

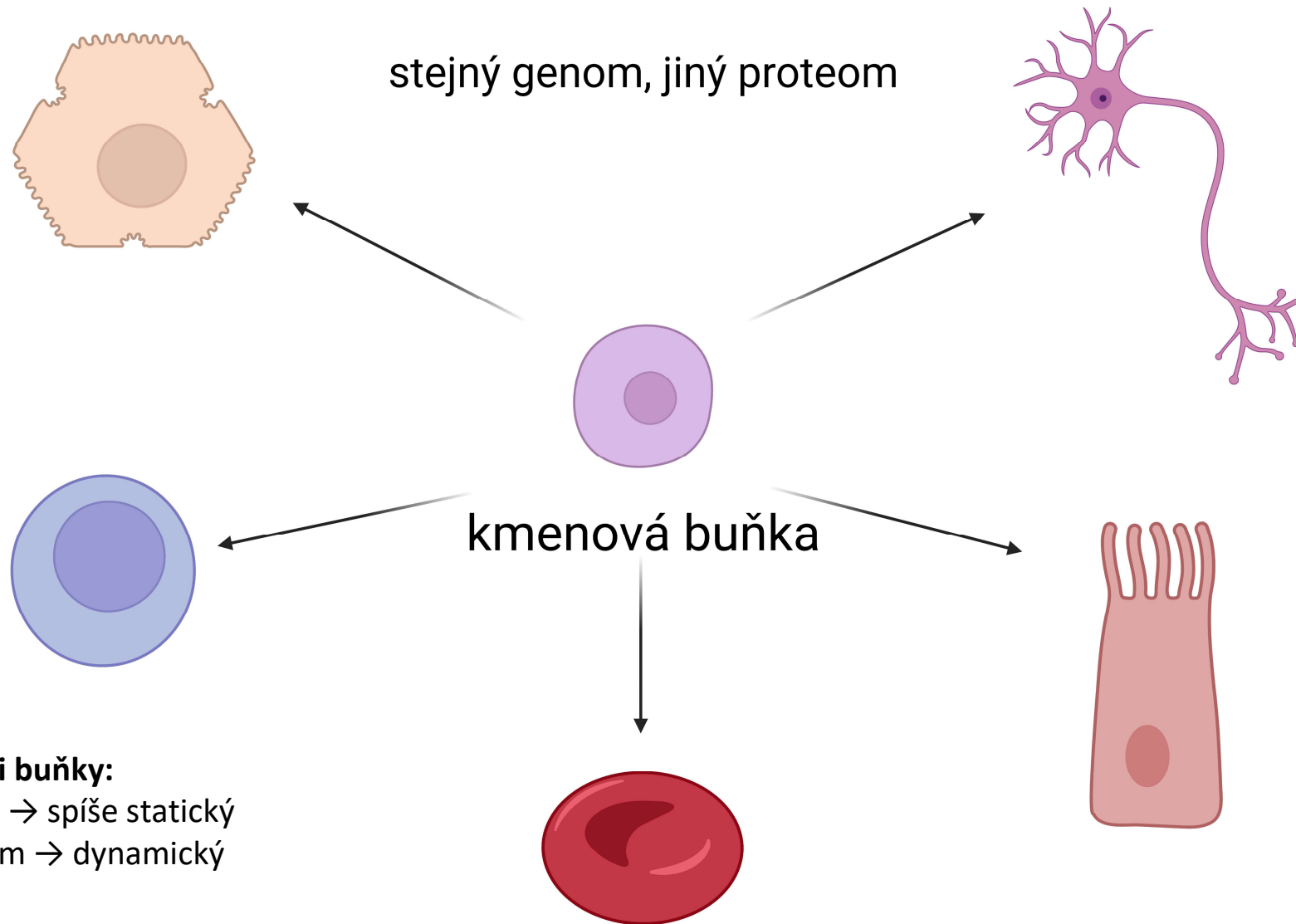
Úvod do molekulární medicíny C7188

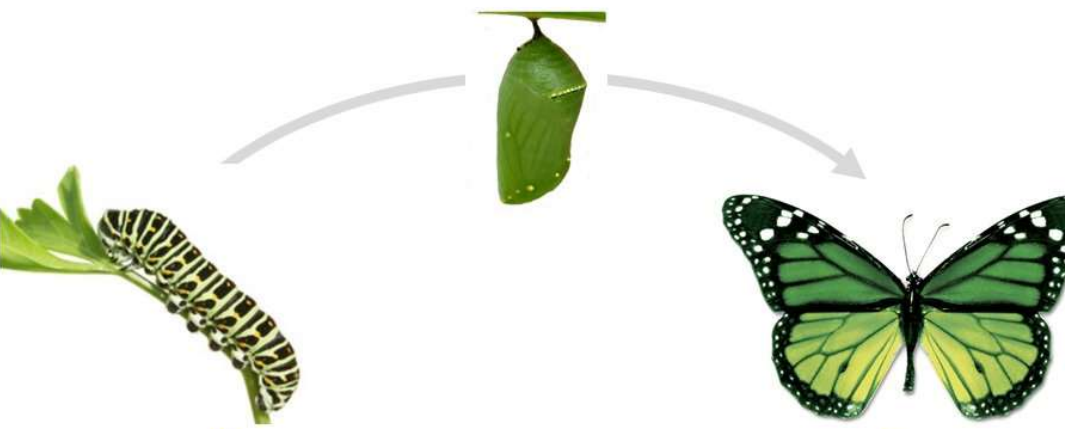


6. Metodické přístupy v molekulární medicíně III – proteomika

Mgr. Júlia Bohošová, Ph.D.

podzim 2024

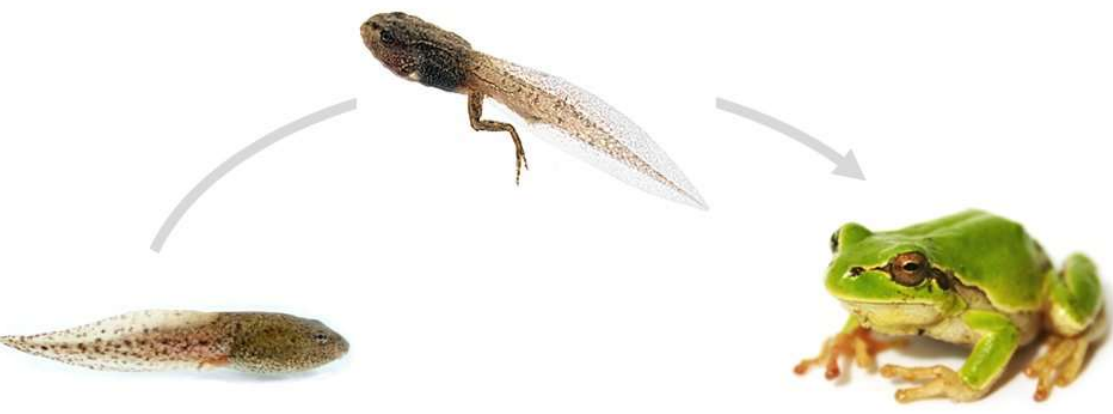




same genome but different proteomes



same genome but different proteomes



same genome but different proteomes



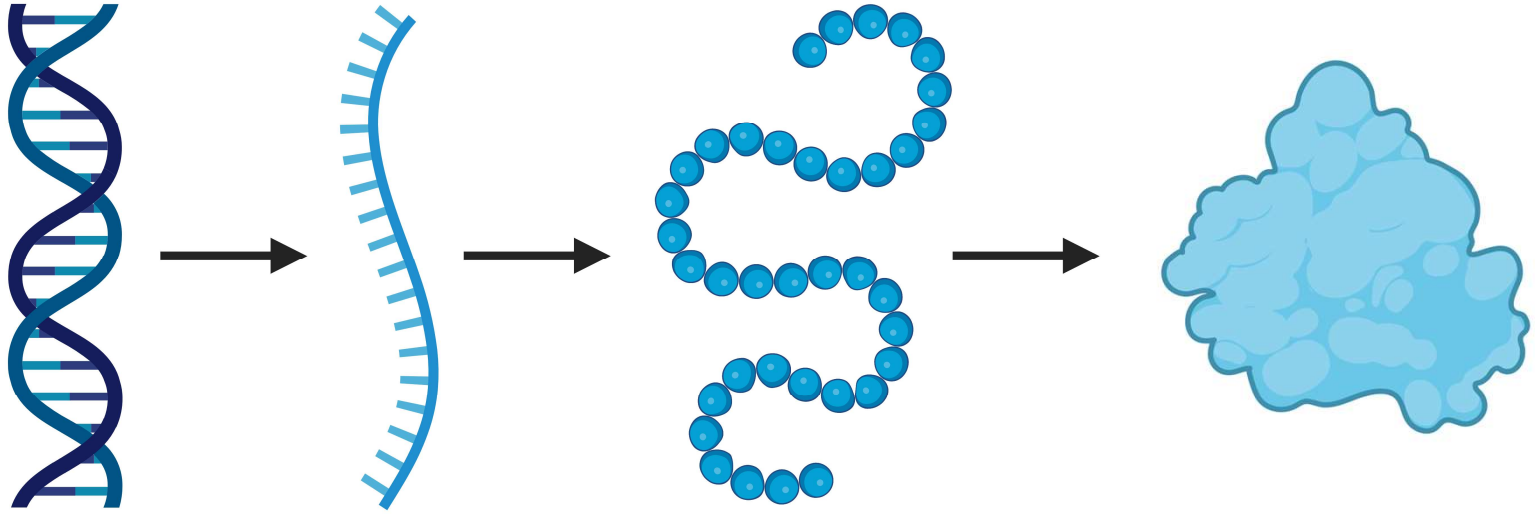
Pastel BioScience
@PastelBio

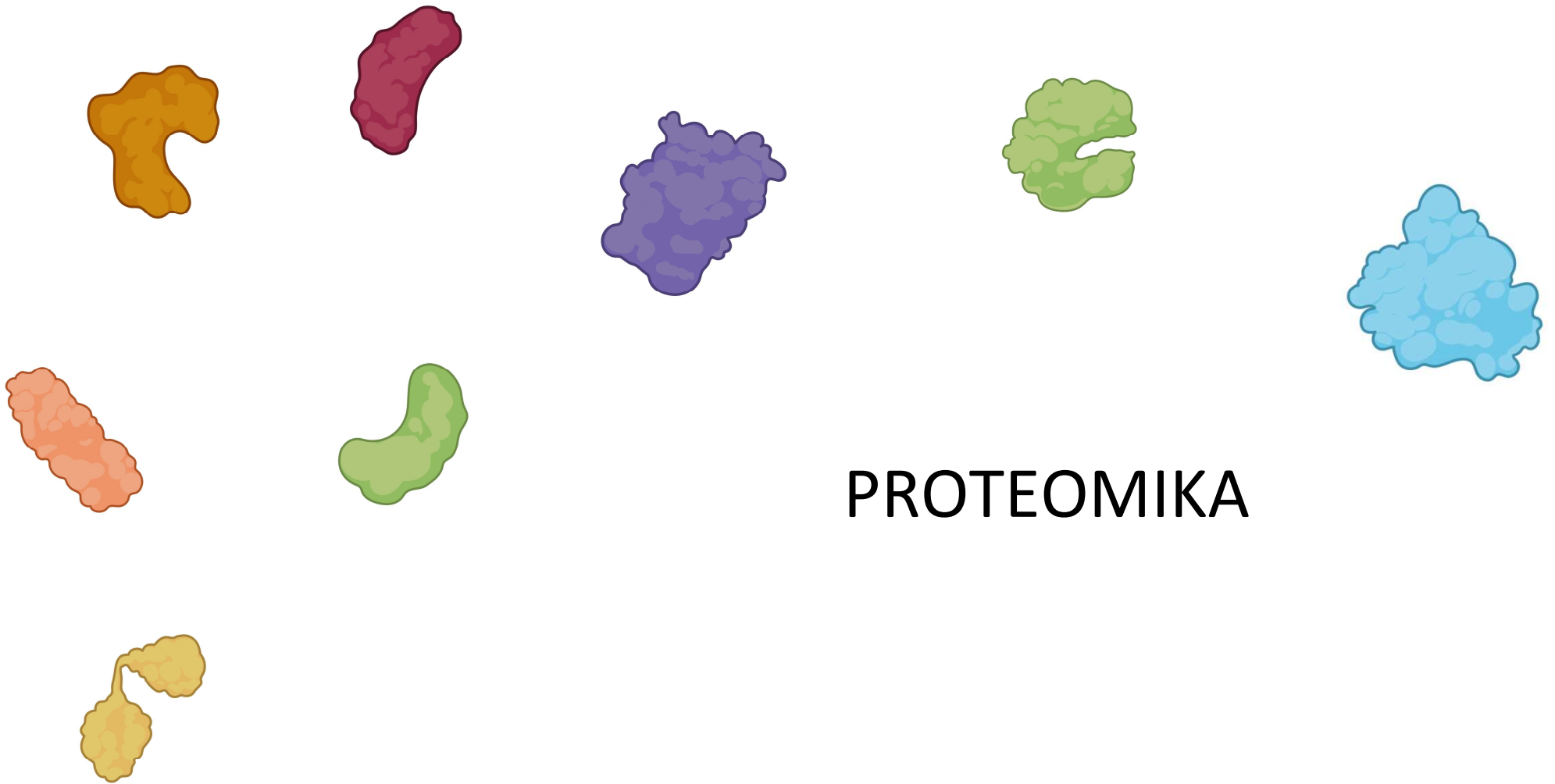
...

