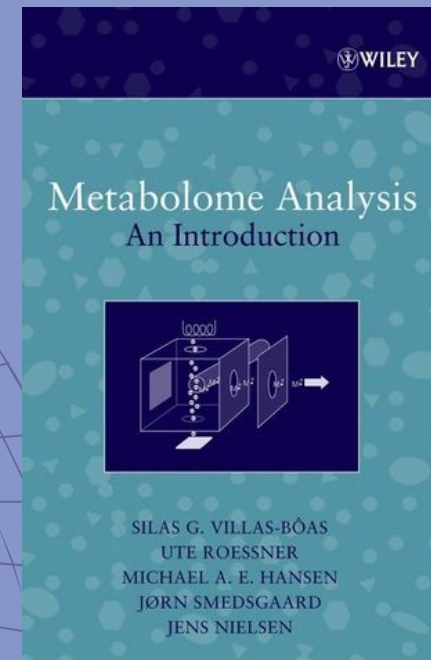
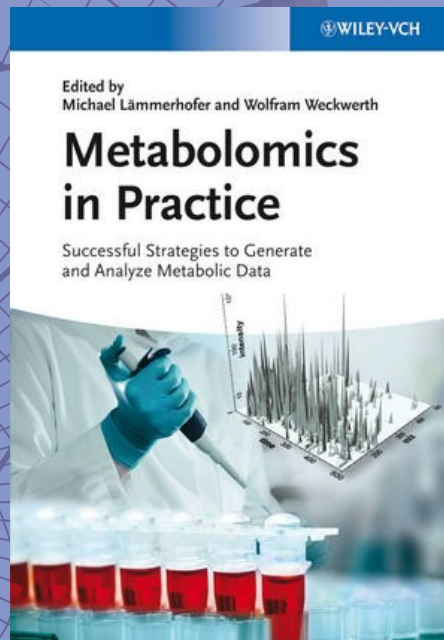
