

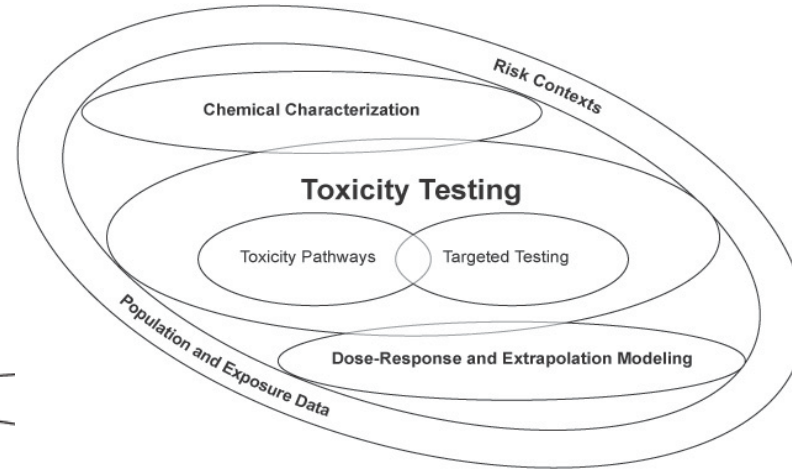
MUNI | RECETOX

# Moderní metody v (eko)toxikologii Omics

Klára Hilscherová

# Studium procesů probíhajících v živých organismech

US National Academy of Sciences (National Research Council, 2007)



## Toxicity Pathways

- Evaluation of perturbations in toxicity pathways rather than apical end points.
- Emphasis on high-throughput approaches using cells or cell lines, preferably of human origin.
- Use of medium-throughput assays of more integrated cellular responses.

## Targeted Testing

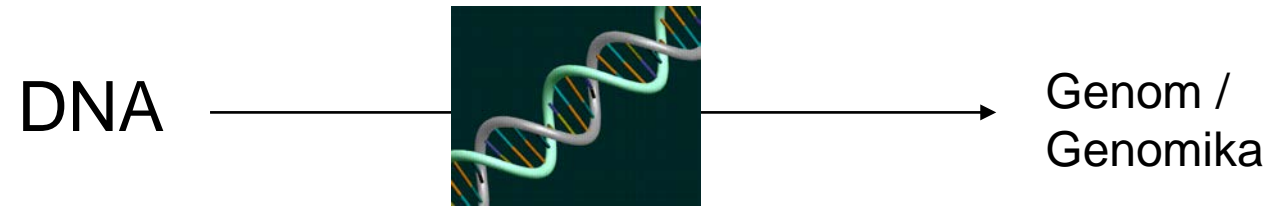
- Testing conducted to evaluate metabolites, assess target tissues, and develop understanding of affected cellular processes at genomics level.
- Limited types and duration of in vivo studies, focusing on up to 14-day exposures.
- More extensive testing for representative compounds in novel chemical classes.

Posun základního paradigmatu od sledování apikálních efektů u testovaných organismů ke studiu narušení fyziologických, biochemických a buněčných procesů

-> definování tzv. „**toxicity pathways**“

# Studium procesů probíhajících v živých organismech

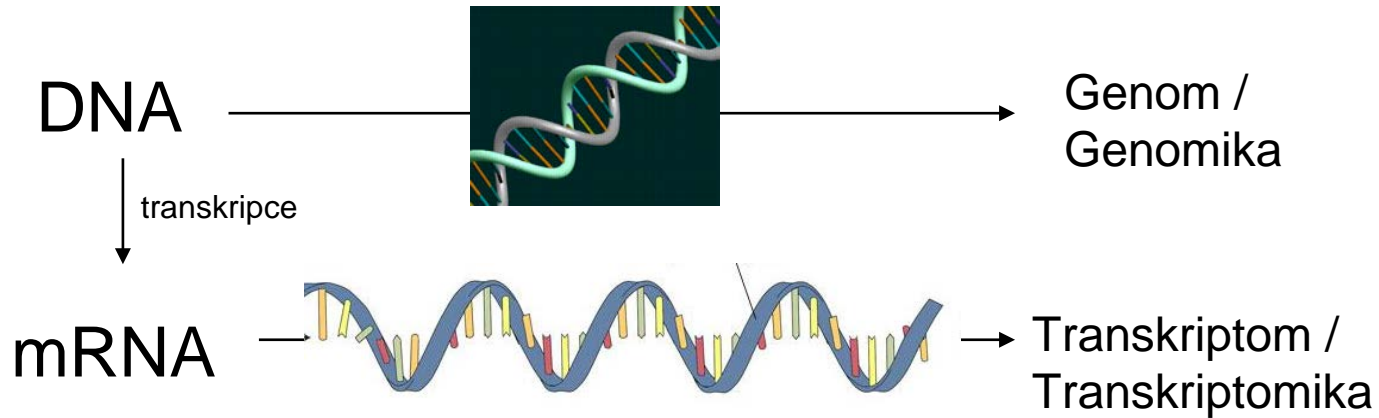
## - nové vědecké disciplíny



**Toxikogenomika** – objasňuje funkce genů a jak je celý genom zapojen v biologických procesech

# Studium procesů probíhajících v živých organismech

## - nové vědecké disciplíny

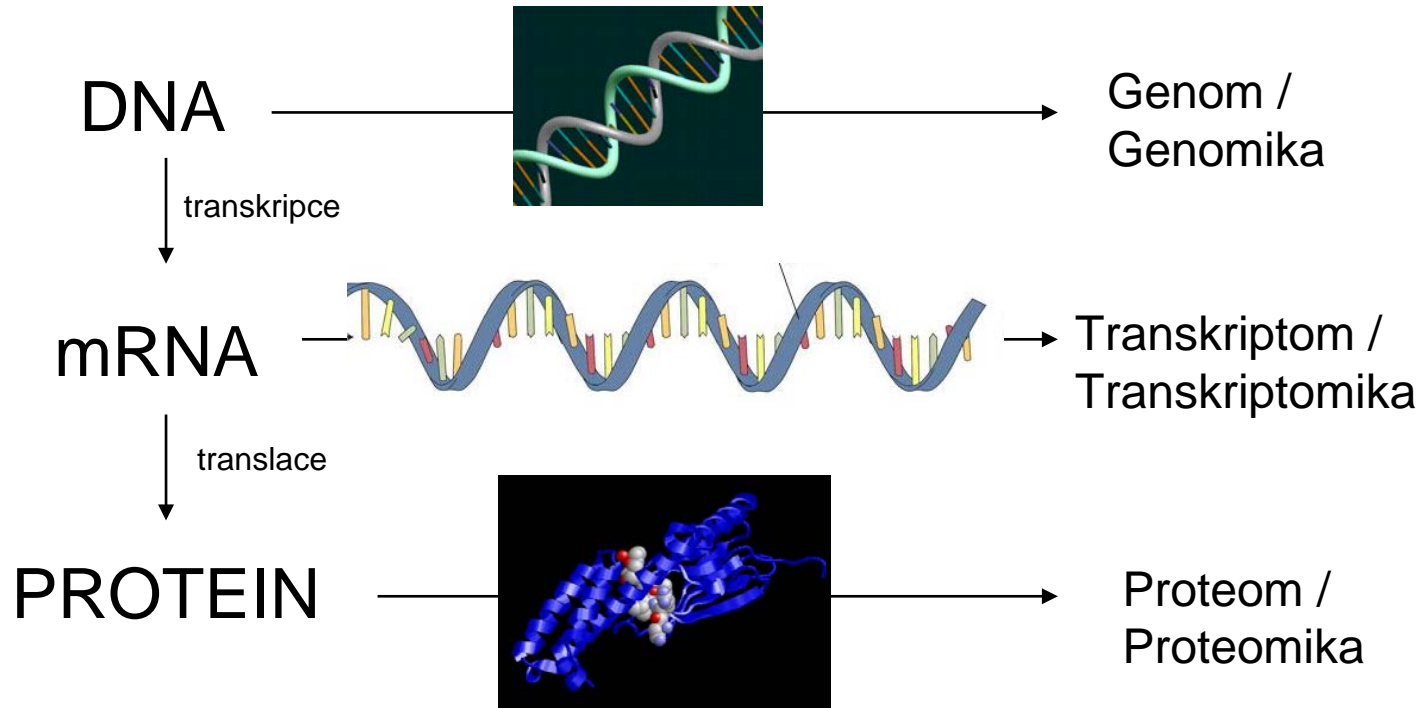


**Toxikogenomika** – objasňuje funkce genů a jak je celý genom zapojen v biologických procesech

**Transkriptomika** – sledování exprese populací genů - hledání rozdílů v genové expresi (za různých podmínek, v různých stádiích vývoje, v různých orgánech,...)

# Studium procesů probíhajících v živých organismech

## - nové vědecké disciplíny

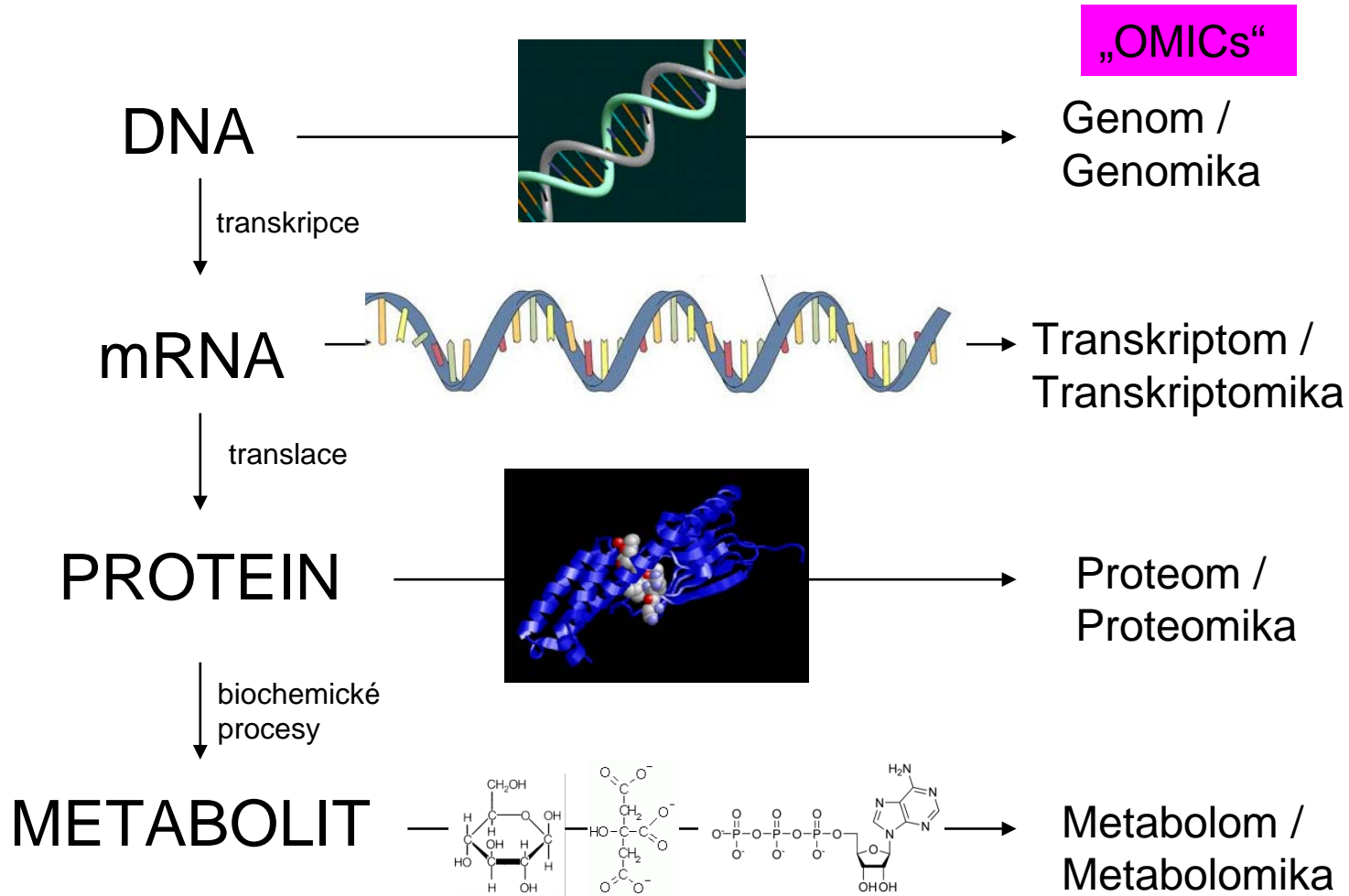


**Toxikogenomika** – objasňuje funkce genů a jak je celý genom zapojen v biologických procesech

**Transkriptomika** – sledování exprese populací genů - hledání rozdílů v genové expresi (za různých podmínek, v různých stádiích vývoje, v různých orgánech,...)

**Proteomika** - analýza proteinů organely, buňky, tkáně či extracelulárních tekutin

# Studium procesů probíhajících v živých organismech - nové vědecké přístupy/disciplíny



**Toxikogenomika** – objasňuje funkce genů a jak je celý genom zapojen v biologických procesech

**Transkriptomika** – sledování exprese populací genů - hledání rozdílů v genové expresi (za různých podmínek, v různých stádiích vývoje, v různých orgánech,...)

