



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



Proteomika

Proteomické aplikace

CG010

Zbyněk Zdráhal

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



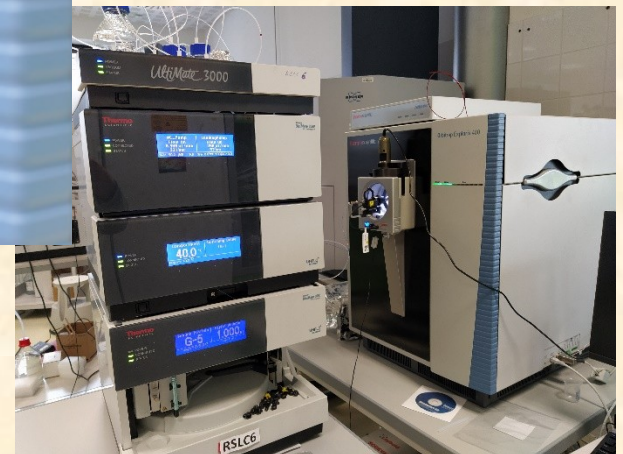
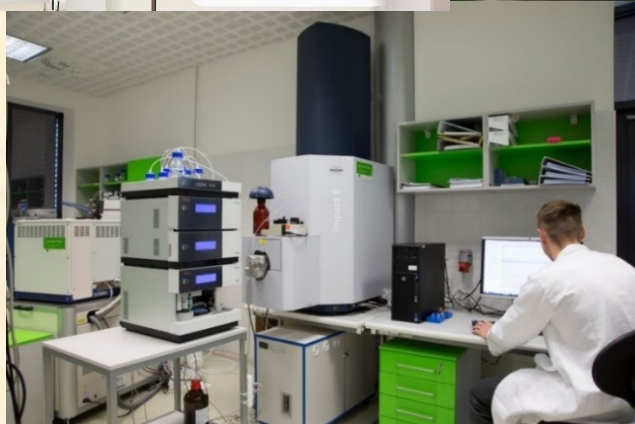
Zbyněk Zdrahal

Phone: +420 777 926 602

E-mail: zbynek.zdrahal@ceitec.muni.cz

CF: www.ceitec.eu/proteomics-core-facility/cf95

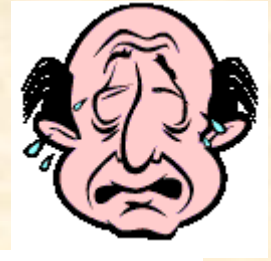
RG: www.ceitec.cz/proteomika-zbynek-zdrahal/rg49



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



● prote lidský

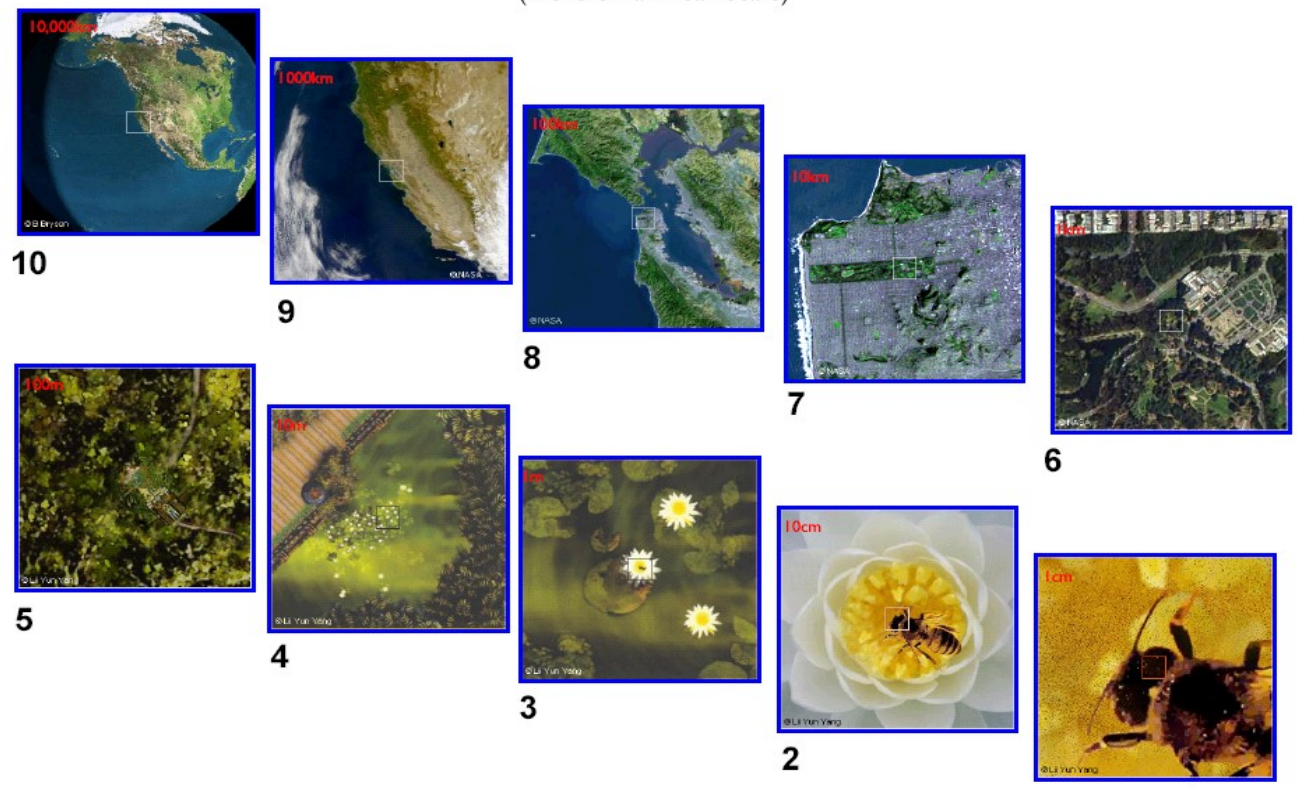
10¹⁰ Really Is Wide Dynamic Range

(Here on a linear scale)

● širok nutno reakce

● širok

● analý pro ú protei



forms
, 186 (2013))

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**

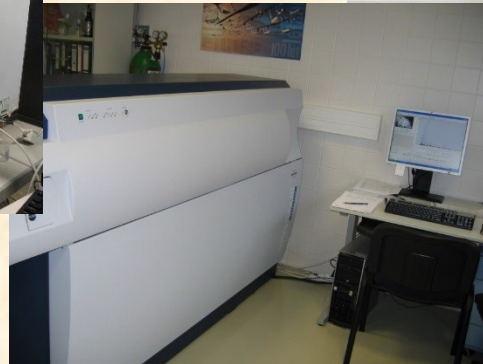
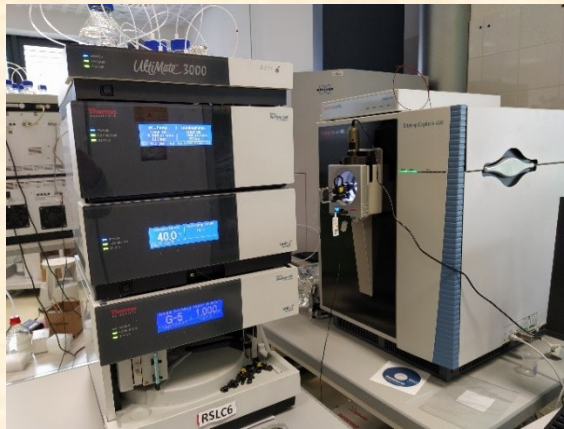
včetně přípravy vzorku a separace

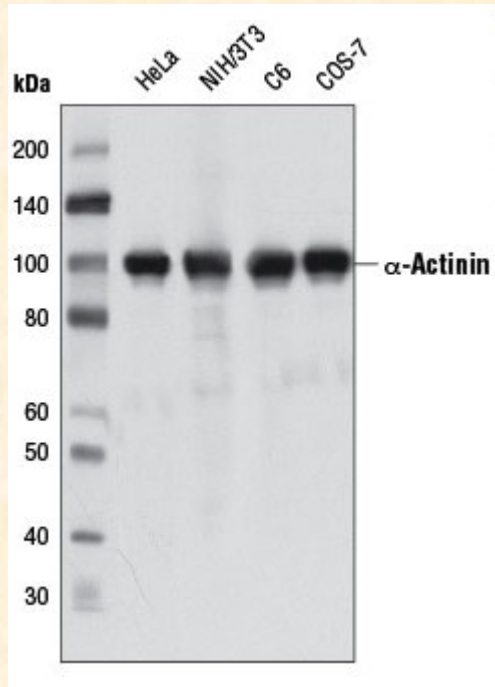
- Proteinové čipy



Proteomické aplikace

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

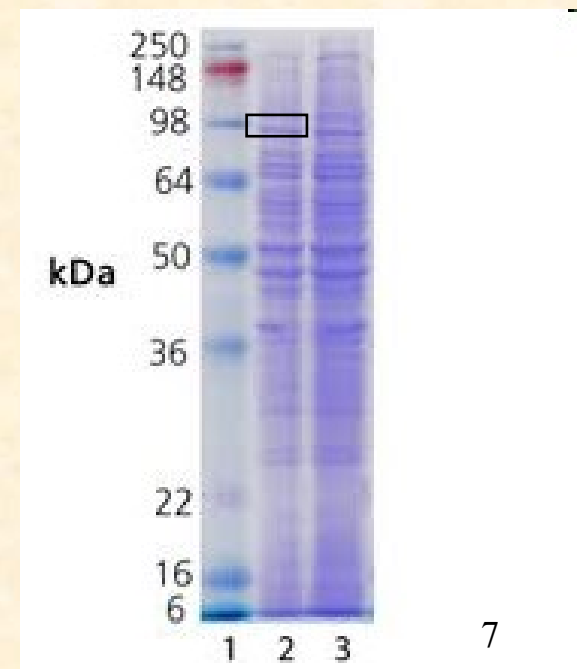




>gi|3157976|gb|AAC17470.1| alpha actinin [Homo sapiens]
 MVDYHAANQSYQYGPSSAAMAWRRGSMGDYMAQEDDWDRDLLLDPAWKQQRKTFTAWSNSHLRKAGTQI
 ENIDEDFRDGLKLMMLLLEVISGERLPKPERGKMRVHKINNVNKALDFIASKGIKLDHFHRAEEIVDGNAMK
 TLGMIWTIILRFAIQDISVEETSAKEGLLLWCQRKTAPYKQNVVQNFHISWKDGLAFNALIHRHRPELIE
 YDKLRKDDPVTNLNNAFEVAEKYLDIPKMLDAEDIVNTARPDEKAIMTYVSSFYHAFSGAQKAETETAAN
 RICKVLAVNQENCSTSMEDYEKLASDLLEWIRRTIPWLED RVPQKTIQEMQQKLEDFRDYRRVHKPPKVQ
 EKCQLEINFNSVQTKLRLSNRPAFMPSEGMVSDINNGWQHLEQAEGYEEWLLNEIRRLERLDHLAEKF
 RQKASIHAWTDGKEAMLKHRDYETATLSDIKALIRKHEAFESDLAAHQDRVEQIAASAQELNELDYYDS
 HNVNTRCQKICDQWDALGSLTHSRREALEKTEKQLEAII DQLHLEYAKPAAPFNWME SAMEDLQDMFIV
 HTIEEIEGLISAHDQFKSTLPDADREREAILHPQGGQRIAESNHIKLSGSNPYTTVTPQIINSKWEKVQQ
 LVPKRDHALLEEQSKQQQSNEHLRRQFASQANVVGPIQTKMEEIAIS IEMNGTLEDQLSHLKQYERSIV
 DYKPNLDLLEQQHQLIQEALIFDNKHTNYTMEHIRVWGWEQLLTTIARTINEVENQILTRDAKGISQEQMQ
 EFRASFNFHFDKDHGGALGRGVQGLPHQPGLRRGERPAGEAEFNRIMSLVDPNHSGLVTFQAFIDFMSRET
 TDDTDADQVITSFKVLGDKNFITAEELRRELPPDQAEYCIARMAPYQGPDPGVRGALDYKSFSTALYGES
 DL

identifikace „neznámých“ proteinů
jistota identifikace
~ citlivost

instrumentální náročnost



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

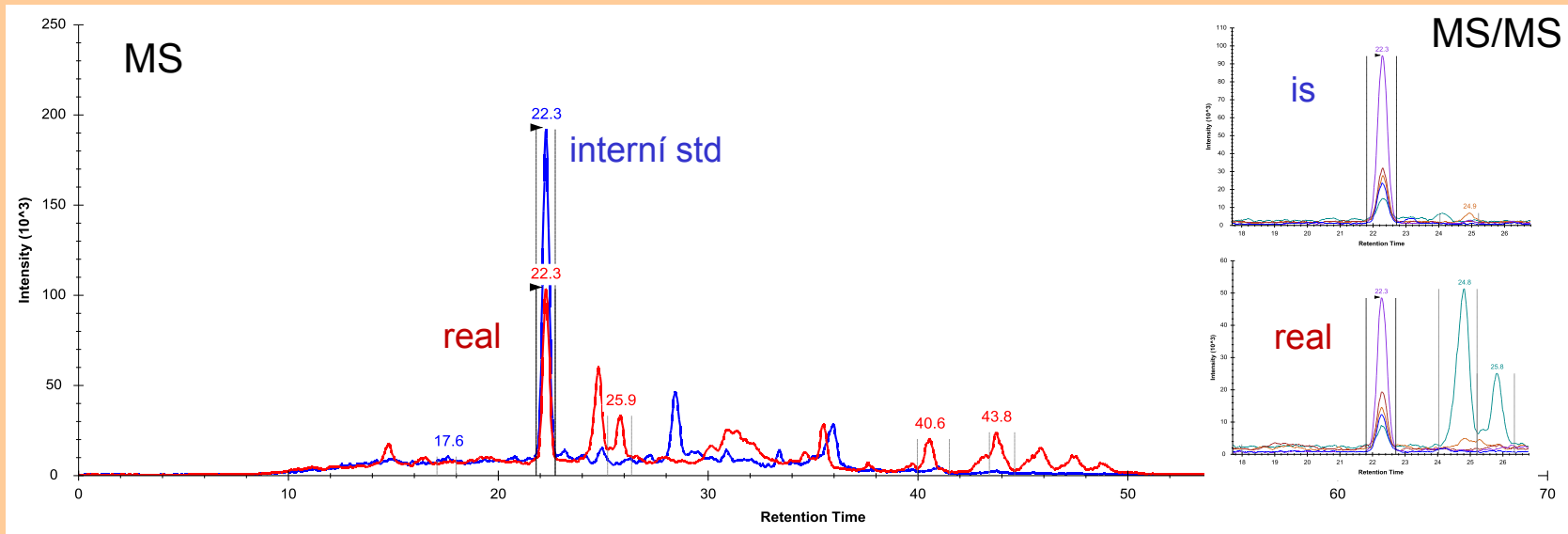


Rhodotorula glutinis

Cílená proteomika

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

Stanovení enterotoxinu (*S. aureus*)

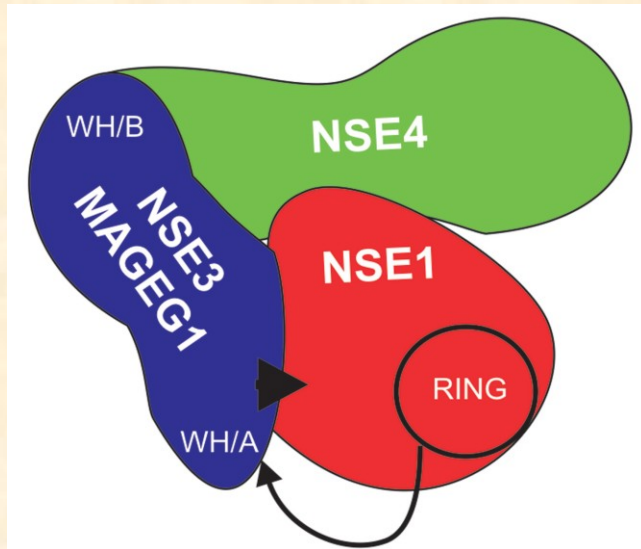


LC-MS/MS (MRM, PRM)

Funkční proteomika

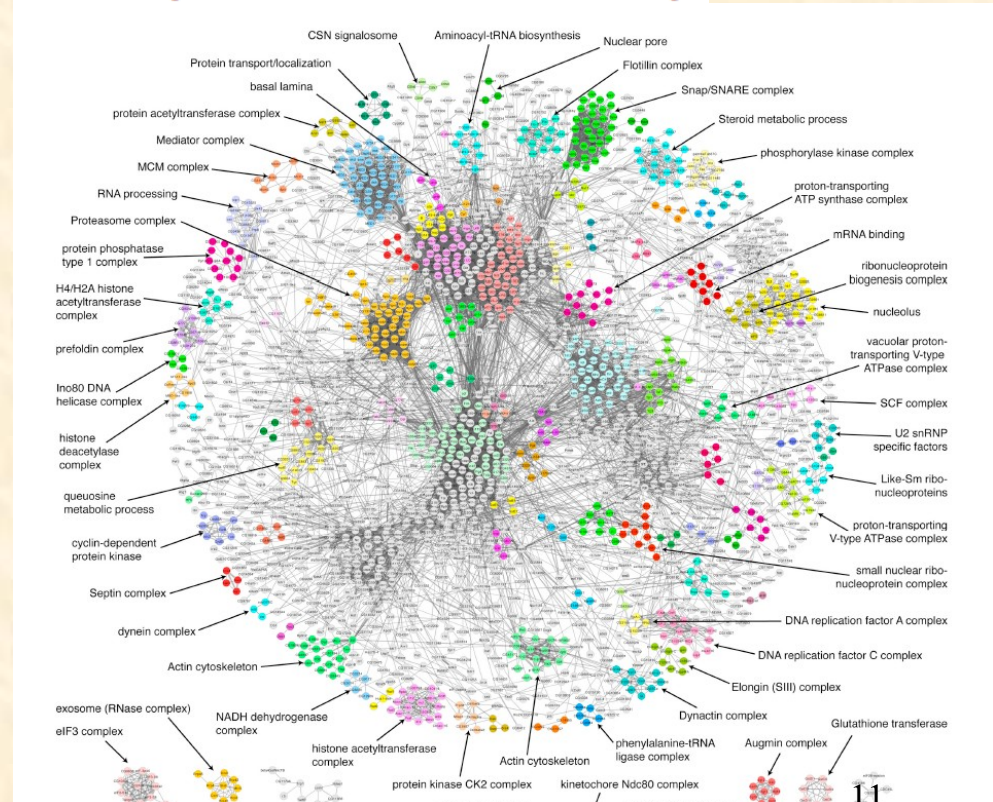
Studium interakcí proteinů a jejich funkční význam.

