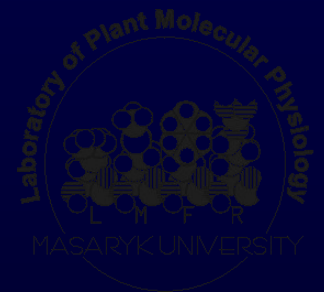


Základy proteomiky

Proč právě proteomika?

Jan Hejátko



Základy proteomiky

zdrojová literatura

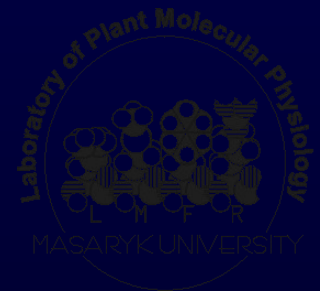
▪ Zdrojová literatura k první přednášce:

Monografie a učebnice

- Plant Functional Genomics, ed. Erich Grotewold, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey
- Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics, ed. Wilkins, M.R., Williams, 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

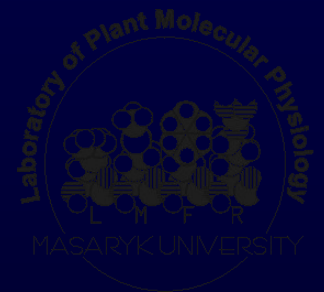
- Wang, L. and Wessler, S.R. (1998) Inefficient reinitiation is responsible for upstream open reading frame-mediated translational repression of the maize R gene. *Plant Cell*, **10**, (1733)
- Friml, J. and Palme, K. (2002) Polar auxin transport. Old questions and new concepts?. *Plant Mol. Biol.*, **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



Základy proteomiky

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

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**



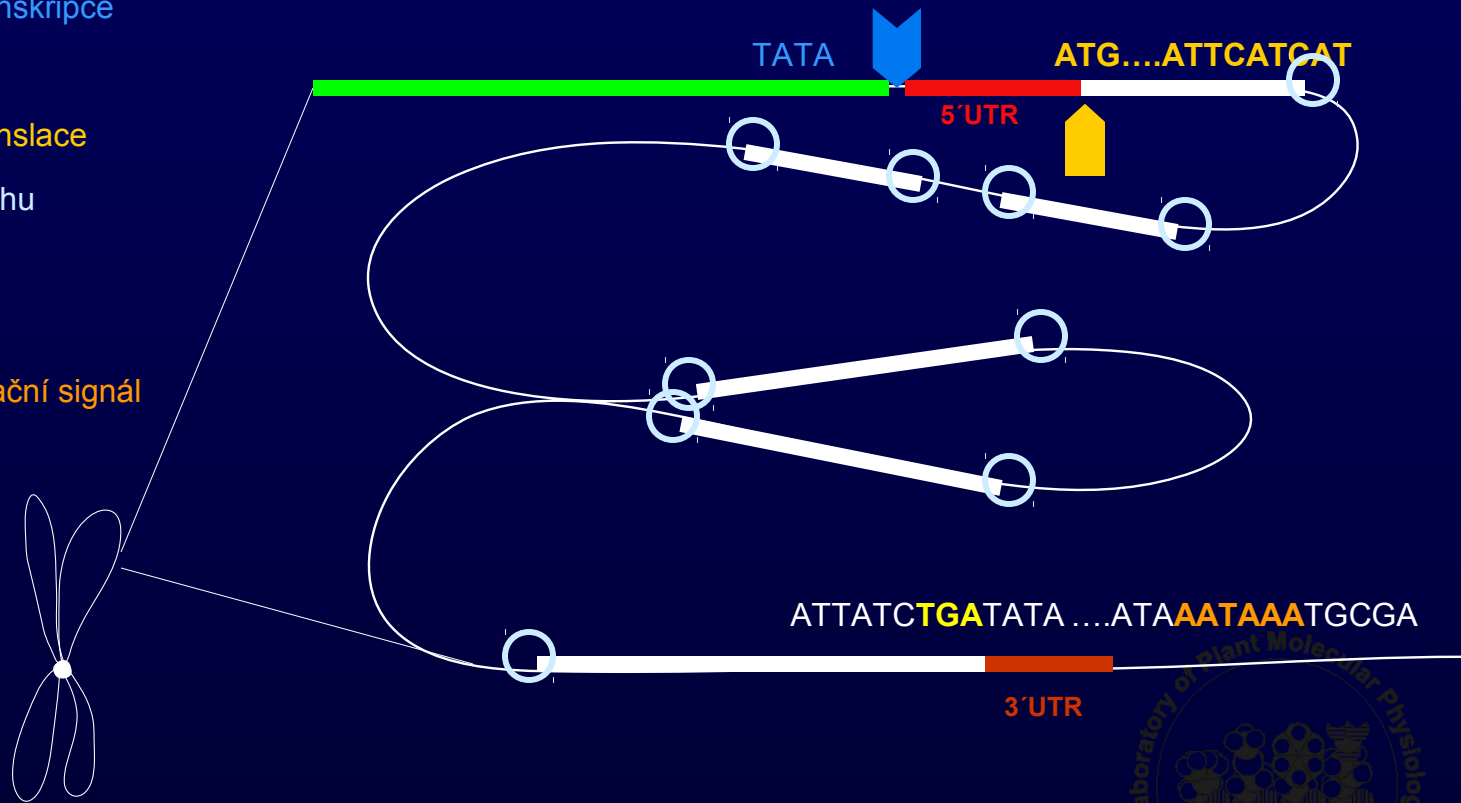
```
19470700 cacacctatagtatagctcaattctagataaaaatatatagaaatggatcttgagaatcatttttttggattcttttggta  
gctccgaggaagaagataaatatgaaaagagctttttagggttatcattctccttgacttgcacaaacgtgaaatgtaaggca  
19470500 tgttgctttttatagctatcgcttctcaataagttaacaatgcttctcgtagaattgcaaaacatttgaggacogtgat  
ttcagtggtctctttgcagcagcttctccttgaggactaatcaagacagaaatctgttctctaaaaacgatcgcggtct  
19470300 ttgacgagcttgatctttagaatcaaaattataagggatcacgagatacacgtaattaattatttttttttttggctt  
tcaactcaaatgatgggtaaagttacaaagcttggttccactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcact  
19470100 atgattctacatttctactcatctcgttctgtttttcaaatgatataaattatttggtgtatataccccatcatgtatatt  
ttcctgggtgtgttttcgagtgcaatttggatctcaaatggcgaacaacaacggagaaacttagtcaagaggtcgctcatt  
19469900 caagtctagtttcggagattgaaaacatcggaatttacaatgccaagacaacttatactcagatcggtttagcgagagt  
caacaacgacactggtttacagagattcaaacacaggttggttaaaactaatatacaaaatcaatttcttagttatattc  
19469700 tatataacatttaactataaatttatgttggttgttattattgttcttcagatcgaccattgttggtttagctt  
gtctcacaagtttcgtacatcagtagggacoggtctcatgttttcttacatgacagaatcaaacacaagtgctgctgttttgc  
19469500 caagtcgtggagactacacttggtagactcaaacogtggatcagtttaactggtcgttcaacgggaactcaacgaaatctca  
tacagattggttccaagcagcacagagtaataactacactacagcctttagtagaacagagctgggagagagaataacagag  
19469300 gttagctttagacagcaagaaaggtctgttctttagggttccgggttaagactttaacogaagtttgaacagtttgaact  
acatgtggacaaaggacgggacoggtgcttctcgtgaaggttcaactgaatgatcttctctcatctccaatggctcagattgc  
19469100 ctcctctggtctcaatgcatcctgaaattgcaatttccagttccagttggatcagaggtggagatcaaaagatataagataccaagctt  
gttccgggcttctctggttaaaactgaacataatttcaactttagatgcagtaaaaatgcatcgactgttggttctcagctt  
19468900 tttgccagagatacacactcatgtttcccaacaaggaggacacacagcactcaagccaagcggaaaaaggcaaaatataca  
atttcttggcttccggttggcctgtatggtttgtgtggtttatgatgcaagcaacaaggagagagatgcatagctgcaacgc  
19468700 ggcacacaacaagctgagagaaagagatgaacaagagatcaagcatttgcacaaatgctagccacgataatagaggtgccttgc  
ttgatatagtcgtgatggagttaaactggctccgacgtagacaccactctcaaccaagtgaatgtttgcgccaaggtattc  
19468500 tctttagcttctctatgcgcttcttctcacttctctcactcaacagaaaaattctctcctcagttgtttaaataactcagctcgt  
tgagcaaaatcgaaagcgggaagatgcagttagtggaagaagatttcaacttctgcgaaactcttgaagacgtcatcgattt  
19468300 gaagaaaggggttgatgtagttttggatccgacagatggctcgggtttcaaaatctcgaatgtagcaggggatagtgccagac  
aatcttggtagcaatgctgtcaagttcaccgtcgacgggacacattgcggtaagagcttgggctcagagggcaggttccaata  
19468100 cataatcctaaggtgtgtccaagtttgtaagagatagttctgcaagaataaagaagagatcaaacctacgagacagaaata  
caatgcaaacacgatggagtttgggttgaagtgatgatactggtaaaaggatacctatggagatgcgtaagtcggatttcc  
19467900 agaaaaacagctcaaggacaccaaggaactggtttagggtcgggatgtgacagcttgggtaagctactaaacagacaacc  
taaactctagatggttttcaatttgggtctattataggttaagataaatgggaggggagataagaatcaccgacaagccat  
19467700 gttccaatcaatgttttatgacaacatagagctcctccagtgagtgacatgaaagtgagacagagatcgaagcaggg  
gccaaacctcgggctgactataaacacttcaacttggaggtagcatgaatatacgtaacctgagctcctagatcaacaactgct
```

Predikce funkce genů *in silico*

struktura genů

- struktura genů

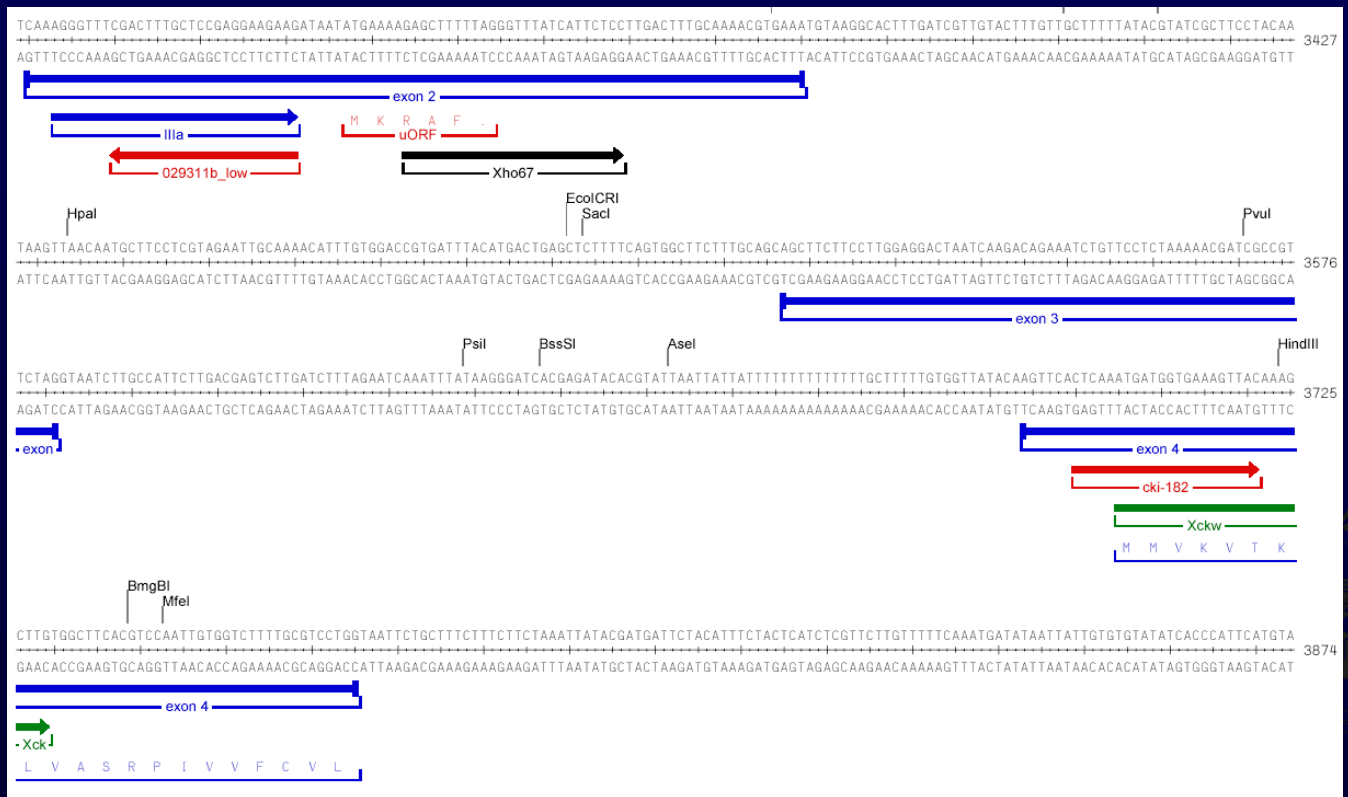
- promotor
- počátek transkripce
- 5'UTR
- počátek translace
- místa sestřihu
- stop kodon
- 3'UTR
- polyadenylační signál



