

The background features a light gray gradient with several realistic water droplets of various sizes scattered across the surface. A faint, circular, textured pattern is visible in the upper center of the image.

PROTEOMIKA

DOC RNDR SABINA ŠEVČÍKOVÁ, PHD

UPF

1838	Název protein - Berzelius
1819-1904	Objevena většina aminokyselin
1926	Sumner – krystalizace ureázy v čistém stavu – katalytický účinek
1933	Tiselius – elfo jako metodika dělení proteinů
1942	Martin a Synge – vývoj chromatografických technik
1951	Pauling a Corey – sekundární struktury proteinů
1955	Sanger – aminokyselinové složení insulínu
1963	Monod a spol. – alosterické změny v konformaci proteinů

PROTEOM

- KOMPLETNÍ SADA PROTEINŮ PŘÍTOMNÝCH V DANÉM OKAMŽIKU V BUŇCE NEBO TKÁNI, Zahrnující veškeré jejich modifikace, vzájemné interakce, lokalizaci a metabolický obrát.

GENOM

- ÚPLNÁ GENETICKÁ INFORMACE DANÉHO ORGANISMU

PROTEOM

- PRVNÍ DEFINICE VŮBEC: MARC WILKINS, 1994
- „PROTEOM JE SOUBOR PROTEINŮ KÓDOVANÝ PŘÍSLUŠNÝM GENOMEM“
- DNEŠNÍ DEFINICE VŠAK VÍCE ZDŮRAZŇUJE DYNAMICKOU POVAHU PROTEOMU
- „PROTEOM JE ČASEM A MÍSTEM VYHRAZENÝ SOUBOR PROTEINŮ KÓDOVANÝ PŘÍSLUŠNÝM GENOMEM“
- KVANTITATIVNÍ A KVALITATIVNÍ CHARAKTERIZACE ÚPLNÉ SADY BÍLKOVIN

PROTEOM

- PROTEOM (NA ROZDÍL OD GENOMU):
 - LIŠÍ SE ORGÁN OD ORGÁNU, TKÁŇ OD TKÁNĚ, BUŇKA OD BUŇKY...
 - JE ZÁVISLÝ NA ŠIROKÉM SPEKTRU VNITŘNÍCH A VNĚJŠÍCH FAKTORŮ (PROSTŘEDÍ, VĚK, POHLAVÍ, NEMOC ATD.)

Proteomika



Genomika

PROTEin+genOME

Proteom

Expres



Genom

+posttranslační modifikace

+alternativní sestřih

+alternativní zavinutí



Souhrn všech proteinů v daném organismu

Lidské tělo obsahuje miliony proteinů

Expres proteinů v rámci jednoho organismu se liší v různých částech těla, v různých stádiích životního cyklu a v různých podmínkách prostředí

Souhrn všech genů v daném organismu

Lidský genom obsahuje 20-25.000 genů

Genom je konstantní celek

GENOM VS PROTEOM

- GENOM
- KOMBINACE 4 BÁZÍ
- STATICKÝ
- CCA 22 000 GENŮ

PROTEOM

KOMBINACE 20 AA

DYNAMICKÝ

NÁSOBNĚ VĚTŠÍ POČET PROTEINŮ: RNA EDITACE,
ALTERNATIVNÍ SESTRŮH, POSTTRANSKRIPČNÍ
MODIFIKACE

SOUHRN SKUTEČNĚ FUNKČNÍCH MOLEKUL

PROTEOMIKA

- STUDIUM KOMPLETNÍ SÍTĚ PROTEINŮ SPÍŠ NEŽ STUDIUM JEDNOTLIVÝCH PROTEINŮ
- FUNKCE A STRUKTURA A 3D MAPA

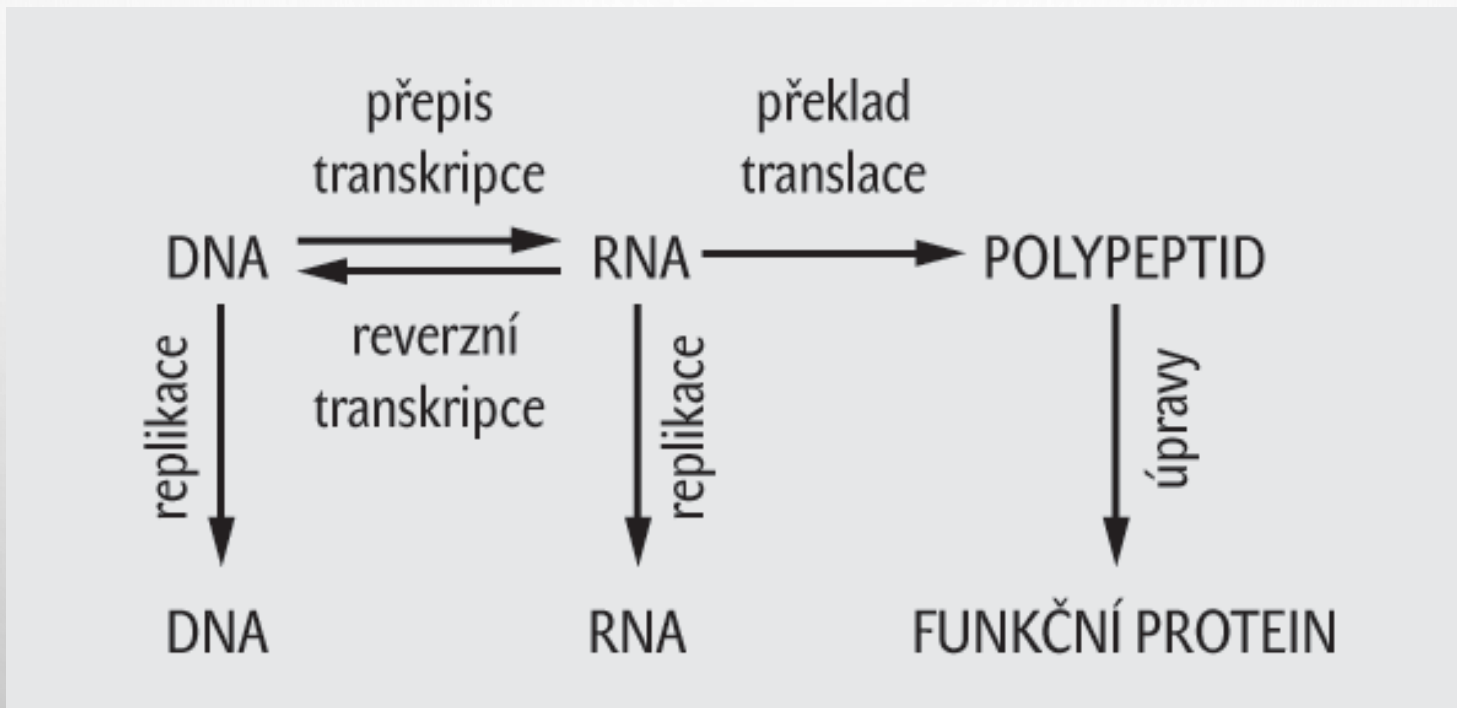
FUNKCE PROTEINŮ

- ENZYM
- STRUKTURNÍ PROTEIN
- TRANSPORTNÍ PROTEIN
- POHYBOVÝ PROTEIN
- SIGNÁLNÍ PROTEIN
- RECEPTOR
- REGULAČNÍ PROTEIN

PROČ PROTEOMIKA?

- FUNKCI PROTEINU NELZE URČIT NA ZÁKLADĚ GENOVÉ EXPRESE
- VĚTŠINOU NEKORELUJE HLADINA MRNA A HLADINA PROTEINU
- MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY NEPOPÍŠEME GENOMIKOU
- 200 TYPŮ POSTTRANSLAČNÍCH MODIFIKACÍ
- ALTERNATIVNÍ TRANSLACE
- FENOTYP JE TVOŘEN PROTEINY !!!!!

CENTRÁLNÍ DOGMA MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

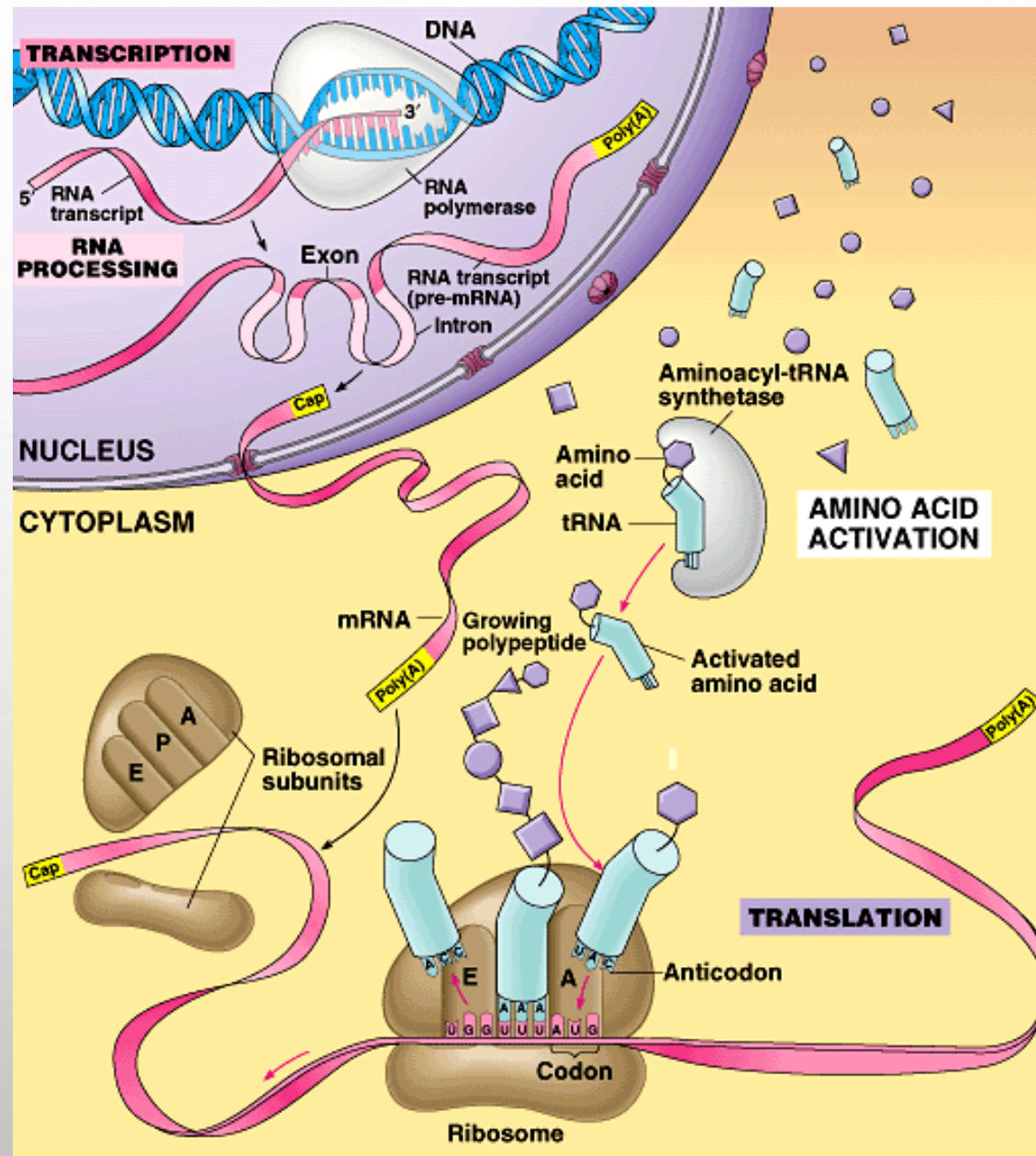


OD RNA K PROTEINU

- GENETICKÝ KOD JE TRIPLETOVÝ – 3 NT V RNA – 1 AA
- RNA – A, U, G, C
- AUG STARTOVNÍ KODON
- UAA, UAG, UGA –STOP KODONY
- KOD DEGENEROVANÝ – 1 AA KÓDOVÁNA NĚKOLIKA TRIPLETY
- **GENETICKÝ KÓD UNIVERZÁLNÍ**

