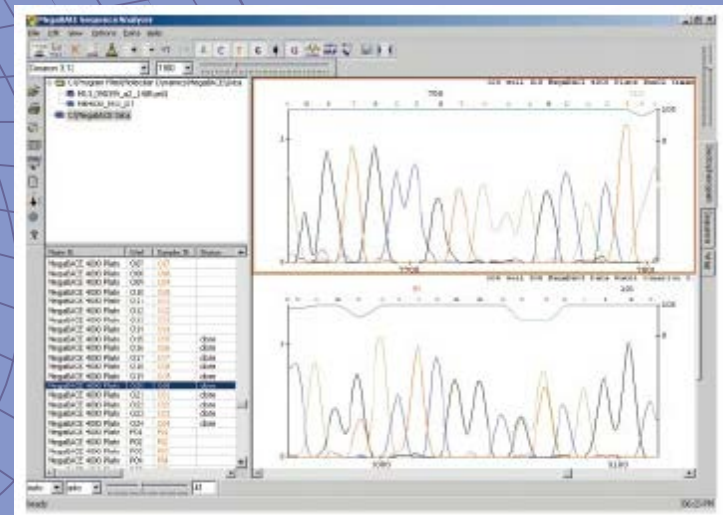
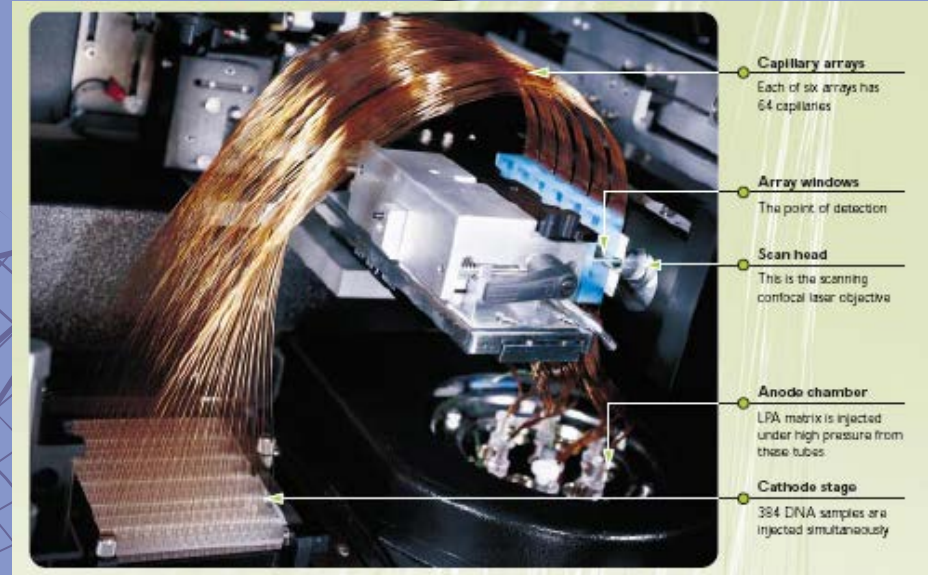


Fig. 1. Electropherogram of dansyl amino acids

2003 - Projekt lidského genomu





Proč CE a biochemie ?