Anotace genů a odhad aminokyselinových sekvencí předpokládaných proteinů

Postgenomová éra a co s informacemi, které neumíme číst

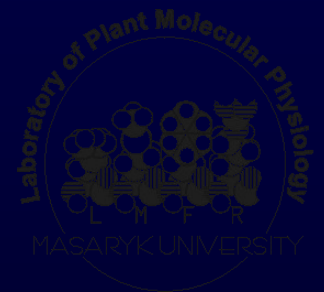
- dnes k dispozici v databázích více než 700 000 záznamů (nr databáze) různých organizmů
- Získané informace lze zpracovat pomocí **bioinformatiky**



Základy proteomiky

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)



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

Možná analogie s textem a jeho interpretací

DNA:

Když adoperbtabijs emdfjfwúcsaknclúsnínjxldalnxckjcnbychcxmasizdciksrdceasnanaazxcnlsdlaň.

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

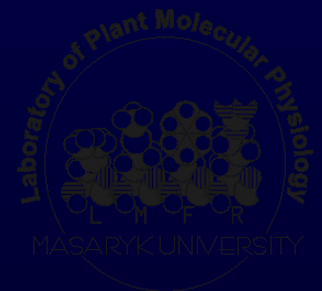
RNA:

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

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

Když jsem snídal srdce.

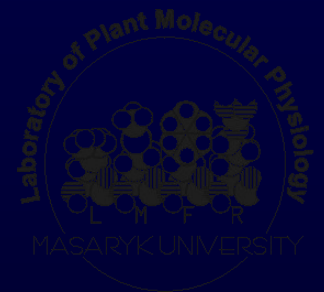
PROTEIN:



Základy proteomiky

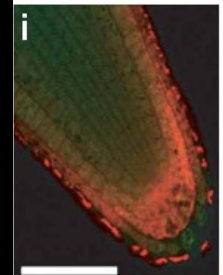
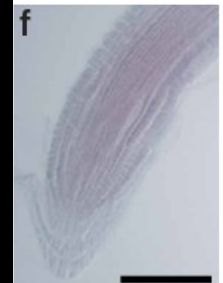
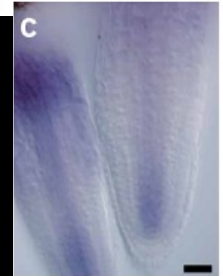
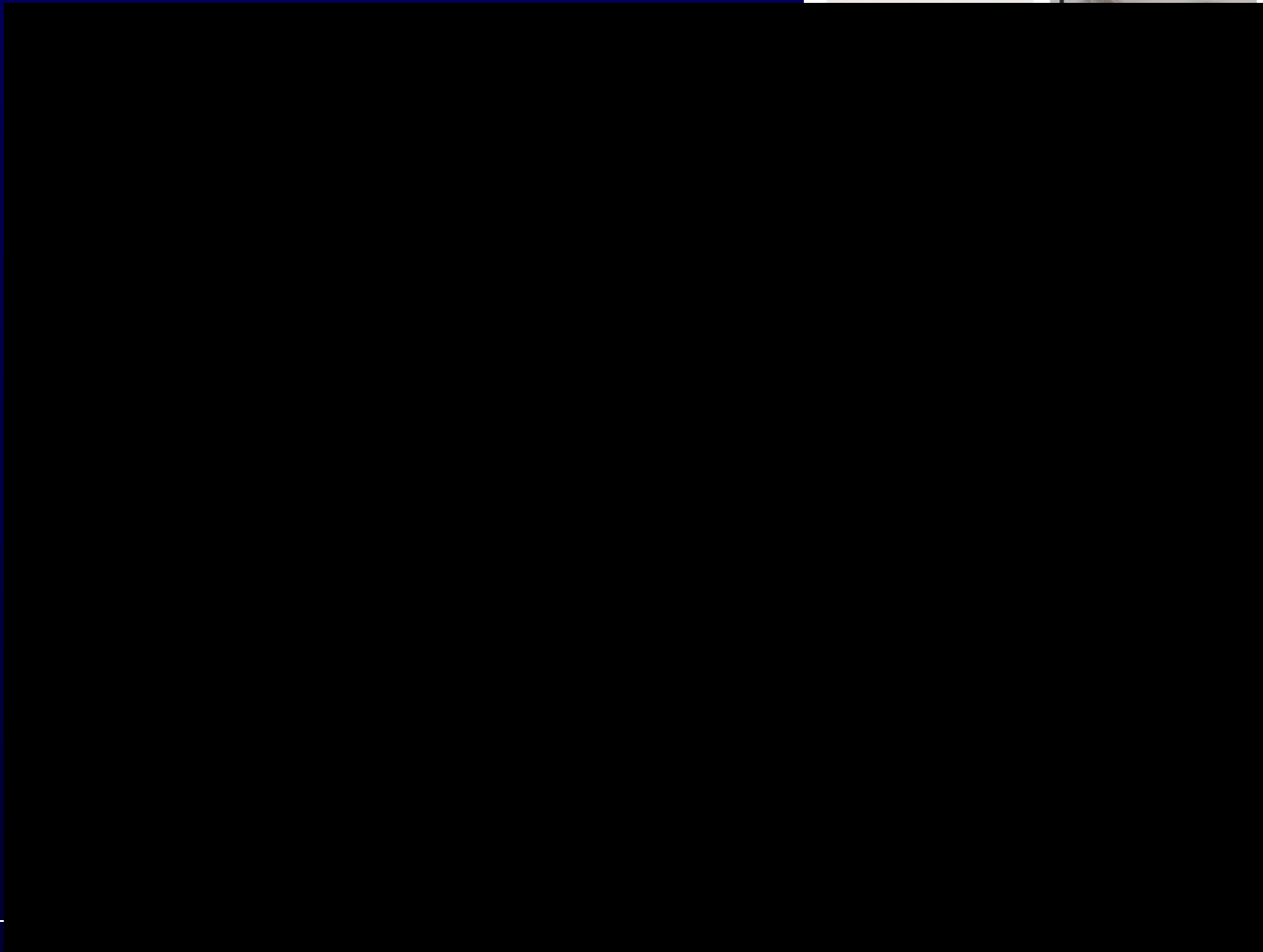
Proč právě proteomika?

- 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

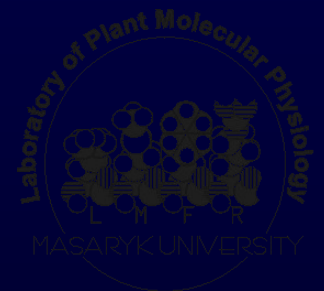
Základní mechanismy regulace genové exprese



Od genu k proteinu a zpět

Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce
- sestřih RNA



Základní mechanismy regulace genové exprese

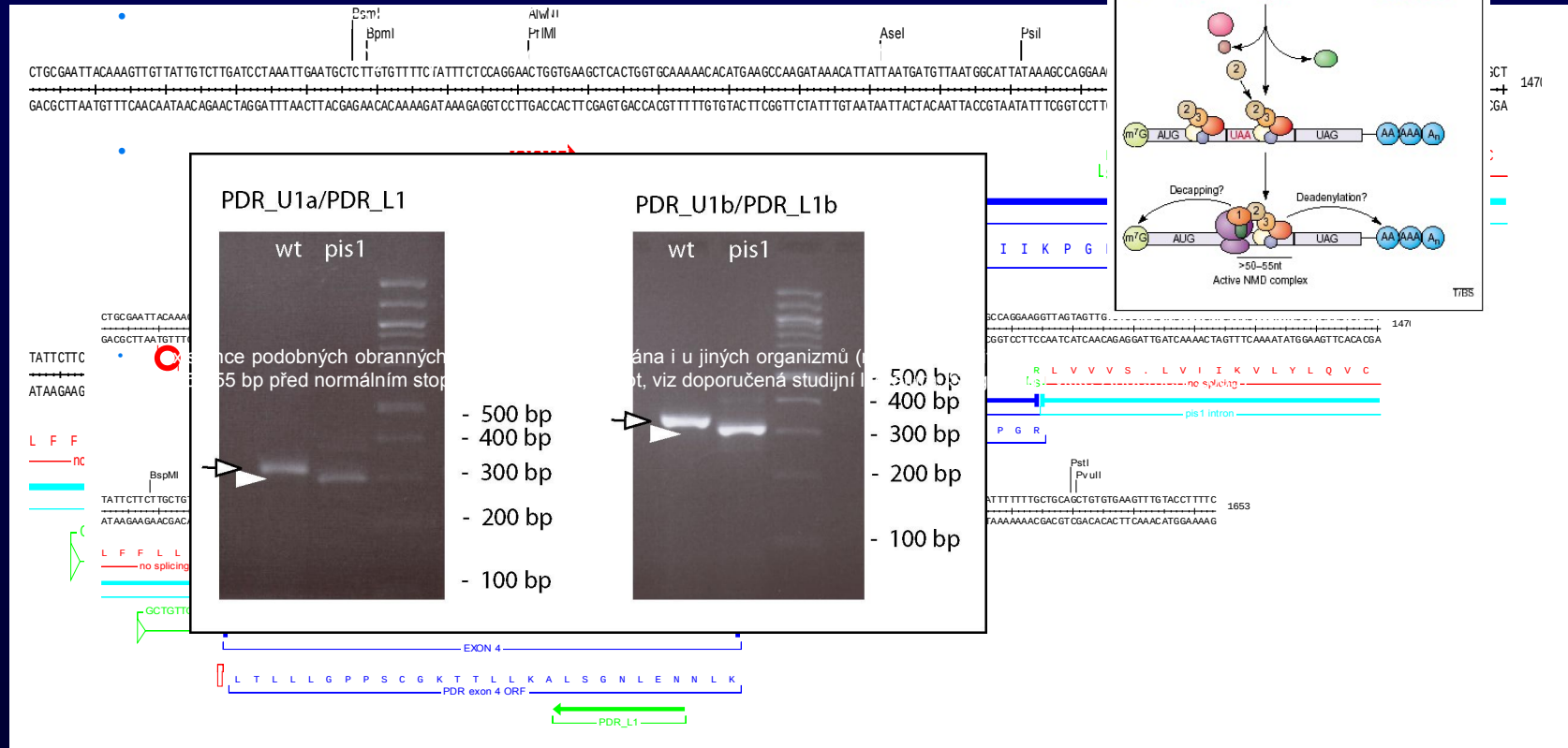
struktura genů

- struktura genů
 - promotor
 - počátek transkripce
 - 5'UTR
 - počátek transkripce
 - místa sestřihávání
 - stop kodon
 - 3'UTR
 - polyadenylační signál

