

# Metabolismus specifických buněčných typů

## ***Metabolismus buněk obecně***

- Glykolýza -> ( $\beta$ -oxidace FA) -> Krebsův cyklus -> OXPHOS

Vždy balancování v rámci potřeb **energie** x **stavebních látek/intermediálních metabolitů** x **substrátů** x **stimulů**

## ***Specifické požadavky buněk***

- **Quiescence** – kmenové buňky; *udržovací metabolismus, malá spotřeba, malá produkce*
- **Proliferace** – aktivované kmenové buňky, progenitory, nádorové buňky,... ; *produkce intermediálních metabolitů a anabolismus (syntéza) upřednostněny nad tvorbou energie štepením substrátů (katabolismus)*
- **Práce** – myocyty, neurony, epitelie,... ; *hlavně produkce ATP (energie)*
- **“Speciality”** – erytrocyty, trombocyty, fagocyty, hnědé adipocyty,... ; *specifické meziprodukty, ROS/RNS, teplo*

# Spící/ quiescentní buňky

glykolýza    Krebsův cyklus    OXPHOS  
Alternativní Krebsův cyklus

# Pracující buňky

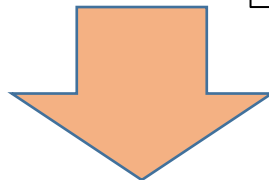
glykolýza    Krebsův cyklus    OXPHOS  
Alternativní Krebsův cyklus  
 $\beta$ -oxidace FA

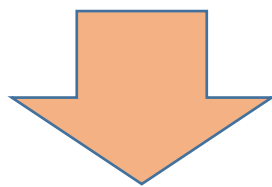
# Proliferující buňky

glykolýza    Krebsův cyklus    OXPHOS  
Alternativní Krebsův cyklus

## Ovlivněno:

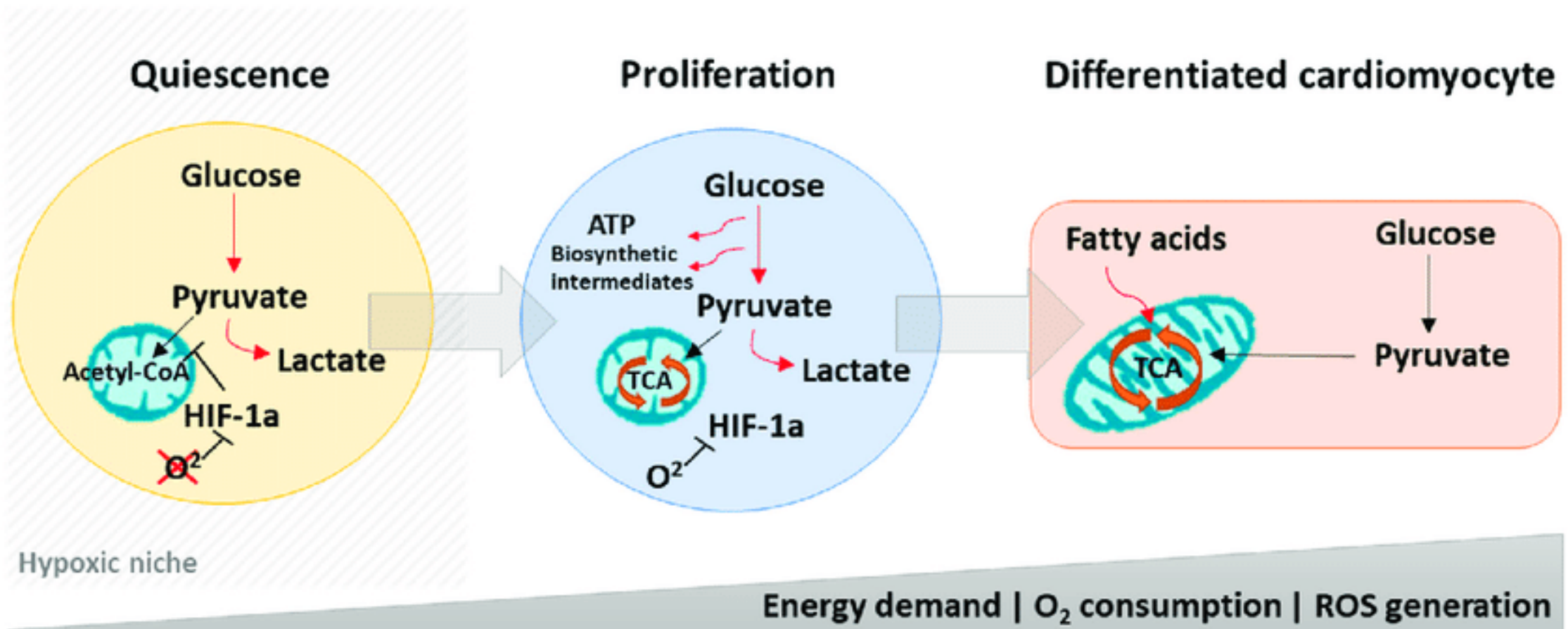
- dostupností substrátů (O<sub>2</sub>, AA, lipidy, glukóza/glutamin,...)
- vnějším řízením (růstové faktory / cytokiny / hormony,...)





Maximal Stemness

Terminal differentiation



**Glykolýza** => tvorba ATP, prekurzory pro pentózový cyklus, intermediální metabolity pro syntézu některých AA,  
tvorba acetátového zbytku jako substrátu pro Krebsův cyklus, syntézu FA,...

**Pentózový cyklus** => tvorba ribóz/nukleotidů, redukované kofaktory NADP,...

**$\beta$ -oxidace FA** => tvorba acetylových zbytků jako substrátu pro Krebsův cyklus, redukované kofaktory NAD, FAD,...

**Krebsův cyklus** => redukce kofaktorů NAD a FAD, tvorba ATP, intermediální metabolity pro syntézu AA,...

**Alternativní (+reversní) Krebsův cyklus** => tvorba ATP, intermediálními metabolity pro syntézu AA,  
tvorba acetylového zbytku pro syntézu FA, redukované kofaktory NAD a FAD,...

**OXPHOS** => oxidace kofaktorů NADH a FADH<sub>2</sub>, tvorba ATP,..

# Kmenové buňky

Somatické adultní kmenové buňky jsou pomalu proliferující/quiescentní, často v „hypoxickém“ prostředí

-> udržovací metabolismus:

- glykolýza = tvorba ATP
  - pentózový cyklus = tvorba nukleotidů
- tvorba AA z glykolýzy a alternativního Krebsova cyklu minimální
- silně potlačený OXPHOS, minimum nezralých mitochondrií (hypoxie/HIF1)

# Progenitory, potenciální (aktivované), embryonální (pluripotentí) a somatické embryonální kmenové buňky, obecně nezralé buňky => intenzivně proliferující buňky

- Rychle proliferující, potřeba materiál pro buněčné dělení
  - => glykolýza, pentózový + modifikovaný Krebsův cyklus, potlačený OXPHOS
- Pro-proliferační transkriptom pod regulací vnějšími faktory/faktory ontogeneze\*,
  - => mitogenní (FGF, EGF, IGF, Wnt...), diferenciální inhibující působky (Notch, LIF..)
- Warburgův efekt, často hypoxické prostředí → podpora glykolýzy, alternativního Krebsova cyklu
- UPC\*\* – regenerace NAD<sup>+</sup> pro štěpení substrátů a oxidaci produktů bez produkce ATP.
- **Podoba s buňkami nádorů**

\*Faktory ontogeneze – růstové faktory / morfogeny / cytokiny => regulace osudu buněk

\*\*UPC (1,2,3) – uncoupling protein, tvoří póry ve vnitřní membráně mitochondrií pro H<sup>+</sup> = inhibice tvorby ATP

# Nádorové buňky = nezralé buňky

Rychle proliferující, metabolismus **podobný\*** jak progenitory a proliferující kmenové buňky

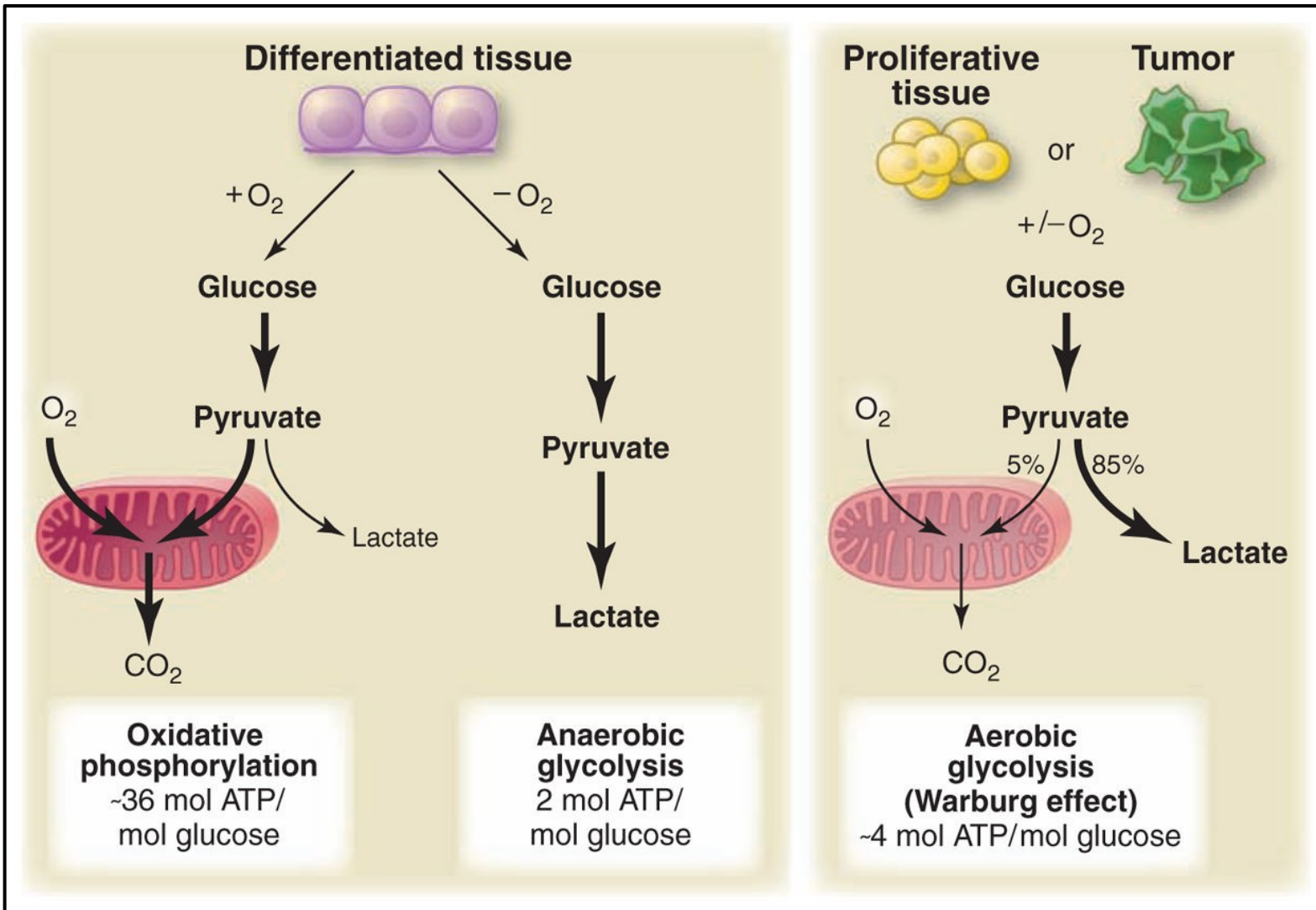
**\*Fenotyp není nastaven/regulován faktory ontogeneze, ale:**

- Změna exprese a/nebo aktivitu modulující mutace příslušných komponent drah transdukce signálu  
a regulace genové exprese
- Změna exprese a/nebo aktivitu modulující mutace příslušných enzymů metabolických drah

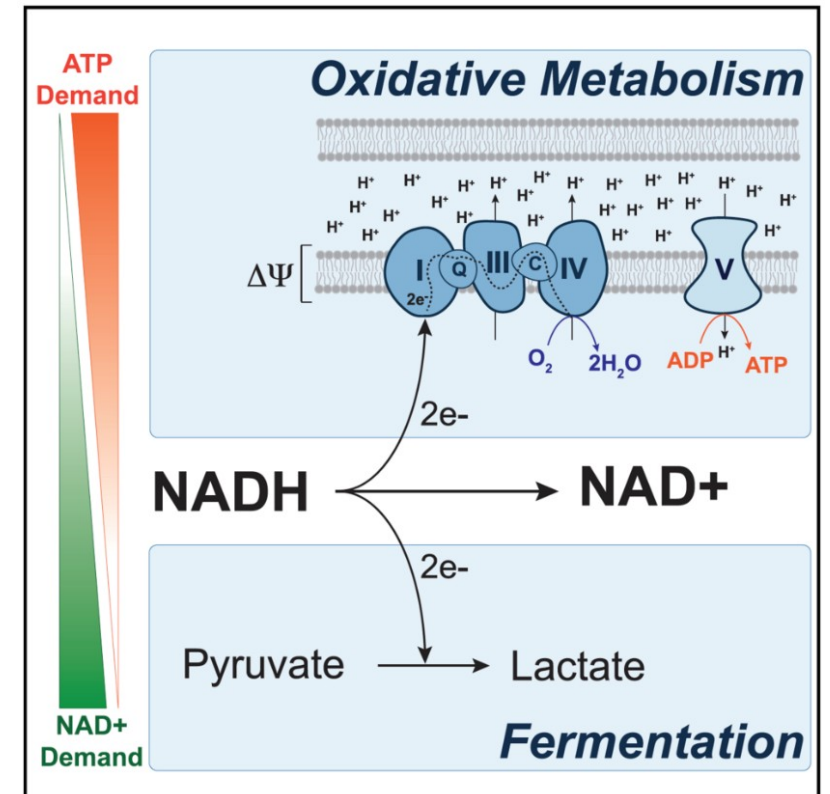
# Základní rozdíl v energetickém metabolismu u diferencovaných/zralých proti nezralým buňkám

Zralé buňky – metabolismus se řídí hlavně dostupností a kapacitou pro využití  $O_2$

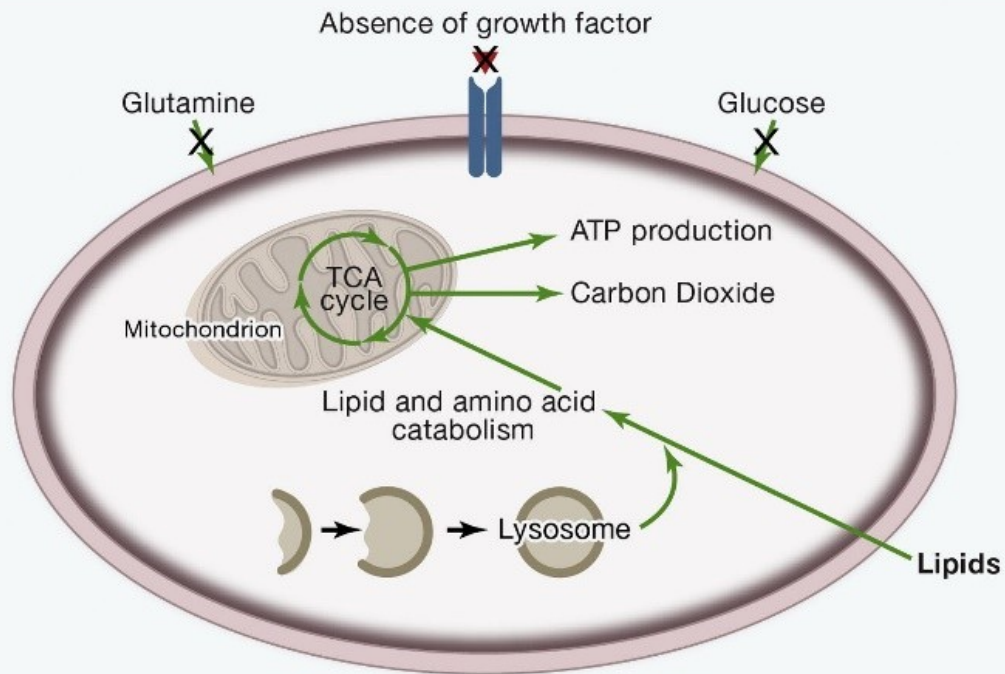
Nezralé buňky – metabolismus je řízen požadavky na buněčné dělení, proliferaci



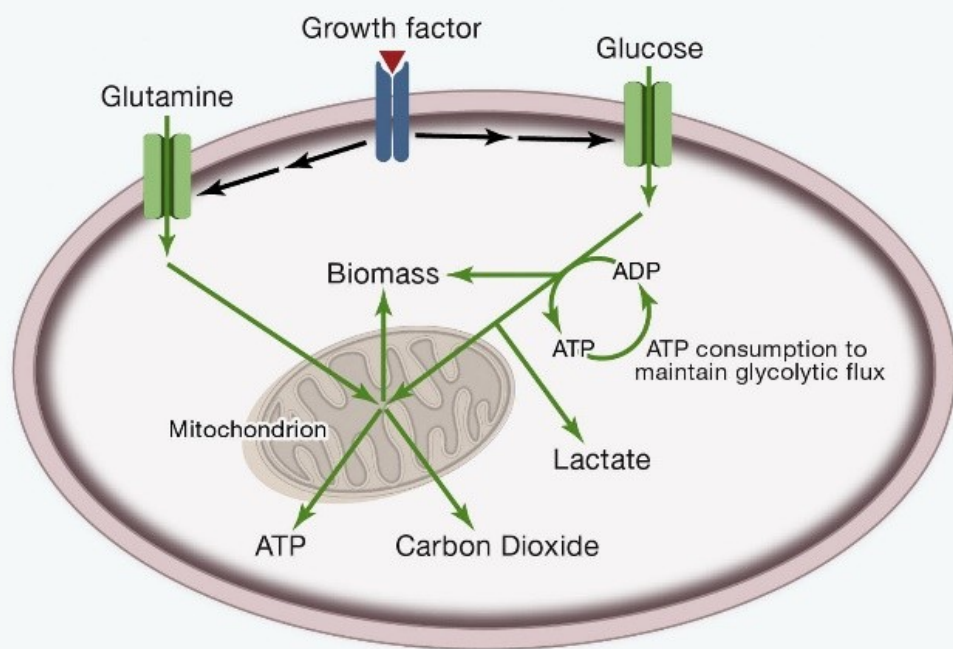
## Zajištění oxidace/redukce kofaktorů



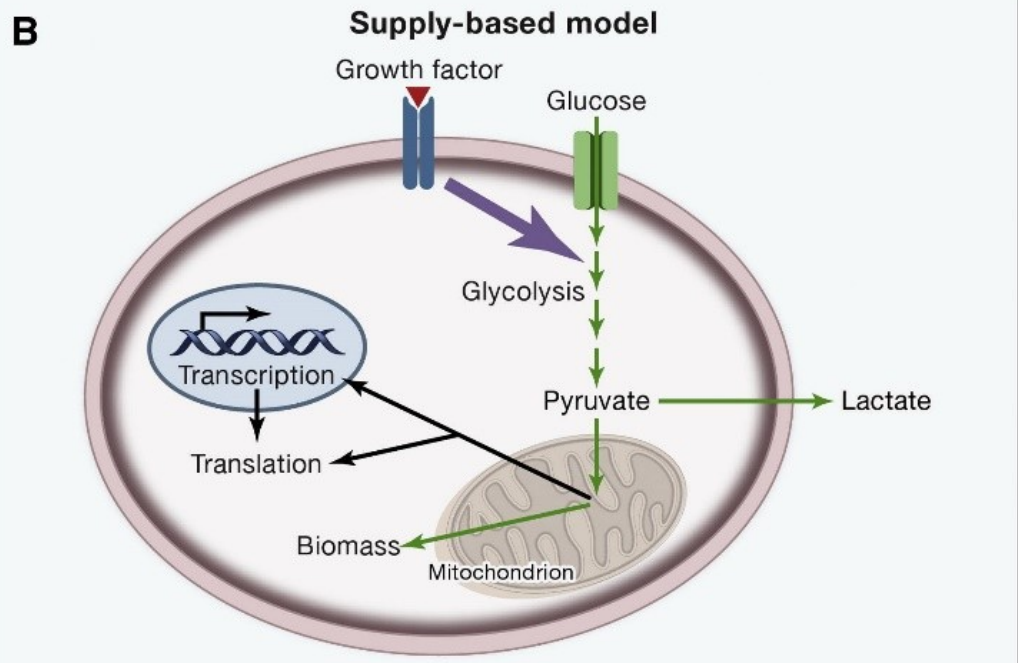
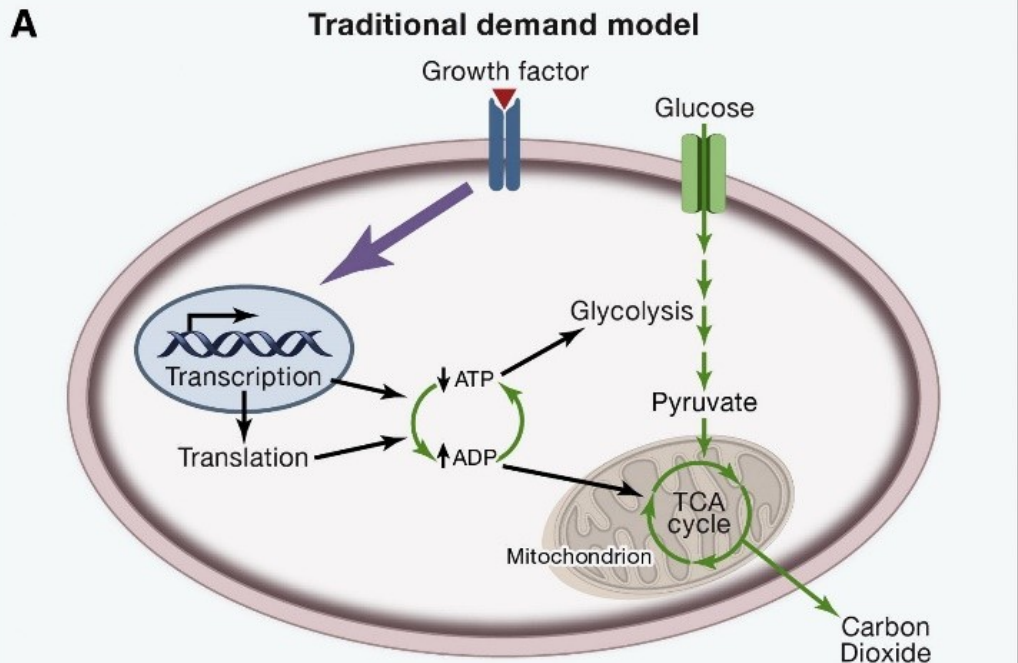


**A**

**A)** Quiescentní buňky bez vnějších pro-metabolických stimulů, nízká úroveň metabolismu, snížený příjem nutrientů (substrátů), častá autofagie, při přístupu  $O_2$  jeho využití pro OXPHOS.