TRANSLACE V EUKARYOTICKÉ BUŇCE

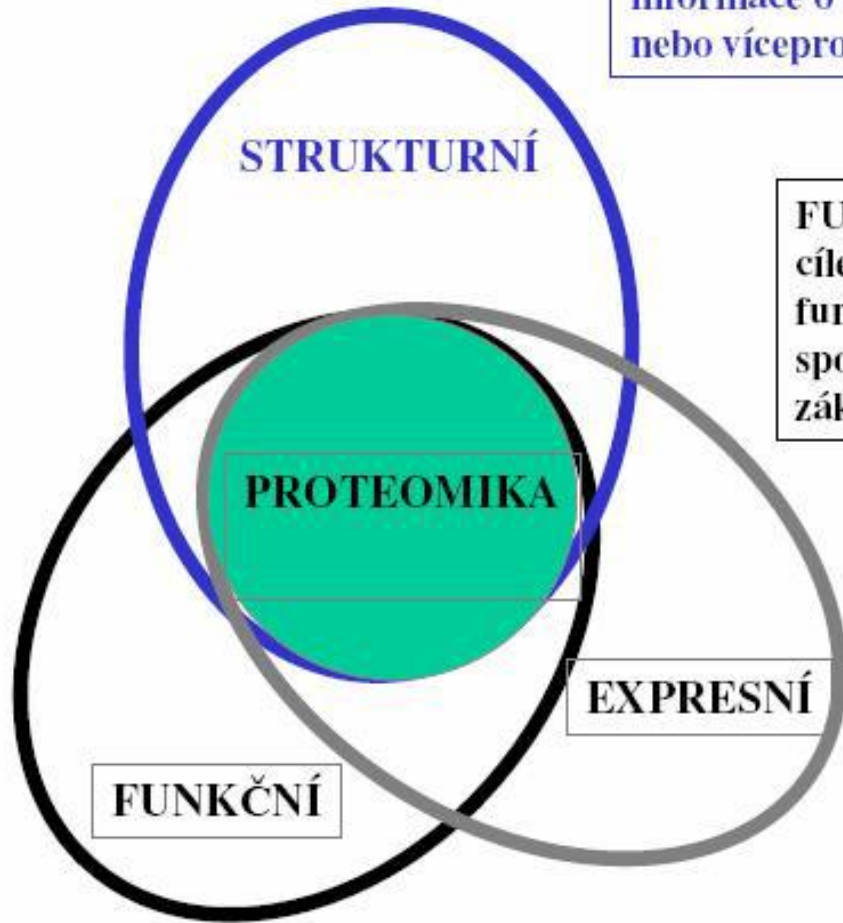
- STRUKTURNÍ GEN – PREMRNA-MRNA
- MRNA OPOUŠTÍ JÁDRO
- NA RIBOZOMECH TRANSLACE – POLYPEPTIDOVÝ ŘETĚZEC
- STOP KODON – KONEC TRANSLACE
- POLYPEPTID SE UVOLNÍ



POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE

- PŘIPOJENÍ FUNKČNÍCH SKUPIN
- MODIFIKACE AMINO SKUPIN
- STRUKTURNÍ ZMĚNY

- ALTERNATIVNÍ SESTŘIH
- ALTERNATIVNÍ ZAVINUTÍ



STRUKTURNÍ PROTEOMIKA

– vytváření buněčných nebo subcelulárních map, kompletní informace o bílkovinách a jejich interakcích v dané organelle nebo víceproteinovém komplexu.

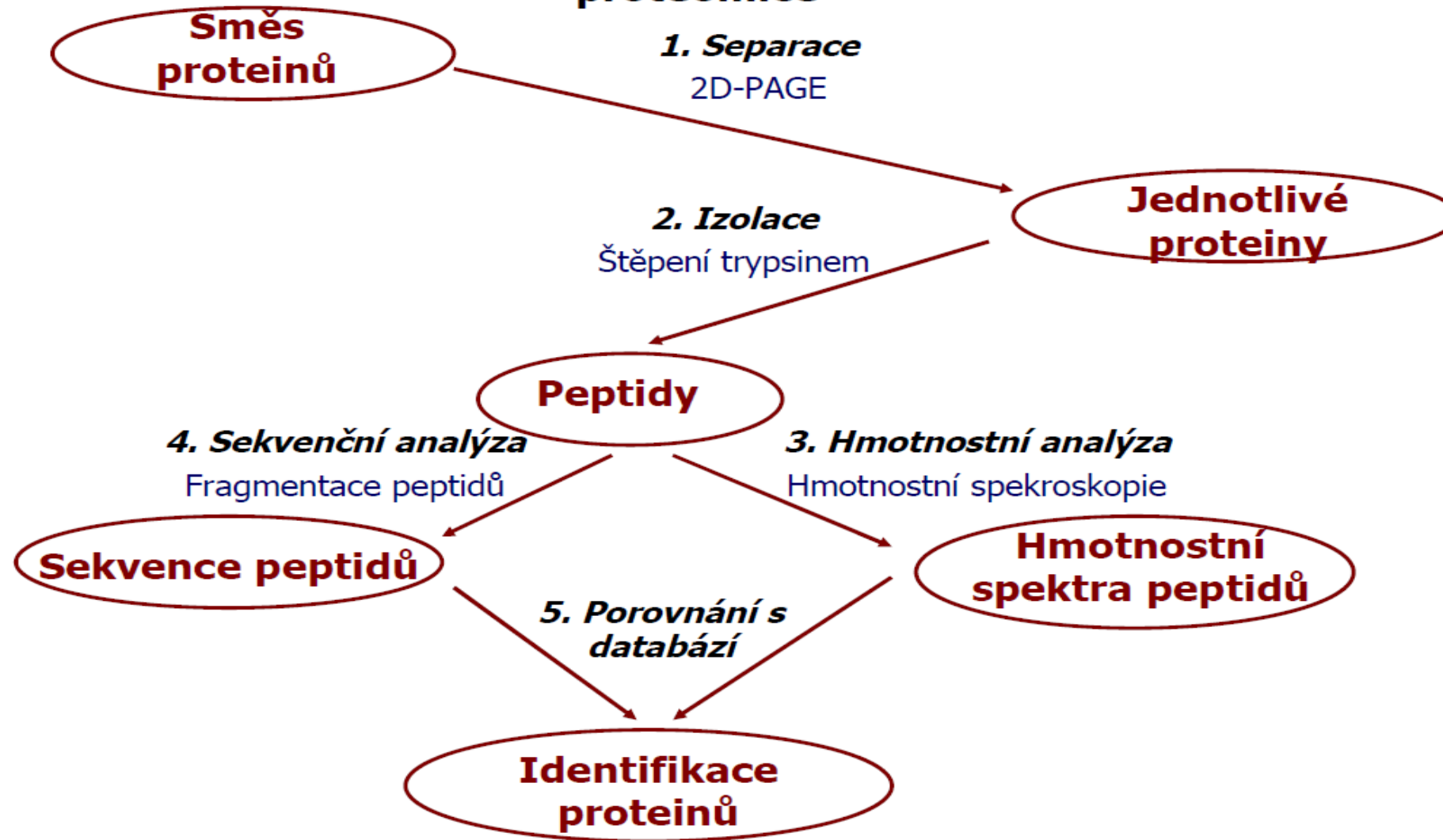
FUNKČNÍ PROTEOMIKA

cílená sub-proteomická izolace a charakterizace funkčních celků nebo souborů bílkovin na základě společné funkce. (identifikace sub-proteomů na základě interakce s nějakým ligandem.)

EXPRESNÍ PROTEOMIKA

kvantitativní studium porovnávající expresi mezi různými proteomy

Základní schéma analýzy užívané v proteomice



Aplikace proteomiky v medicíně (proteomika nemocí)

Úloha proteinů ve vzniku nemocí

Exprese proteinů u nemocí

Biomarkery nemocí

Detekce proteinů vznikajících během
nemoci je využita k diagnóze

Alzheimerova choroba (amyloid β)

Srdeční onemocnění (interleukin-6 a 8, sérový
amyloid A, fibrinogen, troponiny)

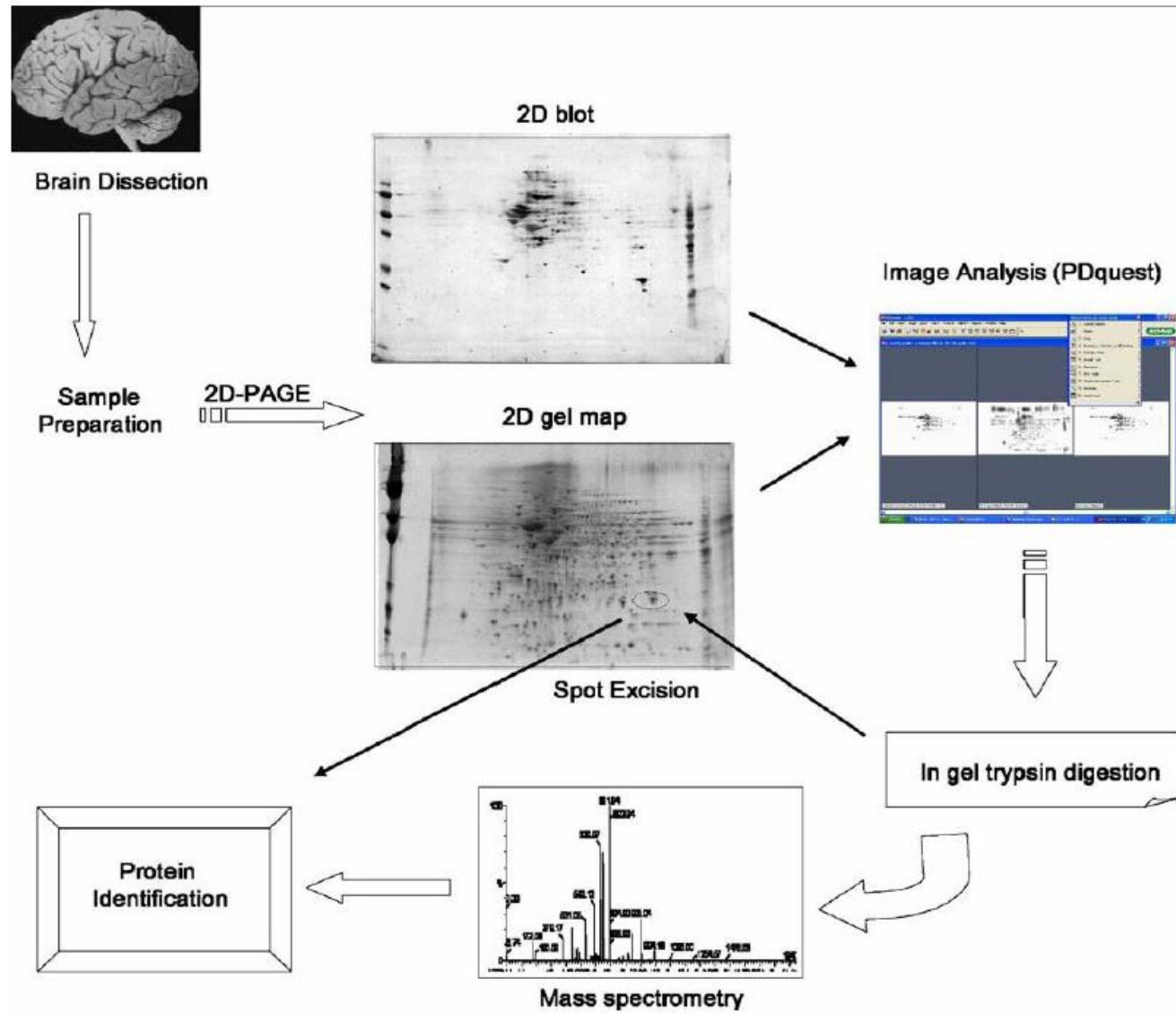
Renální buněčný karcinom
(karbonanhydrasa IX)

