

The background is a light blue gradient with several realistic water droplets of various sizes scattered across the surface. The droplets have highlights and shadows, giving them a three-dimensional appearance.

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, BUŇKY OD BUŇKY...
 - JE ZÁVISLÝ NA ŠIROKÉM SPEKTRU VNITŘNÍCH A VNĚJŠÍCH FAKTORŮ (PROSTŘEDÍ, VĚK, POHLAVÍ, NEMOC ATD.)

Proteomika



Genomika

PROTEin+genOME

Proteom

Expese



Genom

+posttranslační modifikace

+alternativní sestřih

+alternativní zavinutí



Souhrn všech proteinů v daném organismu

Lidské tělo obsahuje miliony proteinů

Expese 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 SÍŤE PROTEINŮ SPÍŠ NEŽ STUDIUM JEDNOTLIVÝCH PROTEINŮ
- FUNKCE A STRUKTURA A 3D MAPA

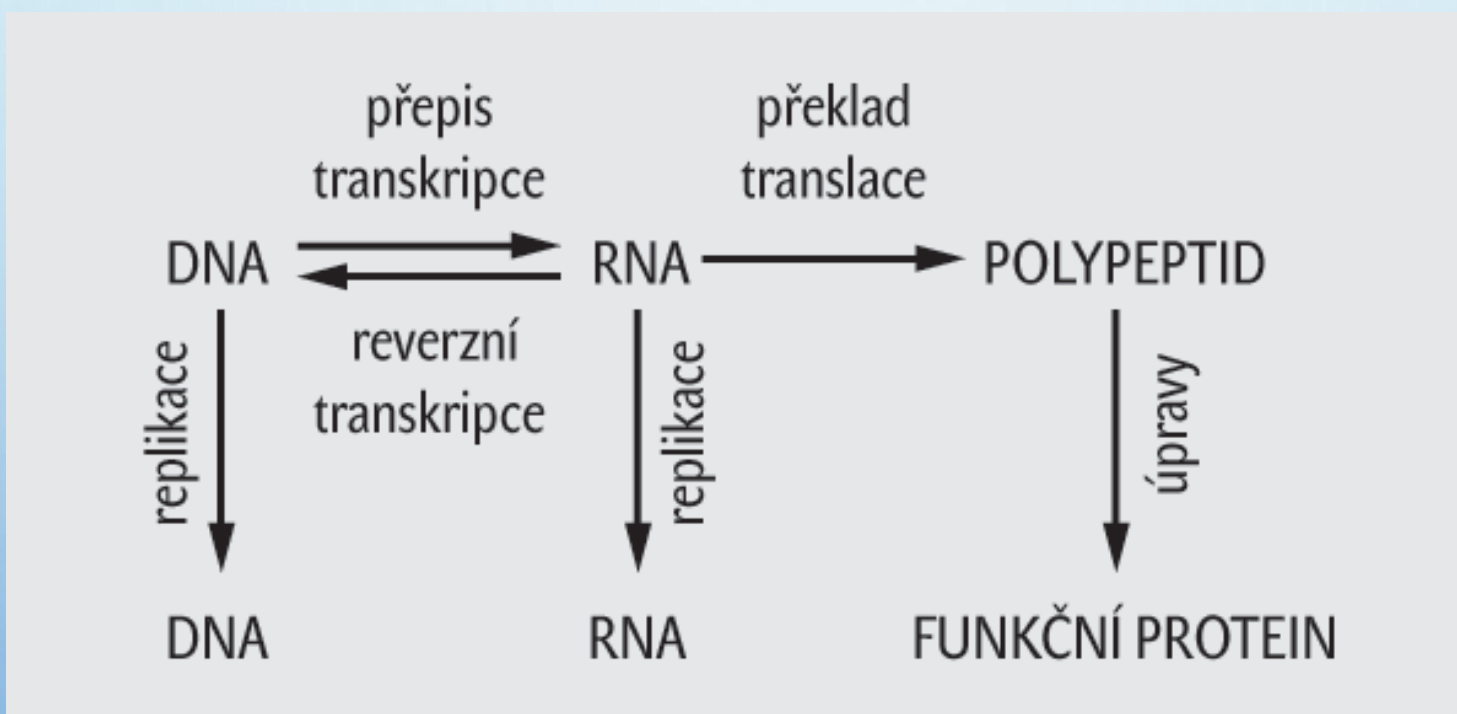
FUNKCE PROTEINŮ

- 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



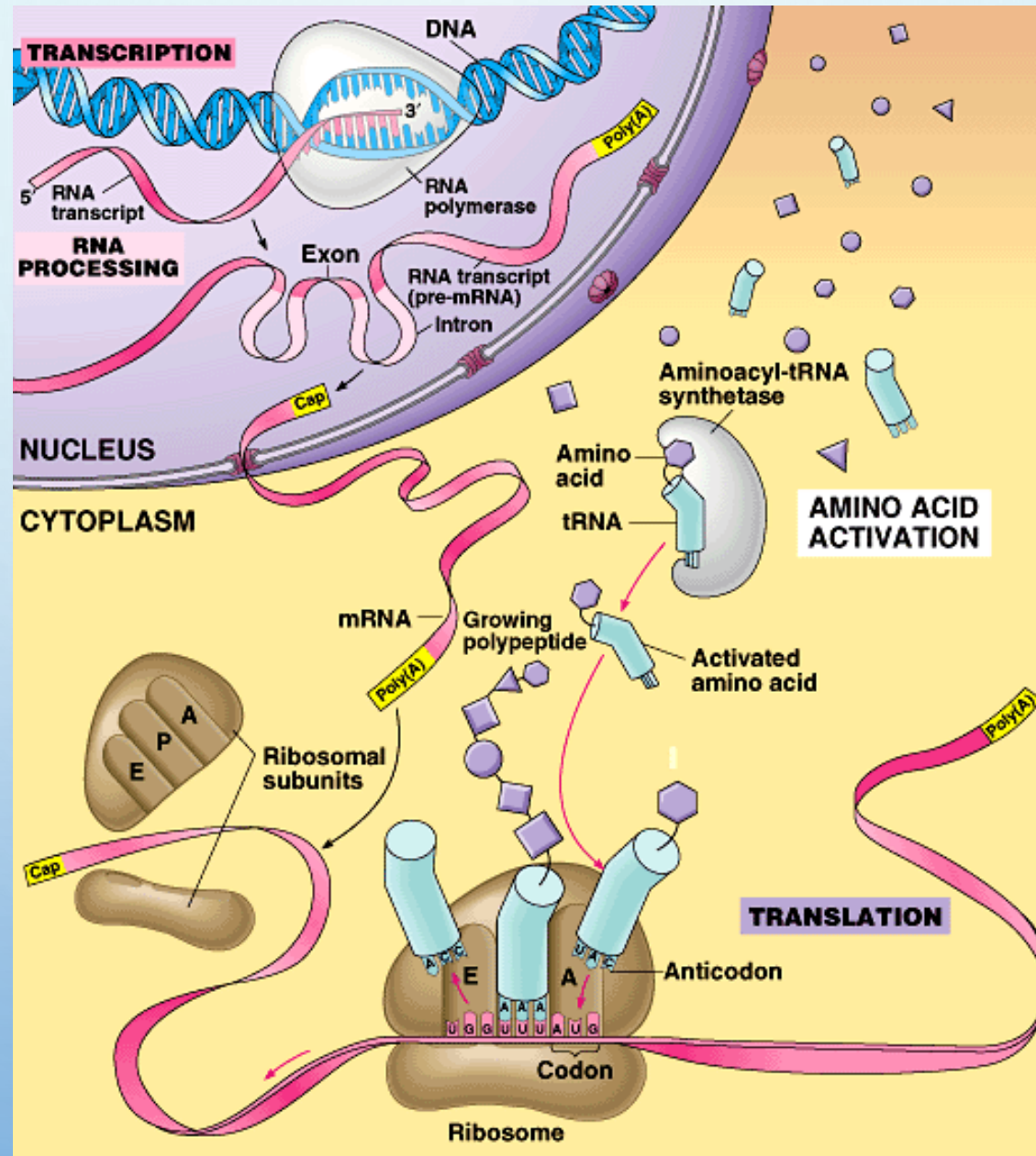
OD RNA K PROTEINU

- 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

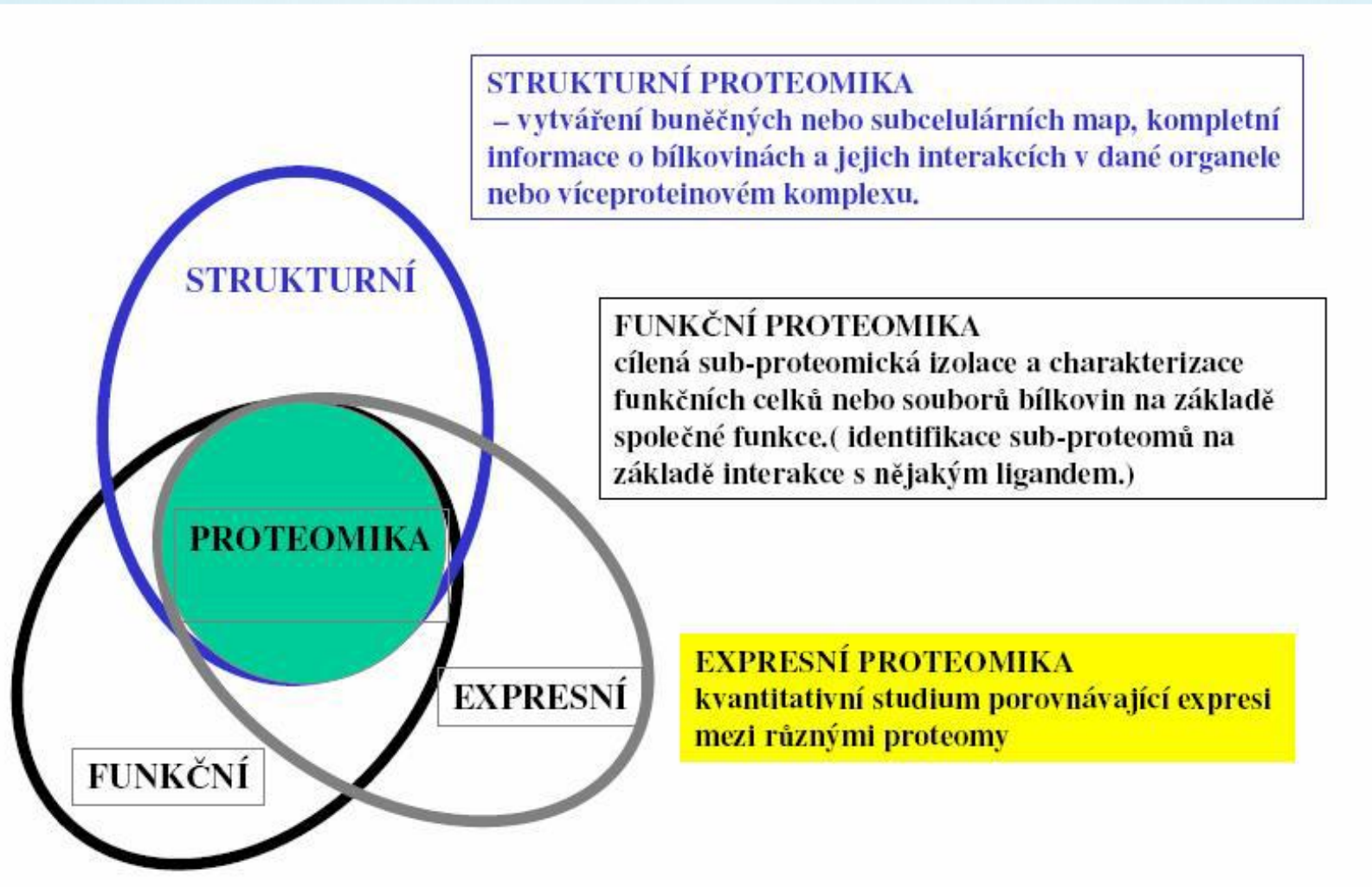
- STRUKTURNÍ GEN – PREMRNA-MRNA
- MRNA OPOUŠTÍ JÁDRO
- NA RIBOZOMECH TRANSLACE – POLYPEPTIDOVÝ ŘETĚZEC
- STOP KODON – KONEC TRANSLACE
- POLYPEPTID SE UVOLNÍ



