

# proteomika



## jan havliš

- : masarykova univerzita
- :: střeoevropský technologický institut
- ::: mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin
  
- :: přírodovědecká fakulta, ústav experimentální biologie
- ::: oddělení funkční genomiky a proteomiky



## **proteiny (II.)**

- : vznik proteinů a jejich složení
- : vlastnosti proteinů
  - :: velikost a tvar, polarita, náboj, reaktivita
  - :: základní hierarchie struktury proteinu
- : transport a lokalizace
- : zánik proteinů

## **expresní a diferenční proteomika (III.)**

- : jak studovat proteom?
- : z čeho se proteom skládá?
- : kolik tam toho je?
- : a co na to má vliv?

## II.

### proč proteiny?

- : stojí mezi **genotypem** a **fenotypem**
- : **oddřou většinu práce** v živém organizmu!
  - :: metabolismus, regulace, obrana, transport, struktura a pohyb

### genom

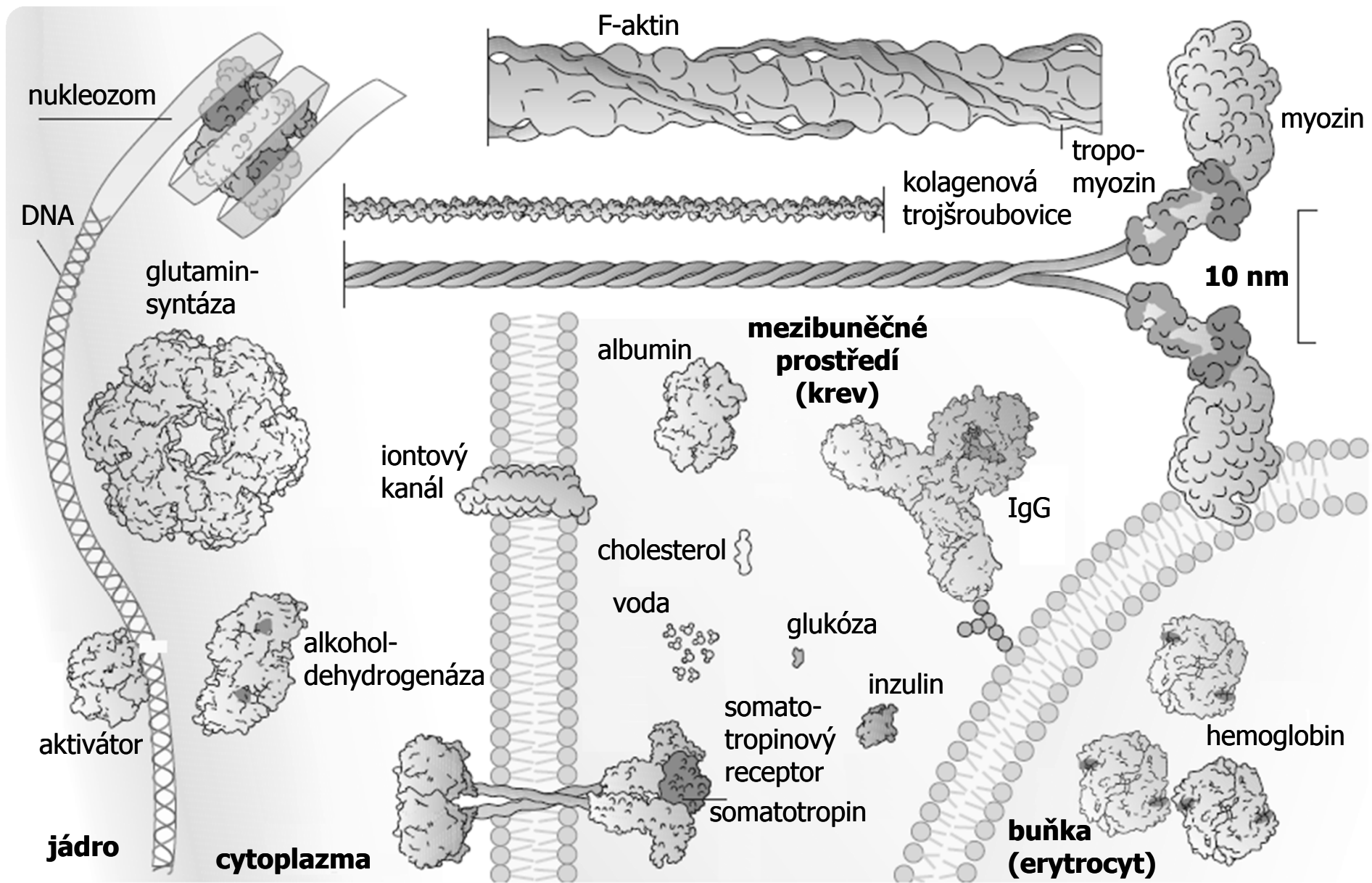
- : v zásadě statická entita
  - :: změny spíše nežádoucí
- : relativně jednoduchý

### proteom

- : dynamický systém
  - :: radikální změny se změnou času a podmínek
- : složitý systém

## proteiny

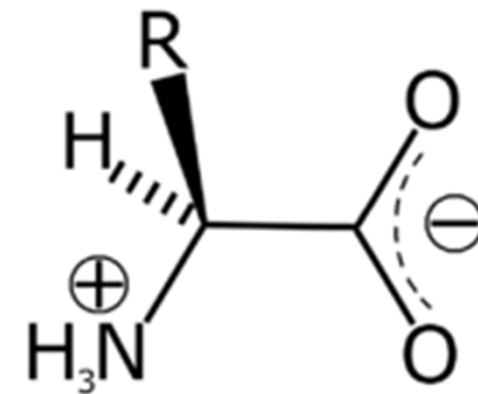
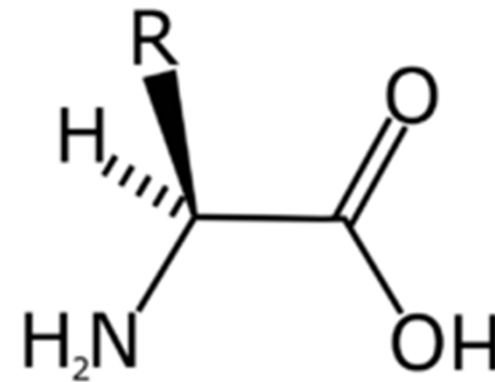
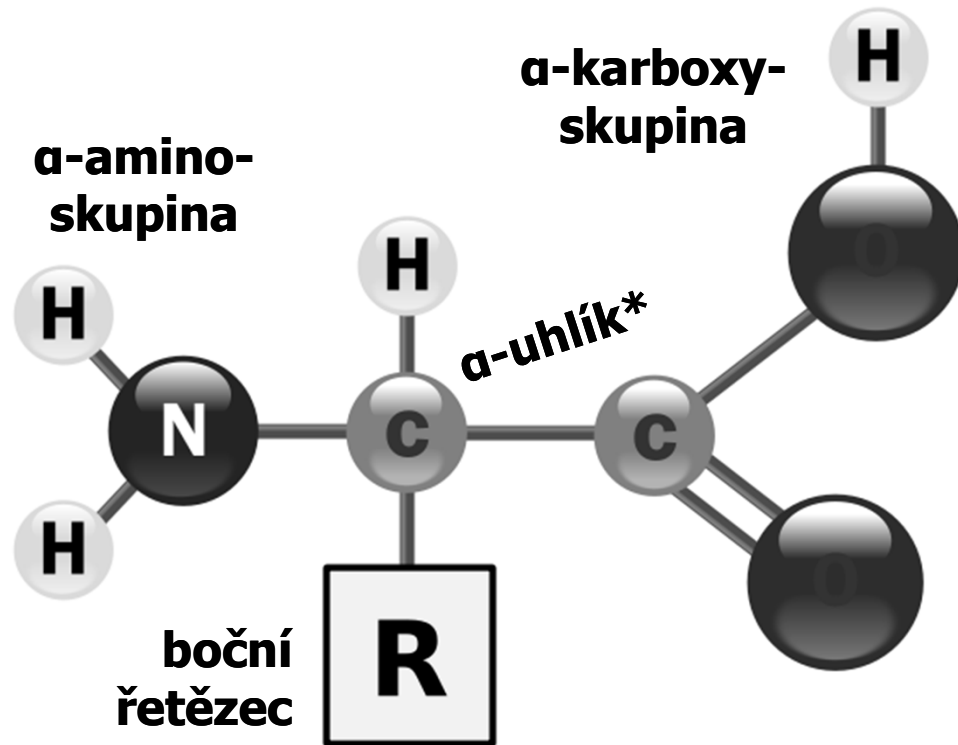




# protein/peptid ~ bio(hetero)polymer

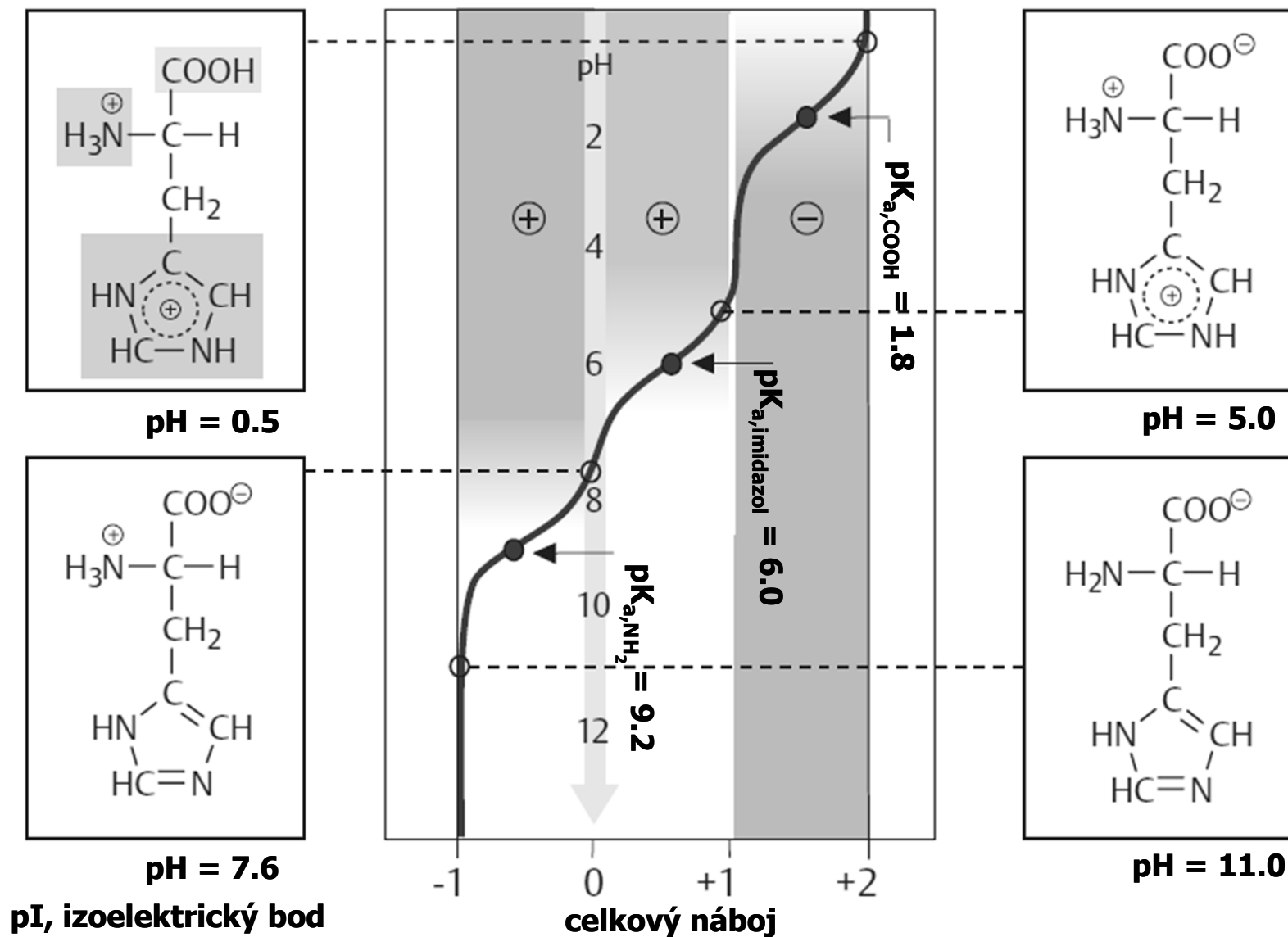
: monomer – *aminokyselina*

:: biogenní aminokyseliny (L-formy)



**obojetný ion**  
(*zwitter-ion*)

# vztah mezi $pK_a$ a pH u aminokyselin (a peptidů/proteinů)



# aminokyseliny (AK)

: běžné

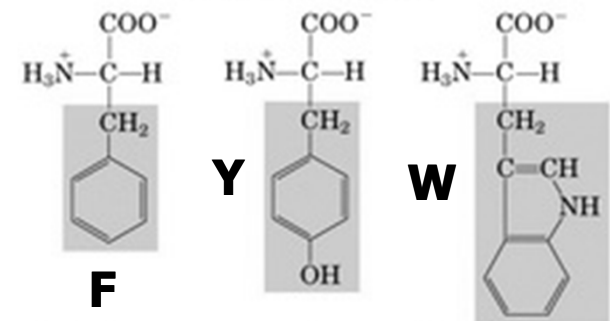
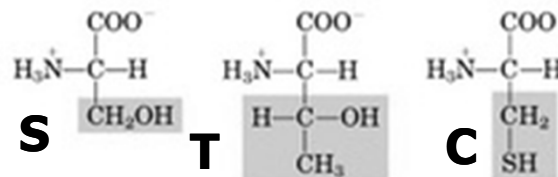
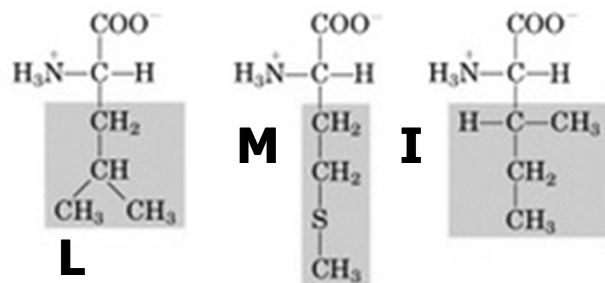
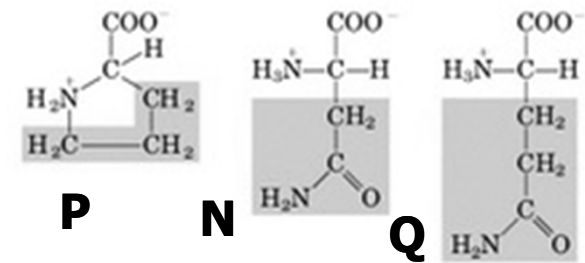
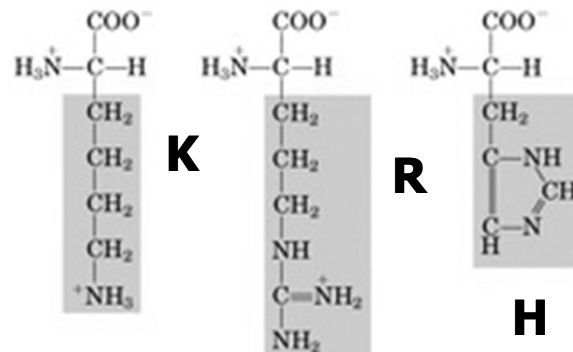
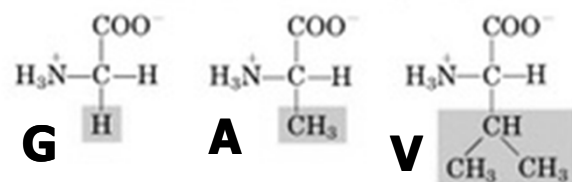
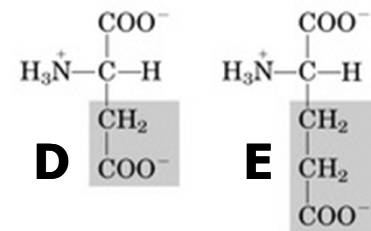
:: Ala/A, Arg/R, Asp/D, Asn/N, Cys/C, Glu/E, Gln/Q, Gly/G, His/H, Ile/I, Leu/L, Lys/K, Met/M, Phe/F, Pro/P, Ser/S, Thr/T, Trp/W, Tyr/Y, Val/V

