

MUNI | RECETOX

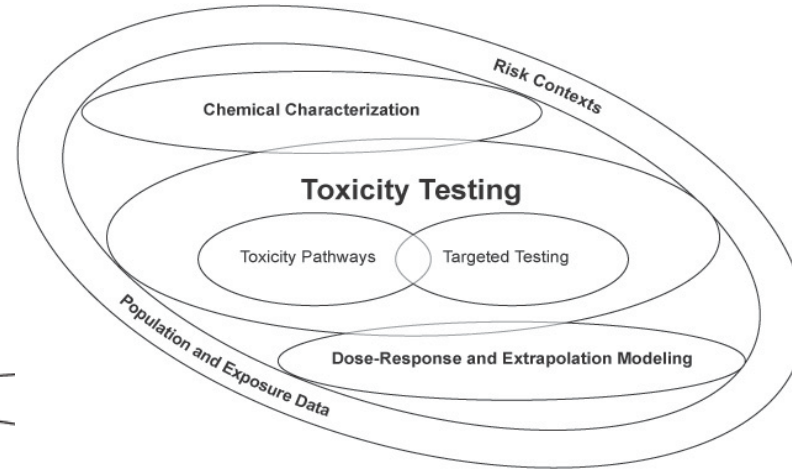
# Omics

Klára Hilscherová



# Studium procesů probíhajících v živých organismech

US National Academy of Sciences (National Research Council, 2007)



## Toxicity Pathways

- Evaluation of perturbations in toxicity pathways rather than apical end points.
- Emphasis on high-throughput approaches using cells or cell lines, preferably of human origin.
- Use of medium-throughput assays of more integrated cellular responses.

## Targeted Testing

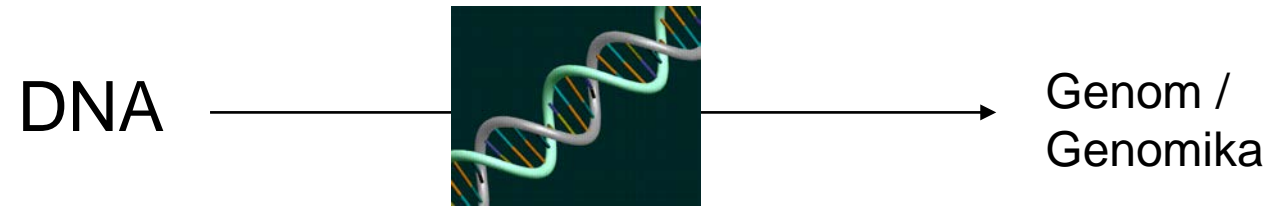
- Testing conducted to evaluate metabolites, assess target tissues, and develop understanding of affected cellular processes at genomics level.
- Limited types and duration of in vivo studies, focusing on up to 14-day exposures.
- More extensive testing for representative compounds in novel chemical classes.

Posun základního paradigmatu od sledování apikálních efektů u testovaných organismů ke studiu narušení fyziologických, biochemických a buněčných procesů

-> definování tzv. „**toxicity pathways**“

# Studium procesů probíhajících v živých organismech

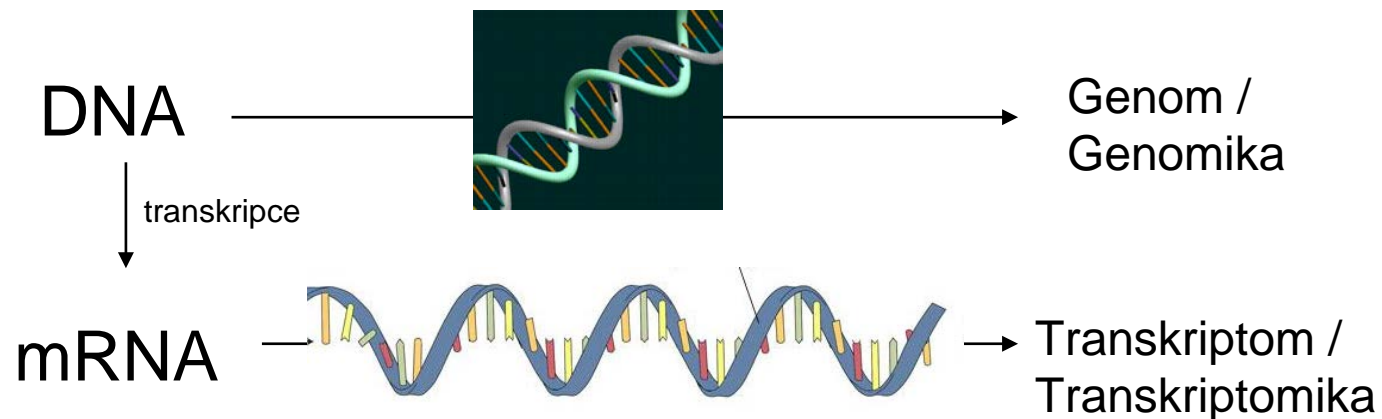
## - nové vědecké disciplíny



**Toxikogenomika** – objasňuje funkce genů a jak je celý genom zapojen v biologických procesech

# Studium procesů probíhajících v živých organismech

## - nové vědecké disciplíny

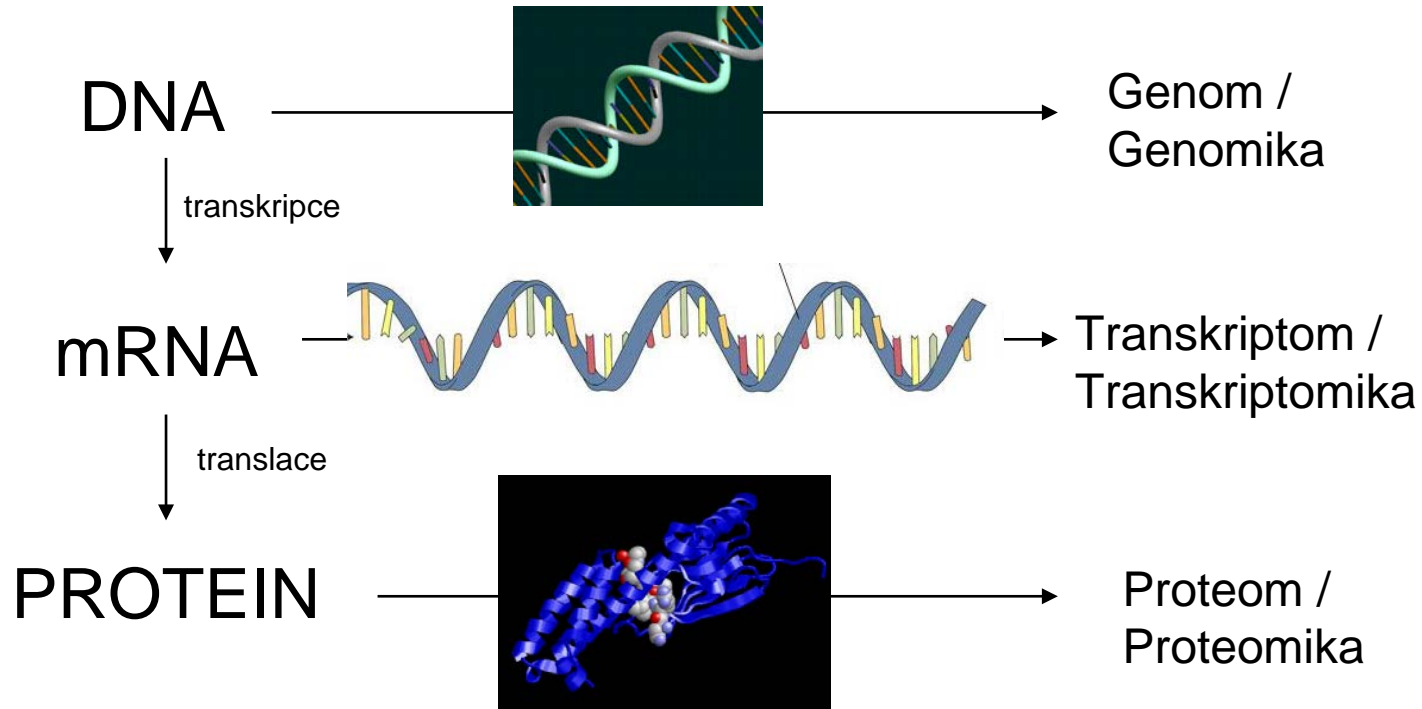


**Toxikogenomika** – objasňuje funkce genů a jak je celý genom zapojen v biologických procesech

**Transkriptomika** – sledování exprese populací genů - hledání rozdílů v genové expresi (za různých podmínek, v různých stádiích vývoje, v různých orgánech,...)

# Studium procesů probíhajících v živých organismech

## - nové vědecké disciplíny



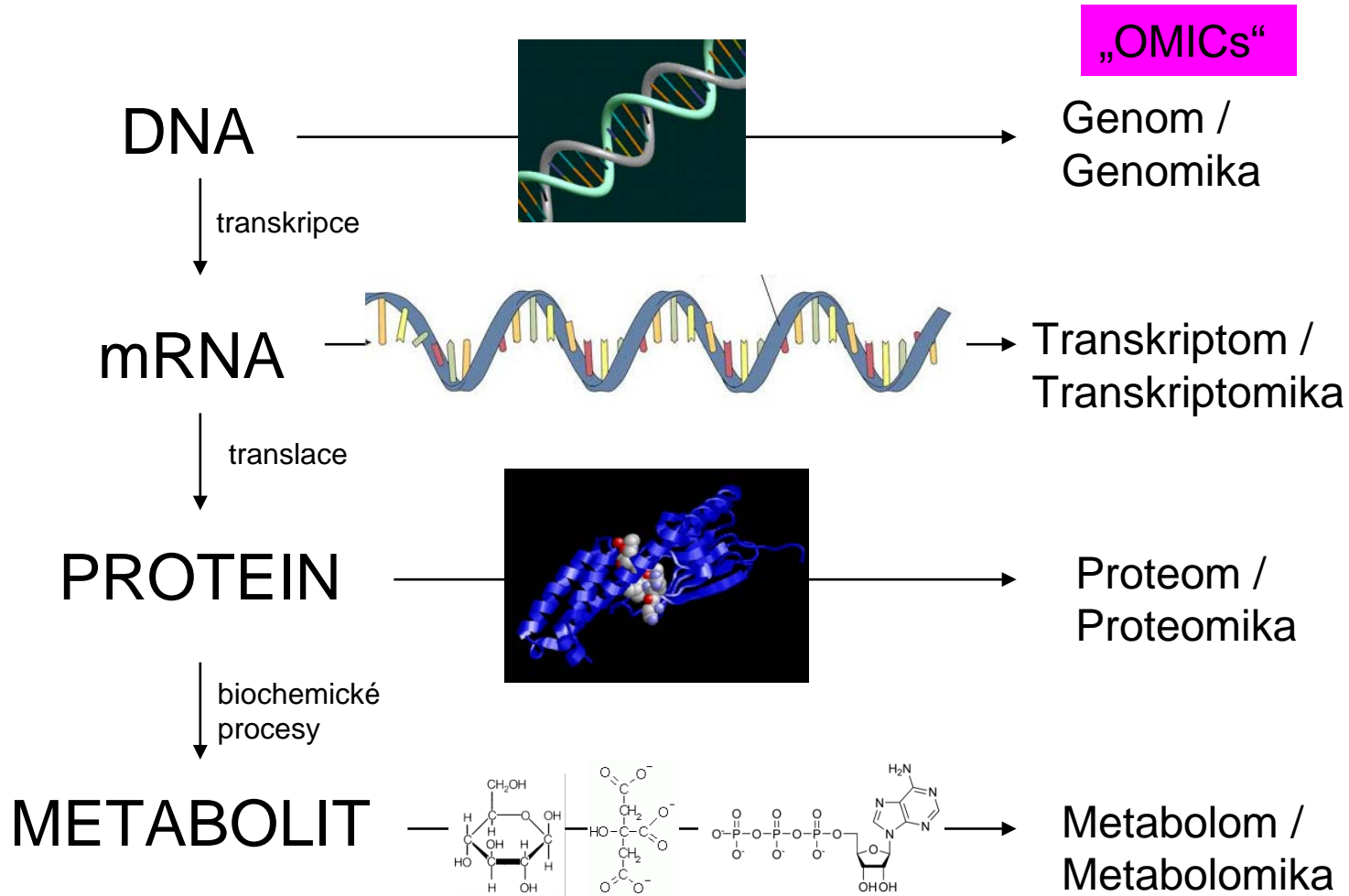
**Toxikogenomika** – objasňuje funkce genů a jak je celý genom zapojen v biologických procesech

**Transkriptomika** – sledování exprese populací genů - hledání rozdílů v genové expresi (za různých podmínek, v různých stádiích vývoje, v různých orgánech,...)

