



Oddělení funkční genomiky a proteomiky  
Národní centrum pro výzkum biomolekul  
Přírodovědecká fakulta MU



středoevropský technologický institut  
BRNO | ČESKÁ REPUBLIKA

# Proteomika

## Proteomické aplikace

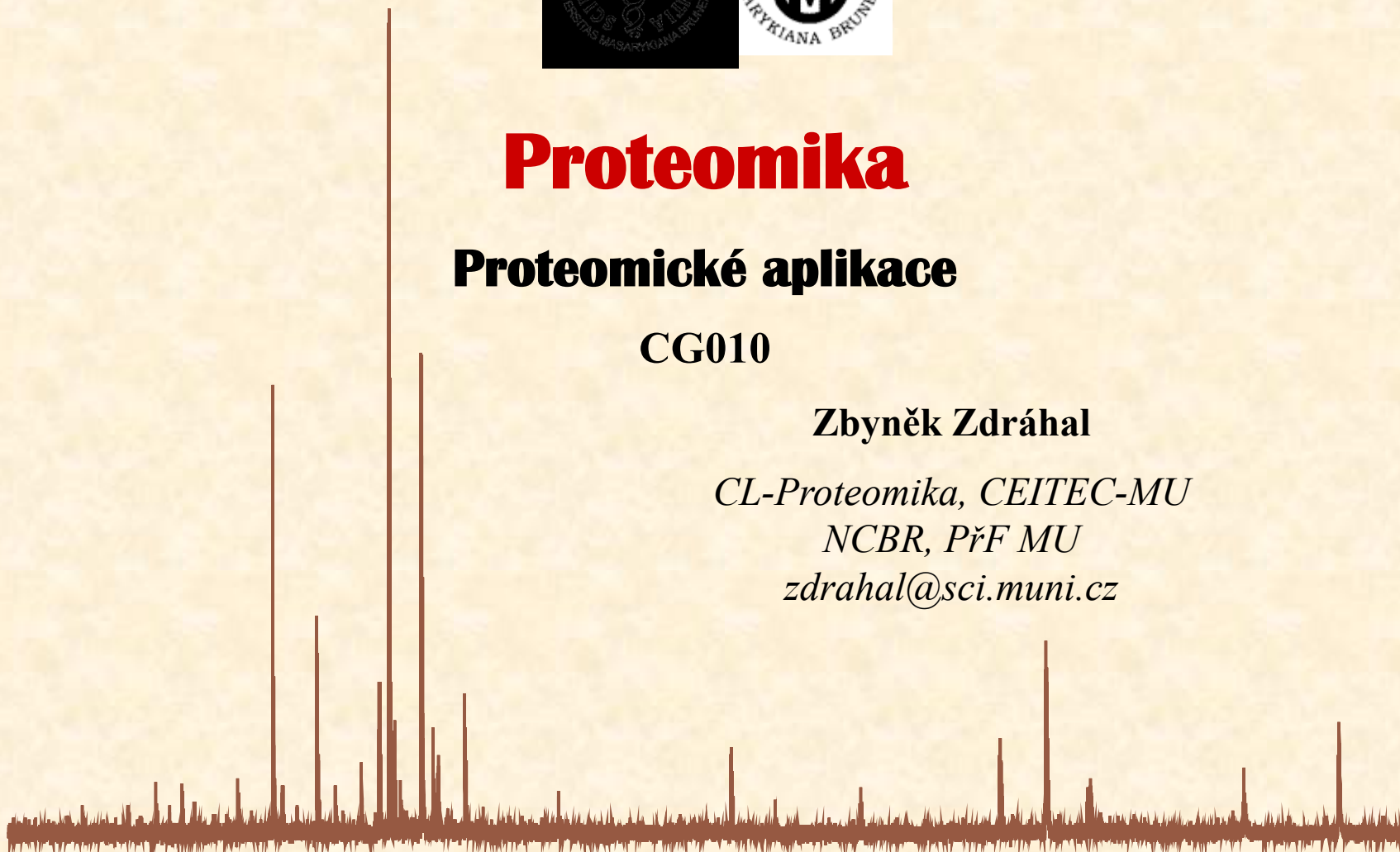
CG010

Zbyněk Zdráhal

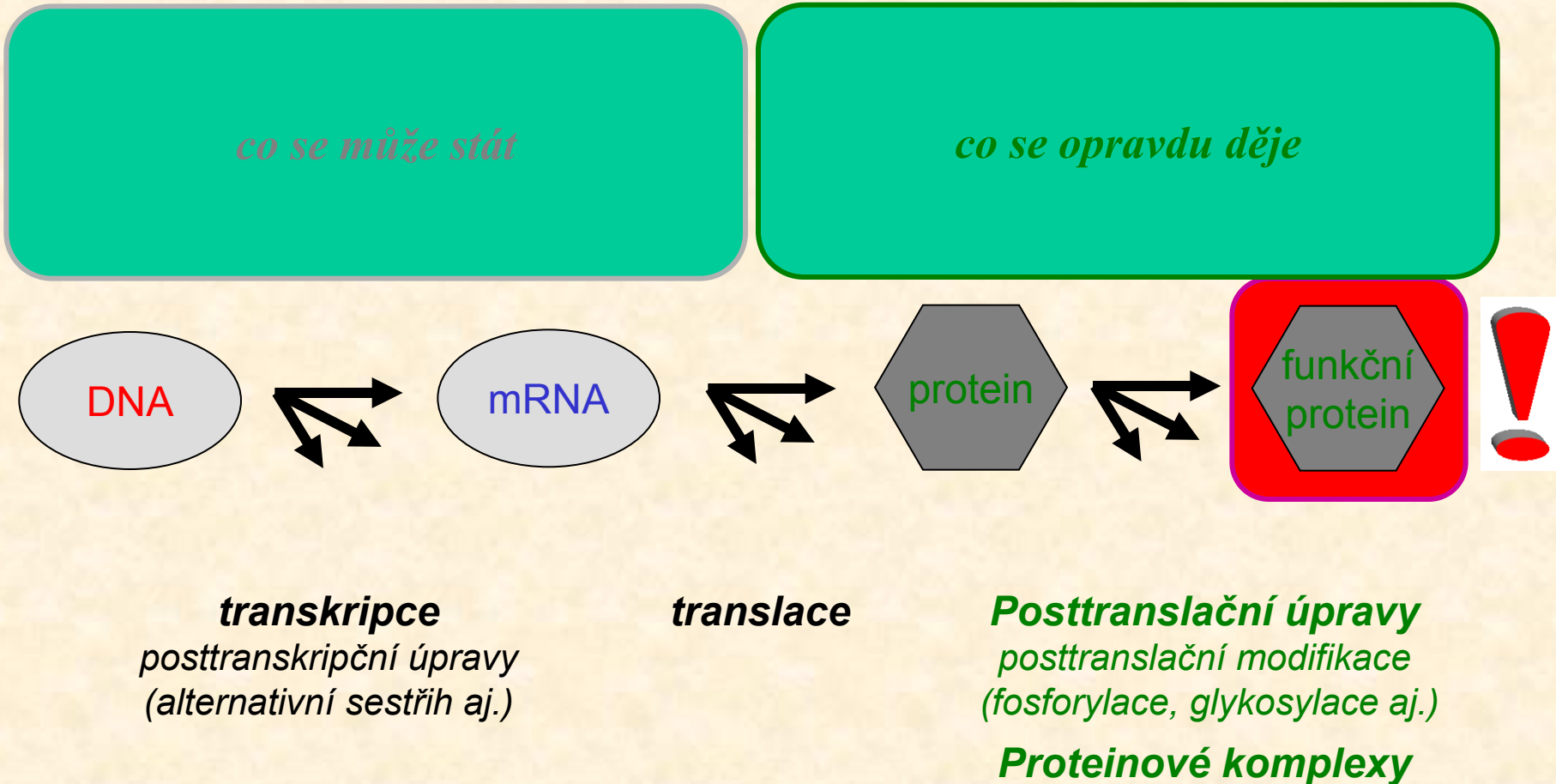
*CL-Proteomika, CEITEC-MU*

*NCBR, PřF MU*

*zdrahal@sci.muni.cz*



# Proteomika – disciplína zabývající se analýzou proteomu

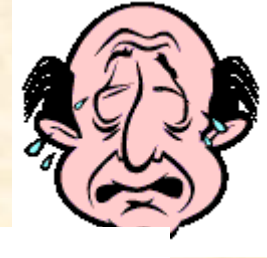


**Metabolomika**

## Proteomika - Proč?

- z každého genu může vzniknout několik proteinů, resp. jejich forem, které nelze indikovat na základě analýzy DNA resp. mRNA
- neexistuje přímá korelace mezi obsahem mRNA a výsledným obsahem proteinů
- funkční význam proteinu závisí velmi často na jeho interakci s jinými proteiny či DNA/RNA
- na úrovni proteinů lze zachytit epigenetické faktory regulace exprese genu

# Náročnost analýzy proteomu



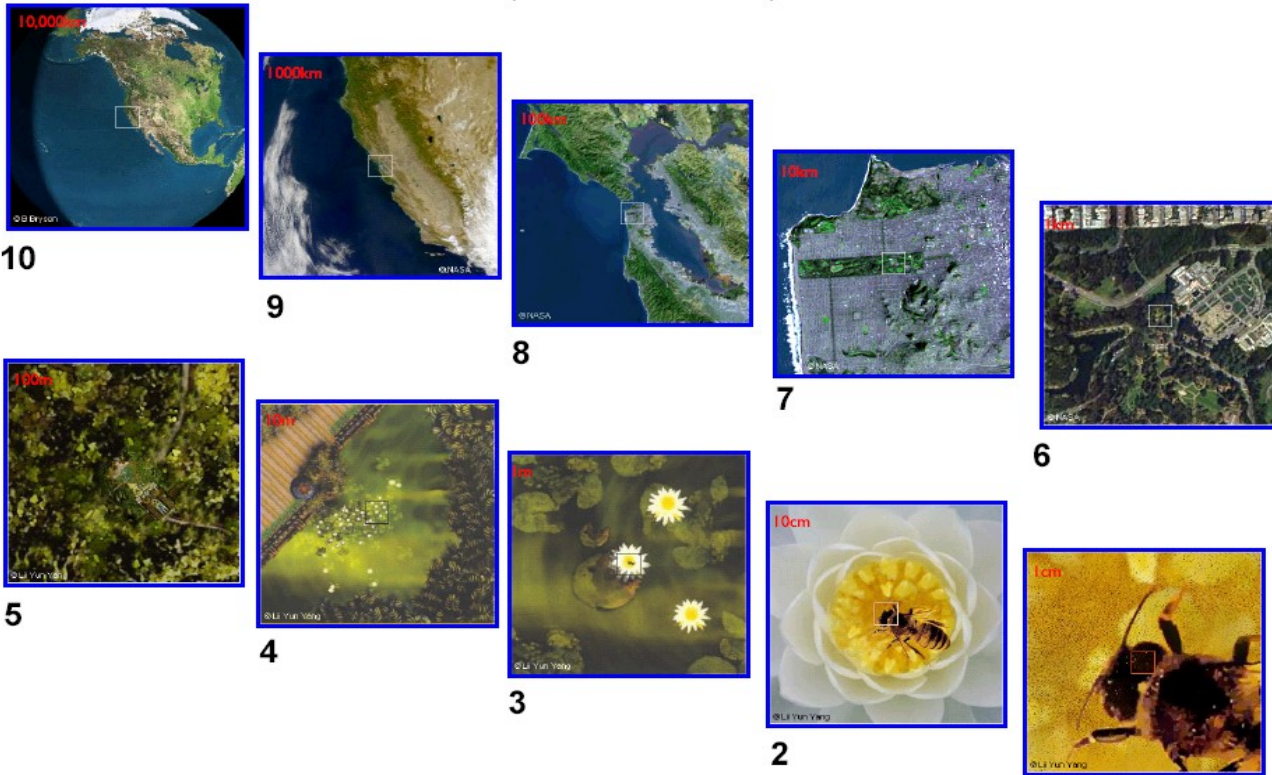
pro lidsi

## 10<sup>10</sup> Really Is Wide Dynamic Range

(Here on a linear scale)

širo nuti rea.

širo ana pro prot



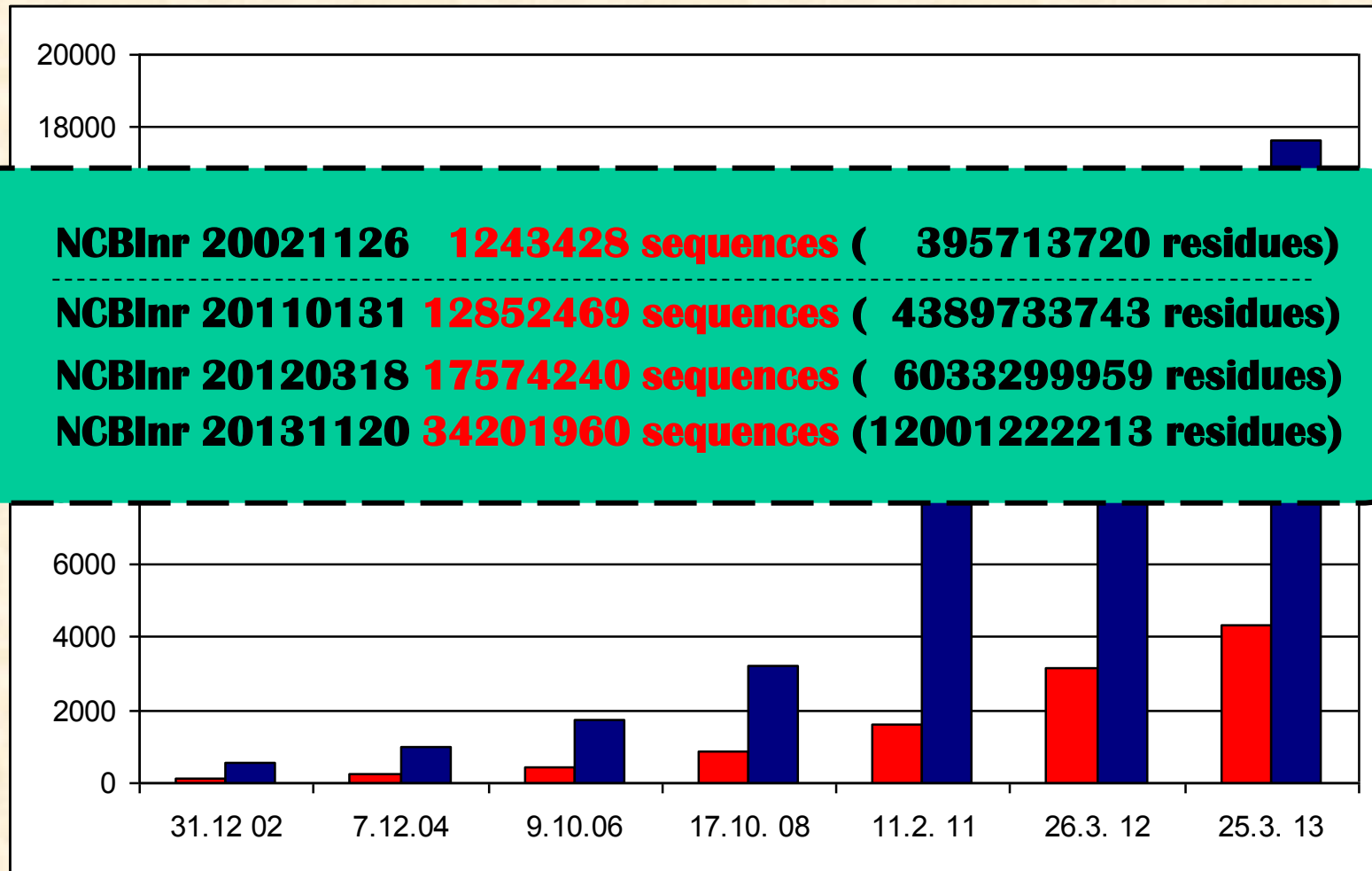
eoforms  
(3), 186 (2013))

sch

Slide courtesy Bruno Domon, ETH Zurich



# Nárůst znalosti genomů



- kompletní genomy
- rozpracované projekty

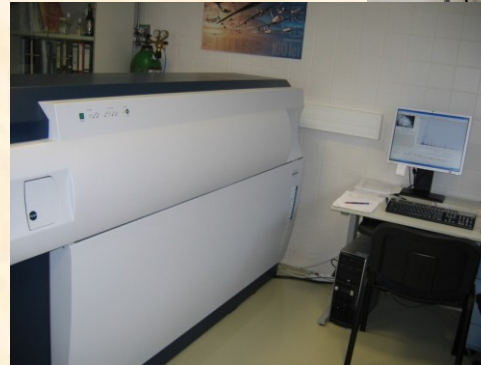
<http://www.genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi>