:: zvláštní značky

**Asx/B** asparagin nebo asparagová kyselina

**Glx/Z** glutamin nebo glutamová kyselina

**Xle/J** leucin nebo izoleucin



## : **klasifikace AK**

:: kyseliny a jejich amidy

::: Asp/D (pK = 3.7), Asn/N, Glu/E (pK = 4.3), Gln/Q

:: alifatické

::: Gly/G, Ala/A, Leu/L, Ile/I, Val/V

:: aromatické

::: Tyr/Y, Trp/W, Phe/F

:: báze

::: His/H (pK = 6.0), Lys/K (pK = 10.5), Arg/R (pK = 12.5)

:: cyklické

::: Pro/P (pK = 11.0)

:: hydroxyderiváty

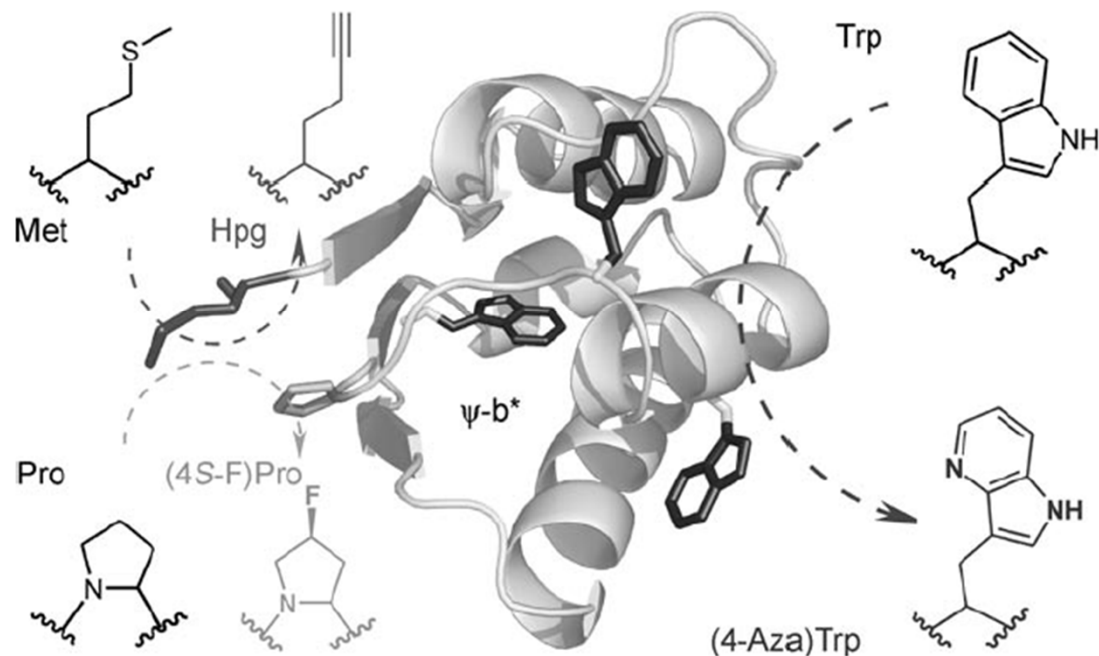
::: Ser/S, Thr/T + Tyr/Y (pK = 10.0)

:: sirné

::: Cys/C (pK = 8.2), Met/M



- : vzácné
  - :: **Sec/U** selenocystein, **Pyl/O** pyrrolyzin (prokaryota)
  - :: AK vzniklé posttranslační modifikací (PTM)
    - ::: hydroxyprolin a selenomethionin
  
- : abiogenní aminokyseliny
  - :: genetický kód 2.0
    - ::: syntetické aminokyseliny do syntetických proteinů
    - ::: bioinženýrství



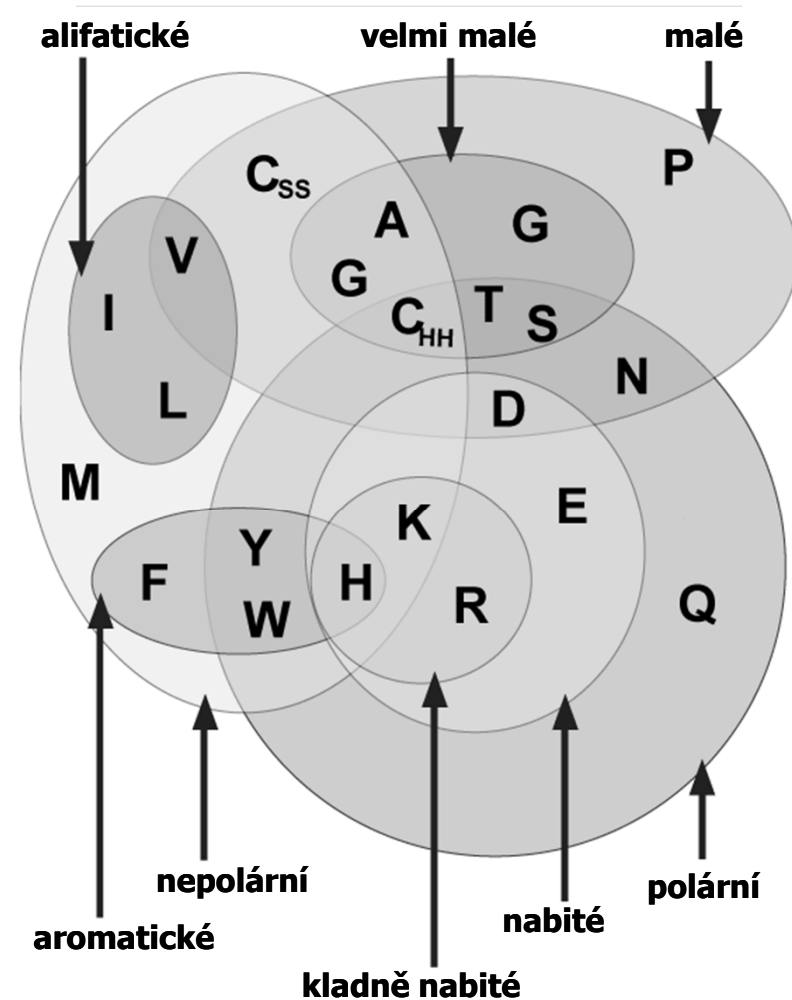
# multifunkční struktura aminokyselin

- : C-konec; kyselý
  - ::  $\Rightarrow$  záporný náboj/polární
- : N-konec; zásaditý
  - ::  $\Rightarrow$  kladný náboj/polární
- : boční řetězec
  - :: široký rozsah vlastností

ovlivnění **fyz.-chem. vlastností**  
a **struktury** proteinů a peptidů

## *vysoká variabilita*

- : složité chování
- : širší spektrum metod studia
  - :: absorbance (UV), fluorescence
  - :: náboj, polarita,  $M_r$
  - :: 3D struktura
  - :: reaktivita, interakce



# vznik peptidů/proteinů

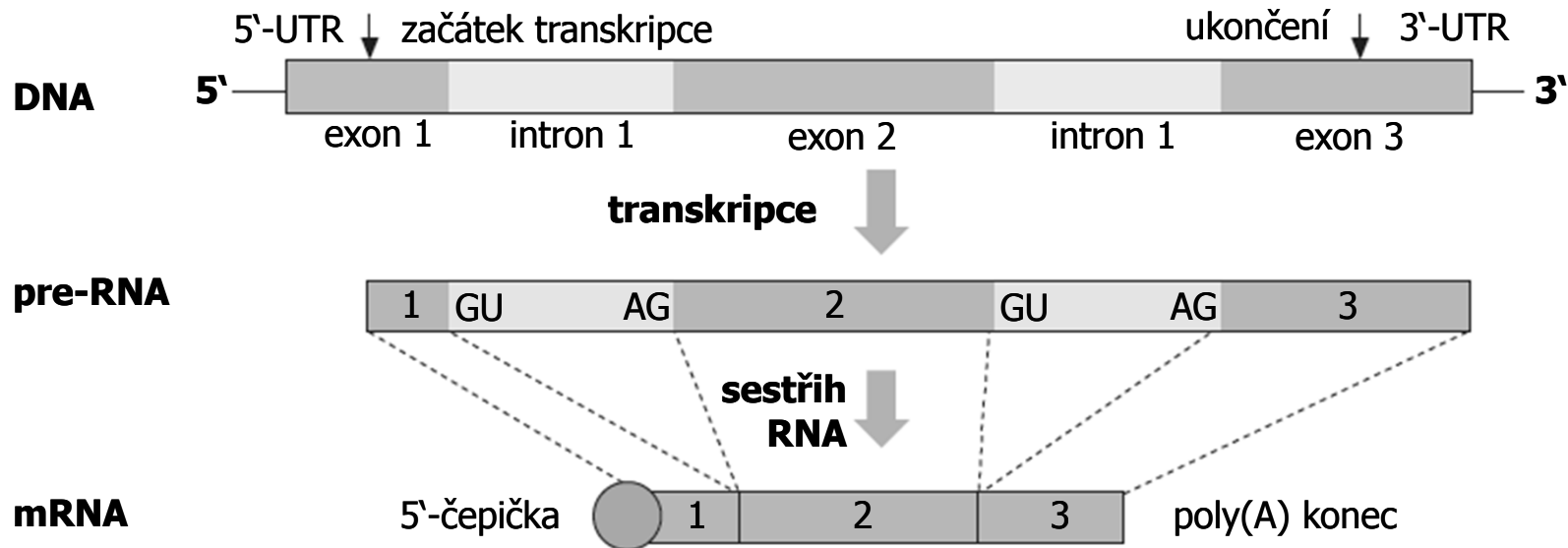
: proteiny

:: **biosyntéza**

::: transkripce (DNA > mRNA)

::: translace (mRNA > protoprotein)

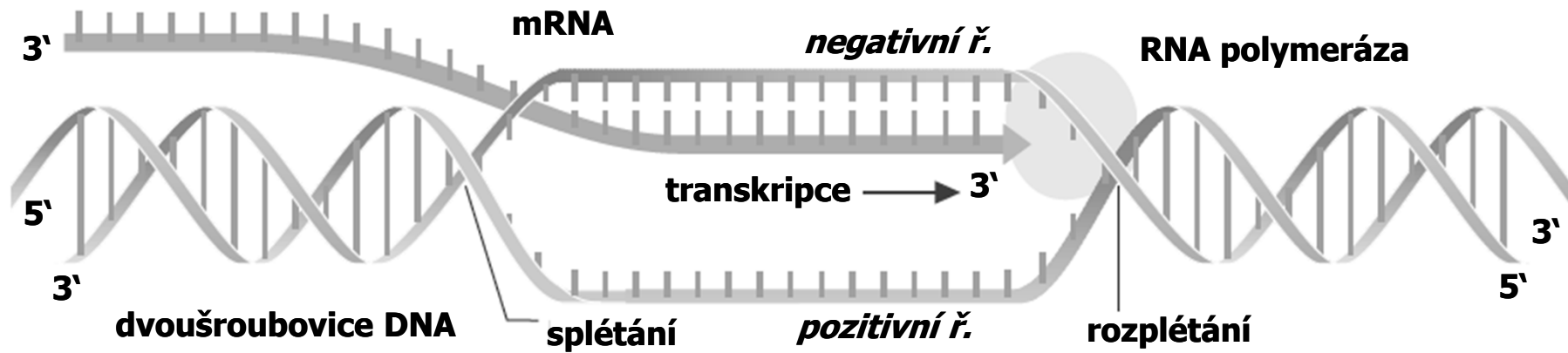
::: posttranslační změny (protoprotein > funkční protein)



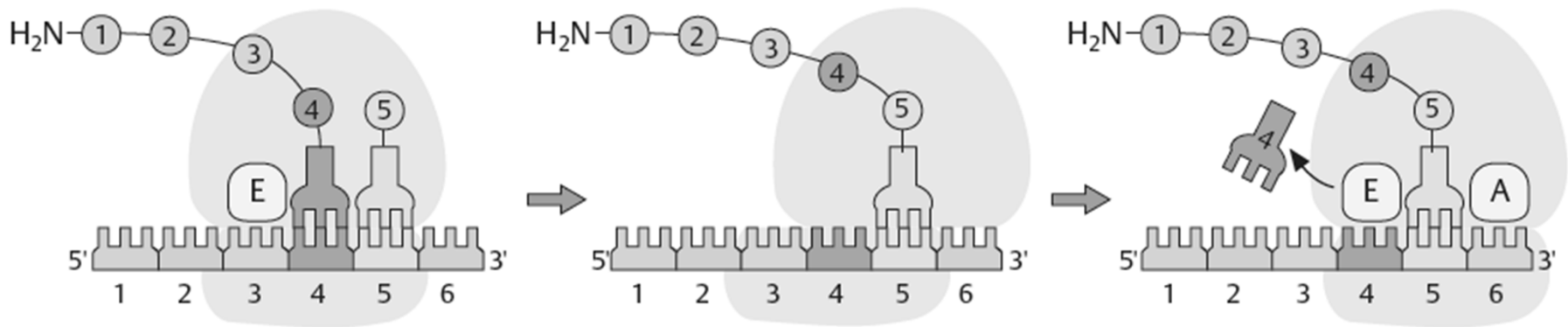
:: **abiosyntéza**

::: *in vitro* syntéza (NCL – *native chemical ligation*)