#proteomics far better than
#genomics for info on
current state of a cell, tissue,
organ, organism or disease ..



10:57 AM · Apr 14, 2016 · Buffer





PROTEOMIKA

PROTEOMIKA

-omika / -omics

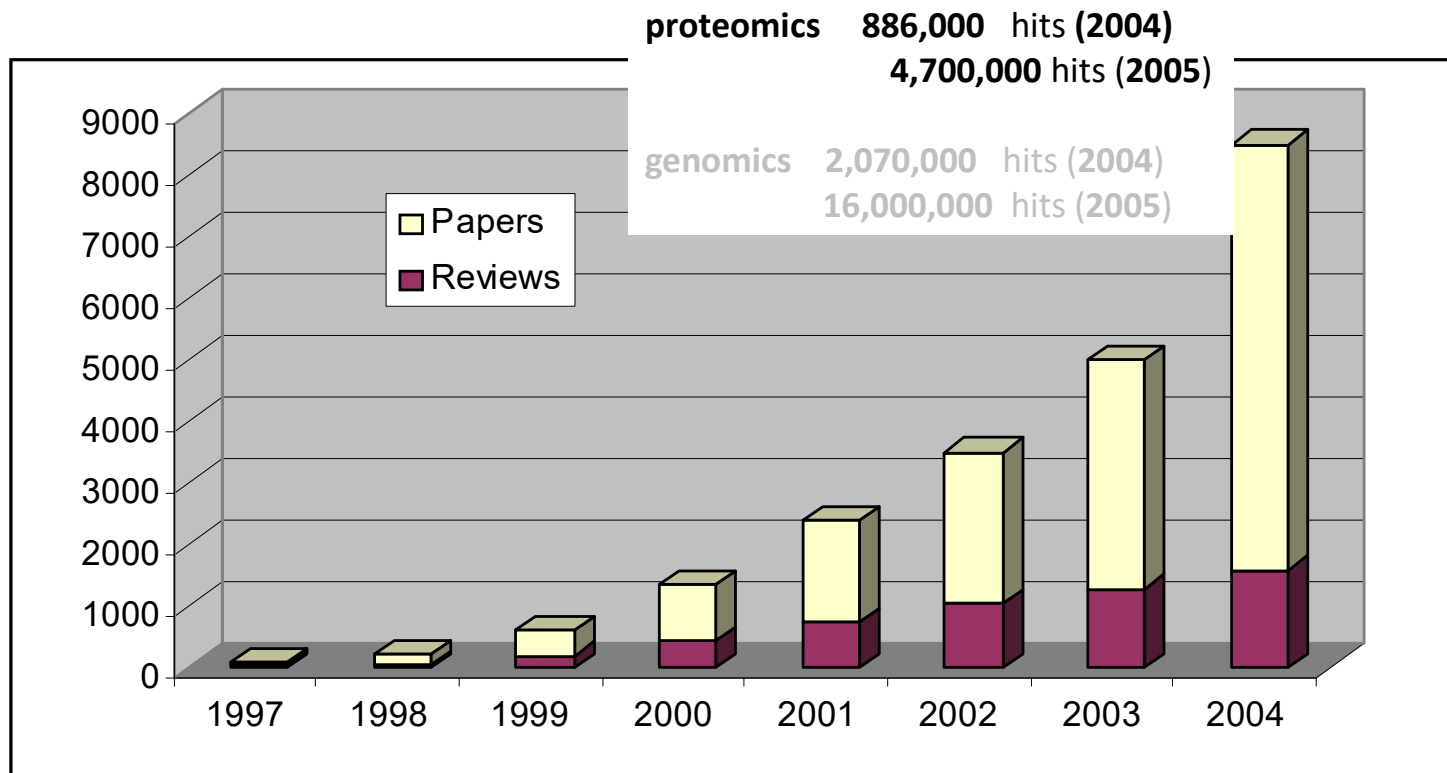
Cílem omiky je kolektivní charakterizace a kvantifikace souborů biologických molekul, které se promítají do struktury, funkce a dynamiky organismu nebo organismů.

Proteomika v odborné literatuře

1995 – pojem **PROTEOM** k pojmu GENOM z anglického „**PROTE**in equivalent of a **genOM**“

Od **220** publikací v minulém miléniu ('94-'99)

přes **34,560** publikací v prvním desetiletí nového milénia



až po současnost ...

117,323 results from Web of Science Core Collection for:

Q proteomics (All Fields)

Analyze Results

Citation Report

Create Alert

Copy query link

Publications

You may also like...

Refine results

Search within results...



Filter by Marked List

Quick Filters

- Review Article 14,027
- Early Access 597
- Open Access 56,392
- Associated Data 5,652
- Enriched Cited References 8,294

Citation Topics Meso

- 2.211 Mass Spectrometry 24,202
- 1.54 Molecular & Cell Biology - Genetics 5,046
- 1.25 Molecular & Cell Biology - Cancer, ... 4,591
- 3.4 Crop Science 3,984
- 1.42 Bacteriology 2,183

See all >

0/117,323

Add To Marked List

Export

Sort by: Relevance

1 of 2,000

1 SPS' Digest: The Swiss Proteomics Society selection of proteomics articles



[Hoogland, C; Lion, N; \(...\); Tissot, JD](#)
4th Annual Congress of the Swiss-Proteomics-Society

Aug 2005 | [PROTEOMICS](#) 5 (12) , pp.3045-3047

Despite the consolidation of the specialized proteomics literature around a few established journals, such as Proteomics, Molecular and Cellular Proteomics, and the journal of Proteome Research, a lot of information is still spread in many different publications from different fields, such as analytical sciences, M S, bioinformatics, etc. The purpose of S P S' Digest is to gather a selection of ... [Show more](#)

[Free Published Article From Repository](#) [Full Text at Publisher](#) ...

2
References

Related records

2 Virtual Labs in proteomics: New E-learning tools



[Ray, S; Koshy, NR; \(...\); Srivastava, S](#)

May 17 2012 | [JOURNAL OF PROTEOMICS](#) 75 (9) , pp.2515-2525

Web-based educational resources have gained enormous popularity recently and are increasingly becoming a part of modern educational systems. Virtual Labs are E-learning platforms where learners can gain the experience of practical experimentation without any direct physical involvement on real bench work. They use computerized simulations, models, videos, animations and other instructional tech ... [Show more](#)

[Free Full Text From Publisher](#) ...

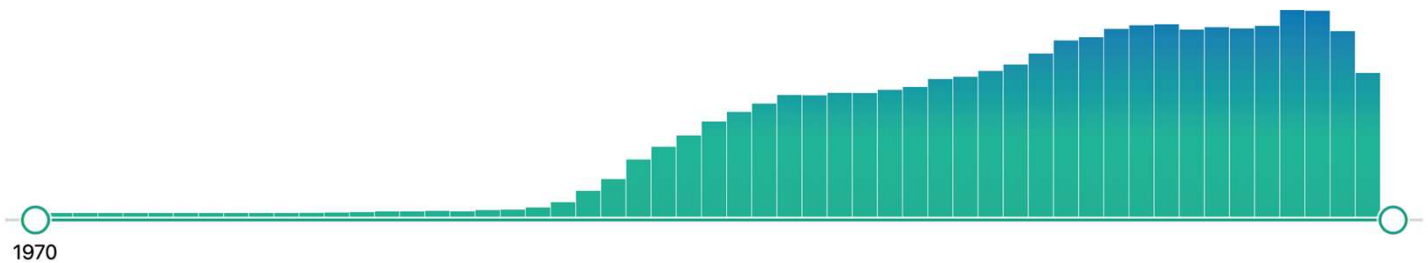
24
Citations

21
References

Related records

117,819 results

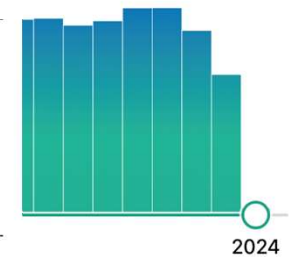
p53






Hassin, O., Oren, M. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. *Nat Rev Drug Discov* **22**, 127–144 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00571-8>

p53

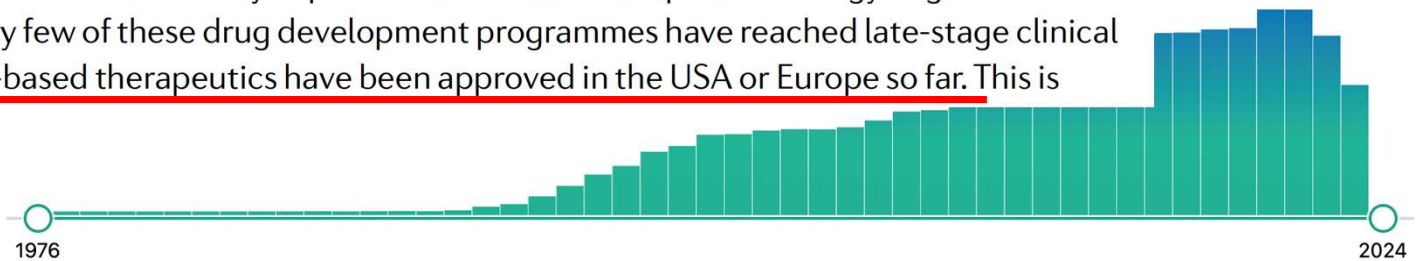
Drugging p53 in cancer: one protein, many targets



Ori Hassin  and Moshe Oren  

Abstract | Mutations in the *TP53* tumour suppressor gene are very frequent in cancer, and attempts to restore the functionality of p53 in tumours as a therapeutic strategy began decades ago. However, very few of these drug development programmes have reached late-stage clinical trials, and no p53-based therapeutics have been approved in the USA or Europe so far. This is

p53 + therapy



Přístupy k proteomickému studiu

Klasická gelová proteomika je starším přístupem založeným na separaci proteinů jedno- a dvojrozměrnou elektroforézou na gelu a jejich identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

Shotgun proteomika je obecný postup pro identifikace bílkovin, kdy je neseparovaná směs bílkovin nejprve enzymově rozštěpena nejčastěji trypsinem na směs peptidů, které jsou následně separovány vhodnou metodou (nejčastěji LC) a dále identifikovány a kvantifikovány tandemovou MS

Cílená proteomika je zaměřená na kvantifikaci vybraných proteinů v komplexních vzorcích pomocí cílených metod MS

Proteomika založená na arrayích využívá zejména imunochemické přístupy ke kvantifikaci vybraných proteinů

Funkční proteomika se zabývá nejen funkcí bílkovin, ale zejména studiem komplexních biologických procesů, jejichž pochopení má zásadní význam pro studium vývoje organismu či mechanismu a léčby nemocí.