**Proteomika** - analýza proteinů organely, buňky, tkáně či extracelulárních tekutin

**Metabolomika** - identifikace a kvantifikace metabolitů v daném organismu nebo v buňce.

**Komplexní (necílené) x cílené přístupy  
= targeted x nontargeted analyses**



# OMICs v eko/toxikologii – sledování reakcí organismu při různé expozici

**Toxikogenomika** – objasňuje, jak je celý genom zapojen v biologických odpovědích organismů na stresory

**Transkriptomika** – sledování exprese populací genů - hledání rozdílů v genové expresi, ovlivněných genů

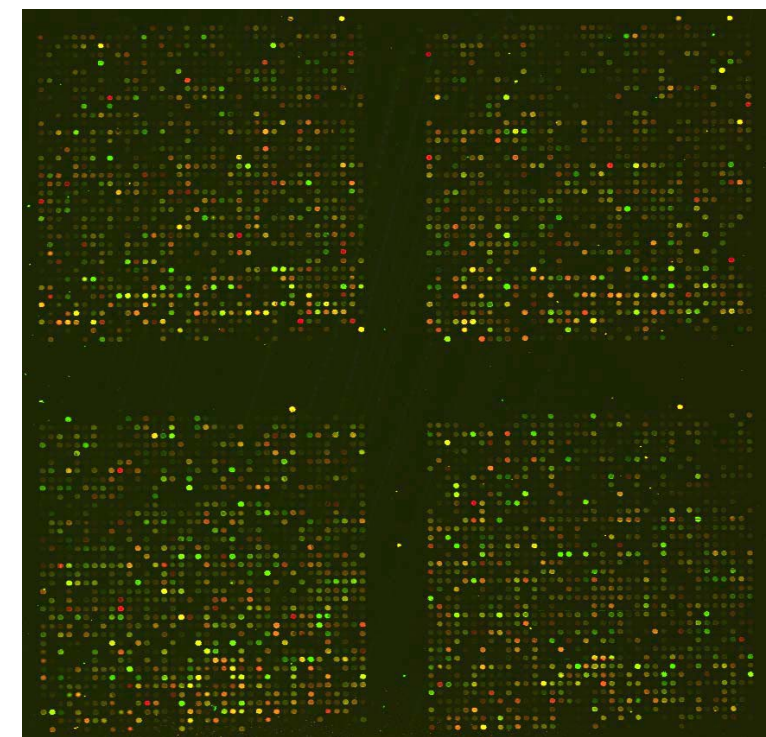
**Proteomika** - analýza proteinů organely, buňky, tkáně či extracelulárních tekutin, detekce ovlivněných proteinů

**Metabolomika** - identifikace a kvantifikace metabolitů v daném organismu nebo v buňce, detekce ovlivněných metabolitů

**kombinace genomiky - transkriptomiky, proteomiky, metabolomiky a bioinformatiky s klasickou toxikologií**

**- odpovědi/reakce organismu na stresory a toxické látky**

- identifikace, kvantifikace potenciálních genetických rizik
- identifikace konkrétních genů, jejich produktů a procesů, kterými buňky reagují na environmentální toxikanty a stresory
- sledování vedlejších účinků chemických látek na biologické systémy
- vytváření databází toxikologických, genetických a genomických informací



# Transkriptomika

## Transkriptom

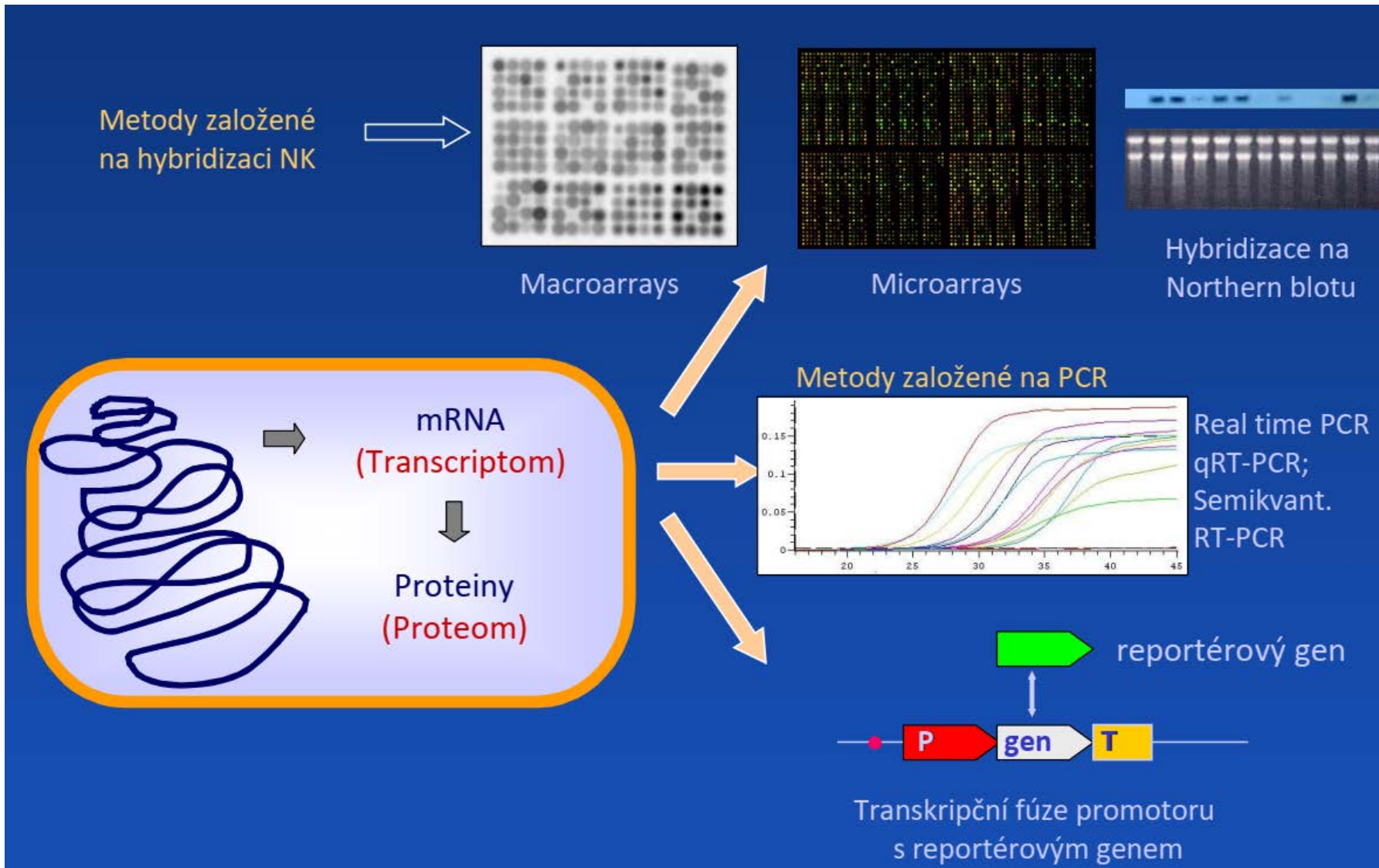
- soubor všech mRNA v dané buňce, tkáni nebo celém organismu
- Odráží míru exprese jednotlivých genů a stabilitu jejich transkriptů

## Transkriptomika

- je podobor stanovující zapojování a vypořádání souboru mRNA transkriptů v určitém typu buněk nebo tkáni a změny exprese genů vyvolávané chorobami, experimentálním zásahem nebo rozdílem ve vývojové fázi



# Transkriptomika



## qPCR

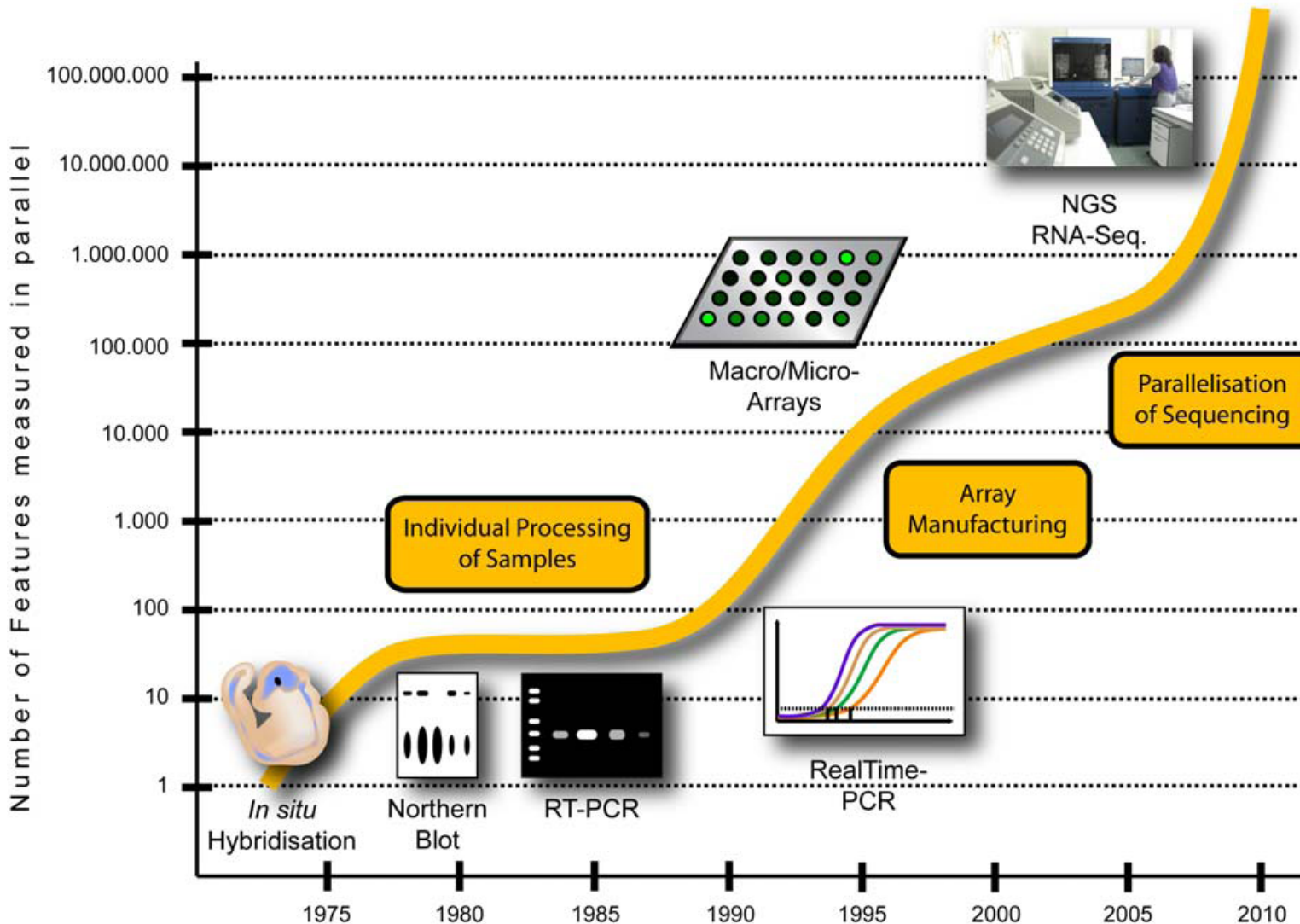
- Izolovaná mRNA se přepíše do cDNA a pomocí specifických primerů a polymerázy (namnožení konkrétní sekvence ze sledovaného genu) se kvantifikuje množství daného transkriptu ve vzorku

## Microarrays

- Do skleněné destičky zakotvené sondy známé sekvence (spec. Primery)
- Na čip je hybridizována amplifikovaná fluorescenčně značená vyšetřovaná DNA a hybridizace této DNA na jednotlivé pozice je detekována čtecím zařízením a počítačem

[SYBR Green qPCR](#)  
[Ion Proton Microarrays](#)

# Transkriptomika



## RNA Seq

- Next generation sequencing (NGS), Illumina
- Umožňuje sledovat všechny mRNA přítomné v daném vzorku na rozdíl od qPCR a microarrays, kde je možné sledovat jen expresi genů se známou sekvencí
- Zároveň umožňuje studium alternativního splicingu, fúze genů, miRNA, tRNA a posttranskripčních modifikací

# Transkriptomika

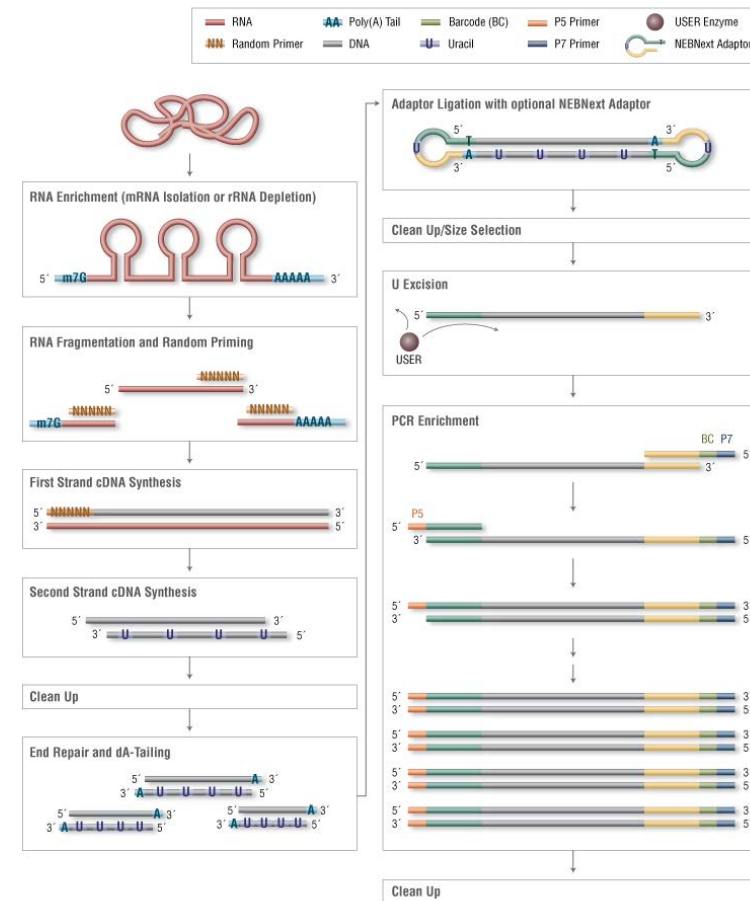
Extrakce RNA



Kontrola kvality RNA

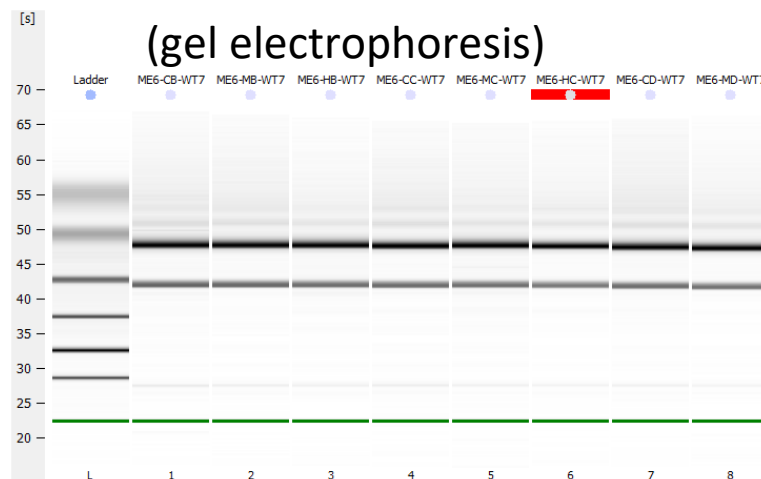


Příprava knihovny = library prep (dsDNA synthesis)

