



Laboratoř funkční genomiky a proteomiky
Národní centrum pro výzkum biomolekul
Přirodovědecká fakulta MU



středoevropský technologický institut
BRNO | ČESKÁ REPUBLIKA

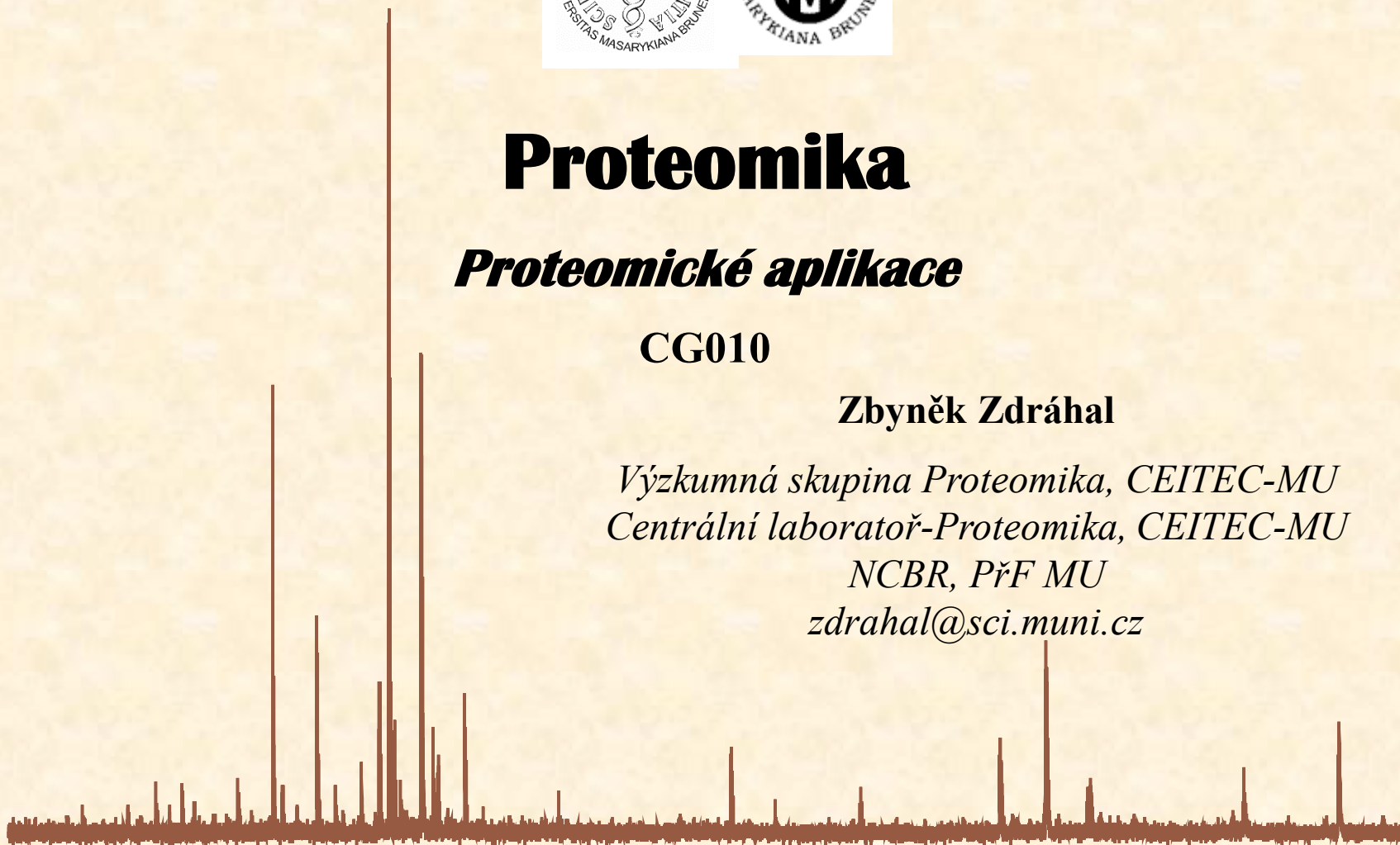
Proteomika

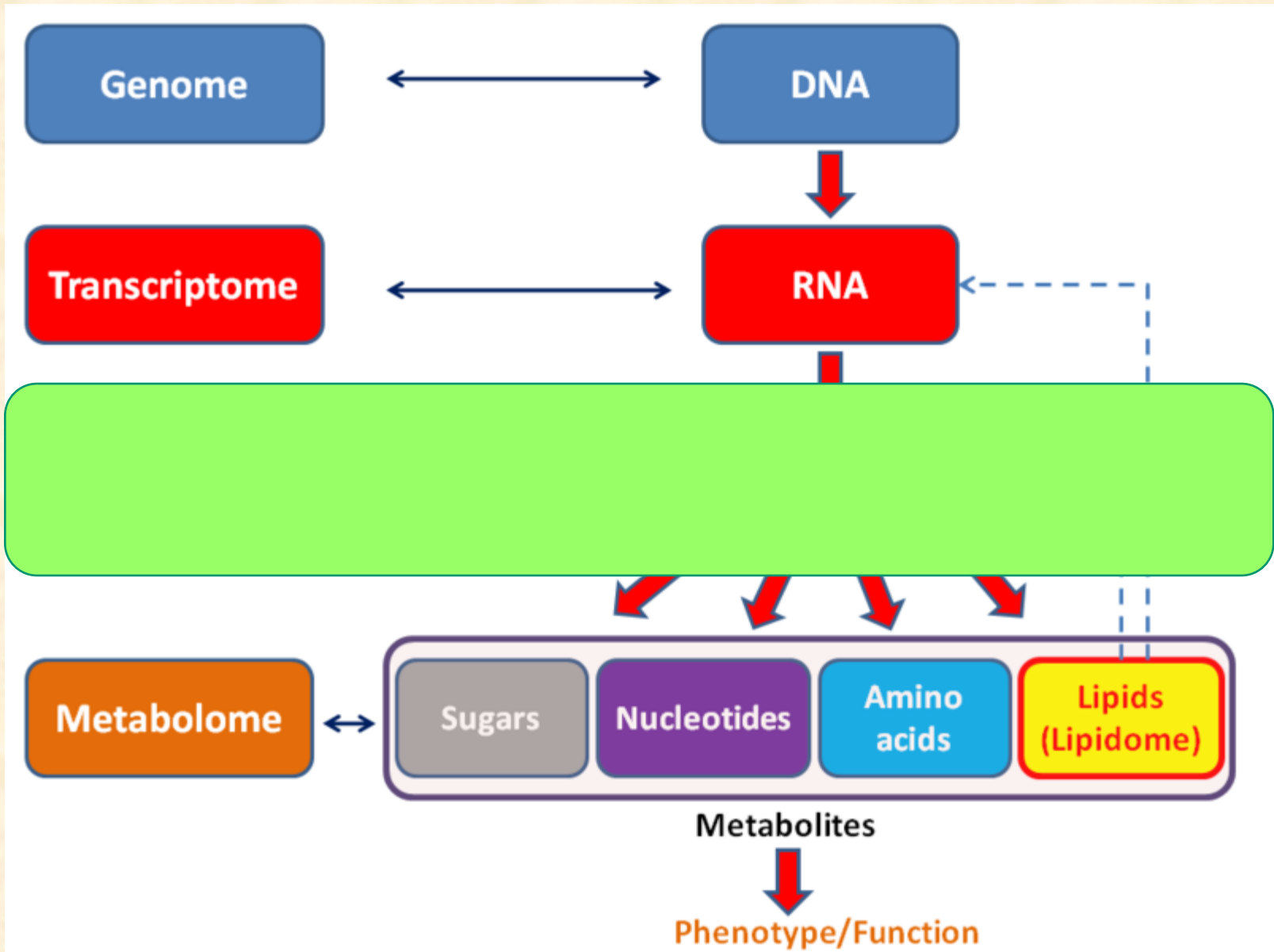
Proteomické aplikace

CG010

Zbyněk Zdráhal

Výzkumná skupina Proteomika, CEITEC-MU
Centrální laboratoř-Proteomika, CEITEC-MU
NCBR, PřF MU
zdrahal@sci.muni.cz

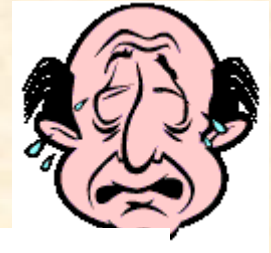




Proteomika - Proč?

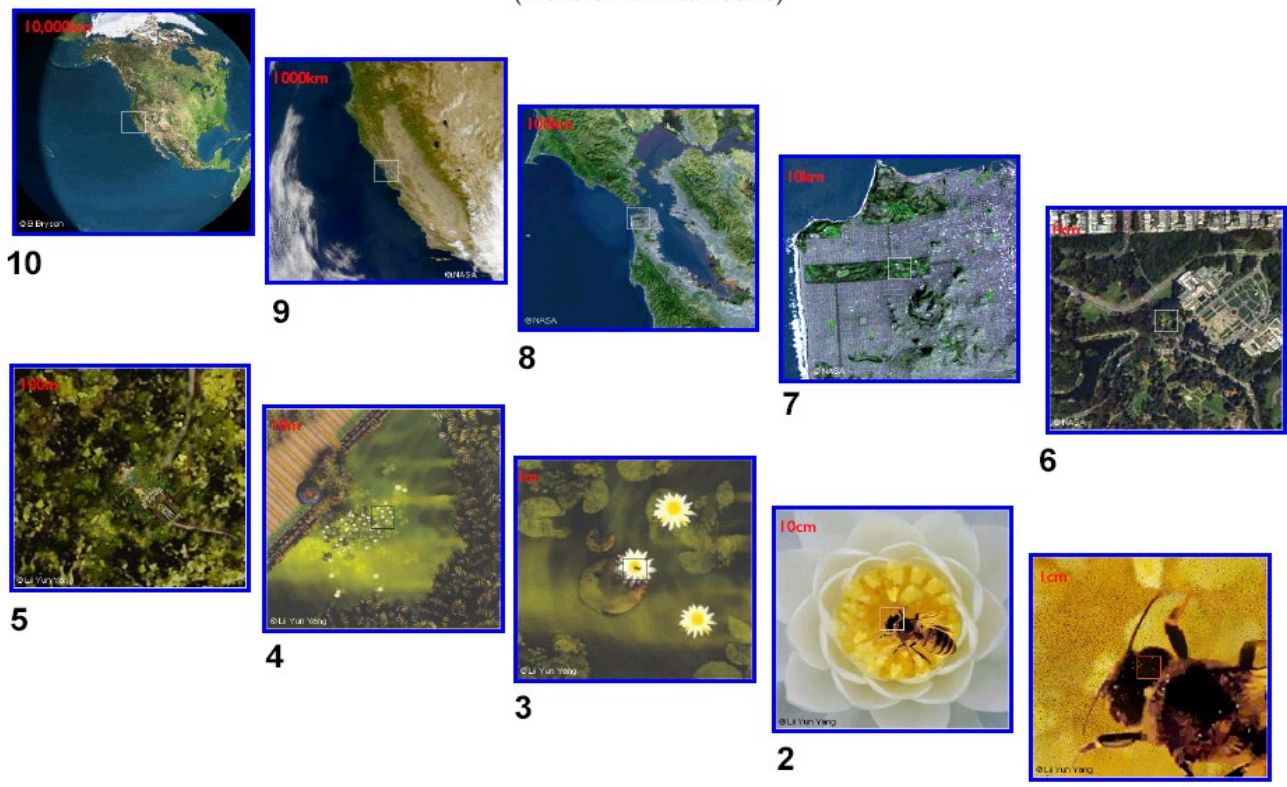
- z každého genu může vzniknout **několik proteinů**, resp. jejich forem, které **nelze indikovat na základě analýzy DNA resp. mRNA**
- **neexistuje přímá korelace** mezi obsahem mRNA a výsledným obsahem proteinů
- funkční význam proteinu závisí velmi často na jeho **interakci s jinými proteiny či DNA/RNA**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

Náročnost analýzy proteomu



- pro lids
- širo nut rea
- širo
- ana pro prot

10^{10} Really Is Wide Dynamic Range
(Here on a linear scale)



eoforms
(3), 186 (2013))

sch

Slide courtesy Bruno Domon, ETH Zurich



Přehled vybraných metod pro studium proteinů

Detekce/lokalizace proteinů

- Imunochemické metody (westernový přenos, ELISA)
- **Mikroskopické techniky**

Interakce proteinů

- Dvouhybridní systém (Y2H)
- Surface plasmon resonance
- **Mikroskopické techniky**

Struktura proteinů

- Cirkulární dichroismus
- Nukleární magnetická resonance
- Rentgenová krystalografie
- Kryoelektronová mikroskopie

Strukturní biologie

Jednotlivé proteiny

Charakterizace komplexních směsí proteinů

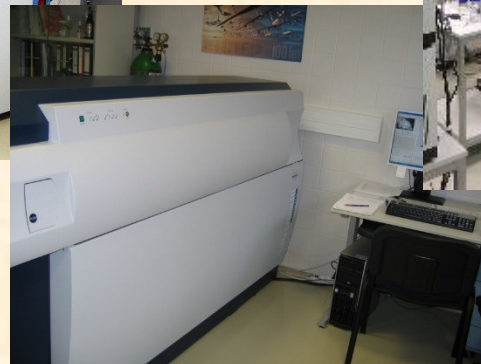
- **Hmotnostní spektrometrie**

včetně přípravy vzorku a separace

- Proteinové čipy

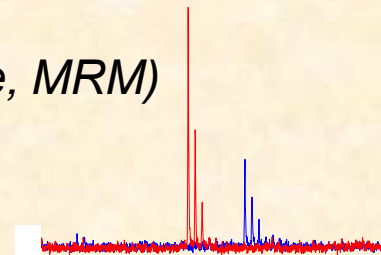
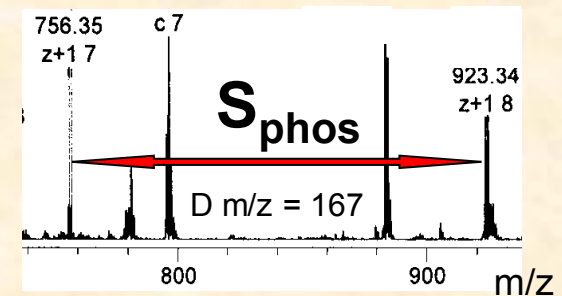
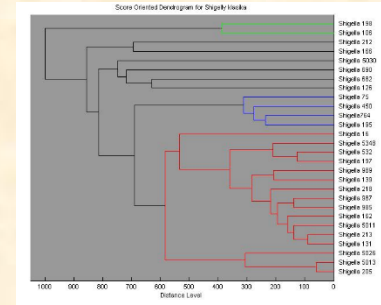
Proteomické aplikace

- **Hmotnostní spektrometrie (MS)**
*nejrozšířenější technika pro charakterizaci proteinů
a jejich modifikací (na základě primární struktury)*



Hmotnostní spektrometrie v proteomice

- **analýza intaktních molekul**
(MW, kontrola produktů reakce, MALDI-MS profilování)
- **identifikace proteinů**
(identifikace, proteinové komplexy, de novo sekvenování)
- **charakterizace proteinových modifikací**
(fosforylace, acetylace, ubikvitinace aj.)
- **kvantifikace proteinů**
(pomocí „izotopických“ značek , label-free, MRM)
- **charakterizace 3D struktury proteinů**
- **MALDI-MS zobrazování**



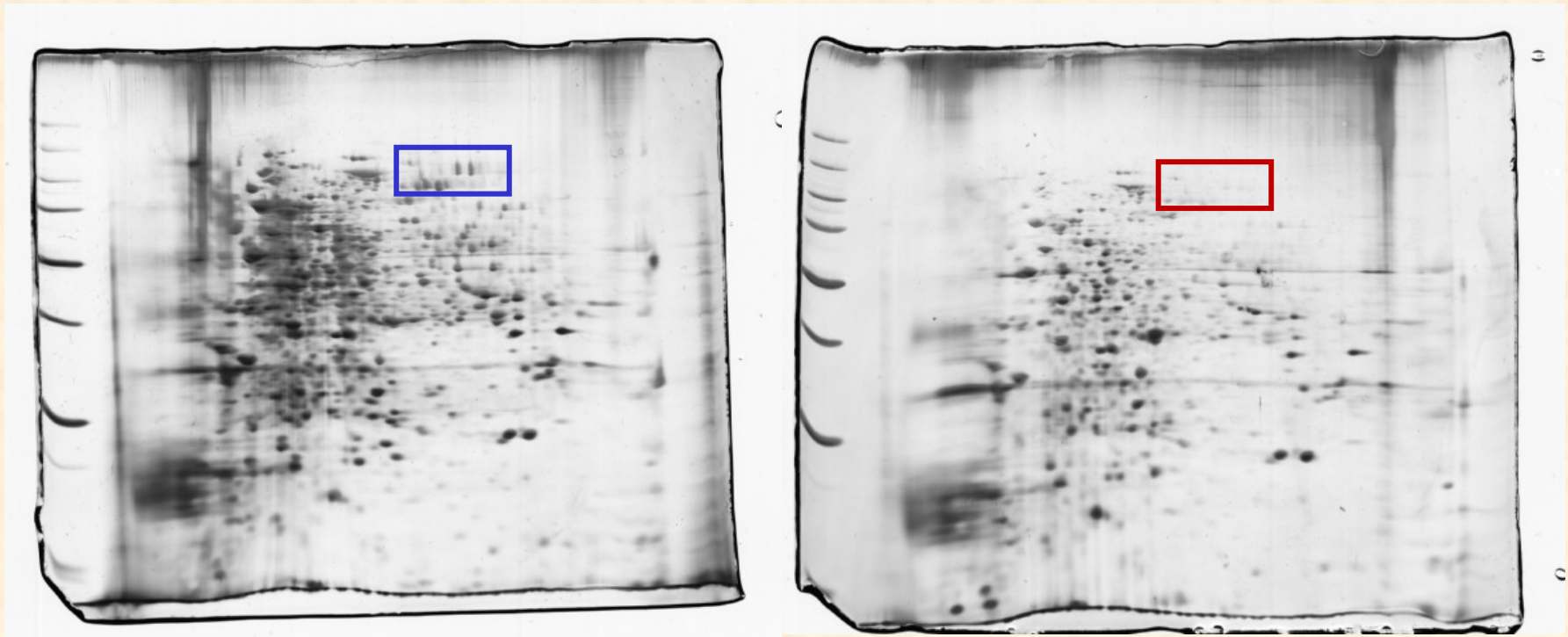
Diferenční (expresní) proteomika

Kvalitativní a kvantitativní srovnání proteomů

- určení změn v regulaci proteinů a jejich forem (PTMs), které nastaly v důsledku vnitřních či vnějších podnětů.