Přístupy k proteomickému studiu

Dle způsobu provedení:

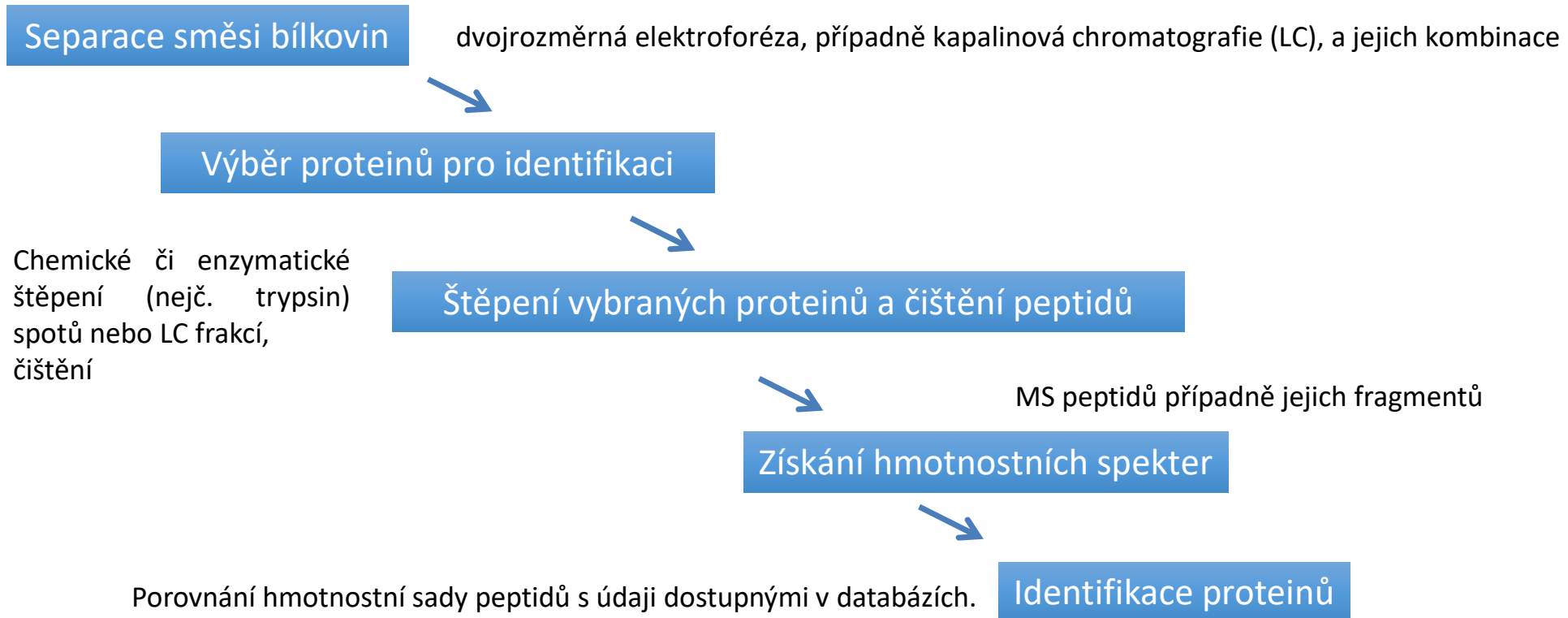
High-throughput proteomika je zaměřena na rychlé získávání údajů o přítomnosti bílkovin, což je důležité zejména pro screeningové účely ve zdravotnictví, zemědělství, kontrole potravin atd.

High-coverage proteomika se zabývá získáváním údajů o sekvenci aminokyselin včetně post-translačních modifikací bílkovin s cílem co nejvyššího pokrytí primární struktury (tj. stanovením pořadí co nejvyššího počtu aminokyselinových zbytků v bílkovině), což je důležité při studiu role bílkovin v životních procesech.

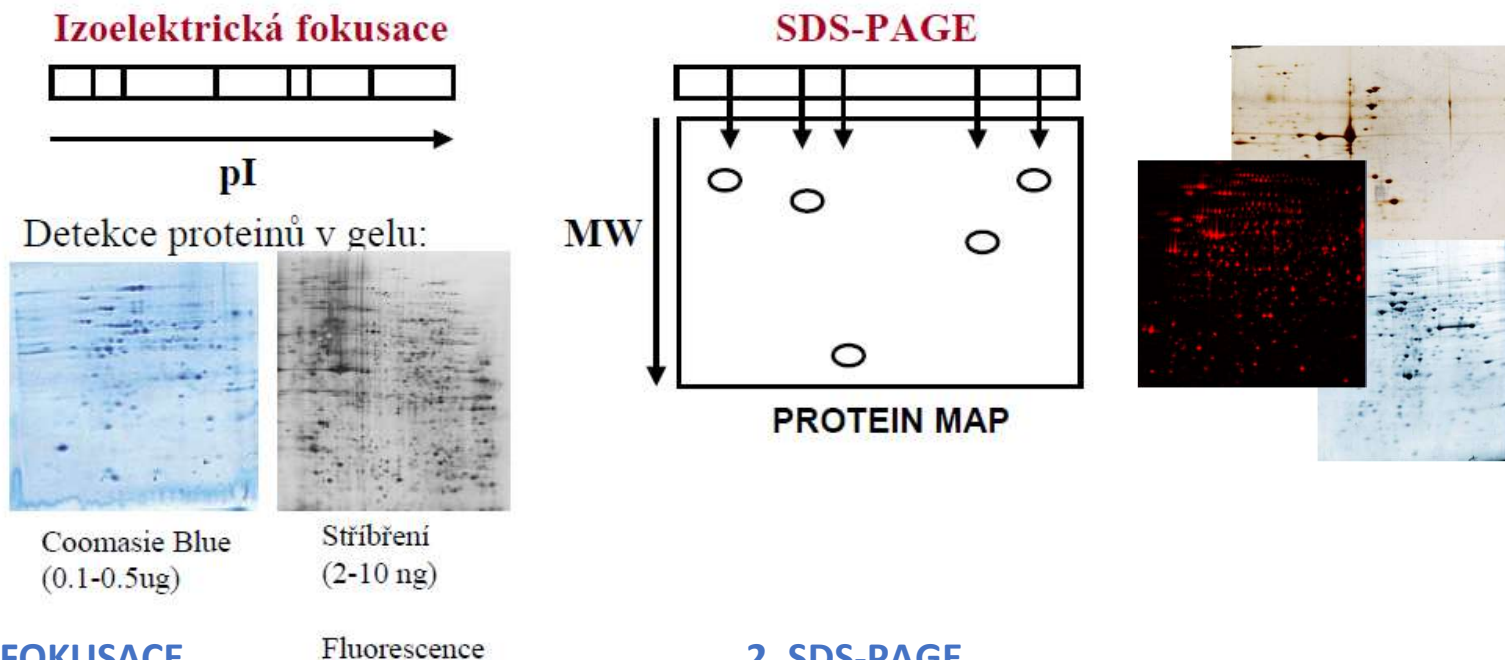


Obecné schéma klasického proteomického experimentu

- *především v rámci výzkumu*



Separace proteinů pomocí dvojrozměrné (2D) gelové elektroforézy



1. IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

- rozdělení složitých směsí proteinů v el. poli na základě jejich **isoelektrických bodů (pI)**
- je přítomen **pH gradient** – téměř výhradní použití komerčních proužků gelu s imobilizovaným pH gradientem
 - pohodlnější, lze navíc aplikovat větší objemy vzorků a množství proteinů oproti manuální přípravě pH gradientu (5 mg vs. 100 µg)

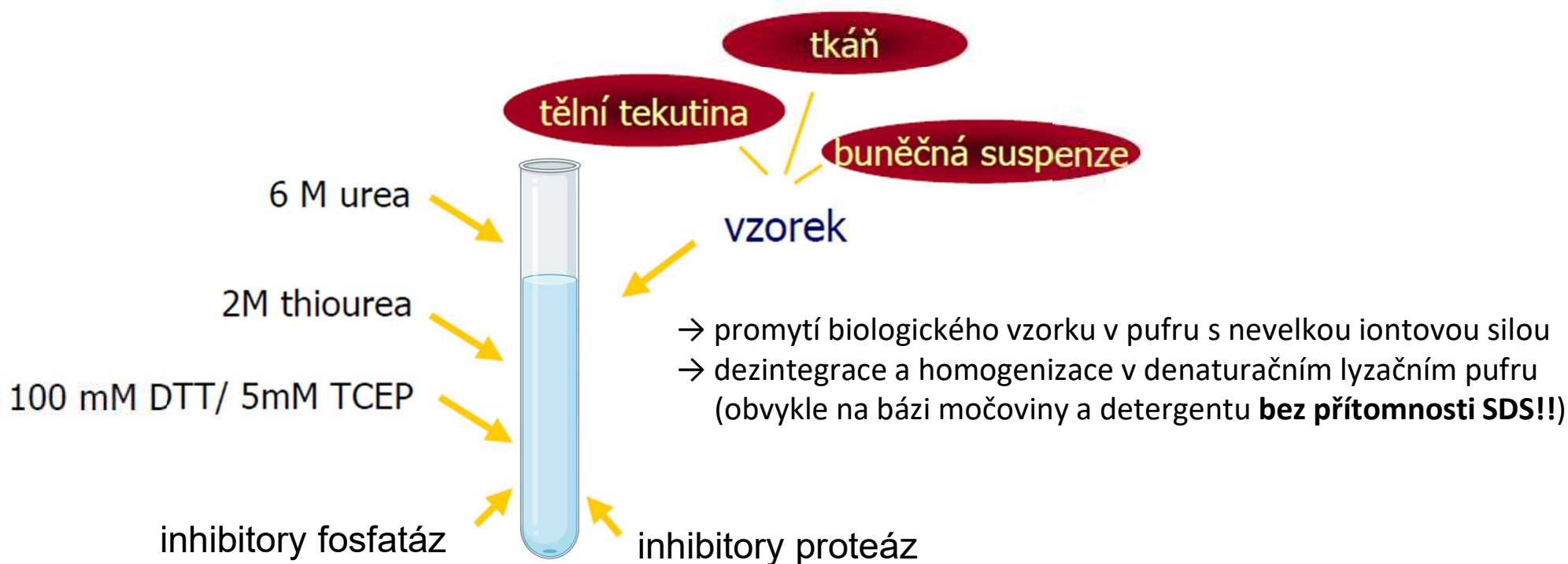
2. SDS-PAGE

- elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
- SDS v gelu dodává proteinům specifický uniformní náboj (-)
- separace pod el. proudem pouze na základě relativních molekulových hmotností tzn. \approx velikostí
- větší molekuly překonávají větší odpor, putují pomaleji

