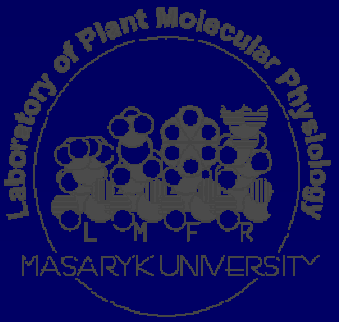
Základy proteomiky 2009

Proč právě proteomika?

Jan Hejátko



Základy proteomiky 2007

- **Schéma přednášek ze Základů proteomiky 2007**

1. blok, 20. 3. 2009

- Proč právě proteomika? (Jan Hejátko)
- Exprese a purifikace rekombinantních proteinů (Radka Fohlerová)

2. blok, 27. 3. 2009

- Funkce proteinů (Lubomír Janda)
- Určování třírozměrných proteinových struktur metodami proteinové krystalografie (Jaromír Marek)

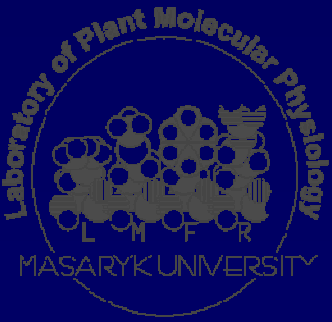
3. blok, 3. 4. 2009

- Metody separace proteinů (Hana Konečná)
- Hmotnostní spektrometrie proteinů (Zbyněk Zdráhal)

Základy proteomiky 2007

Proč právě proteomika?

- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování
- Od genu k proteinu a zpět
- Přístupy současné proteomiky
  - exprese, purifikace a analýza rekombinantních proteinů
  - analýza vztahu mezi strukturou a funkcí proteinů
  - diferenční proteomika
  - analýza posttranslačních modifikací



Základy proteomiky 2007

Proč právě proteomika?

- PROTEOME = PROTEins expressed by genOME (konference 2-D ELFO, Siena, 1994)
  - DNA: GENOME, HAPLOME, EPIGENOME
  - RNA: TRANSCRIPTOME
  - PROTEIN: ORFEOME, PROTEOME, LOCALISOME, INTERACTOME, METABOLOME, PHENOME, …
    - PHENOME: kombinace různých dat, zahrnujících fenotyp, expresní data různých (ideálně všech) genů daného organismu a proteinová data (interakce, jednotlivé vlastnosti proteinů, …)
- Proč vůbec studovat proteiny, když máme tolik genetických dat? (sekvence genomů, expresní profily genů, fenotypy mutantů,…?)

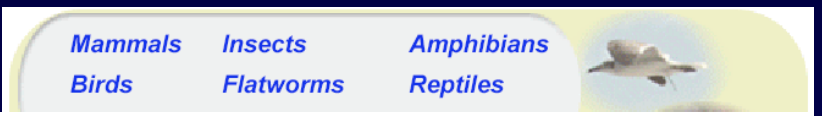
V koncovém výsledku, tedy ***fenotypu***, se vždy projeví regulace na všech úrovních, od genu po protein a jeho modifikaci

Na konci je vždy **BIOLOGICKÝ PROBLÉM** !!!!

Anotace genů a odhad aminokyselinových sekvencí předpokládaných proteinů

Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst

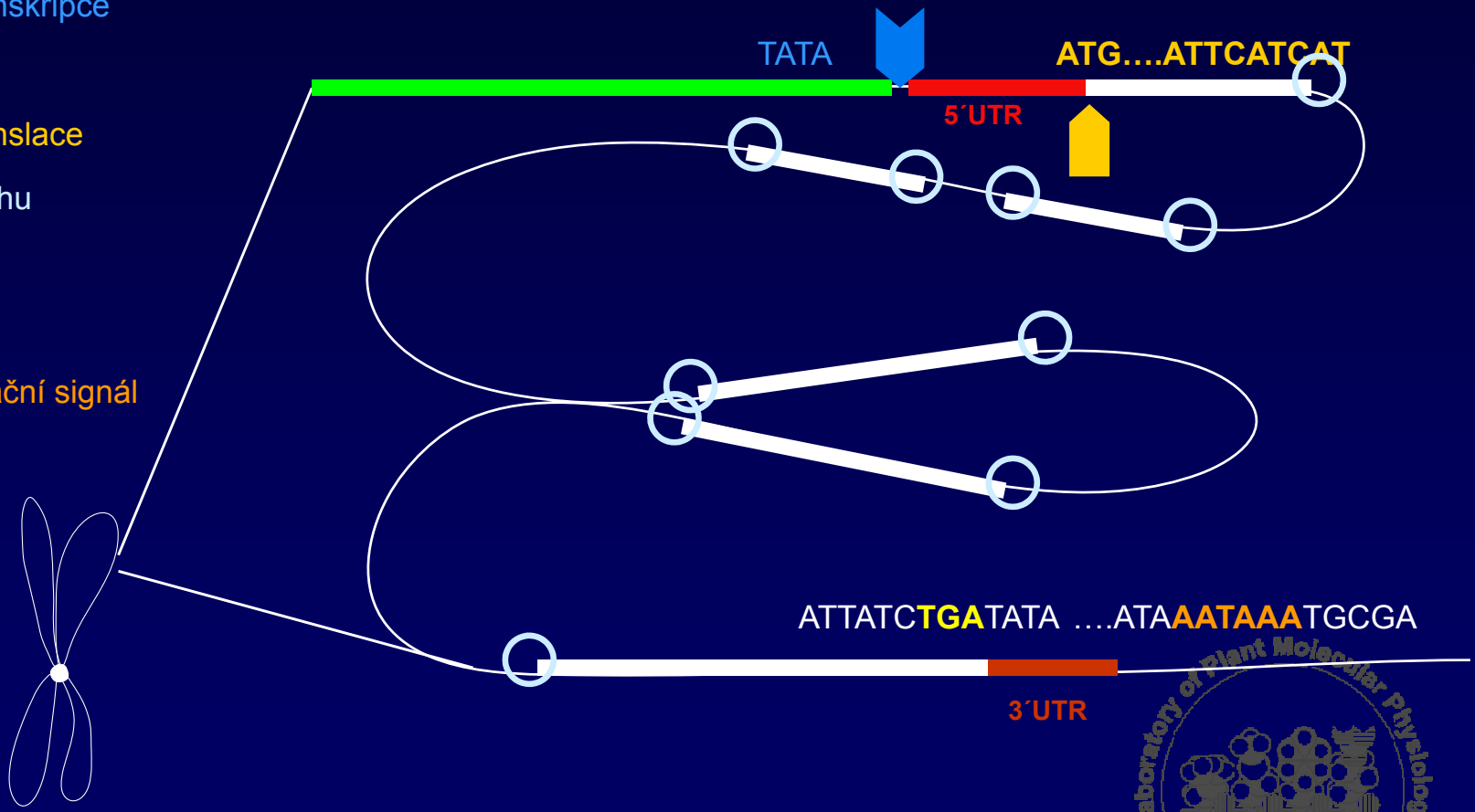
- dnes k dispozici v databázích více než 700 000 záznamů (nr databáze) různých organizmů
- Získané informace lze zpracovat pomocí ***bioinformatiky***



Predikce funkce genů *in silico*

struktura genů

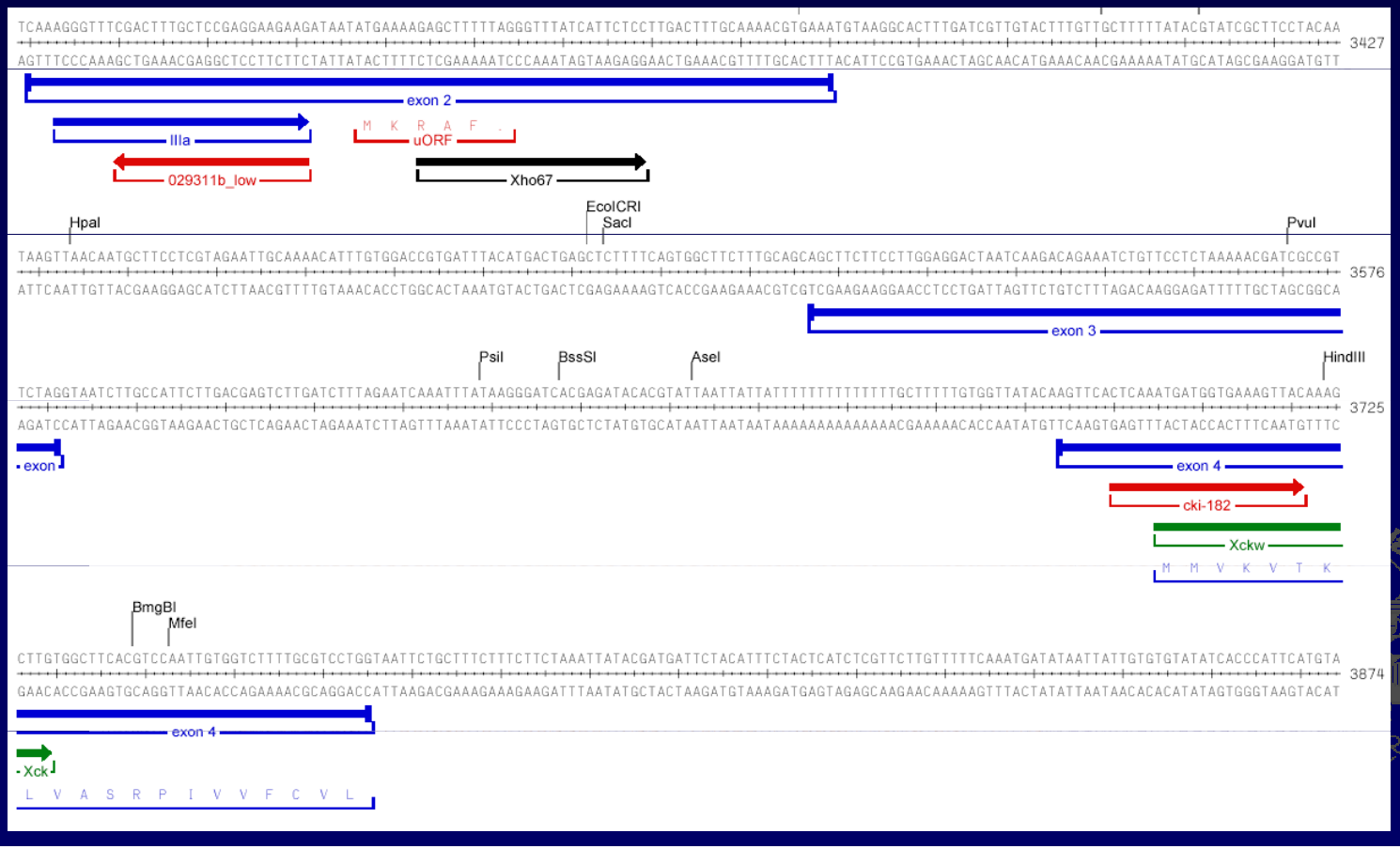
- struktura genů
  - promotor
  - počátek transkripce
  - 5´UTR
  - počátek translace
  - místa sestřihu
  - stop kodon
  - 3´UTR
  - polyadenylační signál