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



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

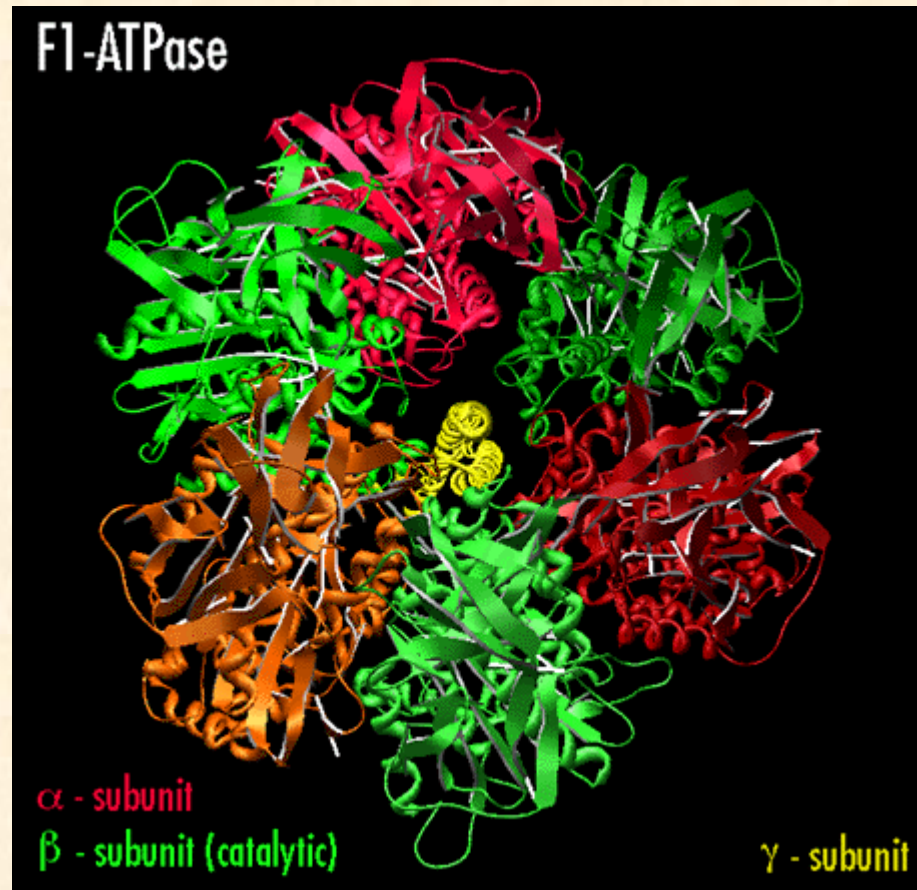
A Drosophila Protein Interaction Map



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.



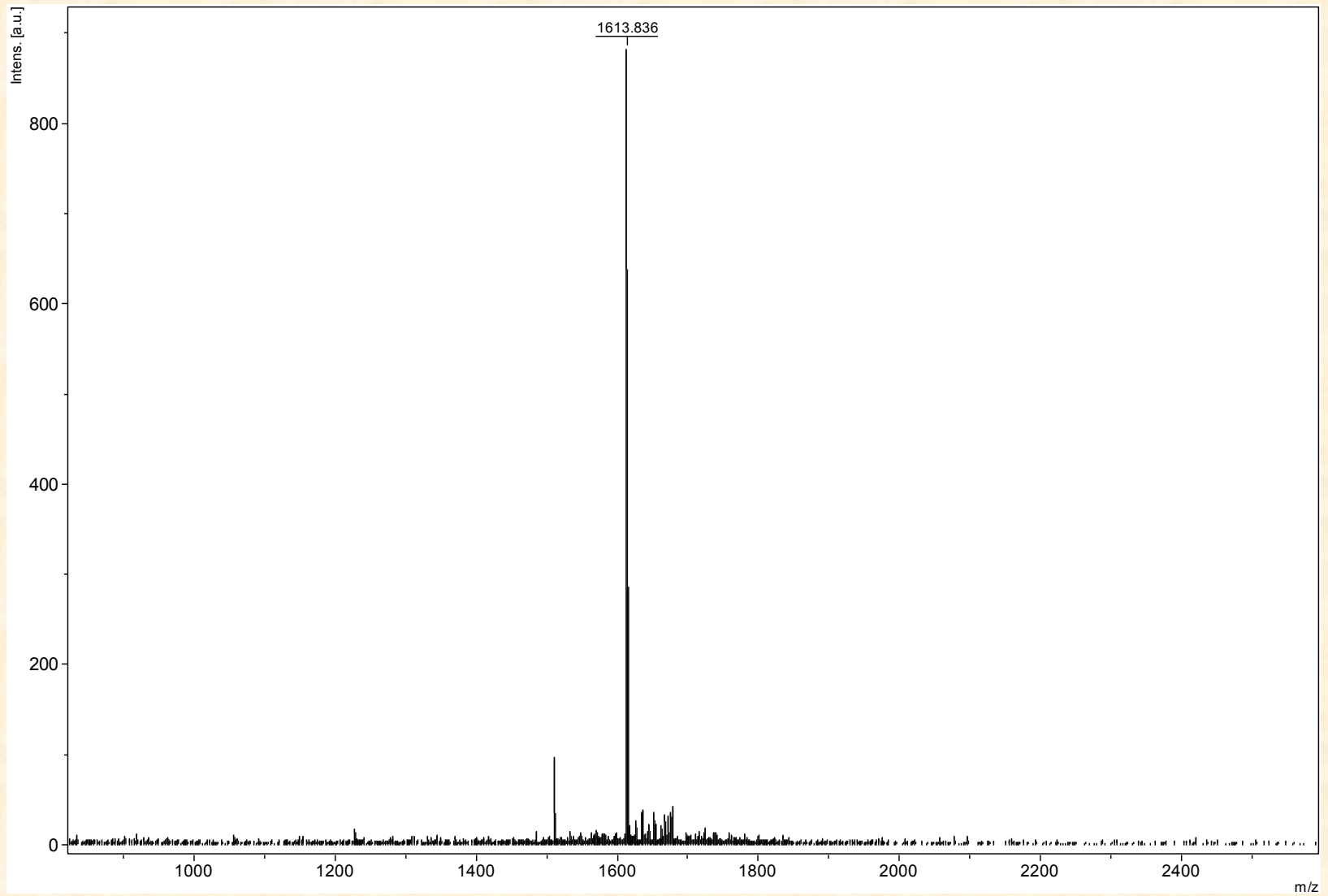
Strukturu formují různé typy vazeb – iontové interakce, vodíkové můstky, van der Waals síly nebo disulfidické můstky.

ZVÍKOV

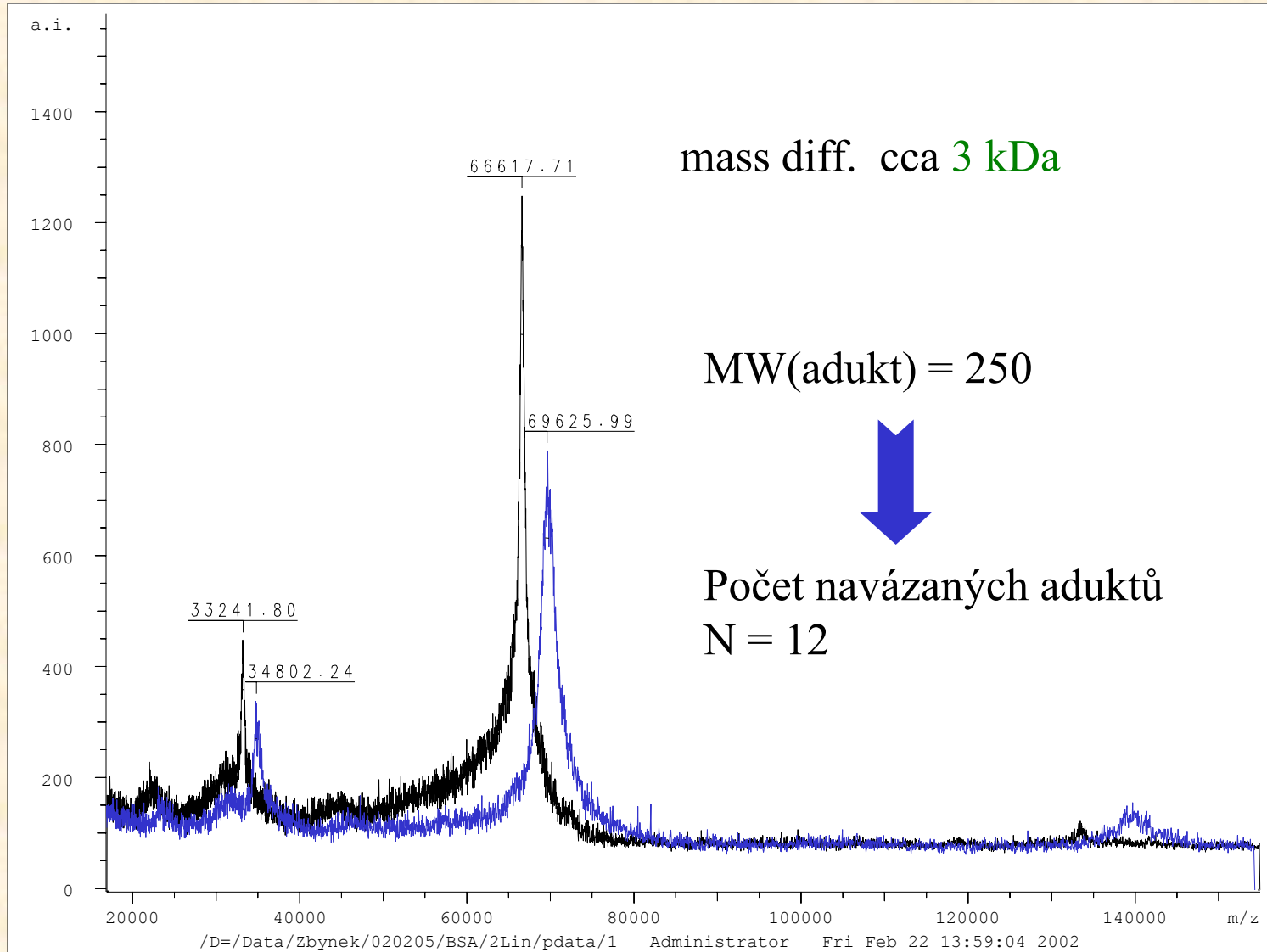


**Proteomické aplikace využívající „pouze“
analýzy intaktních molekul**

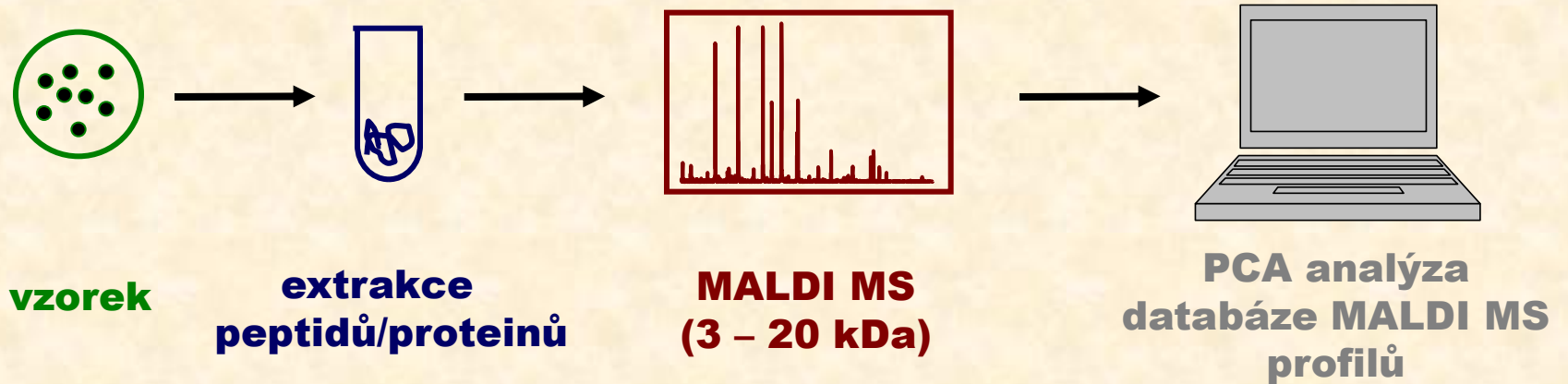
Kontrola produktů syntézy



Kontrola výsledku reakce

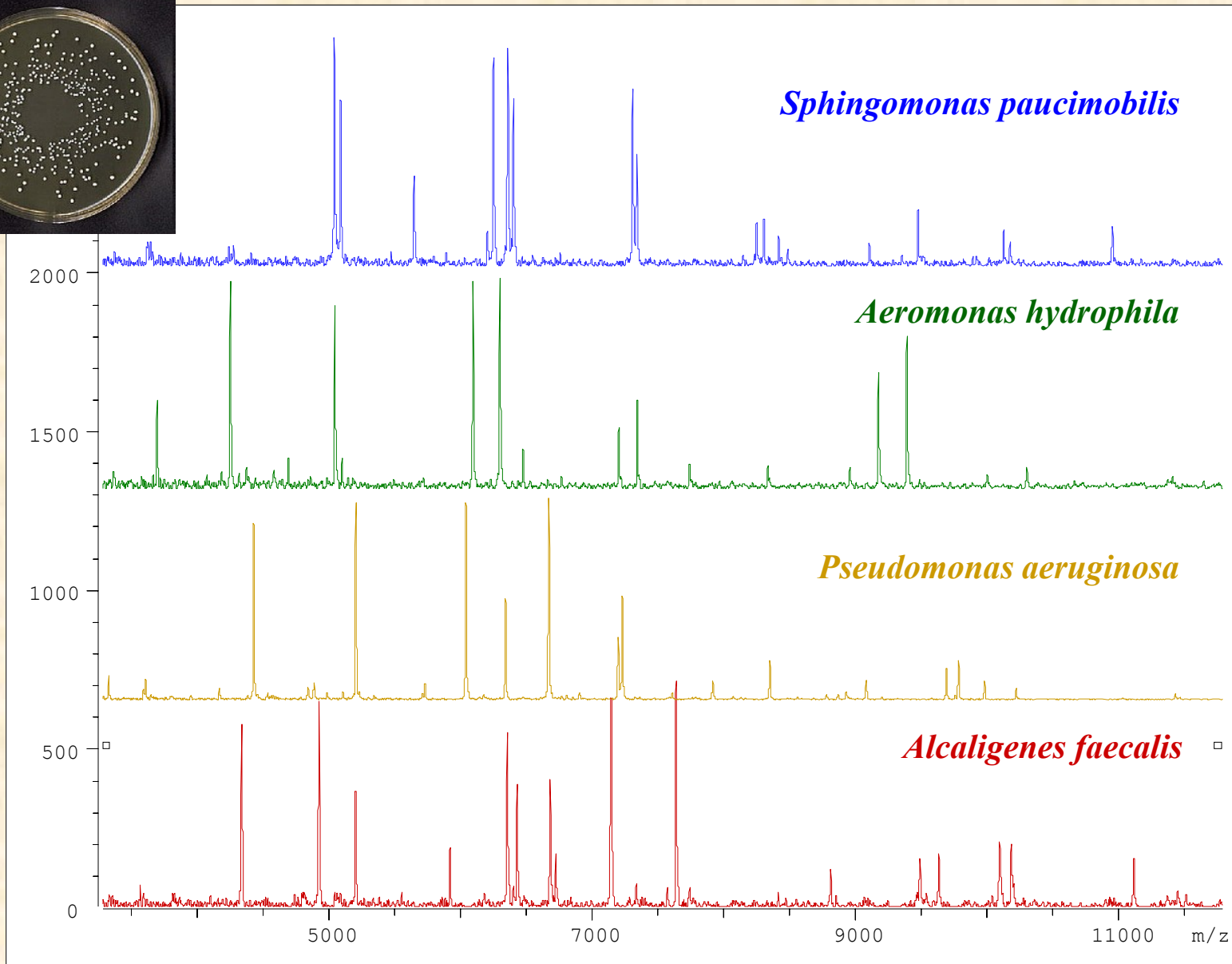


MALDI-MS profilování



- **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

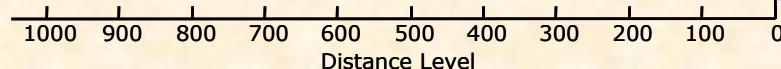
identifikace na základě srovnání naměřeného profilu s profilem z databáze

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

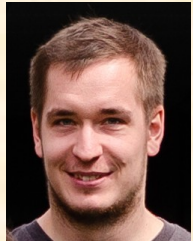
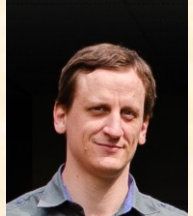
 **uznaná metoda v klinické praxi**