## Hlavní nástroje pro studium struktury proteinů

### ● Hmotnostní spektrometrie (MS)

*nejrozšířenější technika pro charakterizaci proteinů a jejich modifikací (na základě primární struktury)*

- western blotting
- proteinové čipy



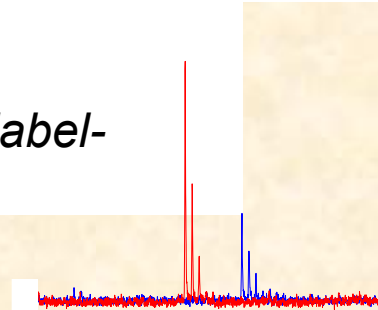
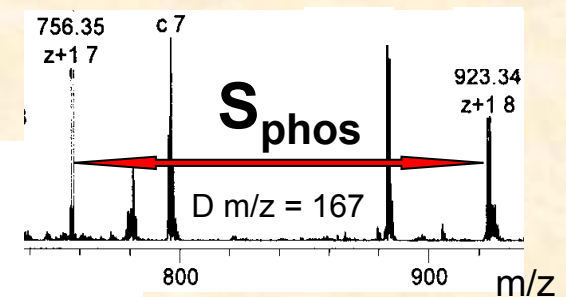
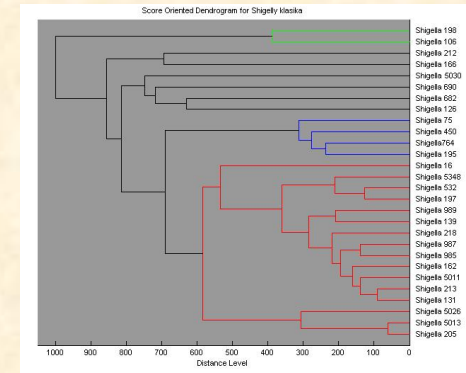
### ● Nukleární magnetická rezonance (NMR)

### ● Rentgenová krystalografie

*charakterizace vyšších úrovní struktury*

## Proteomické aplikace (MS-based)

- **analýza intaktních molekul**  
(MW, kontrola produktů reakce MALDI-MS profilování)
- **identifikace proteinů**  
(diferenční proteomika, proteinové komplexy, de novo sekvenování)
- **charakterizace proteinových modifikací**  
(fosforylace, acetylace, aj. )
- **kvantifikace proteinů**  
(pomocí „izotopických“ značek , label-free, MRM)

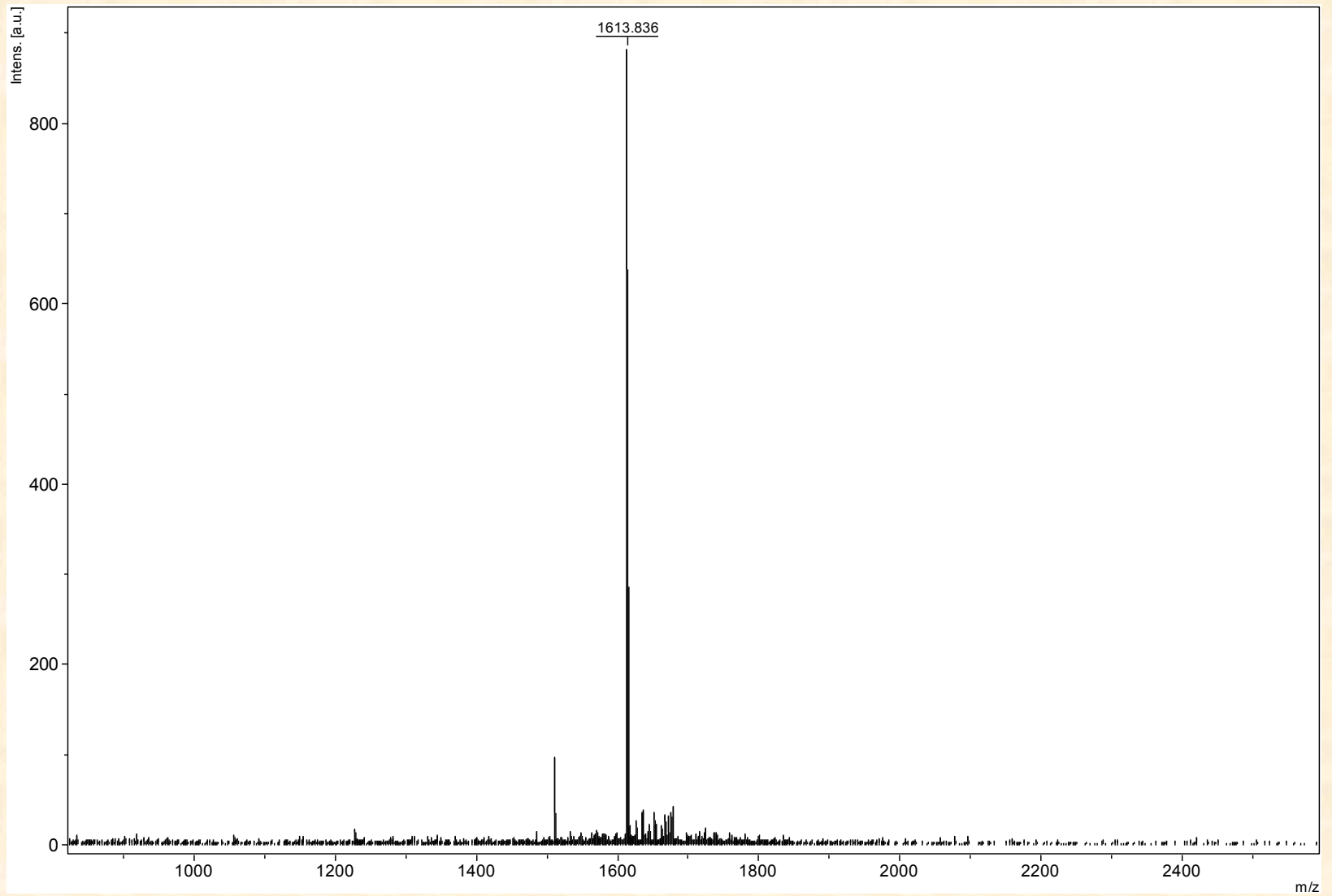


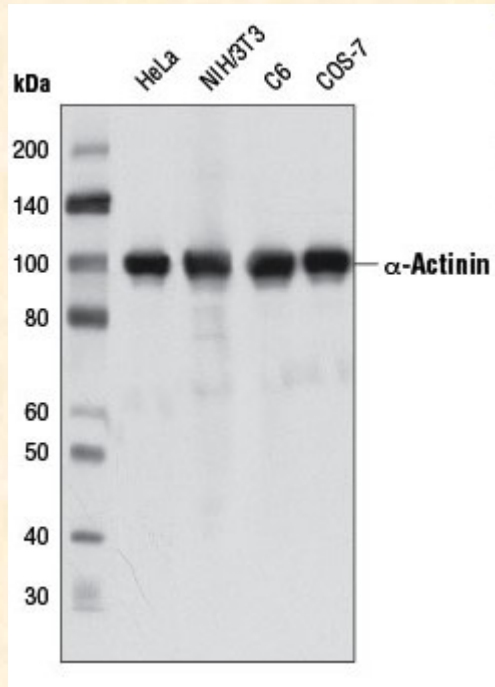
# ZVÍKOV





## Kontrola produktů syntézy

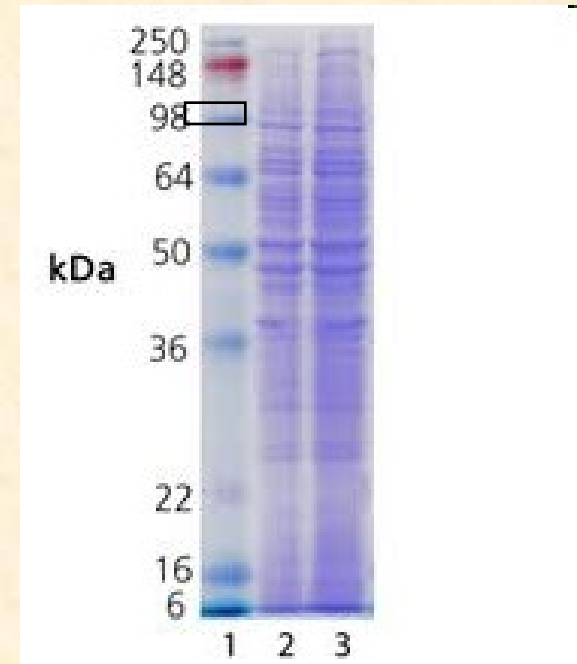




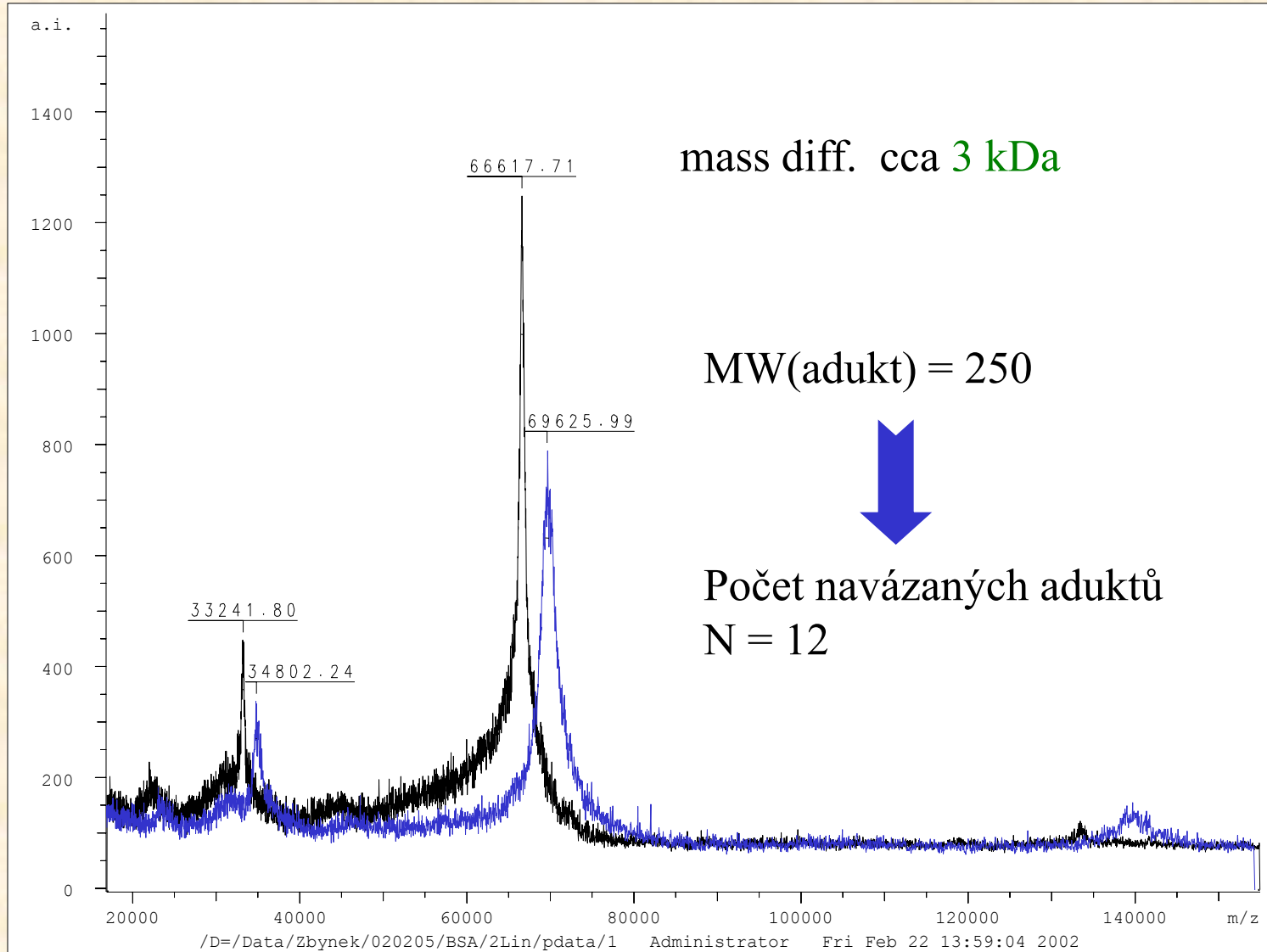
>gi|3157976|gb|AAC17470.1| alpha actinin [Homo sapiens]  
 MVDYHAANQSYQYGSSAAMAWRRGSMGDYMAQEDDWRDLLLLDPAWEKQQRKTFTAWSNSHLRKAGTQI  
 ENIDEDFRDGLKLMLEVISGERLPKPERGKMRVHKINNVNKALDFIASKGIKLDHFHRAEEIVDGNAMK  
 TLGMIWTIILRFAIQDISVEETSAKEGLLLWCQRKTAPYKNVNVQNFHISWKDGLAFNALIHRHRPELIE  
 YDKLRKDDPVTNLNNAFEVAEKYLDIPKMLDAEDIVNTARPDEKAIMTYVSSFYHAFSGAQKAETETAAN  
 RICKVLAVNQENCSTSMEDYEKLASDLEWIRRTIPWLEDVRPQKTIQEMQQKLEDFRDYRRVHKPPKVQ  
 EKCQLEINFNSVQTKLRLSNRPAFMPSEGMVSDINNGWQHLEQAEGYEEWLLNEIRRLERLDHLAEKF  
 RQKASIHAEAWTDGKEAMLKHRDYETATLSDIKALIRKHEAFESDLAAHQDRVEQIAASAQELNELDYYDS  
 HNVNTRCQKICDQWDALGSLTHSRREALEKTEKQLEAII DQLHLEYAKPAAPFNWMESEMEDLQDMFIV  
 HTIEEIEGLISAHQDFKSTLPDADREREAILHPQGGQRIAESNHIKLSGSNPYTTVTPQIINSKWEKVQQ  
 LVPKRDHALLEEQSKQQQSNEHLRRQFASQANVVGPIQTKMEEIAISIEMNGTLEDQLSHLKQYERSIV  
 DYKPNLDLLEQQHQLIQEALIFDNKHTNYTMEHIRVWGWEQLLTTIARTINEVENQILTRDAKGISQEQMQ  
 EFRASFNFHFDKDHGGALGRGVQGLPHQPGLRRGERPAGEAEFNRIMSLVDPNHSGLVTFQAFIDFMSRET  
 TDDTADQVITSFKVLGDKNFITAEELRRELPPDQAEYCIARMAPYQGPDPGVRGALDYKSFSTALYGES  
 DL