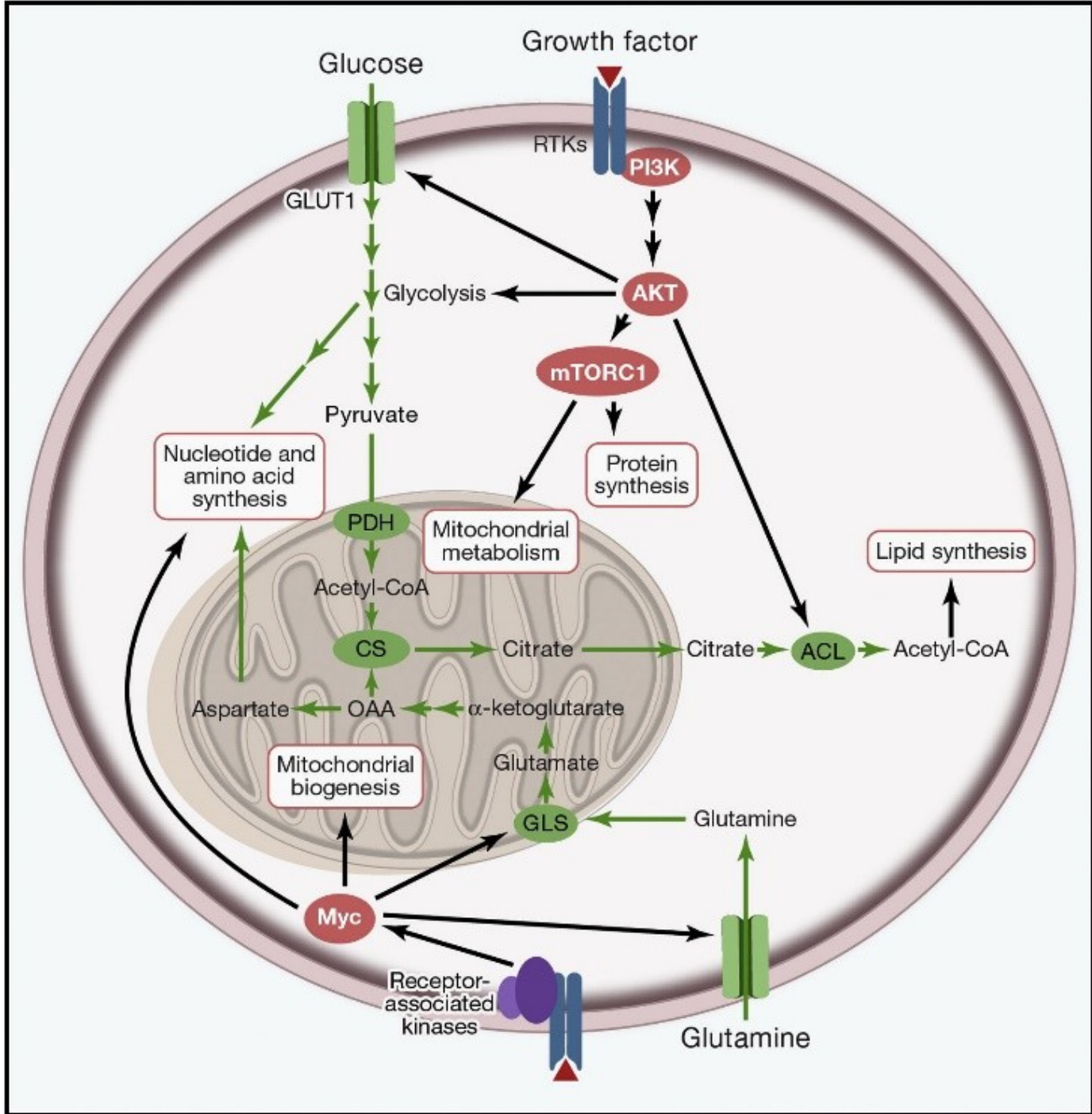
**B**

**B)** Proliferující buňka pod instrukcí vnějších stimulů (růstové faktory), zvýšený příjem substrátů, Krebsův cyklus hlavně produkce intermediálů pro výstavbu, OXPHOS potlačen



## Indukce metabolismu vnějšími stimuly (růstové faktory)

- A)** Nepřímo indukcí exprese genů zprostředkovávající příjem a přeměnu substrátů
- B)** Přímou aktivací/translokací transportérů zajišťující přísun substrátů (typicky Insulin x přenašeč glukózy)



Onkogení\* stimulační příjem substrátů a syntézy zprostředkované signalizací tyrosinkinázy receptoru růstového faktoru a dráhy **PI3K>>Akt(PTEN\*\*)>mTORC1**

\*Účast prooncogenů / oncogenů  
 \*\*PTEN – Phosphatase and tensin homolog, nádorový supresor

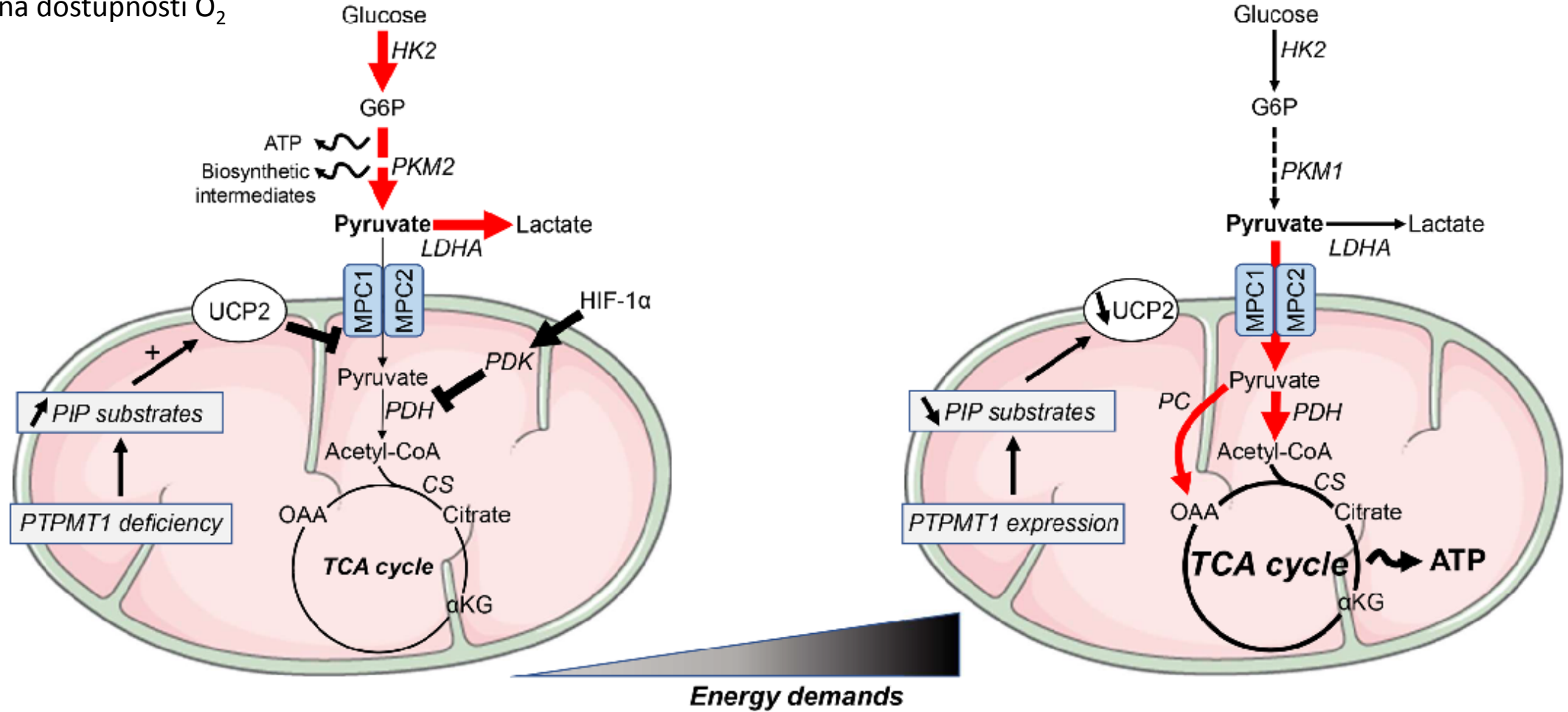
# Úloha isoformem pyruvát kinázy (PKM1,2) pro buněčnou proliferaci & Warburgův efekt

**PKM1,2** – pyruvát kináza1,2, koncový krok v glykolýze

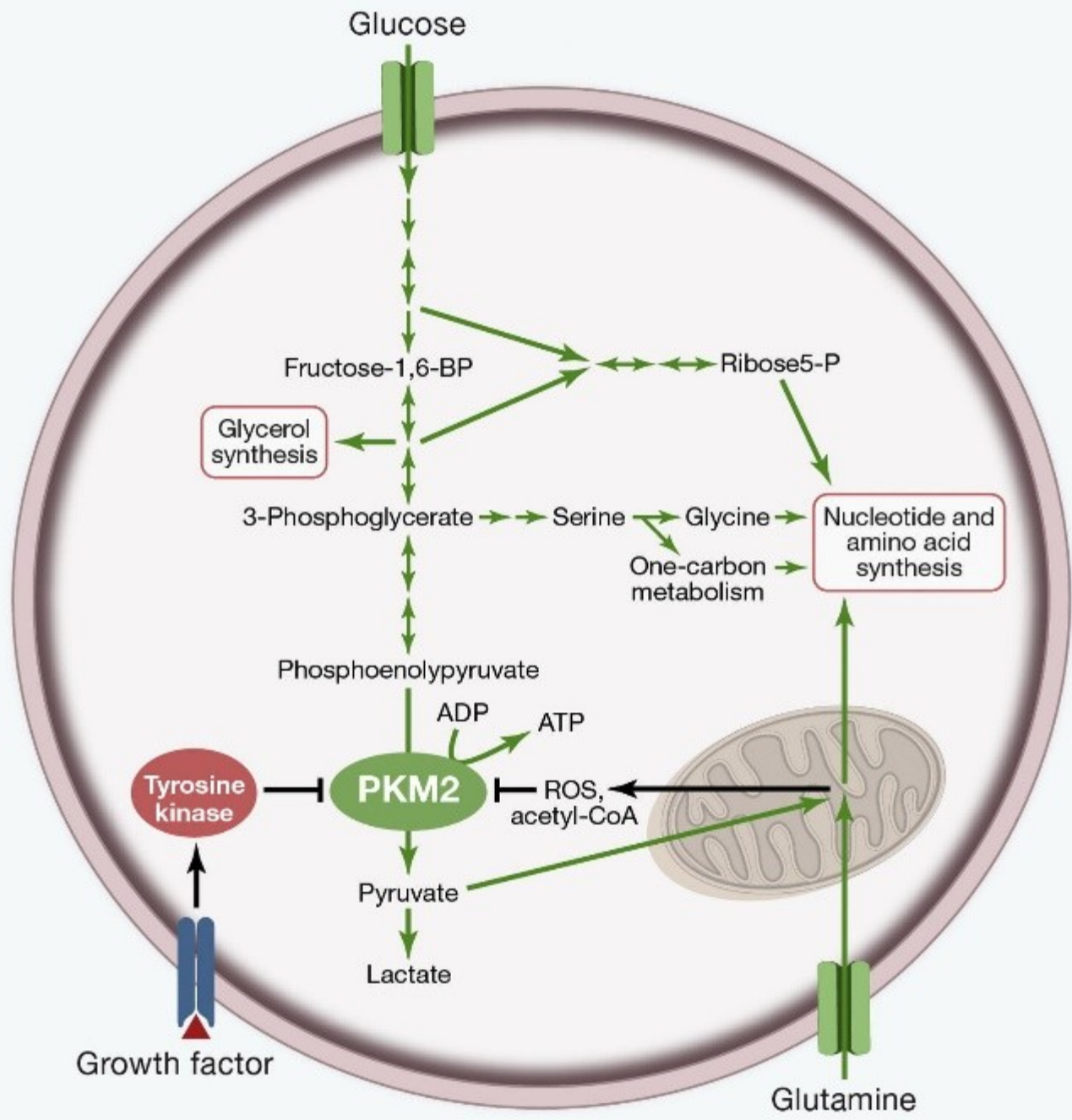
**PKM1** – vysoce aktivní, podpora glykolýzy, velká produkce pyruvátu pro Krebs. cyklus/pro laktát\* u zralých, neproliferujících buněk

**PKM2** – nízká aktivita, zpomalení glykolýzy = nárůst koncentrace intermediálních produktů pro pentózoový cyklus a syntézu AA

\* V závislosti na dostupnosti O<sub>2</sub>







**Expres a aktivita PKM2 je regulována**

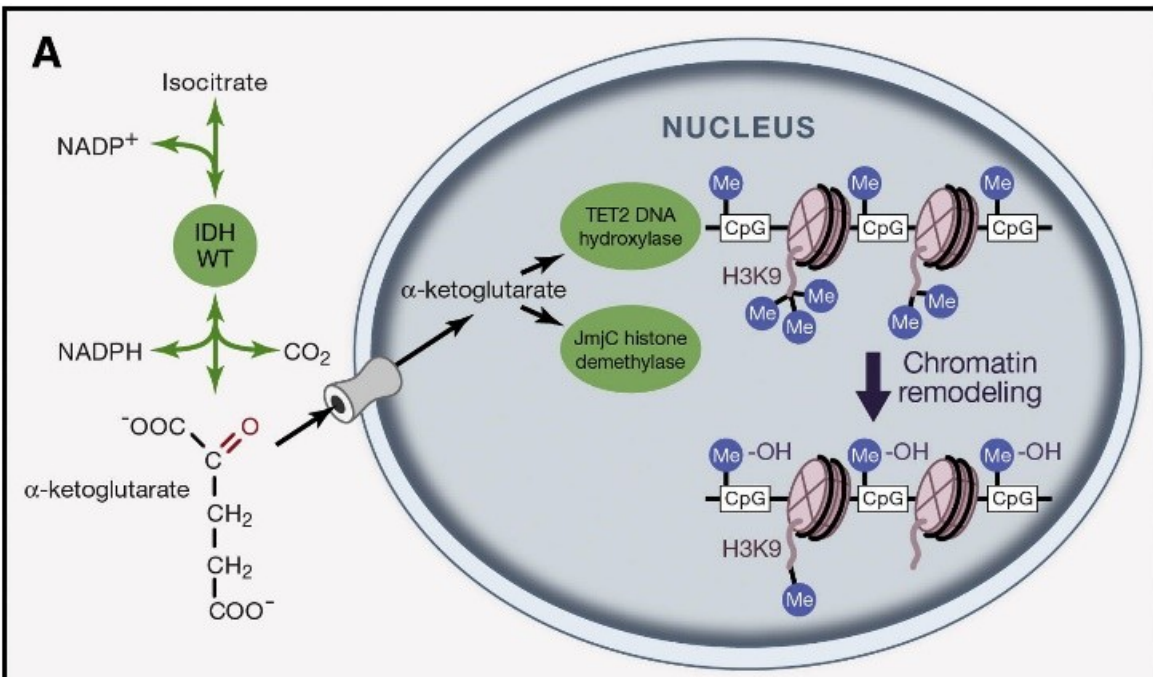
Vnějšími stimuly a metabolismem mitochondrií

Inhibována tyrosin kinásami, ROS, acetylací

=> Zvýšení příjmu substrátů a zvýšení

intermediálů z glykolýzy a Krebsova cyklu

pro anabolismus (nukleotidy, AA pro proteiny)



**A)** Isocitrát dehydrogenáza (**IDH1,2**) → isocitrát na α-ketoglutarát\*

**B)** Mutované, s nádory asociované **IDH1** (cytoplasmatická) a **IDH2** (mitochondriální) - > α-ketoglutarát na 2-hydroxyglutarát (oncometabolit)\*\*

\*α-ketoglutarát substrát zde pro enzymy epigenetických regulací:

- TET2 DNA hydroxyláza →

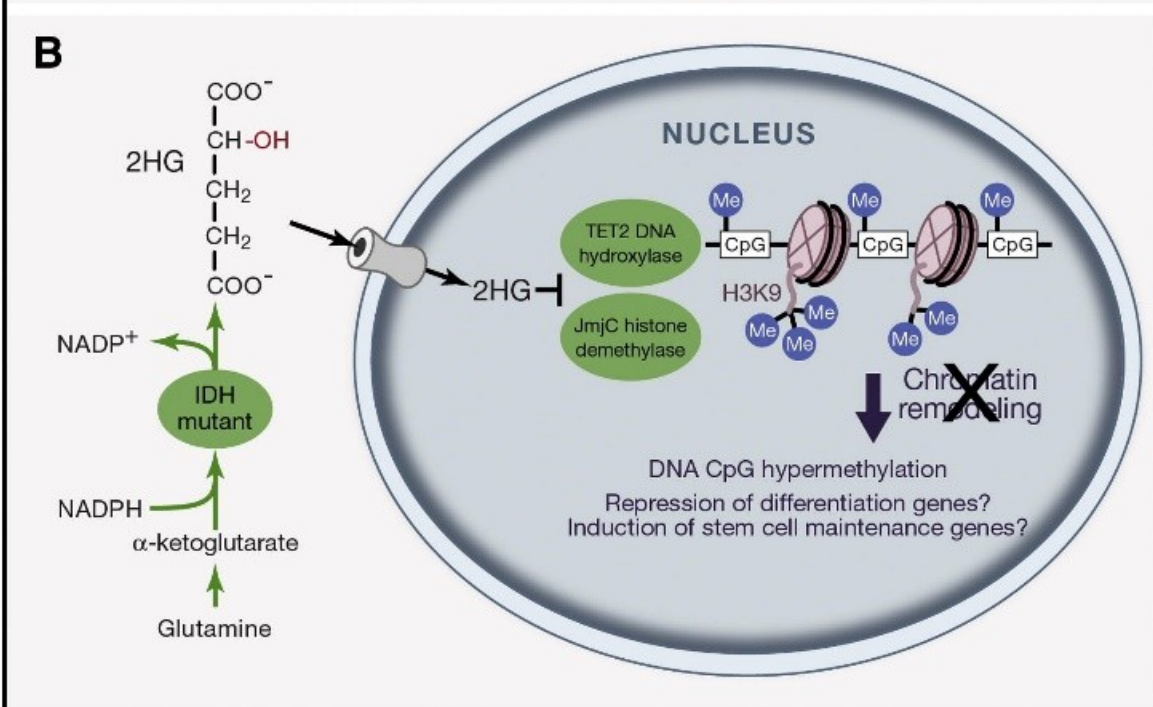
5-methylcytosine na 5-hydroxymethylcytosine = demethylace CpG

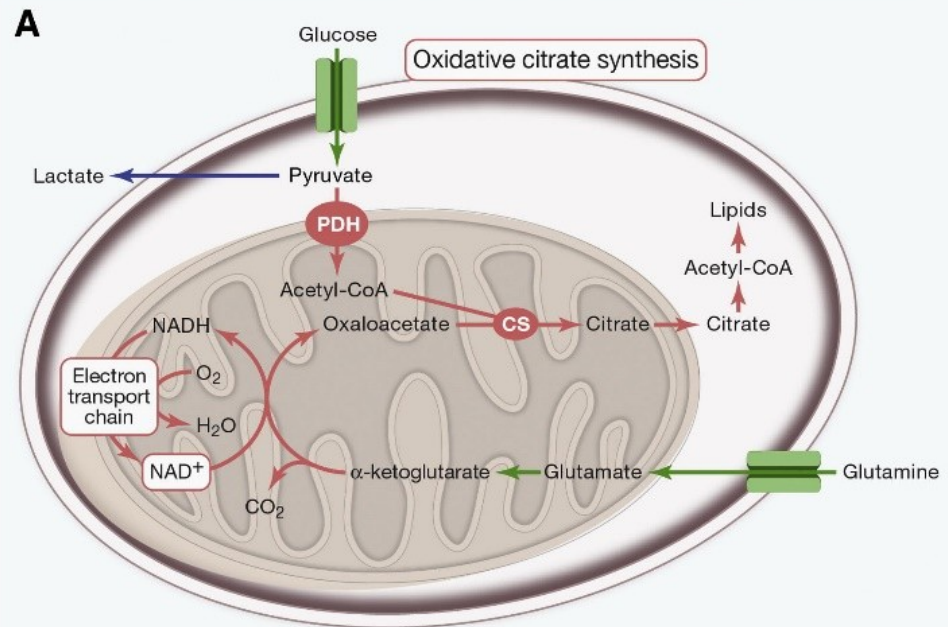
- JmjC domény histonových demethylás

\*\*2-hydroxyglutarát obecně inhibuje dioxygenázy, zde TET2, JmjC = inhibice změn v genové expresi a diferenciaci

- asociován i s hypoxickou odovědí a s utilizací glutaminu

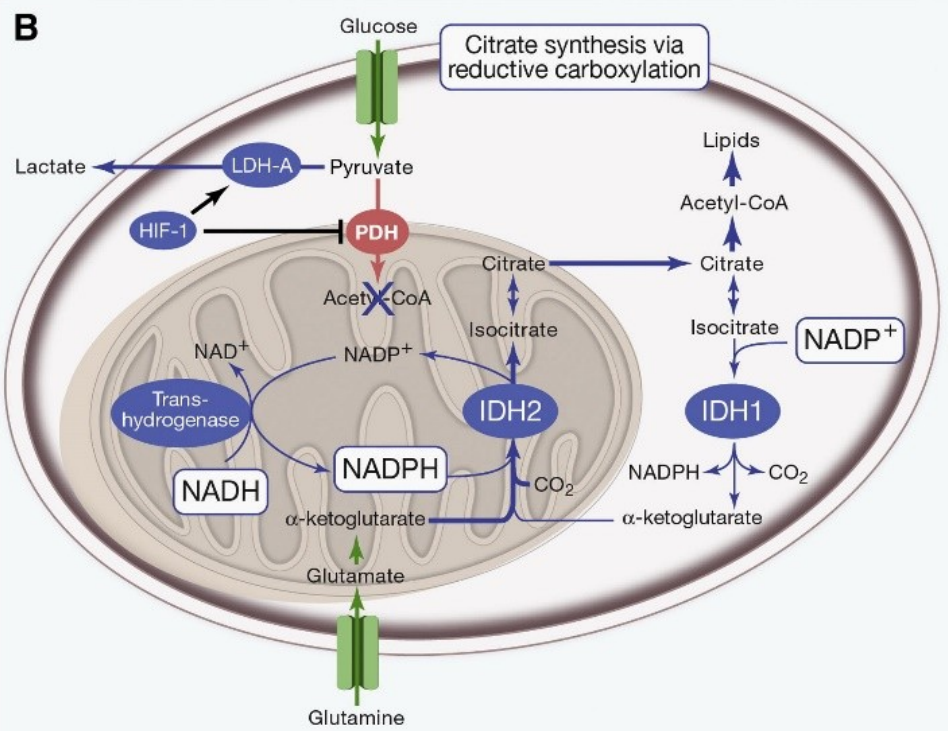
- v normoxii u zdravých buněk prakticky nepřítomen