**Proteomika** - analýza proteinů organely, buňky, tkáně či extracelulárních tekutin

# Studium procesů probíhajících v živých organismech

## - nové vědecké přístupy/disciplíny



**Toxikogenomika** – objasňuje funkce genů a jak je celý genom zapojen v biologických procesech

**Transkriptomika** – sledování exprese populací genů - hledání rozdílů v genové expresi (za různých podmínek, v různých stádiích vývoje, v různých orgánech,...)

**Proteomika** - analýza proteinů organely, buňky, tkáně či extracelulárních tekutin

**Metabolomika** - identifikace a kvantifikace metabolitů v daném organismu nebo v buňce.

**Komplexní (necílené) x cílené přístupy**  
**= targeted x nontargeted analyses**



# OMICs v eko/toxikologii – sledování reakcí organismu při různé expozici

**Toxikogenomika** – objasňuje, jak je celý genom zapojen v biologických odpovědích organismů na stresory

**Transkriptomika** – sledování exprese populací genů - hledání rozdílů v genové expresi, ovlivněných genů

**Proteomika** - analýza proteinů organely, buňky, tkáně či extracelulárních tekutin, detekce ovlivněných proteinů

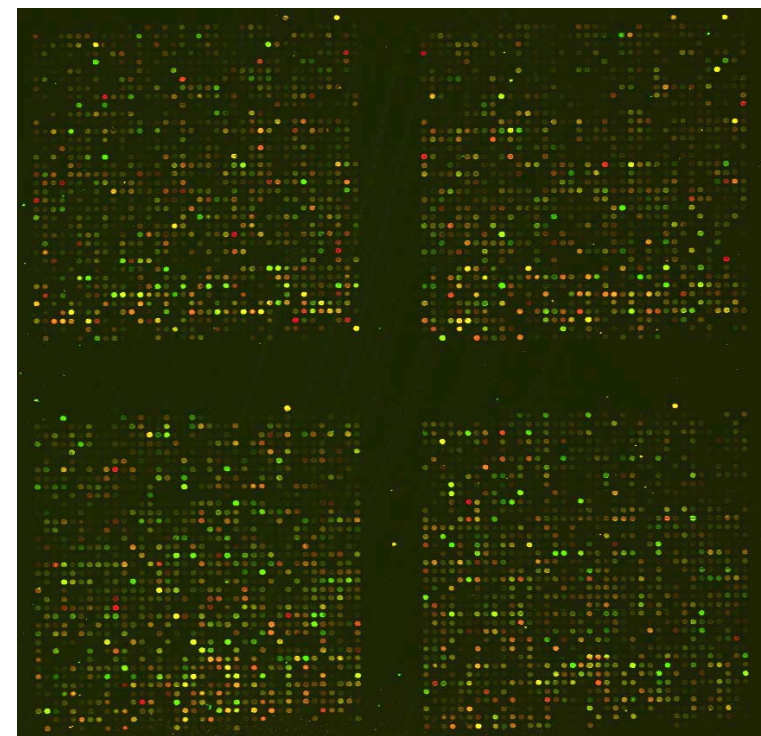
**Metabolomika** - identifikace a kvantifikace metabolitů v daném organismu nebo v buňce, detekce ovlivněných metabolitů

**Bioinformatika** - počítačovými metodami a prací v databázích interpretuje komplexní výstupy z omics technik

## kombinace genomiky - transkriptomiky, proteomiky, metabolomiky a bioinformatiky s klasickou toxikologií

### - odpovědi/reakce organismu na stresory a toxické látky

- identifikace, kvantifikace potenciálních genetických rizik
- identifikace konkrétních genů, jejich produktů a procesů, kterými buňky reagují na environmentální toxikanty a stresory - BIOMARKERY
- sledování účinků chemických látek na biologické systémy
- vytváření databází toxikologických, genetických a genomických informací



# Transkriptomika

## Transkriptom

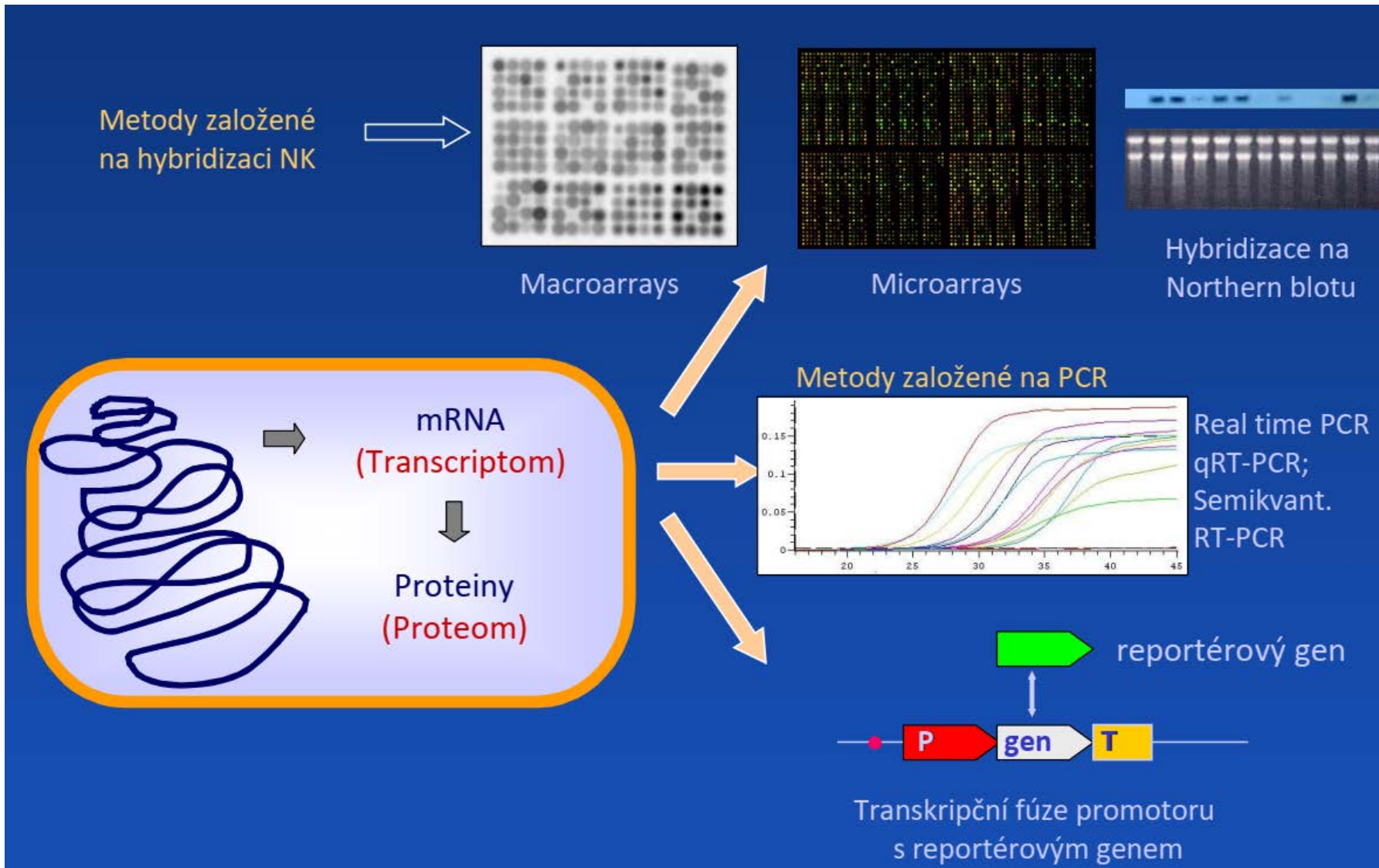
- soubor všech mRNA v dané buňce, tkáni nebo celém organismu
- odráží míru exprese jednotlivých genů a stabilitu jejich transkriptů

## Transkriptomika

- je podobor stanovující zapojování a vypořádání souboru mRNA transkriptů v určitém typu buněk nebo tkání a změny exprese genů vyvolávané chorobami, experimentálním zásahem nebo rozdílem ve vývojové fázi



# Transkriptomika



## qPCR

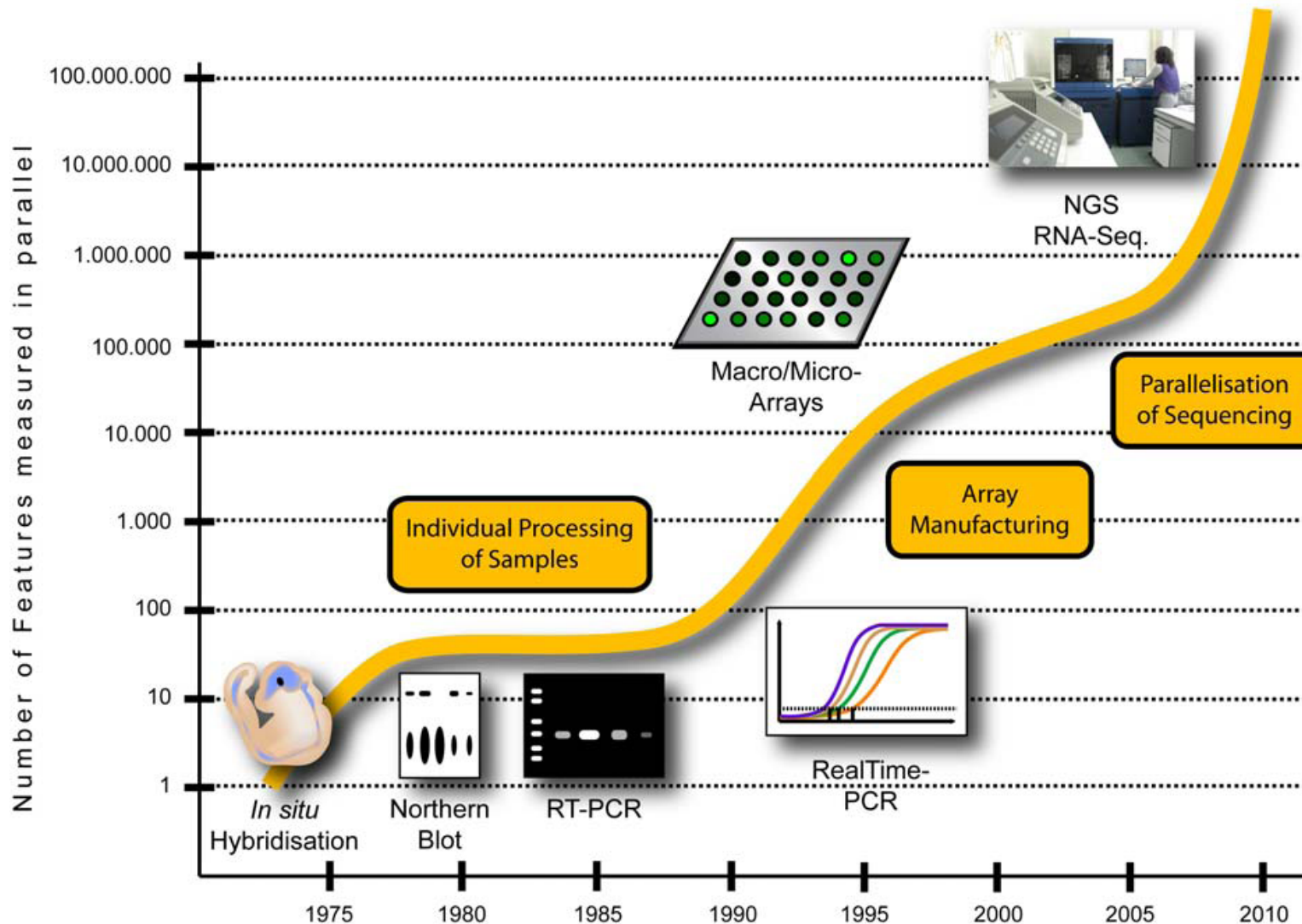
- Izolovaná mRNA se přepíše do cDNA a pomocí specifických primerů a polymerázy (namnožení konkrétní sekvence ze sledovaného genu) se kvantifikuje množství daného transkriptu ve vzorku

