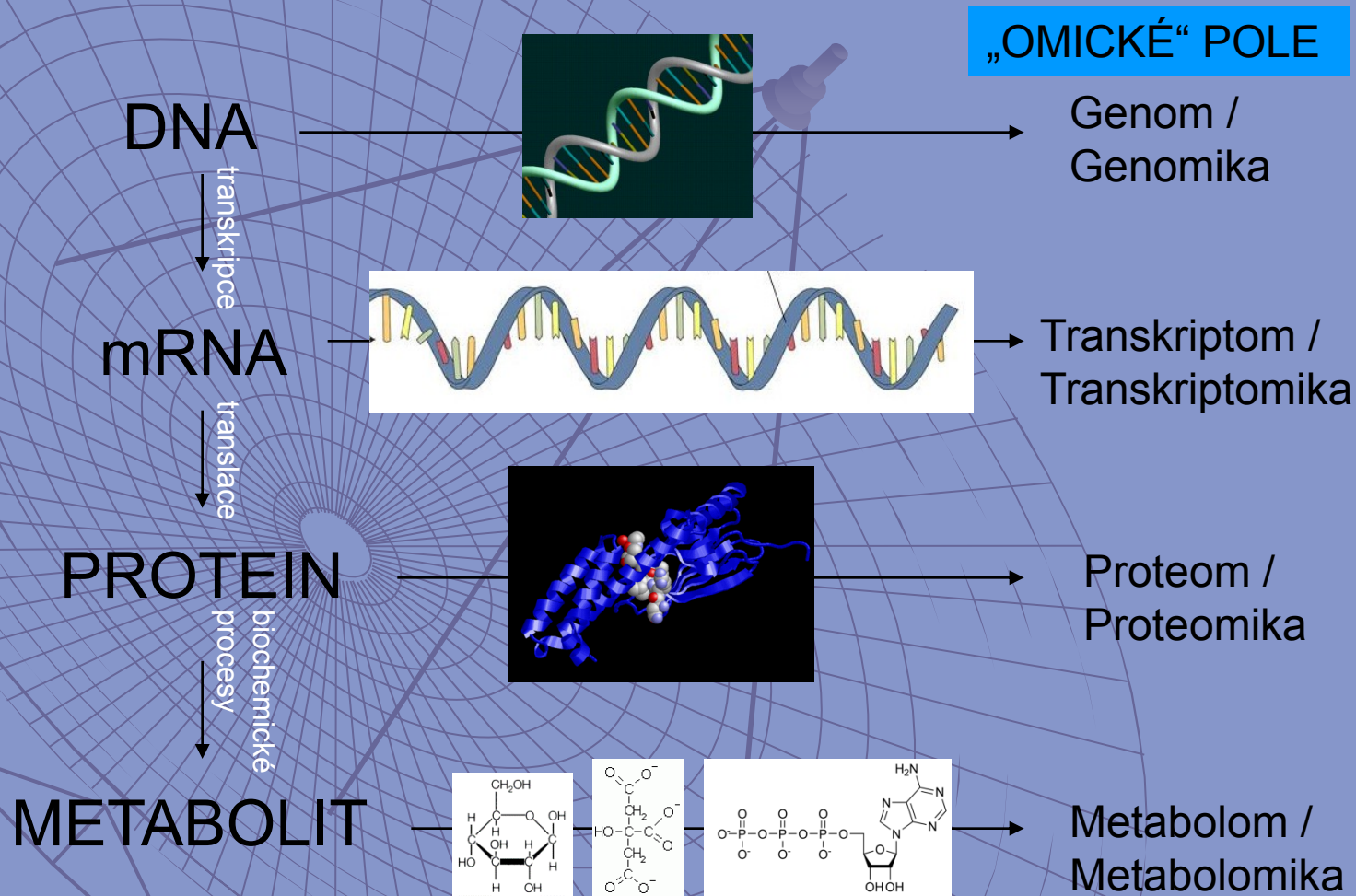


Role metabolomiky v systémové biologii

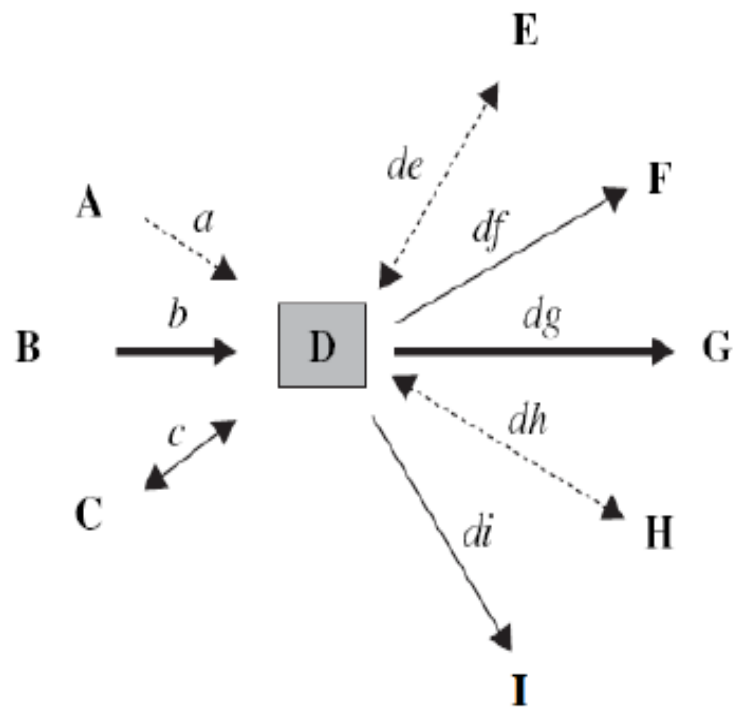
Studium procesů probíhajících v živých organismech



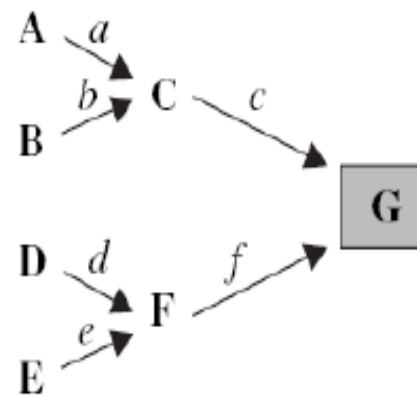
Důležité pojmy

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



Primární metabolismus



Sekundární metabolismus

