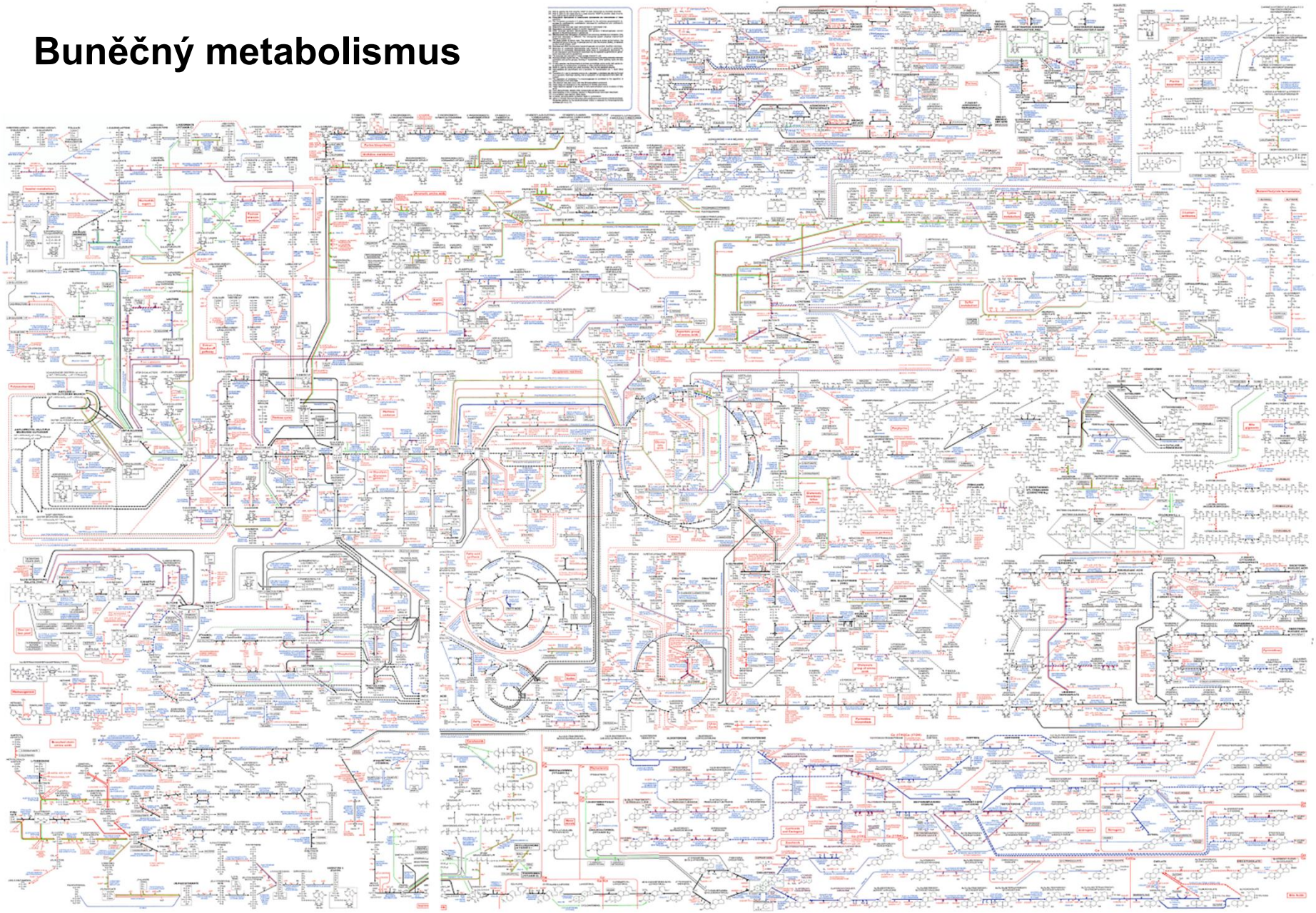
Fyziologie buň. systému

Buněčný metabolismus a jeho adaptace

Jan Vondráček

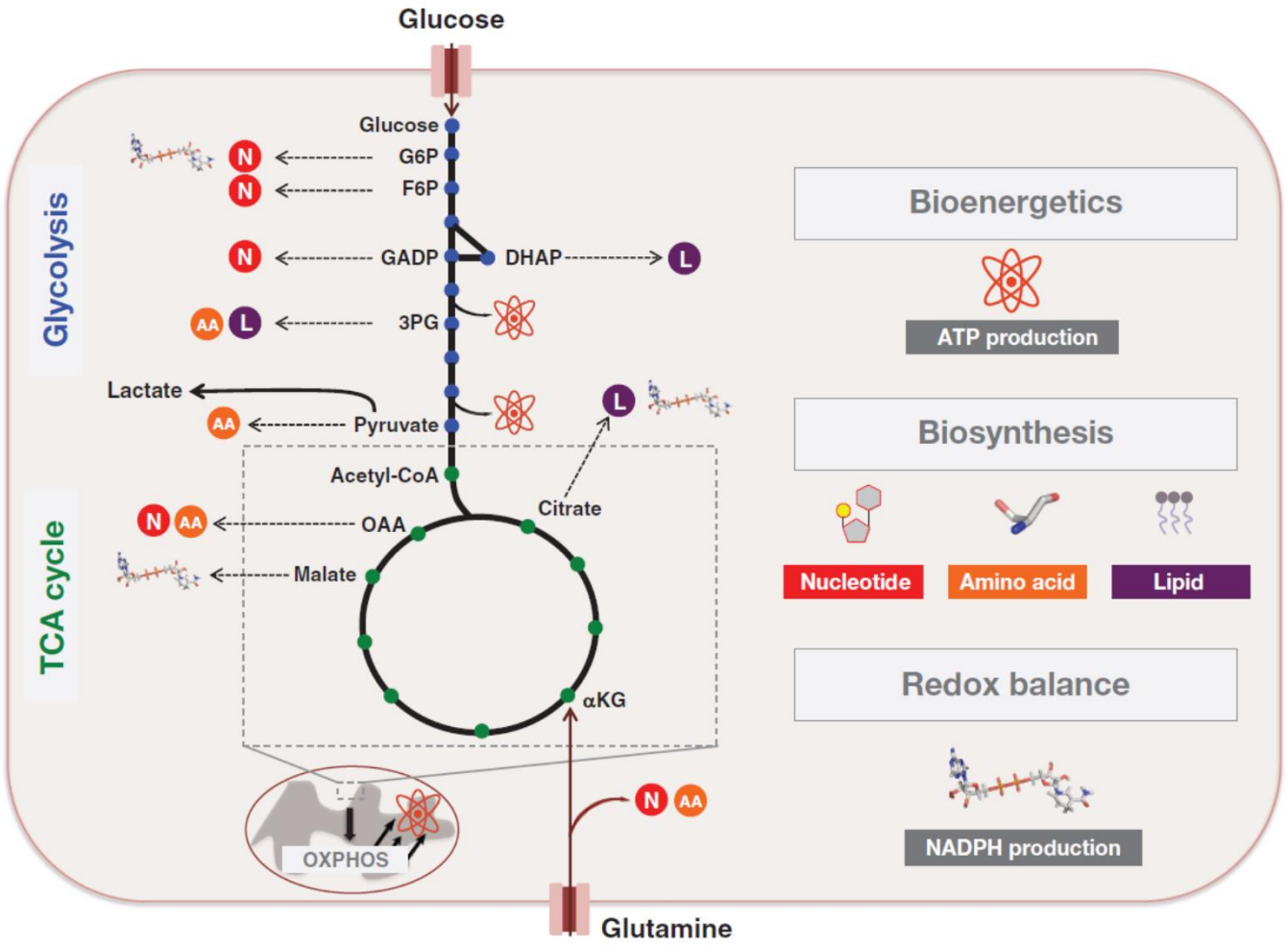
Buněčný metabolismus



Adaptace buněčného metabolismu

- buňky v těle se **rychle metabolicky adaptují na okolní prostředí** – např. změny hladiny kyslíku, hypoxie, zdroje živin **a zároveň na potřeby organismu – specifické signální dráhy**;
- **buněčná proliferace a diferenciace** významným způsobem určuje typ buněčného metabolismu;
- patologické stavy – např. **nádorová transformace** - buněk vedou k **unikátním adaptacím buněčného metabolismu**;
- **kmenové buňky** jsou adaptovány na prostředí niky (niche) kmenových buněk a zároveň metabolické faktory mohou ovlivňovat jejich kmenovost (stemness) a diferenciaci;

Hepatocyt jako příklad diferencované buňky s velmi intenzívním metabolismem



Cancer Discov., 2: 881–98.

Hepatocyt jako příklad diferencované buňky s velmi intenzívním metabolismem

- řada biochemických principů – vznikla na základě studia metabolismu hepatocytů – vynikající model;
- játra slouží jako **zprostředkovatel přenosu látek a energie mezi dietárními zdroji a ostatními orgány v těle**;
- v poměru ke své velikosti spotřebovávají největší množství O_2 – 20 – 30% přijatého O_2 je spotřebováno v játrech – velmi **intenzívní energetický metabolismus**;
- **hepatocyt – příklad diferencované buňky v dospělém organismu, která většinu energie získává díky aktivitě mitochondrií – oxidativní fosforylace**;
- buňka musí zajistit dostatek energie a udržovat redoxní rovnováhu;

Hepatocyt jako příklad diferencované buňky s velmi intenzívním metabolismem

To vše je spojeno s významnou úlohou jaterních buněk v:

- metabolismu cukrů (**tvorba a odbourávání glykogenu, glukoneogeneze**);
- metabolismu tuků (**β-oxidace mastných kyselin, tvorba lipoproteinů, přeměna živin na mastné kyseliny a triglyceridy, syntéza cholesterolu a fosfolipidů**);
- kritická úloha v **deaminaci a transaminaci aminokyselin**, **syntéza neesenciálních aminokyselin** a proteinů krevní plazmy, **tvorba močoviny** – metabolismus dusíkatých sloučenin;
- **tvorba a sekrece žluči**, **odbourávání zplodin metabolismu**, eliminace hemu a bilirubinu, odbourávání řady endogenních látek a xenobiotik;
- to vše jsou procesy **vyžadující energii ve formě ATP, tvorbu** NADPH, apod.;