Acinetobacter nosocomialis NIPH 97
 Acinetobacter nosocomialis NIPH 106

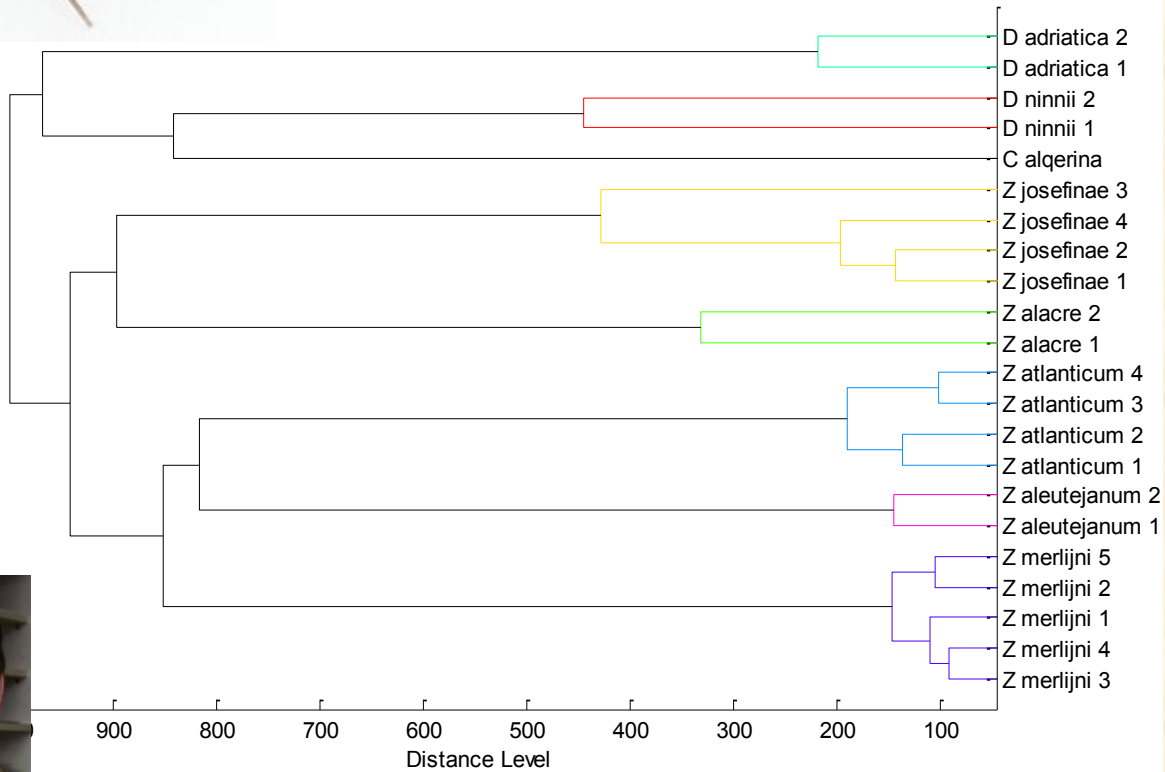


MALDI-MS profiling of spider venoms

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



MSP Dendrogram



Z. merlijni



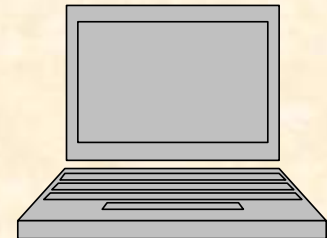
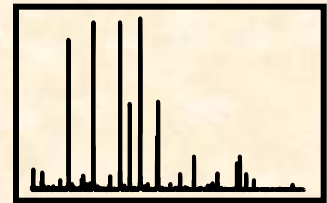
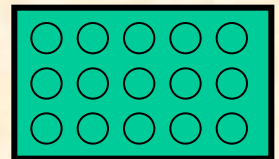
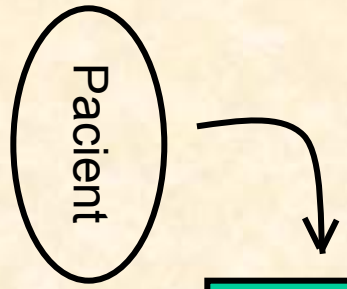
cooperation with prof. Pekar, FS MU

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)

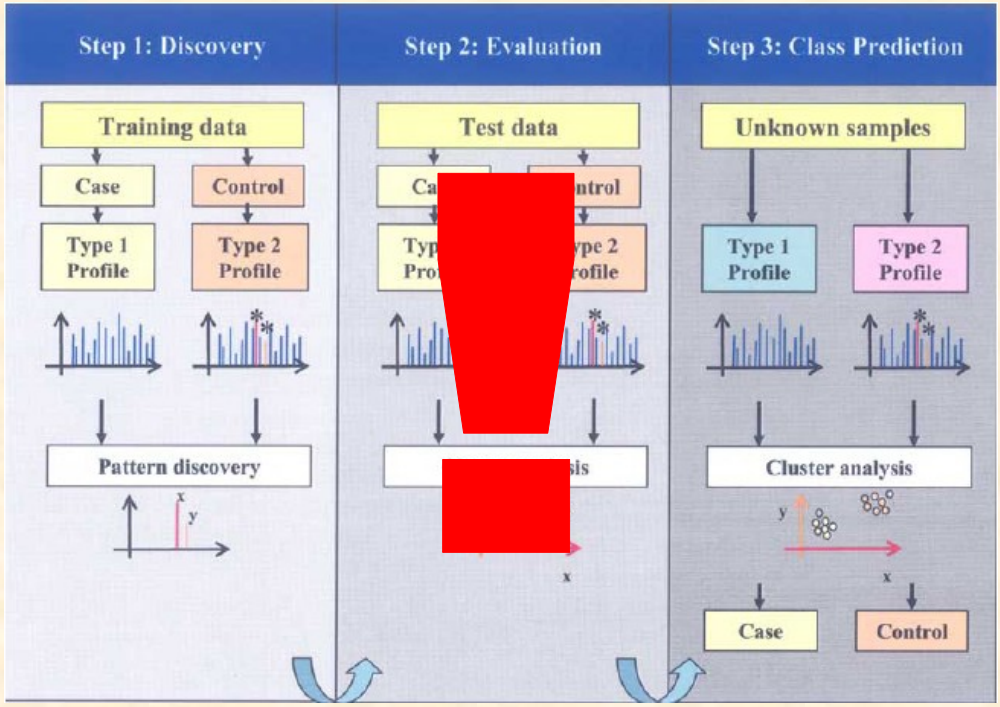
Analýza profilů –včasná detekce chorob (peptide profiling, pattern profiling)

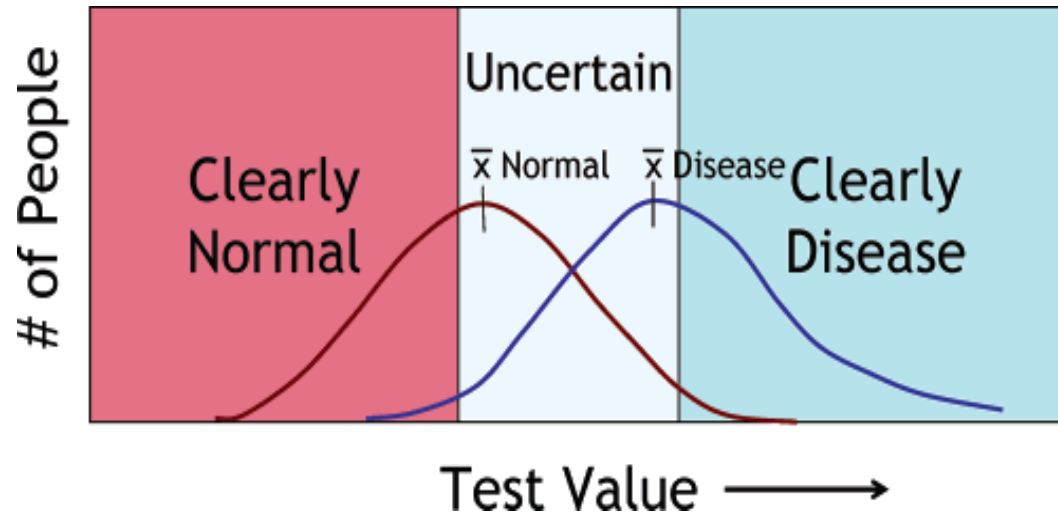


**žádná či minimální
úprava vzorku
(ionex, IMAC, afinitní
sorbent)**

**MALDI MS, SELDI MS
(3 – 20 kDa)**

klastrová analýza





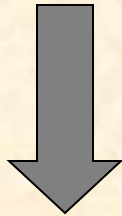
J. LaBaer et al., J. Proteome Res., 4 (4) 1053-1059 (2005).

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
LC**

srovnávání peptidového (proteinového)
složení vzorku „zdravého“ a nemocného
(statisticky relevantní soubory)

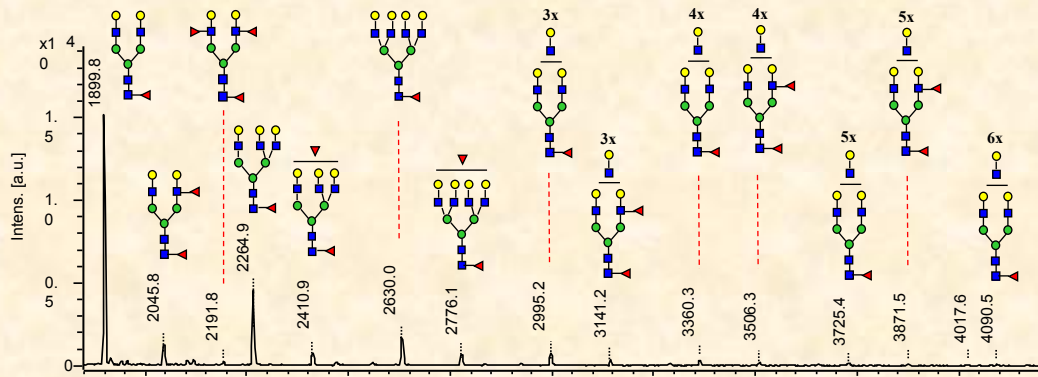
MS/MS

identifikace rozdílových proteinů

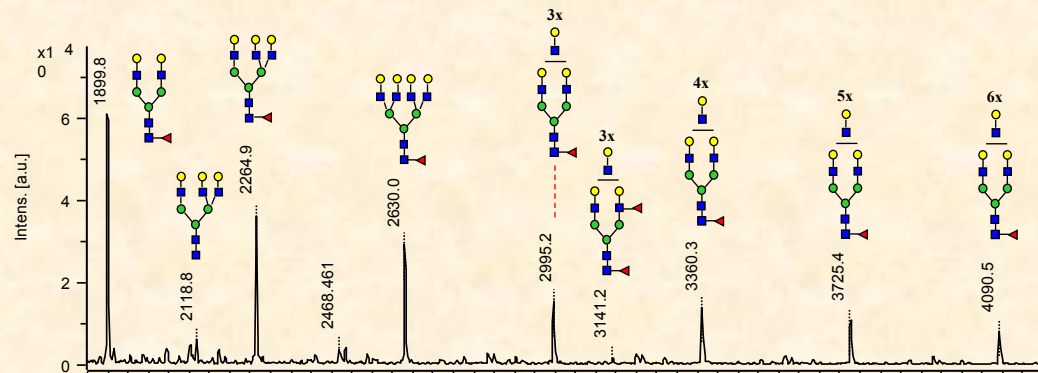


specifická protilátka
Imunodetekce
MS/Protein arrays

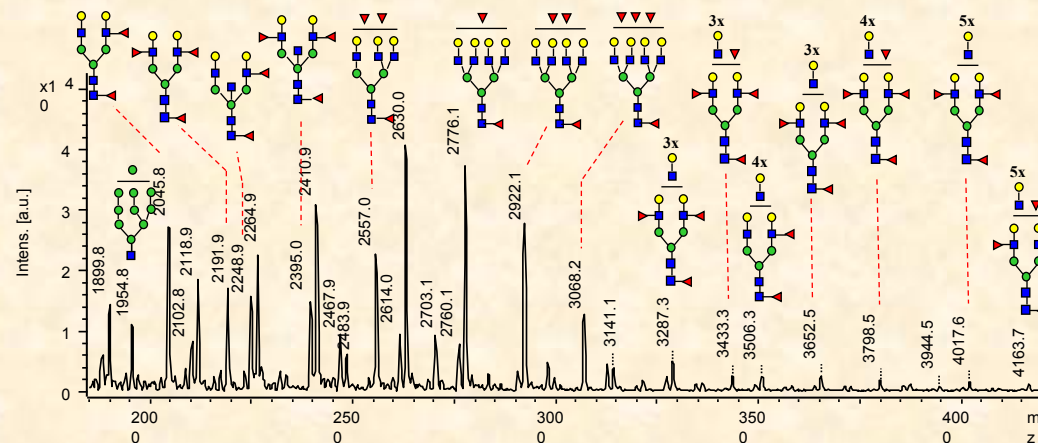
Glycan profiling and structural analysis of glycans



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)

KOST u SOBOTKY



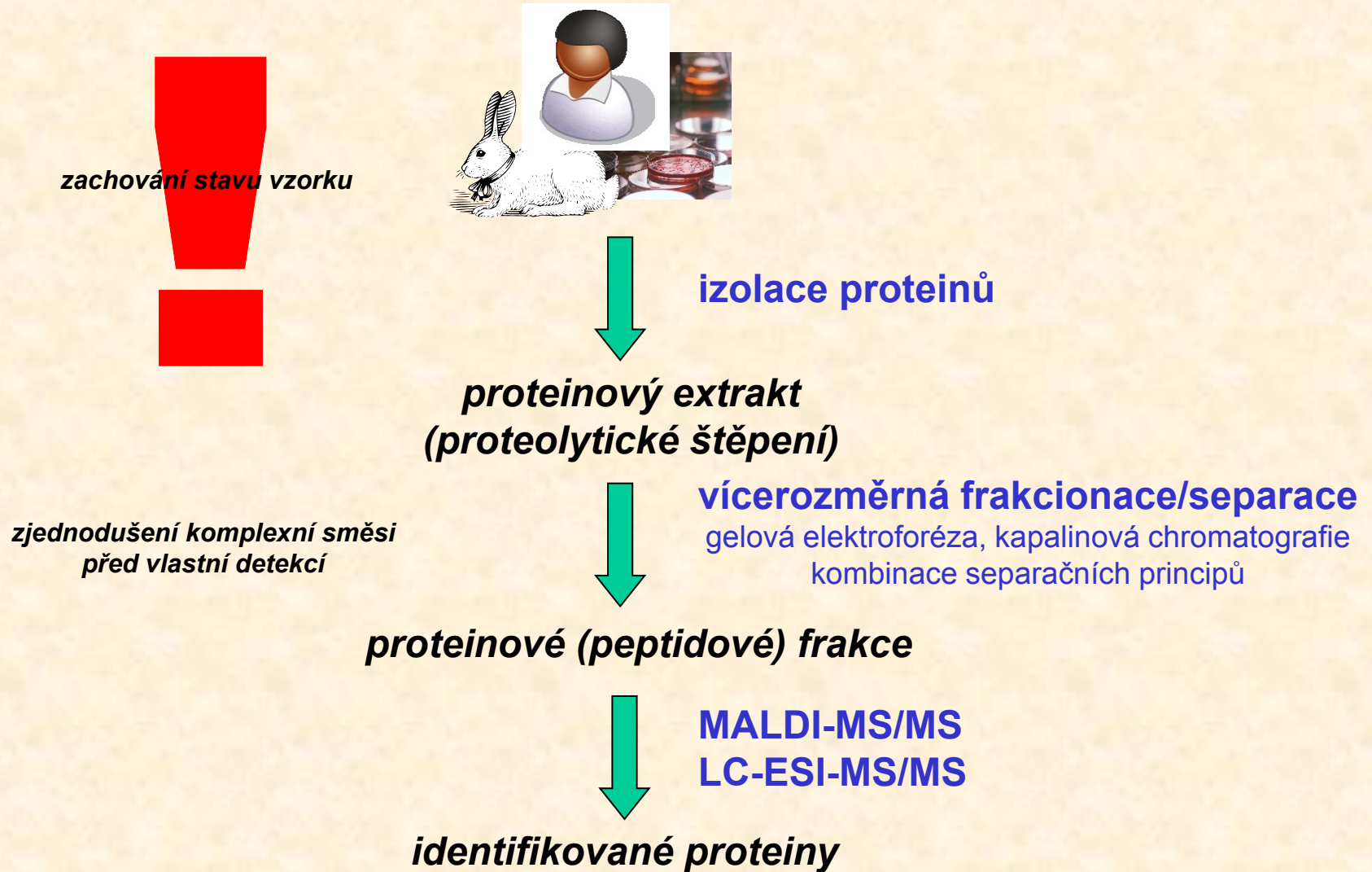
© Alka Č. Budějovic



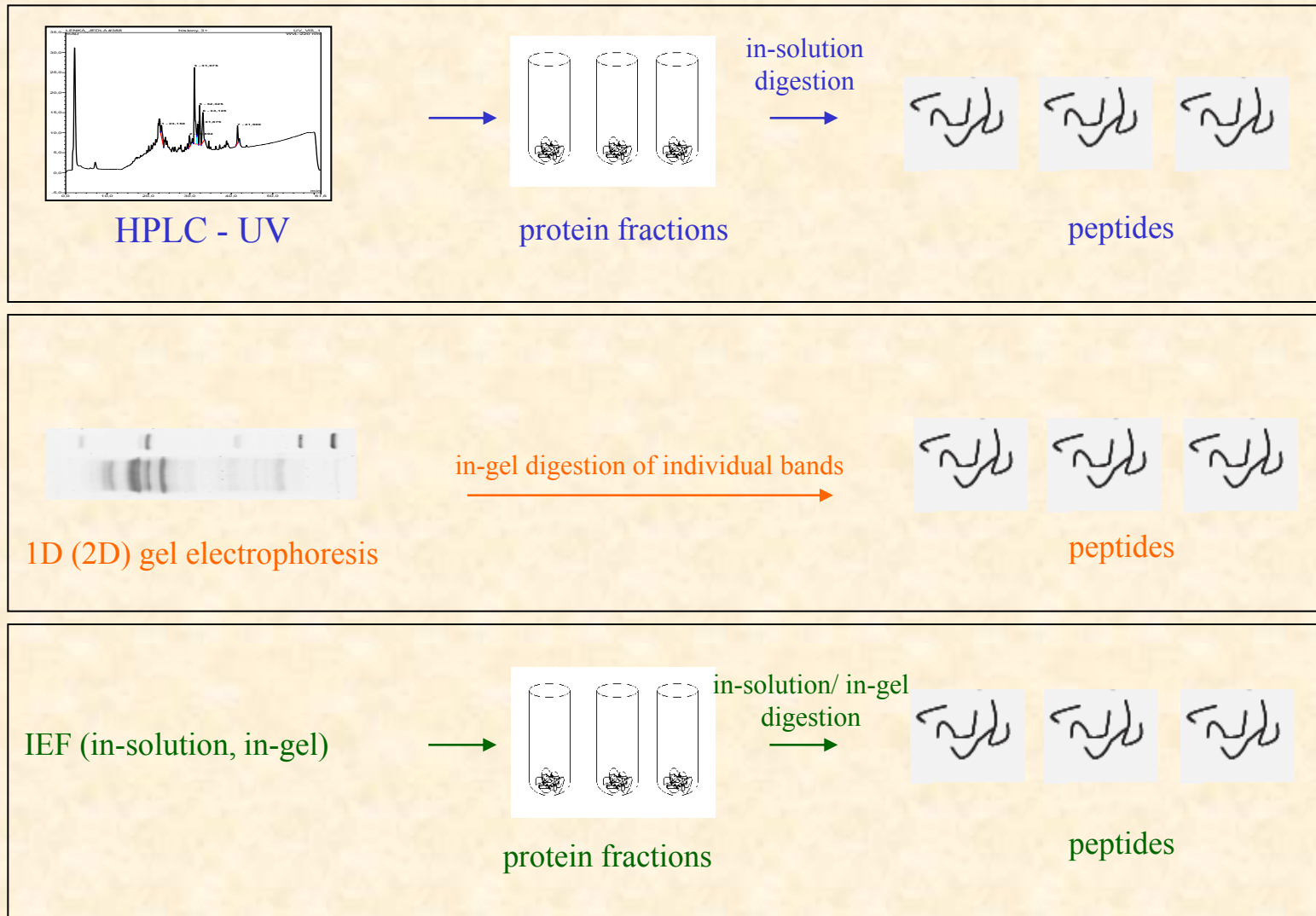
**Proteomické aplikace využívající „pouze“
identifikace proteinů**