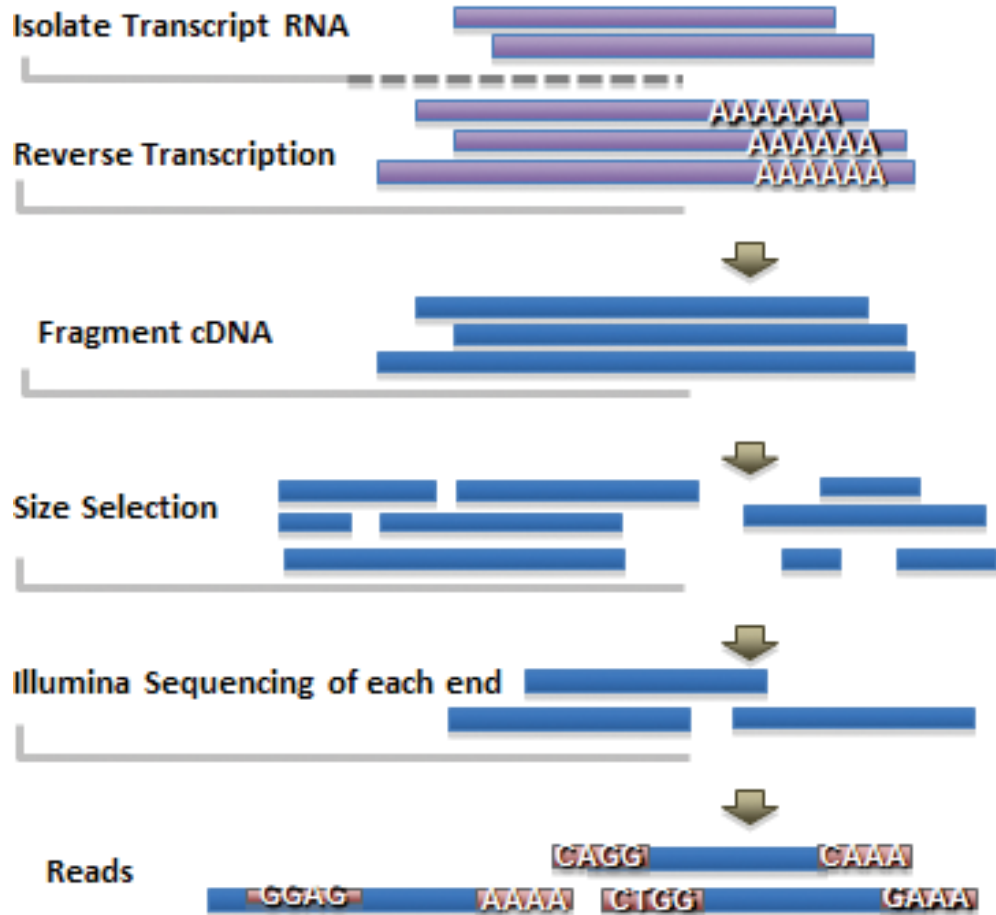


## RNA Seq

- Izolace celkové RNA
- Kontrola kvality (kapilární elektroforéza)
- Příprava knihovny - přepis do cDNA a připojení adaptérů



# RNASeq



Příprava vzorků  
- cDNA+Adapters

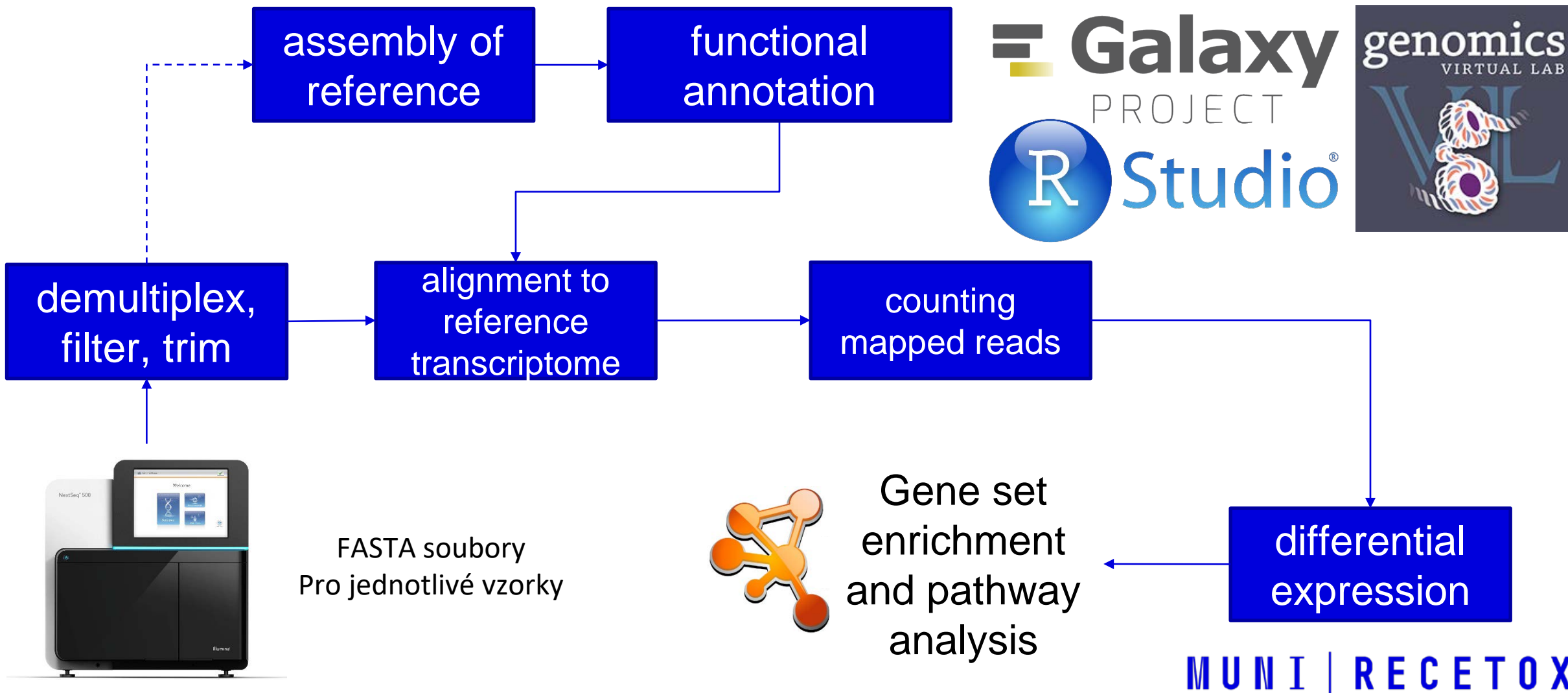
NGS →

Analýza dat

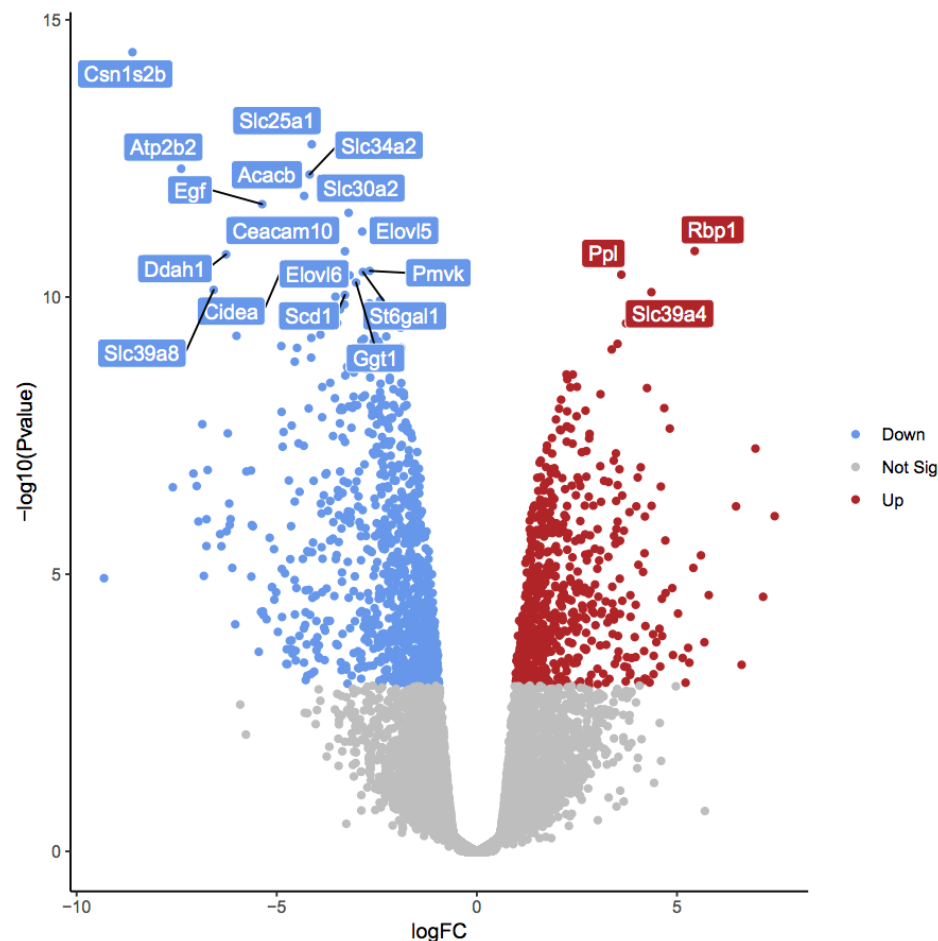
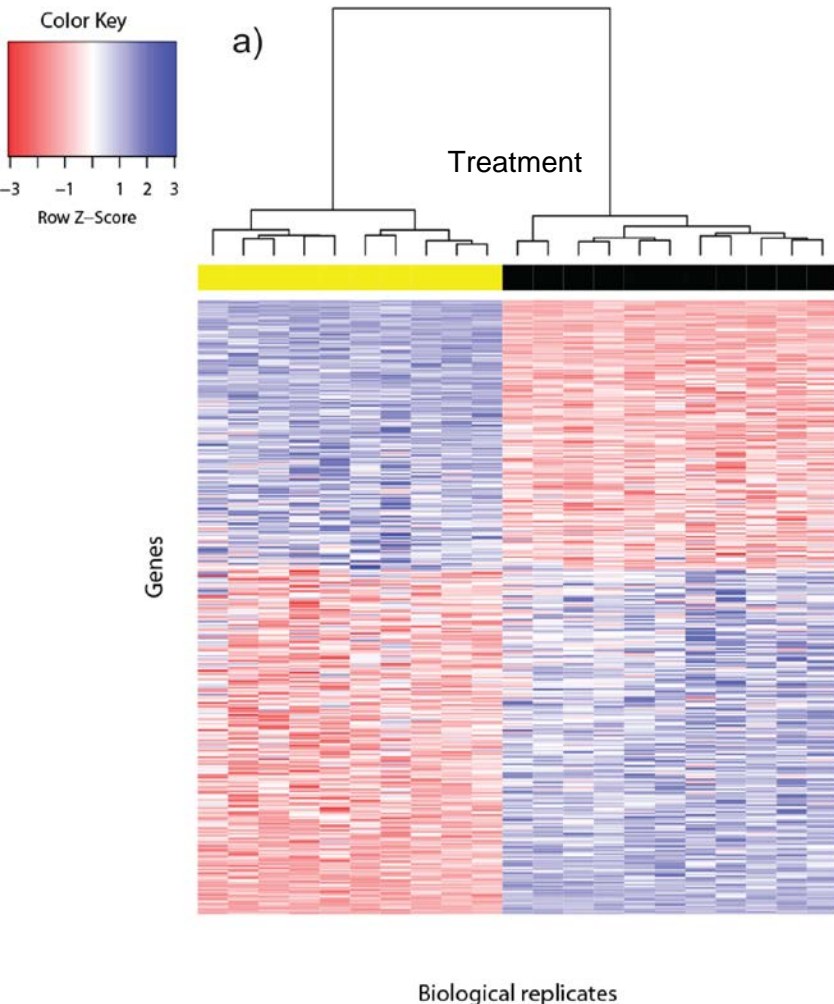




# RNA Seq- Analýza dat



# RNA Seq Výsledky



Celkový profil jednotlivých vzorků- hledání podobného paternu ve vzorcích se stejným experimentálním zásahem

Zobrazení statisticky významně ovlivněných genů napříč vzorky proti kontrole a jejich relativní změnu exprese

- V toxikologii se nejběžněji provádí srovnání četností všech pozorovaných transkriptů mezi jednotlivými vzorky

