

C7188 Úvod do molekulární medicíny 5/12



Moderní metodické přístupy v molekulární medicíně III



GENOMIKA III, PROTEOMIKA



Ondřej Slabý, Ph.D.

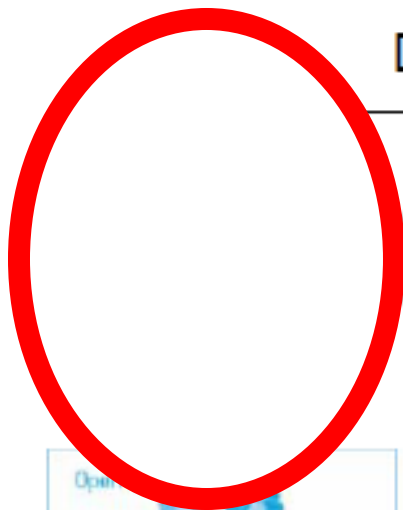
Masarykův onkologický ústav

CEITEC

Lékařská fakulta Masarykovy univerzity



Trend: More Microarray Applications



DNA

RNA

SNPs

ChIP/LA

Gene
Expression

Alternate
Splicing

miRNA

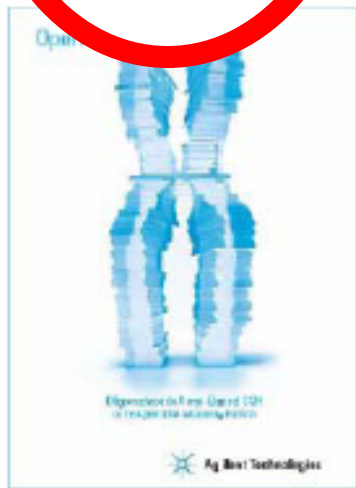
DNA

Gene promoters

mRNA

mRNA variants

microRNAs



Key requirements

Sensitivity

Specificity

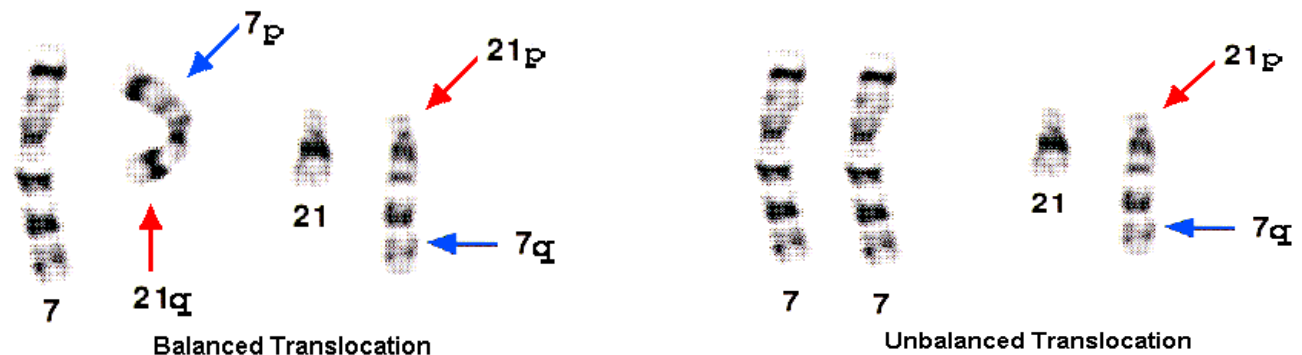
Flexibility

Informatics

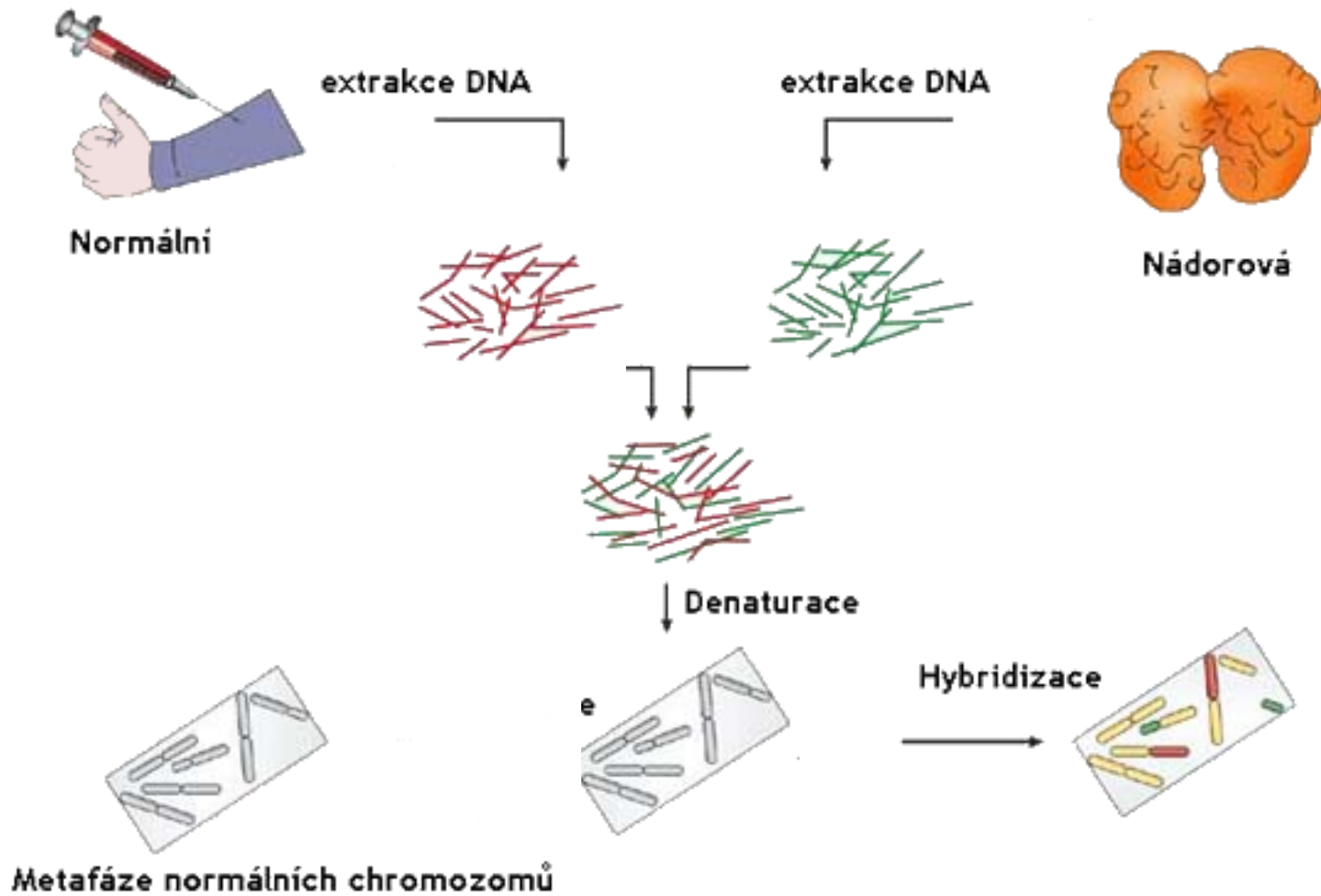
Komparativní genomová hybridizace (CGH)

- Současná hybridizace dvou vzorků DNA značených odlišnými fluorochromy na normální metafázní chromozomy fixované na podložním skle
 - DNA pacienta (nádorová)
značena **zeleně** (FITC)
 - kontrolní DNA (DNA zdravého jedince)
značena **červeně** (TRITC)

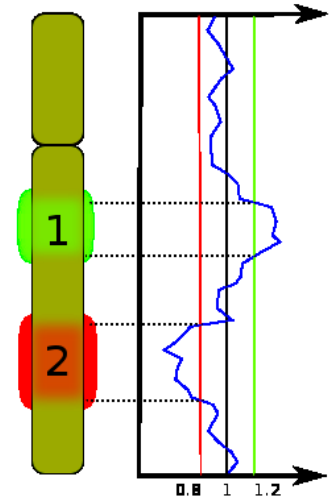
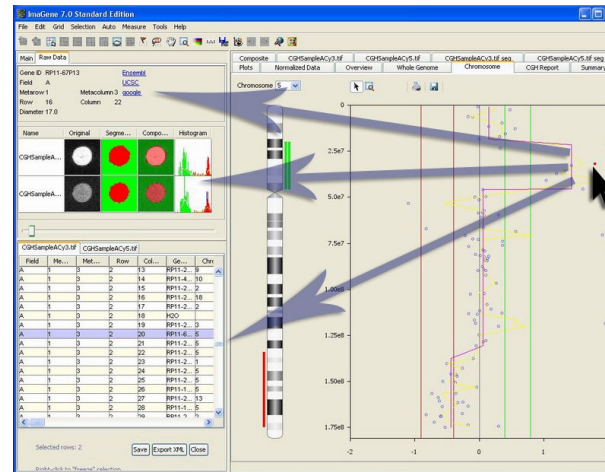
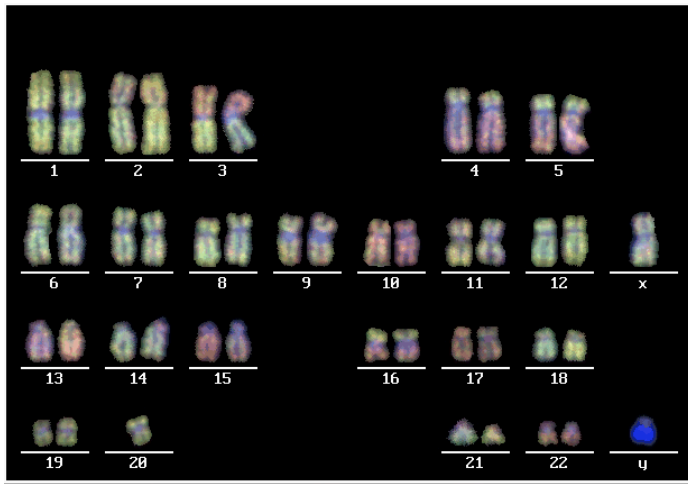
Nelze detekovat balancované translokace a inverze, obecně změny při nichž nedochází ke kvantitativní změnám



Princip chromozomové CGH



Výsledek chromozomové CGH



- vizualizován pomocí fluorescenčního mikroskopu
- pro každý fluorochrom je obraz snímán kamerou do počítače
- speciální softwarový program změří intenzitu obou fluorochromů podél každého chromozomu
- výsledkem analýzy: CGH profil - poměr intenzit signálů obou fluorochromů
 - poměr 1 = nedošlo k žádné kvantitativní změně
 - poměr $<0,75$ = delece
 - poměr $>1,25$ = duplikace, amplifikace

Genomová array CGH (aCGH)

Minulost – cDNA arrays for CGH

Původ genomových sekvencí DNA pro aCGH

YAC [Yeast Artificial Chromosomes] (0,2-2 Mb)

BAC [Bacterial Artificial Chromosomes] (300 kb)

PAC [P1-derived Artificial chromosomes] (130-150 kb)

plazmidů (30-45 kb)

Současnost – oligonukleotidové arrays CGH (oaCGH)

tiling arrays – překrývající se próby, 10 bp

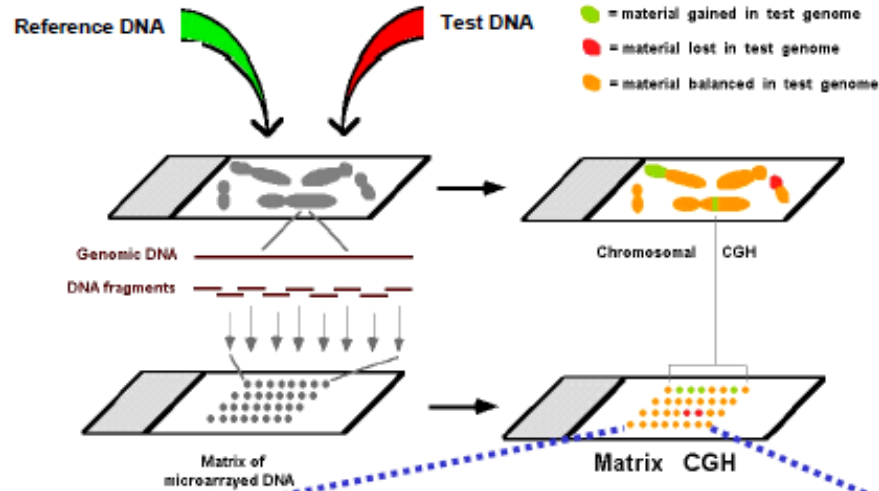
Rozlišovací schopnost array-CGH závisí právě na typu použitého vektoru, V každém případě je však řádově vyšší než u chromozomové CGH!!!



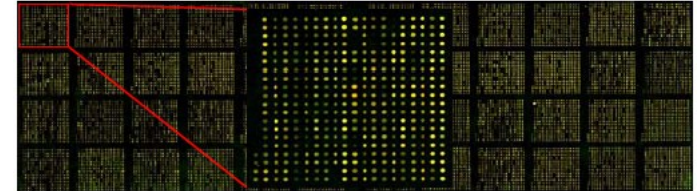
		Resolution	Coverage
a	Cytogenetics		
	Karyotyping	> 10 Mb	Complete
	SKY	> 2 Mb	Complete
	Traditional CGH	> 2 Mb (cytoband)	Complete
	FISH (interphase)	≥ 20 Kb	Probe Specific
	FISH (metaphase)	≥ 100 Kb	Probe Specific
b	aCGH		
	BAC	100 Kb (Spectral Genomics - 2 Mb)	Complete
	cDNA	2 Kb	Genes Only
	Oligo (60-mer)	0.06 Kb	Complete

Genomová array CGH (aCGH)

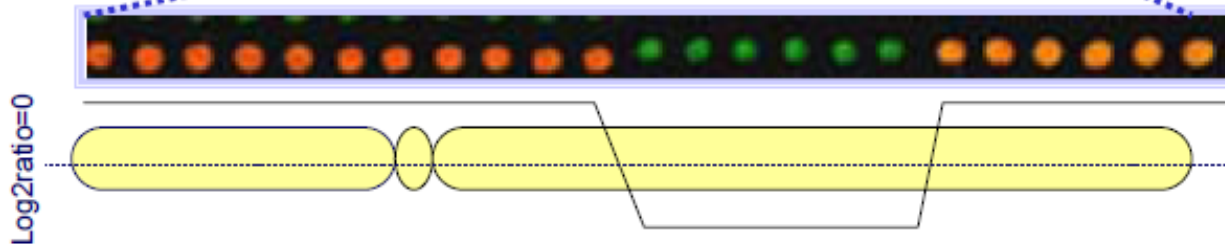
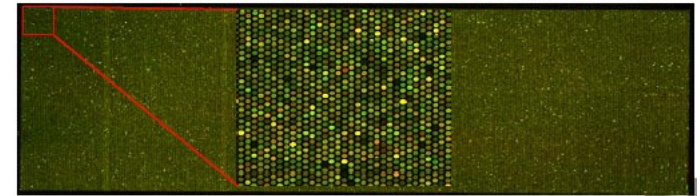
Array-CGH analysis