Základní zdroje energie

- oxidace MK

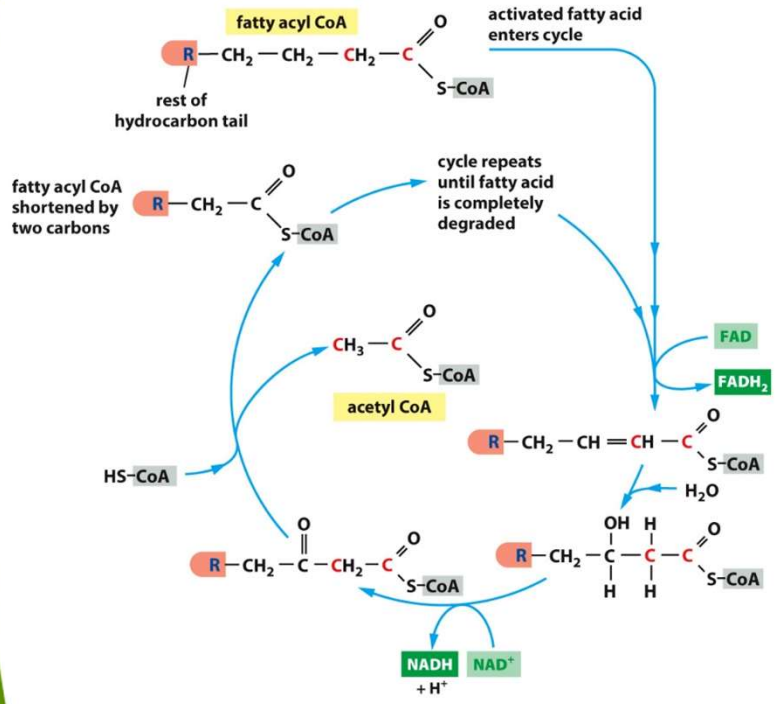


Figure 2-56c Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

>

- glykolýza

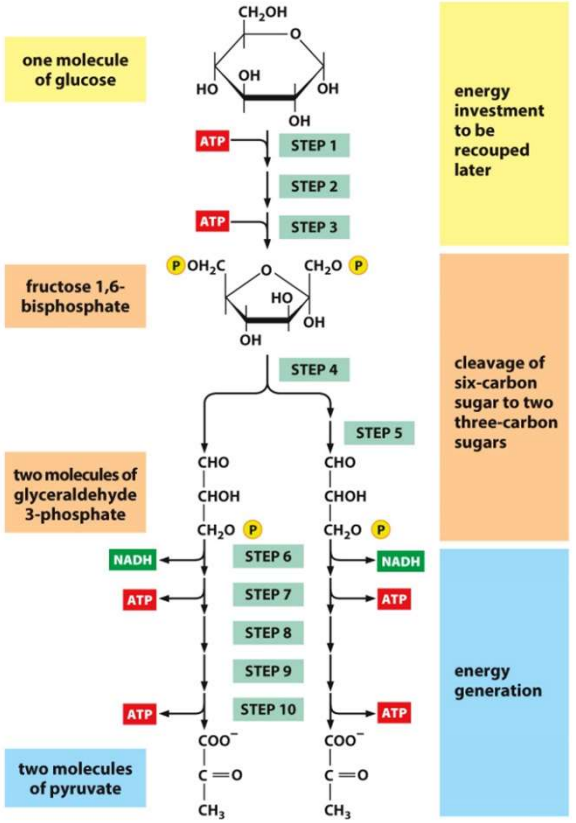


Figure 2-46 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

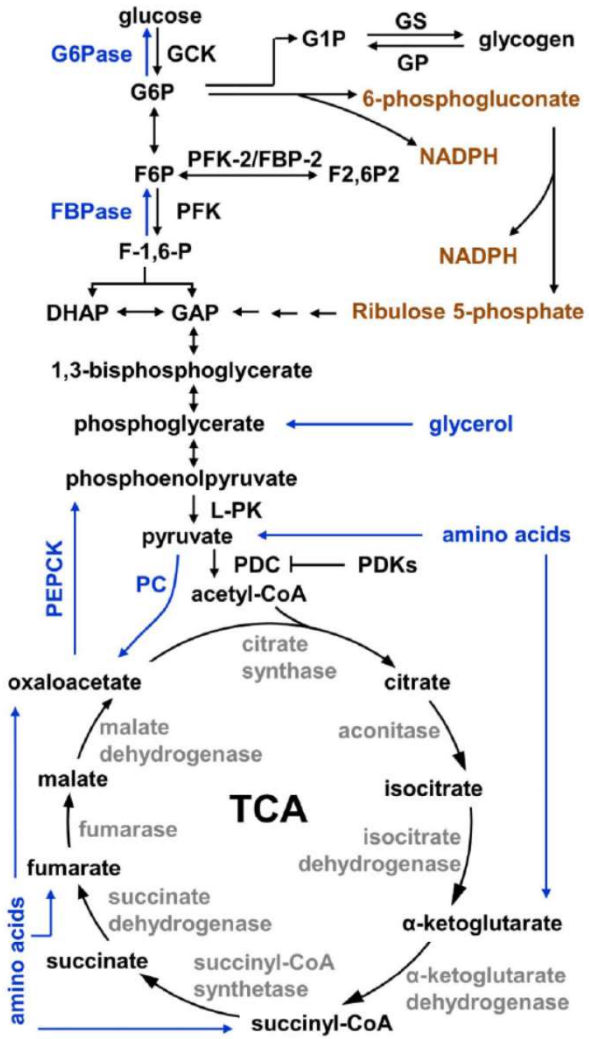
- **za normálních podmínek tvoří hepatocyty většinu ATP prostřednictvím oxidace MK** – mnohem méně pochází z oxidace pyruvátu (vznikajícího buď glykolýzou nebo z laktátu ze svalových a krevních buněk)

Využití energie

- **téměř 50% dostupné energie je využito na aktivní transport** – ionty, substráty a produkty, udržování osmotické rovnováhy, apod.;
- **část je využita k tvorbě zásob** – tvorba glykogenu, syntéza glukózy (glukoneogeneze), syntéza triglyceridů, apod.;
- **syntéza specifických produktů** – lipoproteiny, proteiny krevní plazmy, atd.;

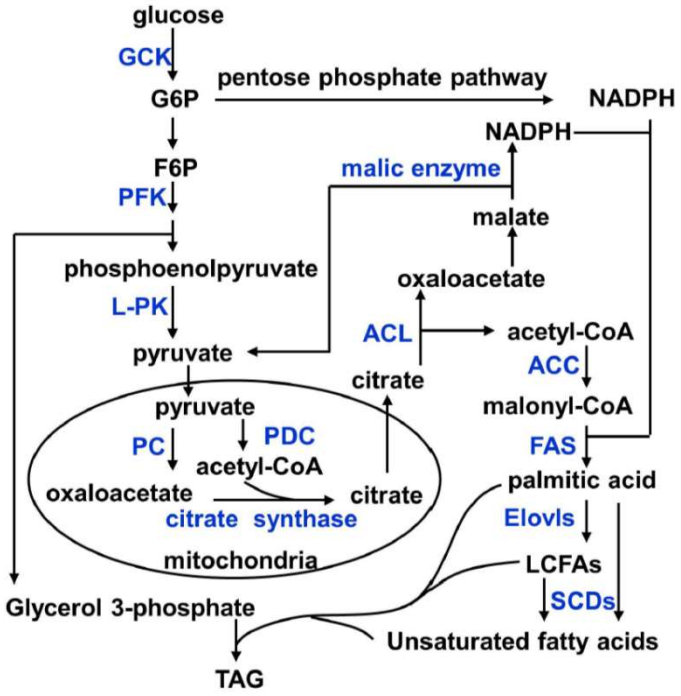
- aktivita metabolických drah v játrech je řízena v rámci celého organismu – **hormonální regulace** (inzulin, glukagon), **nervová regulace**, ale i jako reakce na příjem potravy – dostatek živin v portálním oběhu;

Propojení anabolických a katabolických drah metabolismu v hepatocytu



- glykolýza vs. glukoneogeneze

Compr Physiol.
2014, 4: 177–197.



- lipogeneze

Adaptace metabolismu na základě vnějšího podnětu – potřeby organismu

- **typ metabolické dráhy, která je v daném hepatocytu převážně aktivní**, závisí **na vnějších** (hormony, cytokiny a další regulační molekuly, hladina glukózy, apod.) **i vnitřních faktorech** (transkripční faktory kontrolující diferenciaci hepatocytů a jaterní zonaci);

- rychlá adaptace metabolismu v závislosti na potřebách organismu;

- nicméně stále platí klasické schéma – hepatocyty v podmínkách dostatku kyslíku představují **normální diferencované buňky, které využívají k tvorbě ATP oxidativní fosforylaci**;

ALE!!! Charakter metabolismu v buňkách se rychle adaptuje na změněné podmínky a zároveň ovlivňuje chování buněk

Dr. Otto Warburg (Oct 8, 1883 Aug 1, 1970)

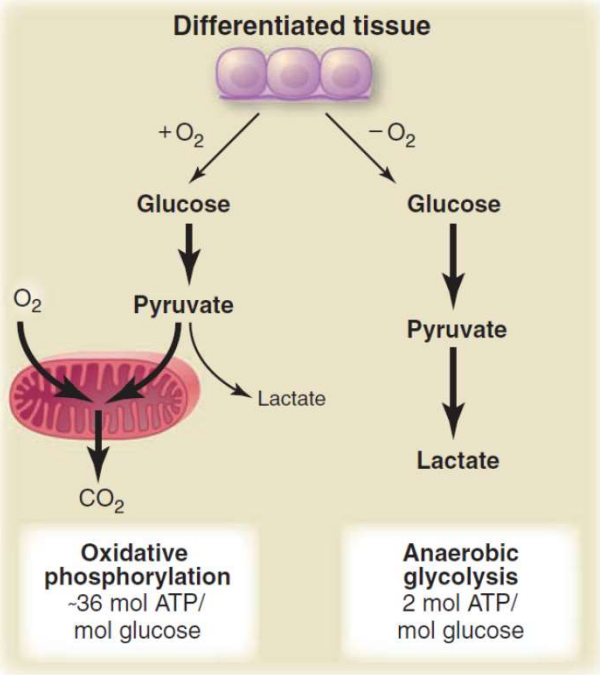
- **1924 – srovnání metabolismu jaterního nádoru a normální jaterní tkáně** - nádorová tkáň spotřebovala 10x více glukózy a vyprodukovala 100x více laktátu než normální tkáň;
- **nádorové buňky preferují glykolýzu jako zdroj energie** – původně považováno za důvod vzniku nádoru – nízká hladina kyslíku je charakteristická pro nádorové buňky (Nobelova cena 1931);

"Cancer, above all other diseases, has countless secondary causes. But, even for cancer, there is only one prime cause. Summarized in a few words, the prime cause of cancer is the replacement of the respiration of oxygen in normal body cells by a fermentation of sugar."

