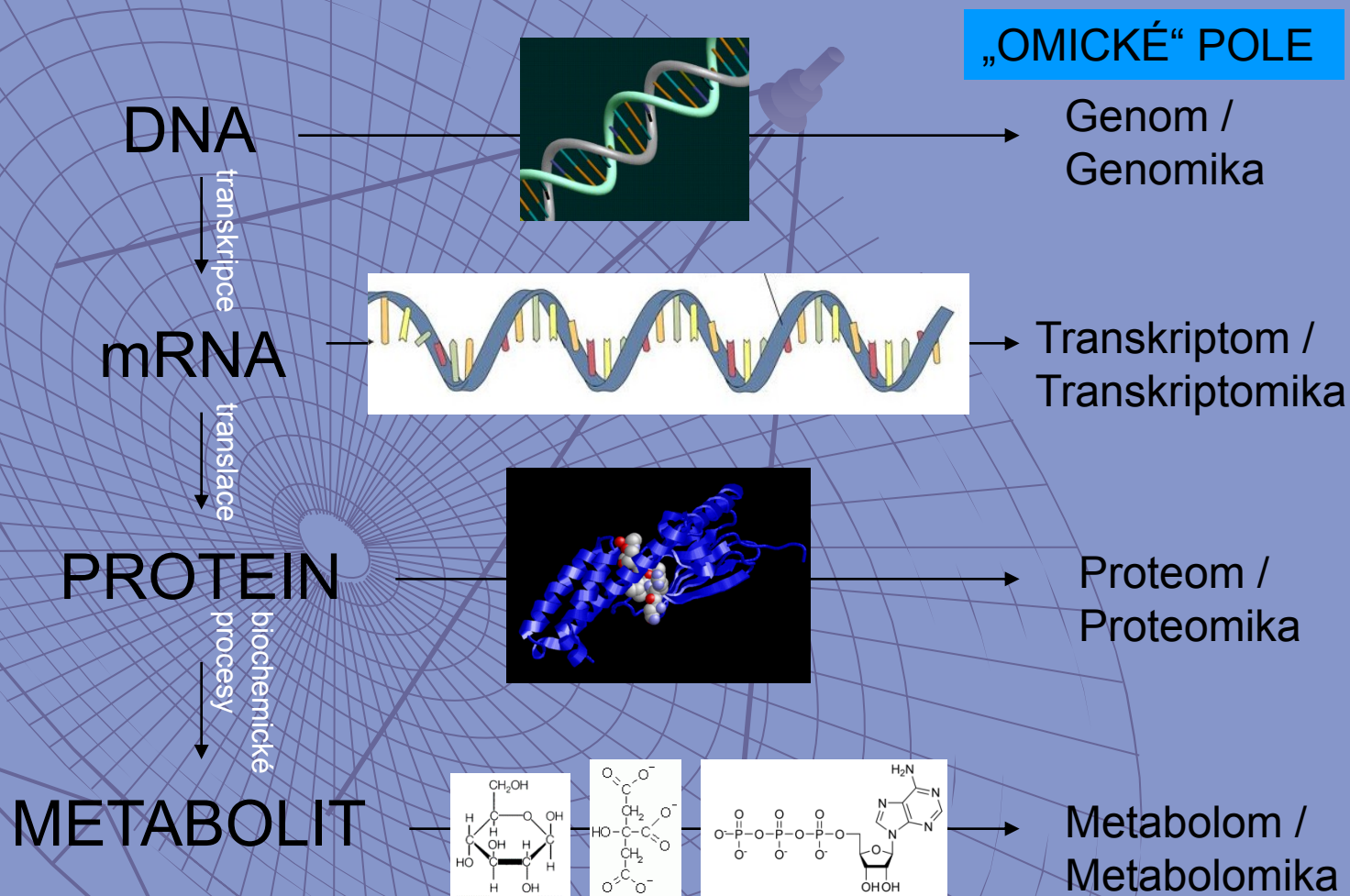