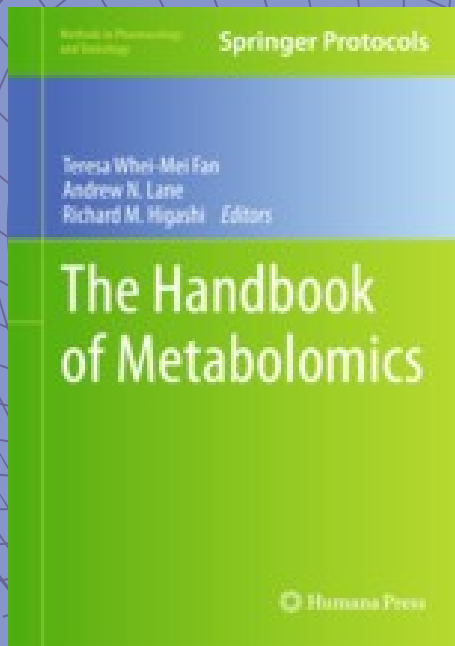
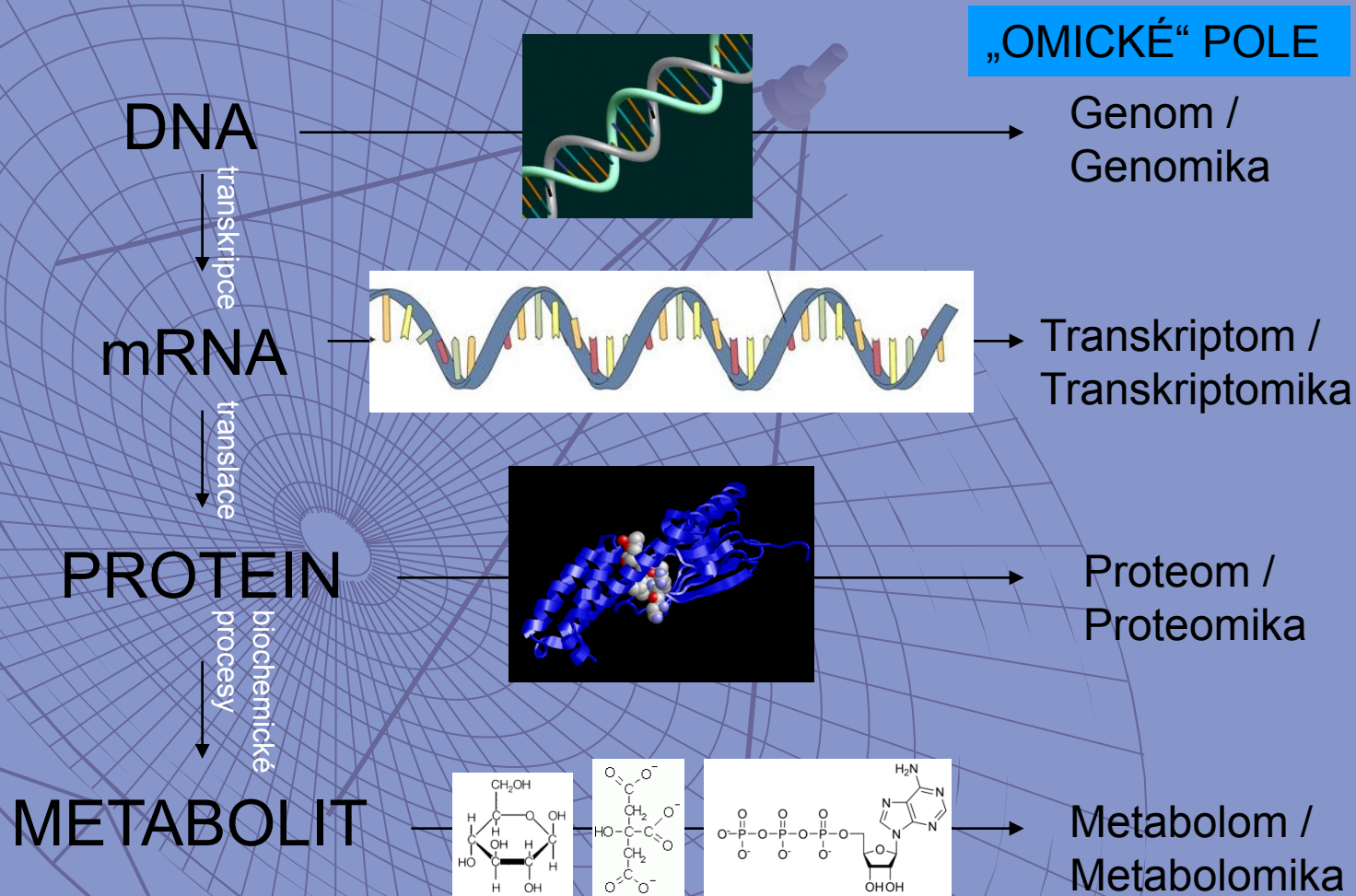