- **přestavba metabolismu je charakteristická pro buněčnou proliferaci – proliferující buňky vykazují z pohledu metabolismu řadu vlastností buněk nádorových;**

Metabolismus diferencovaných buněk v klidovém stavu a metabolismus buněk proliferujících nebo nediferencovaných – významné odlišnosti

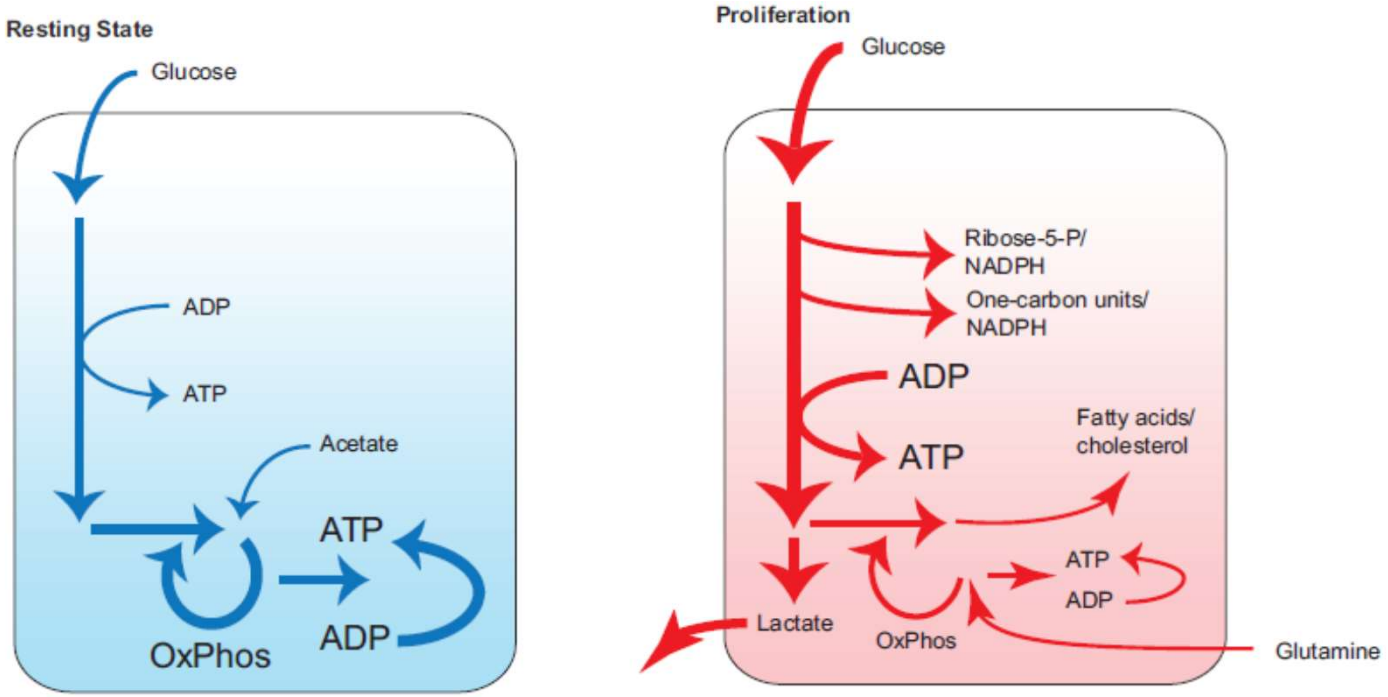
- při dostatečné hladině kyslíku diferencované buňky primárně využívají ke tvorbě ATP oxidativní fosforylaci; příjem živin je spíše limitovaný – bazální metabolismus;
- pouze v hypoxických podmínkách využívají diferencované buňky anaerobní glykolýzu, spojenou s tvorbou laktátu;



Science, 2009, 324:1029 - 1033

Adaptace metabolismu u proliferujících buněk

- **proliferující buňky vyžadují nejen energii**, ale i velké množství substrátů pro anabolické reakce;
- intenzívní **aerobní glykolýza - podpora syntézy buněčných makromolekul, kofaktorů apod. – komplexní přestavba buněčného metabolismu**;



Cell Metabol. 2016, 23: 27 - 47.

Adaptace (přestavba) metabolismu u proliferujících buněk

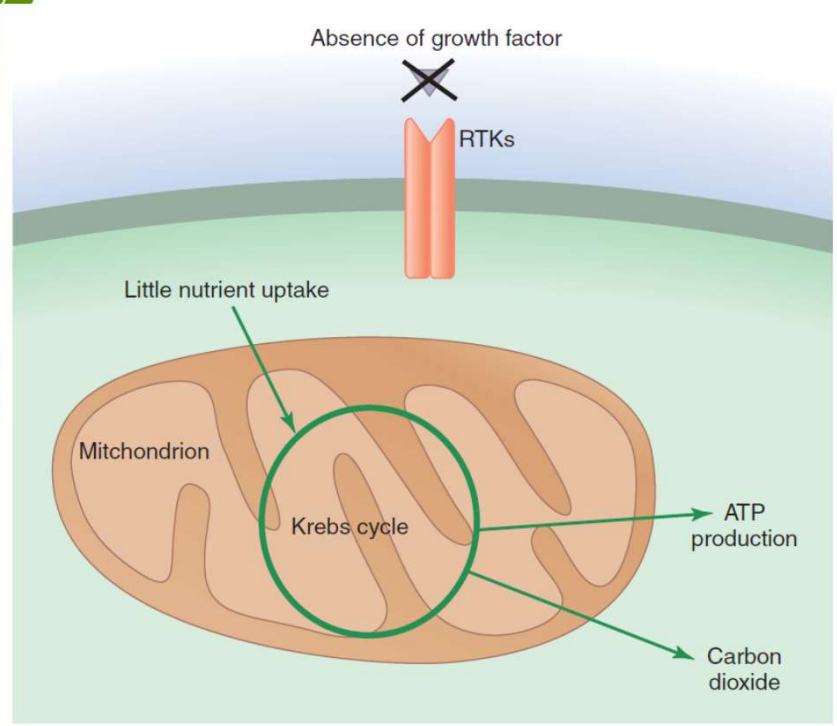
- v mnohobuněčném organismu mají **buňky obvykle ve svém okolí dostupné dostatečné množství živin, které umožňují nepřetržitý růst a proliferaci**; **růst a proliferace buněk ale musí být kontrolovány** pro zajištění udržení **homeostázy tkání a orgánů**;

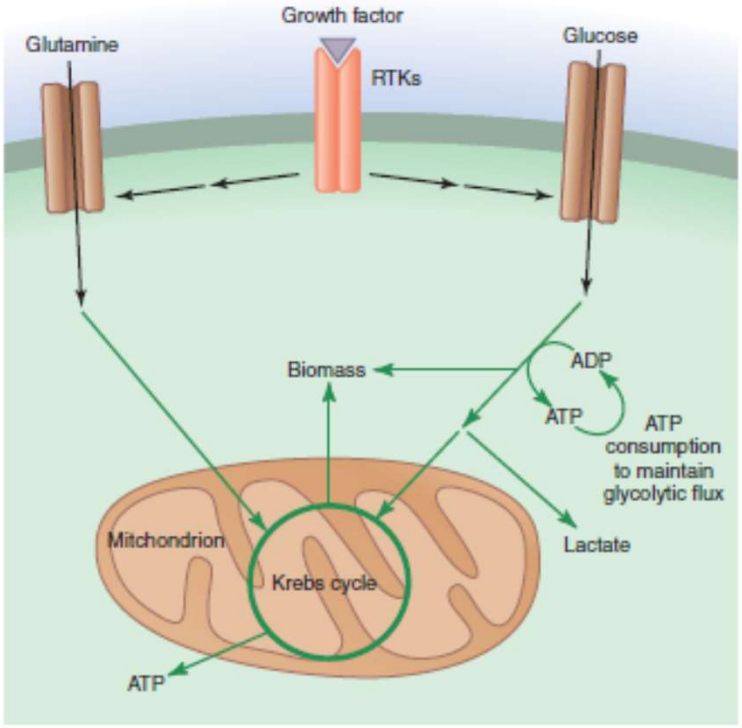
- **proto není metabolismus řízen autonomně v rámci jedné buňky** – buňky tkání jsou kontrolovány signály z okolního prostředí – **teprve na základě signálu stimulujícího proliferaci dojde** nejen ke spuštění mechanismů zodpovědných za přechod buňky do dalších fází buněčného cyklu, ale zároveň i **ke spuštění specifických signálních drah a dalších mechanismů kontrolujících zvýšený příjem živin a přestavbu metabolismu proliferující buňky**;

- pro zajištění správné **koordinace** správného **příjmu živin** (zda je jich dostatek) a zároveň **schopnosti buněk je zpracovávat** je nezbytná **zpětná vazba** – některé **metabolity** proto, např. prostřednictvím **kontroly posttranslačních modifikací** (glykosylace, acetylace) **signálních proteinů** nebo pomocí ovlivnění **aktivit** klíčových (rate-limiting) **enzymů** mohou kontrolovat **aktivitu signálních drah** řídících proliferaci nebo intenzitu **jednotlivých metabolických drah**;

Adaptace (přestavba) metabolismu u proliferujících buněk

- **signalizace růstových faktorů indukuje jak proliferaci, tak změny metabolismu;**

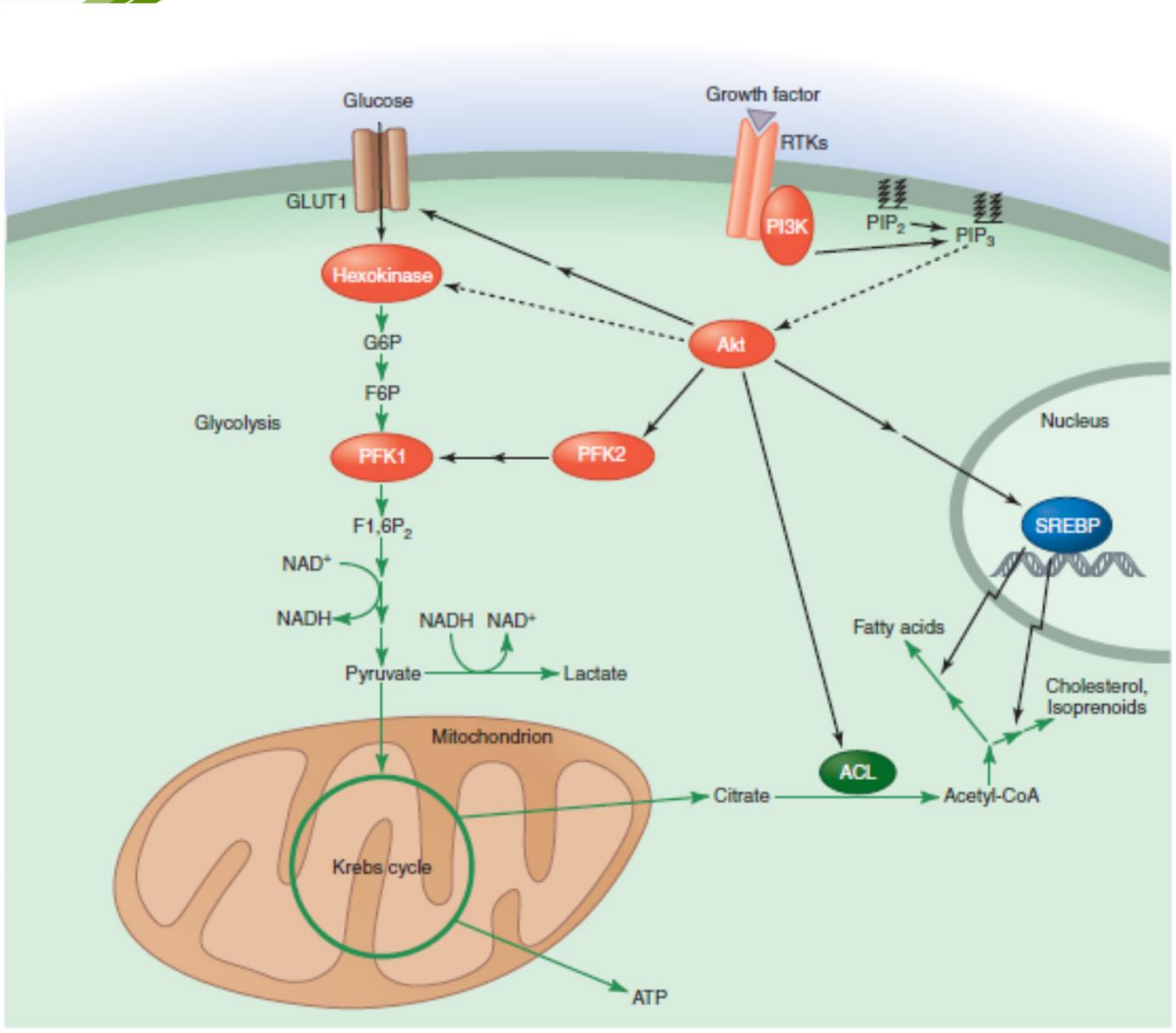




- **zvýšený příjem živin (glukóza, glutamin) – syntéza lipidů, proteinů a nukleotidů;** přebytečný uhlík – vyloučen jako laktát, zvýšená spotřeba ATP udržuje glykolýzu (glycolytic flux);

Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012, 4:a006783

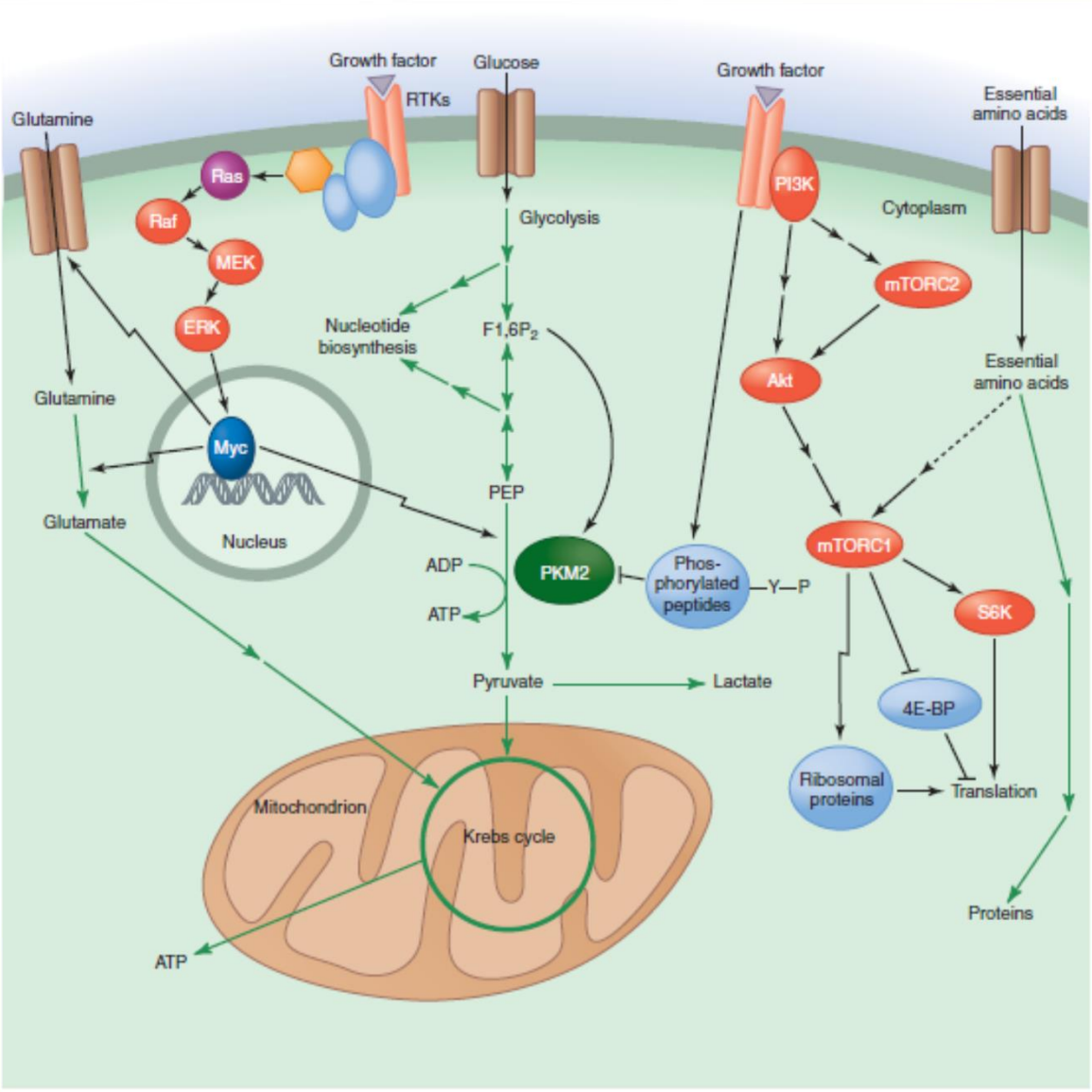
Klíčové signální dráhy – PI3K/Akt – metabolismus glukózy a tvorba buň. makromolekul



Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012, 4:a006783

- stimulace exprese a translokace **transportéru glukózy** (GLUT1)**;**
- **zvyšuje aktivitu enzymů –** hexokináza, fosfofruktokináza 1 (PFK1);
- **aktivace ATP citrát lyázy** (ACL) – klíčový enzym tvorby cytosolového acetylkoenzymu A – syntéza MK;
- **aktivace transkripčních faktorů SREBP** – exprese genů podílejících se na syntéze MK a cholesterolu;

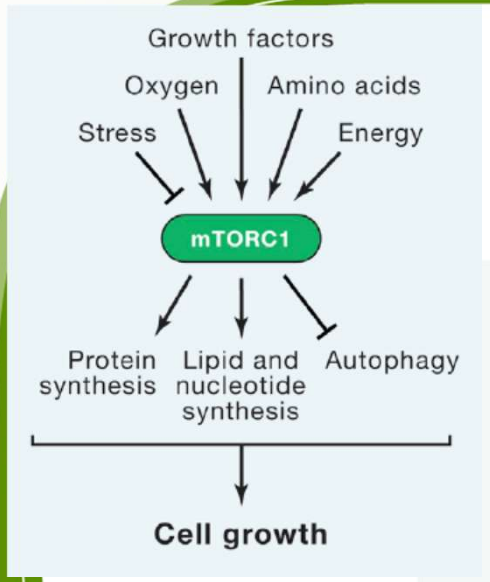
Klíčové signální dráhy – mTOR komplex 1 a Myc – metabolismus aminokyselin (a nukleotidů)

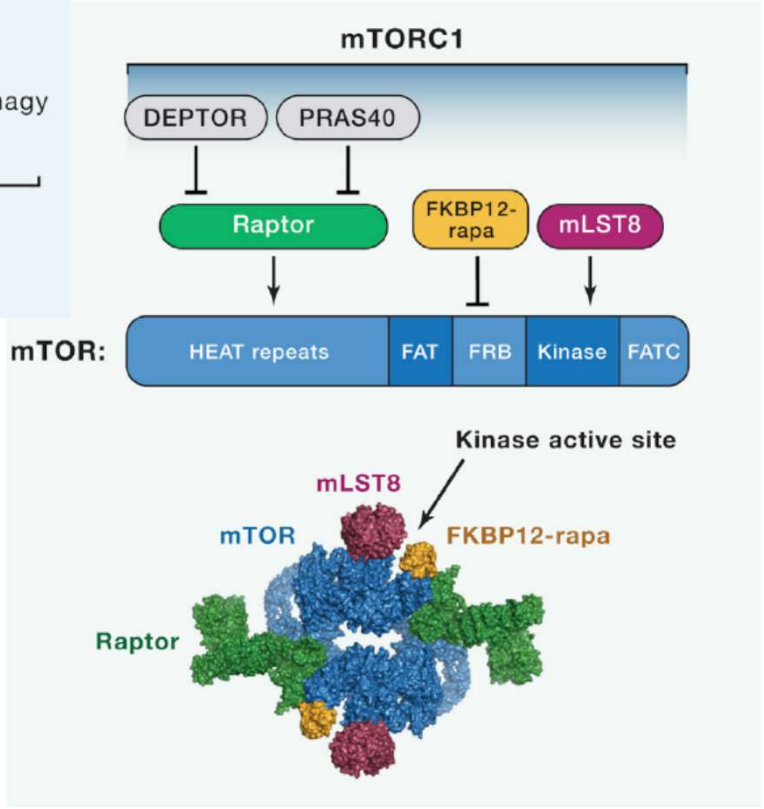


Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012, 4:a006783

- **růstové faktory** (prostřednictvím MAPkináz) **aktivují transkripční faktor Myc – transport glutaminu, tvorbu glutamátu** – využíván v Krebsově cyklu (nahradí odebírané komponenty – **anapleróza**) a **pro syntézu nukleotidů/AA**;
- dochází k **aktivaci komplexů mTOR** – výsledkem je **zvýšená exprese ribozomálních proteinů**, aktivace S6 kinázy (podpora translace) a inaktivace 4E-BP (blokující translaci) – **podpora proteosyntézy**;

mTOR komplex 1 a jeho role

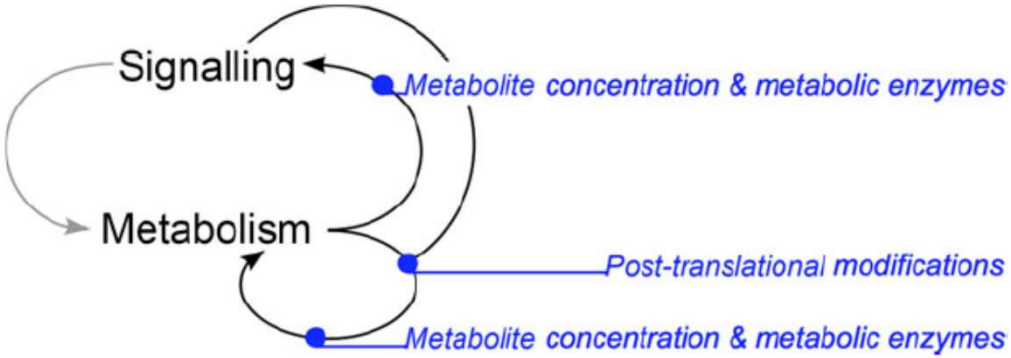




Cell 2017, 168: 960 - 976

- **mTOR** (mammalian target of rapamycin) **– kináza, součást multiproteinového komplexu;**
- vedle podpory proteosyntézy **podporuje také syntézu lipidů, nukleotidů a glykolýzu**;
- mTORC1 je **aktivován růstovými faktory**, hormony (**inzulin**), **aminokyselinami**; **inhibován nedostatkem energie** (glukózová deprivace) – prostřednictvím AMPK, **nedostatkem kyslíku nebo po poškození DNA**;

