

PROTEOMIKA 2015/2016

Pondělí 14/12

**Zvláštní aplikace
izotopových metod**

Klinická proteomika

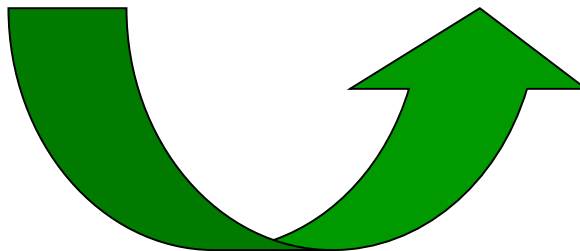
MALDI imaging

Protein arrays

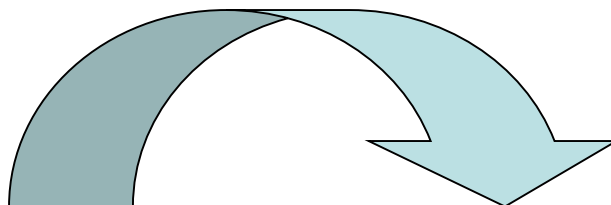
TOP-DOWN

???

Translace



Aktuální koncentrace proteinu



Degradace

Ribosome profiling (Ribosome footprinting)

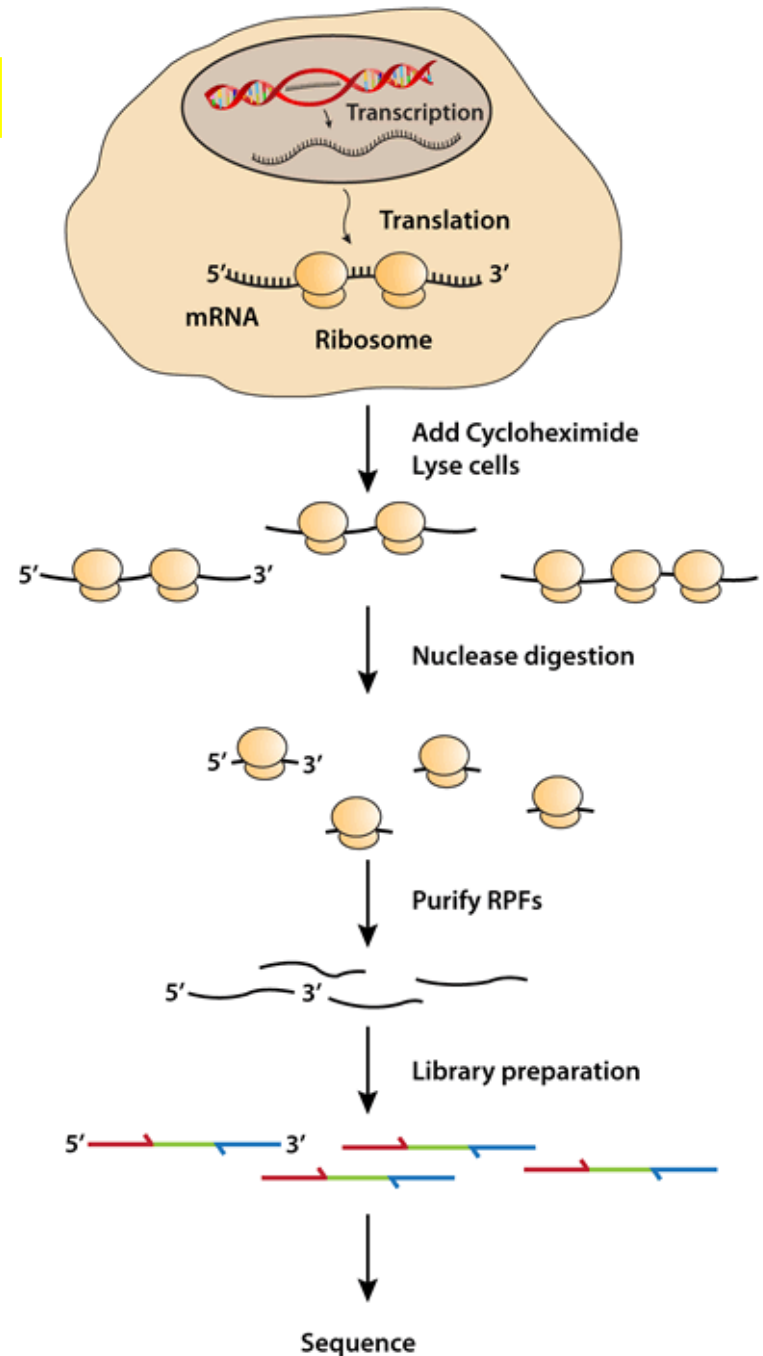
Které mRNA se aktuálně aktivně translatují?

Princip:

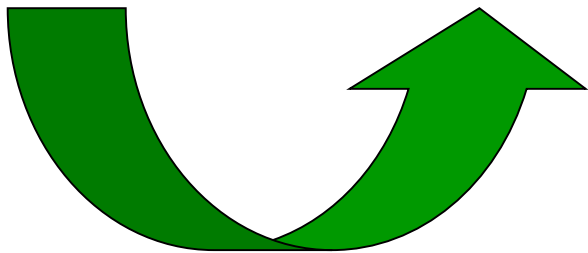
mRNA aktuálně translatovaná v ribozomu a jím chráněná (cca 30 bází) může být izolována s použitím nuklázy, která rozštěpí nechráněné úseky. Následně je fragment reverzně transkribován, amplifikován a sekvenován

Jaké jsou starty translace?

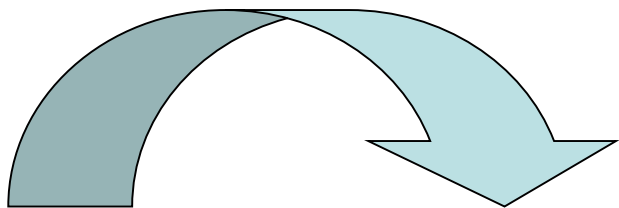
Místo cykloheximidu lze použít **harringtonin** – inhibitor počáteční fáze translace. Ribozomy jsou zastaveny za iniciačním kodonem.