Vývoj nových léků

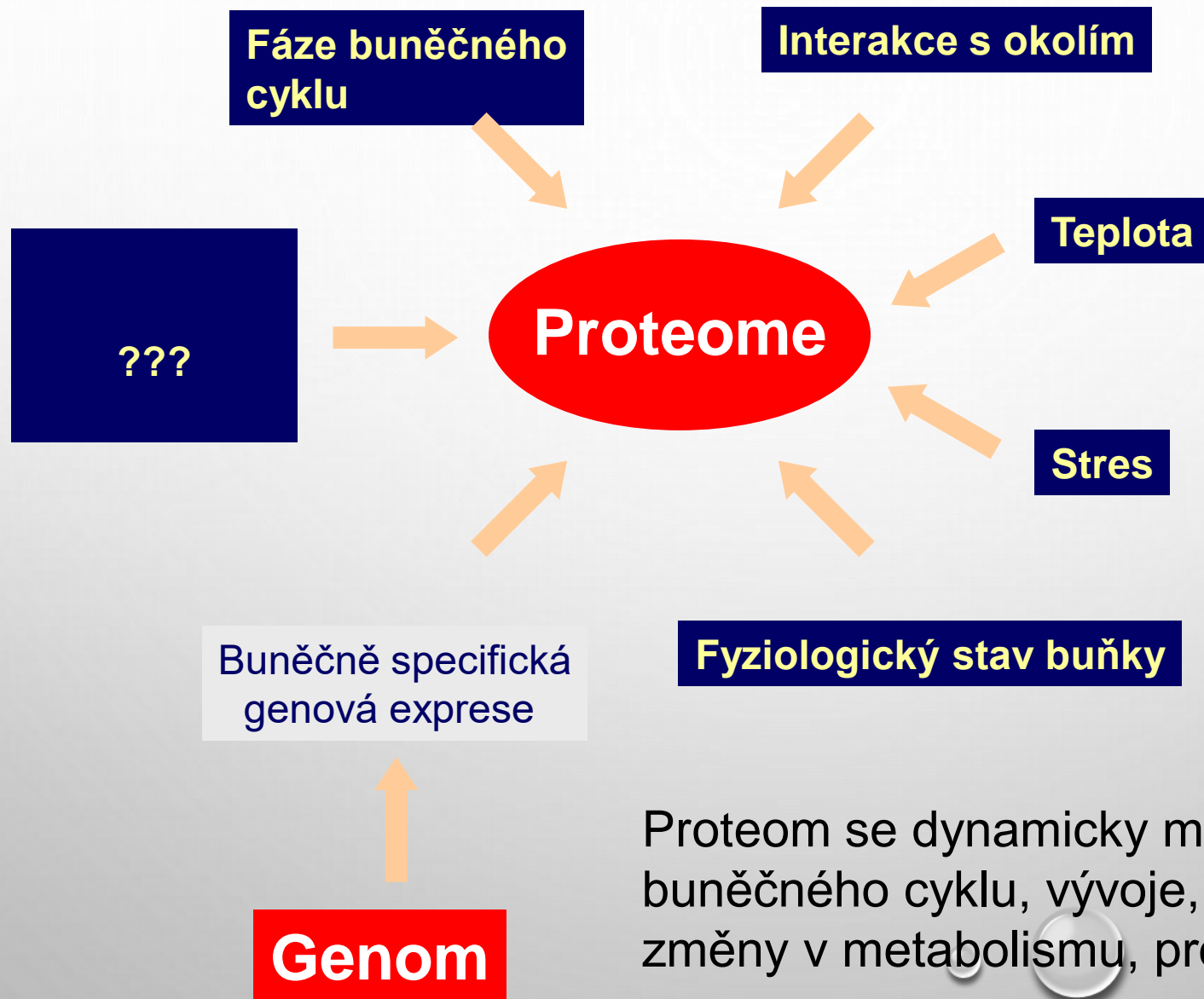
Informace o proteinech způsobující onemocnění je
využita pro vývoj nových léků

1. Známá 3D struktura proteinu-počítačová simulace-hledání
léku, který inhibuje patologický protein (HIV-1 proteasa)
2. Genetické odlišnosti mezi lidmi-odlišný proteom-vývoj
individuálních léků

Schéma pokusu



Faktory ovlivňující proteom buňky



Proteom se dynamicky mění v průběhu buněčného cyklu, vývoje, v reakci na změny v metabolismu, prostředí, ...

Sledování množství a lokalizace proteinů

(nejen proteomické)

Detekce konkrétních proteinů

- **Imunodetekce** - proteinová elektroforéza (SDS-PAGE), Western blot
- Sledování aktivity proteinu (použitelné pouze pro enzymy)

Studium lokalizace proteinu

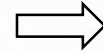
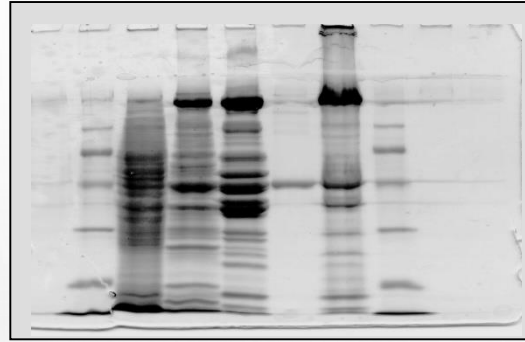
- Translační fúze s reportérovým genem (GFP) – viz dříve
(+ transformace rostlinných buněk)

Studium proteomu

- Dvourozměrná elektroforéza (2D)
- „Gel-free“ metody

Imunodetekce konkrétního proteinu

Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)



Přenos proteinu z gelu na membránu

= Western blot



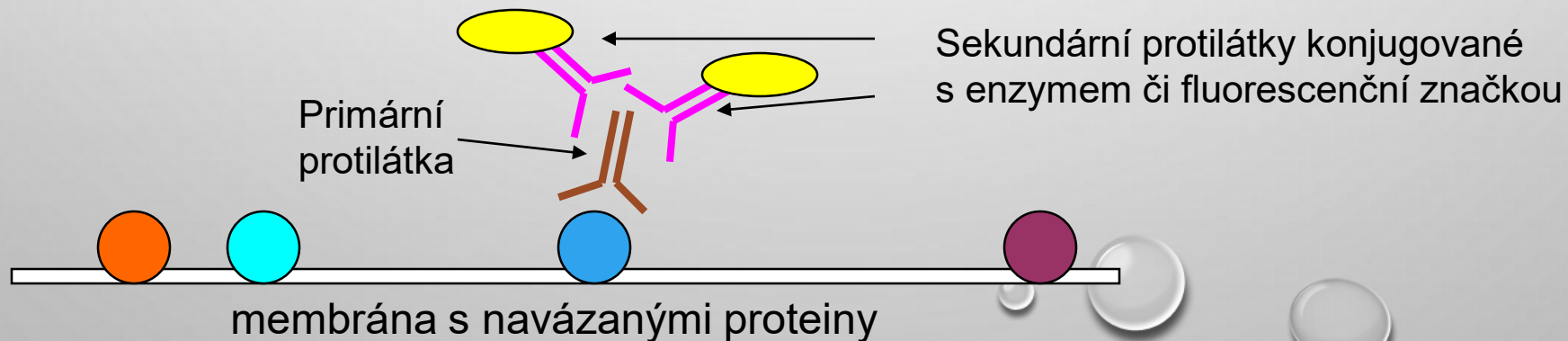
Detekce proteinu protilátkami

(**primární** = rozeznává detekovaný protein
sekundární = rozeznává protilátky z určitého organismu)

W. blot

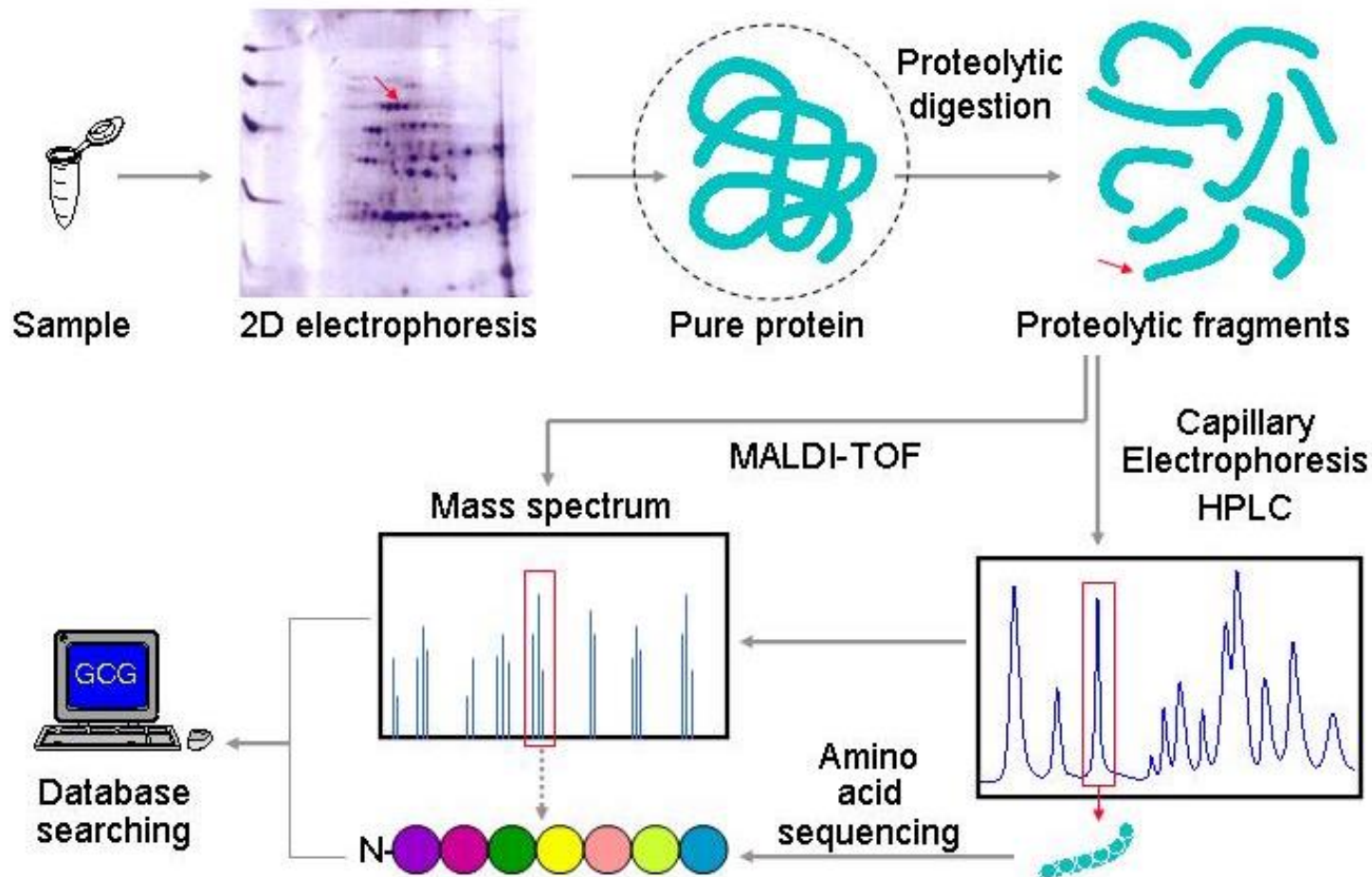


Vizualizace pomocí barevné reakce, fluorescence či chemiluminiscence



Analýzy celého proteomu

- nutná separace jednotlivých proteinů (popř. peptidů):
– 2D elektroforézou či gel-free metodami (chromatografie aj.)