Základní mechanismy regulace genové exprese regulace transkripce

- odchytky 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

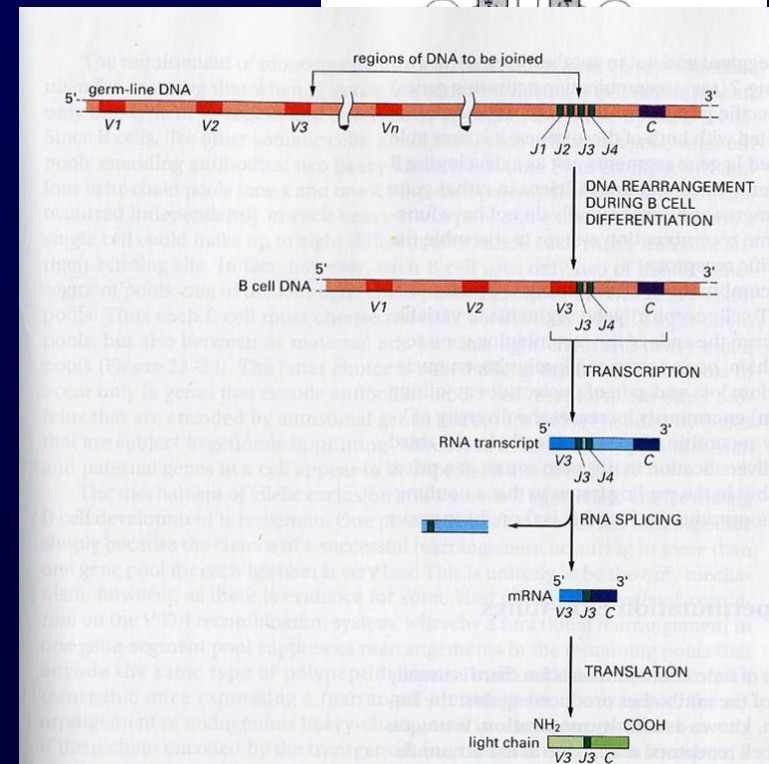
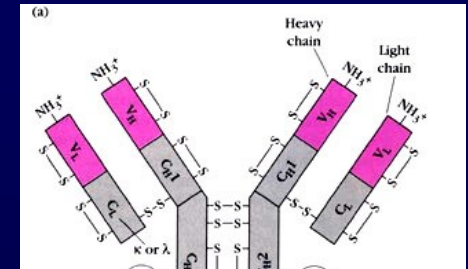


Základní mechanismy regulace genové exprese

přeskupování subgenů při produkci protilátek

Přeskupování subgenů jako specifický mechanismus při produkci protilátek

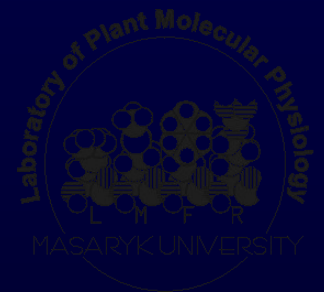
- protilátky variabilní oblast (V) a konstantní oblast (C) a lehký (L) a těžký (H) řetězec
 - každá z V oblastí L řetězce u myši je kódována 2 subgeny (V a J)
 - každá z V oblastí H řetězce u myši je kódována 3 subgeny (V, J a D)
- v zárodečných liniích myších B-lymfocytů dochází k tzv. **kombinatorické diversifikaci** (přeskupování) **subgenů** (místně-specifickou rekombinací)
 - L řetězec (κ): cca 300 V sub-genů a 4 J subgeny (**$300 \times 4 = 1200$** možností)
 - H řetězec: cca 500 V sub-genů, 4 J subgeny a 12 D subgenů (**$500 \times 4 \times 12 = 24000$** možností)
- celkové množství kombinací u myši: cca $1200 \times 24000 = 28$ mil. různých V oblastí (protilátek rozpoznávajících různé antigeny)
- antigen indukuje tzv. **afinitní dozrání** 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

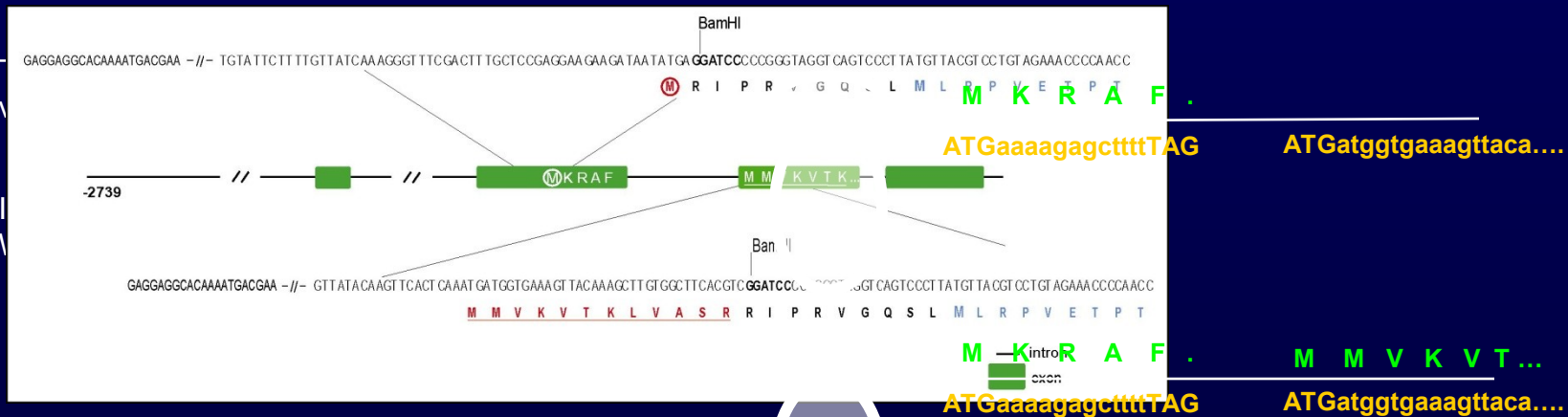
Základní mechanismy regulace genové exprese

- regulace transkripce
- sestřih RNA
- translační represe

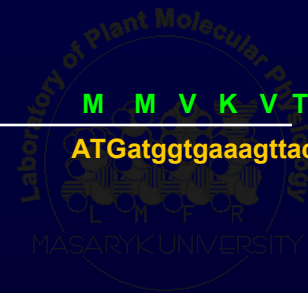


Regulace genové exprese mechanismem translační represe

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

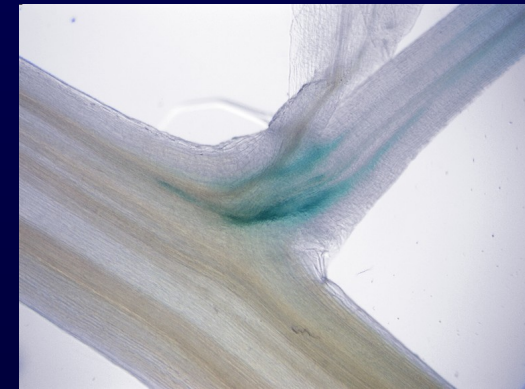
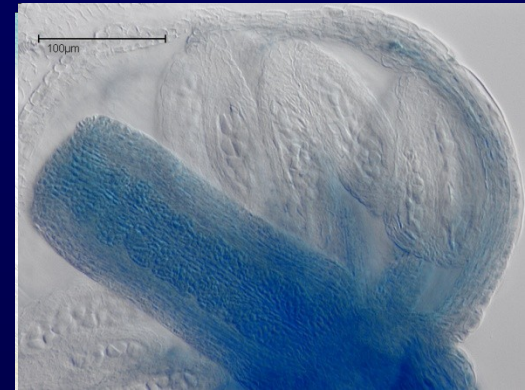
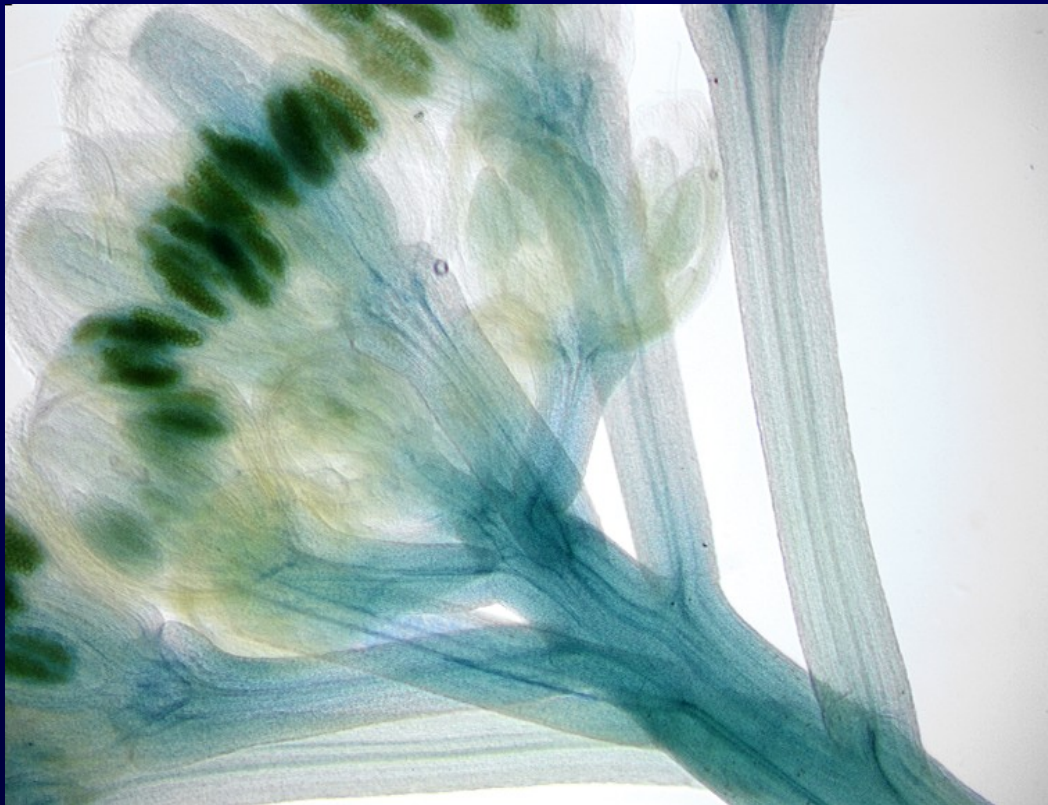


- V případě CK11 pokus prokázat tento způsob regulace genové exprese pomocí transgenních linií nesoucích *uidA* pod kontrolou dvou verzí promotoru, zatím nepotvrzeno



M M V K V T...
ATGatggtgaaagtaca....