1 Mb array-CGH (NMC BAC-array with 18.000 DNA spots)

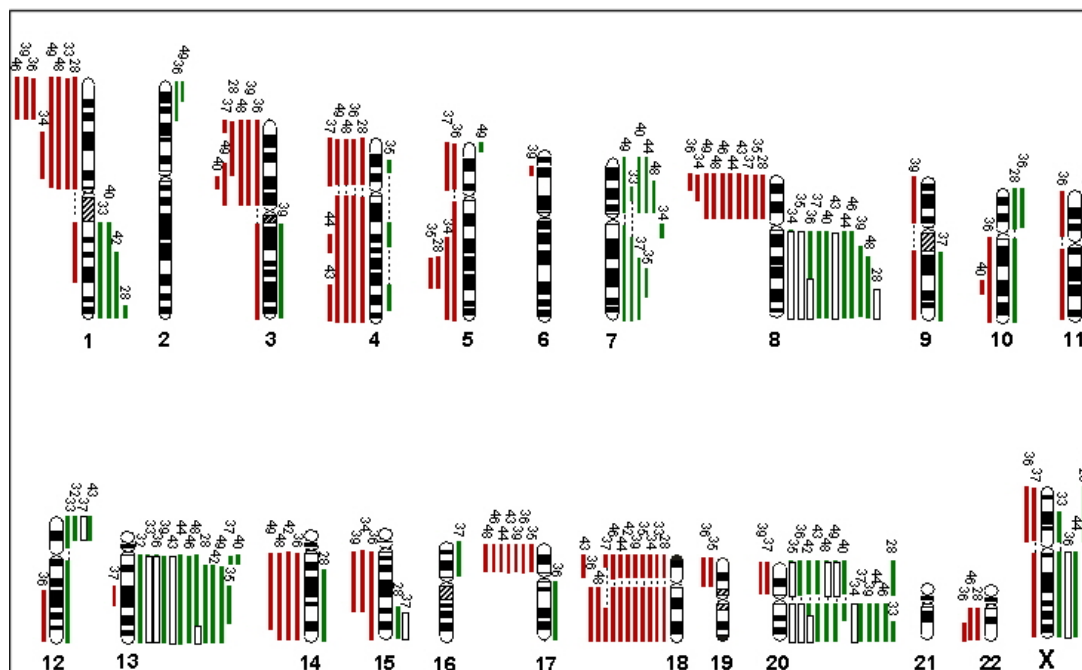


6 Kb array-CGH (Agilent oligo-array with 244.000 DNA spots)

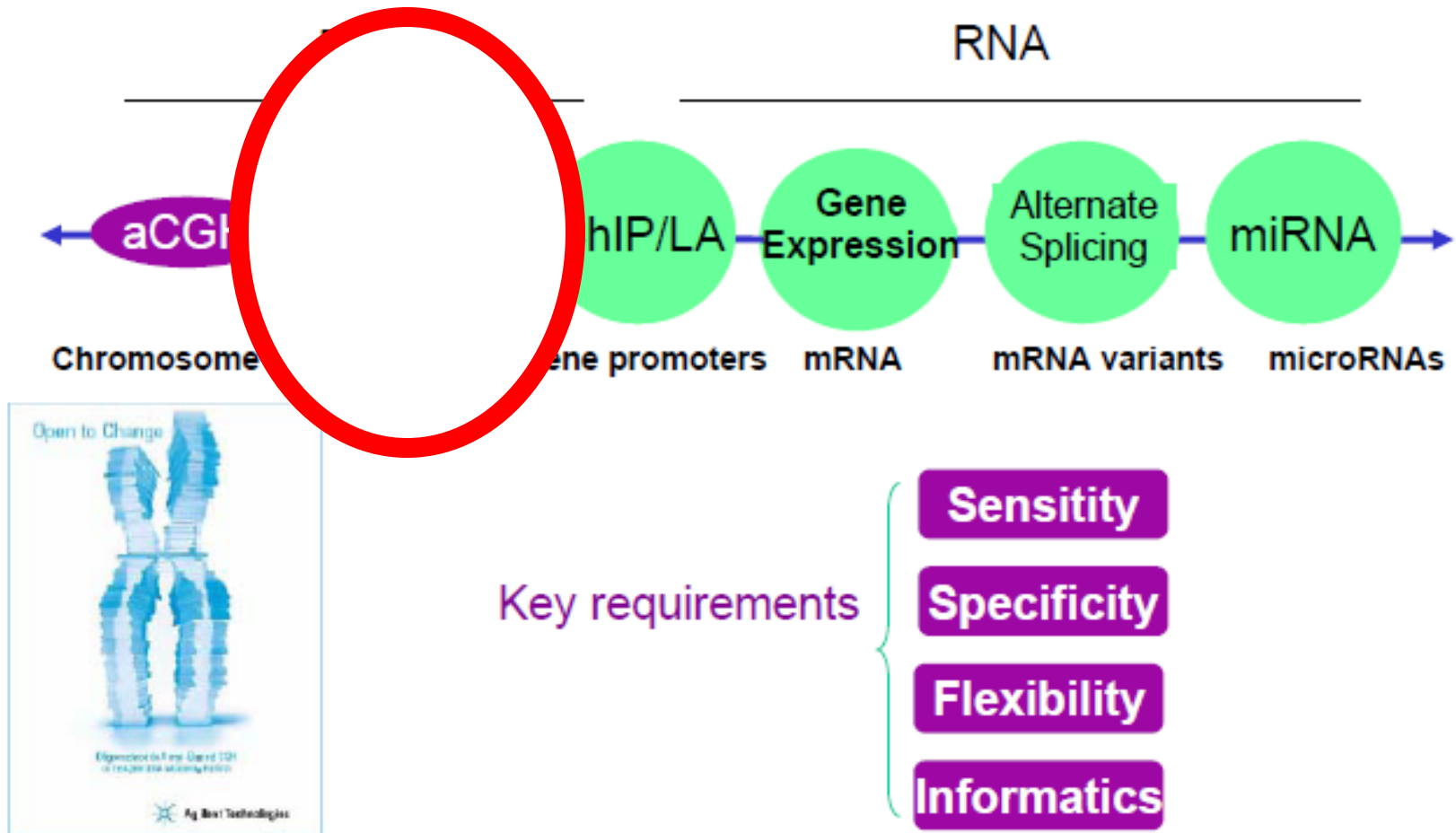


CGH v onkologii

kolorektální karcinom
20 primárních tumorů



Trend: More Microarray Applications



SNP čipy

Za geneticky polymorfní je považován znak s nejméně dvěma geneticky podmíněnými variantami v jedné populaci, které se nachází v takových frekvencích, že i zřídka má frekvenci alespoň 1%.

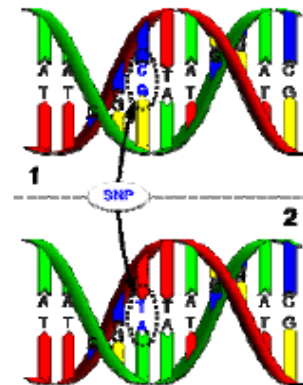
SNP = single nucleotide polymorphism, jsou jednonukleotidové polymorfní znaky
Celogenomové mapy SNPs jsou dostupné ve webových databázích (~6 milionů)

Mezi lidmi je přibližně 99,9% shoda v sekvenci DNA

Zbývajících 0,1% nás činí jedinečnými (jak vypadáme, nemoci, kterými budeme trpět, ...)

Přibližně 1 SNP per 1.000 bp

90% genů obsahuje alespoň 1 SNP



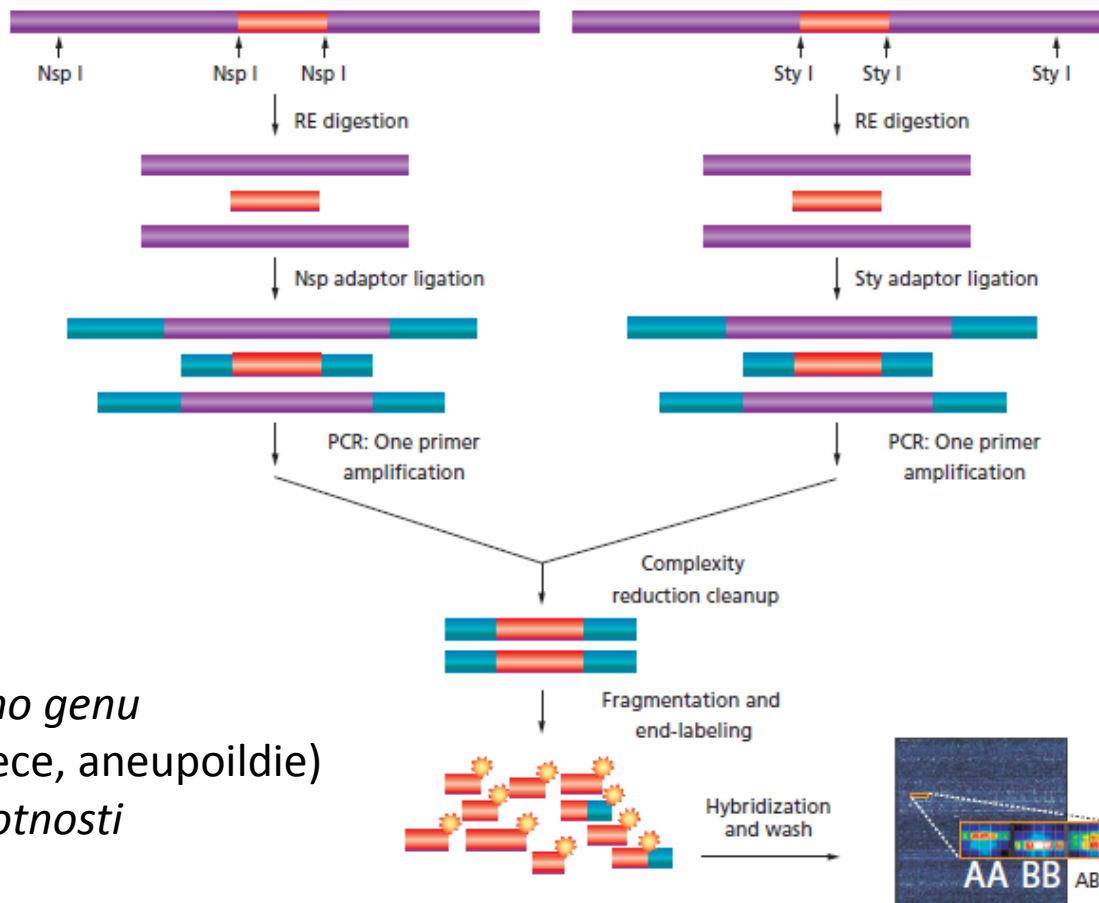
```

ATATGTATGTGGTATATAC-TCAAATGTAATAAATTC-TAT
ATATGTATGTGGTATATAC-TCAAATGTAATAAATTC-TAT
ATATGTATGTGGTATATAC-TCAAATGTAATAAATTC-TAT
ATATGTATGTGGTATATAC-TCAAATGTAATAAATTC-TAT
ATATGTATGTGGTATATAC-TCAAATGTAATAAATTC-TAT
ATATGTATGTGGTATATAC-TCAAATGTAATAAATTC-TAT
ATATGTATGTGGTATATAC-TCAAATGTAATAAATTC-TAT
ATATGTATGTGGTATATAC-TCAAATGTAATAAATTC-TAT
TATGTATGTG-ATATAC-TCAAATGTAATAAATTC-TAT
  
```

Affymterix SNP čipy

Mapping 10K array => Mapping 100K array => Genome-wide Human SNP array 5.0 (500K) => Genome-wide Human SNP array 6.0 (1.8 million, SNP, CNV)

Figure 1: Overview of the Genome-Wide Human SNP Assay 5.0/6.0.



Umožňuje:

Detekci SNP

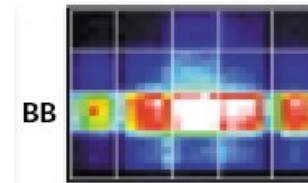
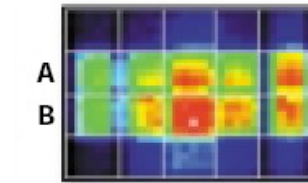
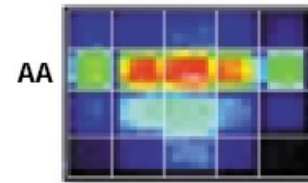
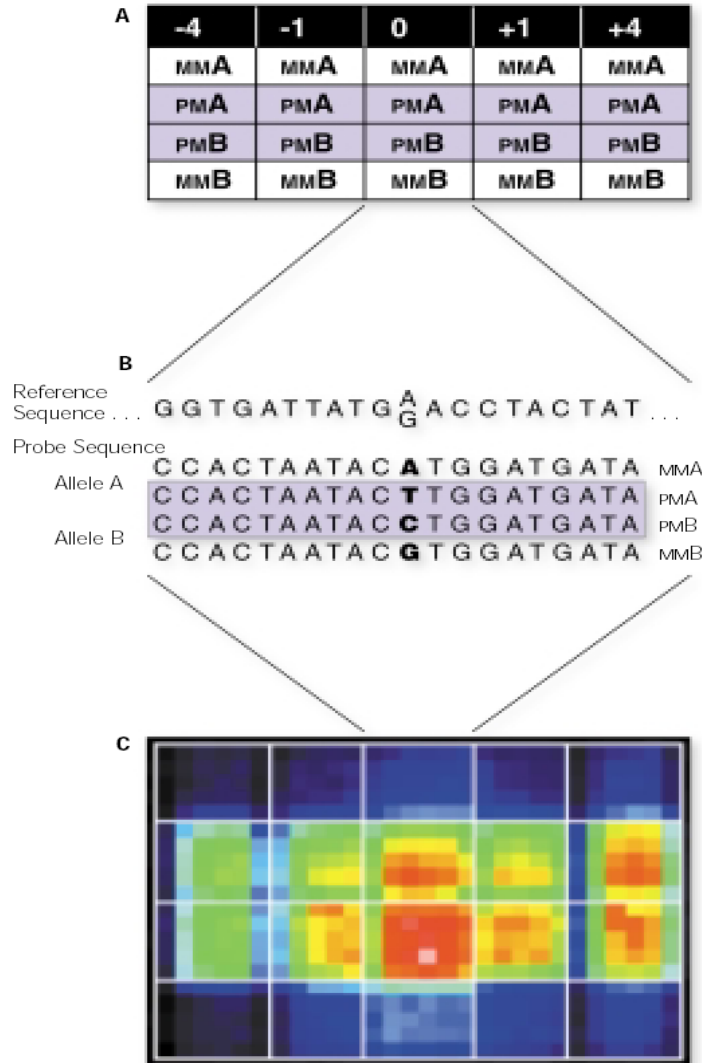
Počít kopíí daného genu

(amplifikace, delece, aneuploidie)

Ztráta heterozygotnosti

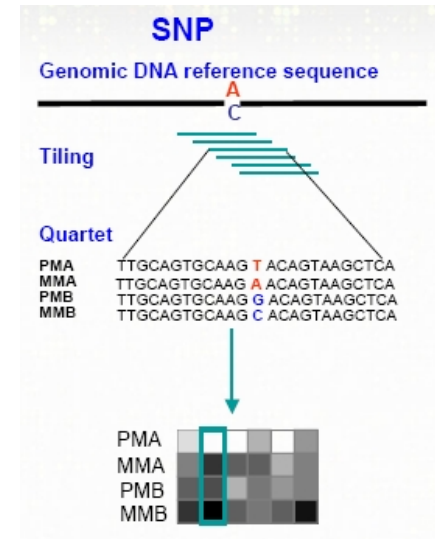
Affymetrix SNP čipy

How the GeneChip® HuSNP™ Array Calls Genotypes

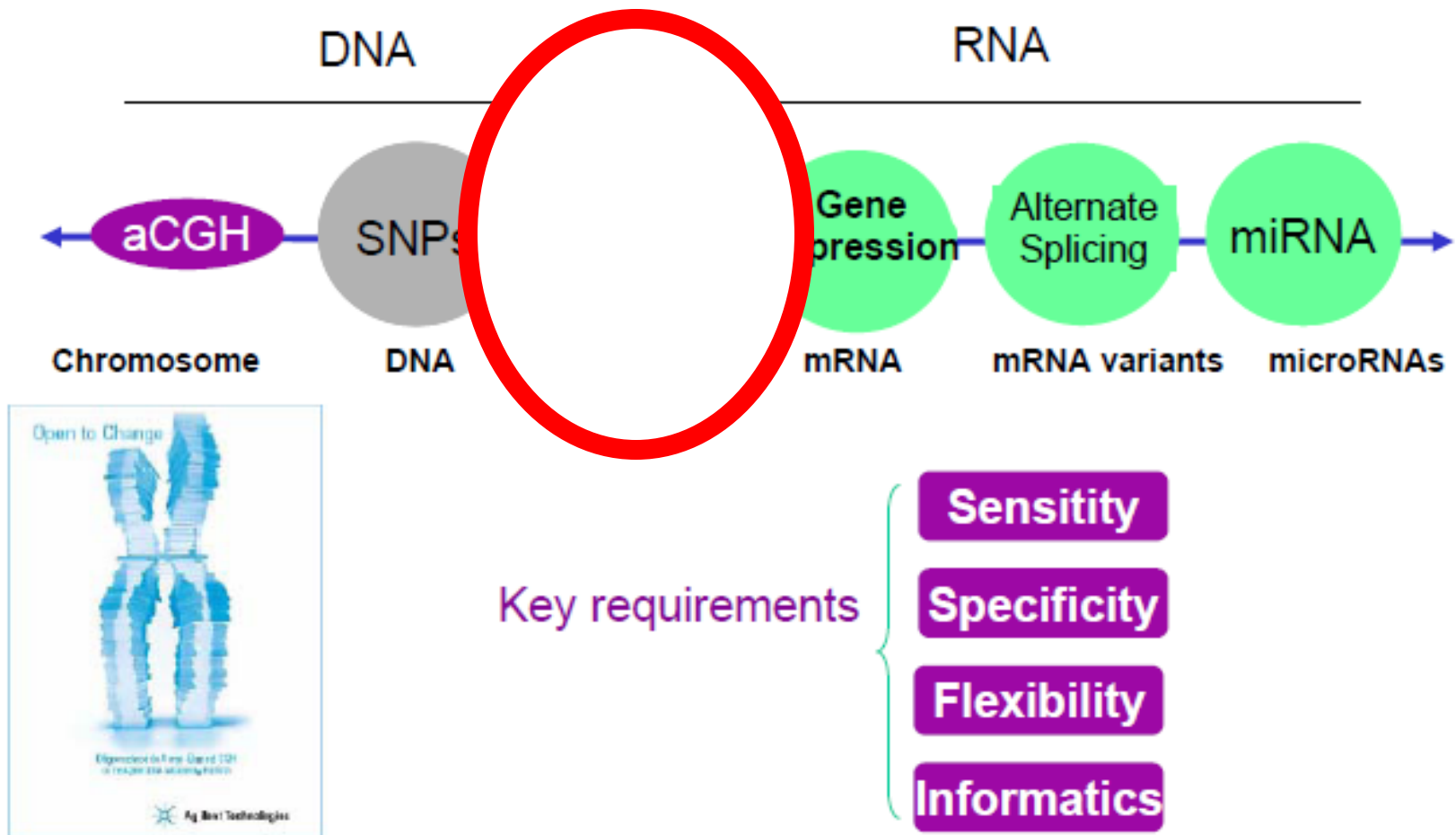


- HJ dané alely: AA, AB, BB
- Intenzita signálu: počet kopií

Pro každou alelu
 5 sond
 +
 5 párových sond
 s nukleotidovou záměnou
 (např. v pozici -4)

