

proteomika



jan havliš

: masarykova univerzita

:: střeoevropský technologický institut

::: mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin

:: přírodovědecká fakulta, národní centrum pro výzkum biomolekul

::: oddělení funkční genomiky a proteomiky



Creative Commons: Uveďte autora-Neužívejte dílo komerčně-Zachovejte licenci 3.0 Česko License

I. úvod do proteomiky

- : definice proteomu a proteomiky
- : postgenomová éra, genotyp vs. fenotyp
- : přístupy současné proteomiky
 - :: expresní a diferenční proteomika
 - :: strukturní proteomika
 - :: funkční proteomika

II. proteiny

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

III. expresní a diferenční proteomika

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

další přednášky kurzu

14. a 21. 10. 2013

: proteinové komplexy – doc. Paleček

11. a 18. 11. 2013

: strukturní proteomika – doc. Marek

25. 11. a 2. 12. 2013

: bioinformatika – Mgr. Potěšil

9. 12. 2013

: proteomické aplikace – doc. Zdráhal

: podzimní semestr

Bi5000 Bioinformatika I – nukleové kyseliny

Bi9060 Bioinformatika II – proteiny

Bi9061 Bioinformatika – cvičení

C7250 Charakterizace proteinů hmotn. spektrometrií

**C7350 Charakterizace proteinů hmotn. spektrometrií
– cvičení**

Bi7528 Analýza genomických a proteomických dat

CB070 Proteinová krystalografie

C7895 Hmotnostní spektrometrie biomolekul

: jarní semestr

CG030 Struktura a funkce proteinových komplexů

I.

úvod do proteomiky

proč právě proteomika?

- : **postgenomová éra**

 - :: jak se dostat k informacím, které neumíme genomicky číst

- : **genotyp vs. fenotyp**

 - :: co vede od jednoho k druhému

- : **proteomika**

 - :: aneb cesta od genu k proteinu a zpět

- : **přístupy současné proteomiky**

 - :: exprese, purifikace a analýza rekombinantních proteinů

 - :: analýza vztahu mezi strukturou a funkcí proteinů

 - :: diferenční proteomika

 - :: analýza posttranslačních modifikací

genomika

: studium funkce a struktury genomu

Hans Winkler (1920): gen+(chromos)om

: **χρῶμα** barva + **σῶμα** těleso (1888 H. W. Waldeyer)

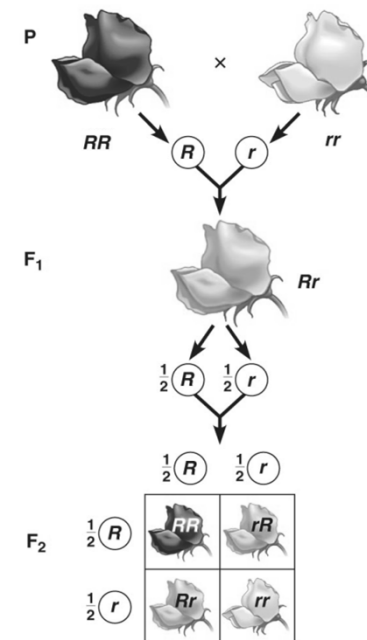
: **γενεά** generace, potomek (1903 W. L. Johannsen)

genom = kompletní dědičná informace organismu
(veškerá DNA, resp. RNA)

genotyp \leftrightarrow fenotyp

: jaký je mezi nimi vztah
na **molekulární úrovni?**

:: stačí pouze genomika?



postgenomová éra

: jak se dostat k informacím, které neumíme genomicky číst

v databázích desítky milionů záznamů

: unikátní záznamy (*non-redundant databases*)

```
19470700 cacacctatagtatagctcaattctagataaaaatatagaaatggatccttgagaatcattttttttgtattcttttgttat
gctccgaggaagaagataaatatgaaaagagcttttttagggtttatcattctccttgactttgcaaaacgtgaaatgtaaggca
19470500 tgttgctttttatcgtatcgcttccctacaataagttaacaatgcttccctcgtagaattgcaaaacatttggaccgtgatt
ttcagtggtcttctttgcagcagcttcttccctggaggactaatcaagacagaaaactgttccctctaaaaacgatcgccgttct
19470300 ttgacgagctcttgatccttagaatcaaatttataagggatcacagatacacgtattaattattttttttttttttgtt
tcactcaaatgatgggtaaagttacaagcttgggcttcacgtccaatttggtcttttgcgtcctggtaattctgctttct
19470100 atgattctacatttctactcatctcgttcttgtttttcaaatgatataaatttgtgtgtatatcacccattcatgtatattt
ttcctgggtgttggtttgcagtgcatctggatctcaaatggcgcaacaacaacggagaacctagtcaaagggtcgcttcatt
19469900 caagtctagtttccggagattgaaaacatcggaaaatttacatatagccaaagacaaacttatctacgatcggtttagcgagagtt
caacaacgacactggtttacagagattcaaacacaggttggttaaaactaattacataaattcaattattcttagttattatc
19469700 tatataacatctaactataattttatgttggttggttggttgattattgttcttcagatcgaccattgttggttgtagctt
gtctcacaagtttctgtacatcagtagggacggctctcatgttttcttacattgcagaatcaaacacaaggtgcgtgttttgc
19469500 caagtcgtggagactacacttgggtacactcaaacctggatcagtttaactggctcgtcttaacgggaactcaacgaaatctcaç
tacagattggttccaagcagcacagagtaataactacactacagcctttgttaggaacgagcttgggaggagaagataacgaga
19469300 gttagcttgtagcaagaaggctctgtttcttttagggtttccgggttaagactttaaccgaagtttgaacagtttgaatct
acatgtggacaaggacgggacgggtgcttggttcgtgaaggttcactgaatgattctttcttcatctccaatggctcgatttgc
19469100 ctccctctggtctcaatgcatccctgaaaattgcagttccagtggtcagaggtggagatcaaaagattaagataccaagctt
gtttcgggcgttccctctggttaaatactgaaacatatttcaacttgatgcagtaaaaatgcatcgacttgttgtttctcagctt
19468900 tttgccagagatacacactcatgtttcccaacaaaggaggagcaacacgcatcaagcaccgaagcggaaaaggcaaaatatcaç
atcttctggcttccggttggcctgtatggtttgtgtggtttatgatgcaagcaacaaggagagagatgcatatgctgcaacgc
19468700 gcgacacaacaagctgagagaaaagagcatgaacaagagtcagcatttgcaaatgctagccacgatattagaggtgccttgc
ttgatataatgctgtgatggagttaaacctggctccgacgtagacaccactctcaaccaagtgaatgtttgcgccaaggatttç
19468500 tctttagctttctcttatgctgtttcttcaactttctctcaacagaaaattcttctcagttgtttaaattacagctctgct
tgagcaaaatcgaaaacgggaagatgcagttagtggaagaagatttcaacttgcgaaaacttcttgaagacgtcatcgatttt
19468300 gaagaaagggttgatgtagttttggatccgcacgatggctcggttttcaaatctcgaatgtacgaggggatagtggcagac
aatcttggtagcaatgctgtcaagttcaccgtcgacgggcacattgcggtaaagagcttgggctcagaggccaggttccaataç
19468100 catatcctaagggtgtgtccaagtttgaagagatggttctgcaagaataaagaagagtcataacctaagagacagaaaatç
caatgcaaacacgatggagtttgtgttgaagtgatgatactggtaaaggatacctatggagatgcgtaagtcggattttç
19467900 agagaaaacagctcaaggacaccaaggaactggttttagggctcgggattgtgcagcttttggtaagctactaaaacagaaacç
taaacttagatggttttcatttgtggtctattatattataggttaagattaatgggaggggagataagaatcaccgacaaggccat
19467700 gtttccaattcaatgttttattgacaacattaggtctcctcagtgagtgacatgaaagtgagacaggagatcgaagcaggaç
gcaaacctcgggctgactataaacacttcaacttggaggtagcatgaatatacgtaacctgagtcctagattcaacaactgtc
```

genotyp vs. fenotyp

: co vede od prvního k druhému



jeden genotyp
tři fenotypy

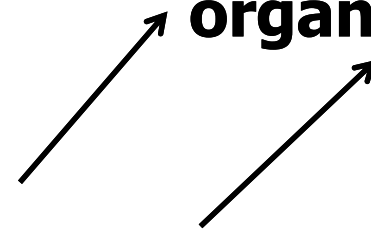
gen

> transkript

> protein

> metabolit

organismus



DNA

TOARMALJEAULMEADATDIKAMENT

1: nahrad' mezerou všechny třípísmenné skupiny končící na L

2a: vystřihni všechny skupiny o počtu znaků ≤ 4 ,
začínají-li na A a končí R nebo T

DNA

TOARMALJEAULMEADATDIKAMENT



mRNA

TOAR JE MEADATDIKAMENT

TOAR JE MEADATDIKAMENT



protein

TO JE MEDIKAMENT

2b: vystřihni všechny skupiny o počtu znaků ≤ 7 , začínají-li na A a končí R nebo T

TOAR JE MEADATDIKAMENT



TOAR JE MEADATDIKAMENT



TO JE MEDIK

2c: vystřihni všechny skupiny o počtu znaků ≤ 7 , začínají-li na A nebo I a končí R nebo T

TOAR JE MEADATDIKAMENT



TOAR JE MEADATDIKAMENT



TO JE MED

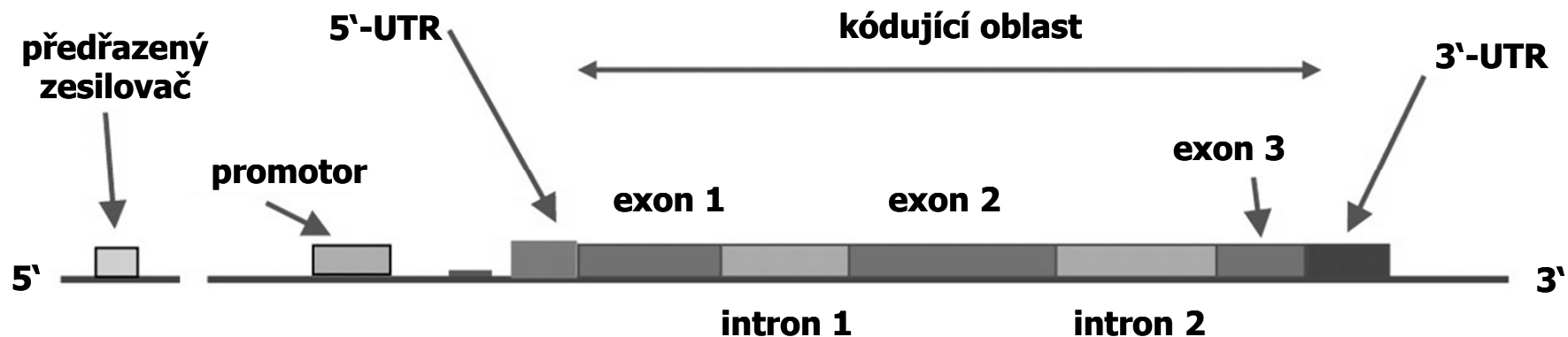
proteomika aneb cesta od genu k proteinu a zpět

struktura genu

- : promotor
- : počátek transkripce
- : 5'-UTR
- : počátek translace
- : místa sestřihu
- : stop kodón
- : 3'-UTR
- : polyadenylační signál (3'-konec)
- : čepička (5'-konec)

regulace genové exprese

- : regulace transkripce
- : sestřih mRNA
- : translační represe
- : posttranslační umlčení
- : směřování proteinů
- : posttranslační modifikace



proteomika

: studium funkce a struktury proteomu

Marc Wilkins (1994) – prote(ins by gen)ome

proteom = souhrn všech proteinů a jejich forem v buňce/tkáni

: **-om** = velký/úplný soubor jednotek

:: lipidom, glykom, metabolom, sekretom...

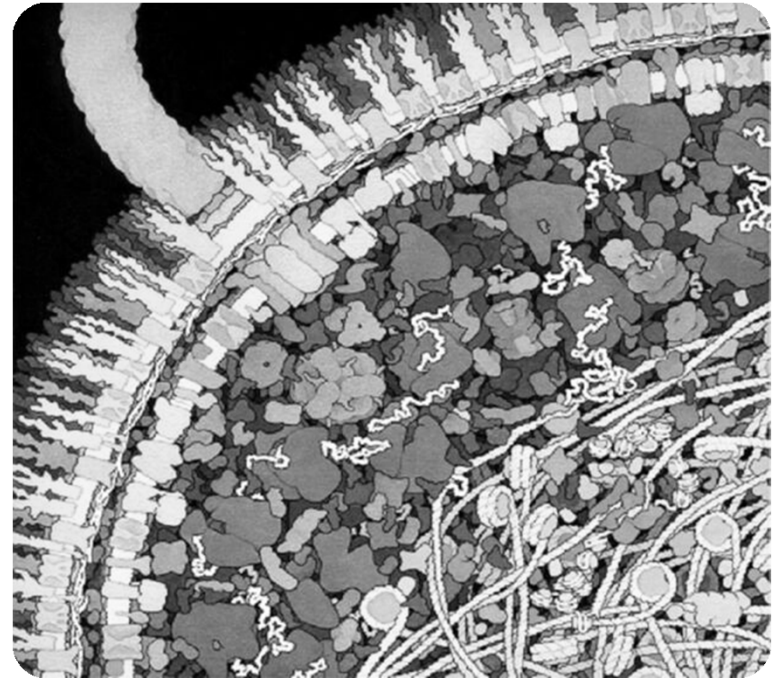
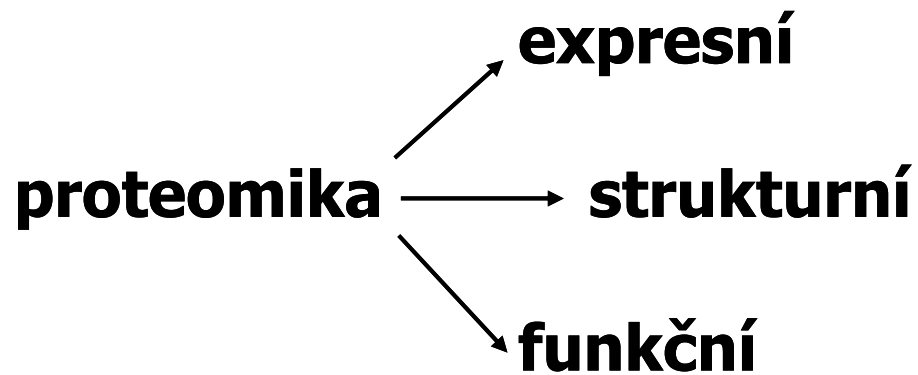
proteiny v buňce

: enzymy, strukturní prvky, informační signály, zásoby, přenašeče

proteinové komplexy

: biologické stroje





- : **identifikace** – PTM; aktivace, sestřih
- : **lokalizace** – buněčná proteinová mapa
- : **interakce** – přenos signálu, p. komplexy, p. soustrojí
- : **funkce**
- : **aberrace** – mutace, alternativní skládání
- : **kvantita**

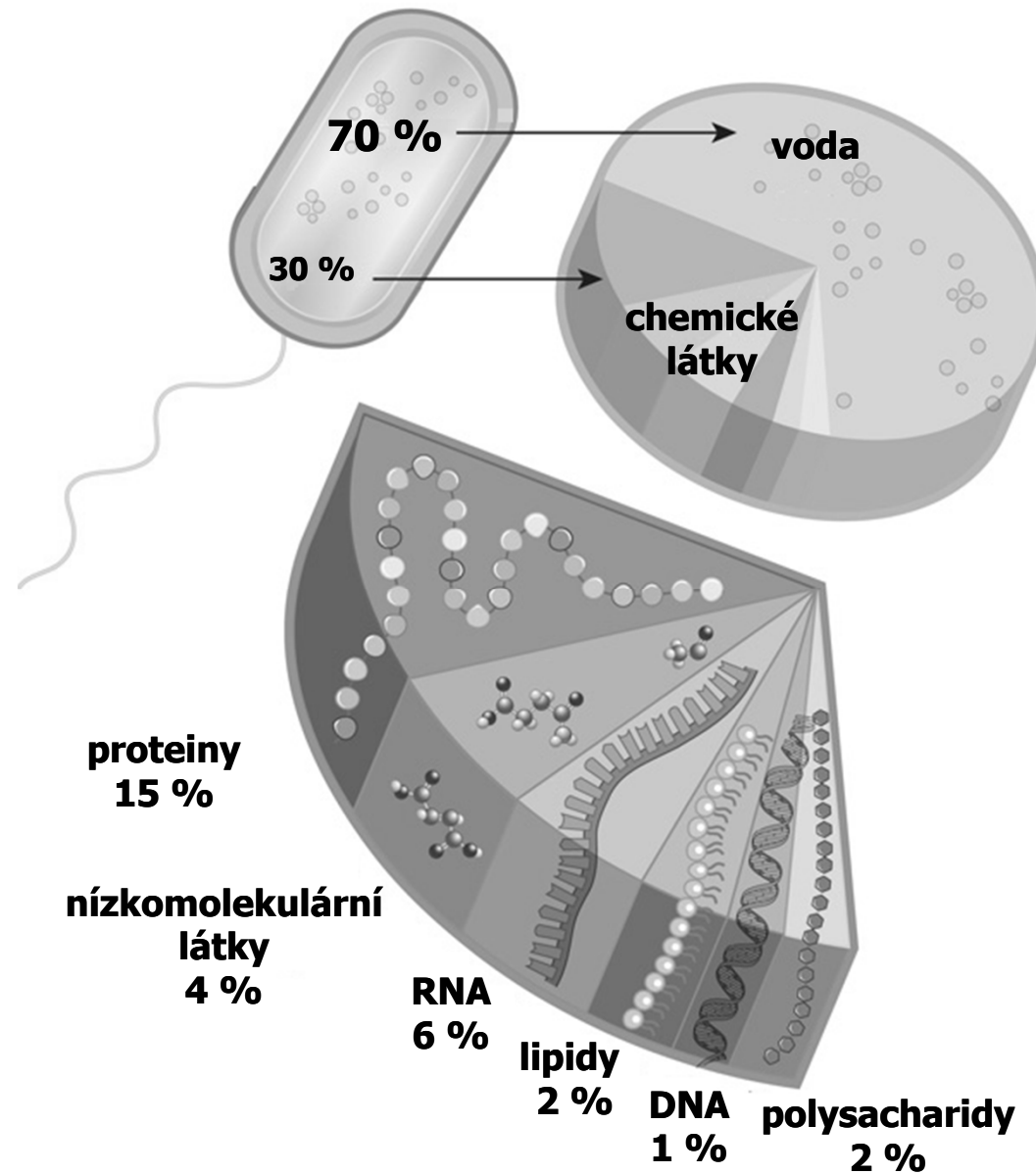
základní charakteristiky proteinů z hlediska jejich studia

- : velmi **široká škála** fyzikálně-chemických **vlastností**
- : jsou jich **řádově desítky tisíc druhů** v jednom organismu
- : mají velmi **dynamické chování**
- : **metody** jsou stále **ve vývoji** a metodika **není triviální**

proč nestudovat proteiny genomicky?