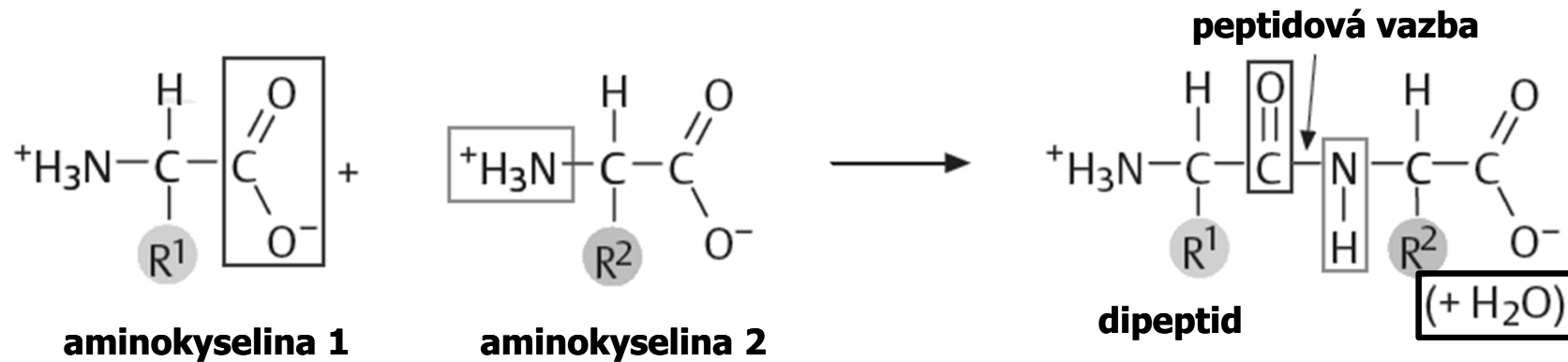
# schéma transkripce



# schéma translace



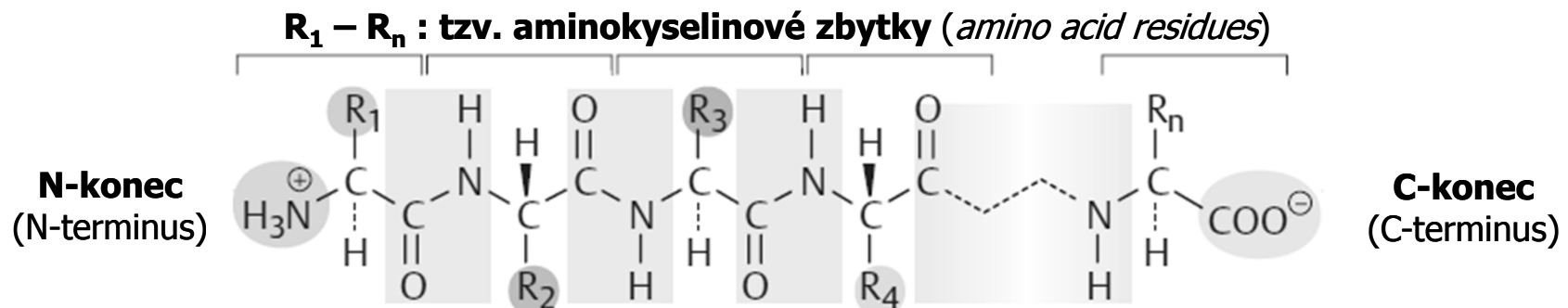
# vznik peptidové vazby



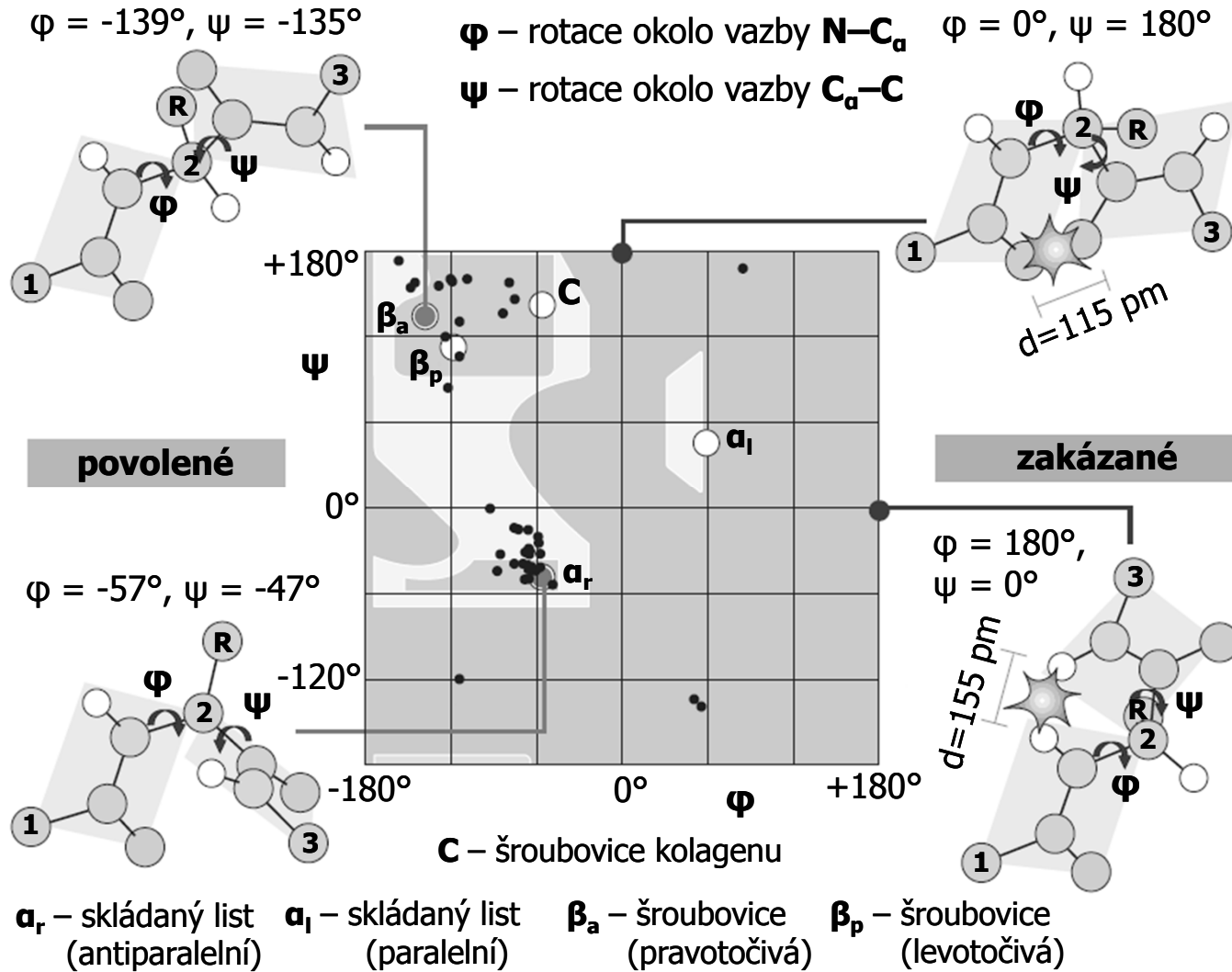
## význam peptidové vazby

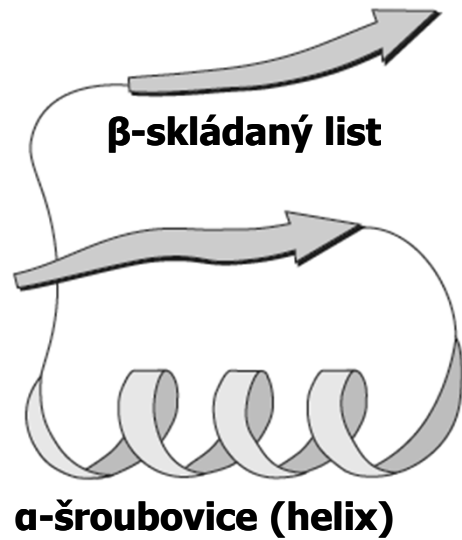
- : primární sekvence proteinů (oligopeptidy, polypeptidy)
- : podílí se významně na sekundární a terciární struktuře
- :: rotace kolem jednoduchých vazeb

## oligopeptid



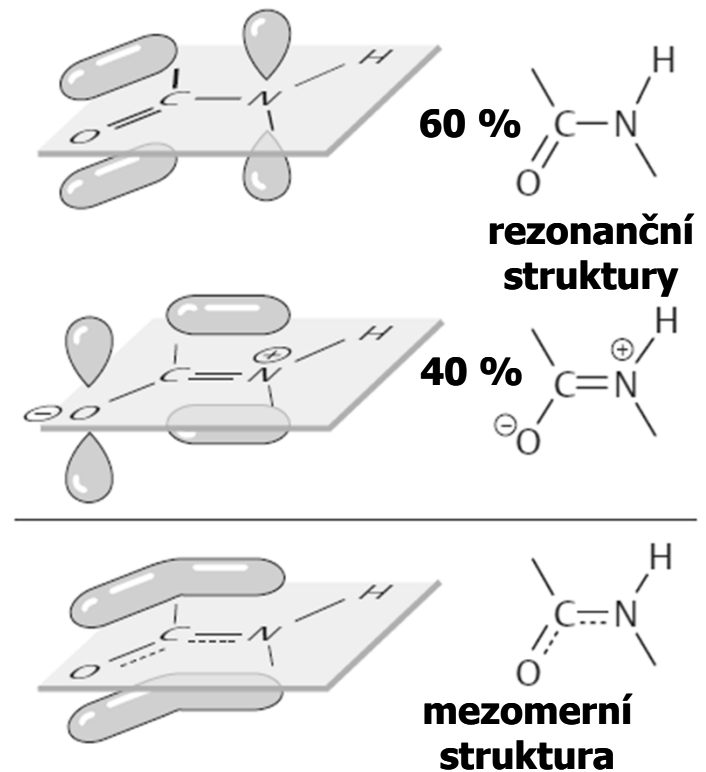
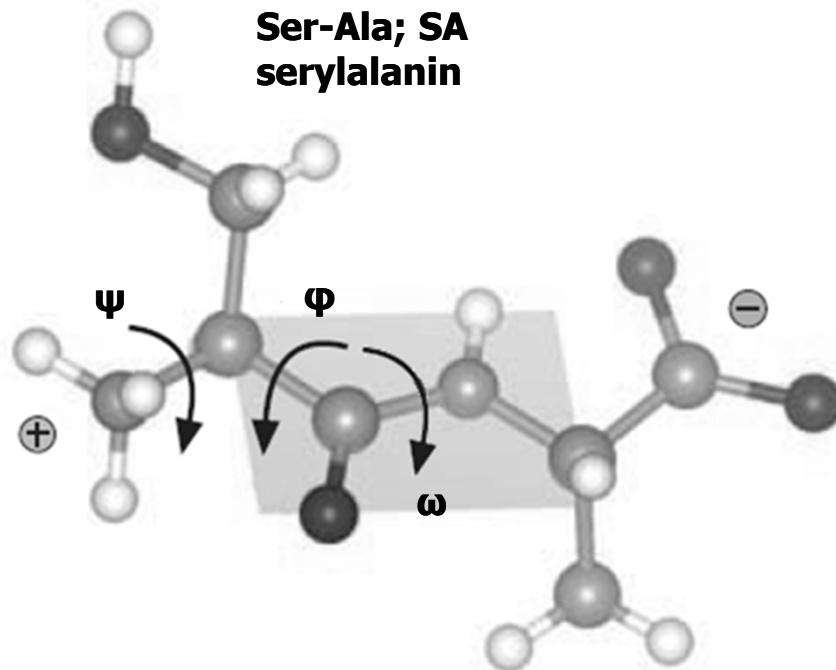
# vliv peptidové vazby na sekundární strukturu proteinů



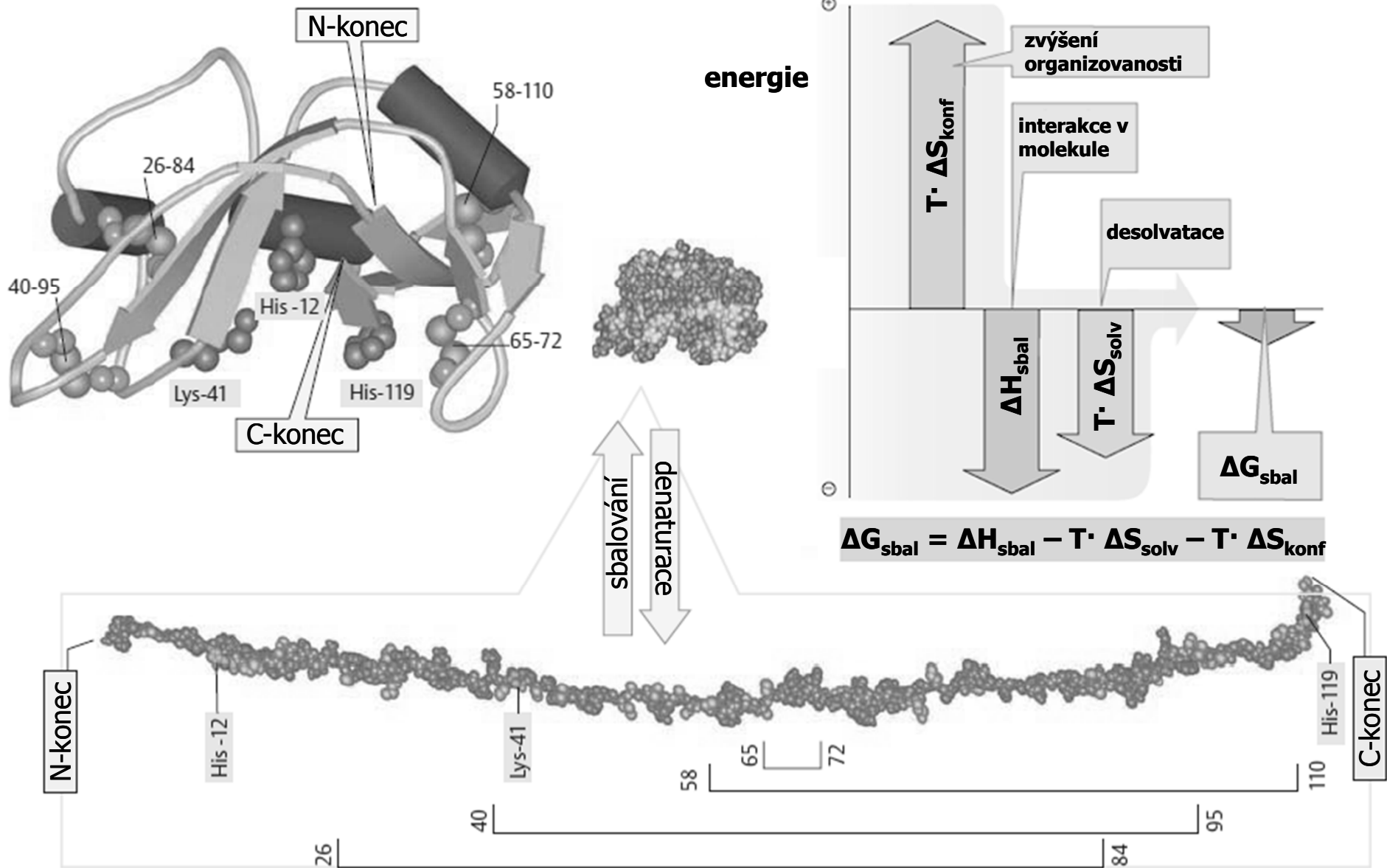


## další formy sek. struk.

- : smyčka (*loop*)
- : ohyb (*turn*)
- : náhodné klubko (*random coil*)