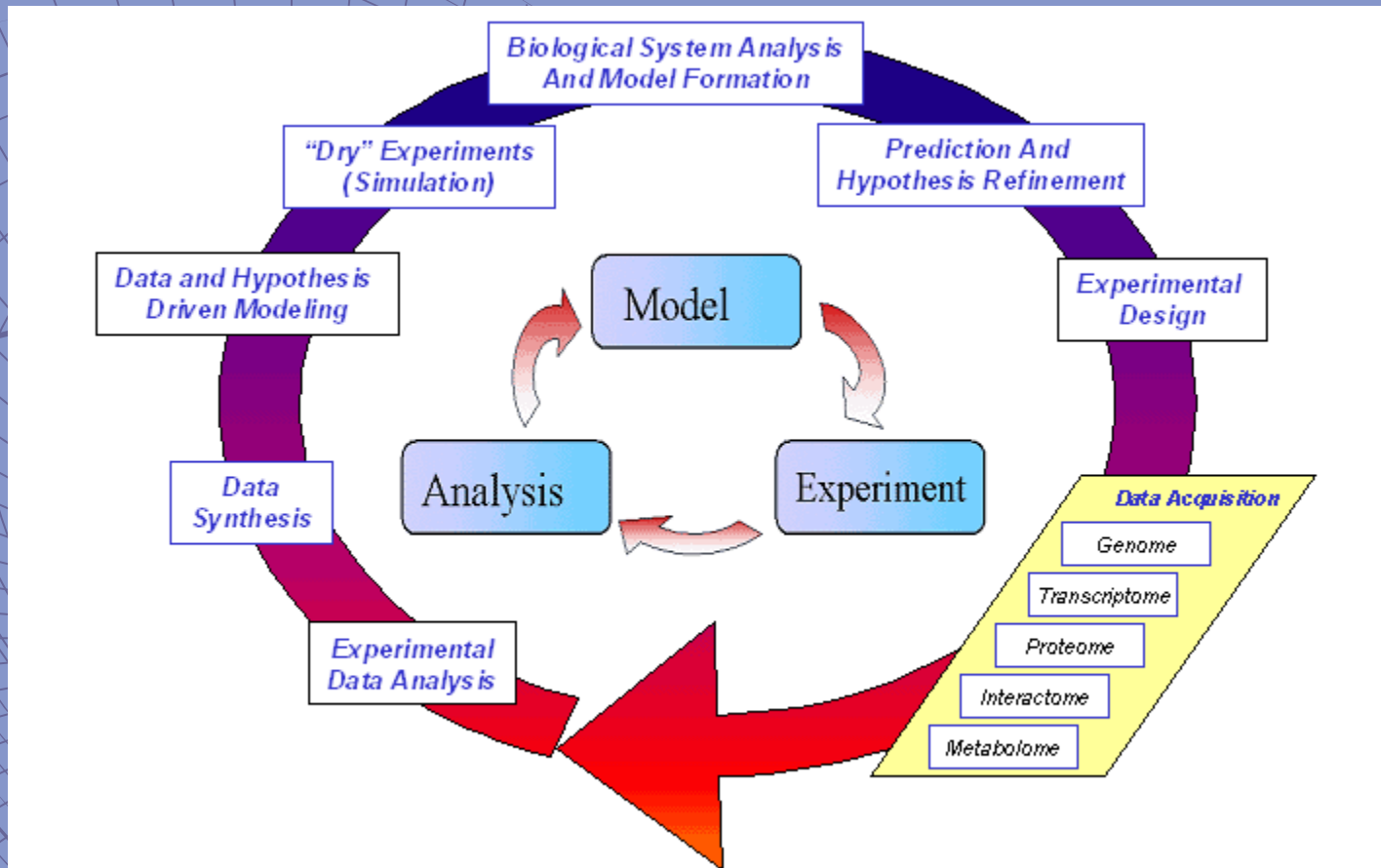
**Metabolomika a
její role v systémové
biologii**