Expression of *CK11* in Diploid Generative Tissue Inflorescence



Od genu k proteinu a zpět

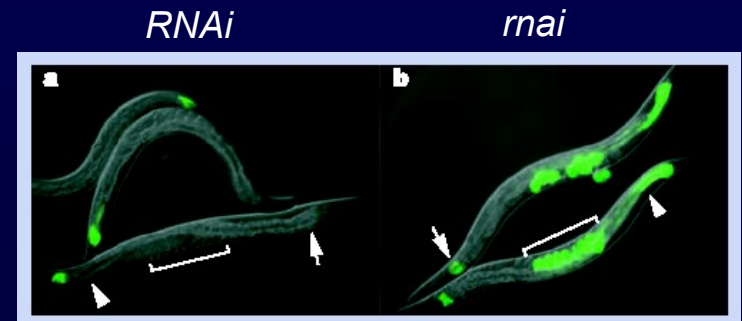
Základní mechanismy regulace genové exprese

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

Genomika III.

mechanismus RNA interference

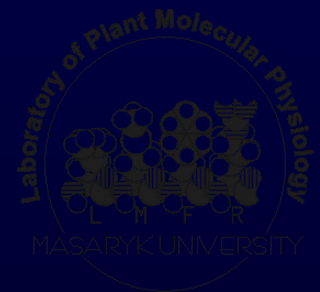
- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
 - RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans*
 - umlčování bylo indukováno jak sense tak antisense RNA (pravd. kontaminace obou při *in vitro* transkripci)
 - dsRNA indukovala umlčování cca 10-100x účinněji
 - dsRNA indukce je závislá na vlastních genech-gen. vyhledávání



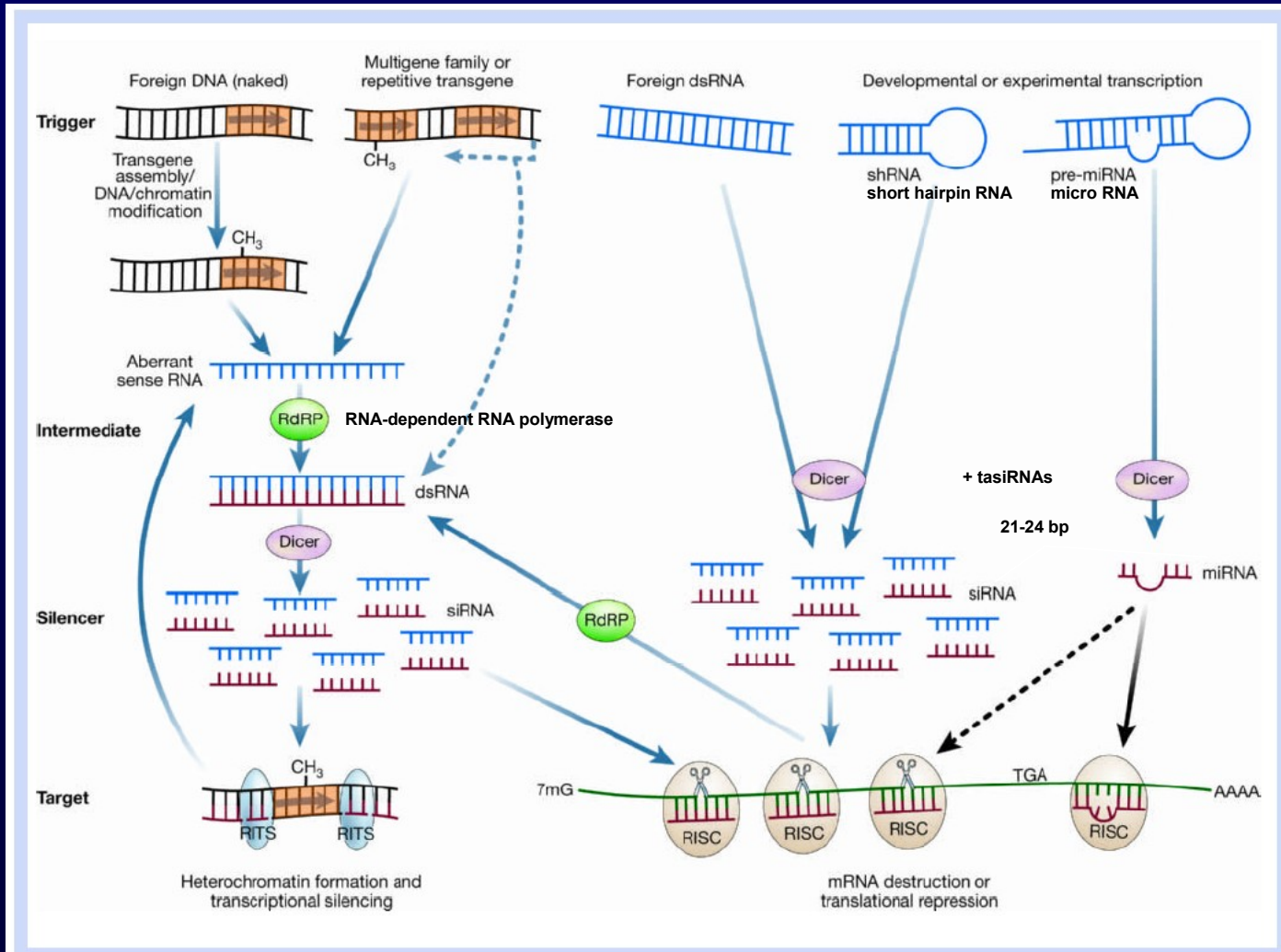
Genomika III.

mechanismus RNA interference

- Molekulární podstata posttranskripčního umlčování genů (PTGS)
 - RNAi objevena u *Coenorhabditis elegans*
 - je to přirozený mechanismus regulace genové exprese u všech eukaryot
 - podstatou je tvorba dsRNA, která může být spuštěna několika způsoby:
 - přítomnost cizí „aberantní“ DNA
 - specifické transgeny obsahující obrácené repetice částí cDNA
 - transkripce vlastních genů pro **shRNA** (short hairpin RNA) nebo **miRNA** (micro RNA, endogenní „vlásečková“ RNA)
 - dsRNA je procesována enzymovým komplexem (DICER), což vede k tvorbě **siRNA** (short interference RNA), která se pak váže buď na enzymový komplex **RITS** (RNA-induced transcriptional silencing complex) nebo **RISC** (RNA-induced silencing complex)
 - **RISC** zprostředkovává buď **degradaci mRNA** (v případě úplné similarity siRNA a cílové mRNA) nebo vede pouze k **zastavení translace** (v případě neúplné homologie jako je tomu např. v případě miRNA)
 - **RITS** zprostředkovává **reorganizaci genomové DNA** (tvorba heterochromatinu a inhibice transkripce)



Mechanism of RNA interference



Mello and Conte, *Nature* (2004)



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

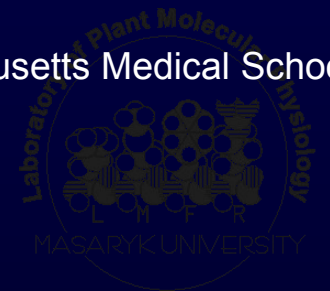


Craig C. Mello

USA

University of Massachusetts Medical School
Worcester, MA, USA

b. 1960



Od genu k proteinu a zpět

transkripční umlčování mechanismem siRNA

květů u *Arabidopsis* prostřednictvím miRNA

řádků u rostlin

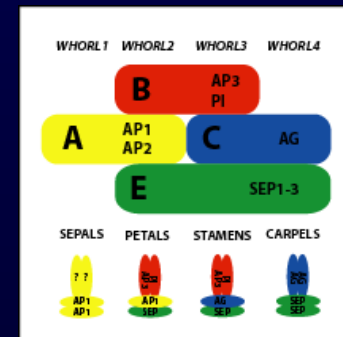
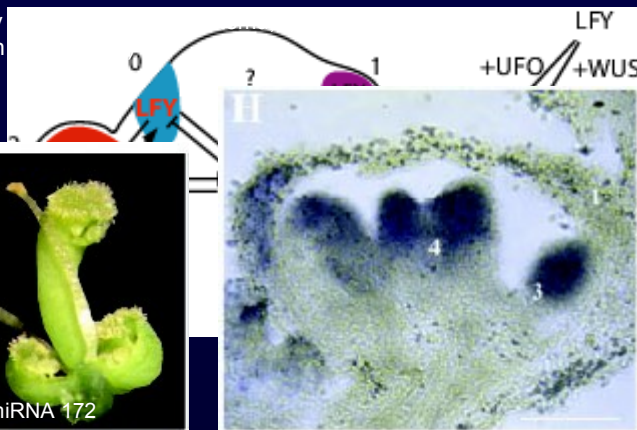
u květních orgánů dochází k určování identity jednotlivých květních orgánů prostřednictvím homeiotických genů

tyto geny kódují většinou rostlinné homology MADS-box

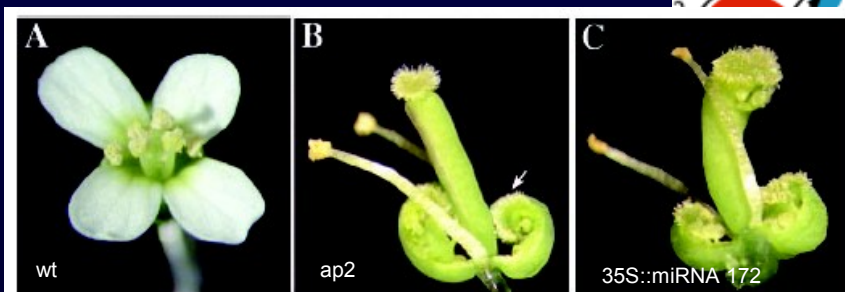
U květních orgánů některými geny dochází k tzv. katastrálním mutacím, kdy expresi jednoho genu inhibuje expresi dalšího

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

- výjimkou je expresi genu *AP2*, jehož mRNA je přítomná v celém květním meristému a její expresi regulována na úrovni translace prostřednictvím miRNA (gen *35S::miRNA 172*)



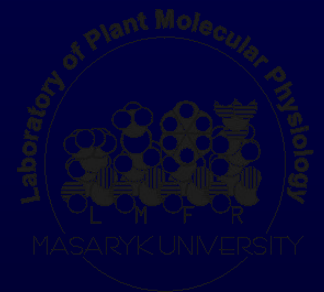
in situ lokalizace miRNA 172 v 3. a 4. kruhu



Od genu k proteinu a zpět

Základní mechanismy regulace genové exprese

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



Od genu k proteinu a zpět

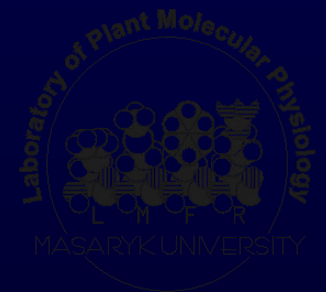
směrování (cílování) proteinů

▪ Intracelulární lokalizace proteinů

- Pro funkci proteinů v buňkách je zásadní jejich správná lokalizace prostřednictvím tzv. signálních sekvencí
- v rostlinných buňkách dochází k velice dynamickým procesům, zprostředkovaným zejména tzv. endomembránovým transportem (viz film, GFP směřované do ER)



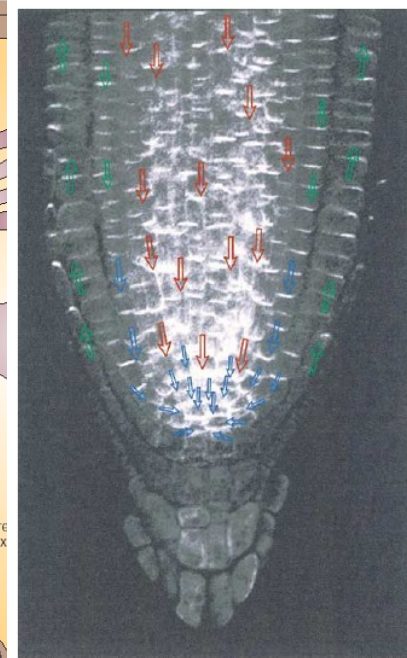
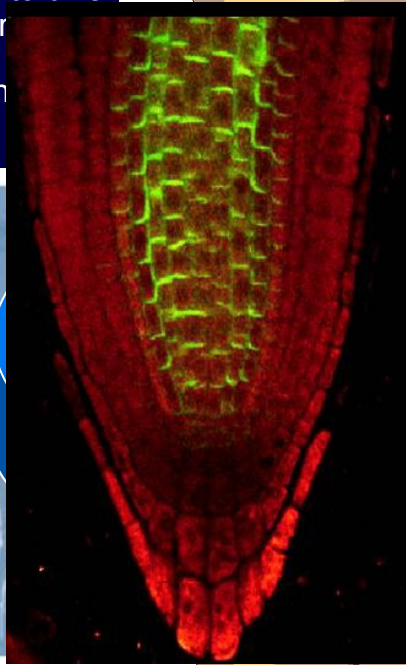
CV, central vacuole; DV, dense vacuole; GA, Golgi apparatus; L, lipid droplet; PSV, protein storage vacuole; SV, secretory vacuole