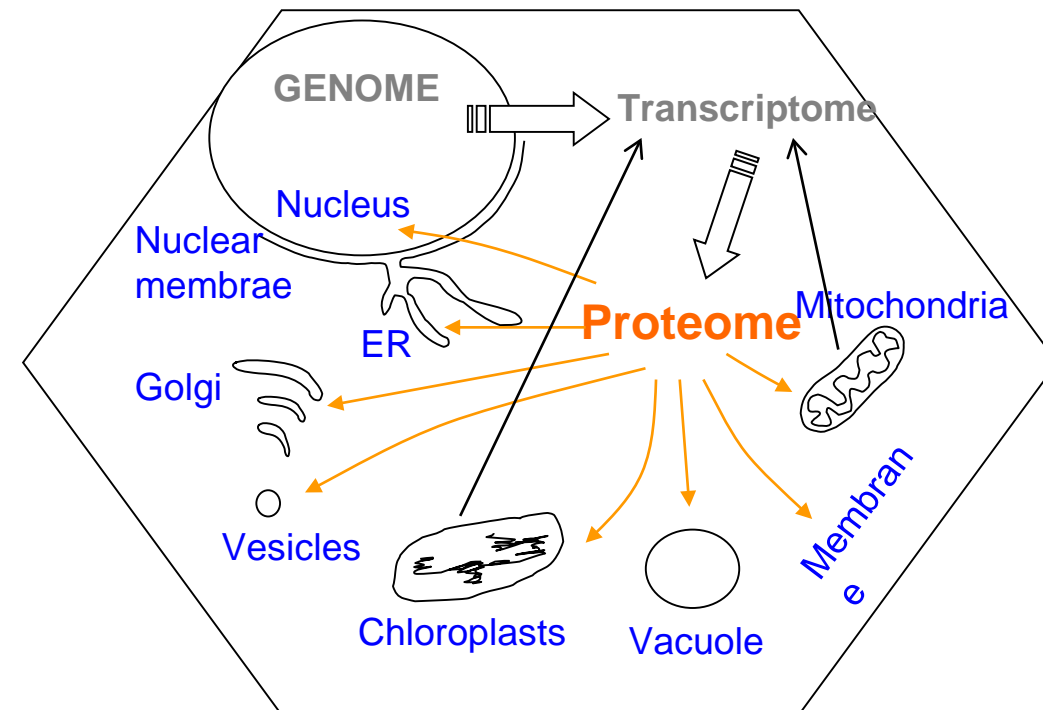
-> **diferenciální exprese genů**

- Identifikované geny ovlivněné zásahem - expozicí toxické látky - poté mohou pomoci vysvětlit mechanismus jejího působení na základní fyziologické úrovni

- Interpretace změny exprese genů směrem k účinkům na organismus ale může být obtížná - nelze říct kolik transkriptů bude přepsáno do funkčního proteinu a tedy mít biologický efekt, navíc jednotlivé procesy mohou působit protichůdně

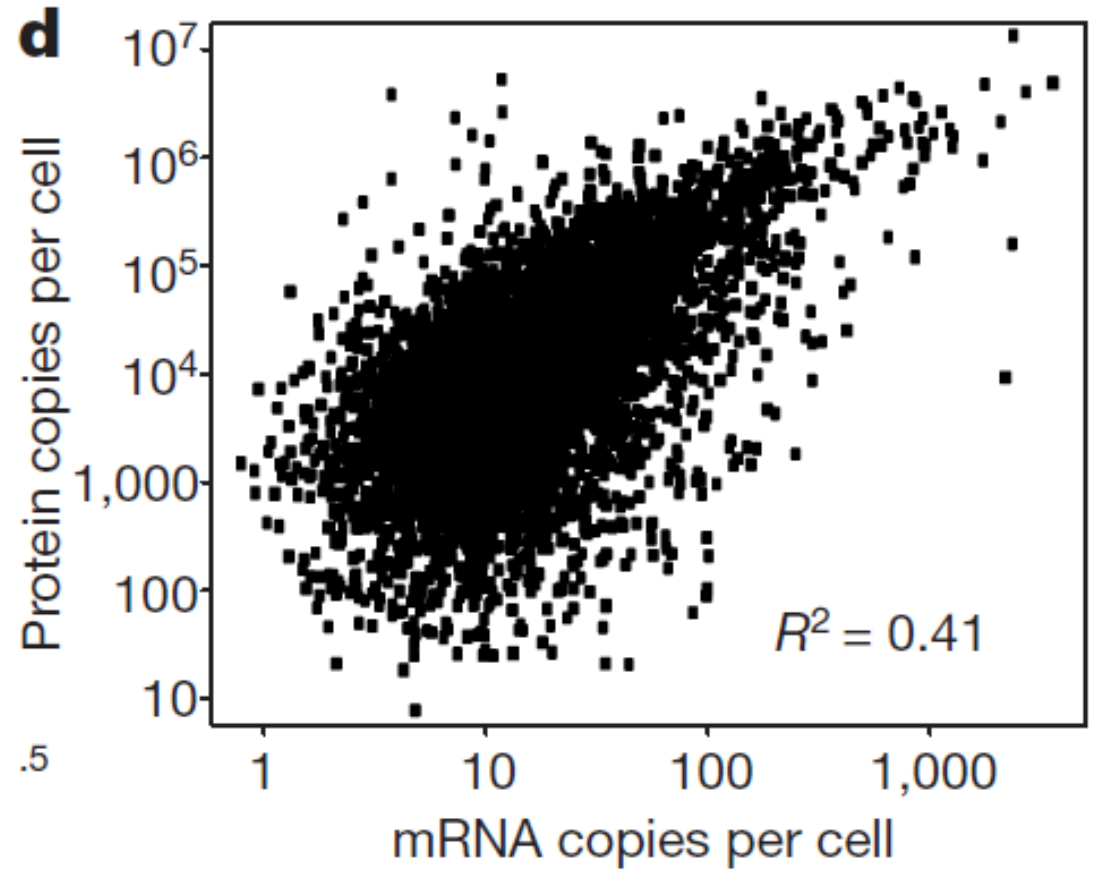
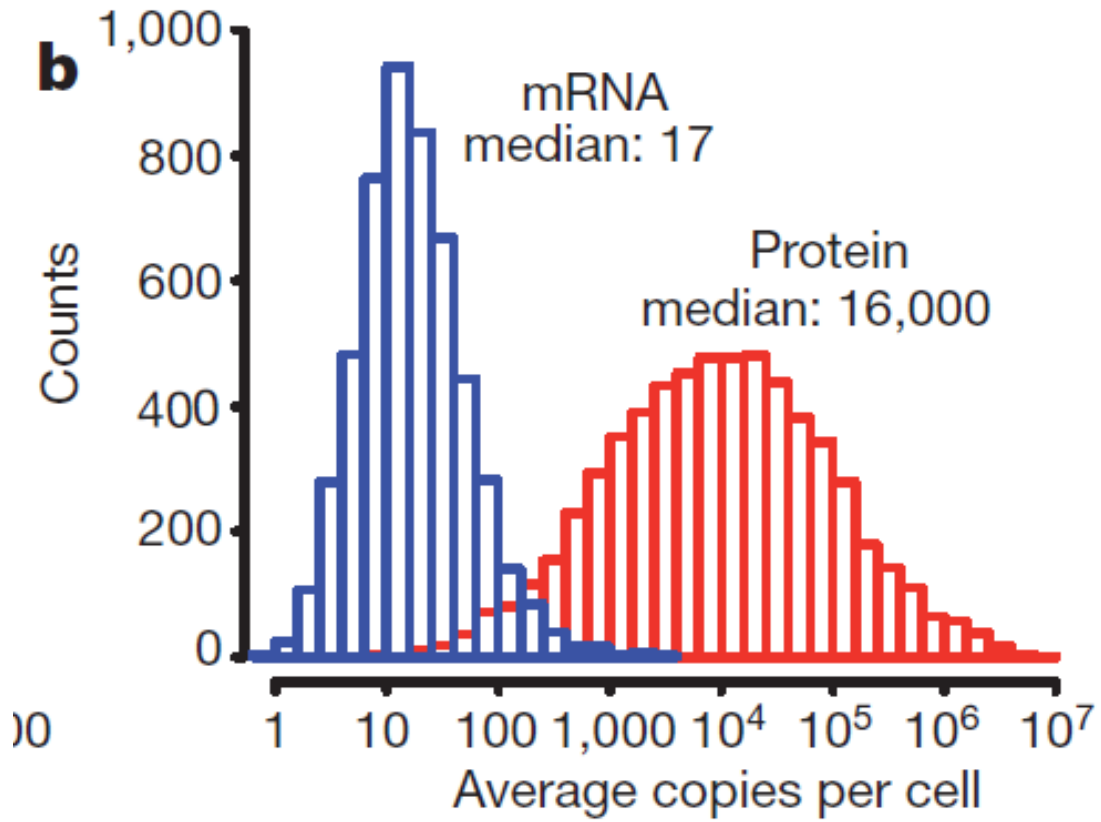
# Proteom

- soubor všech proteinů určitého systému
- organely, buňky, pletiva, orgánu, organismu
- je odrazem transkriptomu, regulace translace, stability proteinů a jejich odbourávání
- navíc zahrnuje i všechny post-translační stavy proteinů (po translaci může být protein přítomen ve více funkčně odlišných formách)
- př. u člověka cca 35 tis. genů a odhadem cca 500 tis. různých proteinů (forem proteinů)