- : **post-translační modifikace** – nejdou odhalit ze sekvence DNA
- : analýza **lokalizace, funkce a interakcí** též nejde ze sekvence DNA

význam proteomu



: **molekulární odpověď**
na vztah genotyp-fenotyp

: **určuje** ostatní **bio-omy**

přístupy současné proteomiky

získání proteinového materiálu

- : exprese *in vivo*
- : rekombinantní proteiny
- :: modifikace proteinu – značka

separace proteinových směsí

- : izolace, purifikace
- : zjednodušení směsí

identifikace proteinu

- : sekvenace
- : určení PTM

stanovení proteinu

: relativní

:: v porovnání k jinému stavu

: absolutní

:: počet kopií v daném stavu

stanovení struktury proteinu

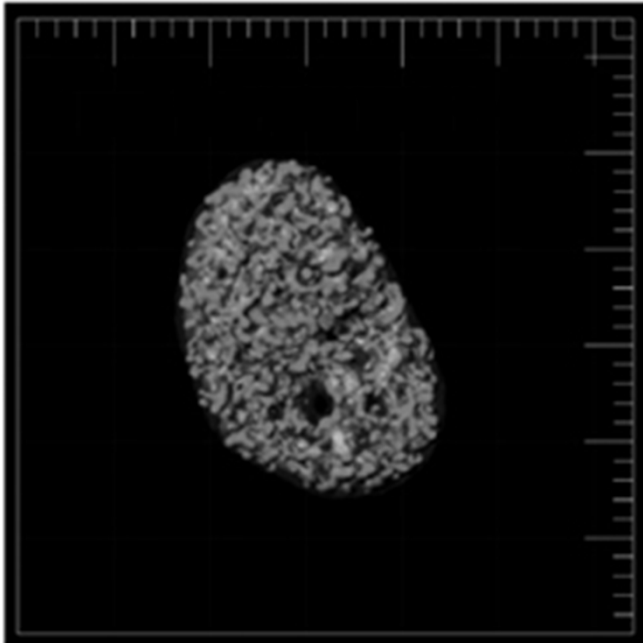
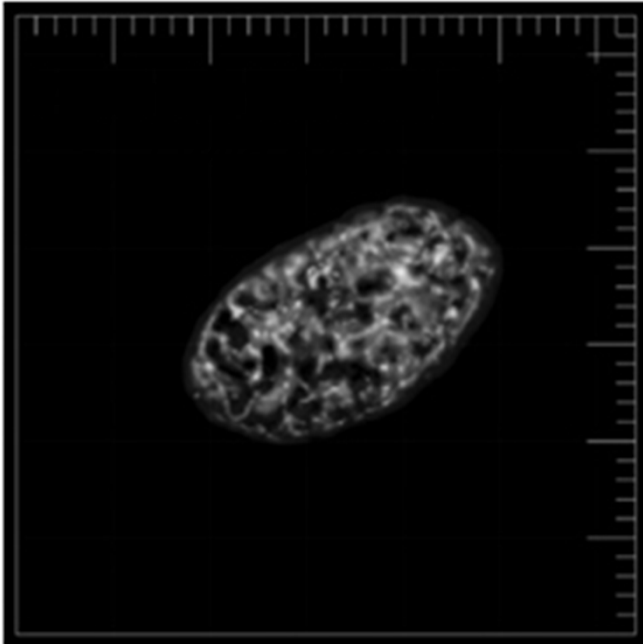
určení interakčních partnerů

: jiné proteiny

: nízkomolekulární látky

:: substrát, koenzym, moderátor u enzymů

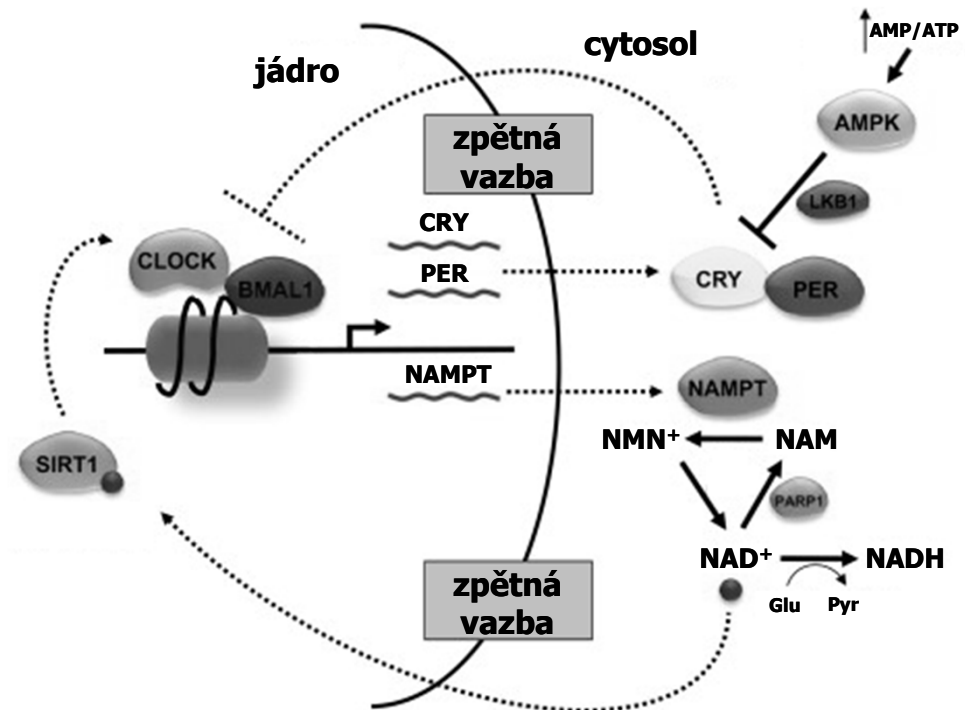
:: přenášené či skladované molekuly



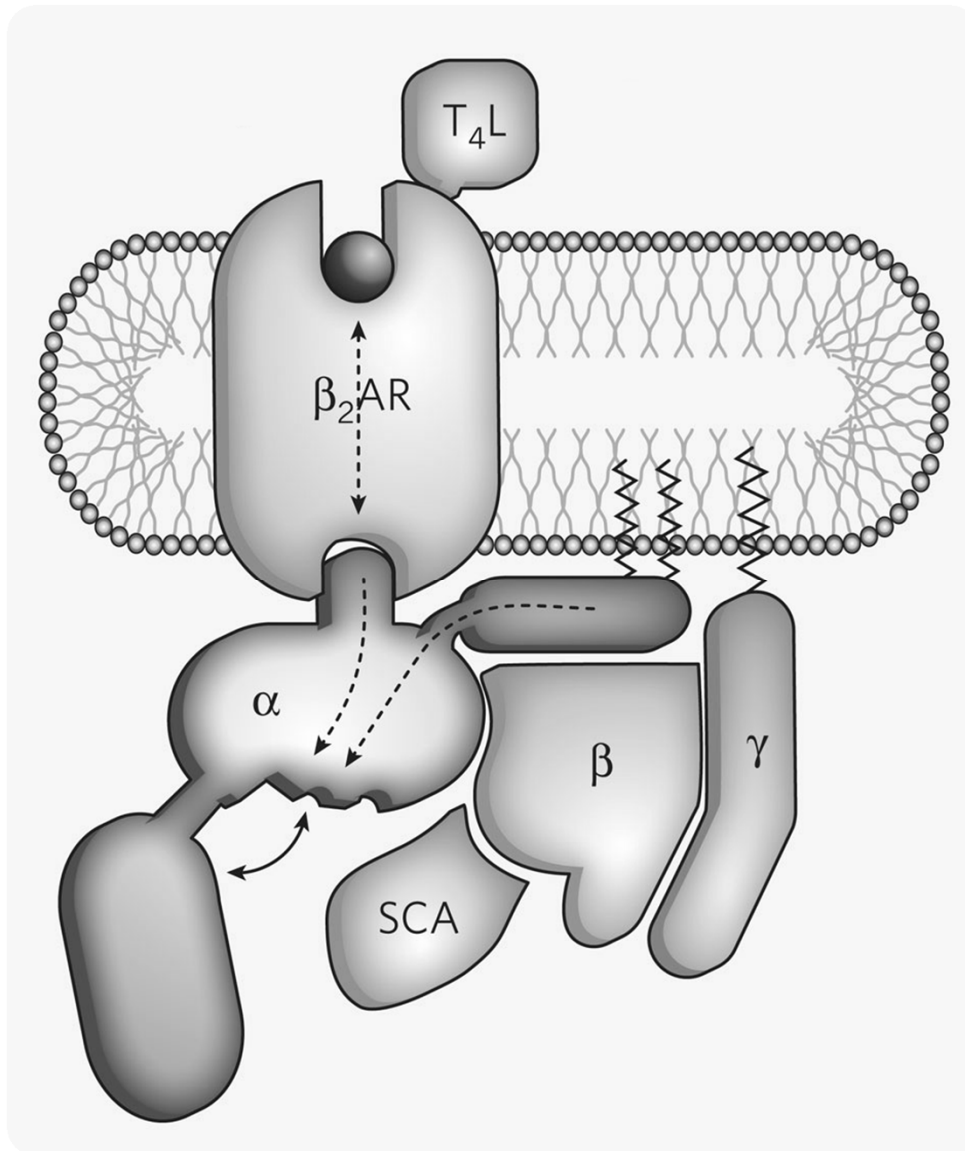
expresní proteomika

: rozdíly ve fungování
(za různých podmínek)

- :: různé sady proteinů
- :: regulace tvorby proteinů



funkční proteomika



- : organizace proteinů**
- :: interakce proteinů**
- :: funkce proteinů**

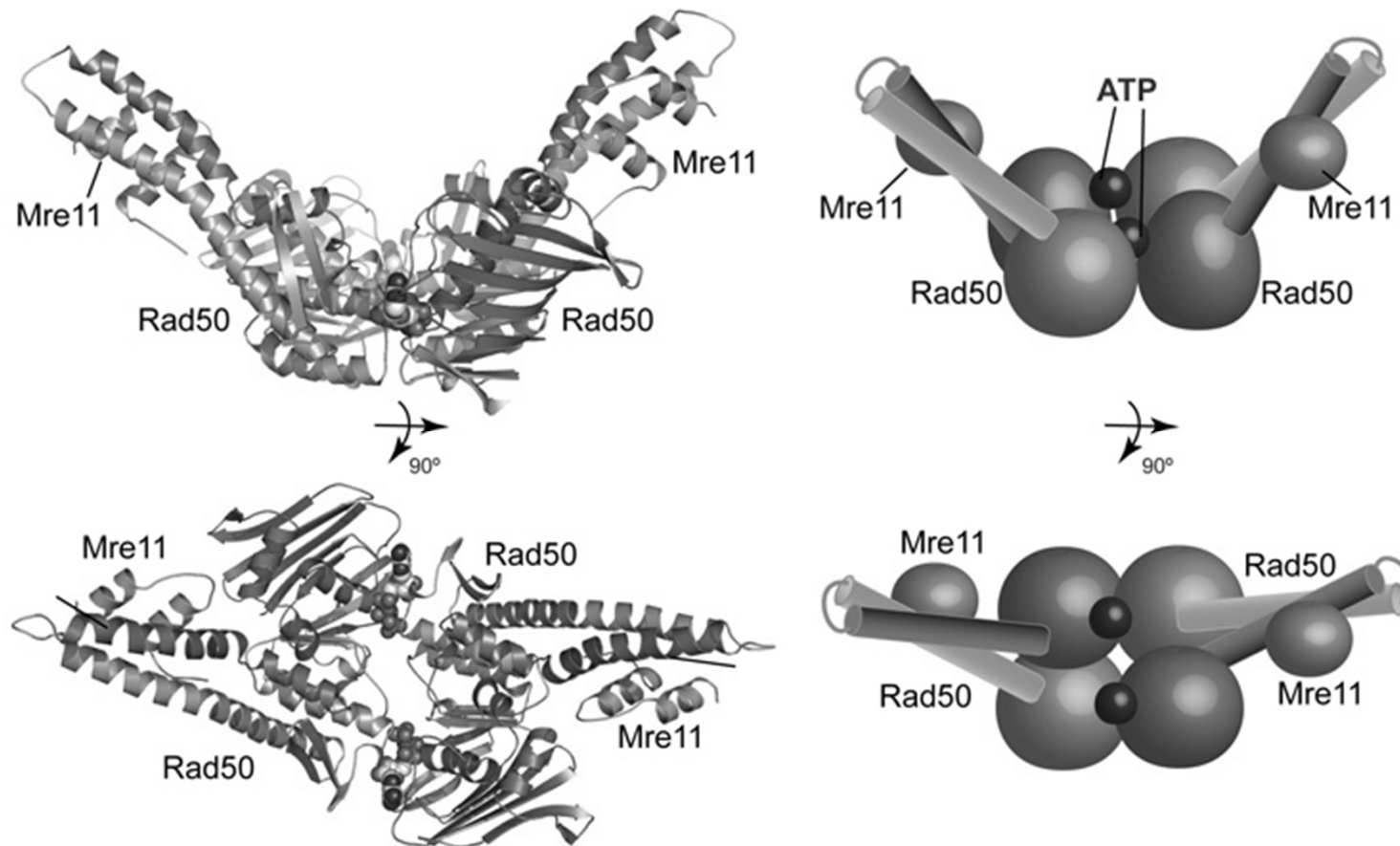
protein

- : proteinový komplex**
- :: proteinové soustrojí**

strukturní proteomika

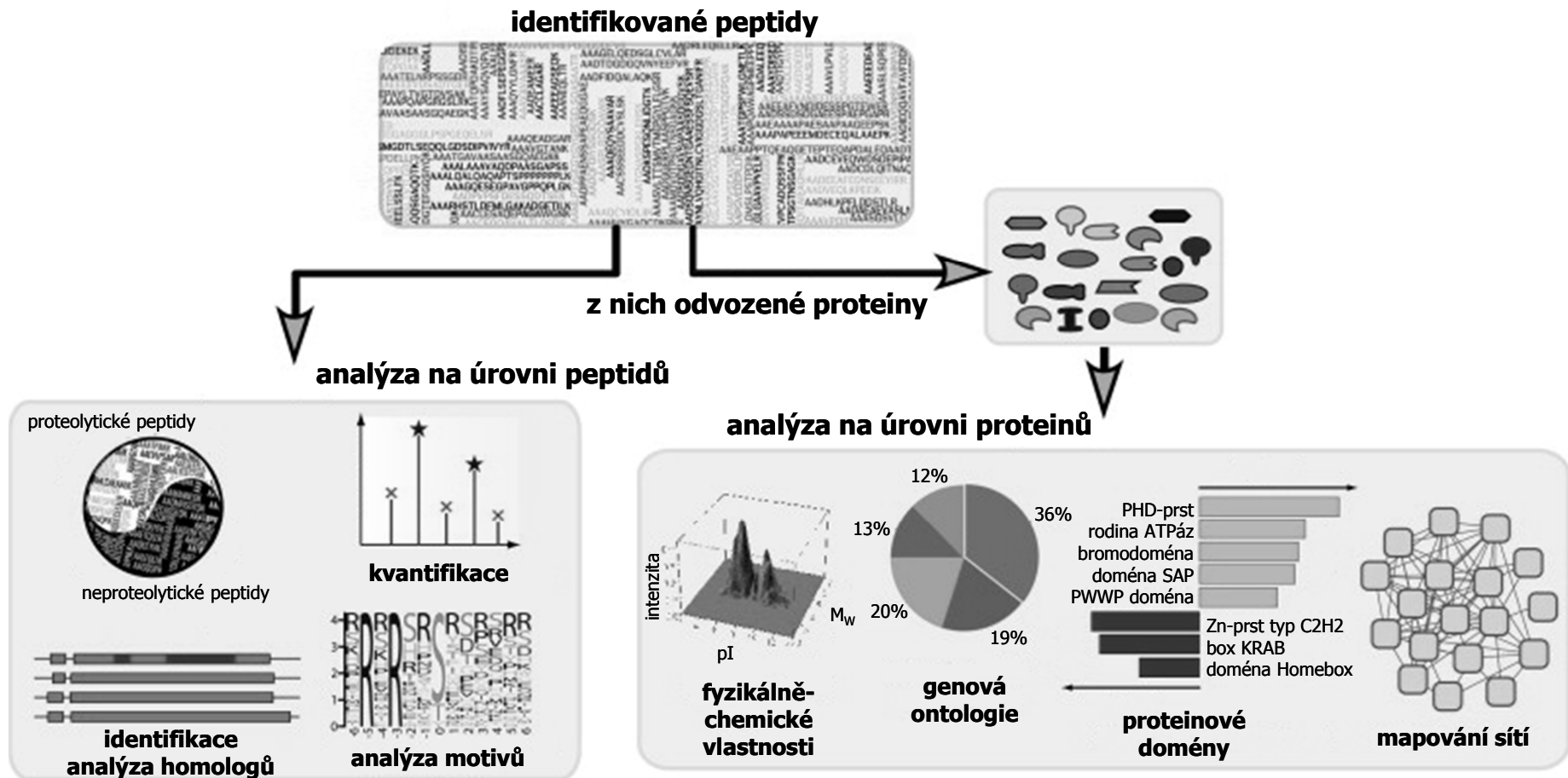
: struktura proteinů

:: vztah mezi strukturou a funkcí

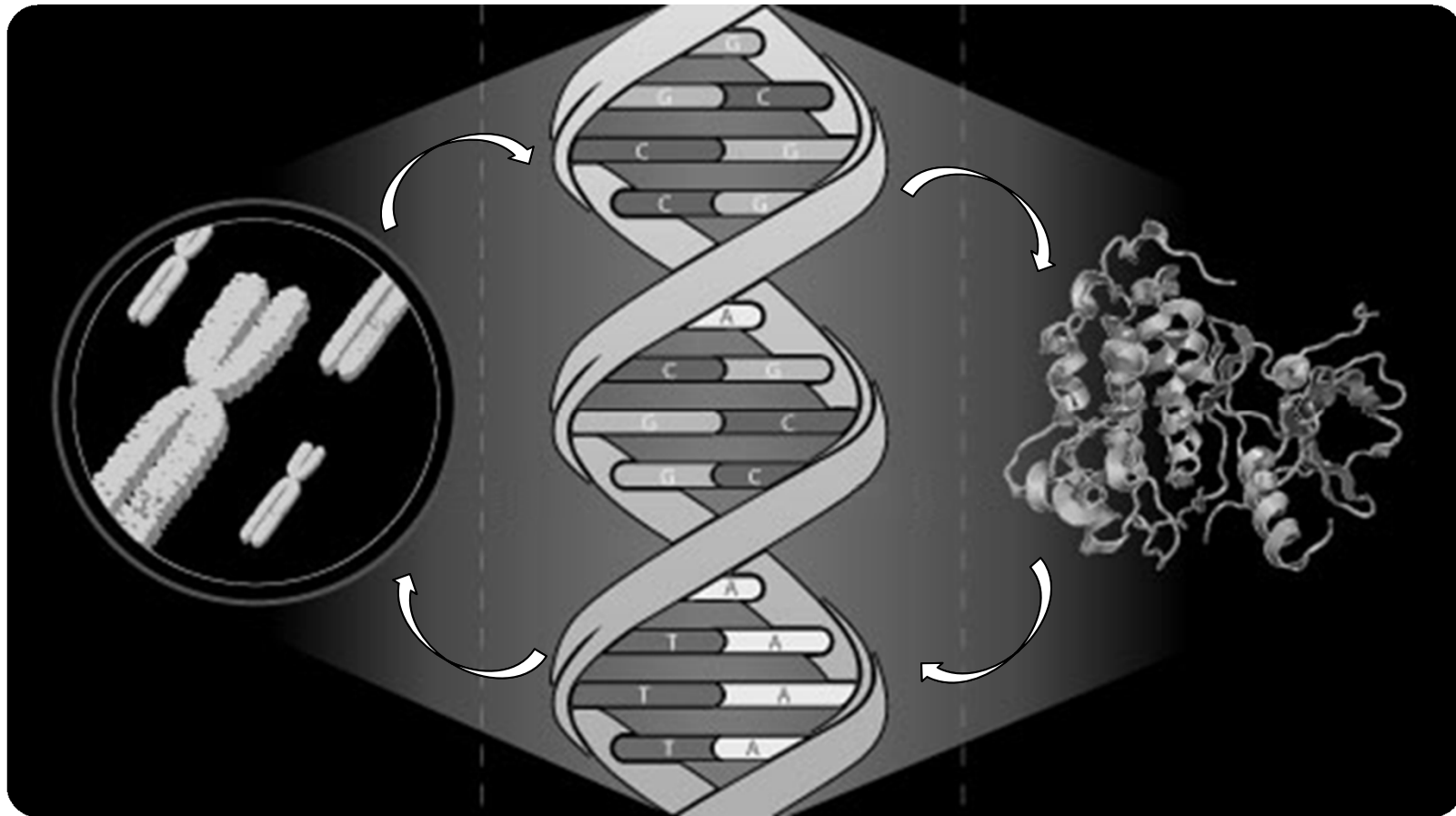


proteomická bioinformatika

: analýza proteomických informací
:: získaných bioanalytickými metodami



genomika a proteomika



systemová biologie

II.

proč proteiny?