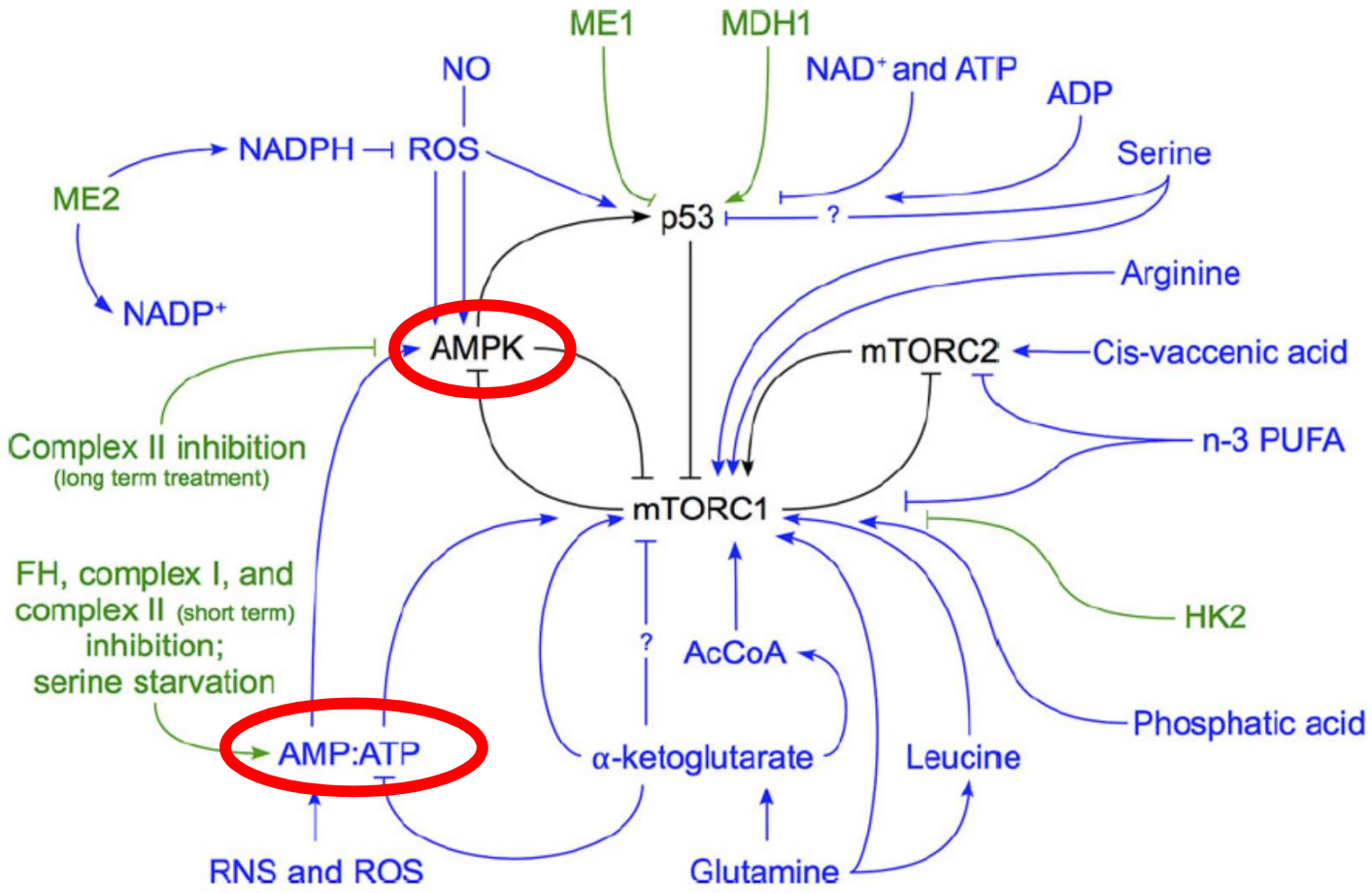
Metabolity a meziprodukty enzymových reakcí – zpětná vazba



- alosterická kontrola enzymatické aktivity;
- **intracelulární metabolity často kontrolují post-translační modifikace** (aktivitu) klíčových proteinů – **signální proteiny** i **metabolické enzymy**
- **glukóza je substrátem** pro tvorbu UDP-N-acetylglukosaminu (UDP-GlcNac) – nezbytná pro **glykosylaci receptorů** (folding, transport) růstových faktorů; tvorba acetylkoenzymu A (aktivita ACL) je klíčová pro acetylaci histonů – tvorba klíčových enzymů a kofaktorů;
- hladina **esenciálních aminokyselin** kontroluje aktivitu mTOR komplexu 1;

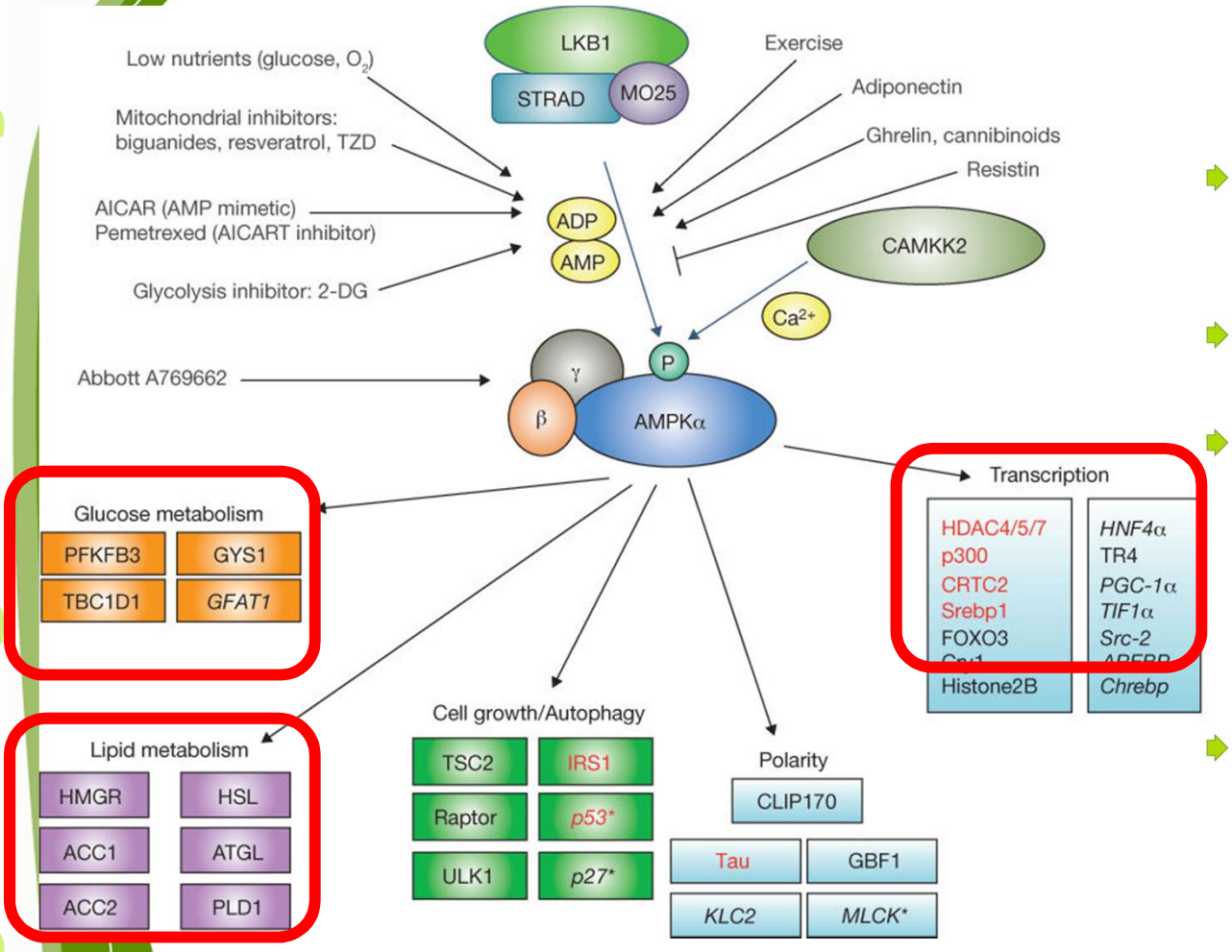
Biol. Cell 2015, 107: 251–272

Produkty, meziprodukty a enzymy – kontrola metabolické signalizace



Biol. Cell 2015, 107: 251–272

AMP-aktivovaná protein kináza – významný senzor kontrolující energetický metabolismus



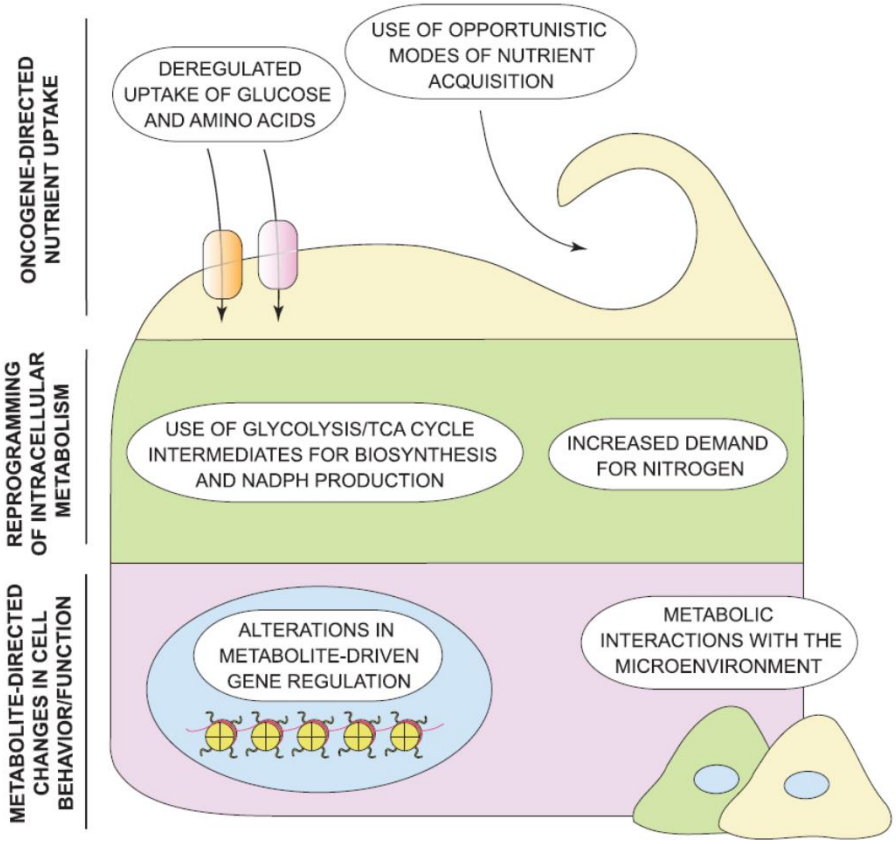
Nat Cell Biol. 2011, 13: 1016–1023.