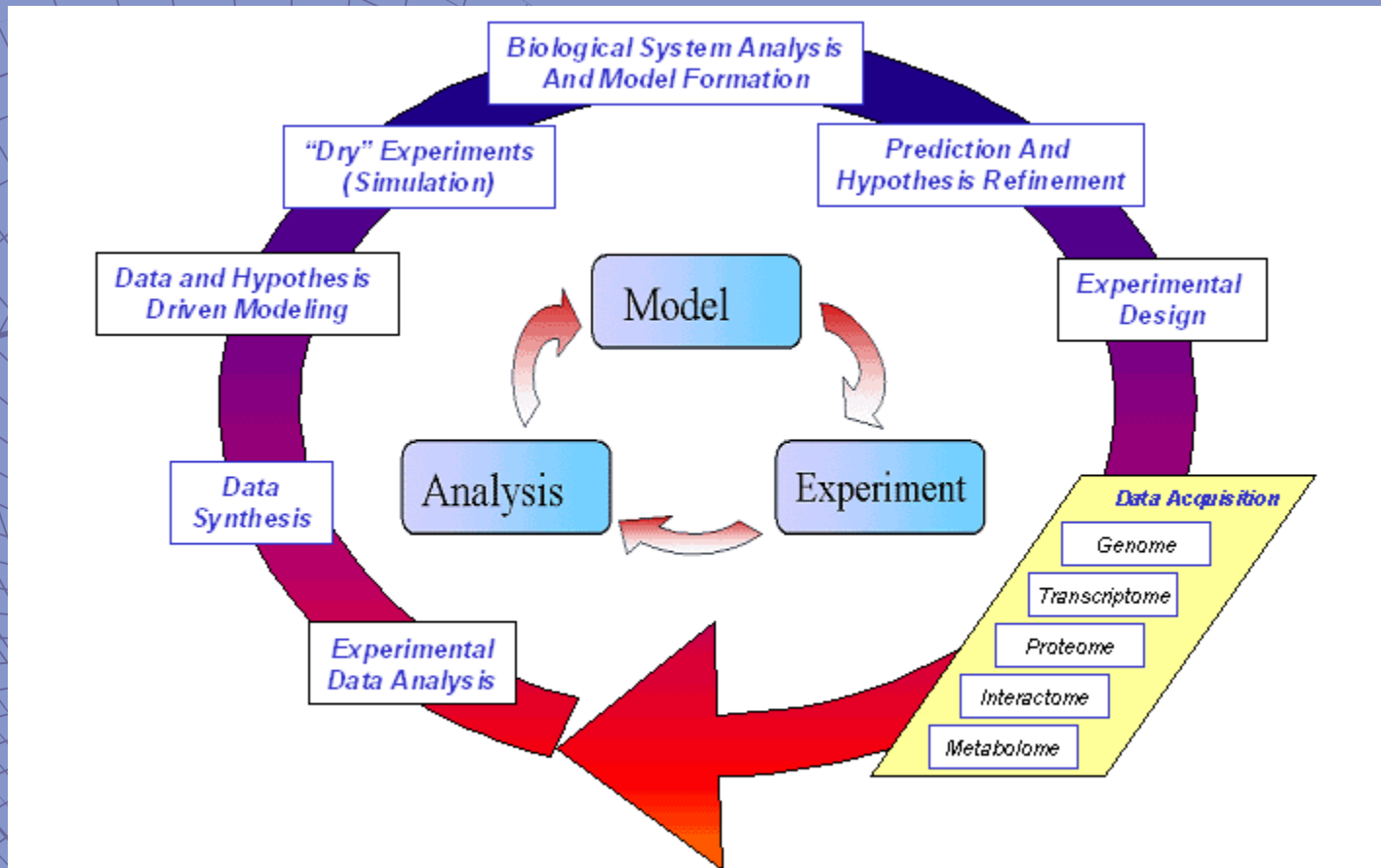