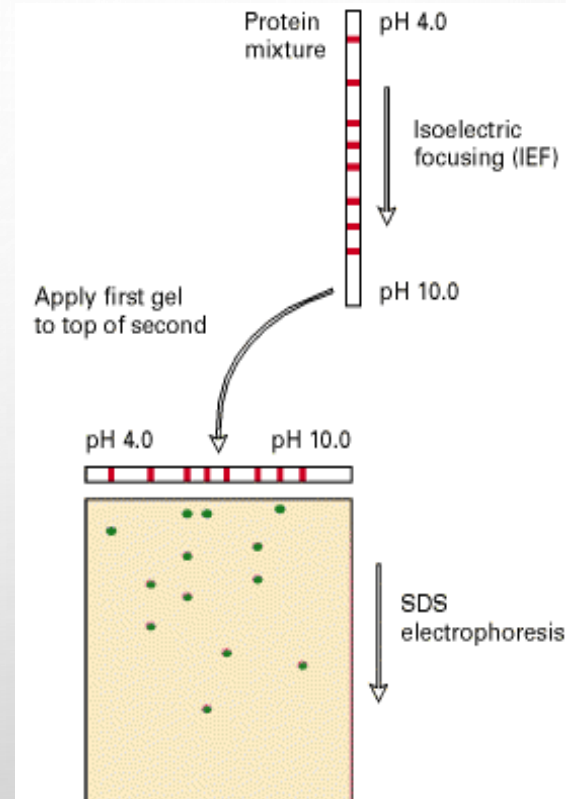


Princip dvourozměrné (2D) elektroforézy

IEF: isoelektrická fokusace



SDS-PAGE



Každá skvrna představuje jeden protein (při záměně či modifikaci aminokyseliny zpravidla dochází ke změně pI a posunu pozice na gelu)

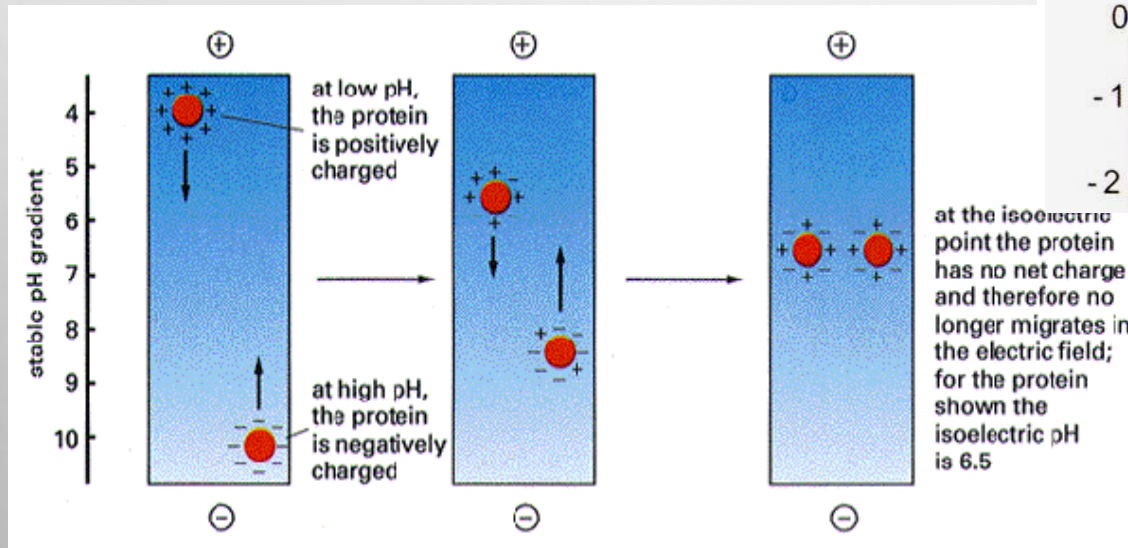
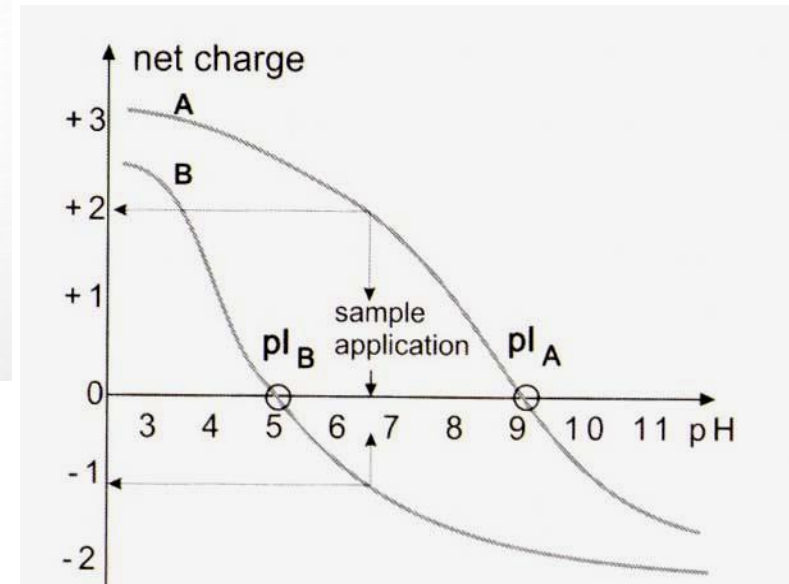
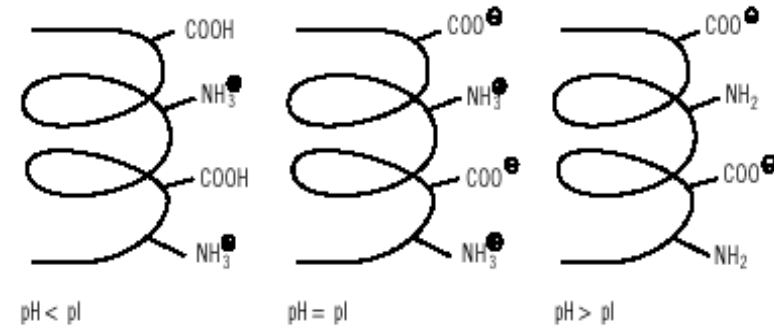
První rozměr IEF

(isoelektrická fokusace):

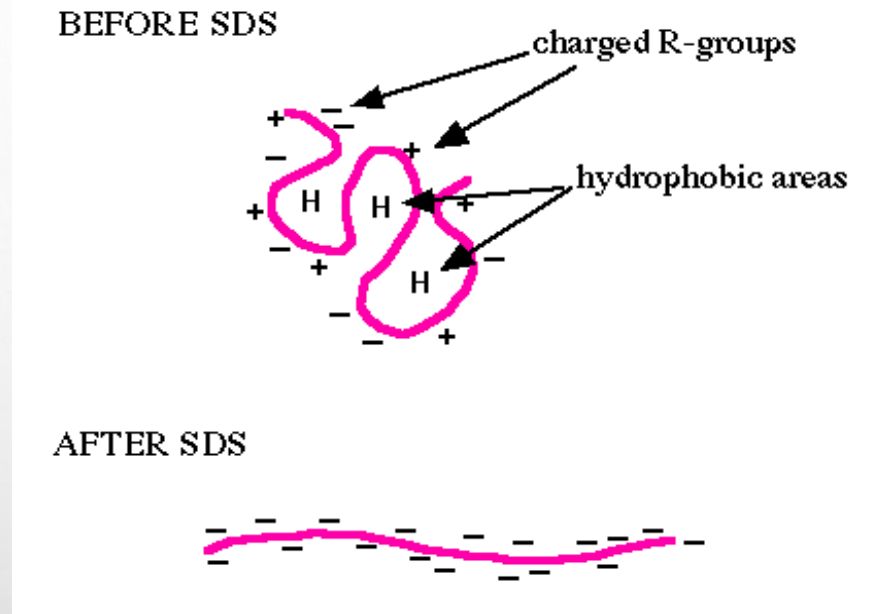
- separace proteinů dle isoelektrického bodu

- proteiny putují do místa, kde pH gelu odpovídá jejich isoelektrickému bodu (pI), tam ztrácejí náboj a zastavují se

= dělení proteinů podle náboje v pH gradientu



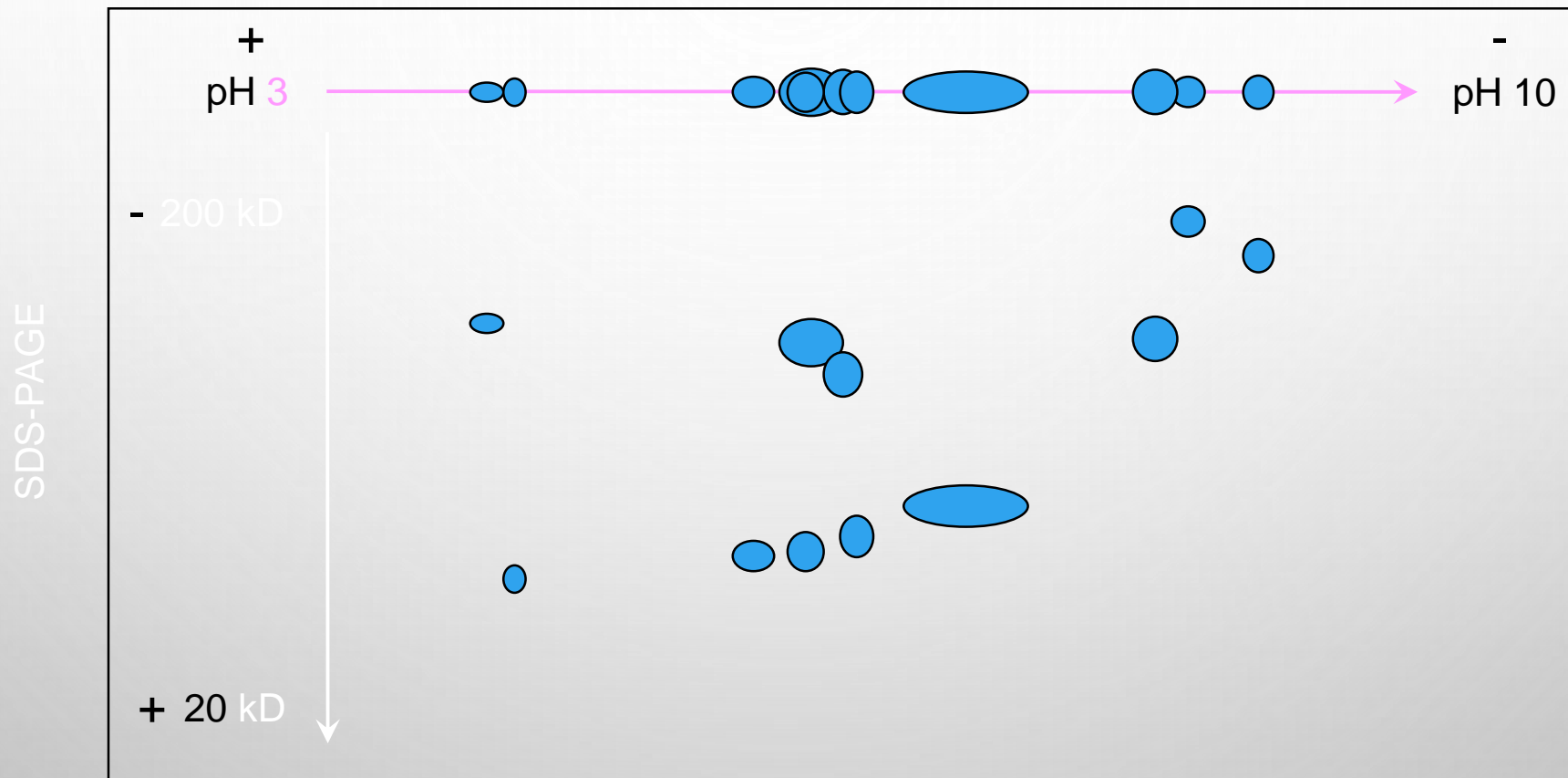
Druhý rozměr SDS-PAGE



- separace denaturovaných obalených proteinů dle velikosti v síti polyakrylamidového gelu

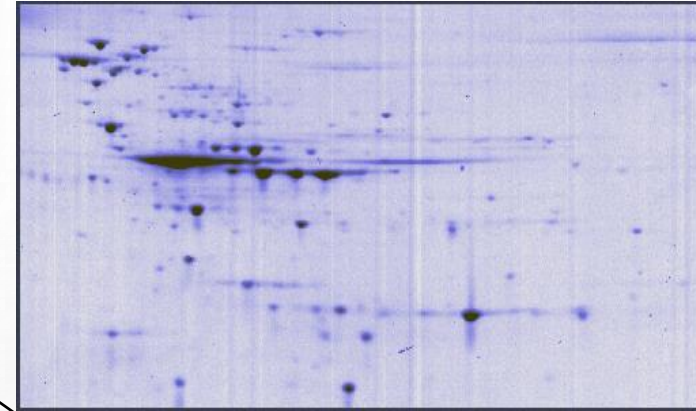
Princip 2-rozměrné (2D) elektroforézy

IEF: isoelektrická fokusace



BARVENÍ PROTEINOVÝCH GELŮ

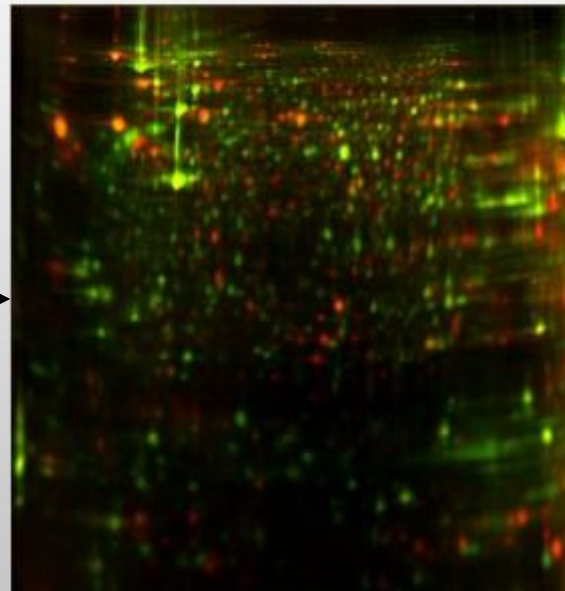
- COOMASSIE BLUE
- STŘÍBREM (CITLIVÉ, ALE NENÍ KVANTITATIVNÍ)
- FLUORESCENČNÍ BARVIVA (DIGE)
- RI (ZNAČENÍ *IN VIVO*)