Anotace genů a odhad aminokyselinových sekvencí předpokládaných proteinů

Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst

- dnes k dispozici v databázích více než 700 000 záznamů (nr databáze) různých organizmů
- Získané informace lze zpracovat pomocí ***bioinformatiky***



Základy proteomiky 2007

Proč právě proteomika?

- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování

Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování

- Genom vs. Proteom

Danaus plexippus (monarch)

Gen → Transkript → Protein → Fenotyp

Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování

Možná analogie s textem a jeho interpretací

DNA:

Kdyžadoperbtabijsemdfjfwůcsaknclůsnínjxldalnxckjcnbychcxmasizdciksrdceasnanazxcnlsdlaň.

Když----------jsem---------snídal---ní-----dal---------bych-----si-----srdce.------na-------dlaň.

RNA:

Když jsem s ní, dal bych si srdce na dlaň.

Když jsem s ní, dal bych si srdce na dlaň.

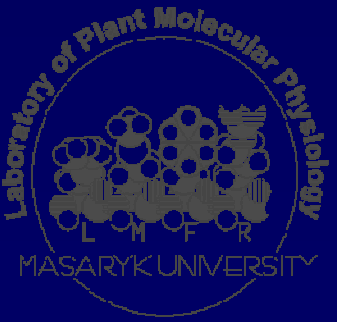
Když jsem snídal srdce.

PROTEIN:

Základy proteomiky 2007

Proč právě proteomika?

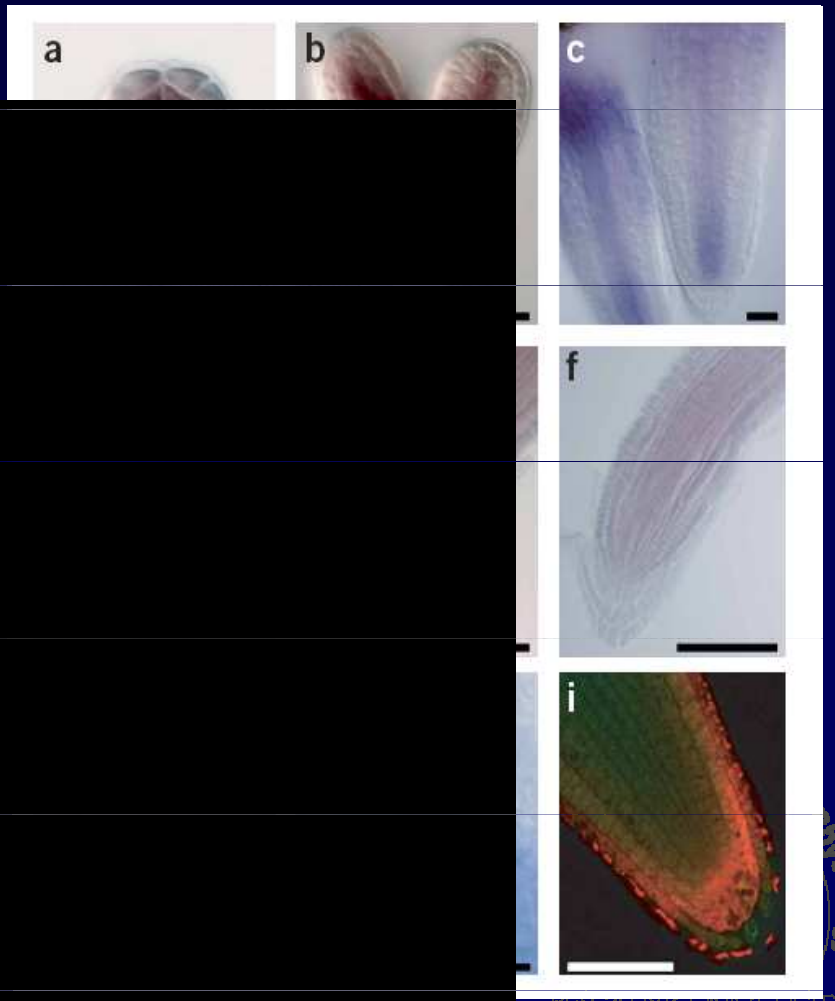
- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování
- Od genu k proteinu a zpět



Od genu k proteinu a zpět

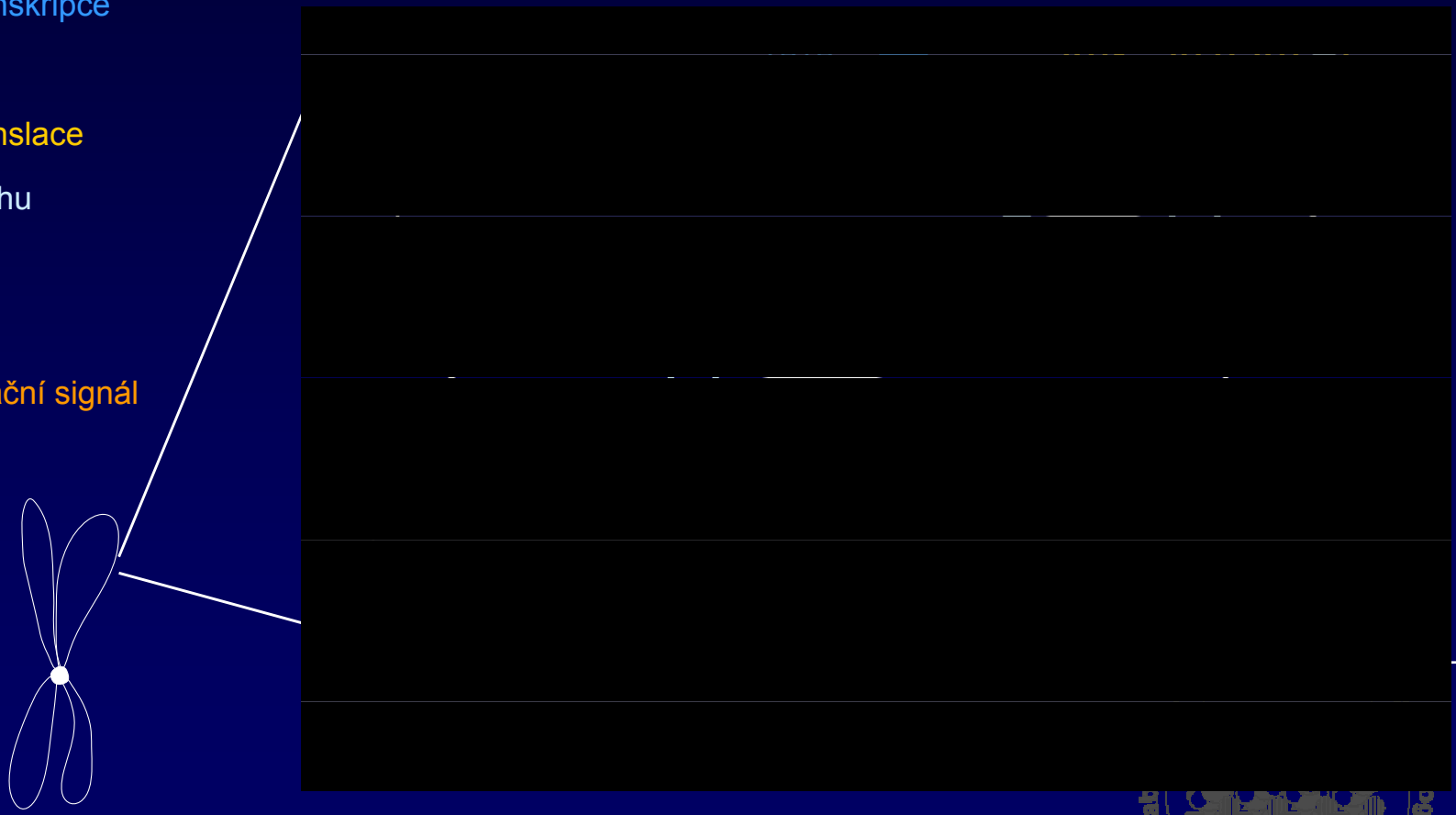
Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce
-