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

genom

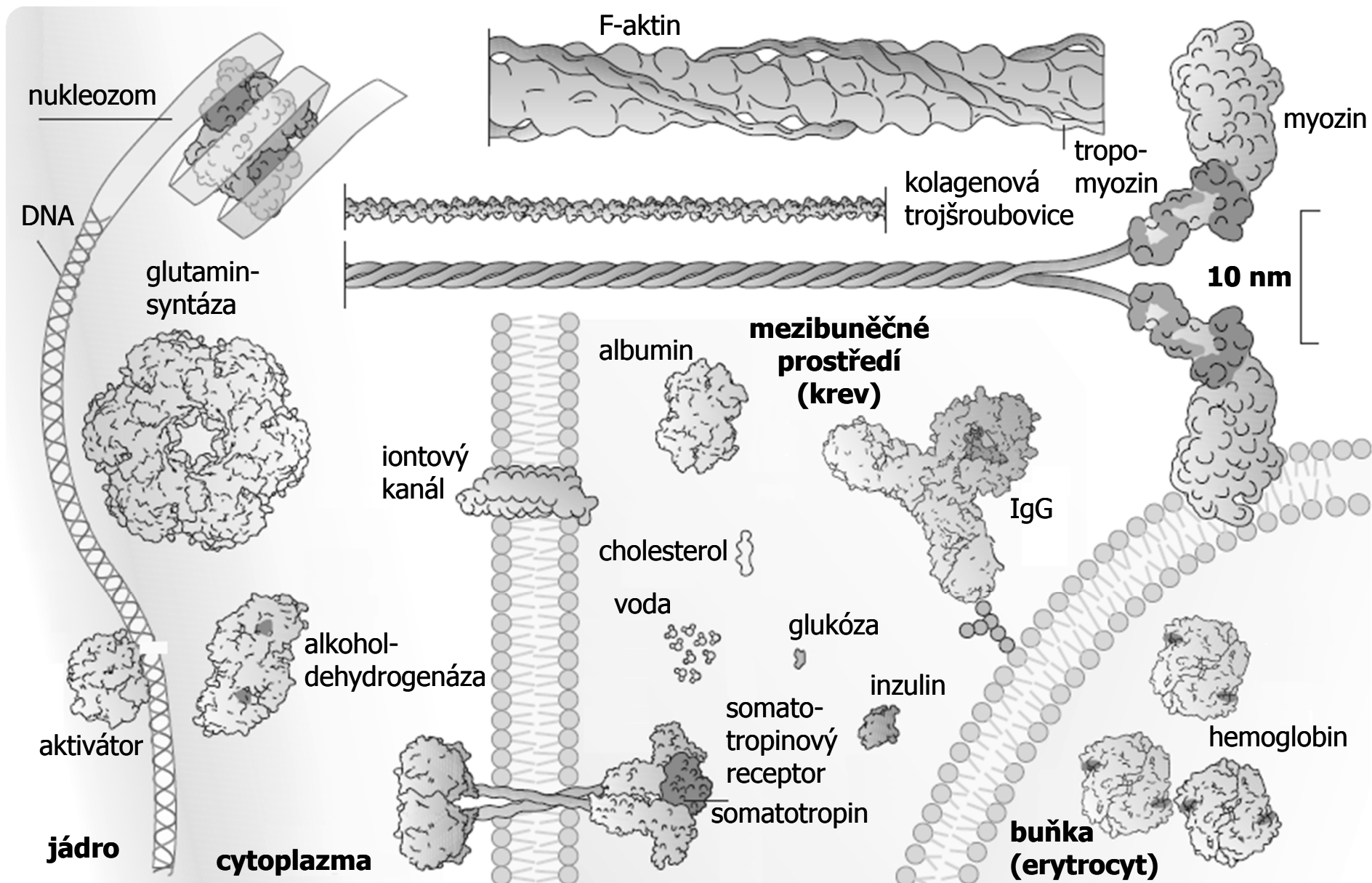
- : v zásadě statická entita
 - :: změny spíše nežádoucí
- : relativně jednoduchý

proteom

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

proteiny

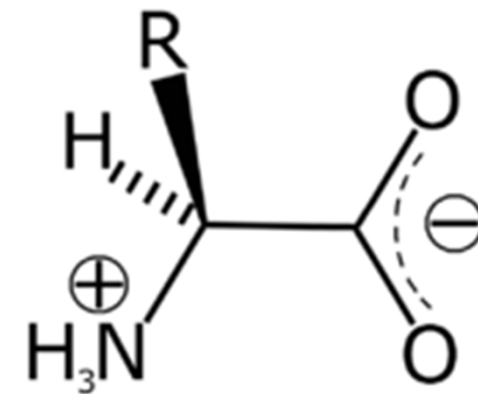
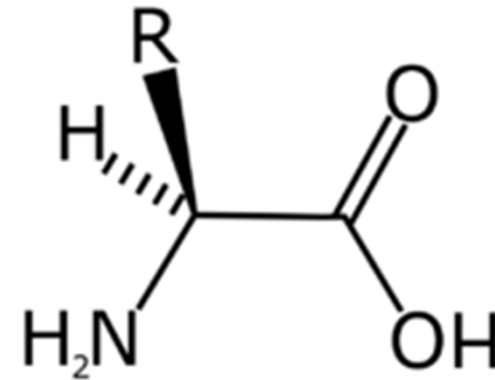
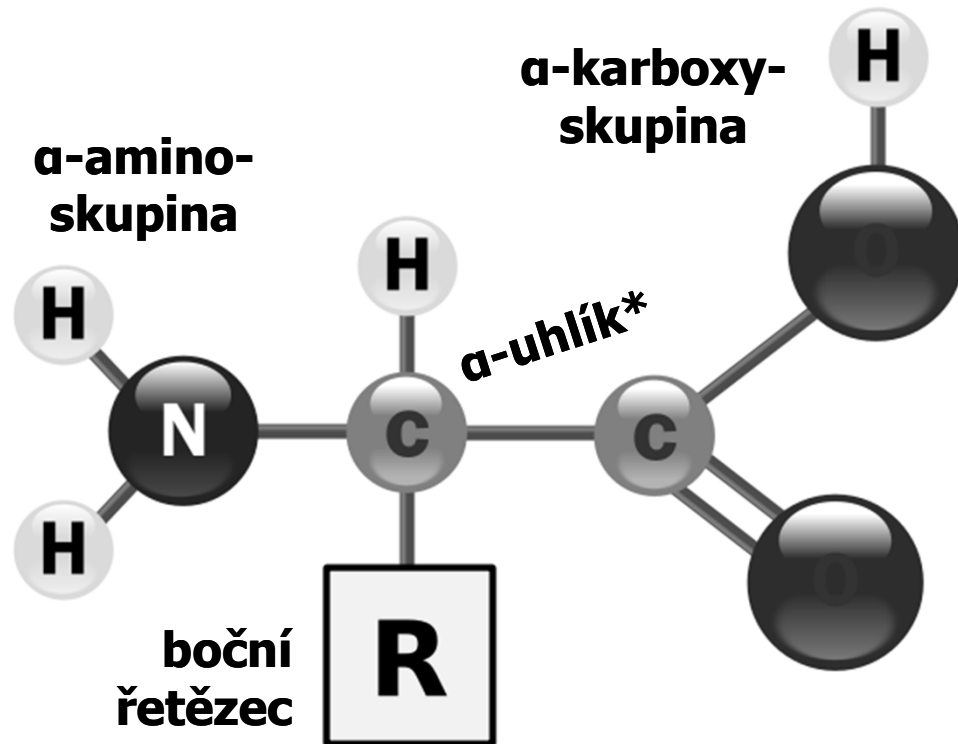




protein/peptid ~ bio(hetero)polymer

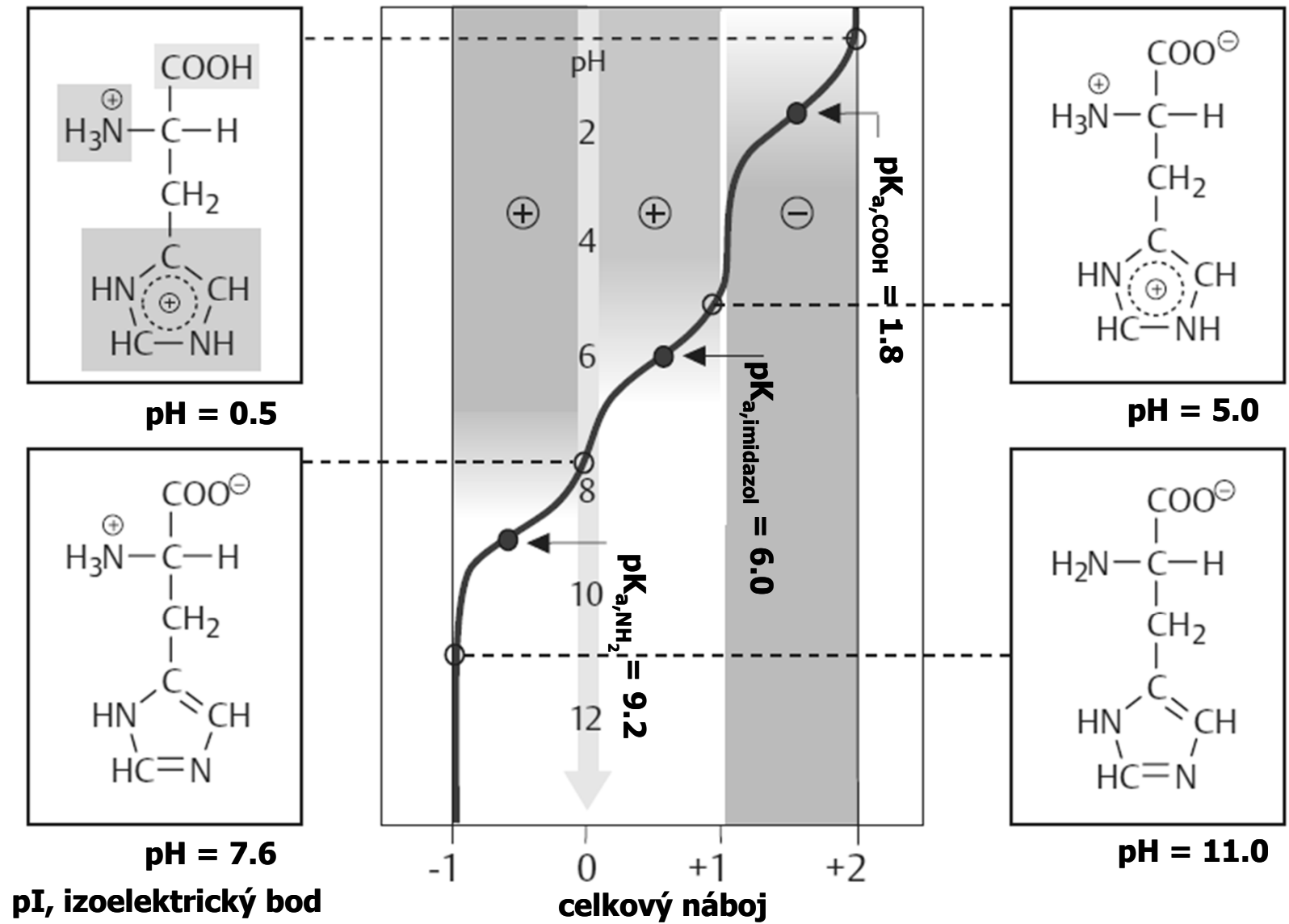
: monomer – *aminokyselina*

:: biogenní aminokyseliny (L-formy)



obojetný ion
(*zwitter-ion*)

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



aminokyseliny (AK)

: běžné

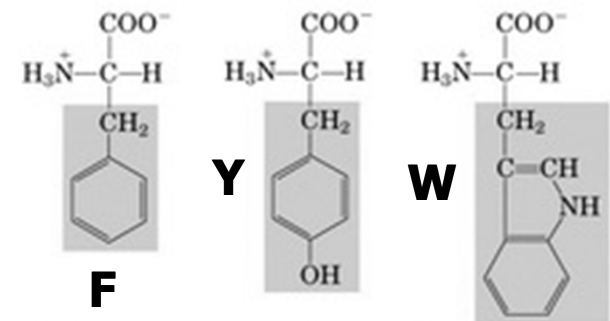
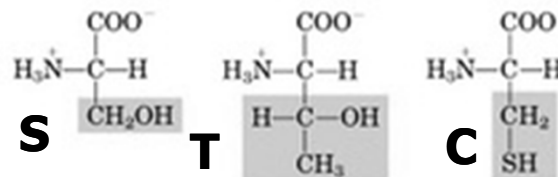
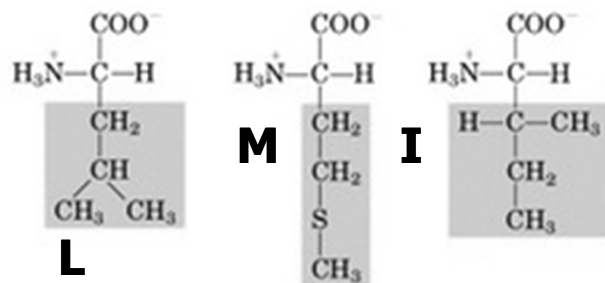
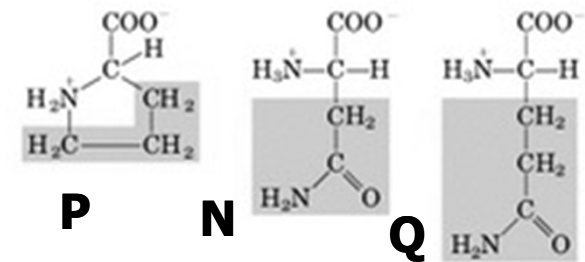
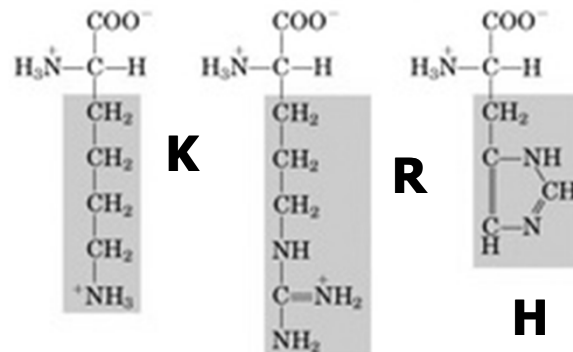
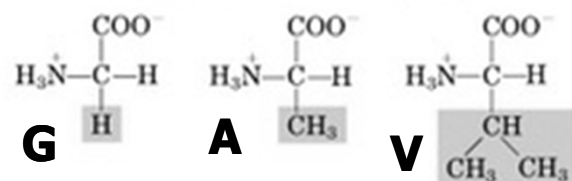
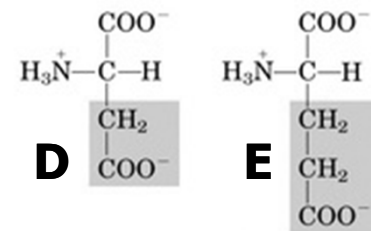
:: Ala/A, Arg/R, Asp/D, Asn/N, Cys/C, Glu/E, Gln/Q, Gly/G, His/H, Ile/I, Leu/L, Lys/K, Met/M, Phe/F, Pro/P, Ser/S, Thr/T, Trp/W, Tyr/Y, Val/V