## Microarrays

- Do skleněné destičky zakotvené sondy známé sekvence (spec. Primery)
- Na čip je hybridizována amplifikovaná fluorescenčně značená vyšetřovaná DNA a hybridizace této DNA na jednotlivé pozice je detekována čtecím zařízením a počítačem

[SYBR Green qPCR](#)  
[Ion Proton Microarrays](#)

# Transkriptomika



## RNA Seq

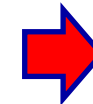
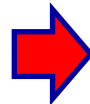
- Sekvenování nové generace (Next generation sequencing) (NGS), Illumina
- Umožňuje sledovat všechny mRNA přítomné v daném vzorku na rozdíl od qPCR a microarrays, kde je možné sledovat jen expresi genů se známou sekvencí

# Transkriptomika

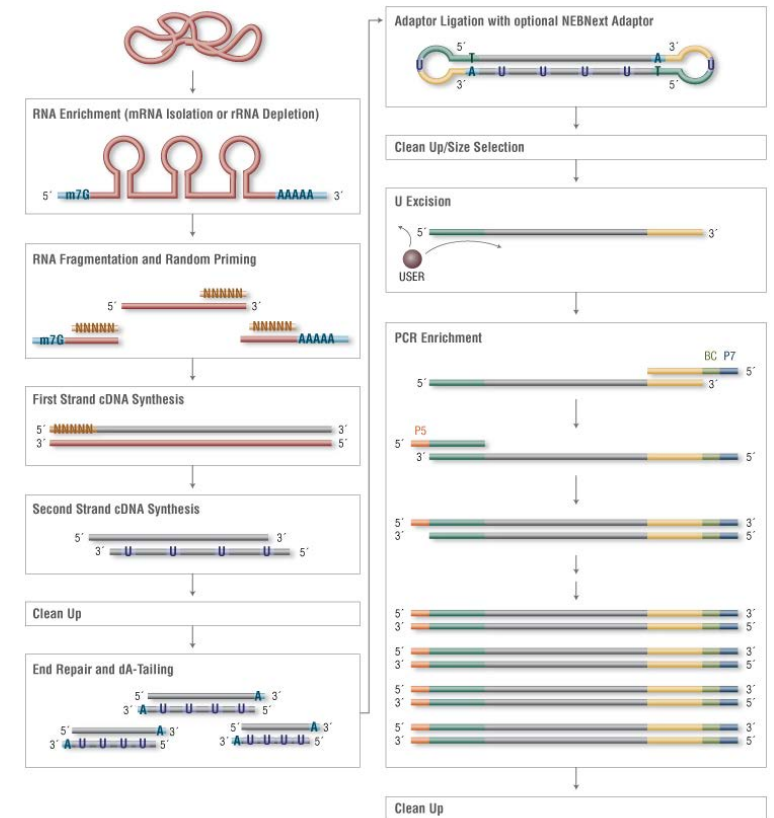
## Extrakce RNA



## Kontrola kvality RNA

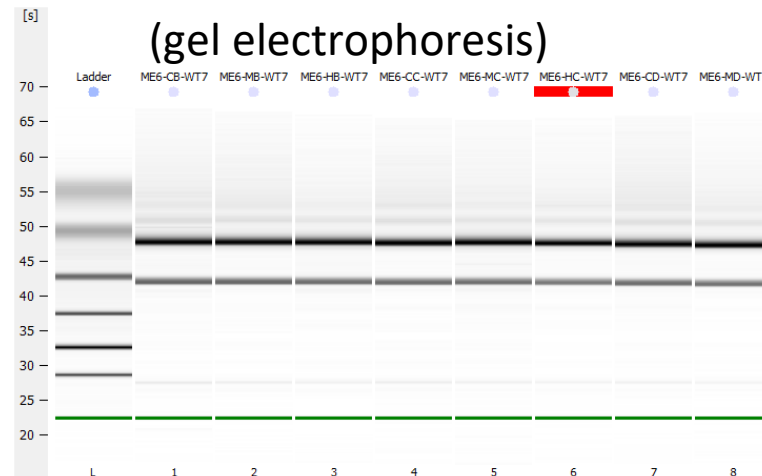


## Příprava knihovny = library prep (dsDNA synthesis)

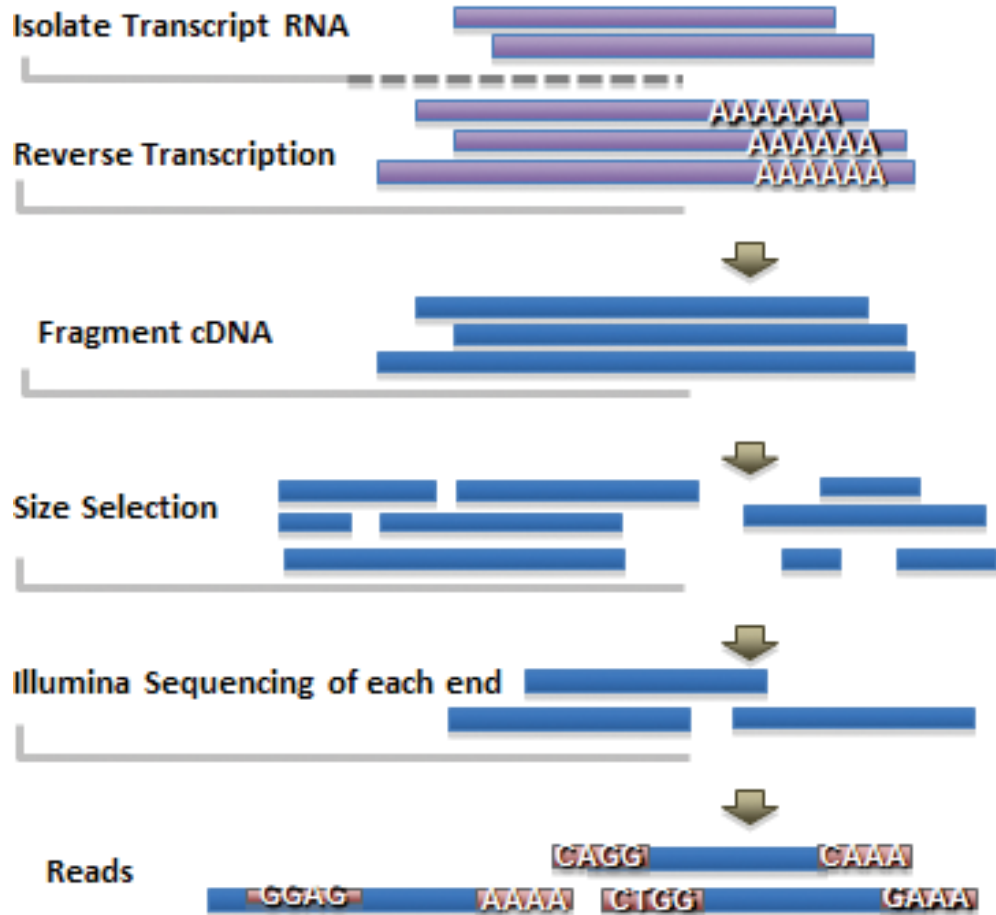


## RNA Seq

- Izolace celkové RNA
- Kontrola kvality (kapilární elektroforéza)
- Příprava knihovny - přepis do cDNA a připojení adaptérů