Od genu k proteinu a zpět

směrování (cílování) proteinů

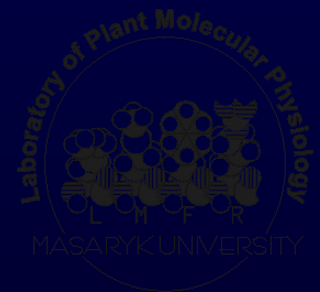
- **Cyklování auxinových přenašečů u *Arabidopsis***
 - auxin je rostlinný hormon se silným morfogenním účinkem
 - proteiny podílející se na transportu proteinů jsou tzv. PIN proteiny, polárně lokalizované v bunčkách kořene u *Arabidopsis*
 - PIN proteiny cyklují v endomembránovém systému rostlinné buňky
 - v přítomnosti inhibitorů endocytózy dochází k akumulaci těchto proteinů v intracelulárním prostoru
 - ...čímž je zároveň narušena polarita



Od genu k proteinu a zpět

Základní mechanismy regulace genové exprese

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

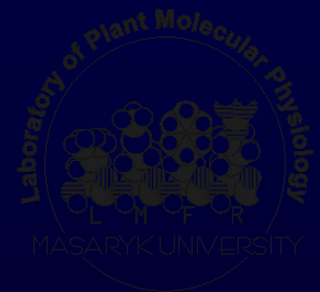


Od genu k proteinu a zpět

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

postranlační modifikace proteinů

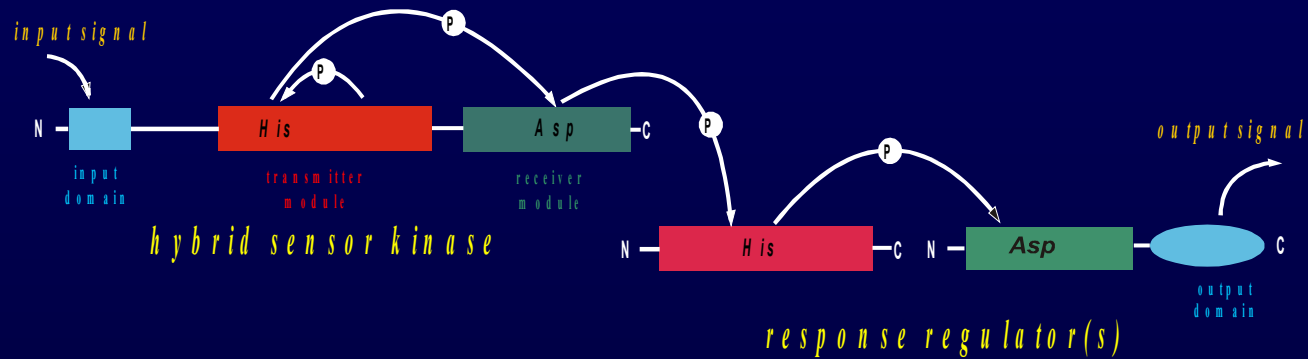
Typy posttranslačních modifikací proteinů

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

Od genu k proteinu a zpět postranlační modifikace proteinů

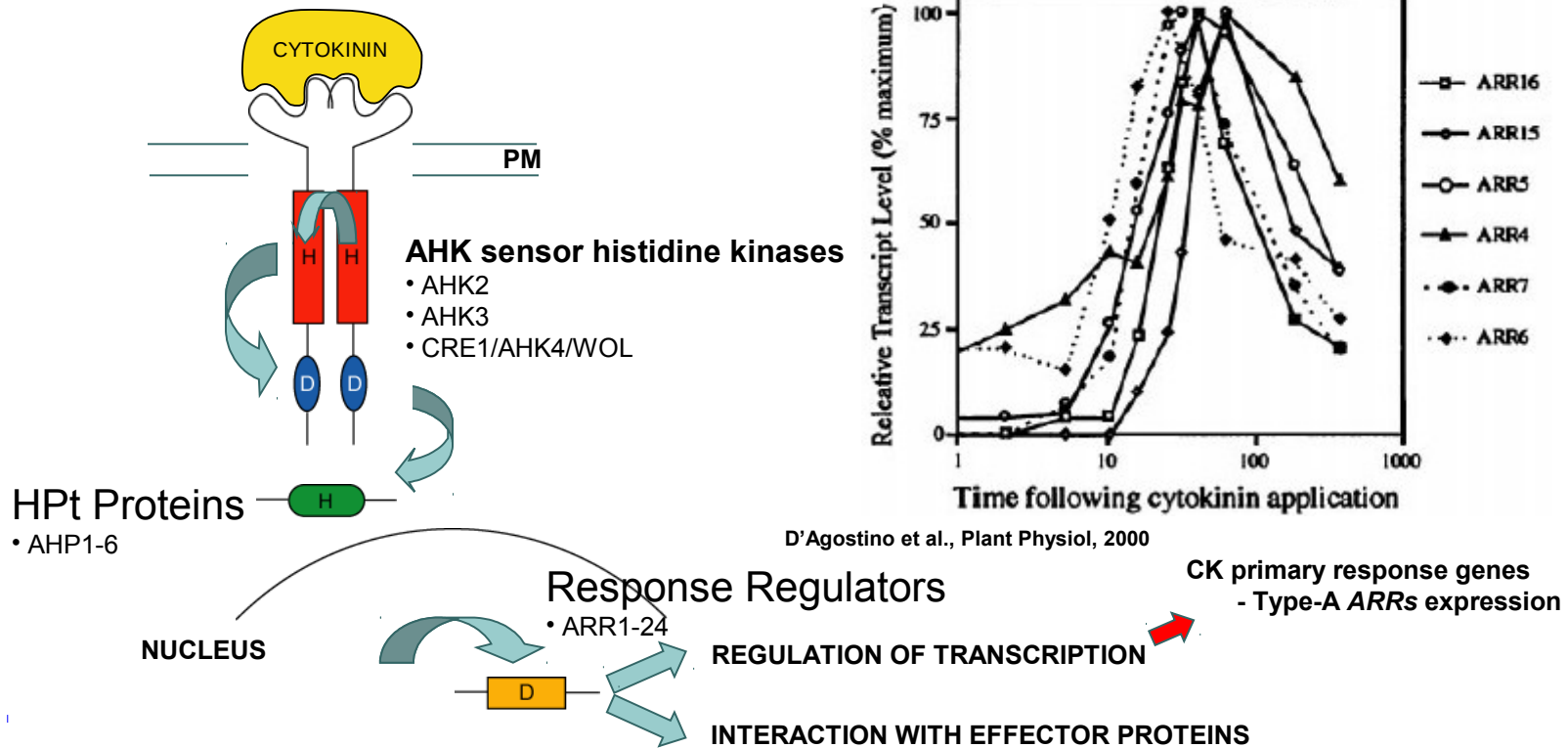
Přenos signálu a regulace genové exprese prostřednictvím fosforylace

- přenos cytokininového signálu u rostlin



Signal Transduction via TCS

Recent Model of the CK Signaling via TCS Pathway



Od genu k proteinu a zpět

postranlační modifikace proteinů

Přenos signálu a regulace genové exprese prostřednictvím fosforylace

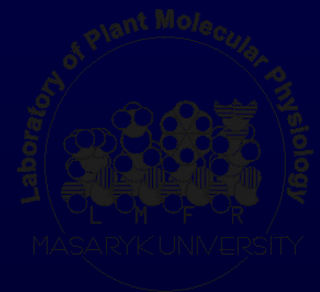
- přenos signálu prostřednictvím TGF β (Transforming Growth Factor) u živočichů



Základy proteomiky

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

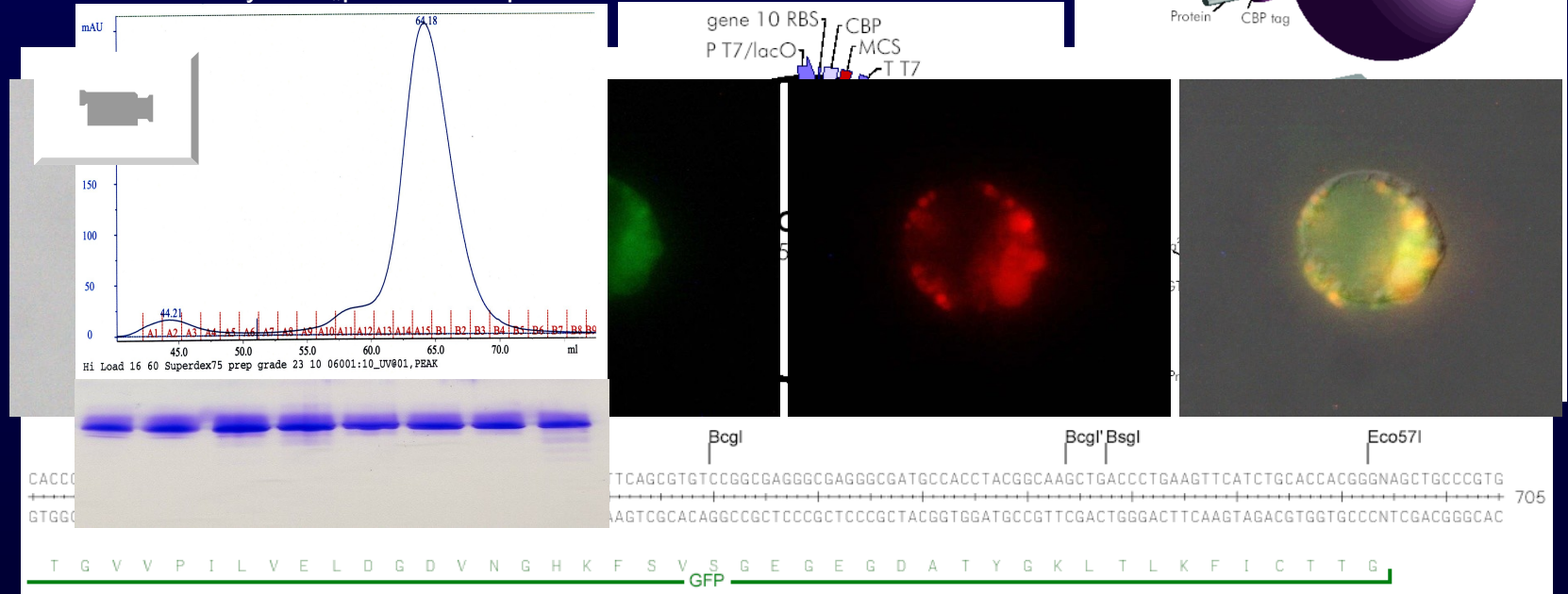
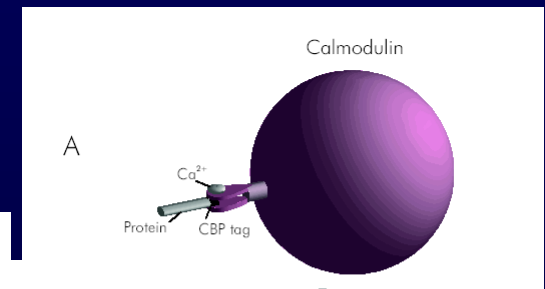