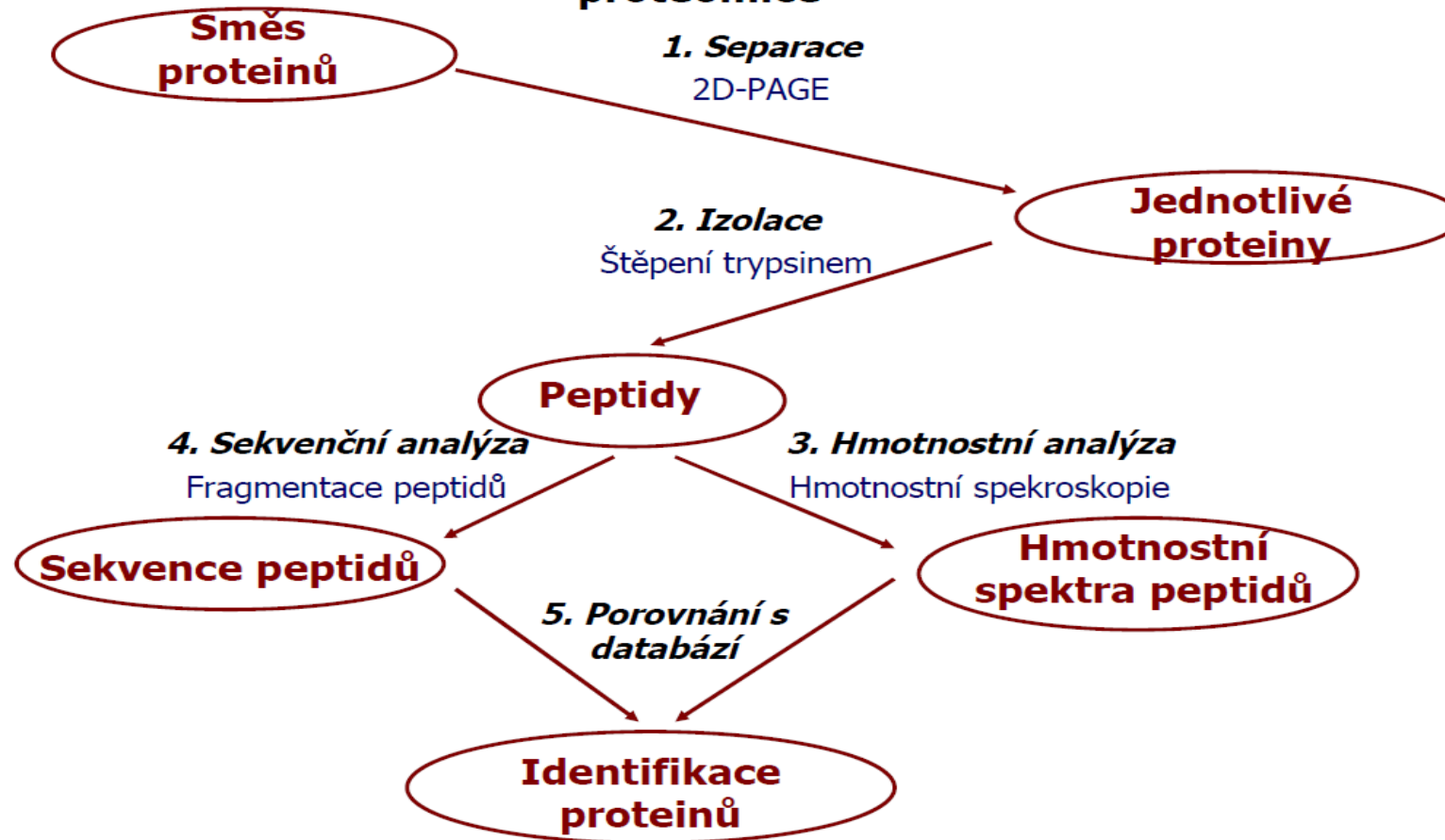
POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE

- PŘIPOJENÍ FUNKČNÍCH SKUPIN
- MODIFIKACE AMINO SKUPIN
- STRUKTURNÍ ZMĚNY

- ALTERNATIVNÍ SESTRĚIH
- ALTERNATIVNÍ ZAVINUTÍ



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)

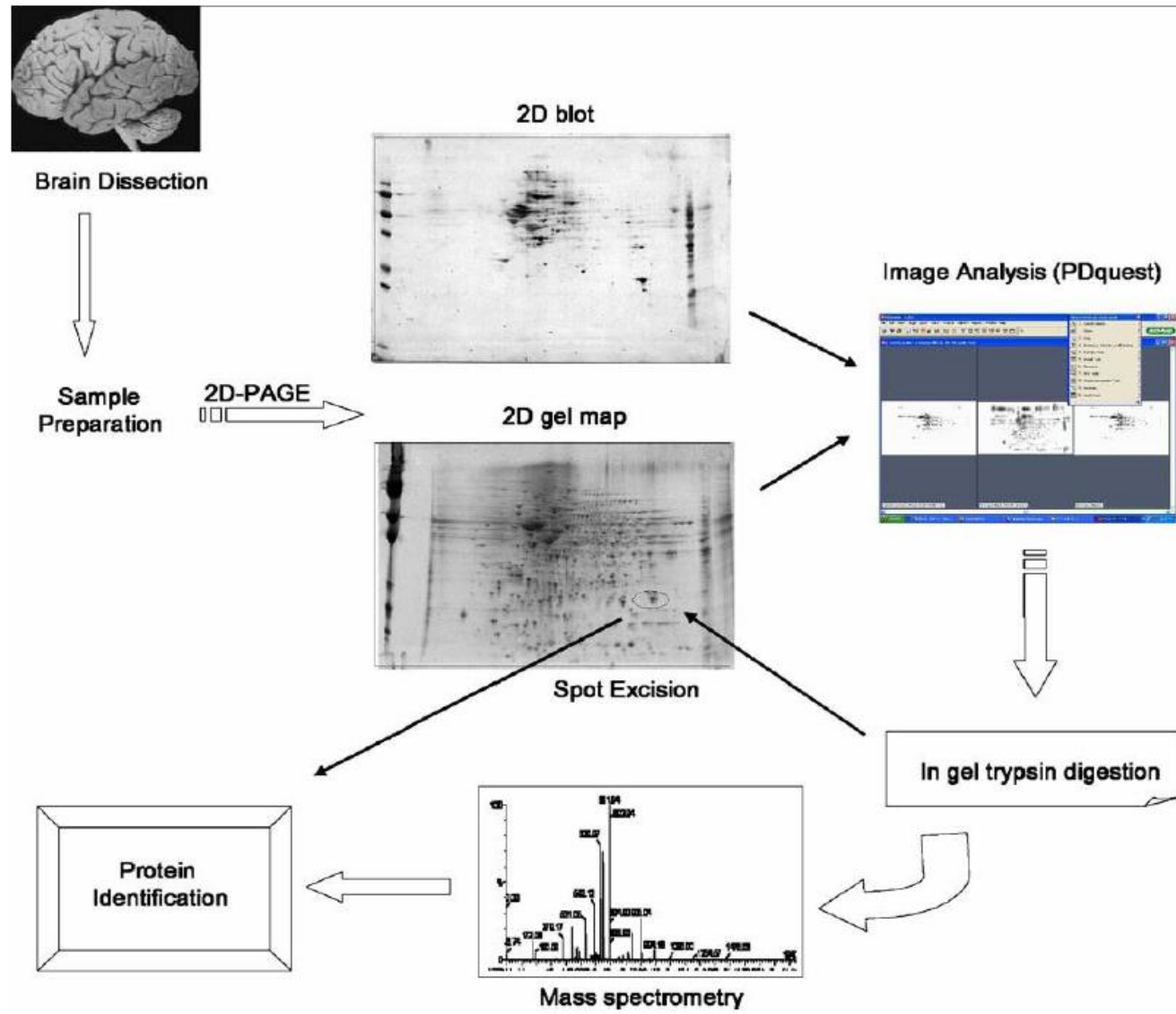
Renální buněčný karcinom
(karbonanhydrasa IX)