# RNASeq



Příprava vzorků  
- cDNA+Adapters

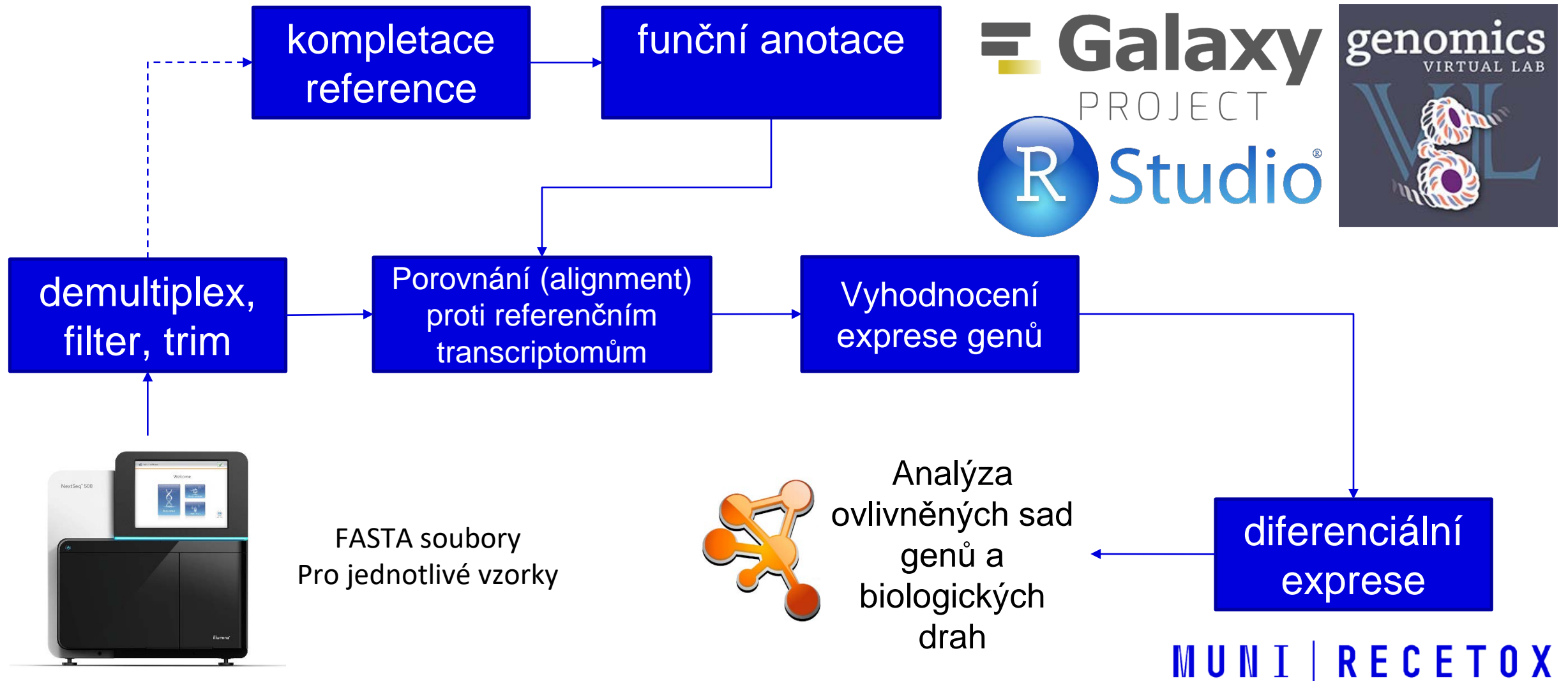
NGS →

Analýza dat





# RNA Seq- Analýza dat



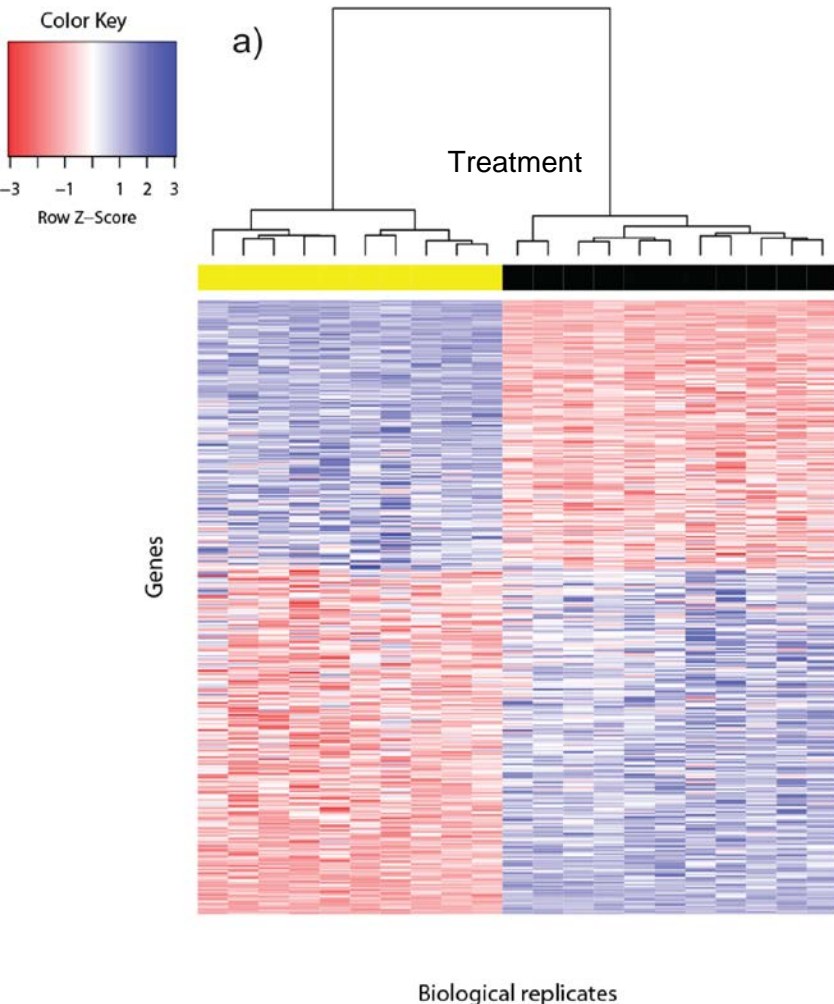
FASTA soubory  
Pro jednotlivé vzorky



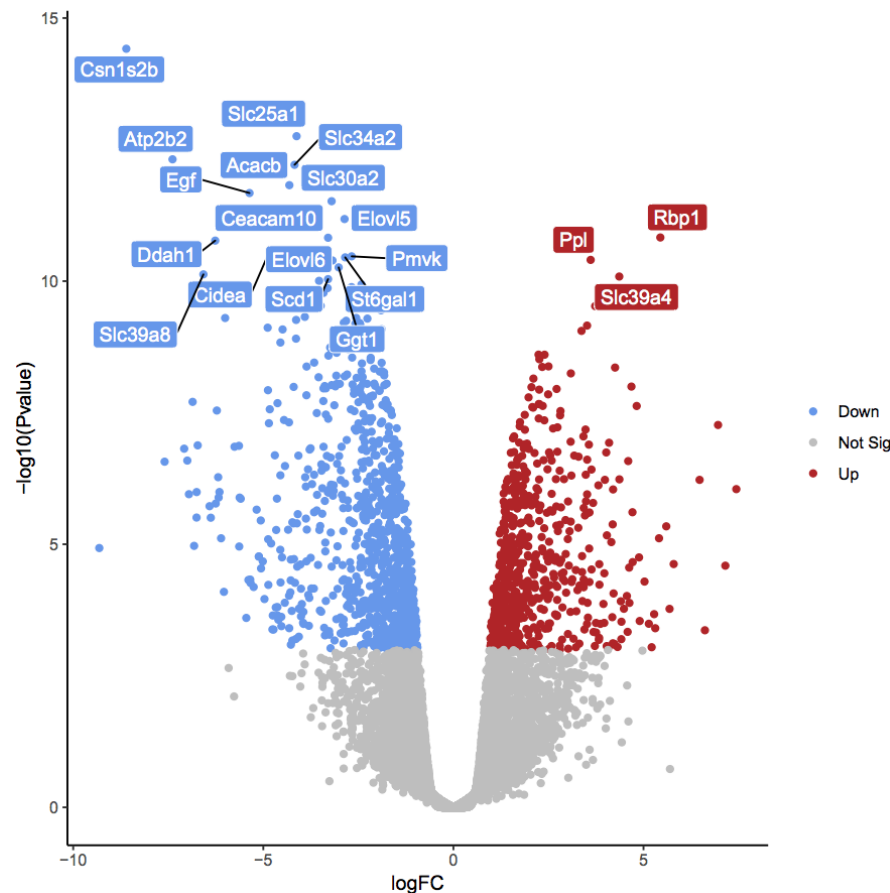
Analýza  
ovlivněných sad  
genů a  
biologických  
drah



# RNA Seq Výsledky



Celkový profil jednotlivých vzorků- hledání podobného paternu ve vzorcích se stejným experimentálním zásahem

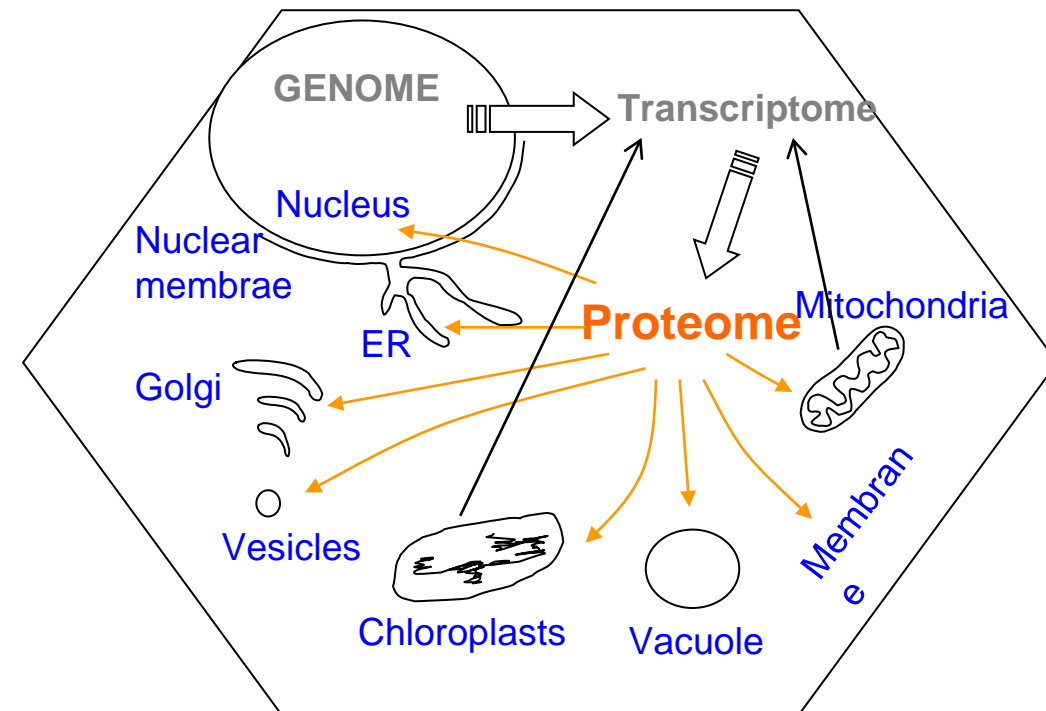


Zobrazení statisticky významně ovlivněných genů napříč vzorky proti kontrole a jejich relativní změnu exprese

- V toxikologii se nejběžněji provádí srovnání četností všech pozorovaných transkriptů mezi jednotlivými vzorky
- > **diferenciální exprese genů**
- Identifikované geny ovlivněné zásahem - expozicí toxické látky - poté mohou pomoci vysvětlit mechanismus jejího působení na základní fyziologické úrovni
- Interpretace změny exprese genů směrem k účinkům na organismus ale může být obtížná - nelze říct kolik transkriptů bude přepsáno do funkčního proteinu a tedy mít biologický efekt, navíc jednotlivé procesy mohou působit protichůdně
- sledování celých ovlivněných drah – biologických procesů

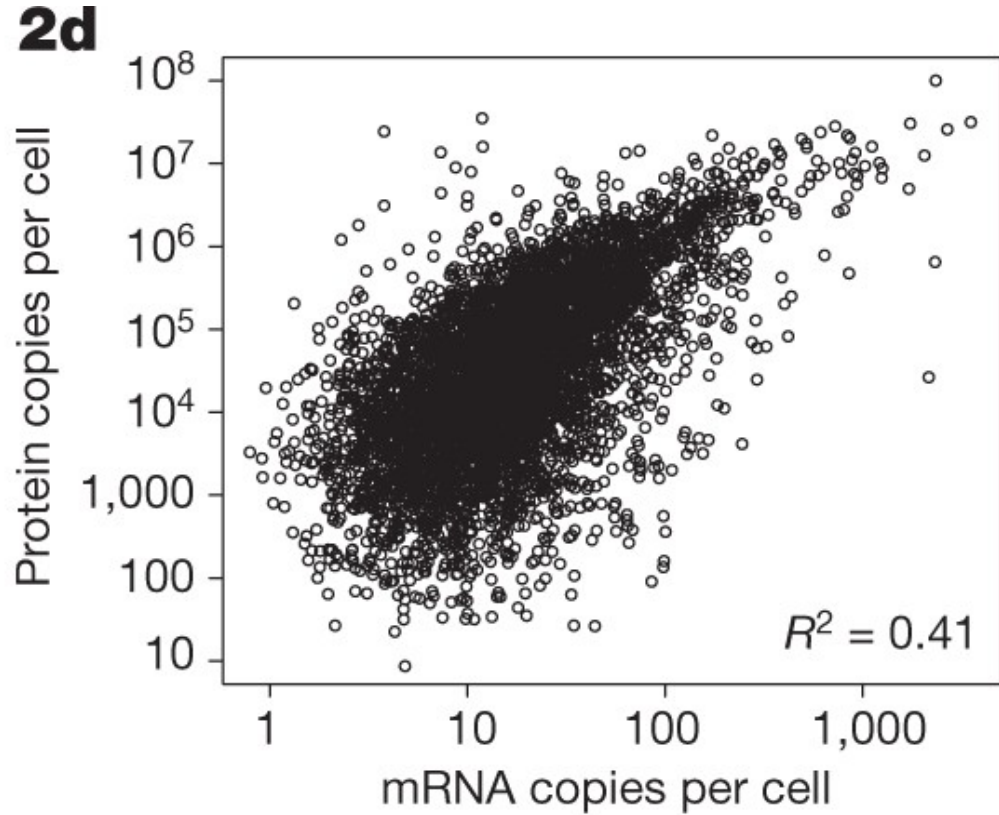
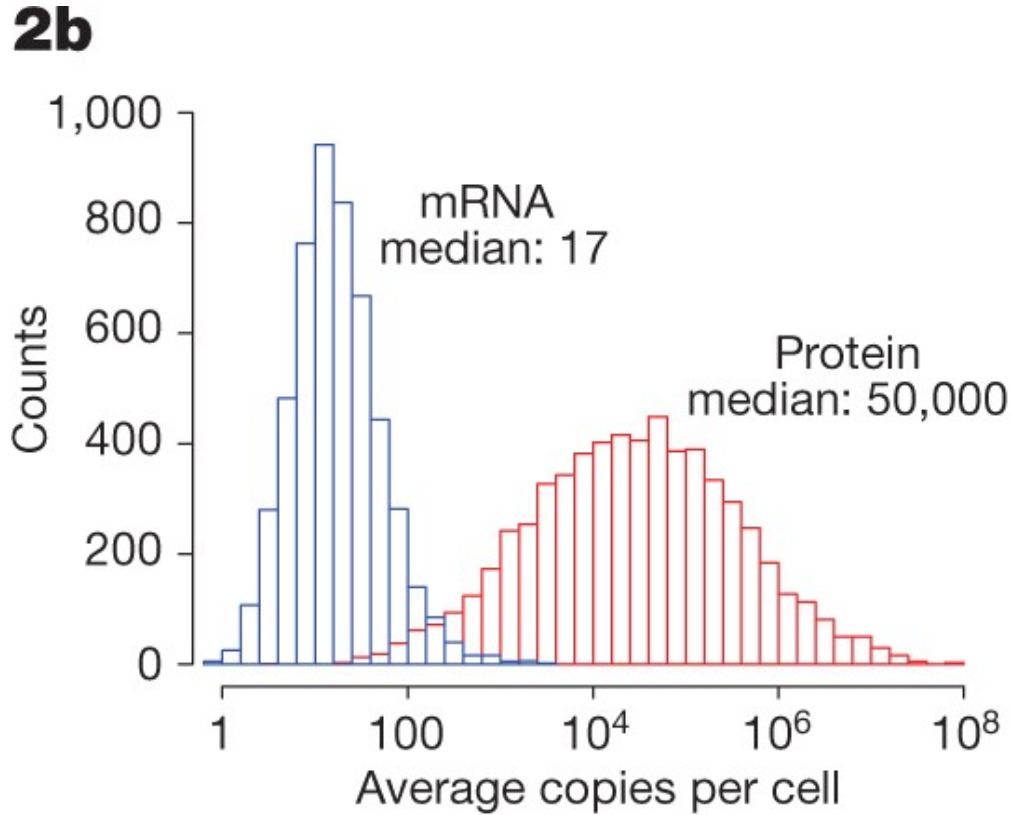
# Proteom