**citlivost**  
**jistota identifikace**

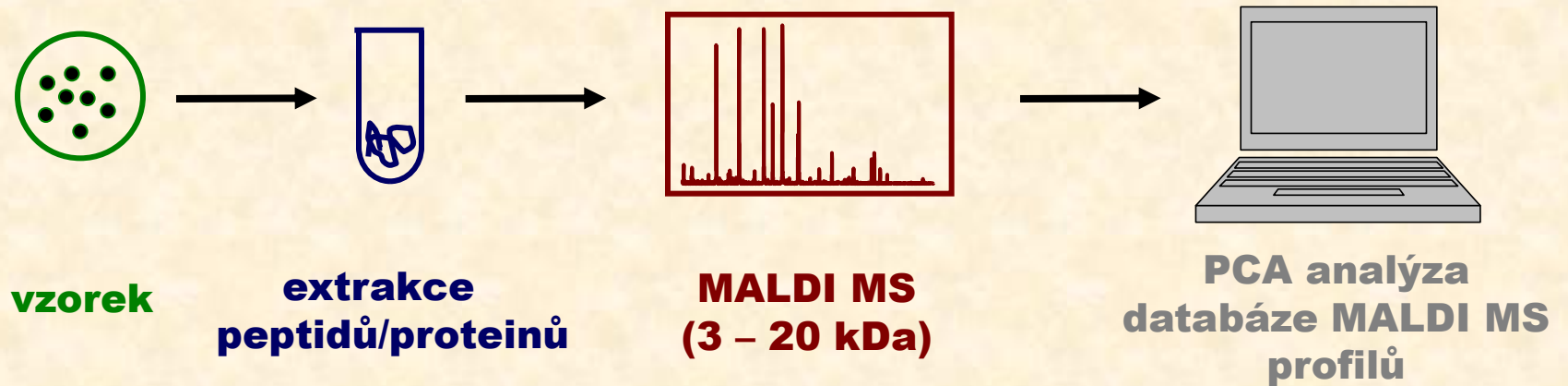
instrumentální náročnost



## Kontrola výsledku reakce

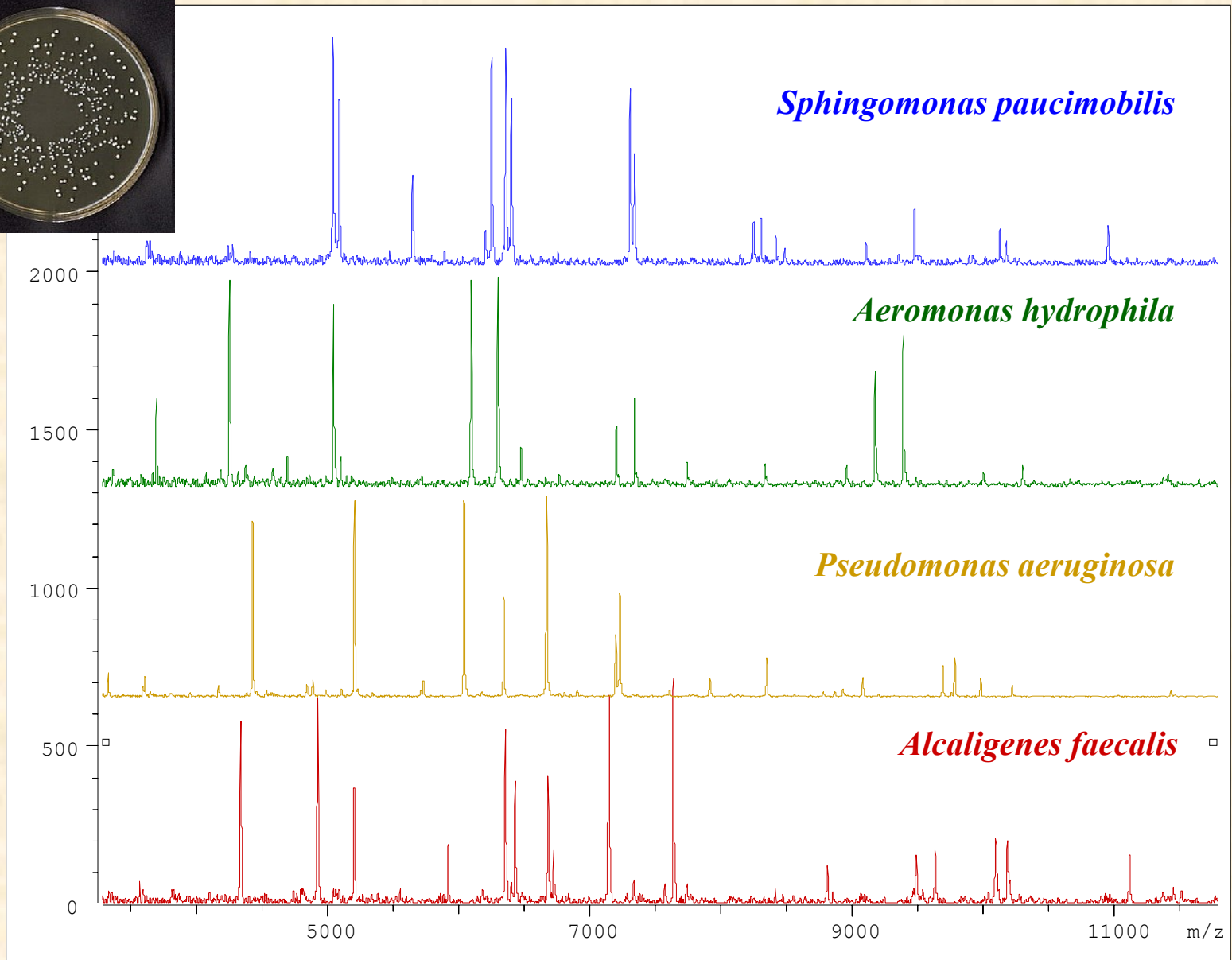


## MALDI-MS profilování



- **identifikace mikroorganismů**
- **třídění vzorků (kontrola kvality potravin)**
- **diagnostika chorob**











# Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-MS



# Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-MS

Acinetobacter calcoaceticus NIPH 2245T  
 Acinetobacter calcoaceticus NIPH 2155  
 Acinetobacter calcoaceticus NIPH 3804  
 Acinetobacter calcoaceticus NIPH 3588

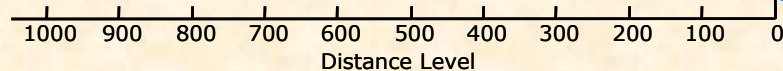
identifikace na základě srovnání naměřeného profilu s profilem z databáze

Detected Species	Lo...
 Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	2.267
 Azoarcus indigens VB32 MPB	1.164
 Paenibacillus polymyxa DSM 741 DSM	1.127
 Lactobacillus antri DSM 16041T DSM	1.122
 Sphingobacterium spiritivorum DSM 11722T HAM	1.070
 Staphylococcus schleiferi ssp schleiferi DSM 4809 ...	1.068
 Azoarcus sp BH72 MPB	1.053
 Acidovorax avenae ssp avenae DSM 7227T HAM	1.018
 Streptococcus salivarius IBS_MS_23 IBS	1.009
 Bacteroides fragilis MB_9009_05 THL	1.006

spolehl

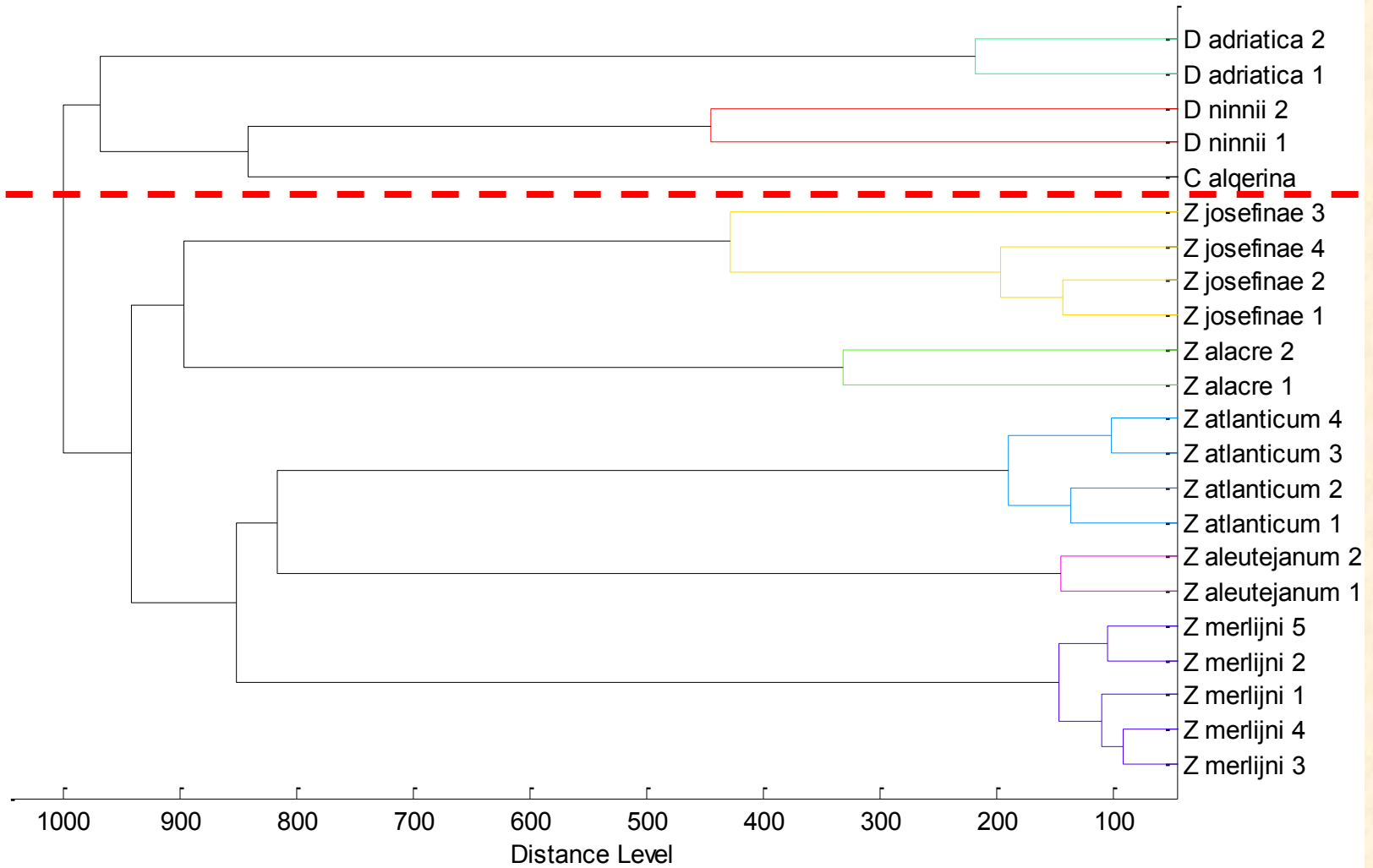
 **uznaná metoda v klinické praxi**

Acinetobacter nosocomialis NIPH 97  
 Acinetobacter nosocomialis NIPH 106

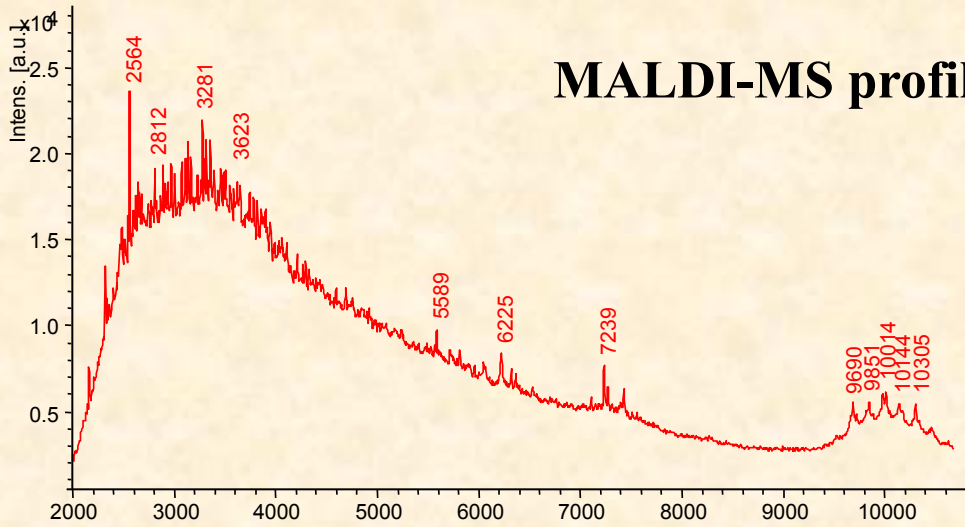


# MALDI-MS profilování pavoučího jedů (Zodariidae)

MSP Dendrogram

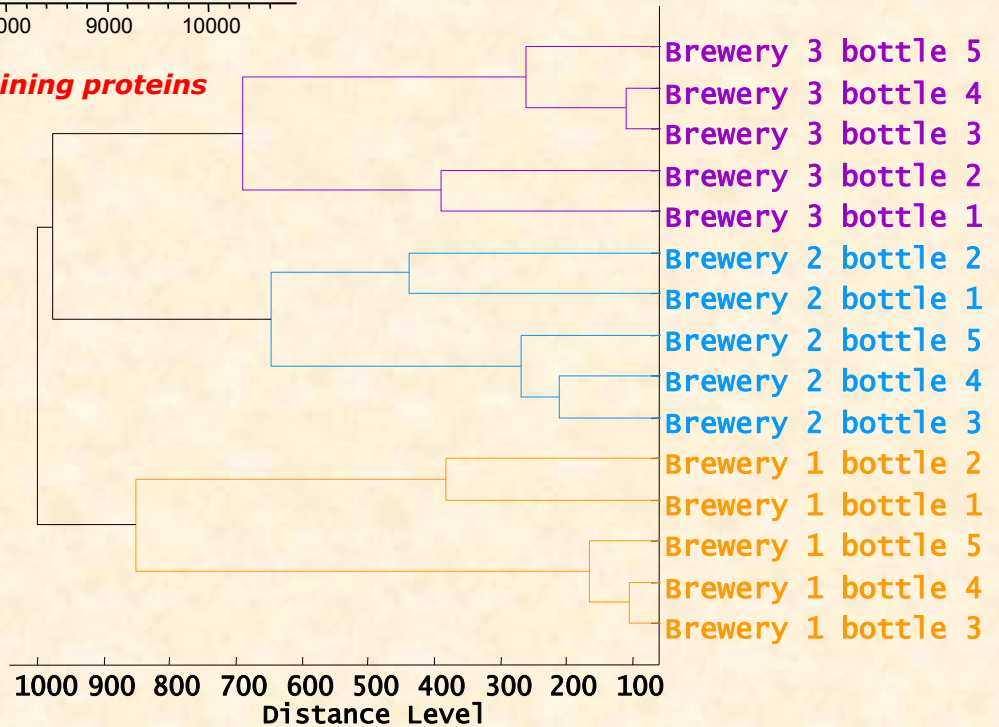


# MALDI-MS profilování piva



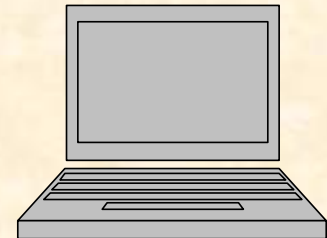
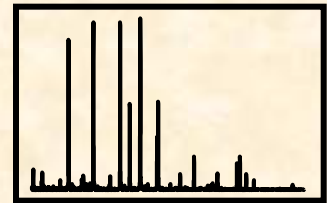
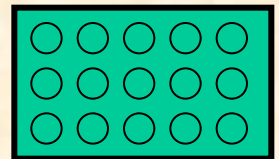
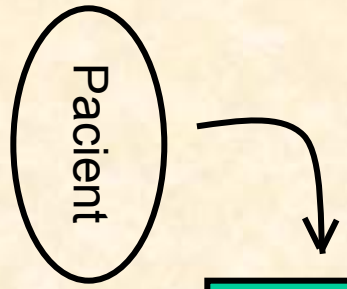
**MALDI-TOF MS fingerprint containing proteins**