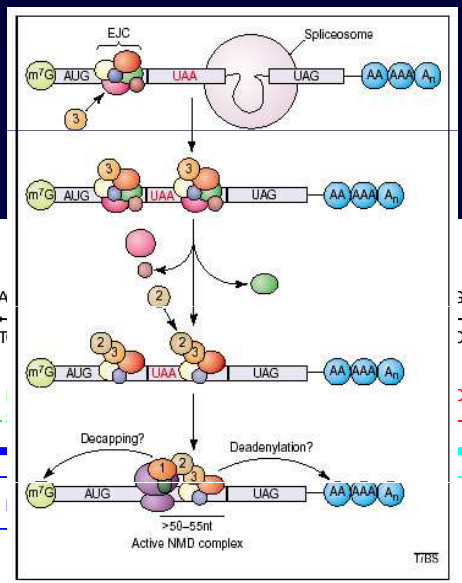
Základní mechanismy regulace genové exprese
struktura genů

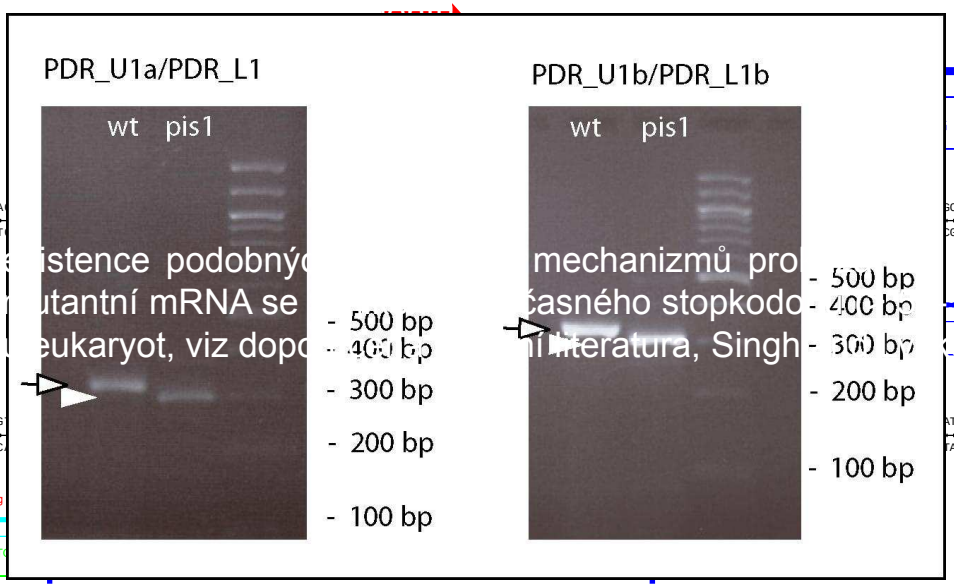
- struktura genů
  - promotor
  - počátek transkripce
  - 5´UTR
  - počátek translace
  - místa sestřihu
  - stop kodon
  - 3´UTR
  - polyadenylační signál



Základní mechanismy regulace genové exprese
regulace transkripce

- odchylky rozpoznávání míst sestřihu u rostlin v praxi - příklad vývojové plasticity (nejen) rostlin
  - identifikace mutanta s bodovou mutací (tranzice G→A) přesně v místě sestřihu na 5‘ konci 4. exonu

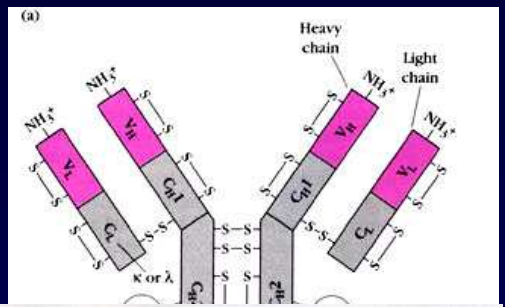




Základní mechanismy regulace genové exprese

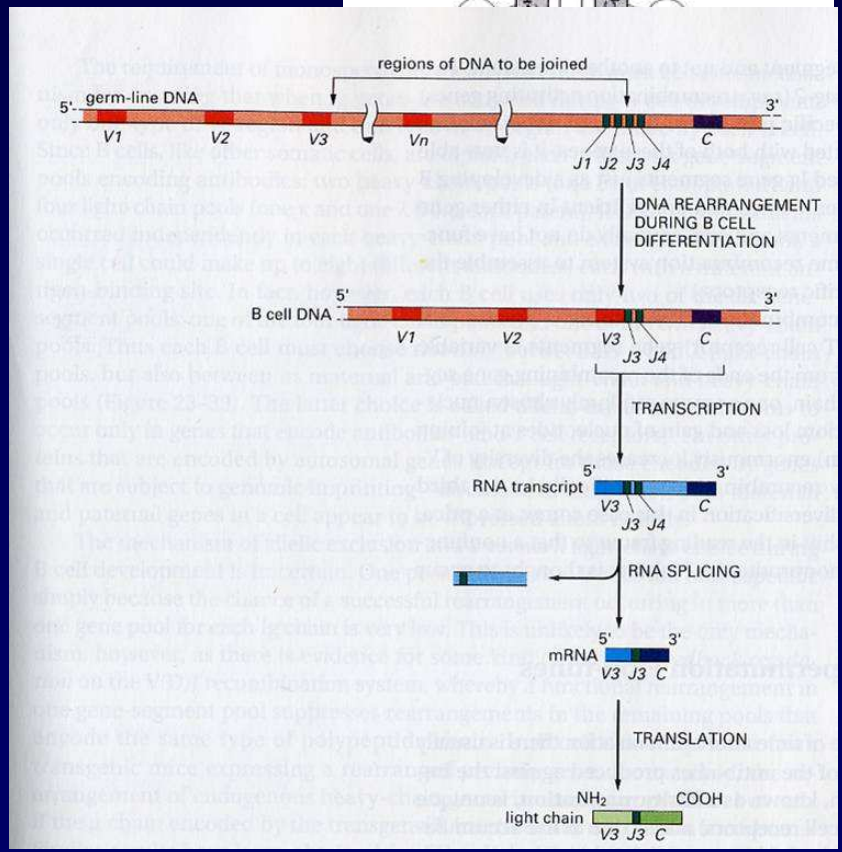
přeskupování subgenů při produkci protilátek

Přeskupování subgenů jako specifický mechanismus při produkci protilátek



- protilátky variabilní oblast (V) a konstantní oblast (C) a lehký (L) a těžký (H) řetězec
  - každá z V oblastí L řetězce u myší je kódována 2 subgeny (V a J)
  - každá z V oblastí H řetězce u myší je kódována 3 subgeny (V, J a D)

- v zárodečných liniích myších B-lymfocytů dochází k tzv. ***kombinatorické diversifikaci*** (přeskupování) ***subgenů*** (místně-specifickou rekombinací)
  - L řetězec (κ): cca 300 V sub-genů a 4 J subgeny (**300 x 4 = 1200** možností)
  - H řetězec: cca 500 V sub-genů, 4 J subgeny a 12 D subgenů (**500 x 4 x 12 = 24000** možností)
- celkové množství kombinací u myší: cca 1200 x 24000 = 28 mil. různých V oblastí (protilátek rozpoznávající různé antigeny)
- antigen indukuje tzv. ***afinitní dozrávání*** mechanismem ***somatické hypermutace***
  - po aktivaci B-lymf. pomocnými T-lymf. dochází ke zvýšenému výskytu mutací ve V oblastech (1 mutace/V oblast/generaci, cca 1 mil. X vyšší než je obvyklé (např. u tzv. „house-keeping“ genů) a selekci protilátek se zvýšenou afinitou k antigenu



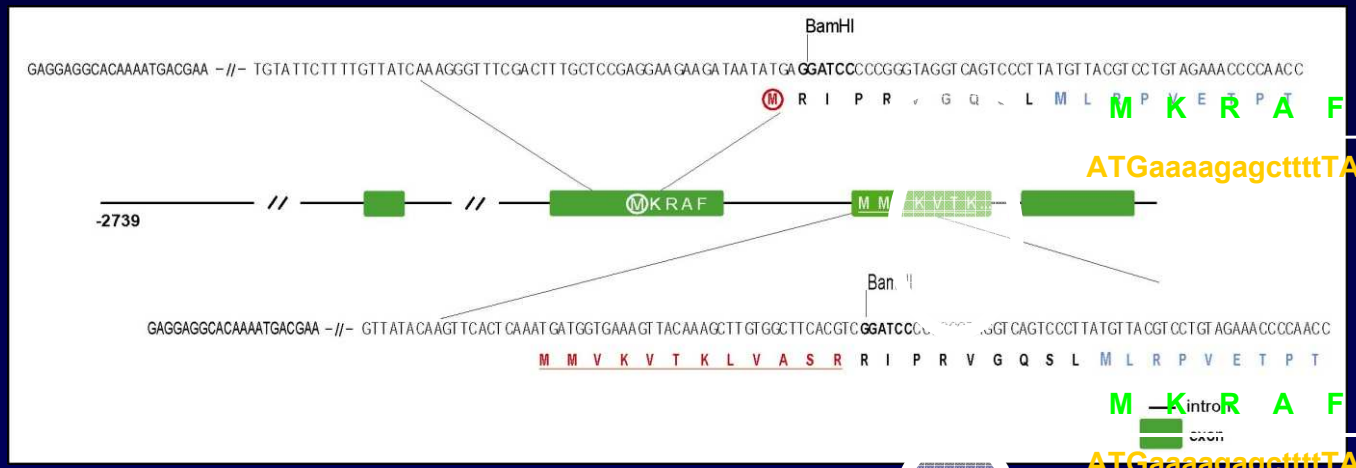
Od genu k proteinu a zpět

Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce
- sestřih RNA
- translační represe

Regulace genové exprese mechanismem translační represe

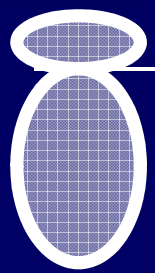
- Funkční význam sestřihu v nepřekládaných oblastech - důležitá regulační součást genů



M K R A F .
ATGaaaagagcttttTAG
ATGatggtgaaagttaca….