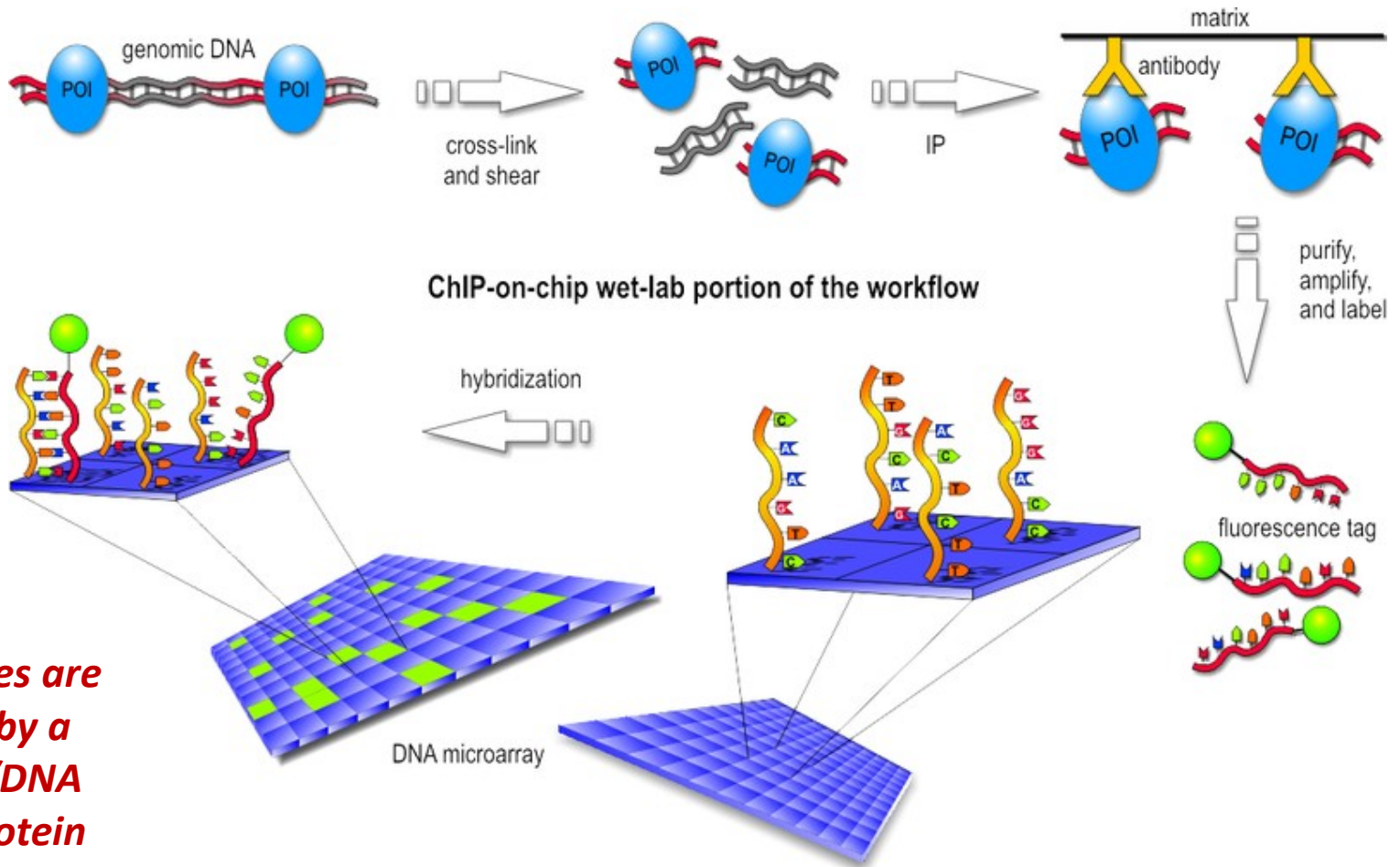


Trend: More Microarray Applications



ChIP-on-chip technologie

kombinace chromatinové imunoprecipitace a čipové technologie

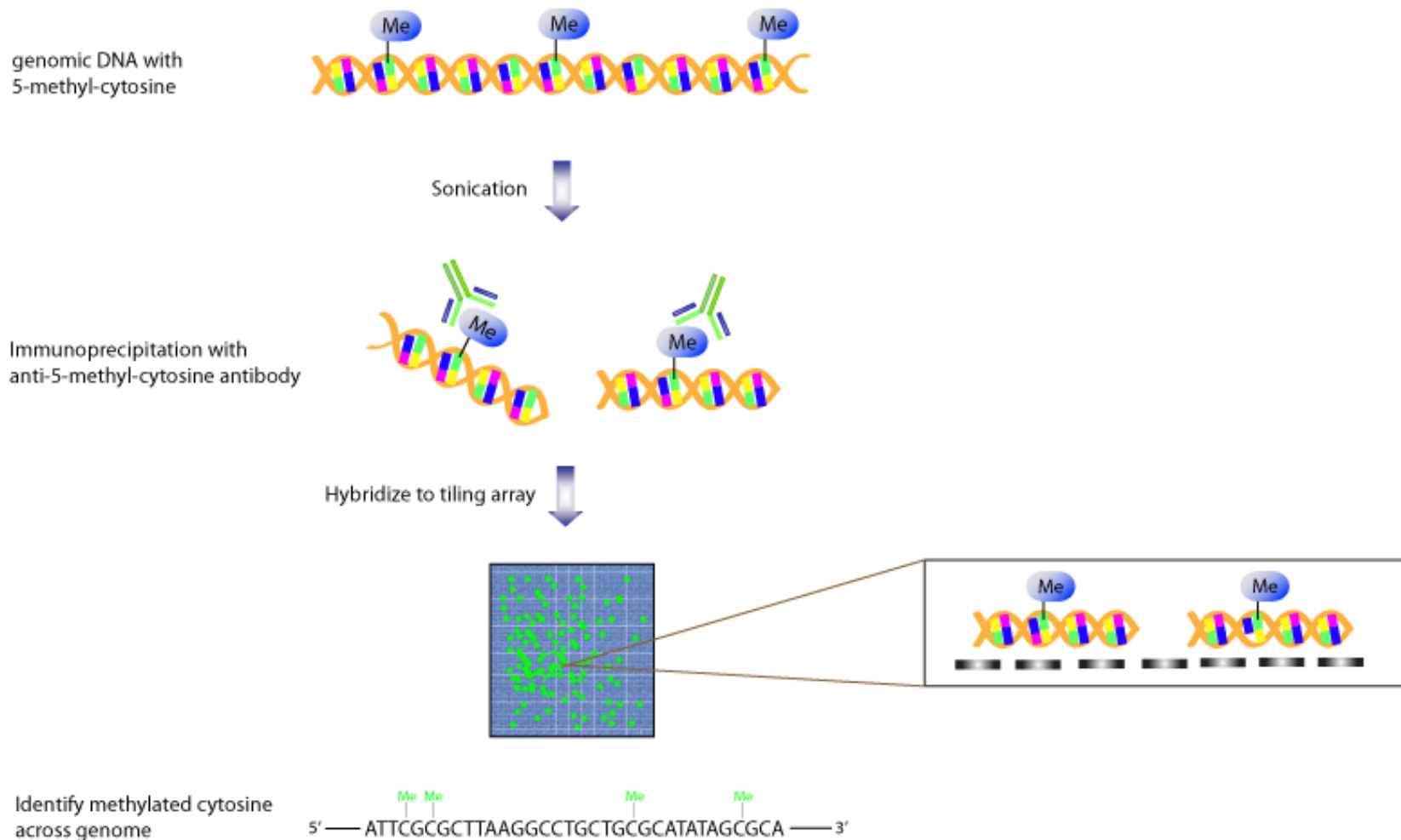


To answer:
which genes are regulated by a known TF/DNA binding protein

Discover protein/DNA interactions!!

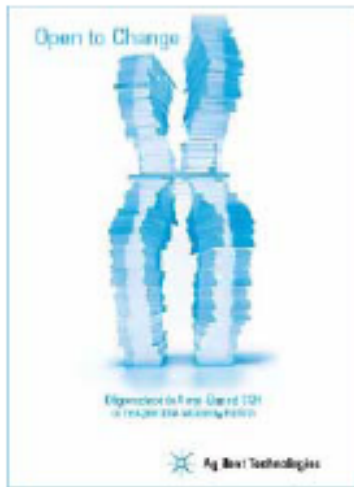
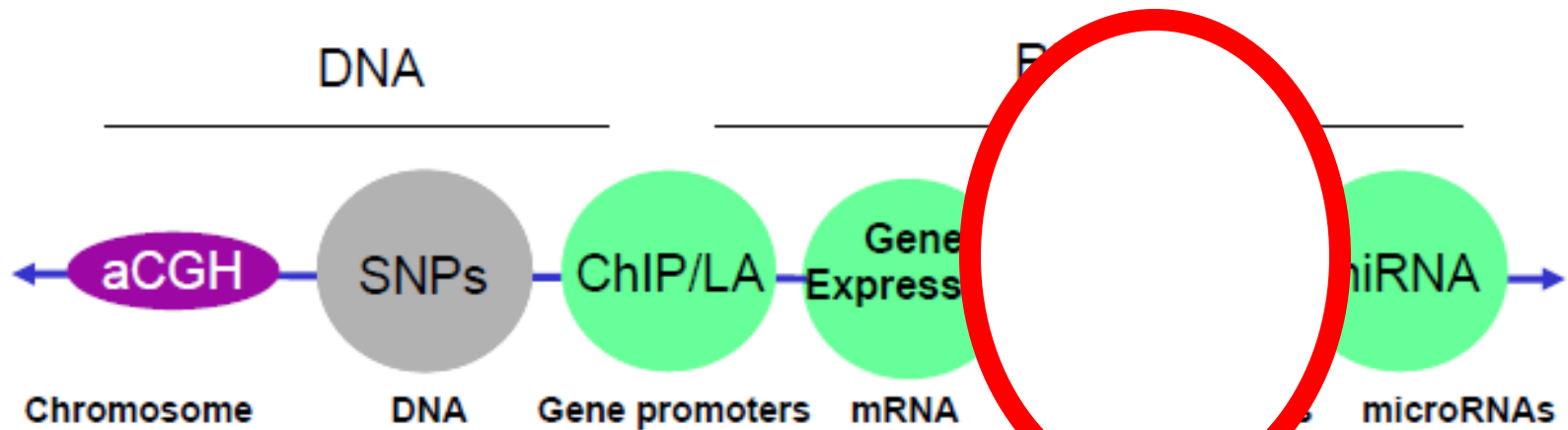
Např. Agilent Technologies...

Technologie čipů k detekci methylace CpG oblastí



Např. Agilent Technologies...

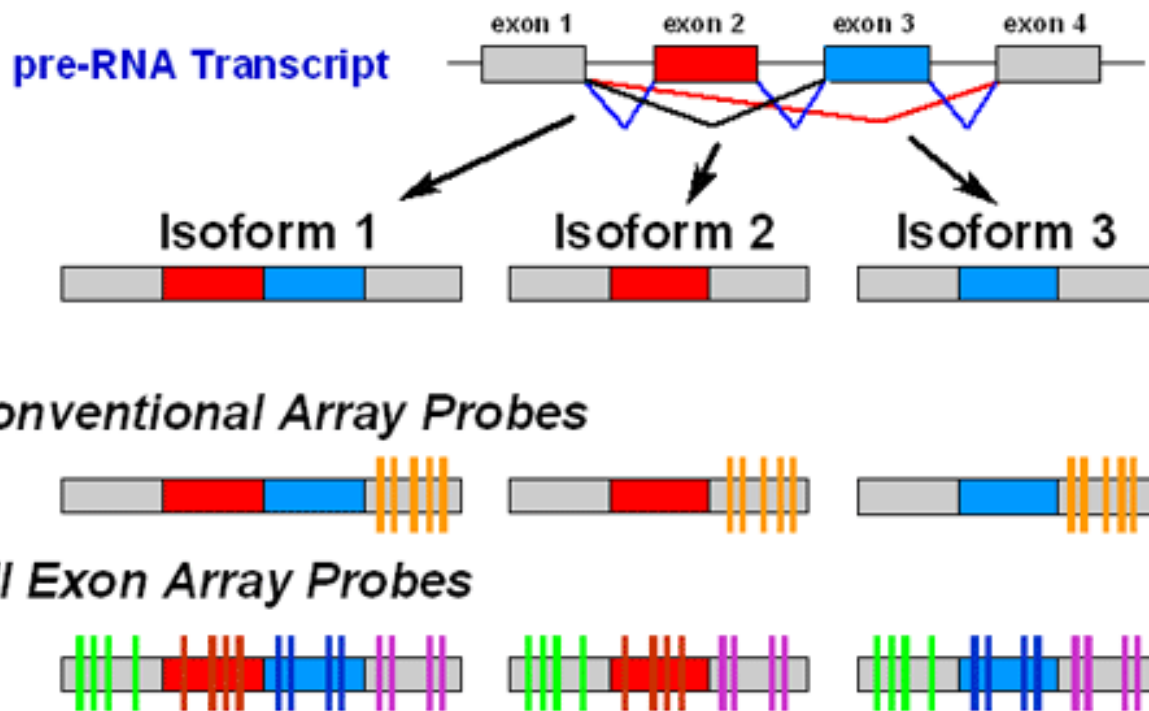
Trend: More Microarray Applications



Key requirements

- Sensitivity
- Specificity
- Flexibility
- Informatics

Technologie exonových čipů



Umožňuje detekci, i nových, sestřihových variant známých genů

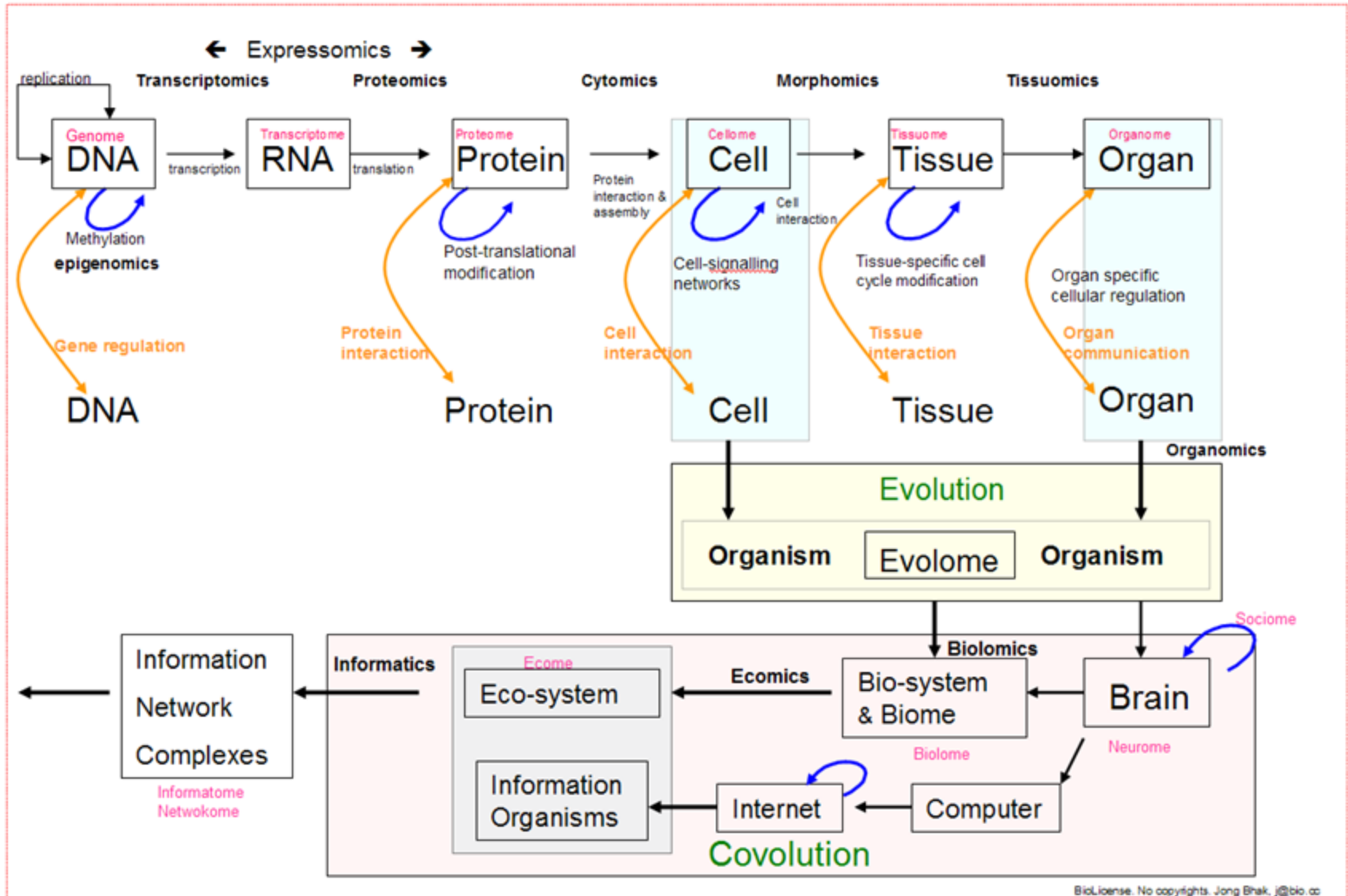
Affymetrix GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array

-omics Mania

biome, cellomics, chronomics, clinomics, complexome, crystallomics, cytomics, cytoskeleton, degradomics, diagnomicsTM, enzymome, epigenome, expressome, fluxome, foldome, secretome, functome, functomics, **genomics**, glycomics, immunome, transcriptomics, integromics, interactome, kinome, ligandomics, lipoproteomics, localizome, phenomics, metabolome, pharmacometabonomics, methylome, microbiome, morphome, neurogenomics, nucleome, secretome, oncogenomics, operome, **transcriptomics**, ORFeome, parasitome, pathome, peptidome, pharmacogenome, pharmacomethylomics, phenomics, phylome, physiogenomics, postgenomics, predictome, promoterome, **proteomics**, pseudogenome, secretome, regulome, resistome, RNome, ribonome, ribonomics, riboproteomics, saccharomics, secretome, somatonome, systeome, toxicomics, transcriptome, translatome, secretome, unknome, vaccinome, variomics...