## Redukční metabolismus glutaminu aktivovaný hypoxií/HIF1

**A) Normoxie** – glutaminu využíváný v Krebsově cyklu za tvorby redukovaných kofaktorů a tvorby ATP v OXPHOS + citrát pro syntézu FA,  $\alpha$ -ketoglutarát  $\rightarrow$  sukcinát



**B) Hypoxie** - alternativní dráha Krebsova cyklu, reverzní syntéza citrátu prostřednictvím IDH2 (mitochondriální isocitrát dehydrogenáza 2)

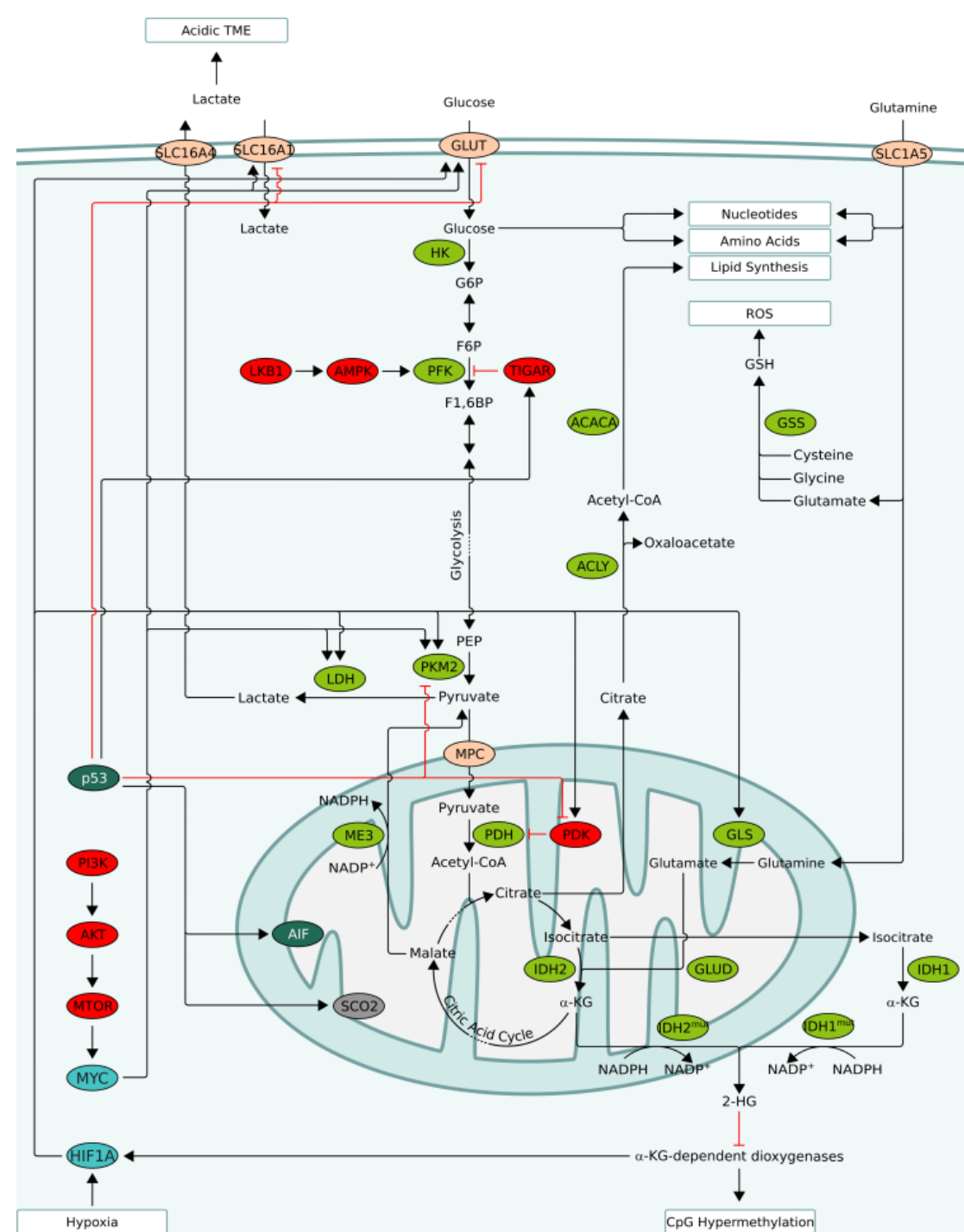
$\Rightarrow$  Podpora syntézy lipidů u proliferujících buněk z  $\alpha$ -ketoglutarát  $\rightarrow$  citrát (kmenové, progenitory, nádorové)



Výše zmíněné procesy jsou spojeny s tzv.

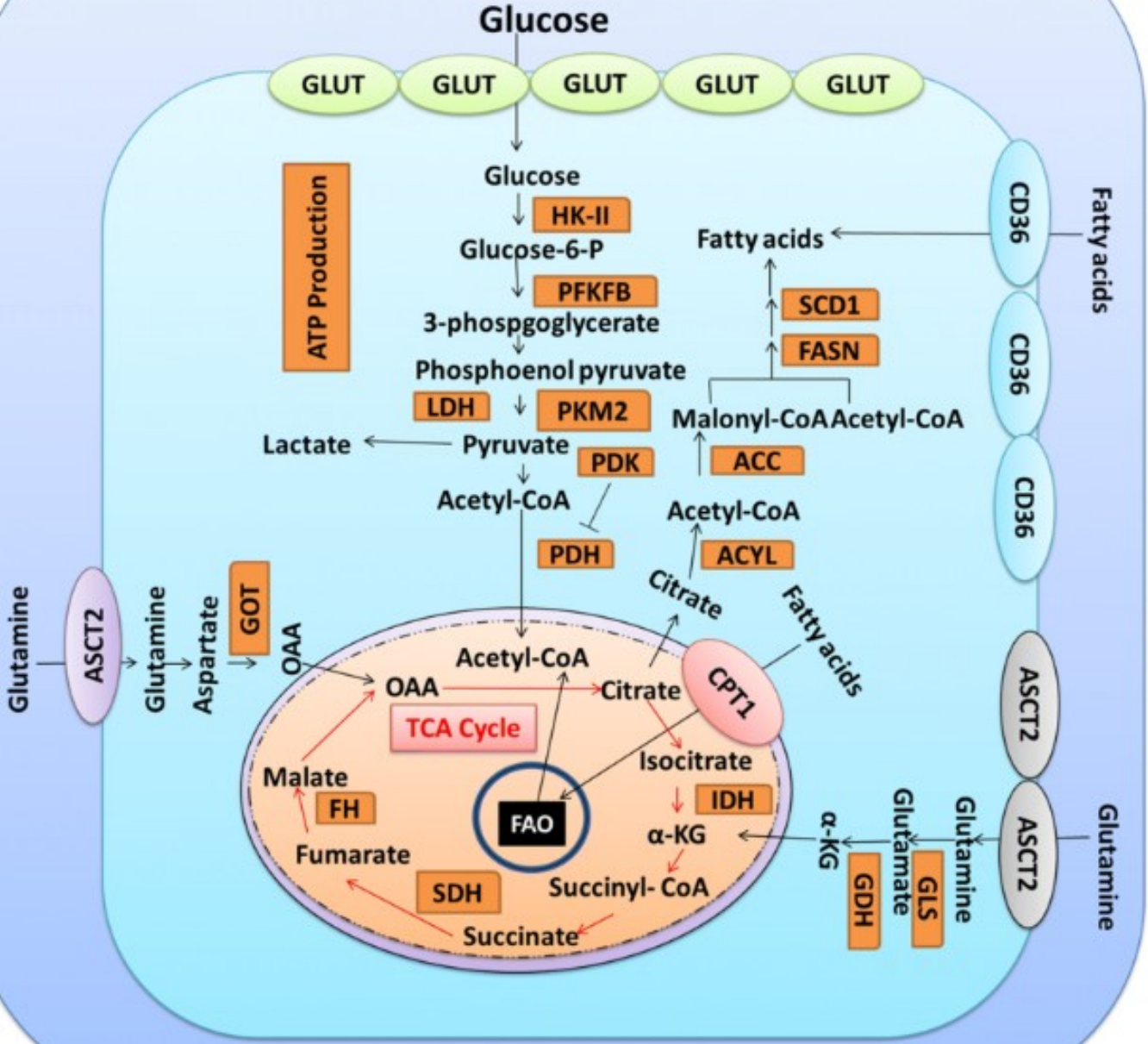
## WARTBURGOVÝM EFEKTEM

- => potlačený OXPHOS i za dostatky  $O_2$
- => „podpora“ glykolýzy, zvýšený příjem glukózy a glutaminu
- => zvýšený příjem FA\*
- => posílená tvorba intermediálních metabolitů pro syntézy látek potřebných pro buněčnou proliferaci – nukleotidy, FA -> lipidy, AA-> protein
- => potlačena epigenetické regulace vedoucí ke změně transkriptomu = Inhibice diferenciaci





**Cancer Stem Cell Metabolism**



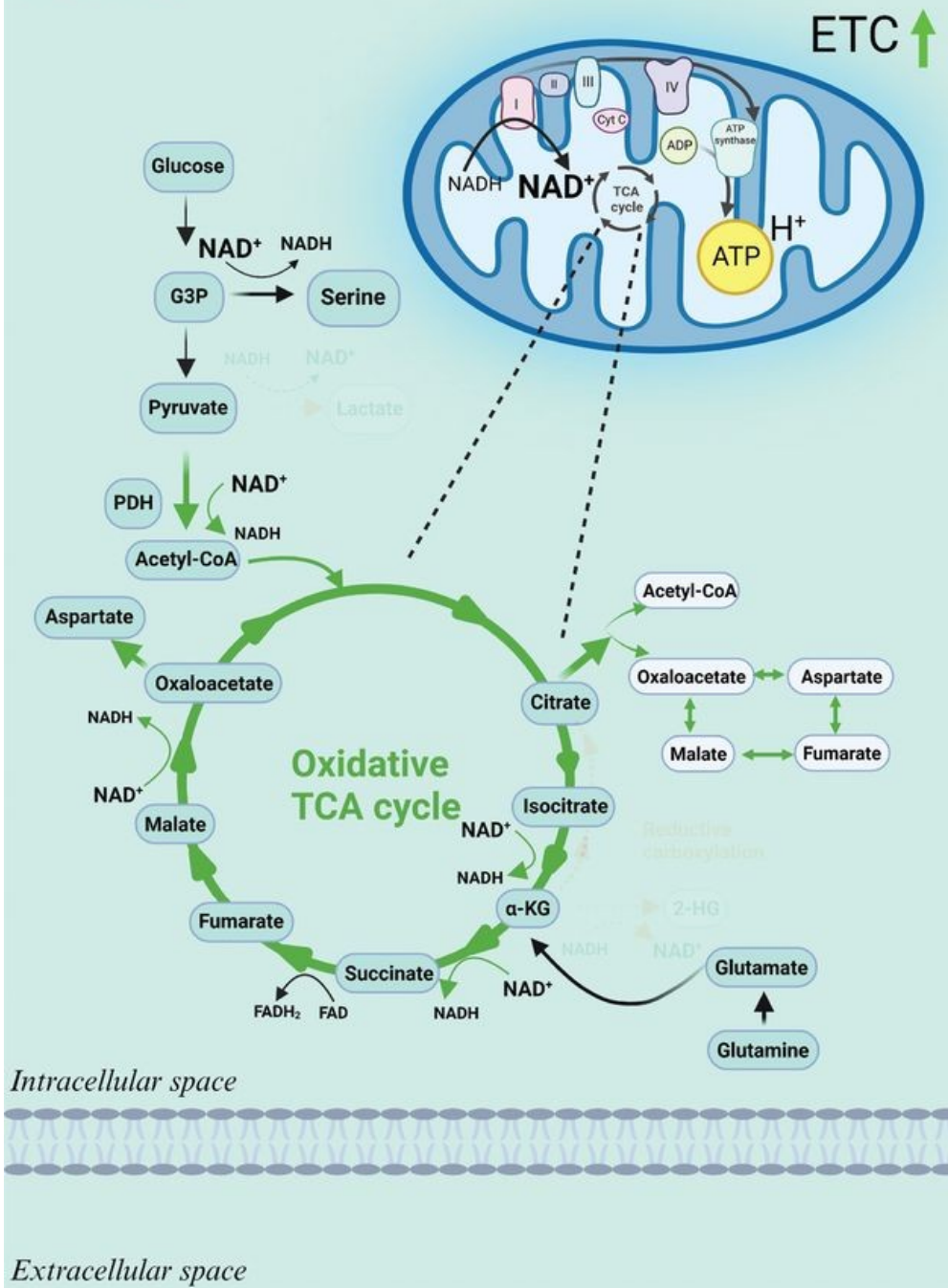
**Zvýšená utilizace FA**

**proliferujícími nádorovými/kmenovými buňkami**

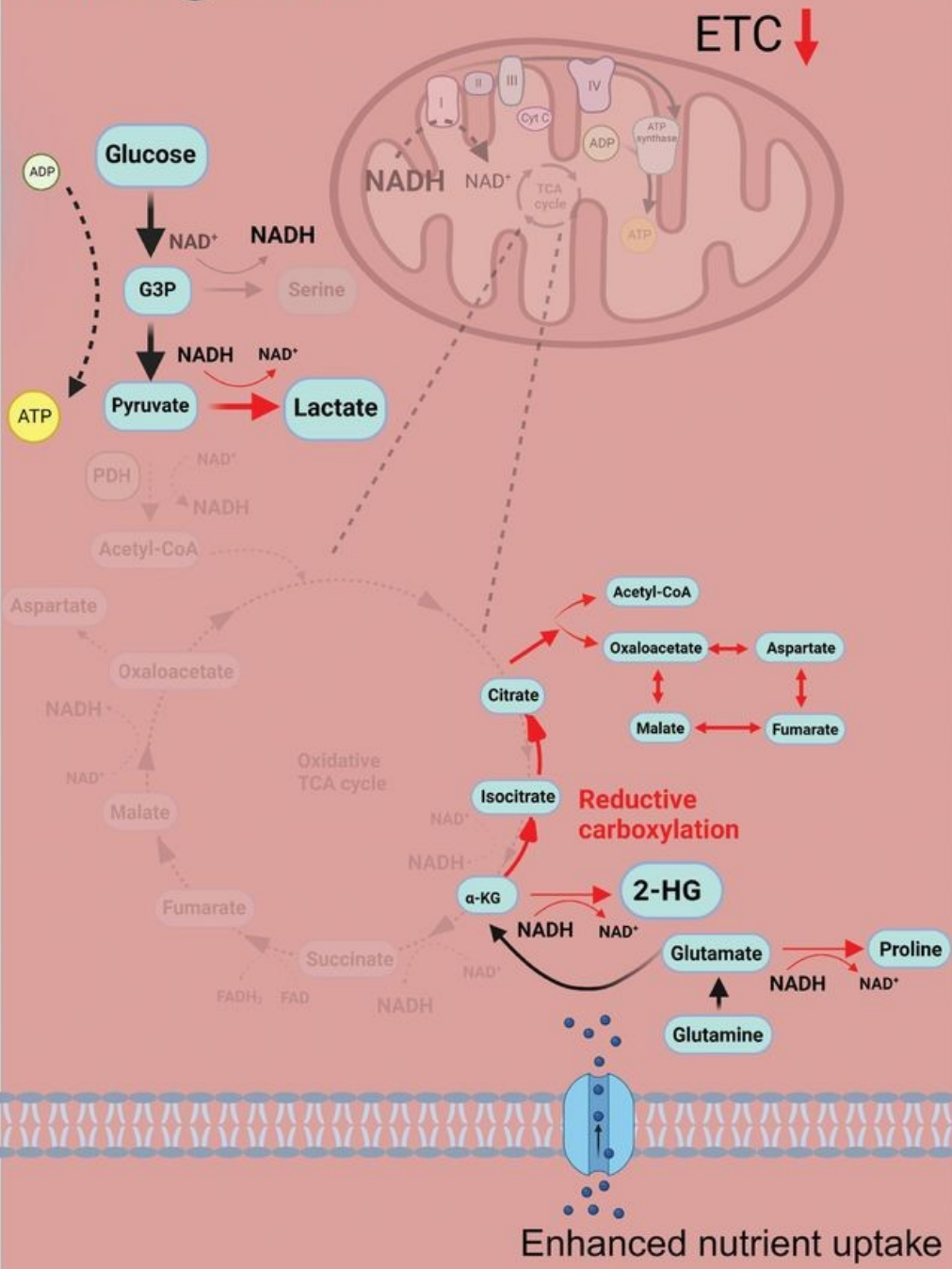
- Příjem FA prostřednictvím CD36 (glykoprotein vázající FA)
- Tvorba Acetyl-CoA β-oxidací z FA v mitochondriích
- Tvorba citrátu citrát syntázou z Acetyl-CoA