:: 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

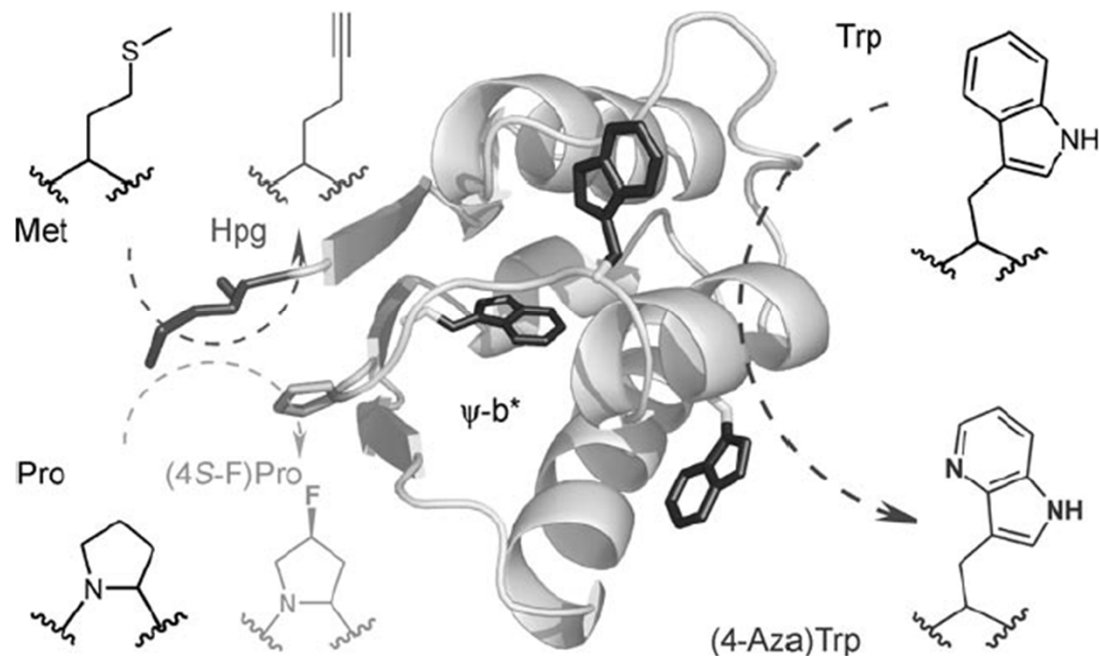
::: Ser/S, Thr/T + Tyr/Y (pK = 10.0)

:: 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



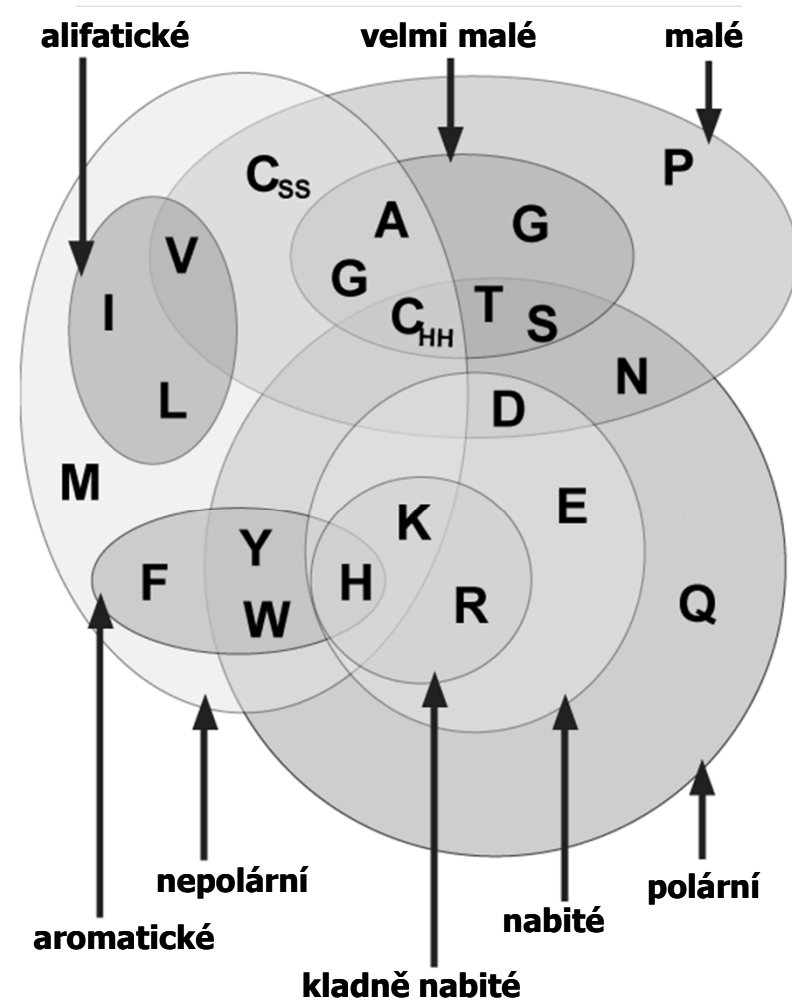
multifunkční struktura aminokyselin

- : 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

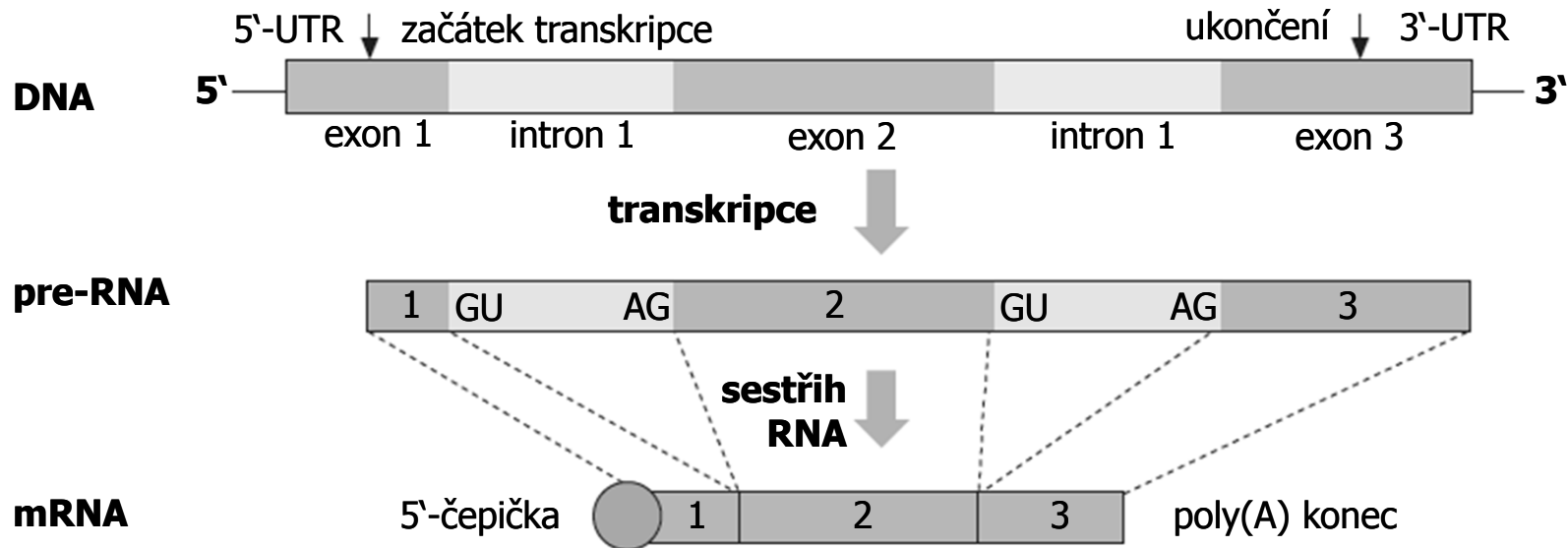
: proteiny

:: **biosyntéza**

::: transkripce (DNA > mRNA)

::: translace (mRNA > protoprotein)

::: posttranslační změny (protoprotein > funkční protein)



:: **abiosyntéza**

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

schéma transkripce

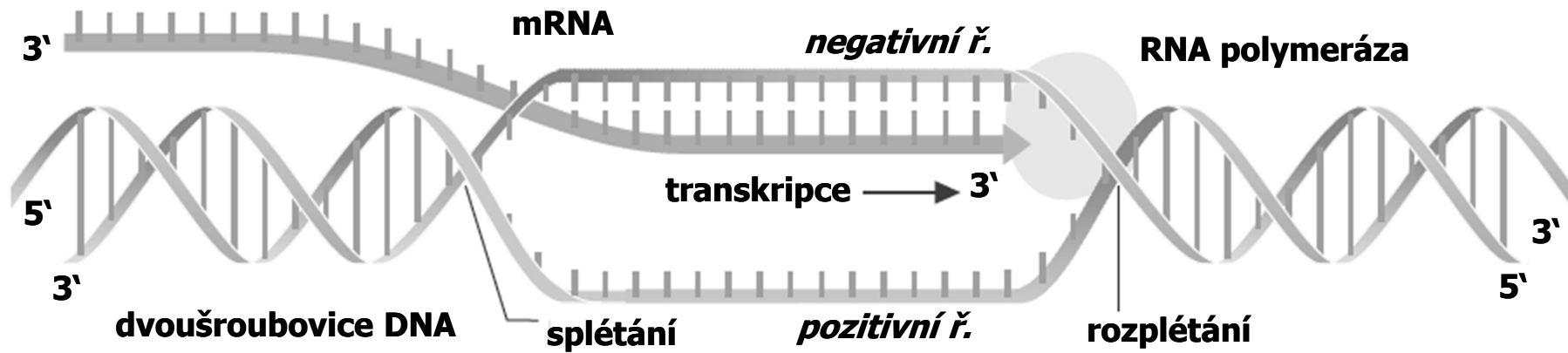
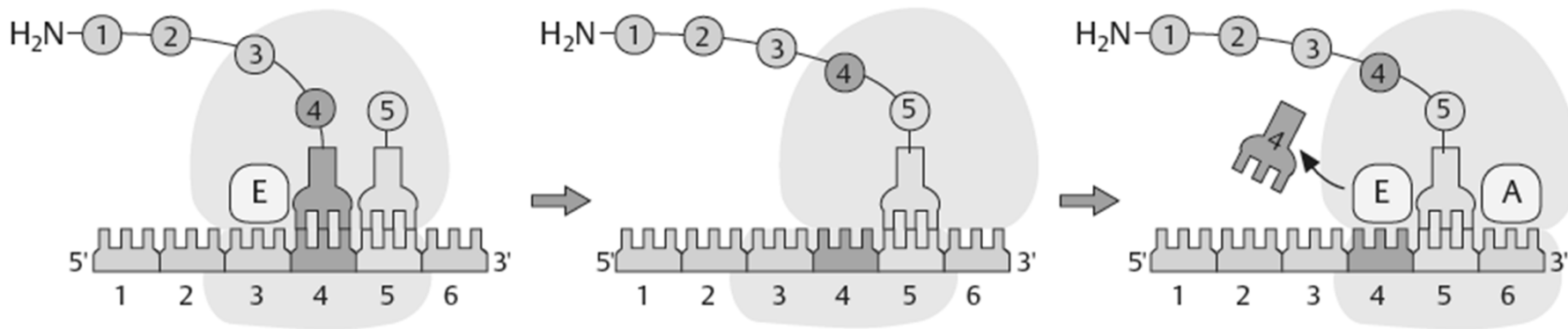
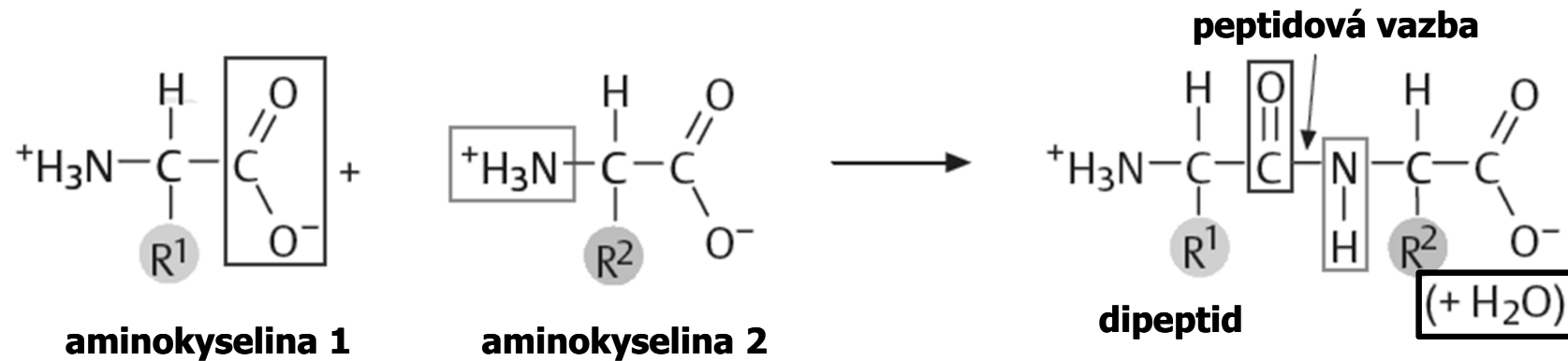


schéma translace



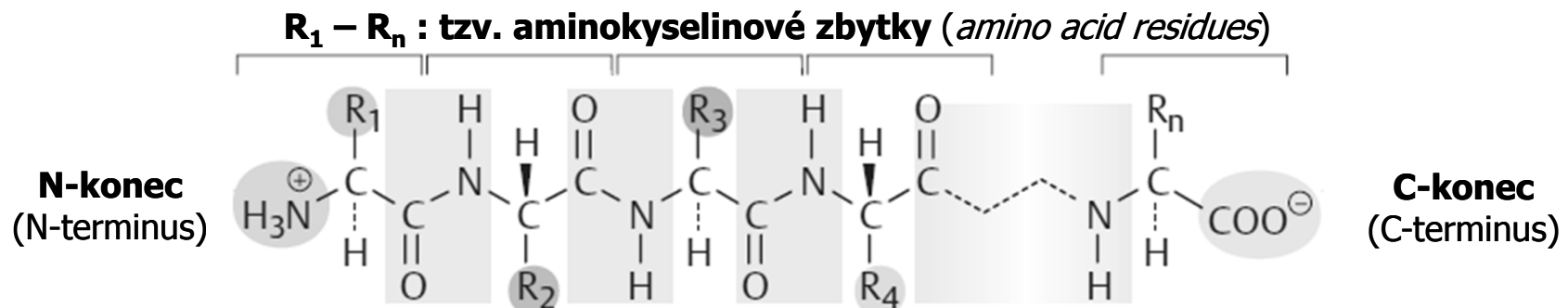
vznik peptidové vazby



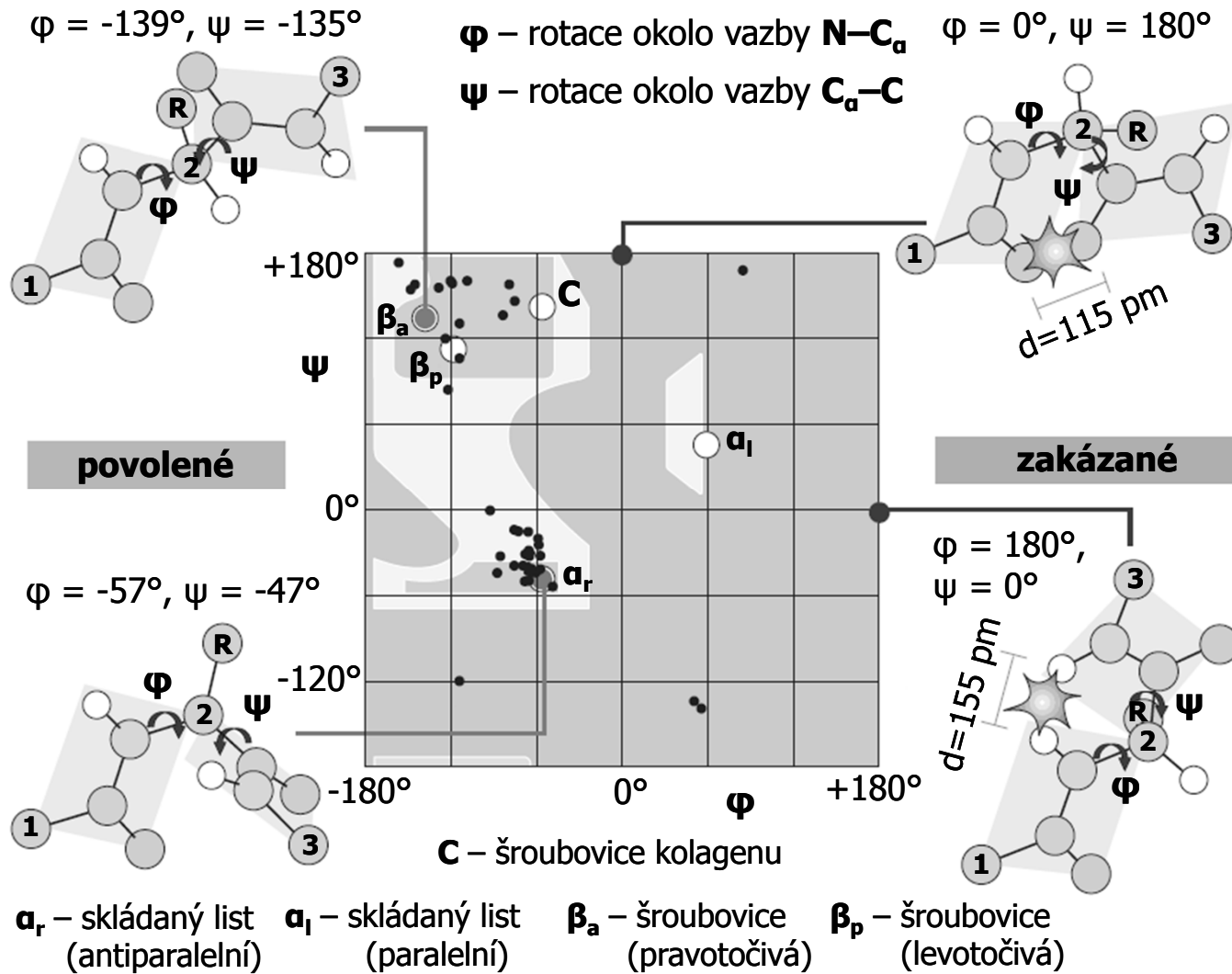
význam peptidové vazby

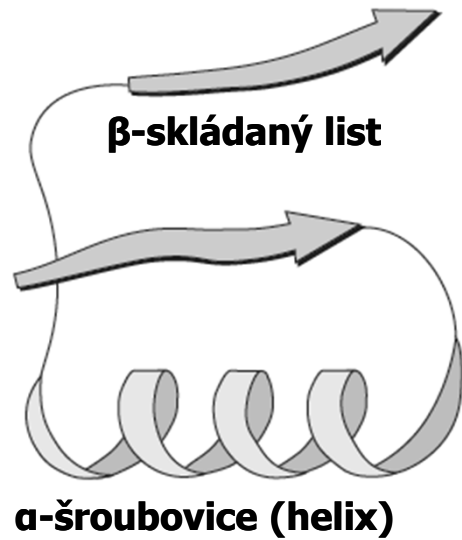
- : primární struktura proteinů (oligopeptidy, polypeptidy)
- : podílí se významně na sekundární a terciární struktuře
- :: rotace kolem jednoduchých vazeb