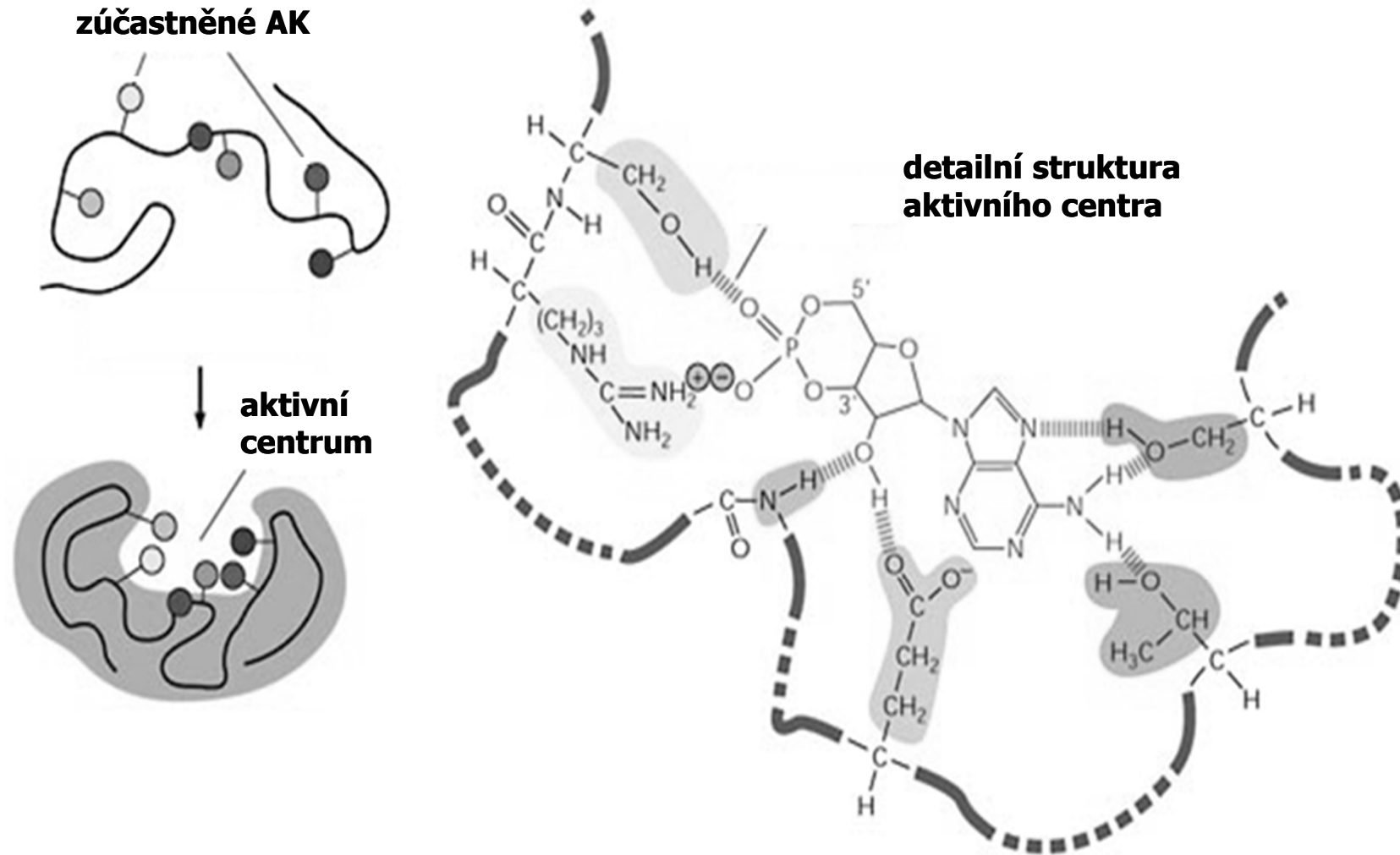


# formování terciární struktury proteinu

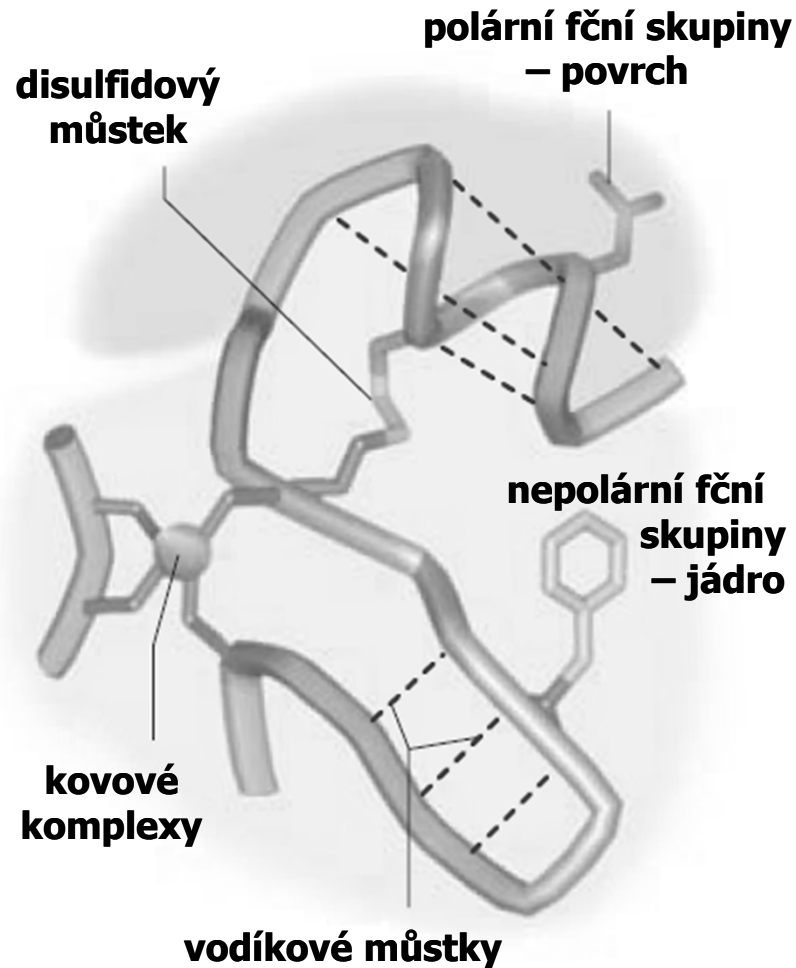




# utváření aktivních center v rámci terciární struktury proteinu

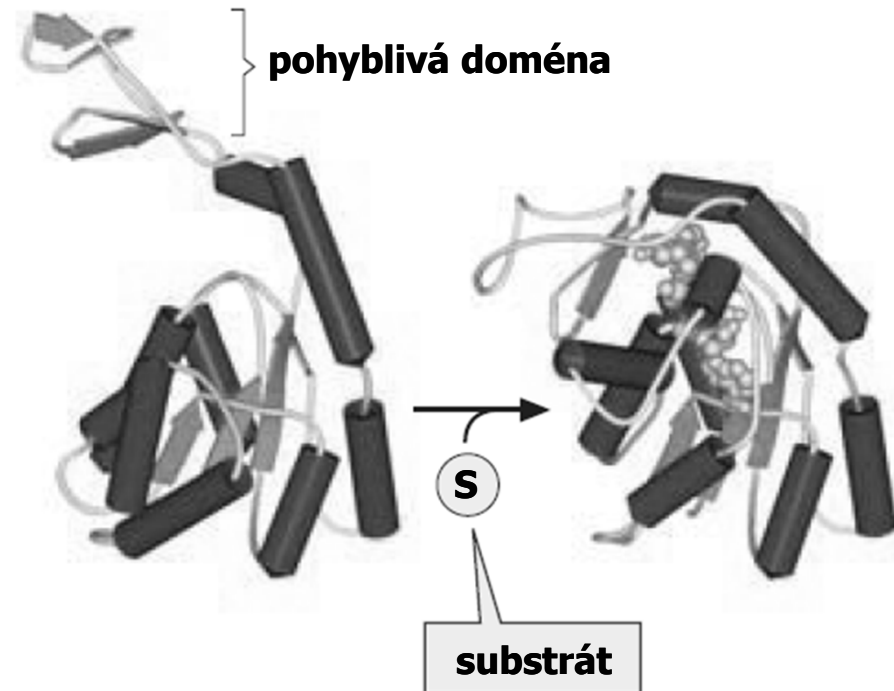


# terciární struktura proteinu a její význam



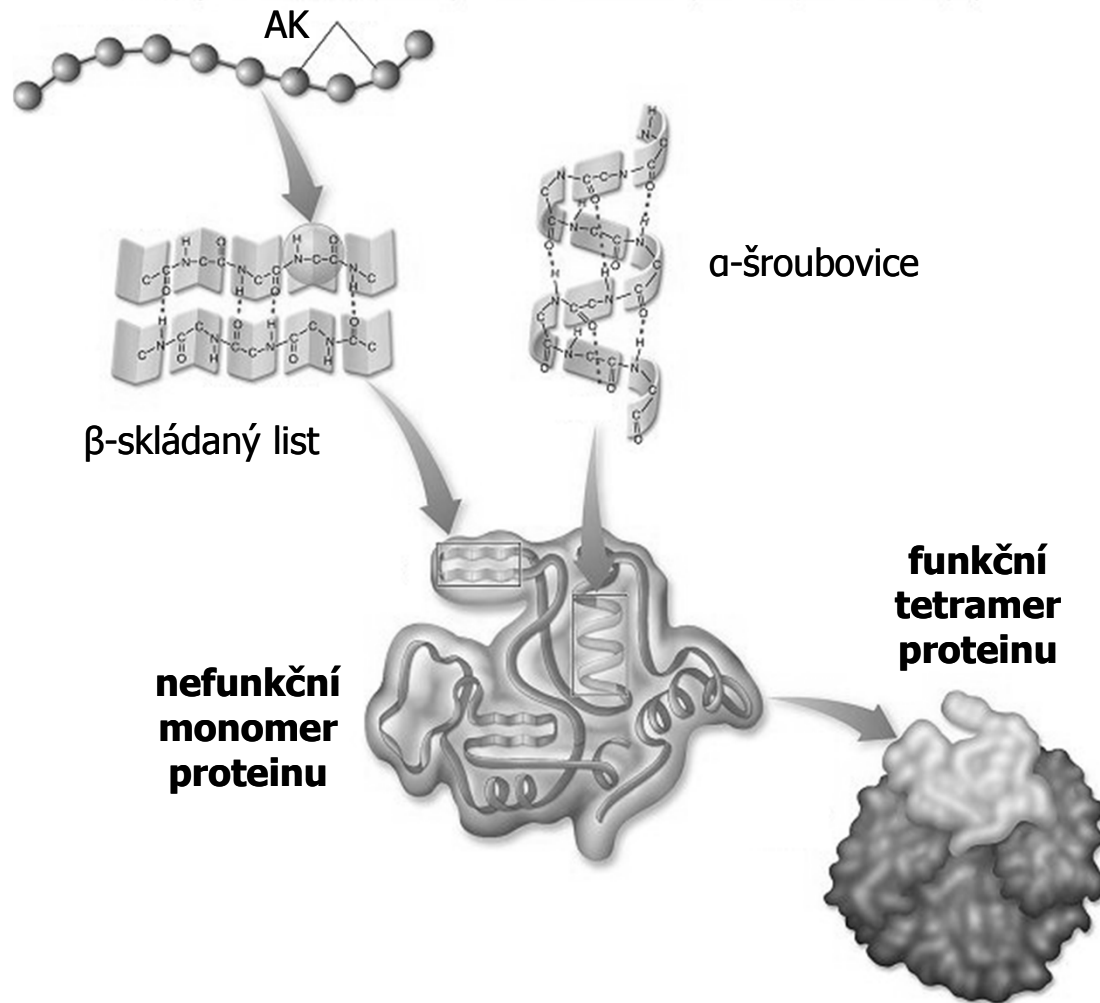
stabilizace struktury  
: + coulombické interakce

## allosterie



: změna primární struktury  
:: jen v genu (ne vždy)  
: změna vyšších struktur  
:: snadno změnou prostředí

# kvartérní struktura proteinu a její funkce



## formování

- : kooperativní vazba
- : allosterie

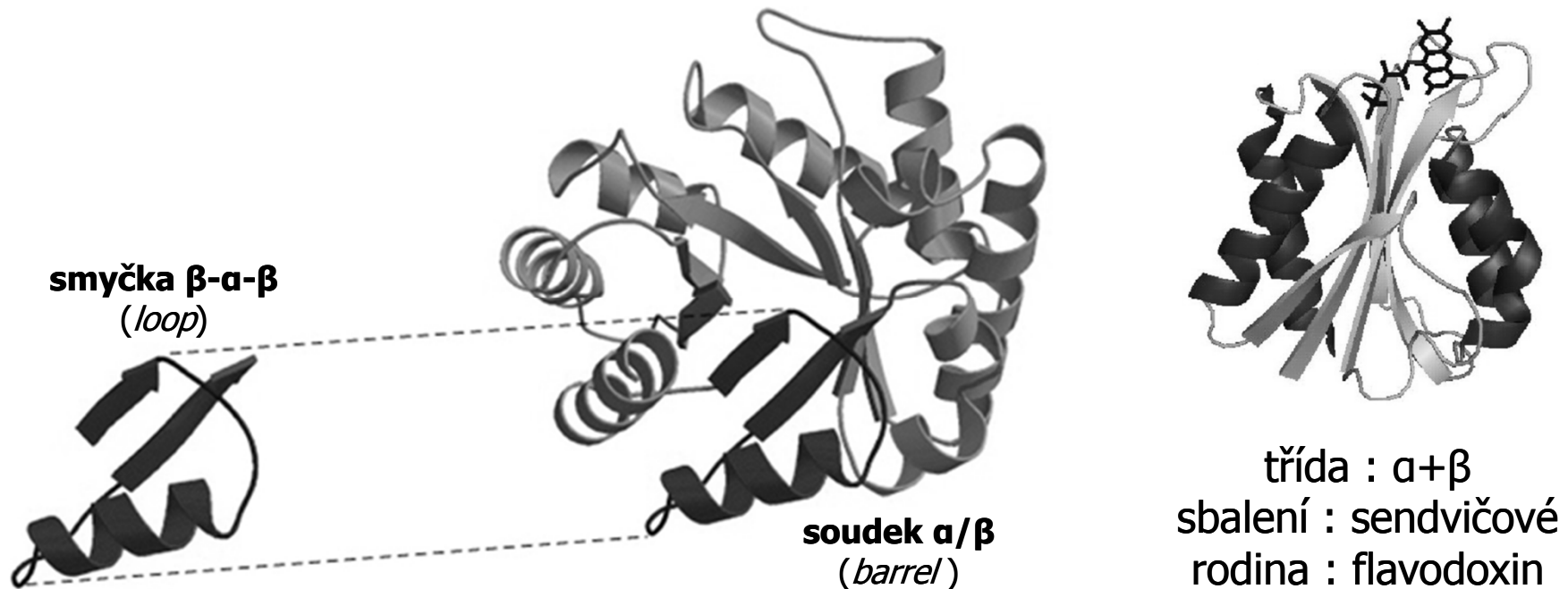
## holoenzym

- : různé fce podjednotek

**kvartérní struktura**  
VS  
**proteinový komplex**

## strukturní motiv a proteinová doména

- : specifická strukturní podjednotka
- : usouvztažnění struktury a funkce
  - :: doména je funkční podjednotka
- : topologie proteinu
  - :: celkový tvar a napojení domén; rodiny a nadrodiny (fylogenetické)



## neribozomální peptidy

- : bakterie, houby a nahožábří
- : syntéza nezávislá na mRNA
  - :: cyklické, větvené
  - :: neproteinogenní AK
  - :: časté PTM
    - ::: N-metylace, N-formylace, glykosylace, acylace, halogenace nebo hydroxylace
    - :::: dehydratace serinu na dehydroalanin
    - ::: cyklizace
      - :::: oxazoliny a thiazoliny
- : často dimery a trimery identických sekvencí
  - :: lineární, cyklické, větvené
- : toxiny (antibiotika), siderofory nebo pigmenty

## **neribozomální peptidové syntetázy (NRPS)** (*nonribosomal peptide synthetases*)

: patrně odvozeno od syntézy polyketidů a mastných kyselin

: několik domén

:: **A** – aktivační (adenylace)

:: **PCP** – peptidový přenašeč

:: **C** – kondenzační, bývá jich až několik (C1, C2, C3...)