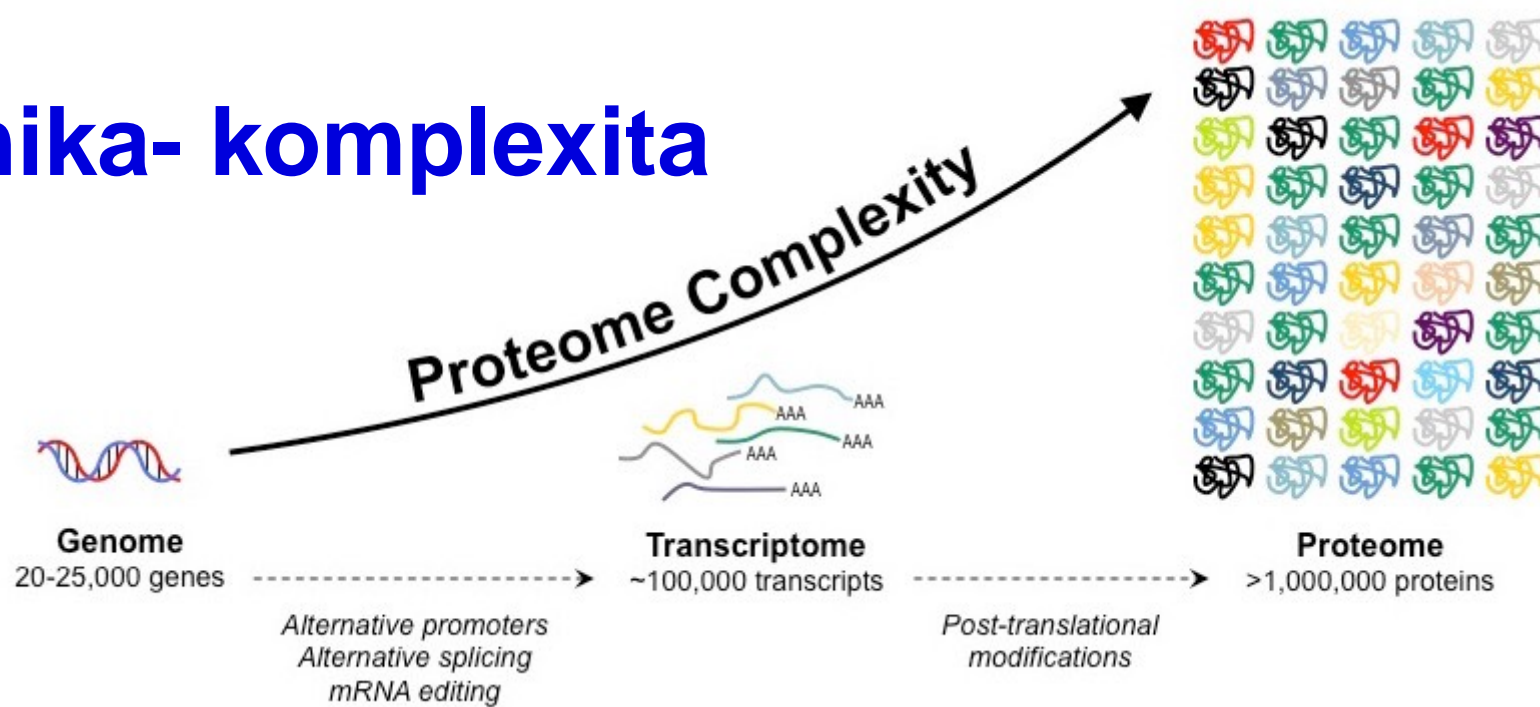




# Proteomika



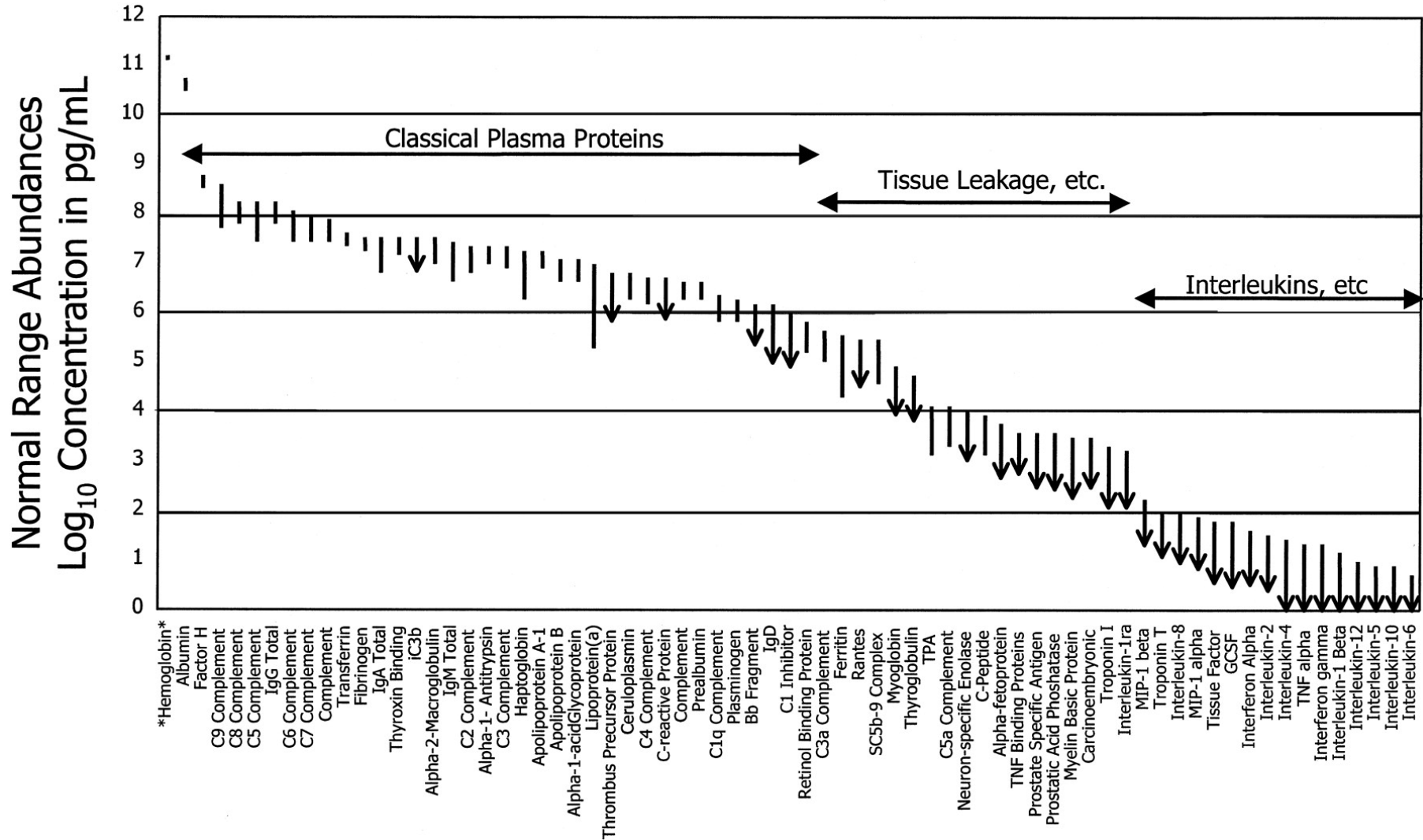
# Proteomika- komplexita



	abbreviation	monoisotopic	average				
<a href="#">Acetylation</a>	ACET	42.0106	42.0373	<a href="#">Geranyl-geranyl</a>	GERA	272.2504	272.4741
<a href="#">Alkylation</a>	ALKY	14.01564	14.02688	<a href="#">Gamma-carboxyglutamic acid</a>	GGLU	43.98983	44.0098
<a href="#">Amidation</a>	AMID	-0.9840	-0.9847	<a href="#">O-GlcNAc</a>	GLCN	203.0794	203.1950
<a href="#">Beta-methylthiolation</a>	BMTH	45.9877118	46.08688	<a href="#">Glucosylation (Glycation)</a>	GLUC	162.0528	162.1424
<a href="#">Biotin</a>	BIOT	226.0776	226.2934	<a href="#">Glutathionylation</a>	GLUT	305.0680814	305.3056
<a href="#">Bromination</a>	BROM	77.9105	78.9	<a href="#">Hydroxylation</a>	HYDR	15.9949	15.9994
<a href="#">Carbamylation</a>	CAM	43.00581	43.02502	<a href="#">Lipoyl</a>	LIPY	188.033	188.3027
<a href="#">Citullination</a>	CITR	0.9840276	0.98476	<a href="#">Methylation</a>	METH	14.0157	14.0269
<a href="#">C-Mannosylation</a>	CMAN	162.052823	162.1424	<a href="#">Myristoylation</a>	MYRI	210.1984	210.3598
<a href="#">Cysteine sulfenic acid (-SOH)</a>	CSEA	15.9949146	15.9994	<a href="#">S-Nitrosylation</a>	NTRY	28.99017	28.99816
<a href="#">Cysteine sulfinic acid (-SO<sub>2</sub>H)</a>	CSIA	31.9898292	31.9988	<a href="#">N-Octanoate</a>	OCTA	126.1044	126.1986
<a href="#">Deamidation</a>	DEAM	0.9840	0.9847	<a href="#">Palmitoylation</a>	PALM	238.2297	238.4136
<a href="#">N-acyl diglyceride cysteine (tripalmitate)</a>	DIAC	788.7258	789.3202	<a href="#">Phosphorylation</a>	PHOS	79.9663	79.9799
				<a href="#">Pyridoxal phosphate</a>	PLP	229.014	229.129

- Více než 1000 popsaných post-translačních modifikací proteinů
- Exponenciálně roste počet verzí jednotlivých proteinů

# Proteomika



- Referenční hodnoty pro sedmdesát lidských proteinů detekovaných v lidské plazmě
- Velmi široký rozsah koncentrací, rozdíl v abundanci jednotlivých proteinů může být až 12 řádů
- Klade to velké nároky na kvalitu a přesnost měření

# Proteomika - komplexita, rozsah 12 řádů





# Proteomika- komplexita, rozsah 12 řádů

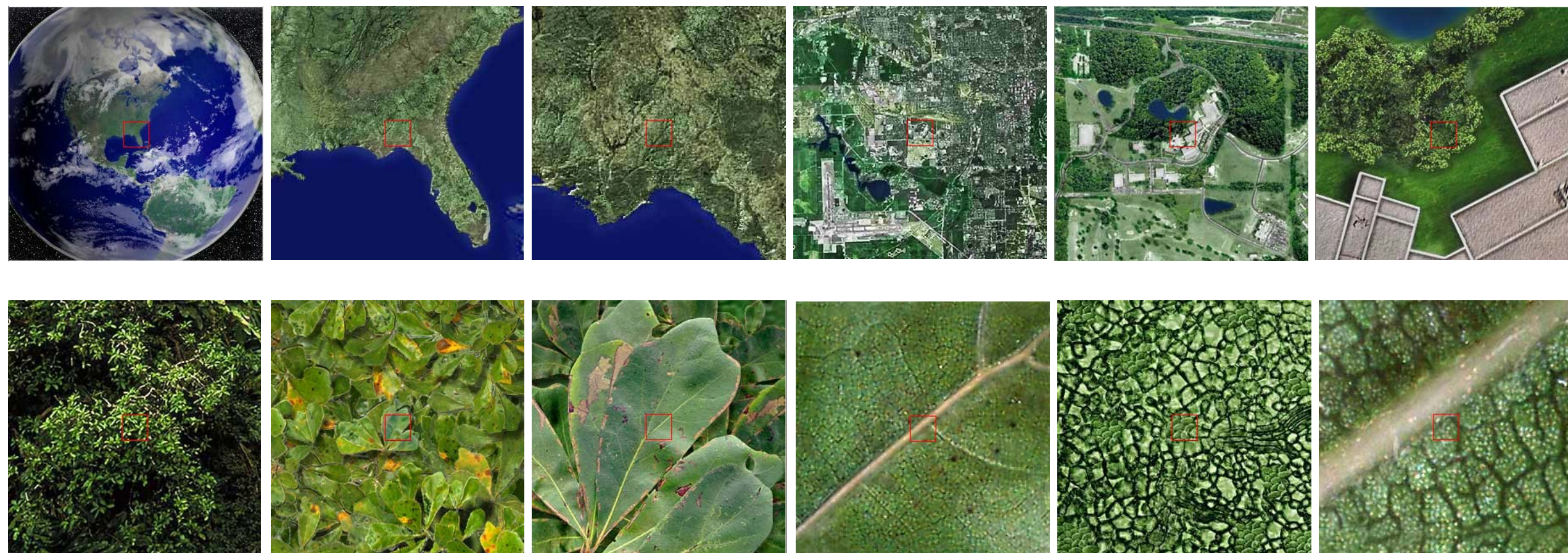
Proteomika





# Proteomika- komplexita, rozsah 12 řádů

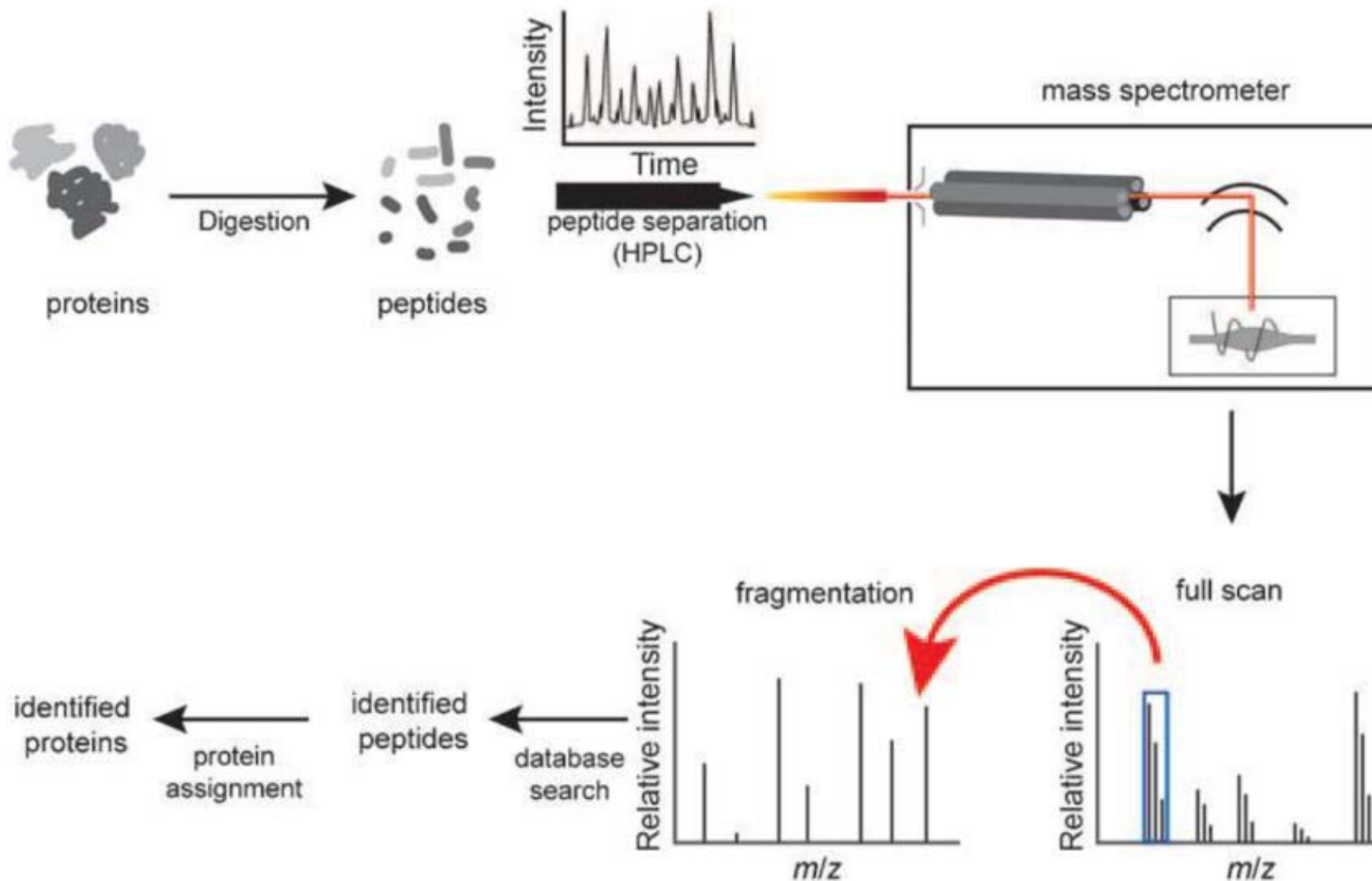
Proteomika



- Dynamický rozsah proteomických dat - až 12 řádů rozdílu v abundanci různých proteinů



# Proteomika- Label-free kvantifikace



Identifikace peptidů hmotnostní spektrometrií:

„Peptide fingerprinting“  
„Bottom-up Proteomics“

- přesné změření velikostí definovaných štěpů proteinu a porovnání s predikovanými štěpy proteinů v databázích

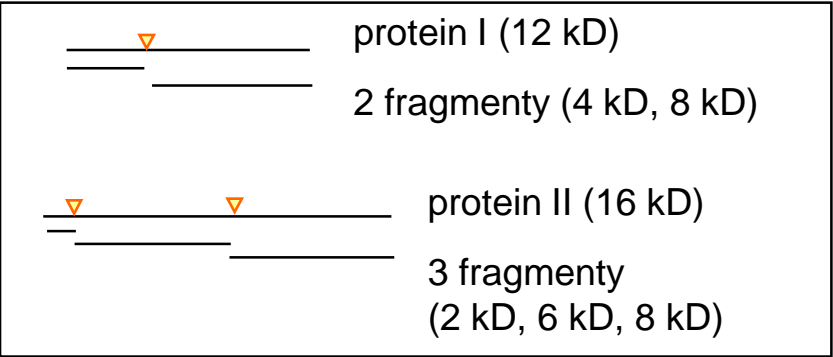
Definované štěpení trypsinem či jinou specifickou proteázou

Hmotnostní spektrometrie např. MS - MALDI/TOF (Matrix-assisted Laser desorption/ionisation Time-of-flight analysis) nebo např. Orbitrap