- rovnováha tvorby a spotřeby ATP – **AMPK – senzor adeninových nukleotidů**;
- pokles ATP – aktivace AMPK – stimulace katabolismu;
- 1 katalytická a 2 regulační podjednotky;
- **nízká hladina ATP, stres –** vazba AMP/ADP - **aktivační fosforylace** + fosforylace některými specifickými kinázami;
- **kontroluje metabolismus** jak prostřednictvím **kontroly transkripce**, tak **přímou kontrolou metabolických enzymů** - fosforylace;

Metabolismus nádorových buněk – příklad patologické adaptace metabolismu – model proliferující buňky

- **specifickým příkladem rychle proliferujících buněk jsou buňky nádorové**;
- pozorujeme u nich řadu **mutací a epigenetických změn** (či změn transkripční regulace) spojených nejen s narušením **signálních drah zapojených do kontroly metabolismu**, ale i **řady enzymů** kontrolujících základní anabolické metabolické dráhy – syntéza MK, AA a nukleotidů či aktivita enzymů podílejících se na metabolismu glukózy;
- tyto poznatky nám umožňují nejen hledání **potenciálního využití v terapii** nádorů, ale zároveň i **identifikaci signálních drah podílejících se na kontrole metabolismu za fyziologických podmínek** v normálních proliferujících buňkách;

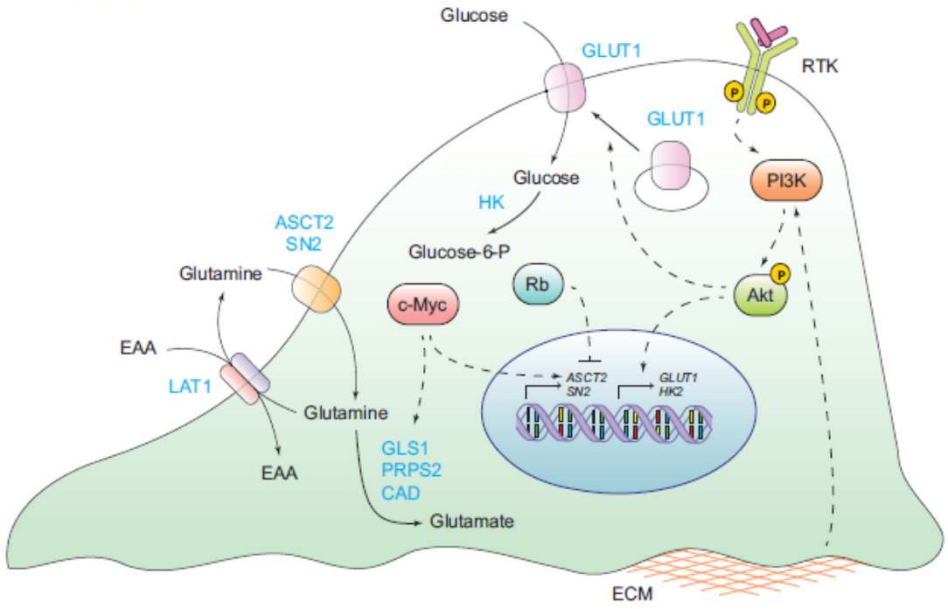
Metabolismus nádorových buněk – příklad patologické adaptace metabolismu – model proliferující buňky



Cell Metabol. 2016, 23: 27 - 47.

- **deregulovaný příjem glukózy a aminokyselin (hlavně Gln);**
- **specifické adaptace na oportunistický příjem živin;**
- **využití meziproduktů glykolýzy a Krebsova cyklu pro syntetické reakce a tvorbu NADPH;**
- **zvýšené požadavky na příjem dusíku;**
- **změny vlivu metabolitů na regulaci genové exprese;**
- tvorba/příjem metabolitů, ovlivňujících jak vlastní nádorové buňky, tak buňky tvořící nádorové mikroprostředí;

1) Zvýšený příjem glukózy a glutaminu (aminokyselin)



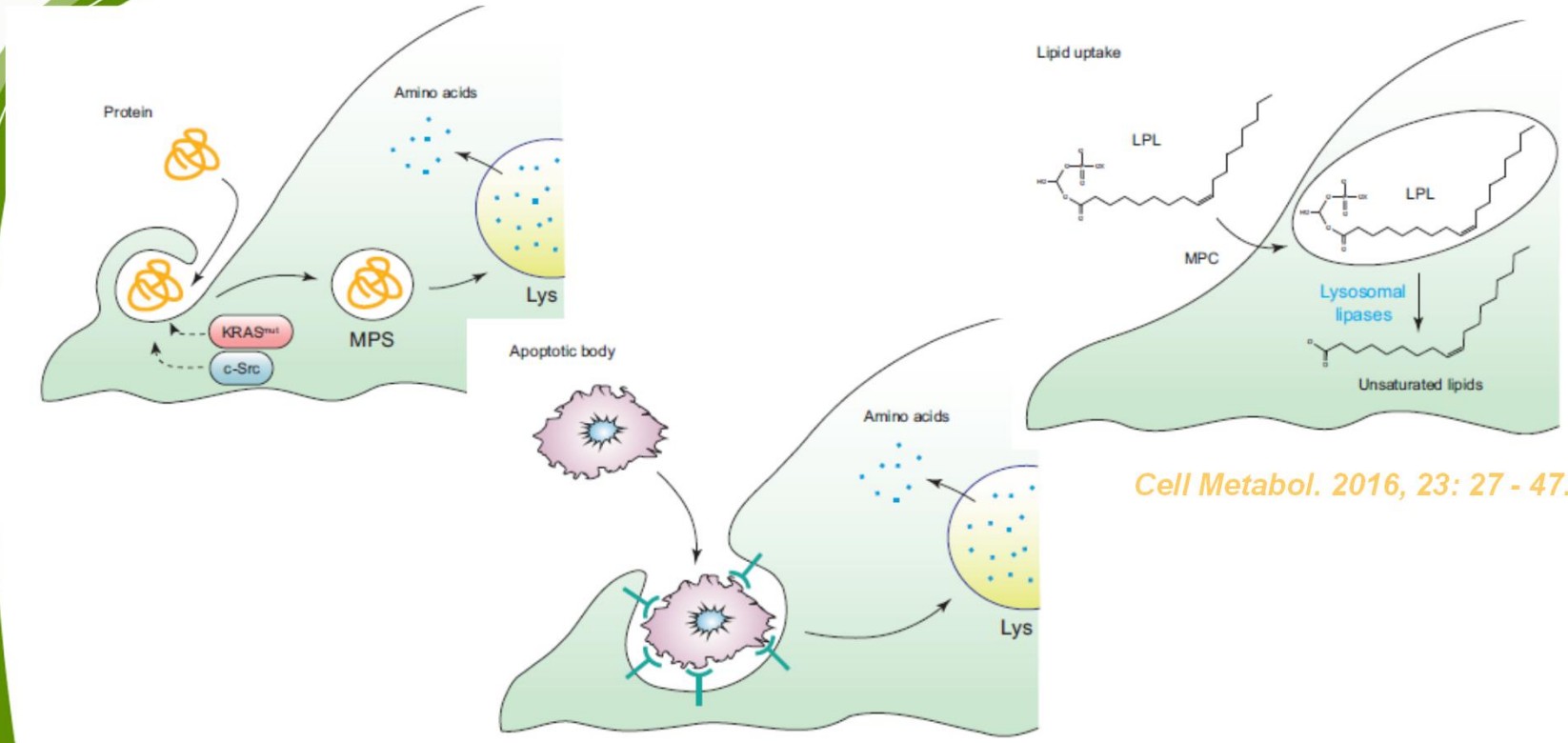
Cell Metabol. 2016, 23: 27 - 47.

- **rychlá proliferace – zvýšené nároky na příjem živin – především glukóza a Gln**;
- **energetický metabolismus** (ATP, NADH, $FADH_2$, NADPH) + poskytují intermediáty pro **syntézu aminokyselin, nukleotidů a lipidů**;

- **Gln – zdroj uhlíku i dusíku –** syntéza nukleotidů, G-6-P, neesenciální AA;, ale také import esenciálních AA pomocí LAT1 (vyžaduje současný export glutaminu); **kultivované nádorové buňky vyžadují nadbytek Gln**;

- deregulace aktivity signálních drah růstových faktorů a kontaktu s ECM – mutace, epig. změny:
- **zvýšený příjem glukózy** souvisí s mutacemi komponent a **aberantní aktivitou PI3K/Akt dráhy**;
- zvýšená exprese a translokace **GLUT1**, aktivace hexokinázy, fosfofruktokinázy;
- **zvýšený příjem Gln** - další onkogeny – **Ras, Myc**;

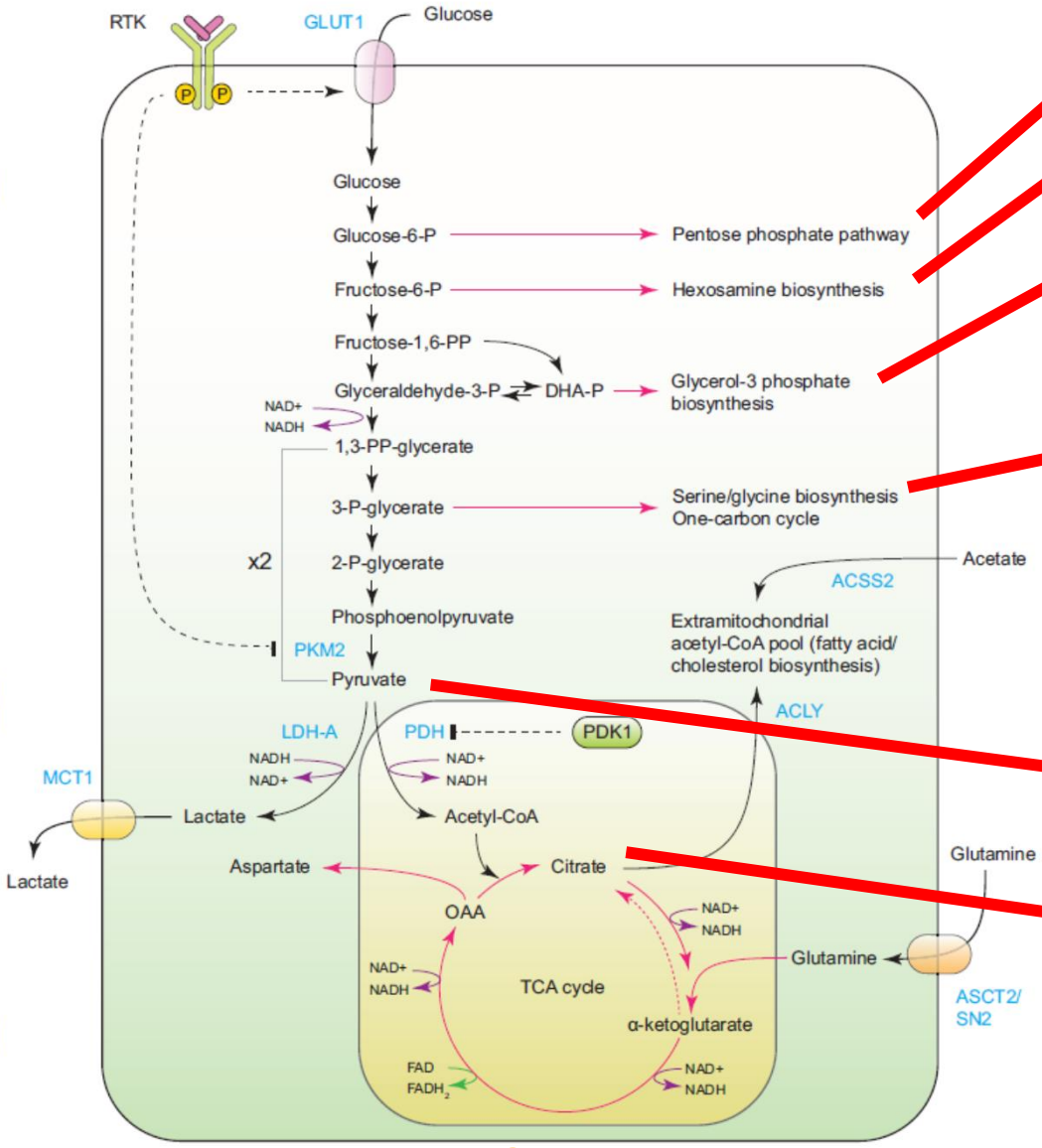
2) Alternativní (oportunistické) zdroje živin



Cell Metabol. 2016, 23: 27 - 47.