3. NÁSLEDNÉ KROKY

- vizualizace / vyříznutí z gelu a MS / western blotting

Separace proteinů pomocí dvojrozměrné (2D) gelové elektroforézy



Močovina, thiomčovina –

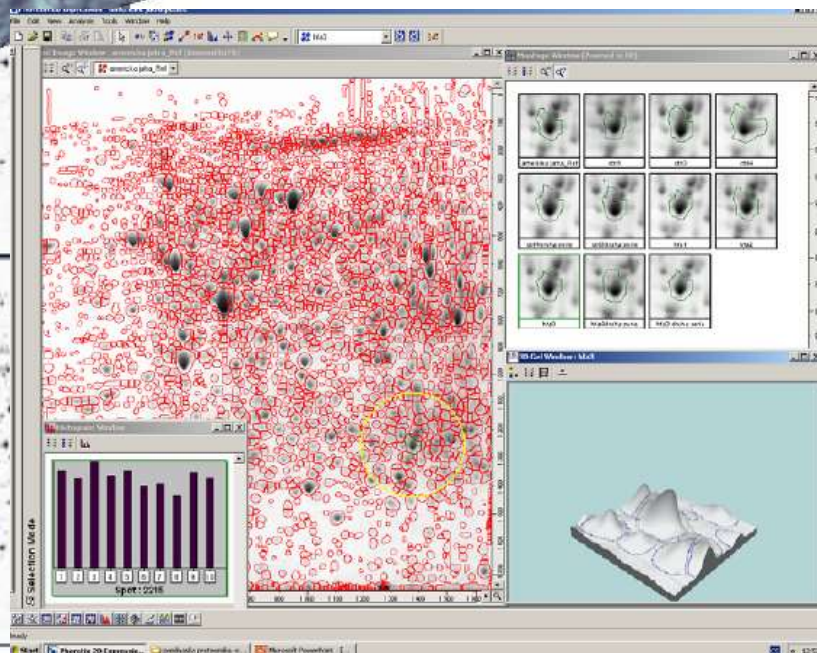
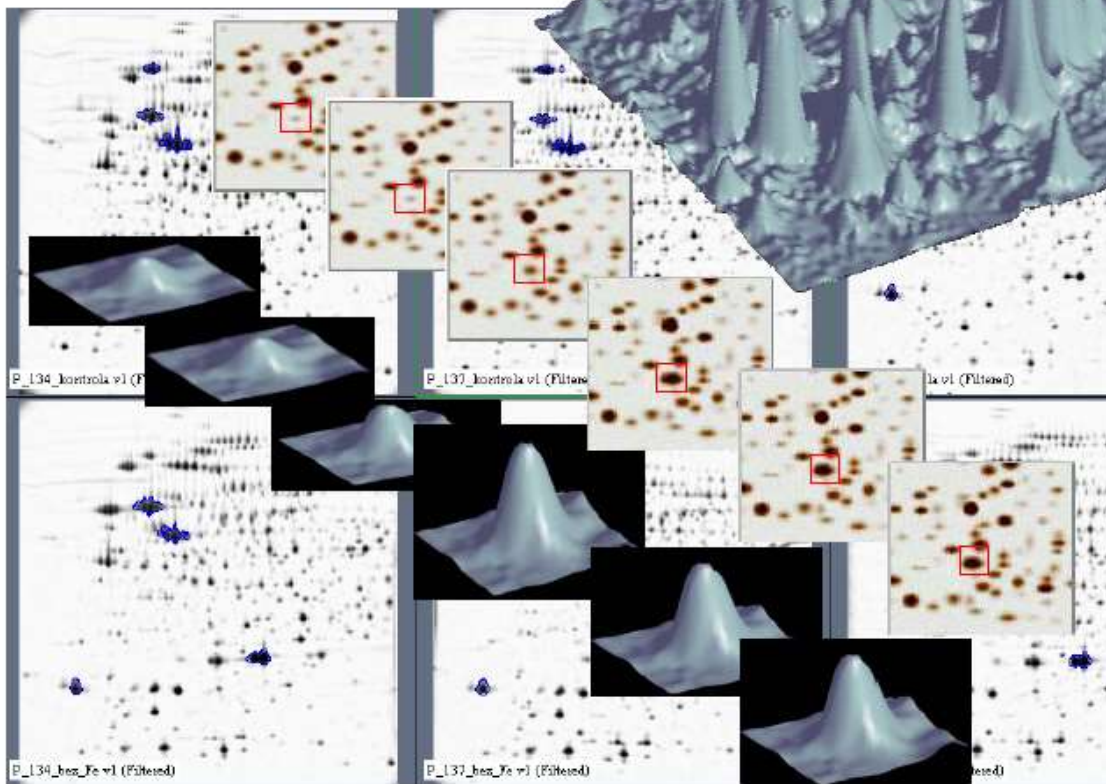
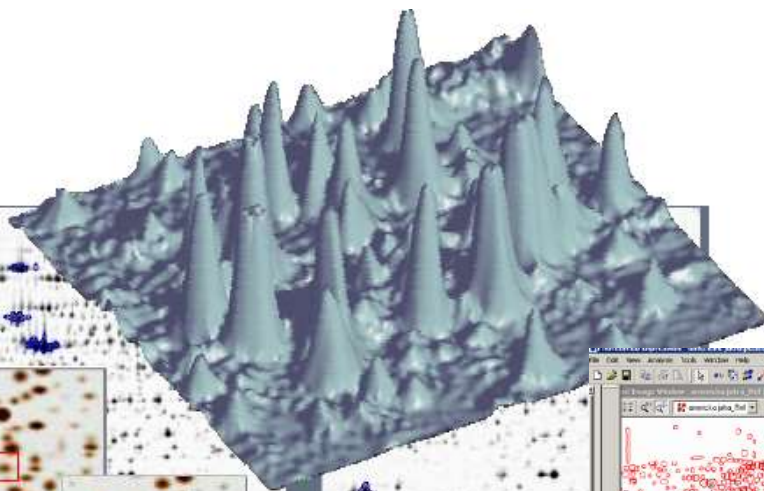
chaotropní činidlo, zvýšení rozpustnosti, denaturace bílkovin

Redukční činidlo (Dithiothreitol, DTT - Cleland's reagent) –

redukce disulfidických můstků

- stěžejní je **PŘÍPRAVA VZORKU**
- zásadní vliv na obraz proteinové mapy
- snaha o solubilizaci a desagregaci co nejvyššího počtu proteinů
- vhodné přidat krok enzymatického odstranění zbytků RNA a DNA

Separace proteinů pomocí dvojrozměrné (2D) gelové elektroforózy



Komerční:

PDQuest
Phoretix
Melanie
ProFinder
Bio Numerics
a další

Volně dostupné:
GelScape
Open2Dprot

Hmotnostní spektrometrie

- Spektrometrické metody → založené na interakci hmoty a záření
- Hmotnostní spektrometrie → založená na **interakci iontů a polí** (magnetického a elektrického)

Separace látek podle rozdílů hmotnosti (***m***) a náboje (***z***) s využitím elektrického / magnetického pole.

V hmotnostním spektrometru → elektromagnety

Určovanou fyzikální veličinou je podíl hmoty a náboje (***m/z***), při znalosti náboje umožňuje určit molekulovou hmotnost, tzn. co to je zač.

Výsledné hmotnostní spektrum → grafické znázornění intenzity fragmentu na hodnotě m/z

Potřeba vysušení a ionizace analyzovaných molekul - **měkké ionizační techniky (ESI, MALDI)** → měření makromolekulárních látek (**proteiny, lipidové komplexy, polysacharidy**)

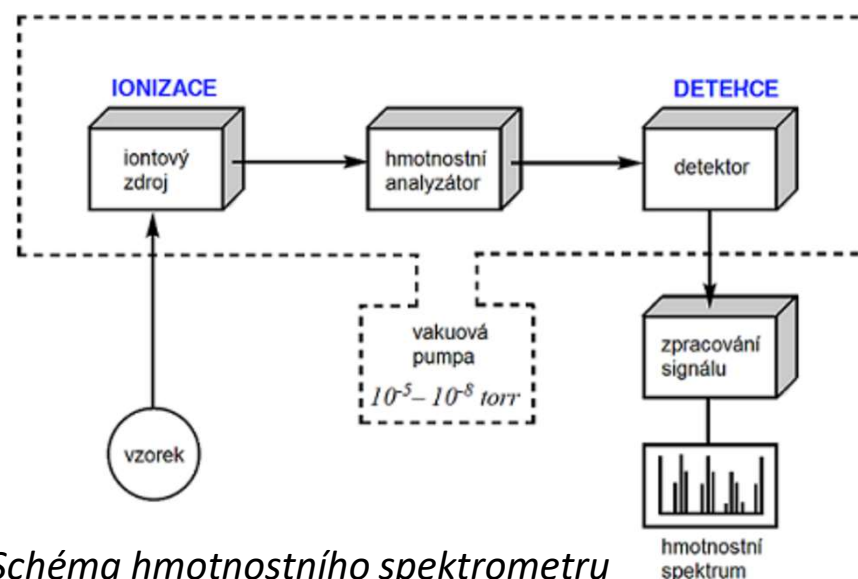


Schéma hmotnostního spektrometru

<https://theses.cz/id/ff9x41/7730580>

KROKY MS

1. IONIZACE
2. ANALÝZA/SEPARACE IONTŮ
3. DETEKCE IONTŮ

Hmotnostní spektrometrie - IONIZACE

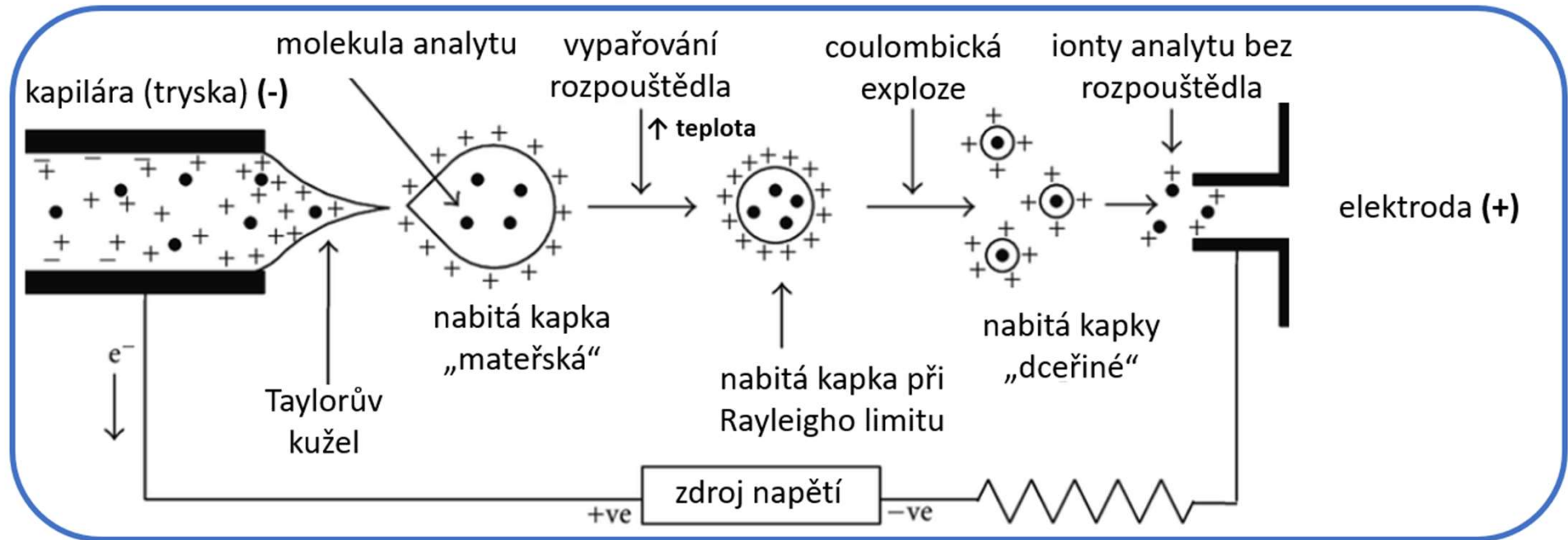
KAPALNÉ VZORKY

Elektrosprej (ESI)

- jedna z nejvýznamnějších a nejvyužívanějších metod ionizace z posledního vývoje MS
- měkká ionizační technika → nezpůsobuje fragmentaci analytu

Princip

- vodivá kapilára (vstup do MS) (-) a elektroda (+) (může být i opačně) jsou spojeny el. obvodem
- (+) ionty z roztoku jsou přitahovány (-) stěnou kapiláry → tvoří se nabitá kapka → uvnitř kapky ionty (-) odpuzovány stěnou kapiláry (-) a přitahovány elektrodou (+) → kapky tryskají z kapiláry
- v určitém momentě vyrovnání sil povrch. napětí kapky a odpudivé síly nábojů (Rayleigho limit)