- soubor všech proteinů určitého systému
- organely, buňky, pletiva, orgánu, organismu
- je odrazem transkriptomu, regulace translace, stability proteinů a jejich odbourávání
- navíc zahrnuje i všechny post-translační stavy proteinů (po translaci může být protein přítomen ve více funkčně odlišných formách)
- př. u člověka cca 25 tis. genů a odhadem cca 500 tis. různých proteinů (forem proteinů)





# Proteomika

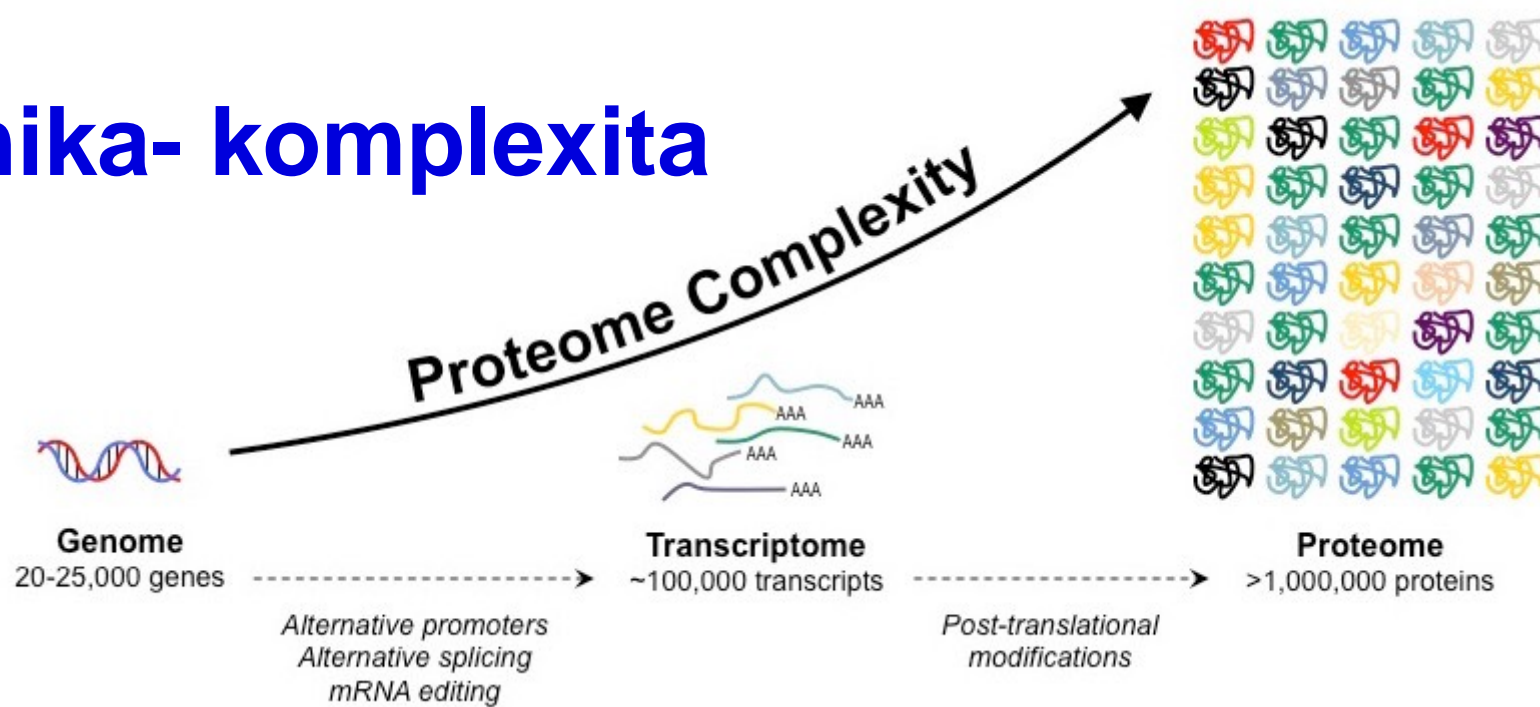


Savčí buňky - Proteiny v průměru 5x stabilnější a 900krát abundantnější než mRNAs

Schwanhäusser B, et al. Nature. 2011;473(7347):337-42 + corrigendum in Nature, March 2013

# Proteomika- komplexita

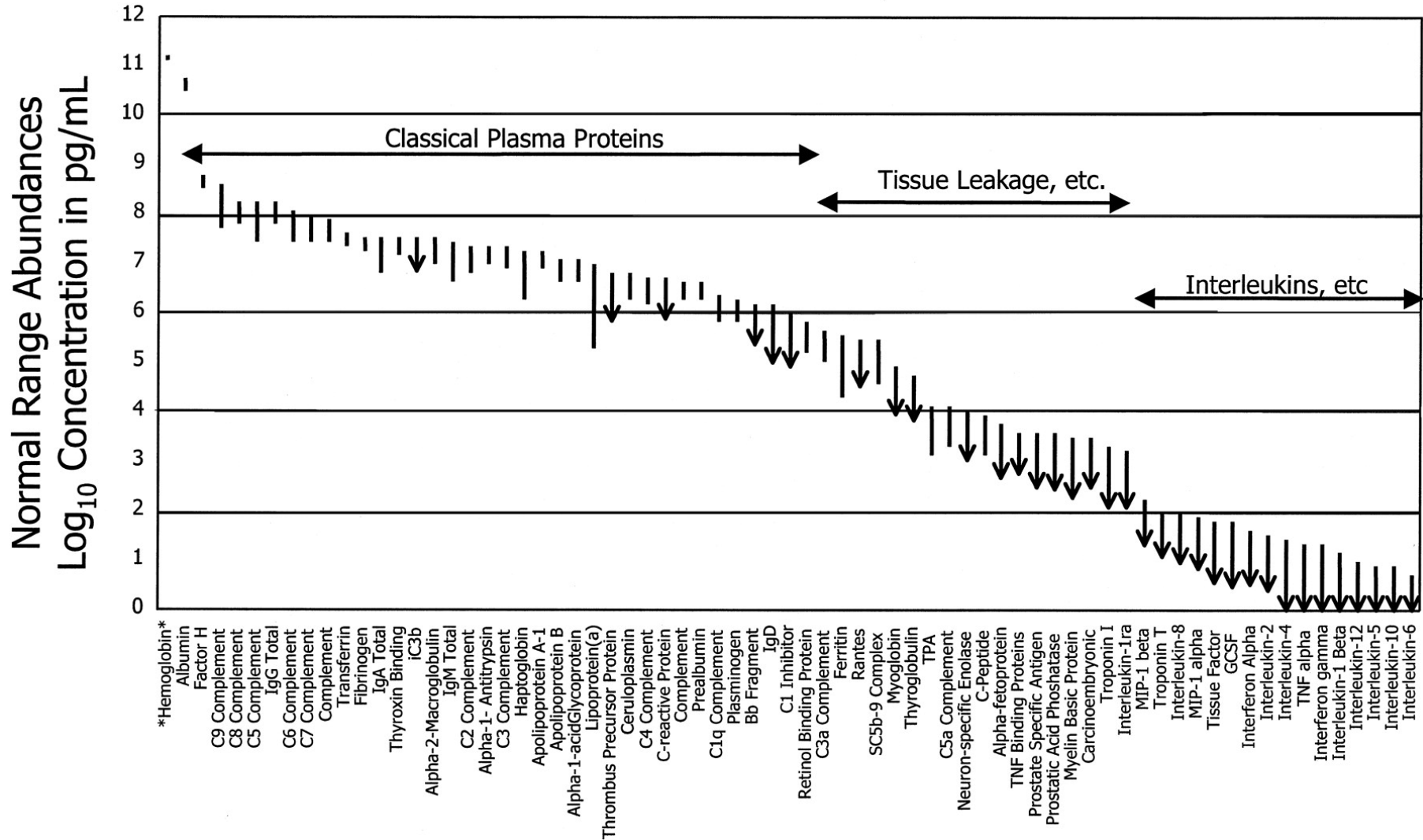
Proteomika



	abbreviation	monoisotopic	average				
<a href="#">Acetylation</a>	ACET	42.0106	42.0373	<a href="#">Geranyl-geranyl</a>	GERA	272.2504	272.4741
<a href="#">Alkylation</a>	ALKY	14.01564	14.02688	<a href="#">Gamma-carboxyglutamic acid</a>	GGLU	43.98983	44.0098
<a href="#">Amidation</a>	AMID	-0.9840	-0.9847	<a href="#">O-GlcNAc</a>	GLCN	203.0794	203.1950
<a href="#">Beta-methylthiolation</a>	BMTH	45.9877118	46.08688	<a href="#">Glucosylation (Glycation)</a>	GLUC	162.0528	162.1424
<a href="#">Biotin</a>	BIOT	226.0776	226.2934	<a href="#">Glutathionylation</a>	GLUT	305.0680814	305.3056
<a href="#">Bromination</a>	BROM	77.9105	78.9	<a href="#">Hydroxylation</a>	HYDR	15.9949	15.9994
<a href="#">Carbamylation</a>	CAM	43.00581	43.02502	<a href="#">Lipoyl</a>	LIPY	188.033	188.3027
<a href="#">Citullination</a>	CITR	0.9840276	0.98476	<a href="#">Methylation</a>	METH	14.0157	14.0269
<a href="#">C-Mannosylation</a>	CMAN	162.052823	162.1424	<a href="#">Myristoylation</a>	MYRI	210.1984	210.3598
<a href="#">Cysteine sulfenic acid (-SOH)</a>	CSEA	15.9949146	15.9994	<a href="#">S-Nitrosylation</a>	NTRY	28.99017	28.99816
<a href="#">Cysteine sulfinic acid (-SO<sub>2</sub>H)</a>	CSIA	31.9898292	31.9988	<a href="#">N-Octanoate</a>	OCTA	126.1044	126.1986
<a href="#">Deamidation</a>	DEAM	0.9840	0.9847	<a href="#">Palmitoylation</a>	PALM	238.2297	238.4136
<a href="#">N-acyl diglyceride cysteine (tripalmitate)</a>	DIAC	788.7258	789.3202	<a href="#">Phosphorylation</a>	PHOS	79.9663	79.9799
				<a href="#">Pyridoxal phosphate</a>	PLP	229.014	229.129

- Více než 1000 popsaných post-translačních modifikací proteinů
- Exponenciálně roste počet verzí jednotlivých proteinů

# Proteomika



- Referenční hodnoty pro sedmdesát lidských proteinů detekovaných v lidské plazmě
- Velmi široký rozsah koncentrací, rozdíl v abundanci jednotlivých proteinů může být až 12 řádů
- Klade to velké nároky na kvalitu a přesnost měření