M — K R A F .
intron
exon
ATGaaaagagcttttTAG
M M V K V T…
ATGatggtgaaagttaca….

- V případě CKI1 pokus prokázat tento způsob regulace genové exprese pomocí transgenních linií nesoucích *uidA* pod kontrolou dvou verzí promotoru, zatím nepotvrzeno

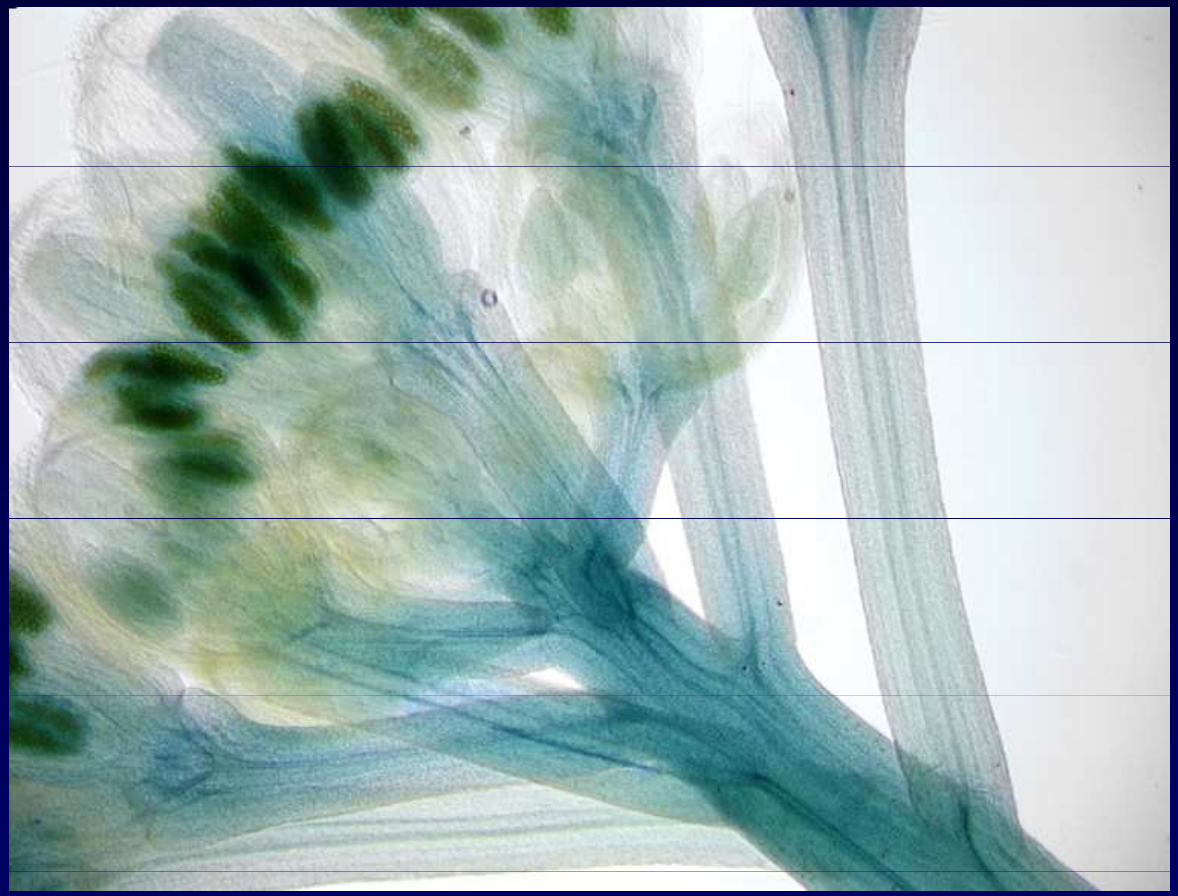


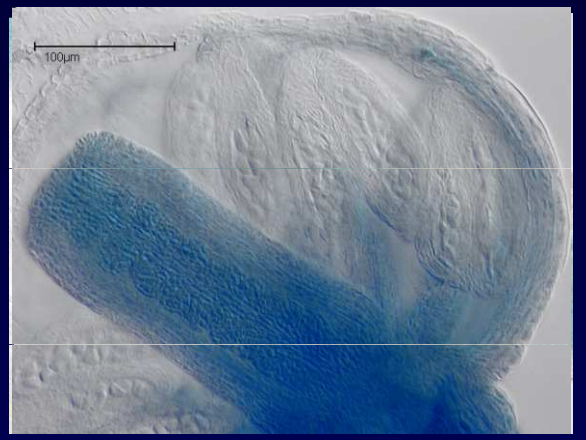
M M V K V T…
ATGatggtgaaagttaca….

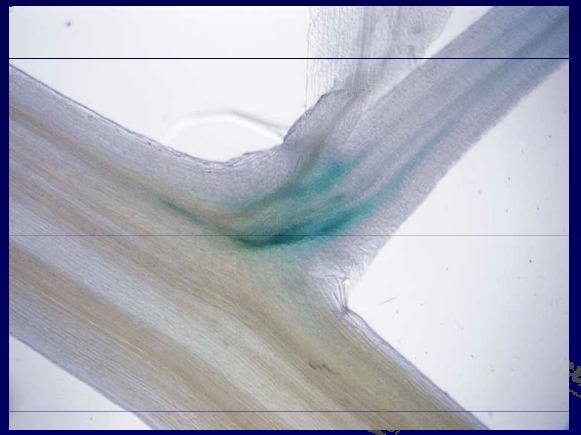
Laboratory of Plant Molecular Physiology
MASARYK UNIVERSITY

Expression of *CKI1* in Diploid Generative Tissue

Inflorescence







MASARYK UNIVERSITY

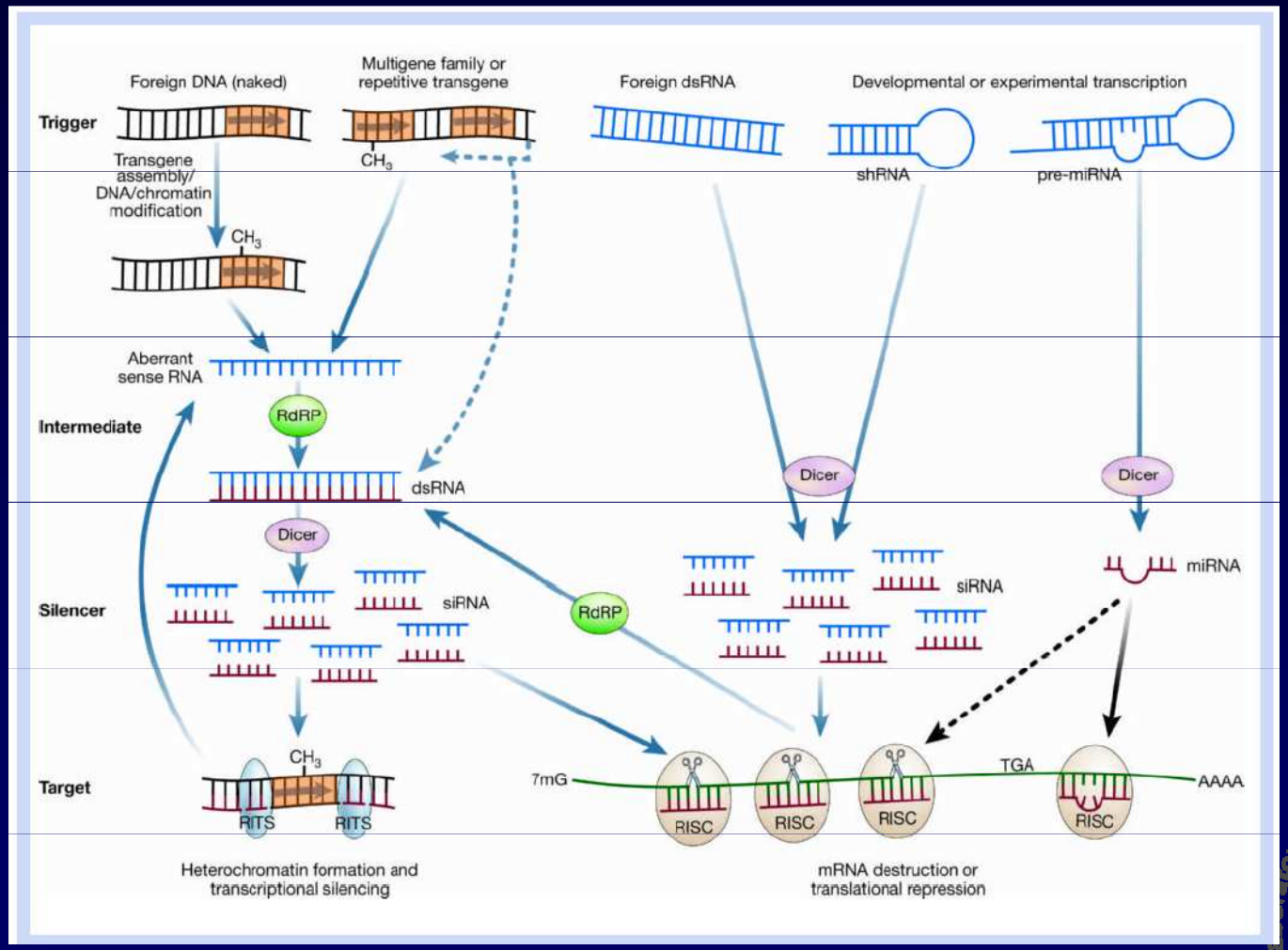
Od genu k proteinu a zpět

Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce
- Sestřih RNA
- translační represe
- posttranskripční umlčování mechanizmem siRNA