oligopeptid



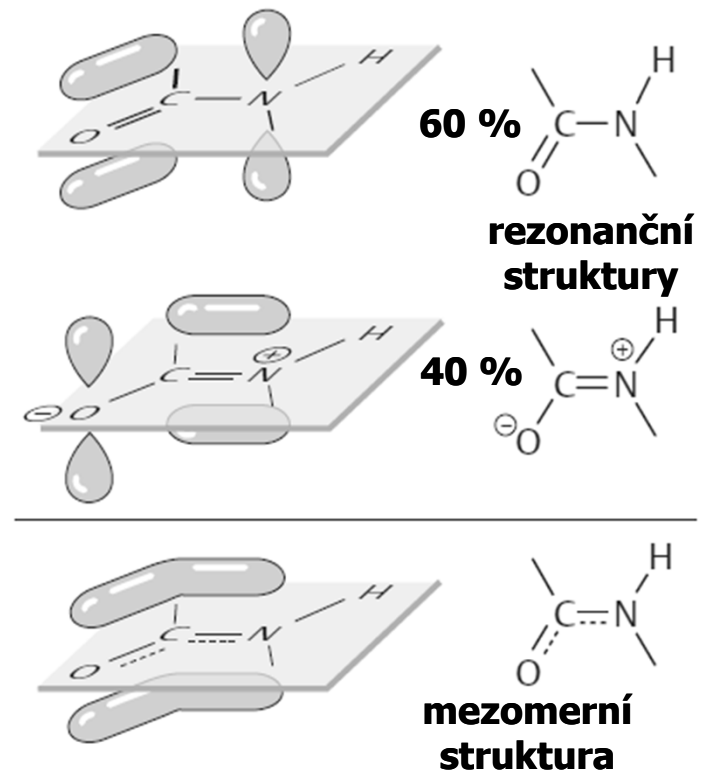
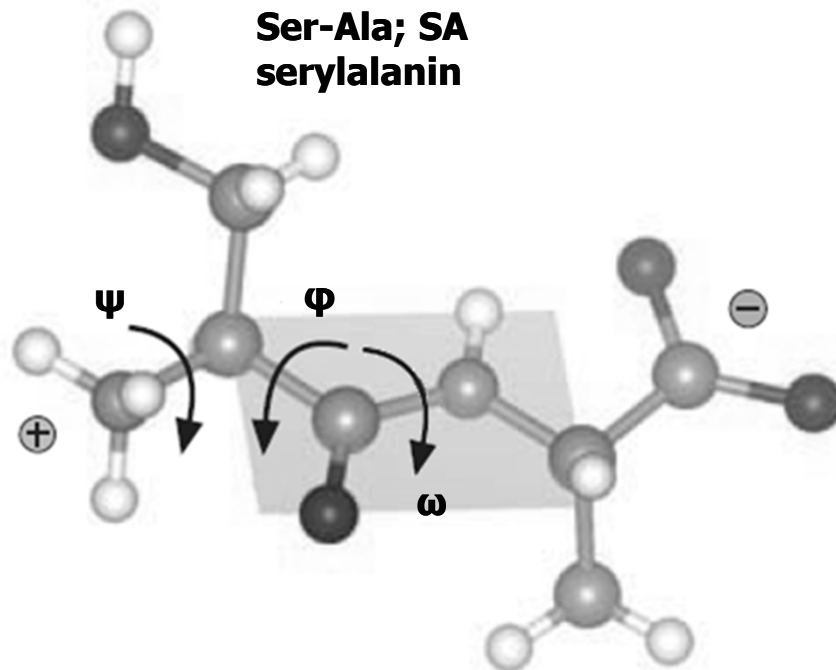
vliv peptidové vazby na sekundární strukturu proteinů



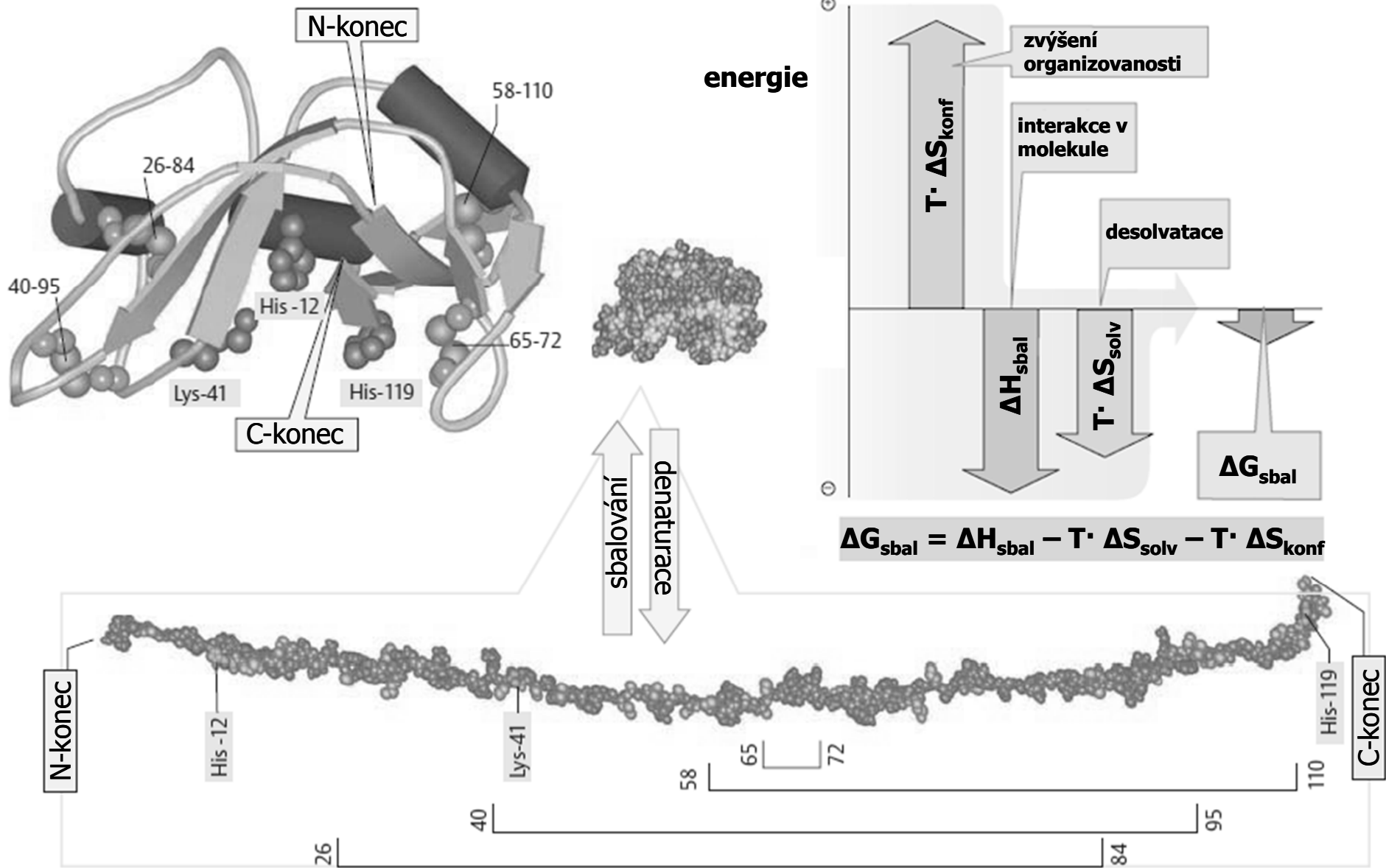


další formy sek. struk.

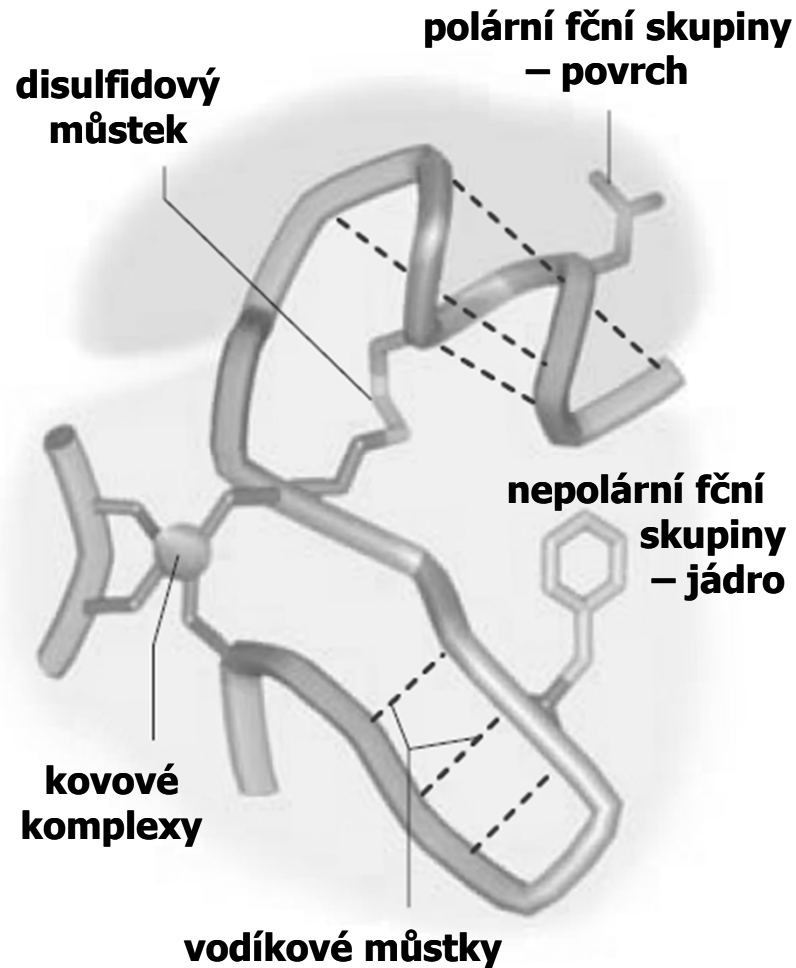
- : smyčka (*loop*)
- : ohyb (*turn*)
- : náhodné klubko (*random coil*)



formování terciární struktury proteinu

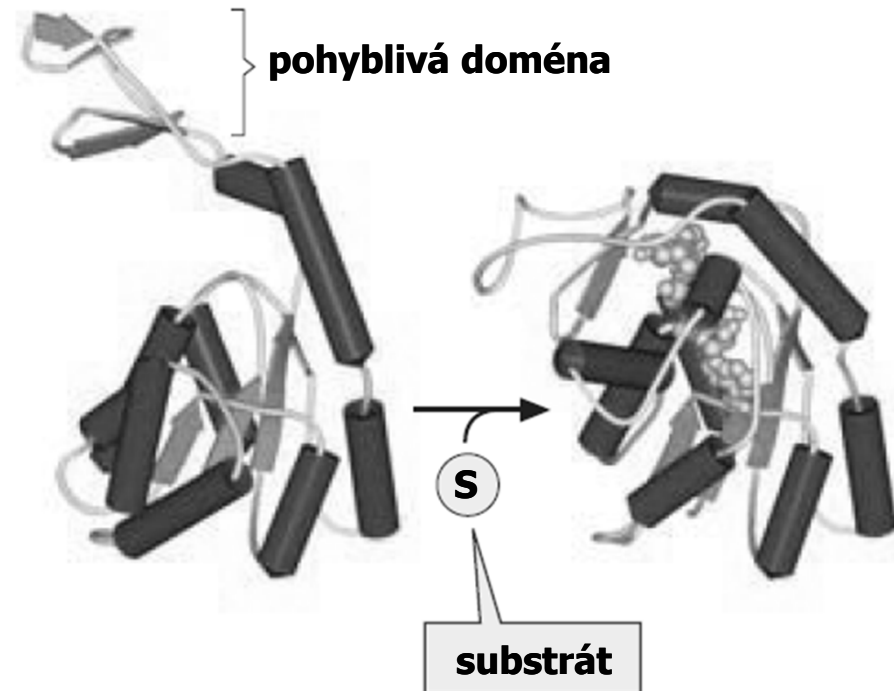


terciární struktura proteinu a její význam



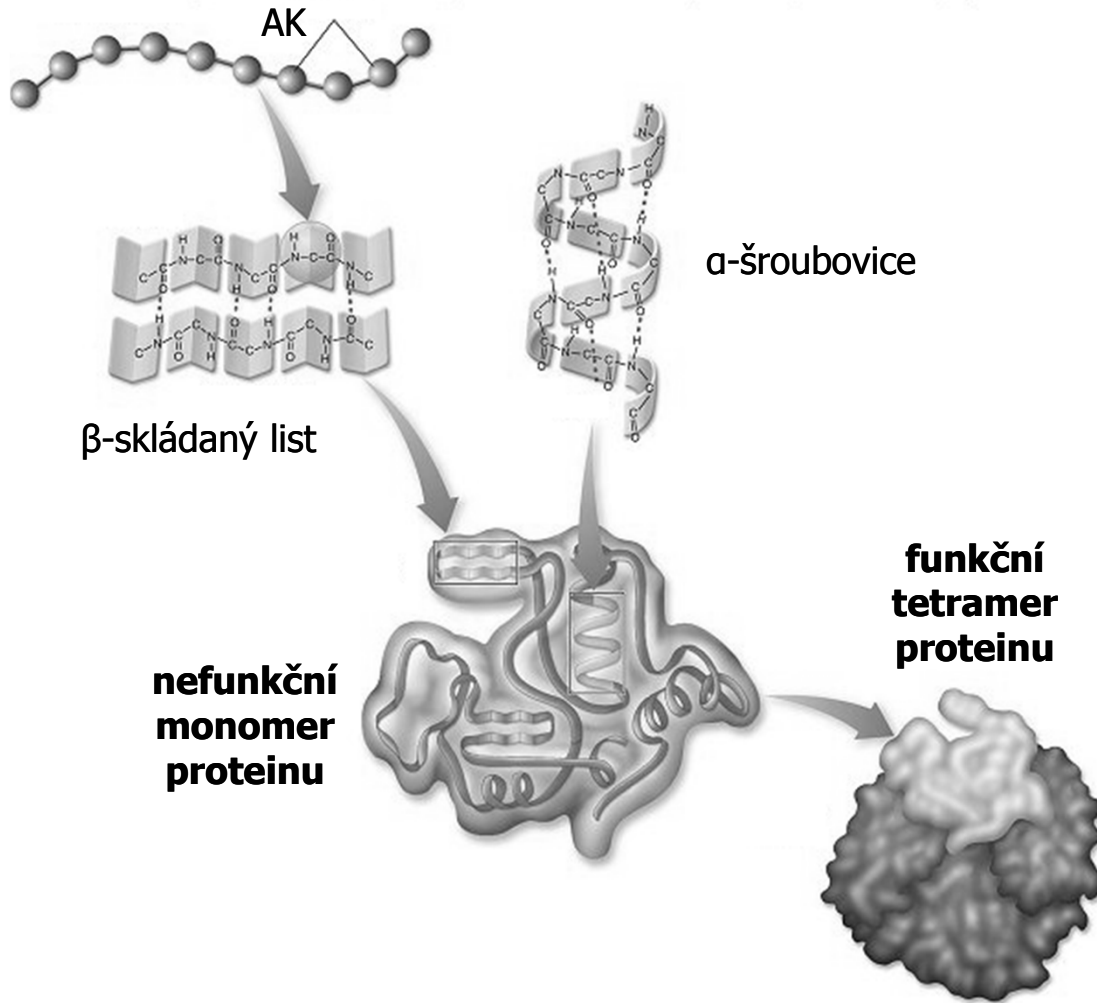
stabilizace struktury
: + coulombické interakce

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

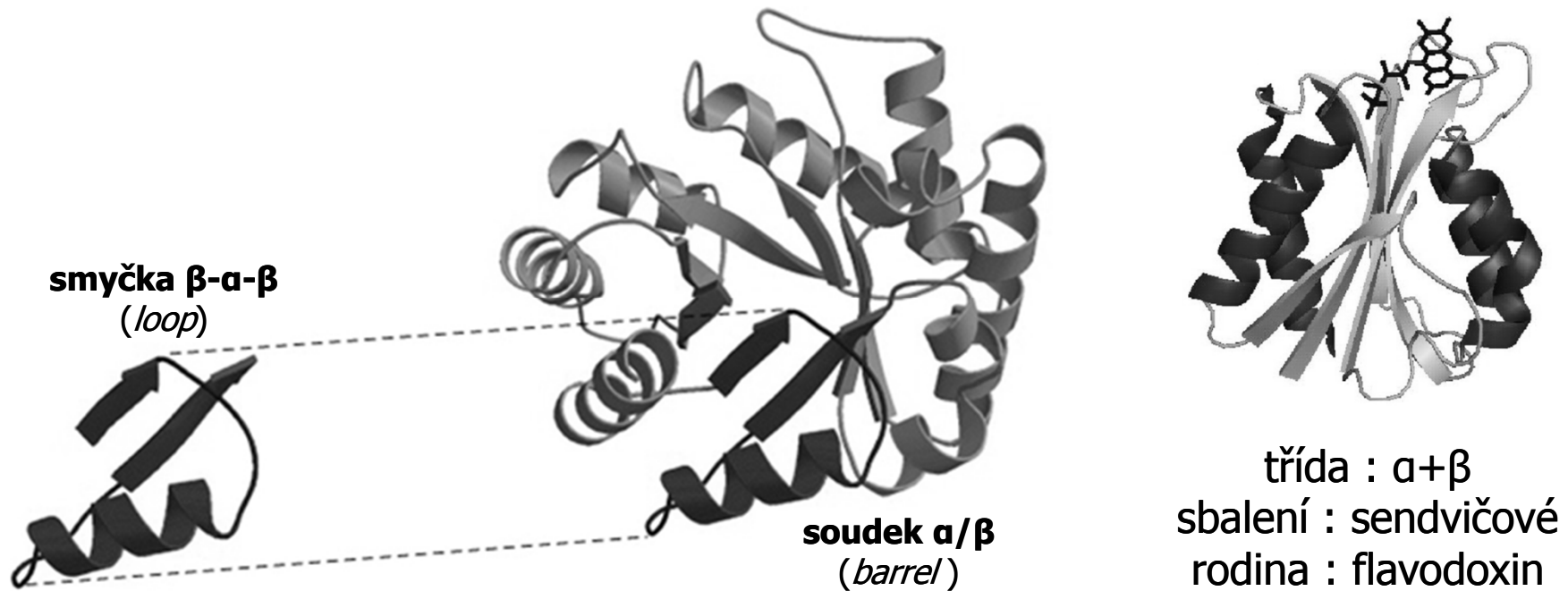
holoenzym

- : 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)



velikost a tvar molekul proteinů

globulární

- : kulovité
- : rozpustné ve vodě
- :: snadno denaturují

skleoroproteiny

- : fibrilární
- : ve vodě nerozpustné
- :: kolagenová šroubovice, zesíťování
- :: nedenaturují snadno

objem proteinu

$$V \approx 1.212 \cdot 10^{-3} \cdot M$$

$$[V] = \text{nm}^3, [M] = \text{amu}$$

poloměr proteinu

$$R \approx 0.066 \cdot \sqrt[3]{M}$$

$$[R] = \text{nm}, [M] = \text{amu}$$

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...)