spolupráce s FCH VUT Brno  
doc. Márová





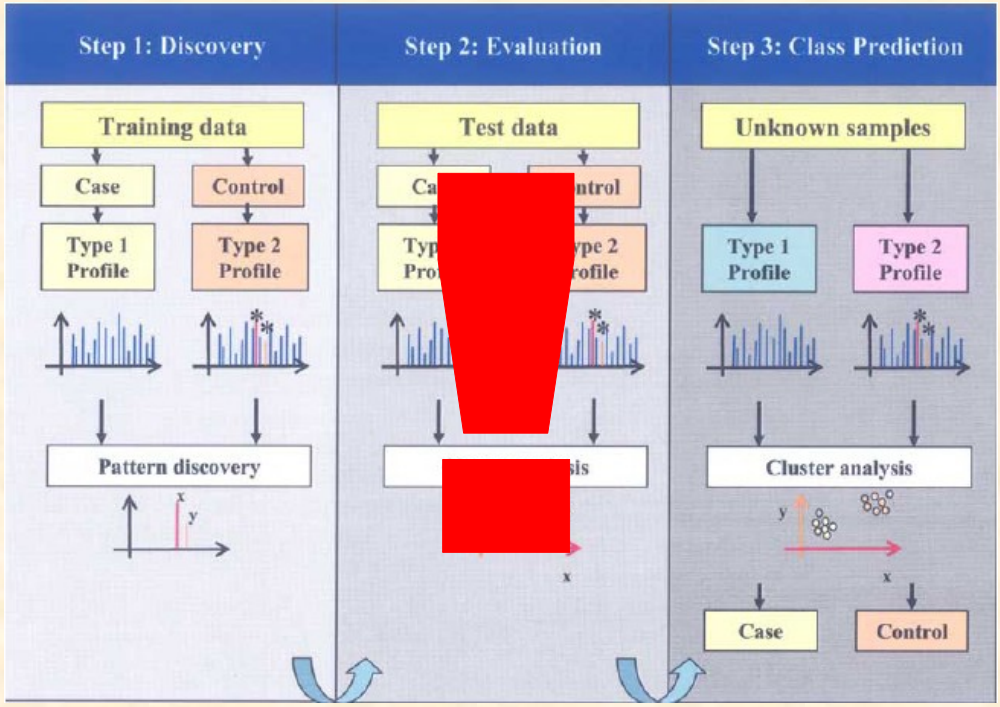
# Analýza profilů –včasná detekce chorob (peptide profiling, pattern profiling)

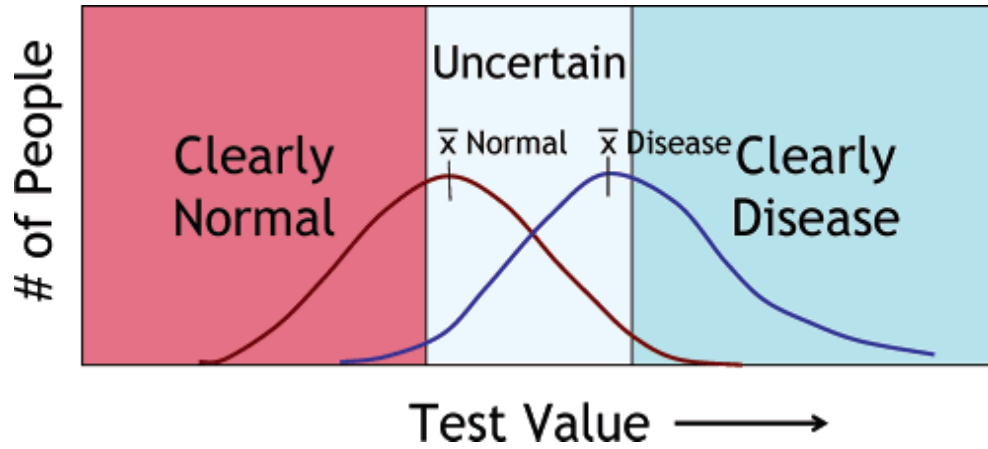


**žádná či minimální  
úprava vzorku**  
*(ionex, IMAC, afinitní  
sorbent)*

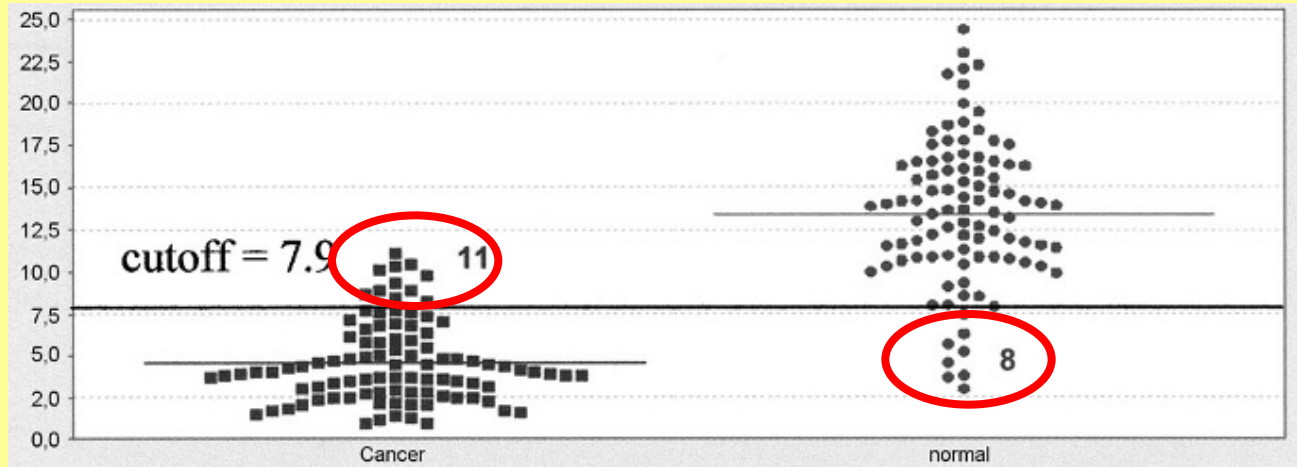
**MALDI MS, SELDI MS**  
**(3 – 20 kDa)**

**klastrová analýza**





*J. LaBaer et al., J. Proteome Res., 4 (4) 1053-1059 (2005).*



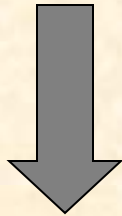
*M. Ehmann et al., Pancreas, 34 (2) 205-214 (2007).*

## Využití MS pro vyhledávání biomarkerů

přímá MS analýza vzorků  
(MALDI MS, SELDI MS)

**Pattern profiling**

srovnávání peptidového (proteinového)  
složení vzorku „zdravého“ a nemocného  
(bez identifikace, statistická analýza)



včasná diagnostika chorob

Identifikace biomarkerů

**Separace  
GE, LC**

srovnávání peptidového (proteinového)  
složení vzorku „zdravého“ a nemocného  
(analýza obrazu)

**MS  
MS/MS**

identifikace rozdílových proteinů



specifická protilátka  
Imunodetekce  
Protein arrays

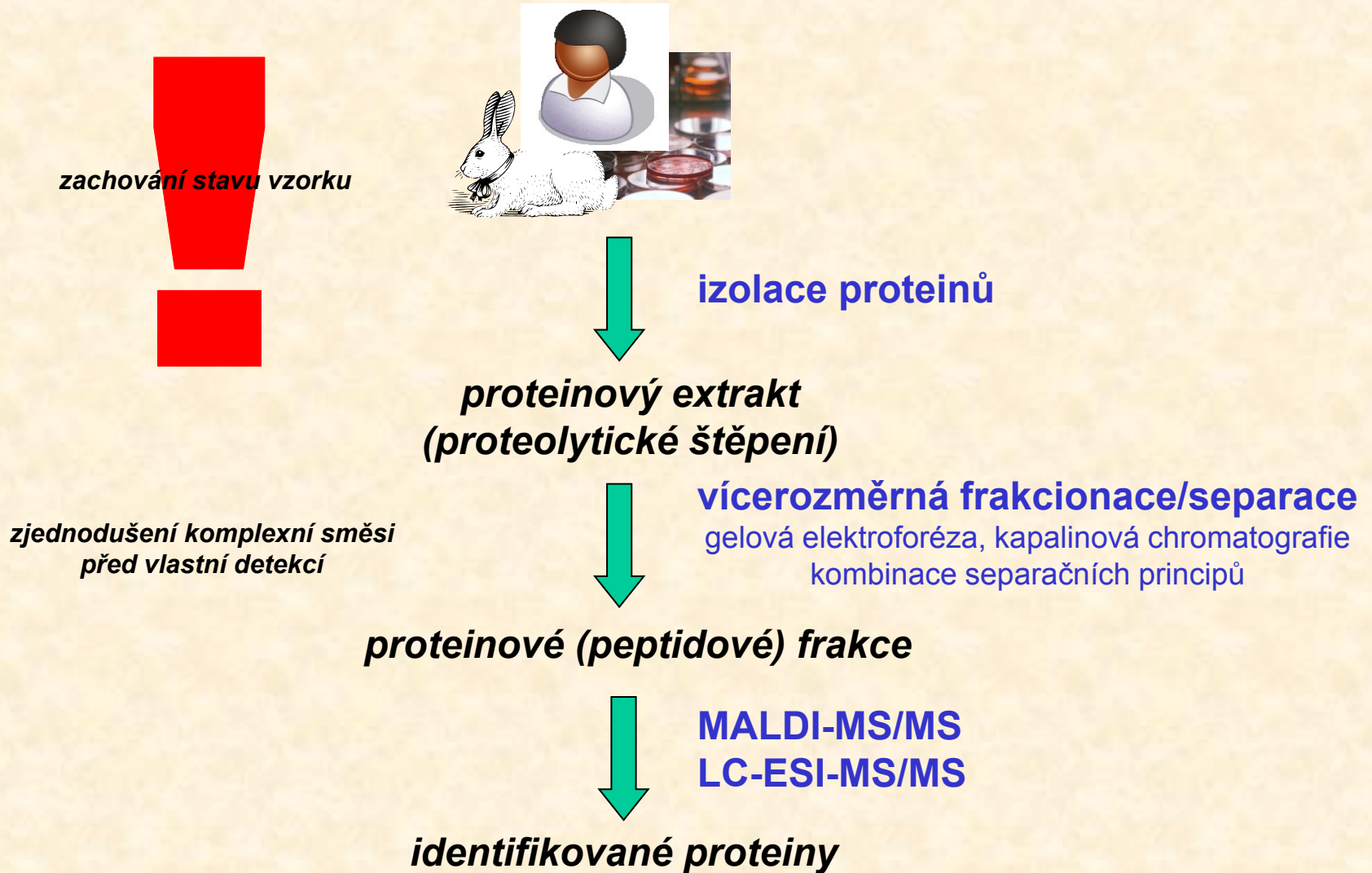
# KOST u SOBOTKY



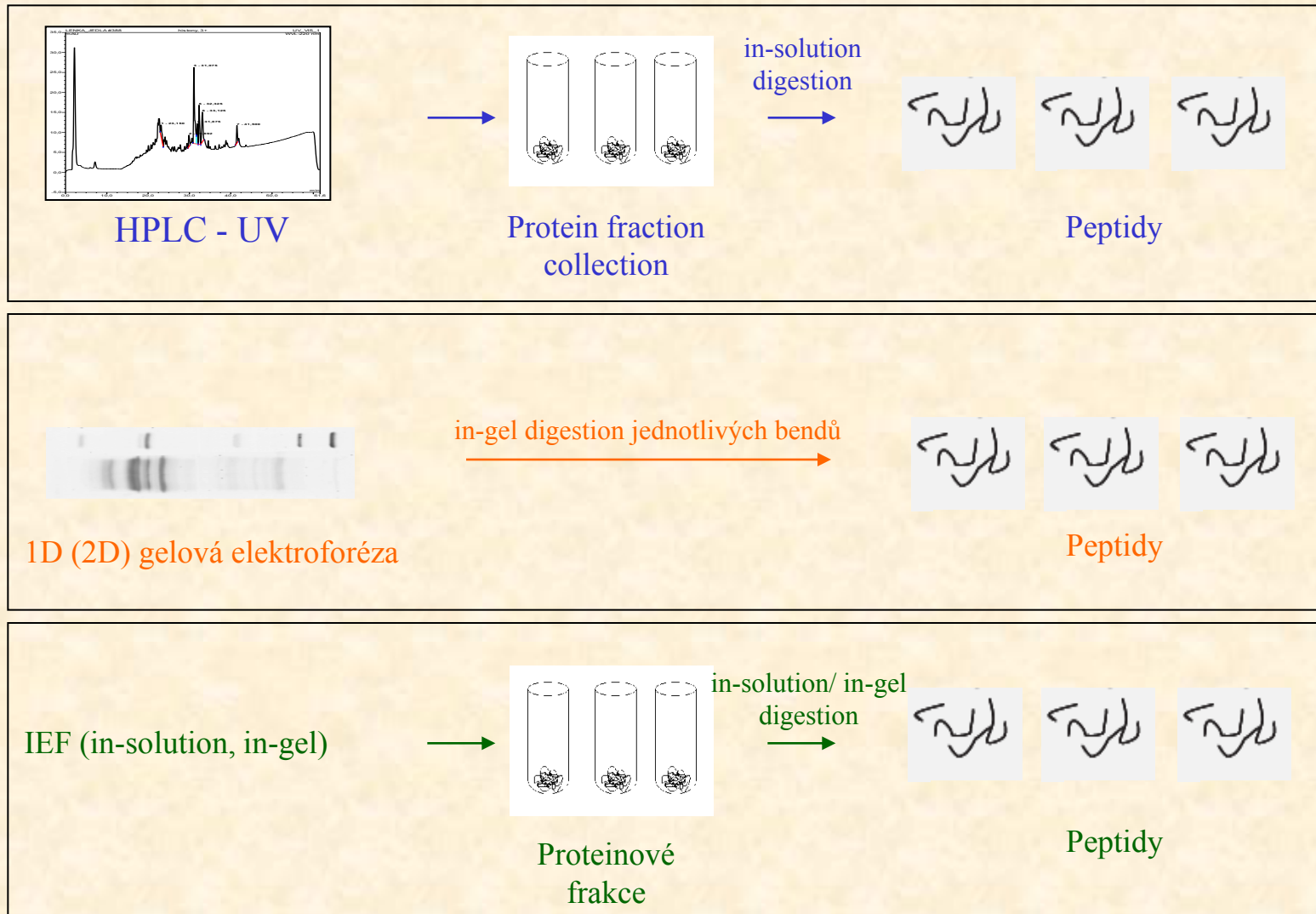
**Proteomické aplikace využívající „pouze“  
identifikace proteinů**