**CPT1** Karnitin palmitoyltransferáza 1 – vazbou Acetyl-CoA/FA na karnitin, umožňuje jejich transport do mitochondrií

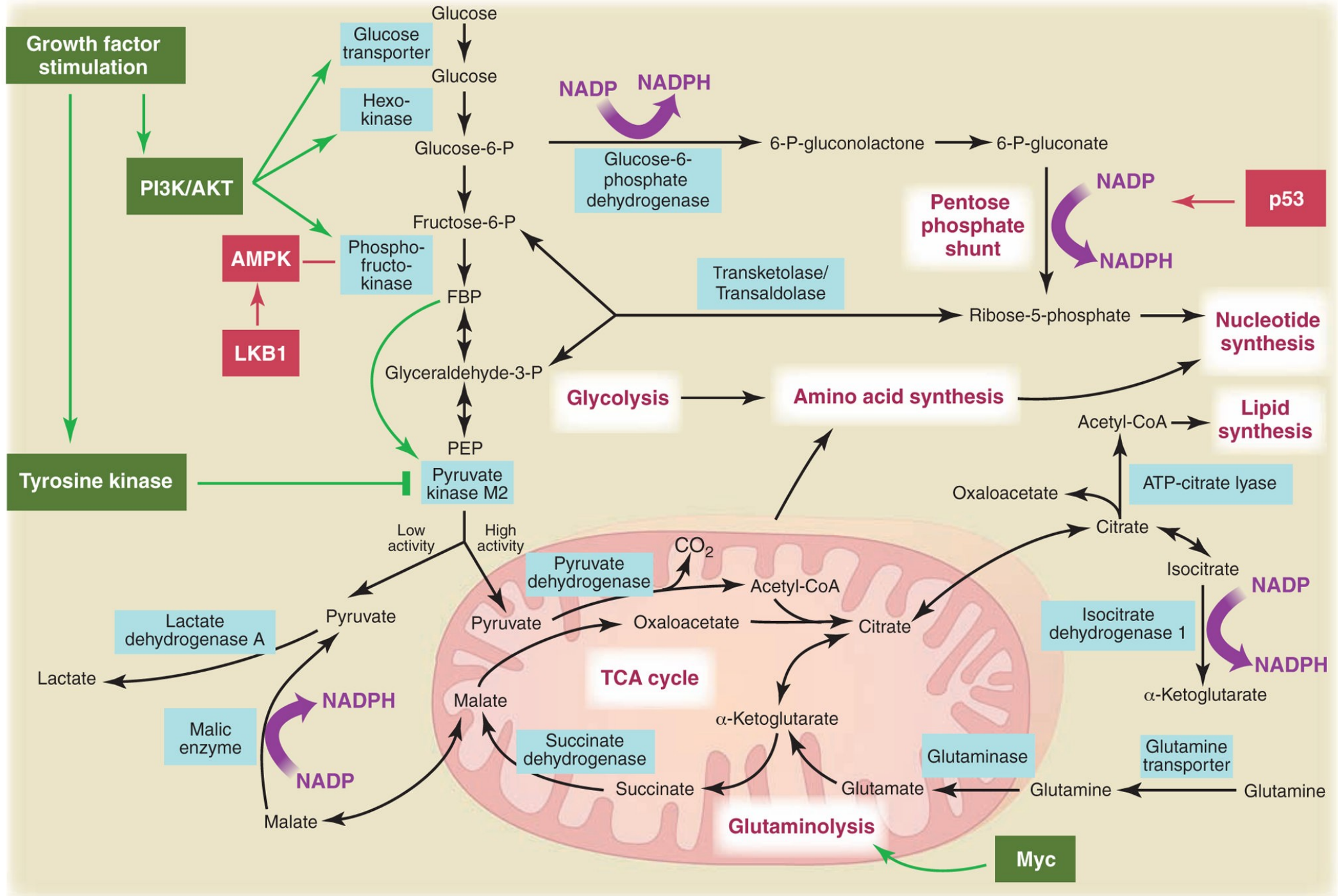
# Normal



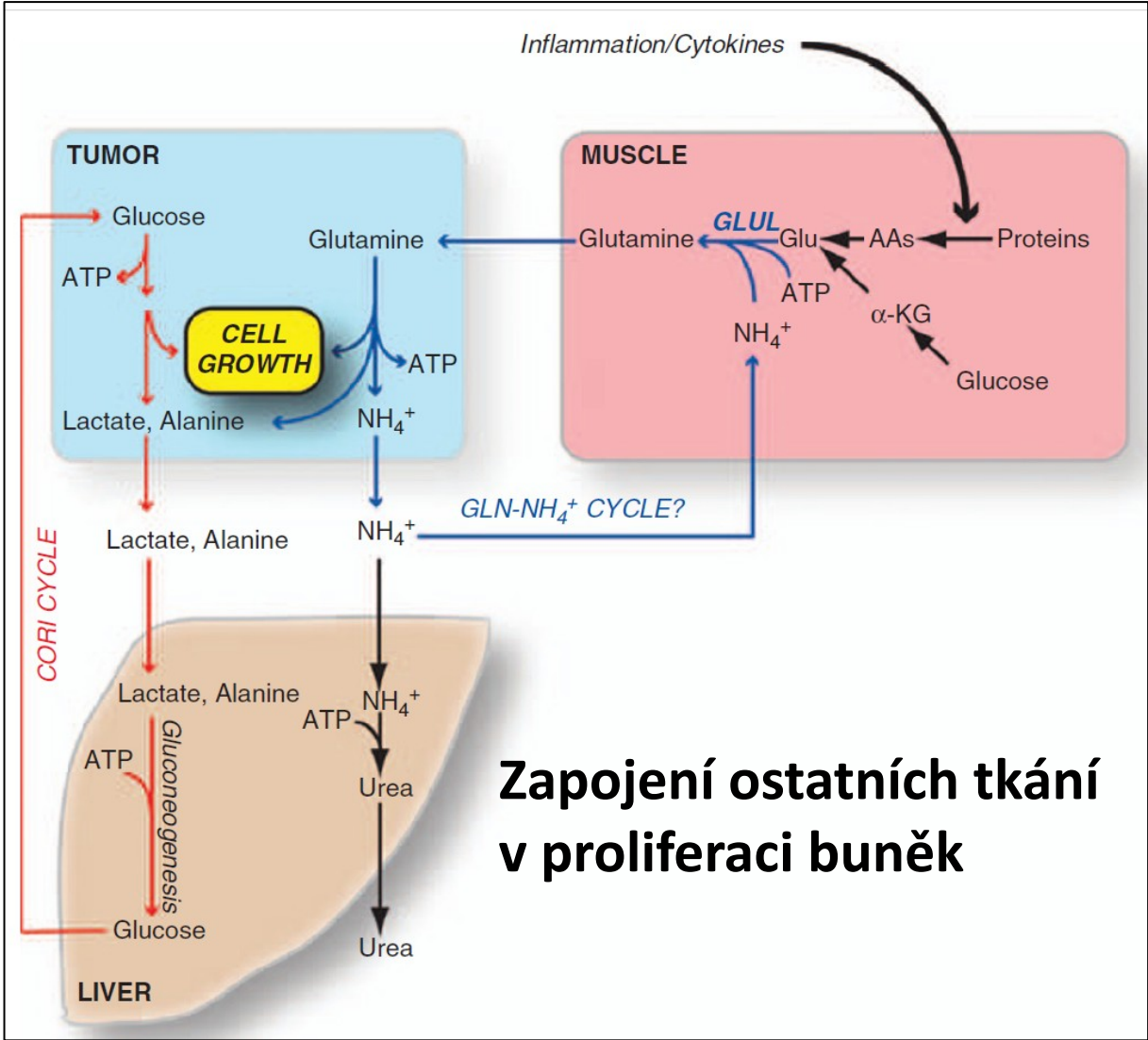
# Warburg effect



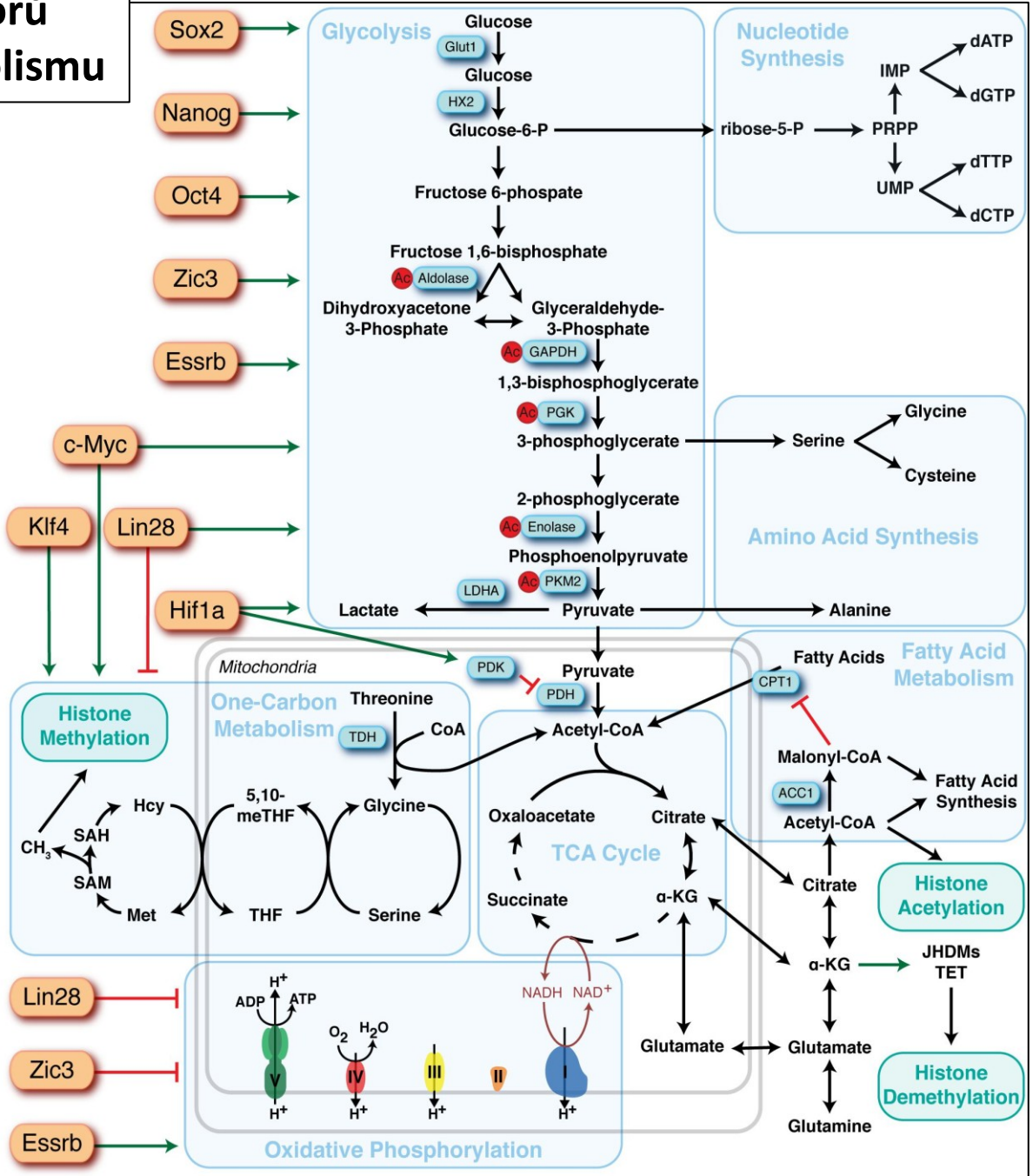




# Příklady transkripčních faktorů spojených s regulací metabolismu



**Zapojení ostatních tkání v proliferaci buněk**

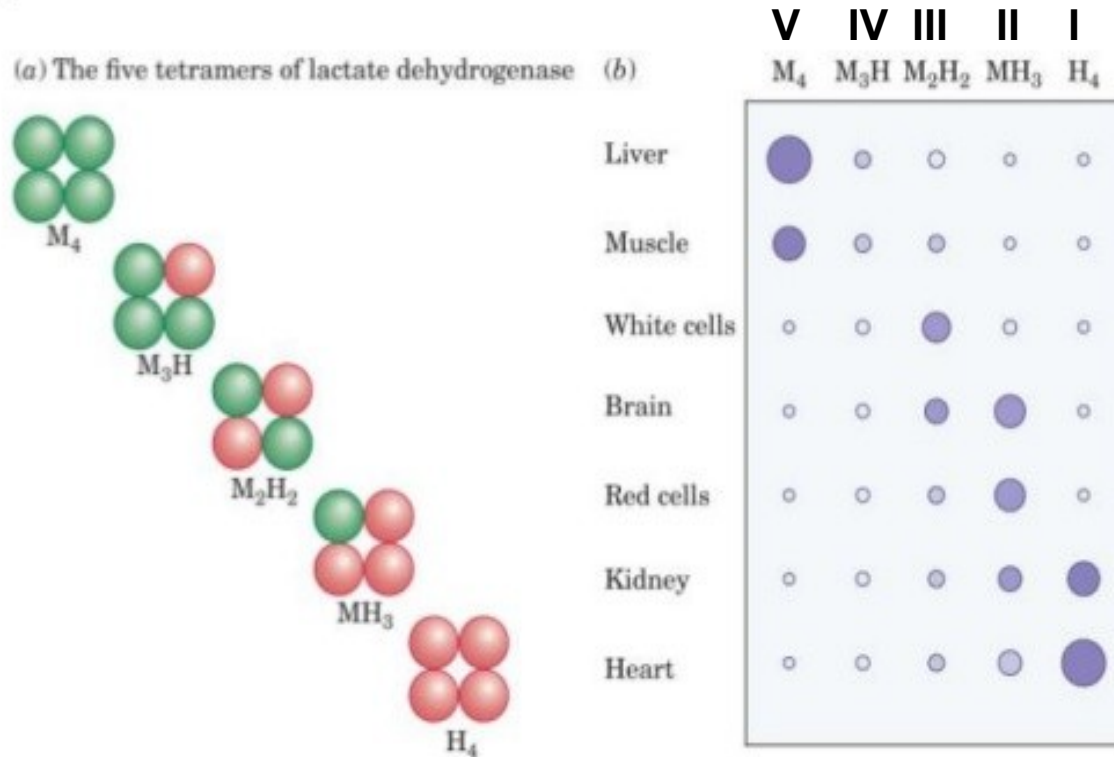


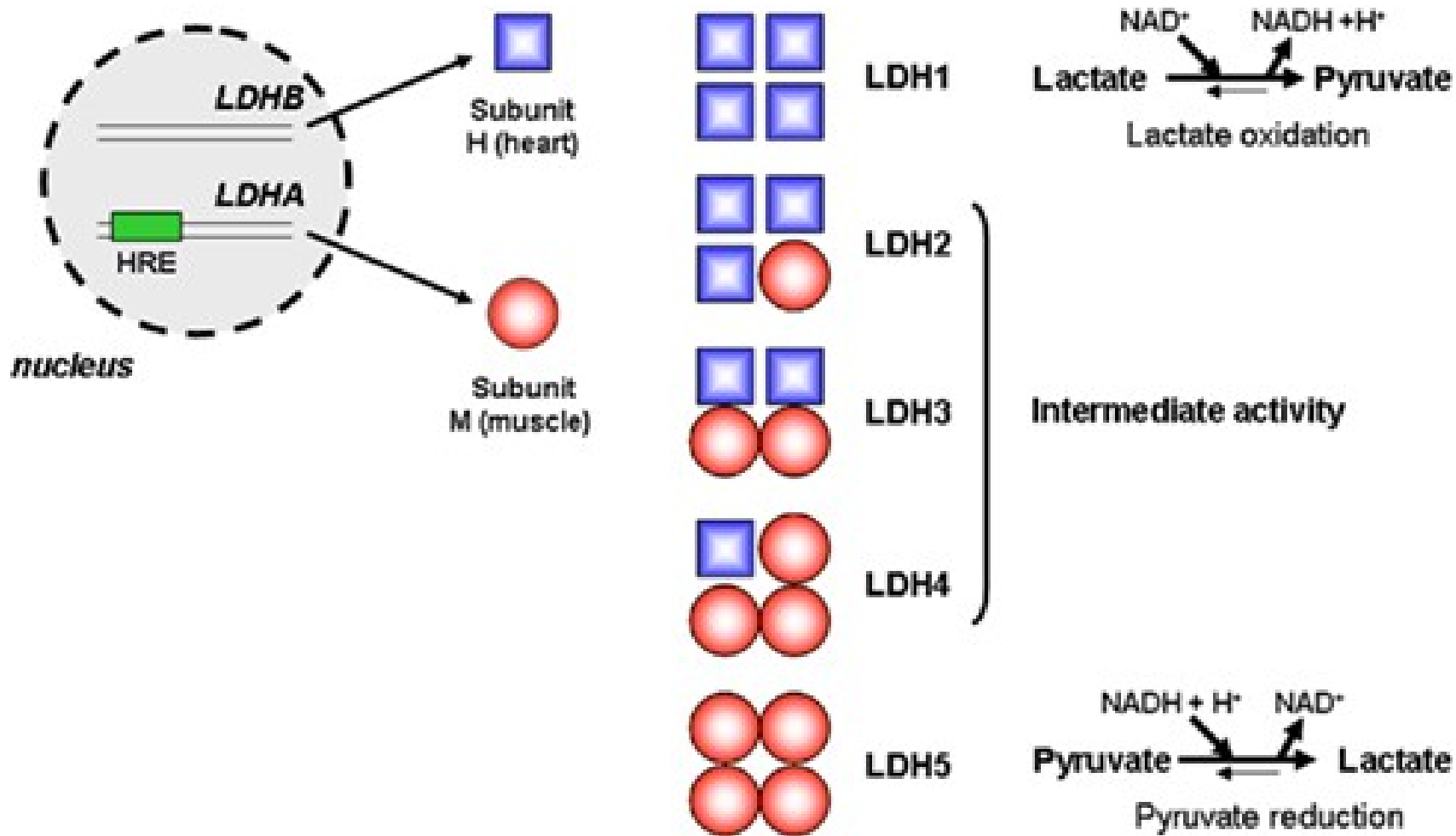
# Allosterická regulace laktát dehydrogenázy (LDH)

laktát  $\rightleftharpoons$  pyruvát na tkáňové úrovni (savci)

## Enzyme Regulation

The isozymes of lactate dehydrogenase (LDH). The electrophoresis gel depicts the relative isozyme types found in different tissues.





Organ	LDH activity (U/g)	% Activity of isozymes					
		LDH-X	LDH-V	LDH-IV	LDH-III	LDH-II	LDH-I
Liver <sup>b</sup>	451 ± 100		96.2	3.6			
Heart	426 ± 180		10.8	21.8	29.9	28.1	10.5
Kidney	364 ± 93		10.1	19.8	30.3	28.5	11.2
Brain	113 ± 15		9.4	24.4	28.5	22.6	14.8
Spleen <sup>b</sup>	75 ± 21		95.8	4.1			
Testis	66 ± 13	32.5	4.9	5.2	12.4	28.3	16.1
Serum	2.7 ± 0.9 <sup>c</sup>		97.1	1.9	0.7	0.1	



# Fagocyty – fagocytósa/oxidativní vzplanutí

- Stimulace fagocytů

(protilátky s antigenem, komplement, cytokiny, opsoniny, LPS,...)

- Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů a oxidů dusíku

(likvidace patogenu ve fagosomu)

- Nárůst spotřeby  $O_2$

- Zvýšení příjmu glukósy (pentózový cyklus)

- Utilizace argininu (NO, ONOO)

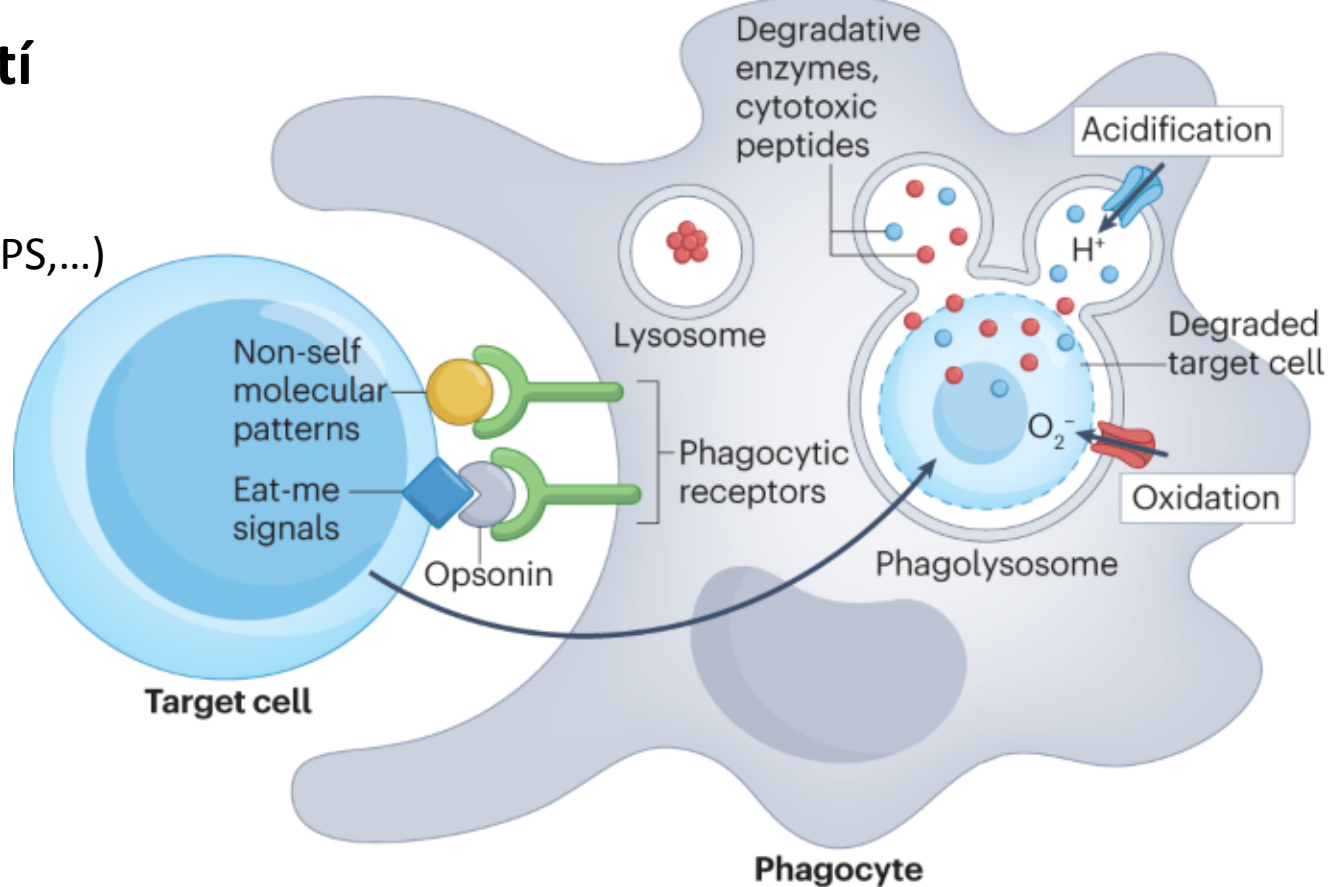
- Zvýšení produkce NADPH (např. pentózový cyklus)

- Nárůst spotřeby energie

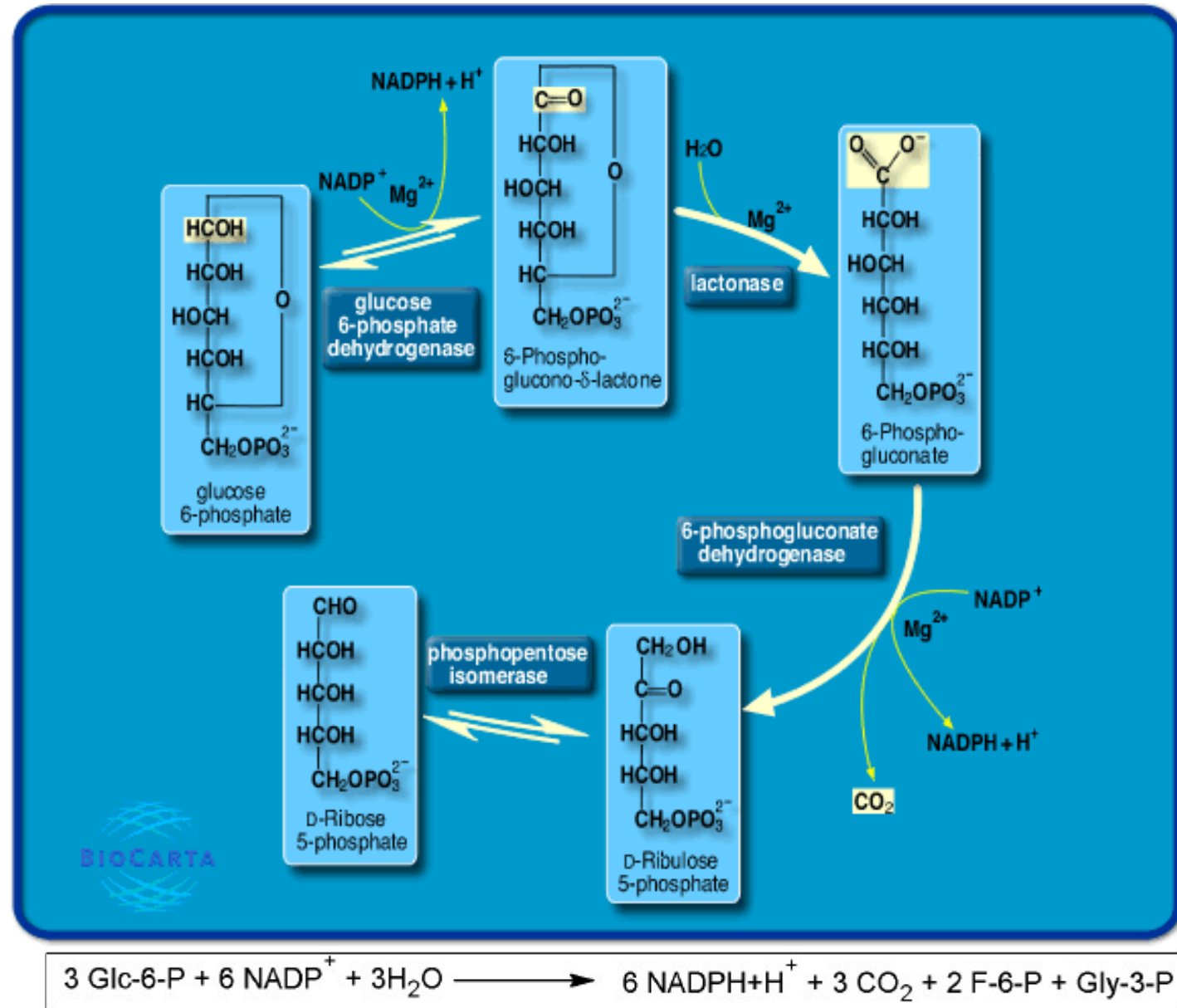
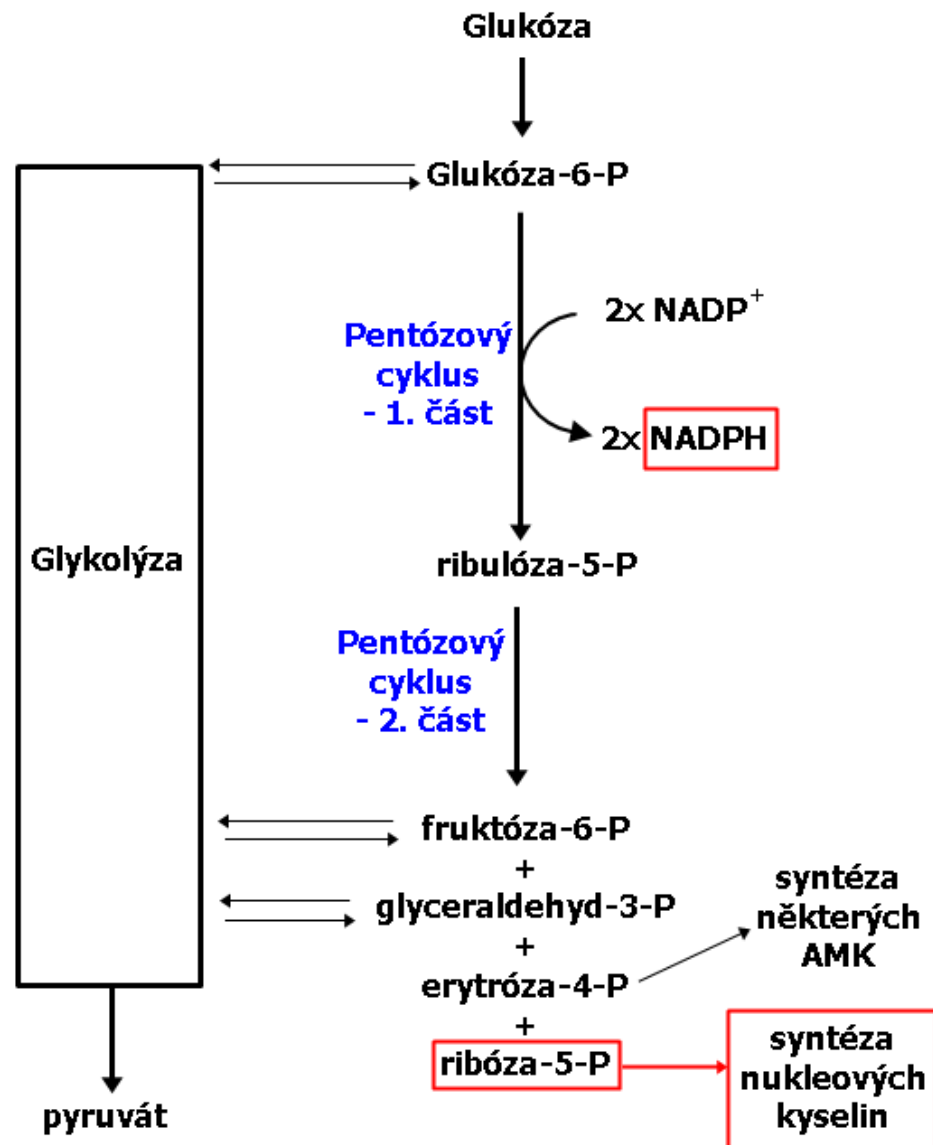
- Zvýšení ochrany proti ROS/NOS – antioxidační mechanismy (metabolismus glutathionu a thiredoxinů)