Přístupy současné proteomiky

exprese, purifikace a analýza rekombinantních proteinů

Technologie rekombinantních proteinů

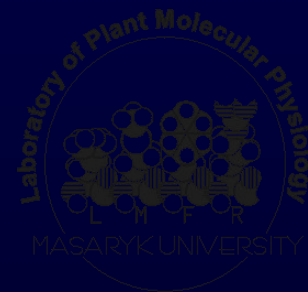
- umožňuje získat velké množství analyzovaného proteinu ve velké čistotě
- využívá technologie rekombinantní DNA
- principem je vložení „přívěsku“ prostřednictvím přípravy rekombinantní DNA, který usnadní purifikaci (afinitní purifikace)
- možnost využití „přívěsku“ i pro lokalizaci a další



Základy proteomiky

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

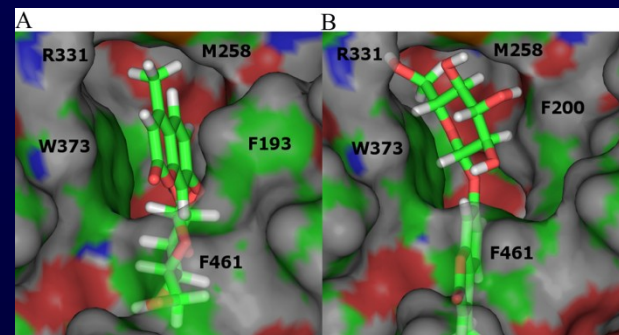
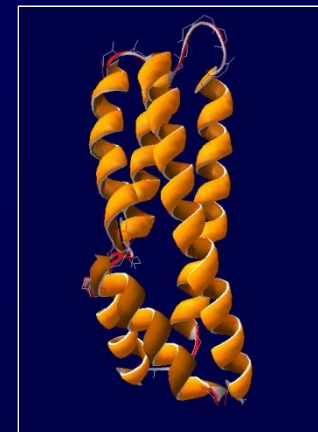


Přístupy současné proteomiky

analýza vztahu mezi strukturou a funkcí proteinů

Analýza vztahu mezi funkcí a strukturou proteinu

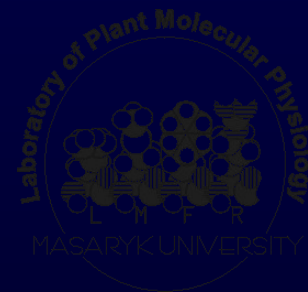
- využívá technologie produkce rekombinantních proteinů a místně řízené mutagenese
- umožňuje analyzovat strukturu rekombinantního proteinu pomocí rentgenové krystalografie nebo NMR
- komparativní analýzou lze pak analyzovat strukturu a funkci jak u standardního typu tak i mutantního proteinu



Základy proteomiky

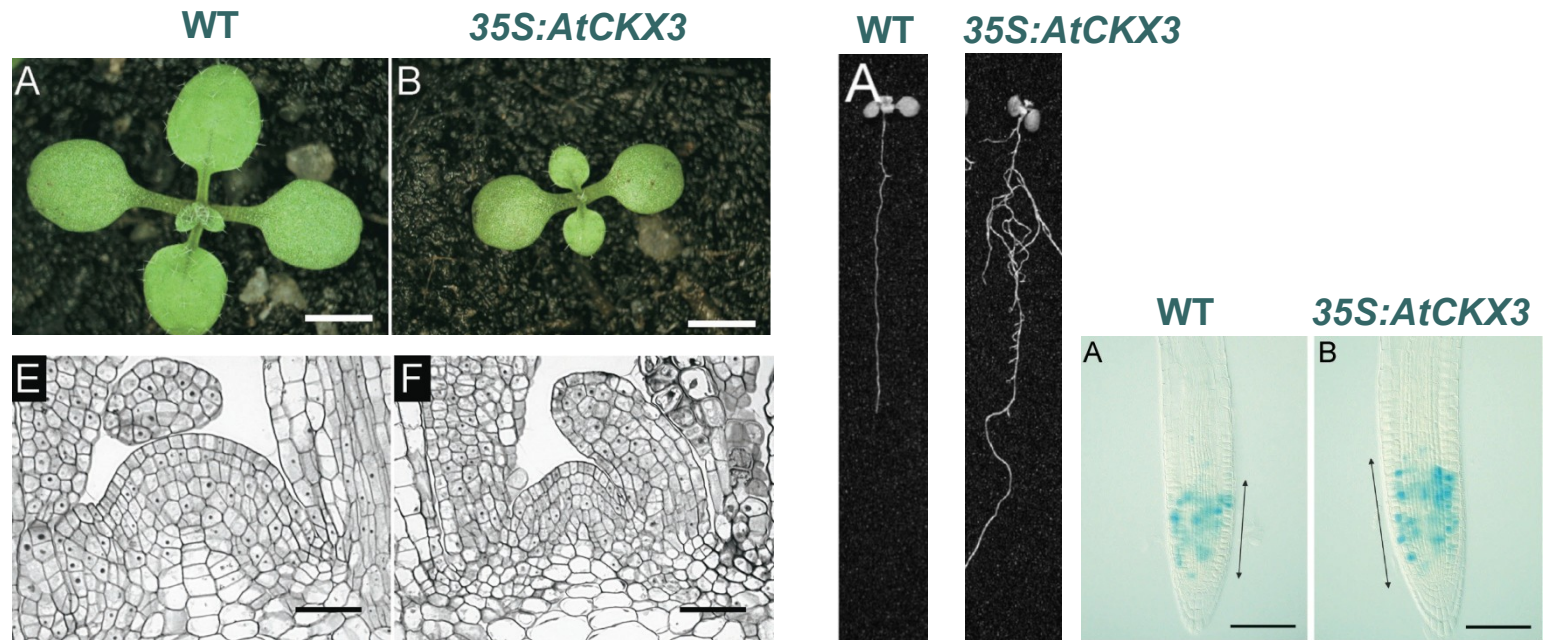
Proč právě proteomika?

- 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



Tissue Specificity of CK Response

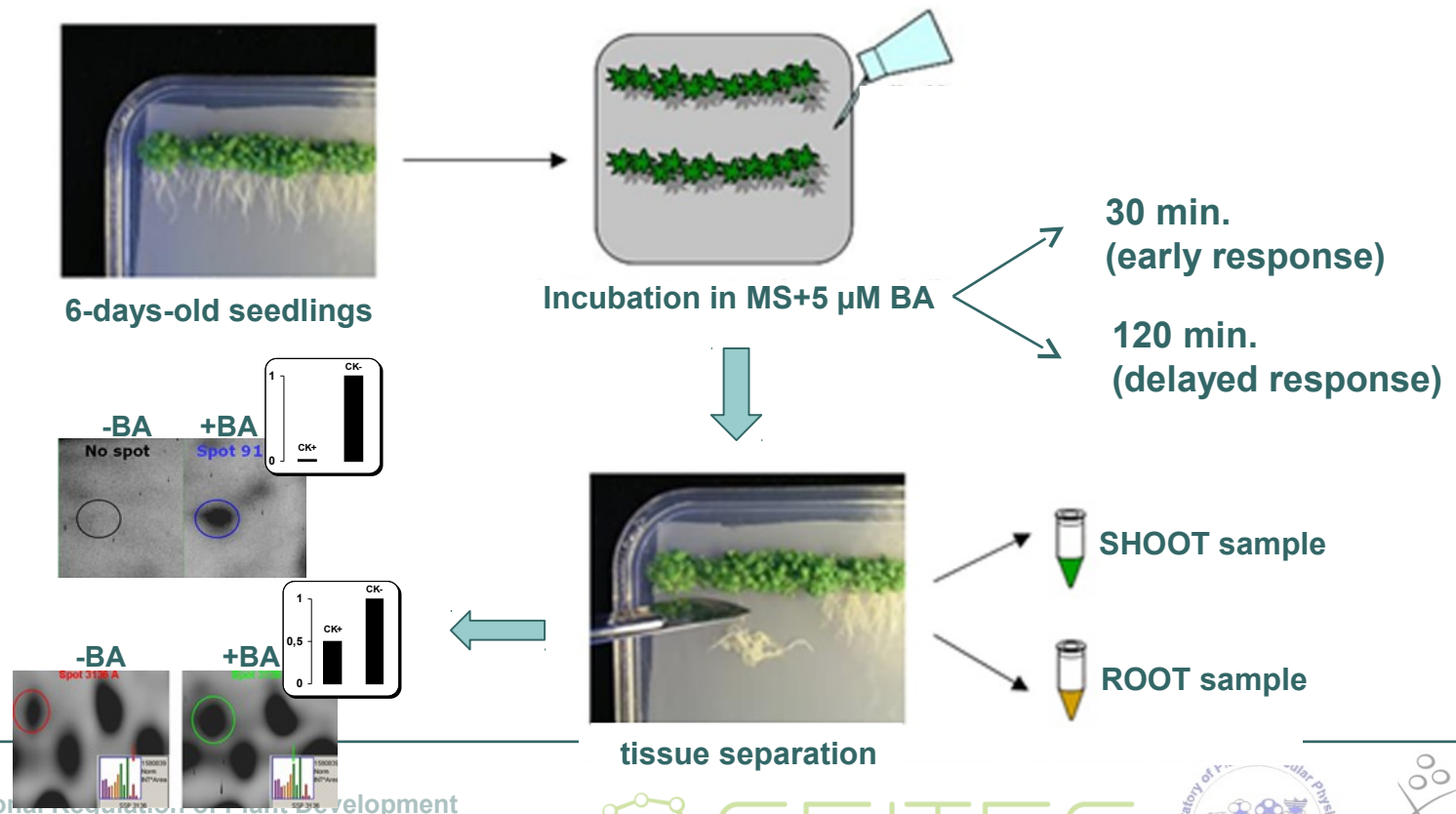
- Cytokinins are supposed to play *opposite role* in the control of *shoot and root development*



Werner et al., *Plant Cell* (2003)

Shoot- and Root-Specificity of Proteome Response to CK

- Is there a shoot- and root-specificity in a *proteome response to CK* ?



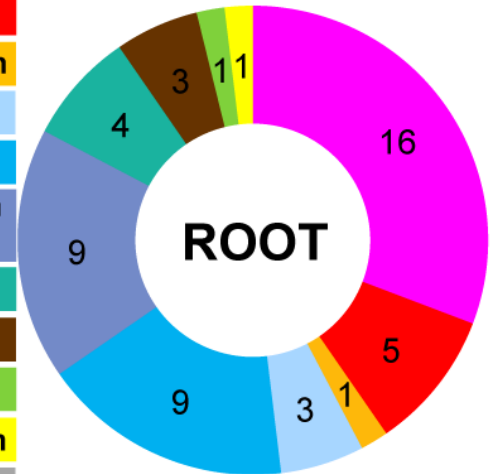
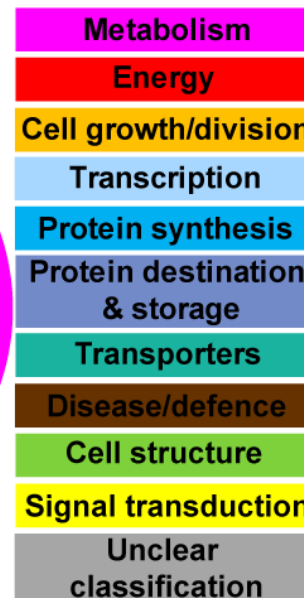
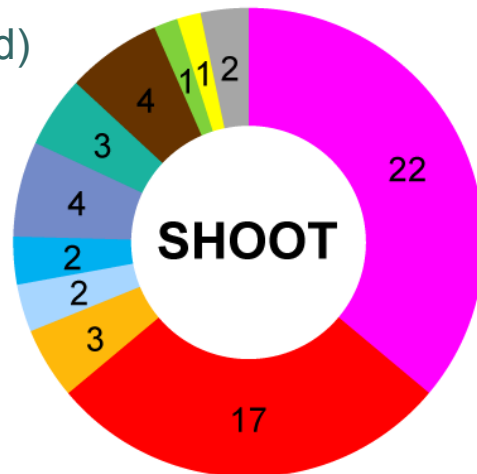
Shoot- and Root-Specificity of Proteome Response to CK