# Obecné schéma proteomického experimentu

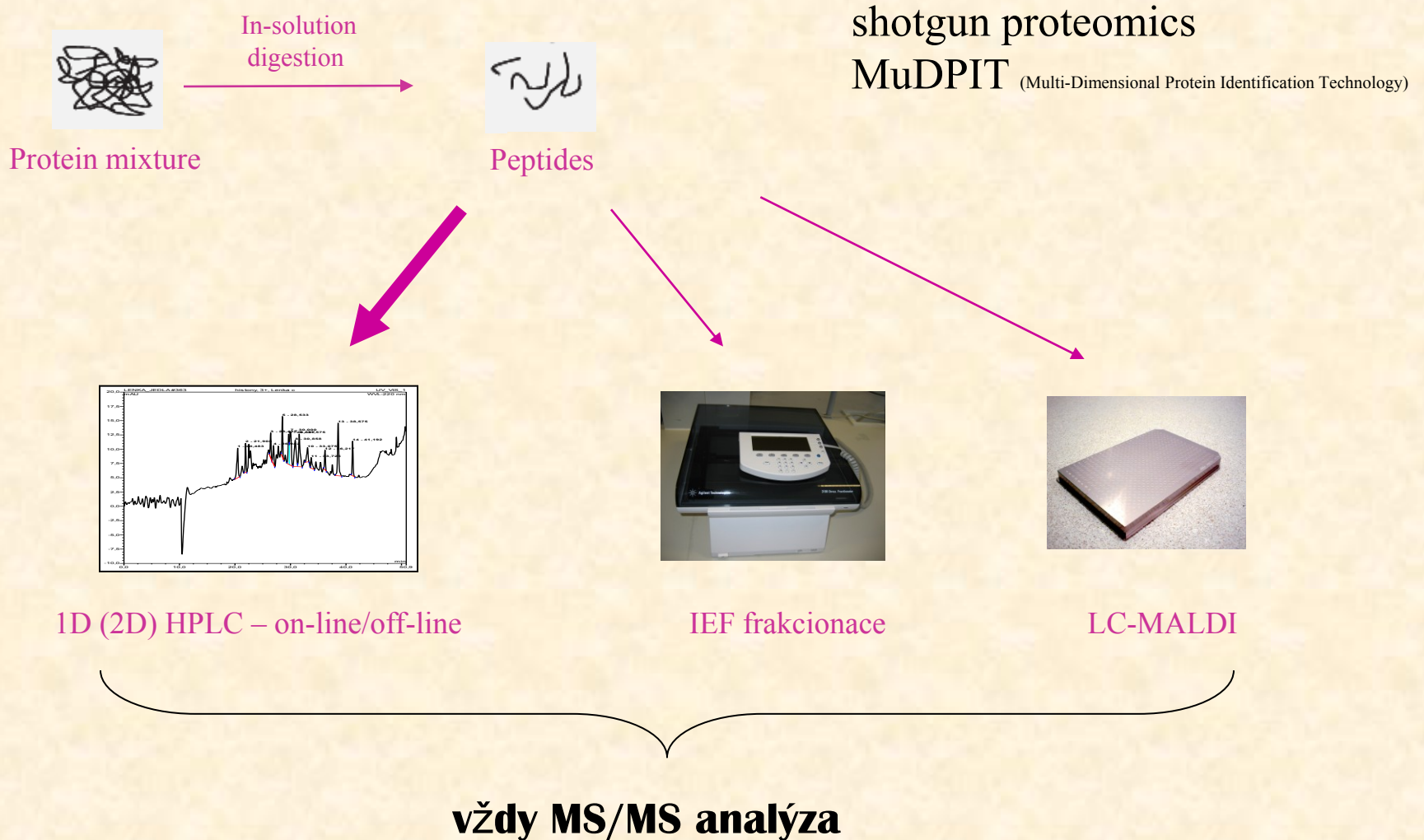
## Analýza komplexních směsí s cílem identifikovat jednotlivé komponenty



# Separace proteinových izolátů na úrovni intaktních proteinů



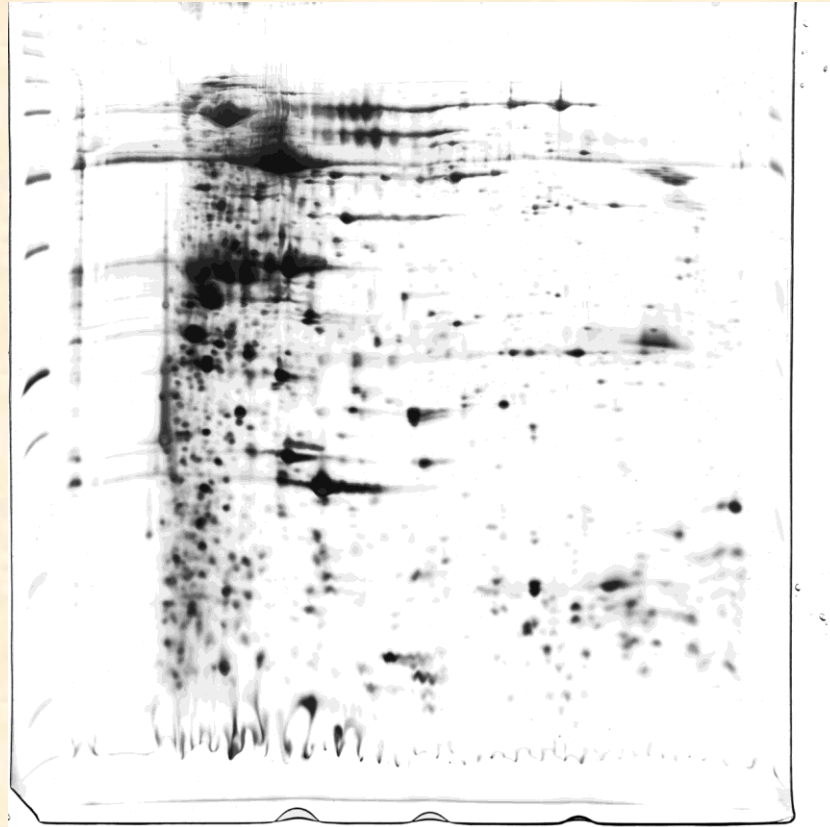
# Separace proteinových izolátů na úrovni peptidů





# Charakterizace proteomu

identifikace proteinů ve spotech MS/MS technik



proteom stafylokokového fága 812, *spolupráce s prof. Doškářem (ÚEB PřF MU)*

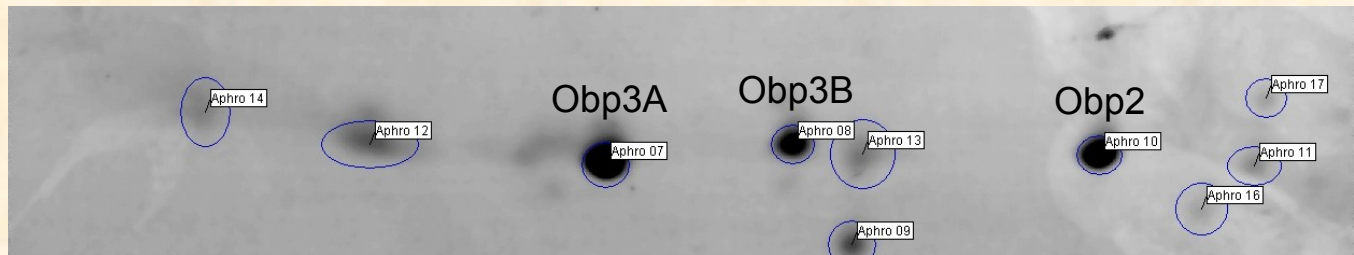
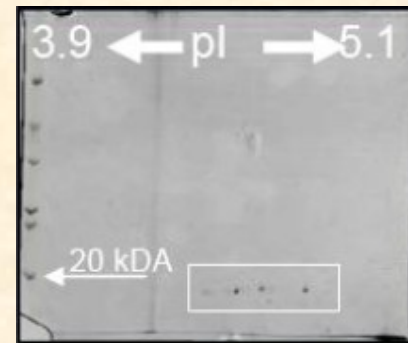
## Ověření sekvence a určení izoforem OBP proteinů



*Myodes glareolus*

- sliny
- 2D gelová elektroforéza
- MS/MS vybraných spotů

- Ⓢ není znám genom
- Ⓢ nejsou protilátky

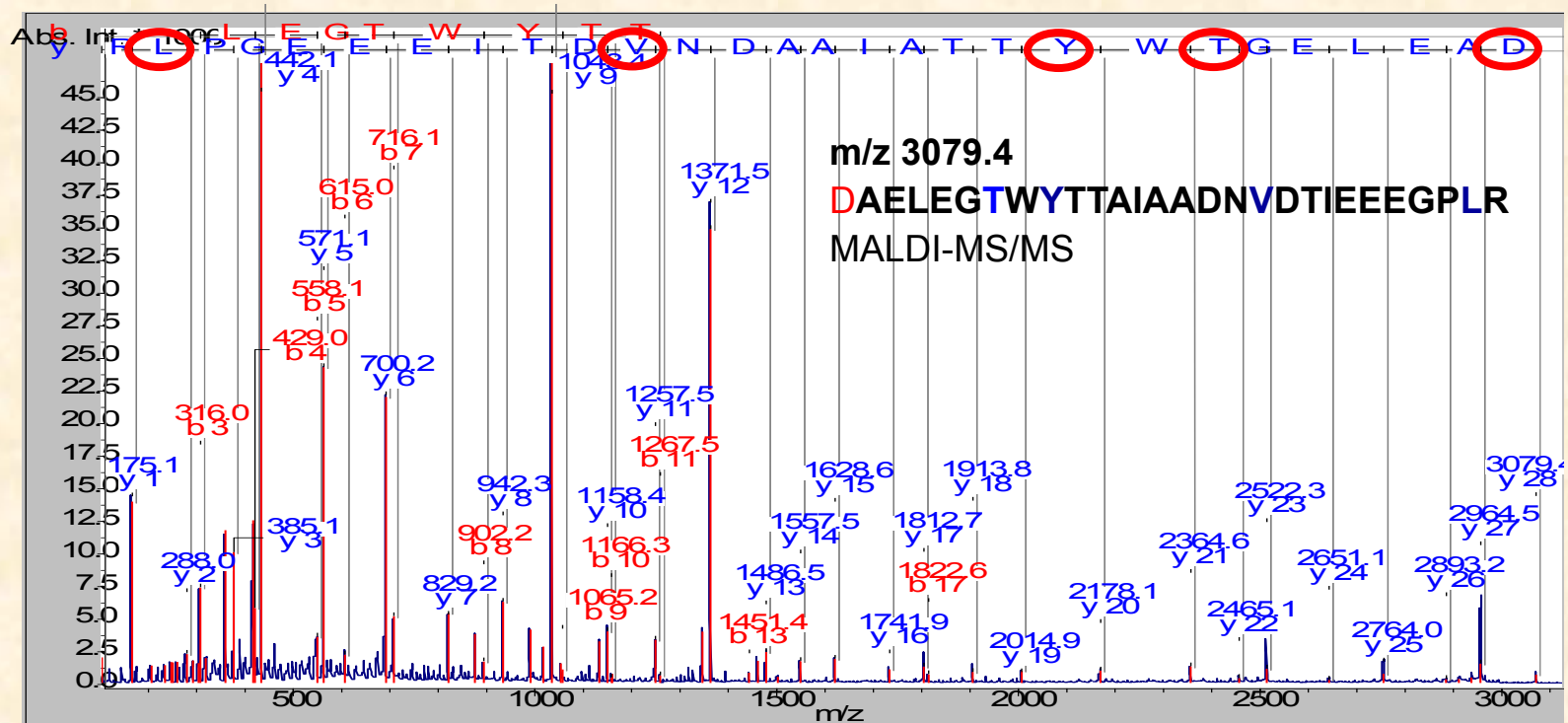


# Ověření sekvence a určení izoform OBP proteinů MALDI-MS/MS a LC-MS/MS manuální interpretace spekter

původní sekvence - QAELEGKWTTAIAADNIDTIEEEGPMR (OBP3)