Translace



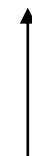
Aktuální koncentrace proteinu



Degradace

Pulsed SILAC

Pulse-chase SILAC



SILAC



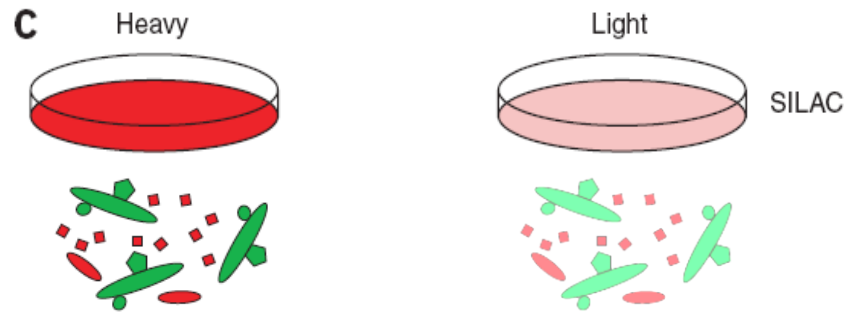
Pulse-chase SILAC

SILAC – Stable Isotope Labeling with Aminoacids in Culture

HEAVY
1-2 AA značené
stabilním izotopem

^{13}C -lysine

^{13}C -arginine

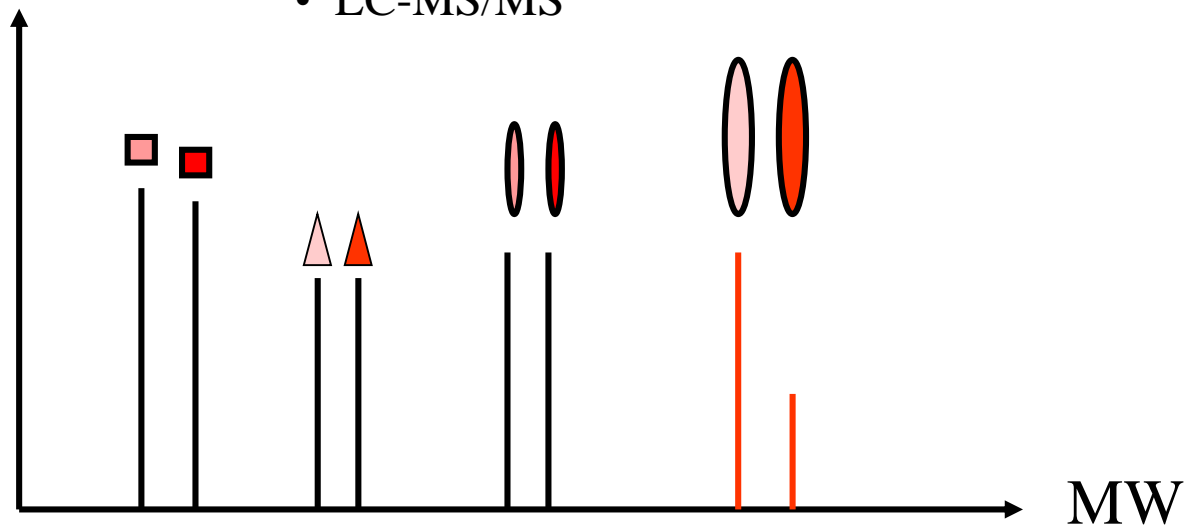


LIGHT
běžné AA

- smíchání
- subcell. frakcionace
- separace
- štěpení trypsinem
- LC-MS/MS

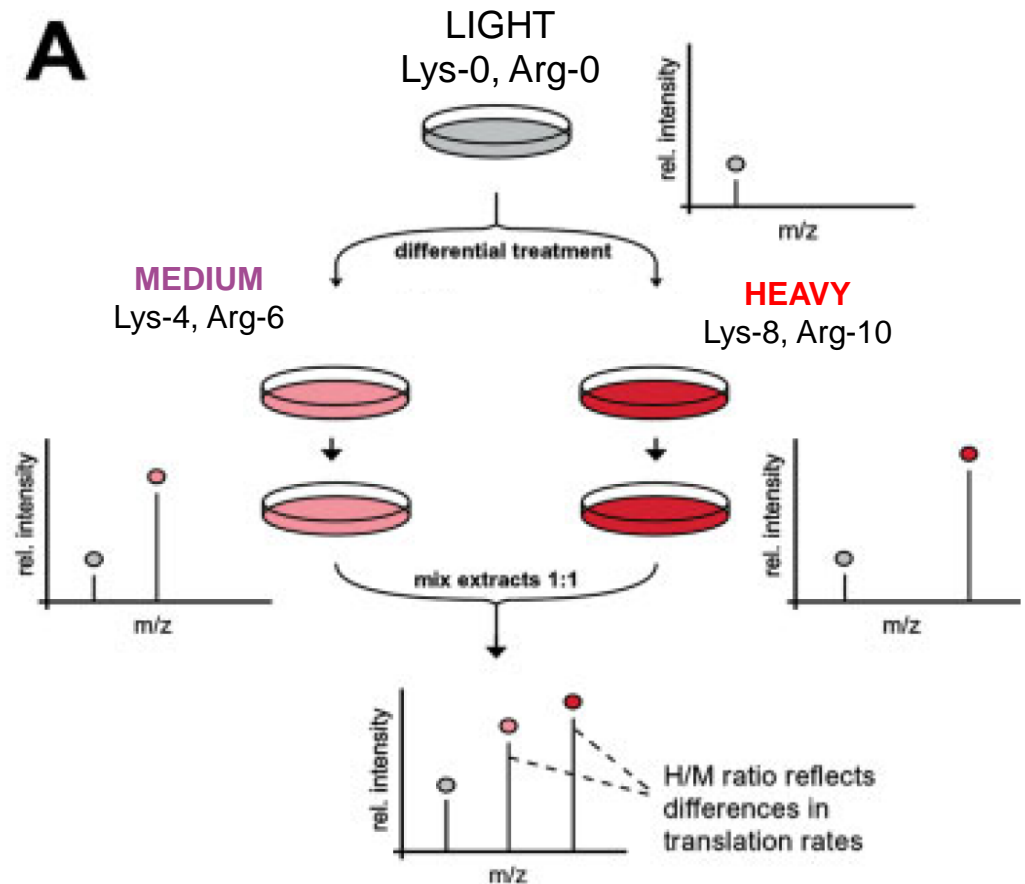
Bezsérové systémy
nebo dializované
sérum !

Kvantifikace MS
Identifikace MS/MS



pulsed-SILAC (pSILAC)

Naznačení různě těžkými aminokyselinami po kratší dobu, než nezbytnou k úplnému proznačení, umožňuje studovat **rychlost translace** jednotlivých proteinů mezi dvěma a více vzorky



pulse-chase SILAC (pcSILAC)

Metoda umožňující studovat změnu **translace i degradace** po nějakém zásahu

Buňky jsou nejdříve kompletně naznačeny „těžkým“ R a následně přeneseny do média s „těžkým“ K.

Používáme však pro 2 různé „těžké“ topoizomery R i K.