# Proteomika- kvantifikace

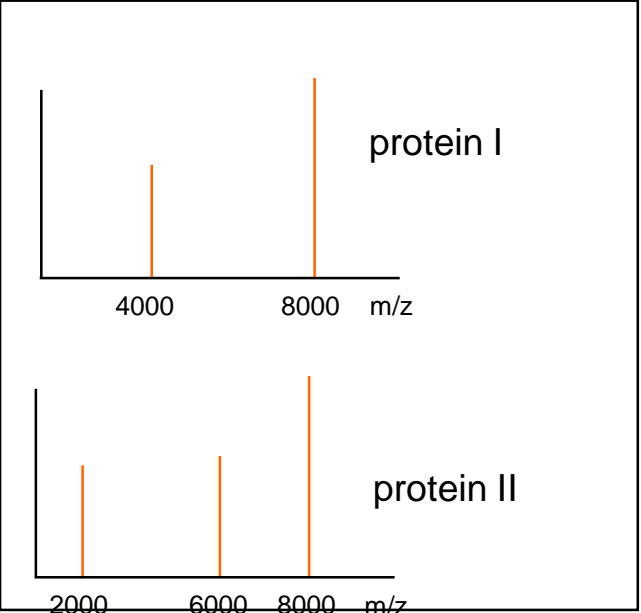
štěpení proteázou (trypsinem)



DNA (i EST), proteinová databáze

generování teoretických trypsinových štěpů ze známých či předpokládaných proteinových sekvencí

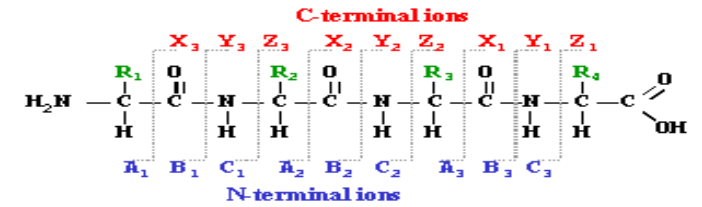
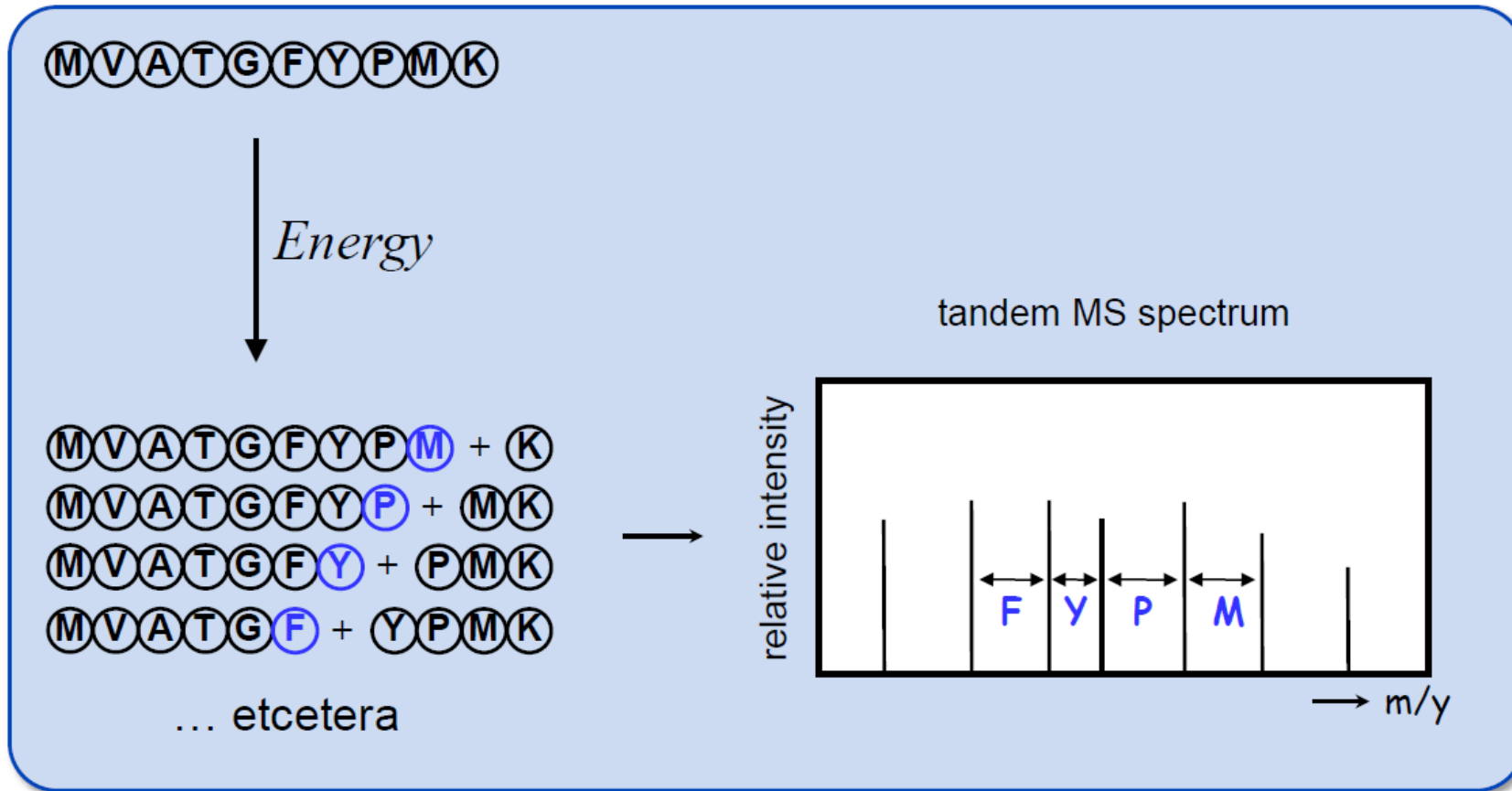
Hmotnostní spektrometrie



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

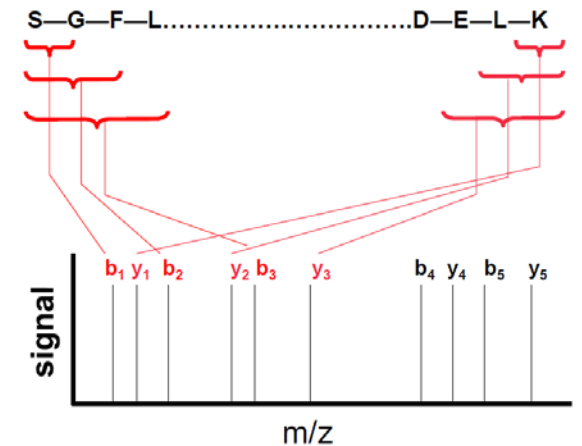
Srovnání experimentálně stanovených velikostí peptidů s teoretickými štěpy

# Proteomika - kvantifikace



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

mass <sup>+</sup>	b-ions	y-ions	mass <sup>+</sup>
88.1	S	PAFDSIMAE TLK	1323.6
185.2	SP	AFDSIMAE TLK	1226.4
256.3	SPA	FDSIMAE TLK	1155.4
403.5	SPAF	DSIMAE TLK	1008.2
518.5	SPAFD	SIMAE TLK	893.1
605.6	SPAFDS	IMAE TLK	806.0
718.8	SPAFDSI	MAE TLK	692.3
850.0	SPAFDSIM	AE TLK	561.7
921.1	SPAFDSIMA	E TLK	490.6
1050.2	SPAFDSIMAE	TLK	361.5
1151.3	SPAFDSIMAE T	LK	260.4
1264.4	SPAFDSIMAE TL	K	147.2



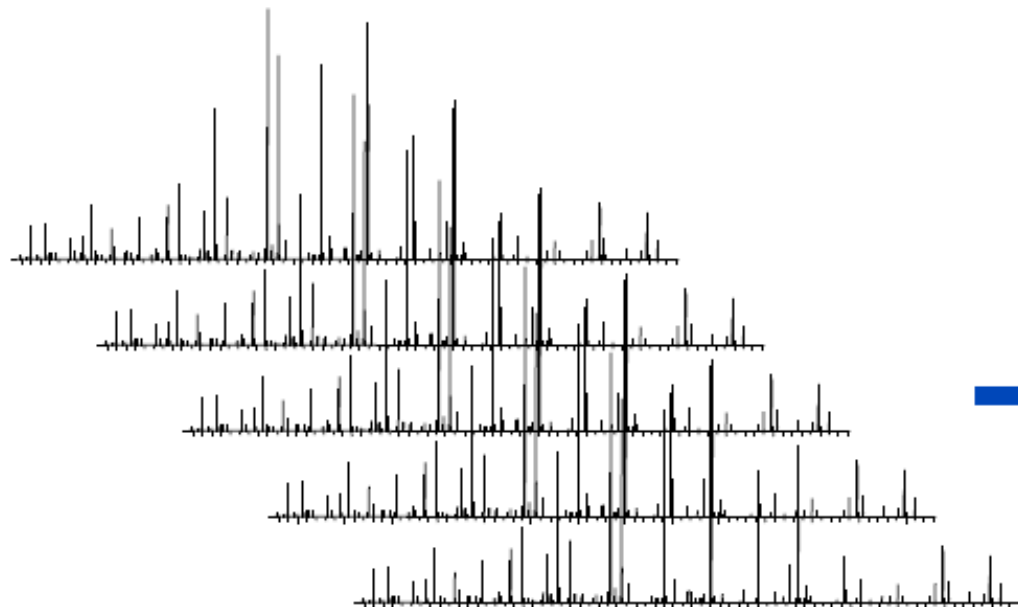
Identifikace peptidů hmotnostní spektrometrií: „Peptide fingerprinting“  
Jednotlivá hmotnostní spektra jsou analyzována proti databázi možných peptidů

[Label-free Proteomics](#)

[Label-free Proteomics - MS quantification](#)

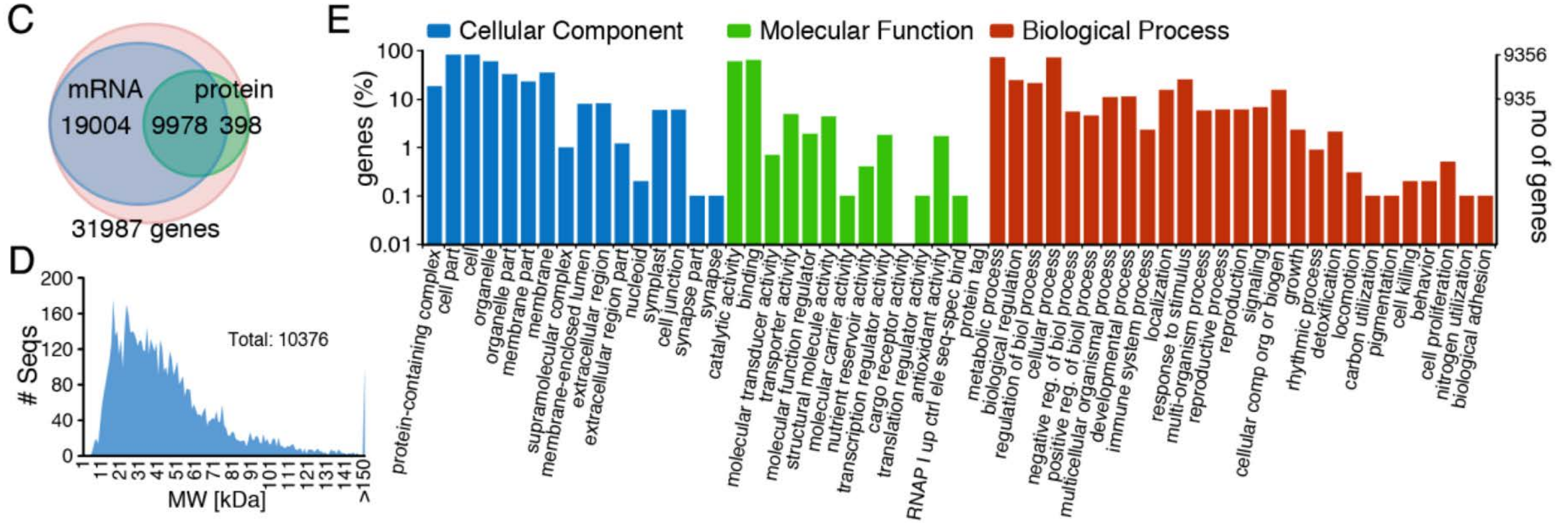
# Proteomika

Raw, un-interpreted  
MS/MS spectra



- Velmi komplexní data vyžadují velkou výpočetní sílu pro analýzu dat získaných hmotnostní spektrometrií - z jednoho vzorku je možné získat až 100 000 hmotnostních spekter, které všechny musí být porovnány s databází pro identifikaci
- Databáze pro jeden organismus obsahuje desítky tisíc proteinů a souvisejících peptidových fingerprintů

# Proteomika



- V toxikologii se nejběžněji provádí srovnání četností všech pozorovaných proteinů mezi jednotlivými vzorky  
 -> **diferenciální abundance proteinů**

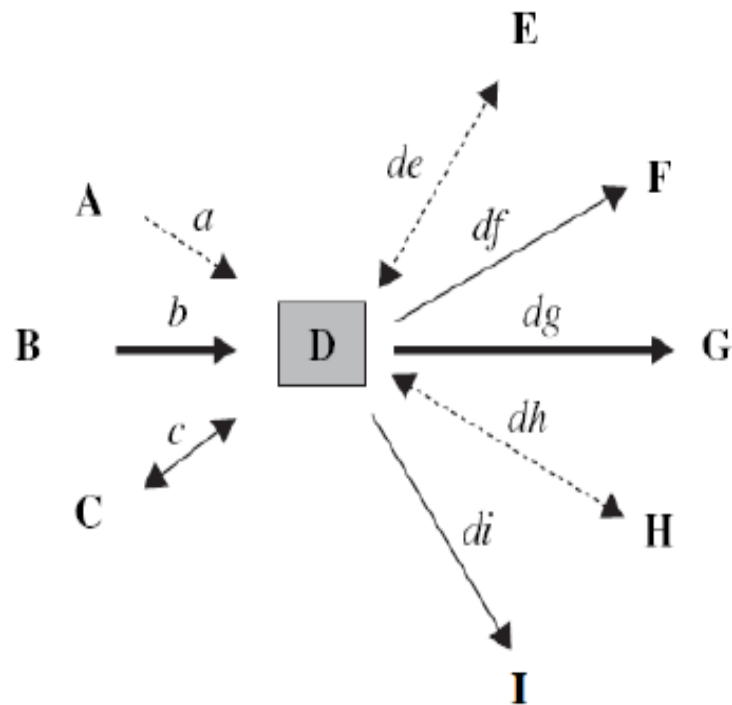
- Složitější interpretace než u ovlivnění exprese genů - proteiny mají různou životnost v organismu a dynamickou odpověď proteomu na stresor je tak těžší zachytit