SHOOT: 43/18

(early/delayed)

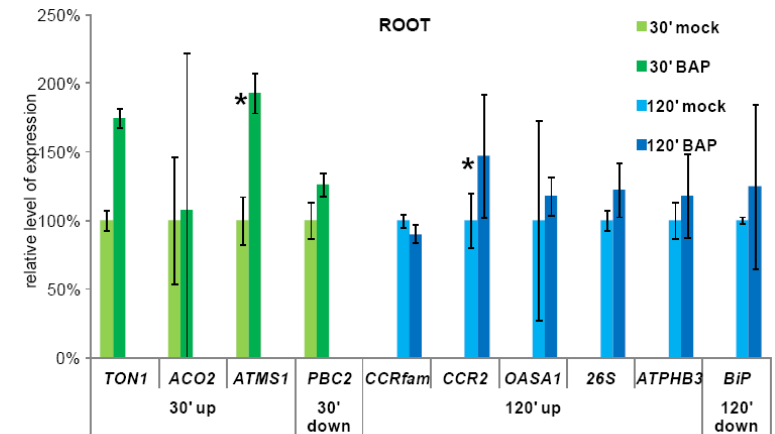
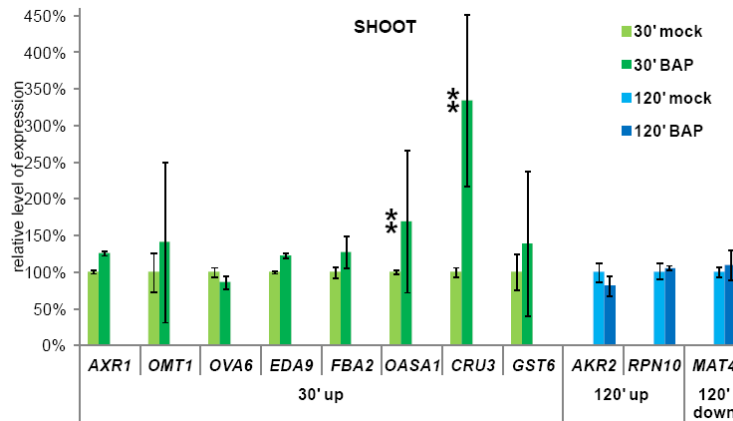
ROOT: 31/21