Úbytek peptidů s těžkým R  degradace

Příbytek peptidů s těžkým K  translace

A

treated

H [R₁₀, K₀] L



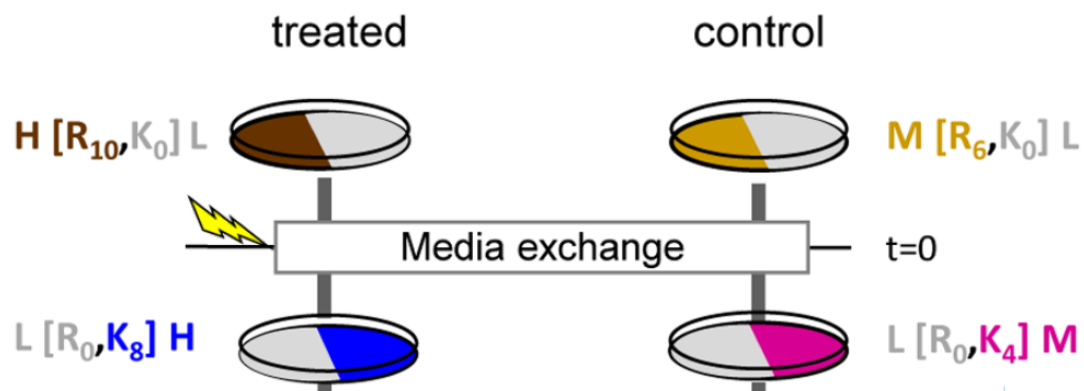
control

M [R₆, K₀] L



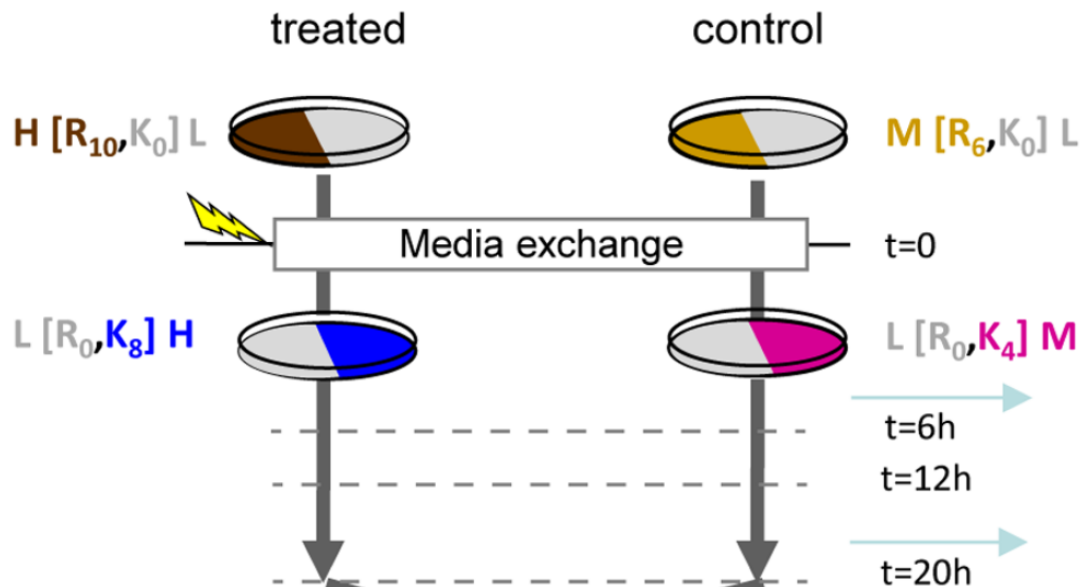
Vše kompletně naznačeno
R6 nebo R10

A



Vše kompletně naznačeno
R6 nebo R10

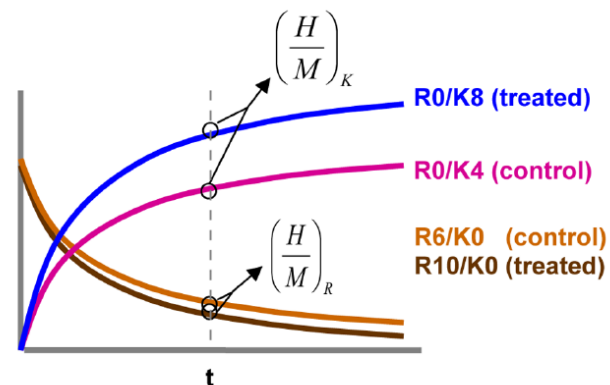
Proveden zkoumaný zásah a
přeneseno do nového média
S K4 nebo K8

A

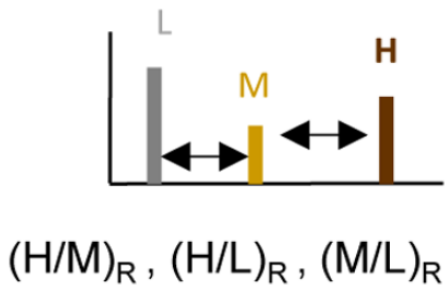
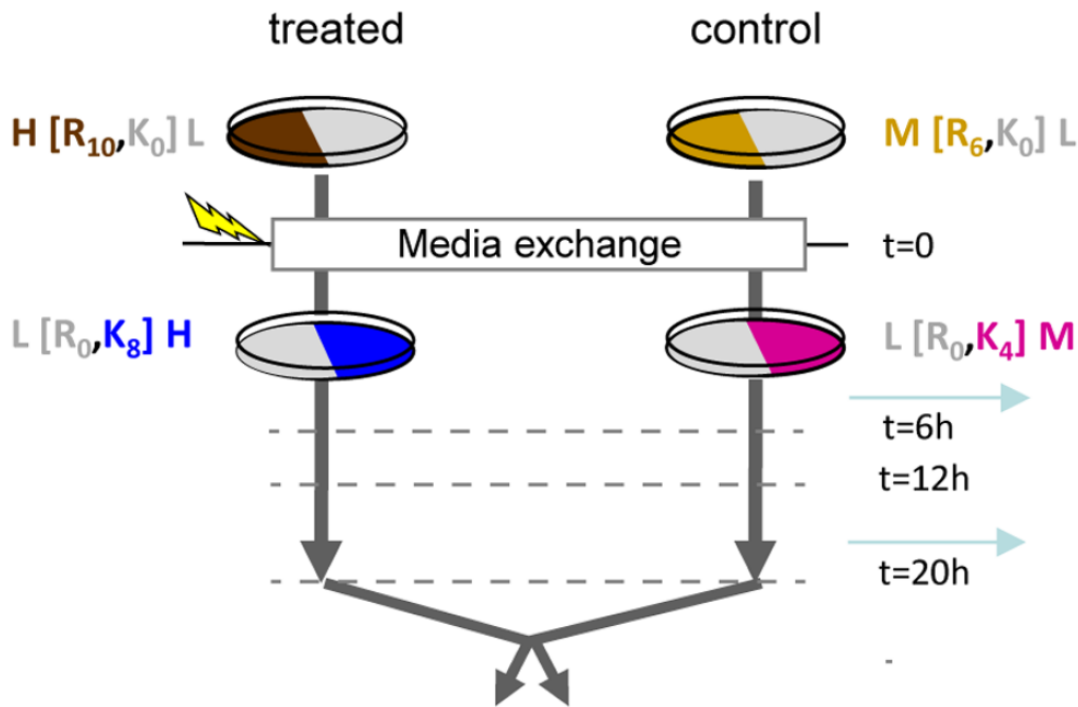
Vše kompletně naznačeno
R6 nebo R10

Proveden zkoumaný zásah a
přeneseno do nového média
S K4 nebo K8

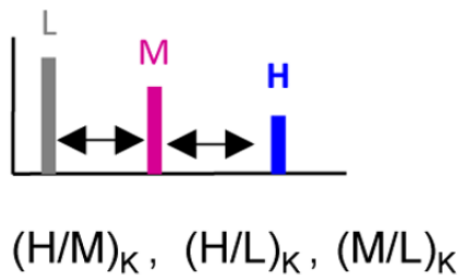
V čase ubývá značeného R
(degradace)
Přibývá značeného K
(translace)