kontrola

stres

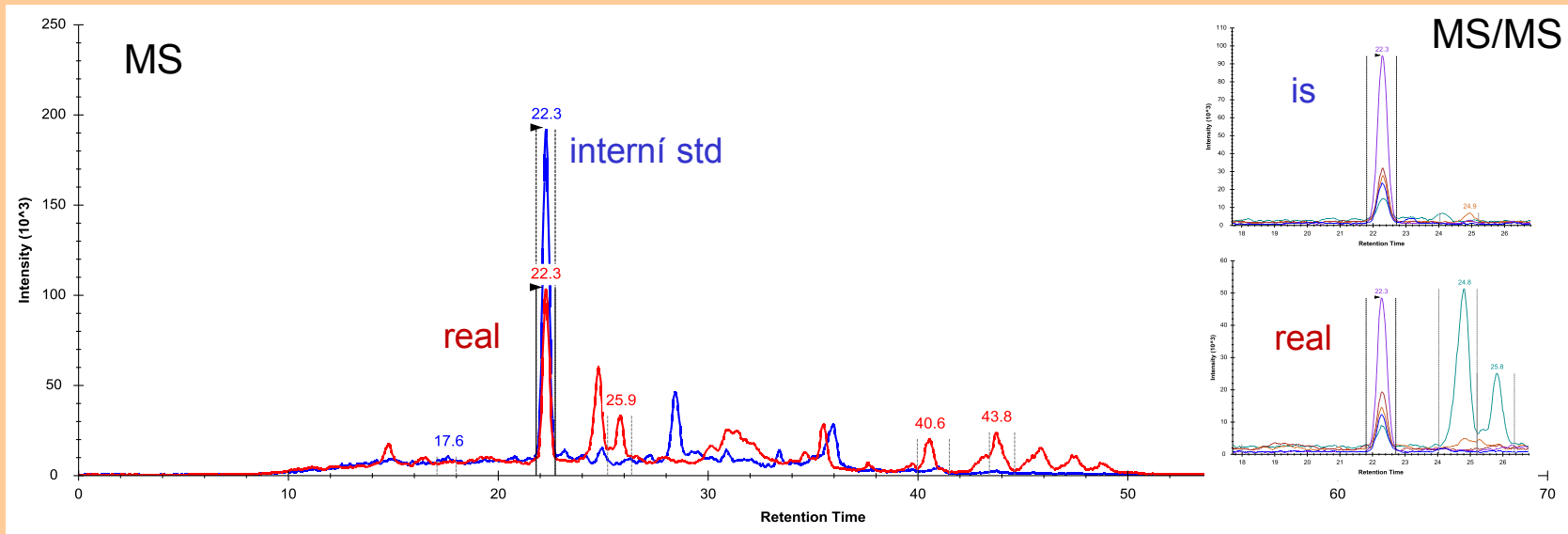


Rhodotorula glutinis

Cílená proteomika

Sledování kvantitativních změn **vybraných proteinů** (např. biomarkerů) ve vzorcích.

Stanovení enterotoxinu (*S. aureus*)

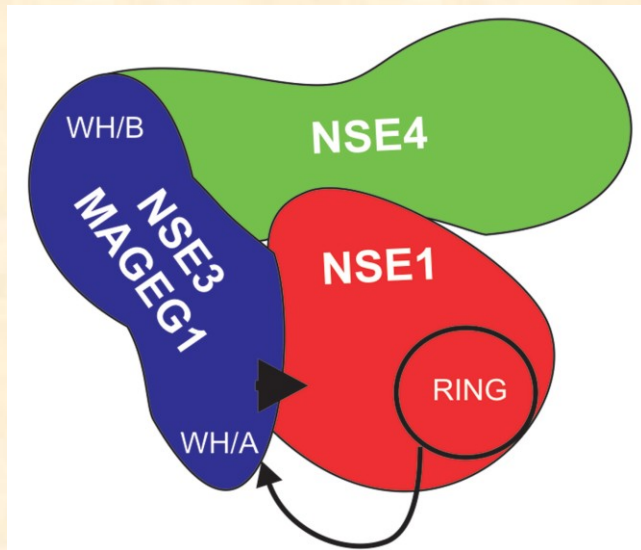


LC-MS/MS (MRM)

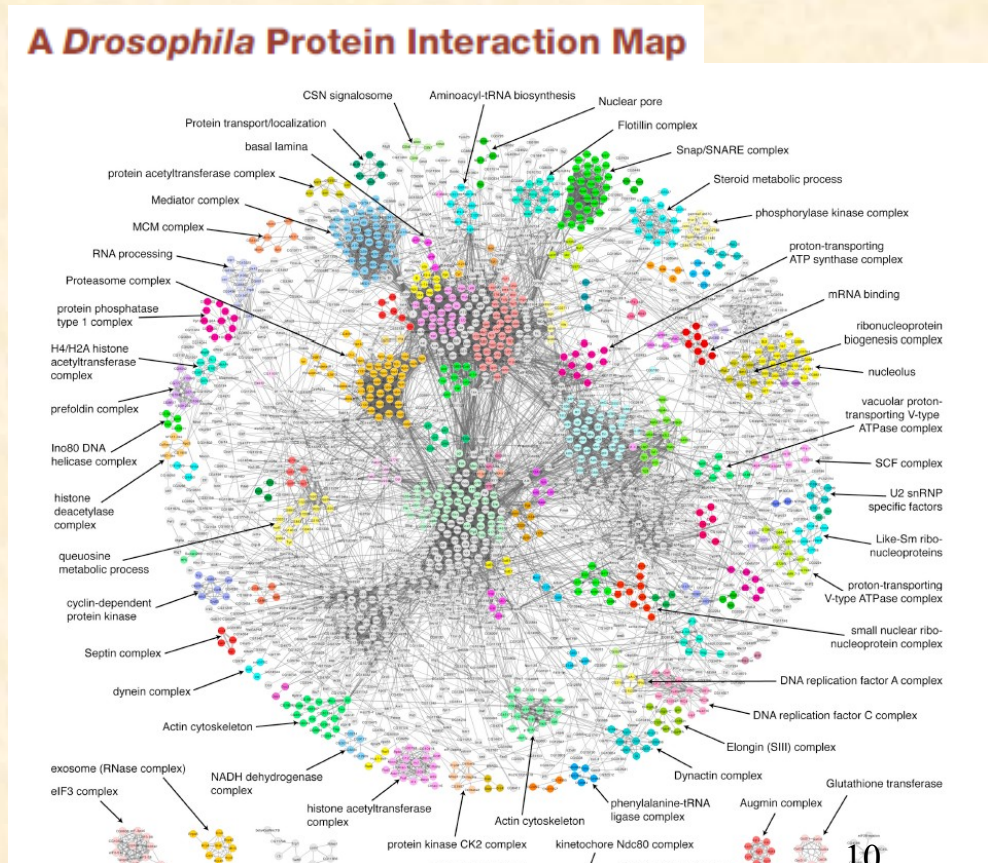
Funkční proteomika

Studium interakcí proteinů a jejich funkční význam.

- interakce mezi proteiny
- vznik a architektura proteinových komplexů
- interakce proteinů s jinými molekulami (RNA, DNA metabolismy aj.)



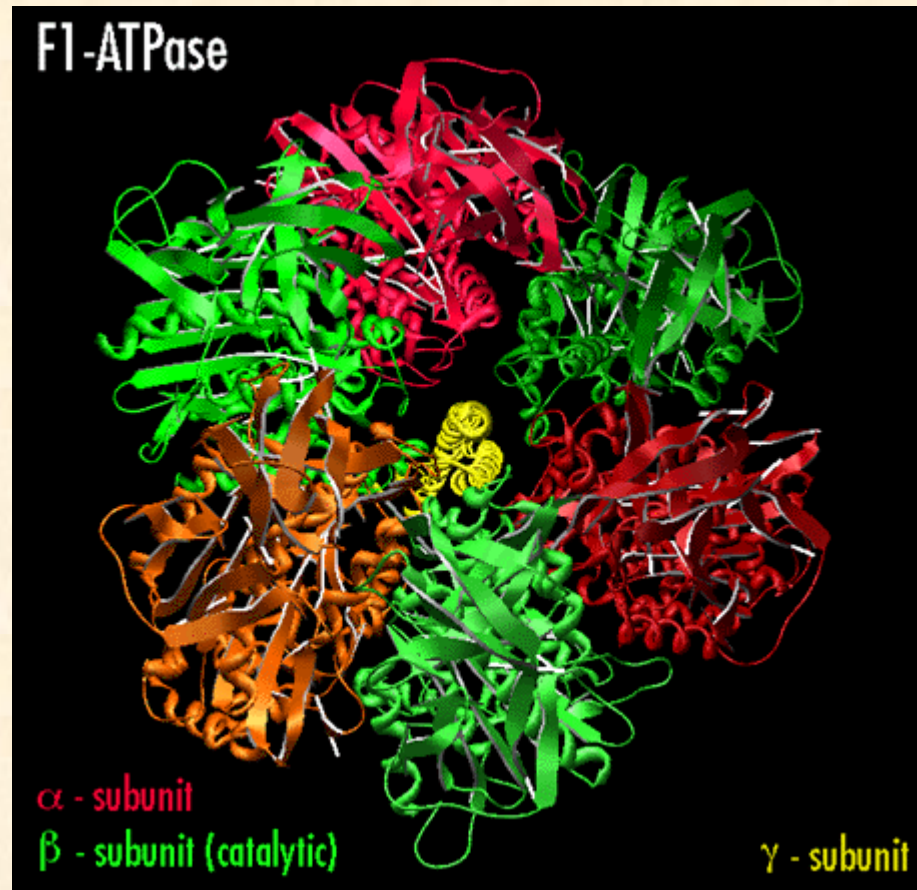
L. Kozakova et al., Cell Cycle, 14, 920-930 (2015)



K.G. Guruharsha et al., Cell, 147, 690-703 (2011)

Strukturní proteomika

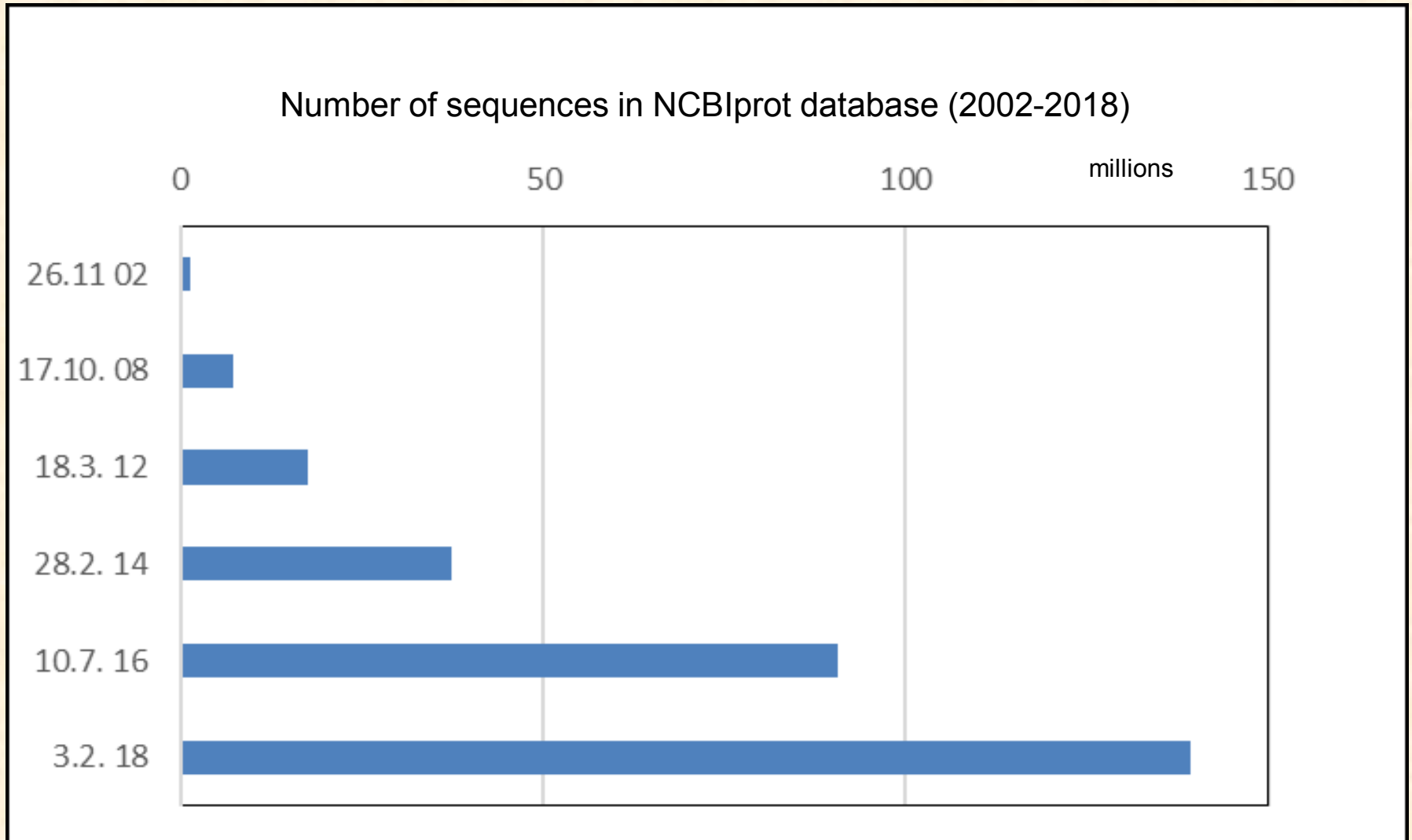
Studium vyšších úrovní proteinové struktury (terciární, kvarterní) a vztahu struktury k funkci proteinu.



Strukturu formují různé typy vazeb – iontové interakce, vodíkové můstky, van der Waals síly nebo disulfidické můstky.

Increase in knowledge of genomes

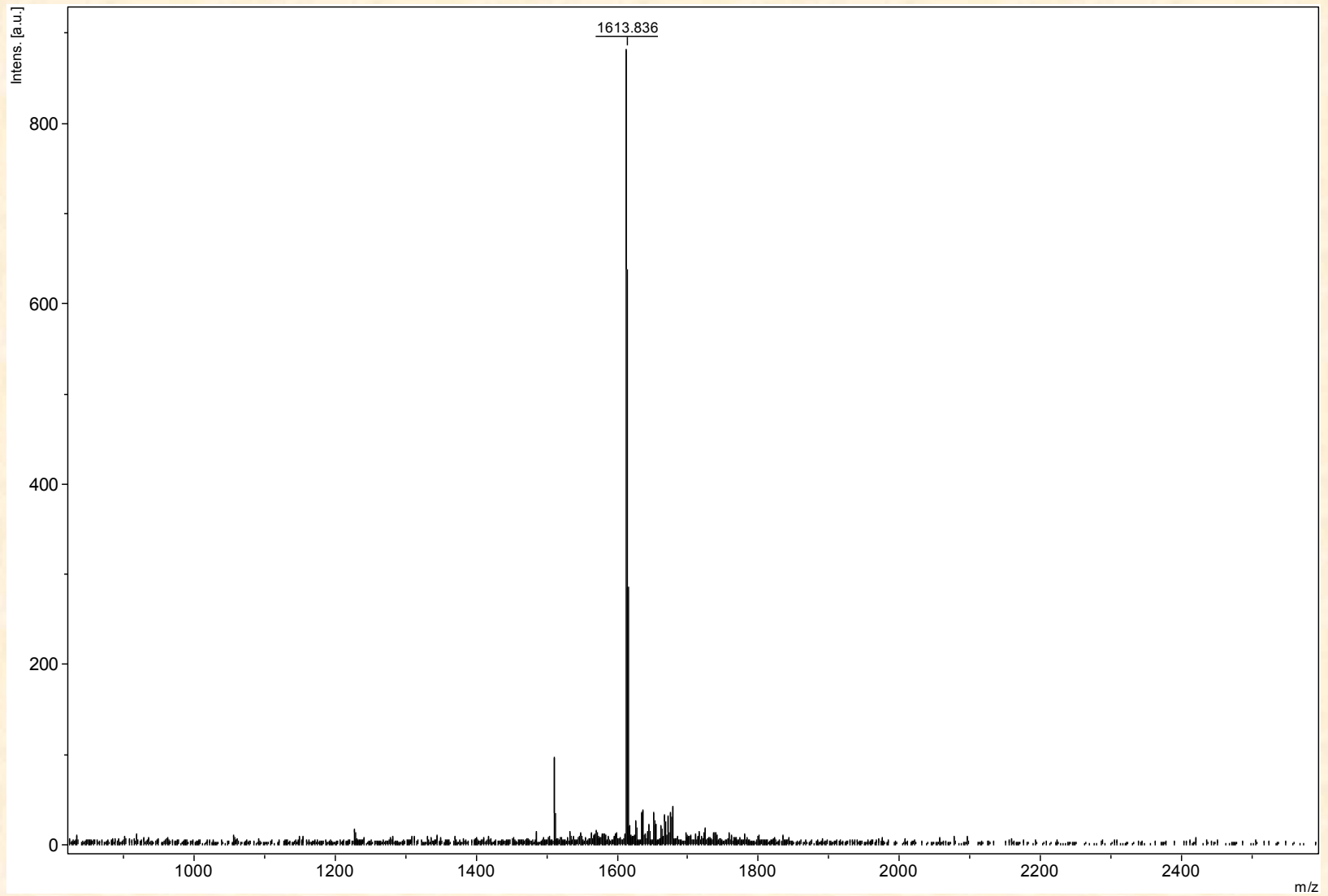
protein characterization by MS is in principle based on knowledge of primary sequence