Studium procesů probíhajících v živých organismech



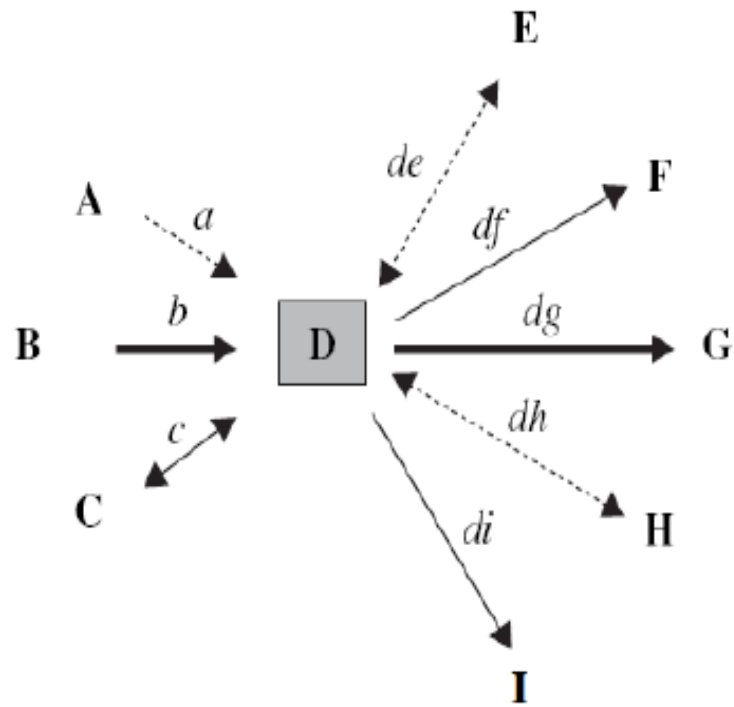
Systemová biologie



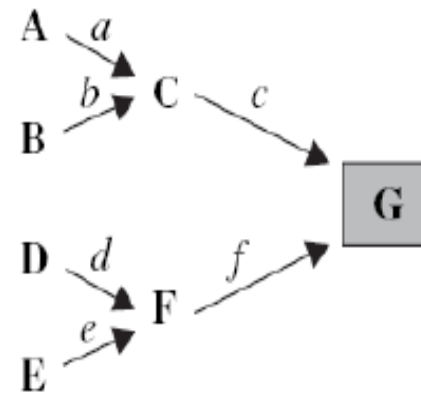
Důležité pojmy

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



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

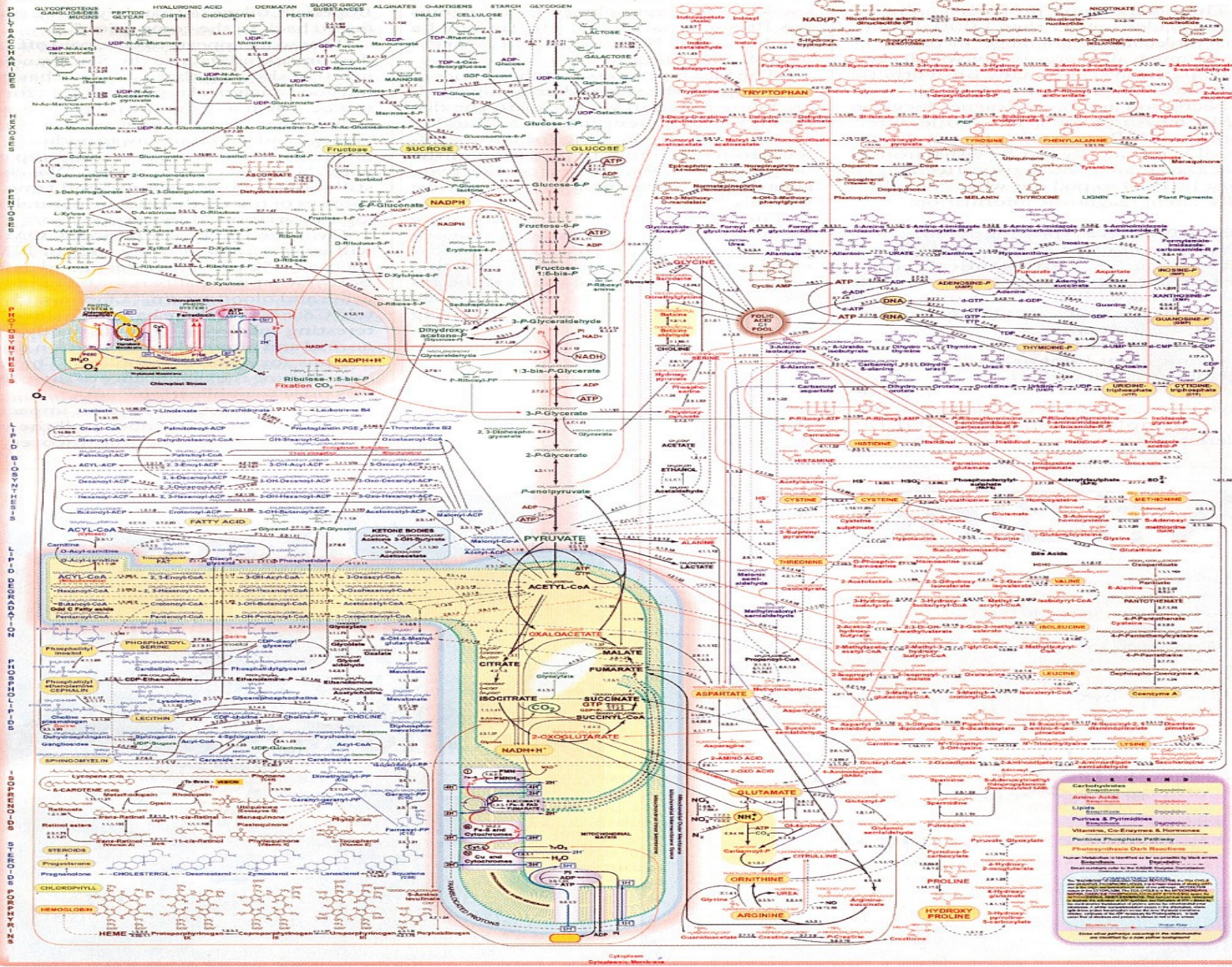
METABOLOM

- ◆ 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



LEADS TO

- Carbohydrates**: Glucose, Fructose, Galactose, Maltose, Sucrose, Lactose, Polysaccharides
- Amino Acids**: Alanine, Glycine, Serine, Cysteine, Methionine, Valine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Arginine, Ornithine, Proline, Hydroxyproline
- Nucleotides**: Adenine, Guanine, Cytosine, Uracil, Thymine, Adenine, Guanine, Cytosine, Uracil, Thymine, Adenine, Guanine, Cytosine, Uracil, Thymine
- Lipids**: Fatty acids, Glycerol, Phospholipids, Steroids, Cholesterol, Steroids
- Other**: Heme, Chlorophyll, Hemoglobin