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 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

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)**

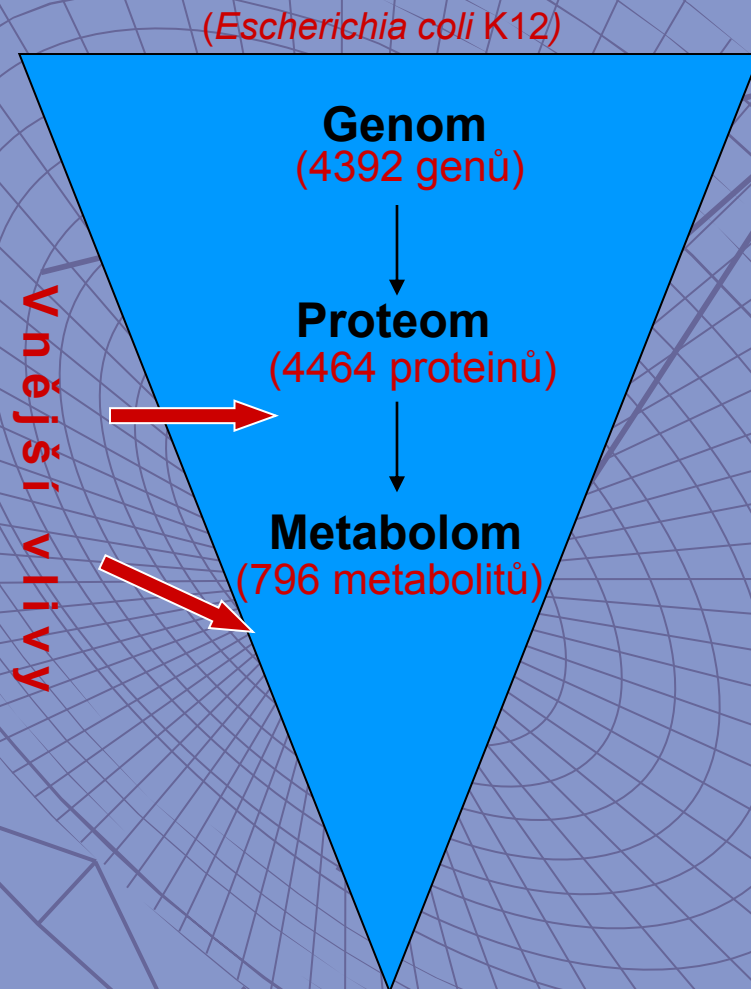
- kvalitativní i kvantitativní analýza vybraných metabolitů související se specifickou metabolickou reakcí
- používána zejména když jsou požadovány nízké limity detekce