# Proteomika - komplexita, rozsah 12 řádů





# Proteomika- komplexita, rozsah 12 řádů

Proteomika





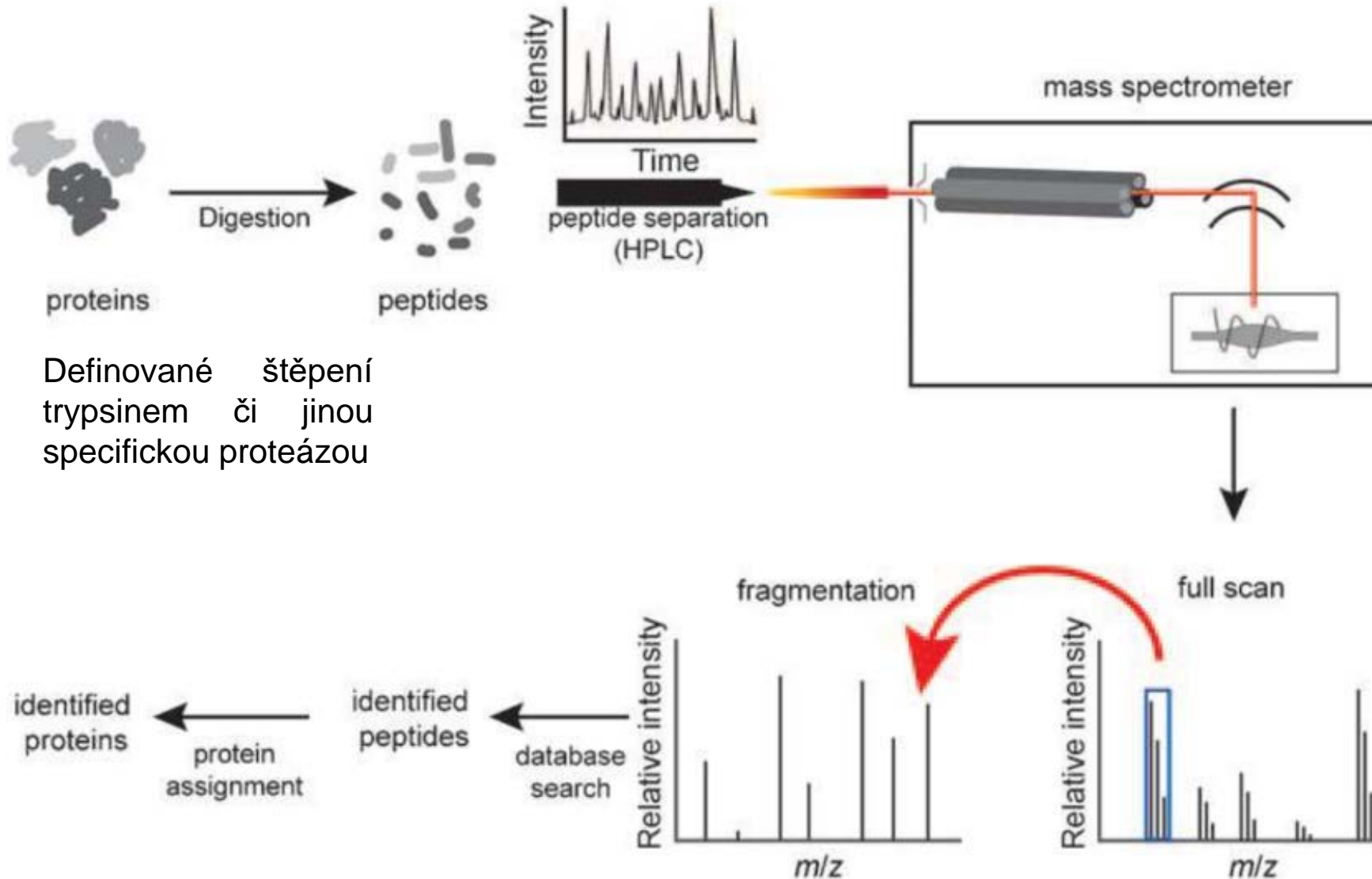
# Proteomika- komplexita, rozsah 12 řádů



- Dynamický rozsah proteomických dat - až 12 řádů rozdílu v abundanci různých proteinů



# Proteomika



Definované štěpení trypsinem či jinou specifickou proteázou

Identifikace peptidů hmotnostní spektrometrií:

- přesné změření velikostí definovaných štěpů proteinu a porovnání s predikovanými štěpy proteinů v databázích

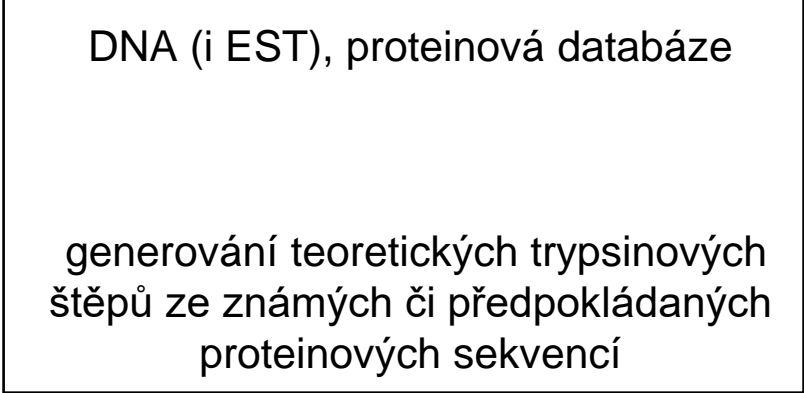
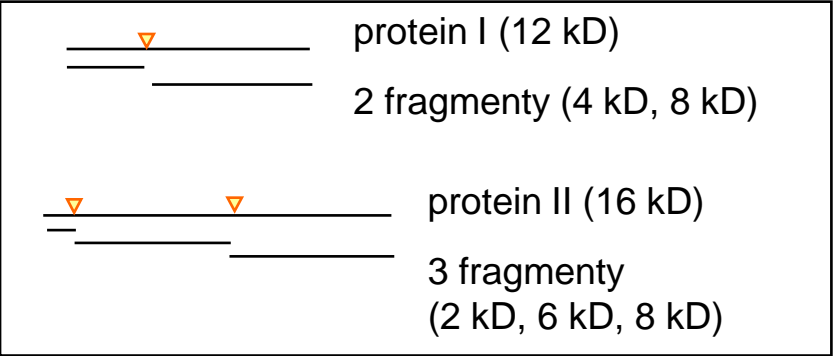
**Hmotnostní spektrometrie (MS)** analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), záznam relativních intenzit jednotlivých iontů

např. MS - MALDI/TOF (Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace + analyzátor doby letu; Matrix-assisted Laser desorption/ionisation Time-of-flight analysis) nebo např. Orbitrap (elektrostatická orbitální iontová past)

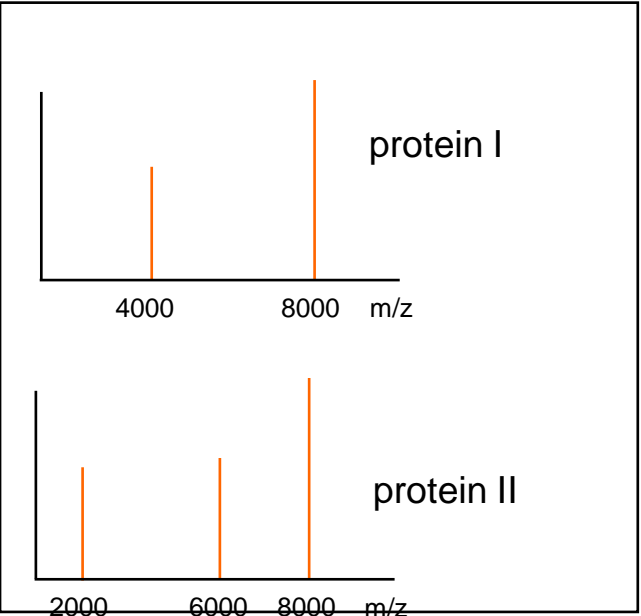


# Proteomika- kvantifikace

štěpení proteázou (trypsinem)



Hmotnostní spektrometrie

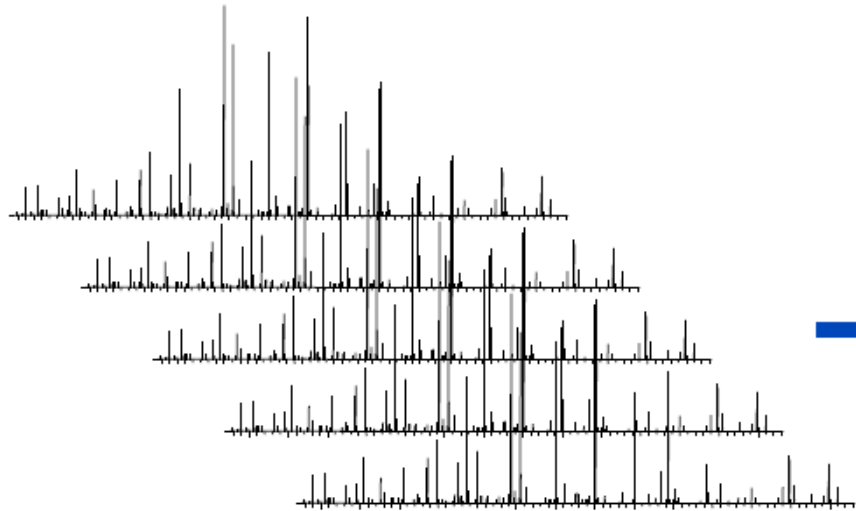


- protein a: 3, 5, 9, 12 kD
- protein b: 2, 7, 9 kD
- protein c: 4, 8 kD
- protein d: 3, 9, 12 kD
- protein e: 2, 6, 8 kD

Srovnání experimentálně stanovených velikostí peptidů s teoretickými štěpy

# Proteomika

Raw, un-interpreted  
MS/MS spectra



Identifikace peptidů hmotnostní spektrometrií: „Peptide fingerprinting“

Jednotlivá hmotnostní spektra jsou analyzována proti databázi možných peptidů

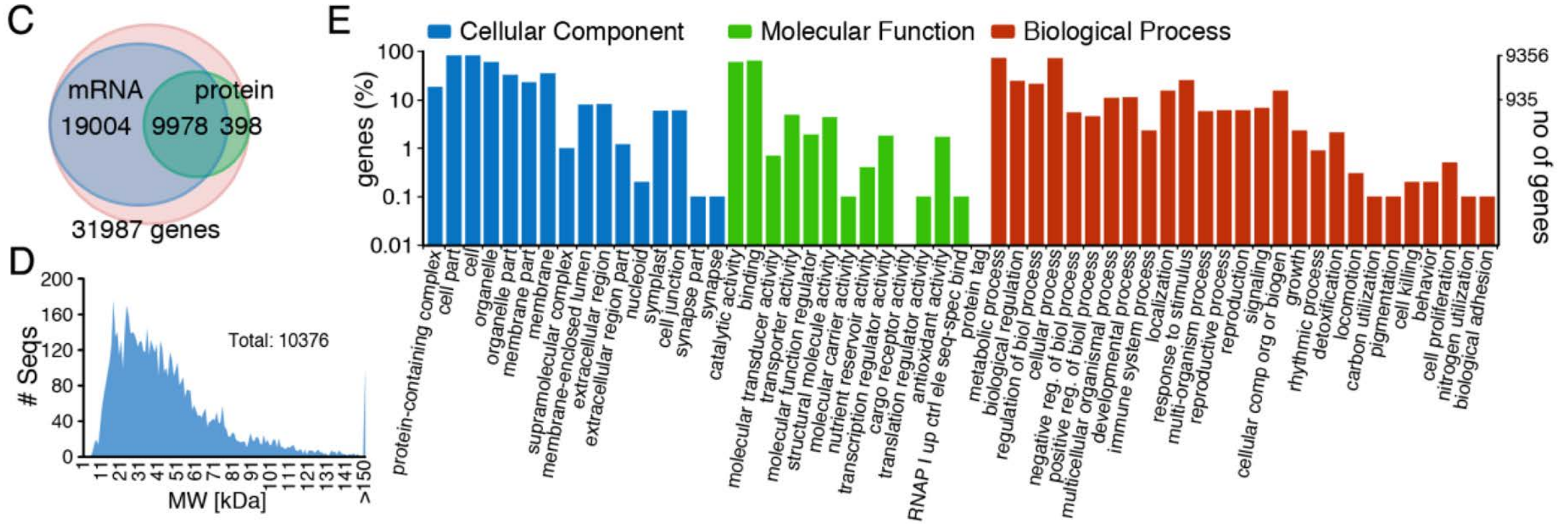
- Velmi komplexní data vyžadují velkou výpočetní sílu pro analýzu dat získaných hmotnostní spektrometrií - z jednoho vzorku je možné získat až 100 000 hmotnostních spekter, které všechny musí být porovnány s databází pro identifikaci
- Databáze pro jeden organismus obsahuje desítky tisíc proteinů a souvisejících peptidových fingerprintů

[Label-free Proteomics](#)

[Label-free Proteomics -  
MS quantification](#)

**MUNI | RECETOX**

# Proteomika



- V toxikologii se nejběžněji provádí srovnání četností všech pozorovaných proteinů mezi jednotlivými vzorky  
-> **diferenciální abundance proteinů**

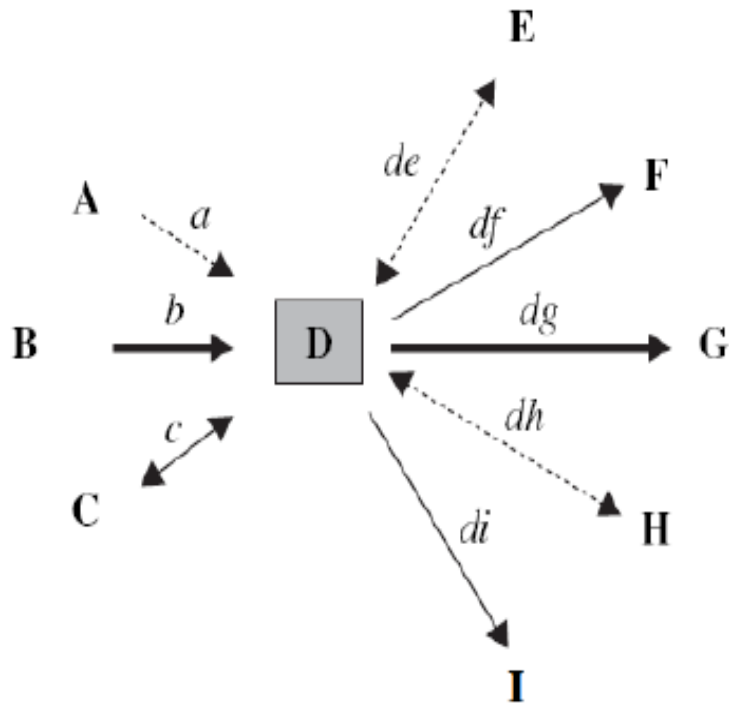
- Složitější interpretace než u ovlivnění exprese genů - proteiny mají různou životnost v organismu a dynamickou odpověď proteomu na stresor je tak těžší zachytit