- Úloha na NADPH závislých oxidáz (NOX1-4, DUOX1,2), fagocyty **NOX2**

- Úloha NO syntázy (NOS; e-endoteliální, n-neurální, i-indukovaná), fagocyty **iNOS**



# Pentózový cyklus

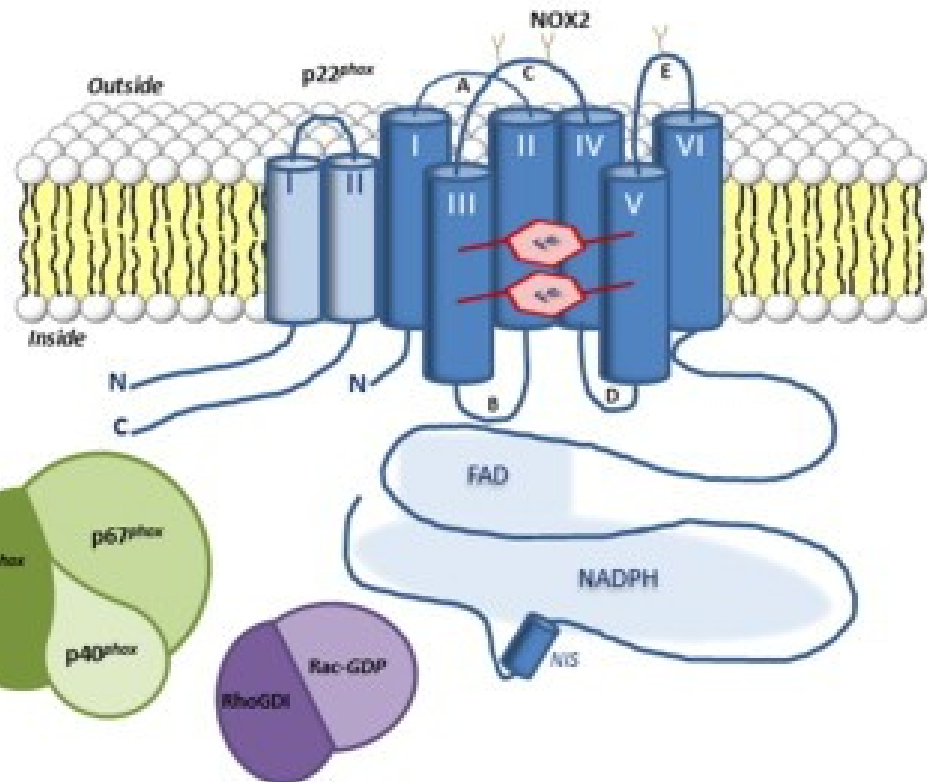




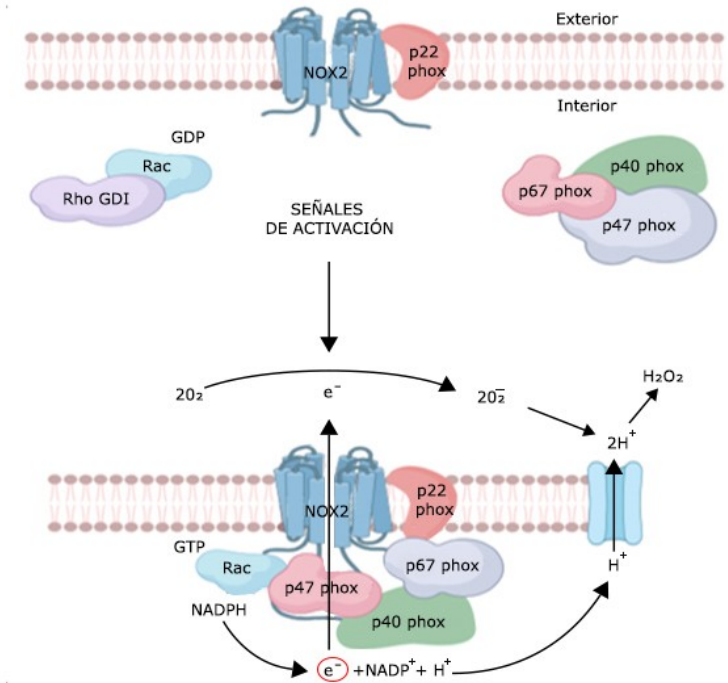
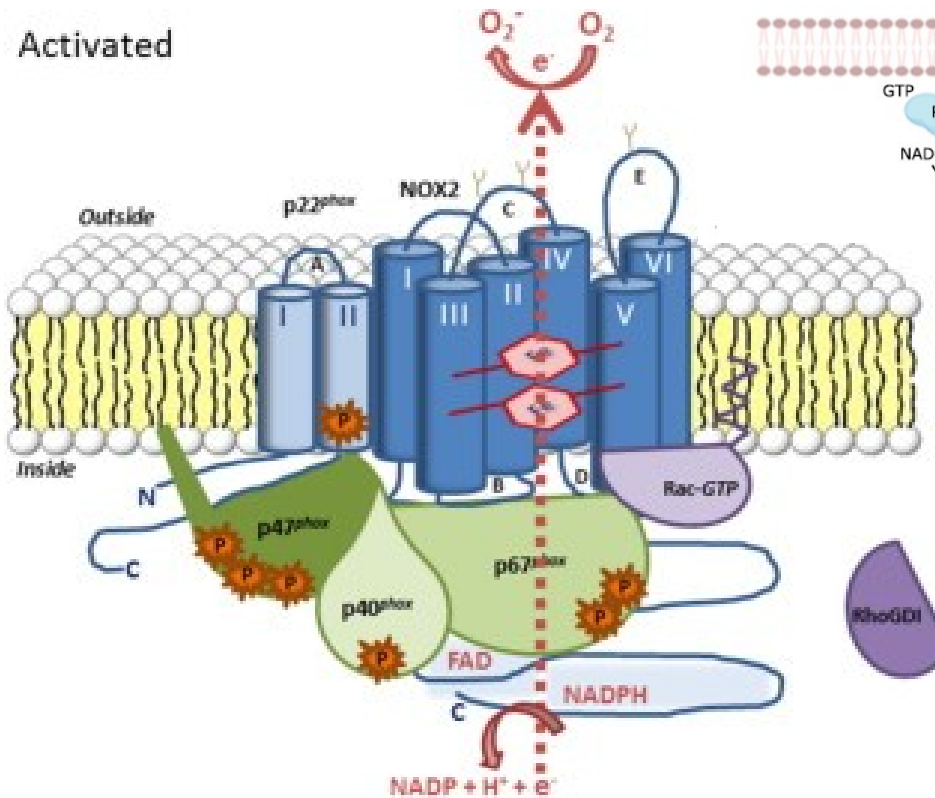
# Na NADPH závilá oxidása

- Tvorba superoxidu  $O_2^-$  a peroxidu vodíku  $H_2O_2$

Resting



Activated



## Výběr ROS produktů oxidativního vzplanutí

Superoxidový anion -  $O_2^{\cdot-}$  (NOX)

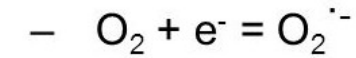
Peroxid vodíku -  $H_2O_2$  (superoxid dismutáza)

Singletový kyslík -  $^1O_2$  (superoxid dismutáza)

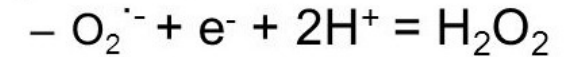
Kyselina chlorna -  $HOCl$  (myeloperoxidáza)

Hydroxylový radikál –  $OH^{\cdot}$

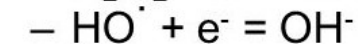
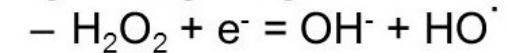
- **superoxid**



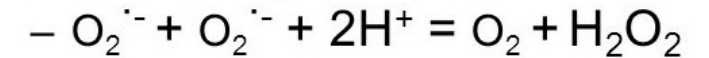
- **peroxid vodíku**



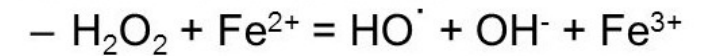
- **hydroxylový radikál**



- **dizmutace peroxidu**



- **Fentonova reakce**



Vznik superoxidu



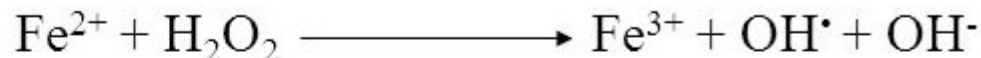
Superoxiddismutáza



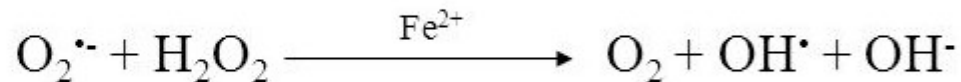
Myeloperoxidáza



Fentonova reakce



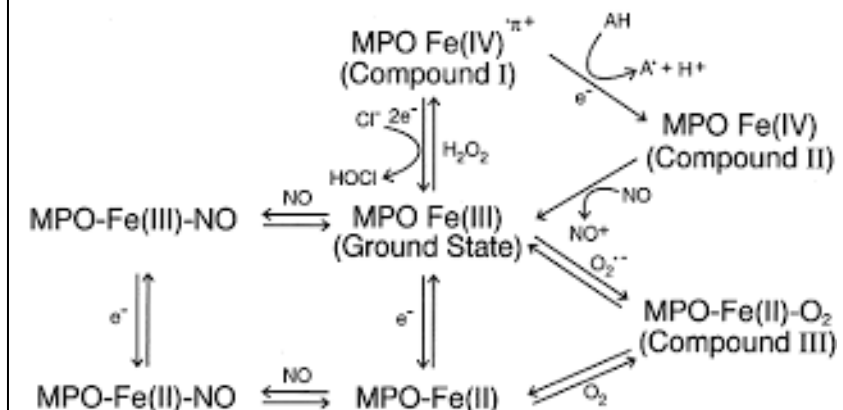
Haberova-Weissova reakce



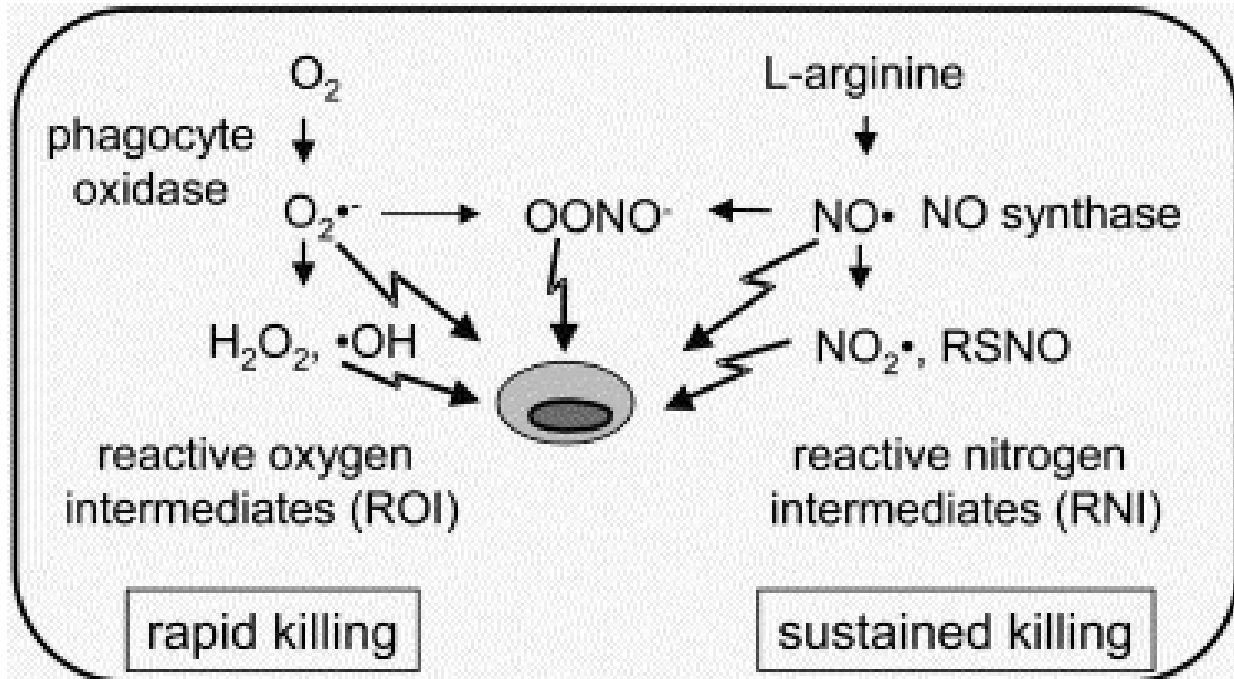
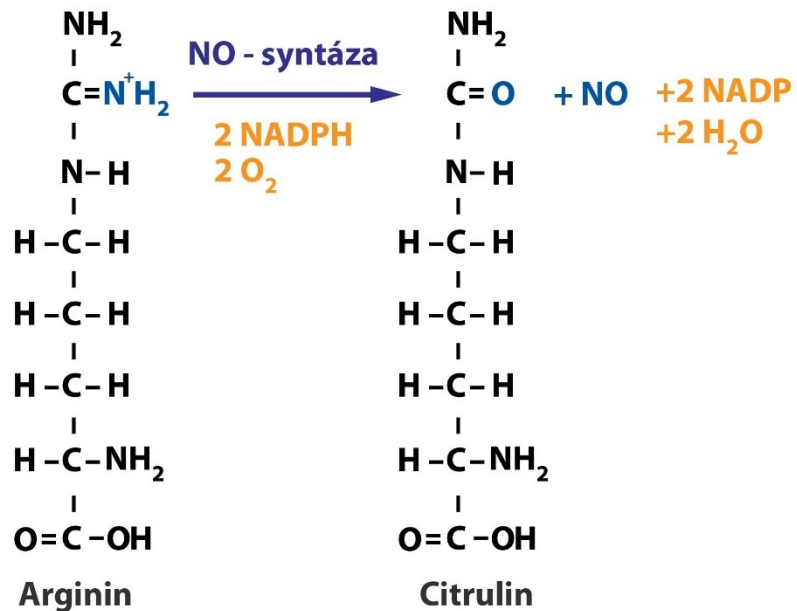
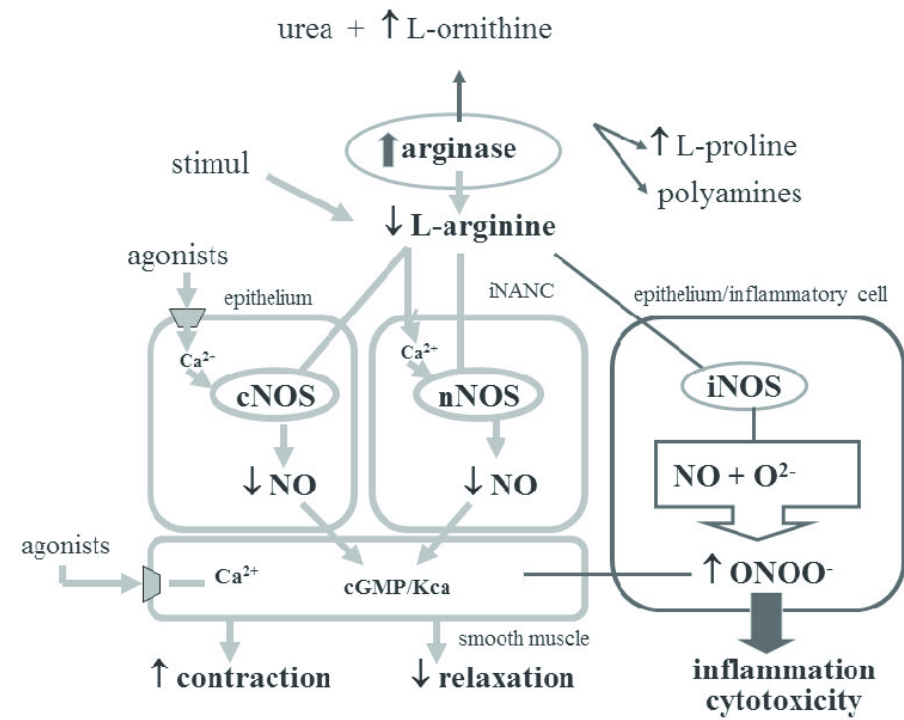
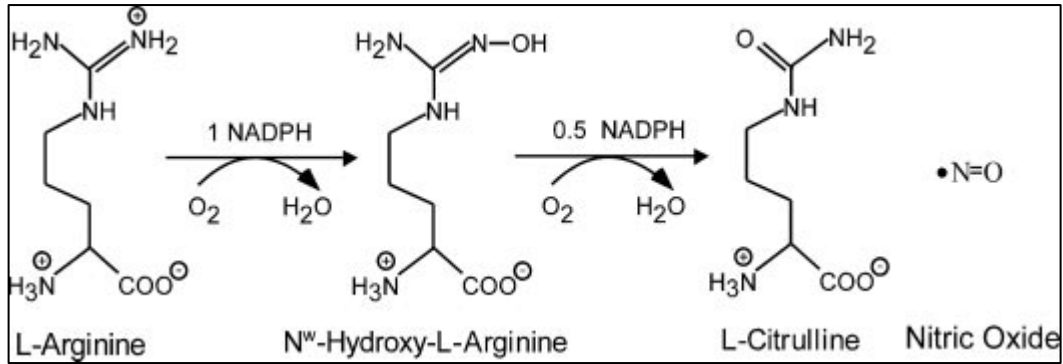
Vznik peroxynitritu