Vývoj nových léků

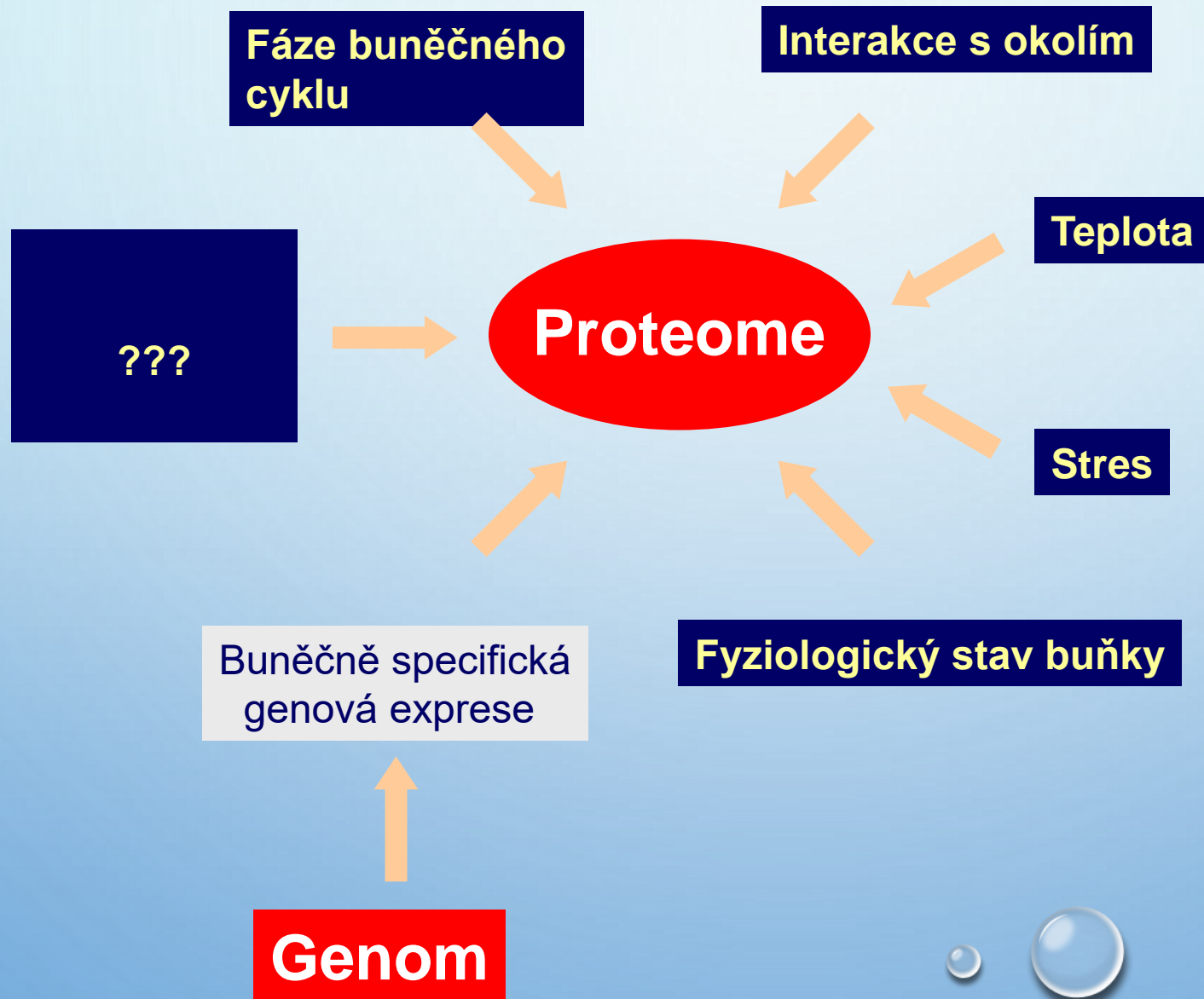
Informace o proteinech způsobující onemocnění je využita pro vývoj nových léků

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

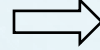
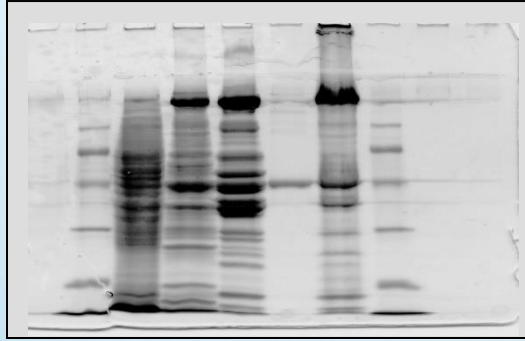
- Translační fúze s reportérovým genem (GFP) – viz dříve
(+ transformace rostlinných buněk)

Studium proteomu

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

Imunodetekce konkrétního proteinu

Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)



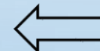
Přenos proteinů z gelu na membránu
= Western blot



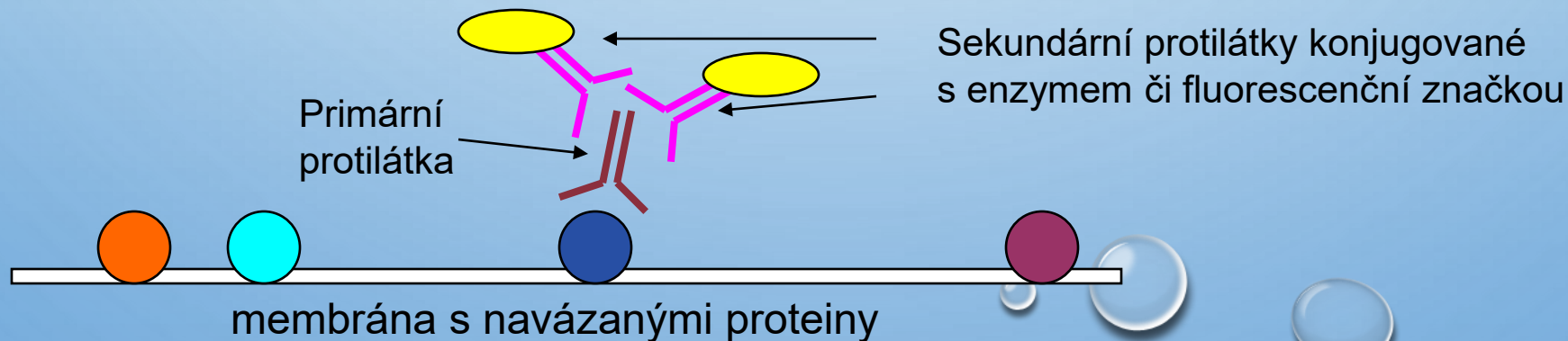
Detekce proteinu protilátkami

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

W. blot

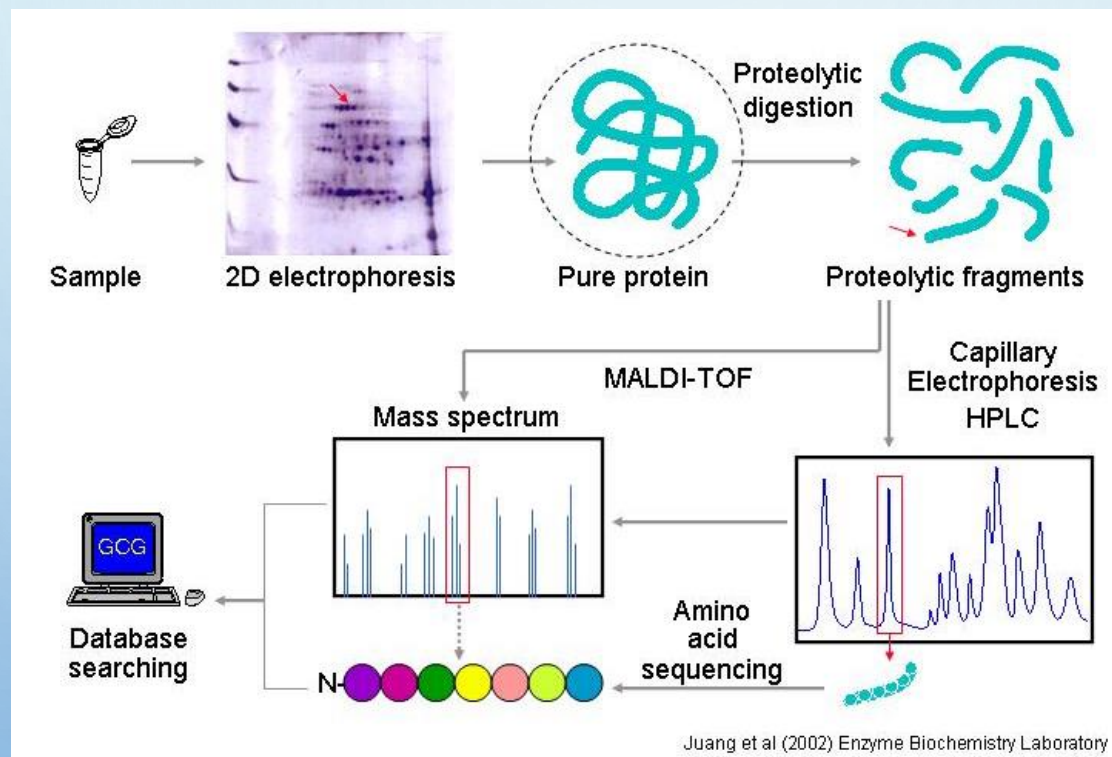


Vizualizace pomocí barevné reakce,
fluorescence či chemiluminiscence



Analýzy celého proteomu

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

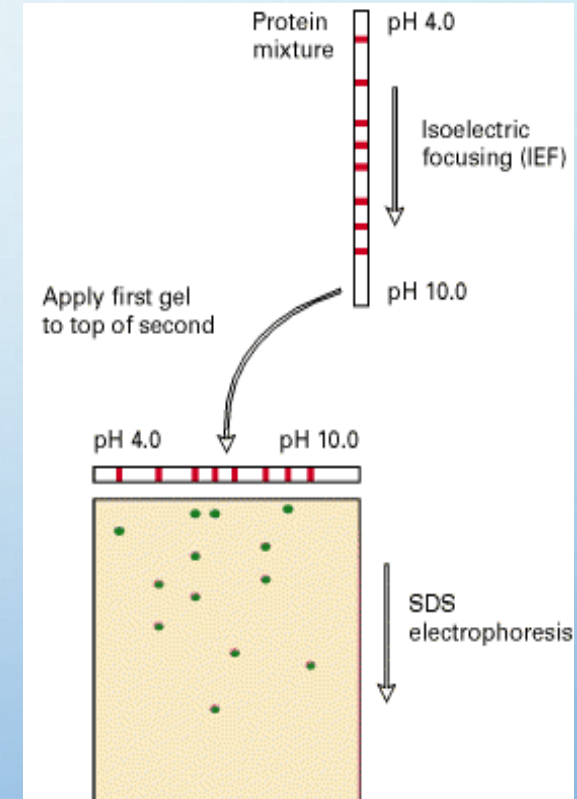


Princip dvourozměrné (2D) elektroforézy

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)