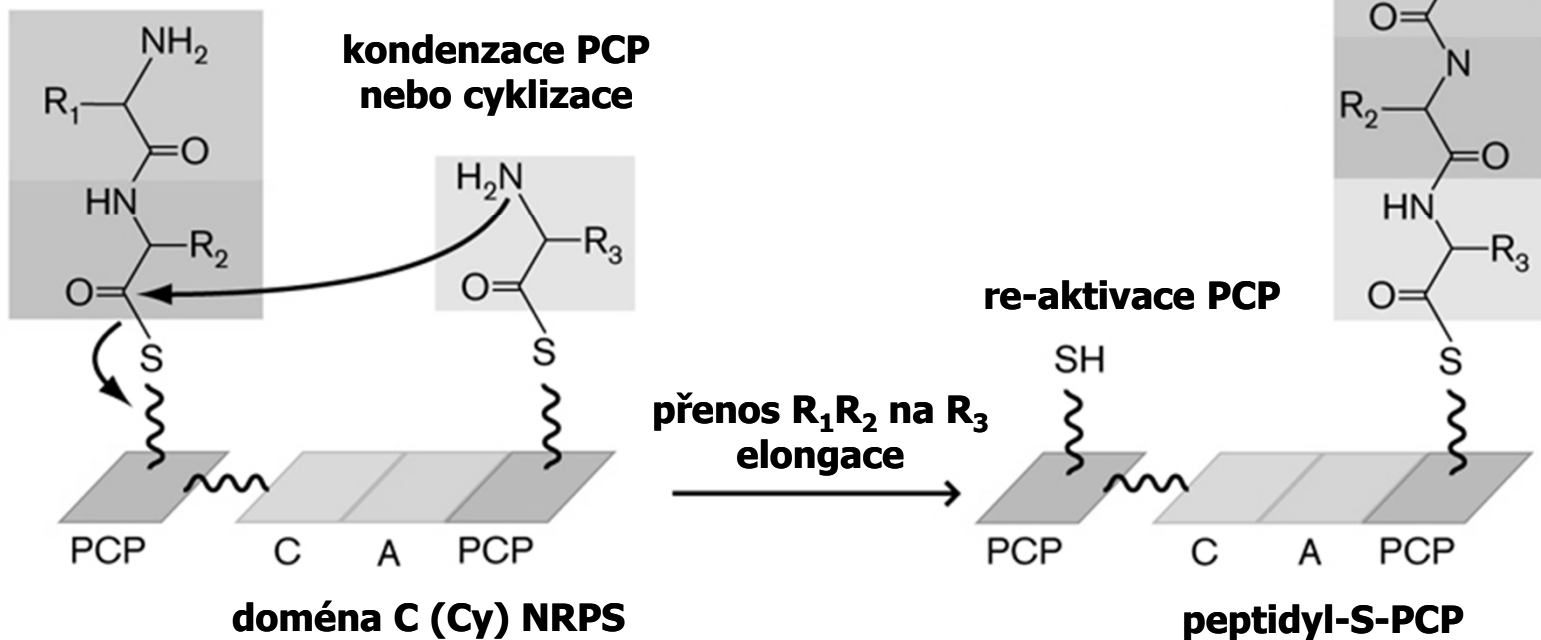
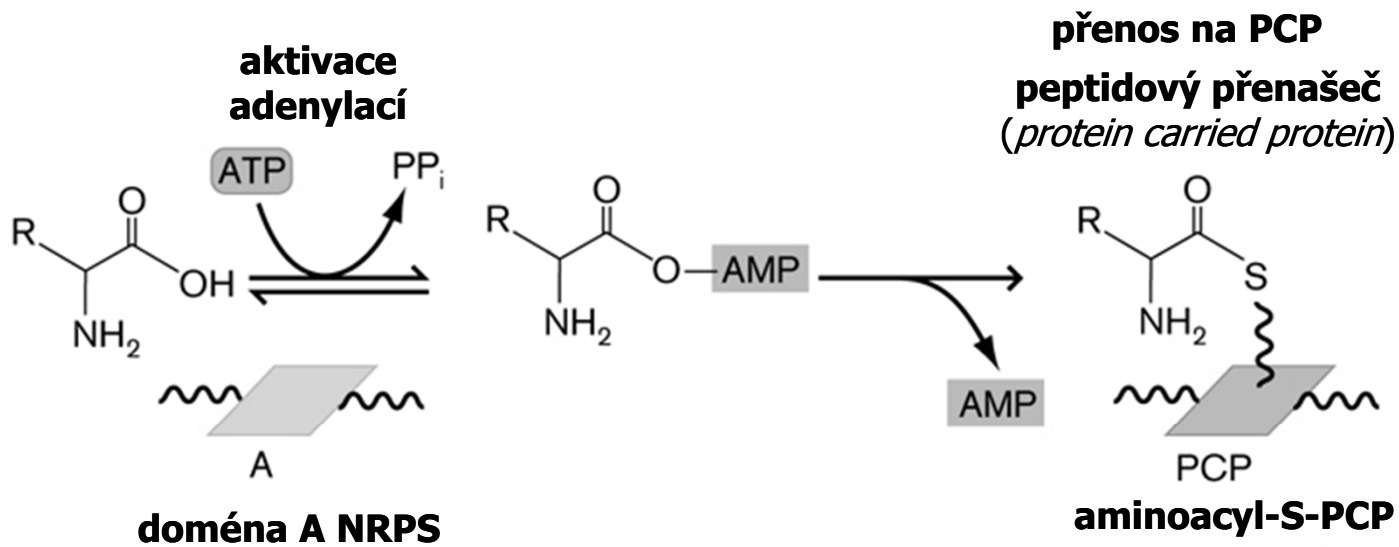
:: **Cy** – cyklizační (často namísto domény C)

:: **E** – epimerace na D-formy

:: **R** – redukce terminálního thioesteru na aldehyd nebo alkohol

:: **TE** – thioesterová terminační doména





# posttranslační modifikace (PTM) proteinů

- : chemická modifikace aminokyseliny
  - :: změna bočního řetězce nebo jeho derivatizace
    - ::: deaminace Gln, racemizace Pro, hydroxylace Phe
- : modifikace primární sekvence protoproteinu
  - ::: aktivace (*trimming*)
  - ::: sestřih (*splicing*)

## : význam PTM

- :: zacílení (lipoproteiny)
- :: stabilita (glykoproteiny)
- :: funkce (fosfoproteiny)
- :: řízení aktivity (kaspázy)



## chemická modifikace aminokyseliny

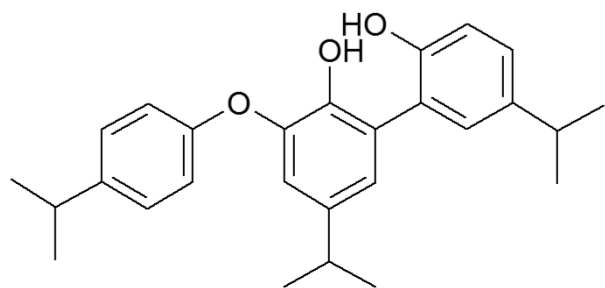
: velké množství (> 200)

: nese funkci, ale nemusí (oxidace Met, Trp)

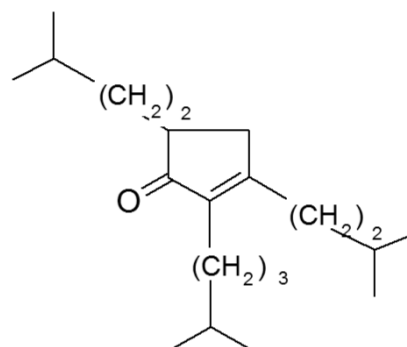
## zesíťování (*cross-linking*)

: vznik můstků (S-S)

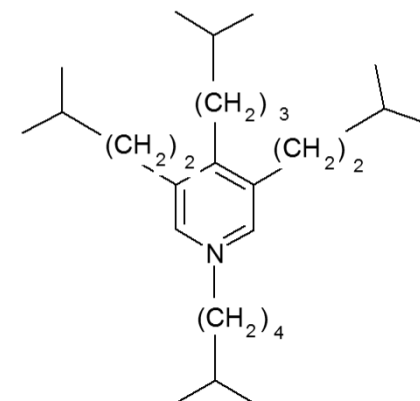
: stabilní funkce



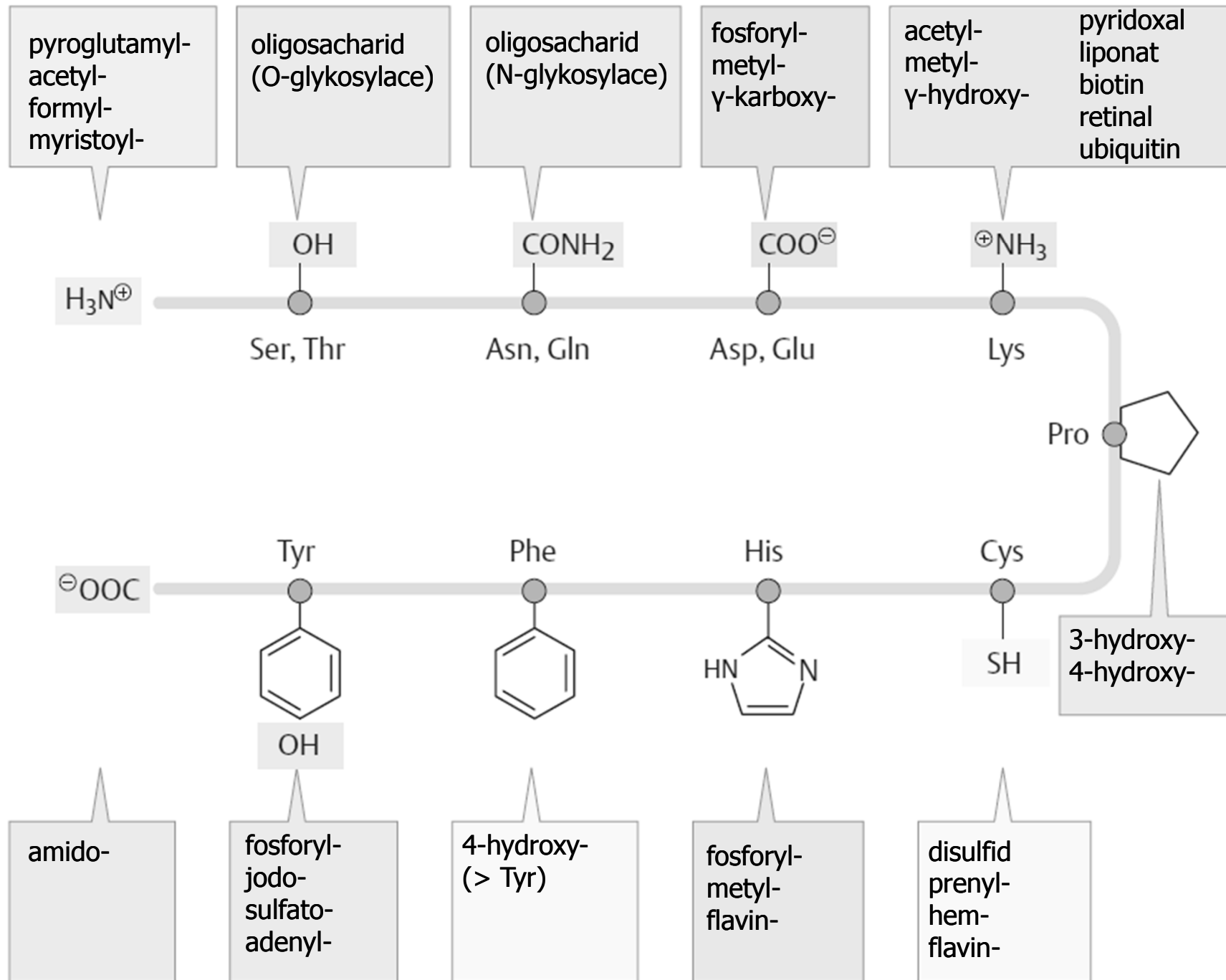
4x Tyr  
pulcherosin



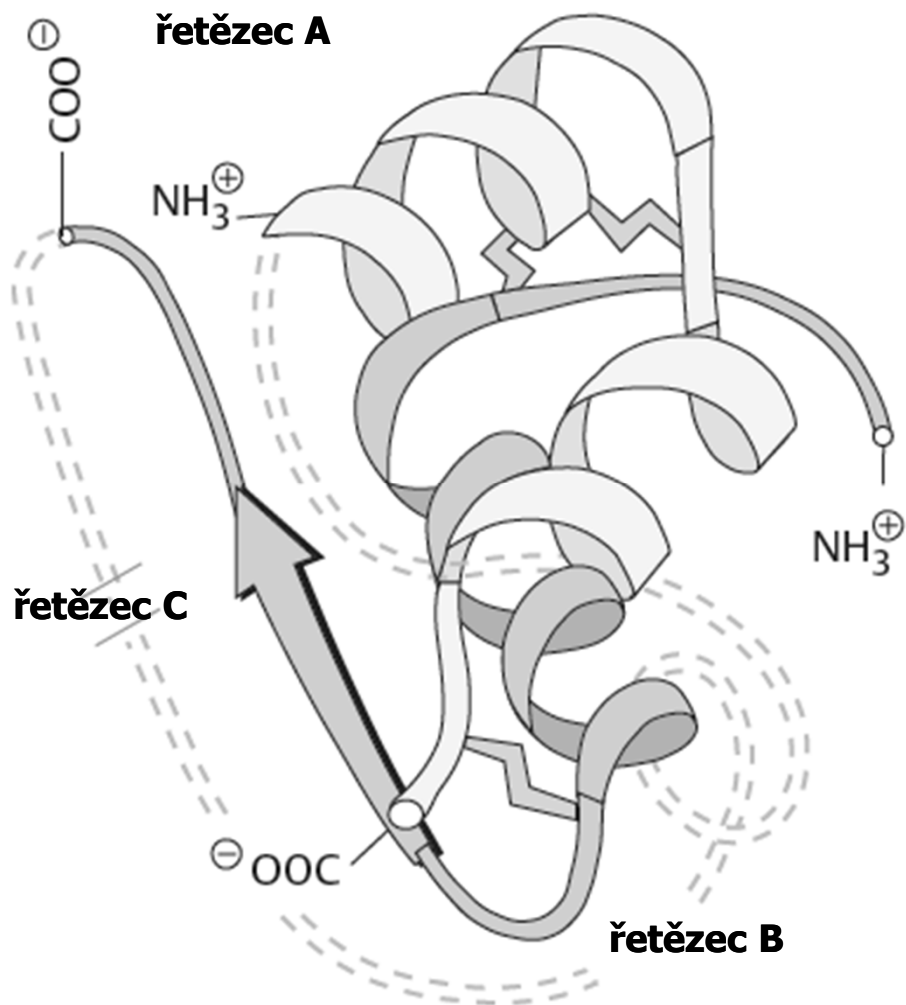
3x Lys  
kolagen



4x Lys  
elastin



# aktivace protoproteinů

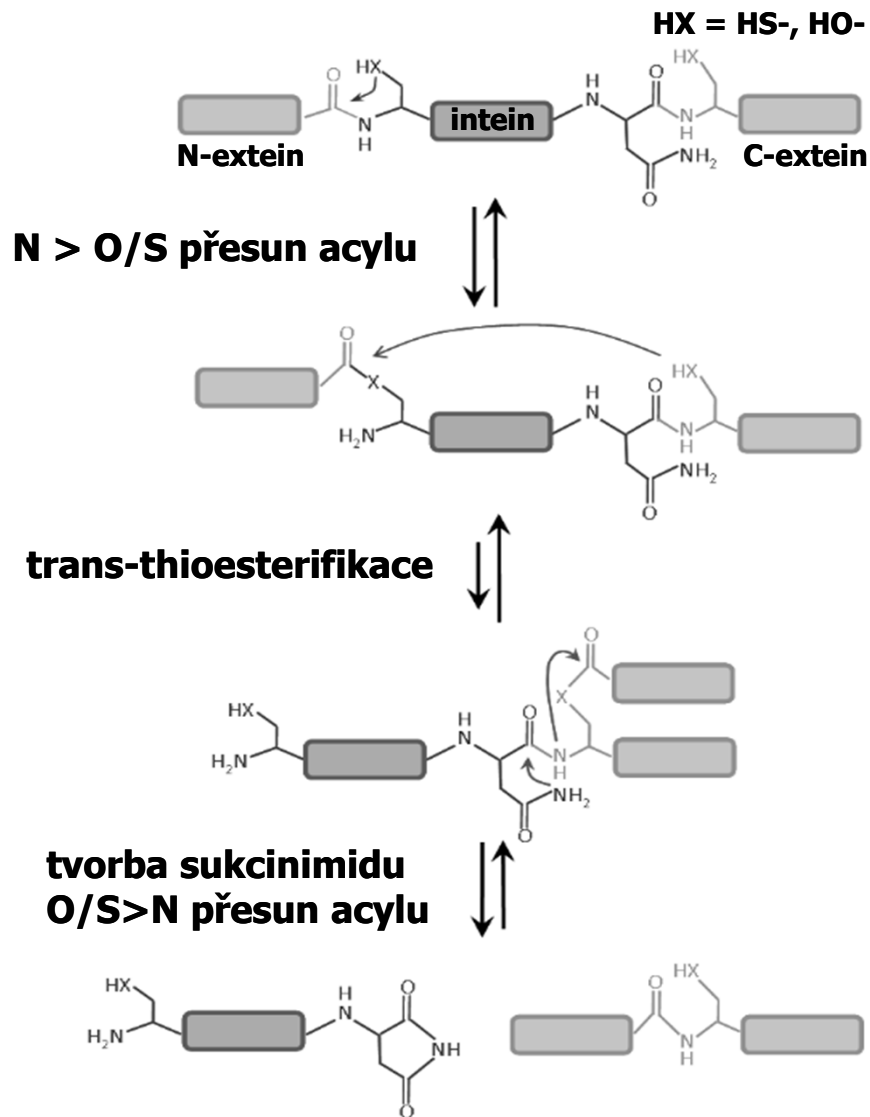


: odstranění signálních pep.  
: odstranění nefunkčních č.