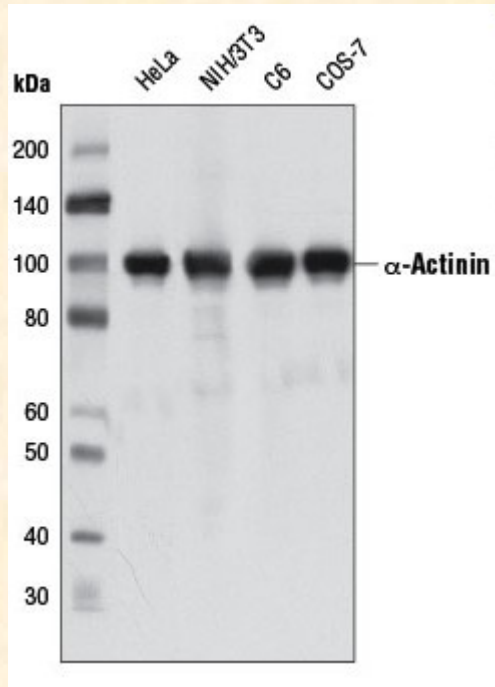


ZVÍKOV



Kontrola produktů syntézy

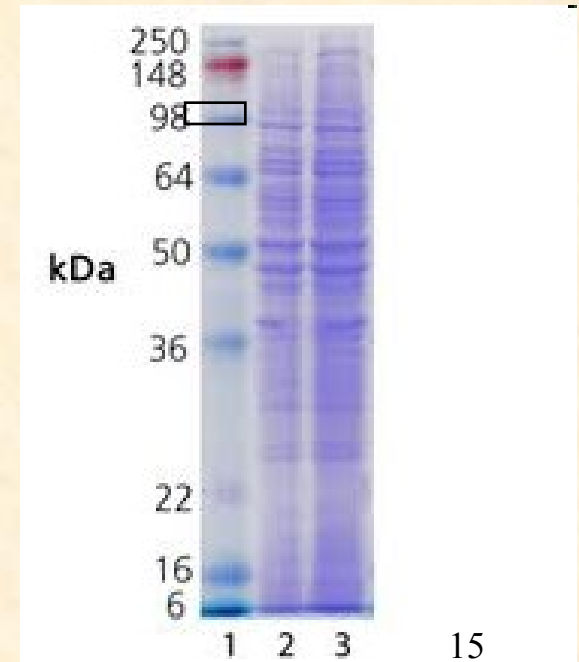




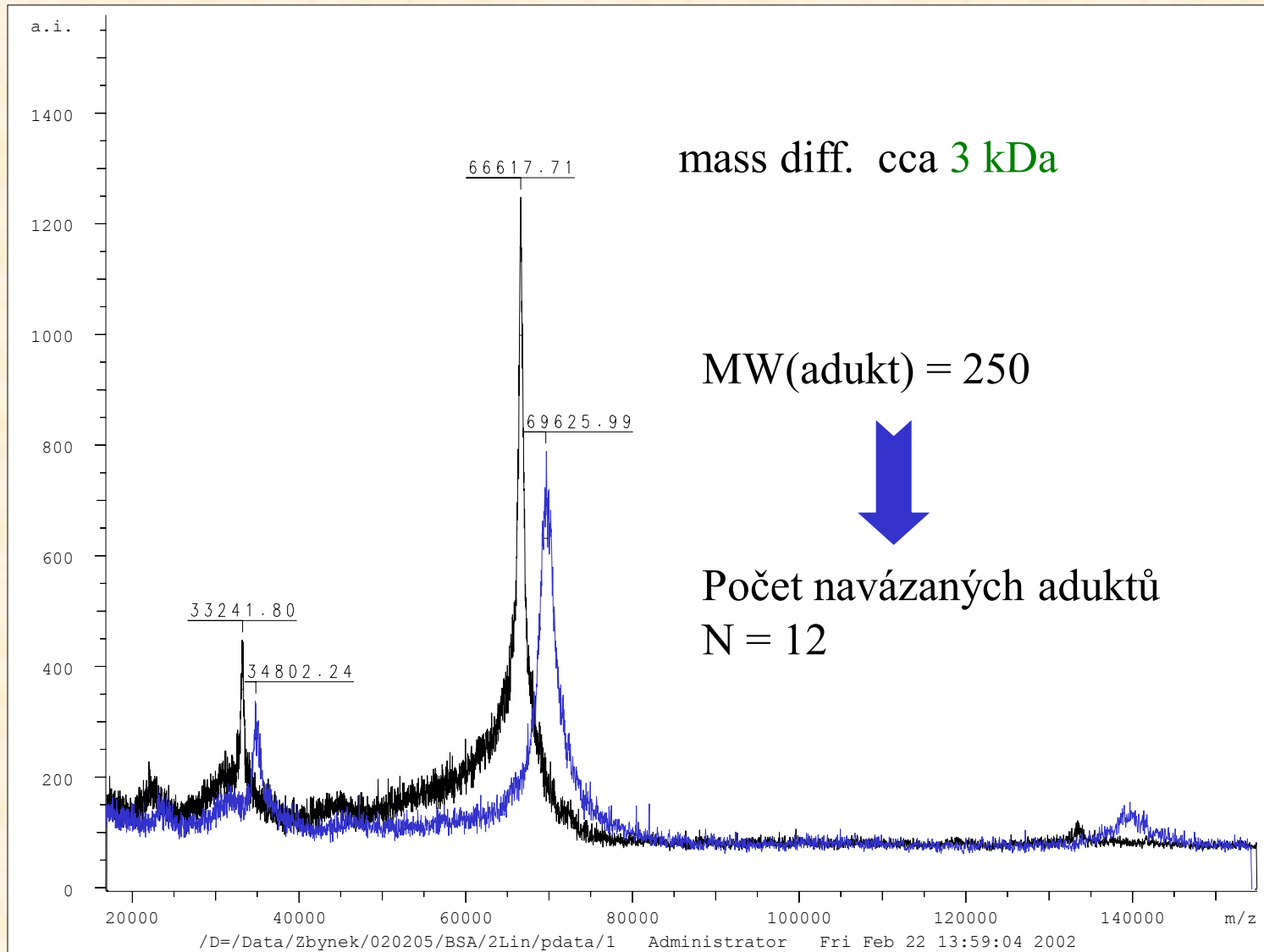
>gi|3157976|gb|AAC17470.1| alpha actinin [Homo sapiens]
 MVDYHAANQSYQYGPSSAAMAWRRGSMGDYMAQEDDWRDLLLDPAWEKQQRKTFTAWSNSHLRKAGTQI
 ENIDEDFRDGLKMLLLEVISGERLPKPERGKMRVHKINNVNKALDFIASKGIKLDHFHRAEEIVDGNAMK
 TLGMIWTIILRFAIQDISVEETSAKEGLLLWCQRKTAPYKQNVVQNFHISWKDGLAFNALIHRHRPELIE
 YDKLRKDDPVTNLNNAFEVAEKYLDIPKMLDAEDIVNTARPDEKAIMTYVSSFYHAFSGAQKAETETAAN
 RICKVLAVNQENCSTSMEDYEKLASDLEWIRRTIPWLEDRVPQKTIQEMQQKLEDFRDYRRVHKPPKVVQ
 EKCQLEINFNSVQTKLRLSNRPAFMPSEGMVSDINNGWQHLEQAQEKGYEEWLLNEIRRLERLDHLAEKF
 RQKASIHAEAWTDGKEAMLKHRDYETATLSDIKALIRKHEAFESDLAAHQDRVEQIAASAQELNELDYYDS
 HNVNTRCQKICDQWDALGSLTHSRREALEKTEKQLEAII DQLHLEYAKPAAPFNWMESEMEDLQDMFIV
 HTIEEIEGLISAHQDFKSTLPDADREREAILHPQGGQRIAESNHIKLSGSNPYTTVTPQIINSKWEKVQQ
 LVPKRDHALLEEQSKQQQSNEHLRRQFASQANVVGPIQTKMEEIAISIEMNGTLEDQLSHLKQYERSIV
 DYKPNLDLLEQQHQLIQEALIFDNKHTNYTMEHIRVWGWEQLLTTIARTINEVENQILTRDAKGISQEQMQ
 EFRASFNHFDDKHGGALGRGVQGLPHQPGLRRGERPAGEAEFNRIMSLVDPNHSGLVTFQAFIDFMSRET
 TDTDTADQVITSFKVLGDKNFITAEELRRELPPDQAEYCIARMAPYQGPDPGVRGALDYKSFSTALYGES
 DL

jistota identifikace
 ~ **citlivost**

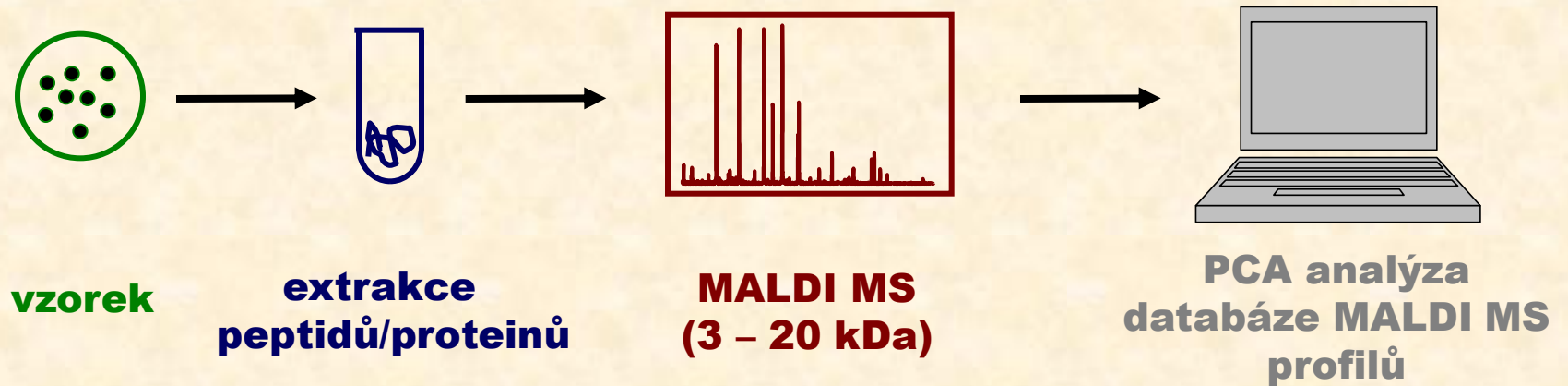
instrumentální náročnost



Kontrola výsledku reakce

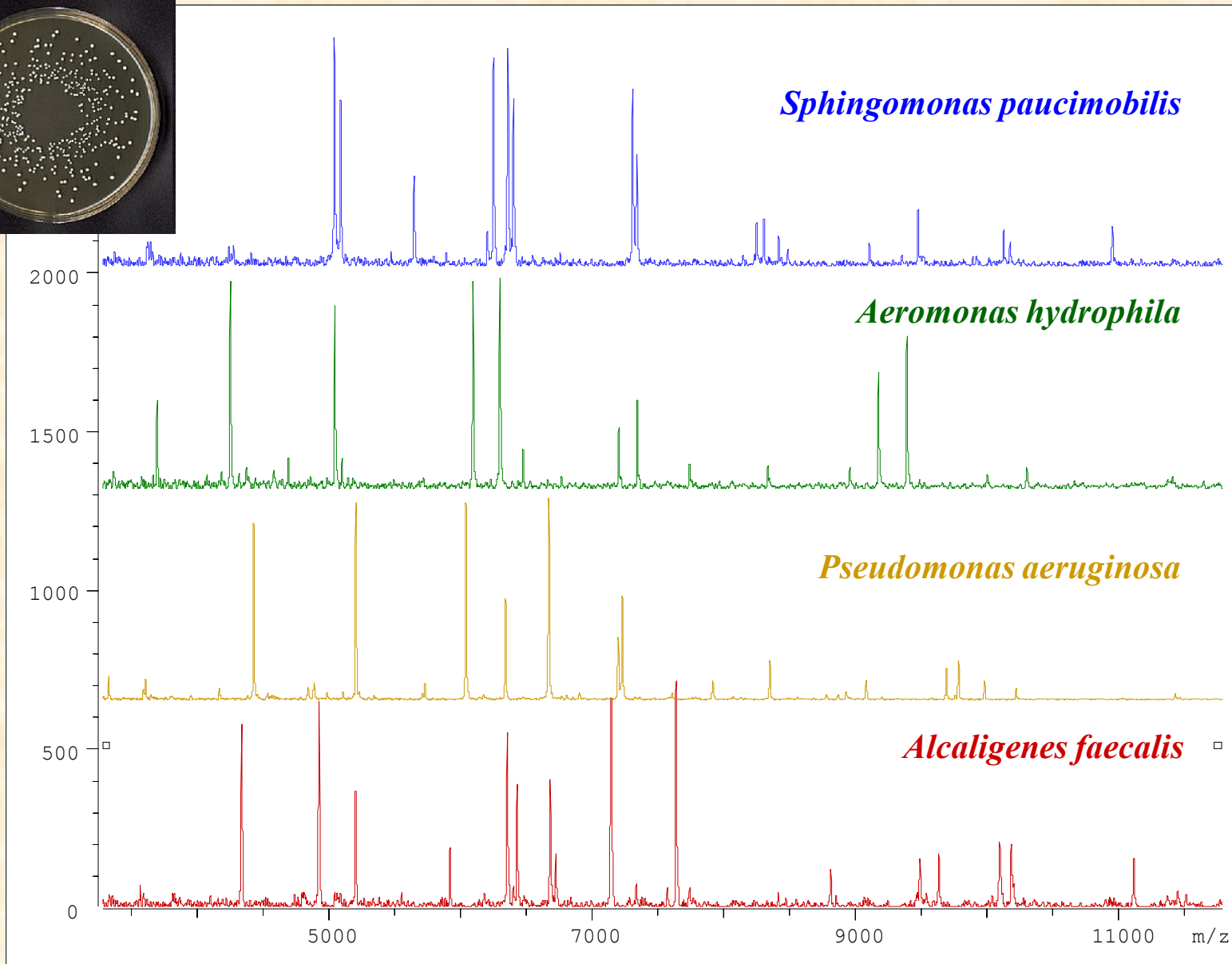


MALDI-MS profilování



- **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

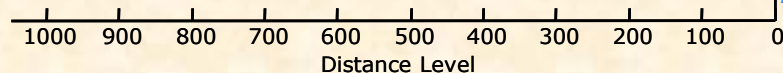
identifikace na základě srovnání naměřeného profilu s profilem z databáze

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

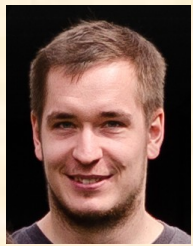
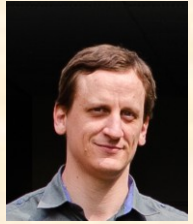


MALDI-MS profiling of spider venoms

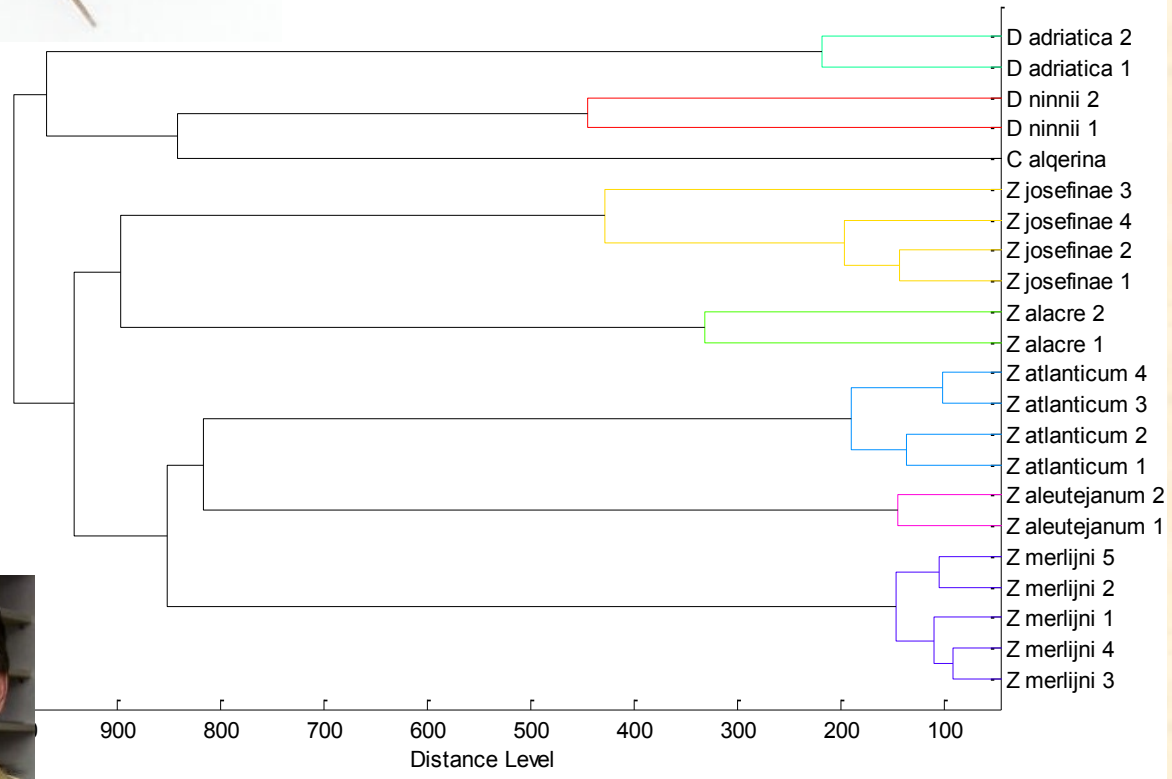
- evolution of food specialisation in spiders
- species adaptations
- ant-eating spiders



Z. merlijni



MSP Dendrogram



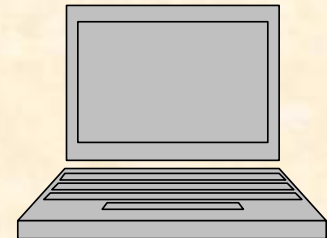
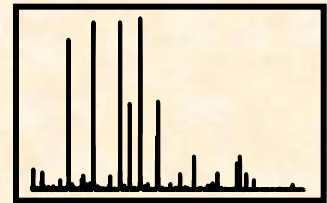
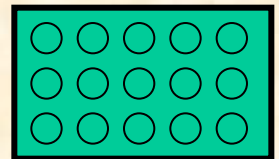
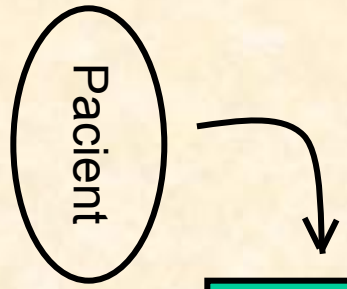
cooperation with prof. Pekar, FS MU

Pekár S. et al., J. Anim. Ecol., 81 (4), 838-848 (2012)

Bočánek O. et al., Toxicon, 133, 18-25 (2017)

Pekár S. et al. Mol. Ecol., 27 (4), 1053-1064 (2018)