Výhody CE

- ◆ **Aplikační diverzita**

nabité i neutrální látky

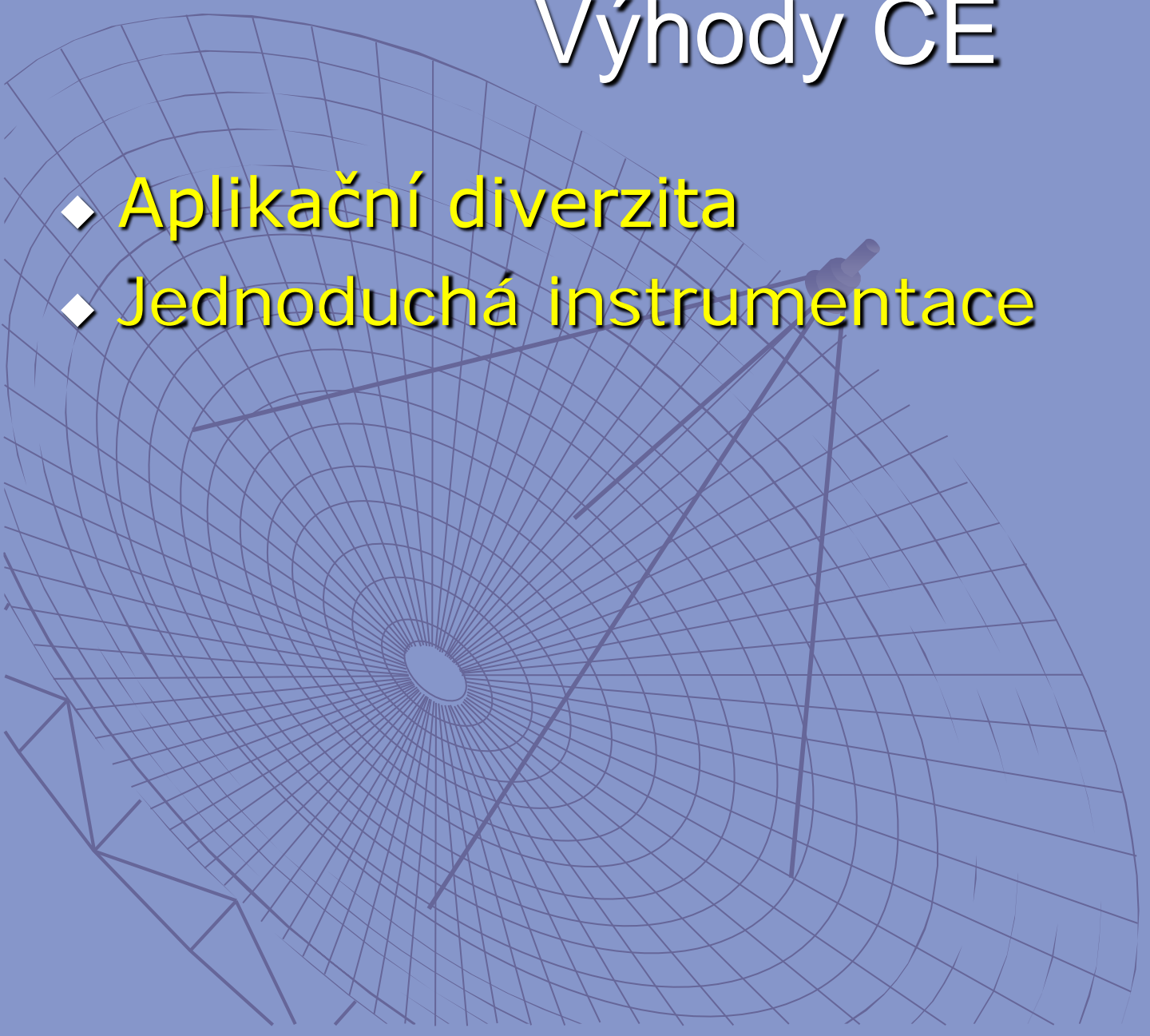
nízkomolekulární i vysokomolekulární látky