preproenzym >  
proenzym >  
enzym

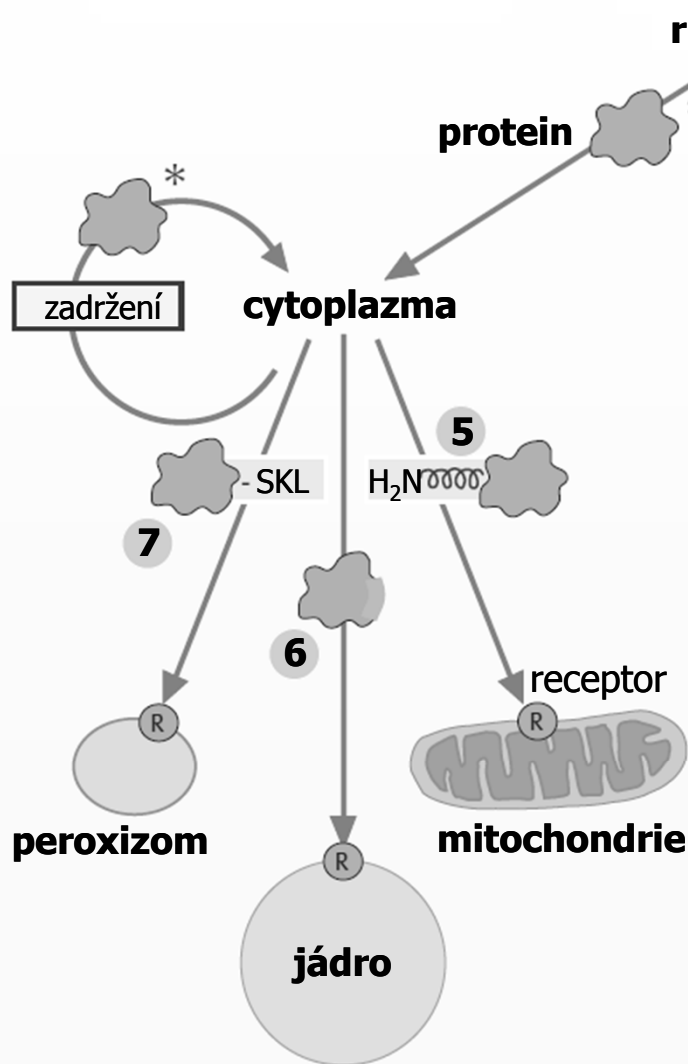
# proteinový sestřih

: podobné jako u RNA (pre-RNA > mRNA)

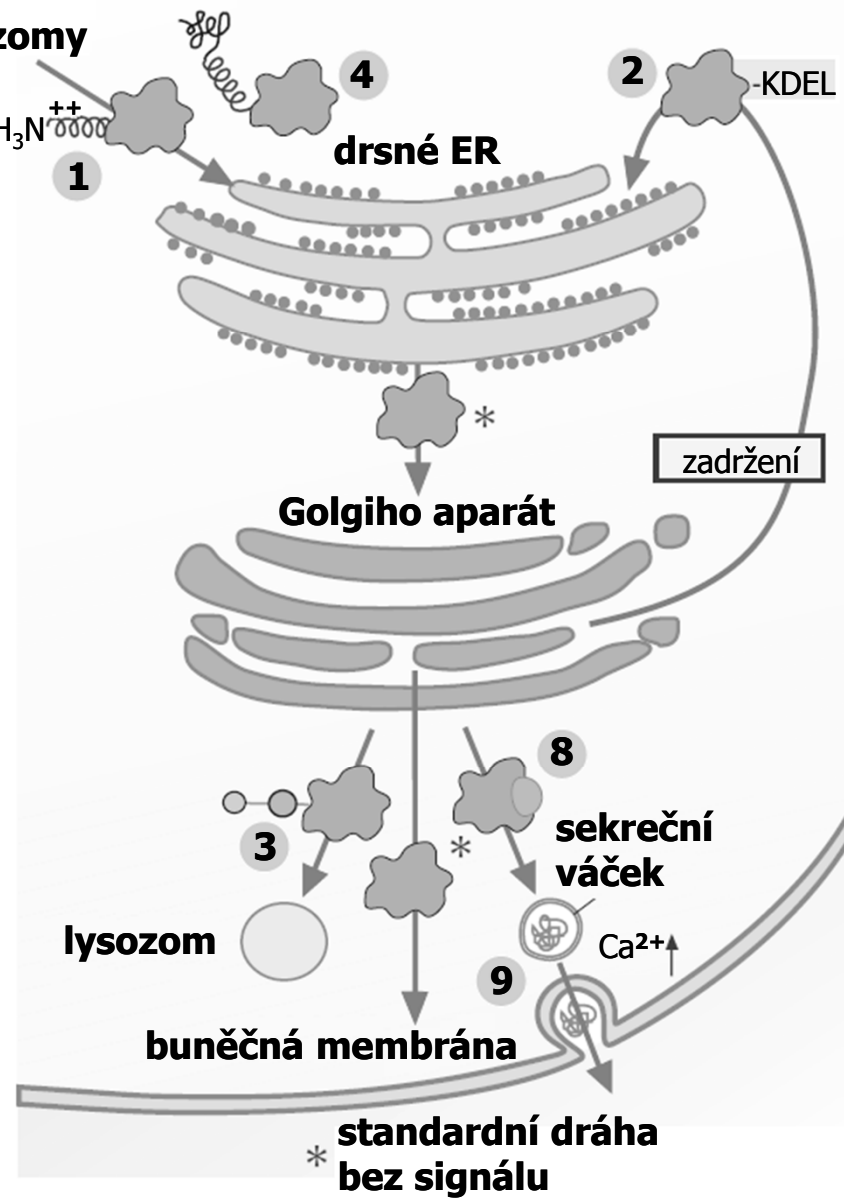


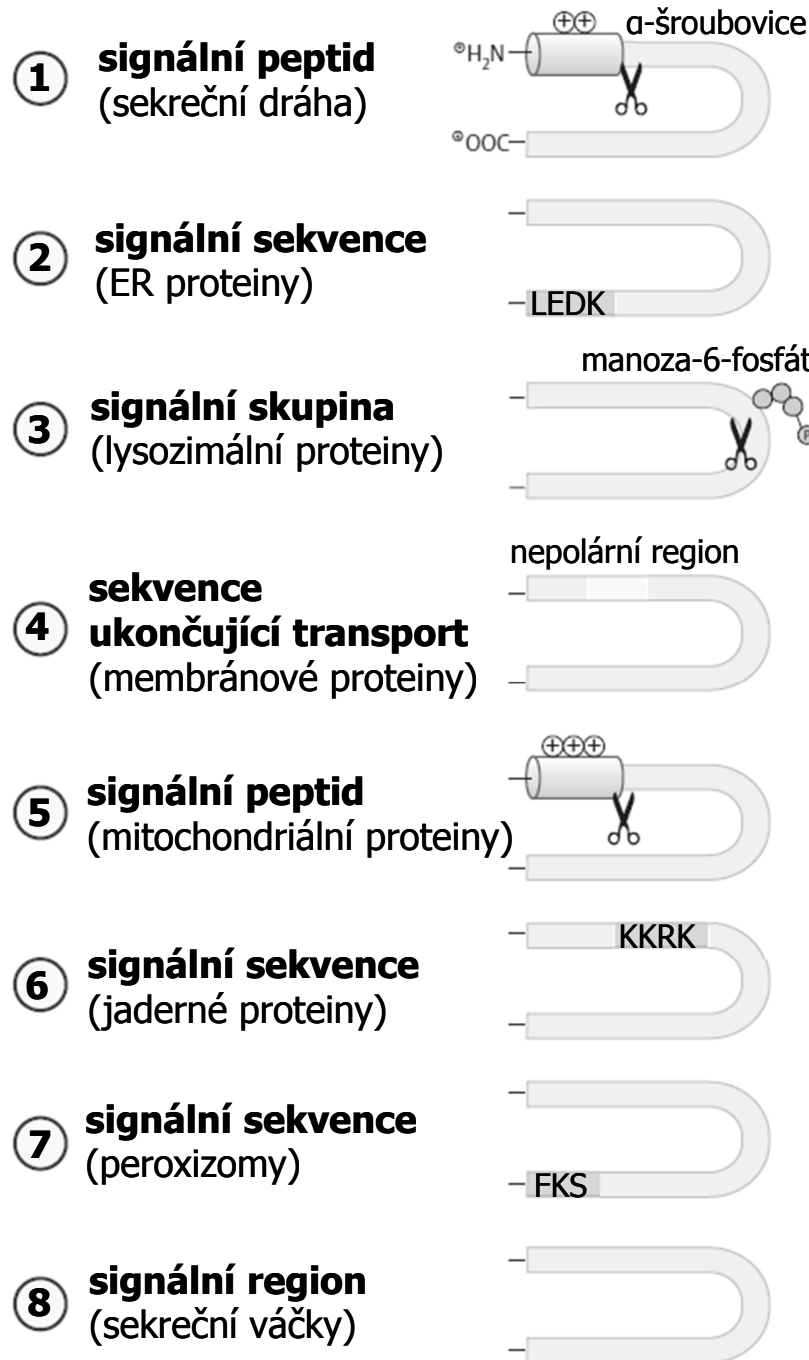
# transport a lokalizace proteinů

## cytoplazmatická dráha



## sekreční dráha





## signální peptid

: krátké peptidy

: N-, C-konec

: intrastrukturní (sign. sekvence)

## signální region

: souhra různých strukt. motivů

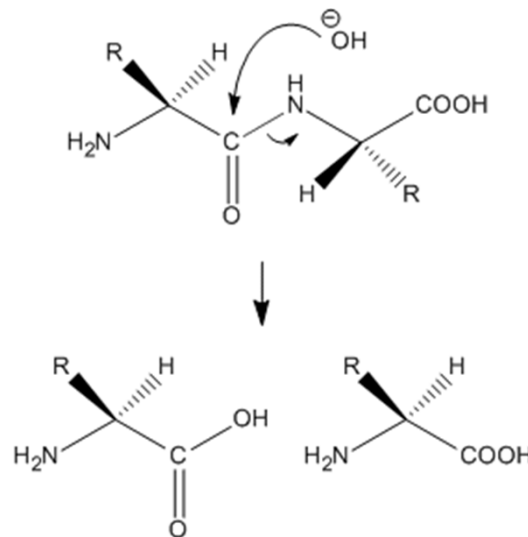
: jsou rozpoznávány receptory

: využití transferových proteinů

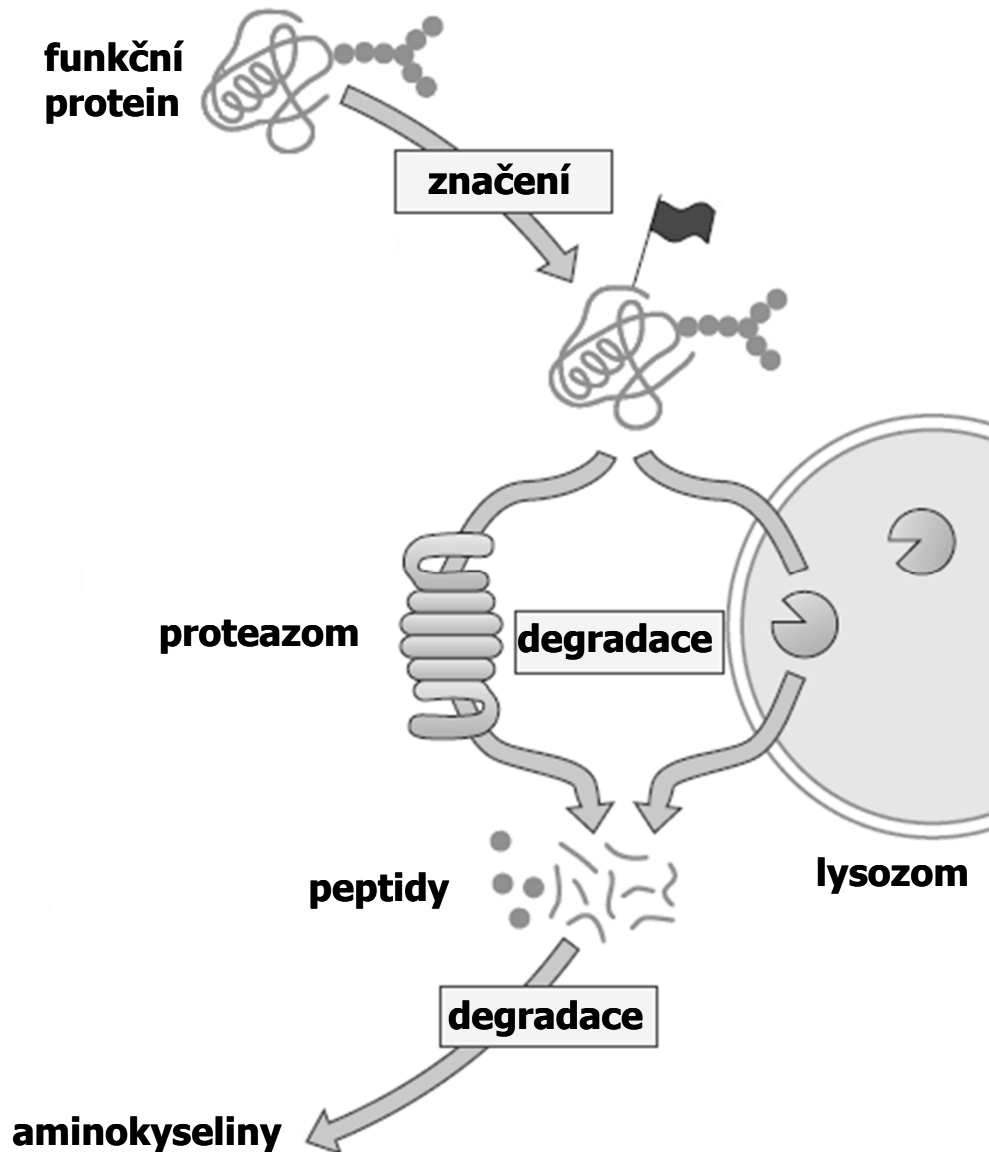
# zánik proteinů

## zánik peptidové vazby

- : proteázy (proteolytické enzymy)
  - :: vznikají proteolytické peptidy
- : peptidázy (karboxy-, amino-, dipeptidázy )
  - :: di- a tripeptidy a dále AK
- : přenos energie *in vitro*
  - :: srážka ( $N_2$ , He, Ar), záření (foton,  $e^-$ )