Hmotnostní spektrometrie - IONIZACE

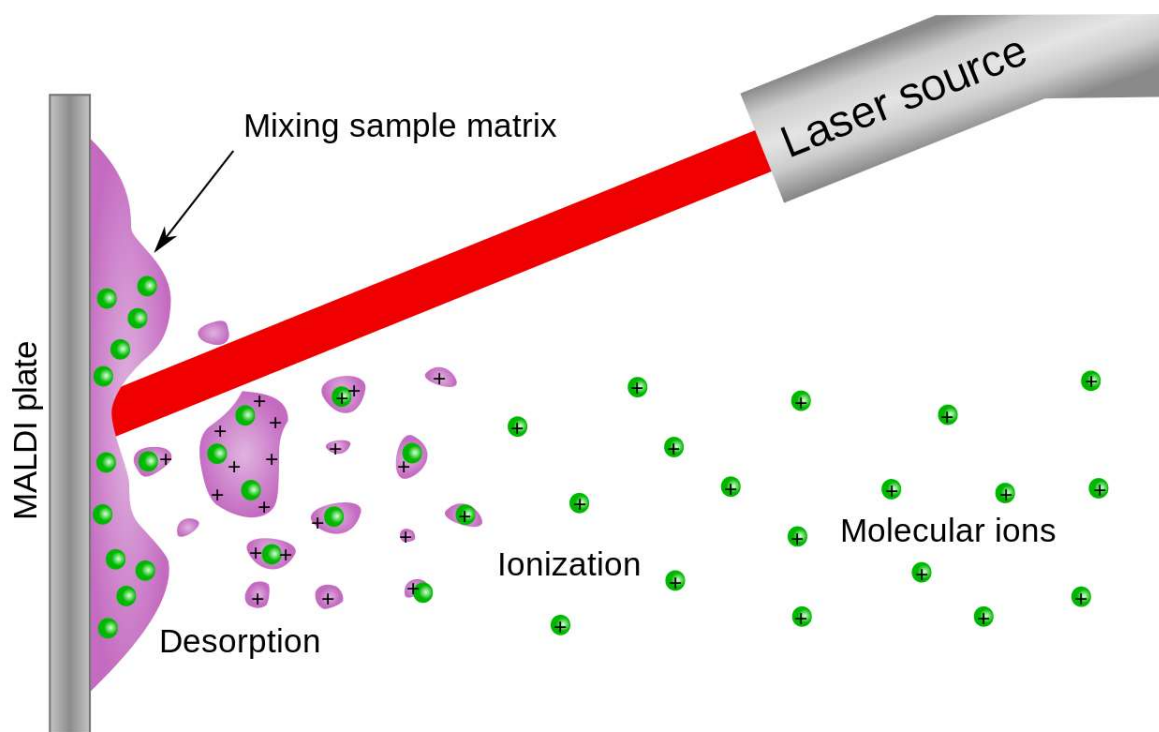
PEVNÉ VZORKY

MALDI

- **M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption **I**onization
- desorpce a ionizace laserem za asistence matrice

Princip

- po nanesení je terčičk přenesen do MS, zdroj energie pro ionizace je UV laser (nejč. dusíkatý laser, 337 nm)
- krátký pulz laseru (3 ns) → fotony dopadnou na vzorek:
 - dochází k **1.** částečné přeměně na tepelnou energii → částečné odpaření vzorku i matrice
 - **2.** jejich částečné absorpci molekulami matrice → excitace → zprostředkovaná ionizace molekul analytu



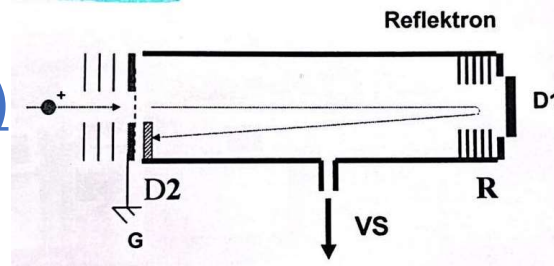
- na terčičku je směs vzorku + matrice
- matrice je nízkomolekulární a je jí relativně více než vysokomolekulárního vzorku
- vznik směsi iontů → působení el. pole mezi vodivým terčičkem a vstupem do analyzátoru → ionty vstupují do analyzátoru

Hmotnostní spektrometrie - ANALÝZA

NEJEDNODUŠŠÍ ANALYZÁTOR

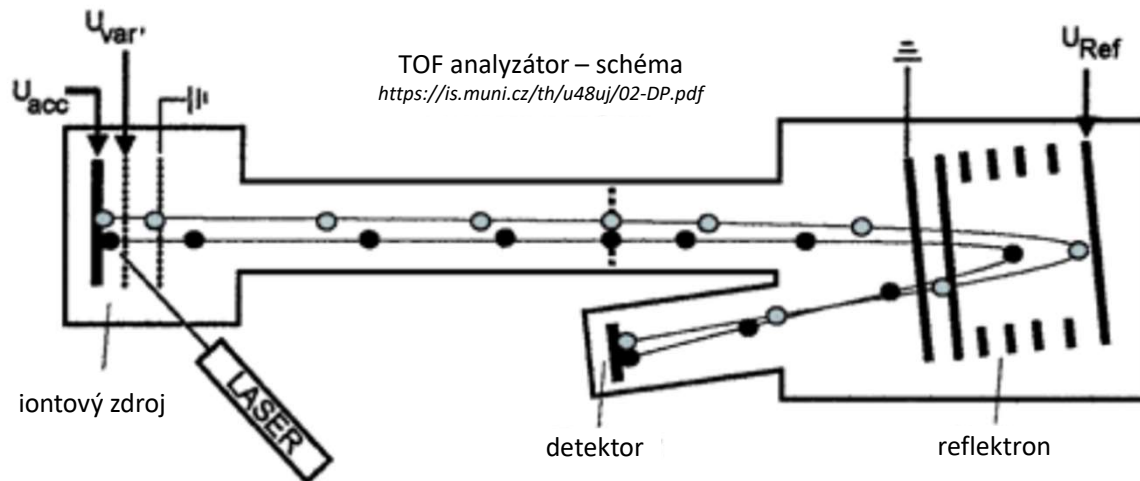
Průletový analyzátor (TOF)

- Time-Of-Flight
- stanovení m/z na základě doby letu iontu
- funguje pulzně, vhodný pro pulzní ionizační techniky jako je MALDI → MALDI-TOF
- technika se dlouho nepoužívala, dnes ale k dispozici precizní detektory rozdílů v rychlosti iontů



Princip

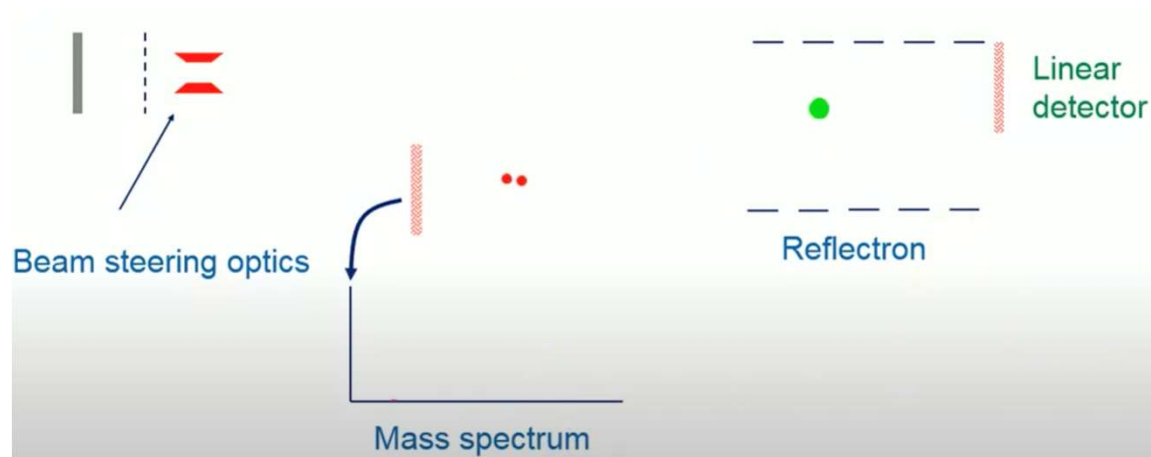
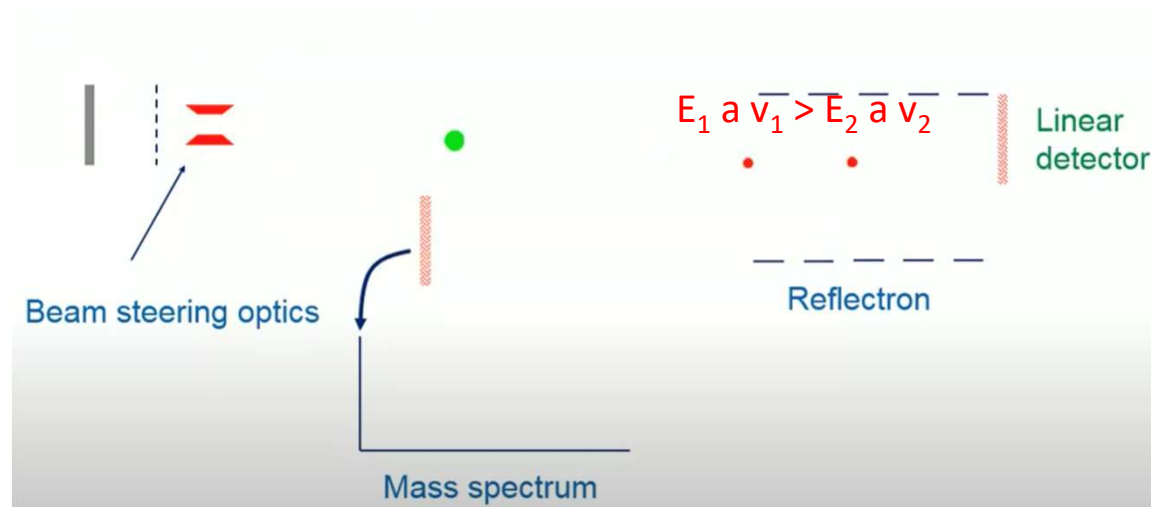
- letová trubice s vakuem, bez pole, ionty před vstupem urychleny → $E_k = 1/2mv^2$ → všem iontům je dána stejná E_k , liší se v hmotnosti (m) a rychlosti (v) → v je zaznamenávána detektorem, m iontu je odvozena
- dva moduly:
 - 1. ionty letí přímo a dopadají na detektor
 - 2. použití **REFLEKTRONU**
 - ionty jsou na konci letové trubice odraženy elektrostatickým odražečem (reflektronem)
 - letí zpět, dopadají na sekundární detektor, čímž se prodlouží dráha letu →
- → FOKUSAČNÍ EFEKT
- ↑ rozlišení → nevýhodou je prodloužení letové trubice, nejdelší mají až 3 m
- to souvisí také s problémy s vakuem → čím větší prostor k evakuaci, tím větší nároky na vakuová čerpadla



Hmotnostní spektrometrie - ANALÝZA

NEJEDNODUŠŠÍ ANALYZÁTOR

Průletový analyzátor (TOF)

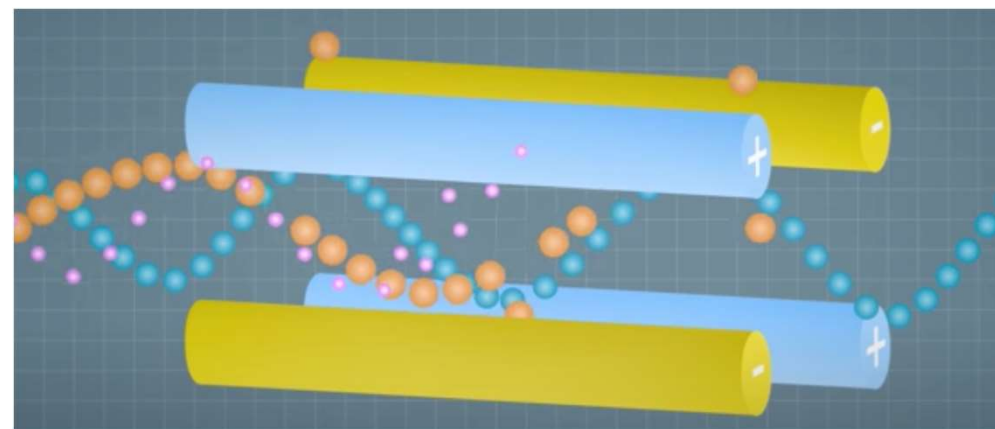
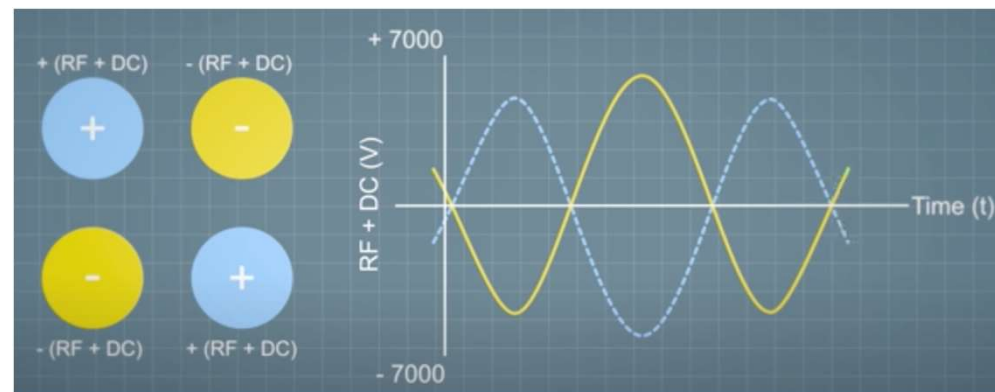
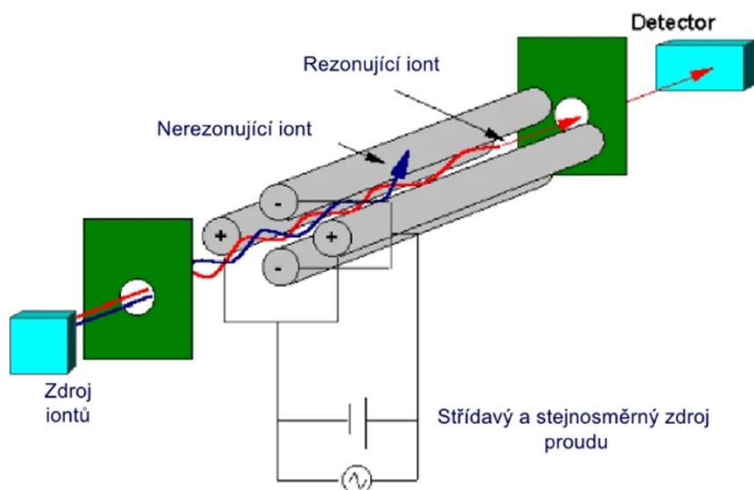