*An **omics** is a neologism referring to a broad field of study in biology, ending in the suffix "-omics" such as genomics, proteomics or Interactomics. The related neologism "'omes'" are the objects of study of the field such the genome or proteome, respectively ("omes" stems from the Greek for 'all', 'every', 'whole' or 'complete').*

Omics Pathway version 1.0 20071231,



BiolLicense. No copyrights. Jong Bhak. j@bio.ac

Different -omics sciences describe many levels of biomolecular organization – but if used in isolation may give misleading inferences about the system!!!

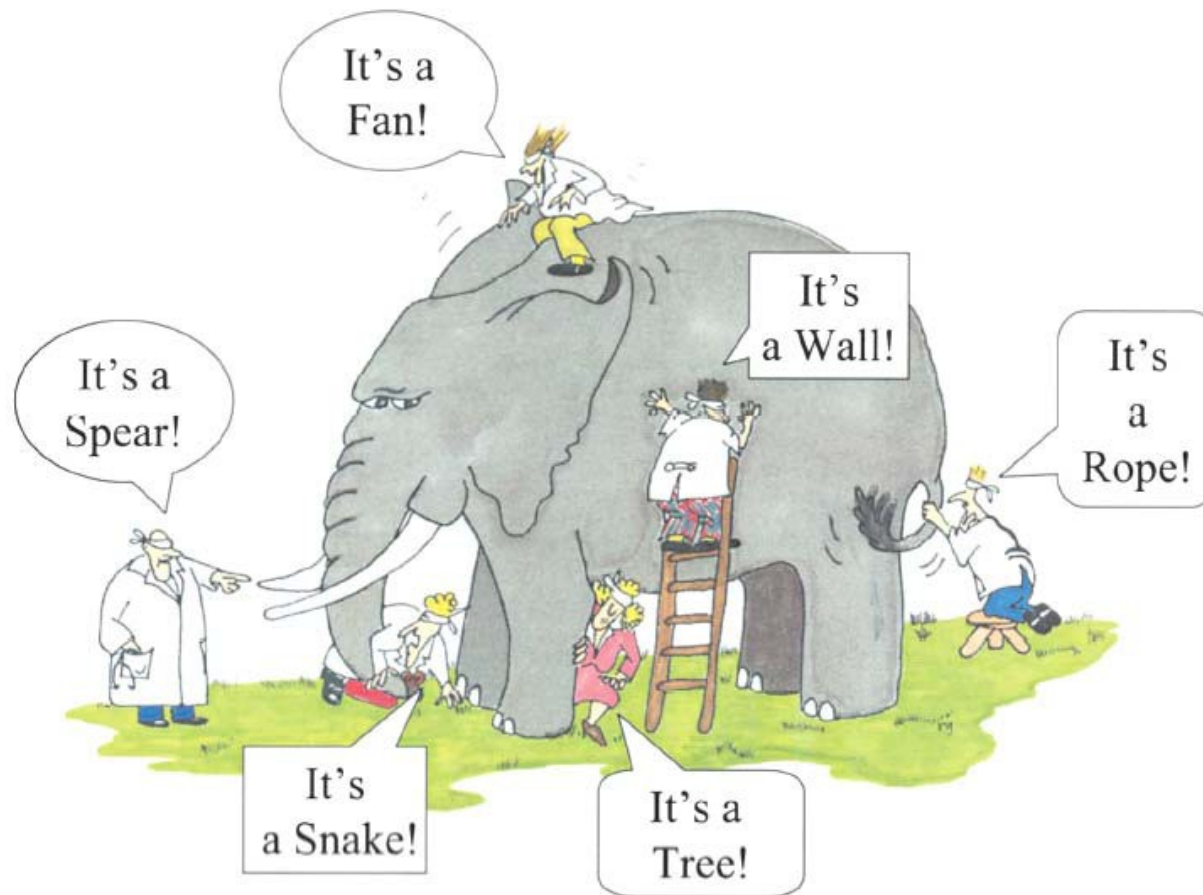


Fig. 1. *The blind men and the elephant.* Poem by John Godfrey Saxe (Cartoon originally copyrighted by the authors; G. Renee Guzlas, artist).

JEDEN GENOM, DVA PROTEOMY

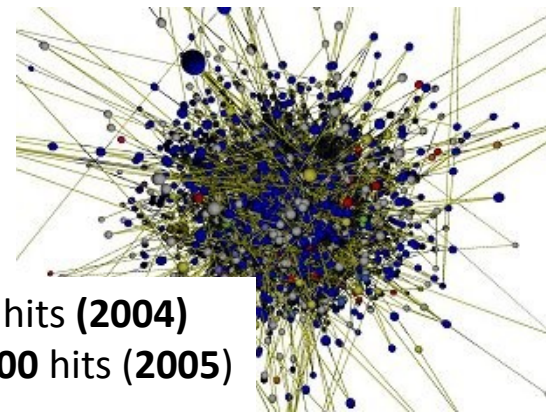


PROTEOMIKA

From **220** publications in the previous millennium ('94-'99)
 To **21,350** (!!!) publications in this millennium ('00-'05)

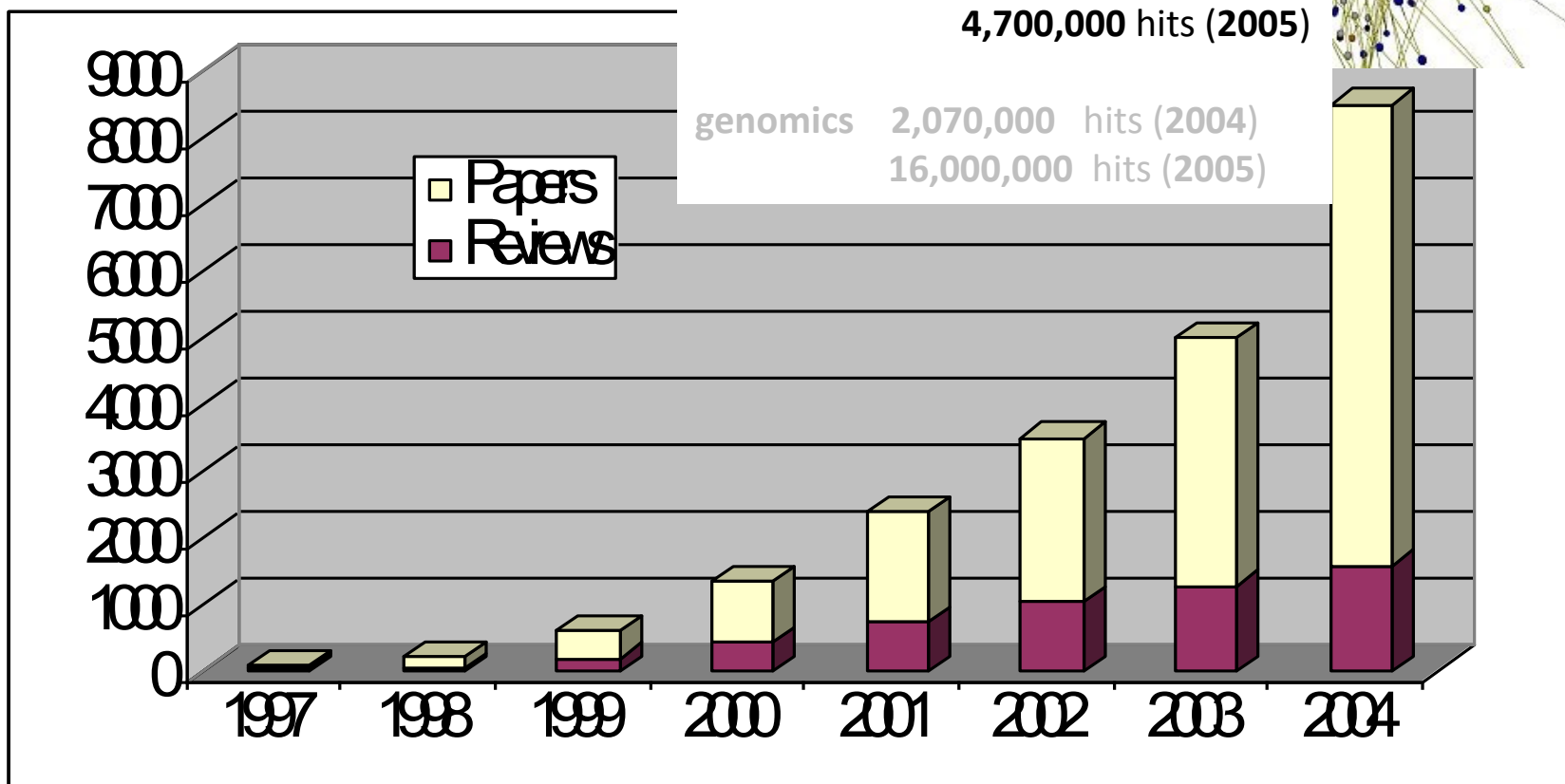
GENOMICS 81975

PROTEOMICS 36494



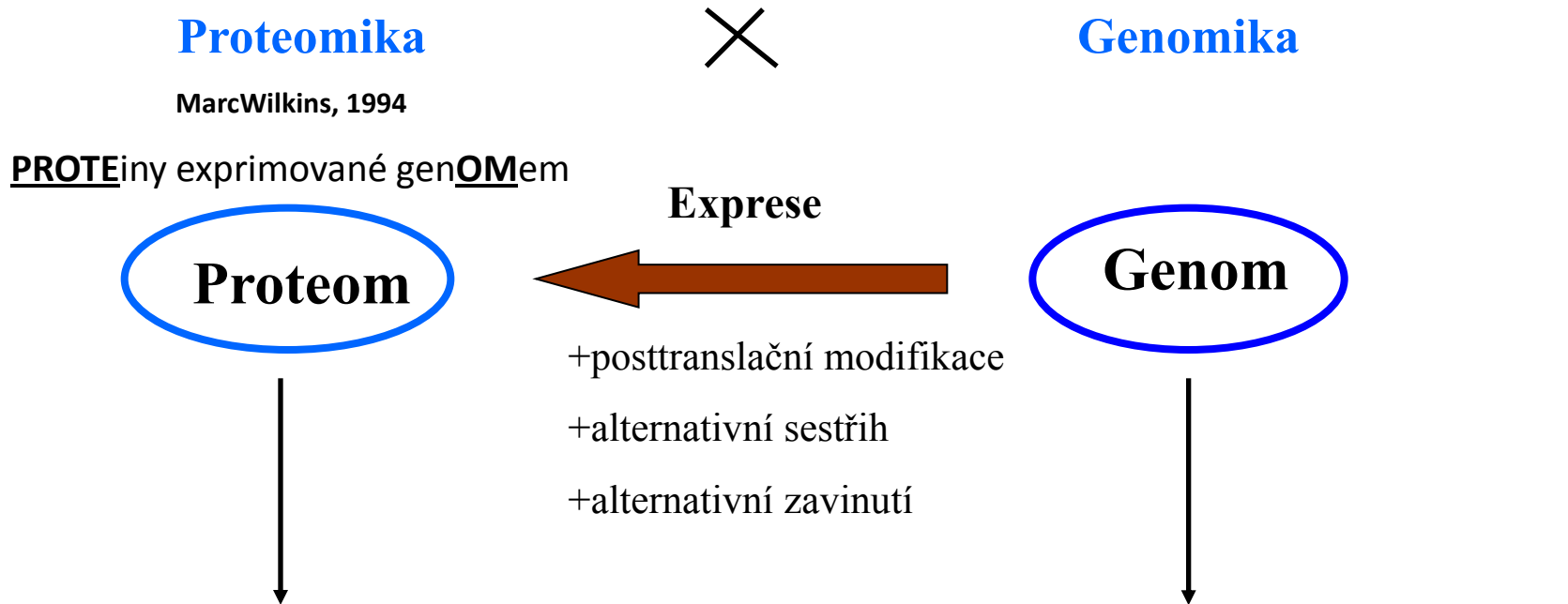
proteomics 886,000 hits (2004)
 4,700,000 hits (2005)

genomics 2,070,000 hits (2004)
 16,000,000 hits (2005)



Co je to proteomika?

Proteomika je obor, který se zabývá systematickou analýzou proteinů z hlediska jejich identity, množství a funkcí



- Souhrn všech proteinů v daném organismu
- Lidské tělo obsahuje miliony proteinů
- Expresse proteinů v rámci jednoho organismu se liší

- Souhrn všech genů v daném organismu
- Lidský genom obsahuje 20-25.000 genů
- Genom je konstantní celek

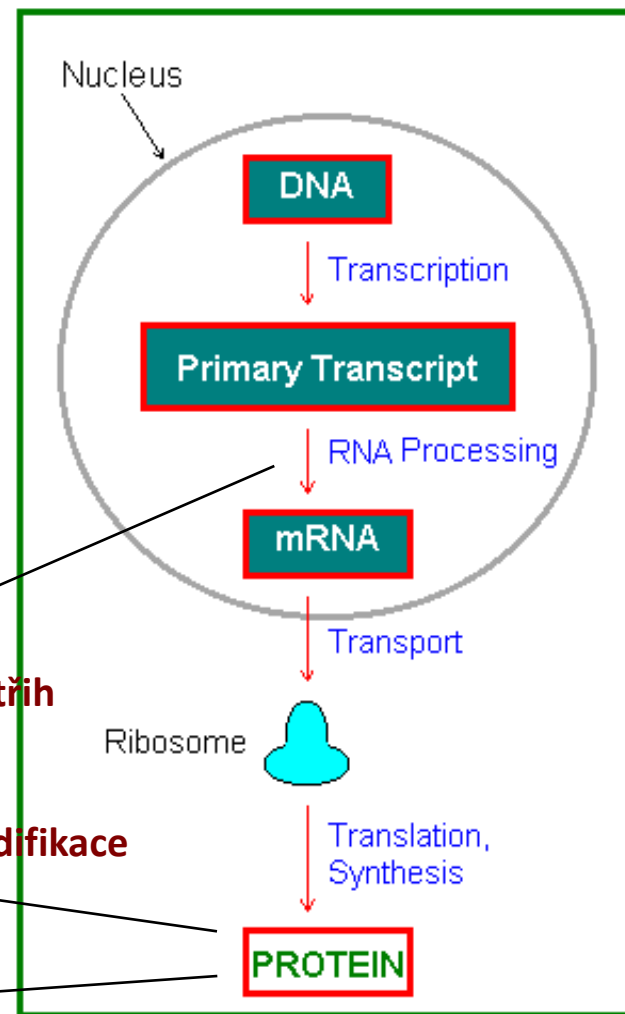
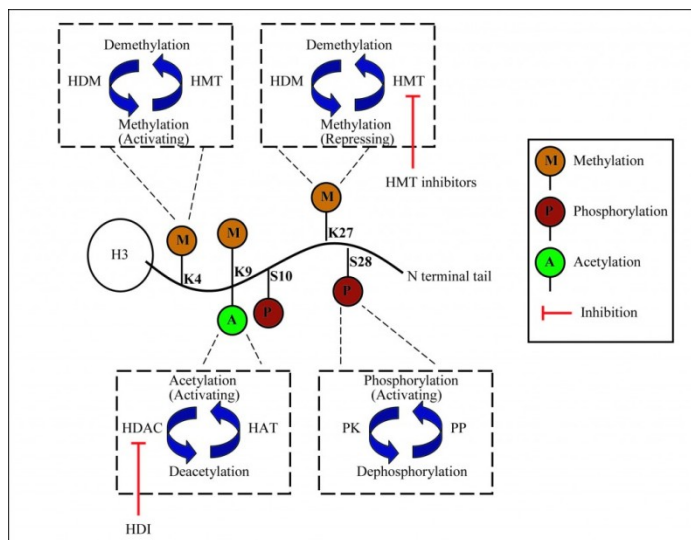
Nárůst diverzity proteinů

➤ Posttranslační modifikace

1. Připojení funkčních skupin (acetát, fosfát, lipidy, cukry)
2. Modifikace amino skupin
3. Strukturální změny (tvorba disulfidických vazeb, proteolytické štěpení)

➤ Alternativní sestřih

➤ Alternativní zavinutí



Alternativní sestřih

Posttranslační modifikace

Alternativní zavinutí

Přístupy k proteomickému studiu

Podle cíle:

proteomika analytická, strukturní, funkční, ...