Obecné schéma proteomického experimentu

Analýza komplexních směsí

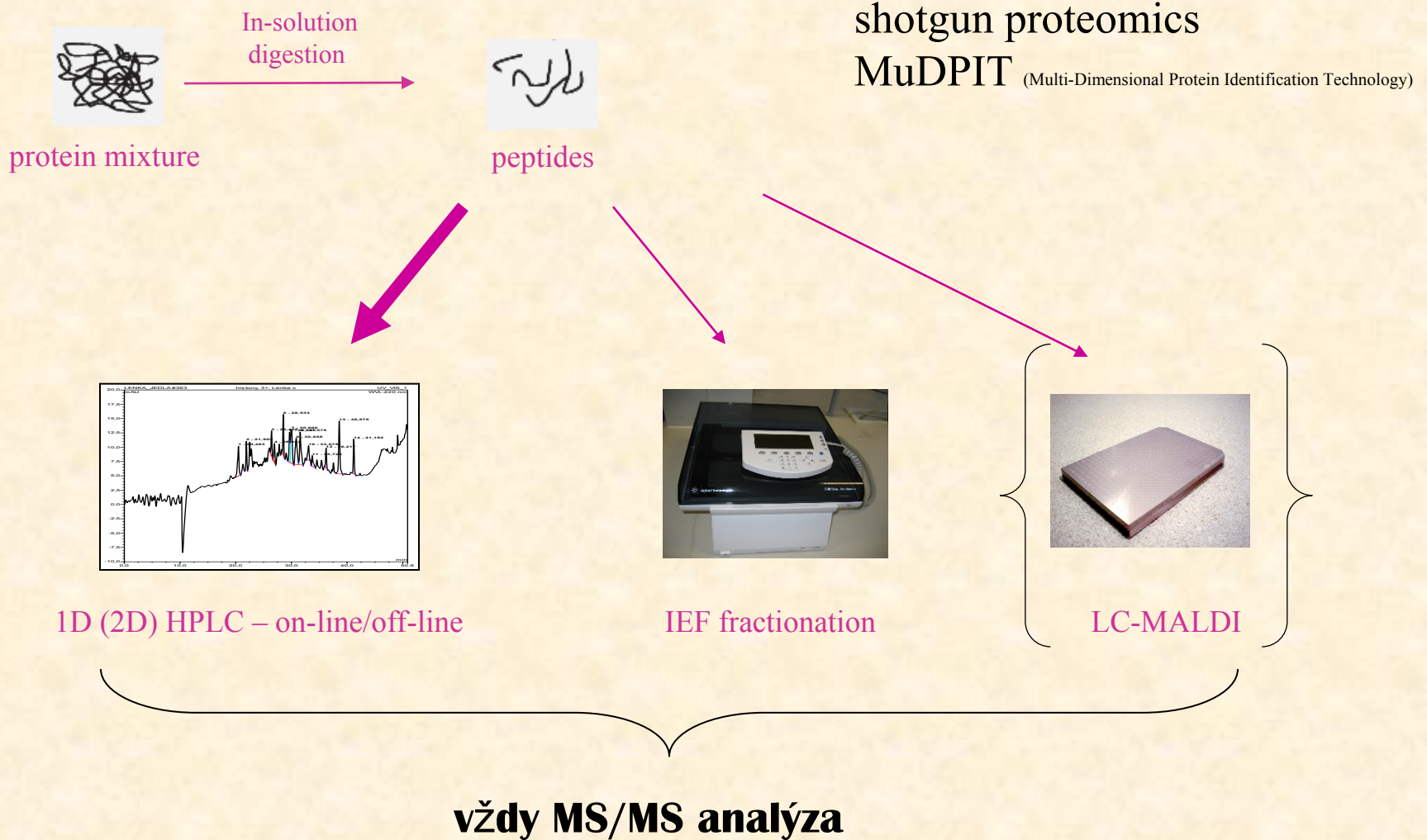


Separace proteinových izolátů na úrovni intaktních proteinů



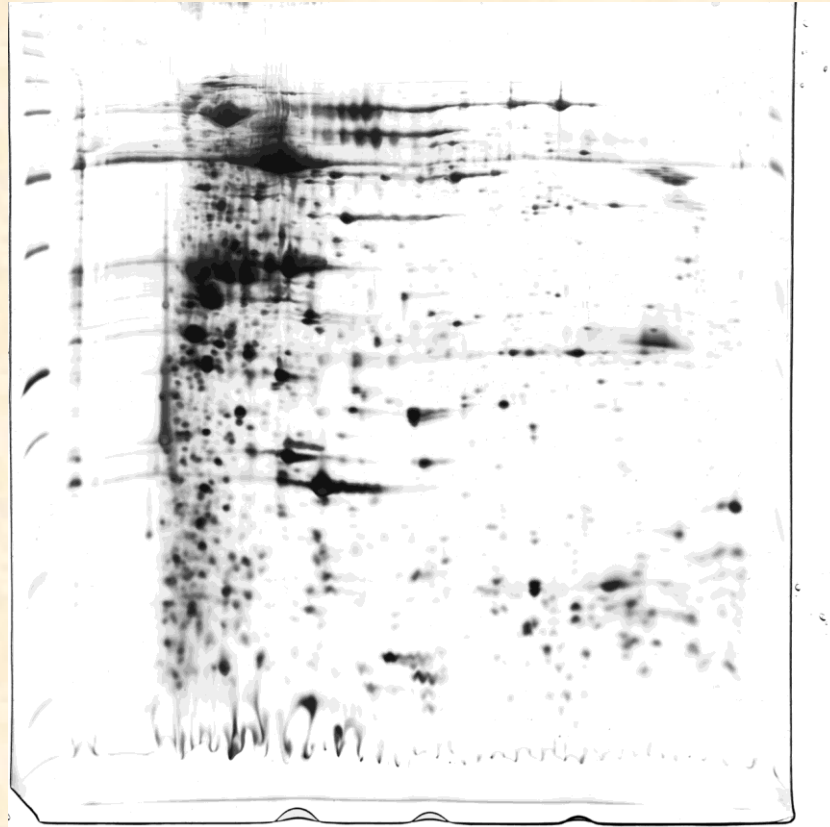
MS analysis

Separace proteinových izolátů na úrovni peptidů



Charakterizace proteomu

identifikace proteinů ve spotech, MS/MS techniky

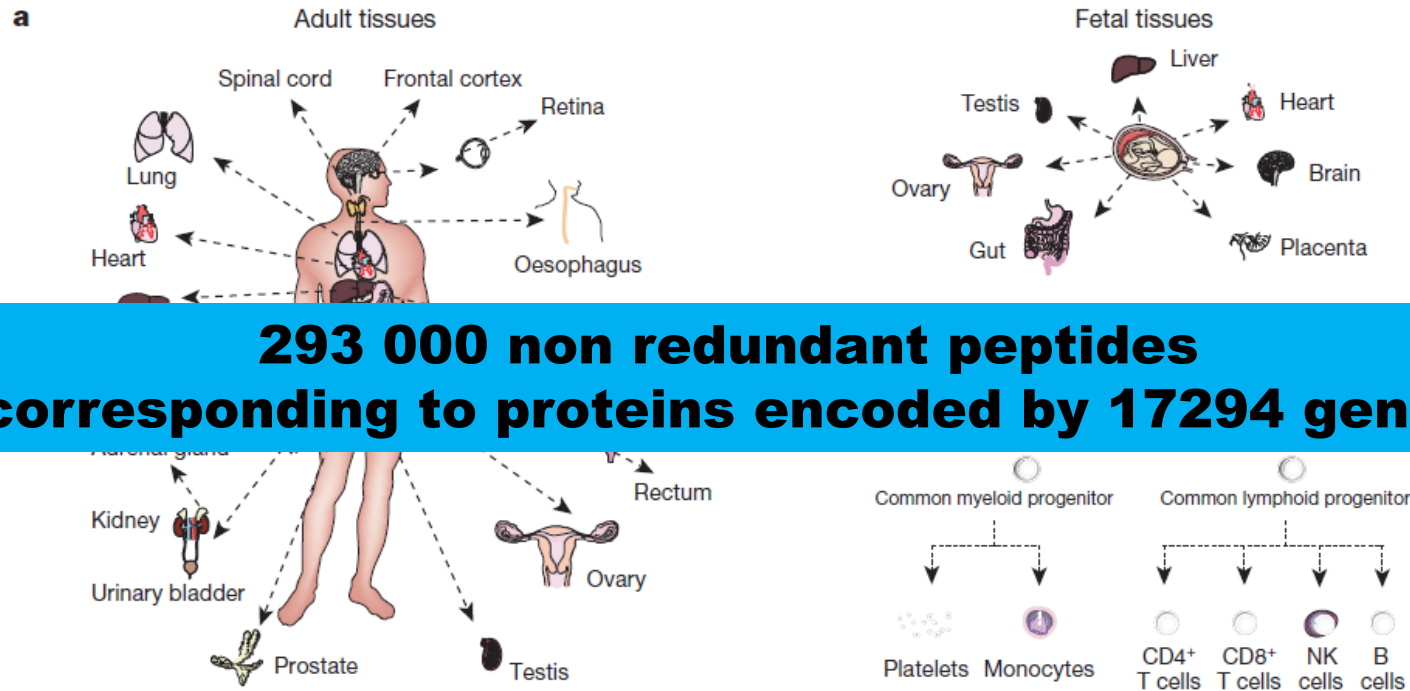


proteom stafylokokového fága 812, spolupráce s prof. Doškářem (ÚEB PřF MU)

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 (2014), doi:10.1038/nature13302



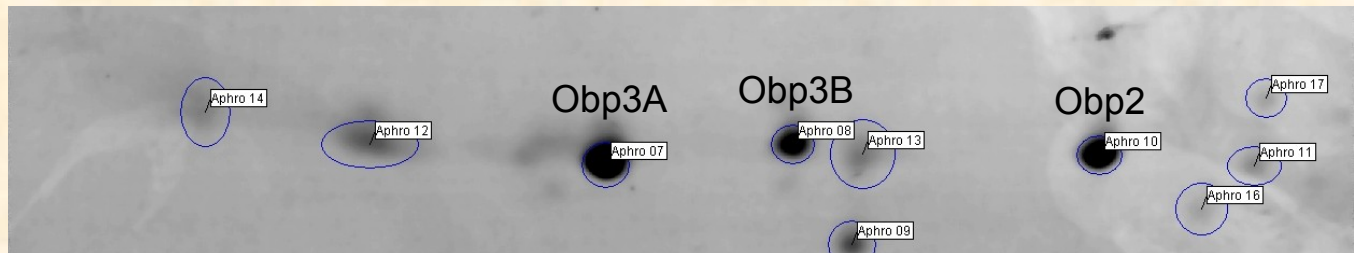
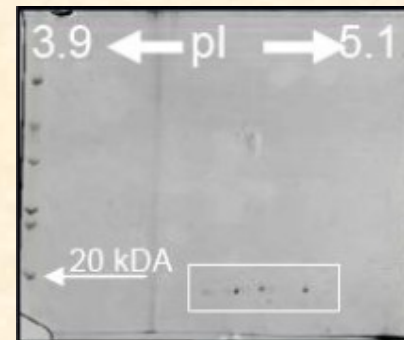
Ověření sekvence a určení izoforem OBP proteinů



Myodes glareolus

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

- Ⓢ není znám genom
- Ⓢ nejsou protilátky

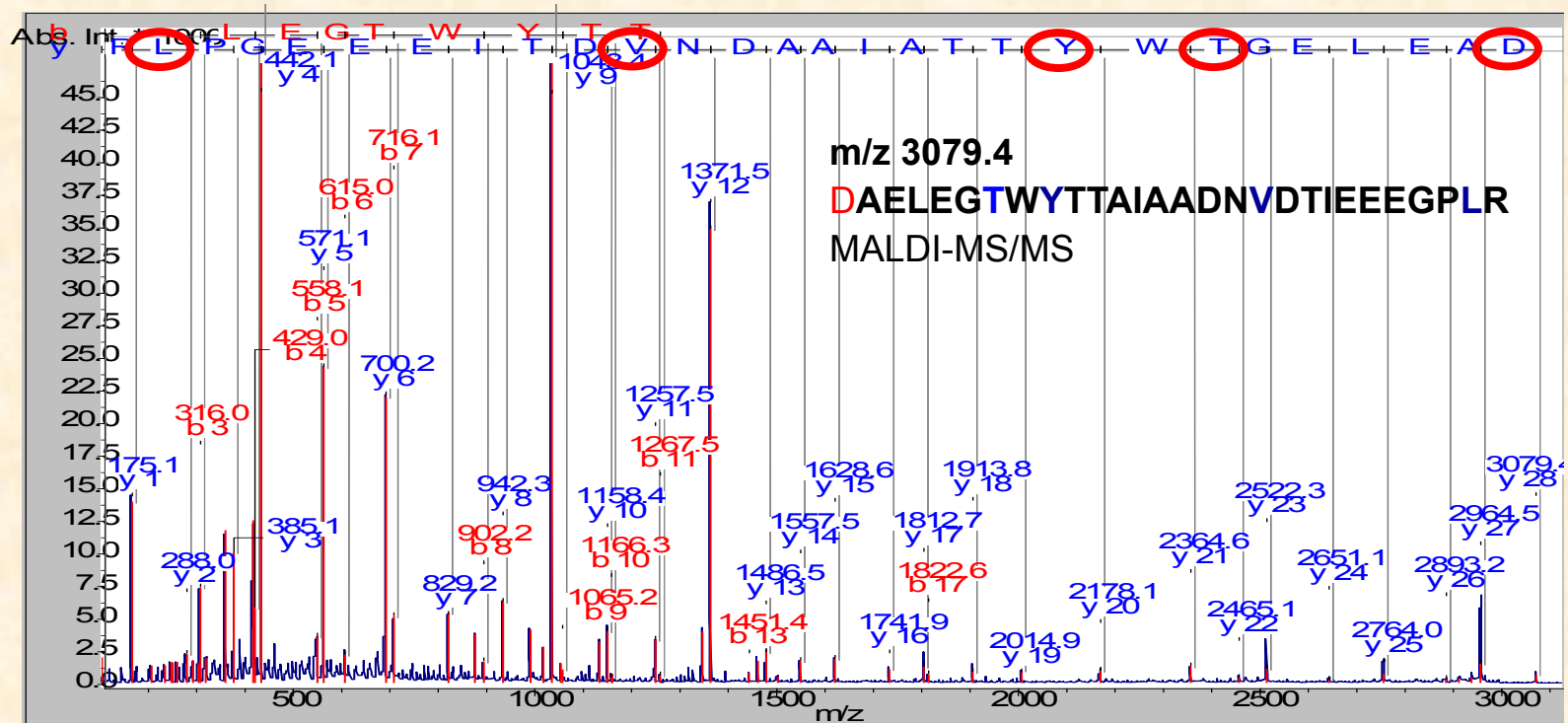


Ověření sekvence a určení izoformem OBP proteinů MALDI-MS/MS a LC-MS/MS manuální interpretace spekter

původní sekvence - QAELEGKWTTAIAADNIDTIEEEGPMR (OBP3)