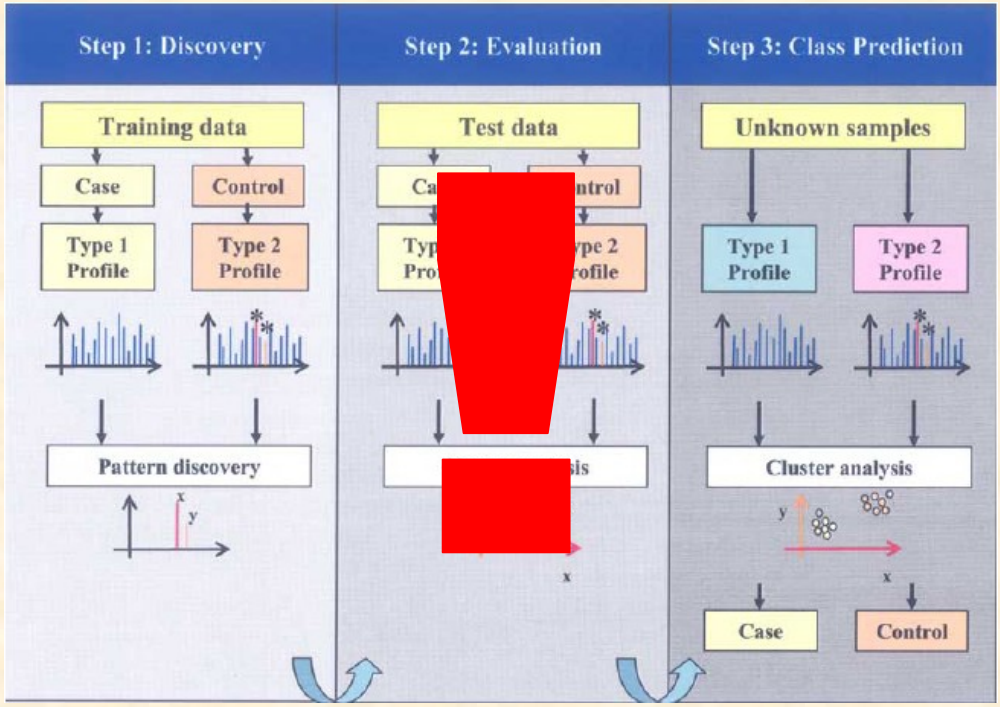
Analýza profilů –včasná detekce chorob (peptide profiling, pattern profiling)

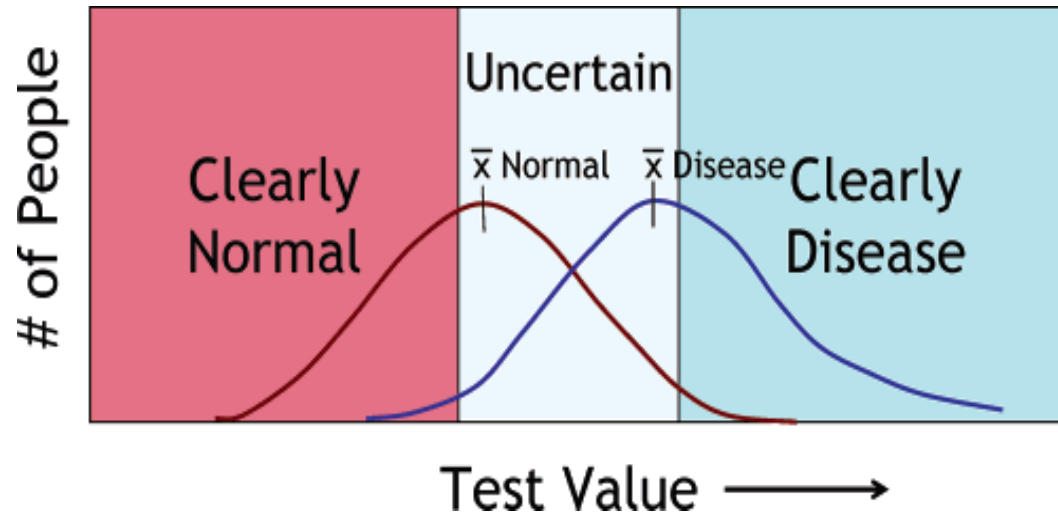


**žádná či minimální
úprava vzorku**
*(ionex, IMAC, afinitní
sorberent)*

MALDI MS, SELDI MS
(3 – 20 kDa)

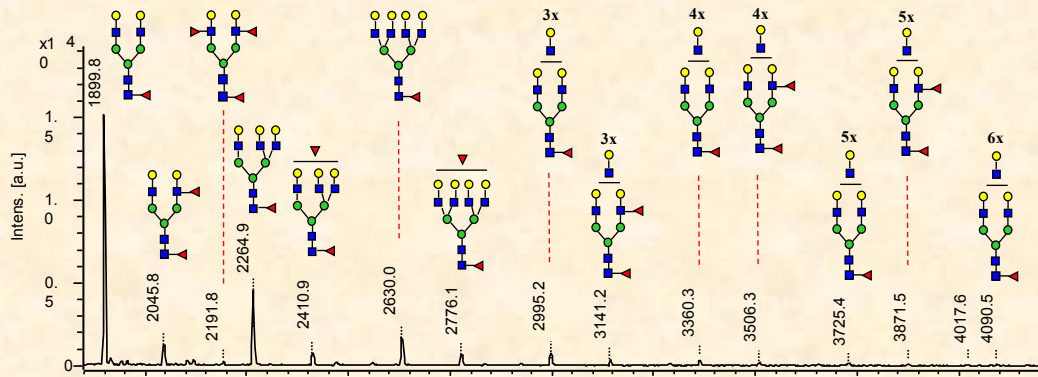
klastrová analýza



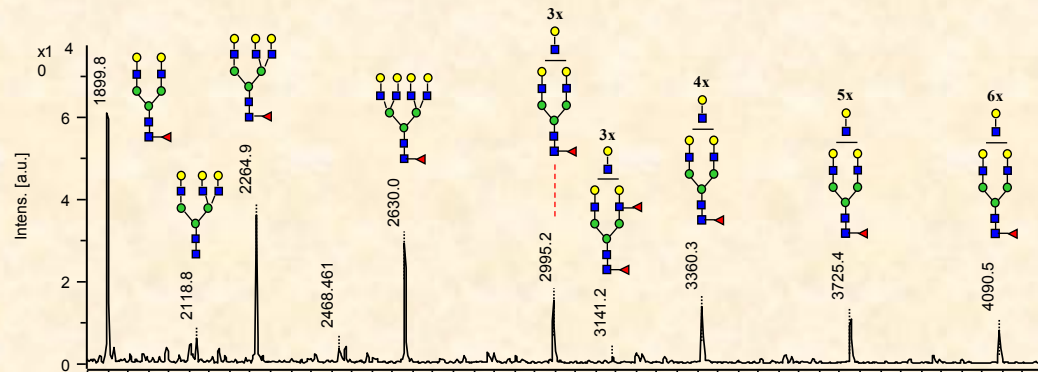


J. LaBaer et al., J. Proteome Res., 4 (4) 1053-1059 (2005).

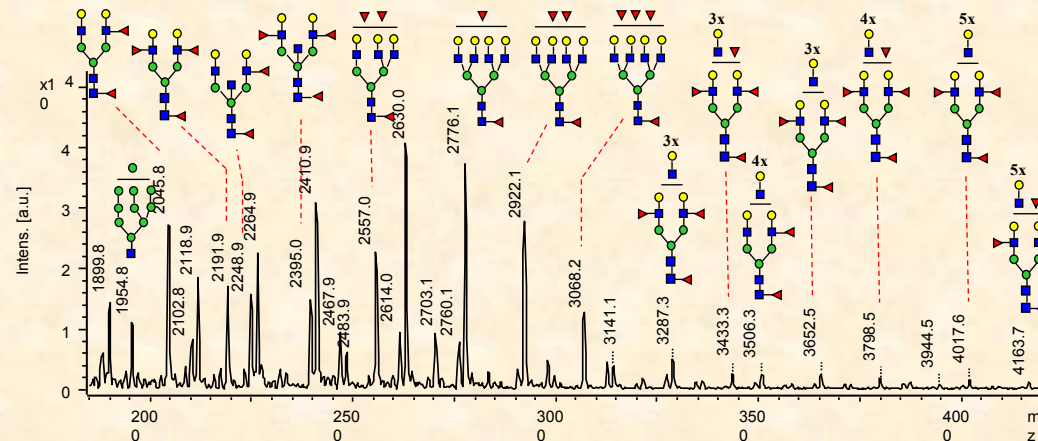
Glycan profiling and structural analysis of glycans



NSCLC - Bronchoalveolar Carcinoma



Bronchoalveolar Adenocarcinoma



Large Cell Carcinoma

MALDI-TOF-MS spectra of N-glycans after desialylation

● Man; ● Gal; ■ GlcNAc; ▼ Fuc

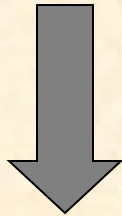
Lattová E., J. Proteome Res., 15 (8), 2777-2786 (2016)

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
MS/Protein arrays

KOST u SOBOTKY



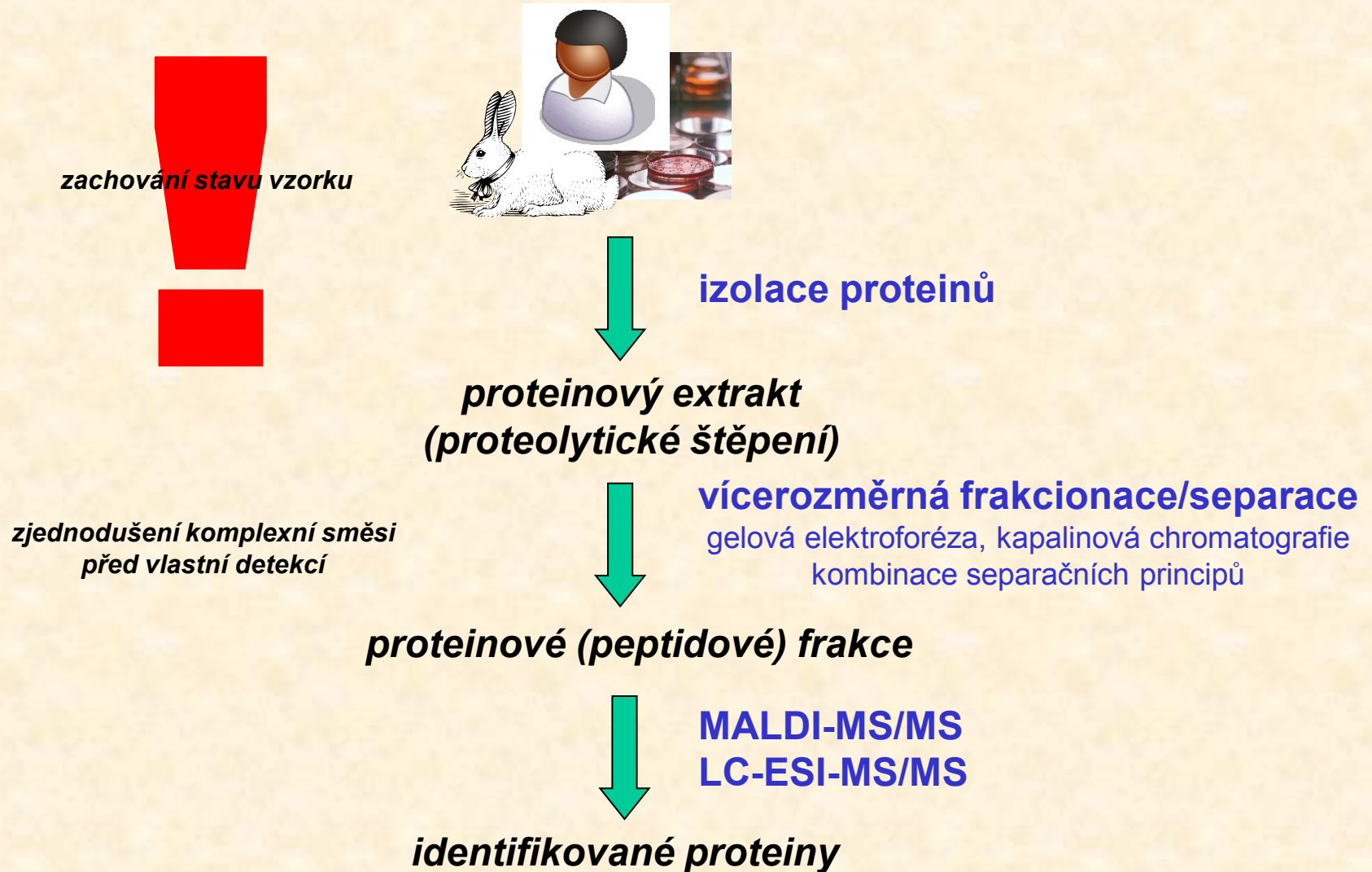
© Alka Č. Budějovic



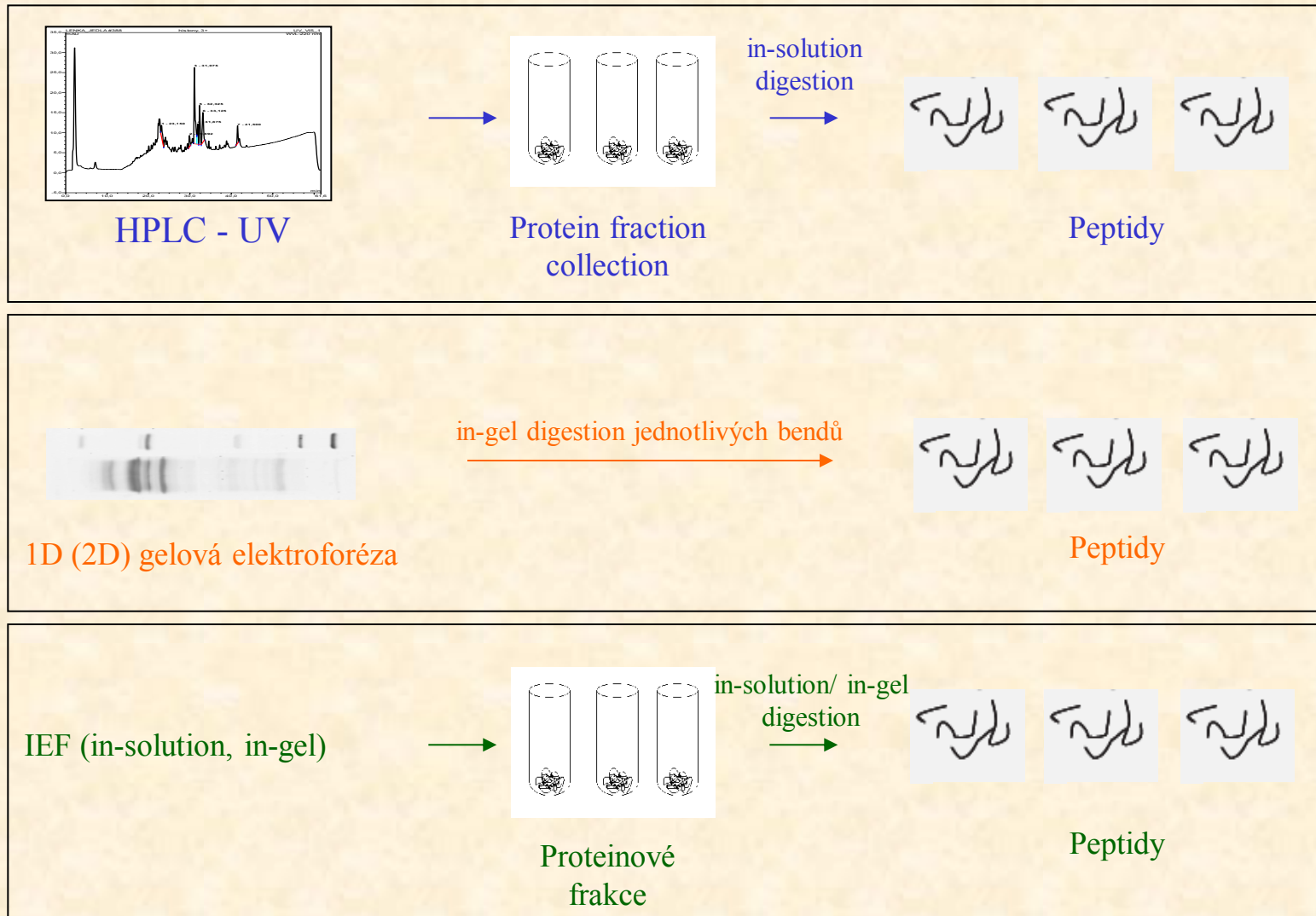
**Proteomické aplikace využívající „pouze“
identifikace proteinů**