- Ovlivněné proteiny (a stejně tak exprese genů) jsou poté často analyzovány dle biologické funkce a podle počtu ovlivněných proteinů se odvozuje vliv na daný biologický proces - „Pathway Analysis“

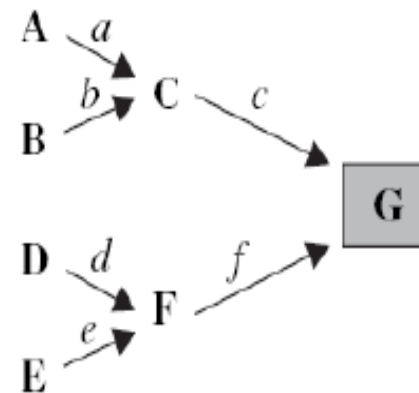
# Metabolomika

## METABOLISMUS – látková přeměna

soubor všech enzymatických reakcí, při nichž dochází k přeměně látek a energií v buňkách a v živých organismech



Primární metabolismus



Sekundární metabolismus

Primární (anabolismus – reakce spojené s biosyntézou, katabolismus – reakce spojené s degradací)

Sekundární

### METABOLOM

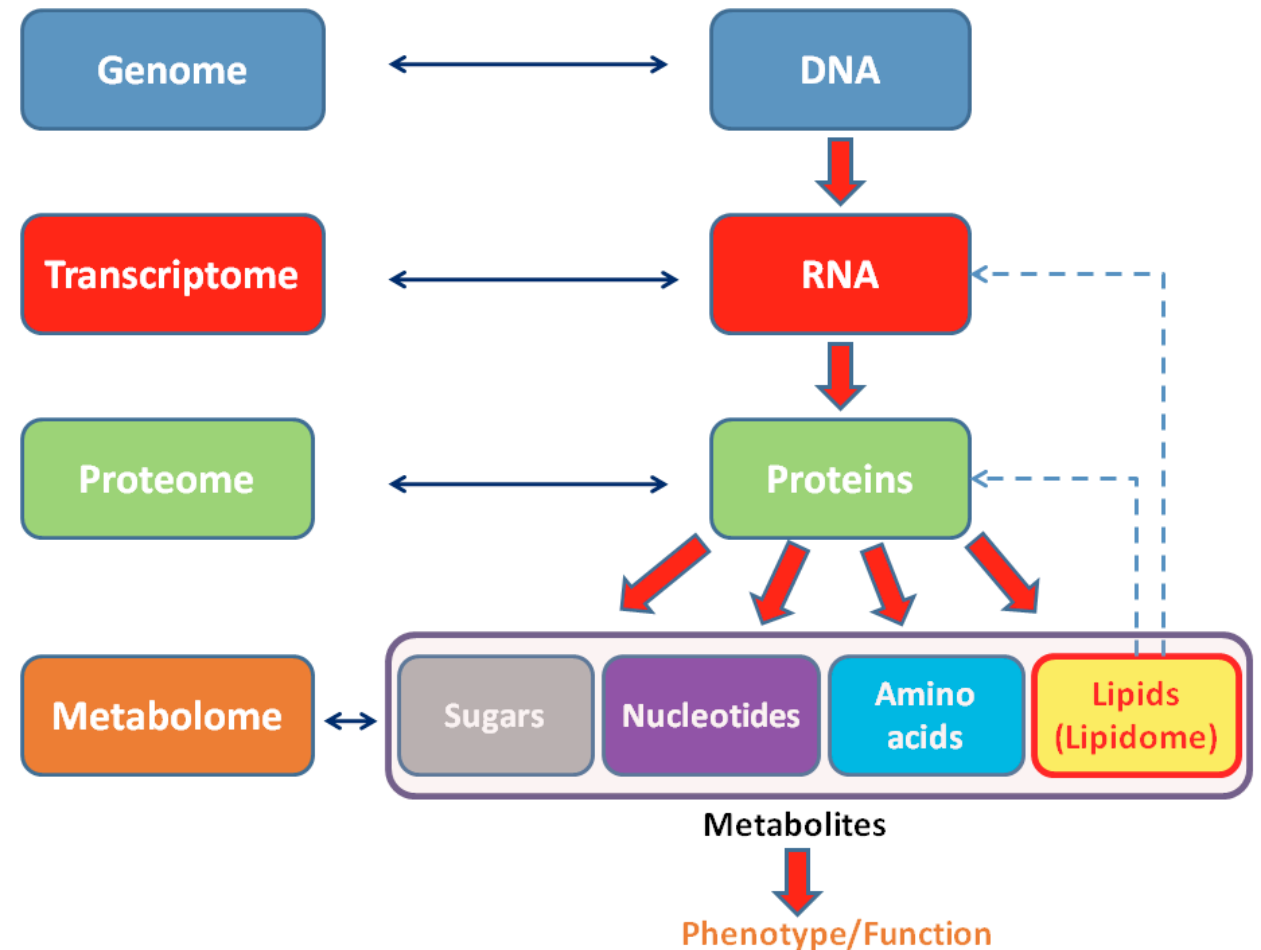
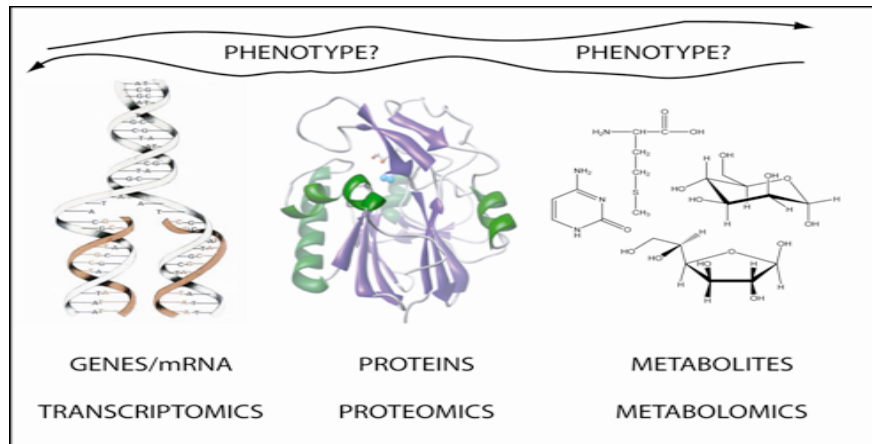
**kompletní** soubor metabolitů v buňce či biologickém systému v daném čase

### METABOLIT

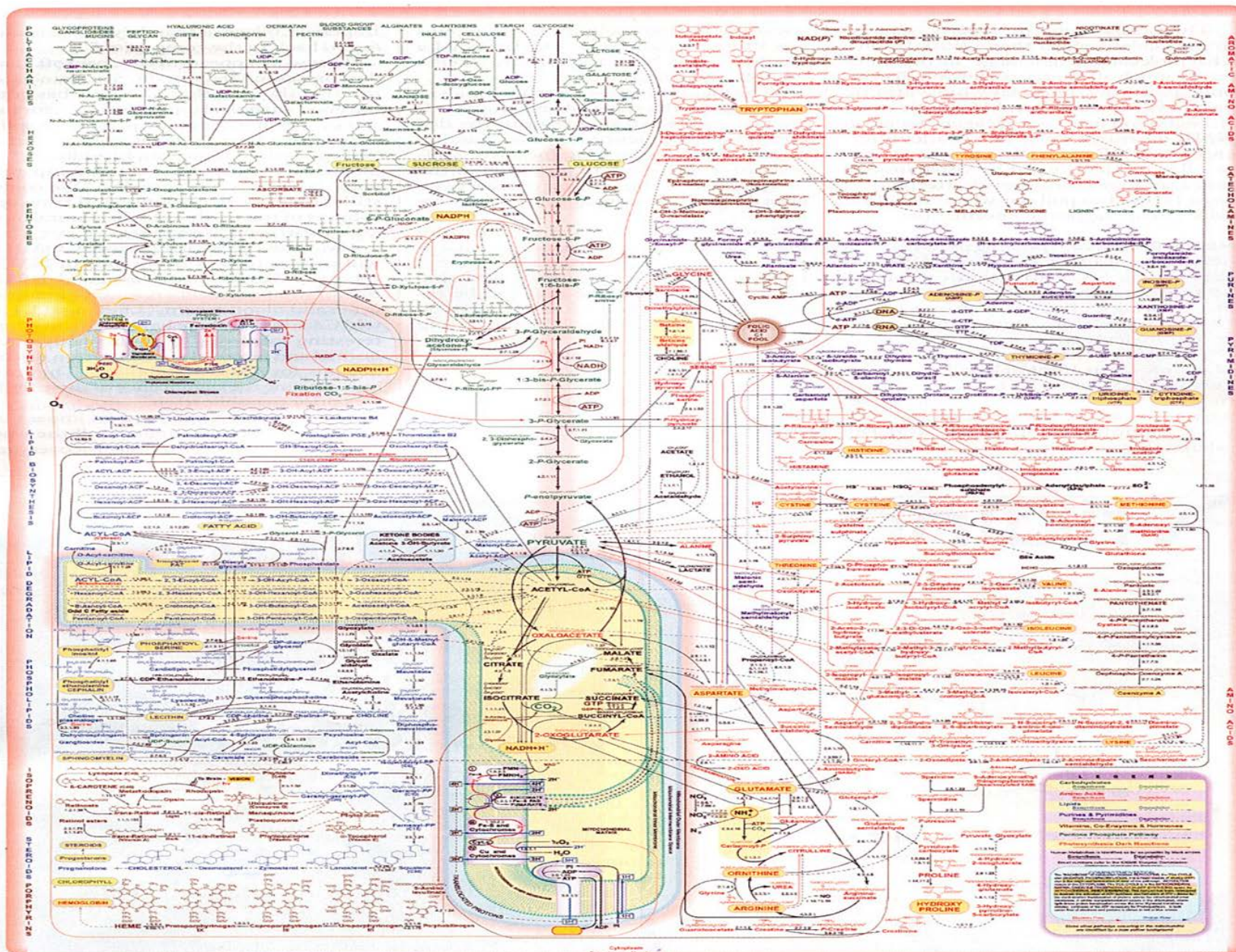
nízkomolekulární organická sloučenina (< 1000 Da), produkt látkové přeměny

– Systémová biologie a funkční genomika - integrace proteomických, transkriptomických a metabolomických informací – komplexní pohled na organismus.

– metabolický profil = aktuální odraz fyziologie buňky







## FINGERPRINTING

komplexní analýza  
**intracelulárních metabolitů** bez  
nutnosti kvantifikace a identifikace  
⇒ screening: klasifikace vzorku na  
základě jeho původu a zdroje

## FOOTPRINTING

komplexní analýza  
**extracelulárních metabolitů** bez  
nutnosti kvantifikace a identifikace  
⇒ screening: klasifikace vzorku na  
základě jeho původu a zdroje



# Metabolomika

## **PROFILOVÁNÍ METABOLITŮ (metabolite profiling)**

analýza daného souboru metabolitů, např. souboru AMK, organických sloučenin  
často semi-kvantitativní analýza

## **CÍLENÁ ANALÝZA METABOLITŮ (metabolite target analysis)**

kvalitativní i kvantitativní analýza vybraných metabolitů související se specifickou metabolickou reakcí  
používána zejména když jsou požadovány nízké limity detekce

## **METABONOMIKA (metabonomics, Untargeted metabolomics )**

komplexní metabolické studie zejména v toxikologii  
současné měření co nejvíce metabolitů s cílem zachycení celkového metabolického profilu vzorku  
ohodnocení tkání a biologických tekutin na základě změn endogenních metabolitů (výsledek nemocí nebo terapeutického léčení) - bez potřeby specifické identifikace

# Metabolomika - Jak?

## Příprava vzorku

Soli, proteiny, lipidy ve vzorku zhoršují kvantifikaci analytu - užití extrakce na tuhé fázi (solid-phase extraction, SPE)

- využívá pevnou a kapalnou fázi k izolaci jednoho typu analytu z roztoku
- využívá stejné typy stacionárních fází jako v kapalinové chromatografii
- limitací je selektivita SPE – ideální pro cílené analýzy jednoho typu, ale nevhodná pro široké profilování metabolitů

## Nukleární Magnetická Rezonance

Je detekována absorpce radiofrekvenčního záření (RFR) jádru atomů v molekule – RFR jsou schopny absorbovat pouze látky s nenulovým spinovým kvantovým číslem I:

- atomy s lichým hmotovým číslem:  $I = n\frac{1}{2}$  ( 1 H , 13C , 15N 31P)

## Hmotnostní spektrometrie

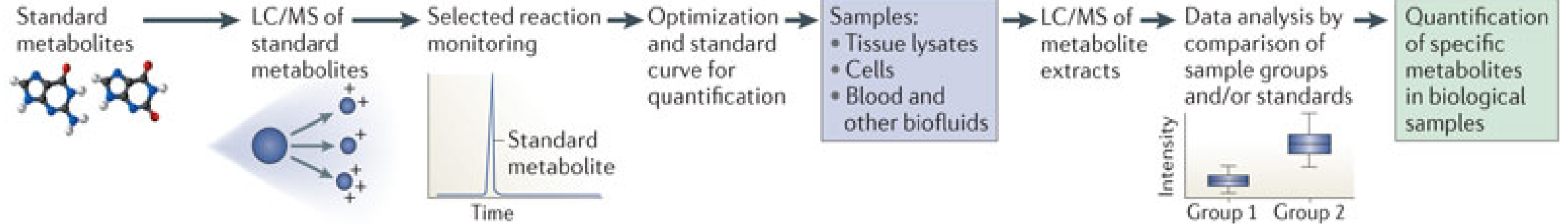
analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z), záznam relativních intenzit jednotlivých iontů

# Typical Workflow for Targeted or Untargeted LC/MS based Metabolomics

## a Targeted metabolomics

Question:

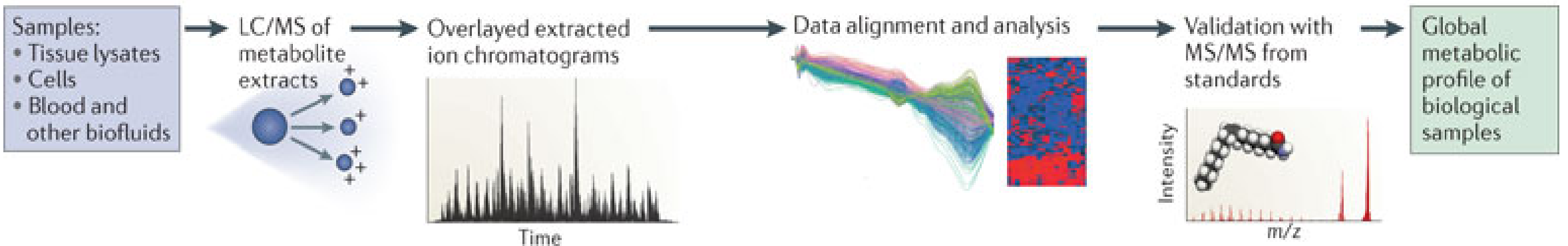
What are the levels of specific metabolites in a sample?