- **nedostatek** glukózy, Gln a dalších AA – alternativní zdroje – především proteiny;
- některé mutace (Ras, c-Src) **– lysozomální degradace extracelulárních proteinů** (plazma, intersticiální tekutina) – **makropinocytóza**;
- fagocytóza apoptických tělísek;
- nádorové buňky mohou také importovat lysofosfolipidy (s jedním řetězcem MK) či přijímat lipidy uvolňované okolními buňkami;

3) Využití meziproduktů glykolýzy (Krebsova cyklu) pro syntetické reakce a tvorbu NADPH



Cell Metabol. 2016. 23: 27 - 47.

NADPH, nukleotidy

syntéza N-acetylgukosaminu (GlcNac), kys. hyaluronová;

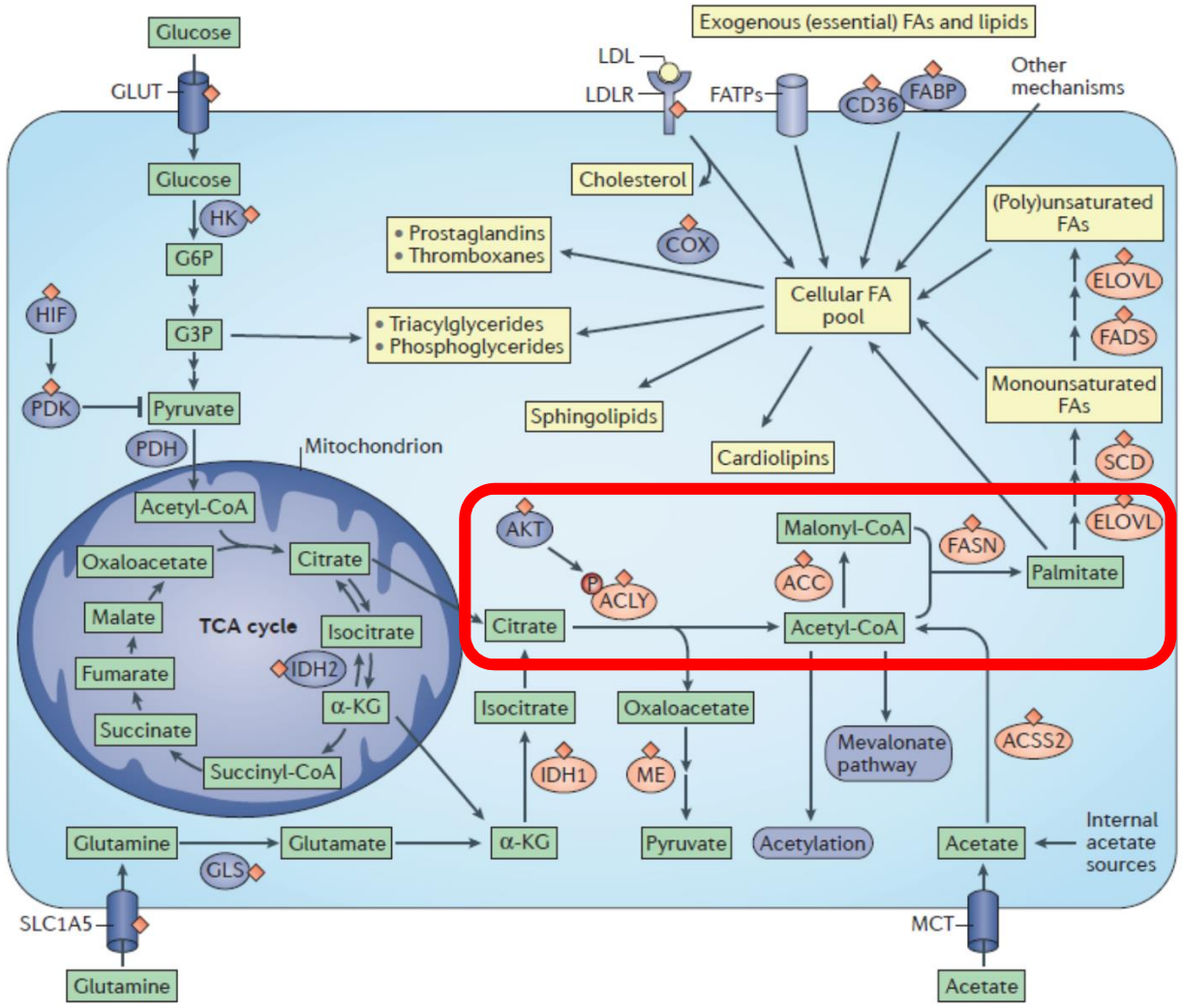
biosyntéza fosfolipidů

biosyntéza AA, serin jako substrát pro folátový cyklus – tvoří substráty pro syntézu purinů, tymidinu a S-adenosylmethioninu – donor methylové skupiny; syntéza NADPH;

potenciální nadbytek pyruvátu je eliminován jako laktát (udržení nízkého poměru NADH/NAD$^+$);

nadbytek citrátu je v cytoplazmě štěpen na acetylkoenzym A (syntéza lipidů) a malát – (zpět do mitochondrií – anapleróza);

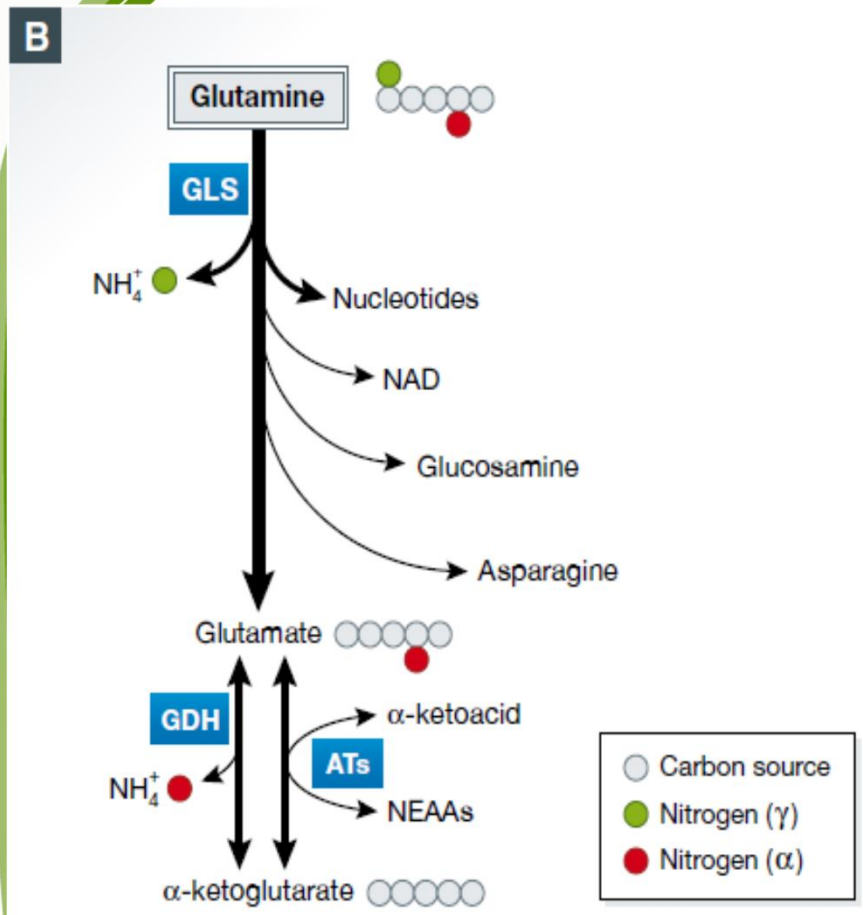
Zvýšená syntéza lipidů a mastných kyselin



Nat. Rev. Cancer 2016, 16: 732 - 749

- **aberantní aktivita PI3K/Akt** – zvýšení cytoplazmatického **acetylkoenzymu A** – zdroj pro **syntézu MK**;
- indukce ACL (**ACLY**), ale i dalších enzymů podílejících se na syntéze MK – acetylkoenzym A karboxyláza (**ACC**) – syntéza malonylkoenzymu A a syntázy mastných kyselin - **FASN**; zdroj pro syntézu lipidů;