Od genu k proteinu a zpět

umlčování genů mechanismem RNA interference (RNAi)



Mello, 2004

Laboratory of Plant Molecular Physiology
L M F R
MASARYK UNIVERSITY

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

"for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"

Andrew Z. Fire

USA

Stanford University School of Medicine
Stanford, CA, USA

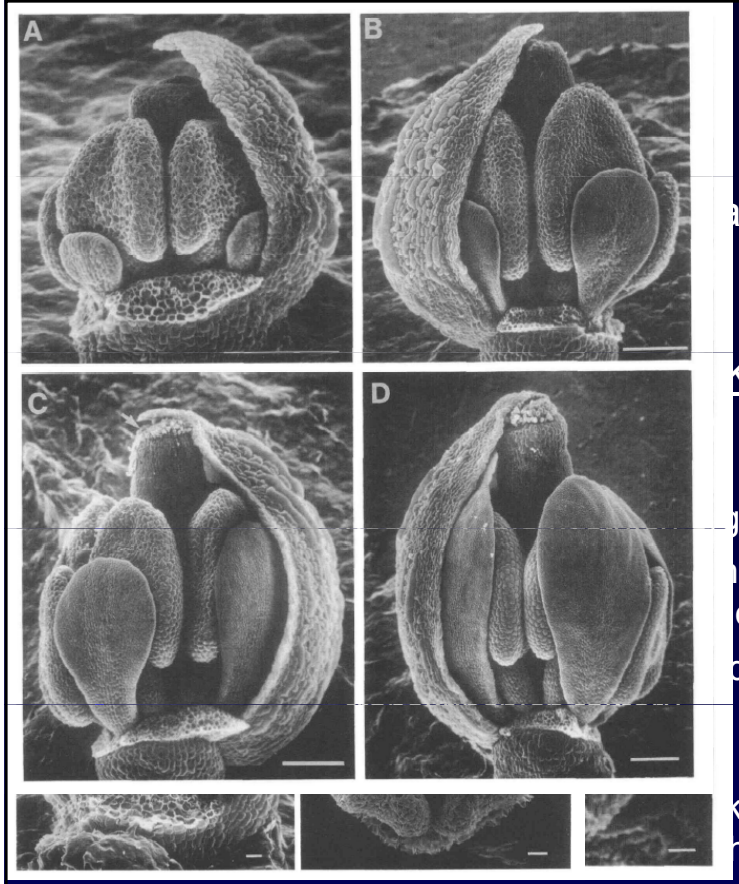
b. 1959

Craig C. Mello

USA

University of Massachusetts Medical School
Worcester, MA, USA

b. 1960



Od genu k proteinu a zpět

anskripční umlčování mechanizmem siRNA

květů u *Arabidopsis* prostřednictvím miRNA

gánů u rostlin

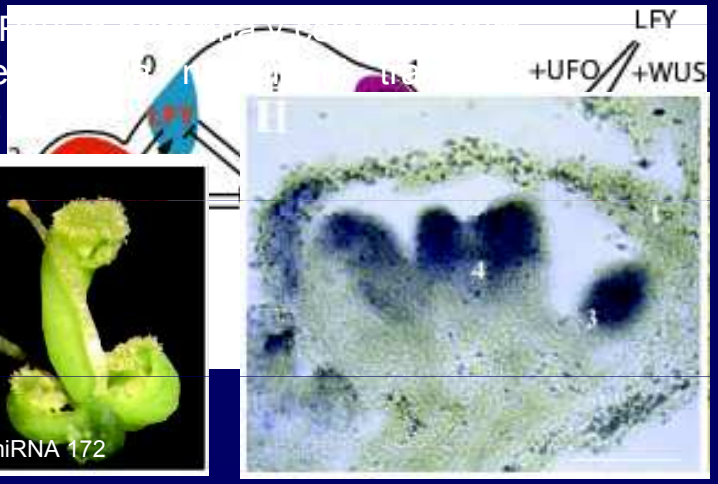
orgánů dochází k určování identity jednotlivých květních orgánů
omeiotických genů

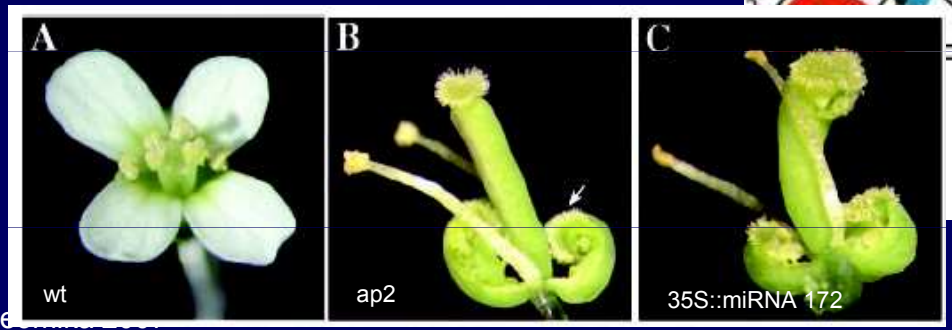
dují většinou rostlinné homolgy MADS-box

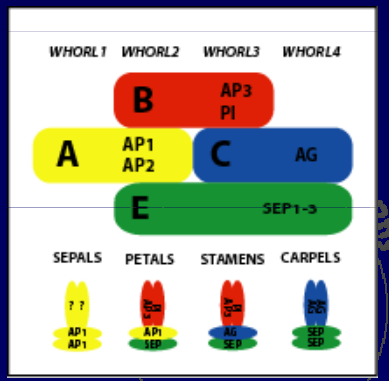
kými geny dochází k tzv. katastrálním
ho genu inhibuje expresi dalšího

- např. *AP1* je nejprve aktivní v celém květním meristému, po indukci exprese *AG* pak *AG* inhibuje expresi *AP1* ve vnitřních dvou kruzích)

- výjimkou je exprese genu *AP2*, jehož m
meristému, ale exprese *AP2* je re
prostředictvím miRNA (gen miRNA 172)







in situ lokalizace miRNA172 v 3. a 4. kruhu

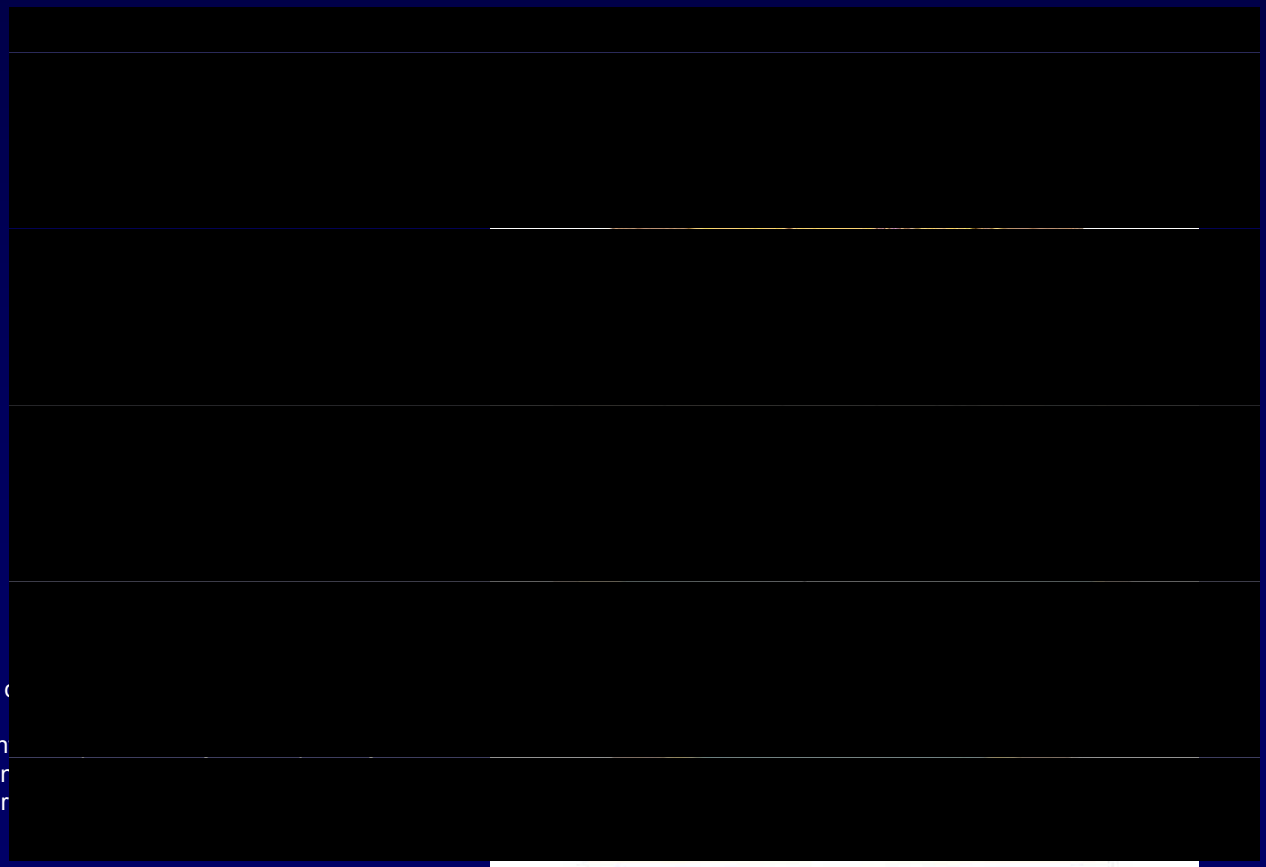
Od genu k proteinu a zpět

Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce
- Sestřih RNA
- translační represe
- posttranskripční umlčování mechanizmem siRNA
- směřování proteinů