A



Peptidy s Arg



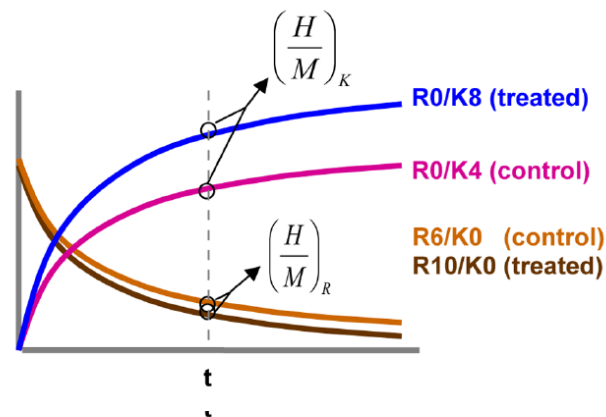
Peptidy s Lys

I

Vše kompletně naznačeno
R6 nebo R10

Proveden zkoumaný zásah a
přeneseno do nového média
S K4 nebo K8

V čase ubývá značeného R
(degradace)
Přibývá značeného K
(translace)

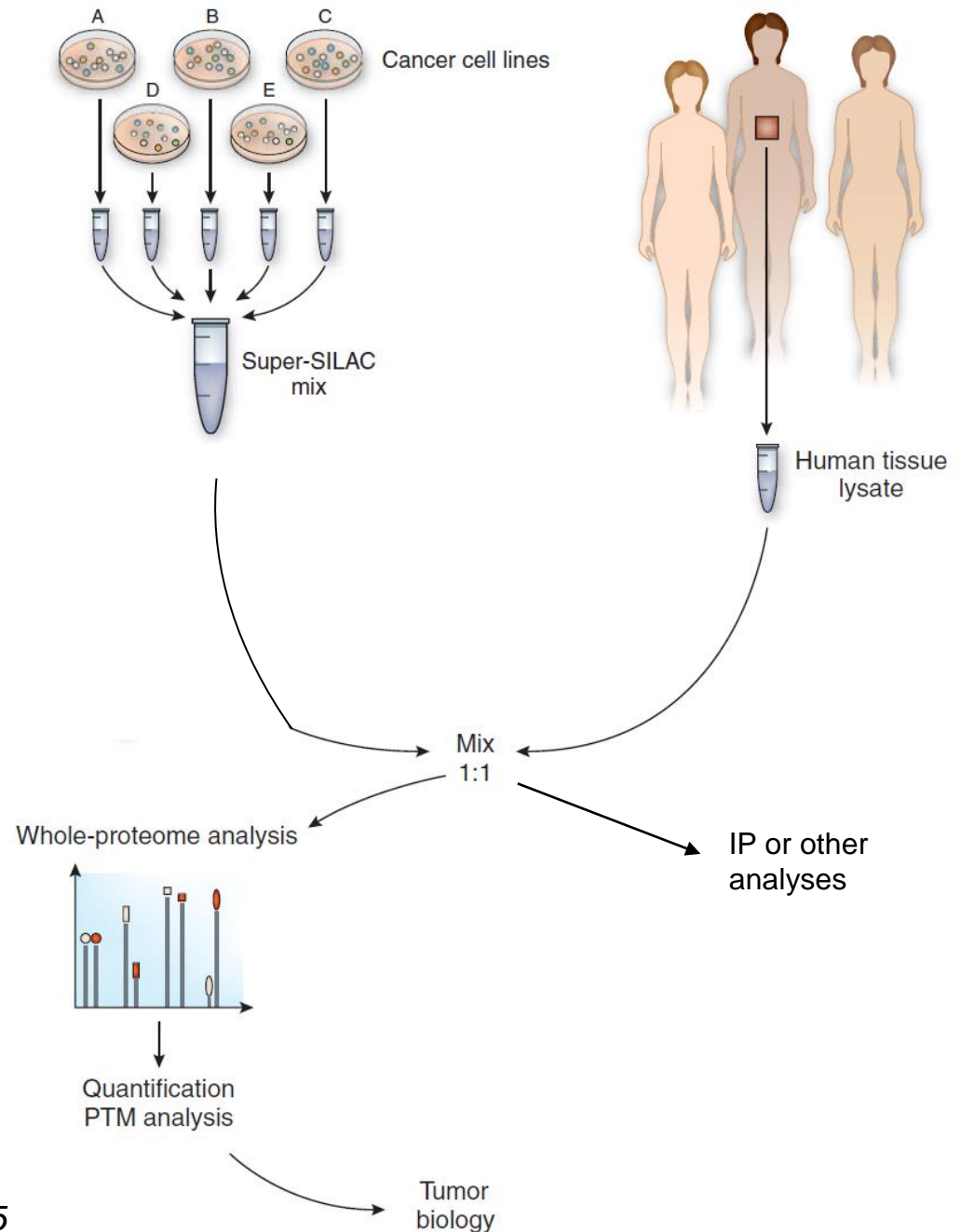


Další netradiční využití metod založených na inkorporaci stabilních izotopů

- Využití vzorku značeného SILAC jako srovnávacího standardu (**Super-SILAC**)
- Stanovení intracelulární lokalizace proteinů (**LOPIT**)

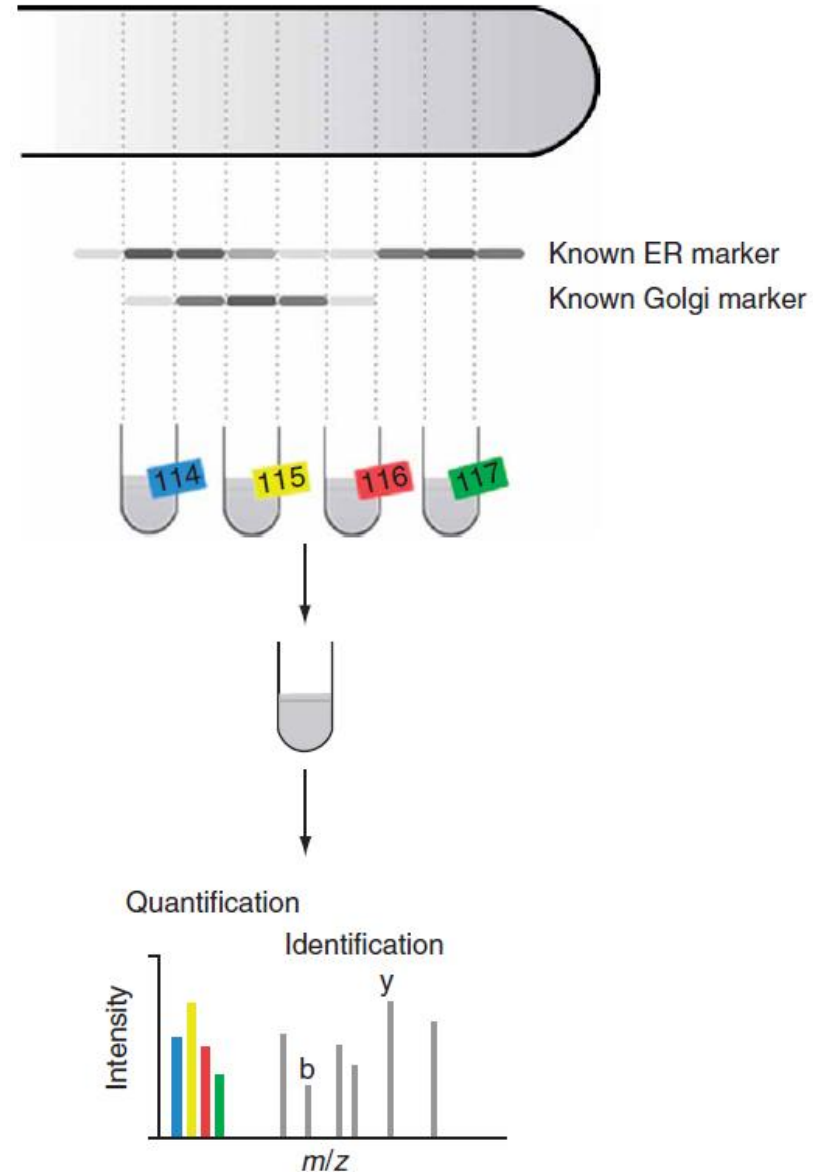
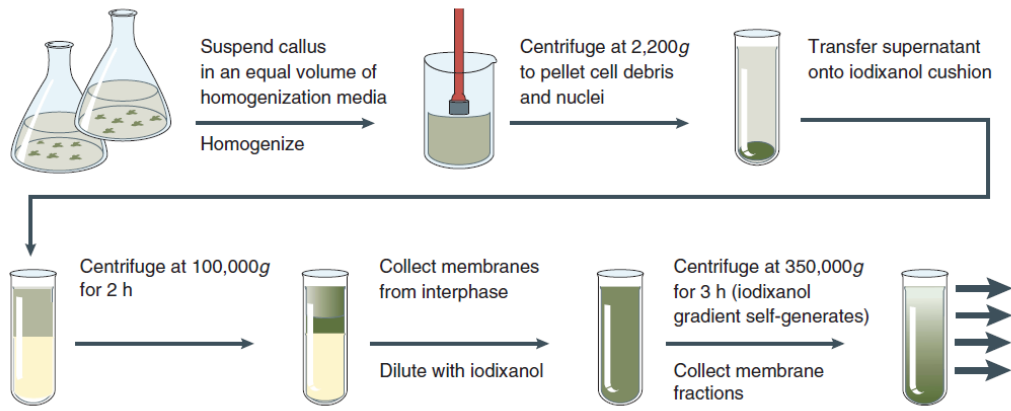
SUPER-SILAC