Podle způsobu provedení:

proteomika diferenciální, high-throughput...

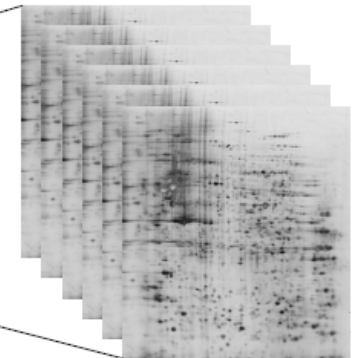
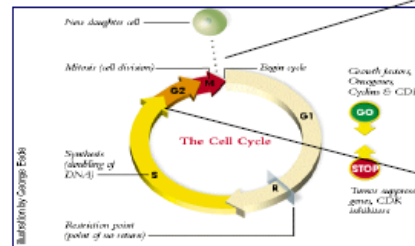
High-throughput proteomika je zaměřena na rychlé získávání údajů o přítomnosti bílkovin, což je důležité zejména pro screeningové účely ve zdravotnictví, zemědělství, kontrole potravin atd.

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 vbílkovině), což je důležité při studiu role bílkovin v životních procesech.

Přístupy k proteomickému studiu

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.



Shotgun proteomika je obecný postup pro identifikace bílkovin, kdy je neseparovaná směs bílkovin nejprve enzymově rozštěpena na směs peptidů, které jsou následně separovány vhodnou metodou (nejčastěji HPLC) a potom sekvenovány tandemovou MS (často jsou využívány i nescifické enzymy např. Proteinasa K).

Obecné schéma klasického proteomického experimentu

Separace směsi bílkovin

2D-elfo, chromatografie LC, a jejich kombinace

Výběr proteinů
pro indentifikaci

Štěpení vybraných roteinů
a čištění peptidů

Enzymatické či chemické
štěpení spotů nebo LC frakcí,
čištění

Měření přesné hmotnosti/náboje peptidů
případně jejich fragmentů

Získání hmotnostních spekter

Identifikace proteinů

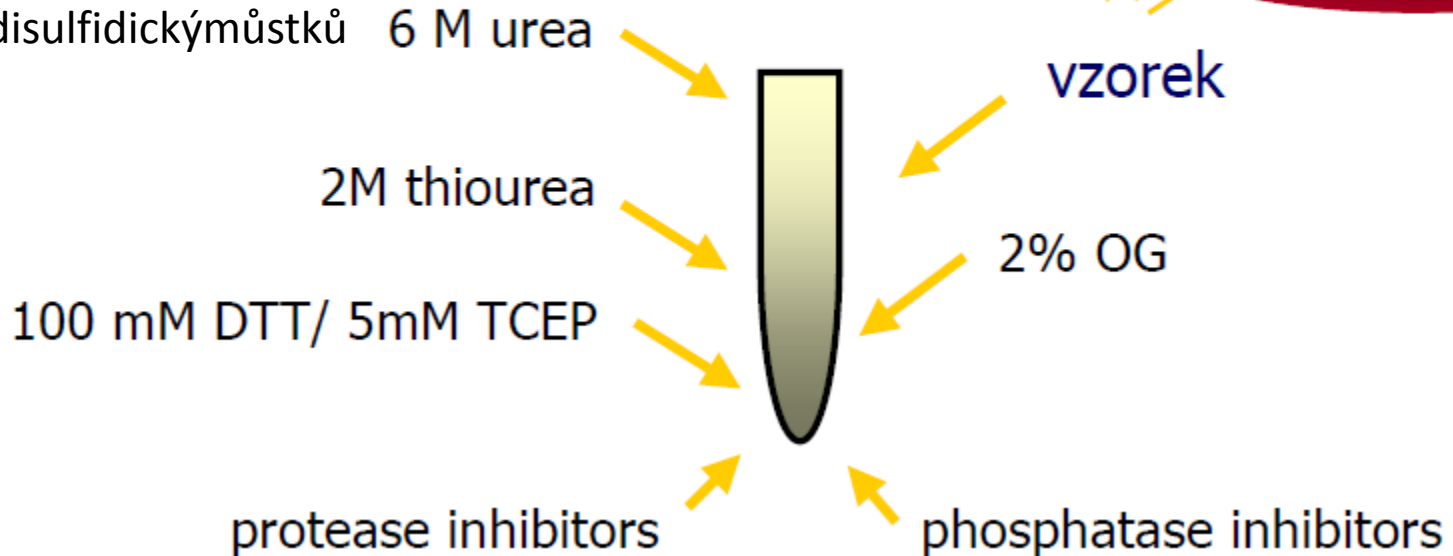
Porovnání hmotnostní sady peptidů s údaji dostupnými v databázích.

Příprava vzorku pro proteomické analýzy

Močovina, thiomčovina – chaotropní činidlo, zvýšení rozpustnosti, denaturace bílkovin

Redukční činidlo (DTT) –

redukce disulfidických můstků

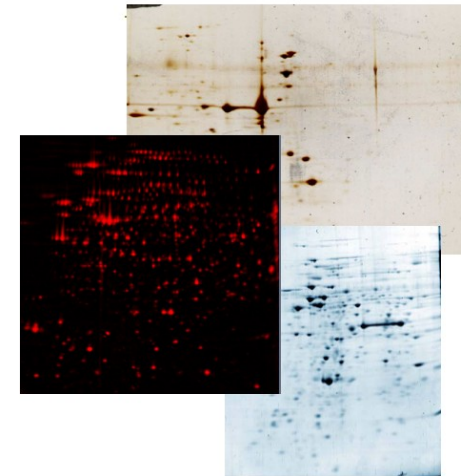
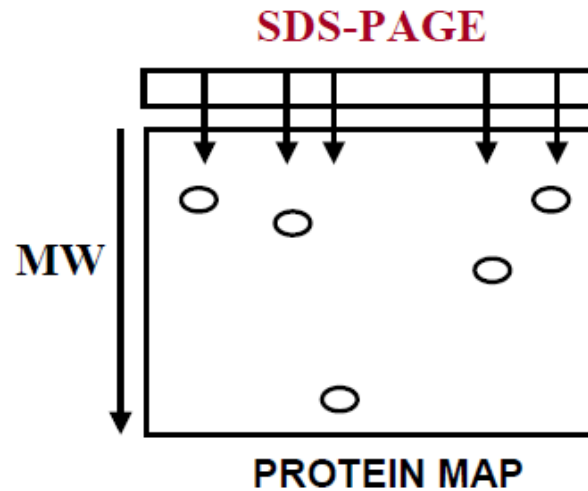
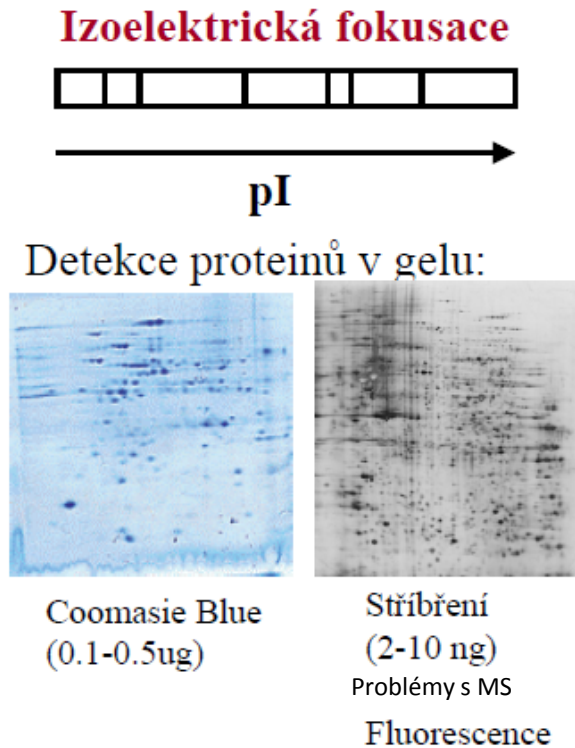


za „subproteomů“

cytoplasma, ribosomy: diferenciální centrifugace

membránová frakce: diferenciální centrifugace, extrakce detergenty (TX-114) nebo extrakce Na_2CO_3

Dvojrozměrná gelová elektroforéza (2D-ELFO) – SEPARACE



SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat–polyakrylamidová elektroforéza elektroforéza)

Bílkoviny se rozdělují na základě jejich MW

Záporně nabitý SDS tvoří komplexy s bílkoviny a stíní náboje proteinu (1,4g SDS :1g proteinu). SDS uděluje proteinům uniformní náboj na jednotku hmotnosti

IEF

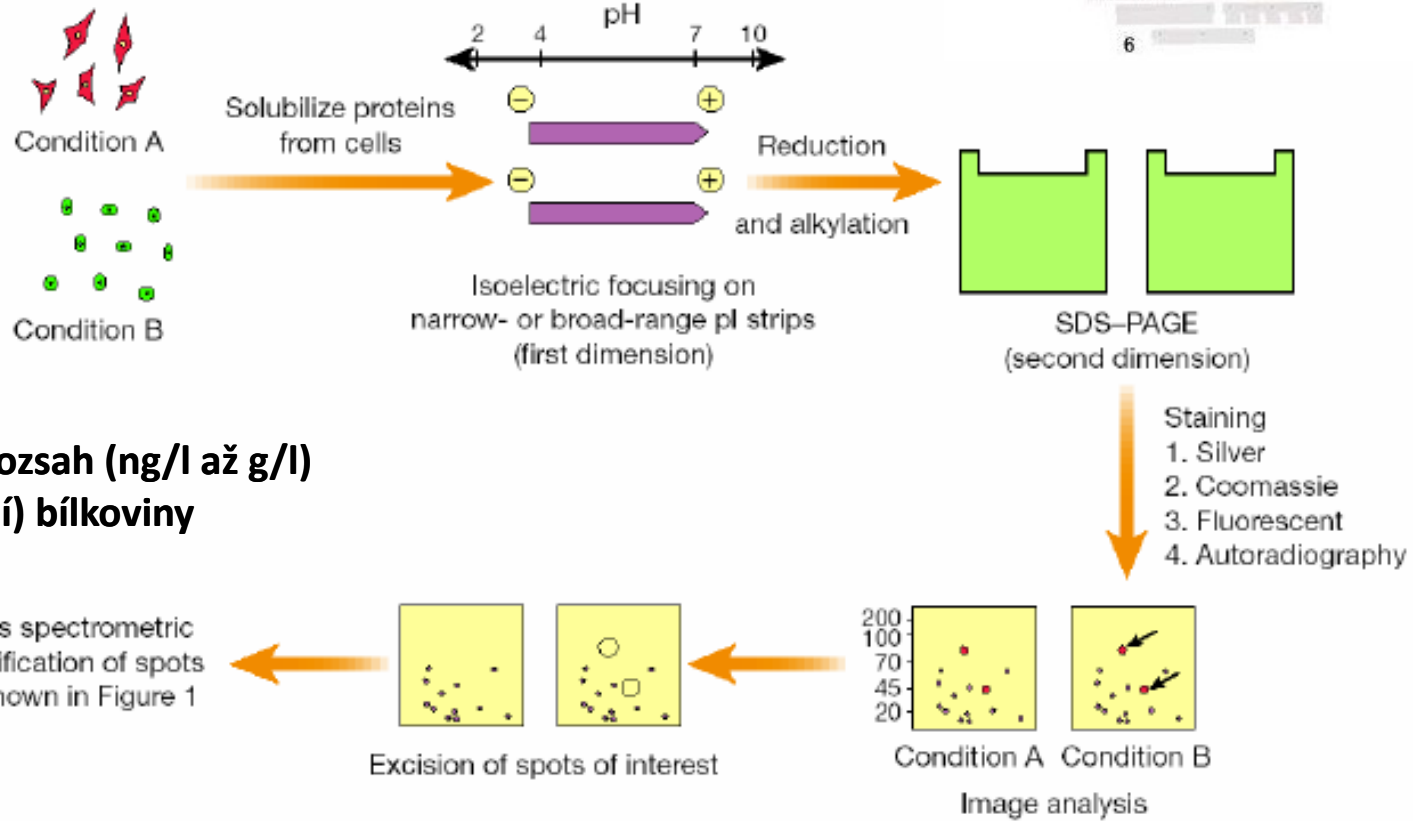
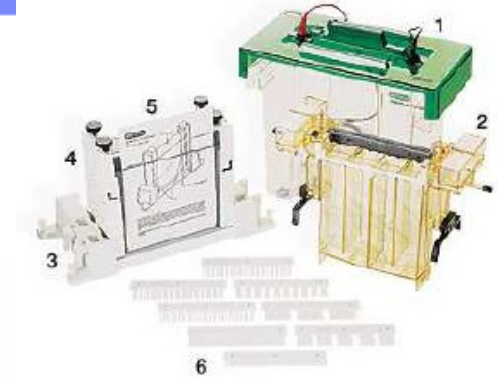
Celkový náboj proteinu(net charge) je součtem všech jeho negativních i pozitivních nábojů.

Kyselé a zásadité skupiny jsou protonovány a deprotonovány v závislosti na pH okolí.

Amfoterní molekula (bílkovina) v elektrickém poli v gradientu pH migruje do bodu, kde je její celkový náboj rovný nule.

pH tohoto bodu odpovídá izoelektrickému bodu (pI) dané bílkoviny.

2D-ELFO



LIMITACE 2D-ELFO!!!!

Bílkoviny s extrémním pI

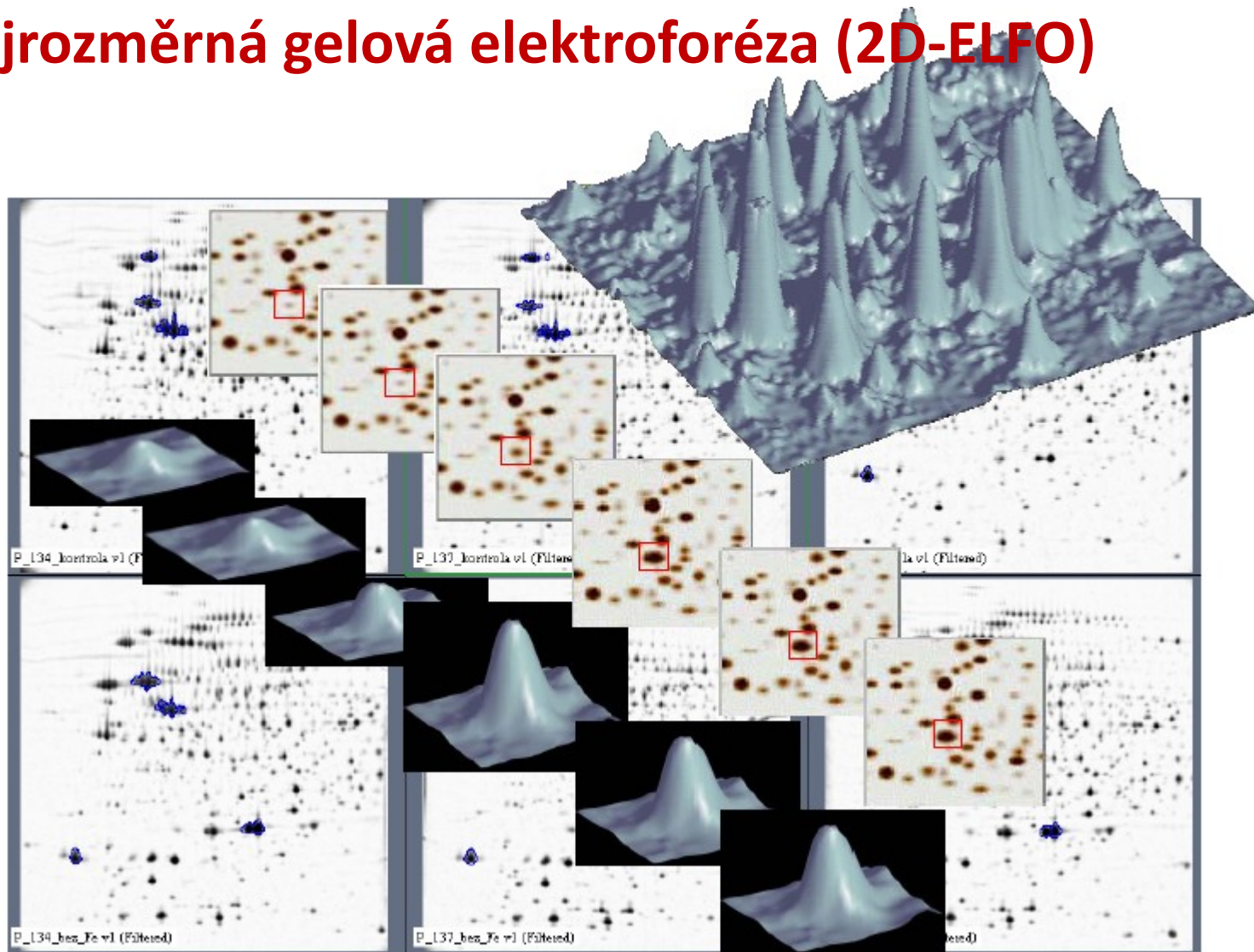
Bílkoviny nad 150 kDa

Ohromný koncentrační rozsah (ng/l až g/l)