chirální i achirální látky

bakterie i viry

Výhody CE

- ◆ Aplikační diverzita
- ◆ Jednoduchá instrumentace



Výhody CE

- ◆ Aplikační diverzita
- ◆ Jednoduchá instrumentace

CZE, MEKC,
CIEF, CITP
NACE, MEEKC,
CGE, ChCE

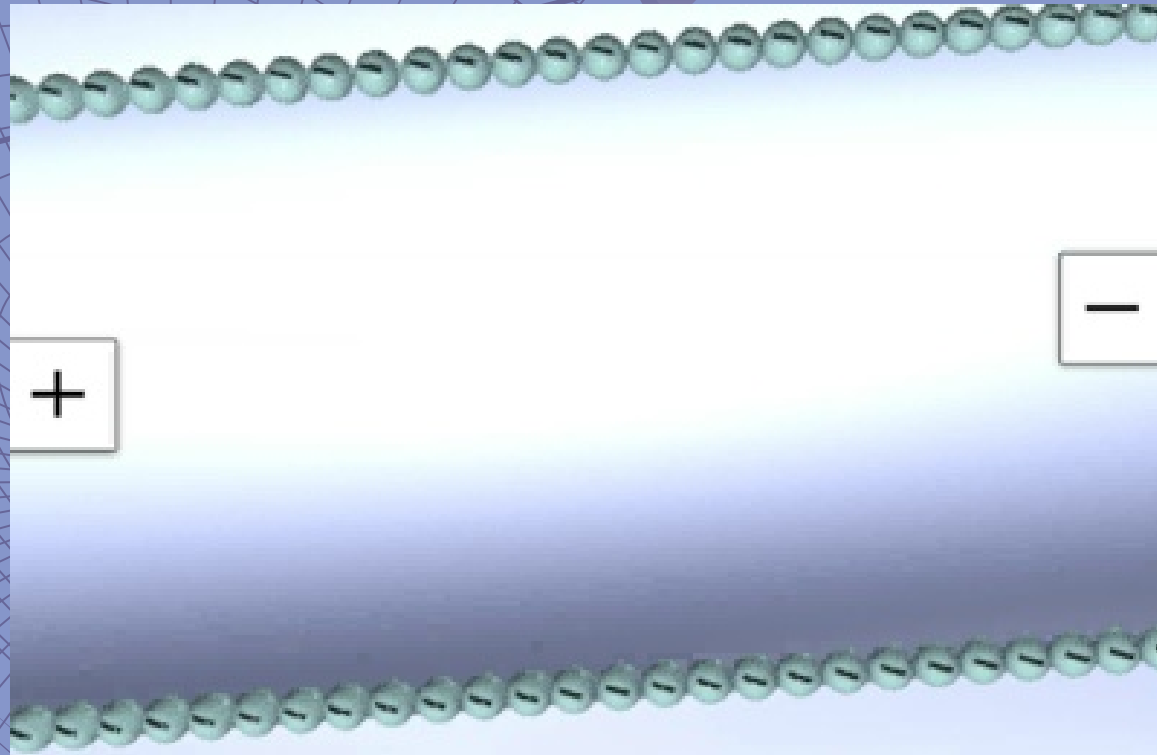


CEC

Výhody CE

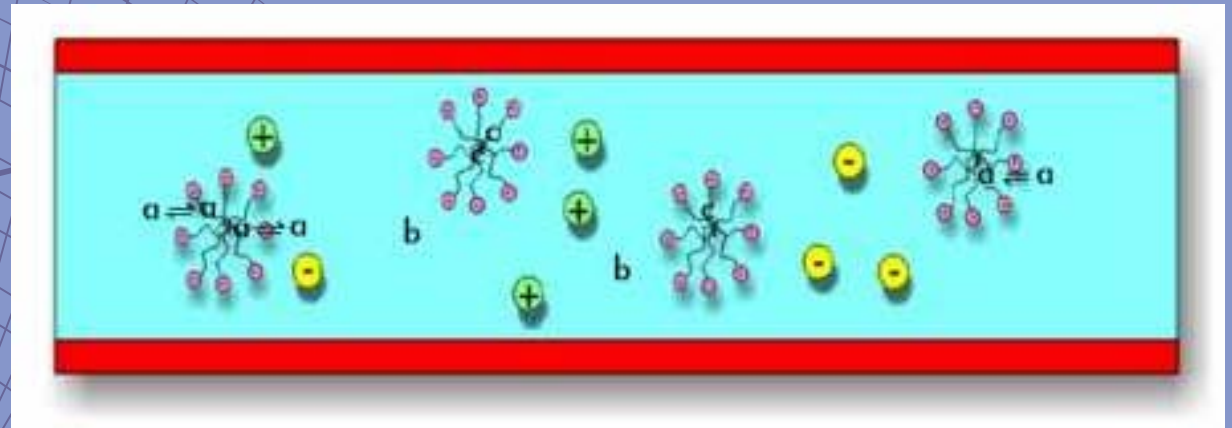
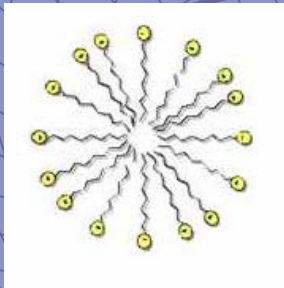
- ◆ Aplikační diverzita
- ◆ Jednoduchá instrumentace
- ◆ Vysoké rozlišení a účinnost separací
- ◆ Malá spotřeba vzorku
- ◆ Rychlost analýzy
- ◆ Malá spotřeba chemikálií a malé množství odpadů