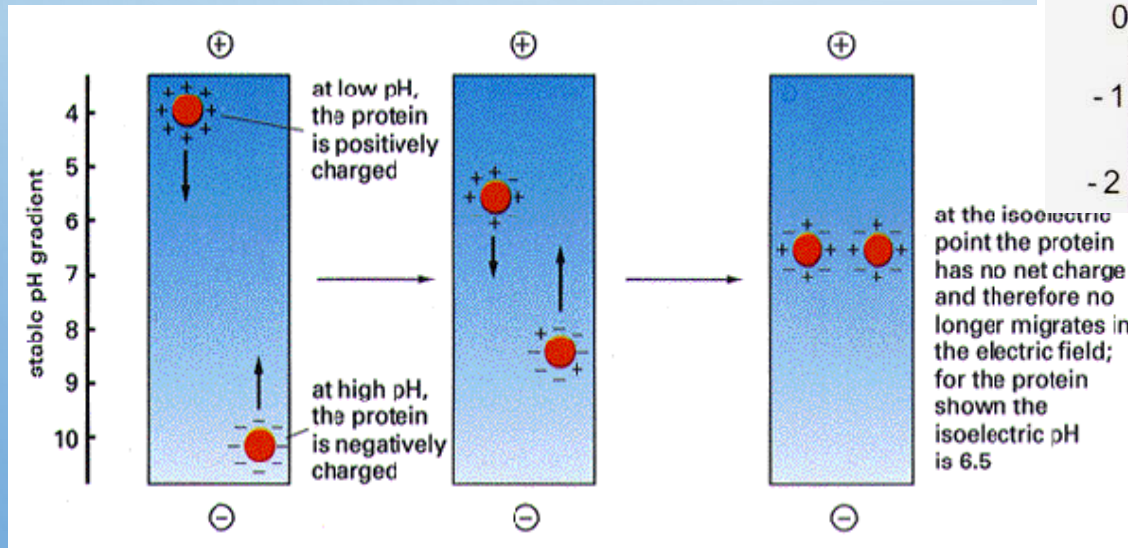
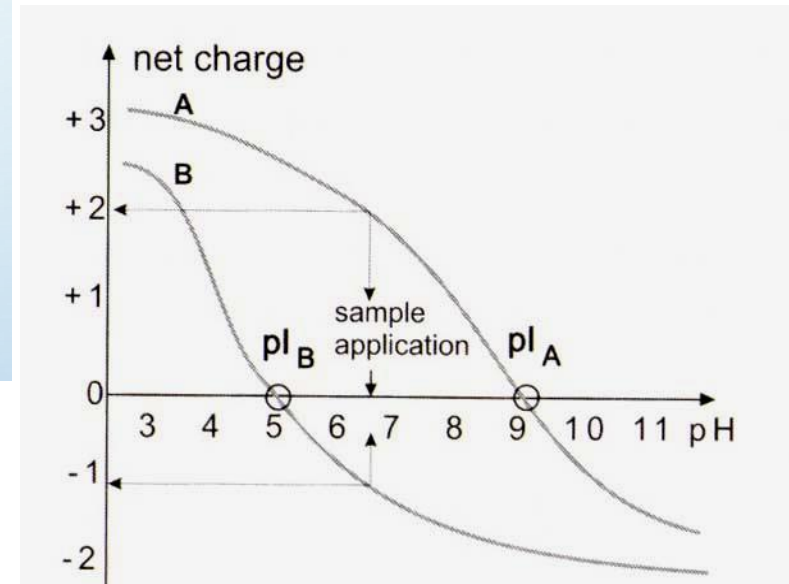
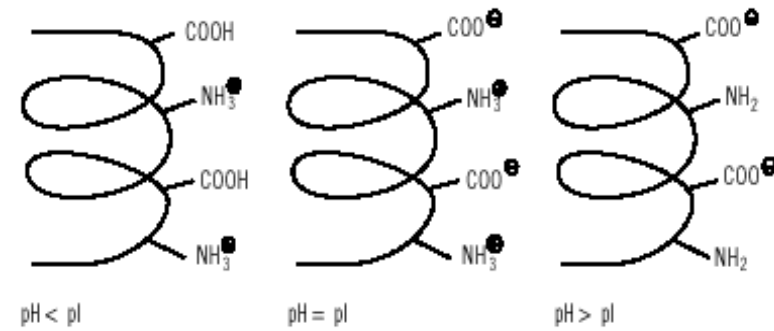
První rozměr IEF

(isoelektrická fokusace):

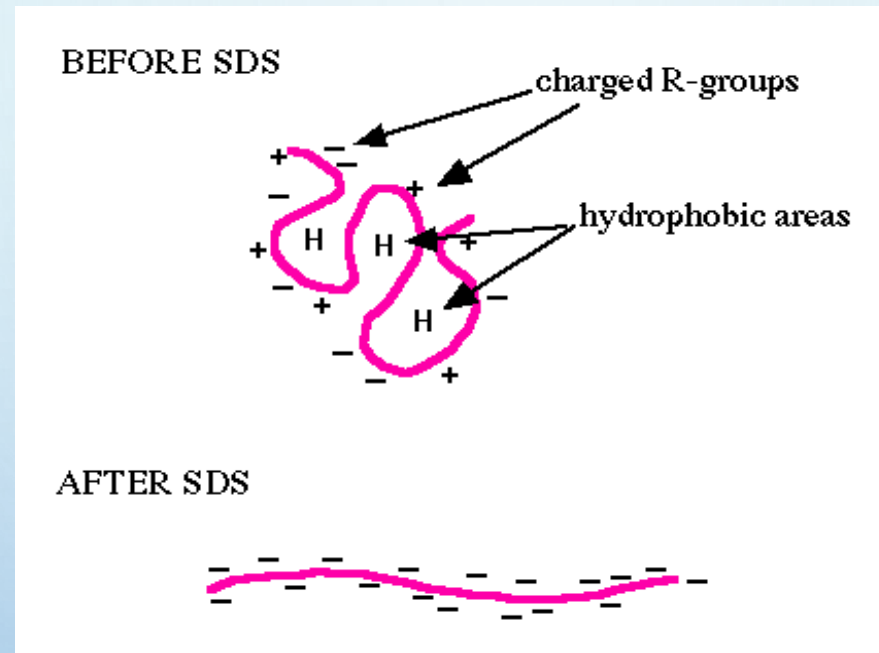
- separace proteinů dle isoelektrického bodu

- 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



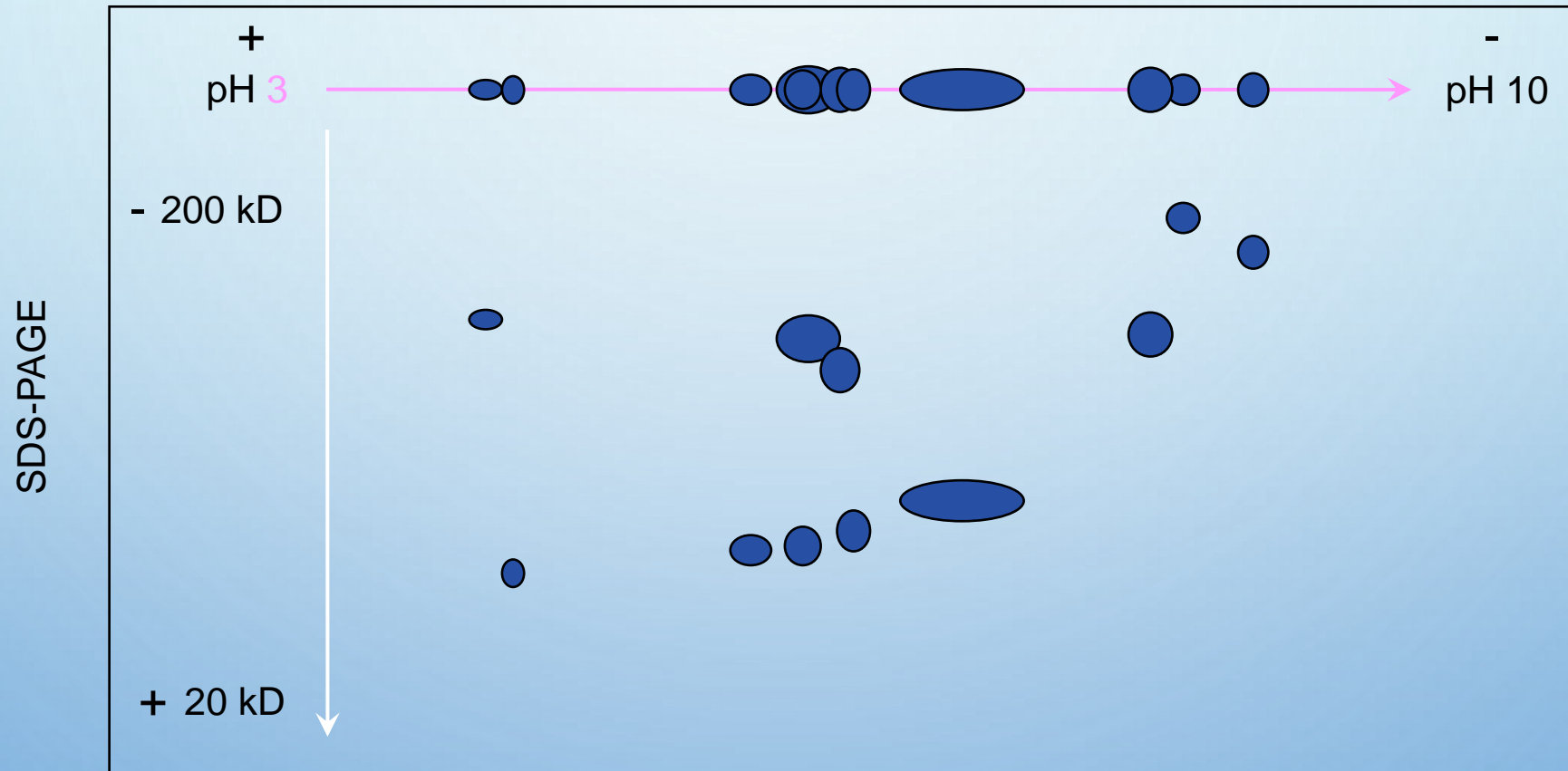
Druhý rozměr SDS-PAGE



- separace denaturovaných obalených proteinů dle velikosti v síti polyakrylamidového gelu

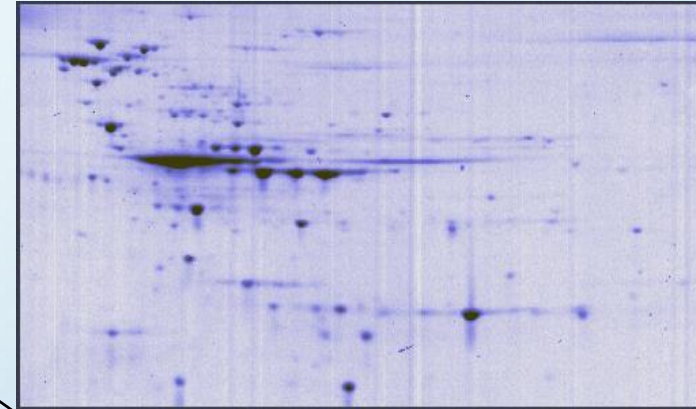
Princip 2-rozměrné (2D) elektroforézy

IEF: isoelektrická fokusace



BARVENÍ PROTEINOVÝCH GELŮ

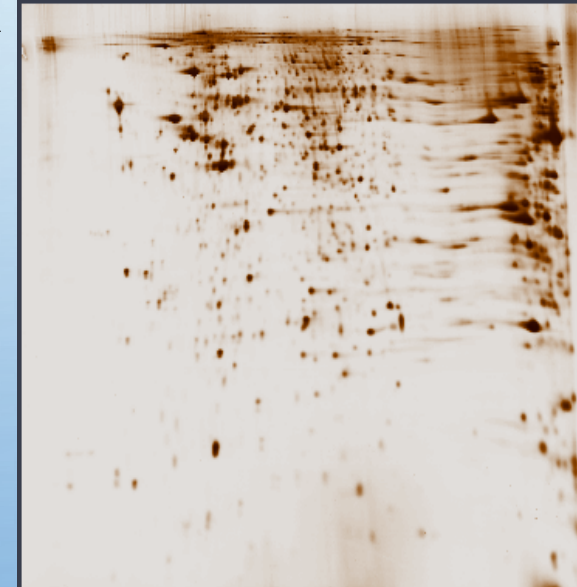
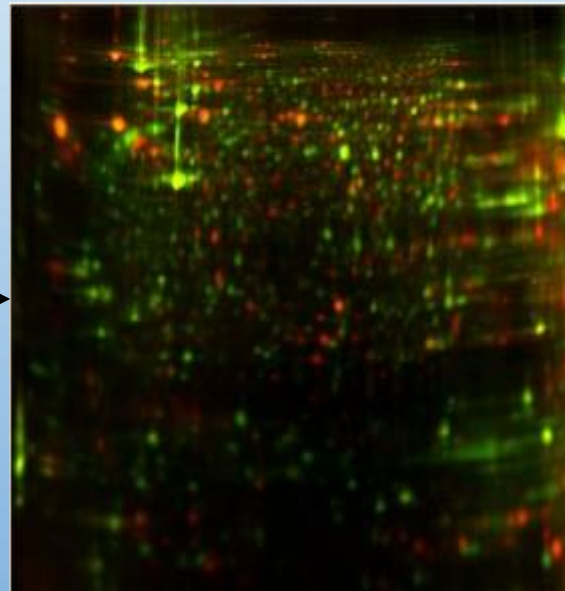
- COOMASSIE BLUE
- STŘÍBREM (CITLIVÉ, ALE NENÍ KVANTITATIVNÍ)
- FLUORESCENČNÍ BARVIVA (DIGE)
- RI (ZNAČENÍ *IN VIVO*)