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

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



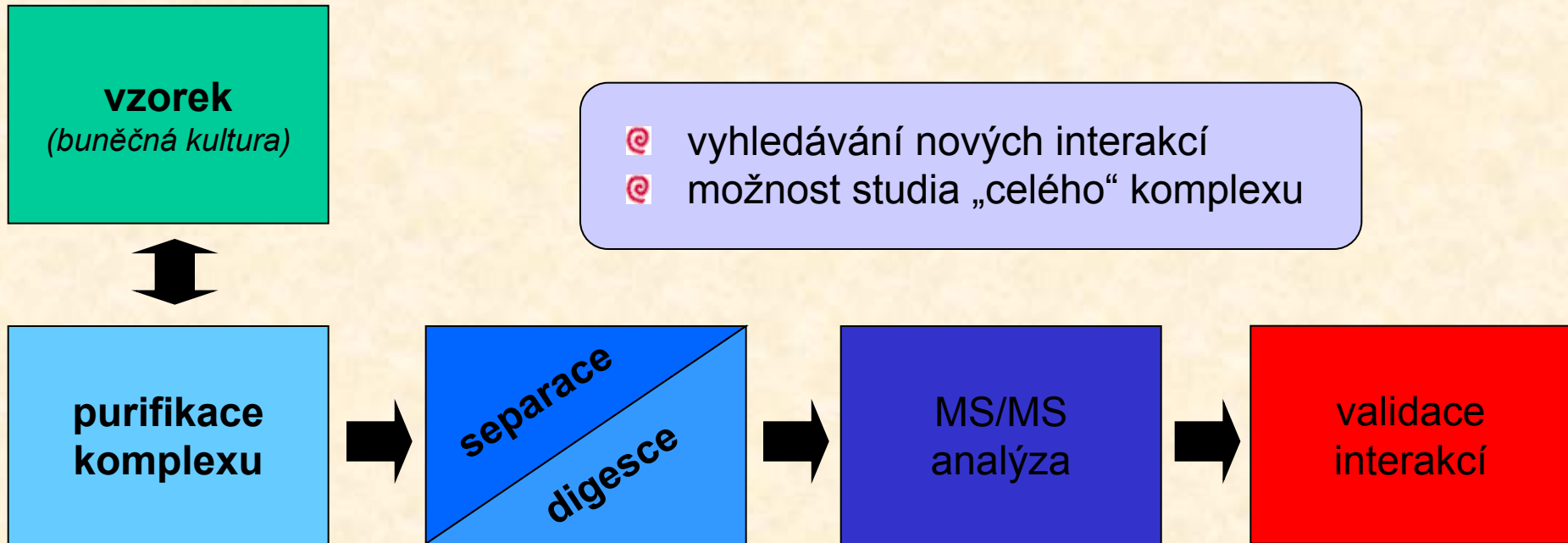
Charakterizace proteinových komplexů

funkční proteomika

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

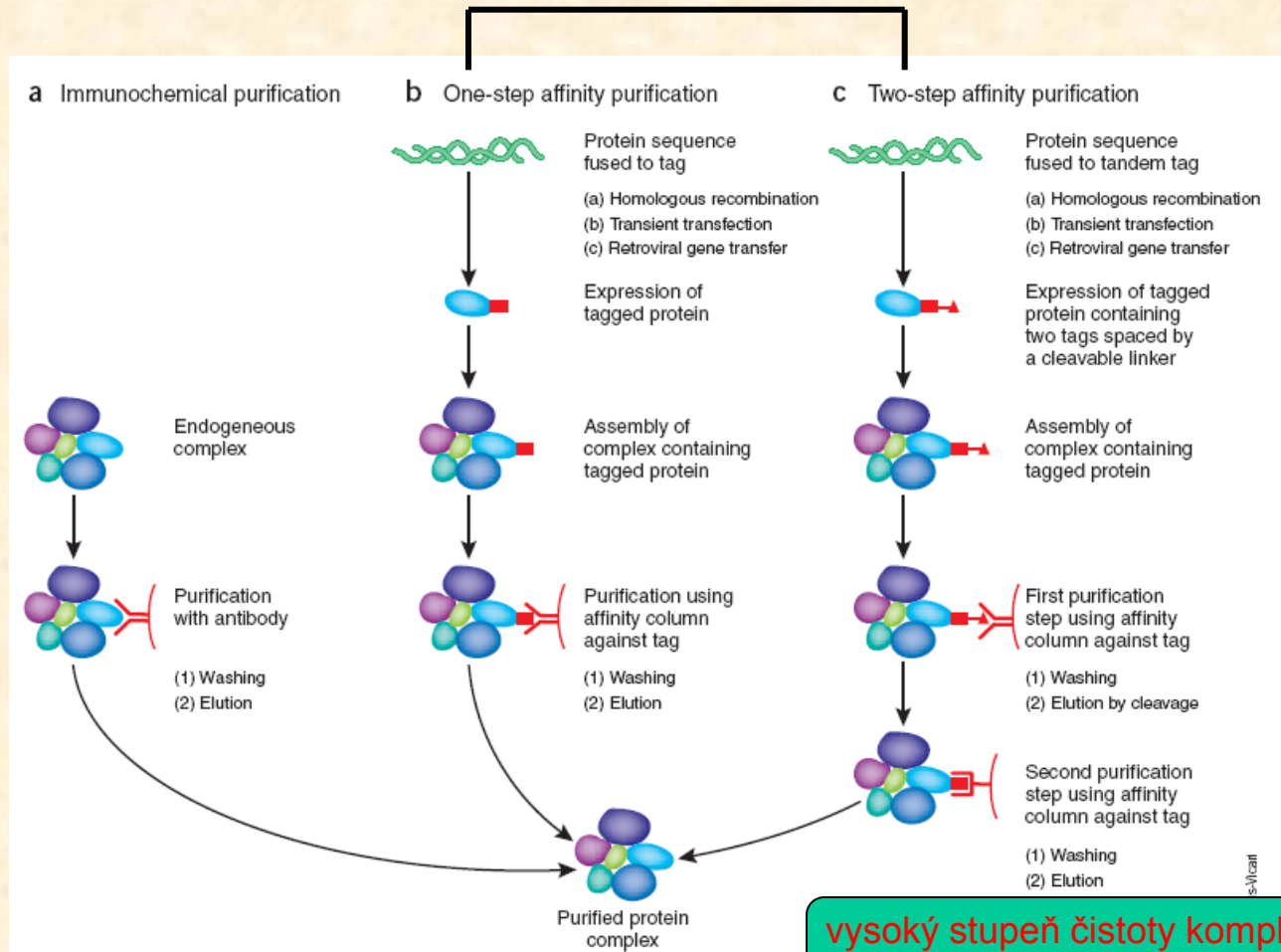
Ⓢ ~ 10000 typů interakcí

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



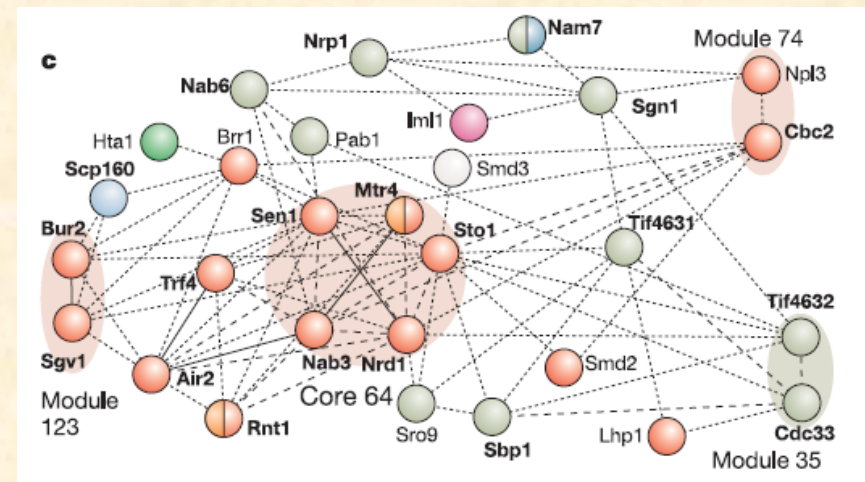
Purifikace proteinových komplexů

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

Proč?

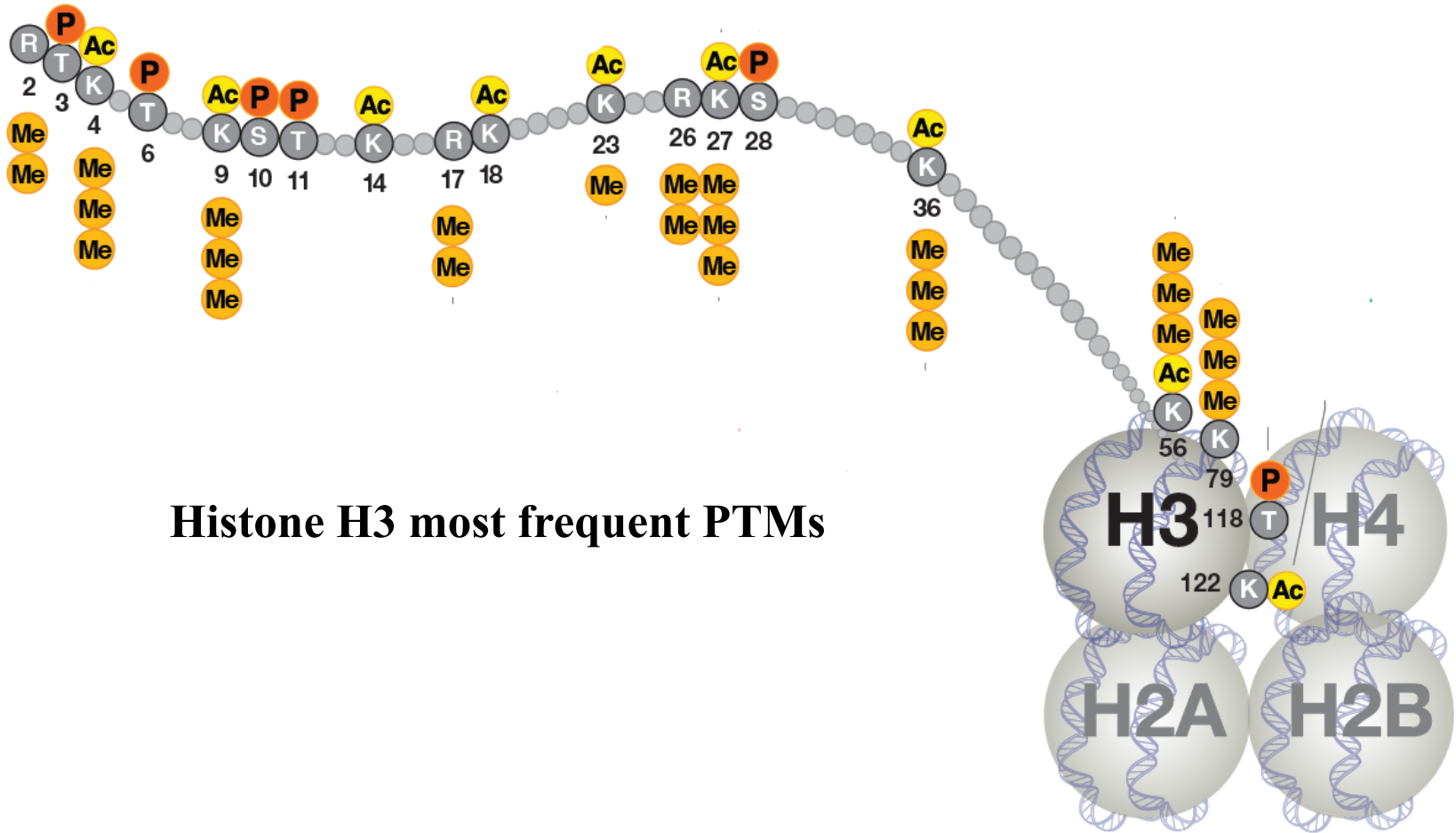
počet druhů PTMs > 400
počet PTMs \approx 90 000 (experimentálně identifikovaných)
 \approx 230 000 (predikce)
(SwissProt, per \approx 530 000 proteinů)

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



Phosphorylation of Dishevelled proteins

comparison of phosphorylation status of DVL3 induced by eight kinases

88 phosphosites detected after TiO₂ enrichment

DVL3	Control	CK1e	NEK2	PLK1	AuroraA	TTBK2	CK2a	RIPK4	PKCd
T 15	1	1	0	1	1	1	1	1	0
S 41	0	0	2	0	2	0	0	0	1
S 48	2	0	3	1	1	2	1	1	0
S 61	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S 76, S80, S 84	2	3	3	3	2	3	2	2	1
T 106 - S 140	3	3	3	3	3	3	3	3	3
S 175, S 176, S 177	3	3	3	3	3	3	3	3	3
T 178, S 181, S 182, S 199	2	1	2	1	1	1	1	0	0
S 188, S 192, S 197, T 198	3	3	3	3	3	3	3	3	3
S 199	0	0	1	0	0	1	0	0	1
S 202 - S 209	3	3	3	3	3	3	3	3	3
S 211	1	3	2	1	1	2	1	0	1
S 232 - S 237	3	2	3	3	3	3	3	3	3
S 244	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 251, Y 257	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S 263, S 268	3	3	3	3	3	3	3	3	3
S 280	0	1	1	0	0	0	0	0	0
T 288	0	1	2	0	0	0	0	0	1
S 311	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T 330, T 332	0	0	1	0	0	0	0	0	0
S 340	3	3	3	3	3	3	3	3	2
T 346	0	2	2	0	0	0	0	0	0
S 350	2	2	2	0	0	3	0	0	0
S 363	0	0	1	0	0	0	0	0	0
S 393, S 394	1	0	1	0	0	0	0	0	0
S 407, S 410	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S 421	3	2	3	3	3	3	3	3	3
S 424	1	1	1	0	0	1	0	0	0
S 445	0	0	1	0	0	0	0	0	0
T 459	0	0	2	0	0	0	0	0	0
S 469	1	0	0	1	1	1	1	1	1
T 485	0	0	1	0	0	0	0	0	0
S 505, S 512, S 513, S 516	3	3	3	2	3	3	2	2	2
S 559 - S 575	3	3	3	3	3	3	3	3	3
S 598 - S 612	3	3	3	2	3	3	3	2	3
S 622, S 625, S 630	3	3	3	3	3	3	3	3	3
S 636 - S 643	3	3	3	3	3	3	3	3	2
S 652	0	0	1	1	0	0	0	0	0
S 697	1	1	2	0	0	0	0	0	0
S 700	3	3	3	3	3	3	3	3	3



Phosphorylation of Dishevelled proteins

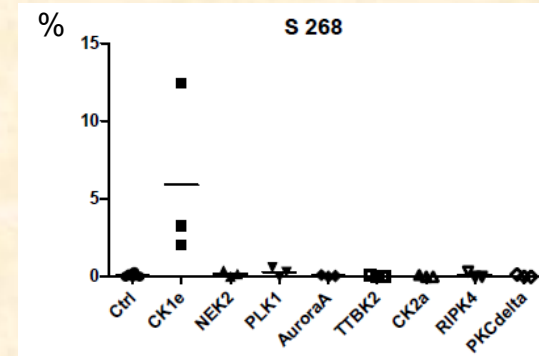
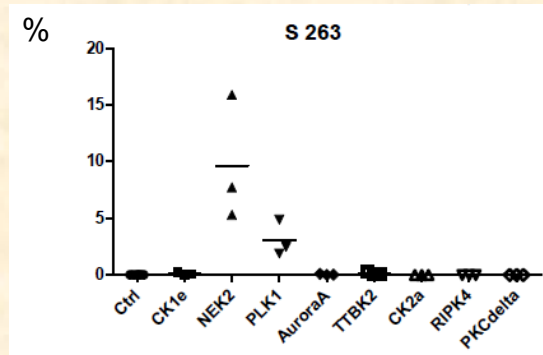
comparison of phosphorylation status of DVL3 induced by eight kinases

- direct analysis without TiO₂ enrichment → site occupancy info

21 phosphosites or clusters

Σ phospho

 Σ phospho + unmodified





Hanáková K. et al, *Cell Commun. Signal.*, 17, 170 (2019)

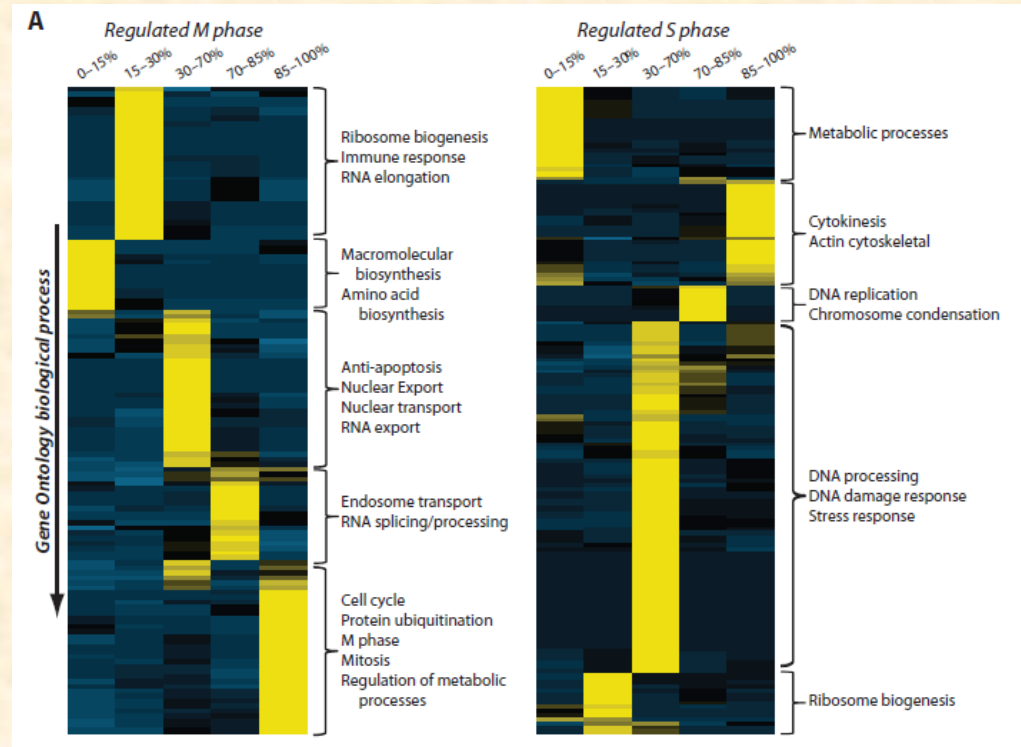
Analýza fosfoproteomu

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).