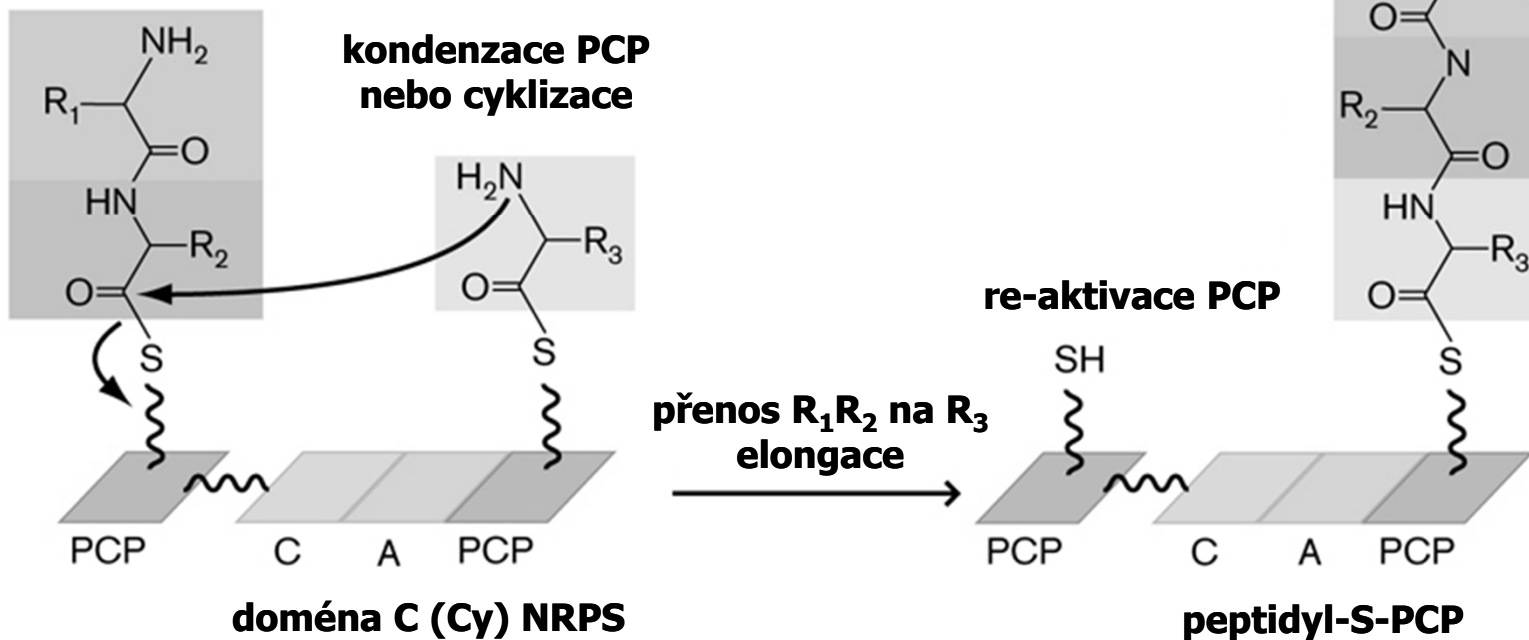
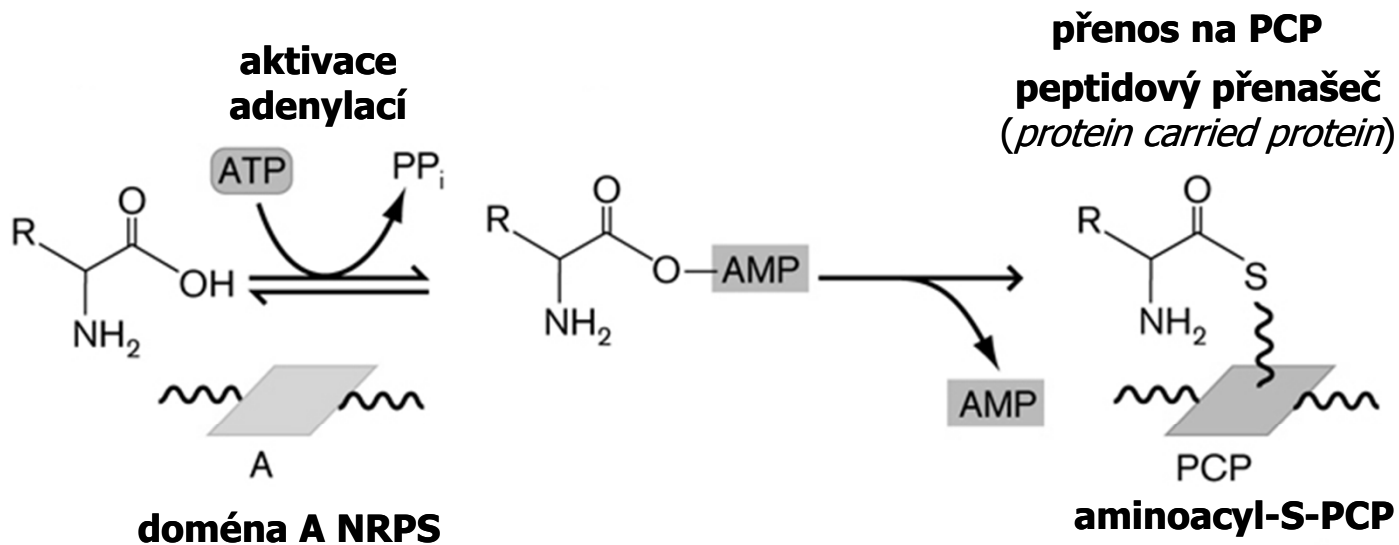
:: **Cy** – cyklizační (často namísto domény C)

:: **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 struktura protoproteinu
 - ::: aktivace (*trimming*)
 - ::: sestřih (*splicing*)

: význam PTM

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

chemická modifikace aminokyseliny

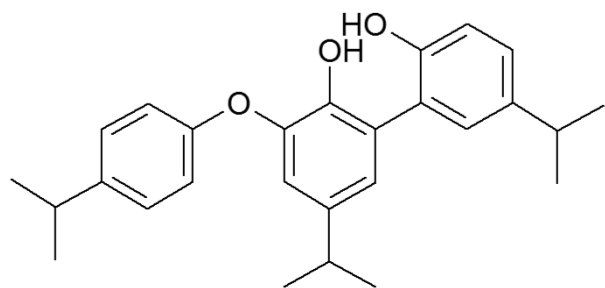
: velké množství (> 200)

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

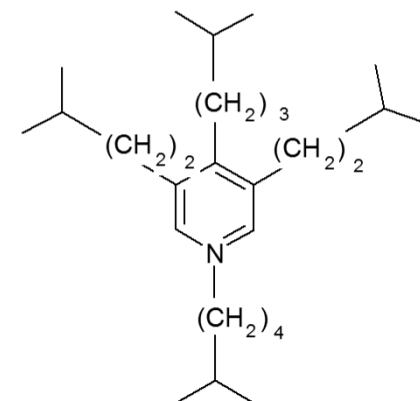
zesíťování (*cross-linking*)

: vznik můstků (S-S)

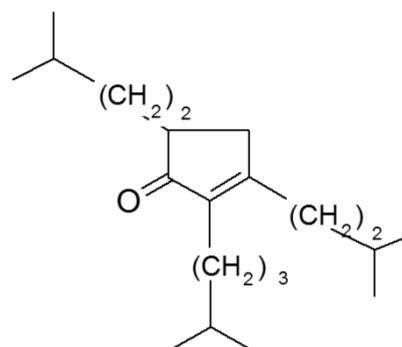
: stabilní funkce



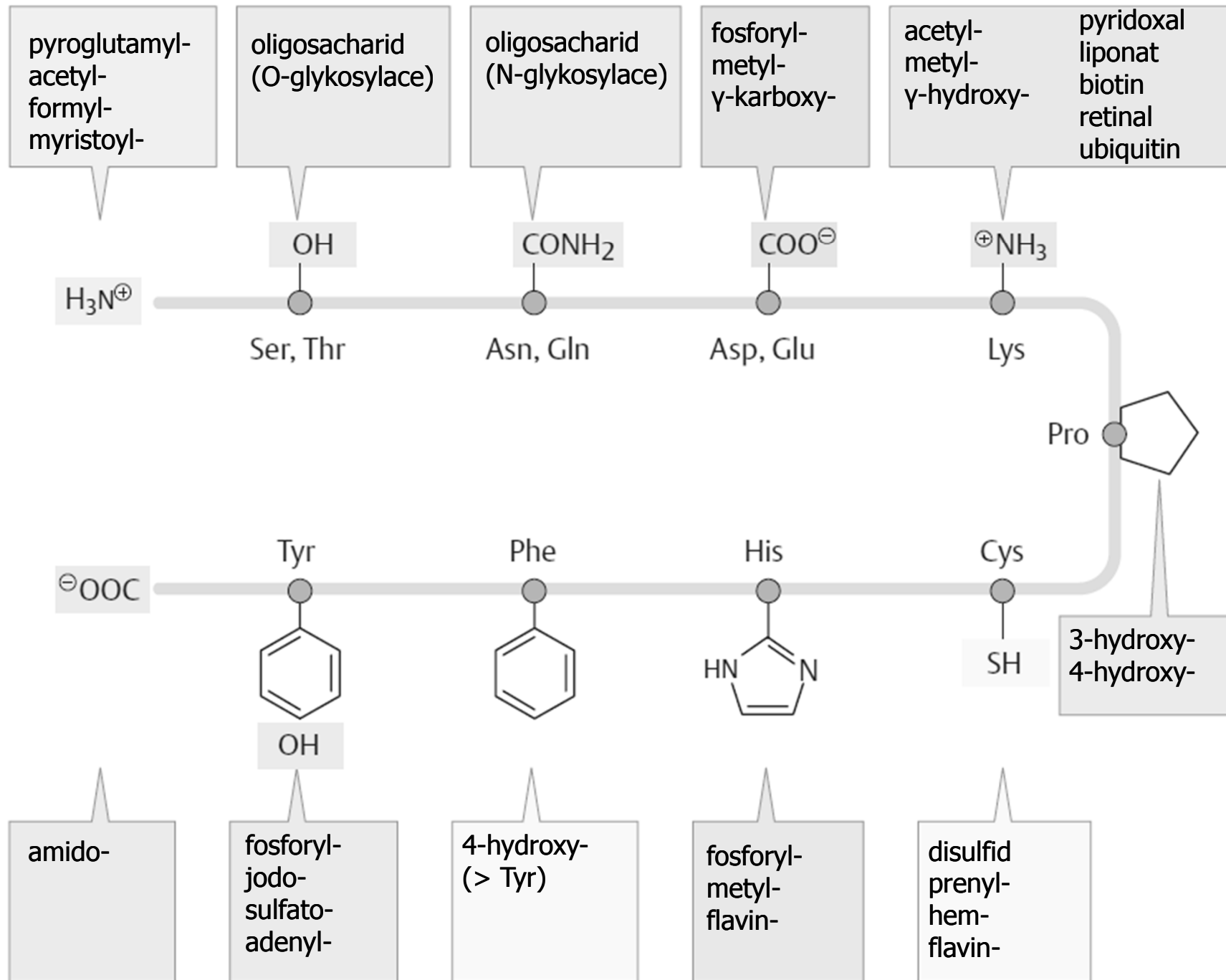
4x Tyr
pulcherosin



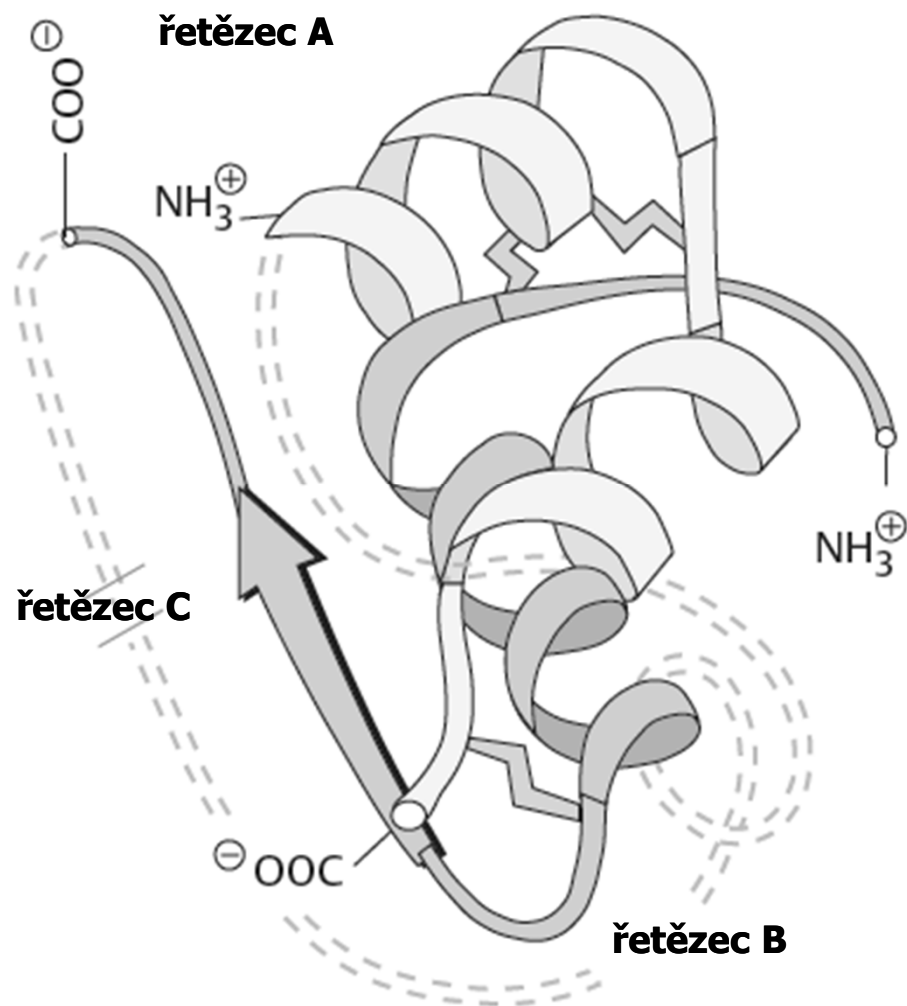
4x Lys
elastin



3x Lys
kolagen



aktivace protoproteinů

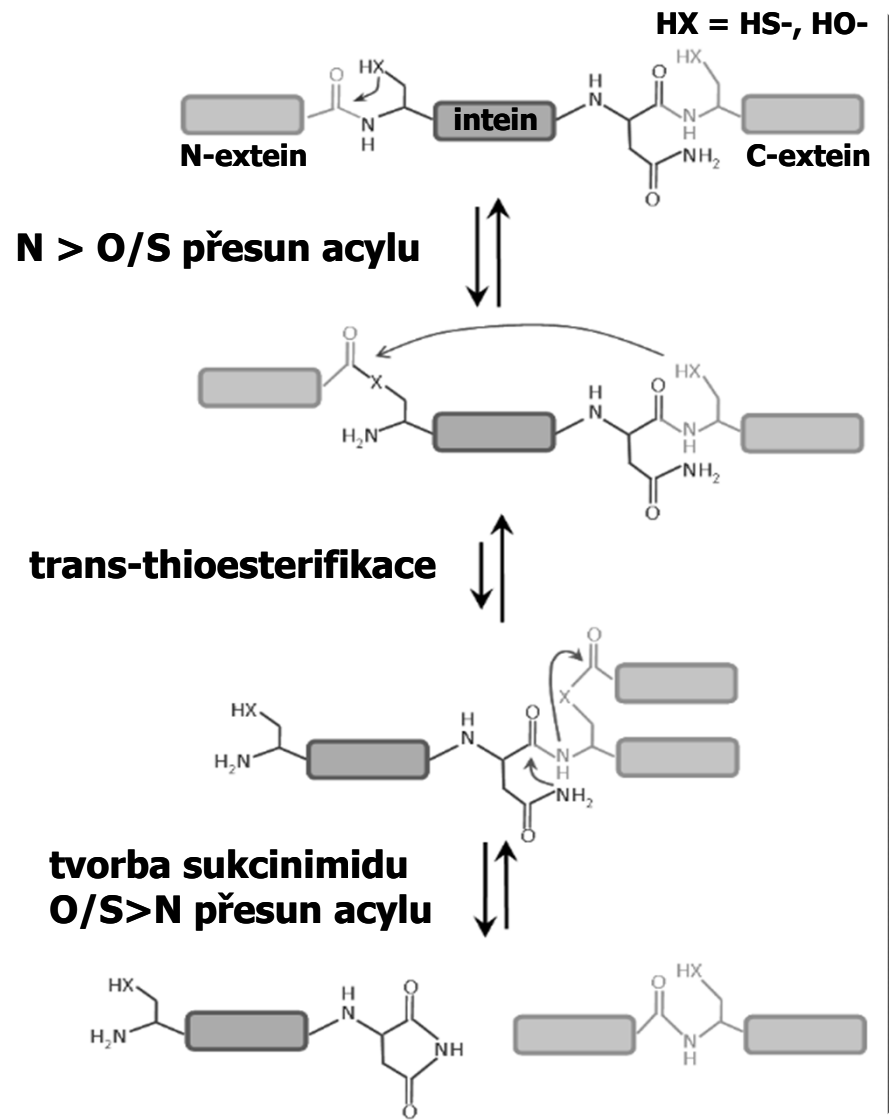


: odstranění signálních pep.
: odstranění nefunkčních č.