Expresní proteomika
pacientských nádorových
vzorků. Jako kontrolní
standard slouží
homogenát ze směsi
buněčných linií
odvozených ze stejného
typu nádoru naznačených
metabolicky „heavy“ Arg
a/nebo Lys.



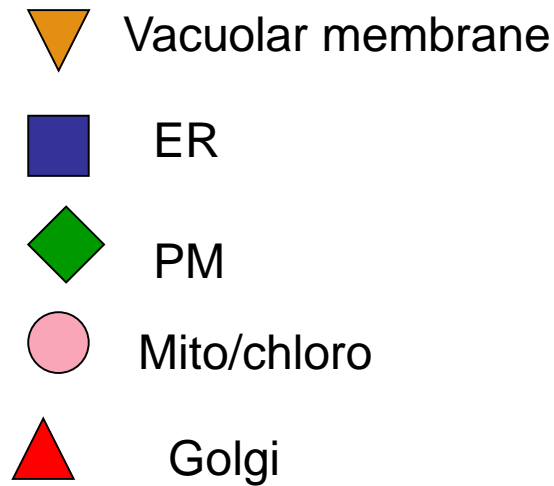
Metody studia subcelulární lokalizace proteinů

- 1) Na základě signálních sekvencí a struktury
- 2) Mikroskopie a imunohistochemie
- 3) Proteomická analýza jednotlivých izolovaných organel
- 4) LOPIT - Localization of organelle proteins by isotope tagging



Proteins in four gradient fractions corresponding to the peaks of organelle distributions are digested with trypsin and the resulting peptides are derivatized with different iTRAQ reagents. Samples are next pooled and analyzed by LC-MS. Proteins derived from the same membrane have similar quantitation profiles, as they co-fractionate in the density gradient.

MS/MS



Filled - known

Open - predicted

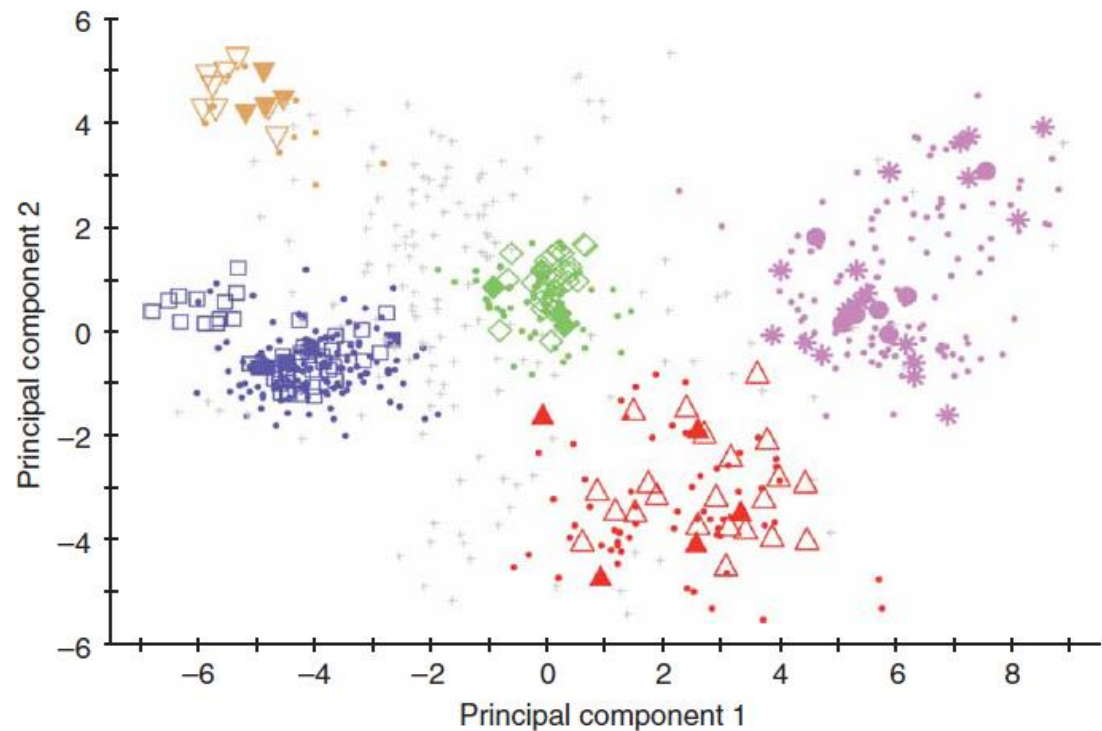


Figure 6 | PCA analysis showing clustering of proteins according to their distribution down the gradient. The iTRAQ quantitation data were analyzed by PCA, resulting in a scores plot on which proteins with similar density gradient distributions, and therefore localizations, co-cluster. Annotation of proteins with known (filled shapes) or predicted localizations (open shapes or stars) revealed the presence of five main clusters, corresponding to Golgi, ER, plasma membrane, vacuole and mitochondria together with plastids (which were not resolved in this study). Small dots indicate proteins, without known or predicted localizations, that were assigned to an organelle using PLS-DA. Small crosses indicate proteins that were not assigned to an organelle. Inverted triangles, vacuolar membrane; squares, ER; diamonds, PM; circles, known mitochondria_plastids; stars, predicted mitochondria_plastids; triangles, Golgi apparatus.