Some reactions are indicated by the color of the arrows and others by a color-coded label.

82-842903 8D-02B-4 8D-02B310 8D-02B311 20-00392 00-01 8D-02B312 8D-02B313 8D-02B314 8D-02B315 8D-02B316 8D-02B317 8D-02B318 8D-02B319 8D-02B320 8D-02B321 8D-02B322 8D-02B323 8D-02B324 8D-02B325 8D-02B326 8D-02B327 8D-02B328 8D-02B329 8D-02B330 8D-02B331 8D-02B332 8D-02B333 8D-02B334 8D-02B335 8D-02B336 8D-02B337 8D-02B338 8D-02B339 8D-02B340 8D-02B341 8D-02B342 8D-02B343 8D-02B344 8D-02B345 8D-02B346 8D-02B347 8D-02B348 8D-02B349 8D-02B350 8D-02B351 8D-02B352 8D-02B353 8D-02B354 8D-02B355 8D-02B356 8D-02B357 8D-02B358 8D-02B359 8D-02B360 8D-02B361 8D-02B362 8D-02B363 8D-02B364 8D-02B365 8D-02B366 8D-02B367 8D-02B368 8D-02B369 8D-02B370 8D-02B371 8D-02B372 8D-02B373 8D-02B374 8D-02B375 8D-02B376 8D-02B377 8D-02B378 8D-02B379 8D-02B380 8D-02B381 8D-02B382 8D-02B383 8D-02B384 8D-02B385 8D-02B386 8D-02B387 8D-02B388 8D-02B389 8D-02B390 8D-02B391 8D-02B392 8D-02B393 8D-02B394 8D-02B395 8D-02B396 8D-02B397 8D-02B398 8D-02B399 8D-02B400