DIGE: DIFFERENCE

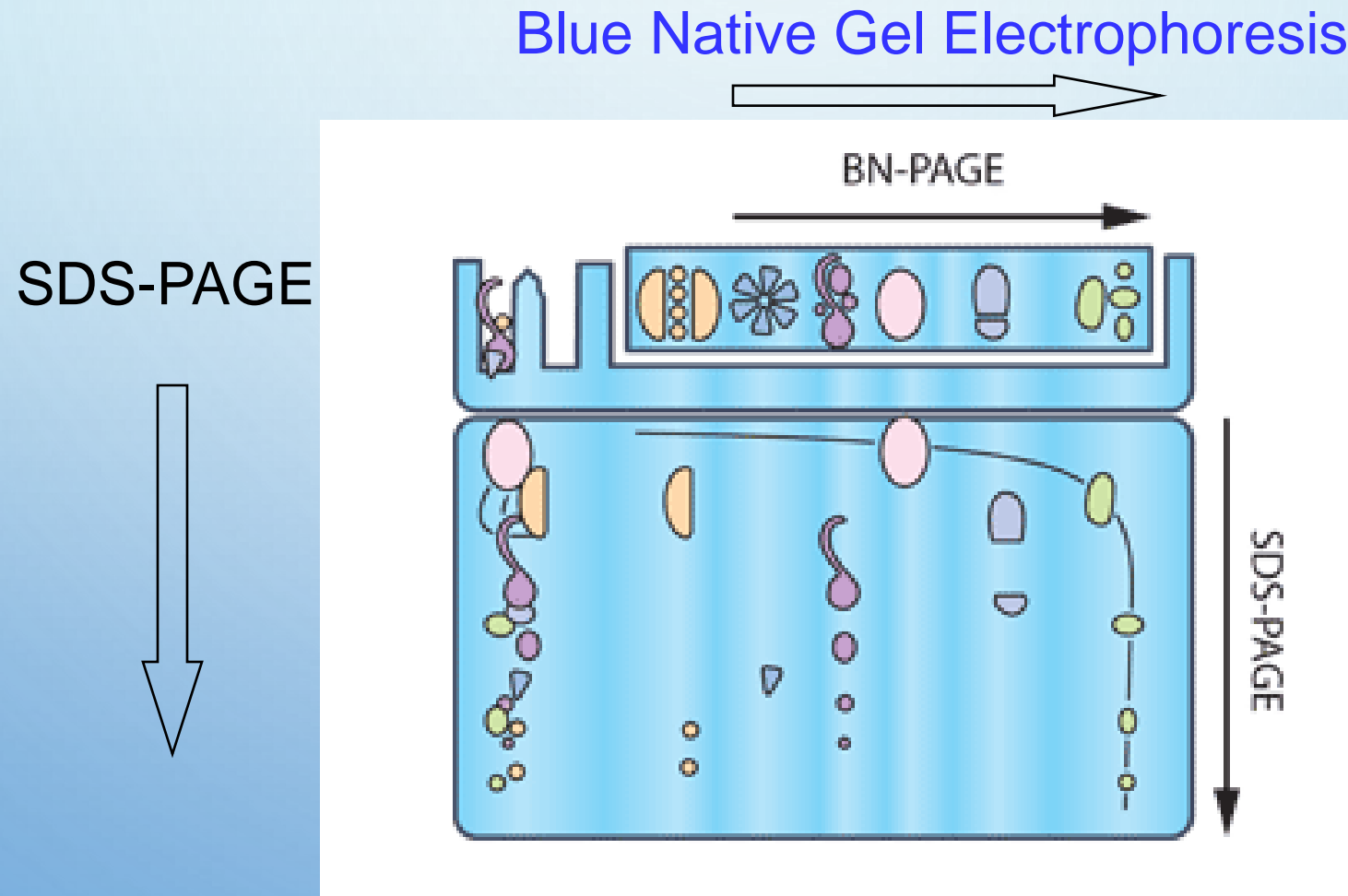
IN GEL ELECTROPHORESIS

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



Analýza proteinových komplexů

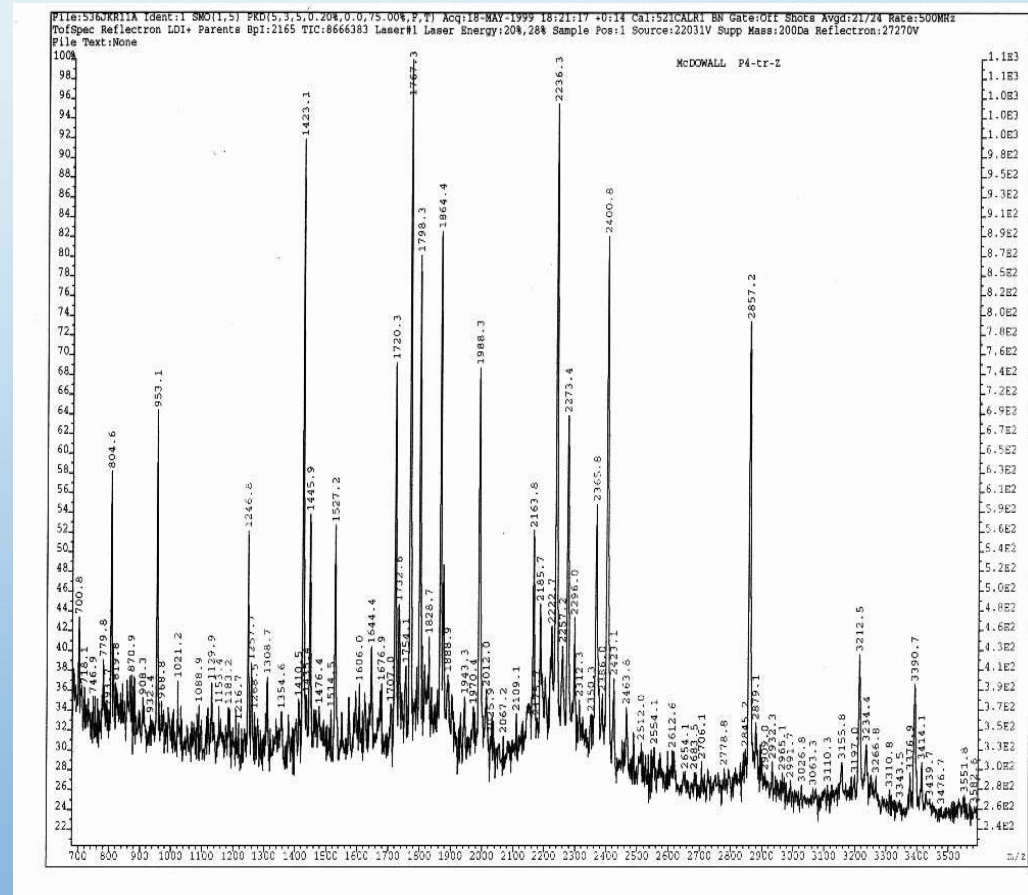
- dělení nativních komplexů (obalených Coomassie BB) dle velikosti v gradientovém gelu (gradient koncentrace akrylamidu = hustota sítě)



IDENTIFIKACE PEPTIDŮ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ: 1) „PEPTIDE FINGERPRINTING“

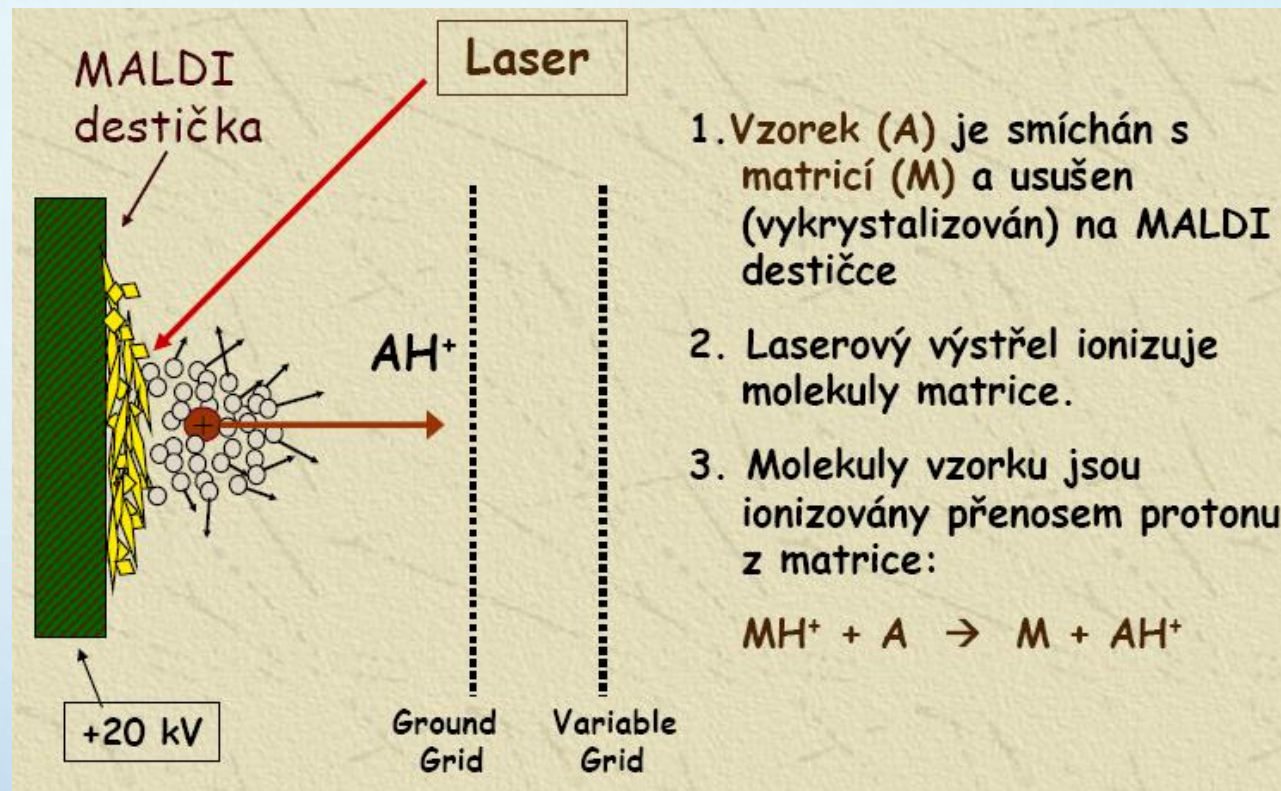
- PŘESNÉ ZMĚŘENÍ VELIKOSTÍ DEFINOVANÝCH ŠTĚPŮ PROTEINU A
POROVNÁNÍ S PREDIKOVANÝMI ŠTĚPY PROTEINŮ V DATABÁZÍCH