- Ovlivněné proteiny (a stejně tak exprese genů) jsou poté často analyzovány dle biologické funkce a podle počtu ovlivněných proteinů se odvozuje vliv na daný biologický proces - „Pathway Analysis“

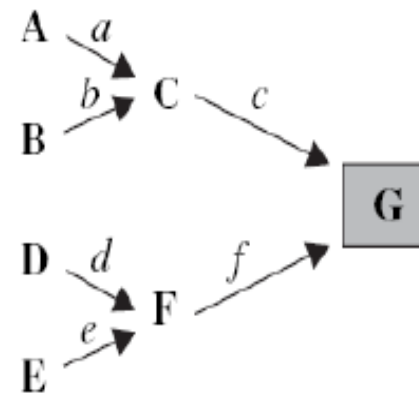
# Metabolomika

## METABOLISMUS – látková přeměna

soubor všech enzymatických reakcí, při nichž dochází k přeměně látek a energií v buňkách a v živých organismech



Primární metabolismus



Sekundární metabolismus

Primární (anabolismus – reakce spojené s biosyntézou, katabolismus – reakce spojené s degradací)

- metabolismus sacharidů, tuků, aminokyselin a nukleových kyselin

Sekundární (produkce a odbourávání specifických, nebílkovinových chemických látek)

### METABOLOM

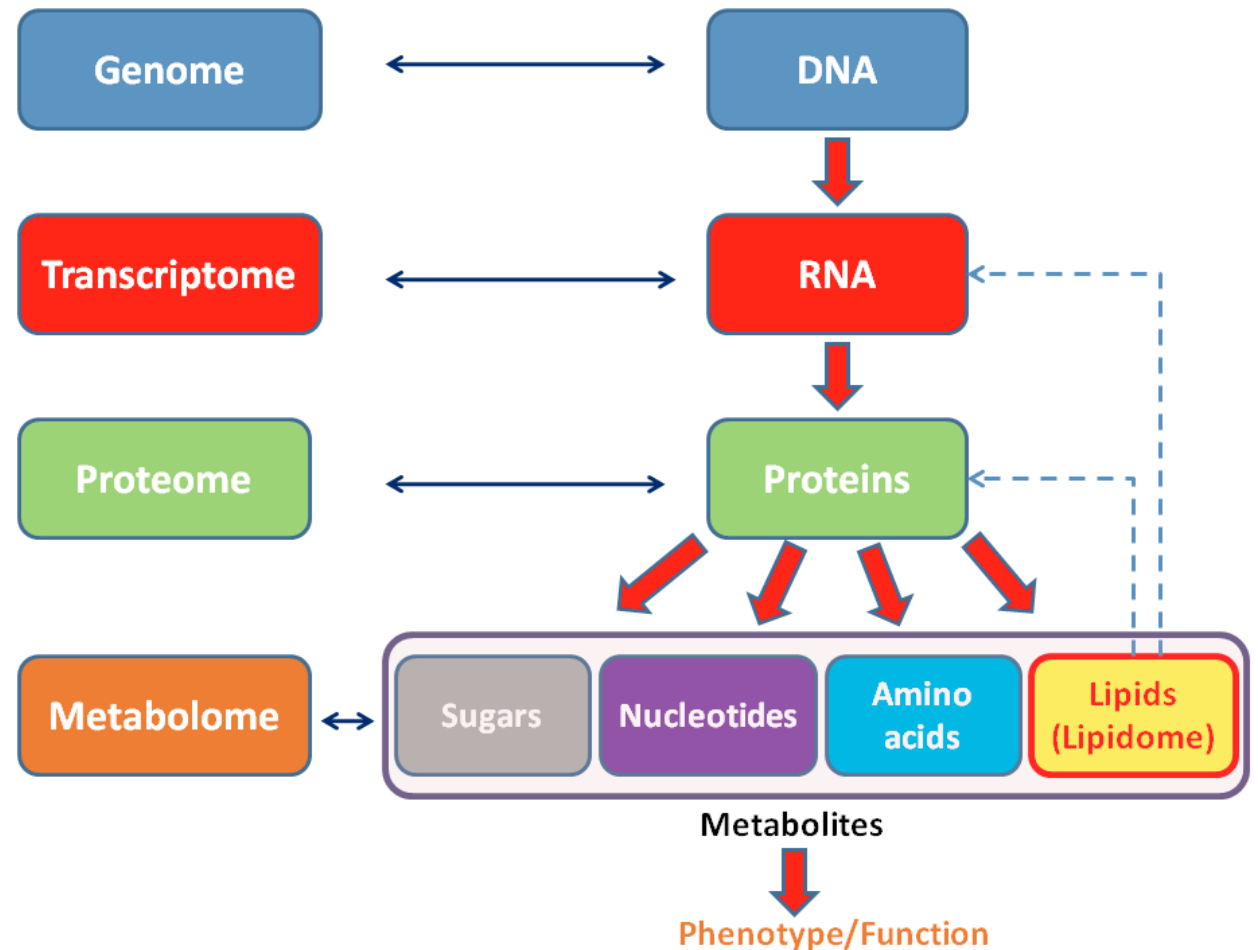
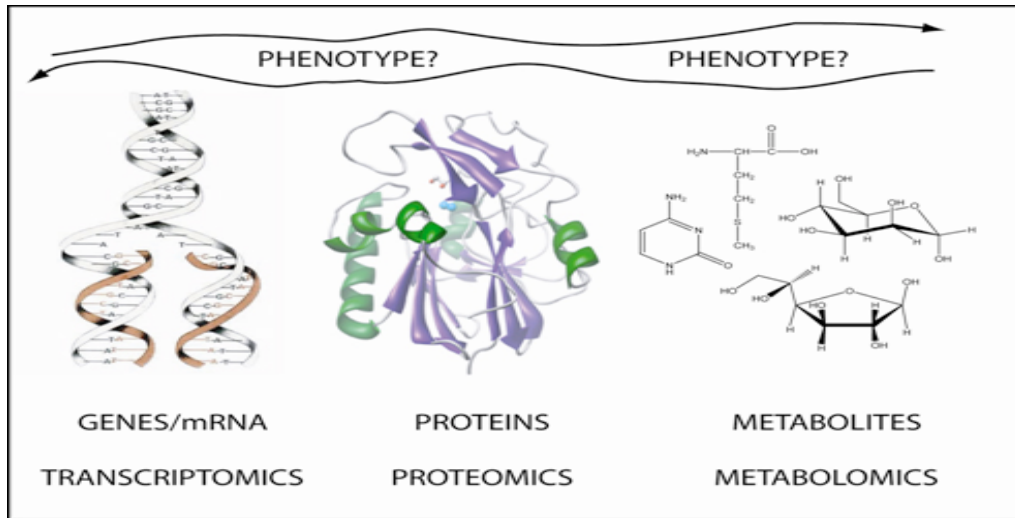
kompletní soubor metabolitů v buňce či biologickém systému v daném čase

### METABOLIT

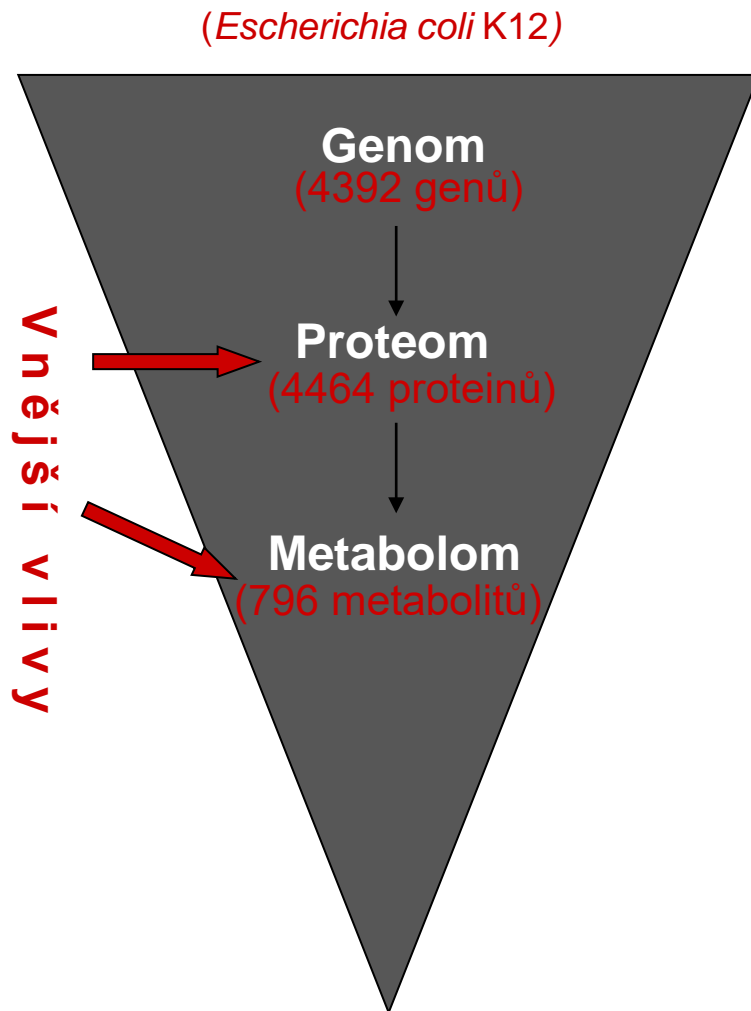
nízkomolekulární organická sloučenina  
(< 1000 Da)  
produkt látkové přeměny

– Systémová biologie a funkční genomika - integrace proteomických, transkriptomických a metabolomických informací – komplexní pohled na organismus.