Obecné schéma proteomického experimentu

Analýza komplexních směsí

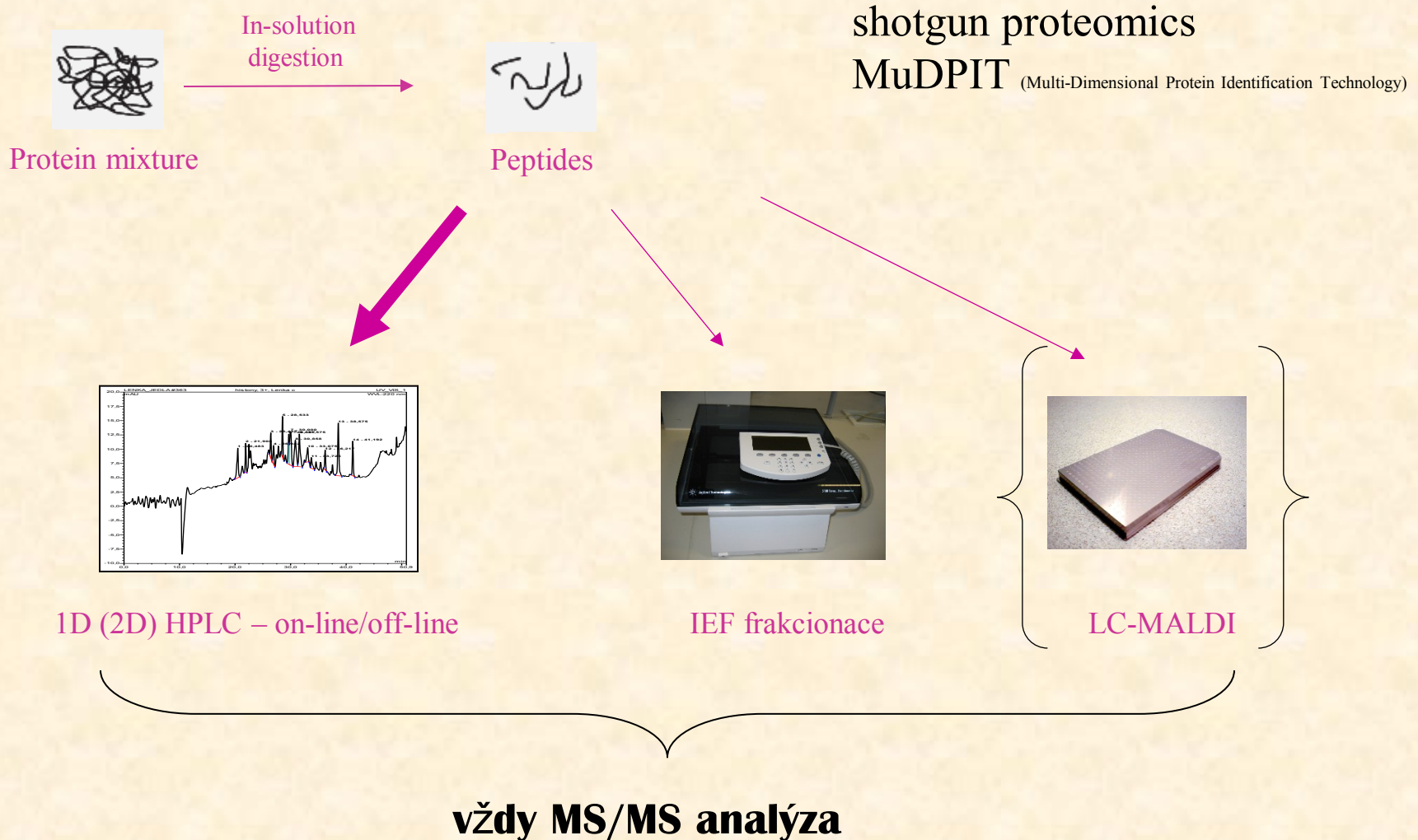


Separace proteinových izolátů na úrovni intaktních proteinů



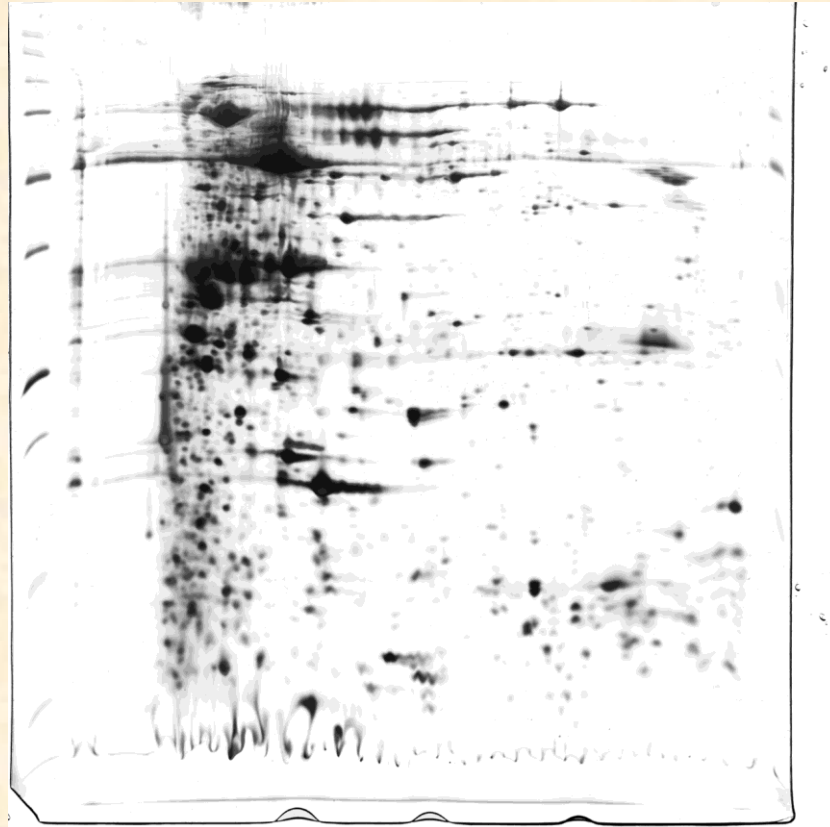
MS analýza

Separace proteinových izolátů na úrovni peptidů



Charakterizace proteomu

identifikace proteinů ve spotech, MS/MS techniky

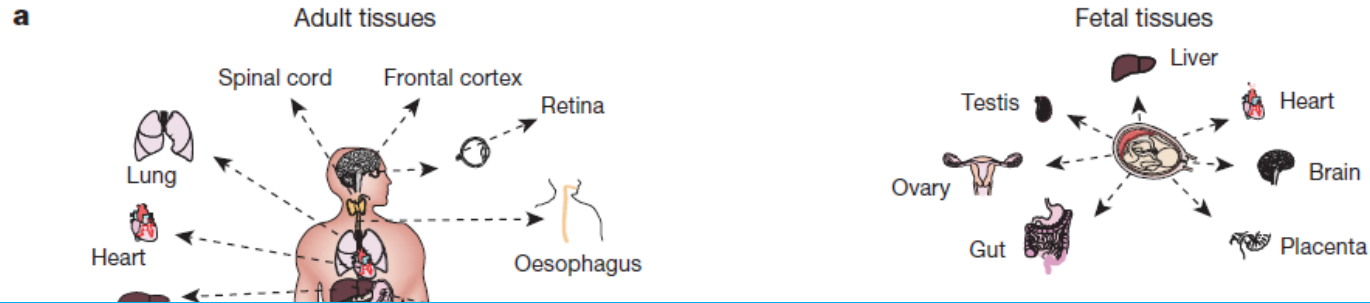


proteom stafylokokového fága 812, spolupráce s prof. Doškářem (ÚEB PřF MU)

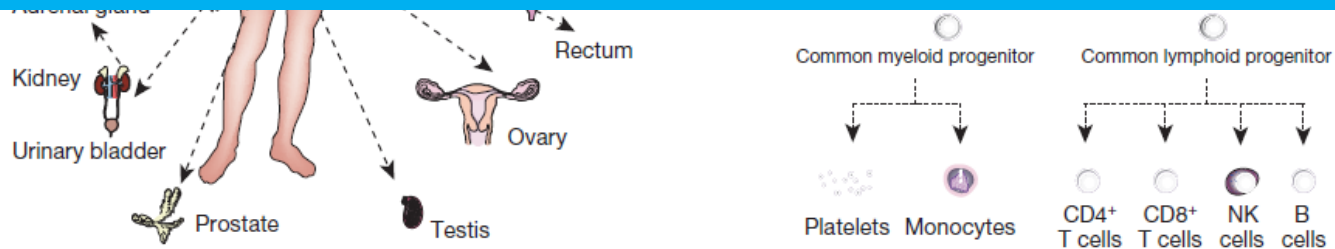
Eyer L. et al., Proteomics, 7 (1), 64-72 (2007)

A draft map of the human proteome

Min-Sik Kim et al., Nature 509, 575-581 doi:10.1038/nature13302



293 000 non redundant peptides corresponding to proteins encoded by 17294 genes



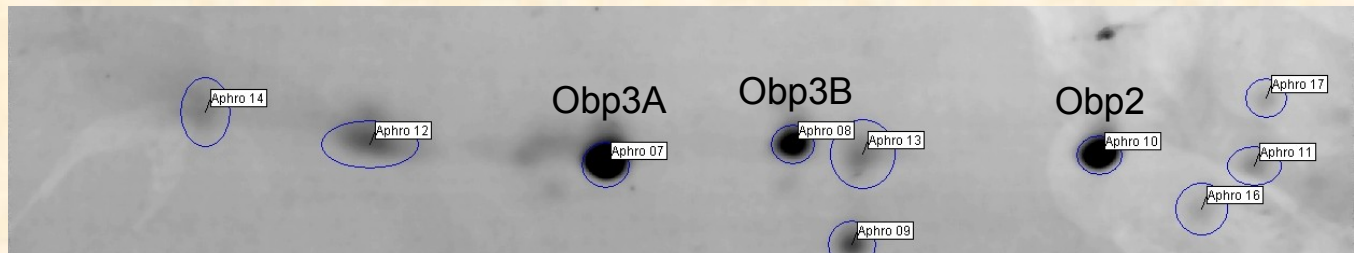
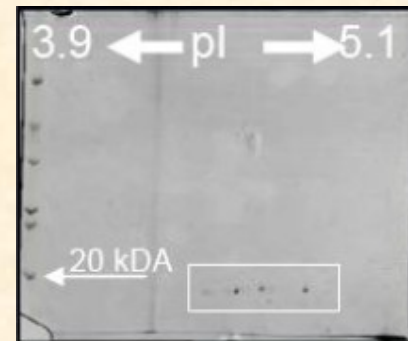
Ověření sekvence a určení izoform OBP proteinů



Myodes glareolus

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

- Ⓢ není znám genom
- Ⓢ nejsou protilátky

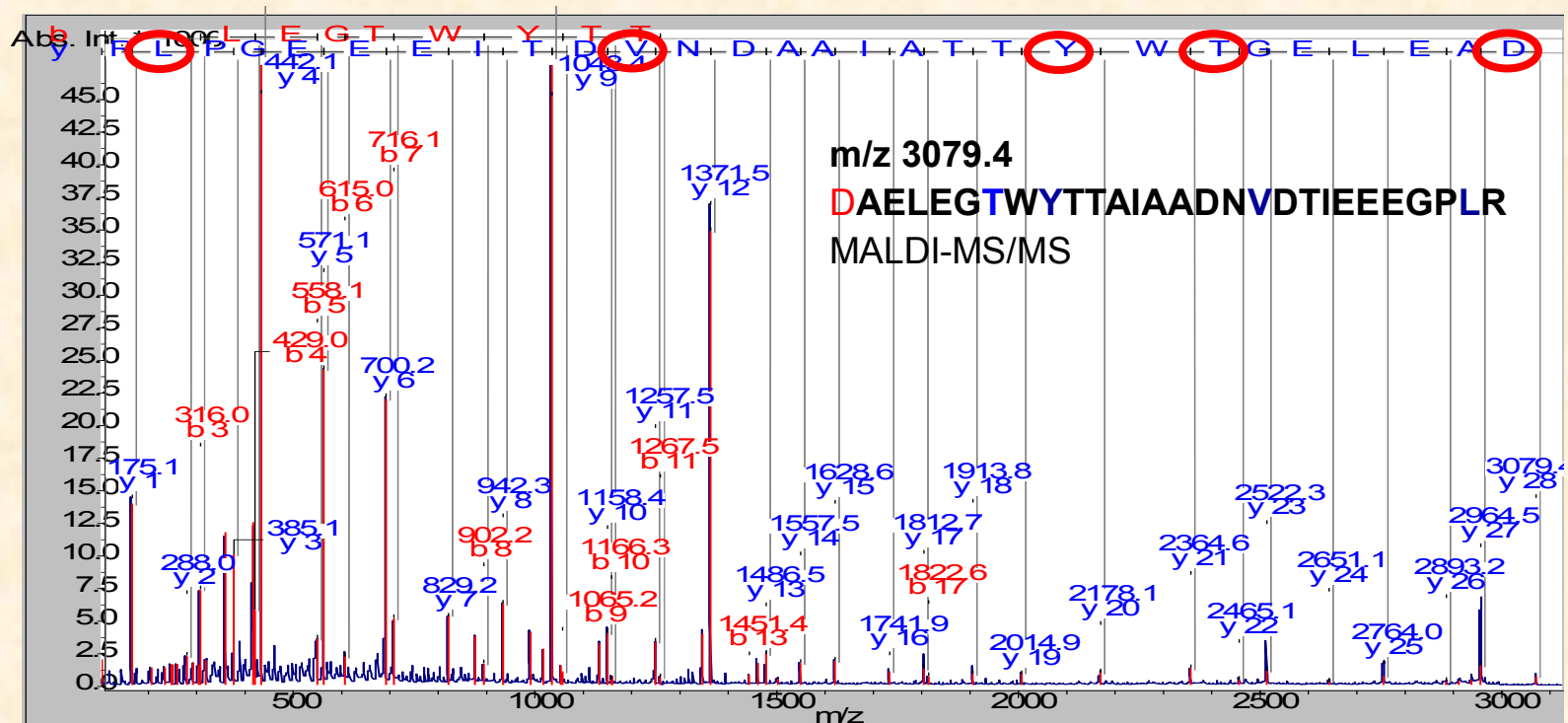


Ověření sekvence a určení izoform OBP proteinů MALDI-MS/MS a LC-MS/MS manuální interpretace spekter

původní sekvence - QAELEGKWVTTAIAADNIDTIEEEGPMR (OBP3)

DAELEG**TWY**TTAIAAD**NVD**TIEEE**G**PLR

HAELEG**TWY**TTAIAAD**NVD**TIEEE**G**PLR

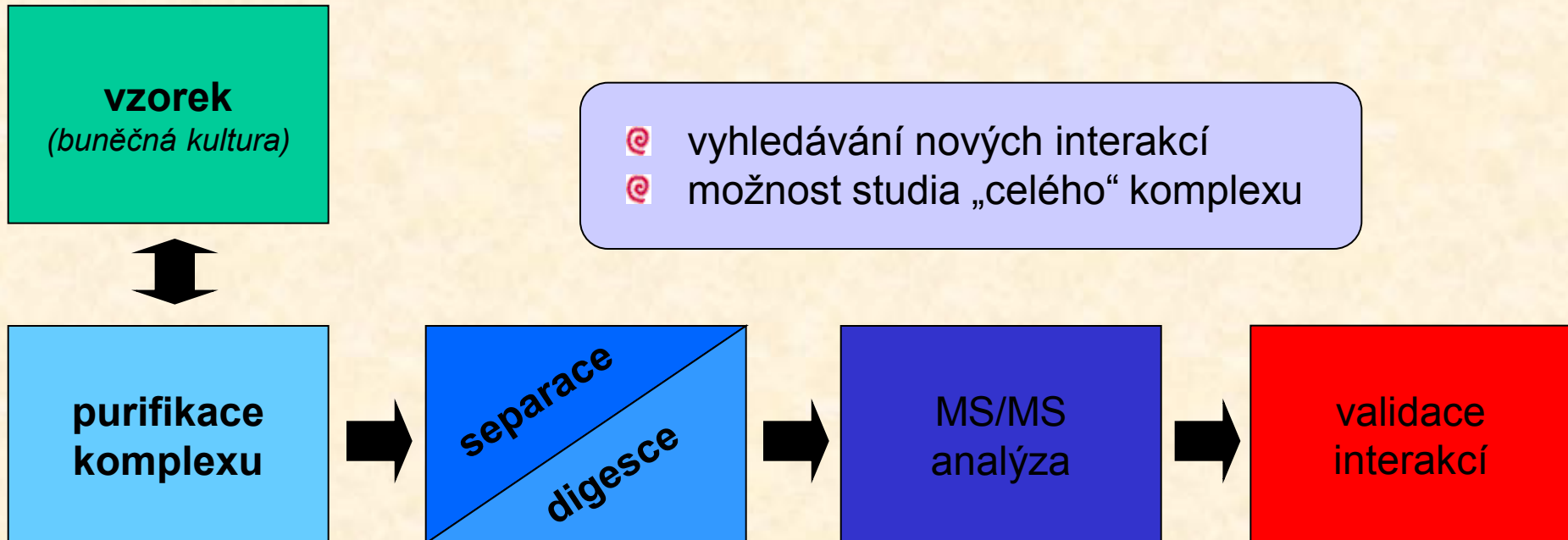


Charakterizace proteinových komplexů

funkční proteomika

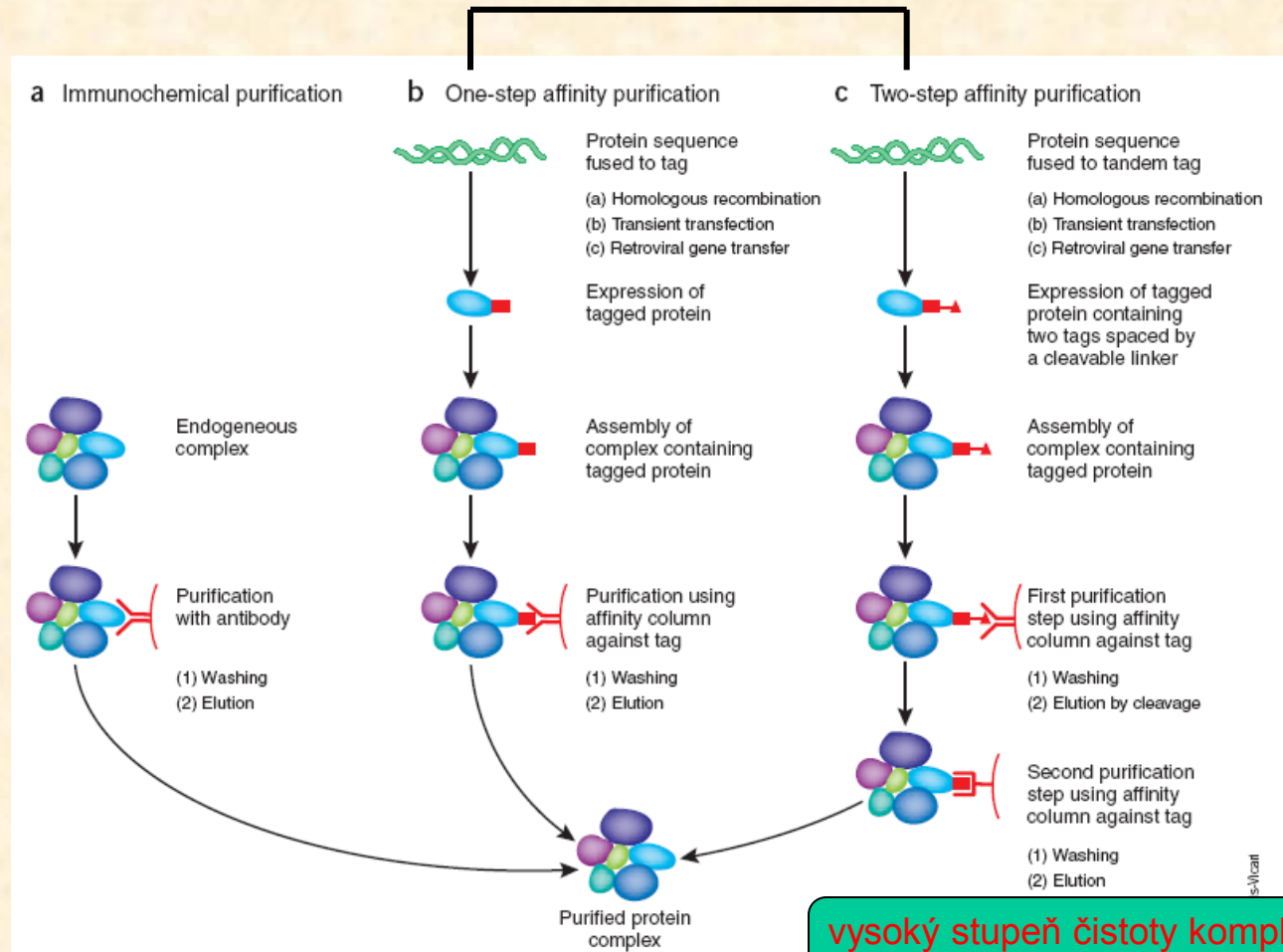
- Ⓢ > 80% proteinů je funkčních až po začlenění do komplexu
- Ⓢ ~ 10000 typů interakcí