PROTEOMIKA 2015/2016

Pondělí 14/12

**Zvláštní aplikace
izotopových metod**

Klinická proteomika

MALDI imaging

Protein arrays

TOP-DOWN

???

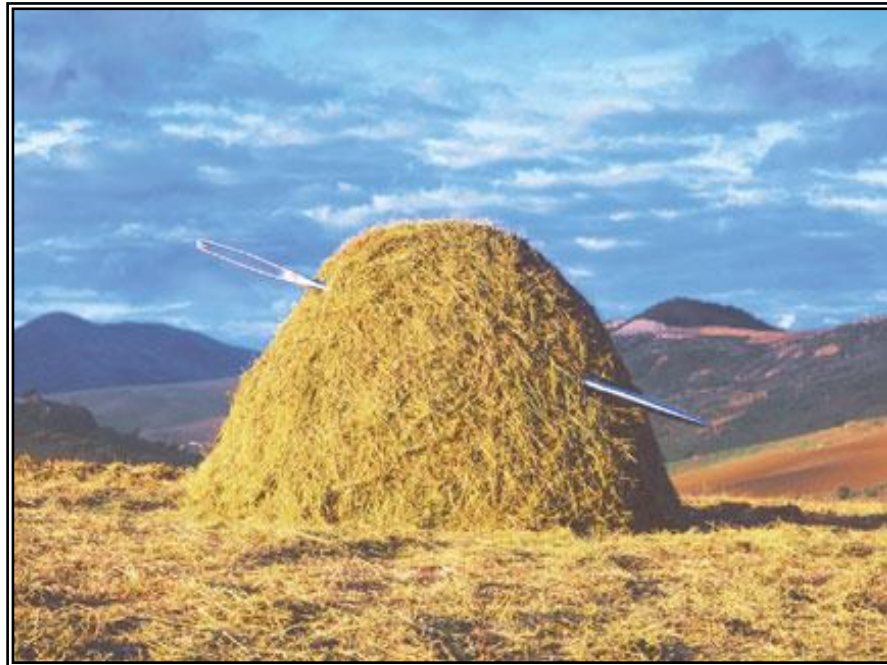
KLINICKÁ PROTEOMIKA, PLAZMA A SÉRUM

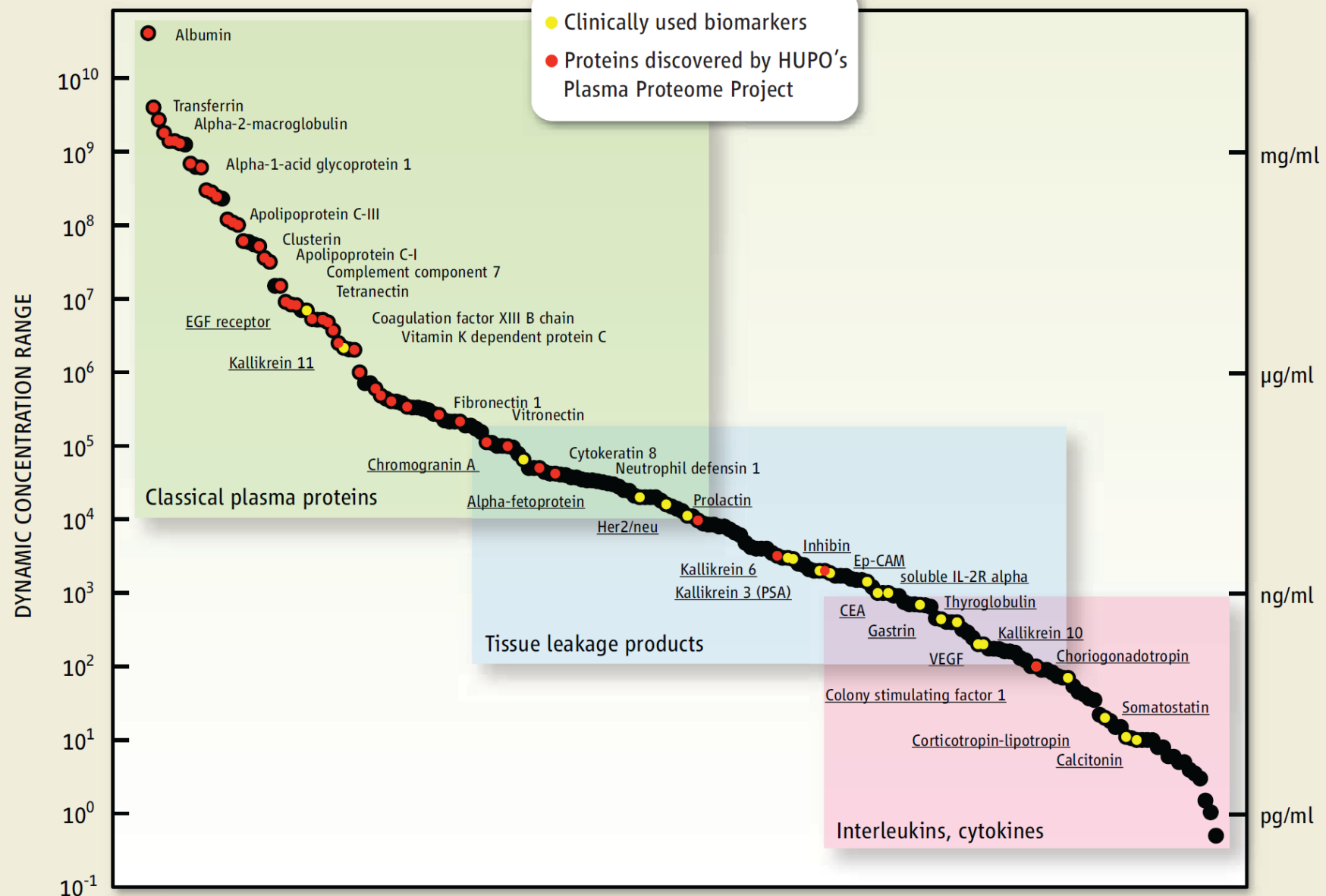


Co je to biomarker ?

*Protein nebo peptid vykazující reprodukovatelné rozdíly
v expresi či struktuře
specifické pro dané onemocnění.*

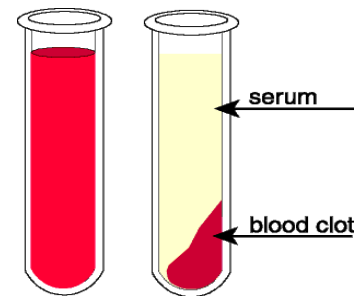
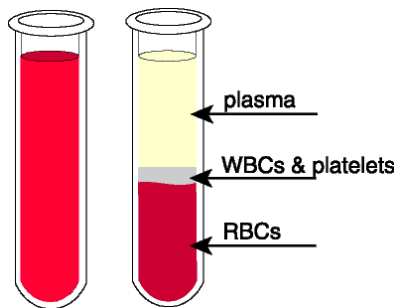
Nejlépe ve snadno dostupné tkáni či tělní tekutině.