Od genu k proteinu a zpět
směřování (cílování) proteinů

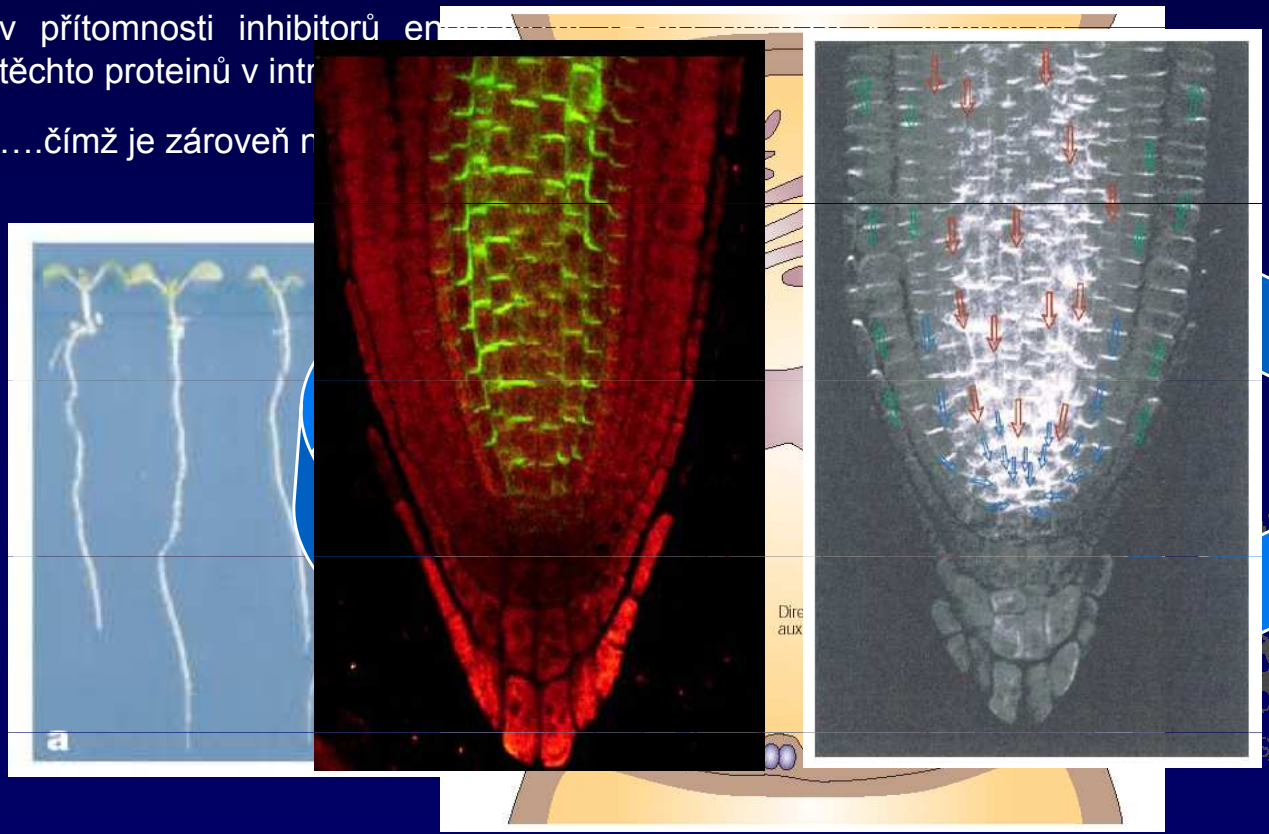
- Intracelulární lokalizace proteinů
  - v rostlinných buňkách dochází k velice dynamickým procesům, zprostředkovávaným zejména tzv. endomembránovým transportem (viz film, GFP směřované do ER)



CV, central vacuole; DV, d
GA, Golgi apparatus; LV,
accumulating compartmen
reticulum; PSV, protein
compartment; SV, secretor

Od genu k proteinu a zpět
směřování (cílování) proteinů

- Cyklování auxinových přenašečů u *Arabidopsis*
  - auxin je rostlinný hormon se silným morfogenním účinkem
  - proteiny podílející se na transportu proteinů jsou tzv. PIN proteiny, polárně lokalizované v bunňkách kořene u *Arabidopsis*
  - PIN proteiny cyklují v endomembránovém systému rostlinné buňky
  - v přítomnosti inhibitorů em
    těchto proteinů v intr
  - ….čímž je zároveň r



Od genu k proteinu a zpět

Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce
- sestřih RNA
- translační represe
- posttranskripční umlčování mechanizmem siRNA
- směřování proteinů
- posttranslační modifikace proteinů

Od genu k proteinu a zpět
postranslační modifikace proteinů

Význam posttranslačních modifikací proteinů

- regulace enzymové aktivity
- regulace interakcí proteinu s dalšími proteiny nebo jinými biomolekulami
- lokalizace proteinu v buňce
- změna mechanických vlastností proteinu
- přenos signálu

Od genu k proteinu a zpět
postranslační modifikace proteinů

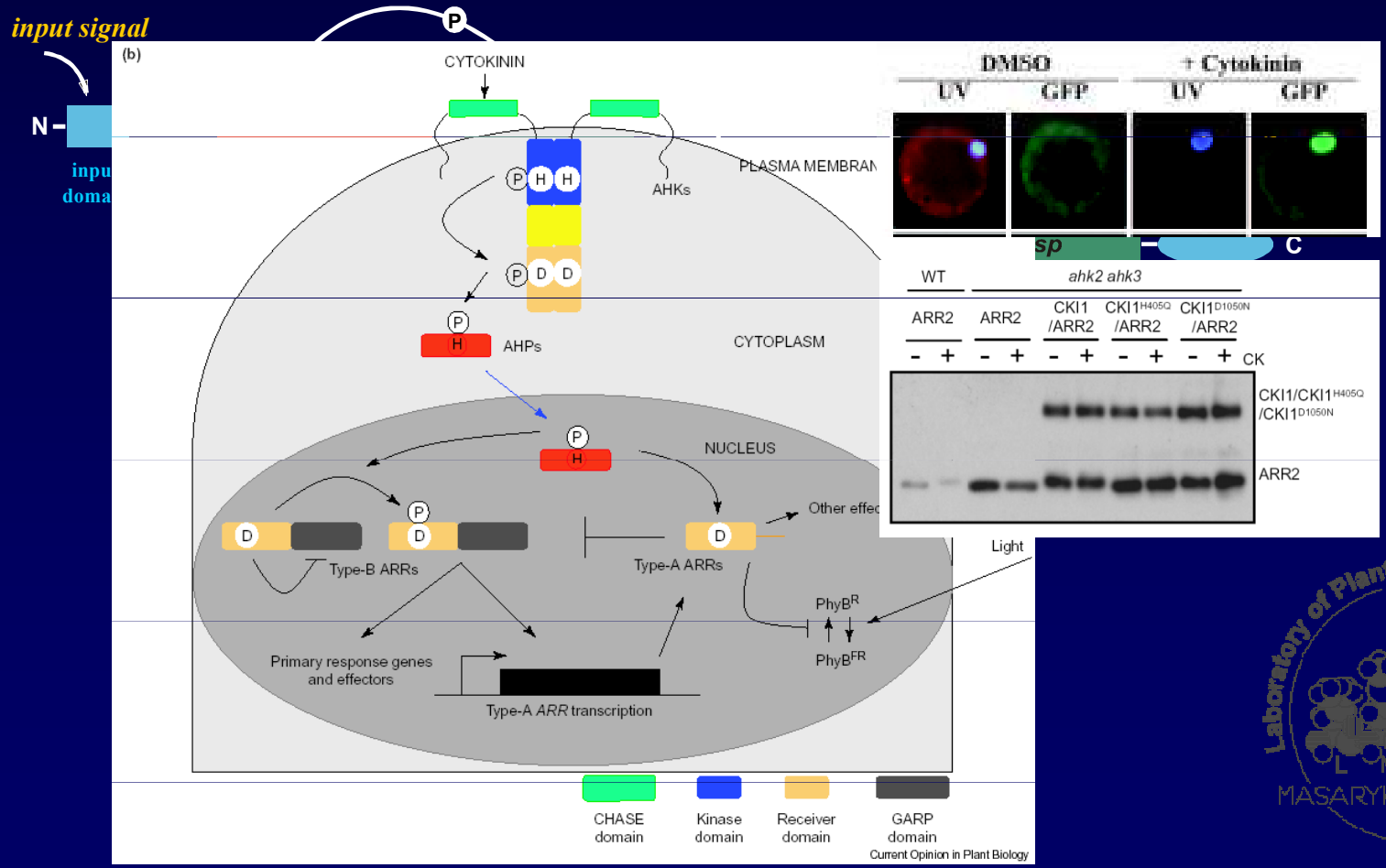
Typy posttranslačních modifikací proteinů

- přidání glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy
- fosforylace
- sulfonace
- glykosylace
- N-myristolyace
- N-metylace
- hydroxylace
- karboxylace
- prenylace
- ….