Kapilární zónová elektroforéza ve volné kapiláře



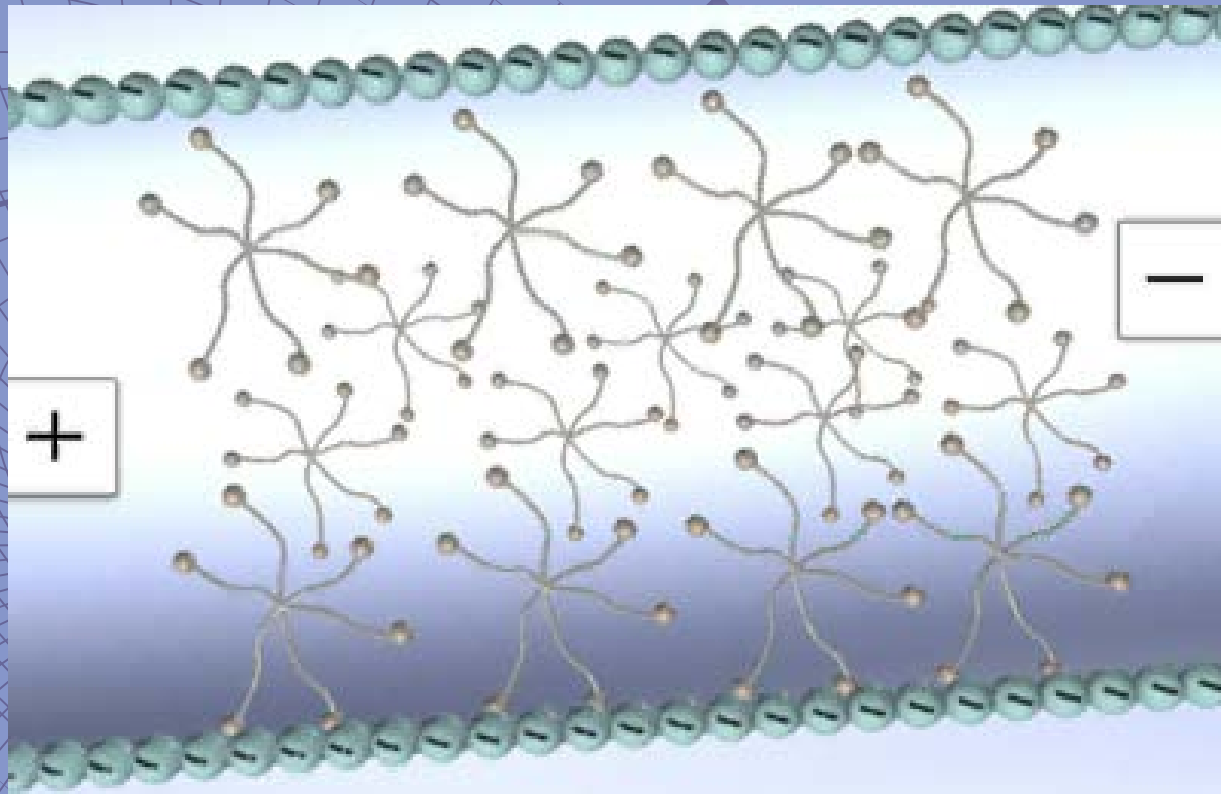
Princip MEKC

Micela



- a – střed – rozpustná v obou
- b – silně hydrofilní – nerozpustná v micelle
- c – silně hydrofóbní – nerozpustná ve vodné fázi

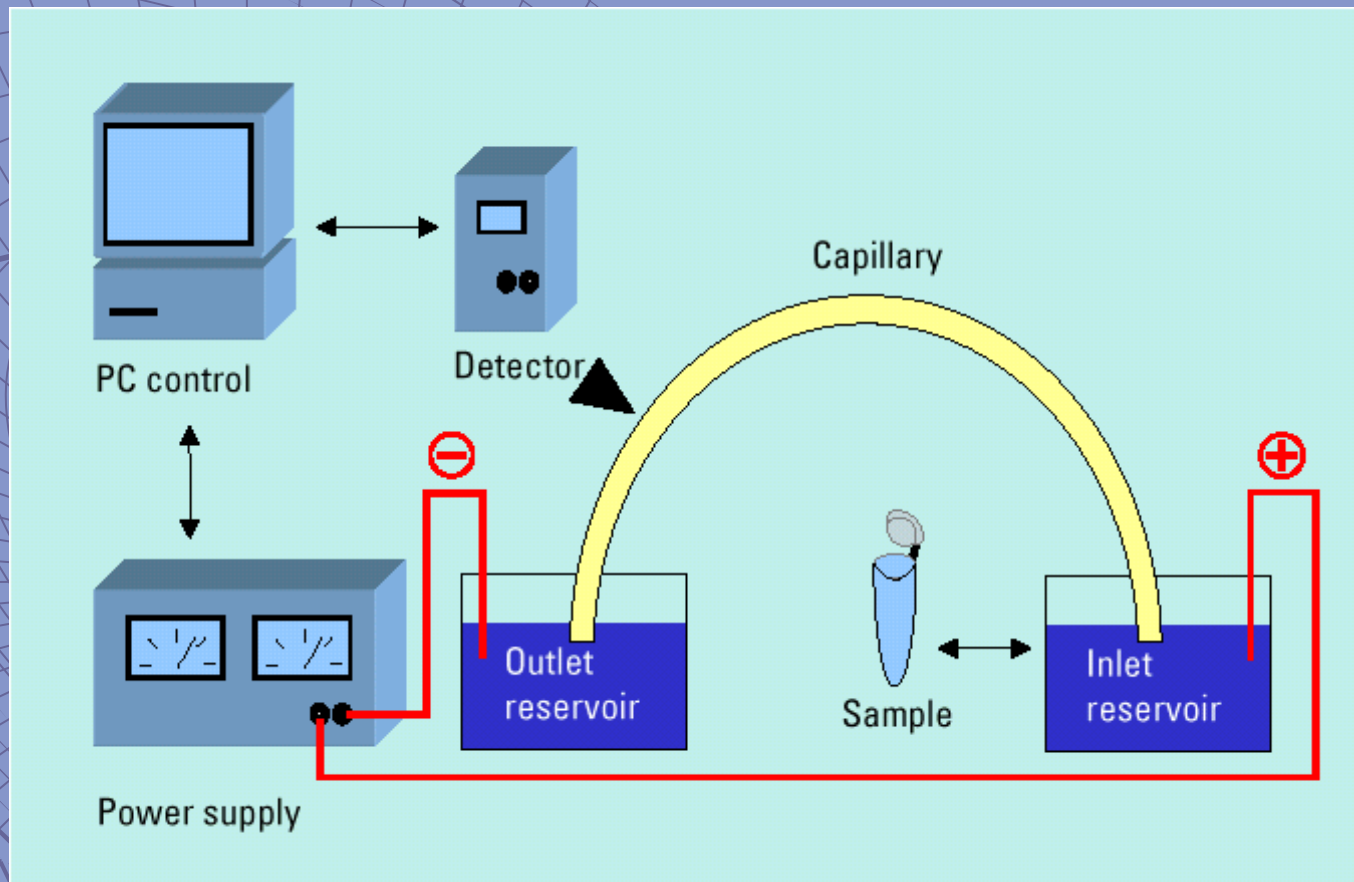
Micelární elektrokinetická chromatografie