PLASMA PROTEINS

Krevní plazma a sérum



- Dosud spolehlivě identifikováno zhruba 3500 bílkovin

- Extrémní rozdíly v koncentracích (10 řádů)

Albumin 40 000 000 000 pg/ml

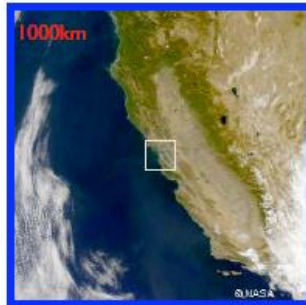
Interleukin 6 5 pg/ml

10^{10} Really Is Wide Dynamic Range

(Here on a linear scale)



10



9



8



7



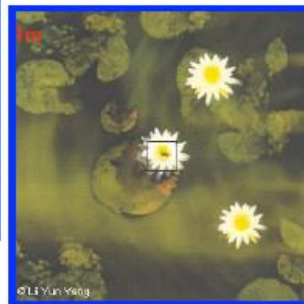
6



5



4



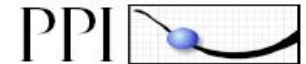
3



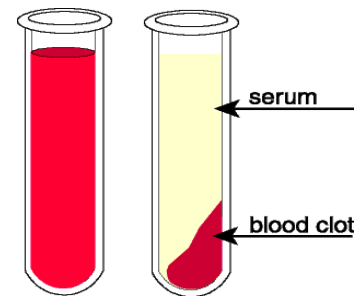
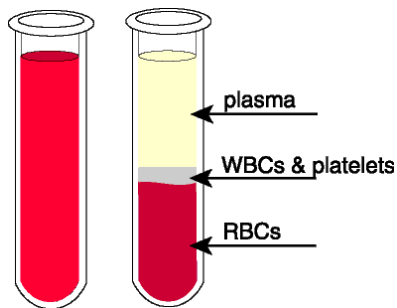
2