DIGE: DIFFERENCE

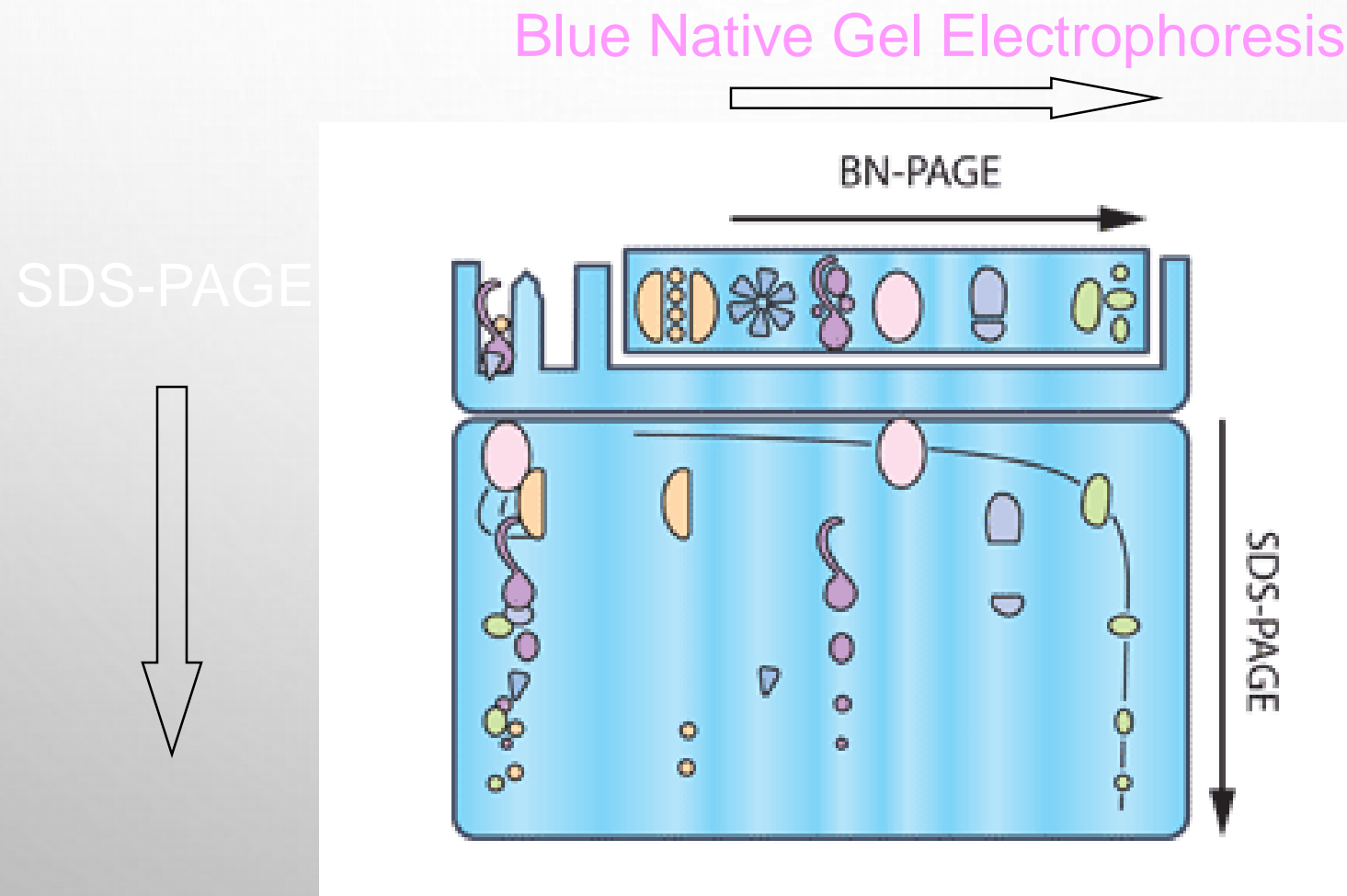
IN GEL ELECTROPHORESIS

- POROVNÁVÁNÍ PROTEOMŮ
NA PROTEINY Z KAŽDÉHO VZORKU
NAVÁZÁN JINÝ FLUOROFOR - STEJNÉ
VLASTNOSTI PŘI IEF A SDS-PAGE,
(SMÍCHÁNÍ, SEPARACE, DETEKCE)



Analýza proteinových komplexů

- dělení nativních komplexů (obalených Coomassie BB) dle velikosti v gradientovém gelu (gradient koncentrace akrylamidu = hustota sítě)

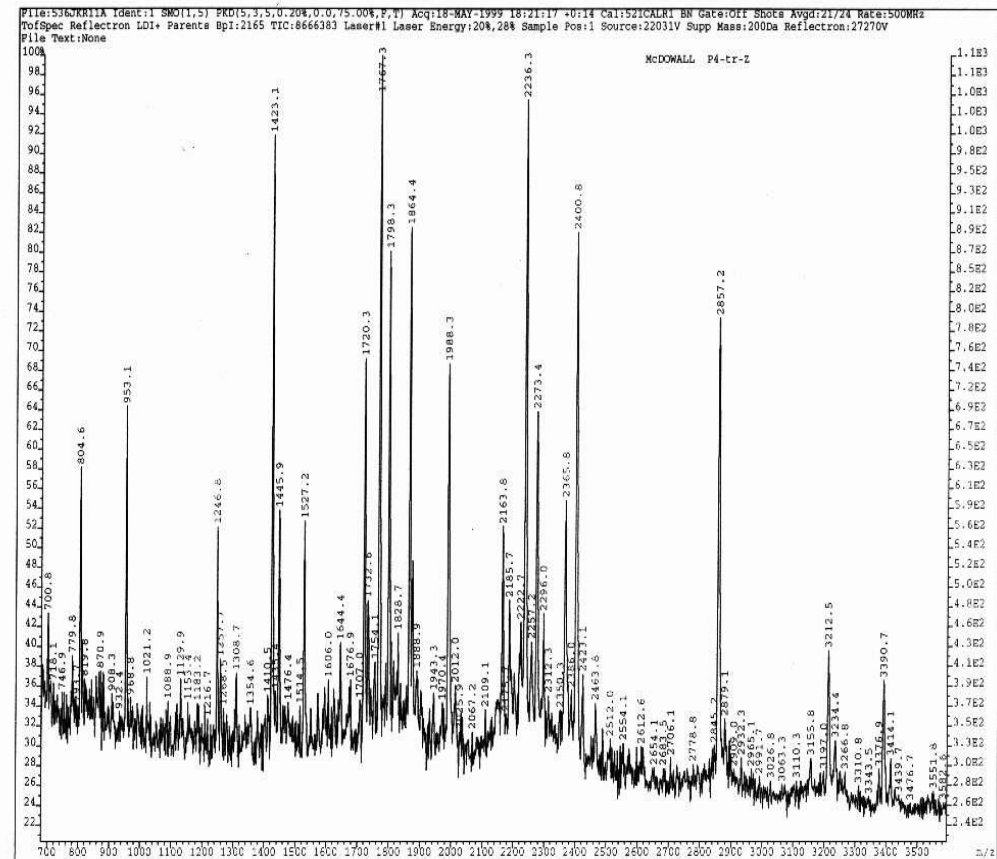


IDENTIFIKACE PEPTIDŮ HMOTOVOU SPEKTROMETRIÍ:

1) „PEPTIDE FINGERPRINTING“

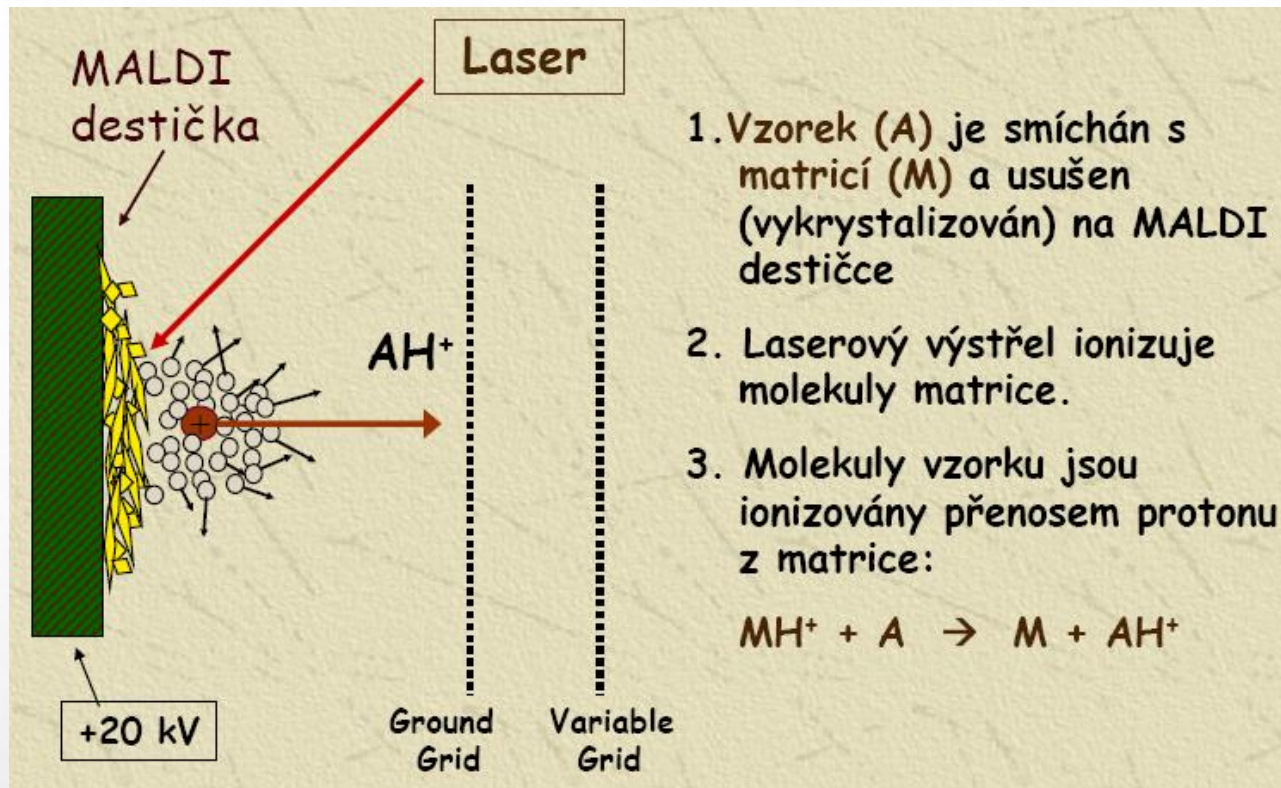
- PŘESNÉ ZMĚŘENÍ VELIKOSTÍ DEFINOVANÝCH ŠTĚPŮ PROTEINU A POROVNÁNÍ S PREDIKOVANÝMI ŠTĚPY PROTEINŮ V DATABÁZÍCH

- DEFINOVANÉ NAŠTĚPENÍ TRYPSINEM ČI JINOU PROTEÁZOU (SPECIFICKÉ, REPRODUKOVATELNÉ ŠTĚPENÍ PROTEINU)
- HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE
NAPŘ. MS - MALDI/TOF
 - MATRIX-ASSISTED
 - LASER DESORPTION / IONISATION
 - TIME-OF-FLIGHT ANALYSIS