Instrumentace CE

Schéma zařízení pro CZE



Napájecí zdroj

- ◆ **stabilizovaný ± 30 kV
300 μ A**
- ◆ **konstantní napětí nebo proud**
- ◆ **obojí polarita**
- ◆ **ochrana obsluhy**

Kapilára

- ◆ křemenná - 25 - 100 μm i.d

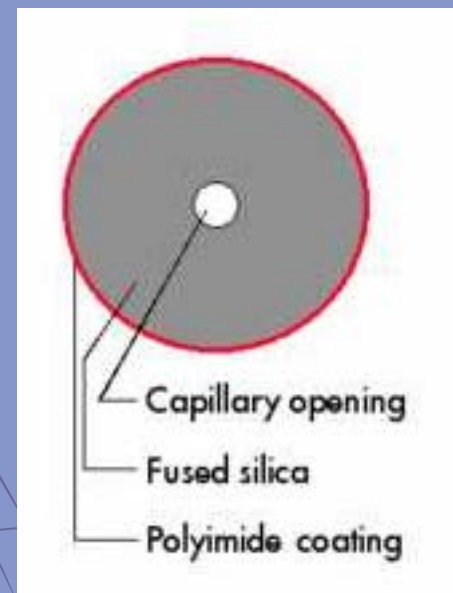
- 350 μm

o.d.