Acetylome analysis

histone and non-histone acetylations

**Cell lysis and
fractionation**
(lysis buffers)

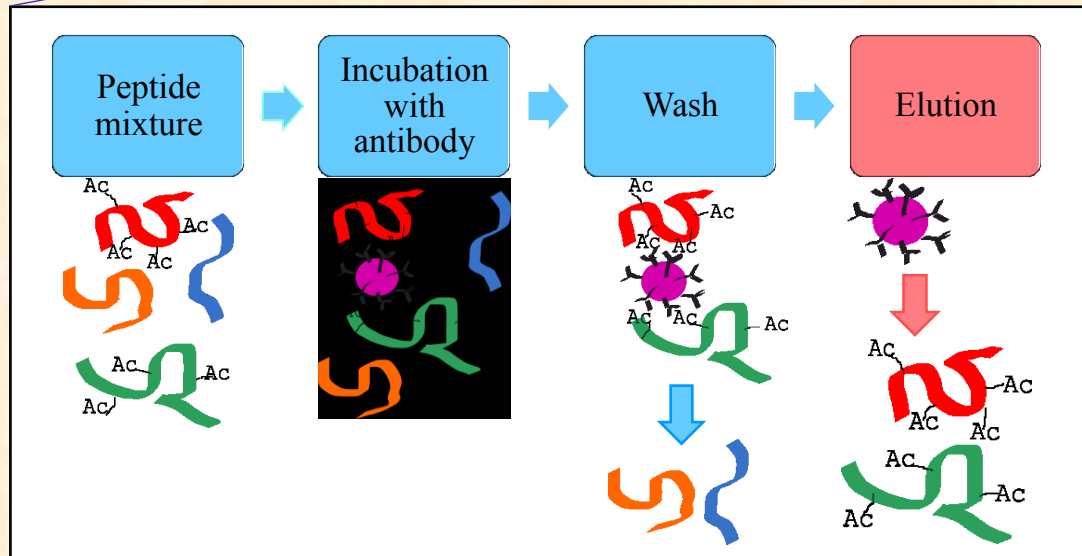


**In-solution
digestion**
(reduction/alkylation,
trypsin)

desalting



Immunoprecipitation
(monoclonal antibody,
2 hours)

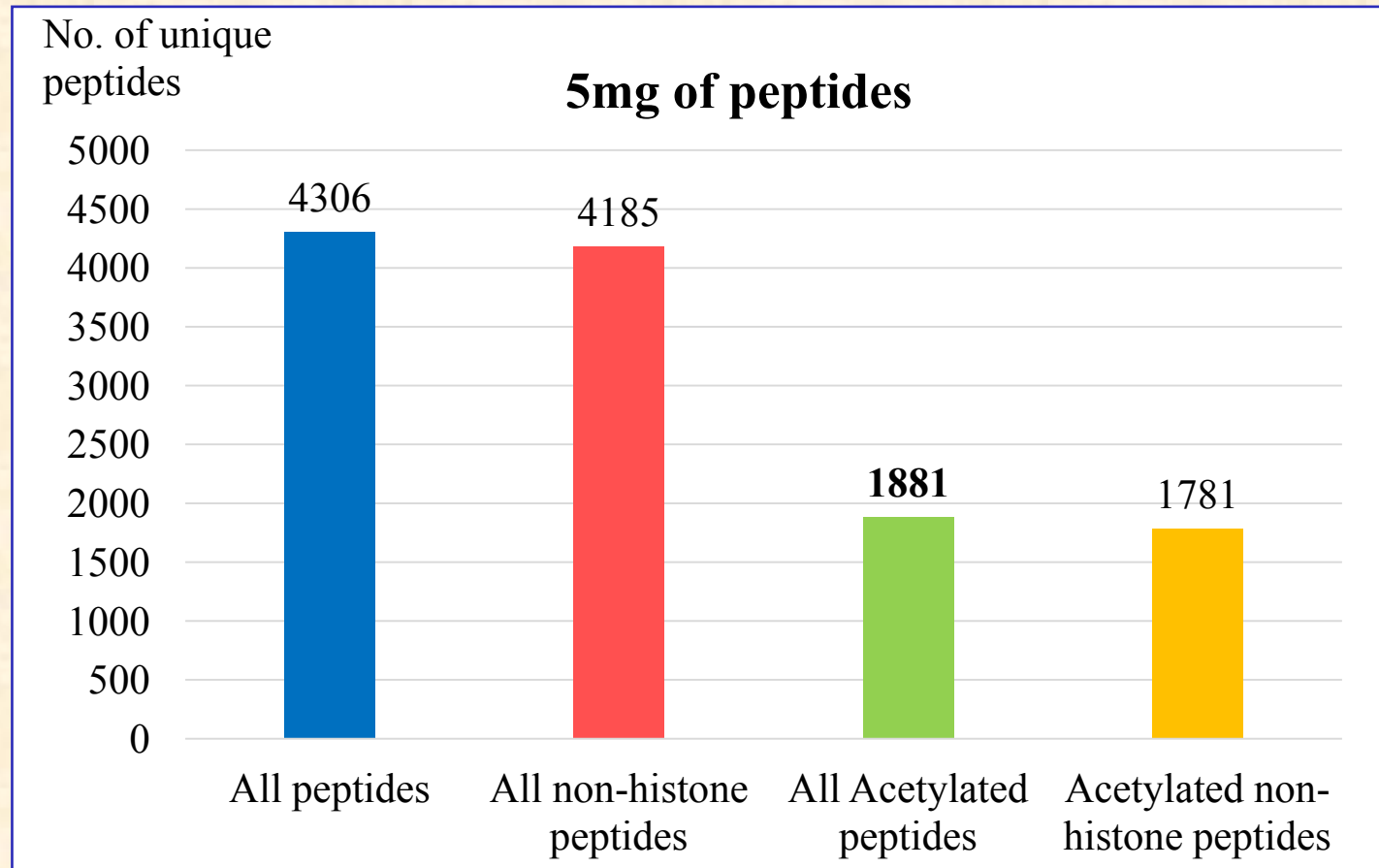


desalting

LC-MS/MS

Acetylome analysis

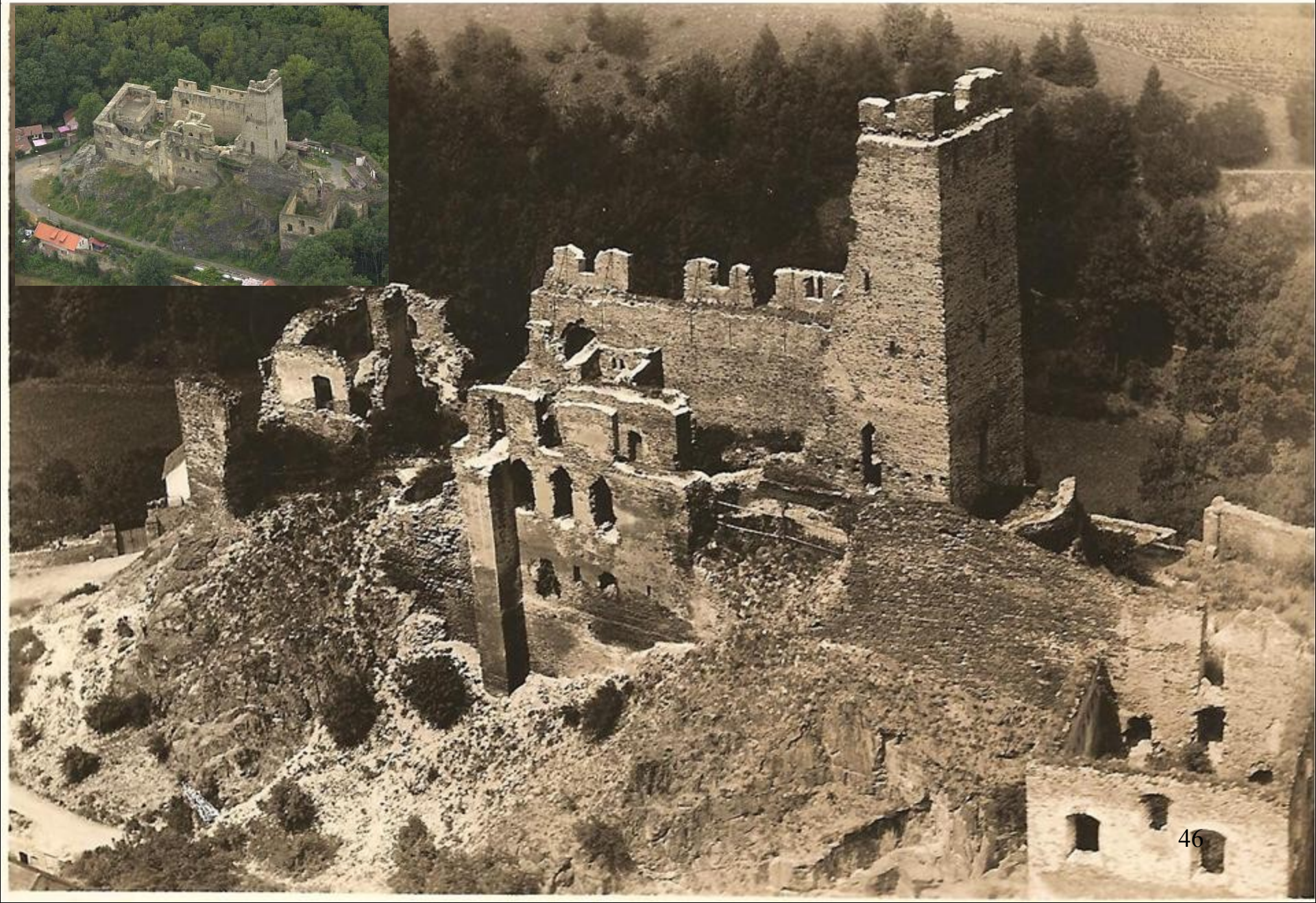
histone and non-histone acetylations



Sample: **lyophilized mouse liver tissue**

Ab - Cell Signaling kit

OKOŘ



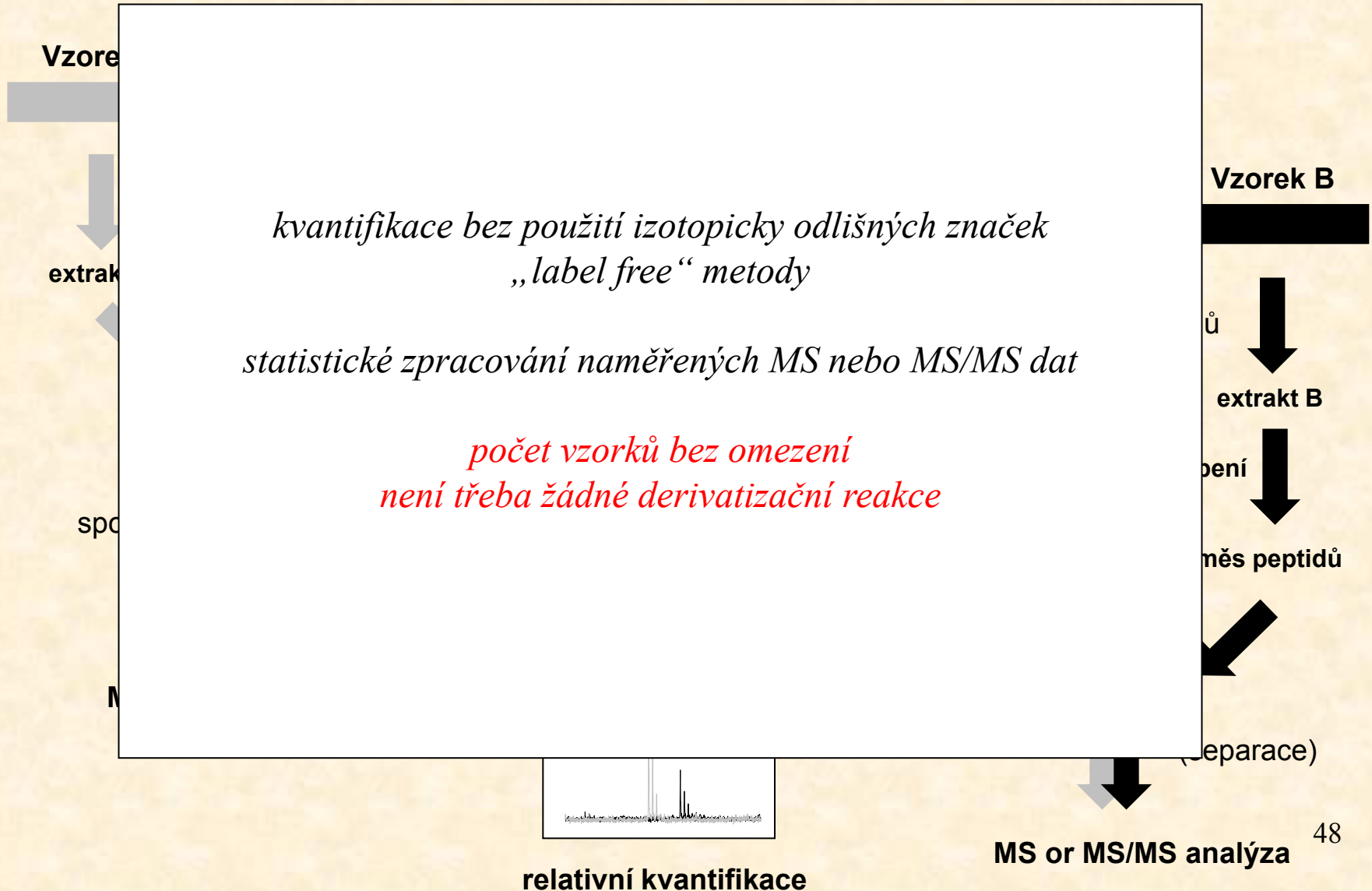
Proteomické aplikace - kvantitativní studie

Relativní kvantifikace

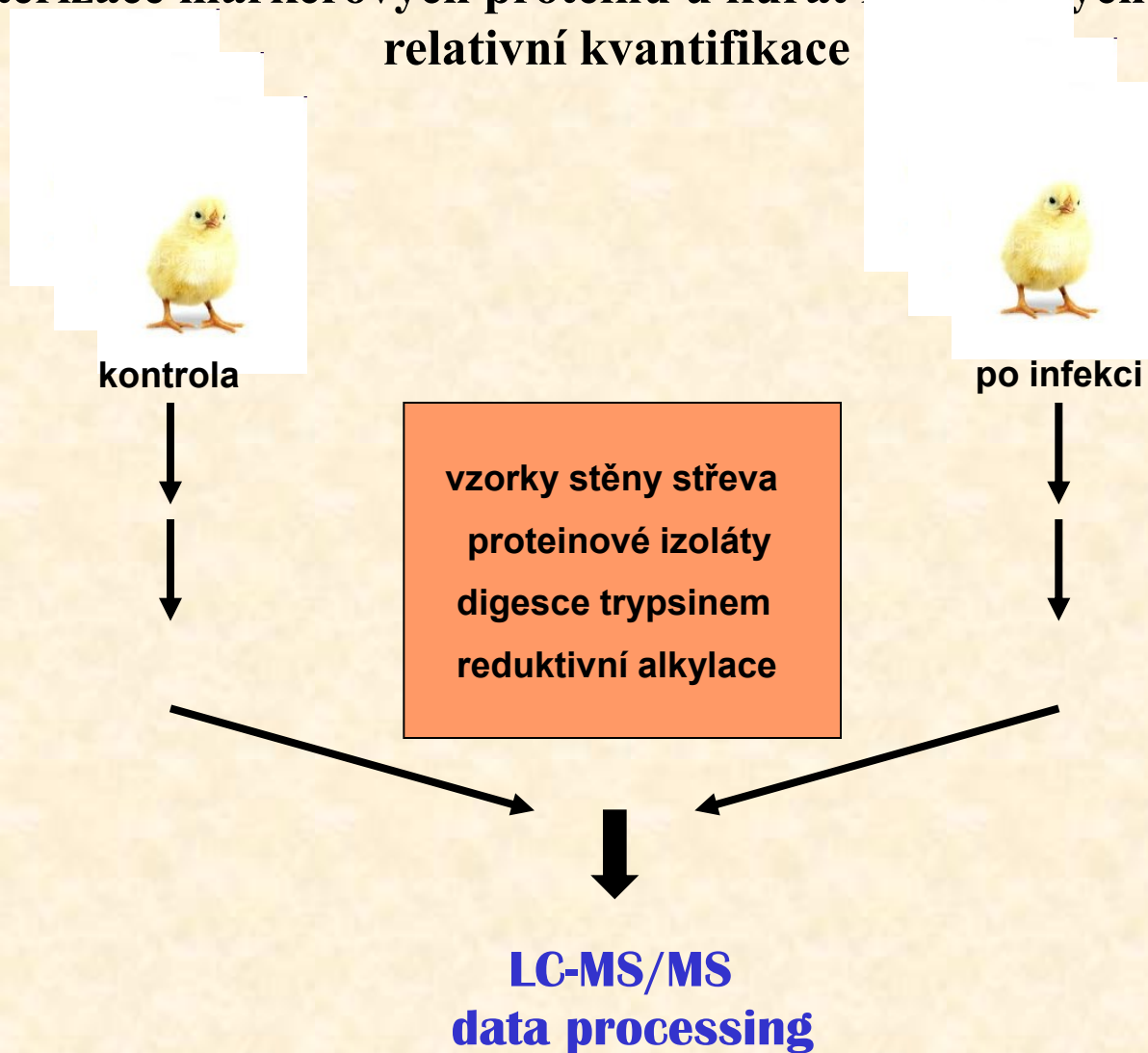
Absolutní kvantifikace

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	objasnění molekulárních mechanismů nalezení markerových proteinů pro časnou diagnostiku	30.221
56118294		25.497
363741459		24.786