Od genu k proteinu a zpět
postranslační modifikace proteinů

Přenos signálu a regulace genové exprese prostřednictvím fosforylace

- přenos cytokininového signálu u rostlin



Od genu k proteinu a zpět
postranslační modifikace proteinů

Přenos signálu a regulace genové exprese prostřednictvím fosforylace

- přenos signálu prostřednictvím TGFβ (Transforming Growth Factor) u živočichů

Základy proteomiky 2007

Proč právě proteomika?

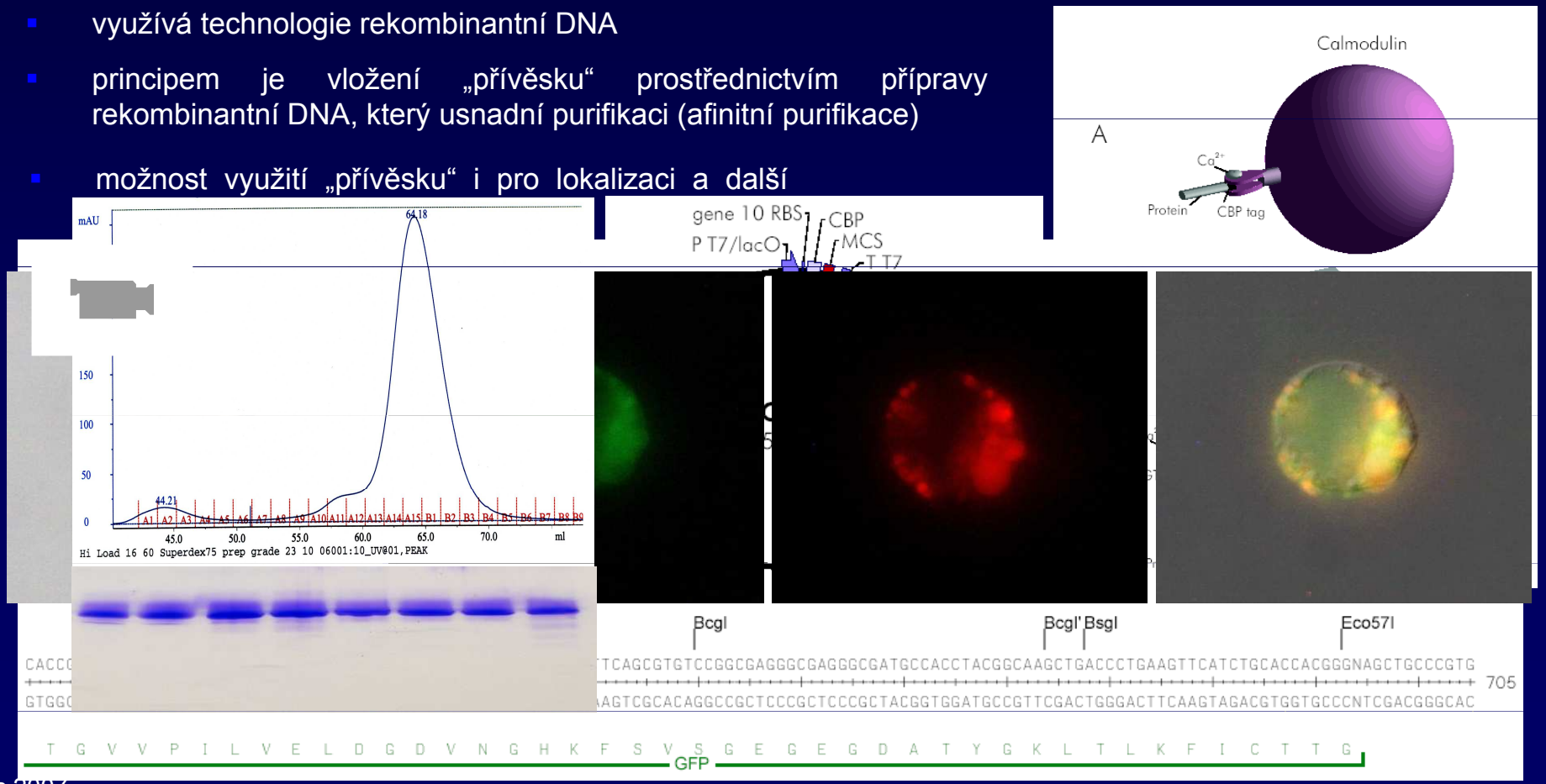
- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování
- Od genu k proteinu a zpět
- Přístupy současné proteomiky
  - exprese, purifikace a analýza rekombinantních proteinů

Přístupy současné proteomiky

exprese, purifikace a analýza rekombinantních proteinů

Technologie rekombinatních proteinů

- umožňuje získat velké množství analyzovaného proteinu ve velké čistotě
- využívá technologie rekombinantní DNA
- principem je vložení „přívěsku“ prostřednictvím přípravy rekombinantní DNA, který usnadní purifikaci (afinitní purifikace)
- možnost využití „přívěsku“ i pro lokalizaci a další



Základy proteomiky 2007

Proč právě proteomika?

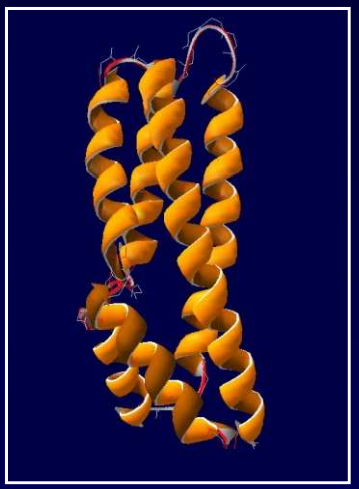
- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování
- Od genu k proteinu a zpět
- Přístupy současné proteomiky
  - exprese, purifikace a analýza rekombinantních proteinů
  - analýza vztahu mezi strukturou a funkcí proteinů

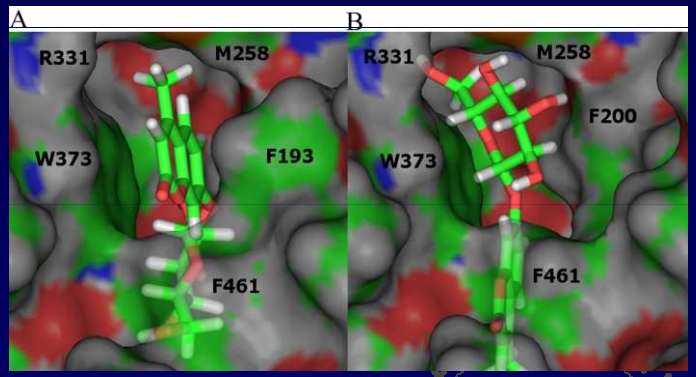
Přístupy současné proteomiky

analýza vztahu mezi strukturou a funkcí proteinů

Analýza vztahu mezi funkcí a strukturou proteinu

- využívá technologie produkce rekombinantních proteinů a místně řízené mutageneze
- umožňuje analyzovat strukturu rekombinantního proteinu pomocí rentgenové krystalografie nebo NMR
- kopmparativní analýzou lze pak analyzovat strukturu a funkci jak u strandardního typu tak i mutantního proteinu

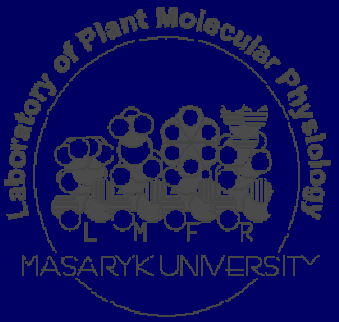




Základy proteomiky 2007

Proč právě proteomika?

- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování
- Od genu k proteinu a zpět
- Přístupy současné proteomiky
  - exprese, purifikace a analýza rekombinantních proteinů
  - analýza vztahu mezi strukturou a funkcí proteinů
  - diferenční proteomika