- 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



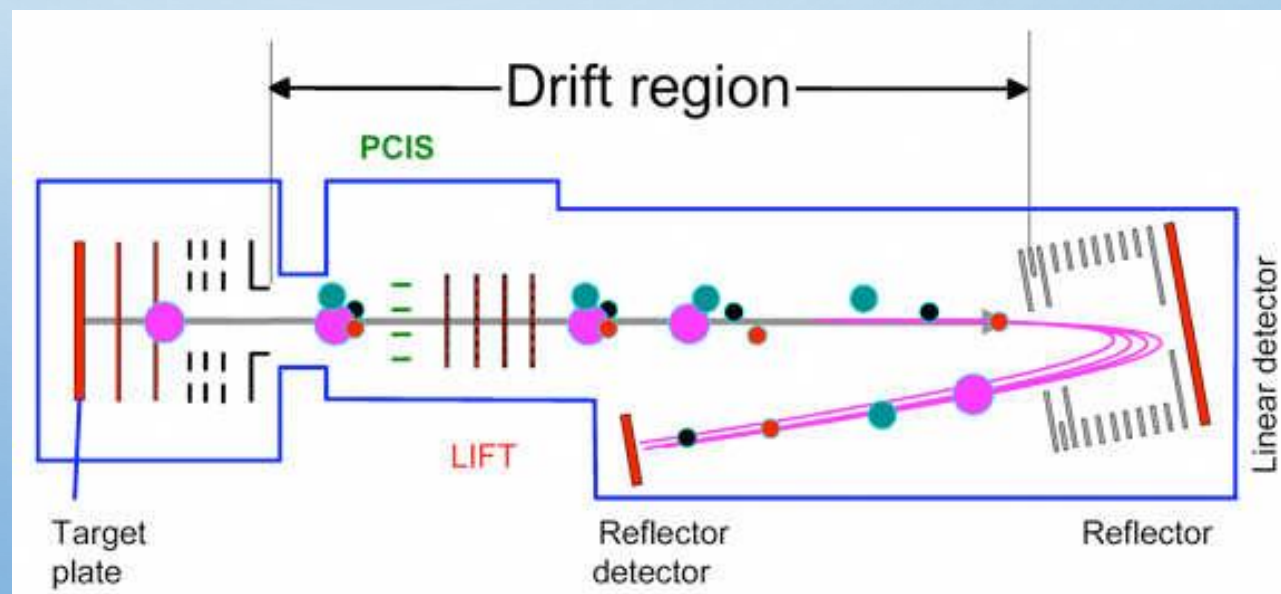
MALDI

Matrix-assisted
Laser desorption /
ionisation



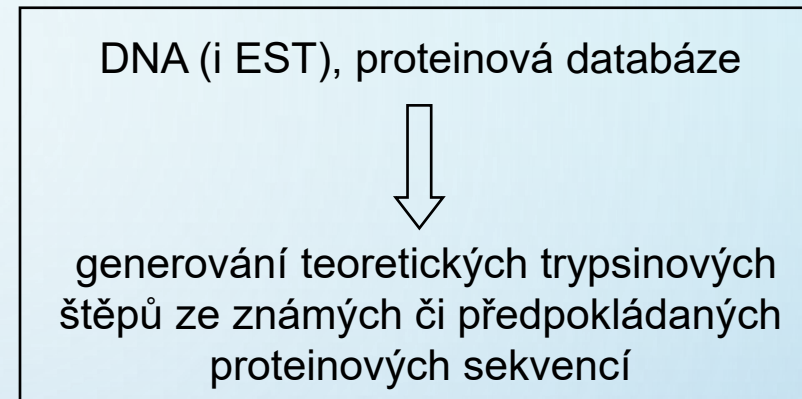
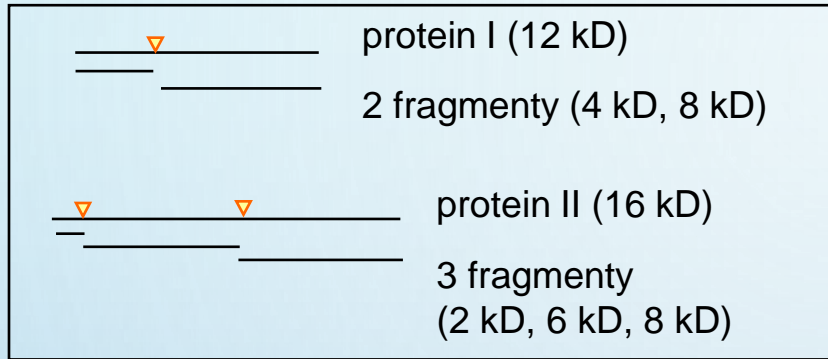
ToF

Time-of-flight
– změření doby
letu k detektoru

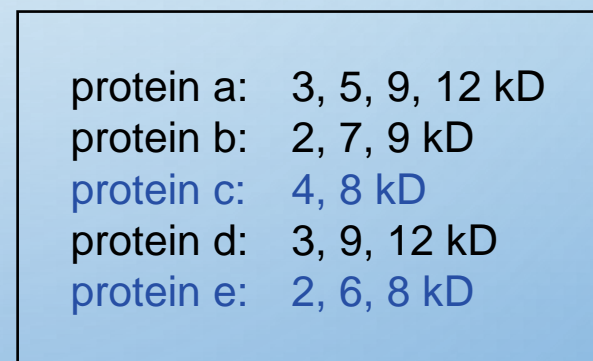
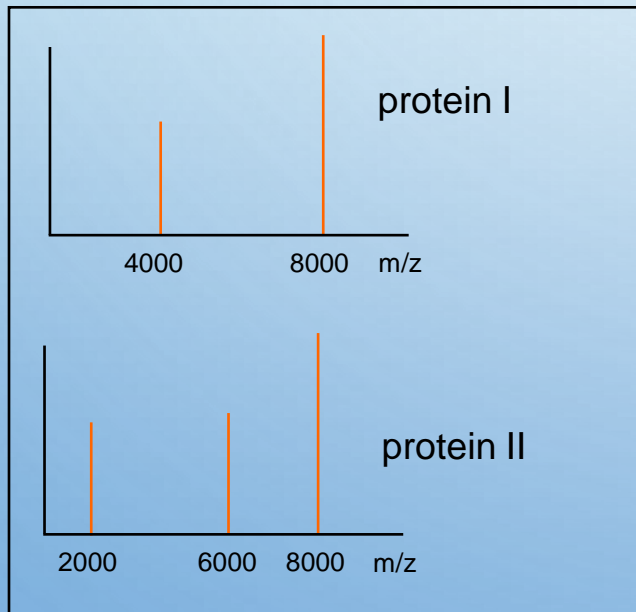


Identifikace proteinů – „peptide fingerprinting“

štěpení proteázou (trypsinem)