# metabolismus proteinů



: **dusíková bilance**

:: rovnováha

:: 300 – 400 g denně

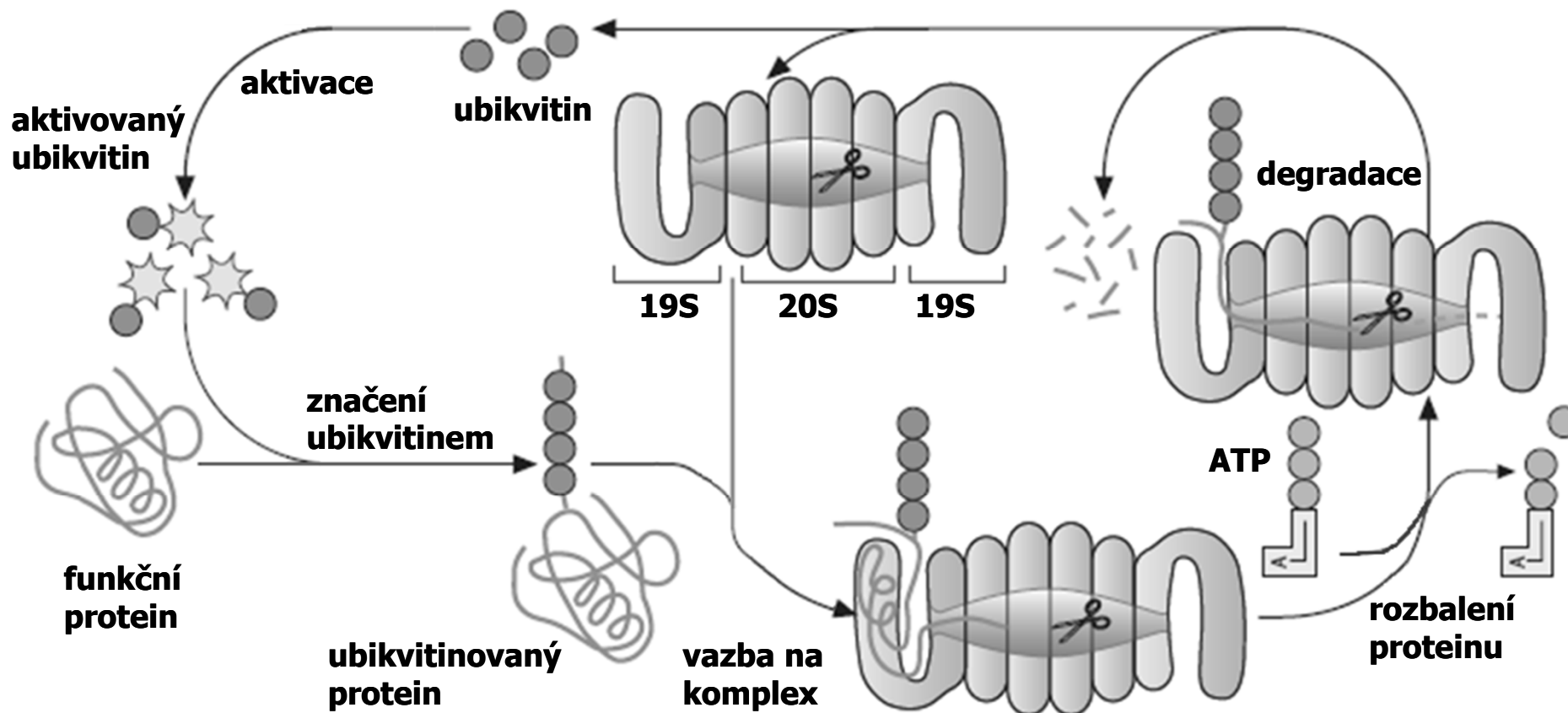
: **lysozom**

:: *cca* 40 hydroláz

:: proteázy



# funkce proteazomu

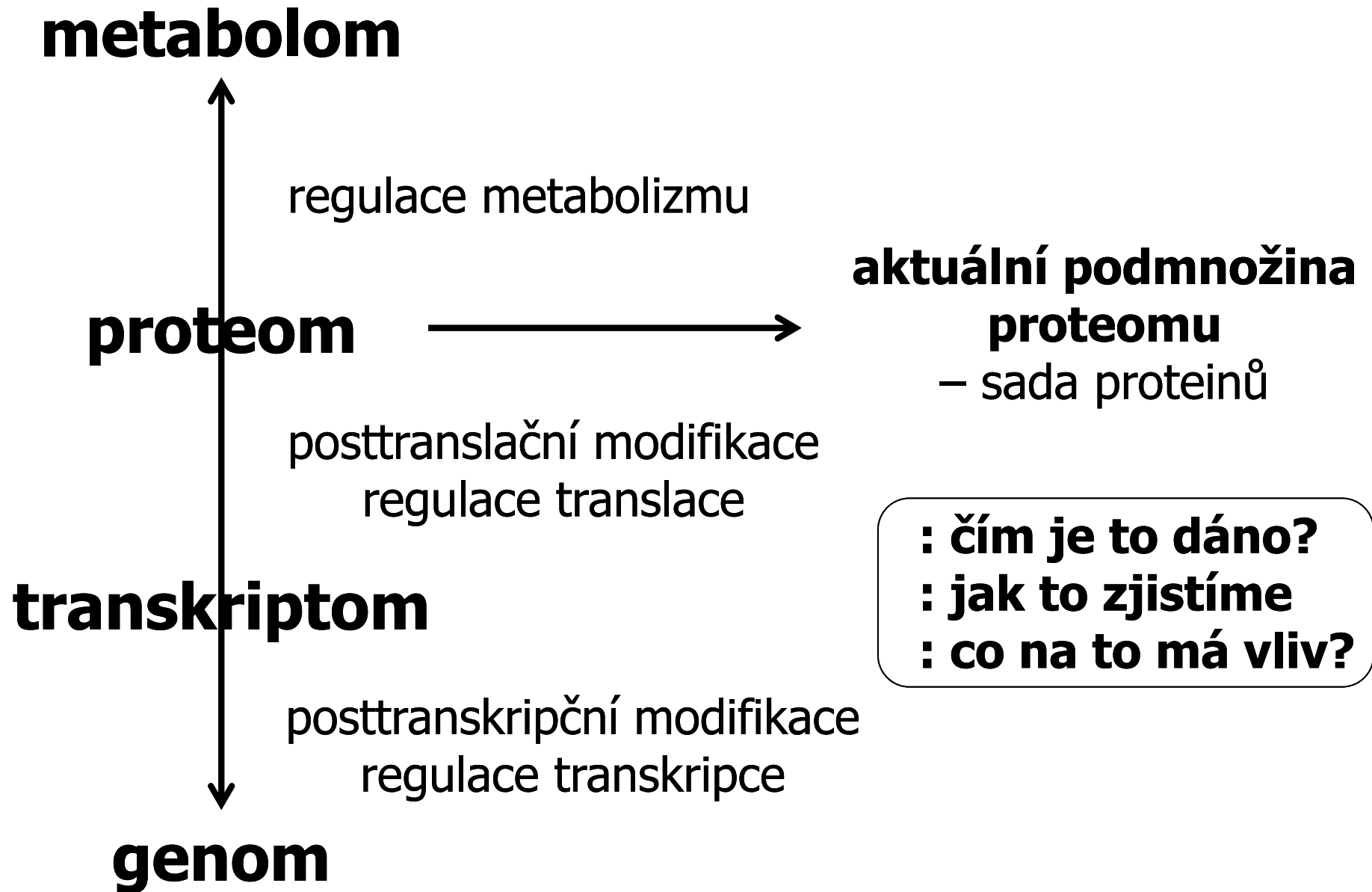


### III.

# expresní a diferenční proteomika praktické základy

## exprese proteinů a rozdíly v ní

- : aktuální podmnožina proteomu definuje děje v živém systému
  - :: **jaké proteiny** se aktuálně v systému vyskytují?
  - :: **kolik** jich tam je?
  - :: **kde** jsou?
  - :: **v jaké formě** tam jsou?
    - ::: volné, vázané v proteinových komplexech
    - ::: strukturní, signální, zásobní, enzymy...
  - :: a **proč?**
- : rozdíly v dějích v různých stavech živého systému
  - :: **podmnožiny** proteomu **různých stavů** a jejich **průnik**



**hypotéza**  
(biologický problém)

opakovatelný jev vs. šum  
předpoklad  
testování předpokladu  
(**odpovídající empirická studie**)  
instrumentální data  
model

reformulování modelu  
(**nové** poznatky)

testování modelu  
(**odpovídající empirická studie**)  
instrumentální data

**analýza**  
**interpretace**  
**syntéza**  
a možná **objev** 😊

**falzifikace**

**justifikace**  
(model biologického systému)

## **základní charakteristika bioanalytů**

- : geny (genom)
- : mRNA (transkriptom)
- : **proteiny (proteom)**
- : nízkomolekulární látky (metabolom)
  
- : **velmi široká škála** fyzikálně-chemických vlastností
- : jsou jich řádově **desítky tisíc druhů** v jednom organizmu
- : jsou **velmi dynamické**
- : **metody** jsou **stále ve vývoji** a metodika **není triviální**

# identita proteinu

**: čím je dána identita proteinu?**

**primární sekvence proteinu**

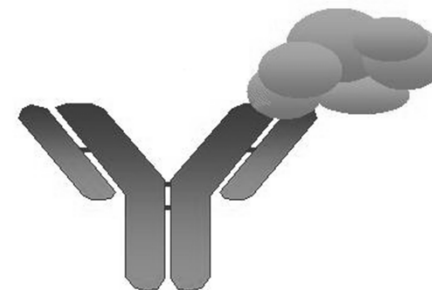
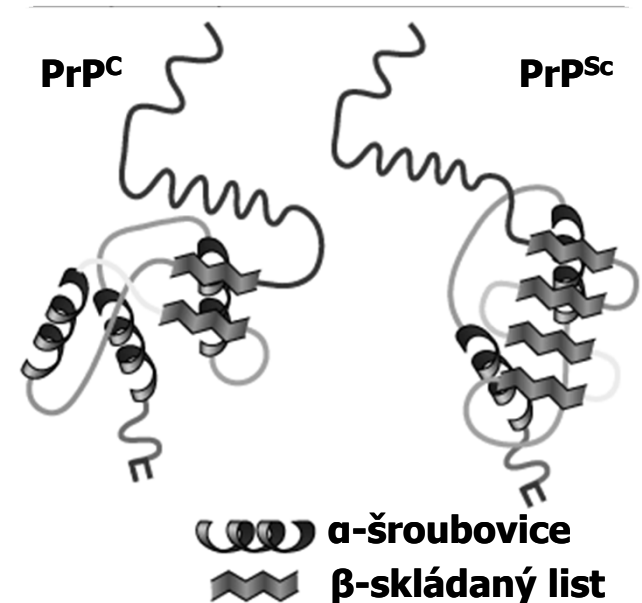
- : alternativní sbalení (priony)
- : posttranslační modifikace

**terciární sekvence proteinu**

- : kvartérní struktura

**unikátní funkce proteinu**

- : enzymová reakce
- : interakce s jinou molekulou



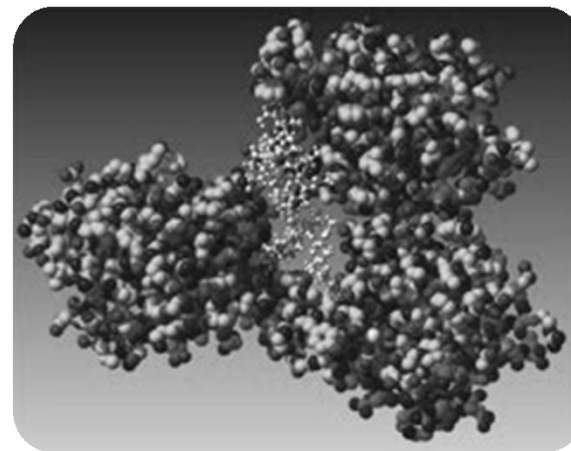
## : jak můžeme zjistit identitu proteinu?

### **specificita**

- : bud' vydělíme protein ze směsi jiných proteinů
- : nebo to jde i ve směsi (specifická interakce)
- :: kontaminace

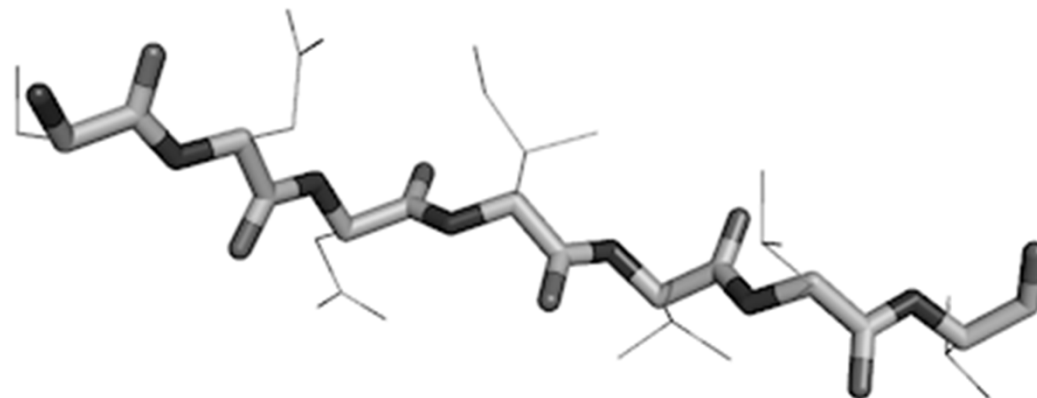
### **separace**

- : už ta závisí na individuálních vlastnostech proteinu
- :: není ale často dostatečně specifická
- : náboj, polarita, molekulová hmotnost/velikost
- : specifické interakce



## primární sekvence

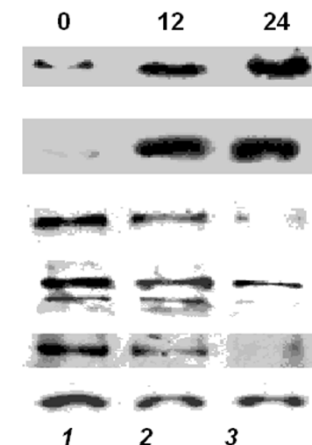
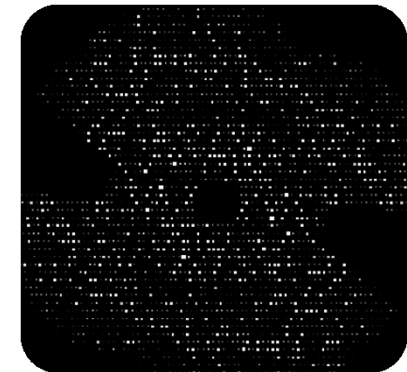
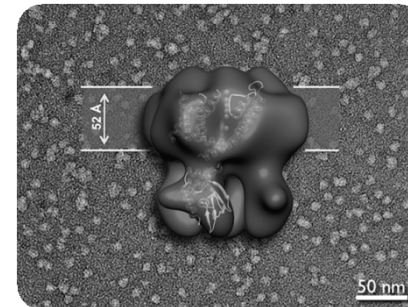
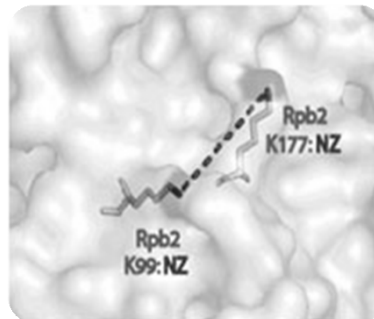
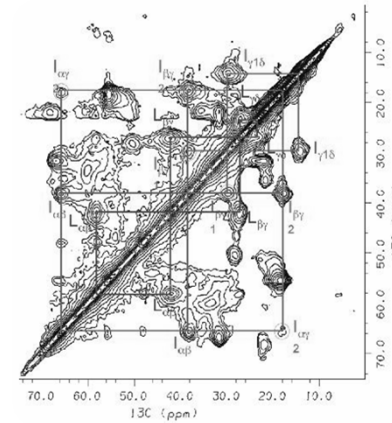
- : určení pořadí aminokyselin
- :: postupné odbourávání
  - ::: enzymaticky (exoproteolýza)
  - ::: chemicky (terminální degradace)
  - ::: fyzikálně-chemicky (štěpení peptidové vazby)
- :: hmotnostně-kombinatoricky
  - ::: peptidové mapování/peptidová signatura
- :: fyzikálně
  - ::: změna odporu při průchodu řetězce nanopórem





## terciární sekvence

- : určení 3D struktury
- :: lokalizace jader/atomů
- ::: jaderný spin
- ::: difrakce záření (X) na atomech
- ::: kryo-elektronová mikroskopie
  
- :: topologická analýza
- ::: vzdálenosti aminokyselin



## unikátní funkce proteinu

- : detekce unikátního produktu enzymové reakce
- : detekce vzniku unikátního komplexu

# : co má vliv na identitu/přítomnost proteinu?

## genomické vlivy

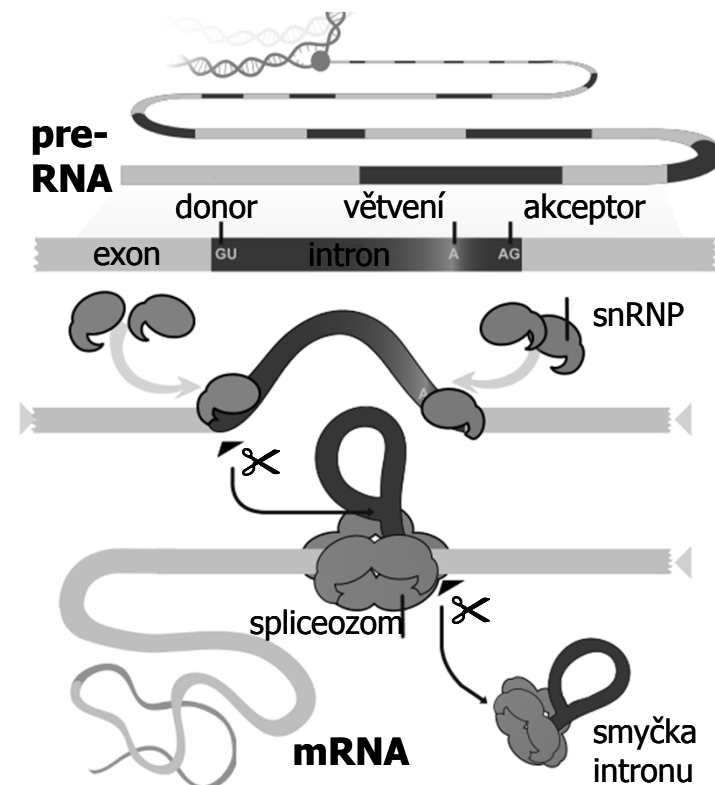
- : zápis genu
- :: mutace
- : převedení genetické informace
- :: chyba v transkripci
- :: chyba v translaci

## proteomické vlivy

- : úpravy proteinu
- :: náhodné či nežádoucí modifikace AK
- :: náhodná či nežádoucí proteolýza

## metodicko-analytické vlivy

- : chyby v přípravě či analýze vzorku



## forma proteinu

: čím je dána forma proteinu?