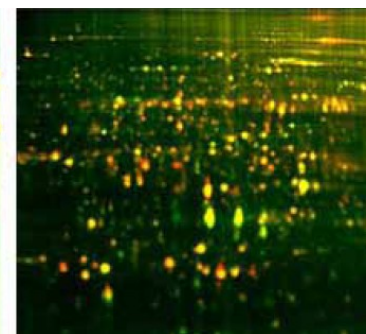
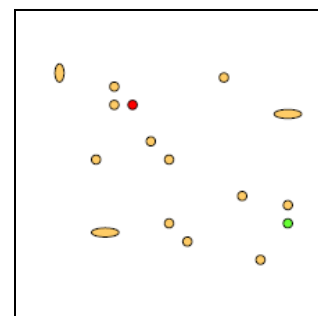
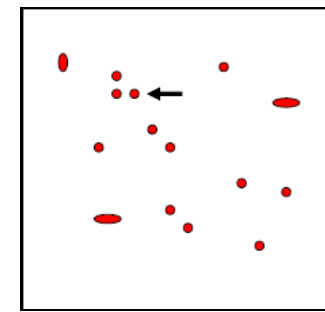
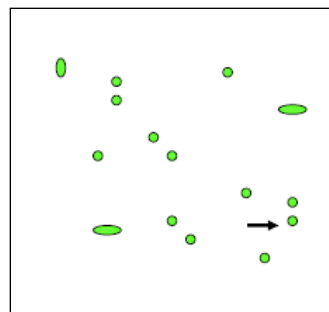
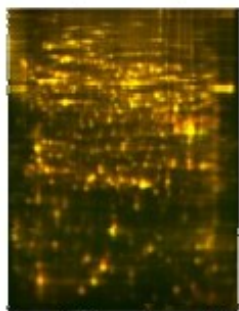
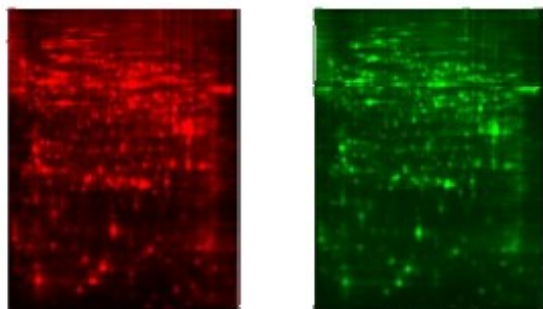
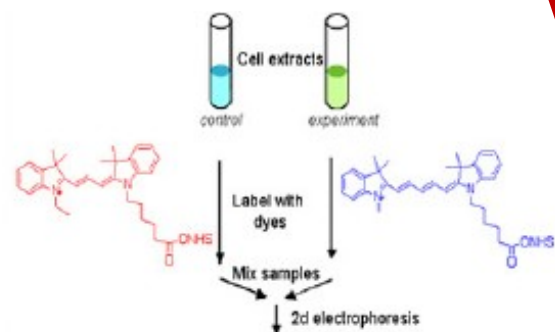
Membránové(hydrofobní) bílkoviny

Pandey & Mann Proteomics to study genes and genomes
 NATURE | VOL 405 | 15 JUNE 2000 |

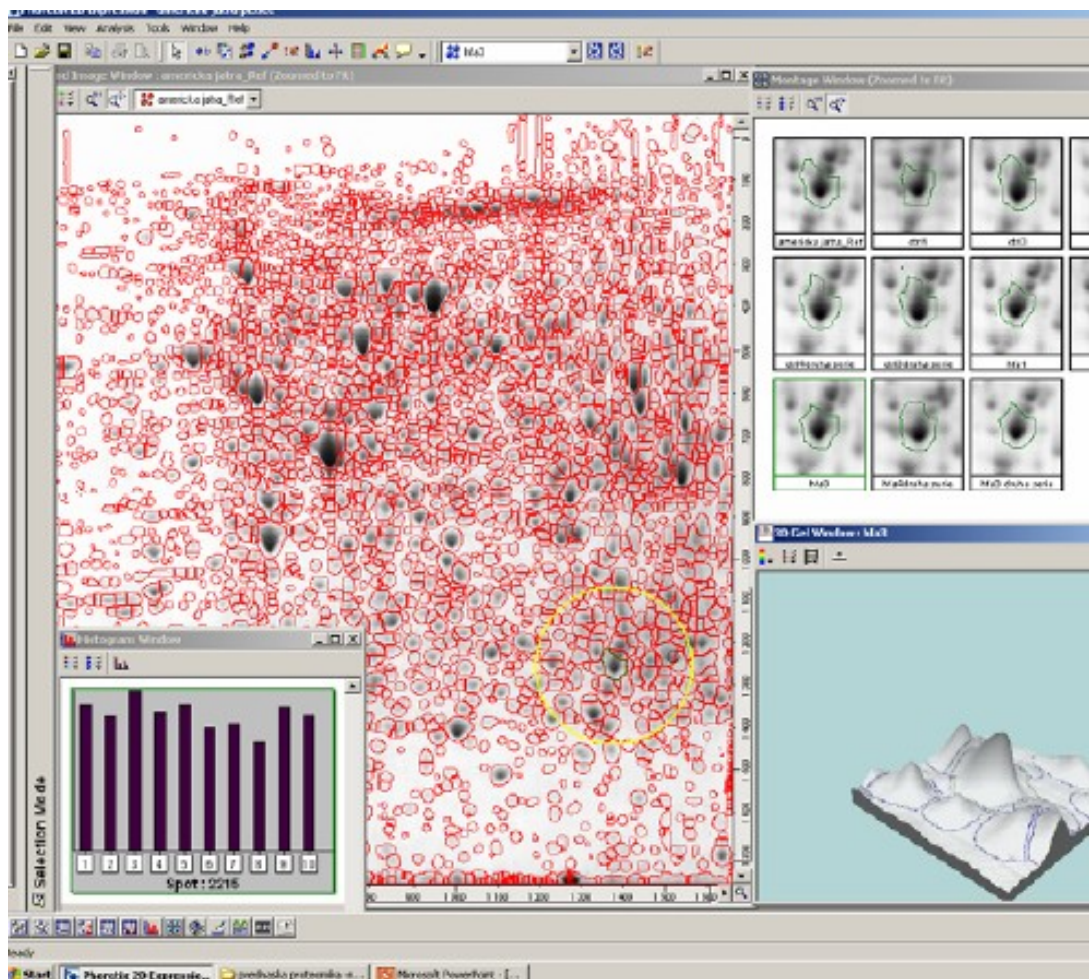
Dvozměrná gelová elektroforéza (2D-ELFO)



Diferenciální dvojrozměrná gelová elektroforéza (2D-DIGE) VÝBĚR PROTEINŮ



Softwarové vyhodnocení 2D-gelů



Komerční:

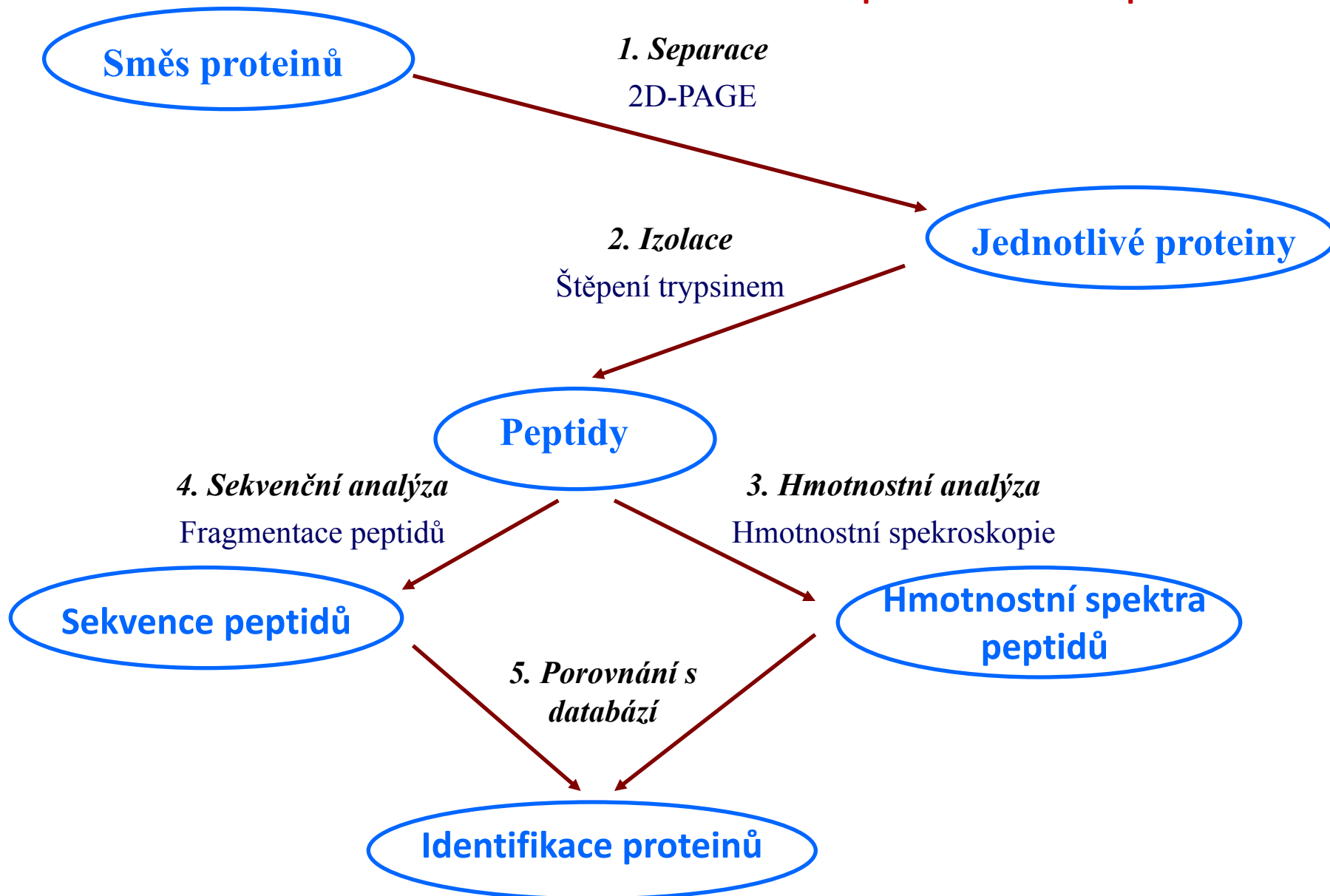
- PDQuest
- Phoretix
- Melanie

2D gels



"You've got one protein missing..."
"No, you've one extra protein!"

Schéma – shrnutí klasického proteomického experimentu



Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry - MS)

IDENTIFIKACE

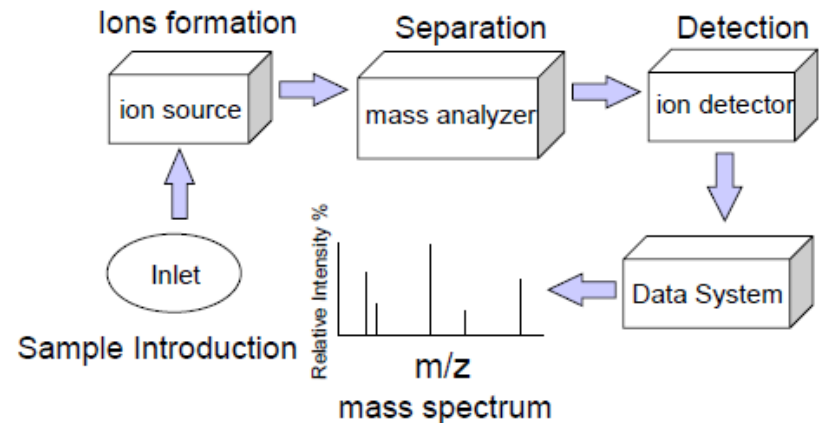
Separace látek podle rozdílů hmotnosti (m) a náboje (z) s využitím elektrického / magnetického pole.

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

Výsledné hmotnostní spektrum → grafické znázornění četnosti iontů na hodnotě m/z

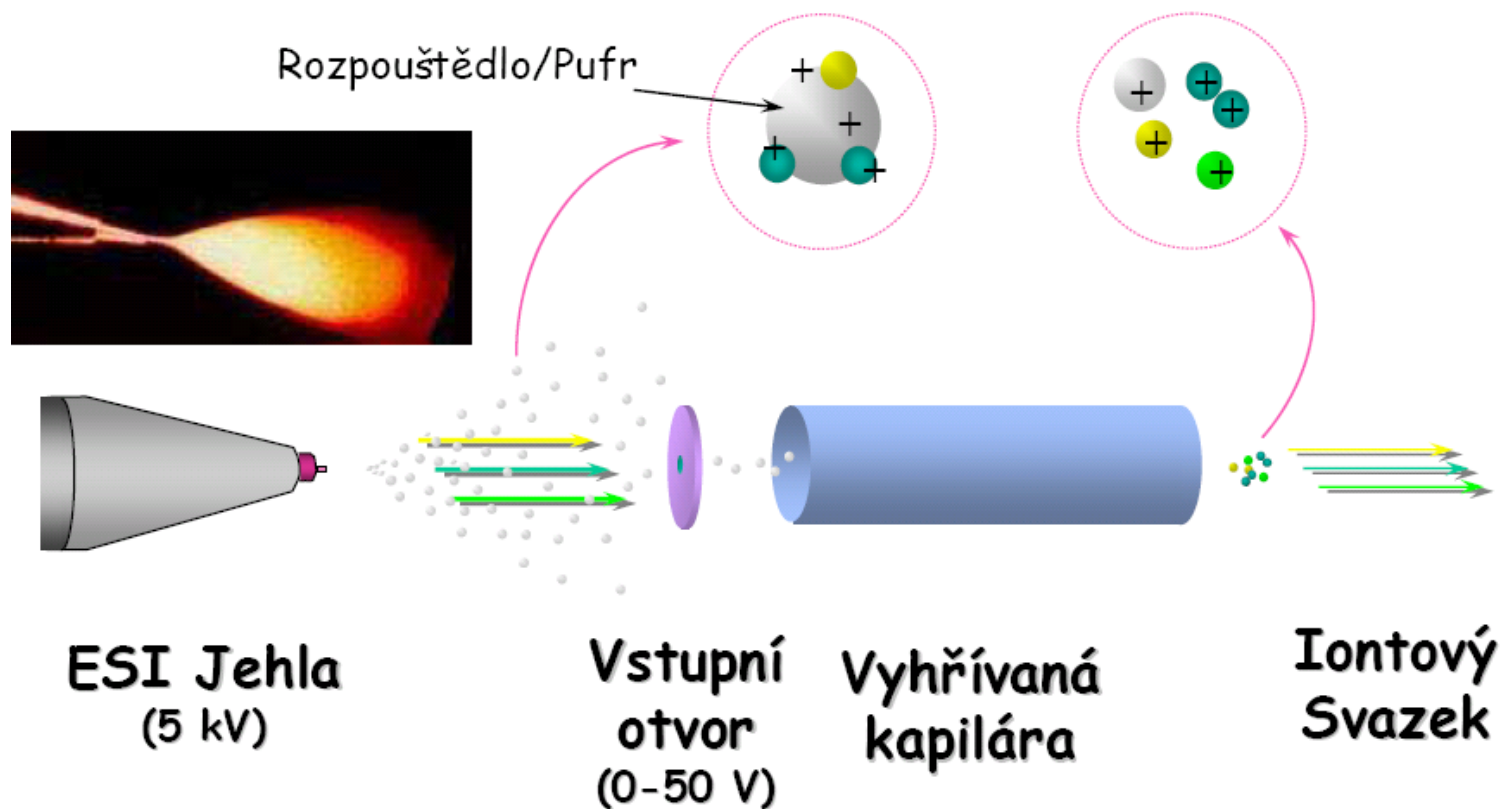
IONTOVÉ ZDROJE

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



Techniky ionizace - elektropray (ESI)