- ◆ délka až 100 cm

délka

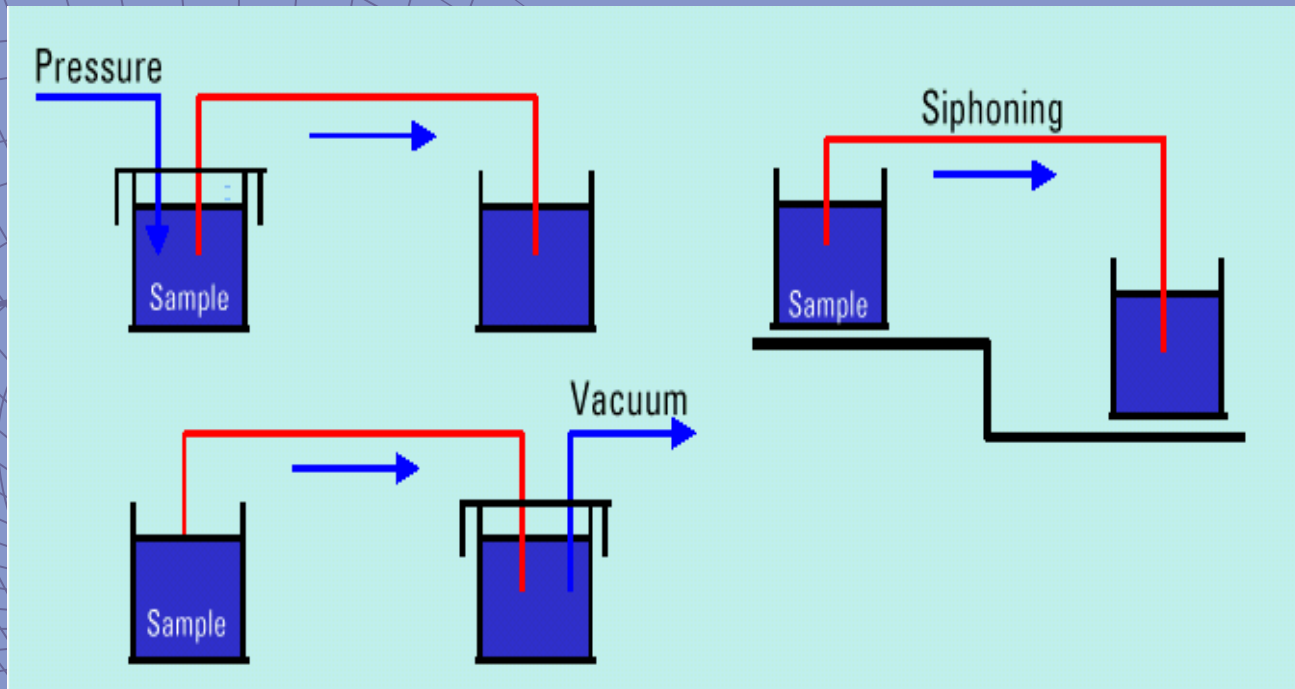
- ◆ polyimidové vnější pokrytí





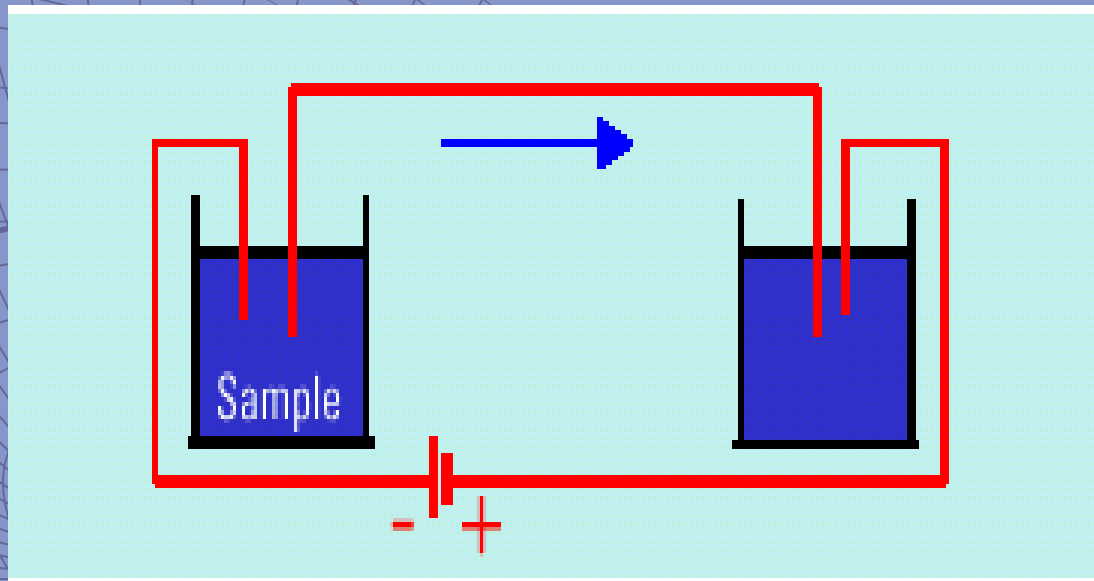
Dávkování

Hydrodynamické



$$\text{Volume} = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L_{\text{tot}}}$$

Elektrokinetické



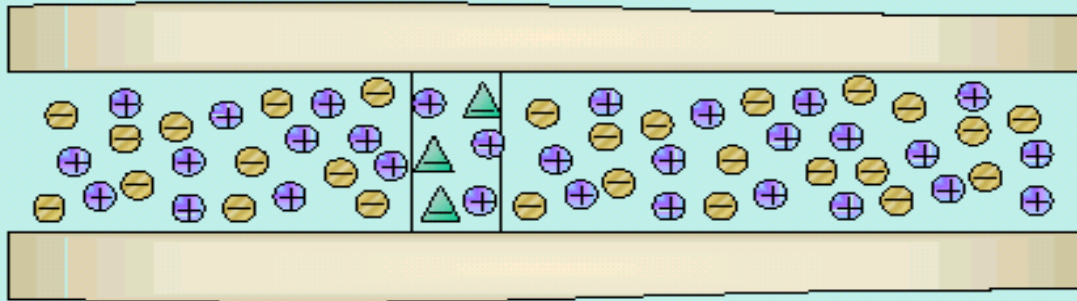
$$Q = (\mu_e + \mu_{\text{EOF}}) E \pi r^2 C$$