ověření pomocí real-time PCR

The quantitative and condition-dependent *Escherichia coli* proteome

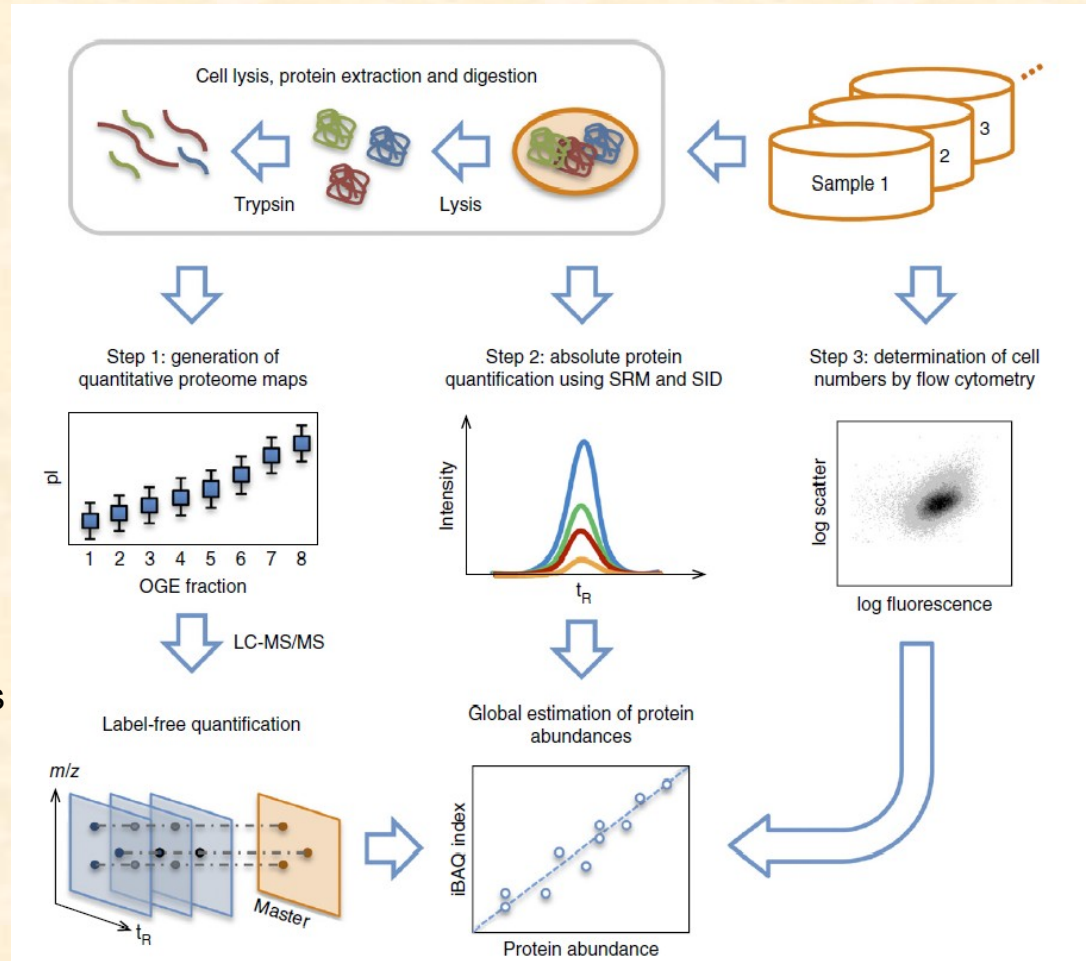
22 different growth conditions in biological triplicates.

- (i) growth on minimal media with an excess of different carbon and energy sources
- (ii) growth in glucose-limited chemostat cultures with varying growth rates,
- (iii) growth on glucose excess with different stress conditions,
- (iv) growth on complex medium, and
- (v) 1 and 3 d into stationary phase.

cellular protein concentrations for **55% of predicted *E. coli* genes** (>2,300 proteins)

41 proteins related to glycolytic pathway, tricarboxylic acid cycle enzymes and others was selected to absolute quantification

The **concentration range** of the 41 proteins covered more than **four orders** of magnitudes ranging from around **92,000 to only 2 copies per cell**.



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 (modified forms not counted)

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

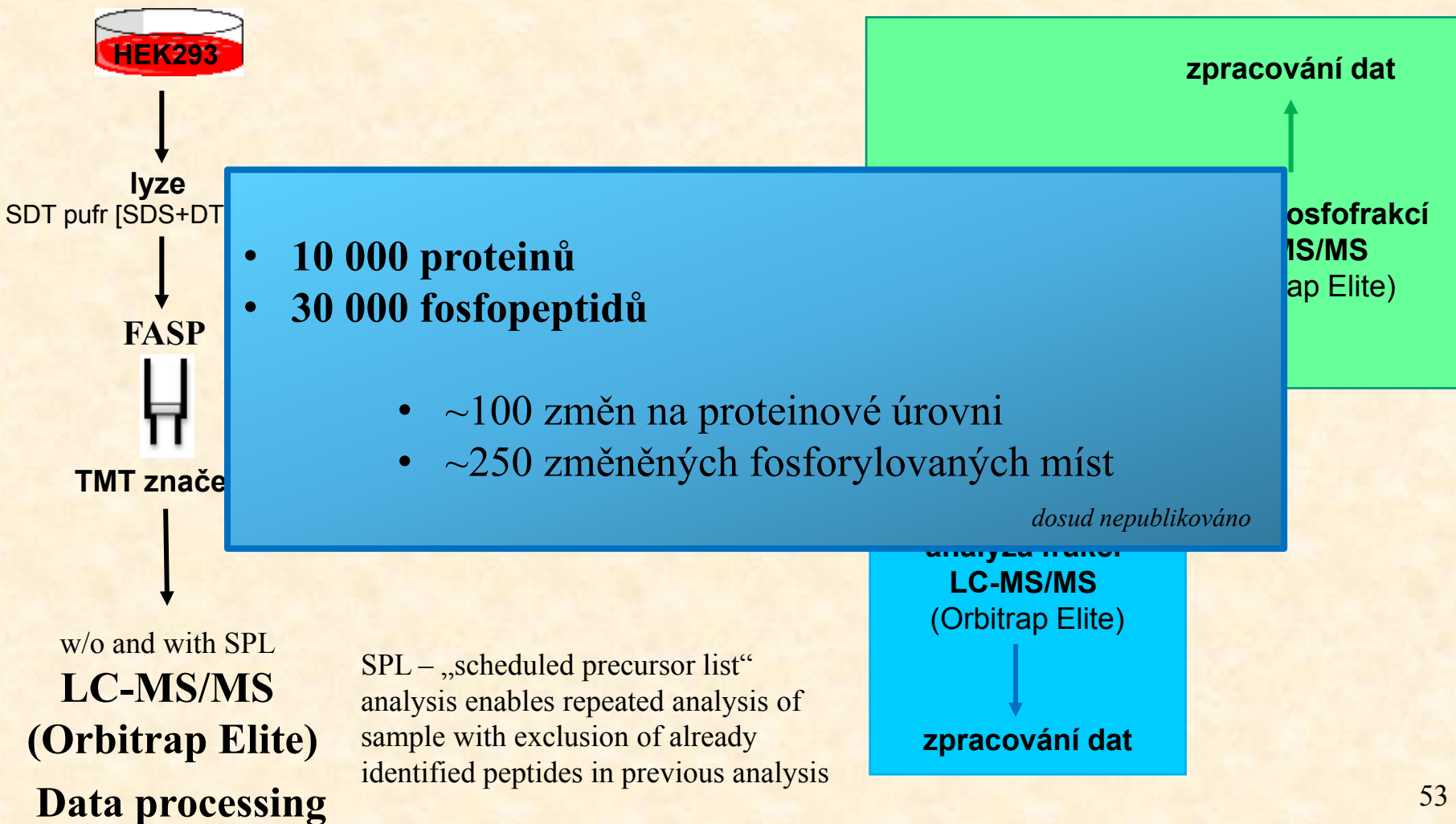
- organelle level
 - protein level
 - peptide level
-
- instrumentally (e.g. repeated analyses of the same sample with exclusion of already identified peptides, scheduled precursor list (SPL))

Charakterizace proteomu a fosfoproteomu buněčné linie HEK293

spolupráce s doc. V. Bryjou, PřF MU

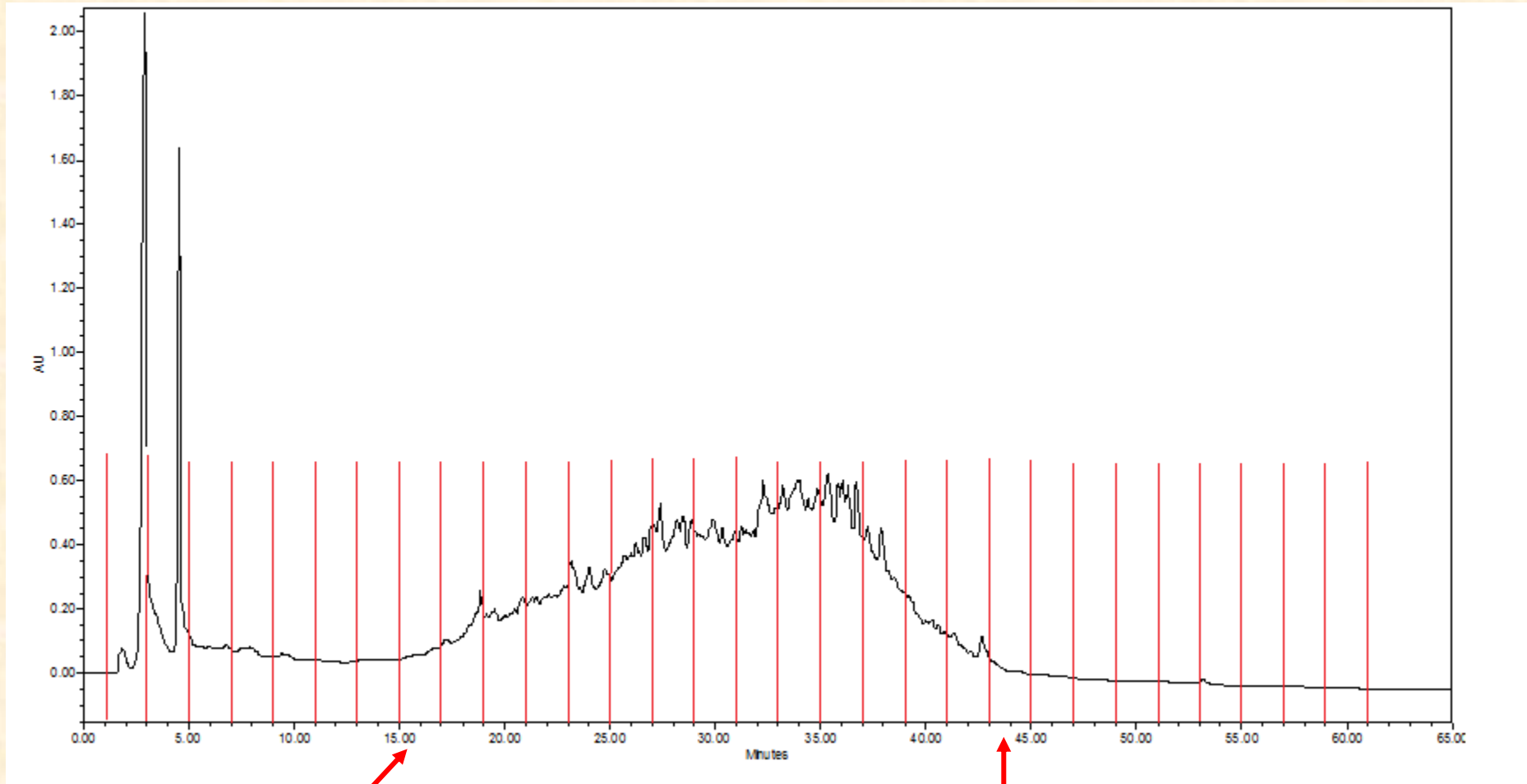
Wnt3a
aktivace
WT vs DVL KO
2 replikáty

2-D LC-MS/MS off-line



2-D LC-MS/MS off-line

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

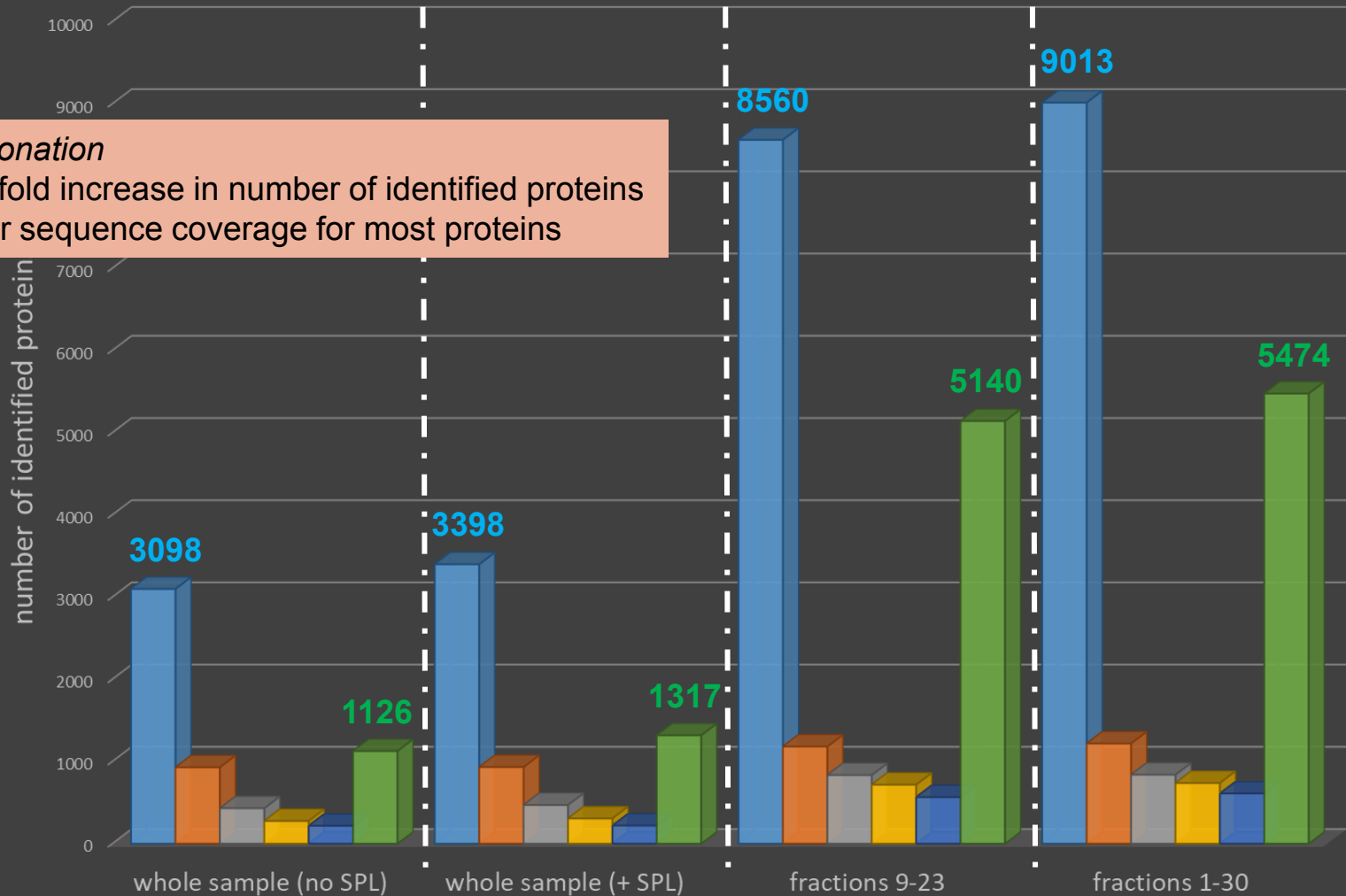


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Number of identified proteins

■ all ■ 1 pep ■ 2 pep ■ 3 pep ■ 4 pep ■ 5+ pep

Fractionation
three fold increase in number of identified proteins
Higher sequence coverage for most proteins