**Metabolomika a  
její role v systémové  
biologii**

# Studium procesů probíhajících v živých organismech



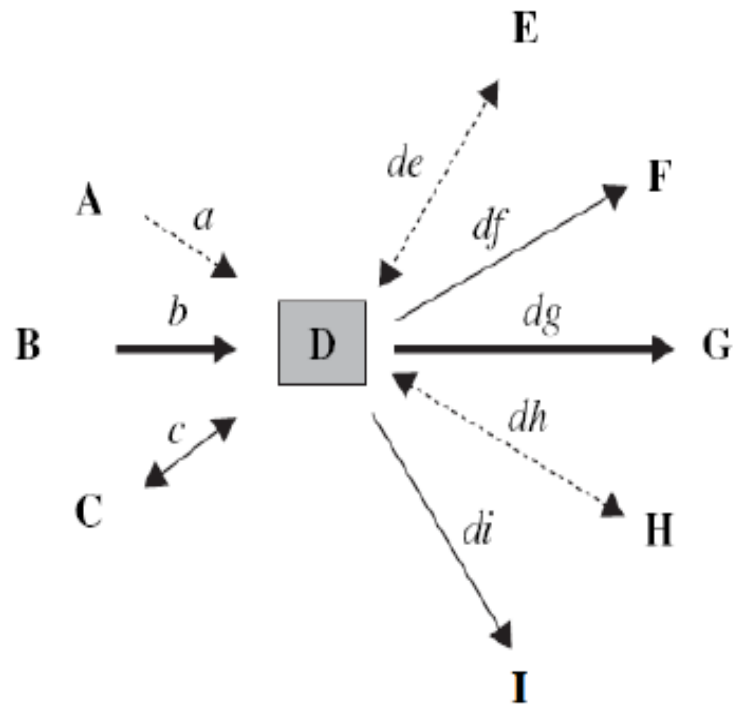
# Systemová biologie



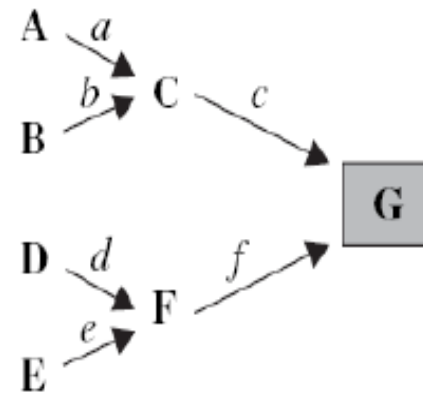
# Důležité pojmy

## **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 <sup>+</sup> , 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)**

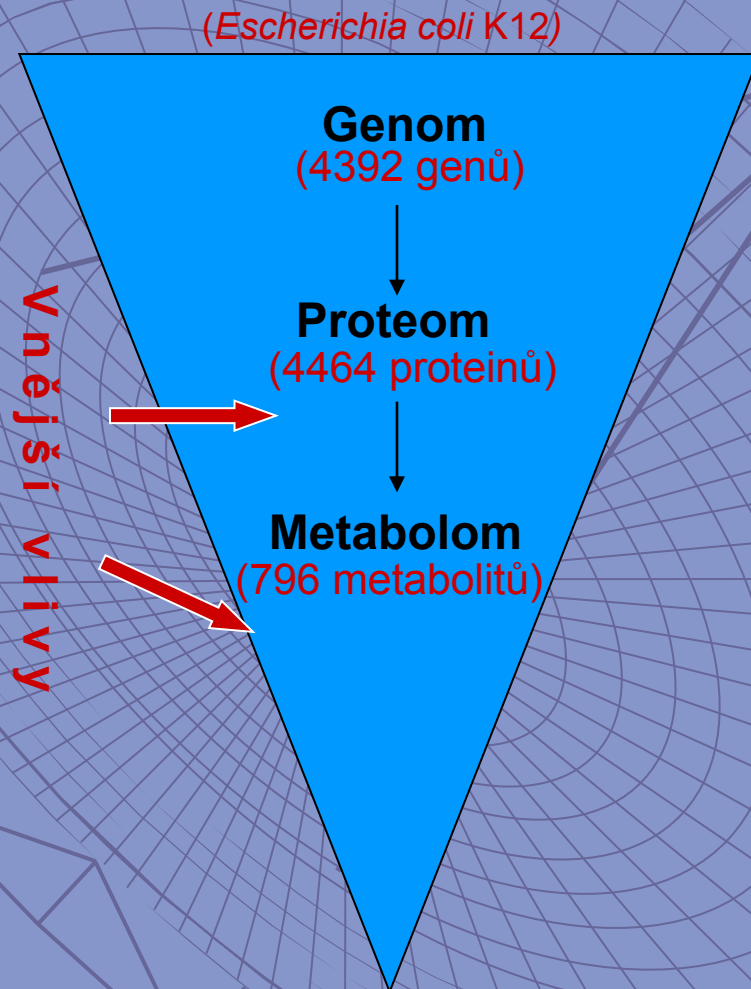
- kvalitativní i kvantitativní analýza vybraných metabolitů související se specifickou metabolickou reakcí
- používána zejména když jsou požadovány nízké limity detekce