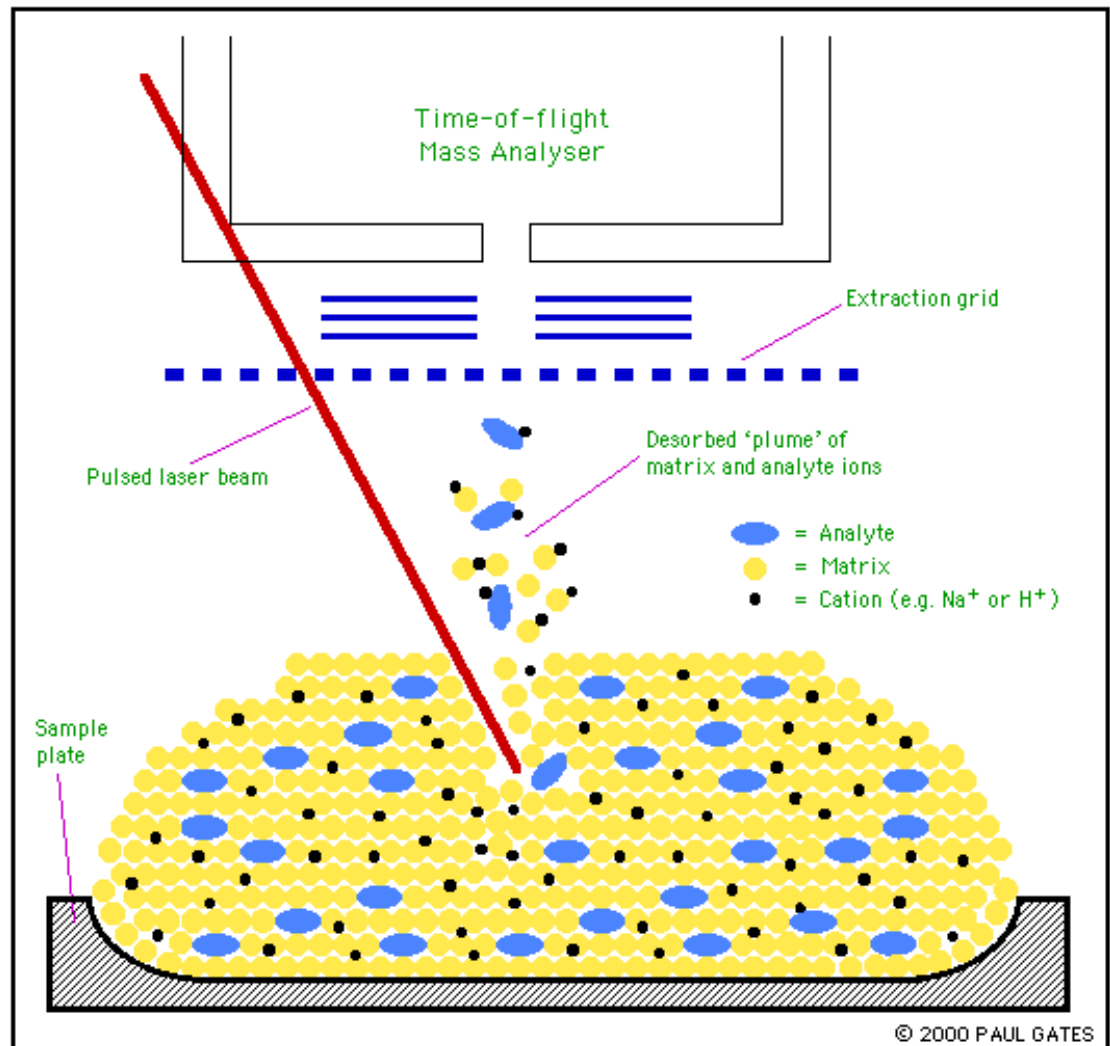
jemná technika ionizace, nezpůsobuje fragmentaci analytu
 vzorek rozpuštěn v těkavém organickém rozpouštědle
 rozprašován pomocí nabité mikrostríkačky
 odpařování rozpouštědla → molekulární ionty vstupují do spektrometru



Techniky ionizace–Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

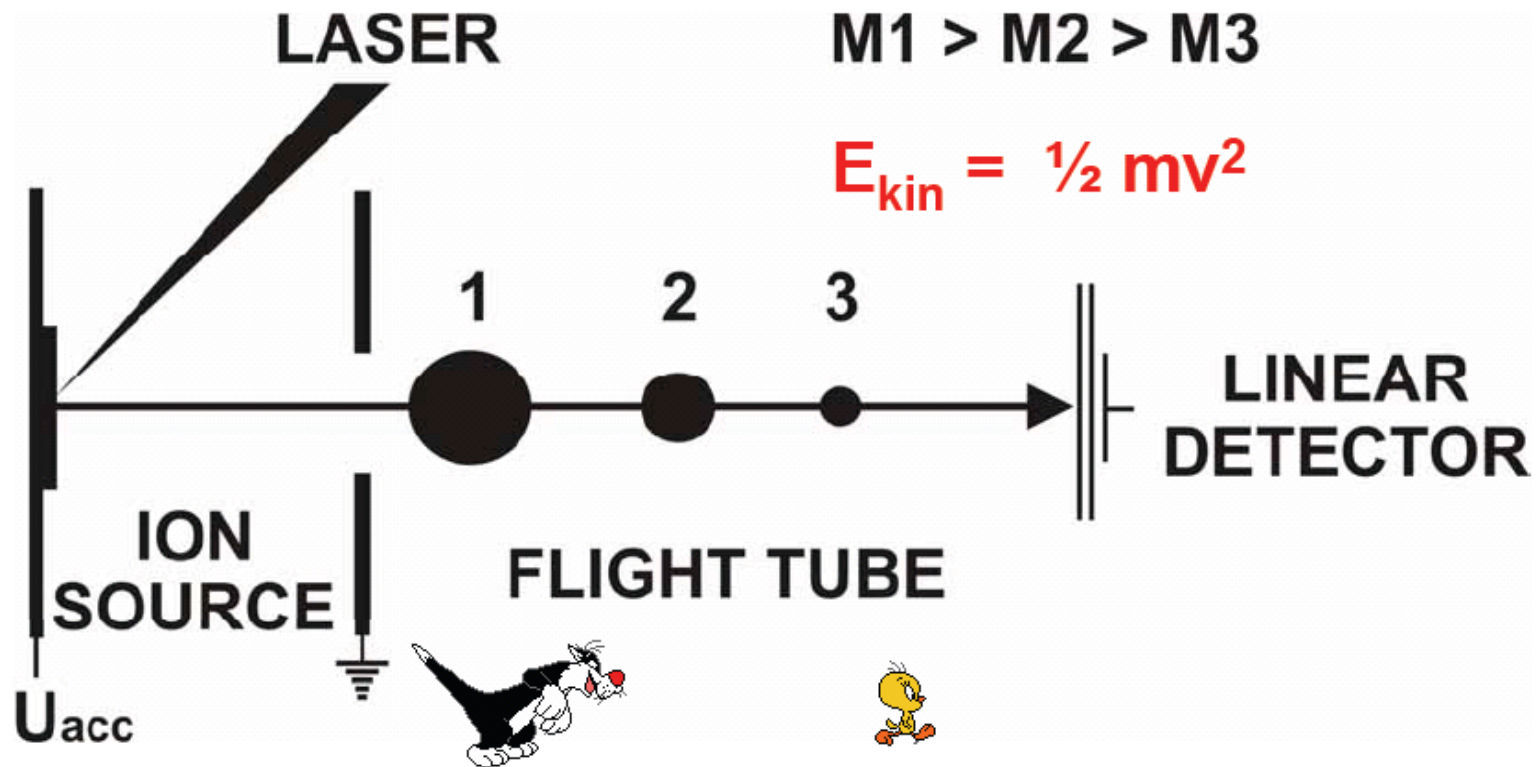
Smíchání vzorku s matricí
 vysušení na kovové destičce
Matrice (kyselina nikotinová,
 dihydroxybenzoová)

- absorbuje energii laseru
- usnadňuje odpaření
- předává náboj analytu



Typy analyzátorů MS – nejjednodušší Time of Flight (TOF)

Urychlení iontů v elektrickém poli o definovaných vlastnostech m/z lze určit z **doby letu** iontu trubicí analyzátoru



Další typy analyzátorů – IT (ion trap-iontová past) Q3 (trojity kvadrupól)

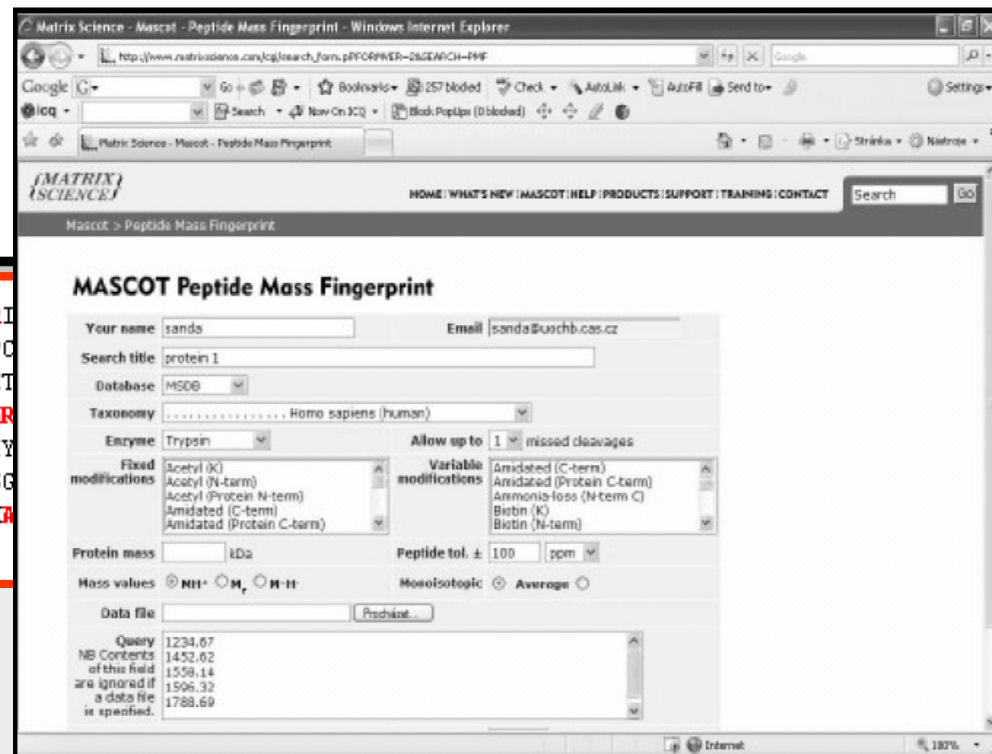
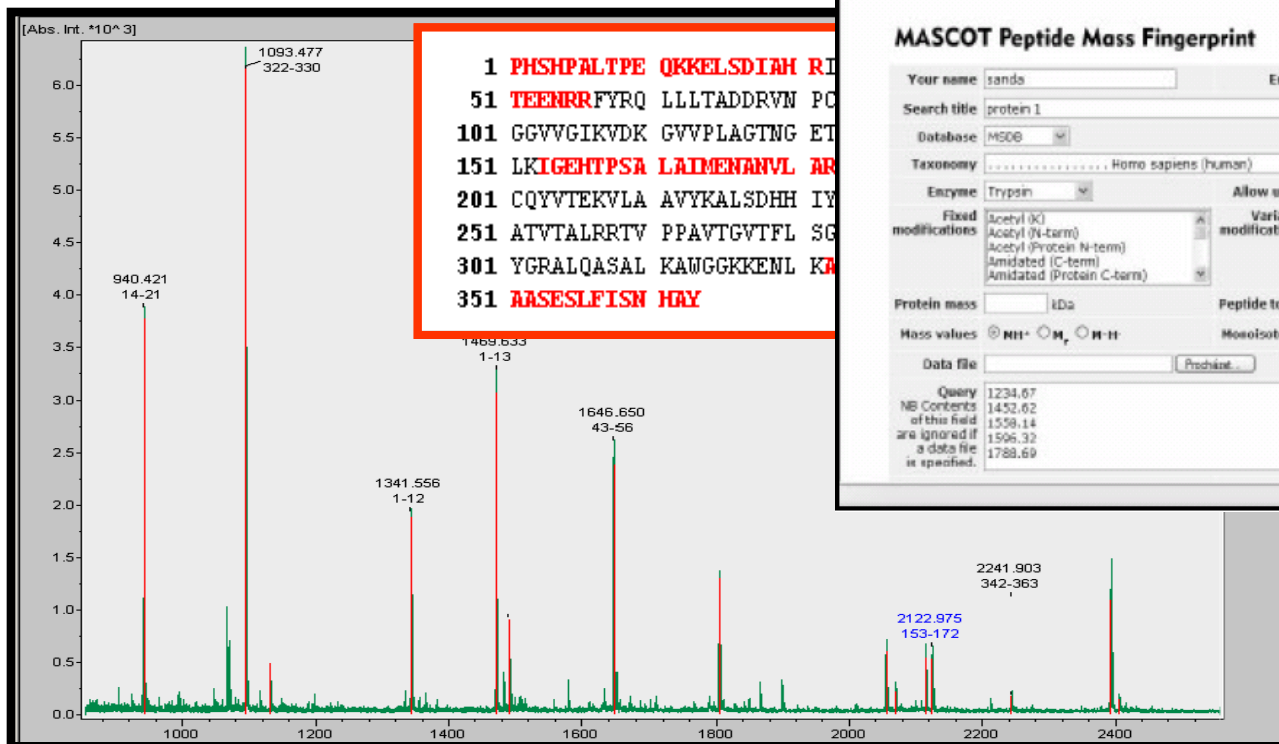
Peptidové mapování (Peptide Mass Fingerprinting – PMF, MS a MS/MS) Identifikace proteinů z roztoku a gelu

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

MALDI-TOF

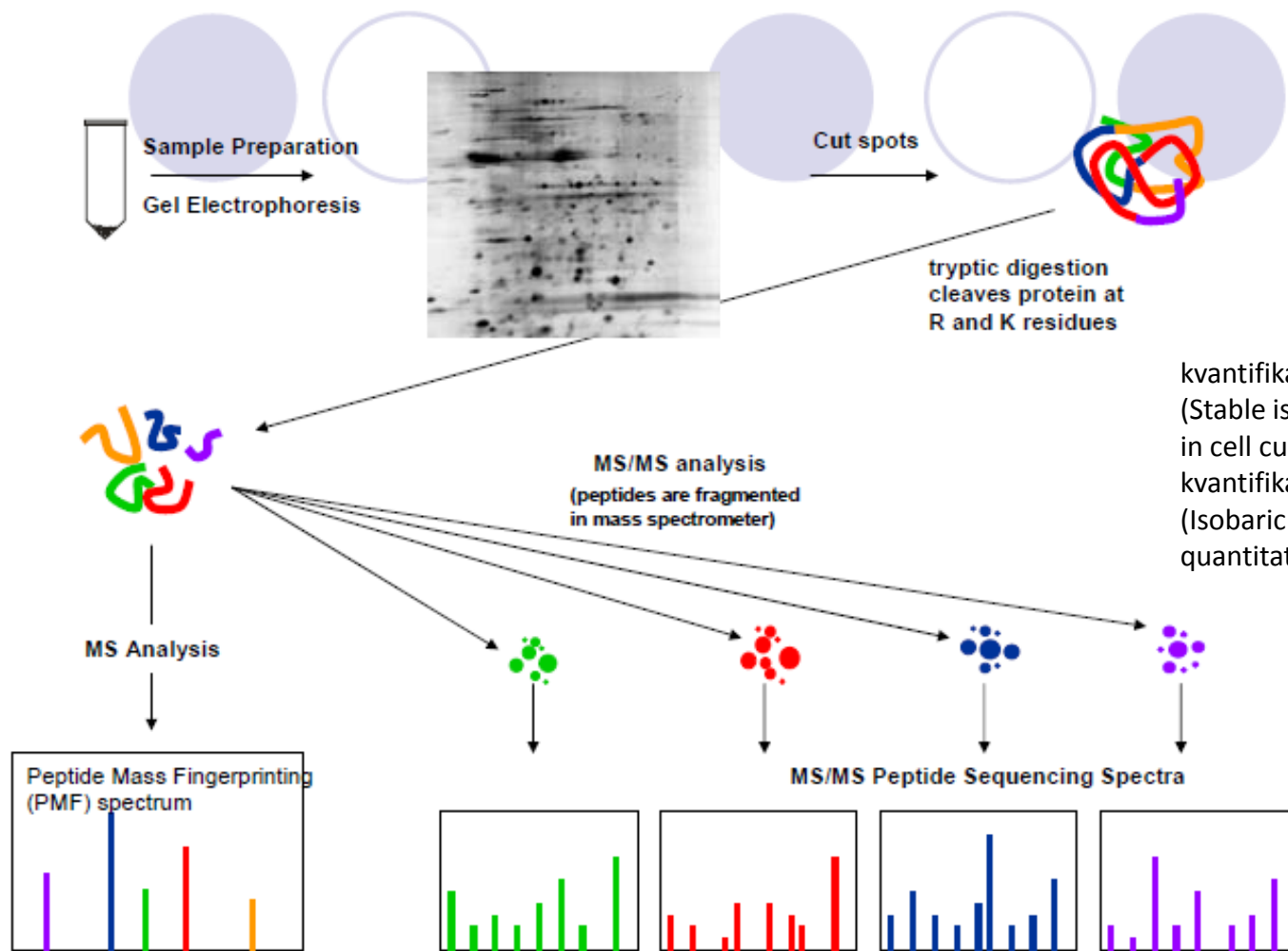
Interpretace MS dat

Programy : Mascot,
ProteinProspector



Databáze:
NCBI
Swissprot

Tandemová hmotnostní spektrometrie sekvenování peptidových fragmentů



kvantifikace peptidů v MS módu: **SILAC**
(Stable isotope labeling by amino acids
in cell culture)
kvantifikace peptidů v MS/MS módu: **iTRAQ**
(Isobaric tags for relative and absolute
quantitation)

Tandemová hmotnostní spektrometrie sekvenování peptidových fragmentů

víceková separace na základě m/z (multiple MS)