DAELEG**W**YTTAIAADN**V**DTIEEE**G**PLR

HAELEG**W**YTTAIAADN**V**DTIEEE**G**PLR



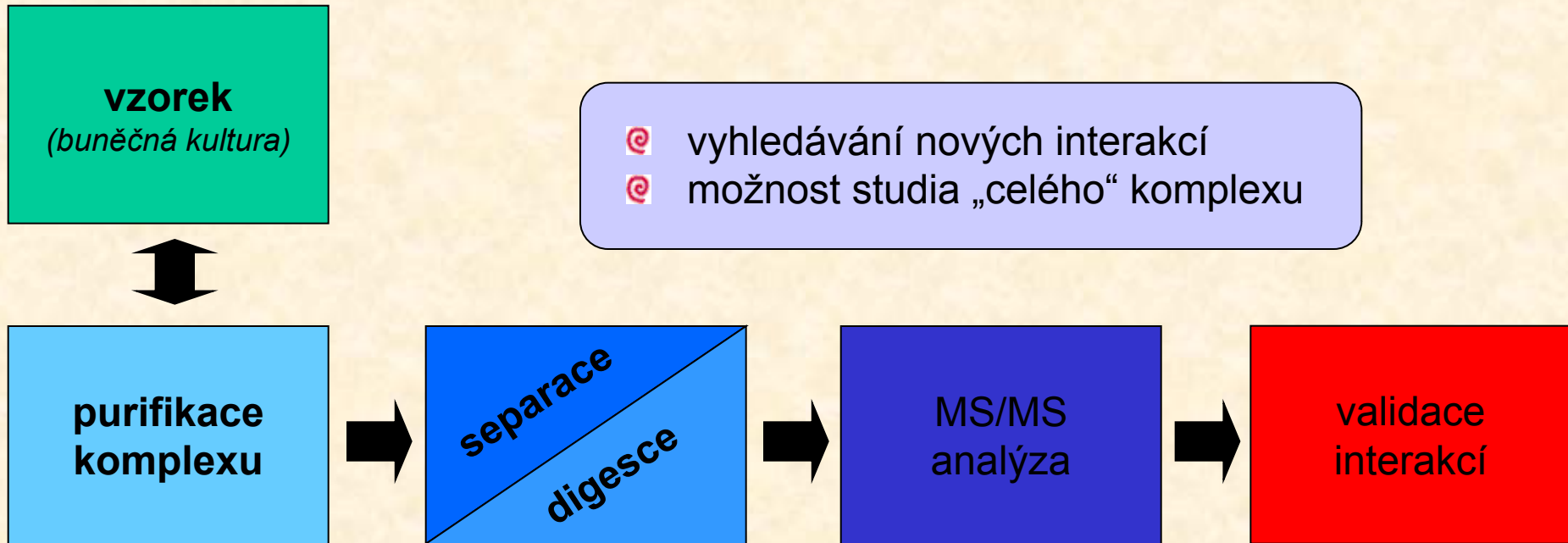
# Charakterizace proteinových komplexů

## *funkční proteomika*

Ⓢ > 80% proteinů je funkčních až po začlenění do komplexu

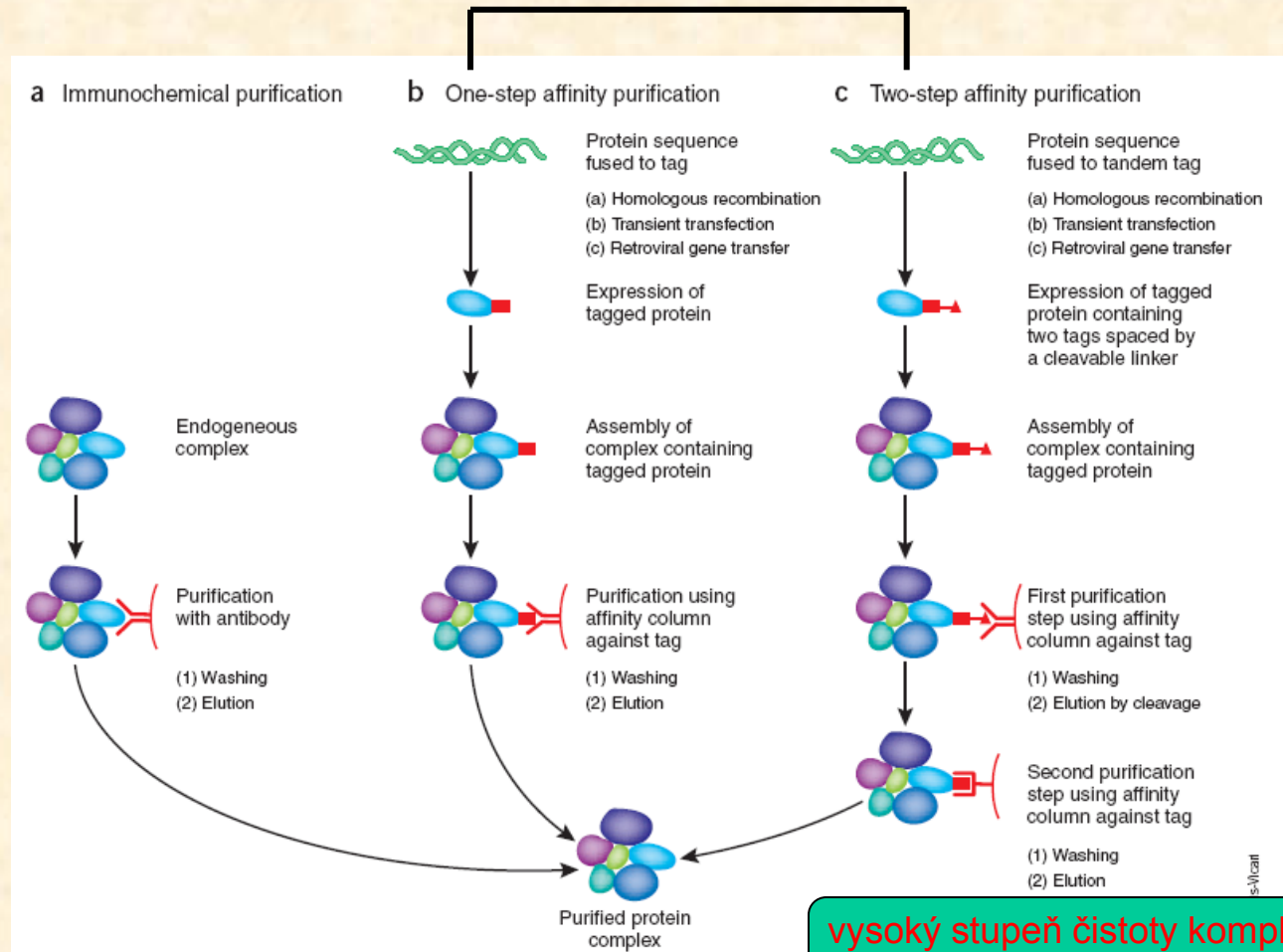
Ⓢ ~ 10000 typů interakcí

*Aloy P., Russell R. B.: Nat. Biotechnol. 22 (10), 1317-1321 (2004)*



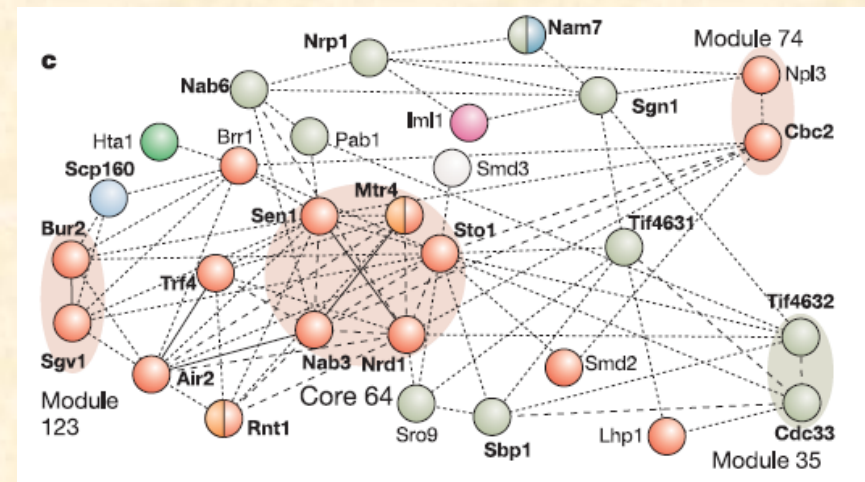
# Purifikace proteinových komplexů

*in vivo* exprese proteinu se značkou



## Možnosti MS v analýze komplexů:

- identifikace jednotlivých členů komplexu včetně posttranslačních modifikací
- validace interakčních partnerů (odlišení nespecifických interakcí)
- určení poměrů jednotlivých členů komplexu (stechiometrie)
- určení prostorové struktury komplexu (cross-linking)



# KONOPIŠTĚ



**Charakterizace posttranslačních modifikací**  
*příklad*



# Proč?

počet druhů PTMs > 400  
počet PTMs  $\approx$  90 000 (experimentálně identifikovaných)  
 $\approx$  230 000 (predikce)  
(SwissProt, per  $\approx$  530 000 proteinů)

*G. A. Khoury et al., Sci. Rep. 1, 90; (2011); <http://selene.princeton.edu/PTMCuration>*

...PTMs are known to act alone and in combination **to regulate nearly all aspects of protein function...**



...Post-translational modifications (PTMs) occur on **nearly all proteins**. Many domains within proteins are **modified on multiple amino acid sidechains** by diverse enzymes to create a myriad of possible protein species. **How these combinations of PTMs lead to distinct biological outcomes is only beginning to be understood...**

*A. P. Lothrop, M. P. Torres, S. M. Fuchs, FEBS Letters. 587 (2013) 1247–1257*

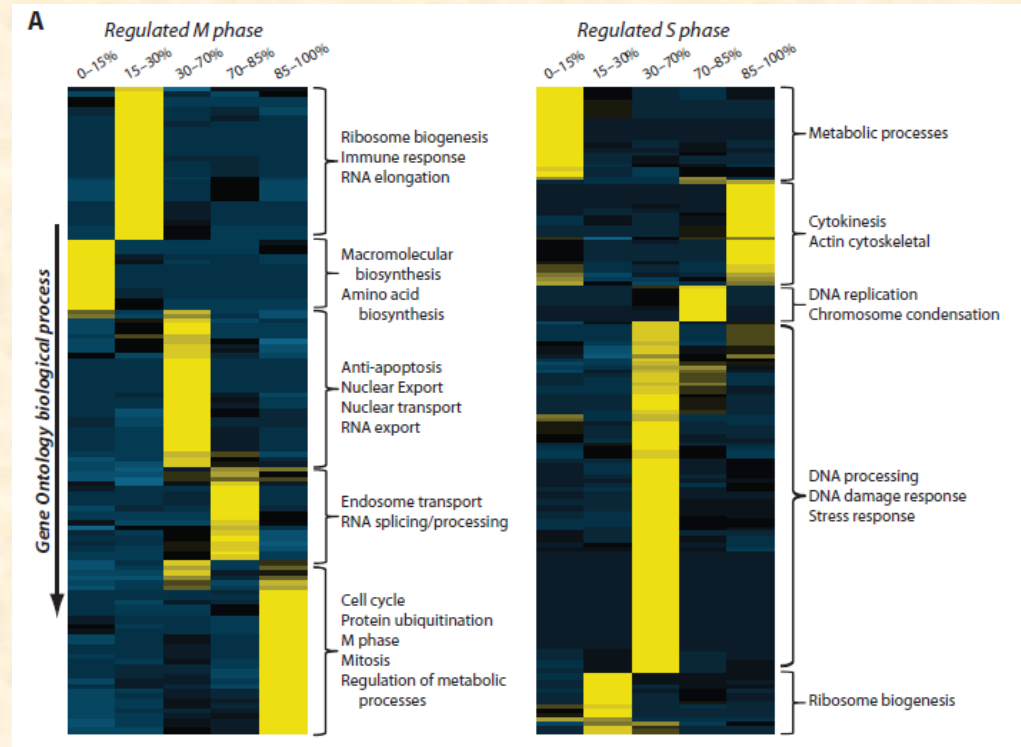
# Analýza fosfoproteomu

změny během buněčného cyklu

Olsen J.V. et al., *Sci. Signal.*, 3 (104) ra3 (2010)

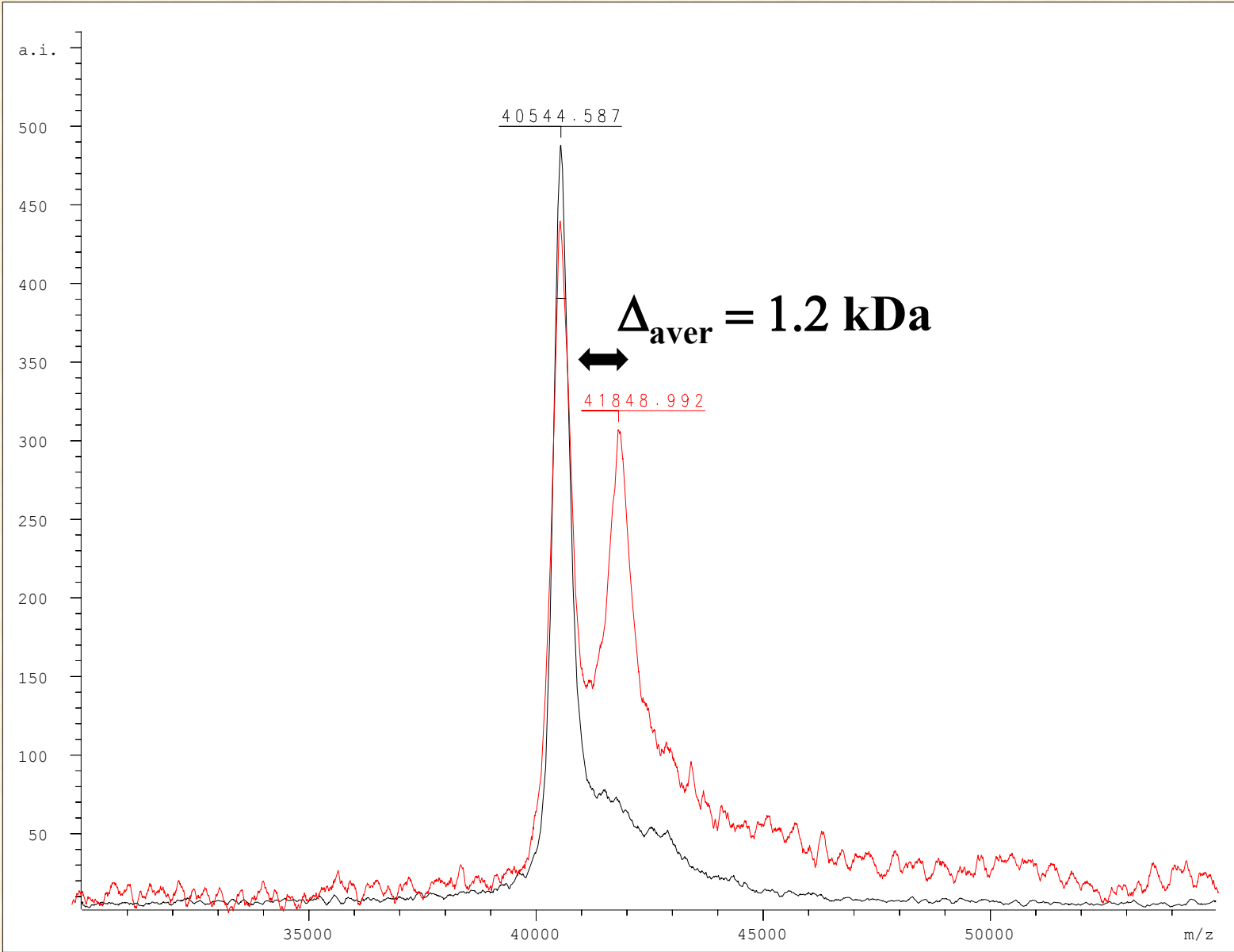
-  quantified 6027 proteins
-  quantified 20,443 unique phosphorylation sites

- HELA buňky
- SILAC značení
- TiO2 frakcionace
- LC-MS/MS (Orbitrap)

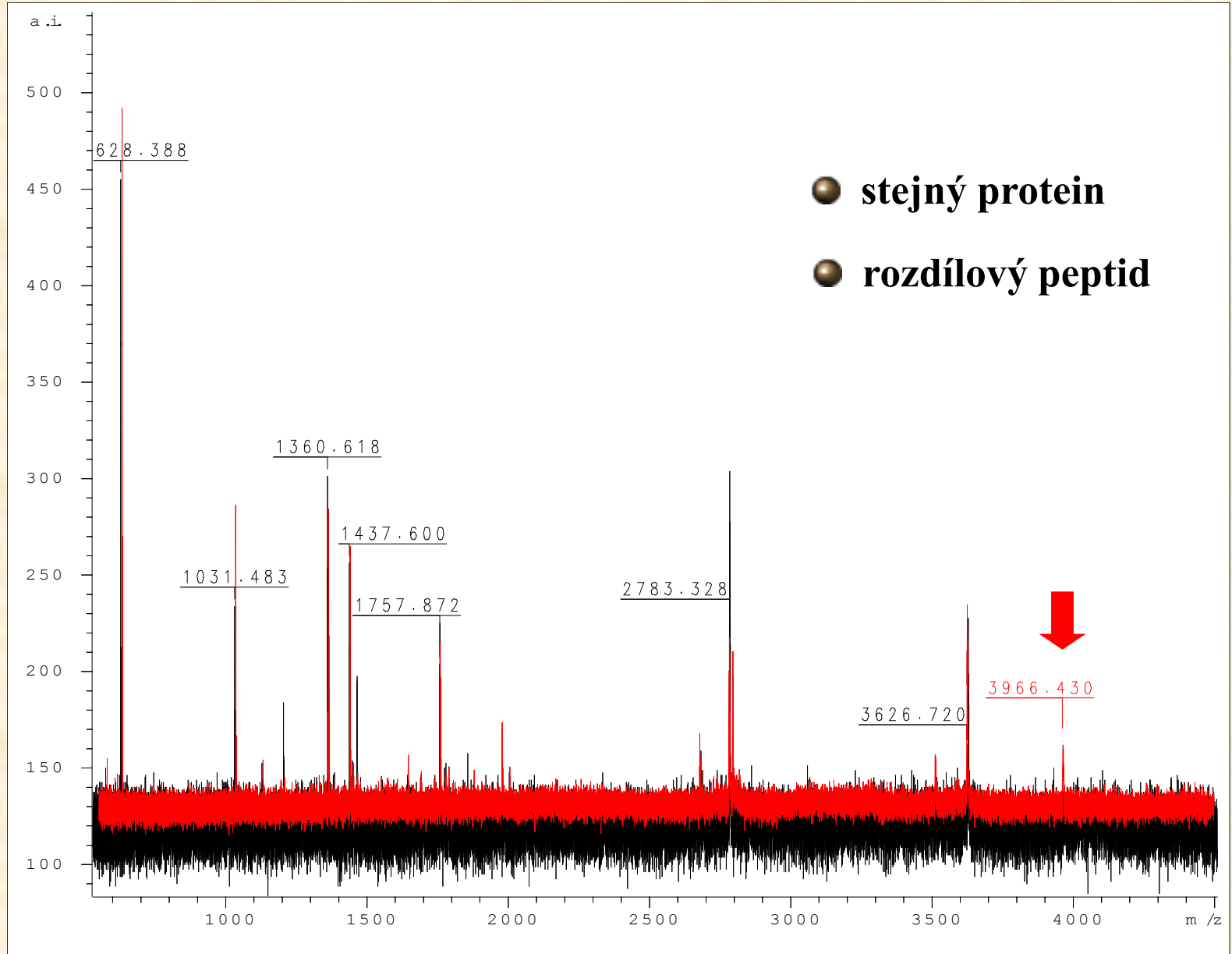


The panels show the phenotypic phosphoproteome comparison organized by GO biological process for mitotic (left) and S phase (right) cells. Proteins involved in metabolic processes have high-occupancy phosphorylation sites during mitosis, but low-occupancy sites during S phase (color scale: yellow, high overrepresentation; dark blue, high underrepresentation).