preproenzym >
proenzym >
enzym

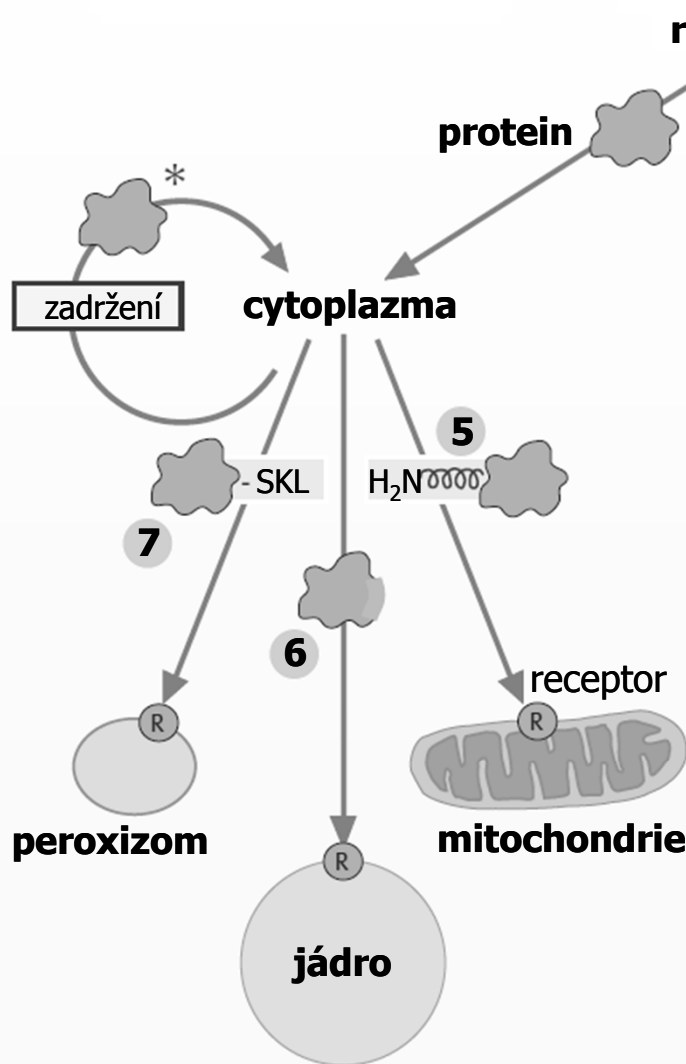
proteinový sestřih

: podobné jako u RNA (pre-RNA > mRNA)

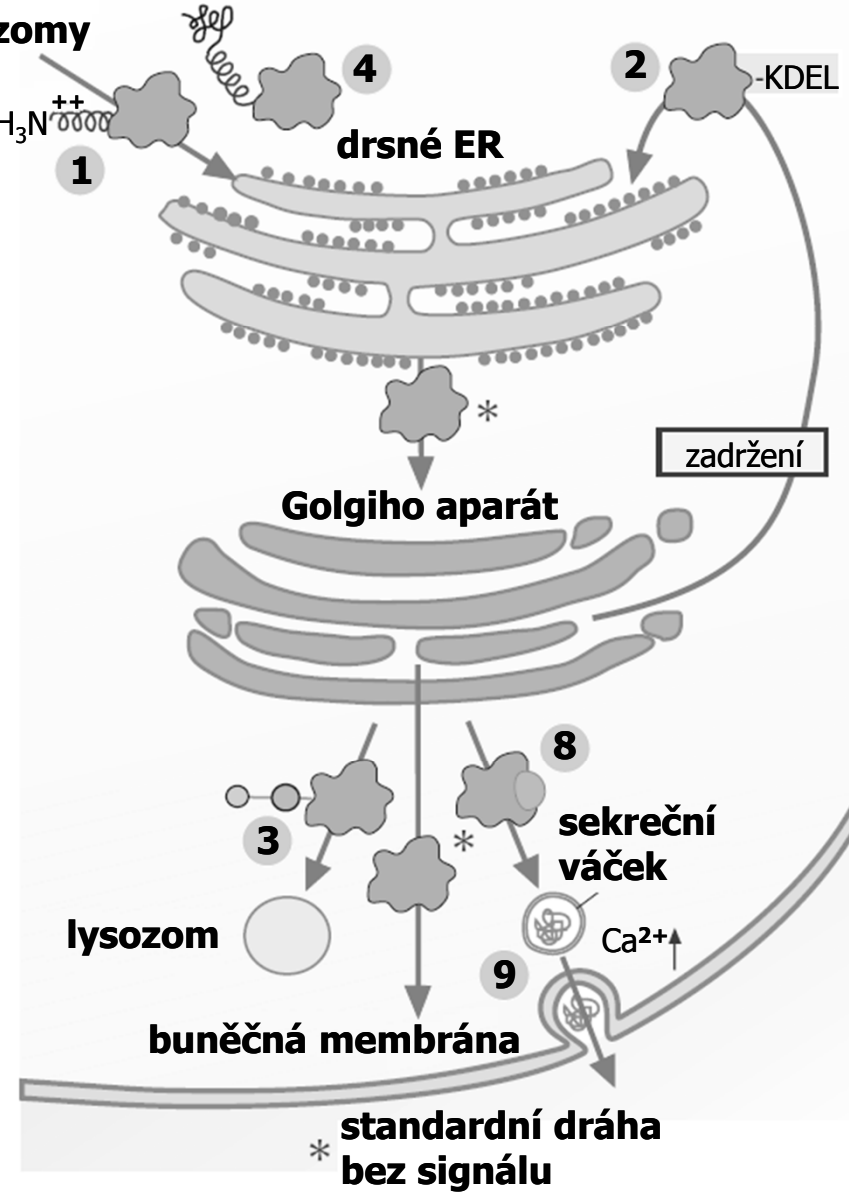


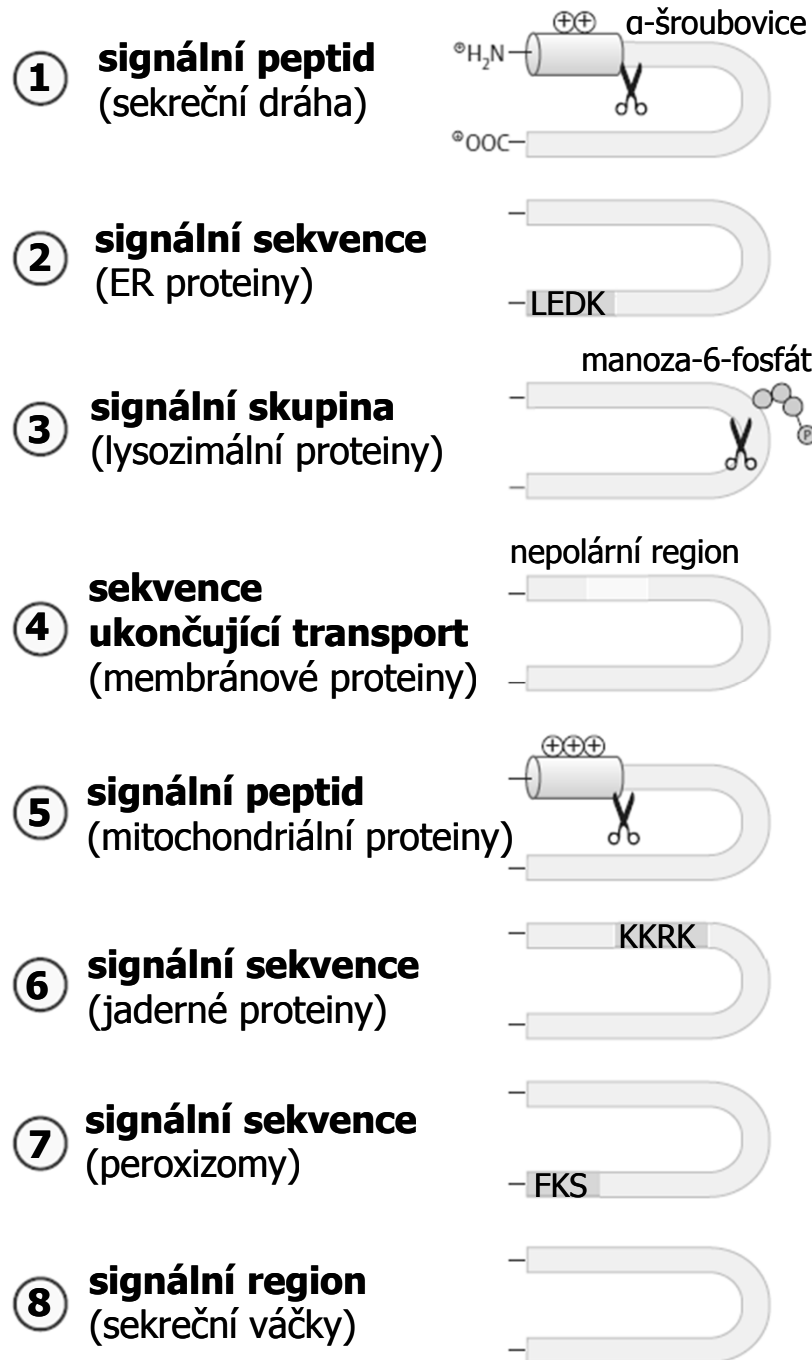
transport a lokalizace proteinů

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)

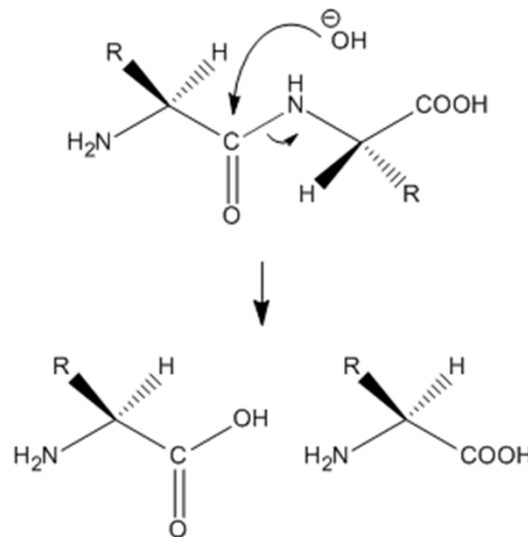
:: vznikají proteolytické peptidy

: peptidázy (karboxy-, amino-, dipeptidázy)

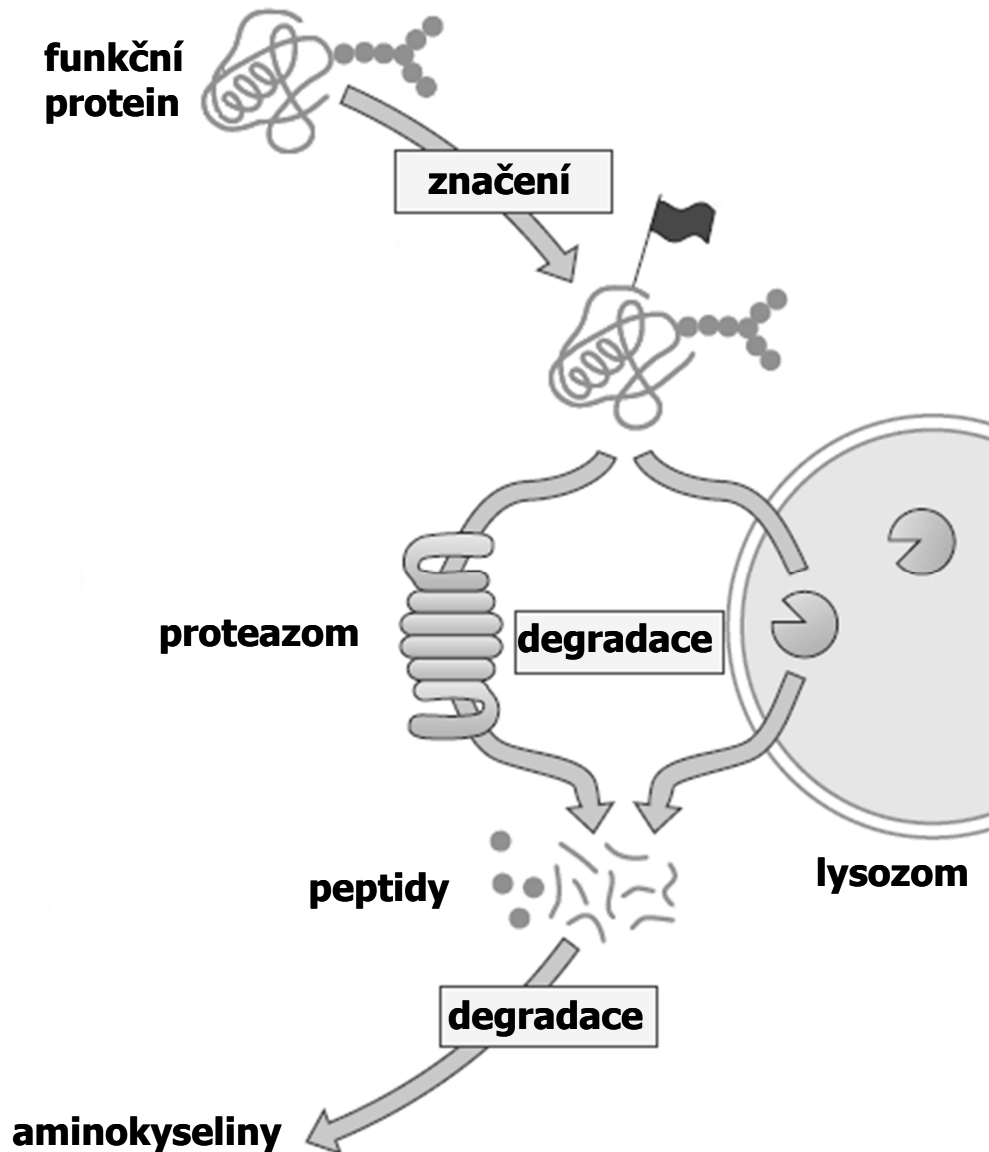
:: di- a tripeptidy a dále AK

: přenos energie *in vitro*

:: srážka (N_2 , He, Ar), záření (foton, e^-)



metabolismus proteinů



: **dusíková bilance**

:: rovnováha

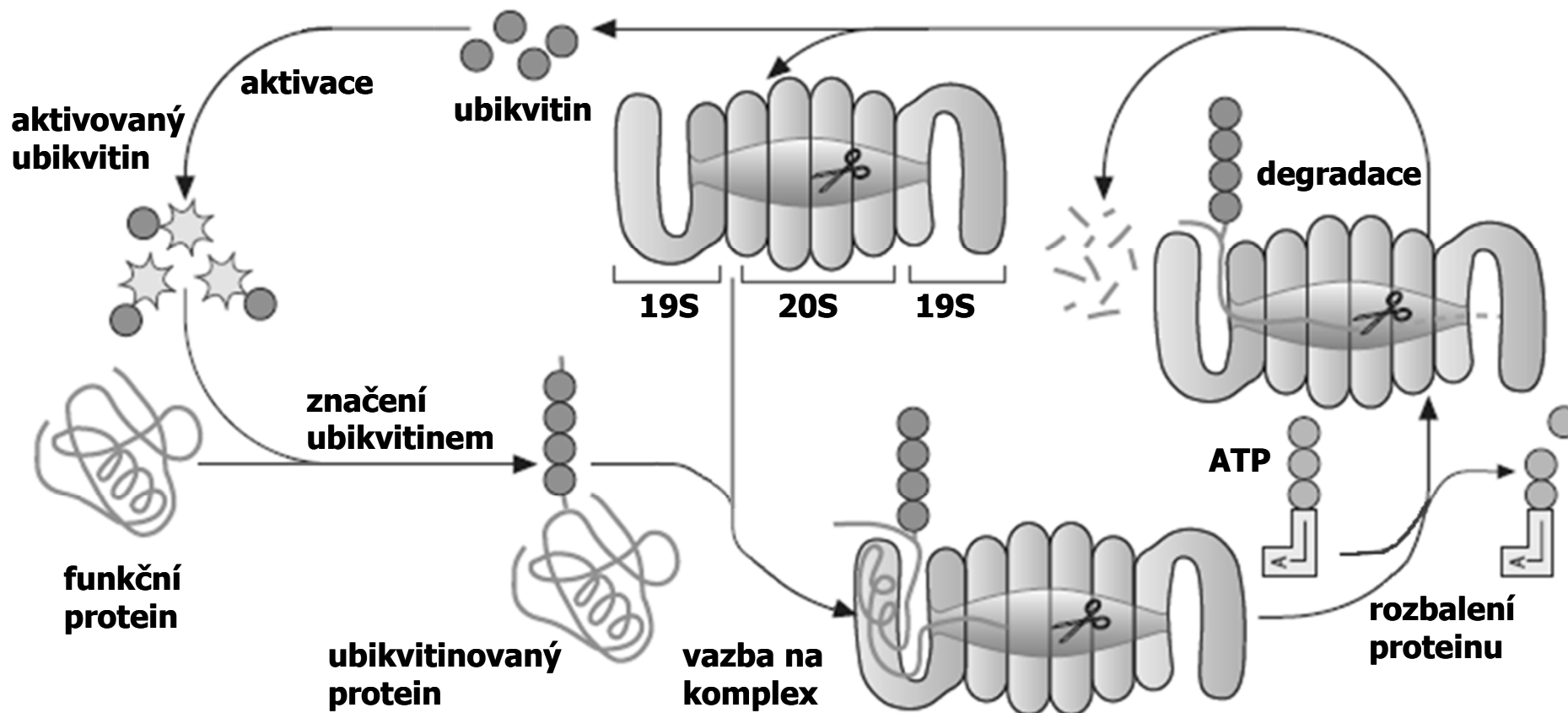
:: 300 – 400 g denně

: **lysozom**

:: *cca* 40 hydroláz

:: proteázy

funkce proteazomu

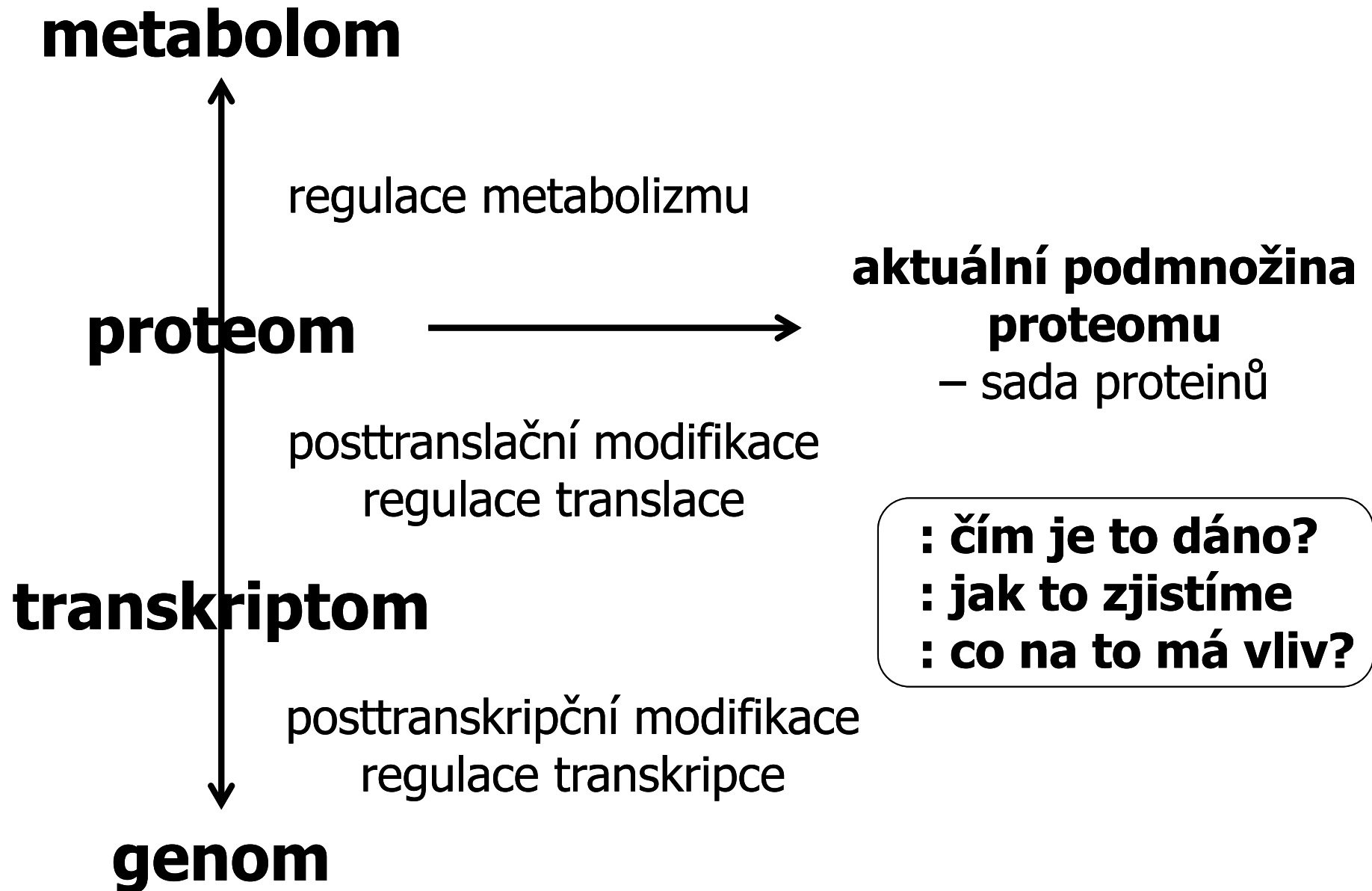


III.