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



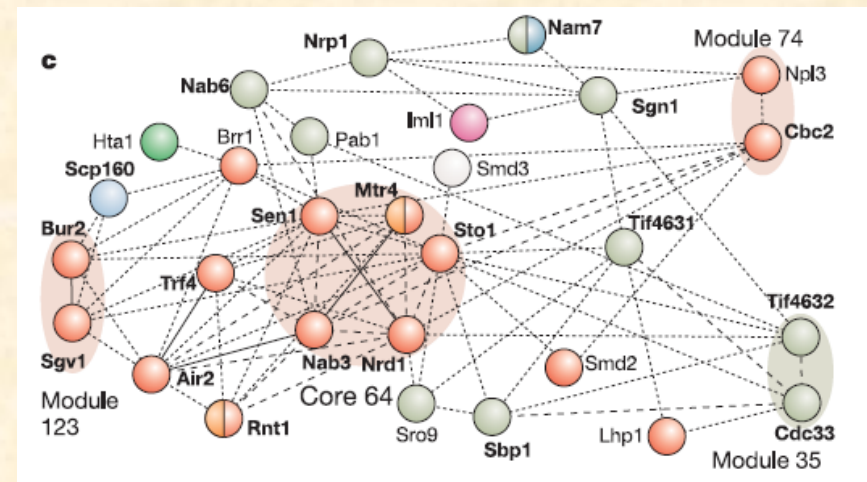
Purifikace proteinových komplexů

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

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

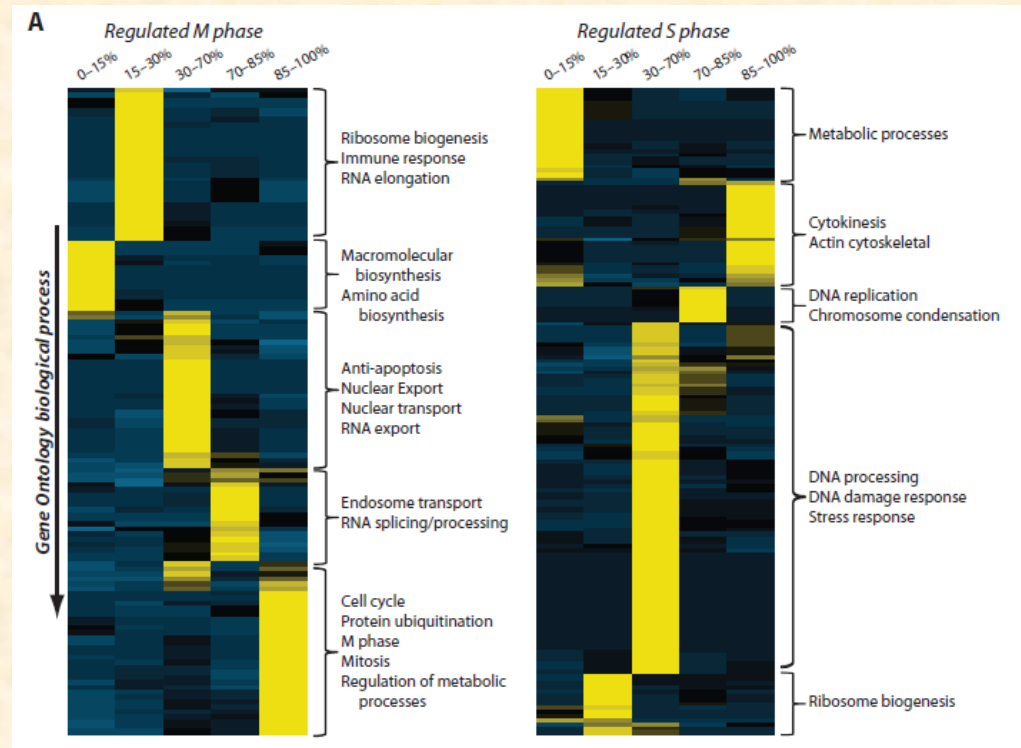
Analýza fosfoproteomu

změny během buněčného cyklu

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

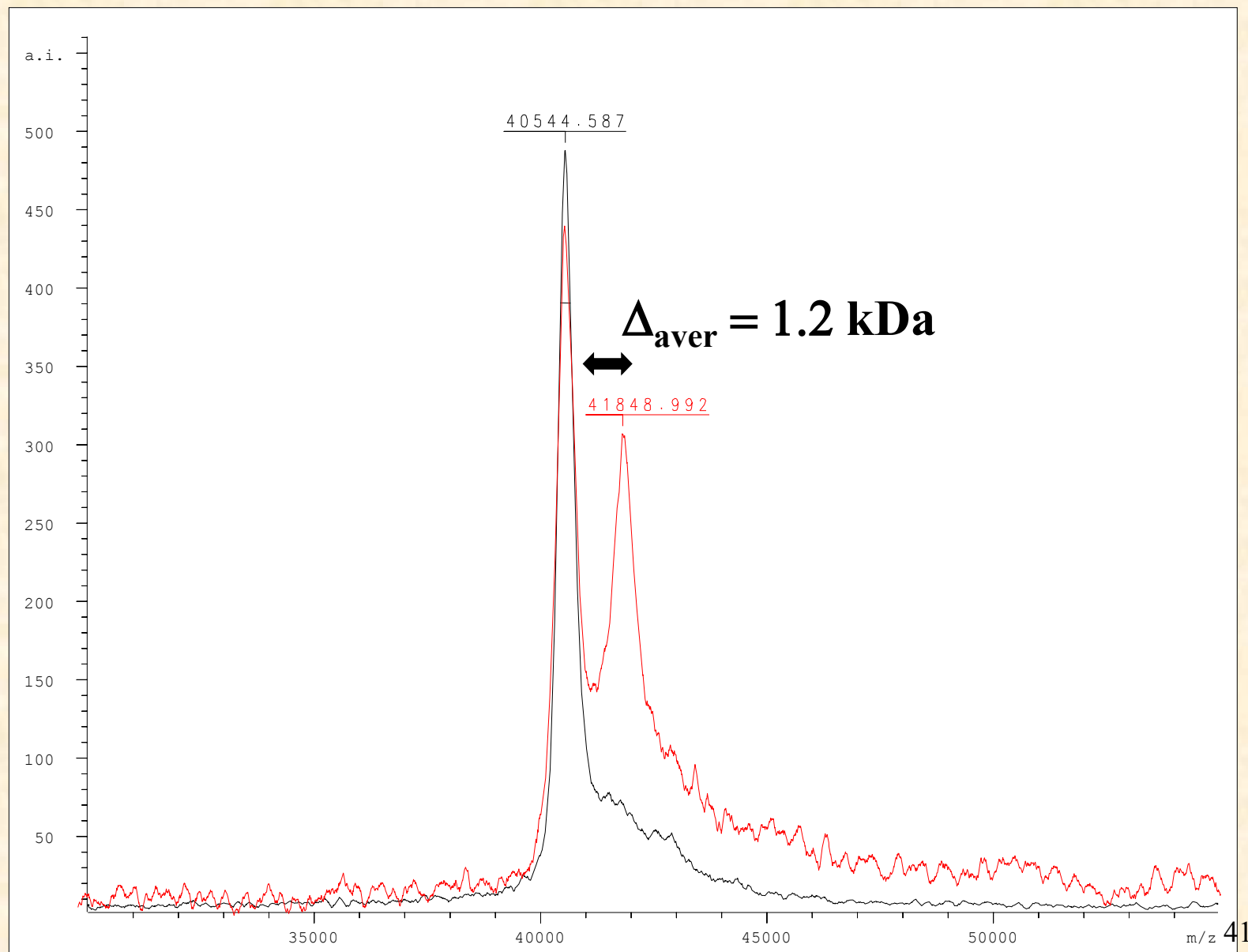
-  quantified 6027 proteins
-  quantified 20,443 unique phosphorylation sites

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

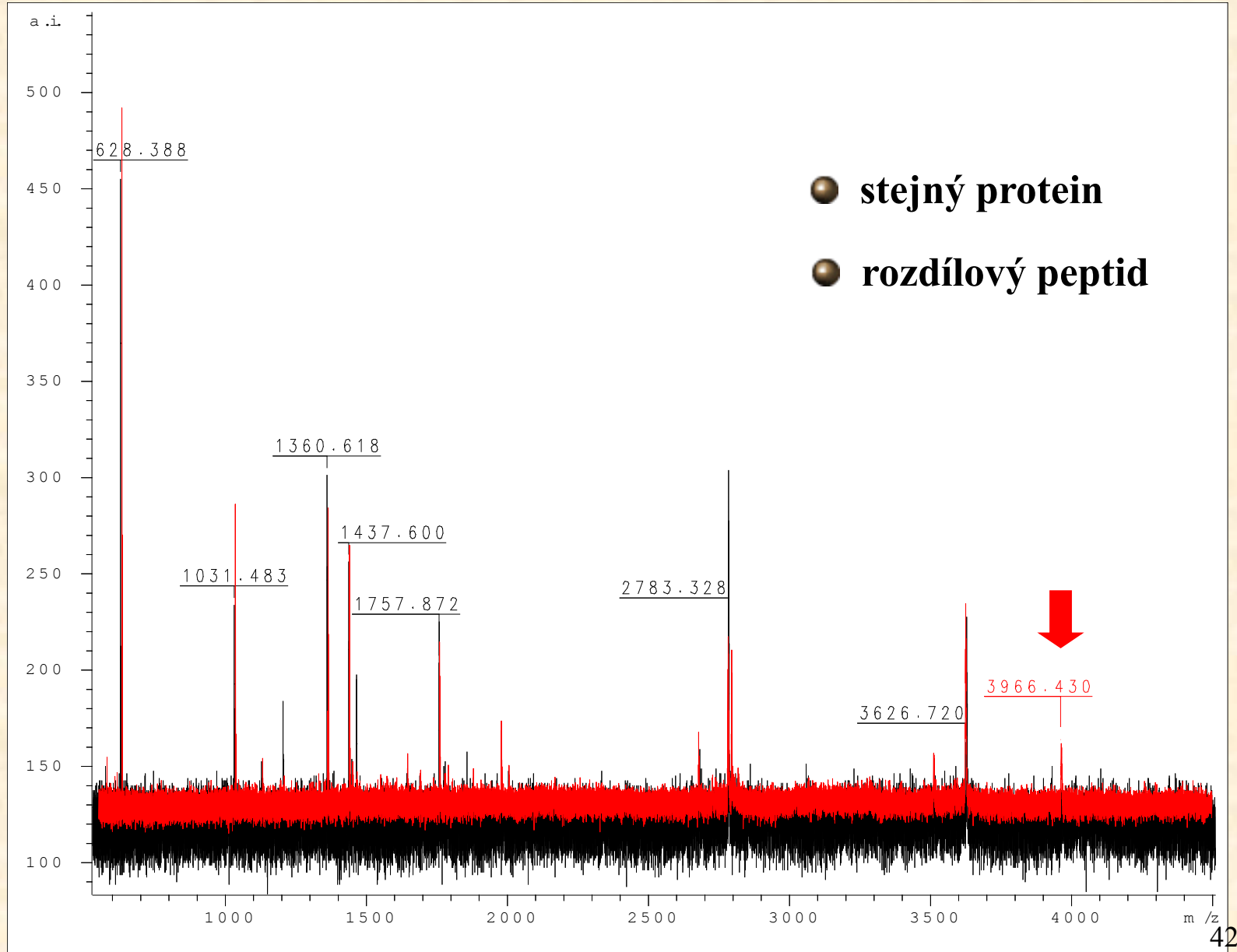


The panels show the phenotypic phosphoproteome comparison organized by GO biological process for mitotic (left) and S phase (right) cells. Proteins involved in metabolic processes have high-occupancy phosphorylation sites during mitosis, but low-occupancy sites during S phase (color scale: yellow, high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