### Myeloperoxidáza - MPO

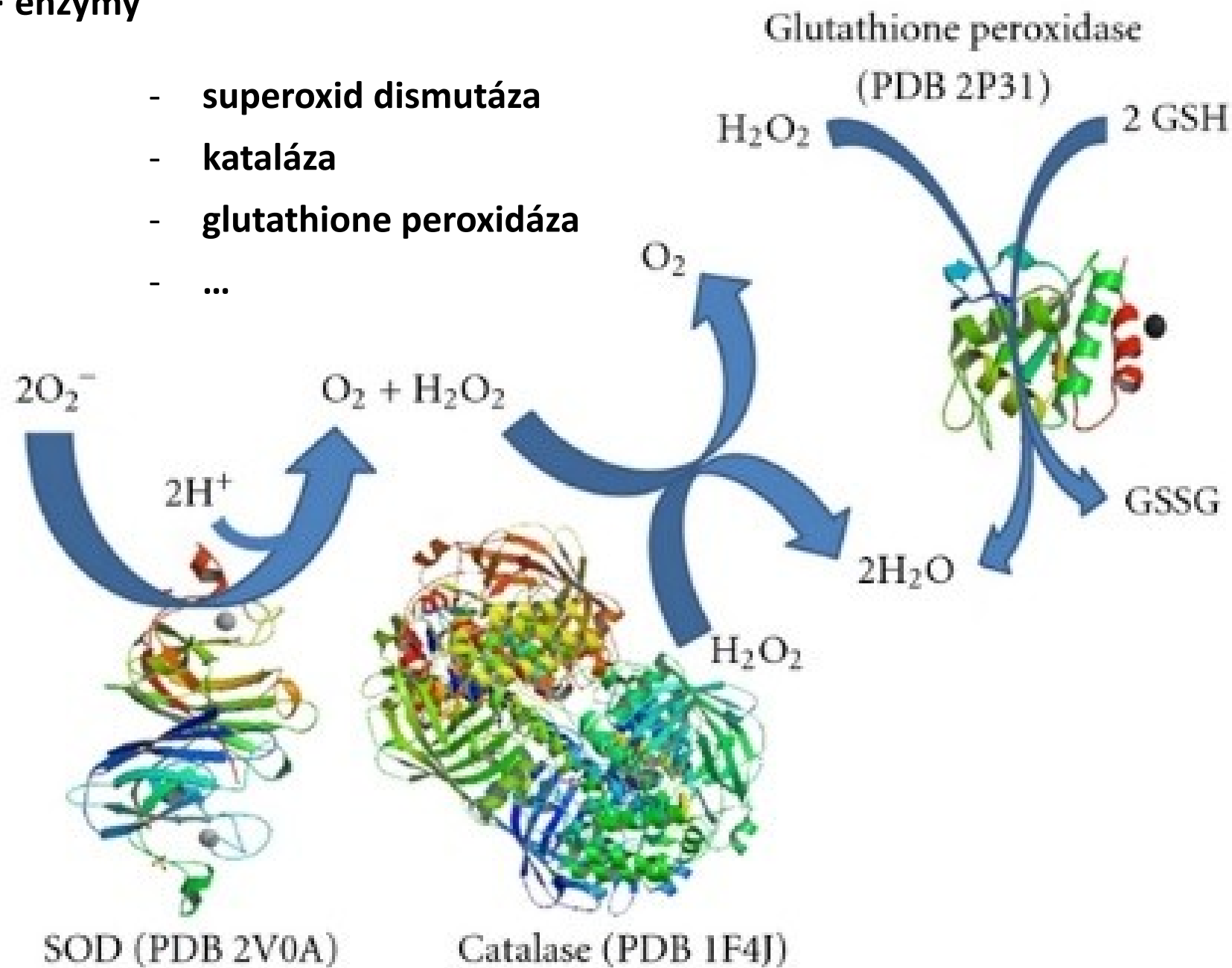


# NO syntáza – produkce NO



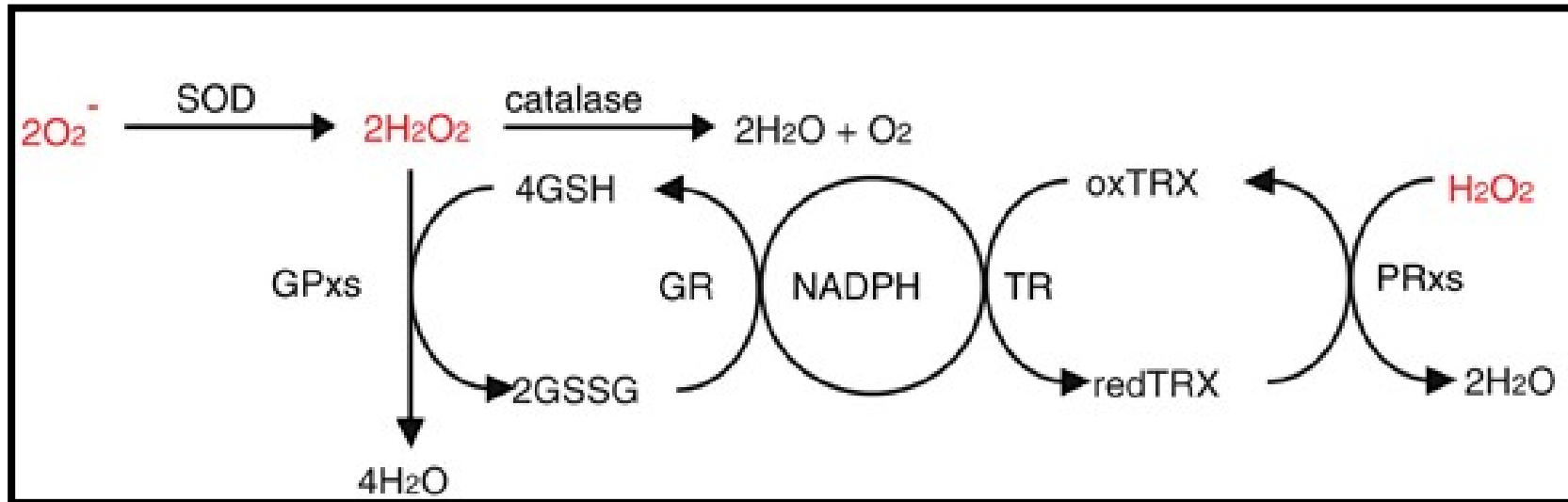
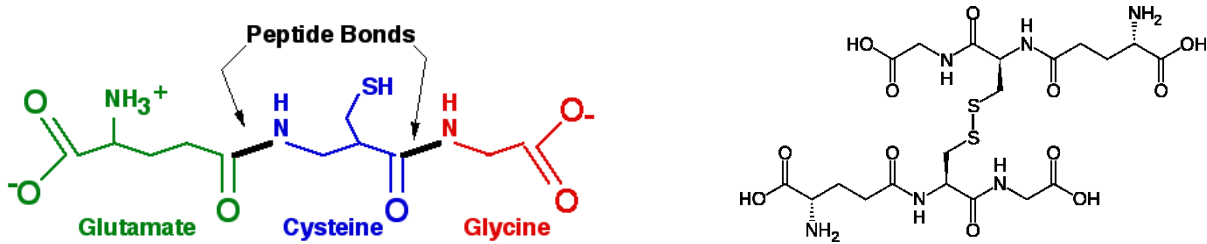
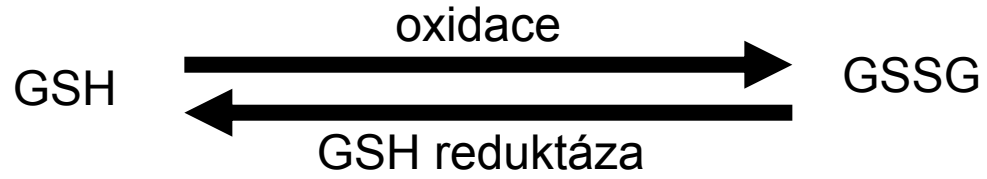
## Detoxikace ROS - enzymy

- superoxid dismutáza
- kataláza
- glutathione peroxidáza
- ...



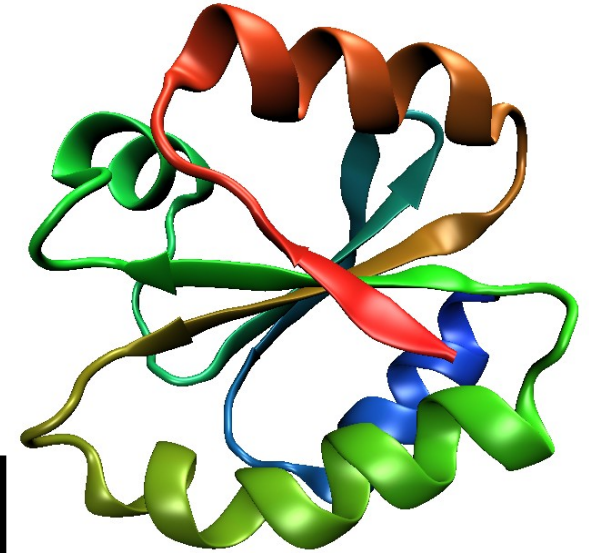
# Detoxikace ROS – neenzymatické antioxidanty

**Glutathion** ( $\gamma$ -glutamyl-cystinyl-glycine; GSH)



# Thioredoxiny (Trx1,2,3) a glutaredoxiny (Grx1,2)

- malé peptidy s aktivním disulfidovou skupinou)
- Trx reduktázy (3): Trx1 a TrxR1 – cytosol, nukleus  
Trx2 a TrxR2 – mitochondrie
- Grx reduktázy (2): Grx2 a GrxR2 – mitochondrie, nukleus



- + kys. Askorbova (vit. C)
- + tocoferol, (vit. E)
- + kyselina močová
- +...

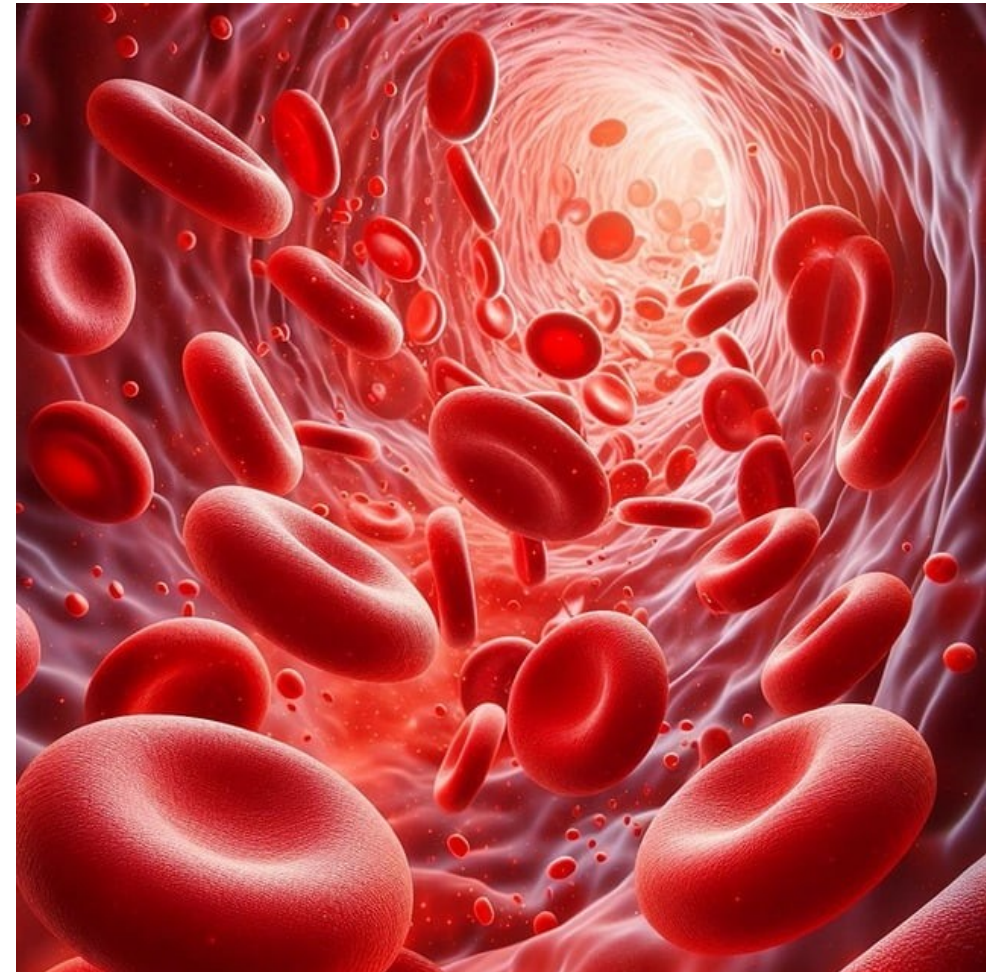


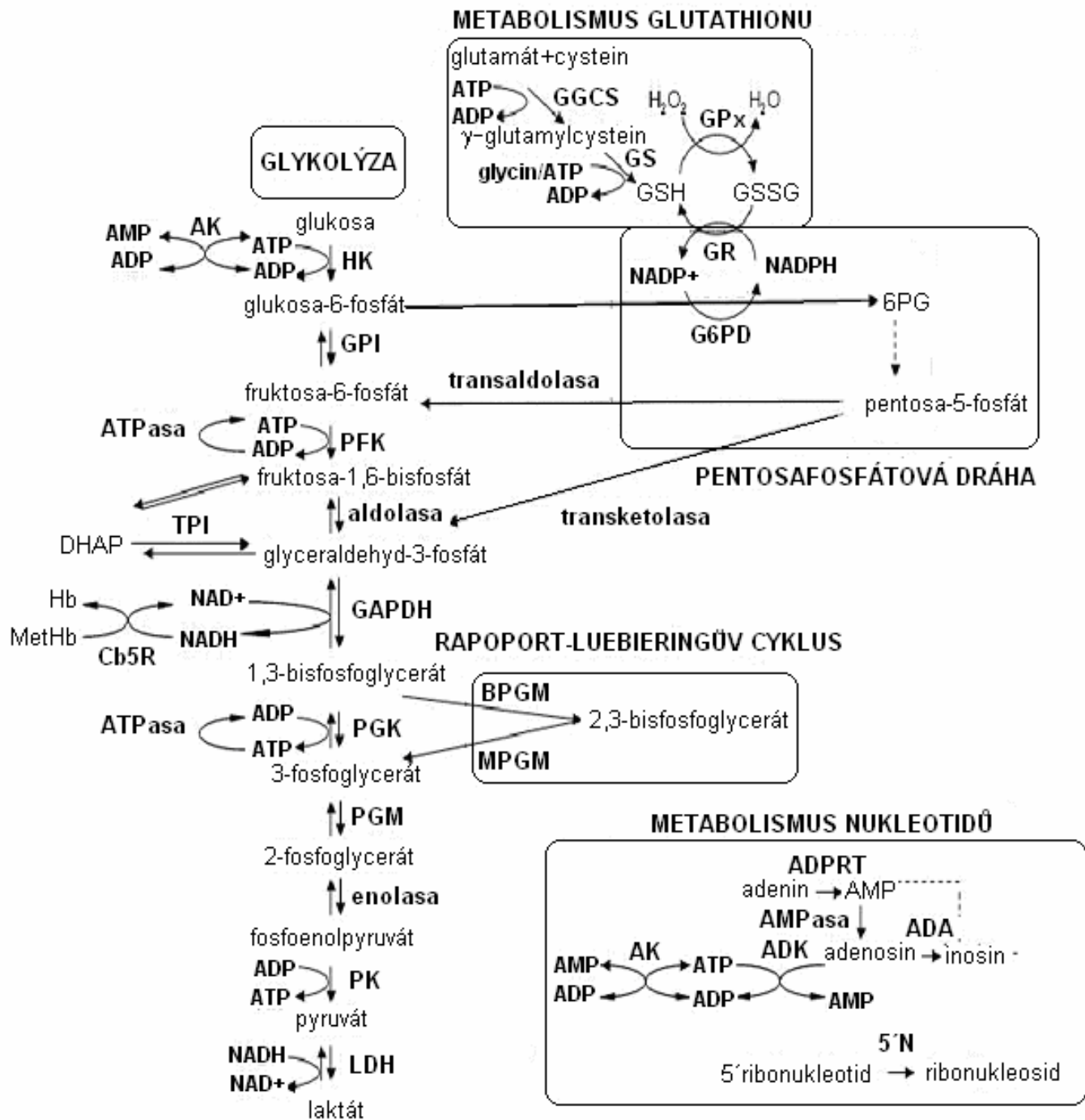
# Erythrocyty<sub>savčí</sub> - přenos O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub>, zapojení do acidobazické homeostáze

Nemají jádro, mitochondrie, endoplasmatické retikulum => Nemají možnost proteosyntézy (120 dnů) a OXPHOS

## Metabolismus erythrocytu

- **Glykolýza** (ATP)
- **Pentózový cyklus** (regenerace a produkce glutathionu,..)
- **Metabolismus adenosinu** (ATP; aktivace trombocytů)
- **Rapoport-Leubering cyklus** (Rapoport-Leubering shunt)
- (Syntéza hemu/porphyrinu – erytroblast/retikulocyt)



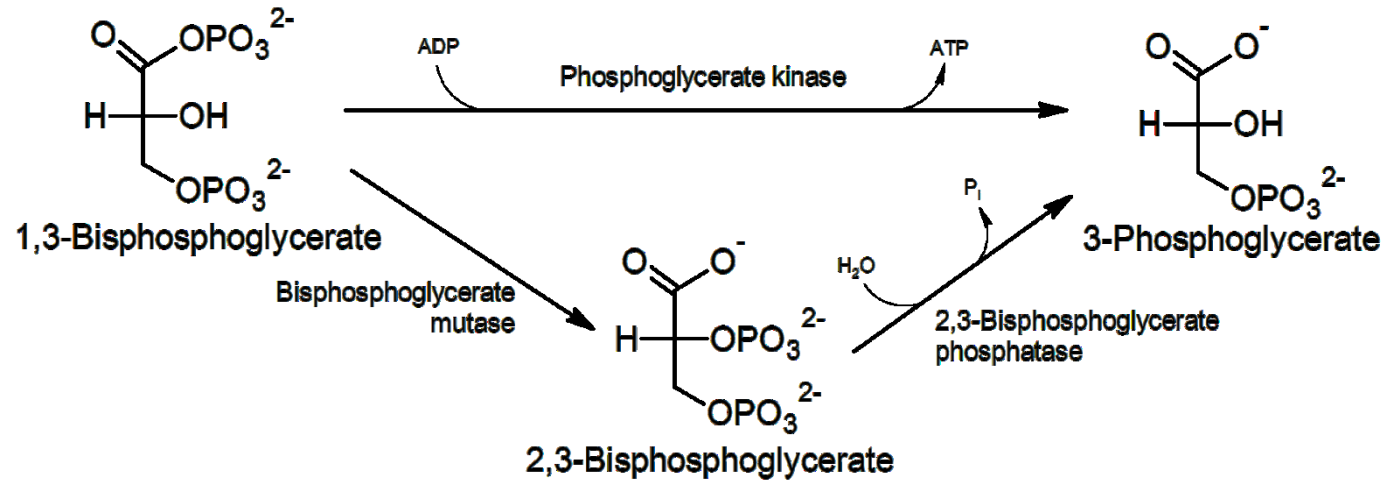
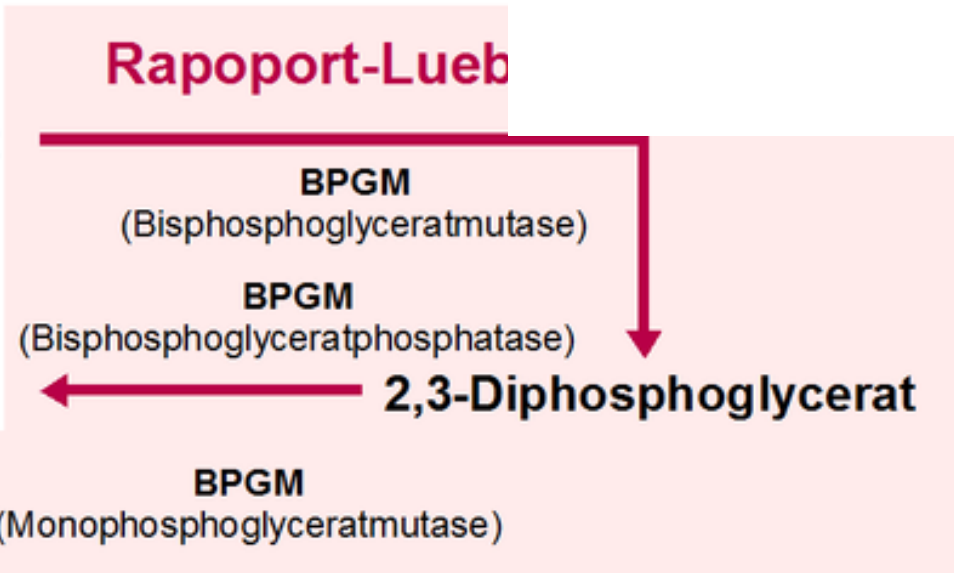
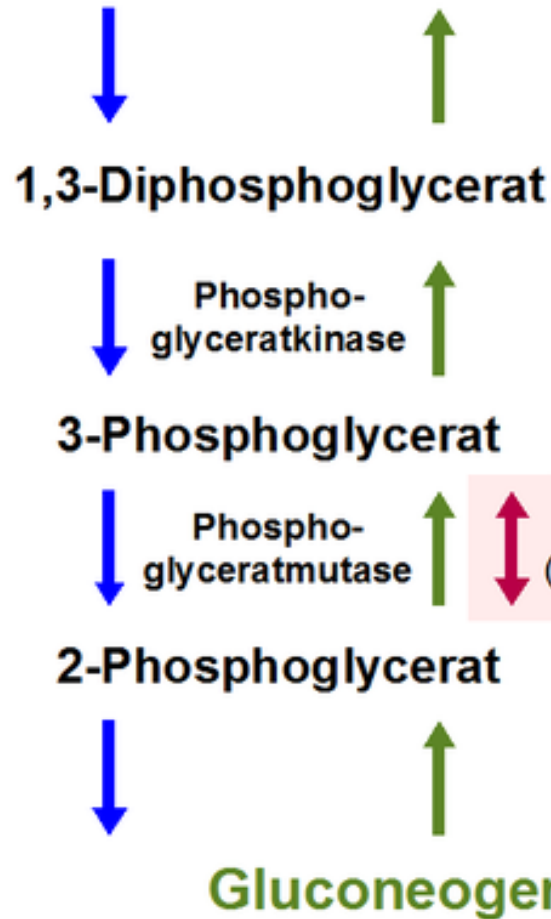


## Metabolické dráhy v erythrocytu

AK-adenylátkinasa, HK - hexokinasa, GPI - glukosa-6fosfátisomerasa, PFK - fosfofruktokinasa, GAPDH - glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa, PGK - fosfoglycerátkinasa, PGM - fosfoglycerátmutasa, PK -pyruvátkinasa, LDH - laktátdehydrogenasa, TPI - triosafosfátisomerasa, Cb5R - cytochrom-b5-reduktasa, BPGM - bisfosfoglycerátmutasa, MPGM - monofosfátglycérátmutasa, GGCS -  $\gamma$ -glutamylcysteinsynthetasa, GS - glutathionsynthetasa, GPx - glutathionperoxidasa, GR - glutathionreduktasa, G6PD - glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, 6PG - 6-fosfoglukonolakton, ADPRT - adeninfosforibosyltransferasa, ADK - adenosínkinasa, ADA - adenosindeaminasa, 5'N - 5'-nukleotidasa, AK - adenylátkinasa, GSH - redukovaný glutathion, GSSG – oxidovaná forma glutathionu (upraveno dle Kaushansky et al., 2010).