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 struktura proteinu

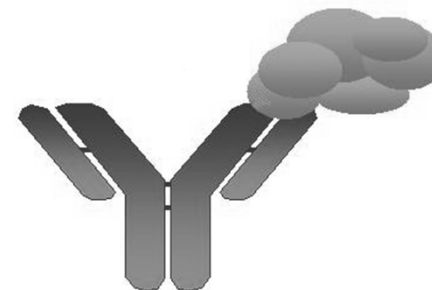
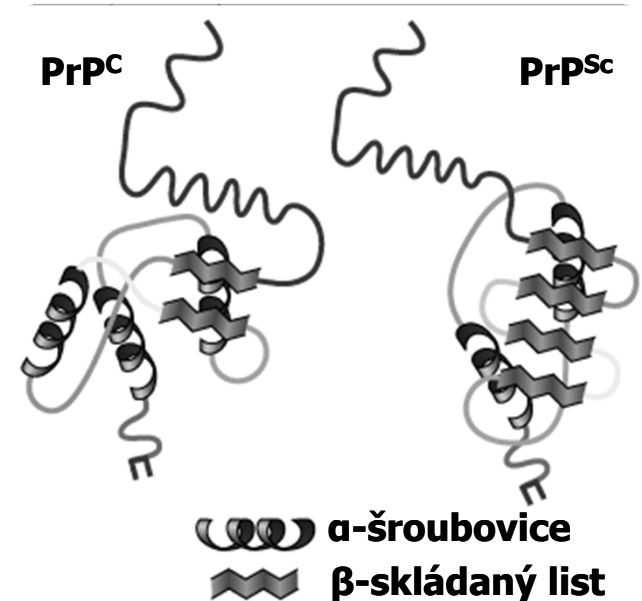
- : alternativní sbalení (priony)
- : posttranslační modifikace

terciární struktura proteinu

- : kvartérní struktura

unikátní funkce proteinu

- : enzymová reakce
- : interakce s jinou molekulou



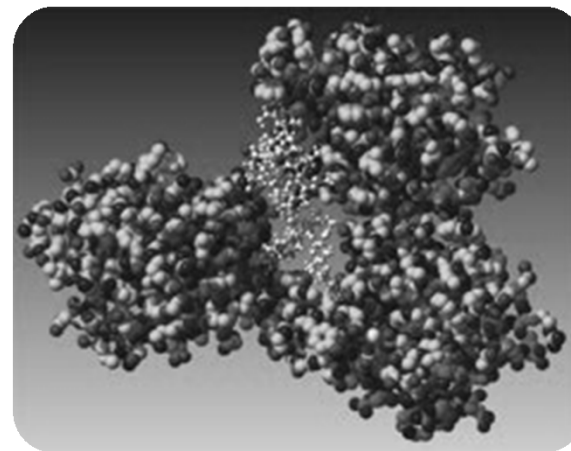
: jak můžeme zjistit identitu proteinu?

specificita

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

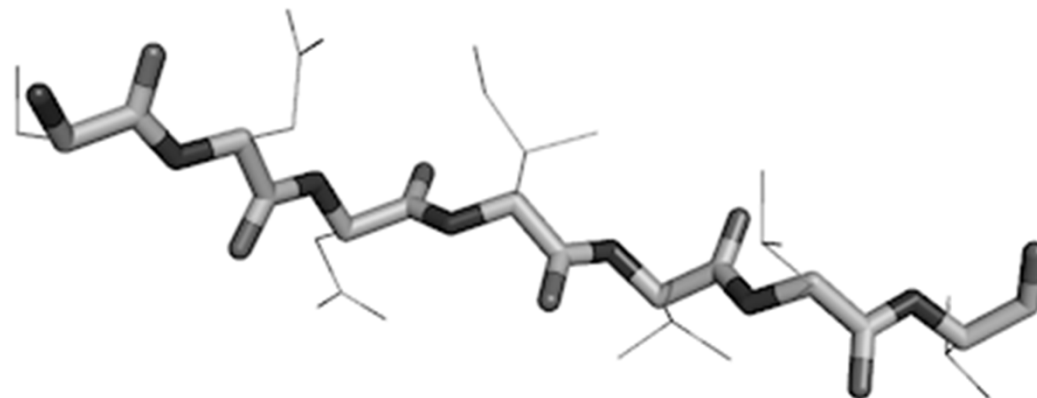
separace

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



primární struktura

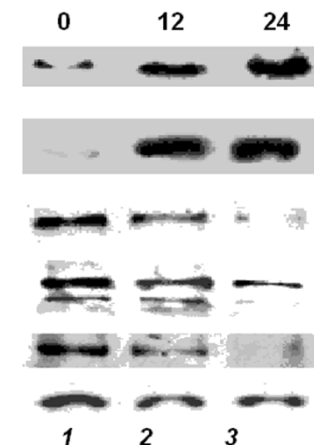
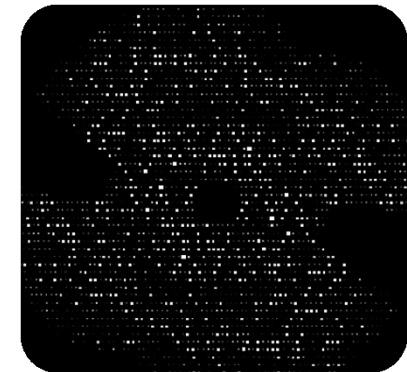
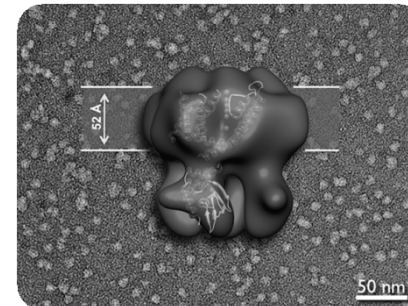
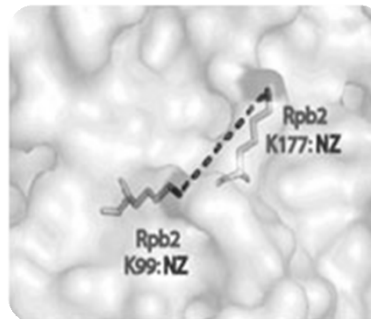
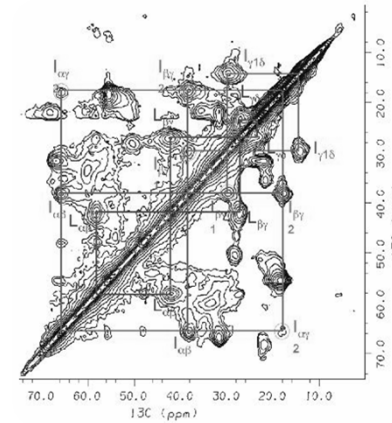
- : určení pořadí aminokyselin
- :: postupné odbourávání
 - ::: enzymaticky (exoproteolýza)
 - ::: chemicky (terminální degradace)
 - ::: fyzikálně-chemicky (štěpení peptidové vazby)
- :: hmotnostně-kombinatoricky
 - ::: peptidové mapování/peptidová signatura
- :: fyzikálně
 - ::: změna odporu při průchodu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



terciární struktura

- : určení 3D struktury
- :: lokalizace jader/atomů
- ::: jaderný spin
- ::: distribuce elektronové hustoty
- ::: 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

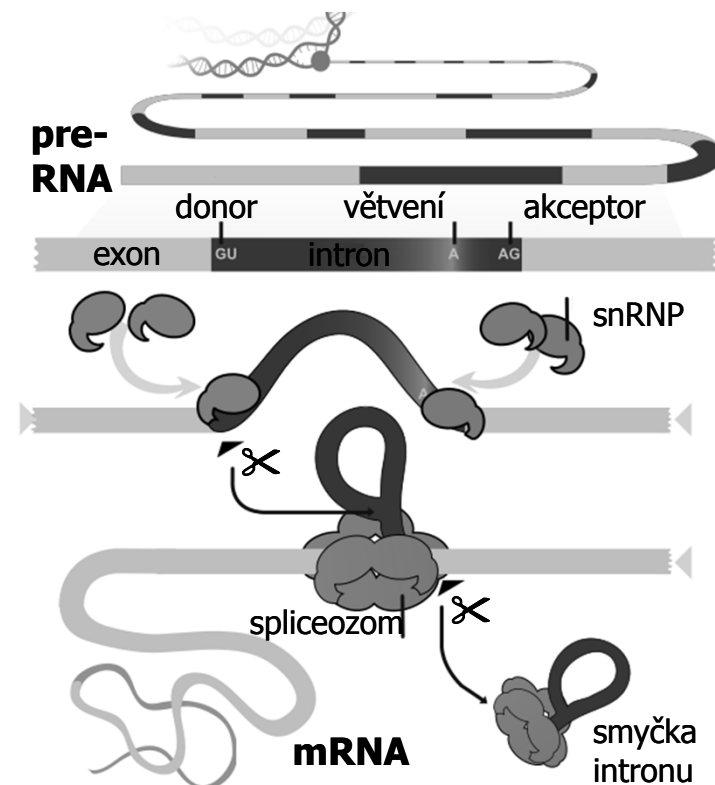
- : převedení genetické informace
- :: chyba v transkripci
- :: chyba v translaci

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

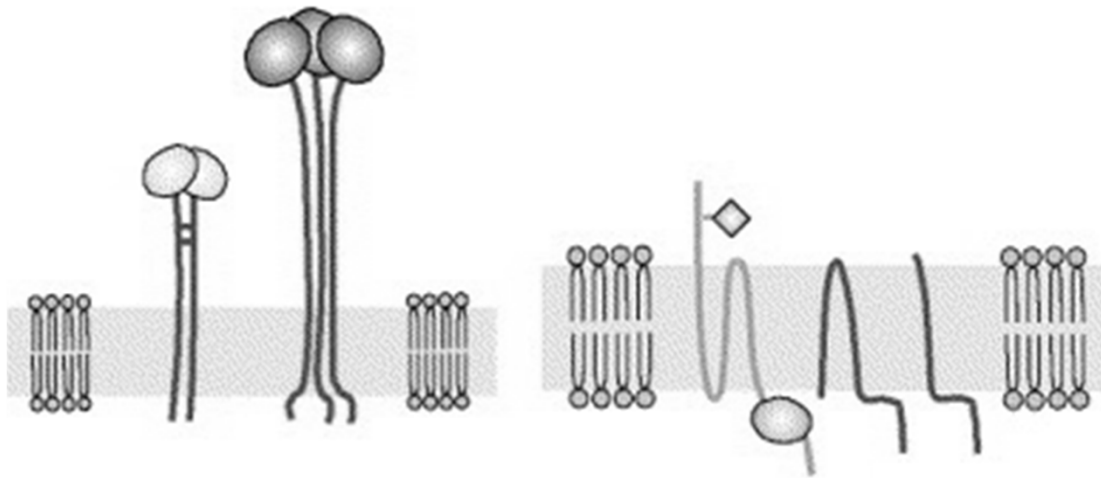
: definuje funkci a interakce

:: volný

:: vázaný – kvartérní struktura, proteinový komplex

lokalizace

: definuje funkci



: jak můžeme zjistit formu proteinu?

složení

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

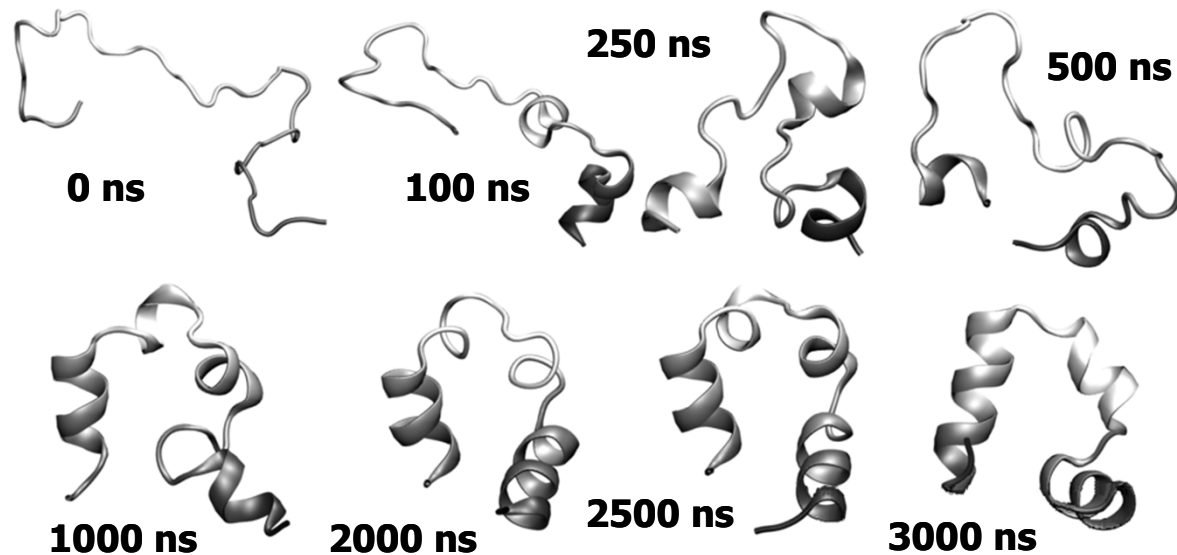
interakční partneři

- : 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 struktura + další informace

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

terciární struktura + 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

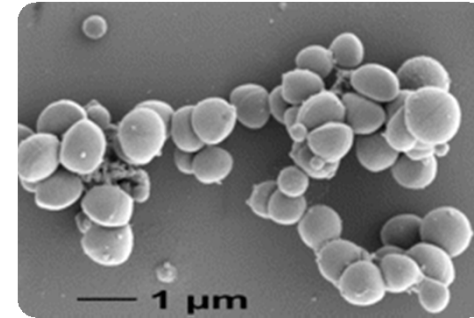
: jen poměr signálů odpovídajících obsahu

:: 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*)

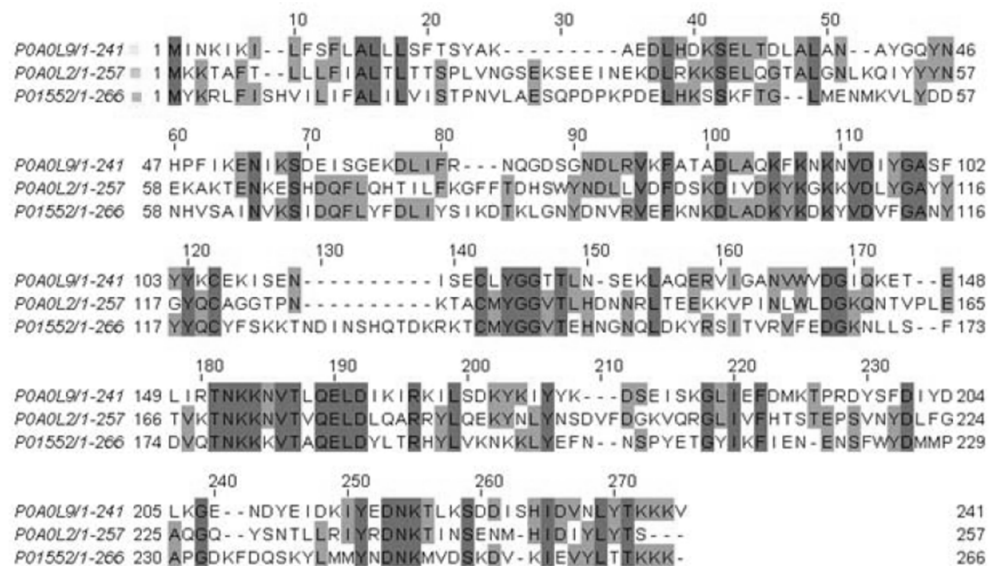
- : enterotoxiny – superantigeny
- :: aktivace imunitního systému > jeho selhání
- :: jen malé množství stačí na vyvolání reakce ($\sim \mu\text{g}$)

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!**

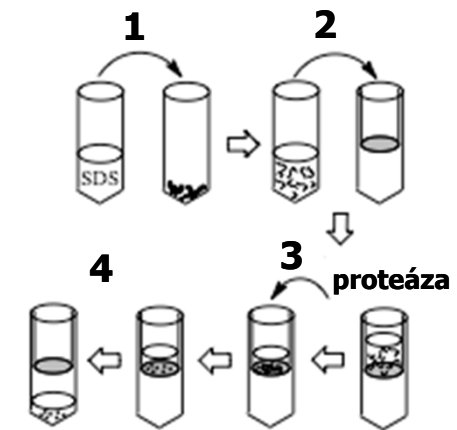


proti

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

stanovení SEH

- : primární struktura
 - :: SIL + hmotnostní spektrometrie (^{18}O , GIST, ICPL)
 - ::: nereprodukovatelné < nespecifické procesy ve FASP
- : terciární struktura
 - :: imunoanalýza (imunoblot)

> konečná?

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 (mod. FASP + RPLC-OT MS)

: jiná metoda stanovení (GIST redukční metylace)

existují sice obecné (expresně) proteomické postupy

: ale nejsou univerzální

:: nutnost hledat vždy přípatřičný postup