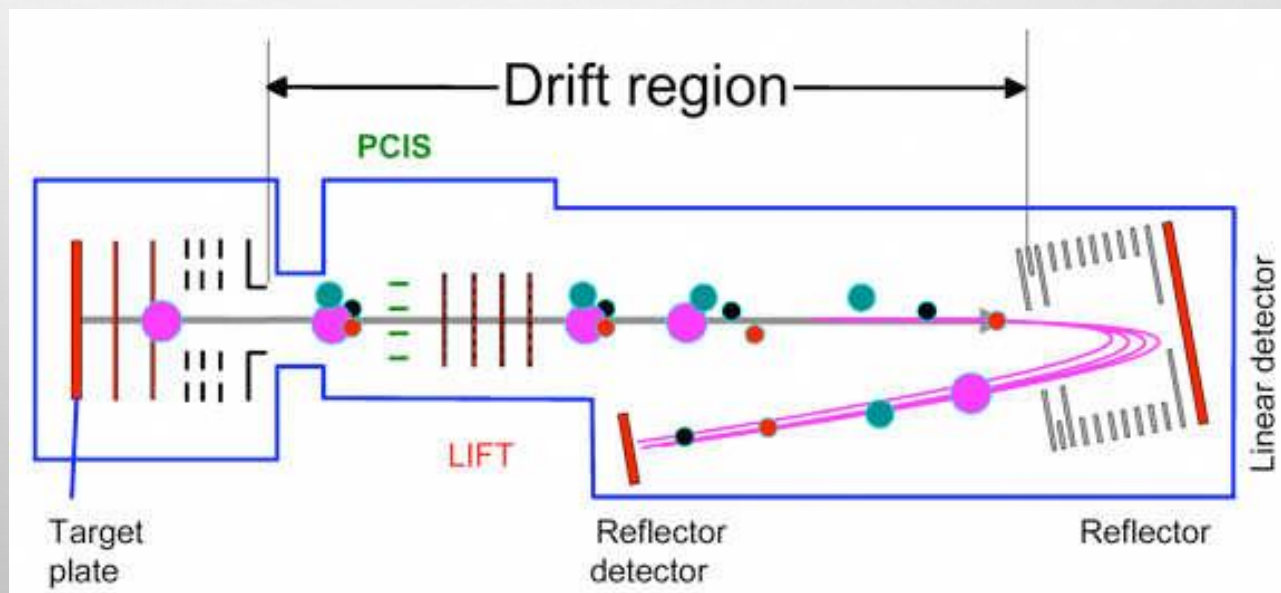
MALDI

Matrix-assisted
Laser desorption /
ionisation



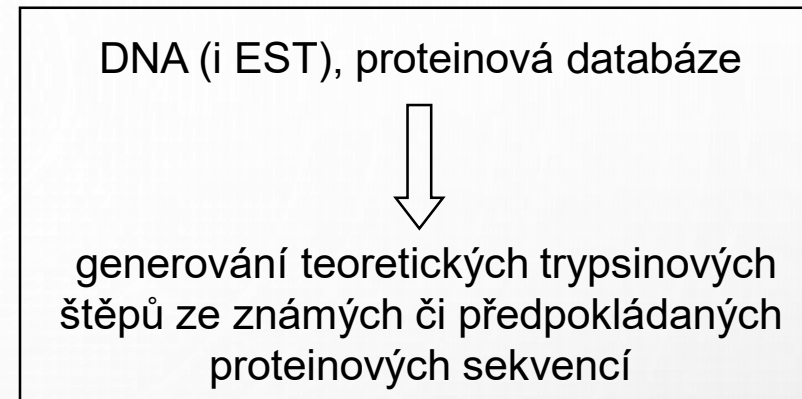
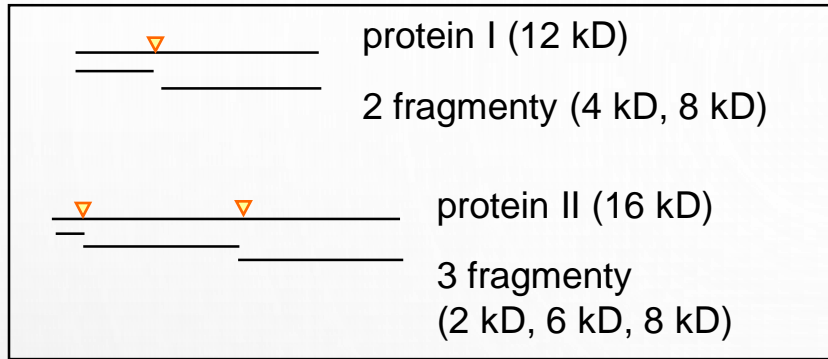
ToF

Time-of-flight
– změření doby letu k detektoru

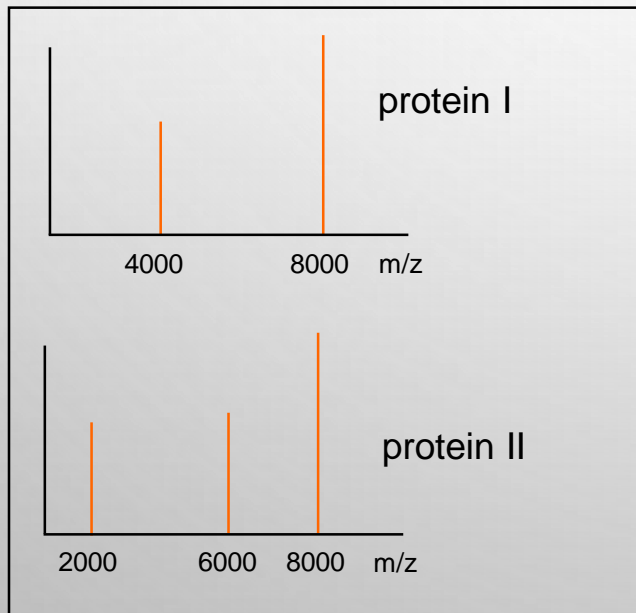


Identifikace proteinů – „peptide fingerprinting“

štěpení proteázou (trypsinem)



MALDI ToF



protein a:	3, 5, 9, 12 kD
protein b:	2, 7, 9 kD
protein c:	4, 8 kD
protein d:	3, 9, 12 kD
protein e:	2, 6, 8 kD

Srovnání experimentálně stanovených velikostí peptidů s teoretickými štěpy

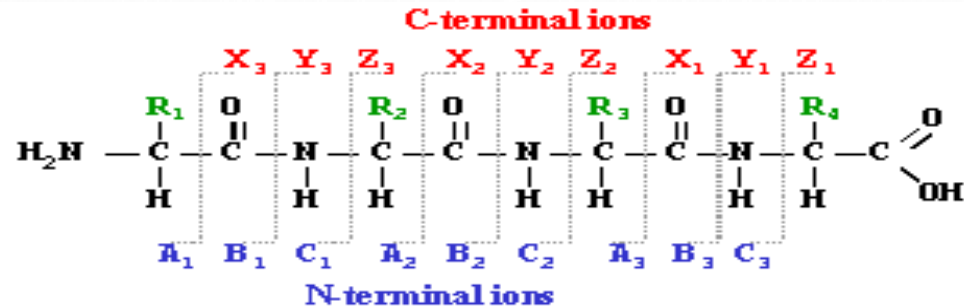
2) MS/MS „sekvenování“ peptidů

např. MALDI TOF/TOF (MALDI MS/MS)

- výběr peptidu (na základě primární TOF)
- fragmentace peptidu (v dráze peptidu např. zařazena „kolizní komora“ s nižším vakuem)
- sekundární ToF analýza vzniklých fragmentů

Přednostní fragmentace peptidové vazby

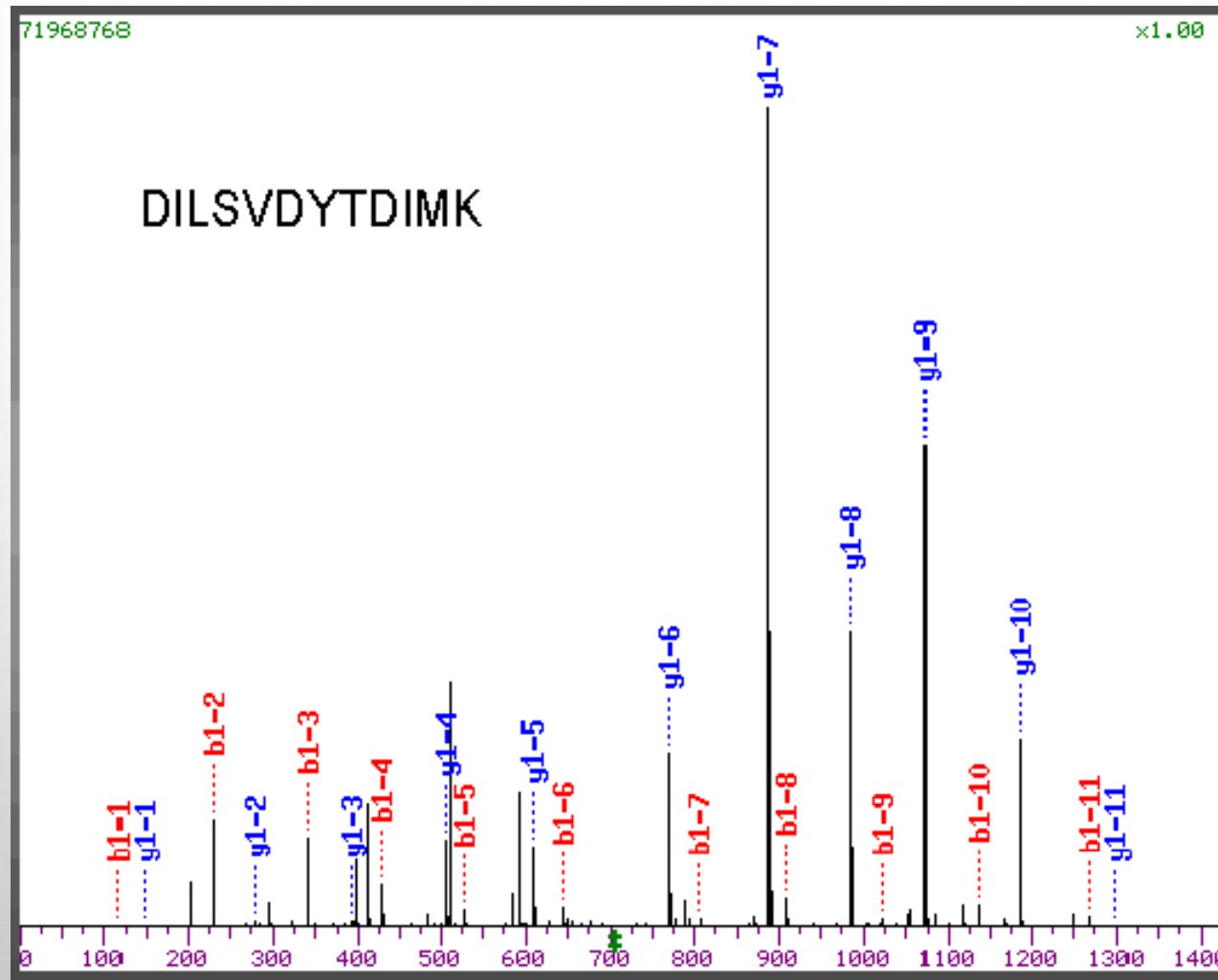
- rozpad na dva fragmenty



S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K
(protonated mass 1410.6)