# Rapoport-Lueberingův cyklus

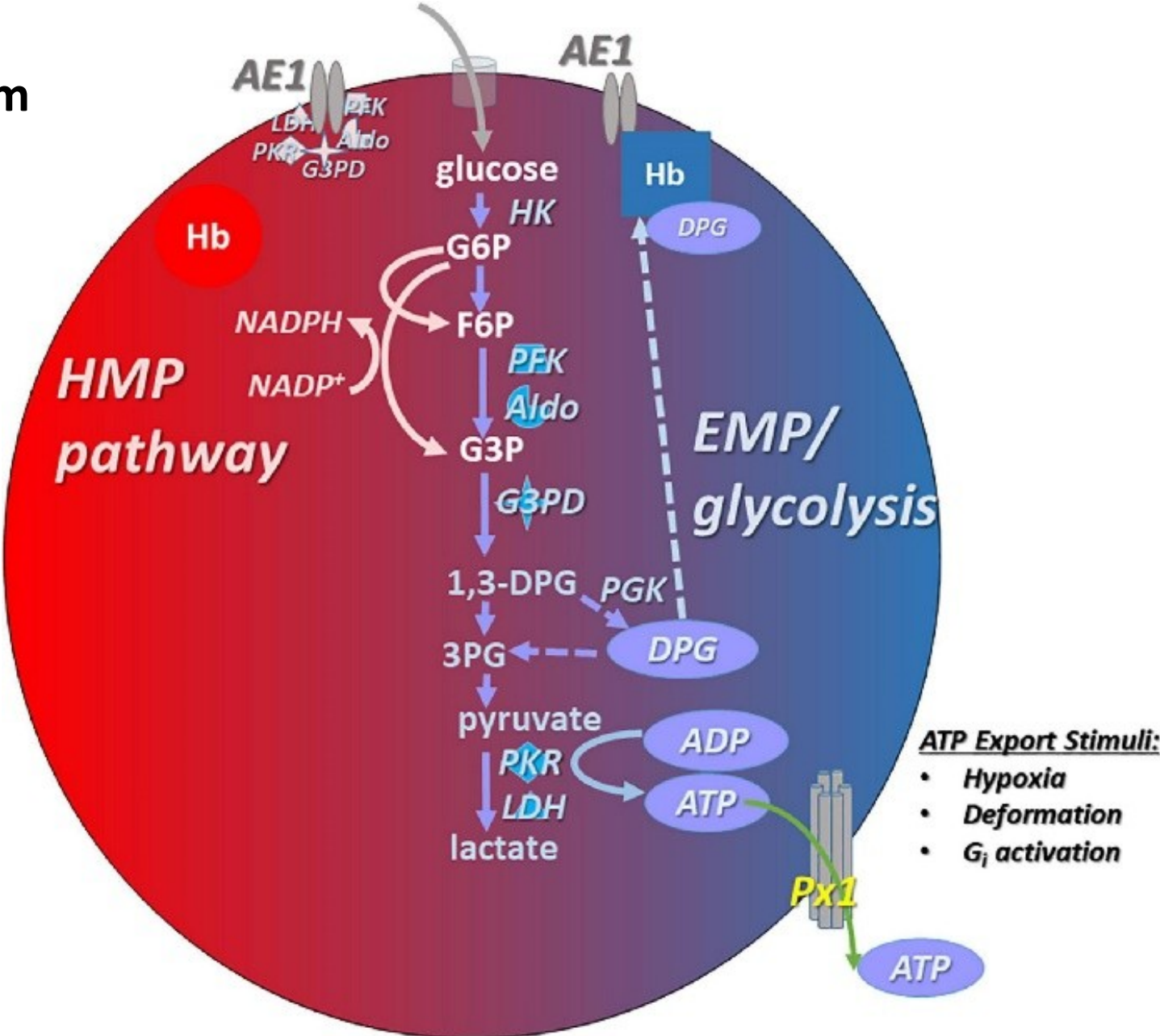
Glykolyse



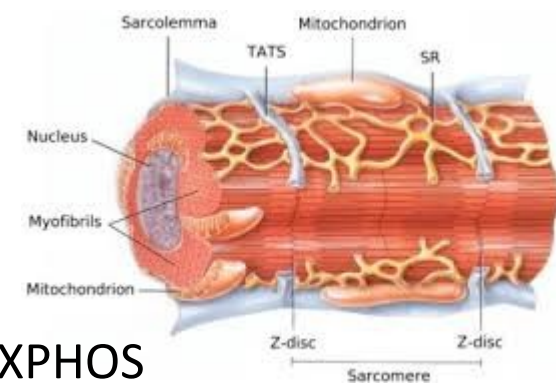
2,3-B(D)PG – podporuje uvolnění  $\text{O}_2$  z hemoglobinu  
 - Intenzita syntézy závisí na pH



# Produkce ATP erythrocytem



# Myocyty



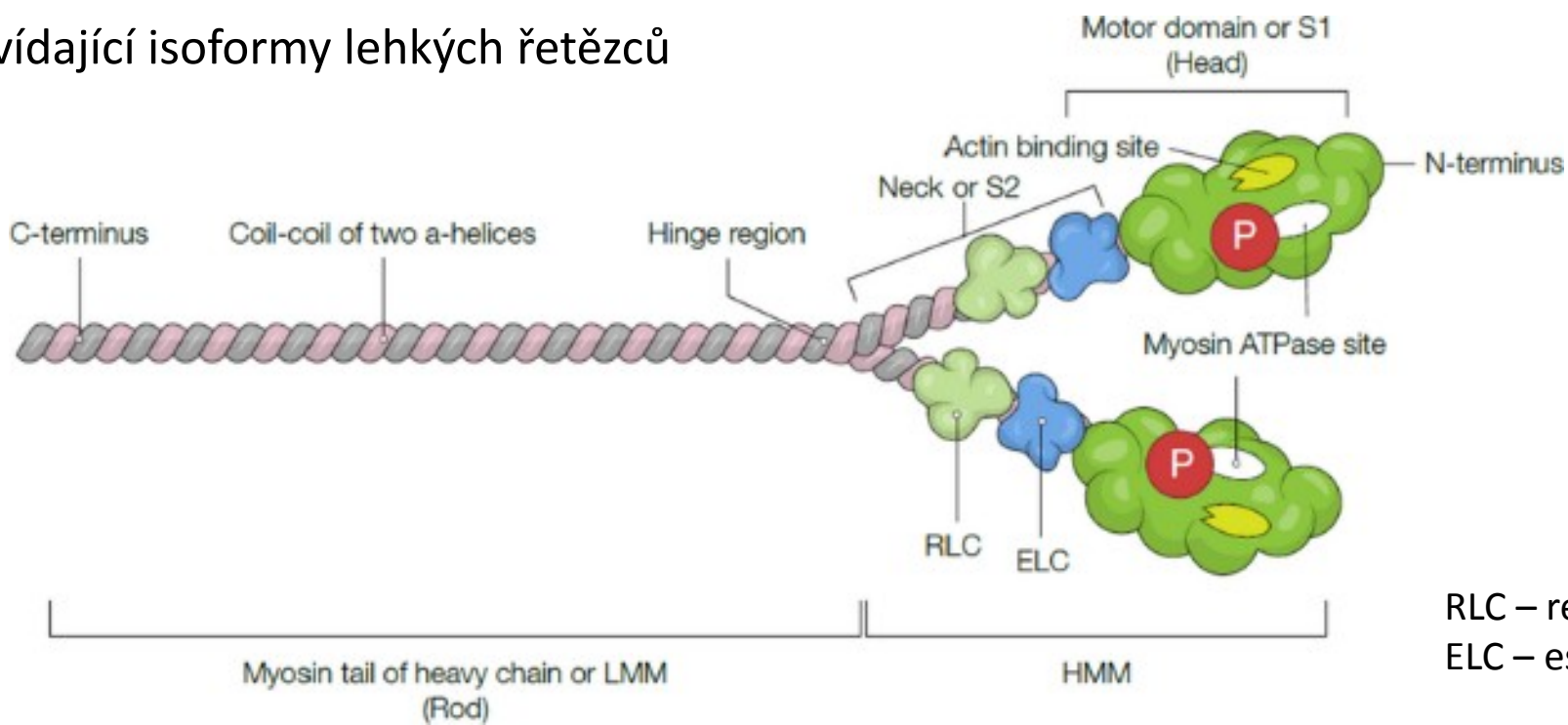
Preference produkce ATP => práce, dominuje OXPHOS

- Ale různé podmínky / dostupnost zdrojů + různé požadavky
- Rychle, silné svaly x pomalé vytrvalé => nastavení metabolických drah – glykolýza x OXPHOS
- Nastavení buňky - isoformy myozinů, četnost a zralost mitochondrií

+/- mitochondrie – Glykolýzy (rychlost) x OXPHOS (vytrvalost) => nároky na redoxní rovnováhu

Různé myoziny – isoformy těžkých řetězců – různá sensitivita na hladinu ATP, Ca<sup>2+</sup>, pH (laktát)

+ odpovídající isoformy lehkých řetězců



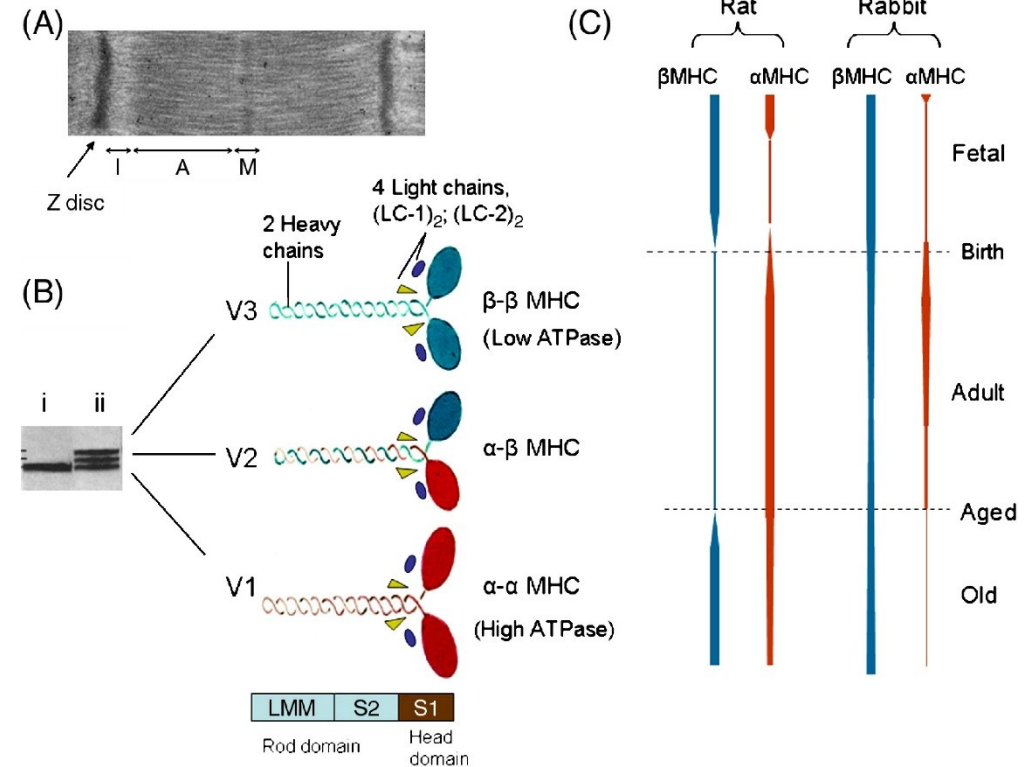
RLC – regulační lehký řetězec  
ELC – esenciální lehký řetězec

# Isoformy těžkých řetězců myosinu u člověka

## Zastoupení MHC6/7 (a/b) myokardu u potkana a králíka během vývoje

Gene	Ch.	Alias	Muscle type
MYH16	7	MyHC-masticatory	Specialized*
MYH15	3	N.S.	Specialized
MYH7b	20	N.S.	Specialized
MYH13	17	MyHC-extraocular	Specialized
MYH8	17	MyHC-perinatal	Developmental
MYH4	17	MyHC-IIb	Fast skeletal
MYH1	17	MyHC-IIx/d	Fast skeletal
MYH2	17	MyHC-IIa	Fast skeletal
MYH3	17	MyHC-embryonic	Developmental
MYH7	14	$\beta$ -MyHC	Cardiac and slow skeletal
MYH6	14	$\alpha$ -MyHC	Cardiac

\*MYH16 is a pseudogene in humans, but is expressed in specialized muscles of other vertebrates.



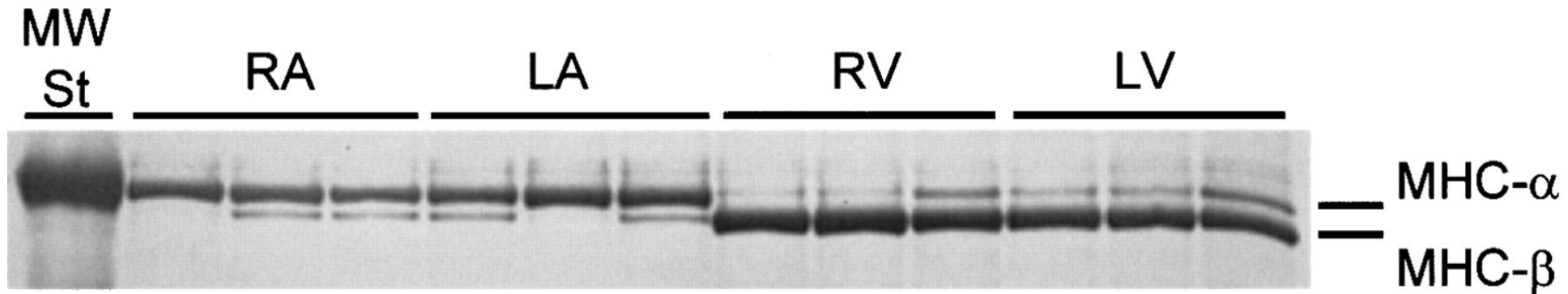
# MYOKARD

Pomalý myokard – dominance MHC-(7) $\beta$  – vysoká afinita k ATP a k Ca<sup>2+</sup>, ale pomalejší reakce

Rychlý myokard – dominance MHC-(6) $\alpha$  - nízká afinita k ATP a k Ca<sup>2+</sup>, ale rychlejší reakce

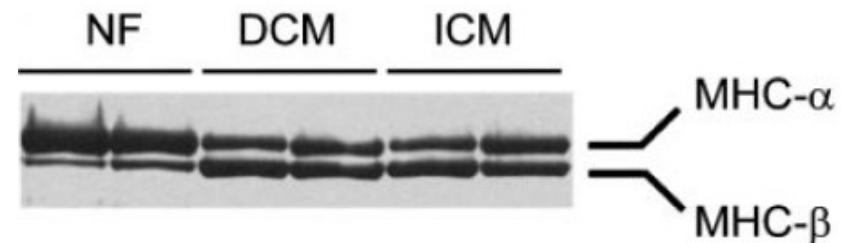
- Specifita druhová: rychlý myokard malí savci, pomalý myokard velcí savci
- Specifita lokální: předsíně (rychlý MHC) x komory (pomalý MHC)

V průběhu embryonálního/fetálního vývoje převaha pomalého myokardu,



The myosin heavy chain (MHC) region of a silver-stained SDS gel on which were loaded 3 fetal samples of the following: right atrium (RA) at gestational (from left to right) day 87 (fetus 328), day 94 (fetus 323), and day 101 (fetus 321); left atrium (LA) at gestational day 87 (fetus 328), day 94 (fetus 323), and day 108 (fetus 322); right ventricle (RV) at gestational day 87 (fetus 300), day 105 (fetus 289), and day 87 (fetus 328); and left ventricle (LV) at gestational day 82 (fetus 329), day 87 (fetus 328), and day 87 (fetus 300). A set of molecular weight standards (MW St) containing myosin was loaded in the first lane.

Reiser et al., 2001

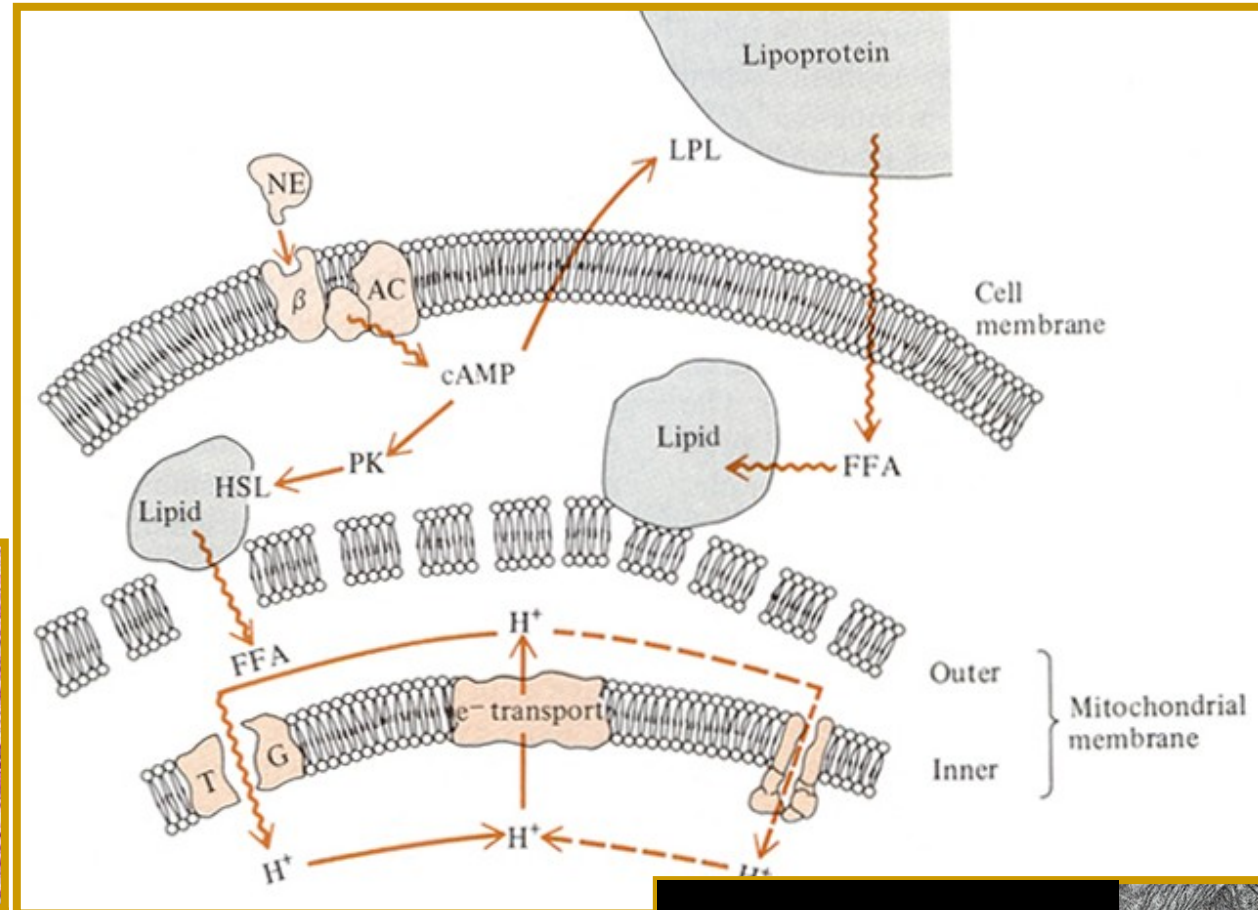


The MHC region of a silver-stained SDS gel on which were loaded samples of adult left atrium from 2 nonfailing (NF) individuals and 2 individuals with dilated cardiomyopathy (DCM) or ischemic cardiomyopathy (ICM).

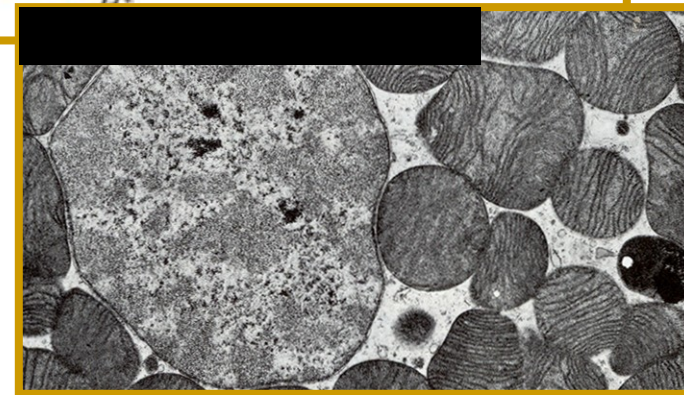


# Struktura a mechanismus tepelné produkce hnědou tukovou tkání

## Hnědé adipocyty (BAT – brown adipose tissue)



FFA – volné mastné kyseliny  
(*free fatty acid*)  
NE – norepinefrin (noradrenalin  
- *buňky dřene nadledvin*)  
TG – termogenin  
HSL – hormony aktivovaná lipáza  
(*hormone-sensitive lipase*)



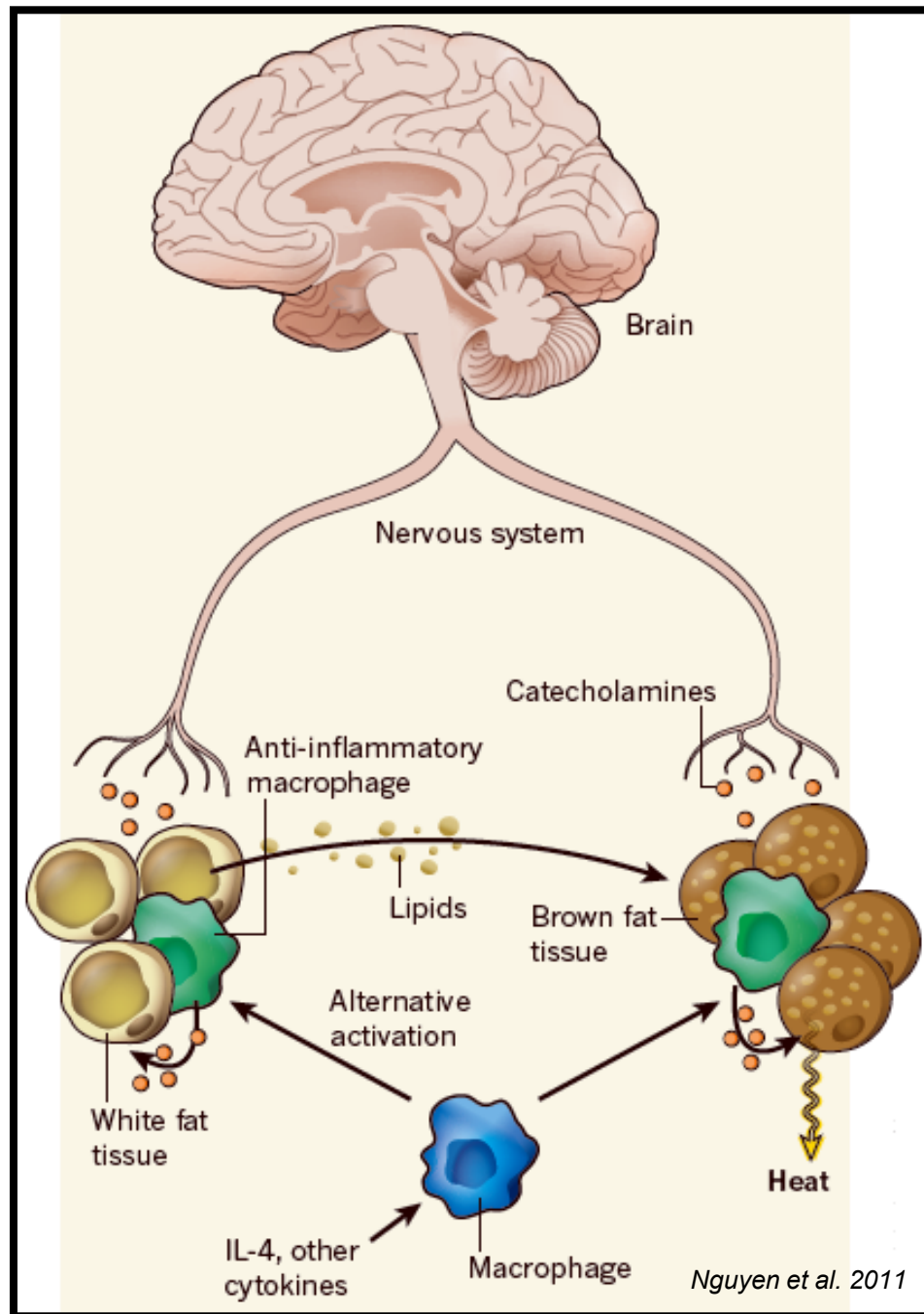
## Regulace netřesové termogeneze v BAT

### INDUKTOR

katecholaminy / noradrenalin / norepinefrin  
(stressové mediátory)

### ZDROJE induktoru

- nervová zakončení sympatiku
- dřeň nadledvin
- makrofágy v tukové tkáni  
(induktor – IL4 a další cytokiny)