Strategie pro výzkum metabolomiky

◆ **METABONOMIKA (metabonomics)**

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

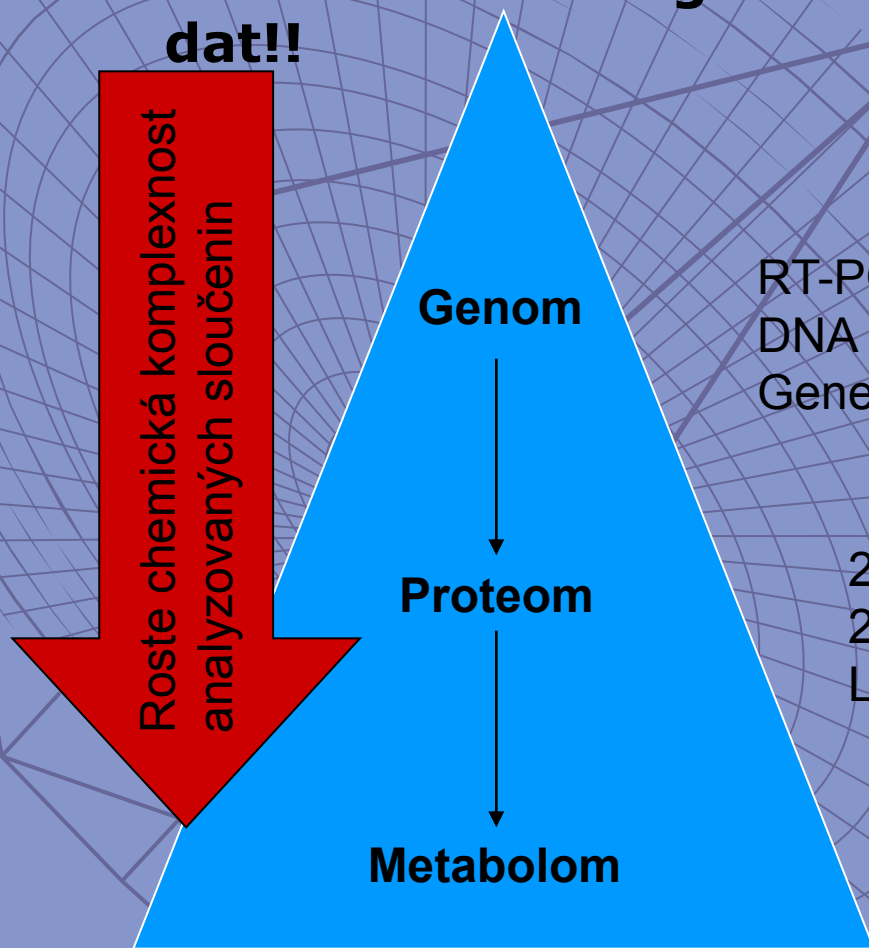
Proč se zabývat metabolomikou?



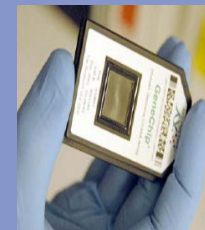
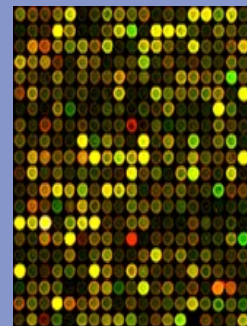
- ◆ Počet metabolitů v buňce může být až řádově nižší než počet genů a proteinů.
- ◆ Metabolom – nejnižší linie genové exprese - přímo odráží funkční úroveň buňky.
- ◆ Změny metabolitů v buňce nejsou regulovány pouze genovou expresí, ale i vlivy životního prostředí.
- ◆ Kvantifikace metabolitů nabízí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

Nevýhoda oproti jiným omickým přístupům

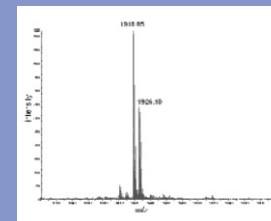
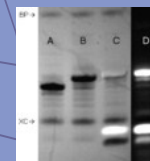
- ◆ **Obtížné technologie – obtížné měření, dostupnost dat!!**