MALDI ToF



Srovnání experimentálně stanovených velikostí peptidů s teoretickými štěpy

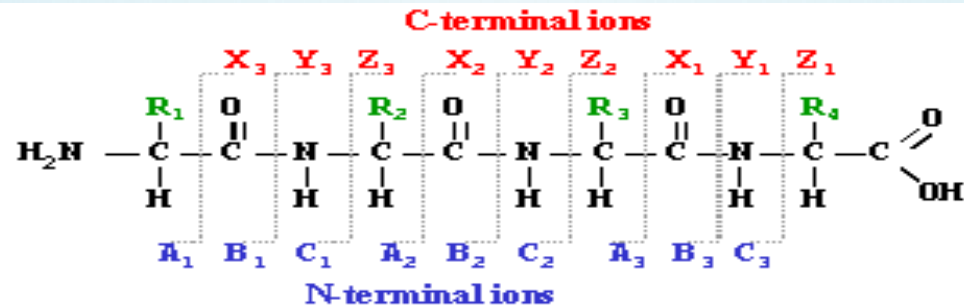
2) MS/MS „sekvenování“ peptidů

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

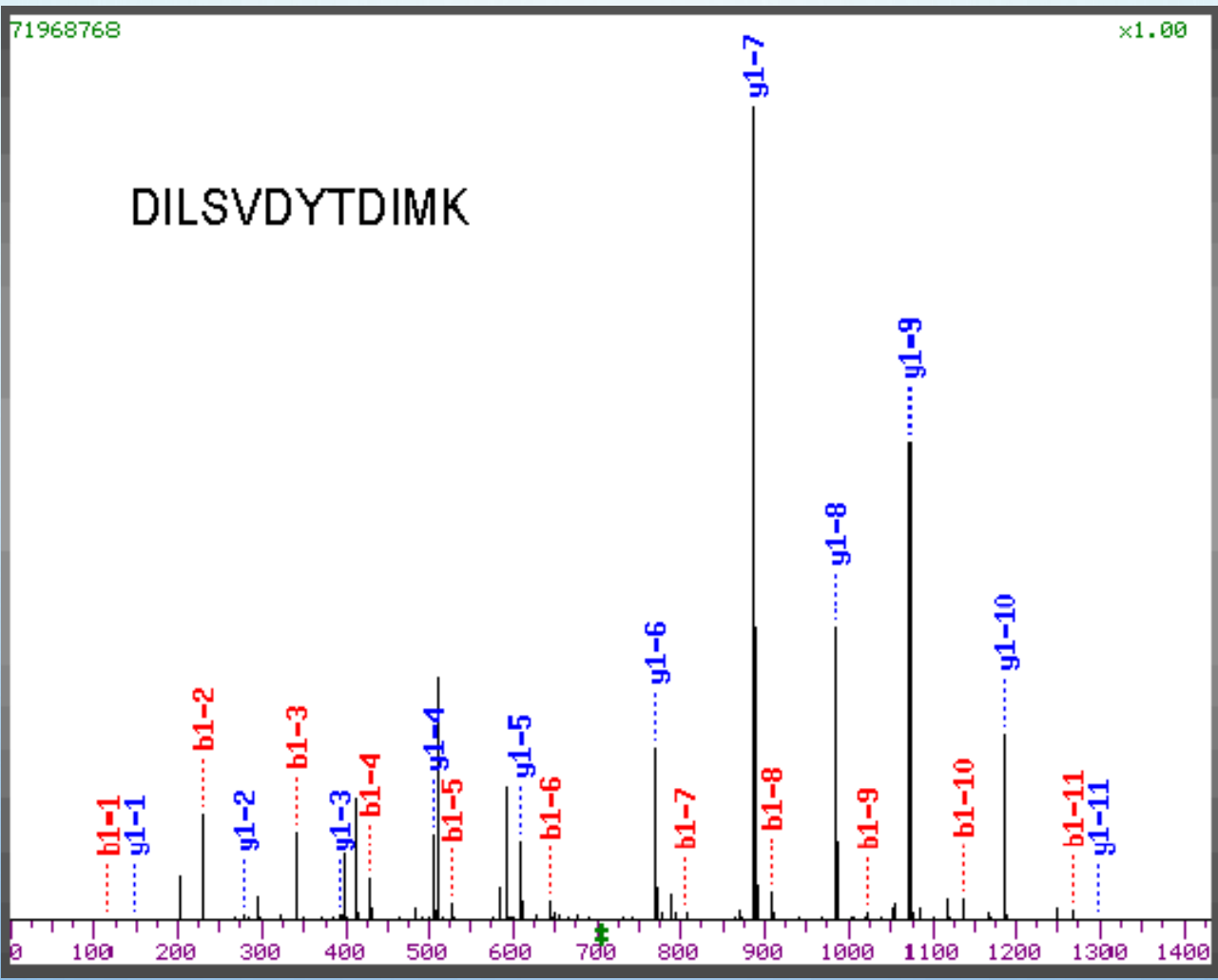
- rozpad na dva fragmenty



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

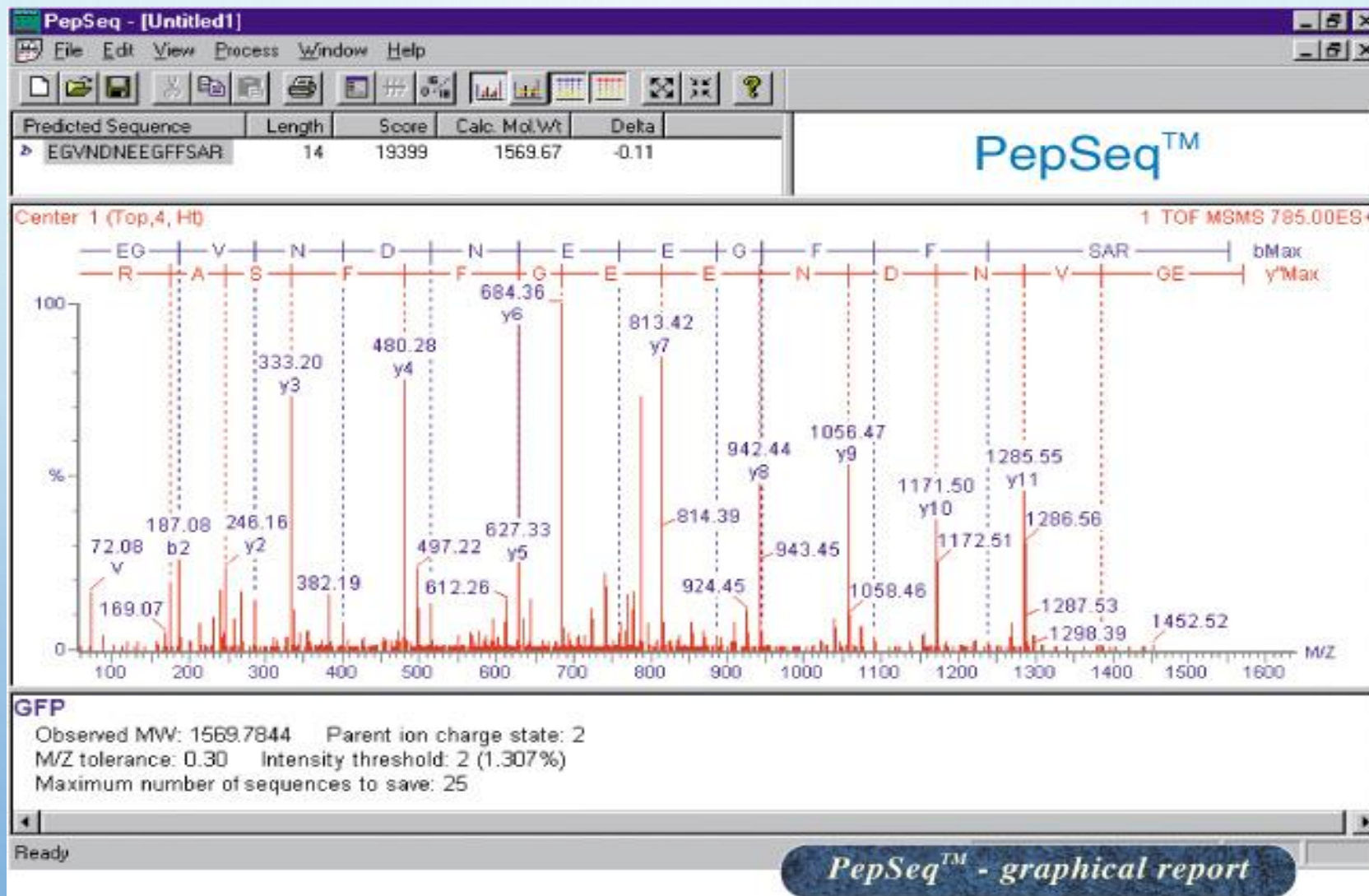
<u>mass⁺</u>	<u>b-ions</u>	<u>y-ions</u>	<u>mass⁺</u>
88.1	S -----	PAFDSIMAETLK	1323.6
185.2	SP	AFDSIMAETLK	1226.4
256.3	SPA	FDSIMAETLK	1155.4
403.5	SPAF	DSIMAETLK	1008.2
518.5	SPAFD -----	SIMAETLK	893.1
605.6	SPAFDS	IMAETLK	806.0
718.8	SPAFDSI	MAETLK	692.3
850.0	SPAFDSIM	AETLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA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

HMOTNOSTNI SPEKTRUM PEPTIDOVÝCH FRAGMENTŮ



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

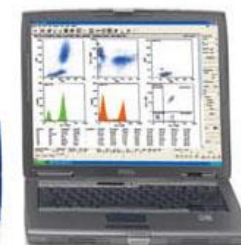
ANALÝZY MS SPEKTRA



FLOWCYTOMETRIE

- ANALÝZA POVRCHOVÝCH ALE I VNITŘNÍCH PROTEINŮ POMOCÍ FLUORESCENČNĚ ZNAČENÝCH PROTILÁTEK

KOMERČNÍ ZAŘÍZENÍ



CO MŮŽEME ANALYZOVAT POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE?

- POČÍTAT ČÁSTICE V SUSPENZI
- ODDĚLIT ŽIVÉ ČÁSTICE OD NEŽIVÝCH
- HODNOTIT 10^5 AŽ 10^6 ČÁSTIC ZA MÉNĚ NEŽ 1 MINUTU
- KVANTIFIKOVAT ROZPTYL SVĚTLA, ALE I INTENZITU FLUORESCENCE
- FYZICKY SEPAROVAT JEDNOTLIVÉ ČÁSTICE (POPULACE) PRO DALŠÍ ANALÝZU

Jaké jsou principy?

- Rozptyl světla (Light scatter) pomocí laseru nebo UV lampy
- Detekce specifické fluorescence
- Hydrodynamicky zaostřený proud částic
- Elektrostatická separace částic
- Možnost multivariační analýzy dat

DEFINICE

- **PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE (FLOW CYTOMETRY)**
 - MEŘENÍ VLASTNOSTÍ PROUDÍCÍCH ČÁSTIC (BUNĚK)
- **PRŮTOKOVÝ SORTING (FLOW SORTING)**
 - SEPARACE ČÁSTIC (BUNĚK) NA ZÁKLADĚ PARAMETRŮ MĚŘENÝCH PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ
 - TAKÉ ZNÁMO JAKO **FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING (FACS)**