4) Zvýšené nároky na příjem dusíku

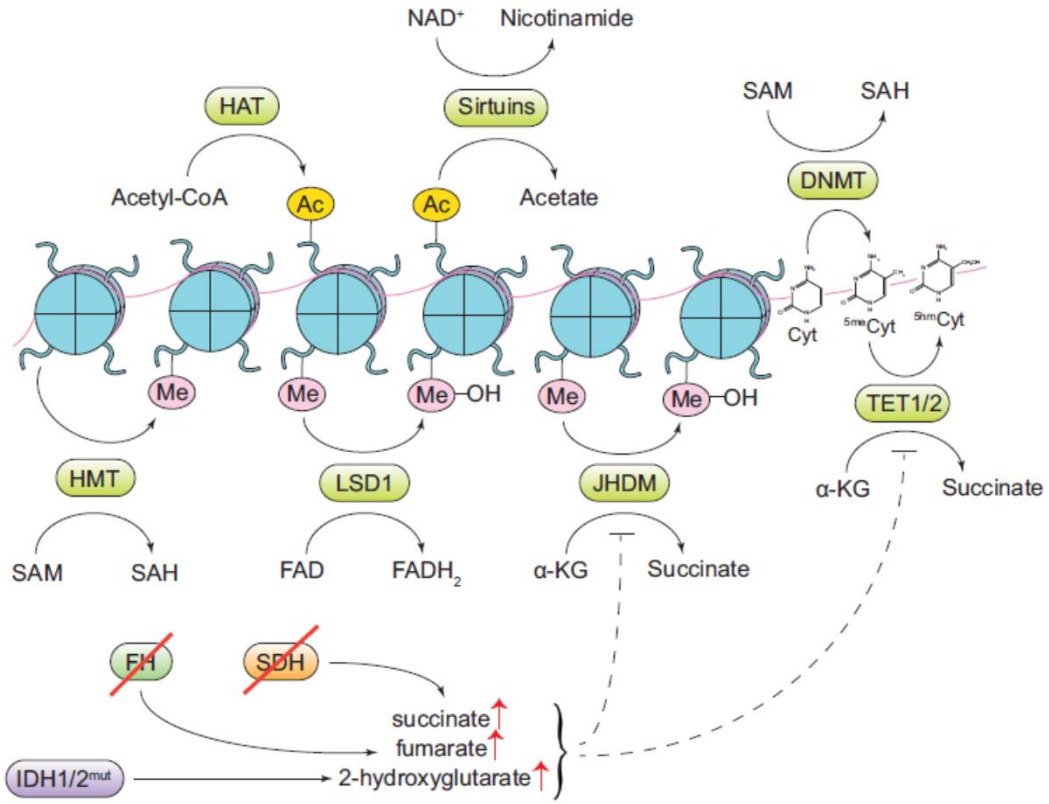


EMBO J. 2017, 36:1302-1315

- rychle proliferující **nádorové buňky** potřebují **syntetizovat velké množství molekul obsahujících dusík** *de novo*;
- **zvýšený příjem Gln – základní molekula transportující redukovaný dusík v organismu**;
- U, T (1 Gln); C, A (2 Gln); G (3 Gln); navíc katabolity Gln slouží pro syntézu purinů a pyrimidinů (a také jako zdroj pro anaplerotické reakce);
- tvorba asparaginu a glutamátu – zdroj dusíku pro transaminační reakce – syntéza neesenciálních AA;

5) Metabolity a regulace genové exprese

- produkované **metabolity slouží také jako kofaktory nebo substráty** pro nejrůznější **enzymatické reakce** zapojené do tvorby a odstraňování epigenetických značek – **acetylace a methylace histonů, methylace DNA**;



HAT, histone acetyltransferase;

SAM, S-adenosylmethionine;

DNMT, DNA methyltransferase;

HMT, histone methyltransferase;

^{5me}Cyt, 5-methylcytosine;

^{5hm}Cyt, 5-hydroxymethylcytosine;

TET1/2, ten eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1/2;

α-KG, α-ketoglutarate;

SDH, succinate dehydrogenase;

FH, fumarate hydratase;

IDH1/2, isocitrate dehydrogenase 1/2

Cell Metabol. 2016, 23: 27 - 47.

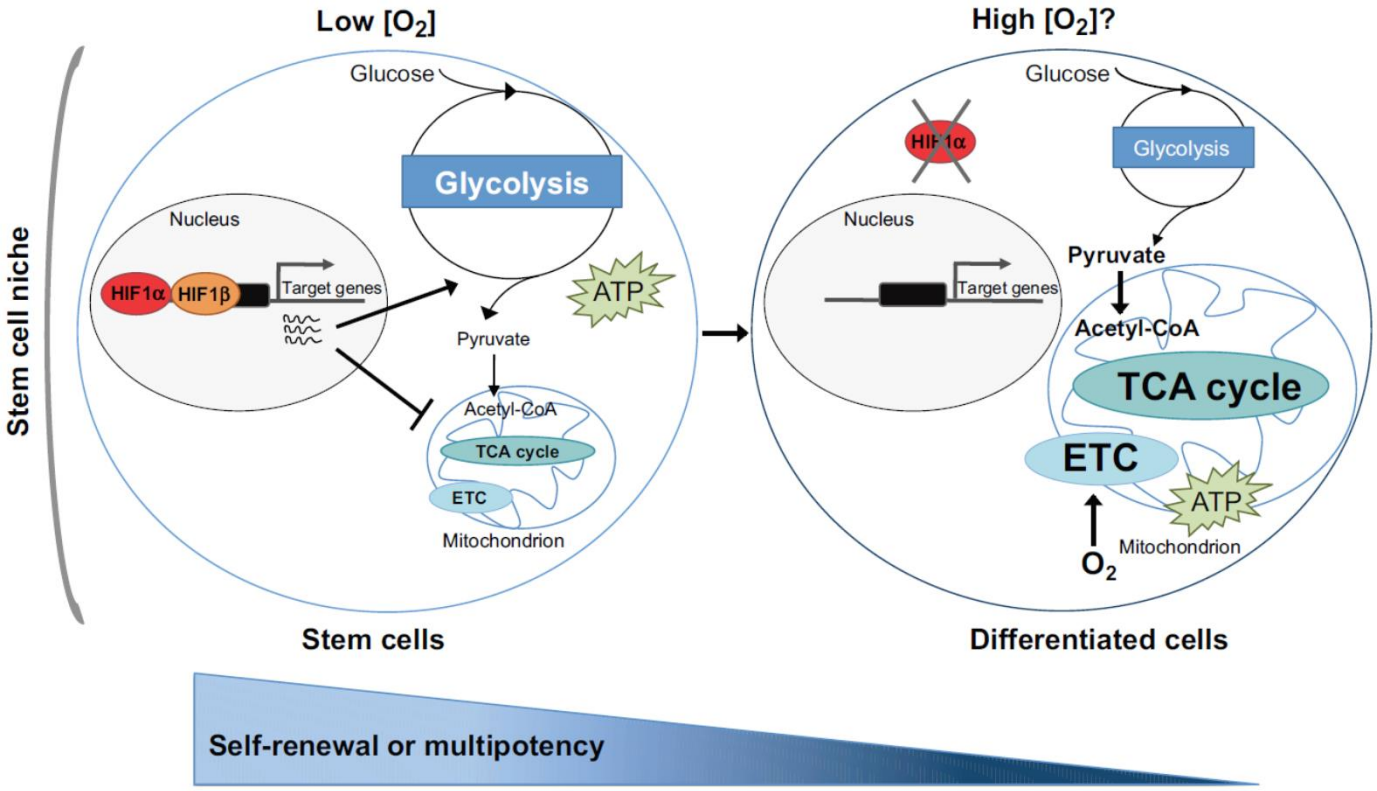
Specializované buněčné typy mohou mít alternativní metabolismus

- **využití alternativního metabolismu – např. glykolýzy – není typické pouze pro buňky proliferující;**
- **diferenciace a aktivace řady typů imunitních buněk je spojen s přestavbou metabolismu** – např. **naivní T lymfocyty primárně využívají oxidativní fosforylaci, zatímco jejich aktivace vede k indukci glykolýzy; podobně i aktivace makrofágů a dendritických buněk je spojená s aktivací glykolýzy**;
- **některé kmenové buňky v dospělém organismu** –např. hematopoetické kmenové buňky – **primárně využívají glykolýzu** jako zdroj ATP a uhl. substrátů; naopak **v průběhu diferenciace** např. nervových buněk dochází **k přechodu z aerobní glykolýzy na oxidativní fosforylaci**;
- změna metabolismu může být nejen důsledkem, ale i příčinou nebo podpůrným mechanismem vedoucím k diferenciaci?

Kmenové buňky a jejich metabolismus

- embryonální kmenové buňky (ESC) mají **méně mitochondrií** – jejich membrána je méně členěná, **menší množství mitochondriálních krist**;
- to umožňuje např. **snižovat tvorbu reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS)**, které mohou negativně ovlivňovat funkce kmenových buněk;
- **transkripční regulátory kmenovosti** (např. OCT4) **kontrolují řadu metabolických genů**;
- inhibice mitochondriální aktivity posiluje expresi markerů kmenových buněk v ESC – **má přepnutí metabolismu i regulační účinky na kmenovost a schopnost sebeobnovy?**

Kmenové buňky využívají k tvorbě ATP zejména glykolýzu – to může souviset i s nízkou hladinou O_2 v nice kmenových buněk



J. Cell Sci. 2012, 125: 5597–5608

Kmenové buňky a jejich metabolismus

- **využívání glykolýzy pro tvorbu ATP není jediný druh adaptace**;
- využití Thr jako zdroje pro tvorbu acetylkoenzymu A;
- změny metabolismu lipidů – indukce syntézy mastných kyselin je např. spojena s indukcí proliferace nervových kmenových buněk;
- signální regulátory zapojené do vnímání metabolitů a živin jsou zapojeny také do kontroly funkcí kmenových buněk - insulin-forkhead box O factors (**FOXO**), mammalian target of rapamycin (**mTOR**), AMP-activated protein kinase (**AMPK**) a další; metabolismus by tedy mohl být důležitým faktorem kontrolujícím diferenciaci kmenových buněk;
- **do budoucna zbývá řada otevřených otázek**;

K zamyšlení

- **metabolismus buněk ve tkáních je regulován** nejen na základě **dostupných živin**, ale **zejména specifickými signálními dráhami**, které **koordinují udržování homeostázy** (hormony, cytokiny); to umožňuje buňkám ve tkáních **rychlé adaptace na změny v prostředí i potřeby celého organismu**;
- **metabolismus je často tkáňově specifický** a závisí také na faktorech jako je např. **hladina kyslíku**;
- **diferencované buňky** využívají jako zdroj tvorby ATP primárně **oxidativní fosforylaci**;
- naproti tomu rychle **proliferující buňky využívají aerobní glykolýzu** nejen jako **zdroj energie (ATP) ale také jako zdroj uhl. substrátů a NADPH** pro syntetické reakce a udržení redoxní rovnováhy;

K zamyšlení

- **podobně jako proliferující buňky, i buňky nádorové využívají aerobní glykolýzu** nejen jako **zdroj energie (ATP) ale také jako zdroj substrátů a NADPH;** zároveň ale mají řadu dalších adaptačních mechanismů umožňujících jim přežití a proliferaci v případě nedostatku živin nebo kyslíku – deregulace příjmu glukózy a aminokyselin, oportunistický příjem živin, apod.;
- **glutamin je významným zdrojem uhlíku a zejména dusíku pro proliferující buňky**, a to zejména pro extrémně rychle proliferující buňky nádorové;
- **u nádorových buněk byla identifikována celá řada mutací a epigenetických změn** vedoucích k **deregulaci metabolismu** a podpoře proliferace;

K zamyšlení

- **metabolismus v nádorových buňkách hraje i úlohu regulační** – **změny regulace transkripce** (epigenetické změny chromatinu), interakce s nádorovým mikroprostředím;
- specifické typy buněk jako jsou např. **kmenové buňky** nebo aktivované buňky imunitního systému často také využívají glykolýzu jako **základní dráhu pro syntézu ATP**; ne univerzální!
- **metabolické procesy** pravděpodobně souvisejí s regulací kmenovosti a schopnosti sebeobnovy kmenových buněk – mohou tedy **aktivně ovlivňovat buněčnou proliferaci a diferenciaci buněk v populacích kmenových buněk**;