82-842903 8D-02B-4 8D-02B310 8D-02B311 20-00392 00-01 8D-02B312 8D-02B313 8D-02B314 8D-02B315 8D-02B316 8D-02B317 8D-02B318 8D-02B319 8D-02B320 8D-02B321 8D-02B322 8D-02B323 8D-02B324 8D-02B325 8D-02B326 8D-02B327 8D-02B328 8D-02B329 8D-02B330 8D-02B331 8D-02B332 8D-02B333 8D-02B334 8D-02B335 8D-02B336 8D-02B337 8D-02B338 8D-02B339 8D-02B340 8D-02B341 8D-02B342 8D-02B343 8D-02B344 8D-02B345 8D-02B346 8D-02B347 8D-02B348 8D-02B349 8D-02B350 8D-02B351 8D-02B352 8D-02B353 8D-02B354 8D-02B355 8D-02B356 8D-02B357 8D-02B358 8D-02B359 8D-02B360 8D-02B361 8D-02B362 8D-02B363 8D-02B364 8D-02B365 8D-02B366 8D-02B367 8D-02B368 8D-02B369 8D-02B370 8D-02B371 8D-02B372 8D-02B373 8D-02B374 8D-02B375 8D-02B376 8D-02B377 8D-02B378 8D-02B379 8D-02B380 8D-02B381 8D-02B382 8D-02B383 8D-02B384 8D-02B385 8D-02B386 8D-02B387 8D-02B388 8D-02B389 8D-02B390 8D-02B391 8D-02B392 8D-02B393 8D-02B394 8D-02B395 8D-02B396 8D-02B397 8D-02B398 8D-02B399 8D-02B400

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)**

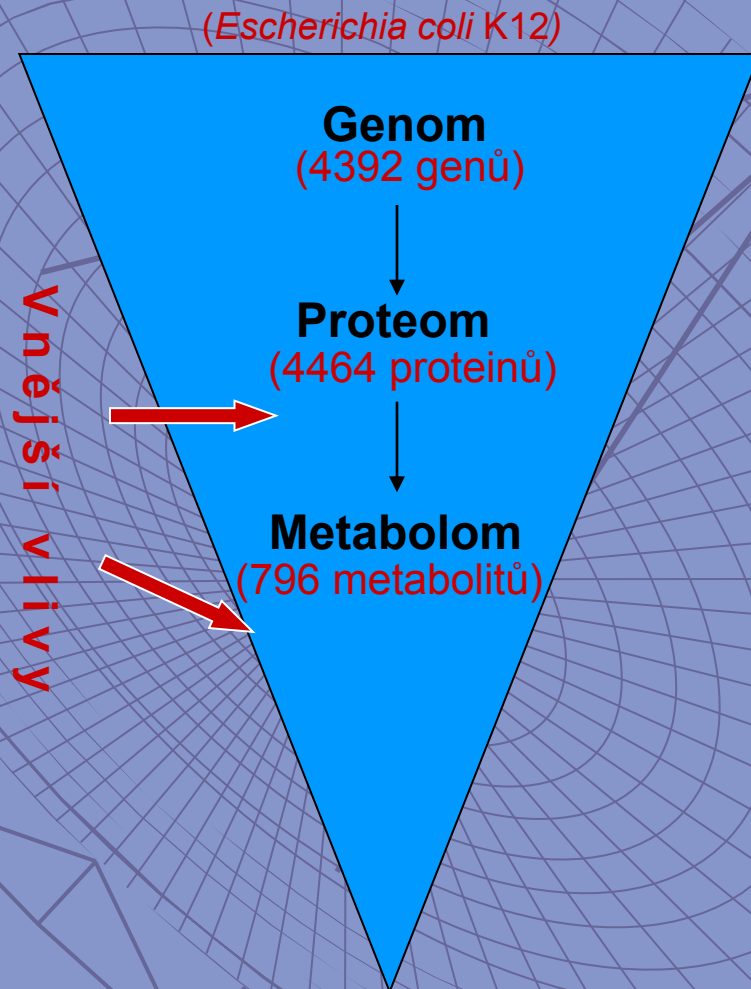
- kvalitativní i kvantitativní analýza vybraných metabolitů související se specifickou metabolickou reakcí
- používána zejména když jsou požadovány nízké limity detekce

Strategie pro výzkum metabolomiky

◆ **METABONOMIKA (metabonomics)**

- komplexní metabolické studie zejména v toxikologii, 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.