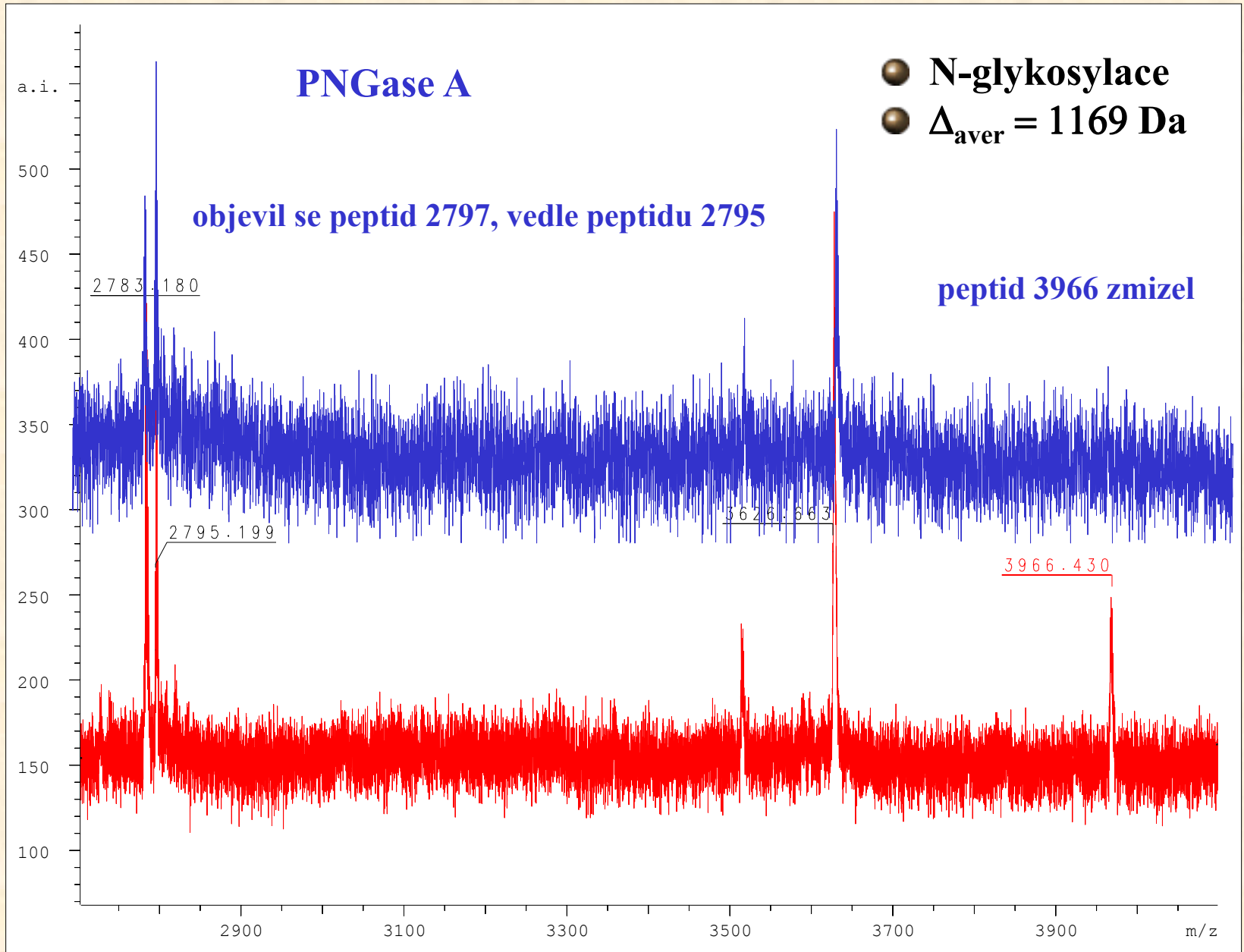
# MALDI-MS celých proteinů



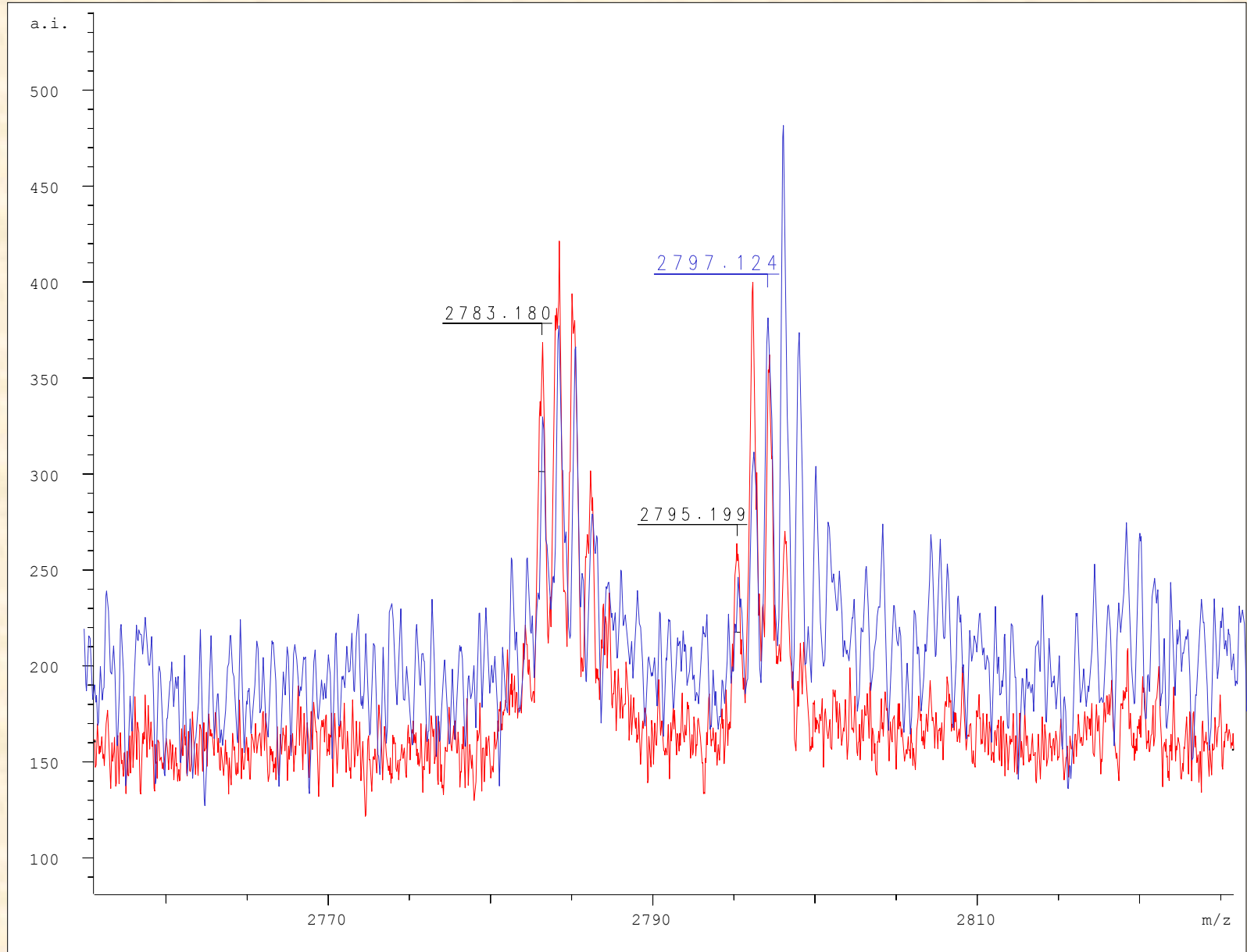
## MALDI-MS tryptických digestů



# Detail spekter digestů proteinu **před** a **po** deglykosylaci



# Detail spekter digestů proteinu **před** a **po** deglykosylaci



## Shrnutí výsledků

**tryptický peptid 2796 Da** ...PHIFDYSGS... ,  
kde D vzniká z N po deglykosylaci PNGasou A

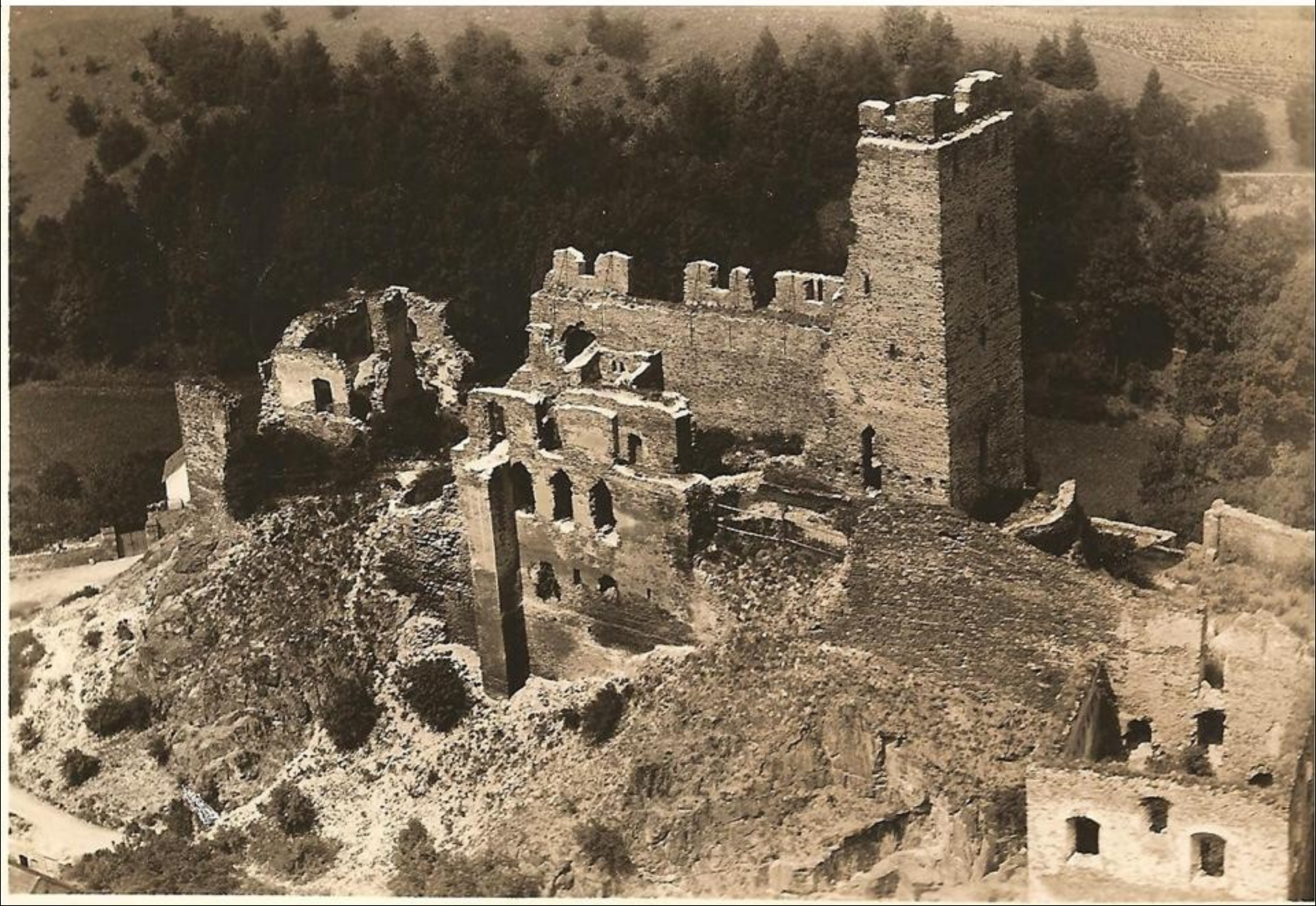
původní sekvence je tedy ...PHIFNYSGS... (hmotnost 2795 Da)

*Peptid potvrzen také LCMSMS analýzou (v glykosylovaném vzorku digestu nebyl nalezen)*

**Hmotnost glykanu 1170 Da odpovídá**  
**xylose+fucose+3\*mannose+2\*N-acetylglukosamin**

*Nebyl dále potvrzen MSMS technikami*

# OKOŘ

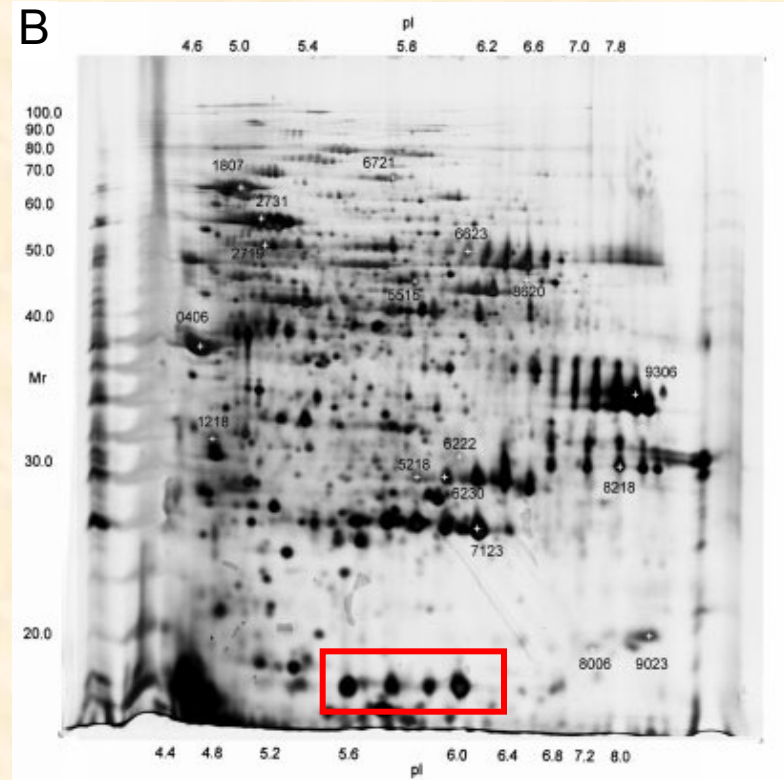
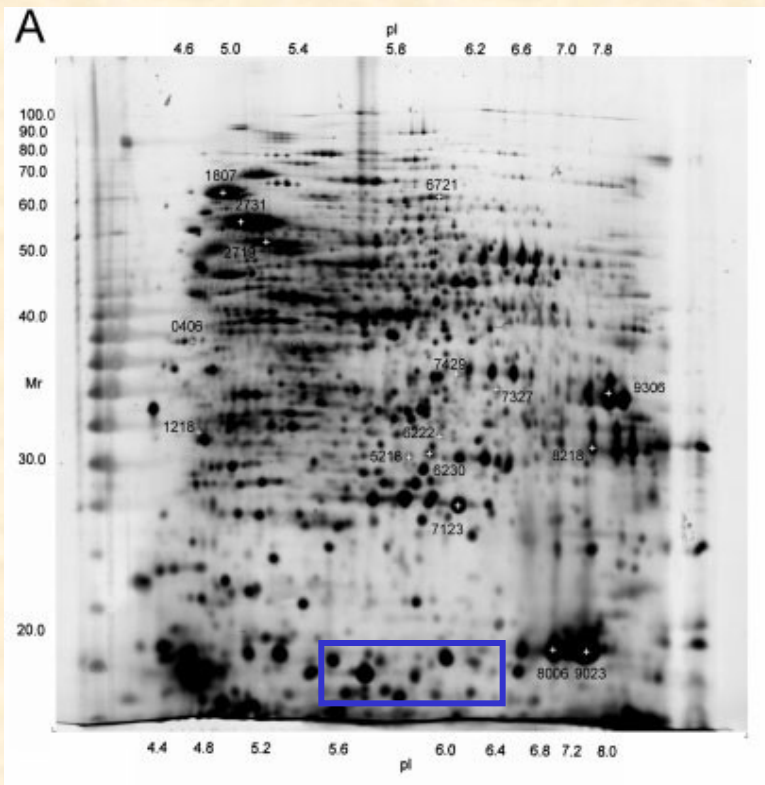