Detekce

Spektrofotometrická detekce

UV light source



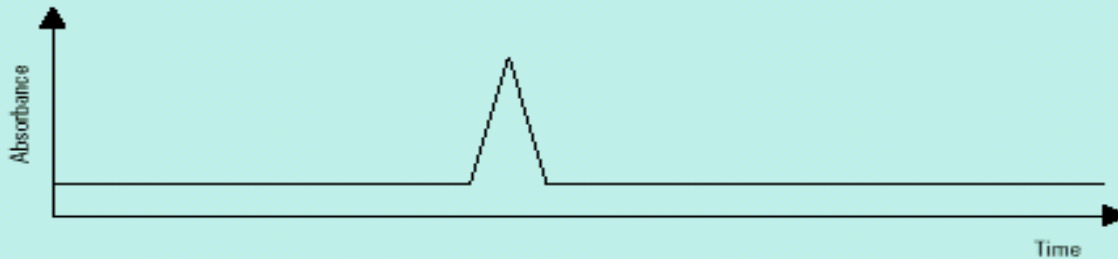
$$\text{Abs} = \epsilon cl$$

where

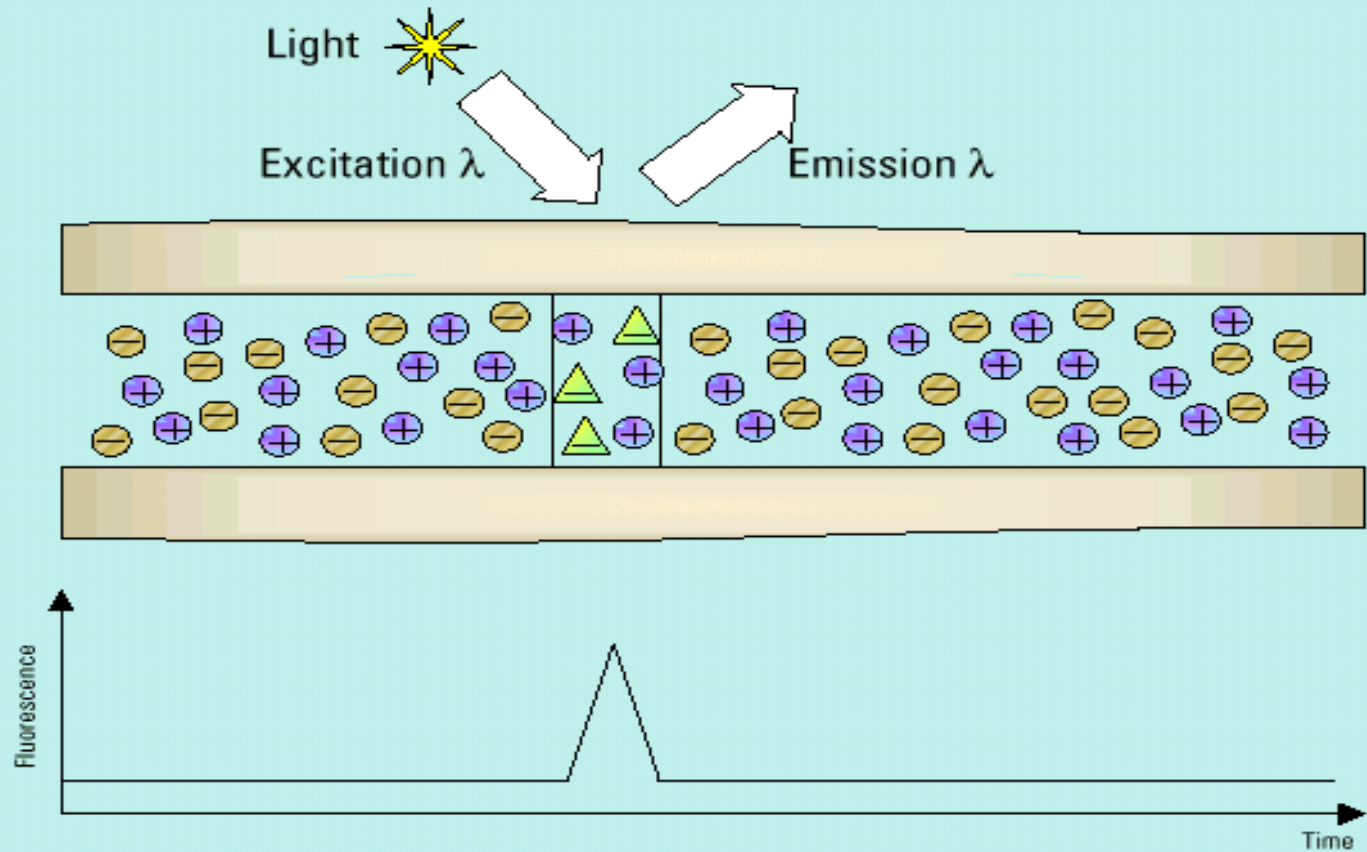
ϵ = molar absorptivity

c = concentration

l = pathlength

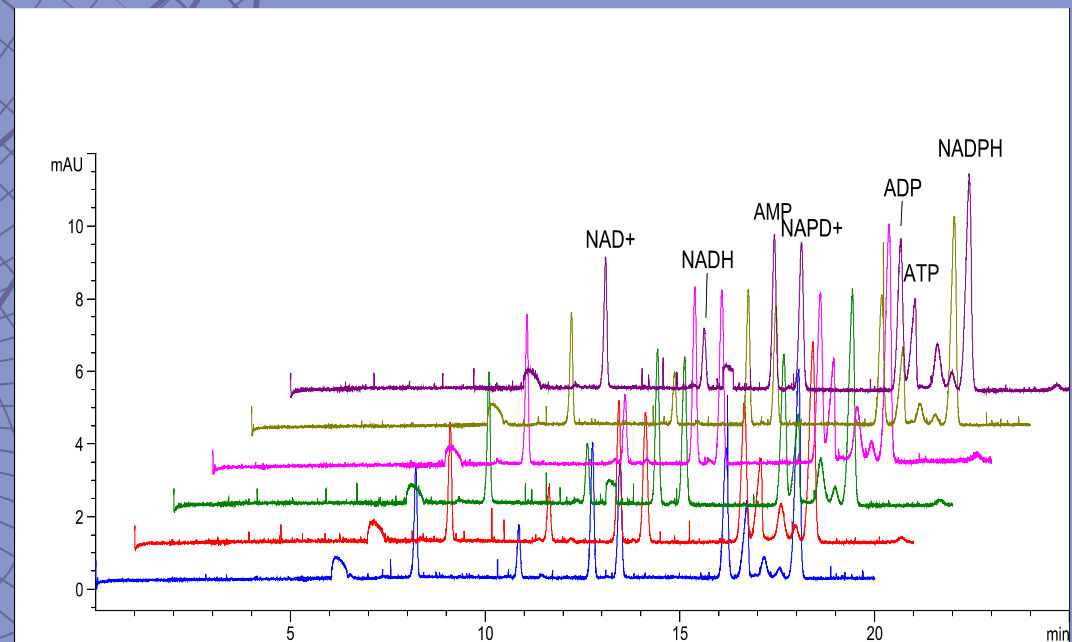
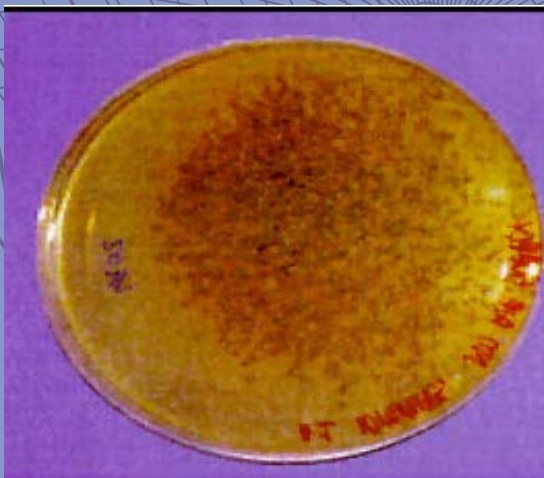