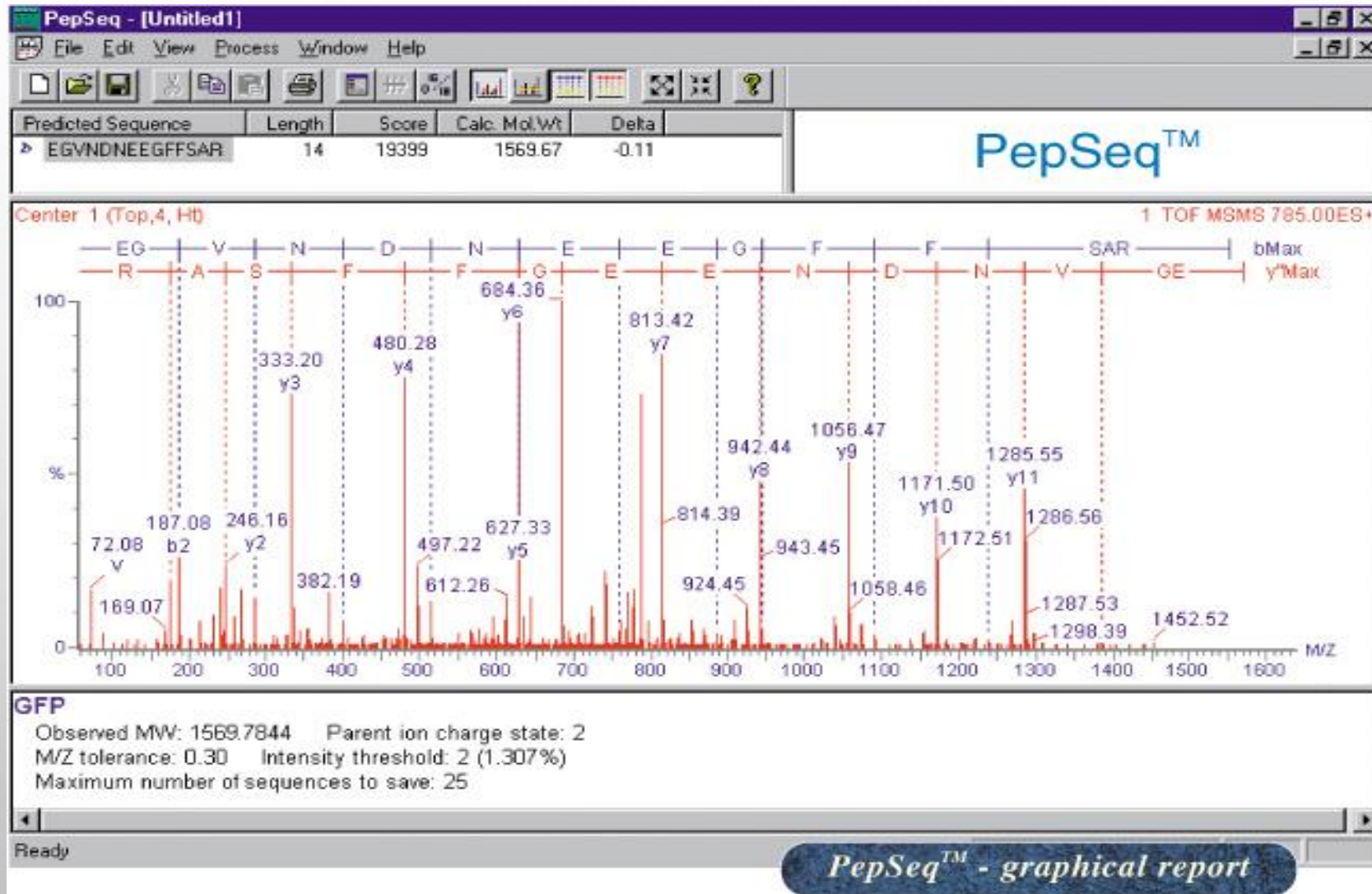
<u>mass⁺</u>	<u>b-ions</u>	<u>y-ions</u>	<u>mass⁺</u>
88.1	S -----	PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP	AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA	FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF	DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD -----	SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS	IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI	MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM	AETLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA -----	ETLK	490.6
1050.2	SPAFDSIMAE	TLK	361.5
1151.3	SPAFDSIMAET	LK	260.4
1264.4	SPAFDSIMAETL	K	147.2

HMOTOVÉ SPEKTRUM PEPTIDOVÝCH FRAGMENTŮ



Směs proteinů → protein → peptid → fragmenty peptidu = identifikace
př. 2D trypsin MS/kolize/MS sw Mascot

ANALÝZY MS SPEKTRA



iTraq isobaric tags for relative and absolute quantitation

„Gel free“ metoda pro hledání a kvantifikace rozdílů v proteomech

Postup:

- rozštěpení proteinů z každého vzorku na peptidy
- modifikace peptidů chemickou skupinou neovlivňující jejich separaci - každý vzorek jinak, ale různě modifikované peptidy stejné sekvence se chovají při další separaci stejně = „jdou“ společně (= chemická struktura připojené skupiny identická a MW takéž!)
- smíchání vzorků, postupná frakcionace (pro snížení komplexity – aby do každé MS analýzy vstupoval jen malý počet peptidů (směs různých peptidů z různých proteinů, ale současně stejné peptidy z různých vzorků – označené připojenou skupinou)
- analýza MS/MS
 - identifikace jednotlivých peptidů (fragmentační spektrum)
 - určení poměru množství peptidu v jednotlivých vzorcích (po odpoutání reportérové skupiny)

iTraq značení

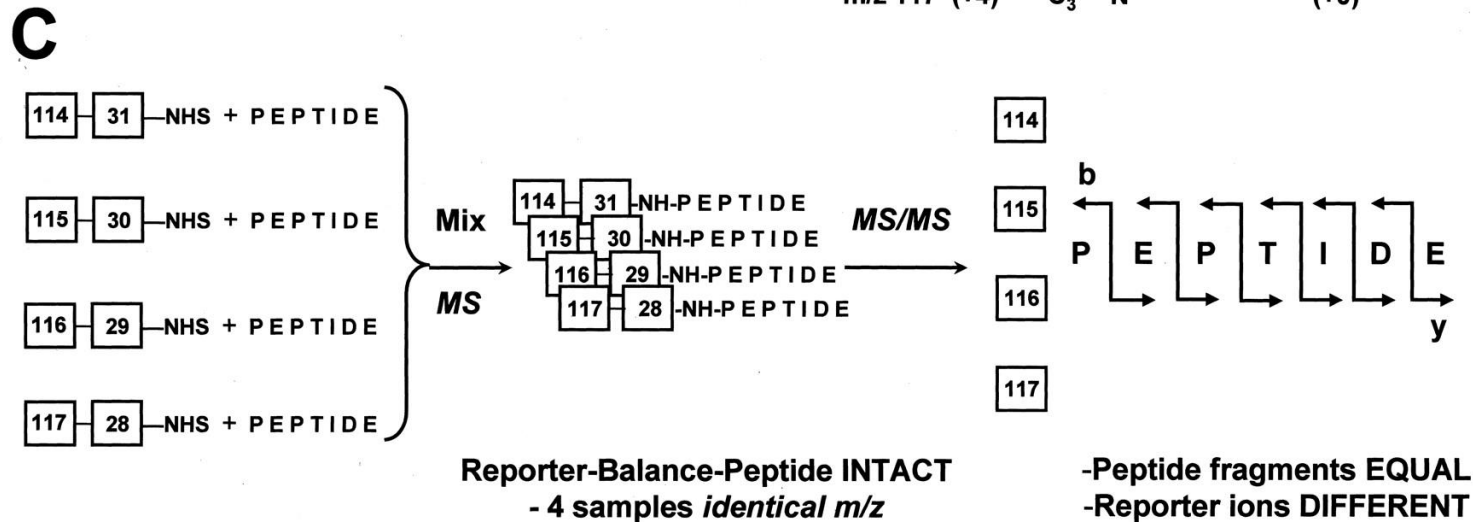
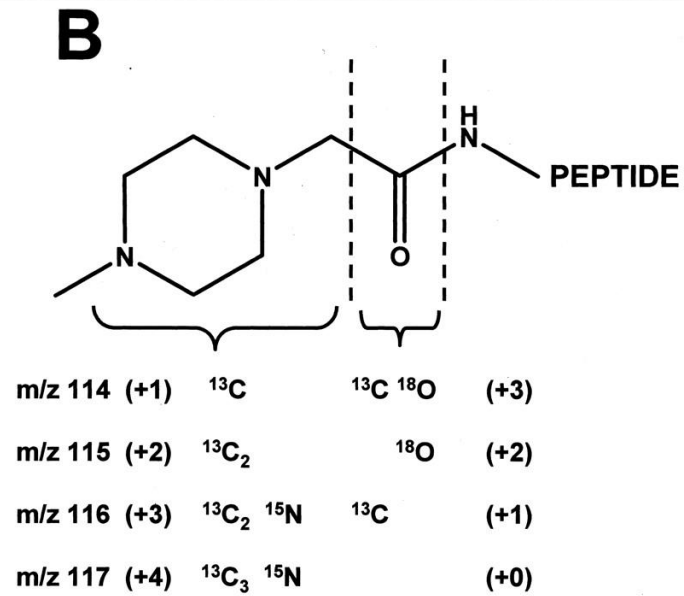
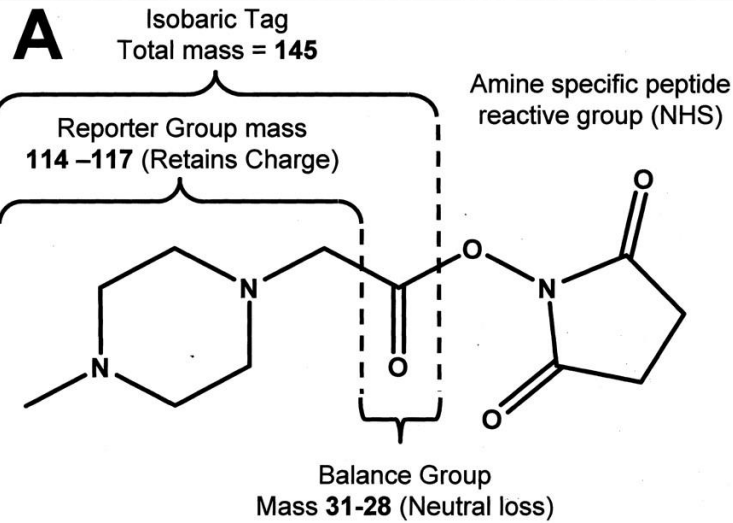
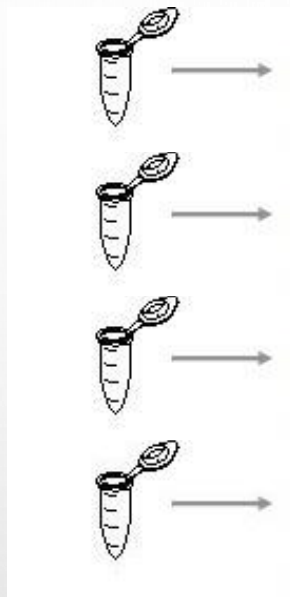
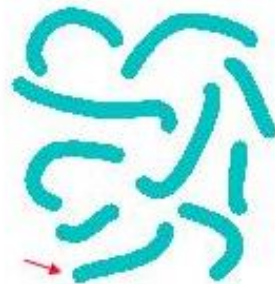


Schéma modelového experimentu

4-(8) x



Proteolytic digestion



Proteolytic fragments

(každý vzorek samostatně)

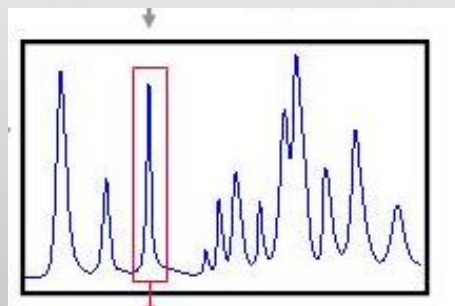
Modifikace
aminoskupin
iTraQ činidly
(každý vzorek jiným
činidlem)

smíchání

frakcionace směsi peptidů



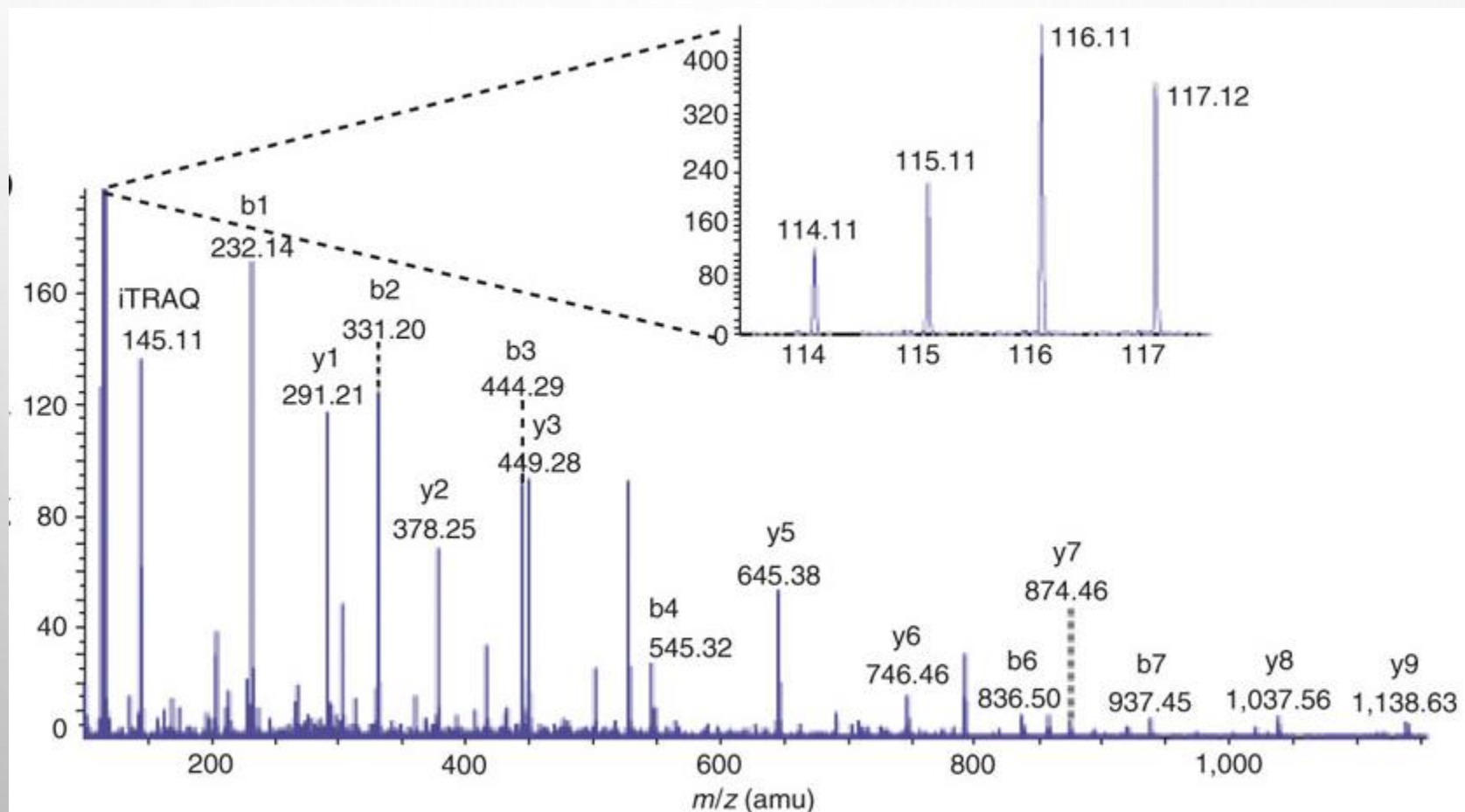
např. isoelektrická
fokusace peptidů



LC

MALDI TOF/TOF
(identifikace peptidů +
zastoupení z jednotlivých
vzorků)