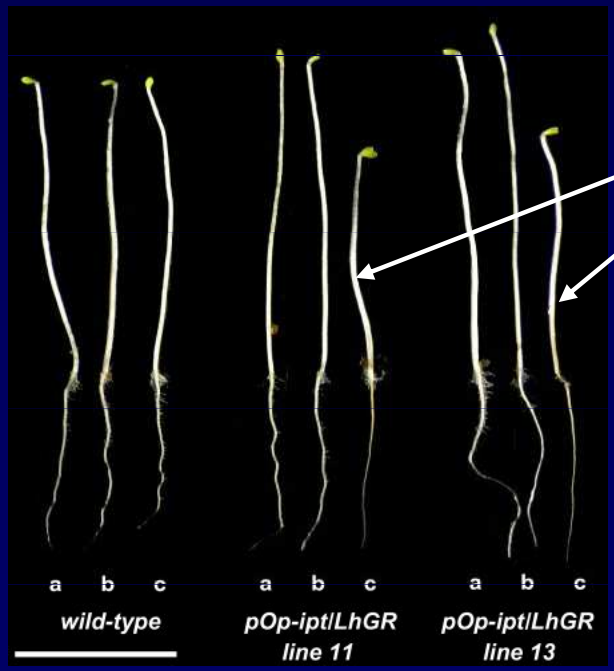


Přístupy současné proteomiky

komparativní proteomika

Analýza změn proteomu organismu na různé stimuly

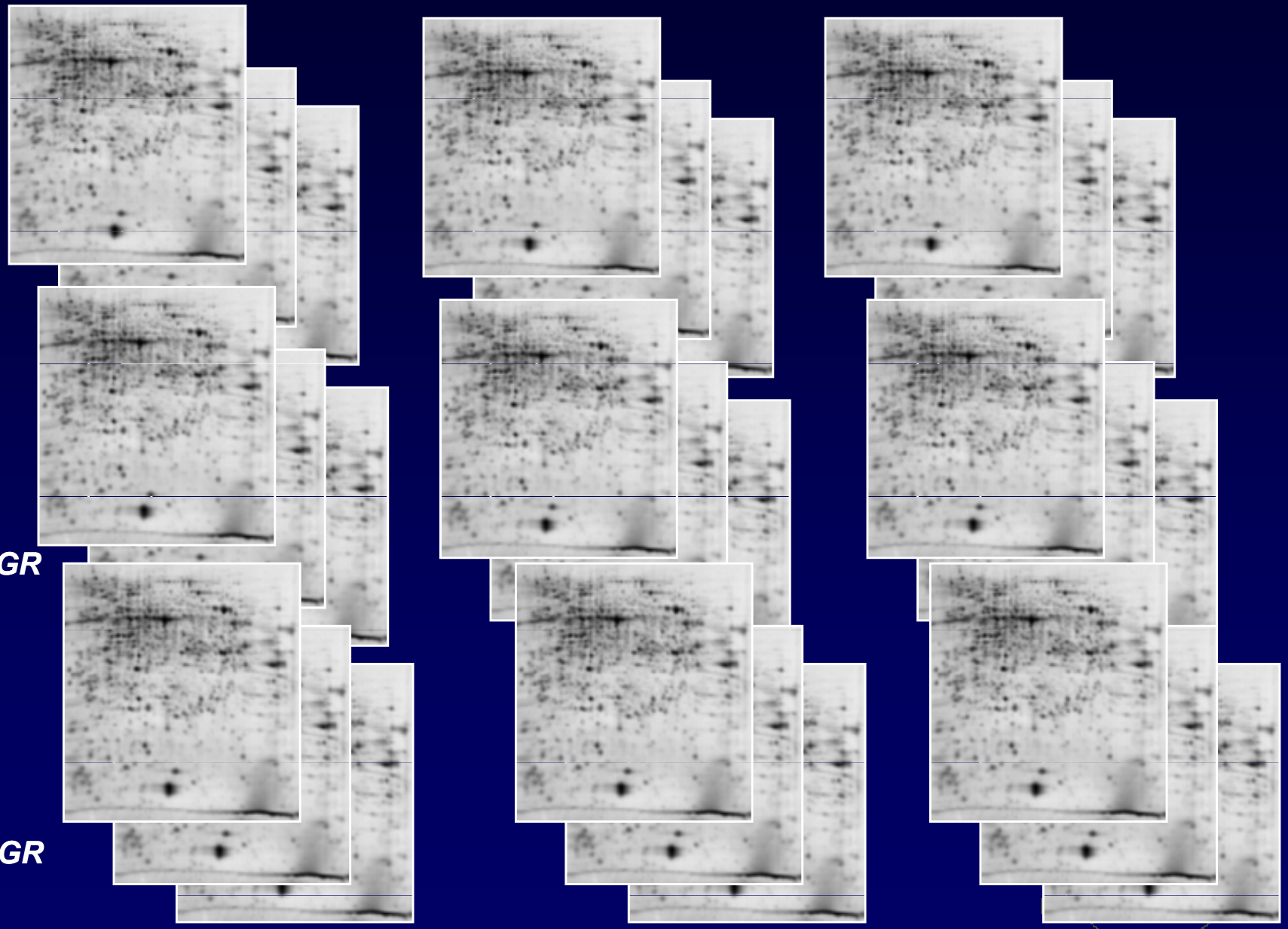
- využívá technologií vícerozměrné separace proteinů (nejčastěji ELFO nebo LC)
- umožňuje analyzovat mnoho proteinů najednou
- pomocí analýzy obrazu lze odhadnout proteiny se změnou vlastností, příp. kvantity za daných sledovaných podmínek (mutace, vývojové stadium, fyziologická odpověď)



Zvýšená hladina endogenních CK

Přístupy současné proteomiky

komparativní proteomika



Přístupy současné proteomiky

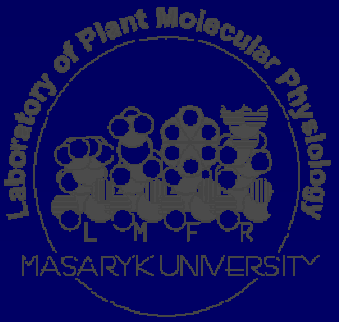
komparativní proteomika

Spot	% Vol	Relative Abundance	Accession No.	Protein Name	MALDI-MS		LC-MSMS		MM [kDa]	pI
					Score	%Cov	Score	%Cov		
1105		3.55	S47970	14-3-3 protein homolog RCI2	-	-	123	20	28.1	5.0
2203		< 0.01	BAB01146	AP000373 NID (jasmonate iducible, myrosinase-like)	97	725	-	-	48.5	5.0
2310		< 0.01	BAA84393	AP000423 NID (RuBisCO large subunit)	116	26	-	-	52.9	5.9
2402		3.40	Q8LBJ7	50S ribosomal protein L12-C	-	-	130	16	19.7	6.0
2801		2.50	AAG51430	AC008153 NID (2-cys peroxiredoxin BAS1, chloroplast [Precursor])	87	29	92	11	29.1	6.9
4503		> 100	Q9SUI9	ATP synthase gamma chain, chloroplast	131	29	393	32	33.3	5.1
5204		< 0.01	E71425	Hypothetical protein (putative epoxide hydrolase)	-	-	40	5	33.4	6.2
7009		< 0.01	T05413	cinnamyl-alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.195) F28A23.10	-	-	86	7	38.7	5.4
7401		< 0.01	Q9LJE4	GloEL protein, chaperonin, 60 kDa	-	-	217	10	63.3	5.6
7606		> 100	F86262	F13K23.15 protein (glyceraldehyde-3-phosphate dh)	81	23	388	33	42.8	8.2
7701		0.37	AAM20572	AY099721 NID (Cysteine synthase, mitochondrial [Precursor])	128	26	236	28	45.8	8.4
8202		> 100	AAL36245	AY063889 NID (50S ribosomal protein L4, chloroplast [Precursor])	-	-	59	4	30.5	8.9
8302		2.69	H84808	probable annexin	-	-	90	9	36.2	6.9
8605		> 100	Q941D3	At5g19940/F28I16_90 (Hypothetical protein)	-	-	142	10	26.5	9.5
8803		0.42	T47470	isovaleryl-CoA dehydrogenase	63	11	213	18	44.7	7.5

Základy proteomiky 2007

Proč právě proteomika?

- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování
- Od genu k proteinu a zpět
- Přístupy současné proteomiky
  - exprese, purifikace a analýza rekombinantních proteinů
  - analýza vztahu mezi strukturou a funkcí proteinů
  - diferenční proteomika
  - analýza posttranslačních modifikací



Přístupy současné proteomiky

analýza posttrranslačních modifikací

Analýza posttranslačních modifikací

- pomocí specifických metod lze identifikovat kotranslační a posttransalční modifikace, buď v gelu nebo po blotování na membránu (barvení spec. barvičkami)
- identifikace modifikací pomocí MS technik (MALDI TOF, ESI-MS, …)
- fosforylace
  - přenos signálu
- acetylace
  - regulace chromatinových strruktur a transkripční aktivity prostřednictvím regulace vazby histonů
- glykosylace
  - velice heterogenní (aktivátor plasminogenu 3 místa pro glykosylaci na N-konci, až 11. 520 různých izoforem)
    - mikroheterogenita díky velkému množství různých cukerných zbytků, které se mohou vá[illegible]
    - makroheterogenita díky rozdílům v přítomnosti různých cukrů na různých ak. na různém počtu kopií daného proteinu

SYPRO Ruby

Pro-Q Diamond

Základy proteomiky 2007
shrnutí

Proč právě proteomika?

- Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst
- Genotyp vs. fenotyp, aneb co všechno se děje při vyjadřování
- Od genu k proteinu a zpět
- Přístupy současné proteomiky
  - exprese, purifikace a analýza rekombinantních proteinů
  - analýza vztahu mezi strukturou a funkcí proteinů
  - diferenční proteomika
  - analýza posttranslačních modifikací

Základy proteomiky 2007
zdrojová literatura

- Zdrojová literatura k první přednášce:

Monografie a učebnice

- Plant Functional Genomics, ed. Erich Grotewold, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey
- Proteome Research: New Frontiers in Functioonal Genomics, ed. Wilkins, M.R., Wiliams, K.L., Appel, R.D., Hochstrasser, D.F., 1997, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Dubová J. , Hejátko J., Friml J. (2005) Reproduction of Plants, in Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine (ed, R. A. Meyers), pp. 249 – 295. Wiley-VCH, Weinheim, Germany

Publikace v mezinárodních časopisech

- Wang, L. and Wessler, S.R. (1998) Inefficient reinitiation is responsible for upstream open reading frame-mediated translational repression of the maize R gene. *Plant Cell*, **10**, (1733)
- Friml, J. and Palme, K. (2002) Polar auxin transport. Old questions and new concepts?. *Plant Mol. Biol.*, **49**, 273-284
- Mello, C.C. and Conte Jr., D. (2004) Revealing the world of RNA interference. Nature, 431, 338-342
- Surpin, M. and Raikhel, N. (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. Nature Reviews/Molecular Cell Biology 5,100-109