Nevýhoda oproti jiným omickým přístupům

Metabolity

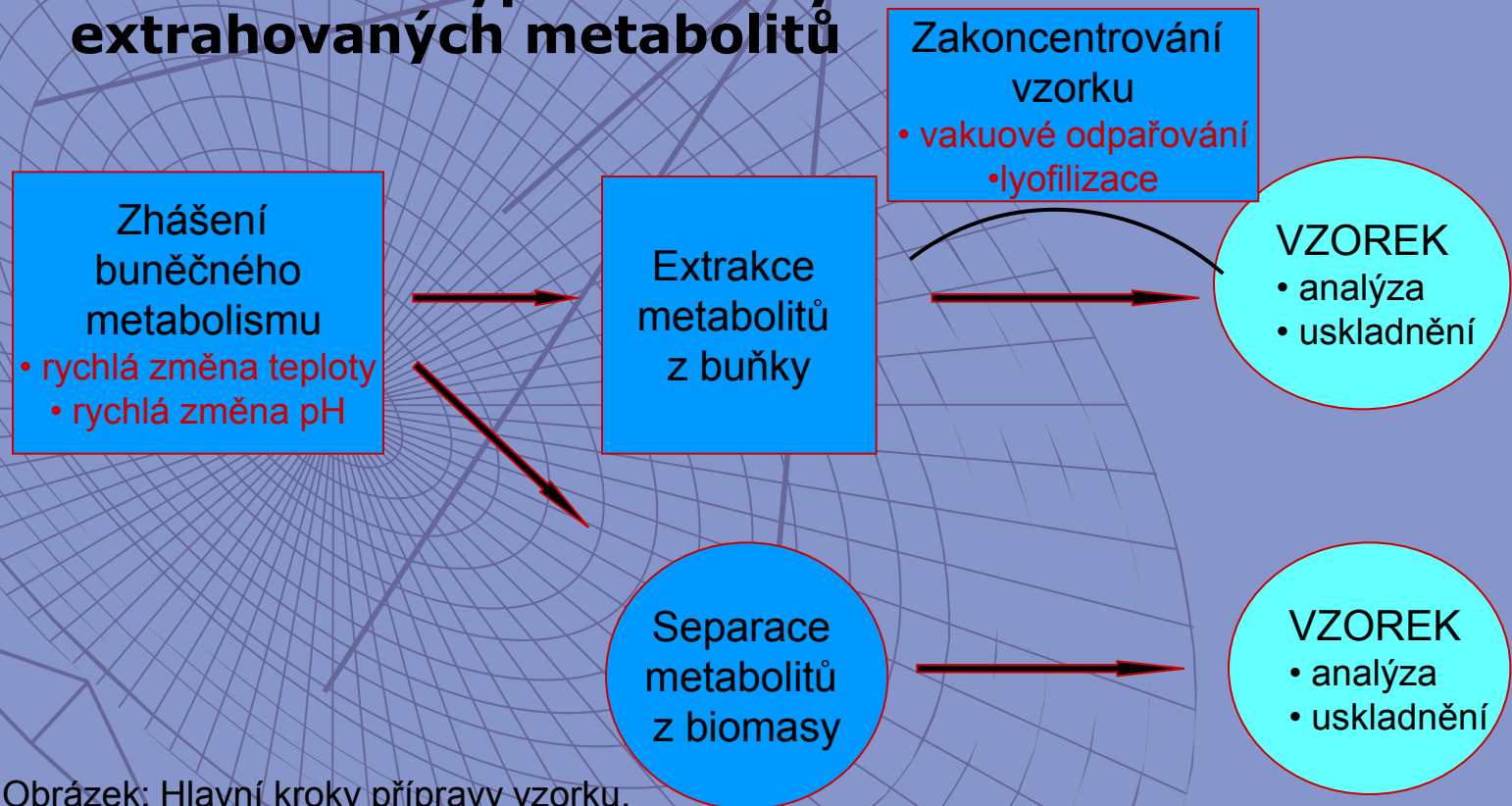
- fyzikálně chemické rozmanitost
- Koncentrační diverzita

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

- získání 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

Analytické metody