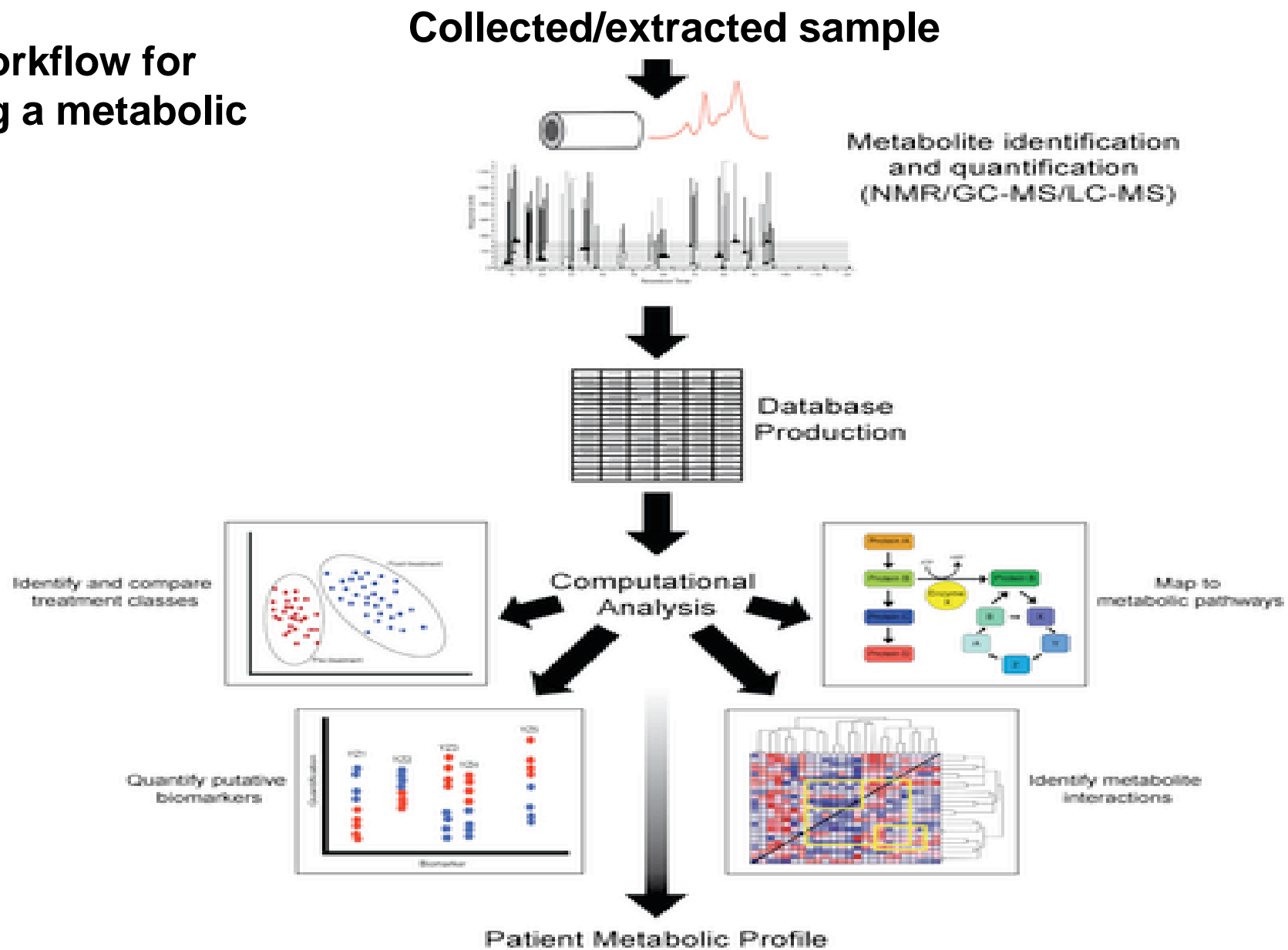
## b Untargeted metabolomics

Question:

What is the global metabolic profile of a sample?

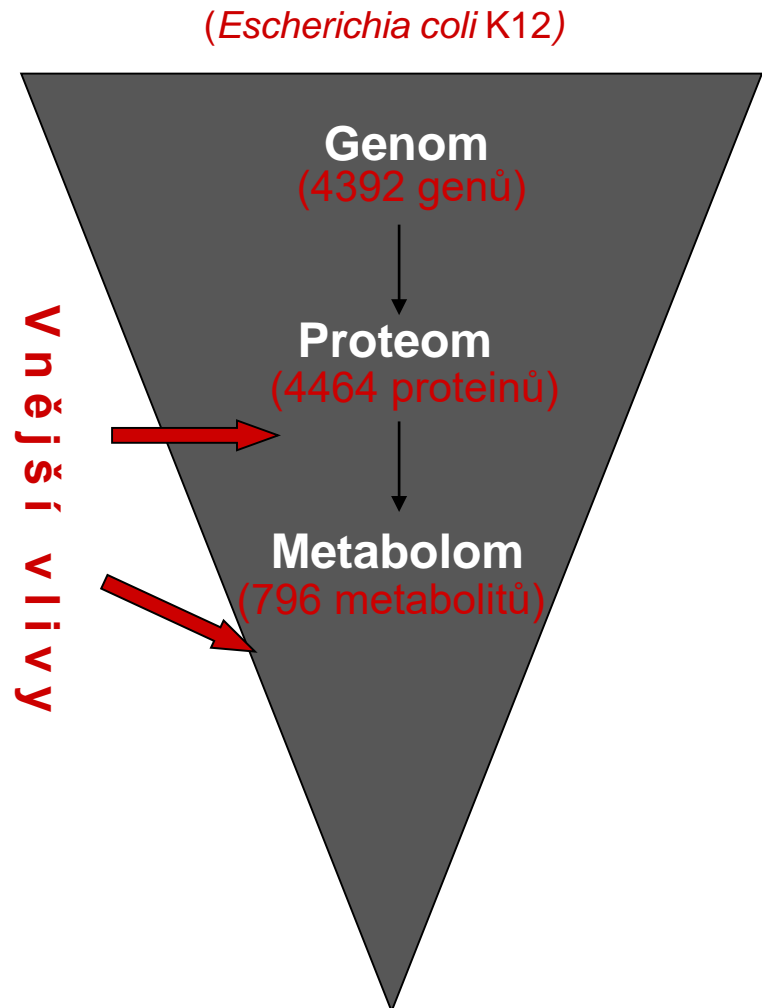


# Typical workflow for generating a metabolic profile



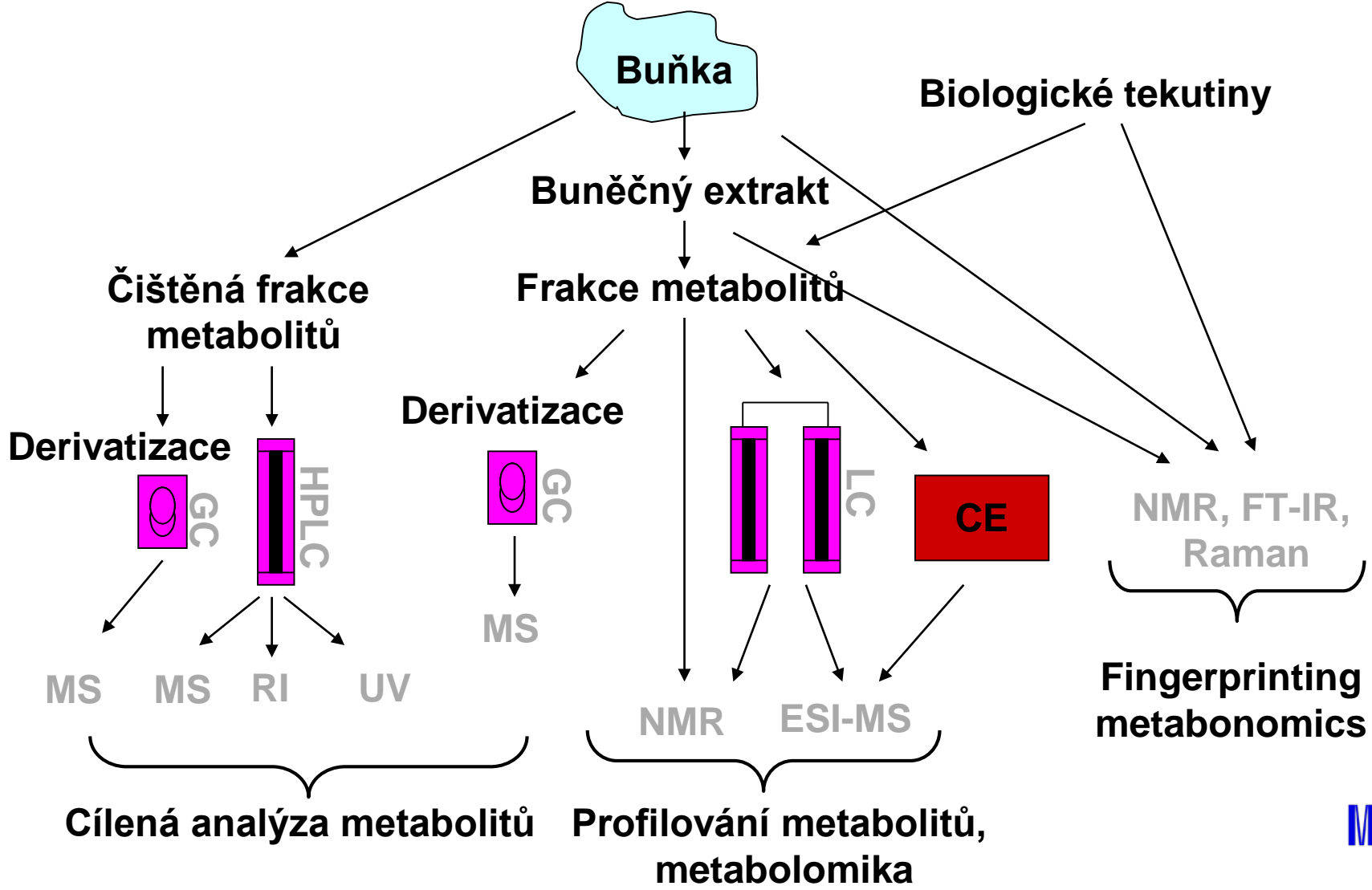
- Predict patient outcome upon treatment with a pharmaceutical compound.
- Predict/monitor efficacy of drug metabolism and potential drug toxicity.
- Predict/monitor the effects of a compound on certain metabolic pathways and biochemical processes.

# Metabolomika- Proč?



- Počet metabolitů v buňce může být až řádově nižší než počet genů a proteinů.
- Metabolom – nejnižší linie genové exprese - přímo odráží funkční úroveň buňky.
- Změny metabolitů v buňce nejsou regulovány pouze genovou expresí, ale i vlivy životního prostředí.
- Kvantifikace metabolitů nabízí přímý přístup ke zkoumání vnitřní kinetiky metabolismu (in vivo kinetics).
- Metabolomické experimenty vyžadují 2x – 3x méně času ve srovnání s proteomickými a transkriptomickými experimenty.

# Metabolomika - Jak?



# Seznam odkazů na videa

## **SYBR Green qPCR**

[https://www.youtube.com/watch?v=GCzH2Wcvd8E&list=TLPQMTEXMjIwMTkWIk25LGG\\_kA&index=17](https://www.youtube.com/watch?v=GCzH2Wcvd8E&list=TLPQMTEXMjIwMTkWIk25LGG_kA&index=17)

## **Ion Proton Microarrays**

<https://www.youtube.com/watch?v=PisqV9cyfoA>

## **Next Generation Sequencing**

[https://www.youtube.com/watch?v=shoje\\_9IYWc](https://www.youtube.com/watch?v=shoje_9IYWc)

## **Minion, Milipore sequencing**

<https://www.youtube.com/watch?v=rXfS4wJoVLQ>

## **Third Generation NGS**

<https://www.youtube.com/watch?v=v8p4ph2MAvI>

## **Label-free Proteomics**

<https://www.youtube.com/watch?v=05kOn7E6M2E>

## **Label-free Proteomics- MS quantification**

<https://www.youtube.com/watch?v=x8DyTXHafd4>

## **Bottom-up vs Top-down Proteomics**

<https://www.youtube.com/watch?v=DAX04wr78Qg>

## **Proteomics- SILAC**

<https://www.youtube.com/watch?v=OjdWrMrCI9o>

## **Proteomics- iTRAQ**

<https://www.youtube.com/watch?v=Rz1YeMZmOc4>