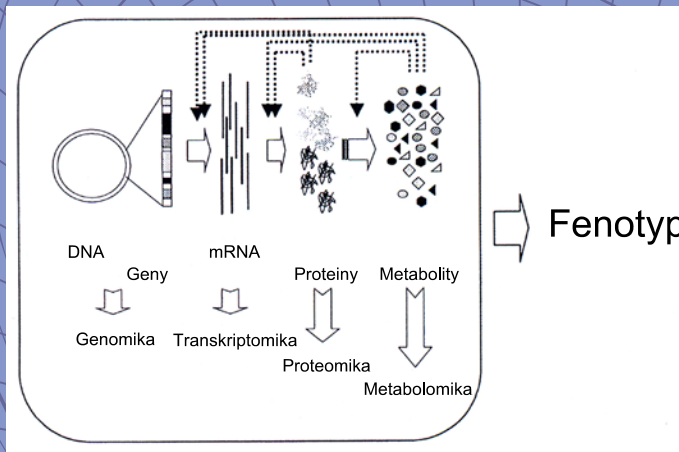


Fluorescenční detekce



Quo vadis Glatz^{CE} ?

Využití CE v metabolomice – systémová biologie
mikrobiální, rostlinná a živočišná metabolomika



„Metabolome Targeting”

Quo vadis Glatz^{CE} ?

Využití CE v metabolomice - biomarkery

Metabolomika v asistované reprodukci