### struktura

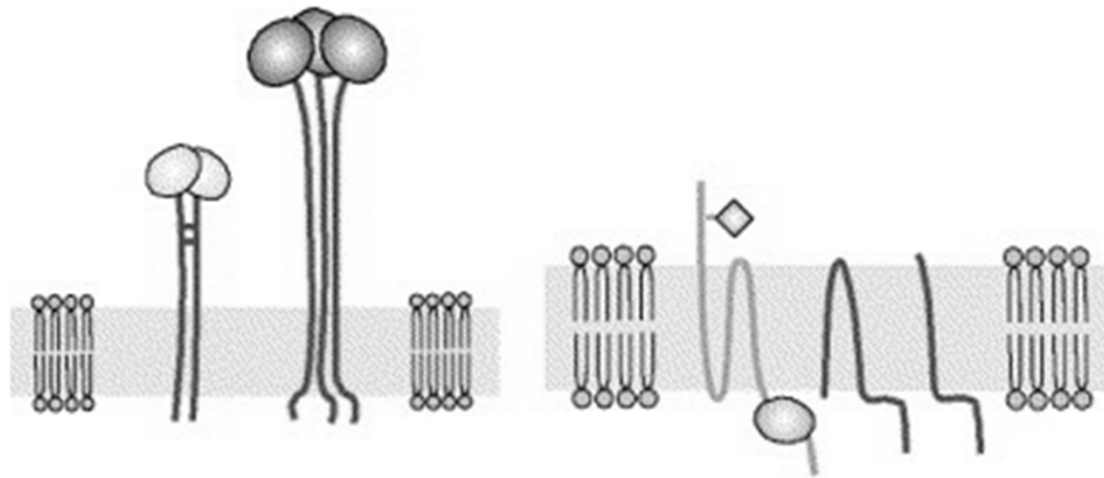
: definuje funkci a interakce

:: volný

:: vázaný – kvartérní struktura, proteinový komplex

### lokalizace

: definuje funkci



## : jak můžeme zjistit formu proteinu?

### složení

- : separace a eventuální denaturace
- :: molekulová hmotnost, tvar...

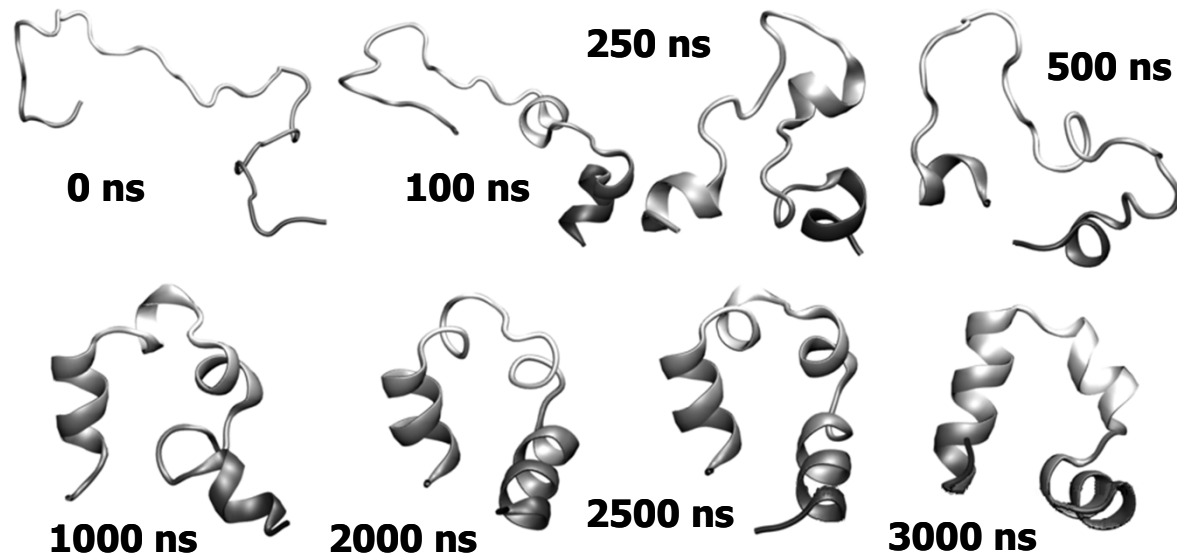
### interakční partneři

- : stabilní ko-lokalizace

## separace na úrovni b. kompartmentů

## : co má vliv na formu proteinu?

### struktura



### : čím je dáno množství proteinu?

#### **fyzický počet kopií proteinu**

: intracelulární

:: různé formy

::: volný

::: proteinové komplexy

::: jiné supramolekulární struktury

:::: jádro, b. membrány, b. organely

: extracelulární

:: ve mnohobuněčných organizmech v mezibuněčném prostoru

::: exoproteom/sekretom

**: jak můžeme zjistit obsah proteinu?**

**specificita  
separace**

**primární sekvence + další informace**

- : množství AK
  - :: absorbance, fluorescence
- : množství specifických peptidů
  - :: iontočet

**terciární sekvence + další informace**

- : specifická interakce
  - :: interaktant s vhodnými analytickými vlastnostmi
    - ::: absorbance, fluorescence, scintilace, enzymová aktivita
- : nespecifická interakce

## **: co má vliv na obsah proteinu?**

### **genomické vlivy**

: transkripční aktivace

:: promotor či zesilovač (*enhancer*), transkripční aktivátor

: transkripční umlčování

:: epigenetika (vtištění, metylace DNA, histonový kód...)

:: dsRNA/střihač (*dicer*)-siRNA-komplex RISC, miRNA...

### **proteomické vlivy**

: metabolismus (katabolizmus)

:: předčasné odstranění

:: dislokalizace

### **metodicko-analytické vlivy**

: chyby v přípravě či analýze vzorku

**... a jejich rozdíly**

**: jak můžeme zjistit rozdíl obsah proteinu?**

**:: relativní rozdíl**

**:: absolutní rozdíl**

**relativní vs. absolutní rozdíl**

**: jen poměr signálů odpovídajících obsahu**

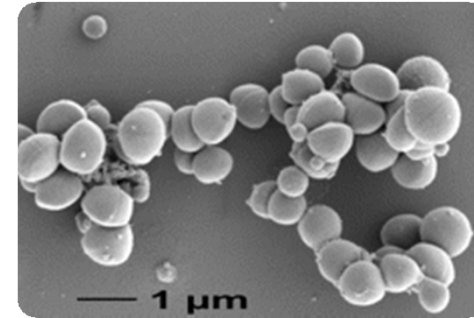
**:: dva srovnávané stavy vs. třetí stav – standard**





## praktický příklad studie expresní proteomiky

### : stanovení obsahu stafylokokového enterotoxinu H v potravinách



#### ***Staphylococcus aureus***

- : enterotoxiny A – V (SE, *staphylococcal enterotoxin*)
- :: exoproteom/sekretom *S. aurea*
- :: spolu s proteázami a dalšími proteiny (*cca* 150; 58 stálých)
- :: obsah SEH *cca* 0.4 – 12.0 nM,  $M_r = 25\ 210$ , pI = 5.65

#### **stafylokoková enterotoxikóza** (SFP – *staphylococcal food poisoning*)

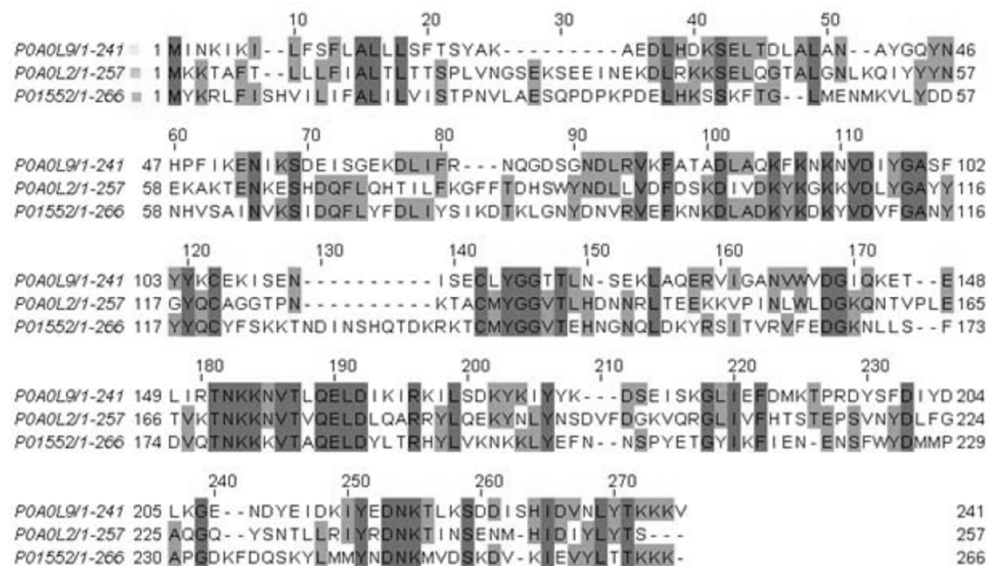
- : enterotoxiny – superantigeny
- :: aktivace imunitního systému > jeho selhání
- :: jen malé množství stačí na vyvolání reakce ( $\sim \mu\text{g}$ )

## výskyt SEH v potravinách

- : masné výrobky
- : mléčné výrobky
- : cukrářské výrobky



- : původně pouze v surovinách
- :: termostabilní, odolný vůči proteázám i změnám pH
- :: původce odstraněn, toxin zůstává



## srovnání s jinými SE

- : menší obsah
- : srovnatelná toxicita
- : vysoká sekvenční homologie až 50 % (SEB, SEA, SEK)

# plán vědecké studie v oblasti expresní proteomiky

*S. aureus* v potravinách produkuje SEH

- : identifikace
- : kvantifikace

## **vývoj metody**

- : kmen *S. aureus* s genem *seh*
  - :: genomické ověření
- : podmínky kultivace
  - :: optimální pro produkci SEH
- : nalezení SEH a jeho stanovení

opakovatelný jev vs. šum  
předpoklad  
testování předpokladu  
(odpovídající empirická studie)  
instrumentální data  
model

## **aplikace metody**

- : nalezení a stanovení SEH ve vzorku potravin
- : nalezení podmínek jeho produkce a toxicity

## provedení studie

### kmen *S. aureus* s genem *seh*

- : potvrzení pomocí PCR
- : i jiné metody (přenos podle Southerna)
- :: můžeme a máme je využít?

### podmínky kultivace

- : hledání média
- :: fyziologický roztok, mozkosrdcová infúze
- : optimální podmínky
- :: teplota, obsah živin, doba kultivace
- : první stádium přípravy vzorku
- :: odstranění buněk *S. aurea*
- ::: nespecifické ztráty při centrifugaci



## **druhé stádium přípravy vzorku**

- : separace SEH
- :: obohacení, frakcionace, purifikace?

### **pro**

- : zjednodušení vzorku
- : zvýšení citlivosti
- : zvýšení specifity

### **separovat!**

- : stojí za to to zkusit
- :: metodické výhody převažují
- : principiálně bezproblémové

**separovat nebo neseparovat?  
to je, oč tu běží!**

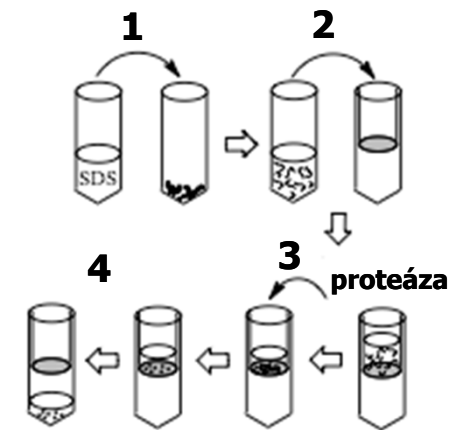


### **proti**

- : ztráty
- :: další manipulace
- ::: kumulování chyb
- :: nedokonalá separace
- :: nespecifické ztráty
- : náročnost
- :: peníze a čas

## separujeme proteiny/peptidy

- : moderovaná hydrofobicita
  - :: potlačení hydrofilních a coulombických interakcí
  - ::: iontově párovací chromatografie na obrácené fázi
- : náboj proteinu
  - :: elektromigrační metody (CZE, IEF)
  - :: iontová chromatografie
- : velikost/tvar molekuly
  - :: potlačení jiných vlastností
  - ::: denaturační gelová elektroforéza
  - :: síťový efekt (FASP)
  - :: specifické interakce
  - ::: imunoanalýza



### > FASP

ostatní metody

- : žádná separace
- :: artefakty (IEF)
- : nízká výtěžnost
- :: nespecifické ztráty

## **detekce SEH**

- : primární a sekundární sekvence
  - :: UV-Vis detekce (IP-RPLC)
  - :: tandemová hmotnostní spektrometrie (IEF, IP-RPLC, SDS-PAGE, 2D-PAGE)
- : terciární sekvence
  - :: imunoanalýza (SDS-PAGE)

## **stanovení SEH**

- : primární sekvence
    - :: SIL + hmotnostní spektrometrie ( $^{18}\text{O}$ , GIST, ICPL)
      - ::: nereprodukovatelné < nespecifické procesy ve FASP
  - : terciární sekvence
    - :: imunoanalýza (imunoblot)
- > konečná ☹**

## **výsledky studie**

### **detekce SEH v modelovém vzorku**

: ano

### **stanovení SEH v modelovém vzorku**

: ne

### **> žádná aplikace v reálném vzorku**

: žádný model sekrece SEH v potravinách

: žádná metoda stanovení SEH v potravinách

### **metodické překážky**

: nereprodukovatelné stanovení SEH

:: velmi nízký obsah > zásadní vliv nespecifických ztrát

### **řešení?**

: jiná metoda separace (RPLC-OT MS)

: jiná metoda stanovení (???)



**existují sice obecné (expresně) proteomické postupy**

**: ale nejsou univerzální**

**:: nutnost hledat vždy přípatřičný postup**