-fragmentace určitého iontu: Post Source Decay (PSD), Collision Induced

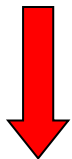
Disociation (CID) - fragmentace při kontaktu s inertním plynem (dusík, helium) v kolizní cele

Post Source Decay (PSD)

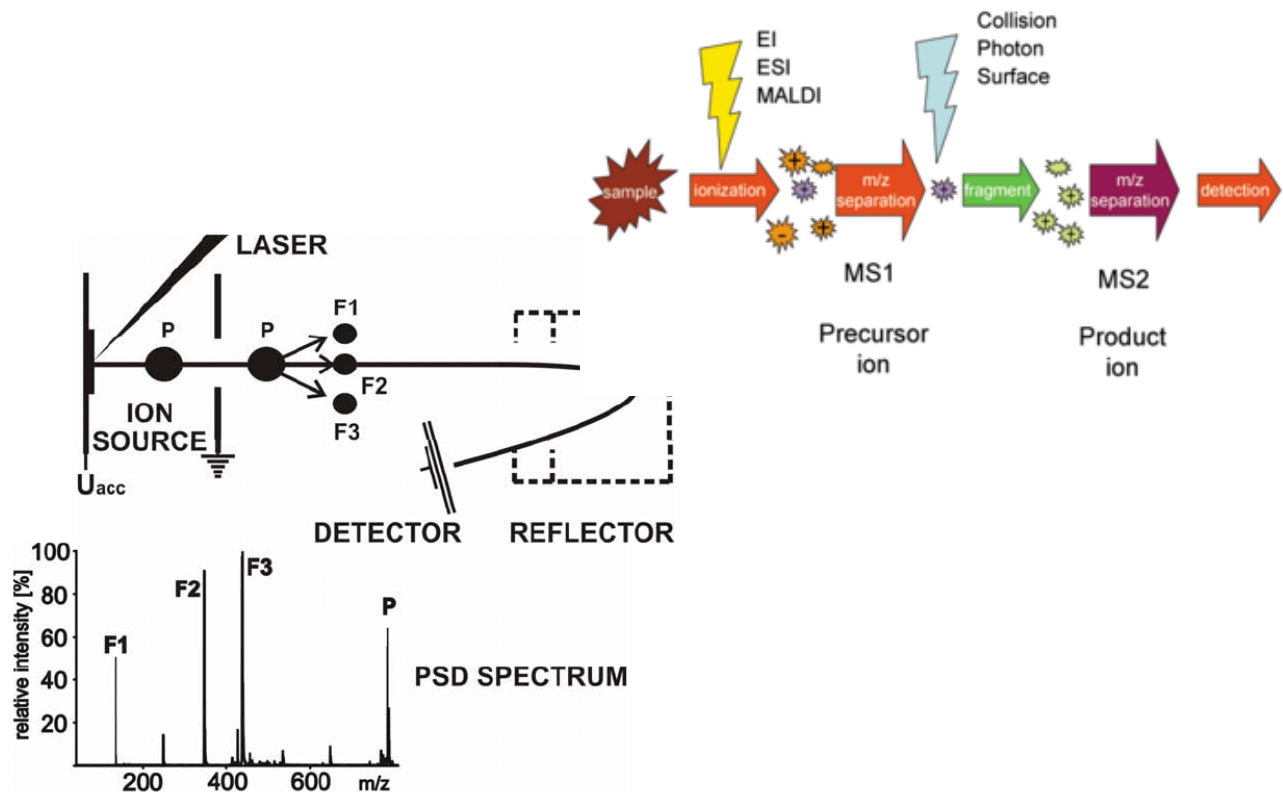
Při vyšší energii laseru →

fragmentace peptidu

(kolize mezi ionty analytu)



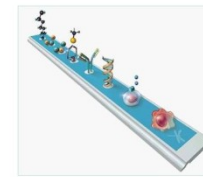
Peptide fragment
Sequencing- metoda
pro sekvenování
peptidů



ProteinChips and SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) Kvantifikace proteinů

byla definována na počátku devadesátých let

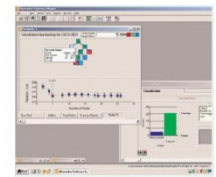
- 1) je rozšířením MALDI-TOF-MS
- 2) metoda desorpce a ionizace netěkavých látek
- 3) měření proteinů v lineárním módu aktivní účast povrchu čipu při extrakci, prezentaci a strukturní modifikaci daného vzorku



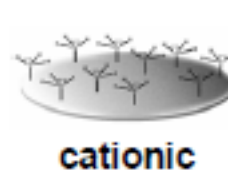
ProteinChip Arrays
» Separation



ProteinChip Reader
» Detection

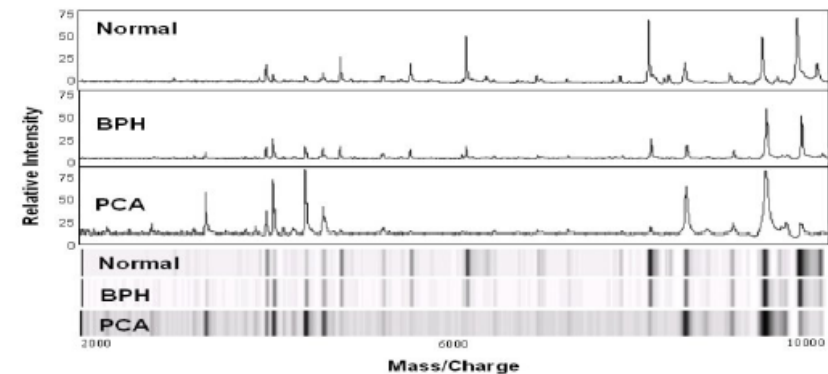


ProteinChip Software
» Analysis

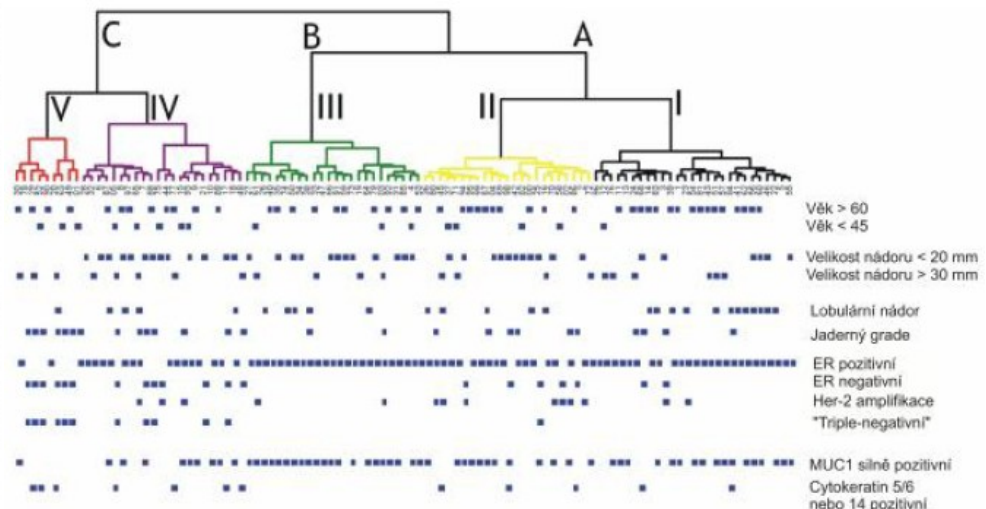
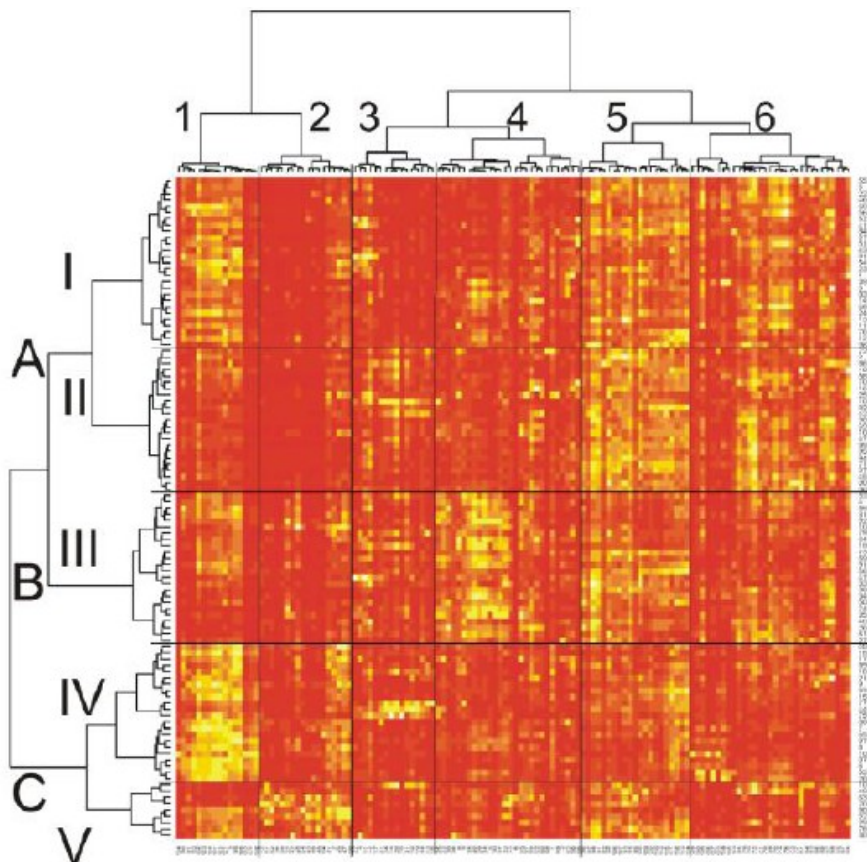


Rozdíly mezi metodami MALDI a SELDI

- 1) v prvotním zpracování samotného vzorku (inertní versus aktivní povrchy)
- 2) softwarové vyhodnocení získaných dat (hledání biomarkerů)



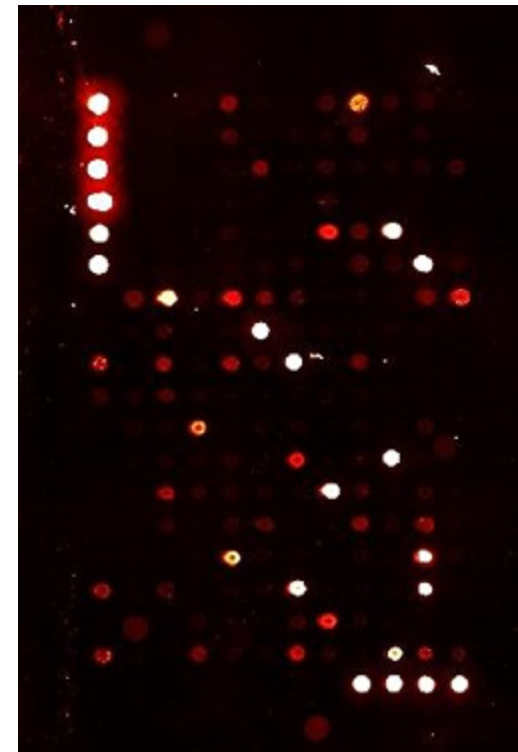
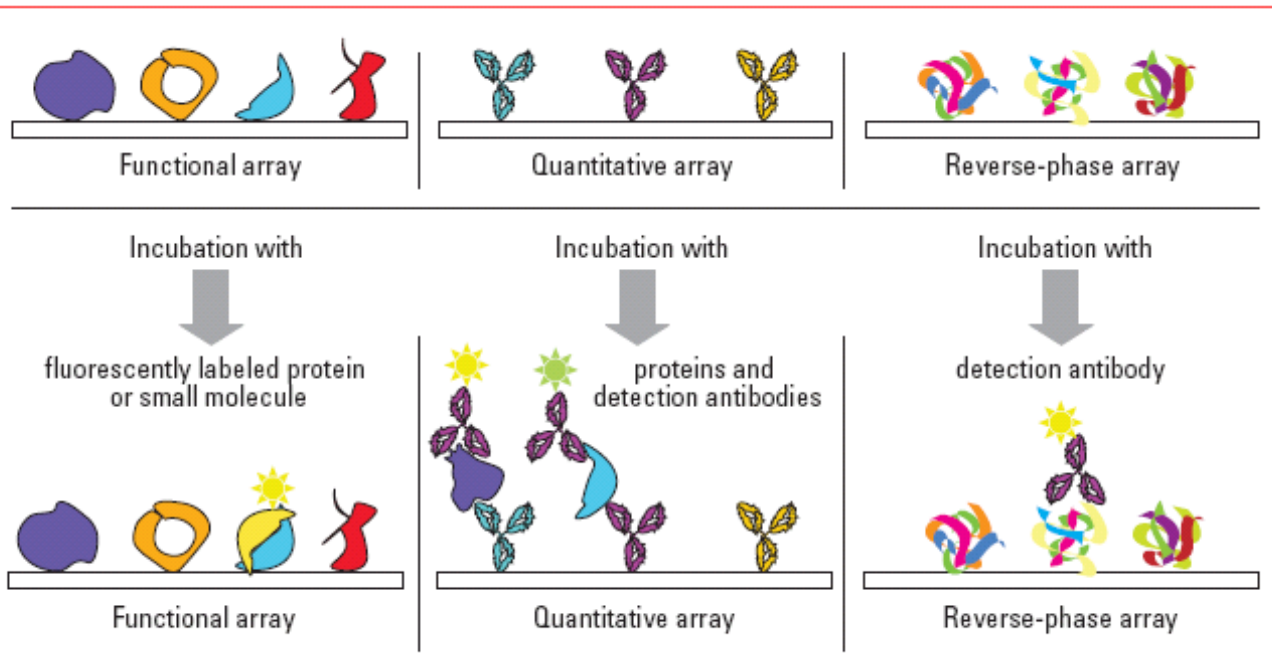
Proteinové profily získané metodou SELDI umožňují rozdělit pacientky s karcinomem prsu do skupin analogicky jako u DNA čipů



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)



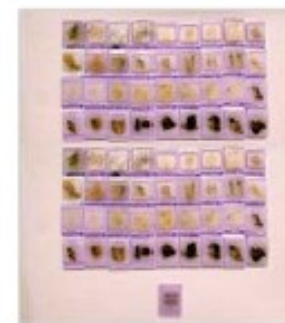
Tkáňové arrays (Tissue MicroArrays - TMA)



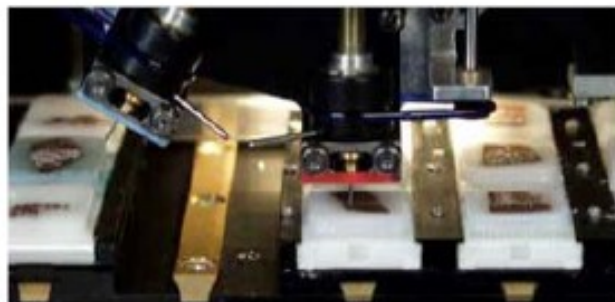
Collection of tissues



Annotation



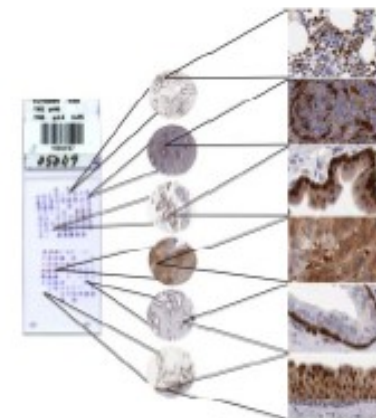
TMA design



TMA construction



TMA sectioning



Analysis

Take home

Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Genomová array CGH (aCGH)

SNP čipy

ChIP-on-chip technologie

Technologie čipů k detekci methylace CpG oblastí

Technologie exonových čipů

Proteomika

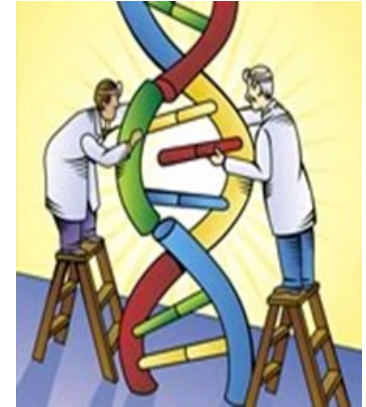
Obecné schéma klasického proteomického experimentu

Dvojměrná gelová elektroforéza (2D-ELFO)

Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry – MS, ISE, MALDI, SELDI, TOF, tandemová MS)

Proteinové arrays

Tkáňové arrays



Náplň příští přednášky

Molekulární epidemiologie – definice a vymezení oboru, identifikace molekulárních rizikových faktorů vzniku a rozvoje onemocnění, analýza vztahu molekulárních faktorů a vlivů prostředí na rozvoj nádorového onemocnění, význam molekulární epidemiologie u karcinomu plic a kolorektálního karcinomu

Molekulární farmakologie I – cílená léčba – vývoj nových léčiv = identifikace nových molekulárních cílů, vysokovýkonný screening, tkáňové kultury, transgenní zvířecí modely, poměr rizik a prospěchu, ekonomická a etická hlediska při výběru identifikovaných cílů a vývoji nových léčiv

Dotazy?