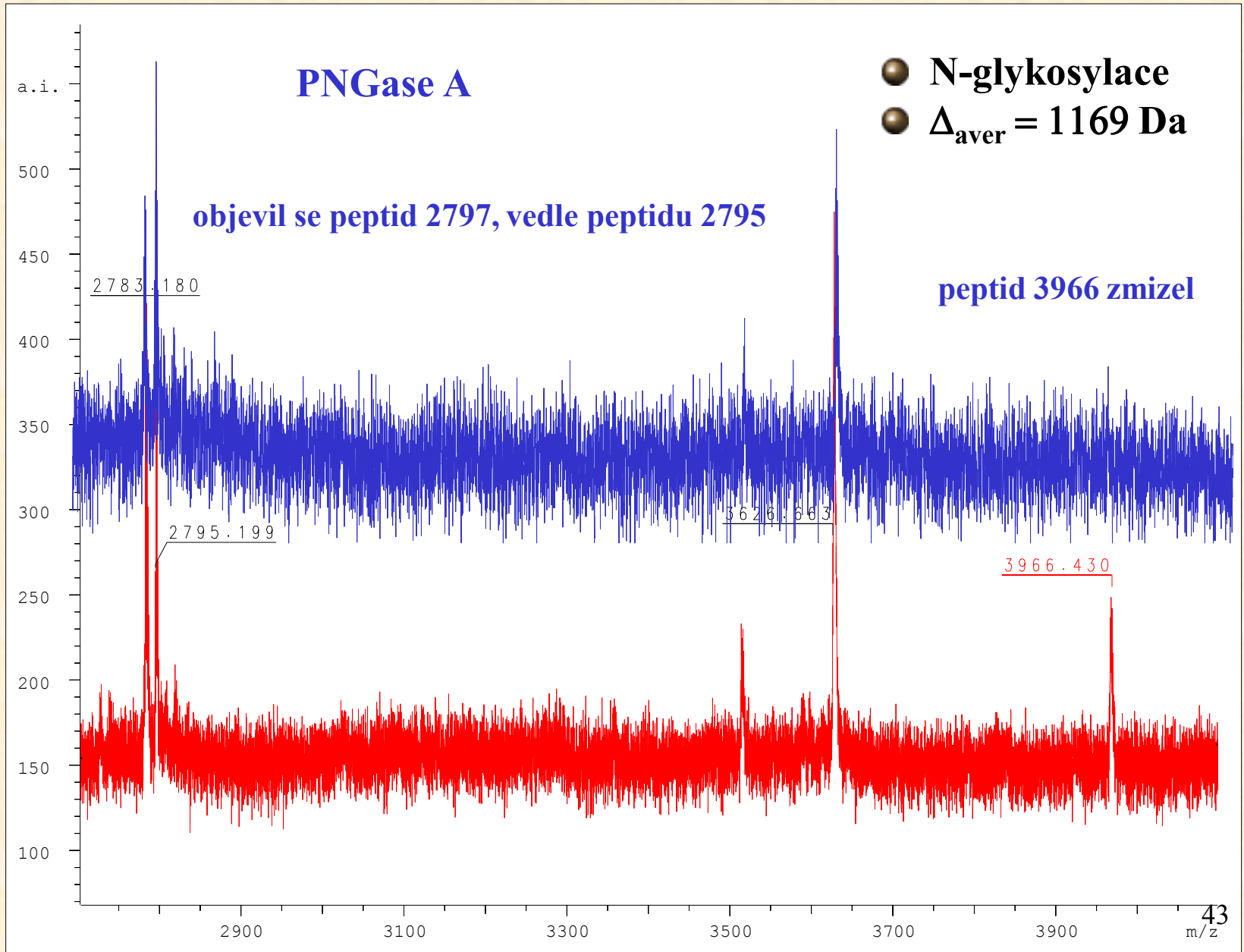
MALDI-MS celých proteinů



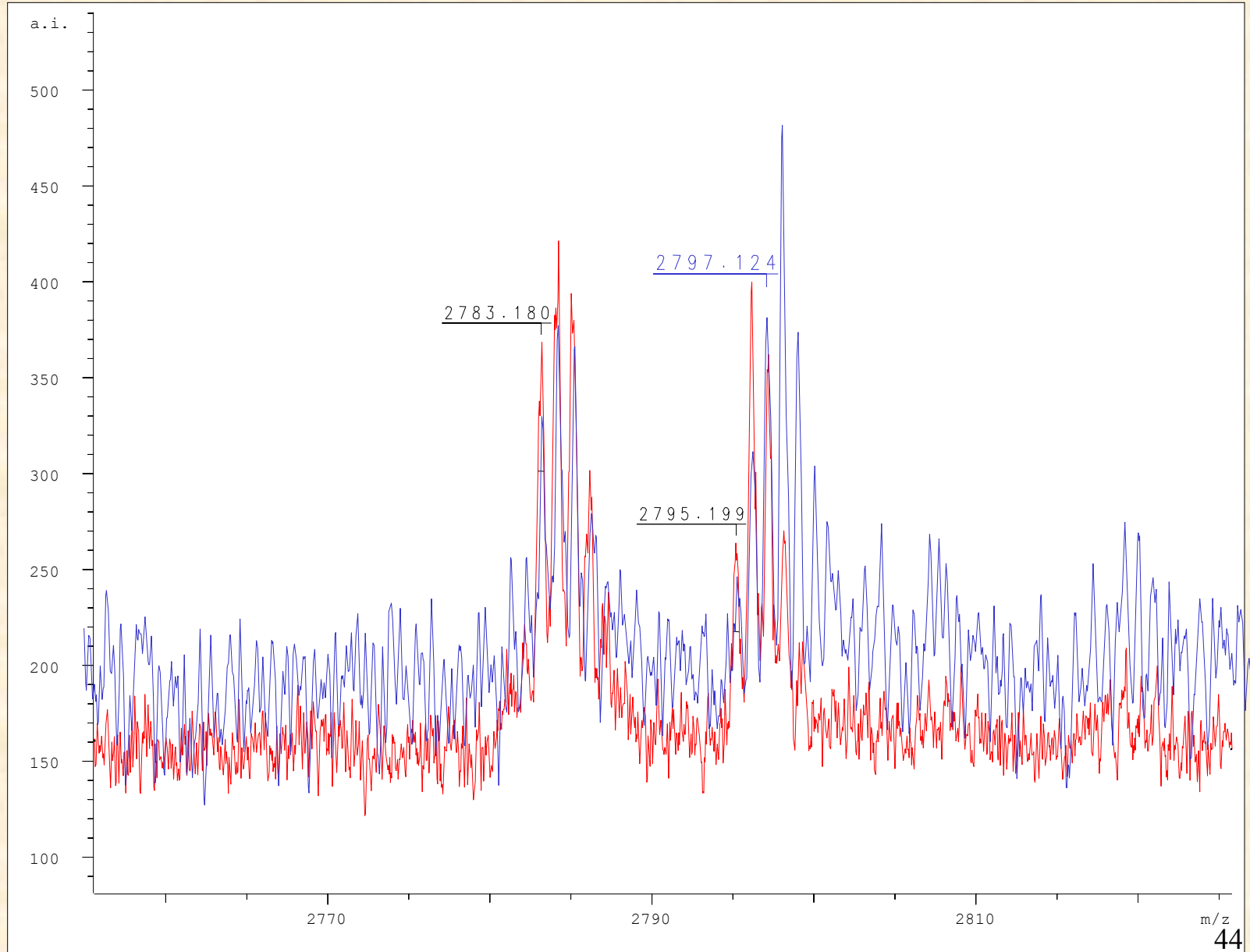
MALDI-MS tryptických digestů



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

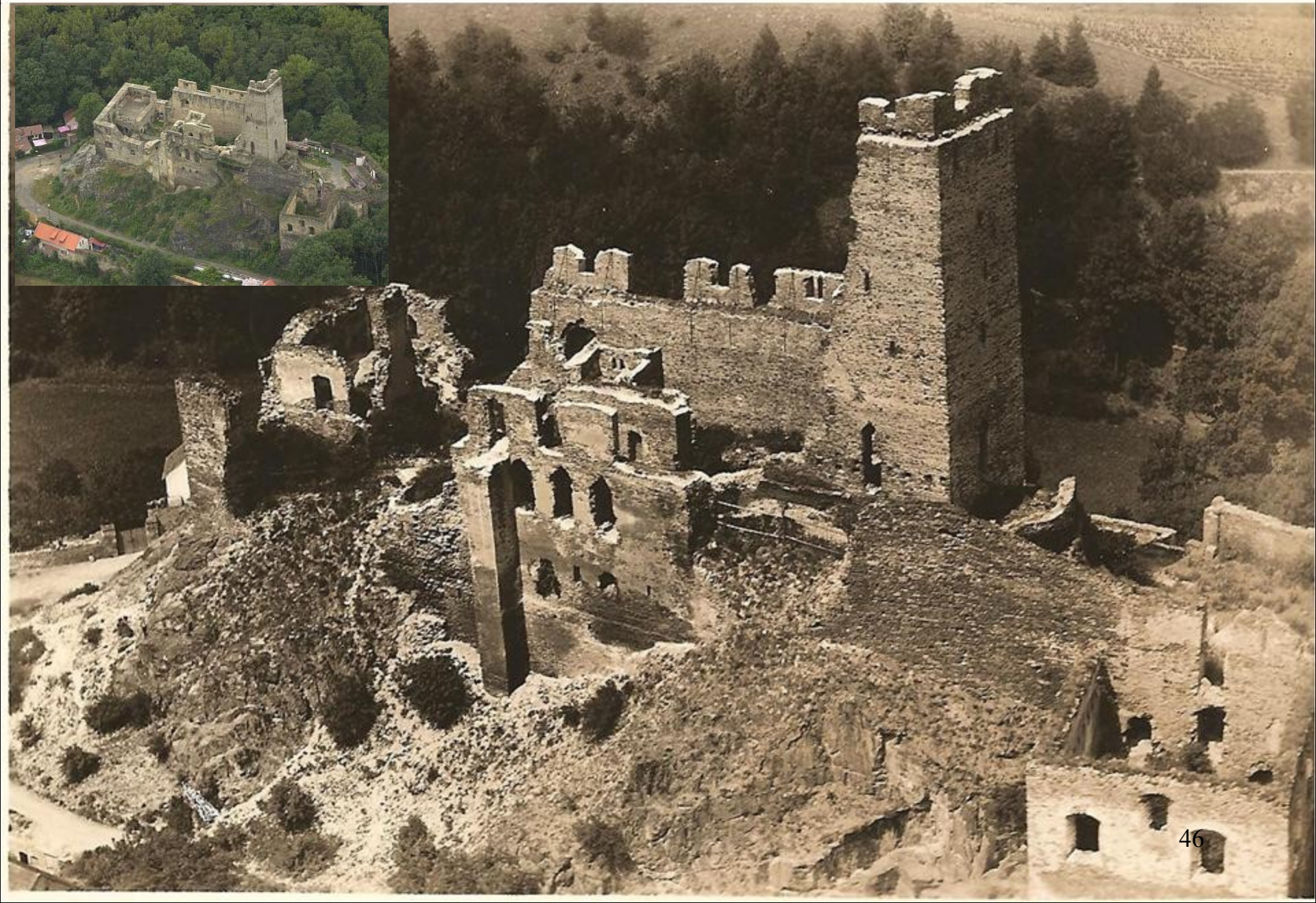
původní sekvence je tedy ...PHIFNYSGS... (hmotnost 2795 Da)

Peptid potvrzen také LC-MS/MS analýzou (v glykosylovaném vzorku digestu nebyl nalezen)

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

Nebyl dále potvrzen MS/MS technikami

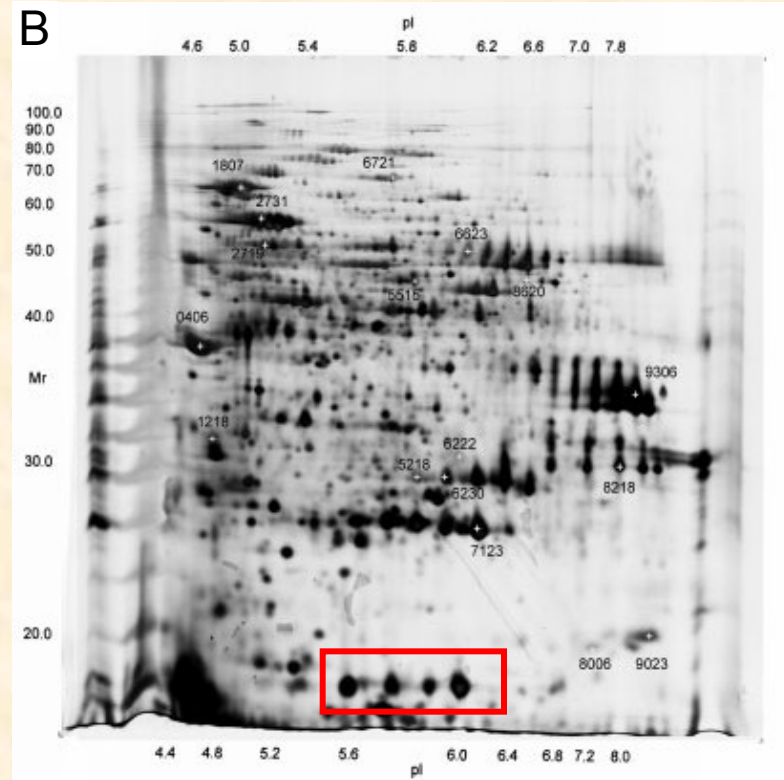
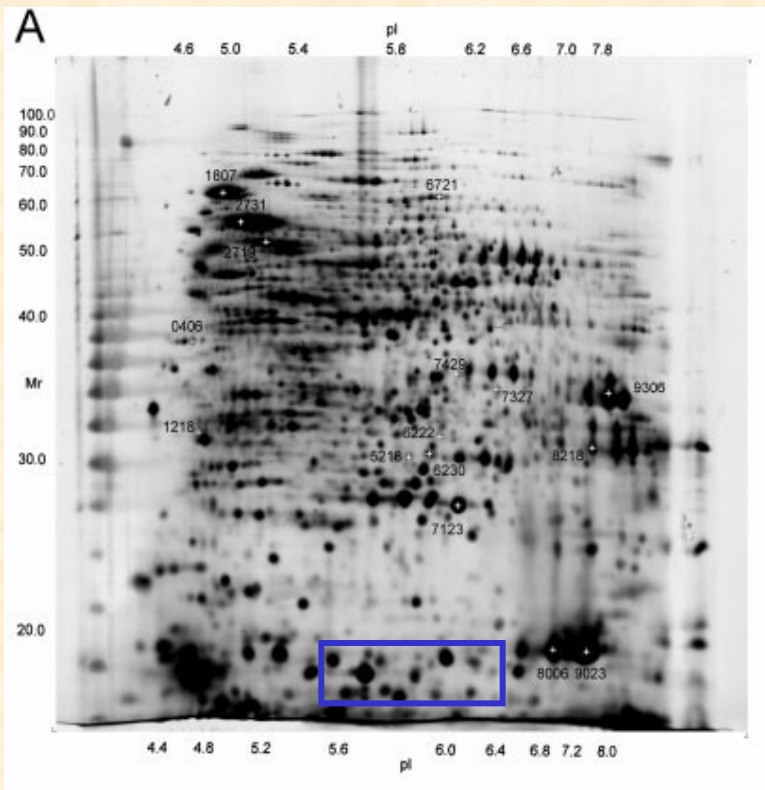
OKOŘ



Proteomické aplikace - kvantitativní studie

Charakterizace změn proteomu *diferenční proteomika*

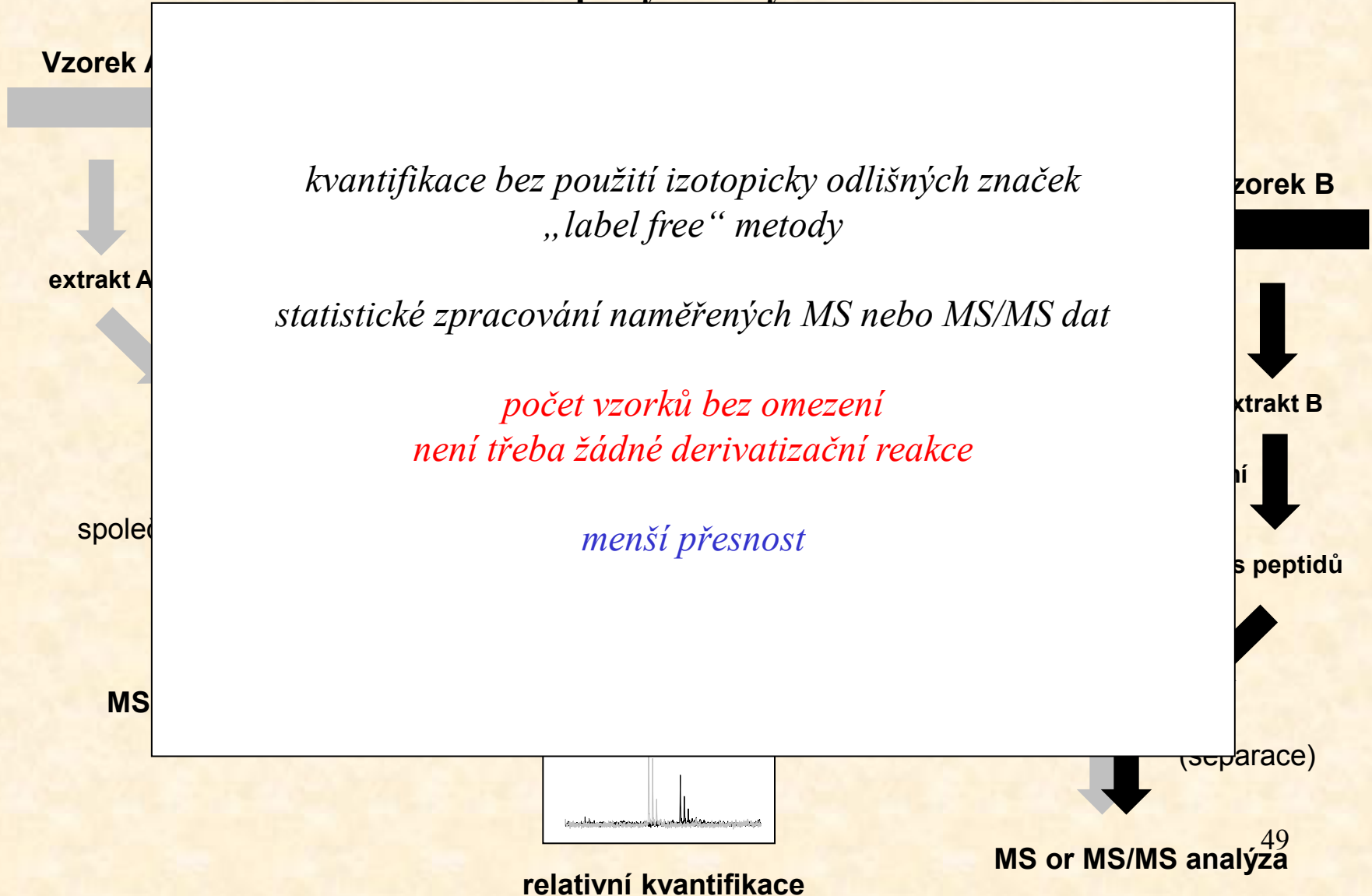
analýza obrazu 2-D gelů
LC-MS/MS vybraných spotů s rozdílnou intenzitou



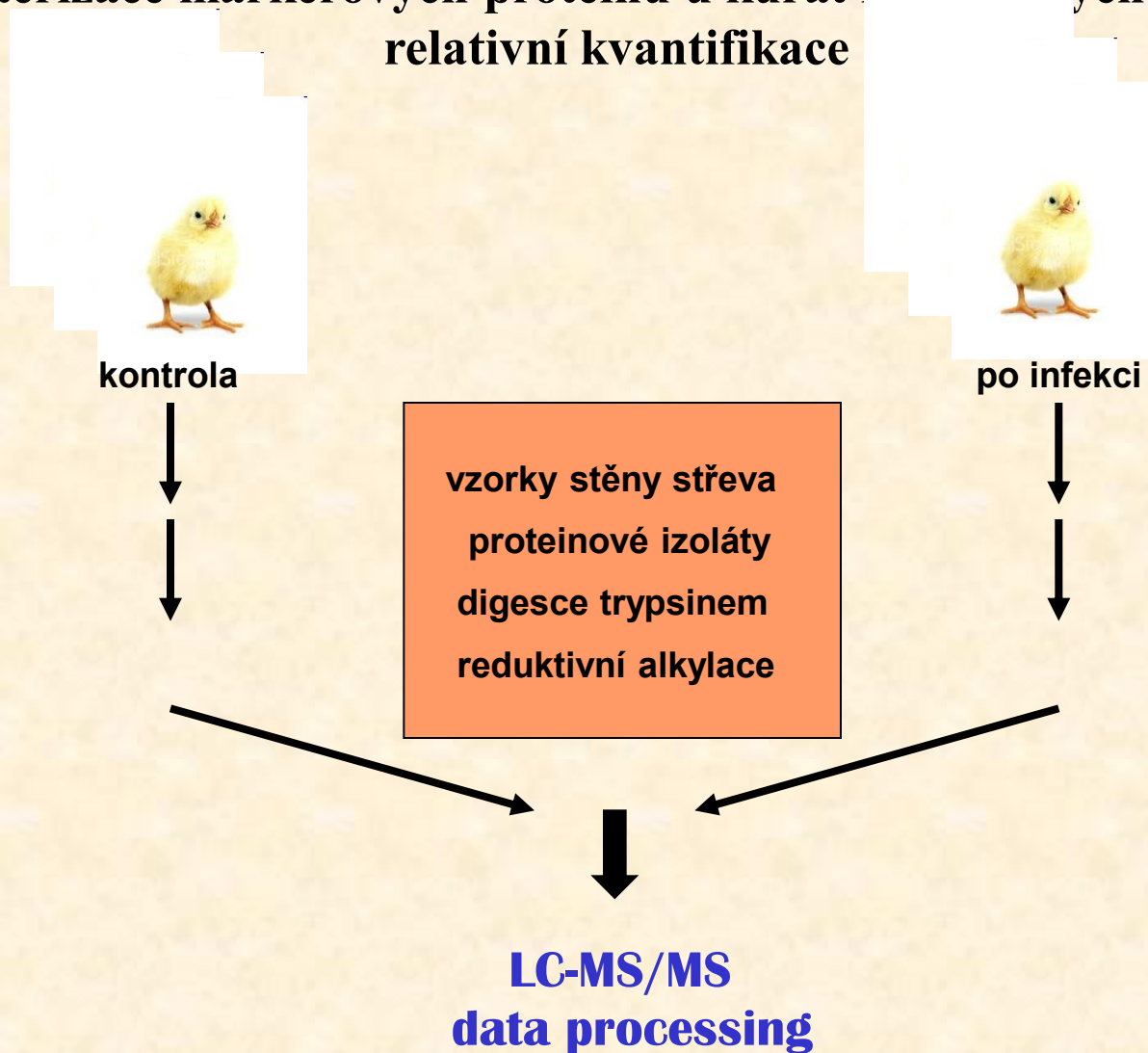
Acidithiobacillus ferrooxidans grown on ferrous iron (A) and elemental sulfur (B)

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	PREDICTED: syntenin-2-like [Gallus gallus]	41.032
118095649	PREDICTED: beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 3 [Gallus gallus]	34.036
4927286	alpha enolase [Bos taurus]	33.575
112491068	<p style="text-align: center;">objasnění molekulárních mechanismů</p> <p style="text-align: center;">nalezení markerových proteinů pro časnou diagnostiku</p>	30.221
56118294		25.497
363741459		24.786



ověření pomocí real-time PCR

Deep proteome coverage

obtaining maximum information about proteome

Direct analysis of complex protein mixture (tryptic digest) by LC-MS/MS
2000-5000 protein identifications