# 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

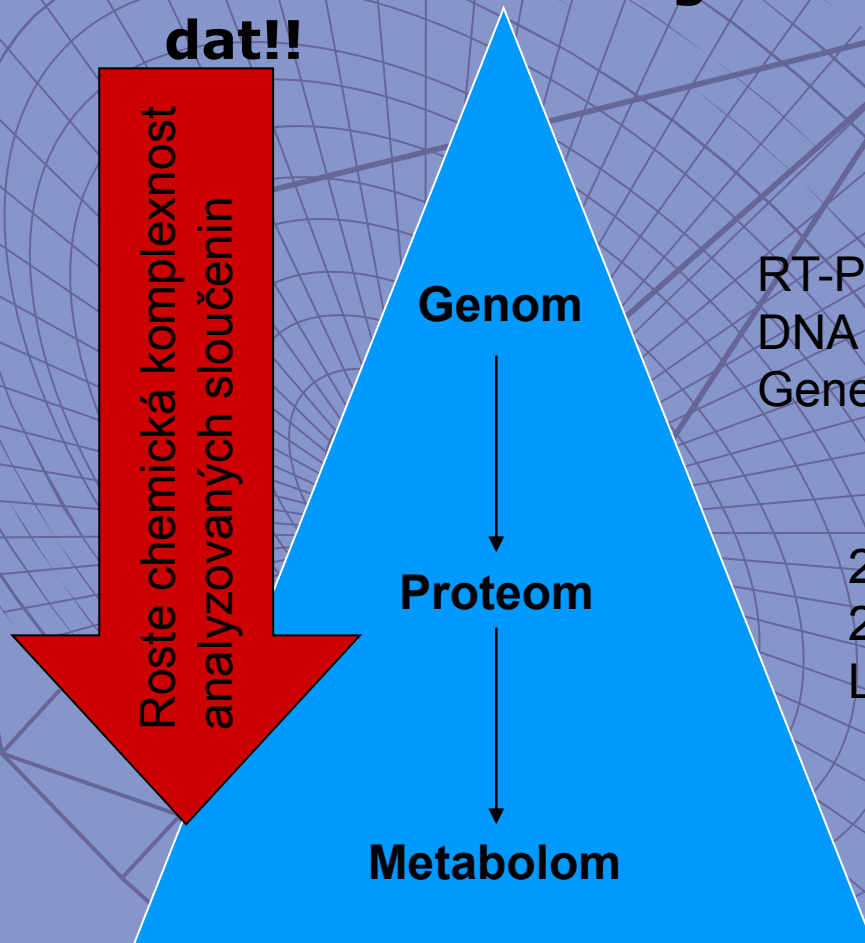
# Proč se zabývat metabolomikou?



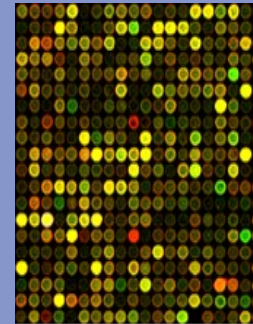
- ◆ Počet metabolitů v buňce může být až řádově nižší než počet genů a proteinů.
- ◆ Metabolom – nejnižší linie genové exprese - přímo odráží funkční úroveň buňky.
- ◆ Změny metabolitů v buňce nejsou regulovány pouze genovou expresí, ale i vlivy životního prostředí.
- ◆ Kvantifikace metabolitů nabízí 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

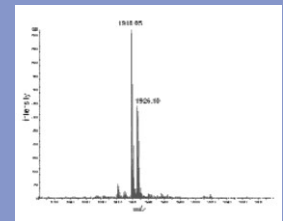
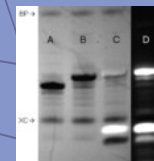
- ◆ **Obtížné technologie – obtížné měření, dostupnost dat!!**