Cílená MS/MS analýza vybraných proteinů

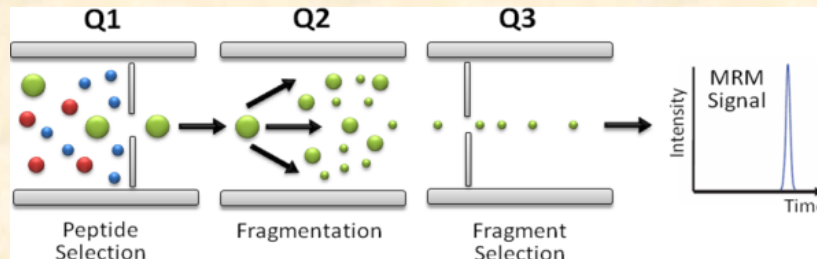
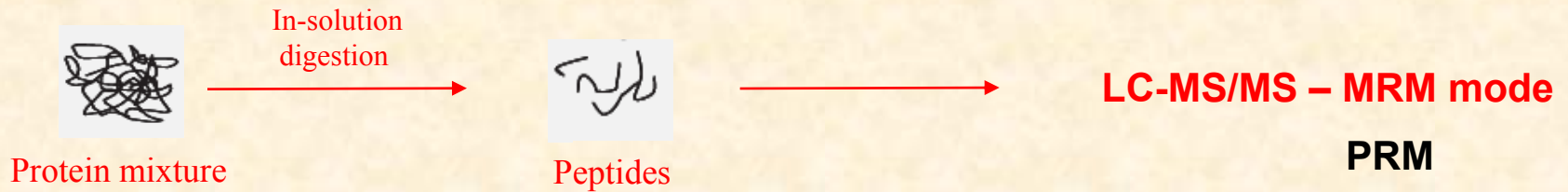
relativní /absolutní kvantifikace

multiple reaction monitoring (MRM)

screening – výběr kandidátního proteinu

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

vlastní analýza a zpracování dat

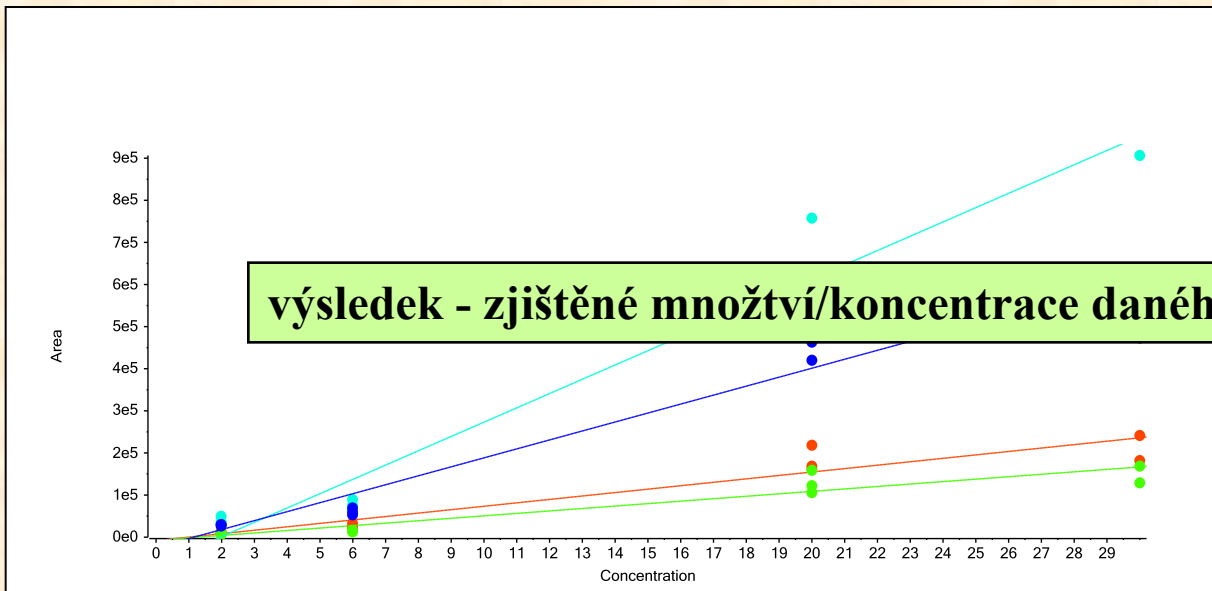
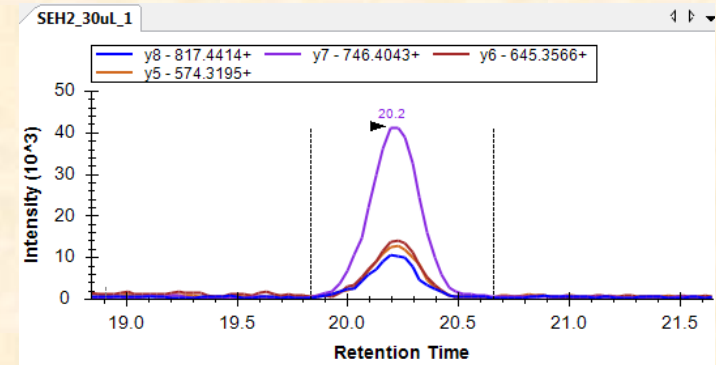


Kvantifikace enterotoxinů

cílená analýza vybraného proteinu

MRM

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

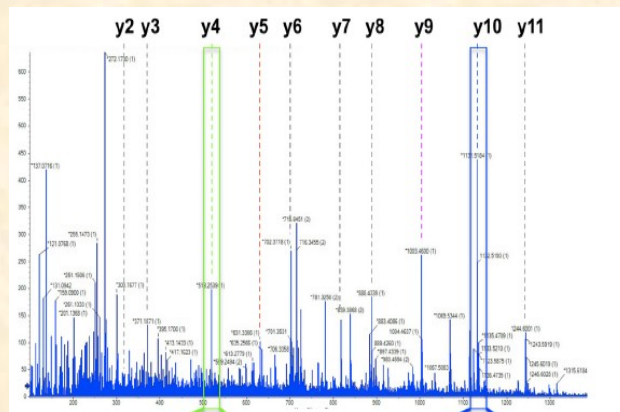


SWATH MS

Q-TOF, MS/MS < 10 ppm



Gillet et al, MCP, 11, 1-17 (2012)



- Relativní i absolutní kvantifikace
- Procesování dat –
 - srovnání s knihovny MS/MS spekter
 - klasické prohledávání proti databázím proteinových sekvencí

DDA vs DIA

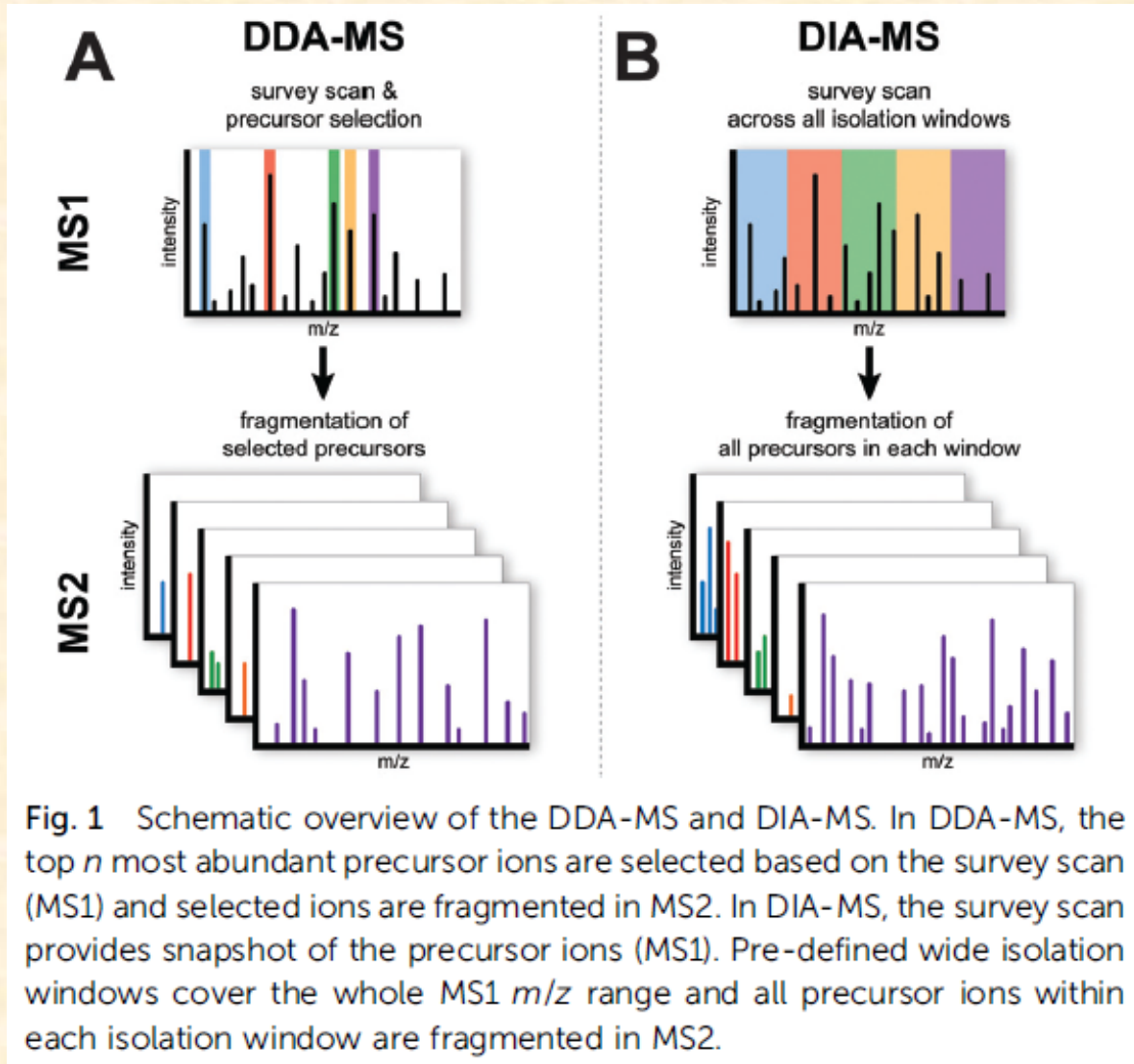
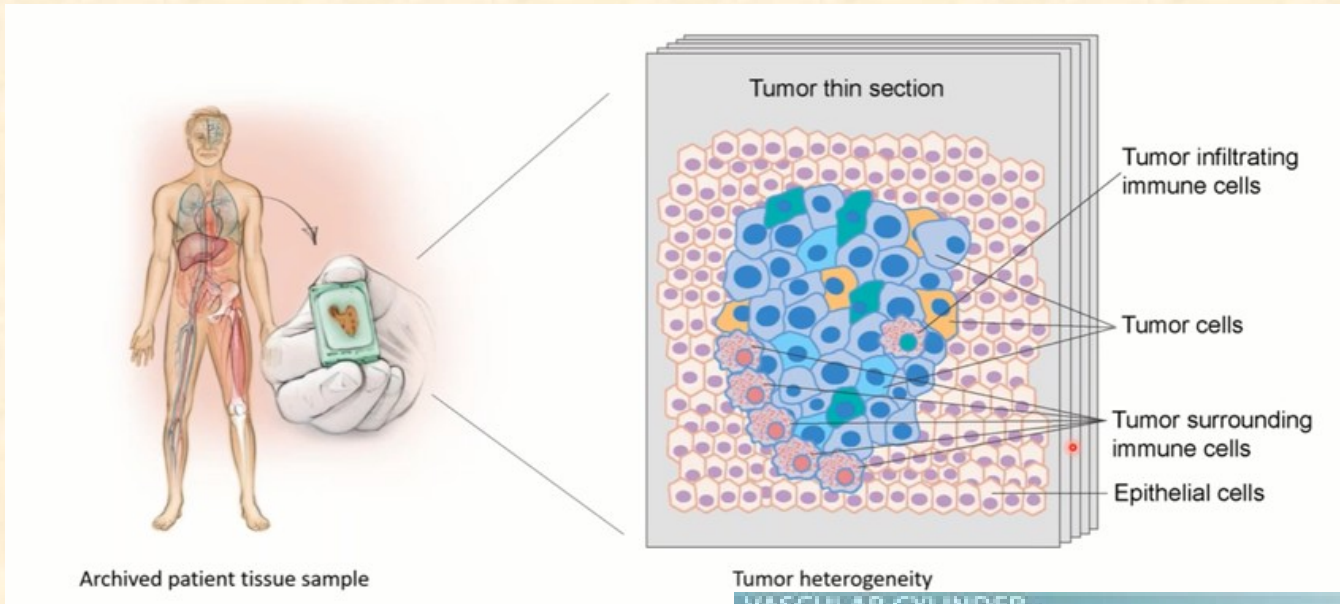


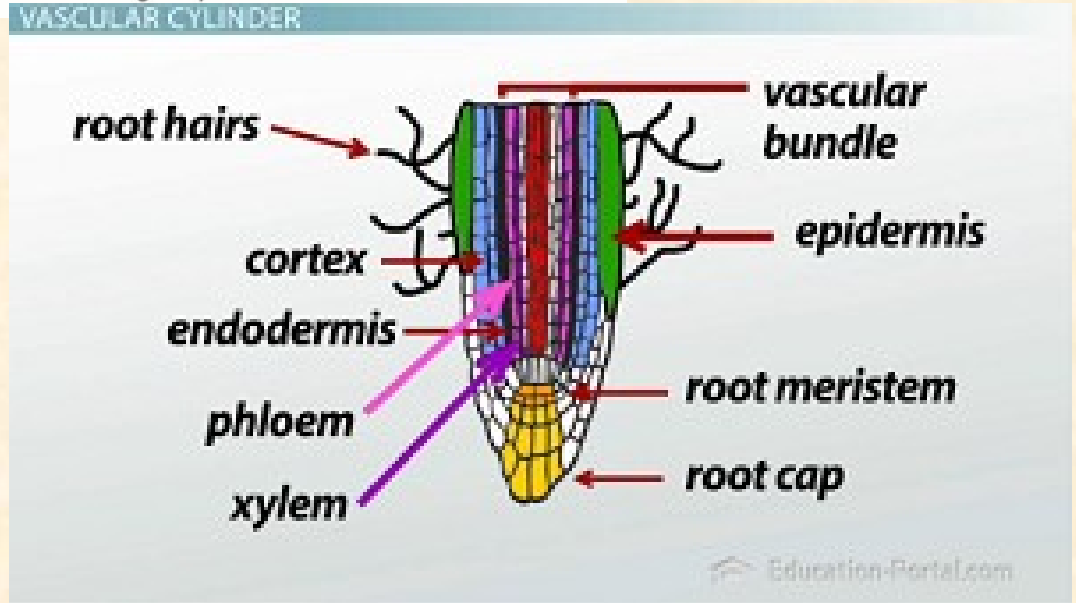
Fig. 1 Schematic overview of the DDA-MS and DIA-MS. In DDA-MS, the top *n* most abundant precursor ions are selected based on the survey scan (MS1) and selected ions are fragmented in MS2. In DIA-MS, the survey scan provides snapshot of the precursor ions (MS1). Pre-defined wide isolation windows cover the whole MS1 *m/z* range and all precursor ions within each isolation window are fragmented in MS2.

Single-cell proteomics

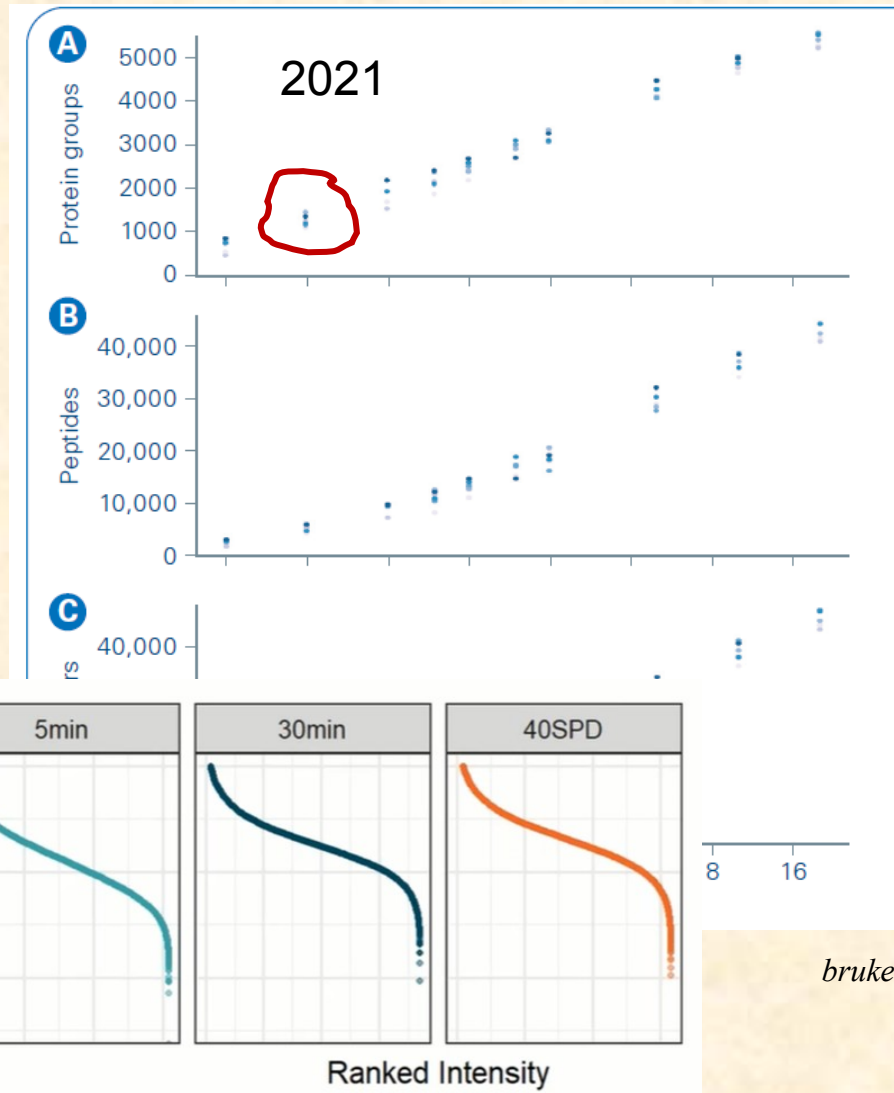
Why?



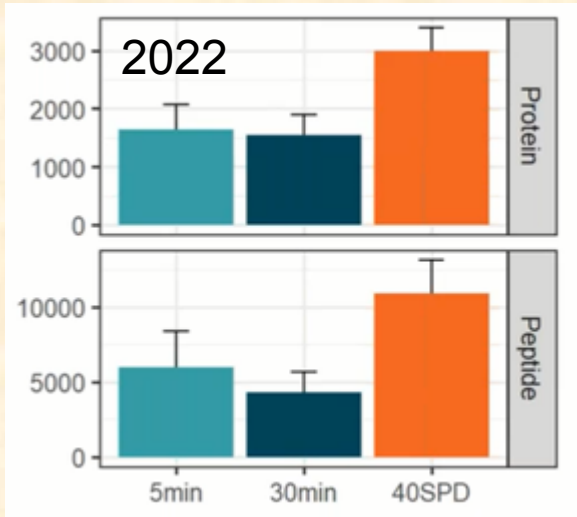
Tumor heterogeneity
VASCULAR CYLINDER



Single-cell proteomics



HEK293T single cells



bruker.com

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



Erik Schelkun / Elsestar Images