Žďárská et al., *manuscript in preparation*

Shoot- and Root-Specificity of Proteome Response to CK

- *Transcriptional* vs *post-transcriptional* type of regulations

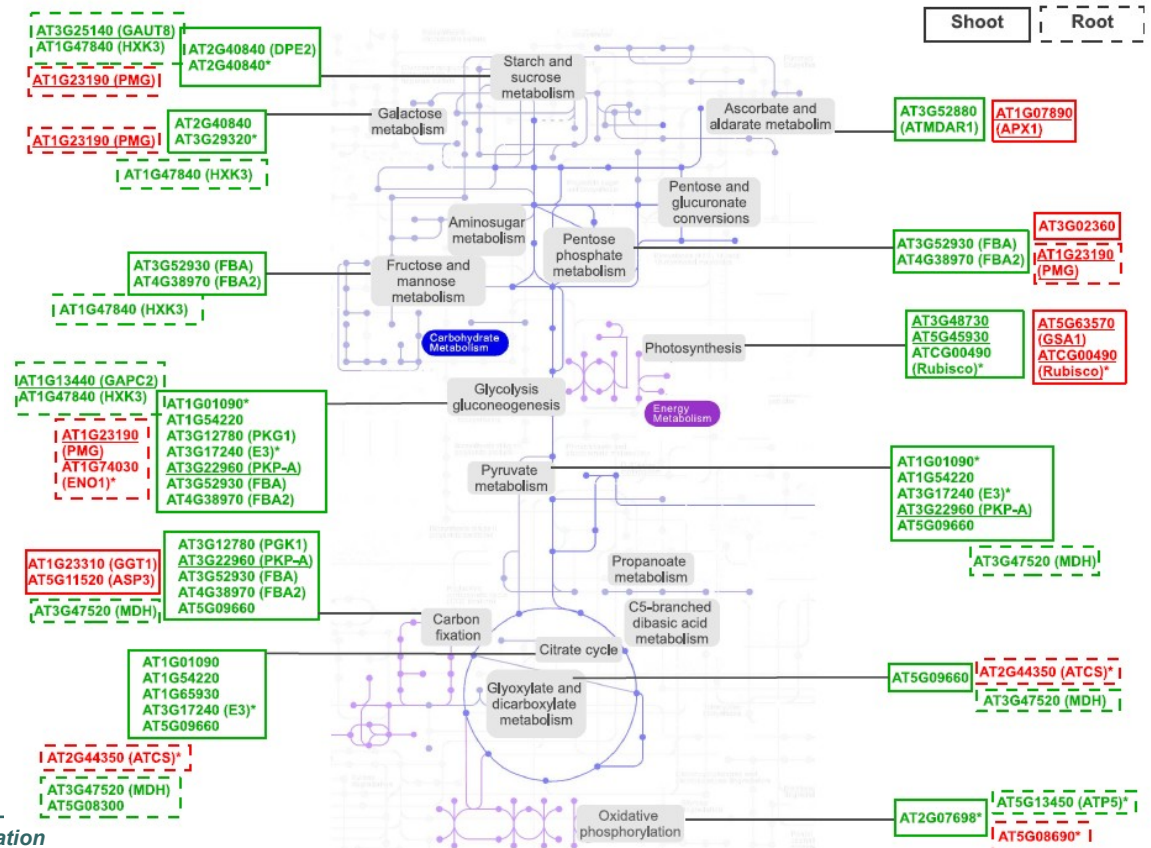


Shoot- and Root-Specificity of Proteome Response to CK

Carbohydrate Metabolism



SHOOT



Ždárská et al., manuscript in preparation

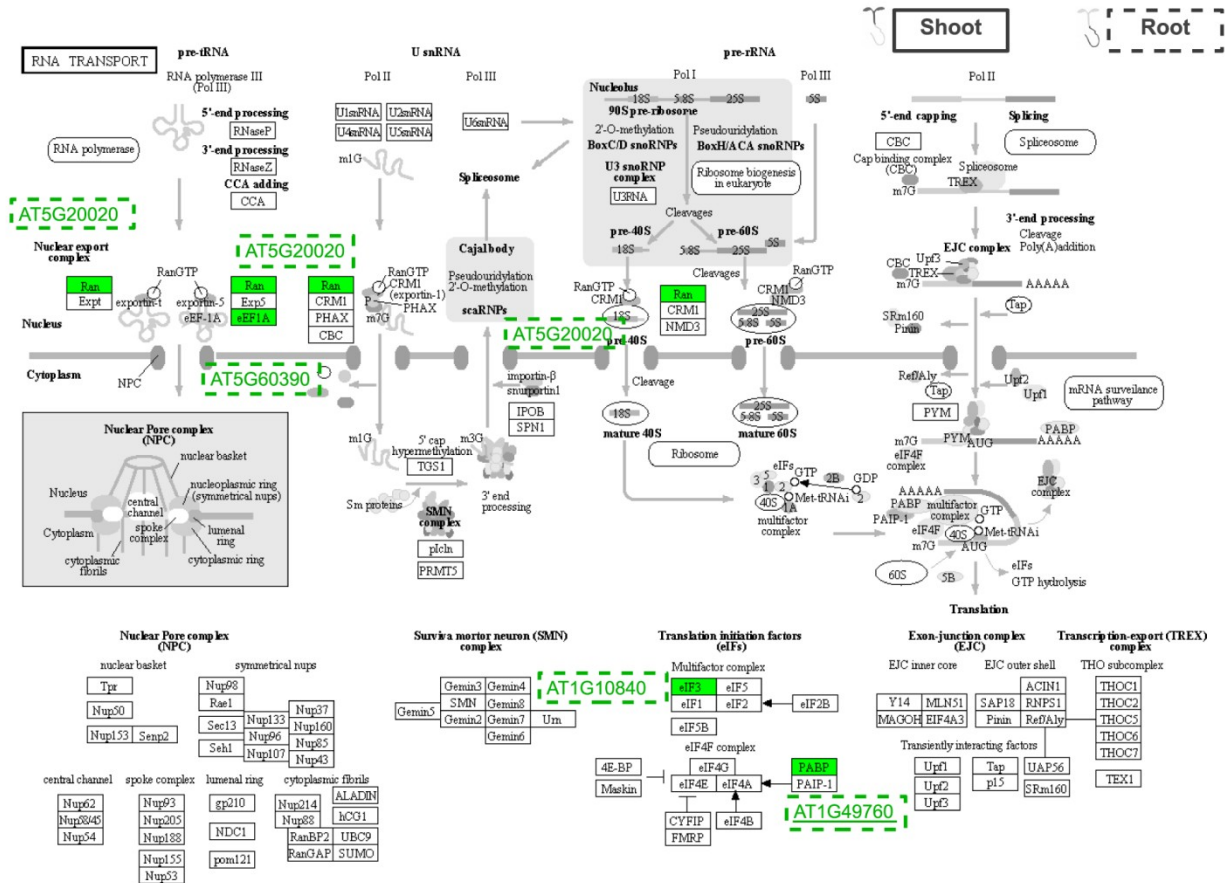


Shoot and Root Specificity of CK Response

Protein Synthesis and Destination



ROOT

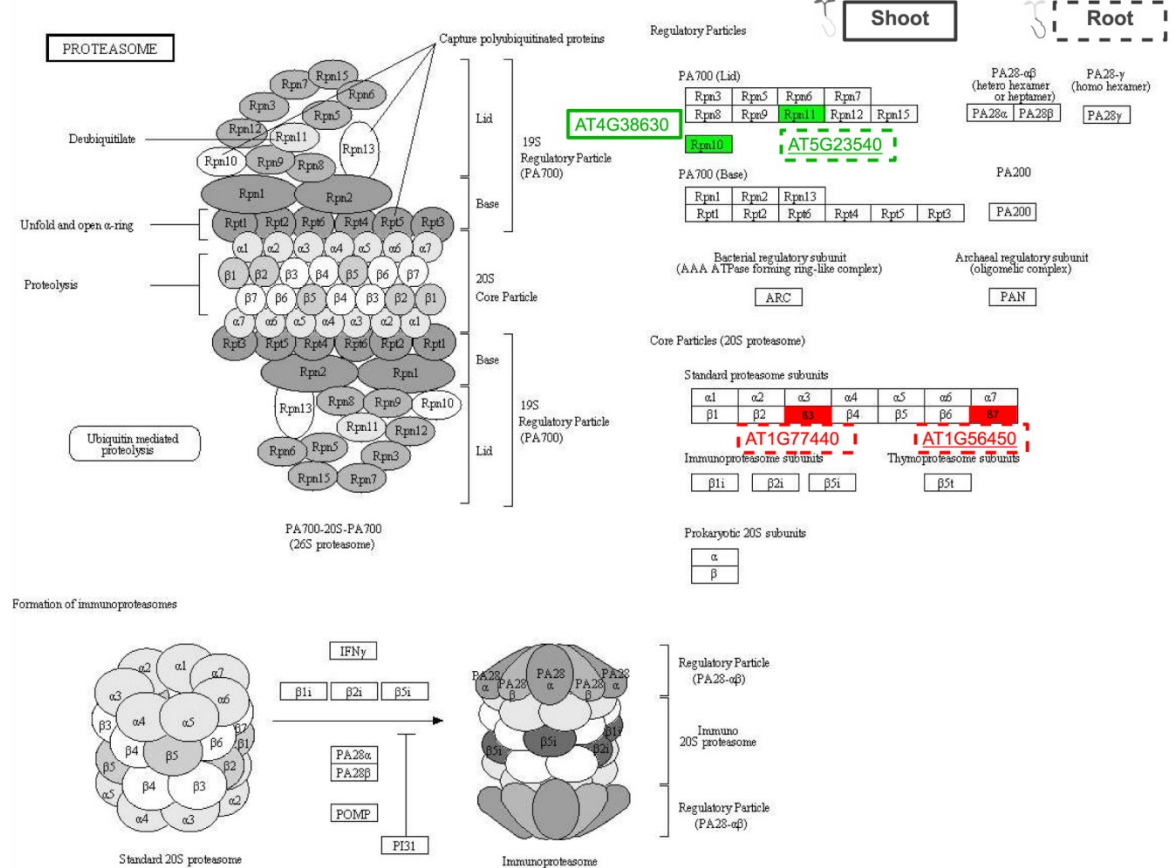


Shoot and Root Specificity of CK Response

Protein Synthesis and Destination



ROOT

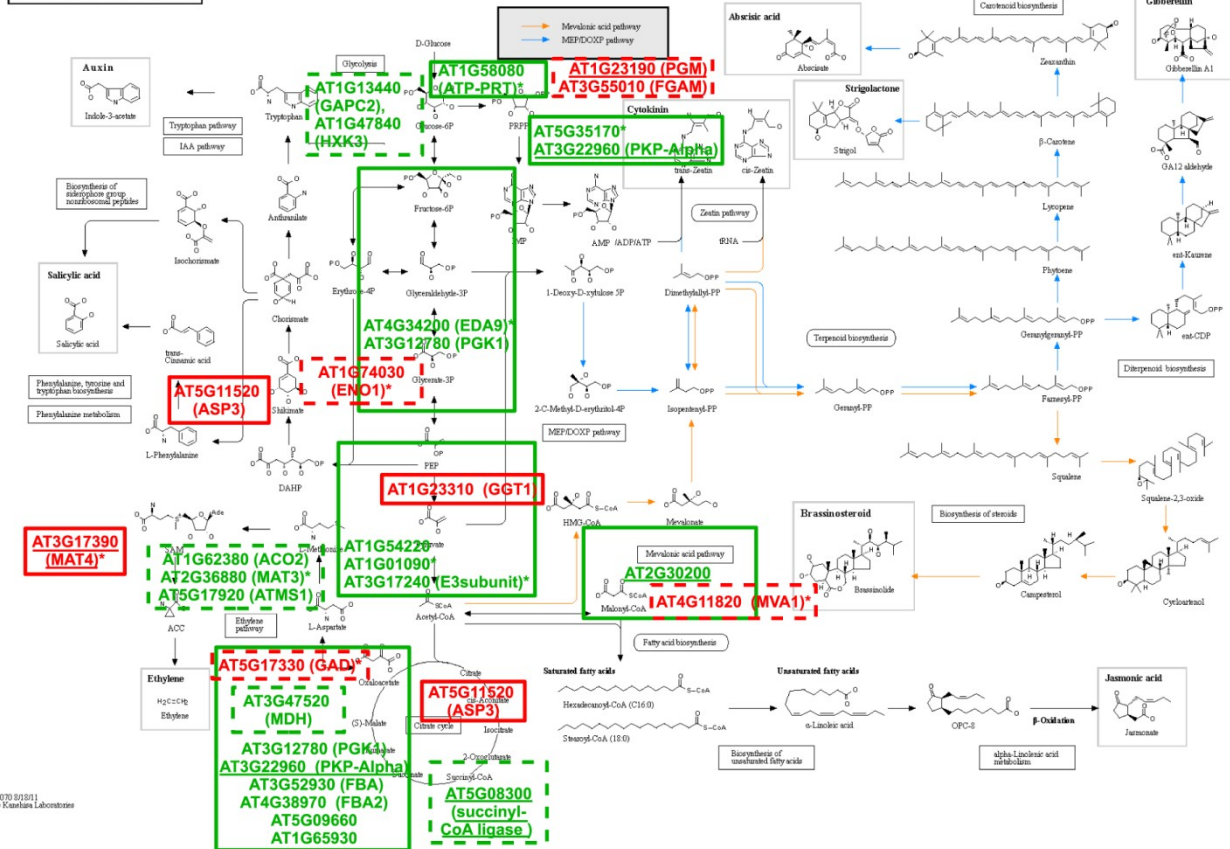


03050 12/1/10

Shoot and Root Specificity of CK Response

Hormonal Metabolism

BIOSYNTHESIS OF PLANT HORMONES

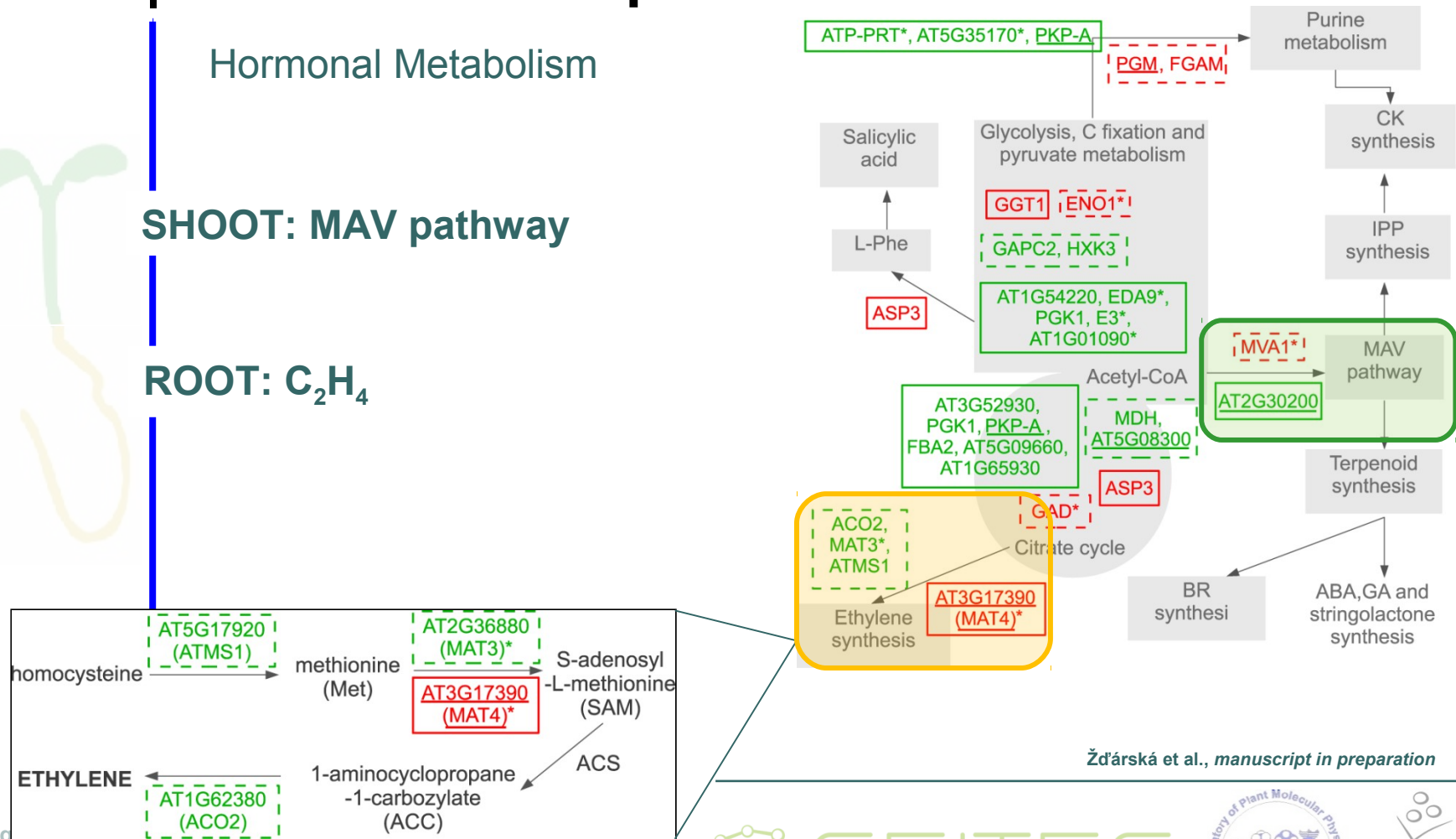


Shoot and Root Specificity of CK Response

Hormonal Metabolism

SHOOT: MAV pathway

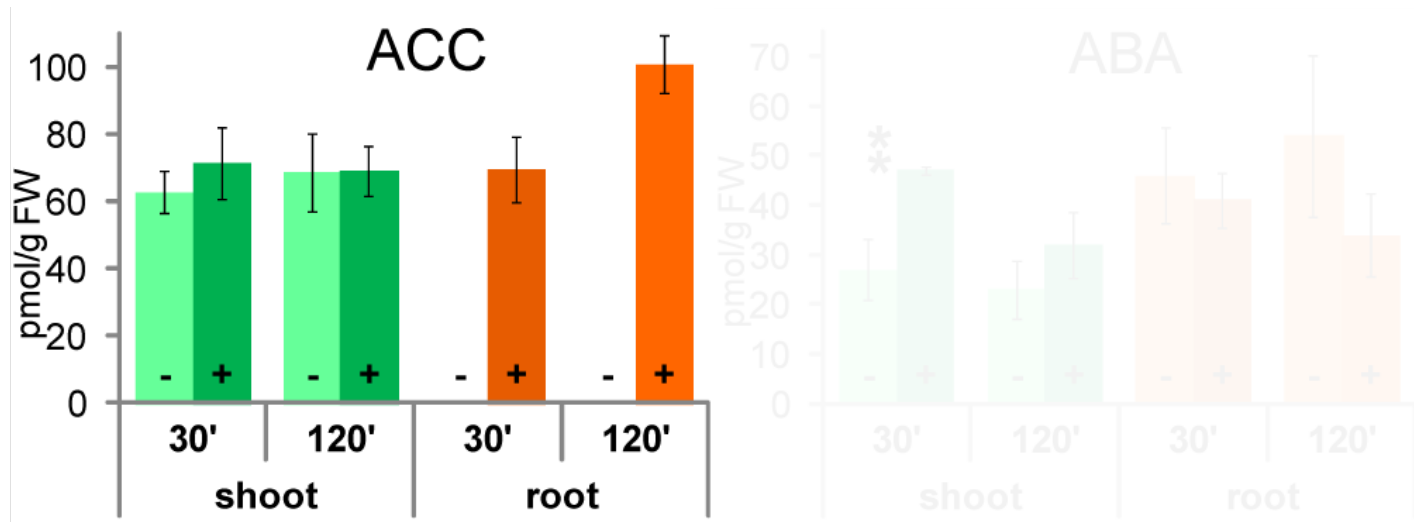
ROOT: C₂H₄



Žďárská et al., manuscript in preparation

Shoot and Root Specificity of CK Response

Endogenous Hormone Levels

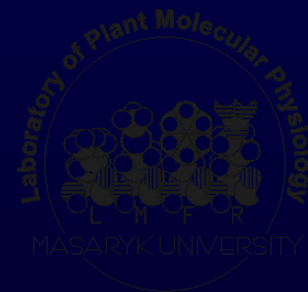


Žďárská et al., manuscript in preparation

Základy proteomiky

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 posttranslačních modifikací

Analýza posttranslačních modifikací

- pomocí specifických metod lze identifikovat kotranslační a posttranslační 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 struktur a transkripční aktivity prostřednictvím regulace vazby histonů
- glykosylace
 - velice heterogenní (aktivátor plasminogenu 3 místa pro glykosylaci na N-konci, až 11. 520 možností vizoforem)



- mikroheterogenita díky velkému množství různých cukerných zbytků, které se mohou vázat na jeden ak.
- makroheterogenita díky rozdílu v přítomnosti různých cukrů na různých ak. na různém počtu kopií daného proteinu



Základy proteomiky 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