RT-PCR,
DNA Microarrays,
Gene Chips



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



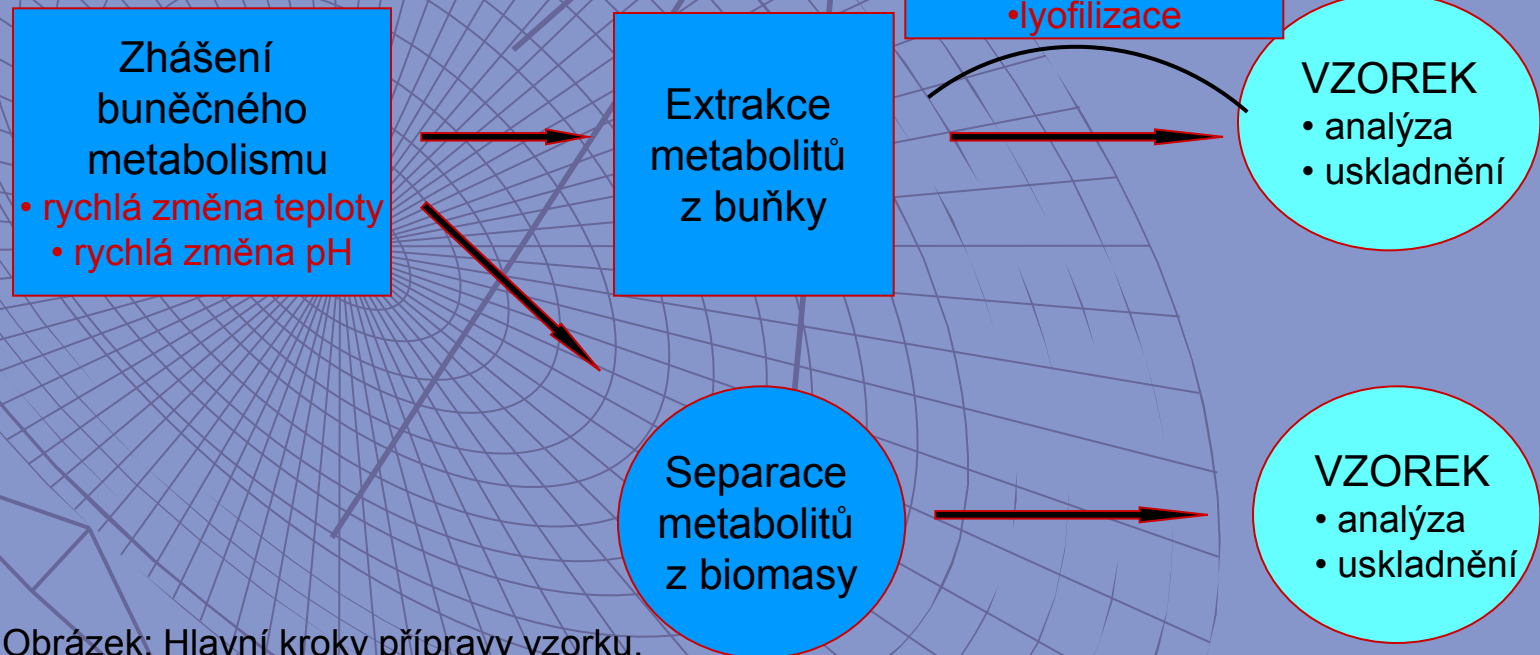
NMR, MS
GC-MS, LC-MS, CE-MS

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



Obrázek: Hlavní kroky přípravy vzorku.

Příprava vzorku

Extrakce metabolitů z biologického vzorku

- Biologické vzorky obsahují tři hlavní třídy metabolitů:
 - metabolity rozpustné ve vodě
 - metabolity nerozpustné ve vodě
 - těkavé metabolity
- všechny tři třídy metabolitů mohou být nalezeny intra- i extracelulárně

1) Extracelulární metabolity

- zisk z extracelulárních médií
 - ◆ Zachycení na koloně
 - ◆ Odpaření rozpouštědla – rozpuštění ve vhodném rozpouštědle
 - ◆ Pokud vzorky těkavé – přímá analýza GC

Příprava vzorku

2) Intracelulární metabolity

- 2 cesty narušení buněčných stěn:
 - ◆ Nemechanické
 - Enzymatické – enzymy
 - Fyzikální – osmotický, teplotní šok
 - Chemické – chemická činidla:
 - ◆ Kyselá extrakce – HClO_4 , HCl , CCl_3COOH ,...
 - ◆ Bazická extrakce – NaOH , KOH
 - ◆ Organickými rozpouštědly – CH_3OH , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, CHCl_3
 - ◆ Mechanické
 - Ultrasonikace
 - Superkritická fluidní extrakce (SFE)
 - French Press