ANALÝZA NK

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

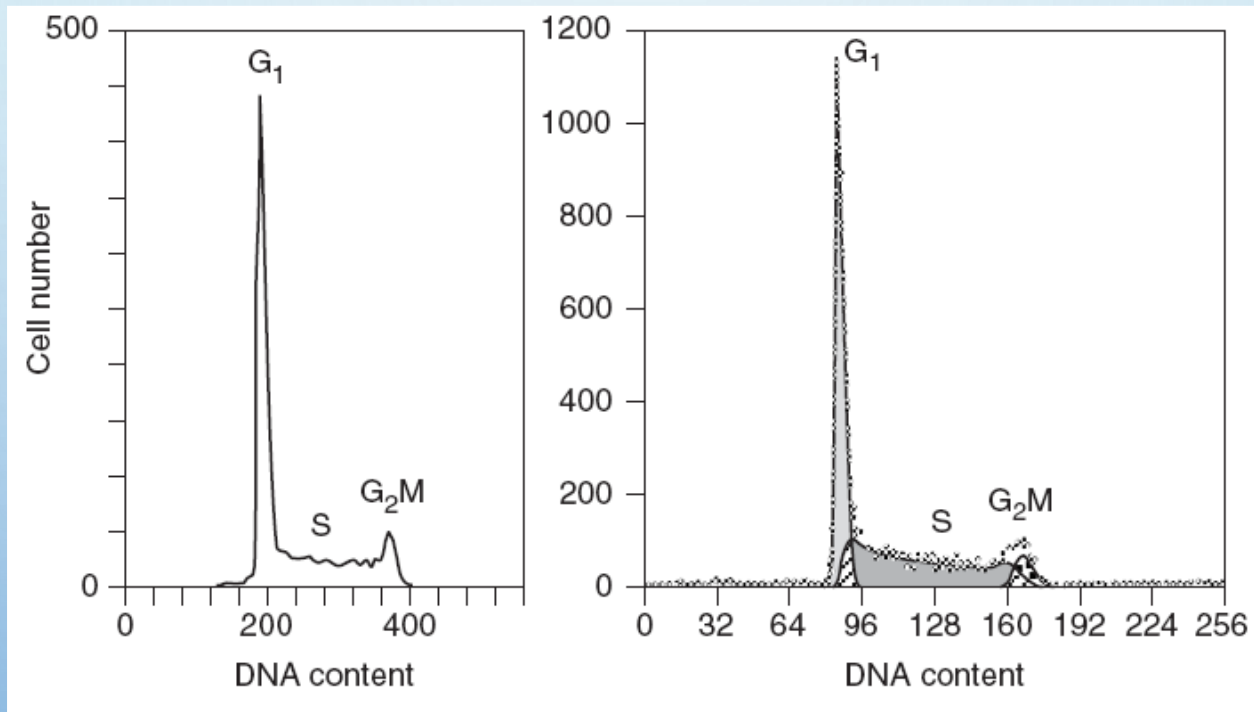
STUDIUM BUNĚČNÝCH FUNKCÍ

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

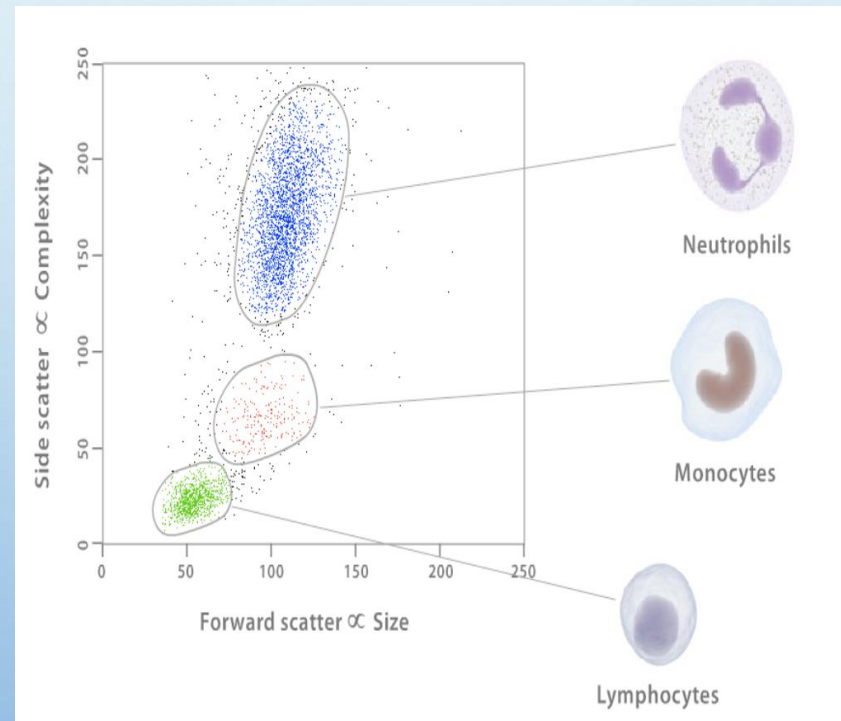
ANALÝZA BUNĚČNÉHO FENOTYPU

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

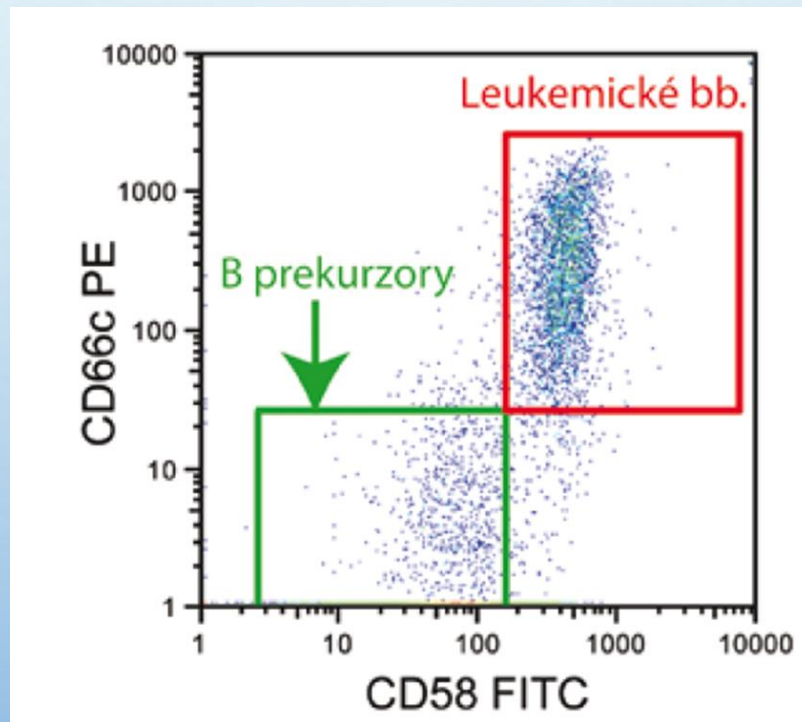
ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU



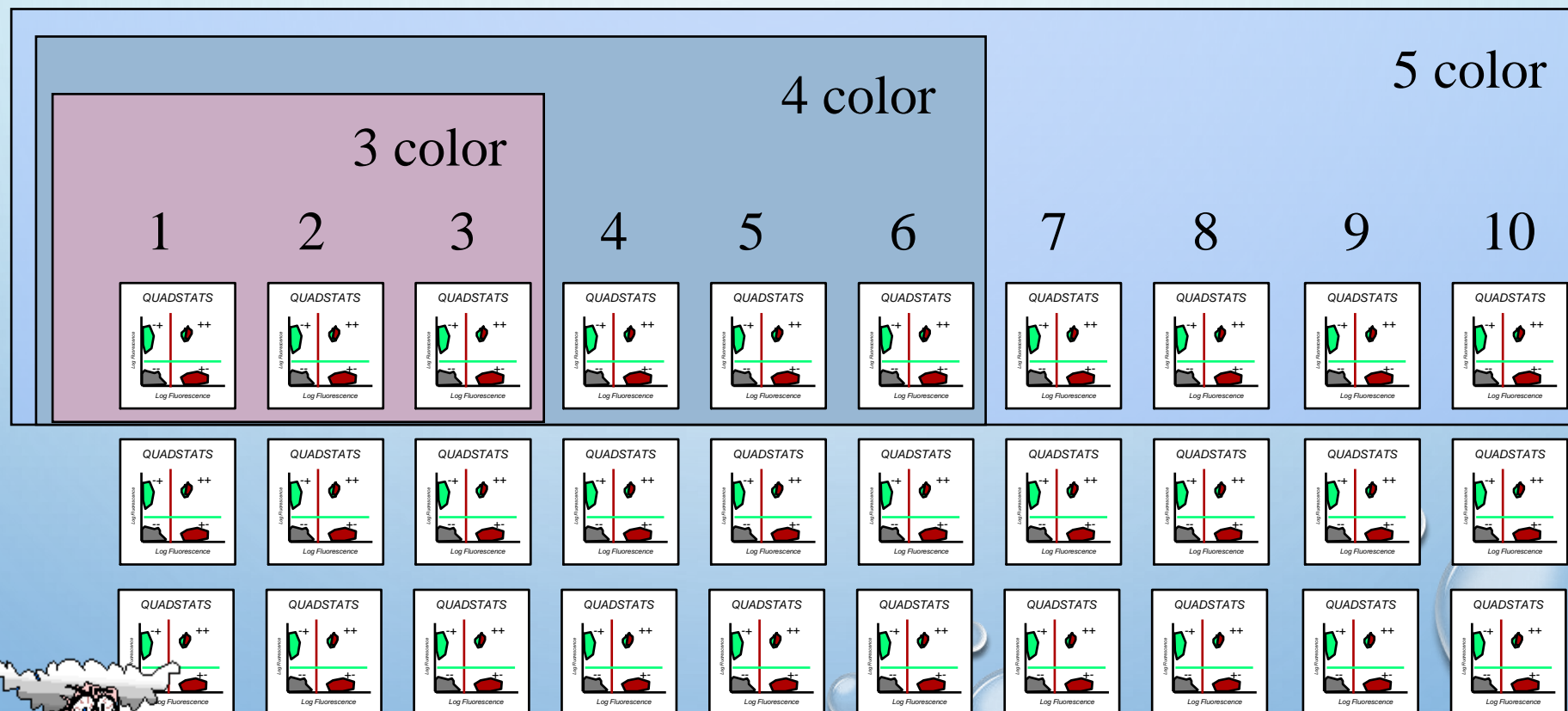
ANALÝZA KREVNÍCH BUNĚK



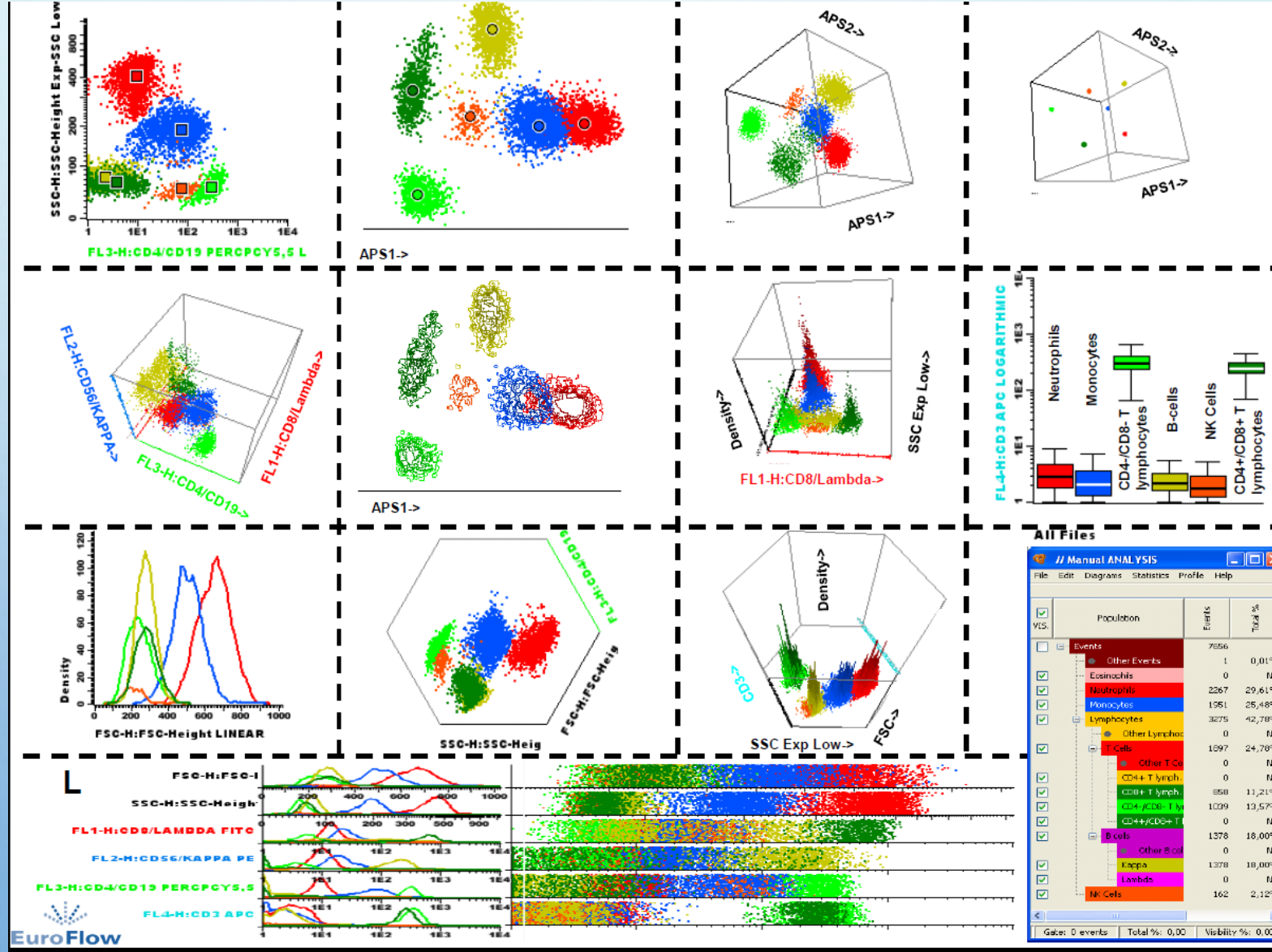
DETEKCE MRD



VÍCEBAREVNÉ ANALÝZY GENERUJÍ MNOHO DAT...



DATA ANALYSIS



Automatic Population Separator