Identifikace peptidů (fragmentační spektrum) + relativní zastoupení v jednotlivých vzorcích (množství jednotlivých tagů)



Kvantifikace rozdílů v proteomech

iTRAQ - omezené množství vzorků (max. 8)

(TMT - podobný princip - až 10 vzorků)

- snižuje rozdíly mezi variantami

(kontaminace jinými peptidy – reportérové skupiny)

Label free metody

- nezávislá analýza vzorků za plně identických podmínek

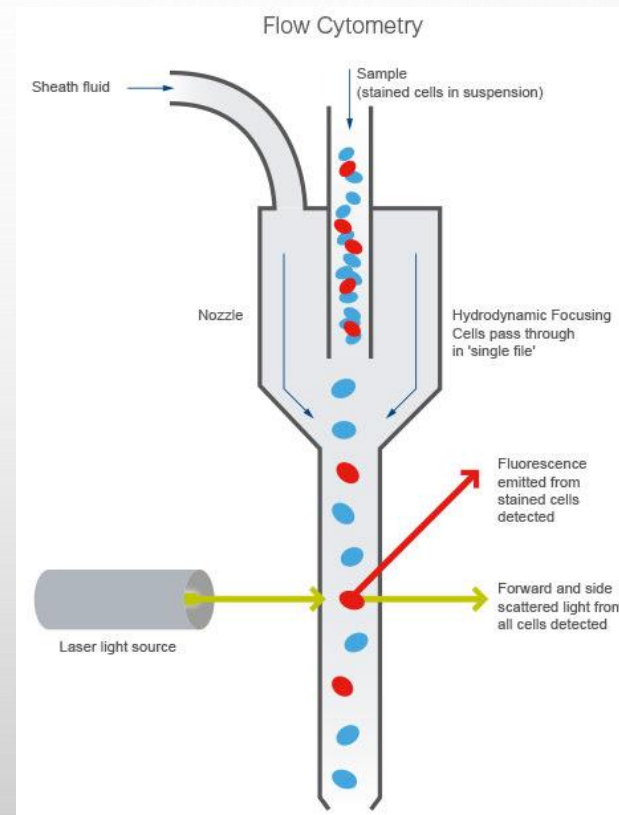
- technicky náročné

- vnitřní kalibrace

- náročné počítačové zpracování

FLOWCYTOMETRIE

- ANALÝZA POVRCHOVÝCH ALE I VNITŘNÍCH PROTEINŮ POMOCÍ FLUORESCENČNĚ ZNAČENÝCH PROTILÁTEK
- BUŇKY PROCHÁZÍ V SUSPENZI
- MĚŘÍCÍM BODEM PROJDE VŽDY JEN JEDNA BUŇKA
- BUŇKY OBARVENÉ SPECIFICKÝMI PROTILÁTKAMI SE SPECIFICKÝMI FLUOROCHROMY



ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN

- BUNĚČNÝ CYKLUS
- ANALÝZA ZLOMŮ DNA
- INKORPORACE BRDU
- EXPRESE CYKLINŮ
- ANALÝZA DENATURACE DNA

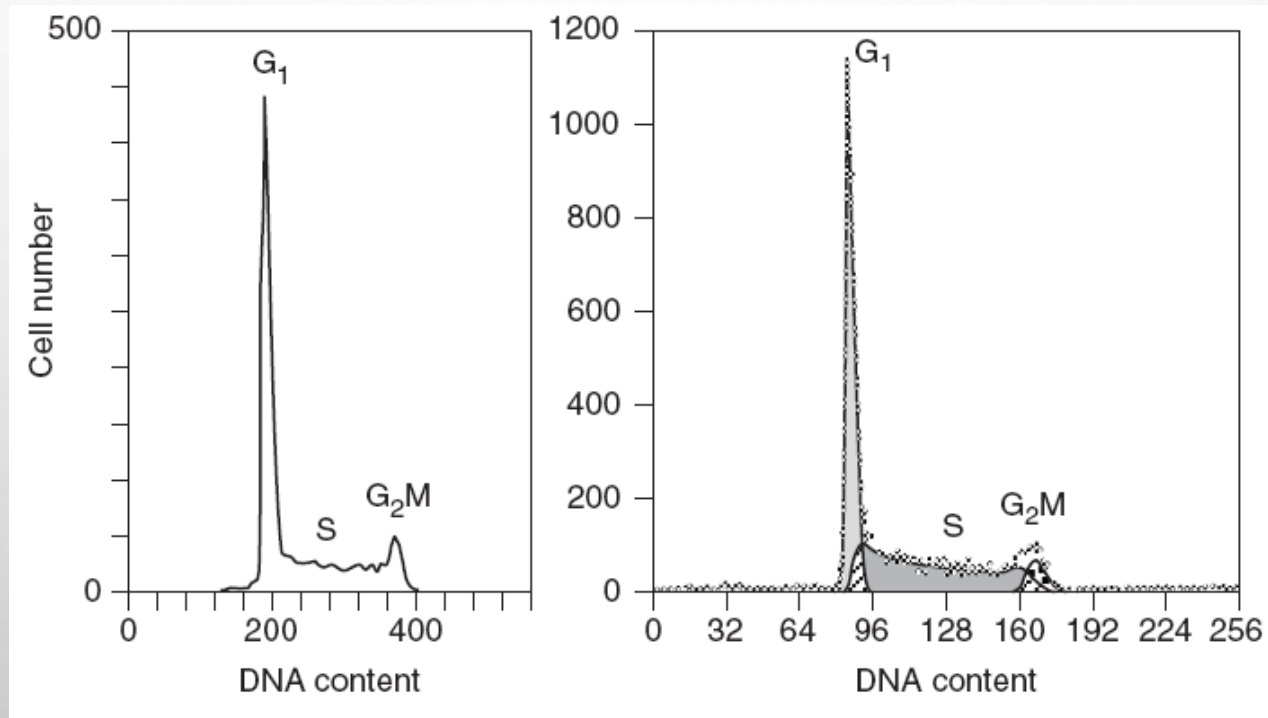
STUDIUM BUNĚČNÝCH FUNKCÍ

- VIABILITA
- STANOVENÍ INTRACELULÁRNÍHO PH
- ANALÝZA ORGANEL A CYTOSKELETU
- STANOVENÍ MEMBRÁNOVÉHO POTENCIÁLU
- OXIDATIVNÍ VZPLANUTÍ
- STANOVENÍ INTRACELULÁRNÍHO Ca^{2+}
- STANOVENÍ INTRACELULÁRNÍCH CYTOKINŮ

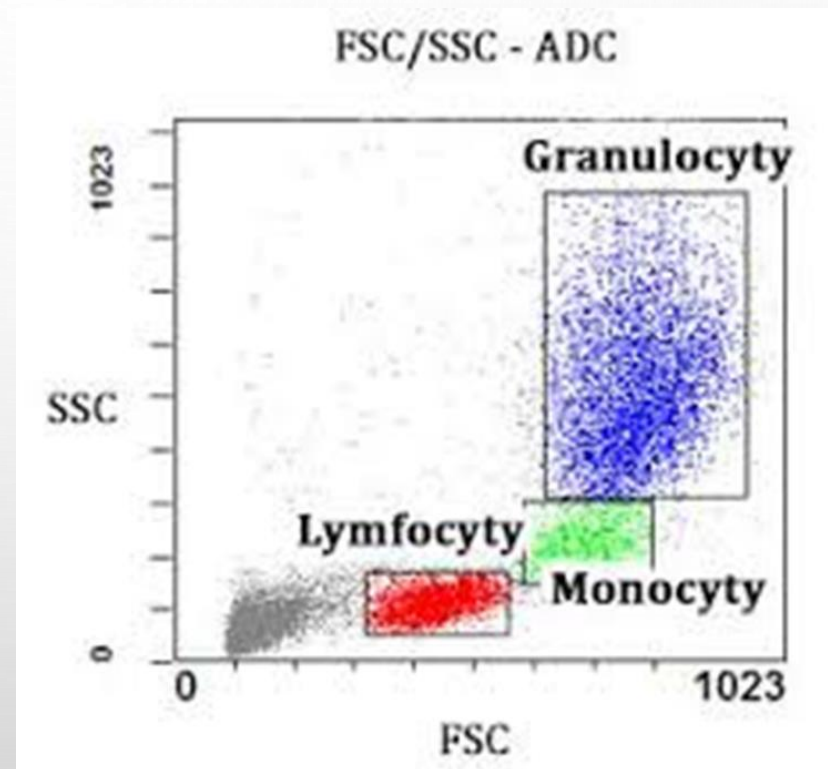
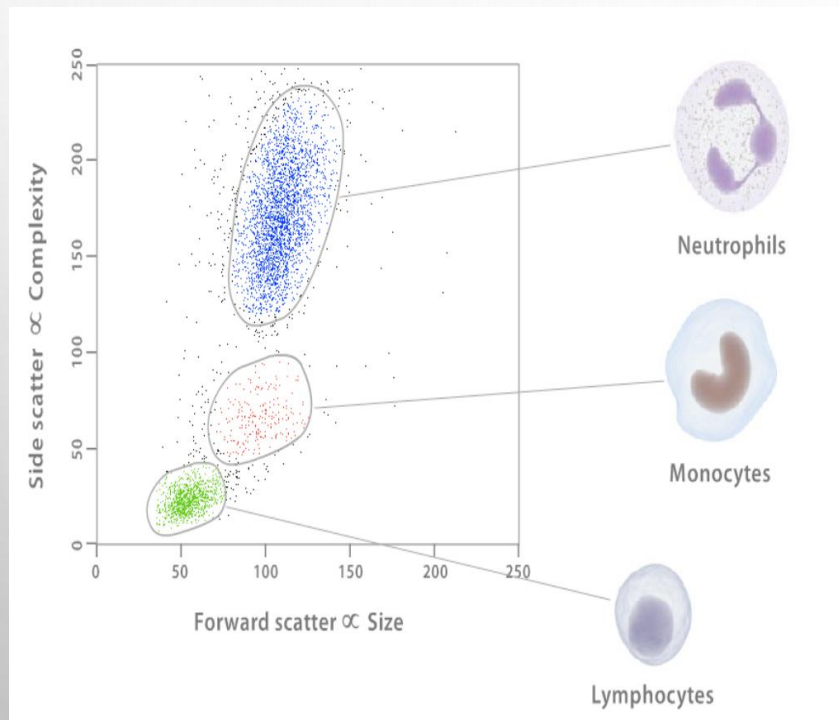
ANALÝZA BUNĚČNÉHO FENOTYPU

- IMUNOFENOTYPIZACE POMOCÍ CD ANTIGENŮ
- (DETEKCE DIFERENCIAČNÍCH A NÁDOROVÝCH MARKERŮ)
- DETEKCE CYTOKINOVÝCH RECEPTORŮ

ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU



ANALÝZA KREVNÍCH BUNĚK



DETEKCE MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ CHOROBY