Cells contain ~ 8 000 – 10 000 proteins

Reasons

- Wide dynamic concentration range
- Time limitation of mass spectrometers (not enough time to measure all peptides eluting simultaneously from column)

Solution

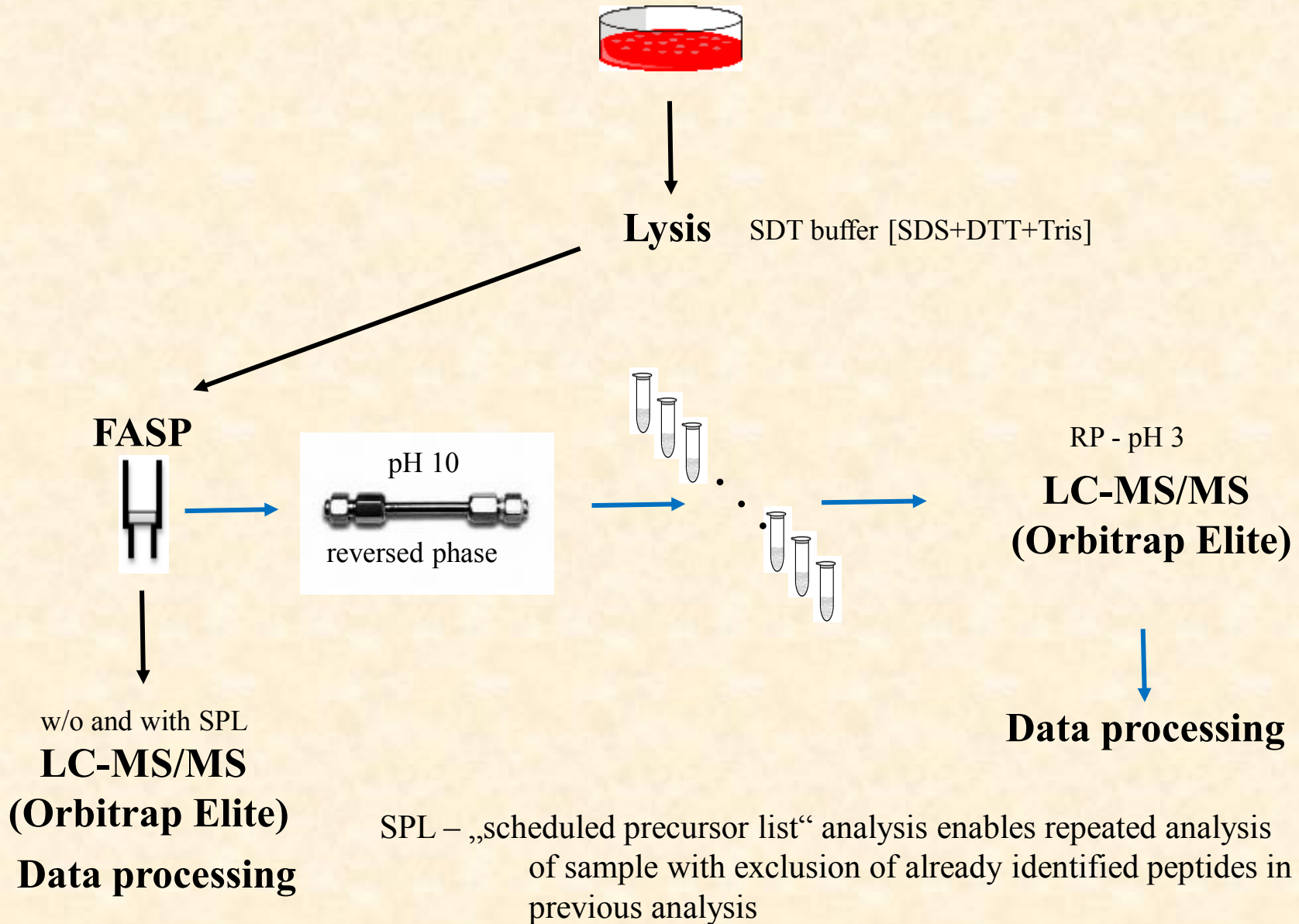
To simplify the complex sample prior LC-MS/MS analysis by fractionation

- organelle level
- protein level
- peptide level
- instrumentally (e.g. repeated analyses of the same sample with exclusion of already identified peptides, scheduled precursor list (SPL))

2-D LC-MS/MS off-line

Vita Bryja's lab

Experimental design

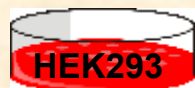


Charakterizace proteomu a fosfoproteomu buněčné linie HEK293

spolupráce s doc. V. Bryjou, PřF MU

Wnt3a
aktivace
WT vs DVL KO
2 replikáty

2-D LC-MS/MS off-line



lyze

SDT pufr [SDS+DT



FASP



TMT znače



w/o and with SPL

**LC-MS/MS
(Orbitrap Elite)**

Data processing

- **10 000 proteinů**
- **30 000 fosfopeptidů**
- ~100 změn na proteinové úrovni
- ~250 změněných fosforylovaných míst

dosud nepublikováno

zpracování dat

fosfotrací
LC-MS/MS
(Orbitrap Elite)

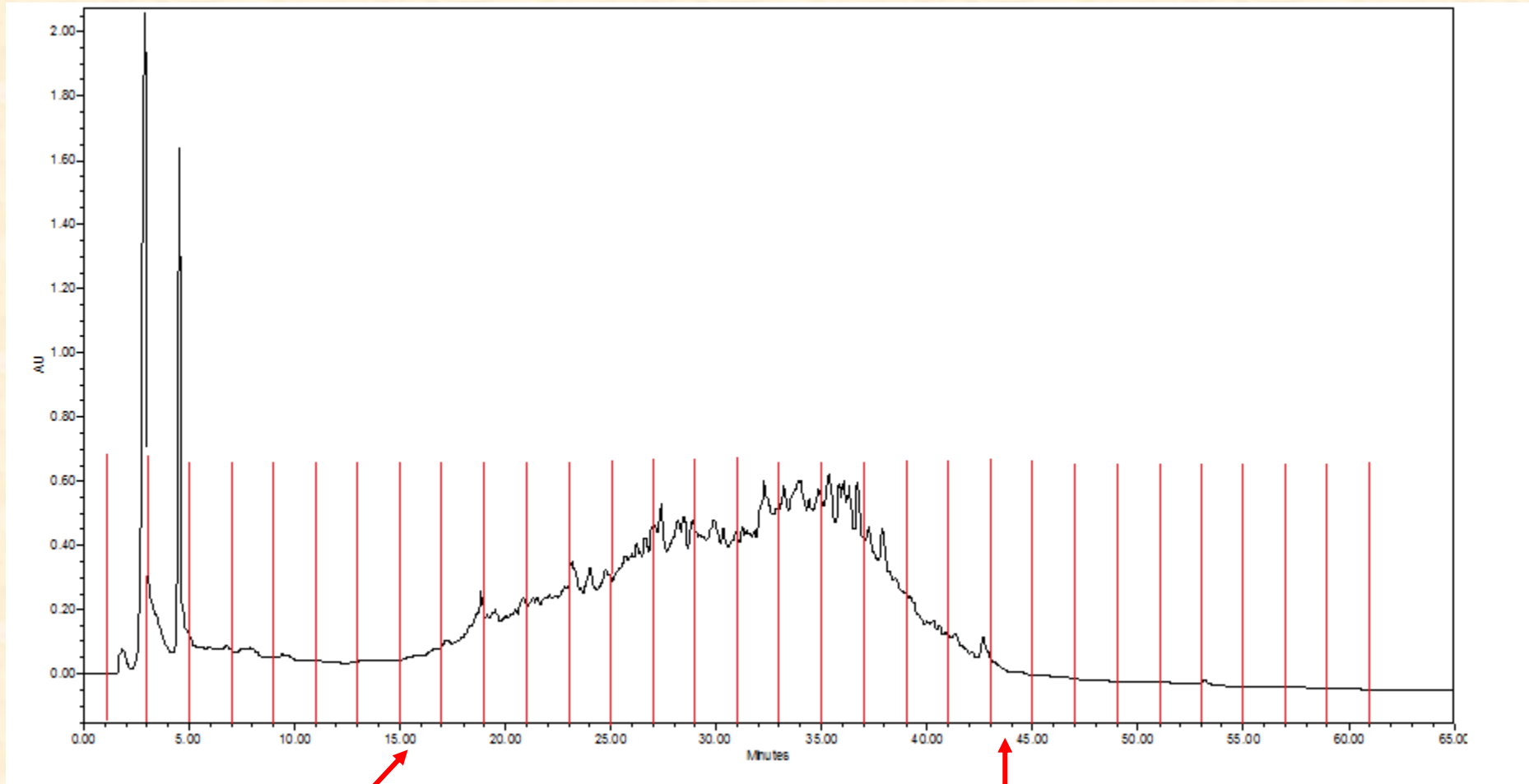
analýza frakcí
LC-MS/MS
(Orbitrap Elite)

zpracování dat

SPL – „scheduled precursor list“
analysis enables repeated analysis of
sample with exclusion of already
identified peptides in previous analysis

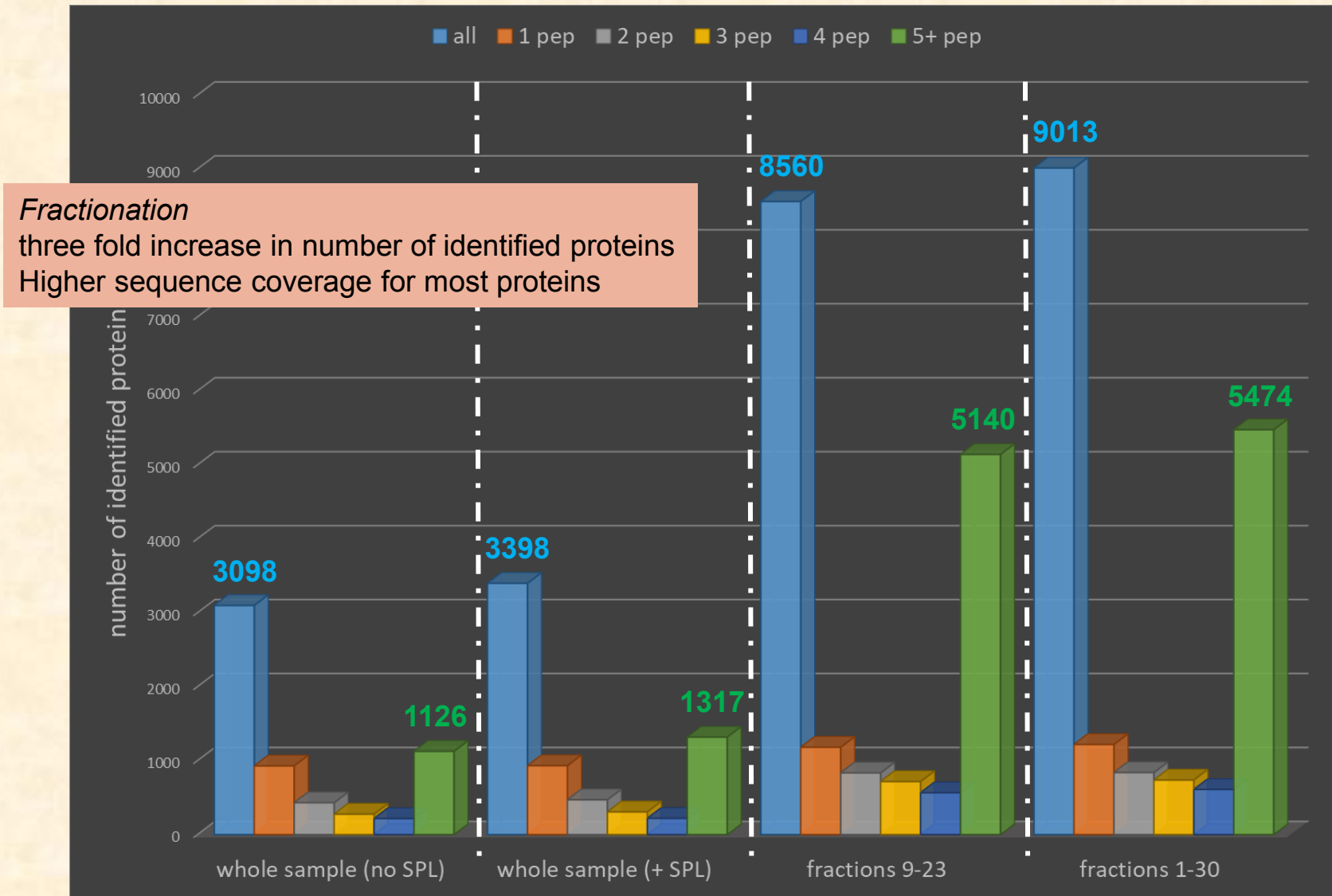
2-D LC-MS/MS off-line

High pH fractionation of whole proteome digest (1th D)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Number of identified proteins



Cílená MS/MS analýza vybraných proteinů

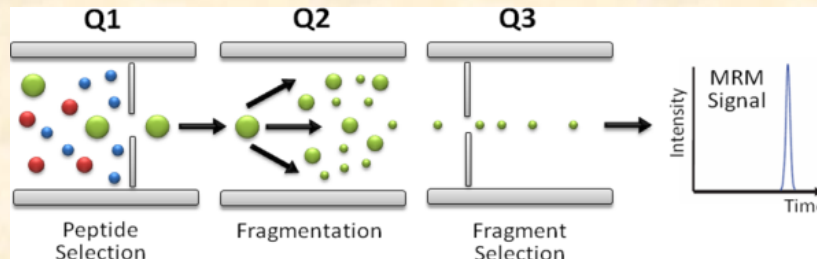
relativní /absolutní kvantifikace

multiple reaction monitoring (MRM)

screening – výběr kandidátního proteinu

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

vlastní analýza a zpracování dat

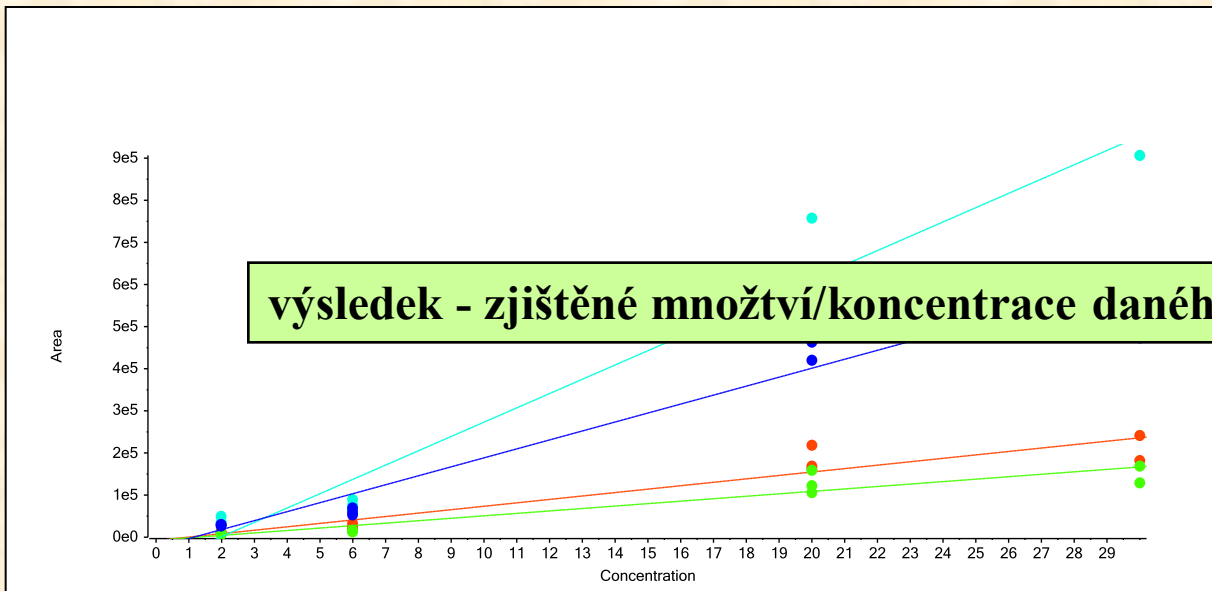
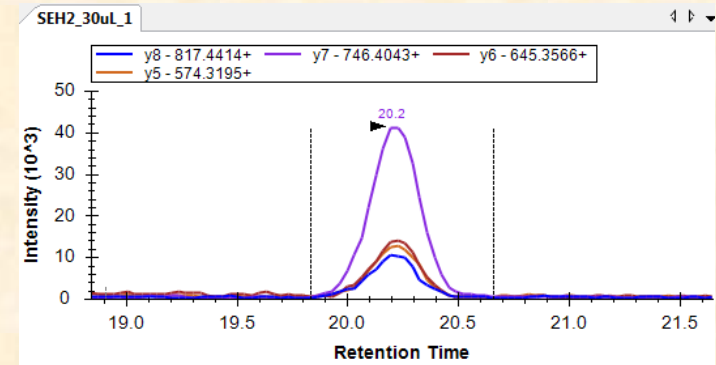


Kvantifikace enterotoxinů

cílená analýza vybraného proteinu

MRM

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

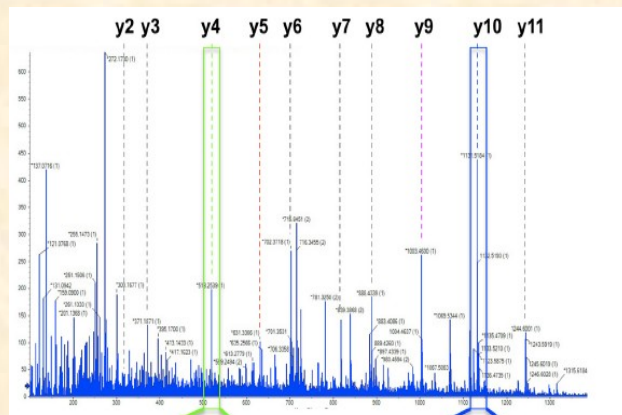


SWATH MS

Q-TOF, MS/MS < 10 ppm



DIA – data independent acquisition



celé MS/MS spektrum

- klasické DB prohledávání **nelze**
- srovnání s knihovny ref. MS/MS spekter
- Relativní i absolutní kvantifikace

základní předpoklad úspěchu – správná příprava vzorku

Proces přípravy proteomických vzorků je složen z mnoha procedur, v každém z nich hrozí ztráta vzorku či jeho ovlivnění

zachování původního proteinového složení
zachování modifikací (např. inhibitory fosfatáz)
odstranění kontaminant rušících koncovou MS
analýzu

...

GIGO

a to je konec