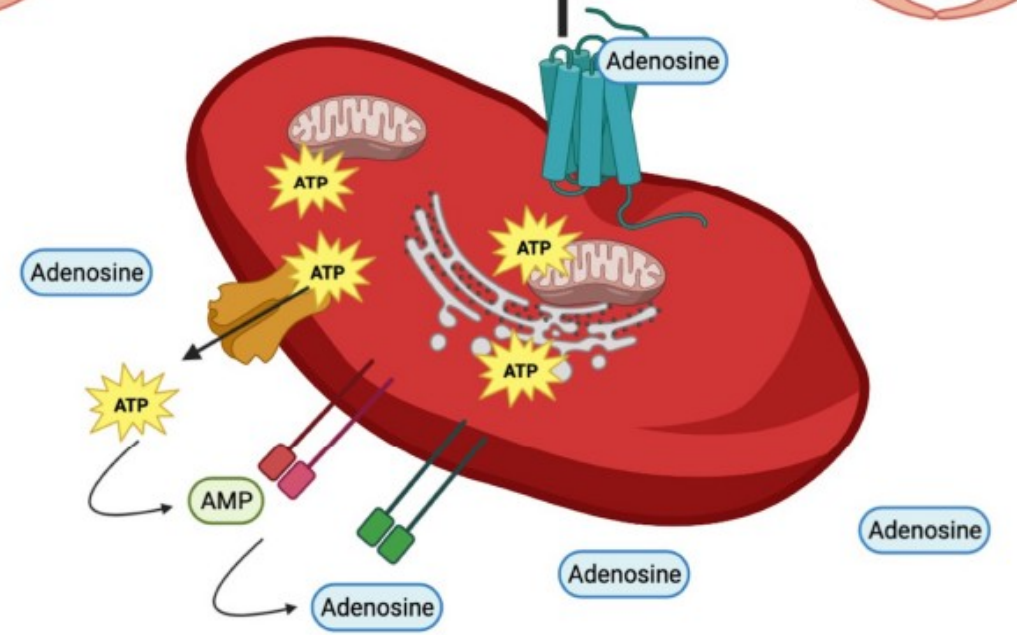
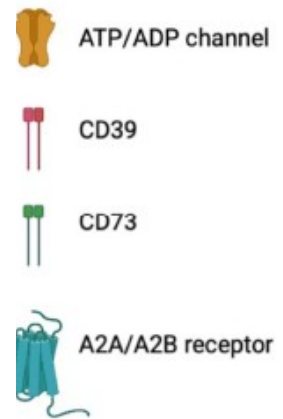
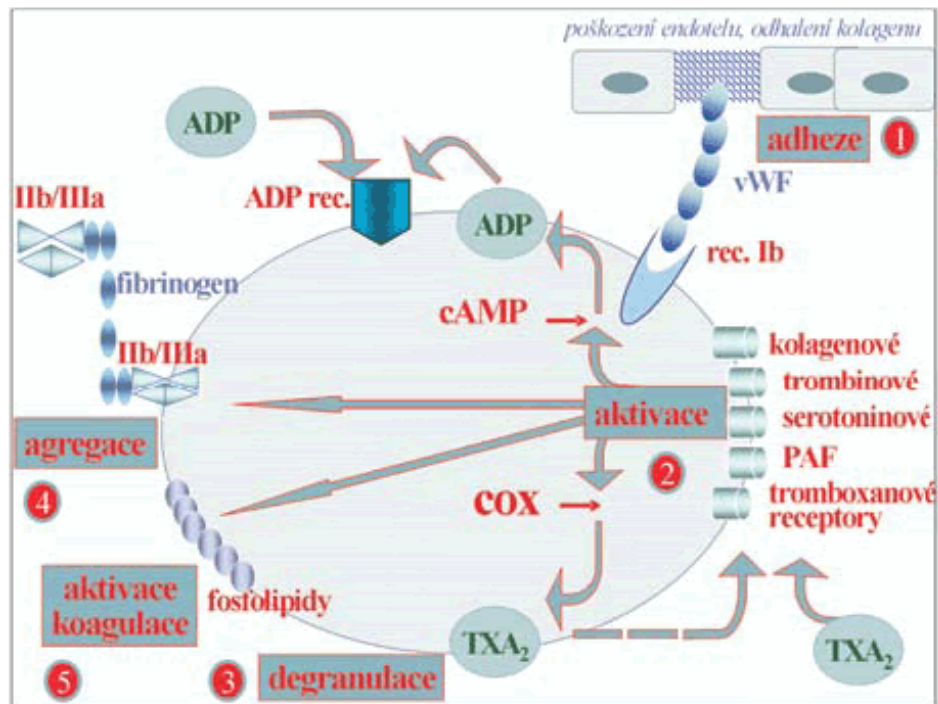


# Trombocyty

- Nemají jádro, bez možnosti transkripce
- Mají mitochondrie, endoplasmatické retikulum,...
- Metabolismus – glykolýza-OXPHOS
- Aktivace trombinem, integriny, TXA, serotonin, ADP...

=> aktivace OXPHOS = produkce ATP

-> agregace vylití granulí – tromboc

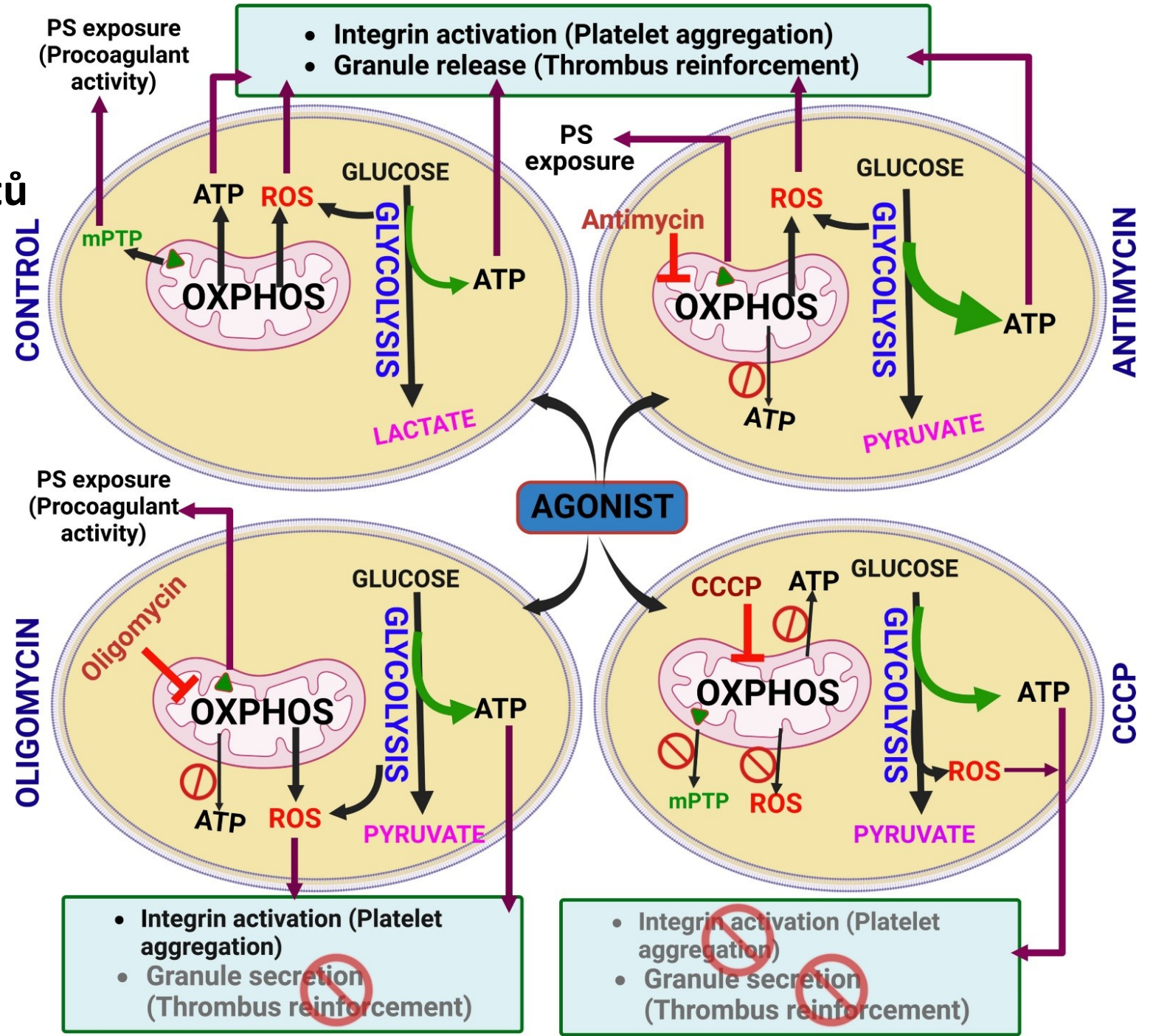




# Modulace OXPHOS

⇒ modulace aktivity trombocytů

Aktivace trombocytů je závislá na indukci jejich OXPHOS metabolismu a produkci ATP

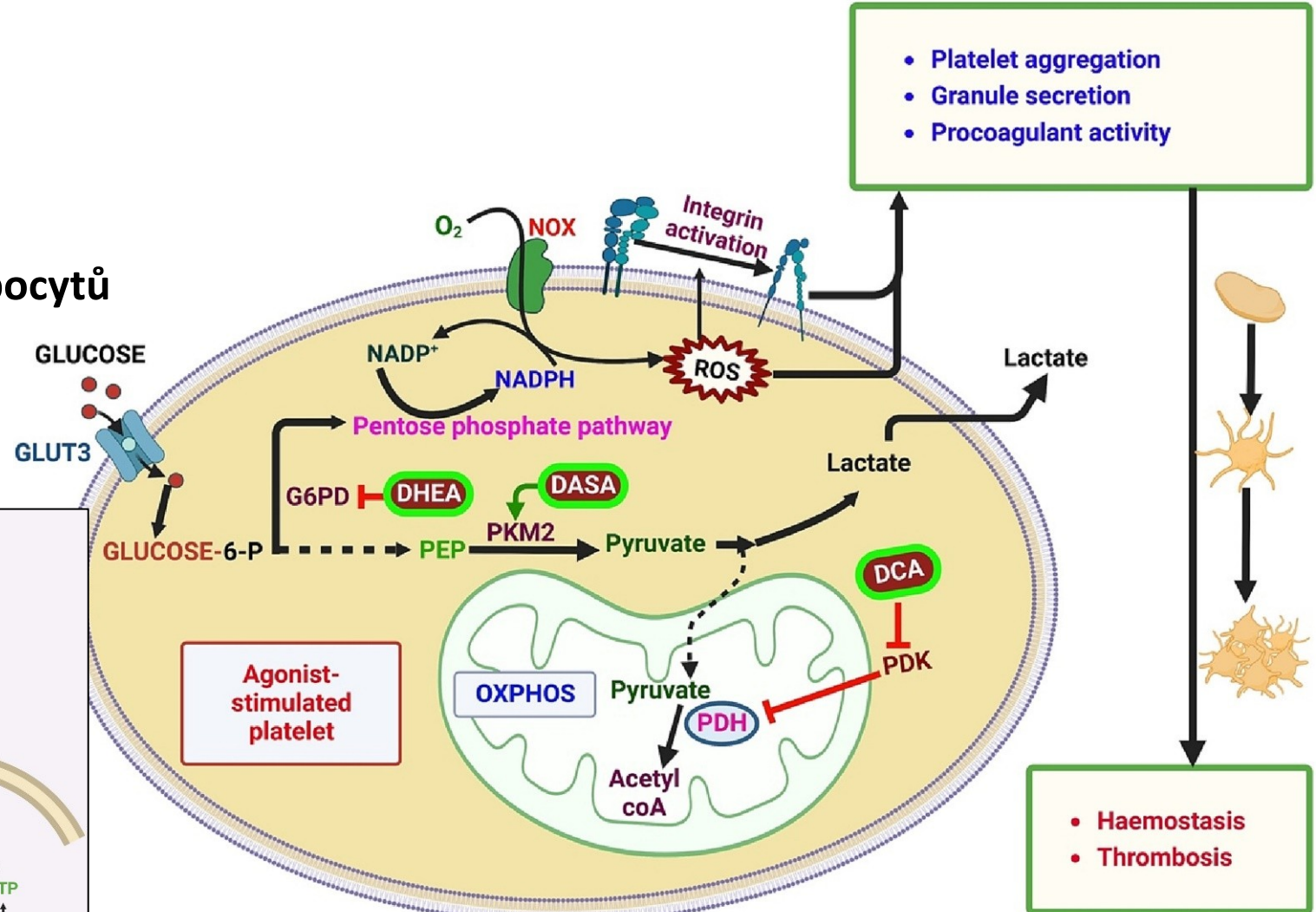
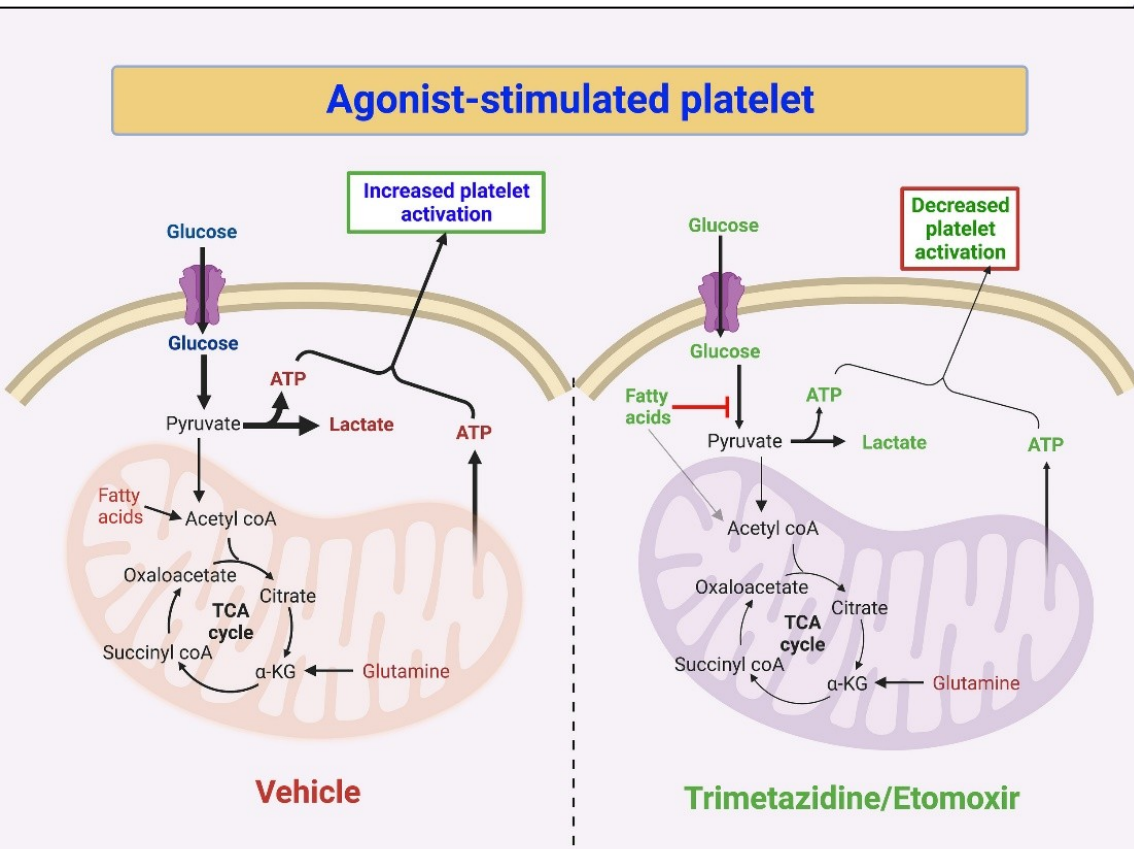




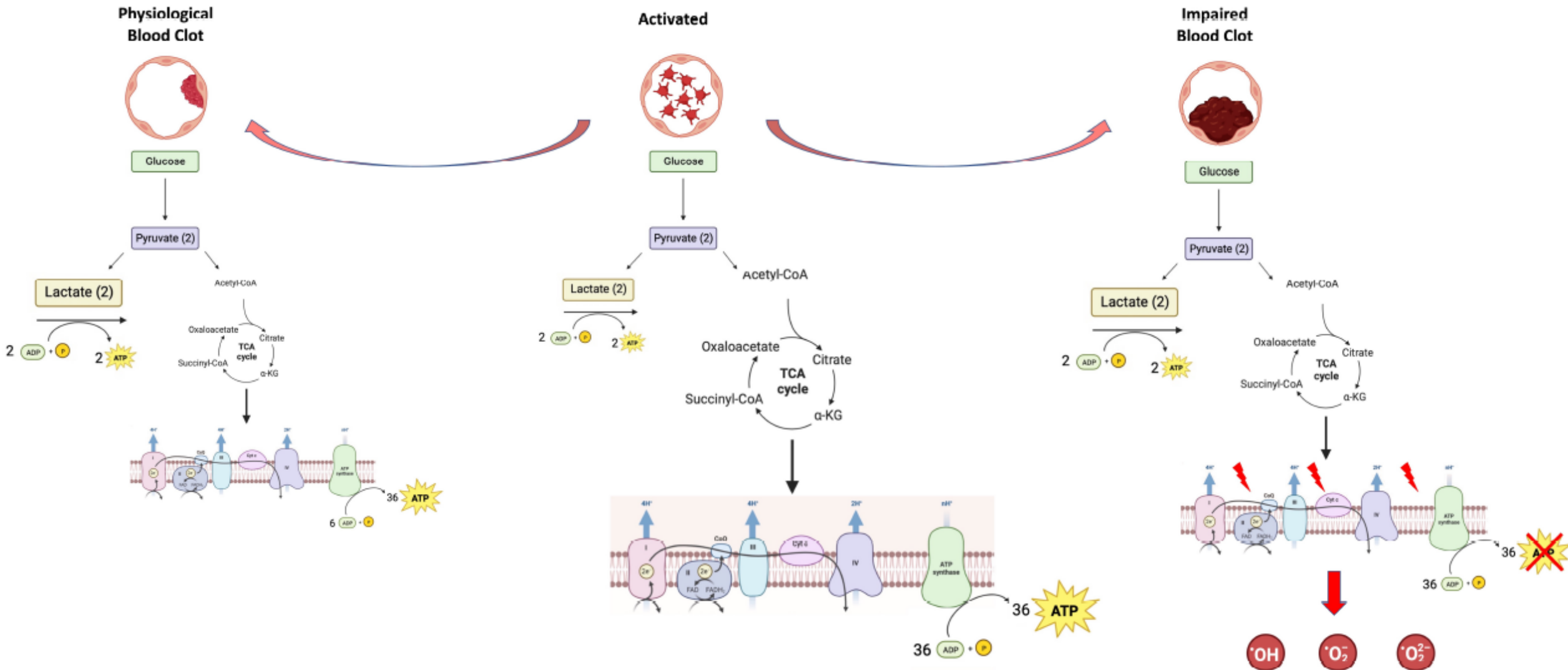
# Modulace OXPHOS

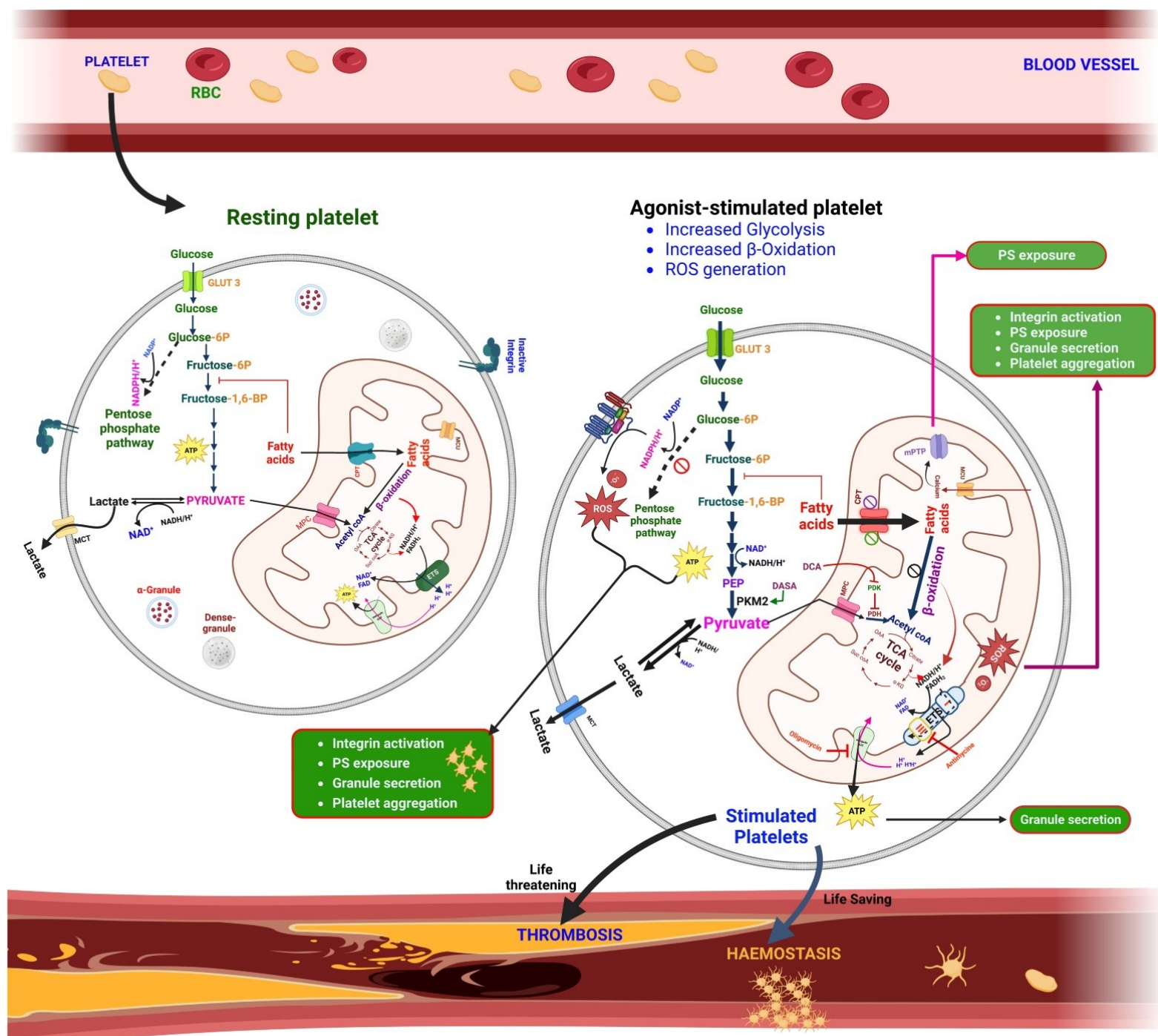
⇒ modulace aktivity trombocytů

Díky závislosti na OXPHOS, lze aktivaci trombocytů modulovat inhibitory pochodů spřaženými s OXPHOS



# ROS – podporují koagulaci – nadprodukce ROS = patologická koagulace





•  $\ominus$  DHEA,  $\circ$  OXF,  $\circ$  ETO,  $\circ$  TMZ

## **Příklady otázek**

Charakterizace energetického metabolismu buňky a preference jednotlivých metabolických drah

Metabolismus zralé a nezralé buňky, preference drah a proč.

Principy regulace metabolismu zdravé a nádorové buňky.

Wartburgův efekt a jeho význam.

Úloha glukózy a glutaminu v metabolismu buňky.

Co podporuje metabolismus nádorové buňky a jaké jsou důsledky.

Specifický metabolismus vybraných buněk, jak a proč.