# **Proteomické aplikace - kvantitativní studie**

## Charakterizace změn proteomu *diferenční proteomika*

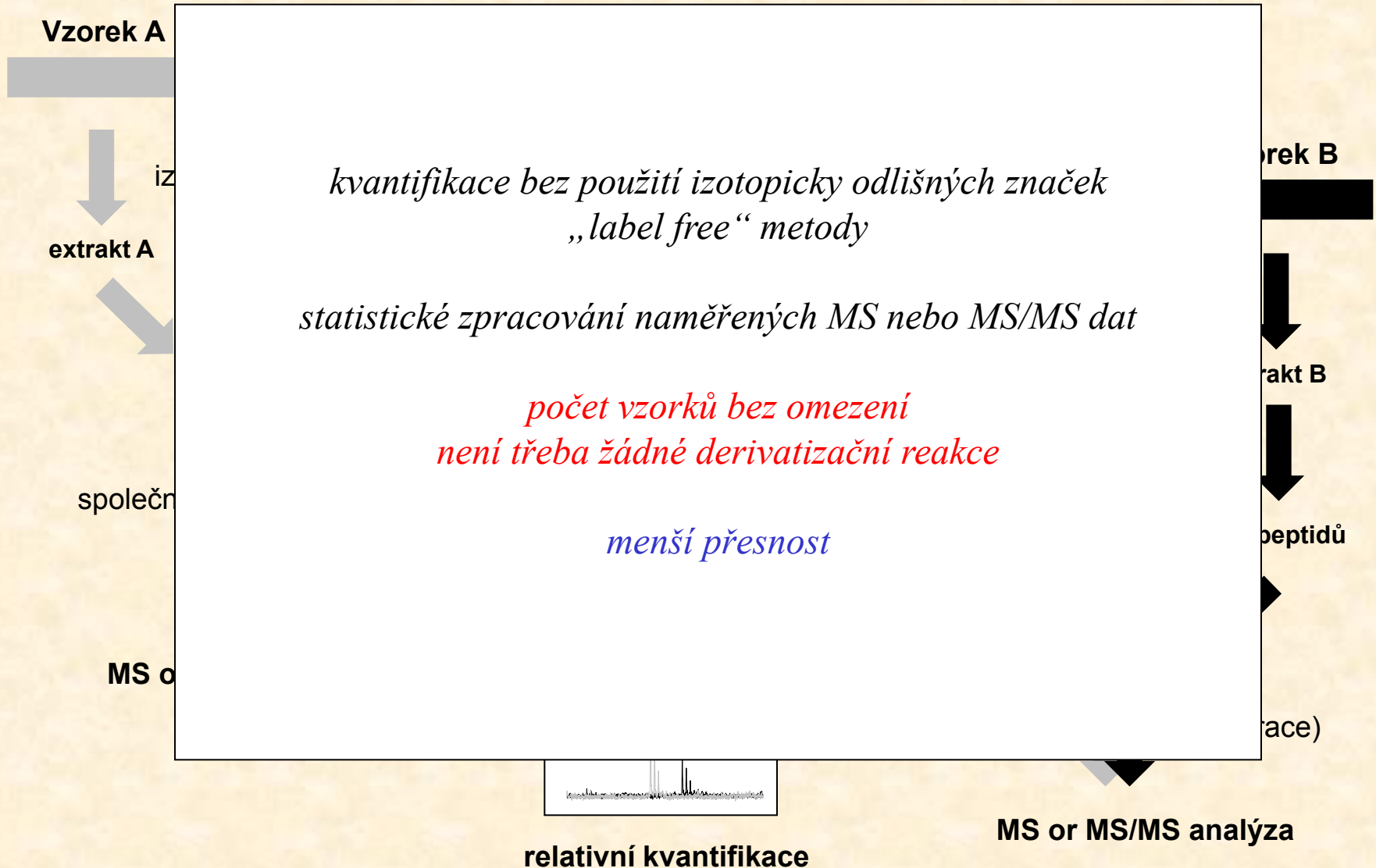
analýza obrazu 2-D gelů  
LC-MS/MS vybraných spotů s rozdílnou intenzitou



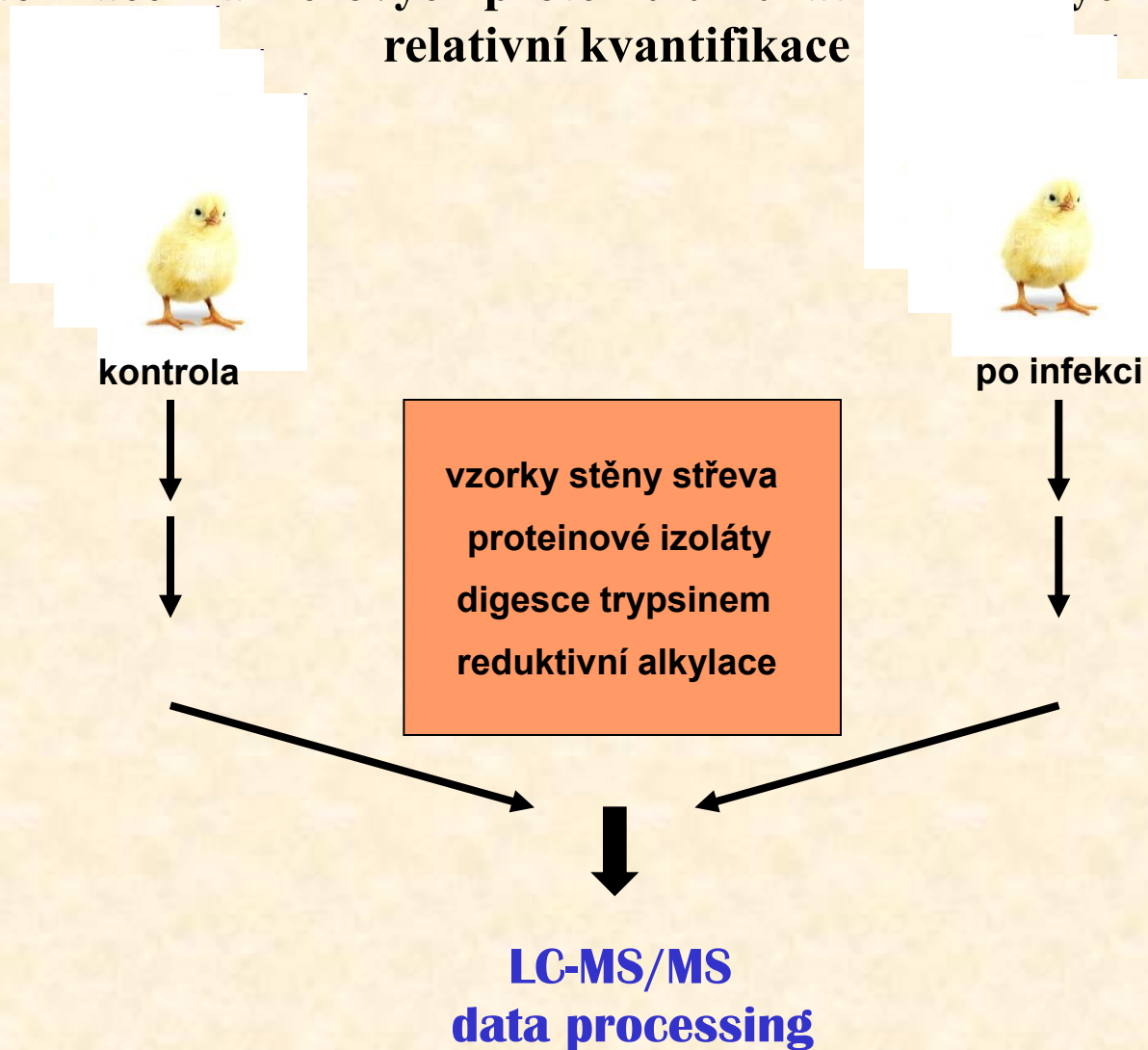
*Acidithiobacillus ferrooxidans* grown on ferrous iron (A) and elemental sulfur (B)

## Obecné schéma proteomického experimentu

Analýza komplexních směsí s cílem kvantifikovat jednotlivé komponenty pomocí izotopicky odlišných značek



# Charakterizace markerových proteinů u kuřat infikovaných salmonelou relativní kvantifikace



- identifikováno více než 2300 proteinů
- kvantifikační údaj pro více než 1900

Accession	Description	infikovaný/ kontrola
363741657		41.032
118095649		34.036
4927286		33.575
112491068	Chain A, Crystal structure of A11 Loop Deletion variant of M2E1 in the cleaved conformation	30.221
56118294	ribonuclease homolog precursor [Gallus gallus]	25.497
363741459	PREDICTED: protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E [Gallus gallus]	24.786

**objasnění molekulárních mechanismů  
nalezení markerových proteinů pro časnou diagnostiku**



**ověření pomocí real-time PCR**

*spolupráce s VÚVet Brno*

# Cílená MS/MS analýza vybraných proteinů

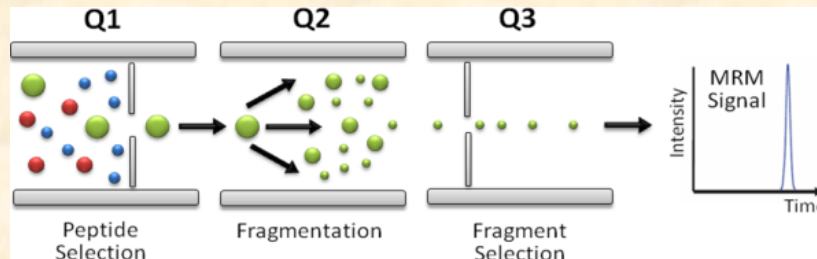
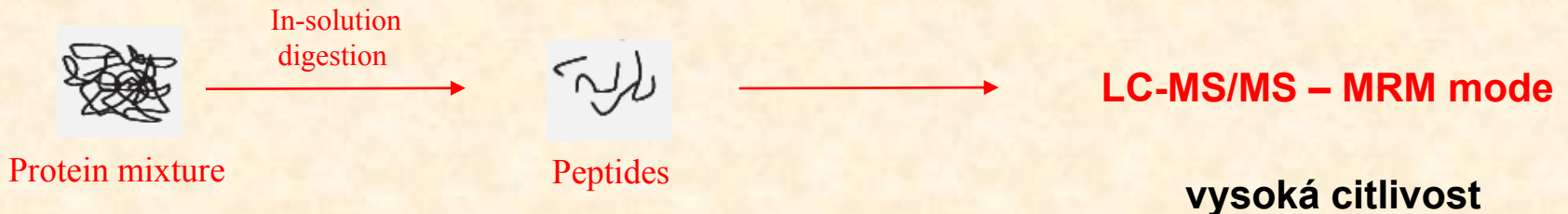
relativní /absolutní kvantifikace

## multiple reaction monitoring (MRM)

screening – výběr kandidátního proteinu

příprava metody (výběr MRM přechodů – peptid + vybraný fragment)

vlastní analýza a zpracování dat

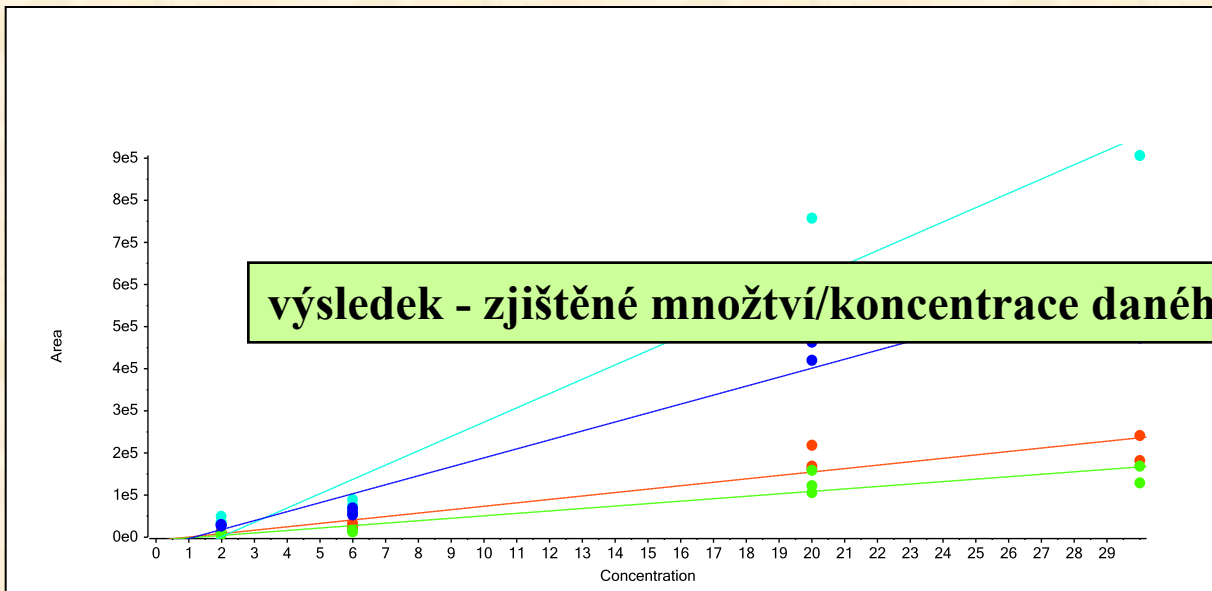
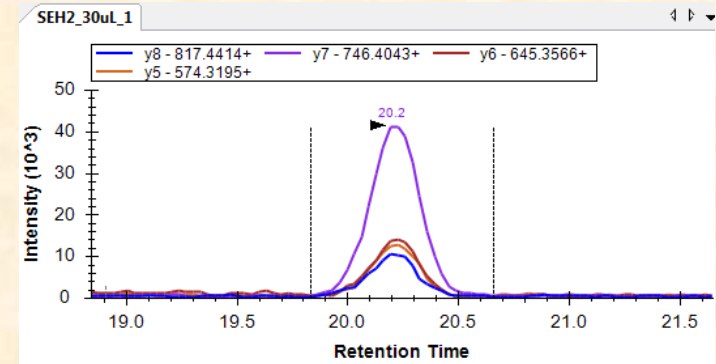


# Kvantifikace enterotoxinů

## *cílená analýza vybraného proteinu*

### *MRM*

- výběr peptidů vhodných pro kvantifikaci
- absolutní kvantifikace pomocí AQUA peptidů



**a to je konec**