RT-PCR,  
DNA Microarrays,  
Gene Chips



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



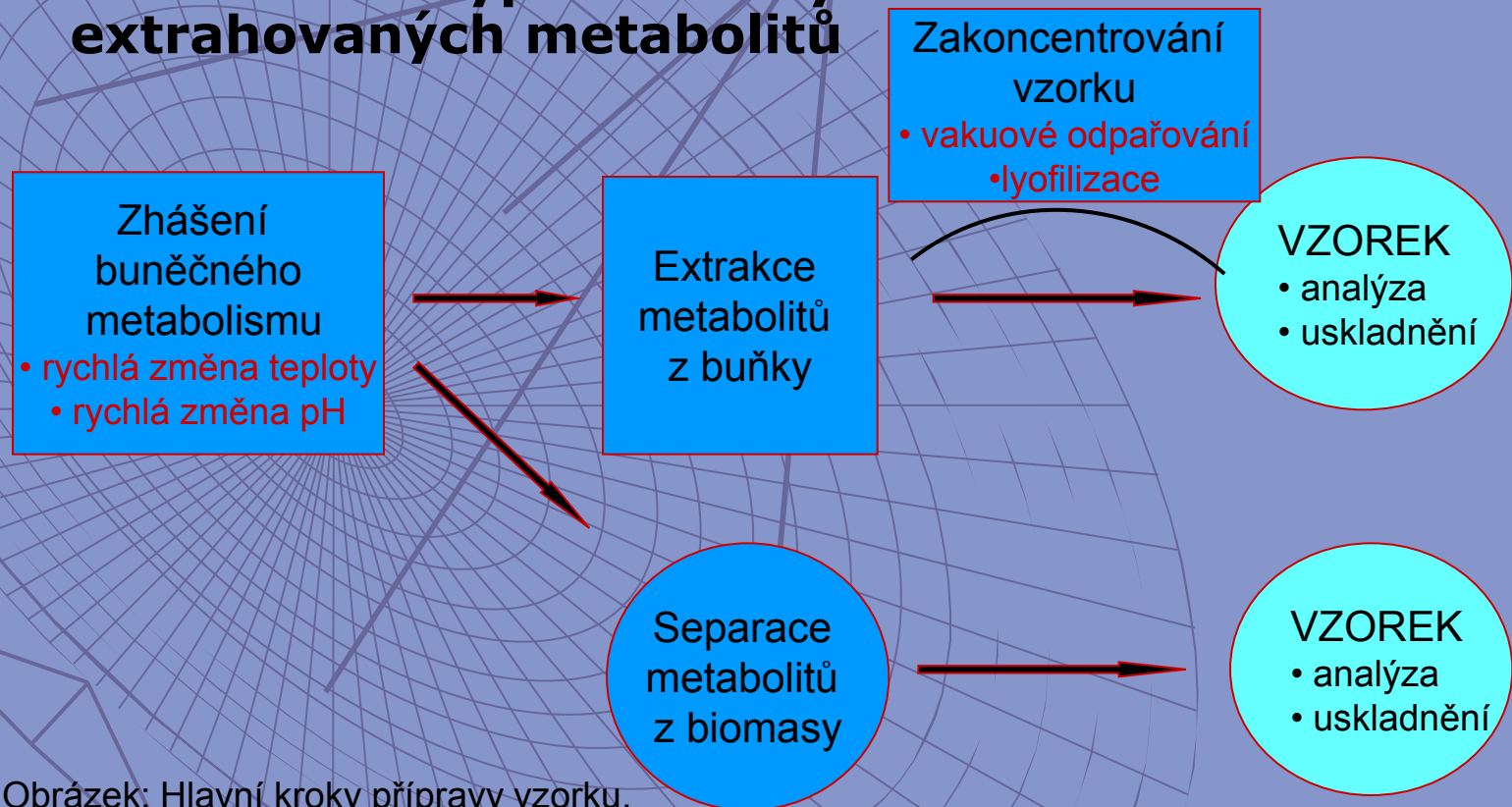
NMR, MS  
GC-MS, LC-MS, CE-MS

# 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 –  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ,...
      - ◆ Bazická extrakce –  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$
      - ◆ Organickými rozpouštědly –  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ,  $\text{CHCl}_3$
  - ◆ Mechanické
    - Ultrasonikace
    - Superkritická fluidní extrakce (SFE)
    - French Press

# Analytické metody