Hmotnostní spektrometrie - ANALÝZA

DALŠÍ ANALYZÁTORY

Kvadrupól

- laditelný filtr – v daném okamžiku propouští **pouze ionty o určitém m/z**
- nejpoužívanější
- 2 a 2 vodivé tyče (asi 25 cm), vodivě spojené, vloženo střídavé napětí + superponace stejnosměrné složky → jejich poměr stále stejný
- **princip:** iont vletí mezi 4 tyče, je jednou z nich přitahován → letí k ní → než tam doletí tyč přepne polaritu → takto pokračuje celou dobu → vzniká šroubovicová trajektorie



1 MHz

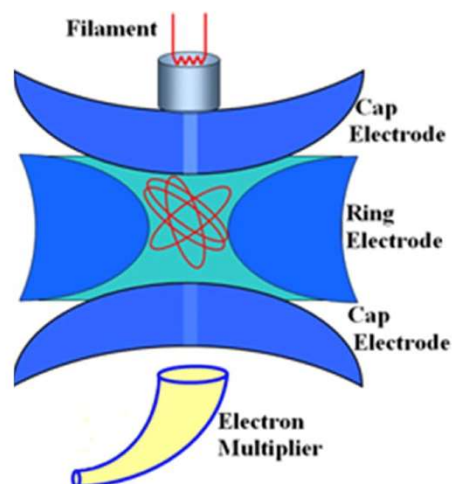
Stabilita iontu v tomto poli závisí na poměru m/z

Hmotnostní spektrometrie - ANALÝZA

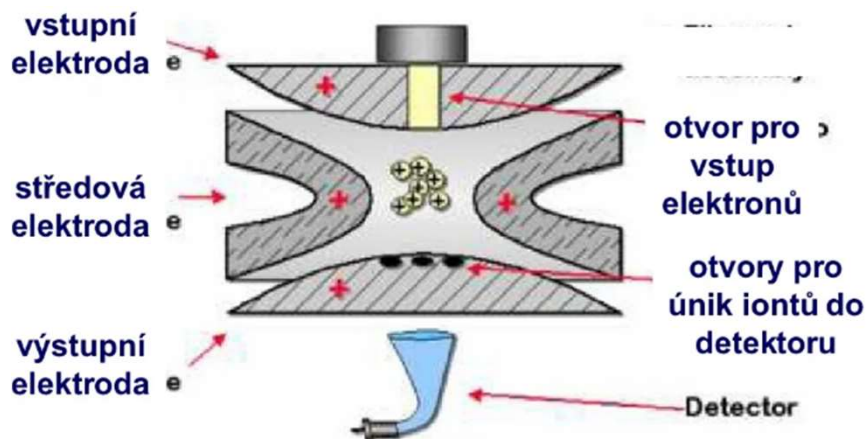
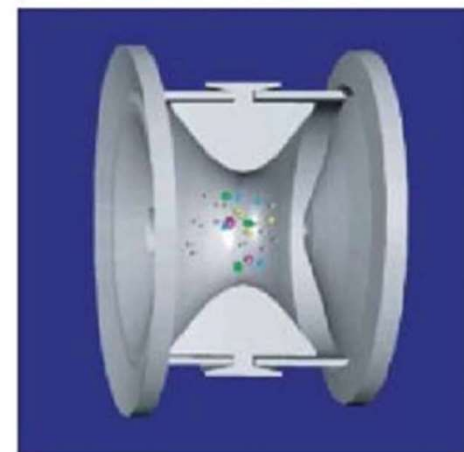
DALŠÍ ANALYZÁTORY

Iontová past (IT)

- krycí elektrody + prstencová (středová) elektroda
- **princip:** vkládá se střídavé radiofrekvenční napětí na prstencové elektrodě v základním módu
- díky němu prstencová elektroda střídavě přitahuje a odpuzuje ionty → ty obíhají osmičkovou trajektorií, soustřeďovány ve středu IT, klesá jim E_k
- posléze jsou z IT vypuzeny → dopad na detektor → generují signál



3D quadrupole ion trap



- ionty jsou krátkým napěťovým pulzem přivedeny do pasti vstupním otvorem koncové elektrody
- vhodnými poměry napětí vloženého na kruhovou a dvě koncové elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř pasti
- postupnou změnou napětí jsou podle jejich m/z vypuzovány na detektor výstupním otvorem

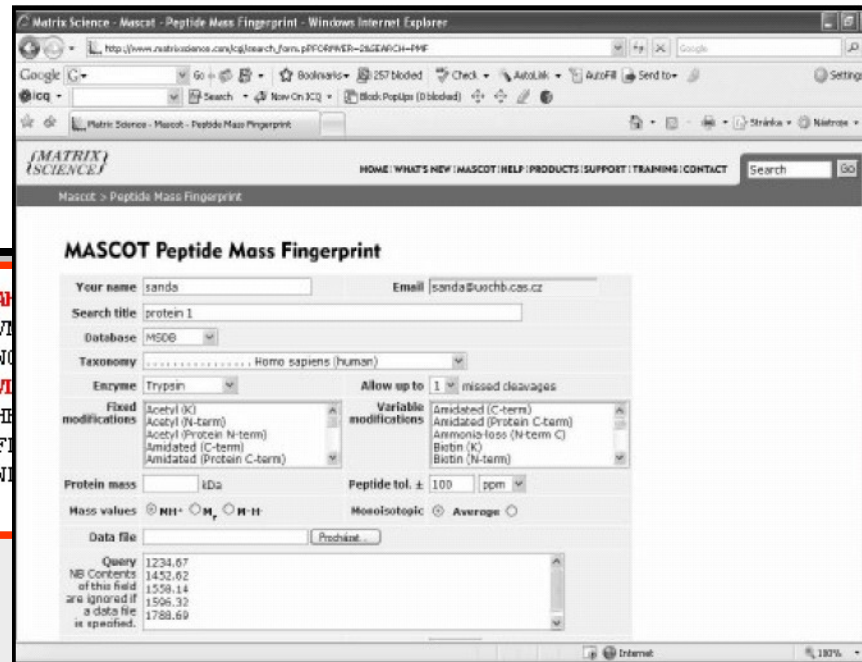
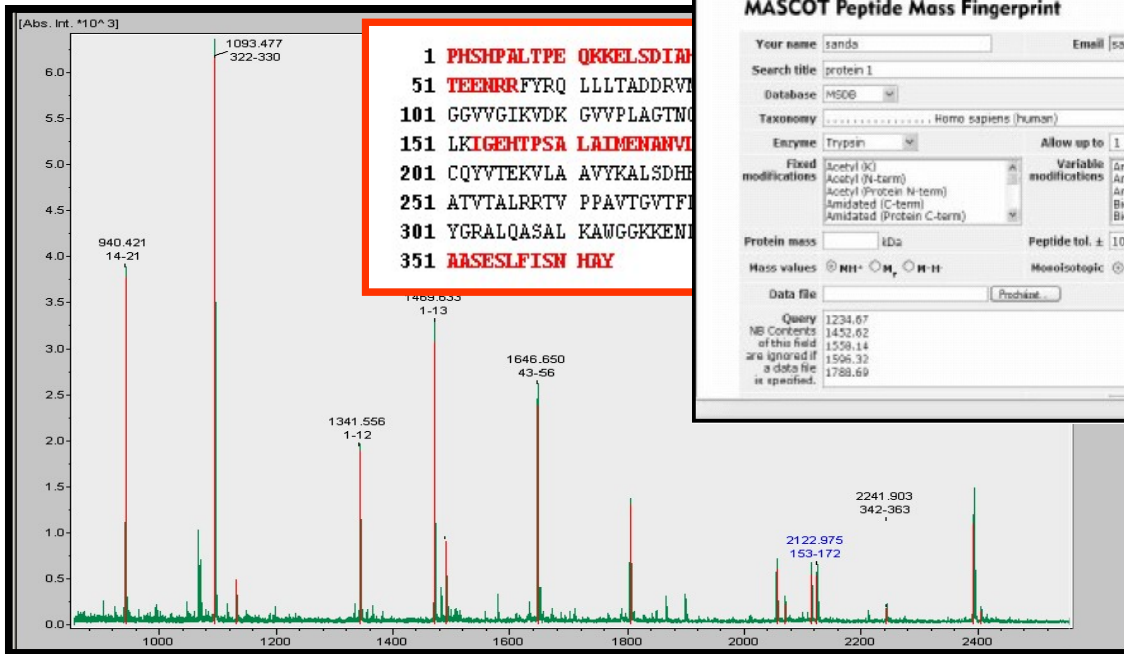
Peptidové mapování (Peptide Mass Fingerprinting - PMF)

- Srovnání MS peptidového spektra s informacemi v databázích (AMK sekvence → teoretické štěpy)

MALDI-TOF

Interpretace MS dat

Programy : Mascot,
ProteinProspector



Databáze:
NCBI
Swissprot

RUTINNÍ VYUŽITÍ MALDI-TOF:

Oddělení klinické mikrobiologie

Analýza směsi peptidů uvolněných z bakteriálních povrchových struktur, svým složením specifickou pro danou bakterii.