– metabolický profil = aktuální odraz fyziologie buňky

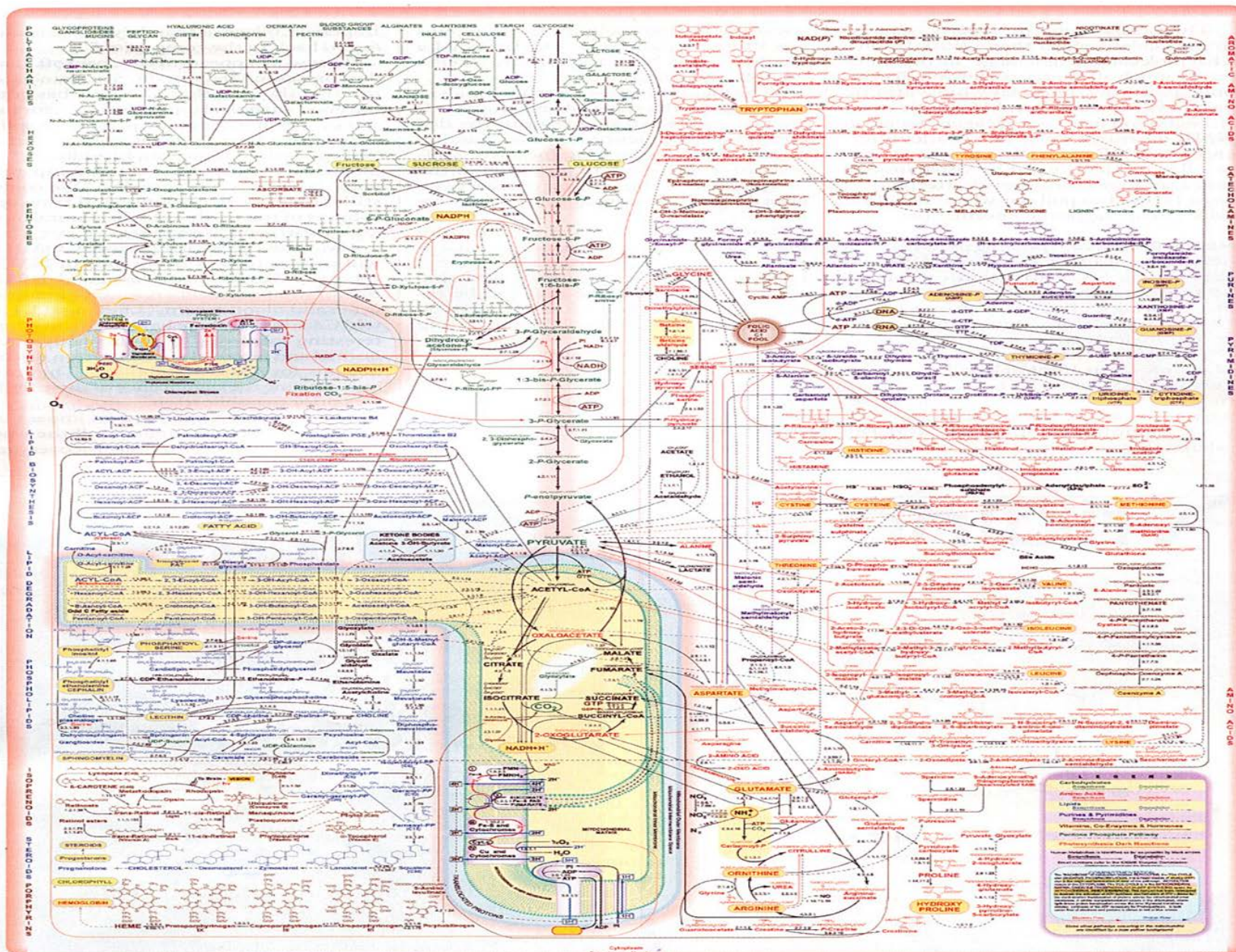


# Metabolomika- Proč?



- Počet metabolitů v buňce může být až řádově nižší než počet genů a proteinů.
- Metabolom – nejnižší linie genové exprese - přímo odráží funkční úroveň buňky.
- Změny metabolitů v buňce nejsou regulovány pouze genovou expresí, ale i vlivy životního prostředí.
- Kvantifikace metabolitů nabízí přímý přístup ke zkoumání vnitřní kinetiky metabolismu (in vivo kinetics).
- Metabolomické experimenty vyžadují 2x – 3x méně času ve srovnání s proteomickými a transkriptomickými experimenty.





## FINGERPRINTING

komplexní analýza  
**intracelulárních metabolitů** bez  
nutnosti kvantifikace a identifikace

## FOOTPRINTING

komplexní analýza  
**extracelulárních metabolitů** bez  
nutnosti kvantifikace a identifikace

⇒ skrining: klasifikace vzorku na  
základě jeho původu a zdroje



# Metabolomika

## **PROFILOVÁNÍ METABOLITŮ (metabolite profiling)**

analýza daného souboru metabolitů, např. souboru AMK, organických sloučenin  
často semi-kvantitativní analýza

## **CÍLENÁ ANALÝZA METABOLITŮ (metabolite target analysis)**

kvalitativní i kvantitativní analýza vybraných metabolitů související se specifickou metabolickou reakcí  
používána zejména když jsou požadovány nízké limity detekce

## **METABONOMIKA (metabonomics, Untargeted metabolomics )**

komplexní metabolické studie zejména v toxikologii  
současné měření co nejvíce metabolitů s cílem zachycení celkového metabolického profilu vzorku  
ohodnocení tkání a biologických tekutin na základě změn endogenních metabolitů (výsledek nemocí nebo terapeutického léčení) - bez potřeby specifické identifikace

# Metabolomika - Jak?

## Příprava vzorku

Soli, proteiny, lipidy ve vzorku zhoršují kvantifikaci analytu - užití extrakce na tuhé fázi (solid-phase extraction, SPE)

- využívá pevnou a kapalnou fázi k izolaci jednoho typu analytu z roztoku
- využívá stejné typy stacionárních fází jako v kapalinové chromatografii
- limitací je selektivita SPE – ideální pro cílené analýzy jednoho typu, ale nevhodná pro široké profilování metabolitů

## Nukleární Magnetická Rezonance

Je detekována absorpce radiofrekvenčního záření (RFR) jádru atomů v molekule

## Hmotnostní spektrometrie

# Typický postup u cílené a necílené LC/MS metabolomiky

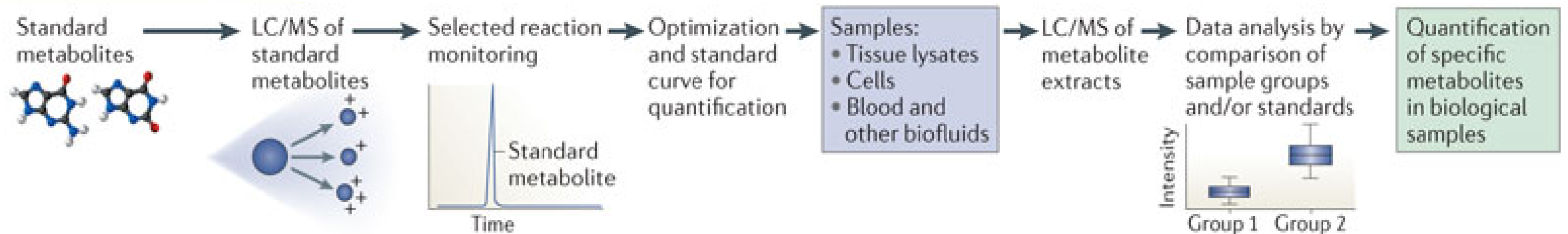
## a Targeted metabolomics

Question:

What are the levels of specific metabolites in a sample?

Cílená metabolomika

- Hladiny specifických metabolitů ve vzorku



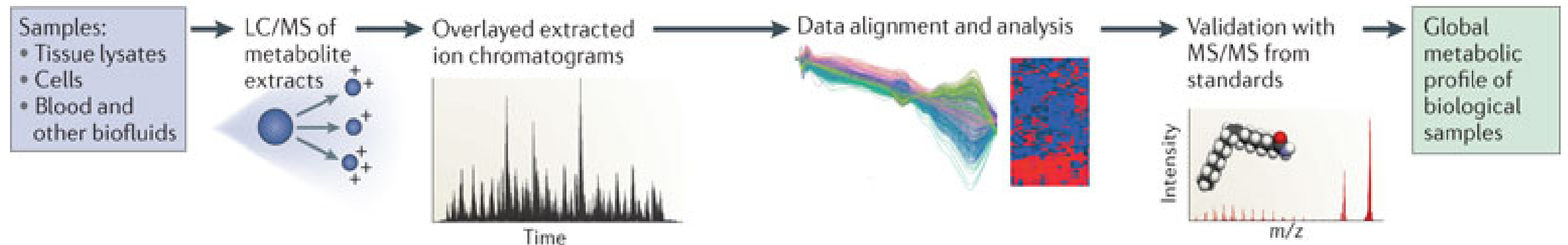
## b Untargeted metabolomics

Question:

What is the global metabolic profile of a sample?

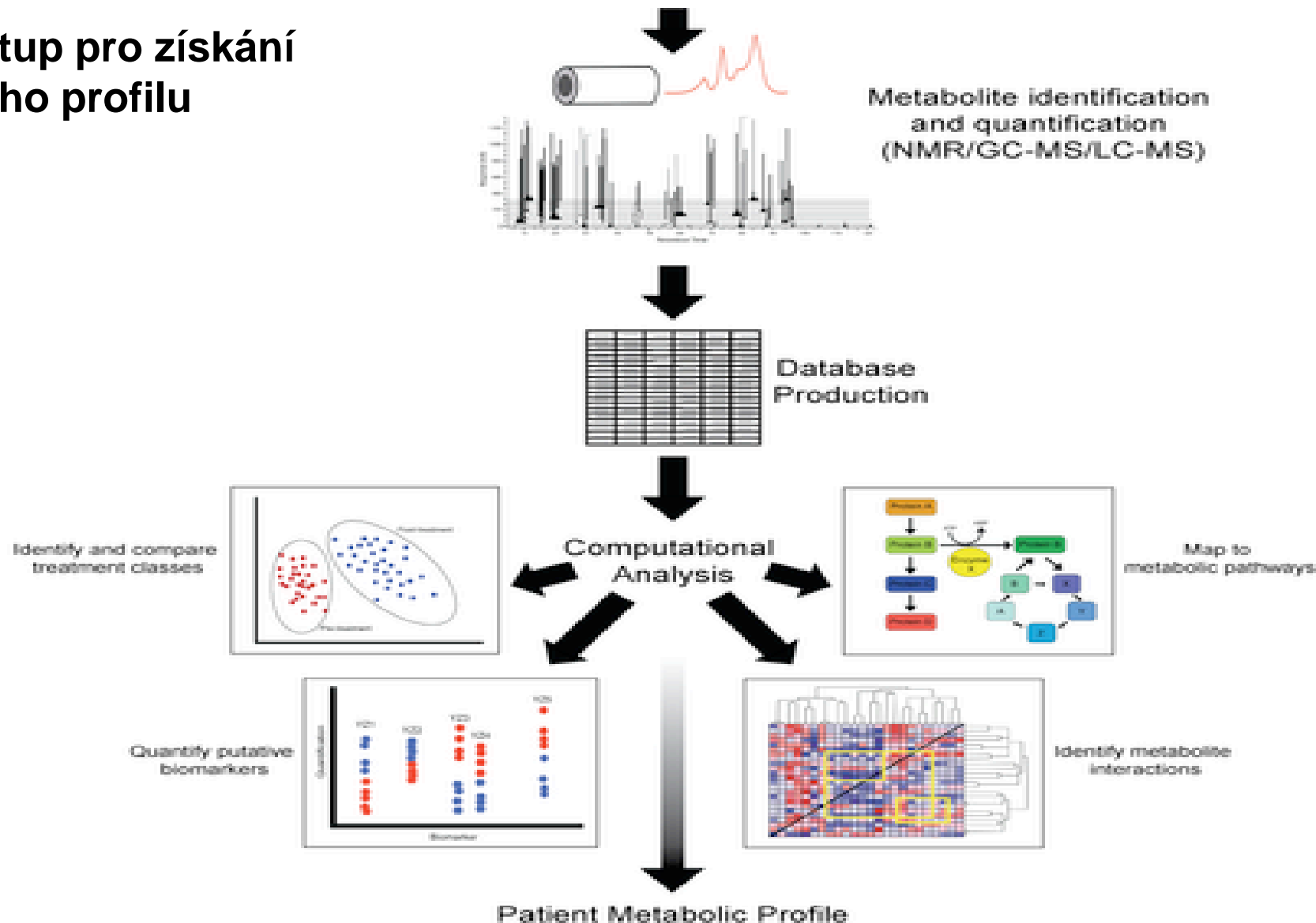
Necílená metabolomika

- Globální metabolický profil ve vzorku



# Odebraný/extrahovaný vzorek

## Typický postup pro získání metabolického profilu



- Predict patient outcome upon treatment with a pharmaceutical compound.
- Predict/monitor efficacy of drug metabolism and potential drug toxicity.
- Predict/monitor the effects of a compound on certain metabolic pathways and biochemical processes.

# Seznam odkazů na videa

## **SYBR Green qPCR**

[https://www.youtube.com/watch?v=GCzH2Wcvd8E&list=TLPQMTEXMjIwMTkWik25LGG\\_kA&index=17](https://www.youtube.com/watch?v=GCzH2Wcvd8E&list=TLPQMTEXMjIwMTkWik25LGG_kA&index=17)

## **Ion Proton Microarrays**

<https://www.youtube.com/watch?v=PisqV9cyfoA>

## **Next Generation Sequencing**

[https://www.youtube.com/watch?v=shoje\\_9IYWc](https://www.youtube.com/watch?v=shoje_9IYWc)

## **Minion, Milipore sequencing**

<https://www.youtube.com/watch?v=rXfS4wJoVLQ>

## **Third Generation NGS**

<https://www.youtube.com/watch?v=v8p4ph2MAvI>

## **Label-free Proteomics**

<https://www.youtube.com/watch?v=05kOn7E6M2E>

## **Label-free Proteomics- MS quantification**

<https://www.youtube.com/watch?v=x8DyTXHafd4>

## **Bottom-up vs Top-down Proteomics**

<https://www.youtube.com/watch?v=DAX04wr78Qg>

## **Proteomics- SILAC**

<https://www.youtube.com/watch?v=OjdWrMrCI9o>

## **Proteomics- iTRAQ**

<https://www.youtube.com/watch?v=Rz1YeMZmOc4>