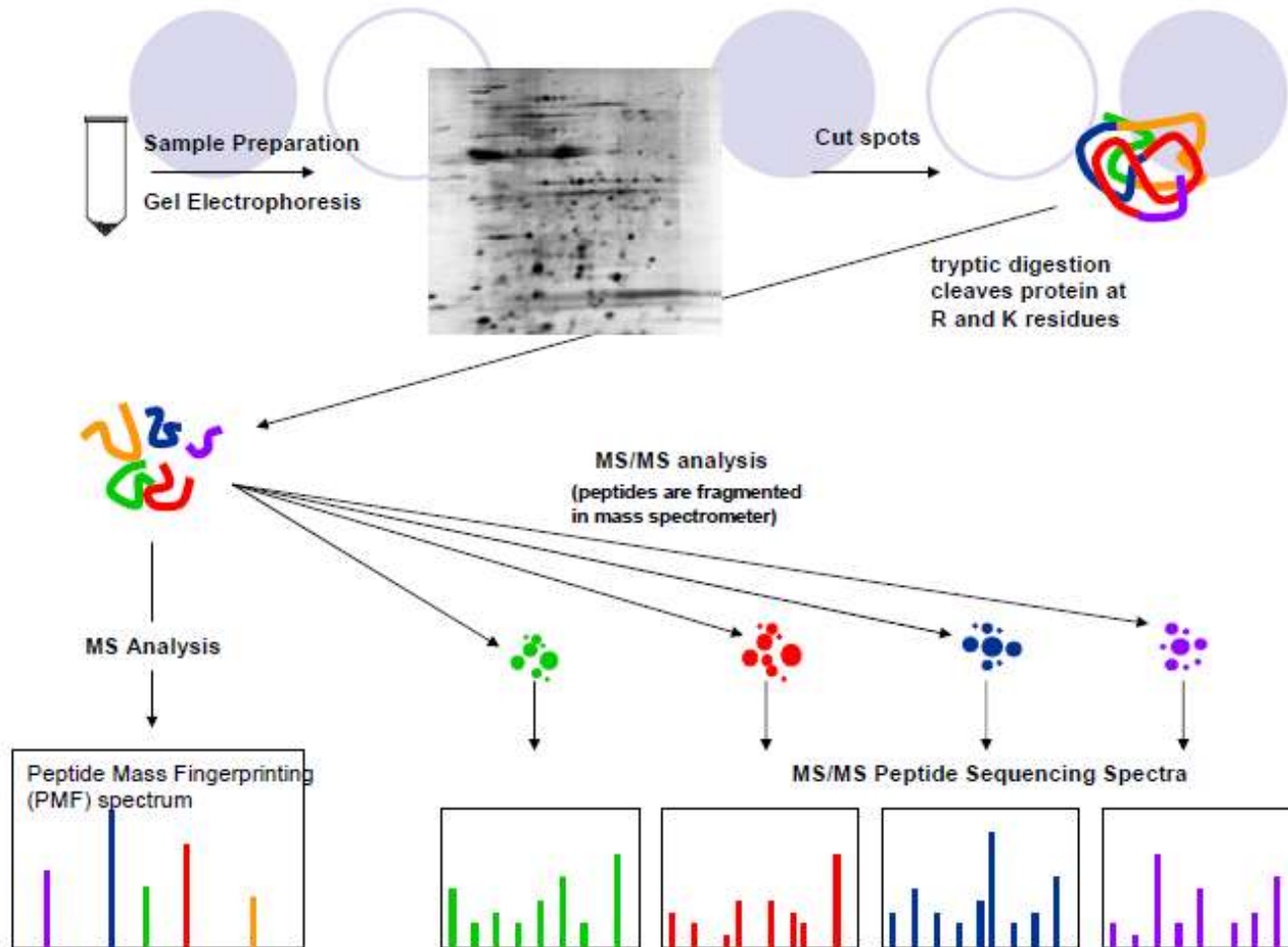
MALDI-TOF analyzuje spektrum peptidů a software je srovná s databází spekter bakterií.

Spektra tvoří jednotlivé vrcholy, které velikostí a intenzitou odpovídají detekovaným proteinům unikátním pro danou bakterii.

Rod i druh bakterie identifikujeme s procentuálním vyjádřením míry shody spektra s databází.

Rychlé a jednoduché provedení.

Tandemová hmotnostní spektrometrie sekvenování peptidových fragmentů



- vybraný ion podrobíme excitaci (nejčastěji srážkám s inertním plynem - tzv. kolizní plyn), čímž může dojít k rozpadu tohoto iontu na fragmentové ionty, jejichž hmotnostní spektrum změříme

- MS/MS spektrum bude obsahovat pouze fragmentové ionty vzniklé rozpadem vybraného prekurzoru a žádné nečistoty

- + citlivost
- nákladnost

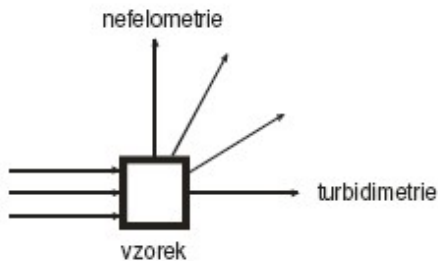
Jiné klinické aplikace detekce proteinů / glykoproteinů

Turbidimetrie / Imunoturbidimetrie

Nefelometrie / Imunonefelometrie

Stanovení imunoglobulinů G, M a A v séru a plasmě, stanovení C-reaktivního proteinu

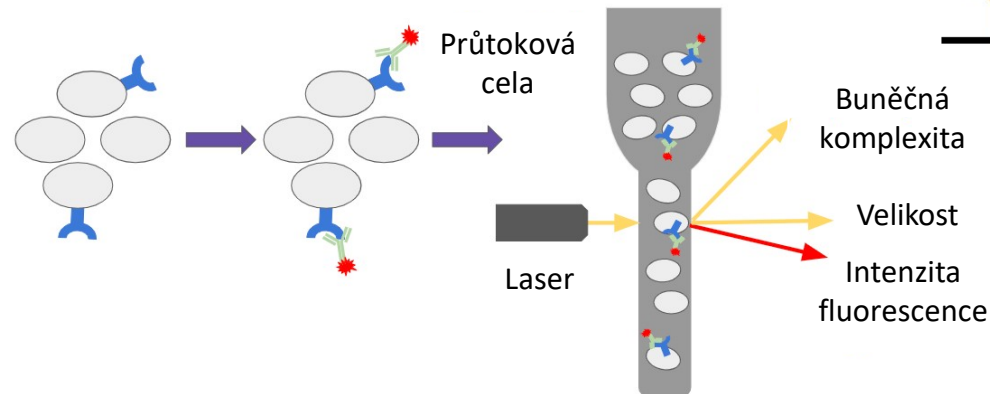
Princip: Měření zákalu vytvořeného interakcí měřeného analytu se specifickou protilátkou → tvorba imunokomplexů → zákal



Flow cytometrie

Diferenciální diagnostika leukemií a lymfomů, nepostradatelná pro transplantační program periferních kmenových buněk a kostní dřeně

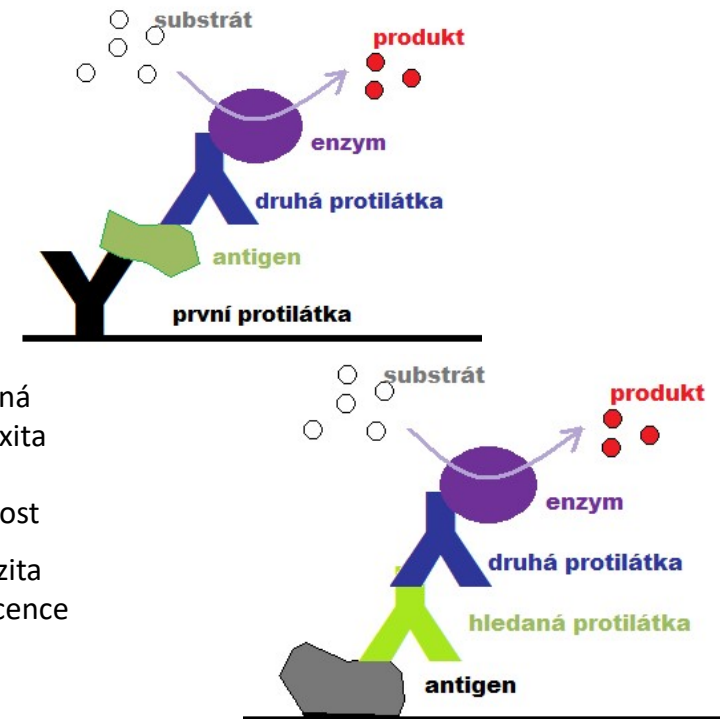
Princip: Antigeny sledovaných buněk označeny monoklonálními protilátkami konjugovanými s různými fluorochromy, jež jsou excitovány laserem a jejichž emisní signály jsou snímány a následně digitálně zpracovány



ELISA

Diagnostika původců onemocnění, detekce protilátek

Princip: Založeno na vysoce specifické vazbě protilátka-antigen



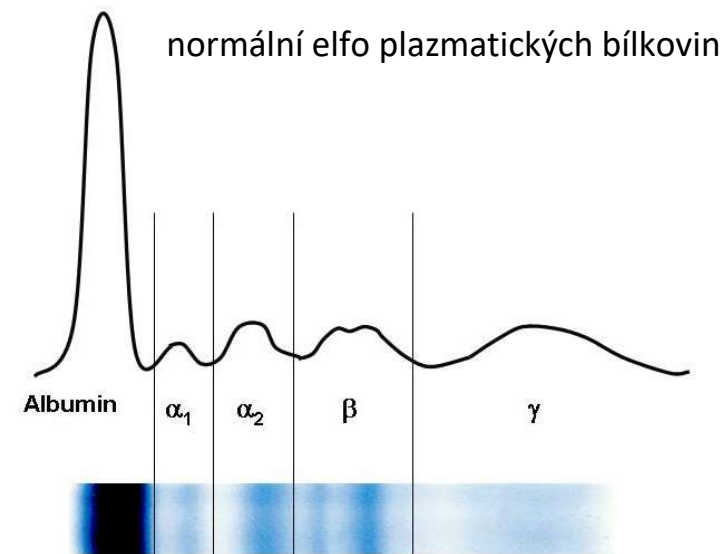
Jiné klinické aplikace detekce proteinů / glykoproteinů



Monoklonální gamapatie u plazmocelulárního (mnohočetného) myelomu

- stanovení **paraproteinu (monoklonálního imunoglobulinu) v krvi** – elektroforéza plazmatických bílkovin, koncentrace paraproteinu v séru je obvykle > 30 g/l,
- **stanovení volných řetězců (FLC)** – nejcitlivější metoda, odhalí i nesekretorický myelom, kdy stanovení paraproteinu by vyšlo negativně, normální poměr lehkých řetězců kappa:lambda je 2:1, v případě myelomu je to například 350:1
- stanovení **Bence Jonesovy bílkoviny** v moči

Princip elektroforézy: Využívá odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli. Na principu rozdílných elektroforetických mobilit se při ní dělí nabitě molekuly (ionty).



Jiné klinické aplikace detekce proteinů / glykoproteinů

Imunohistochemie (IHC) v patologii

- histologická technika barvení histologických preparátů, která umožňuje znázornit přítomnost v ideálním případě jedné konkrétní látky pomocí specifických protilátek

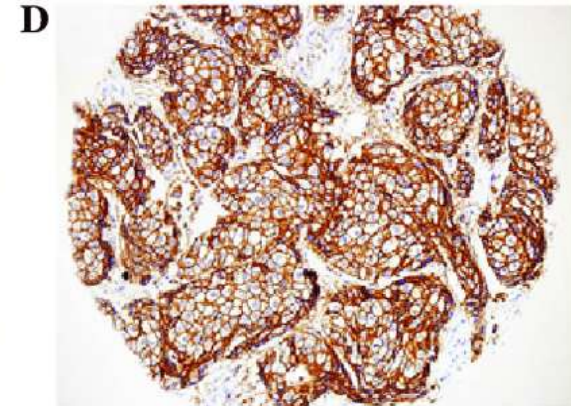
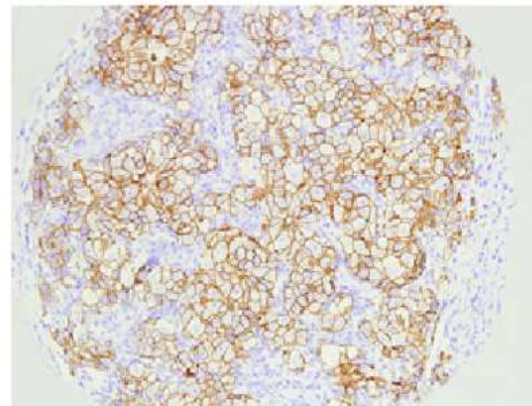
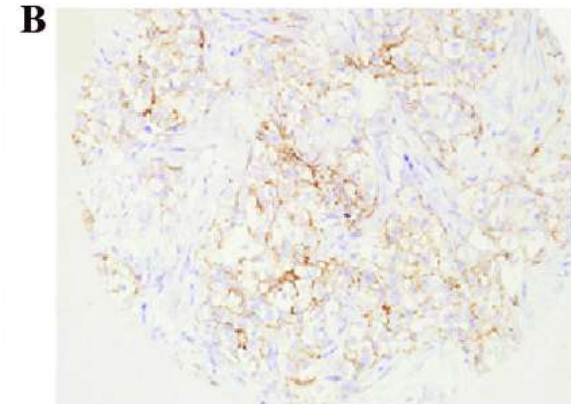
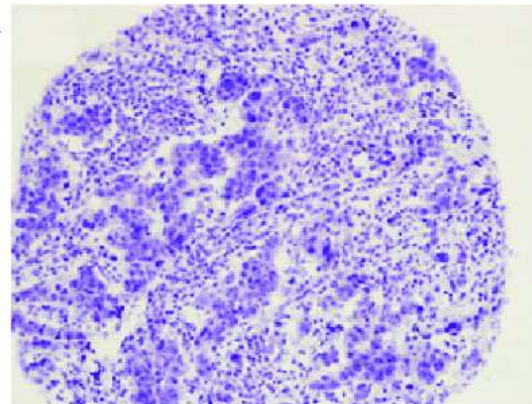
Například:

- stanovení přítomnosti tzv. proliferačního antigenu Ki67 exprese receptoru HER-2 u karcinomu prsu (proliferační aktivita)
- rutinní vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů v nádorech prsu, kde přítomnost má význam nejen pro posouzení biologického chování, ale i význam pro volbu terapie
- rozlišení jednotlivých typů lymfomů, přítomnost některých povrchových antigenů může být definující

Princip: Obvykle tzv. nepřímé imunochemické barvení, při kterém se v prvním kroku na tkáňový řez naváží protilátky proti konkrétním strukturám a ve druhém kroku se použijí protilátky se značkou (např. s enzymem peroxidázou), které se váží na protilátky z prvního kroku

Expese proteinu Her-2 detekovaná pomocí IHC

A – negativní; B – expese Her-2 +1; C – expese Her-2 +2; D – expese Her-2 +3



Jiang et al. (2014)

ProteinChips and SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization)

byla definována na počátku devadesátých let

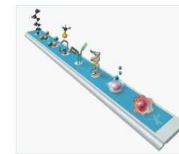
1) rozšířením MALDI-TOF-MS

2) metoda desorpce a ionizace netěkavých látek

3) měření proteinů v lineárním módu aktivní účast povrchu čipu při extrakci, prezentaci a strukturální modifikaci daného vzorku



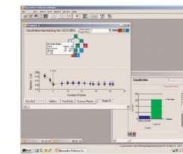
The ProteinChip® Company



ProteinChip Arrays
» Separation



ProteinChip Reader
» Detection



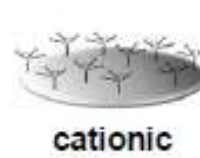
ProteinChip Software
» Analysis



hydrophobic



anionic



cationic



IMAC

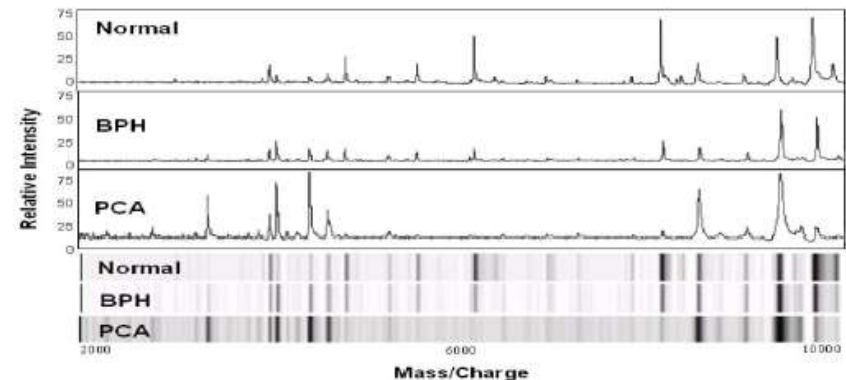


normal phase

Rozdíly mezi metodami MALDI a SELDI

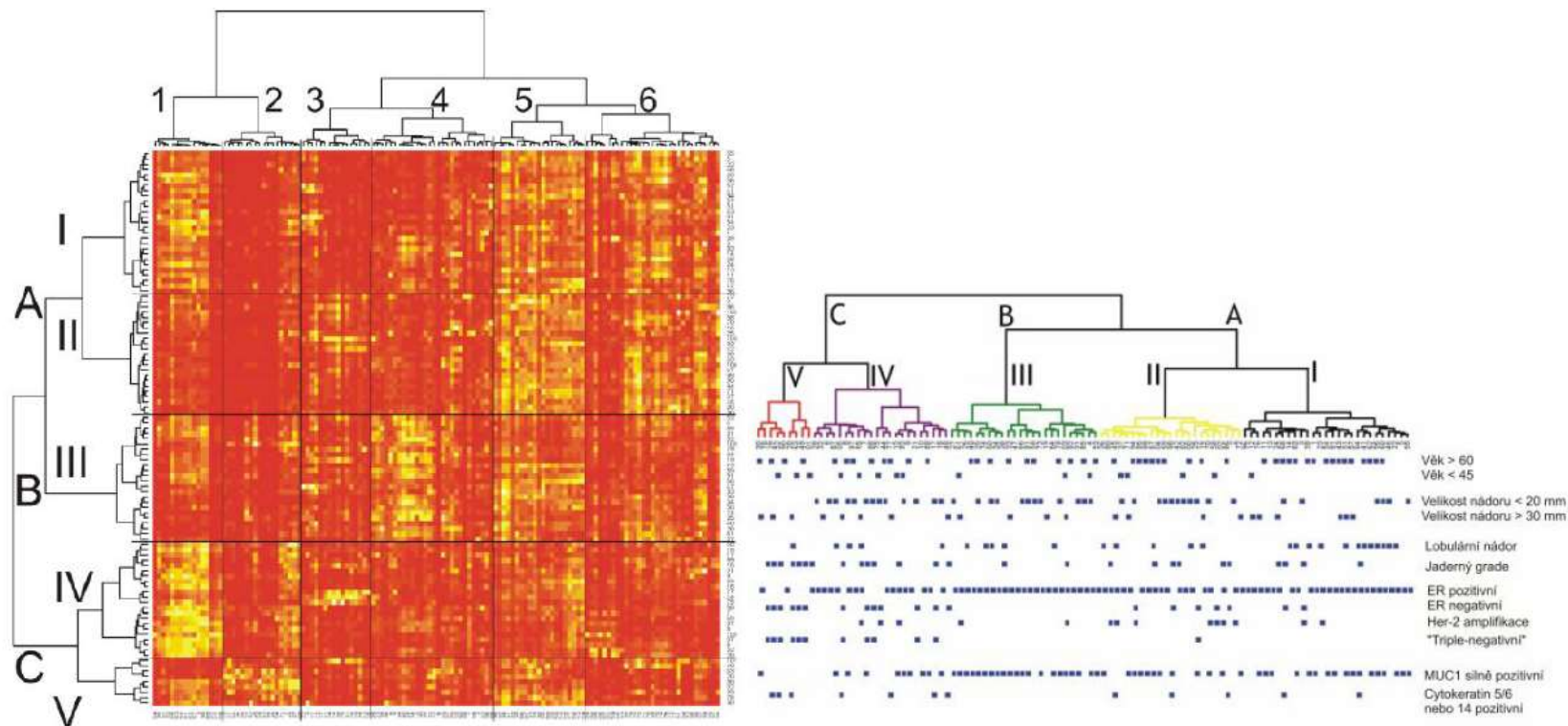
1) v prvotním zpracování samotného vzorku (inertní versus aktivní povrchy)

2) softwarové vyhodnocení získaných dat (hledání biomarkerů)



ProteinChips and SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization)

Proteinové profily získané metodou SELDI umožňují rozdělit pacientky s karcinomem prsu do skupin analogicky jako u DNA čipů



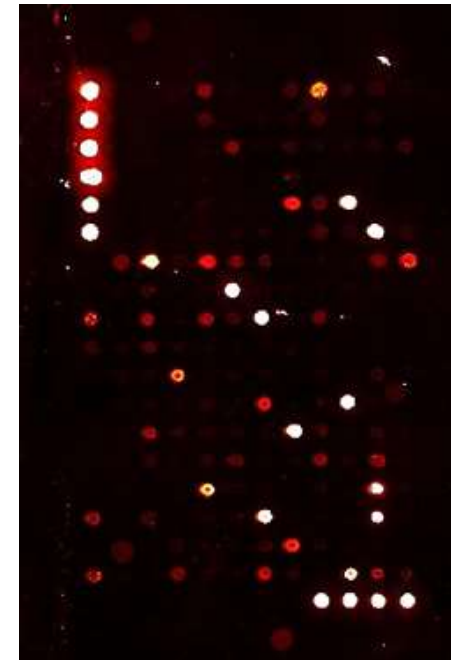
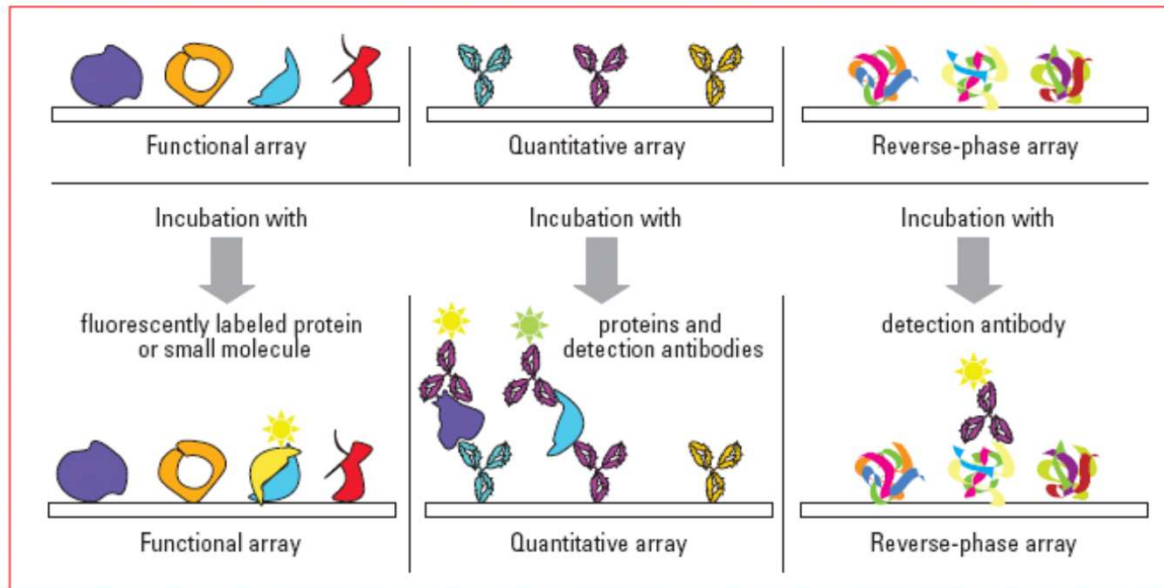
Brožková et al., 2008

Proteinové Arrays

Protilátkové microarrays : kvantitativní array vazba proteinu na imobilizovanou protilátku → detekce sendvičovou metodou (fluorescenčně značená protilátka)

Reverzní array : spotované lyzáty probované vždy jednou protilátkou

Funkční array – spotované purifikované proteiny probované fluorescenčně značenou látkou (protein, DNA, jiné biologicky aktivní molekuly)



Tkáňové Arrays (Tissue MicroArrays – TMA)



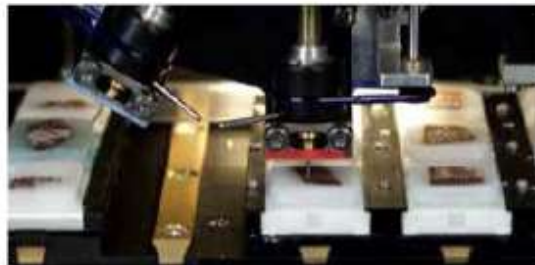
Collection of tissues



Annotation



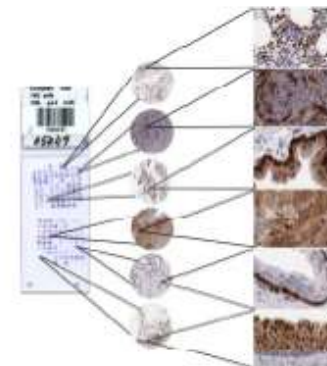
TMA design



TMA construction



TMA sectioning



Analysis

Děkuji za pozornost.