1



Krevní plazma a sérum

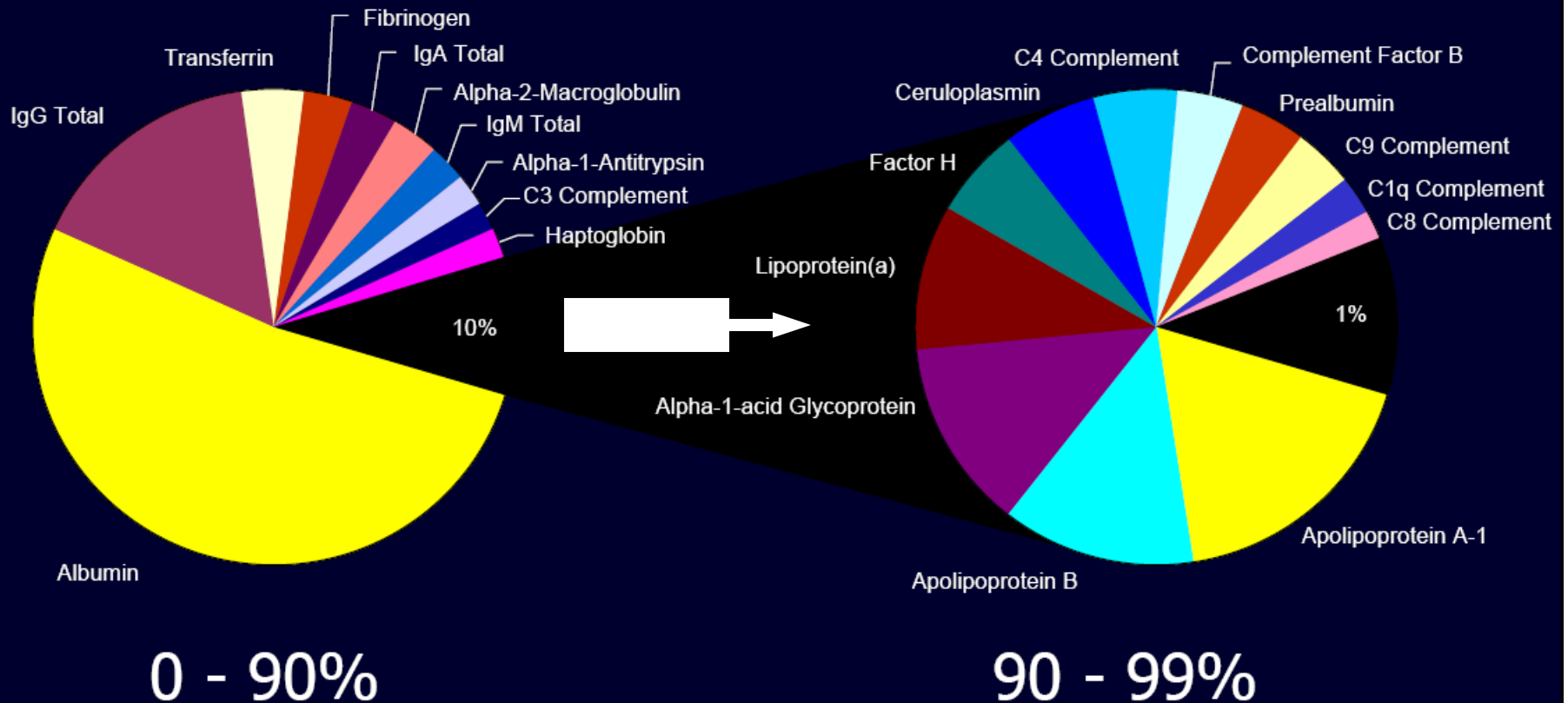


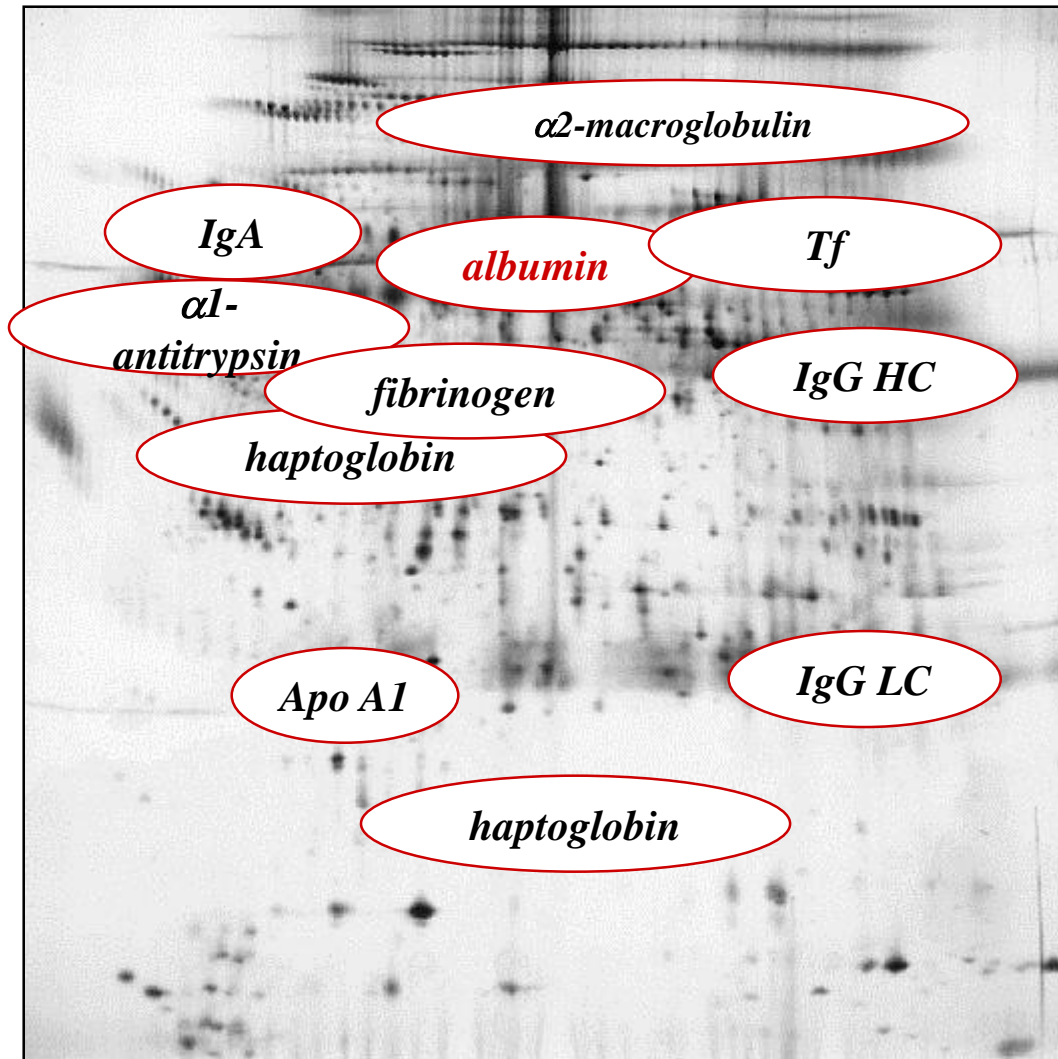
- **Dosud spolehlivě identifikováno zhruba 3500 bílkovin**
- **Extrémní rozdíly v koncentracích (10 řádů)**

Albumin	40 000 000 000 pg/ml
Interleukin 6	5 pg/ml
- **10 hlavních proteinů představuje cca 90% bílkoviny**
(Albumin, IgG, IgA, Tf, alpha-2 makroglobulin, haptoglobin...)
- **22 majoritních proteinů představuje více než 99 % bílkoviny**
- **složení séra se mění (nejen) při chorobných stavech**

Major Plasma Proteins

99% of plasma protein mass





Deplete majoritních proteinů a chromatografické přístupy !!!

Afinitní mechanismy deplece majoritních proteinů

- **Imunodeplece nejkonzentrovanejších proteinů**

„Top6“ „Top10“ „Top12“ „Top14“ „Top20“

(albumin, transferrin, haptoglobin, antitrypsin, IgG, IgA....)

Protilátky + Cibacron Blue (albumin)+ Protein A, protein G (IgG, IgA)

- **„Ekvalizace“**

knihovna náhodných hexapeptidů sloužících jako ligandy

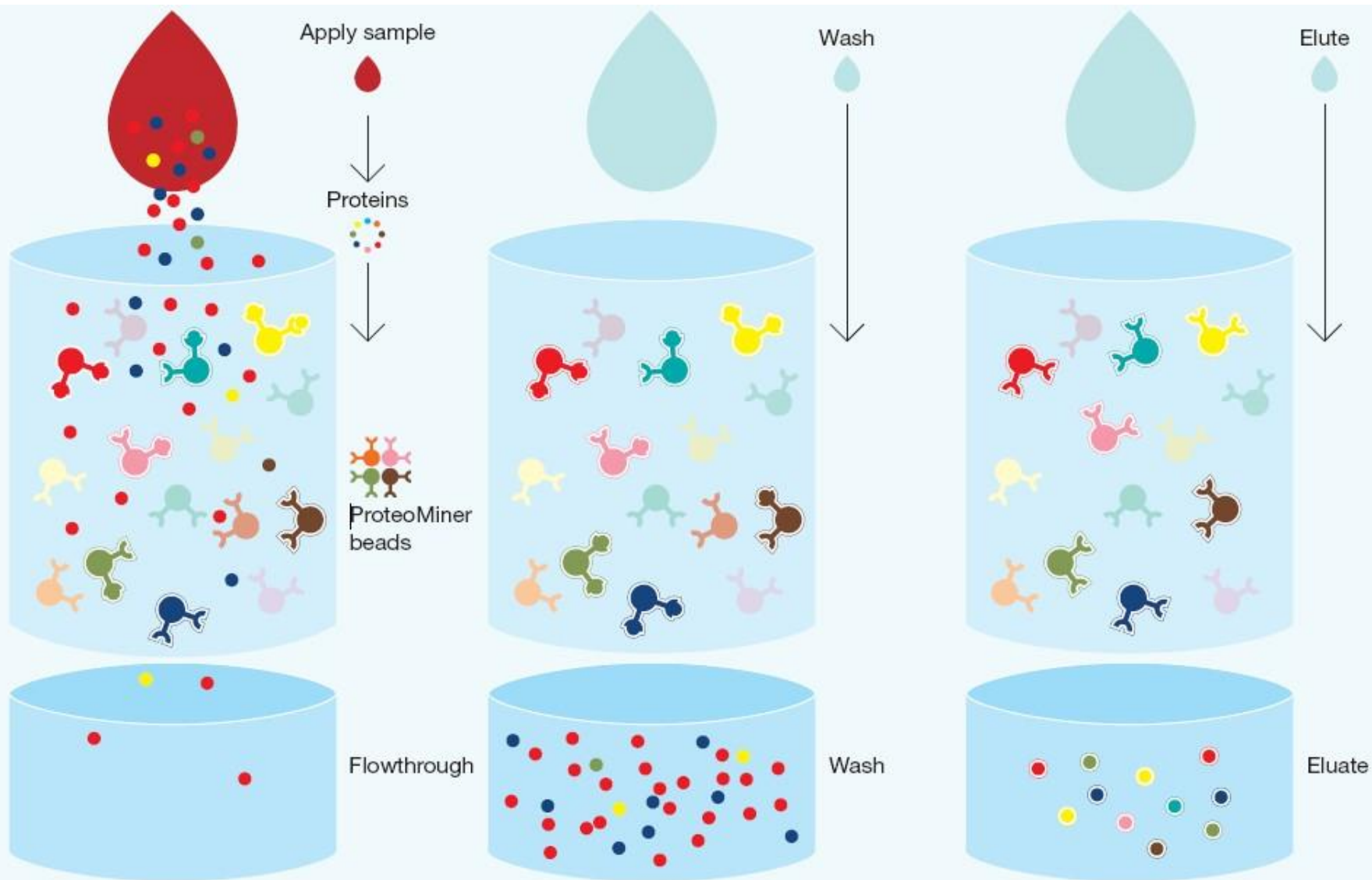
„ProteoMiner“

Při depleci jsou odstraňovány asociované proteiny a peptidy!

Cena!

Nízká reproducibilita!

Knihovna náhodných hexapeptidů sloužících jako ligandy „ProteoMiner“



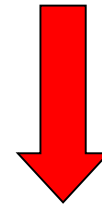
Sérum
Plasma
CSF



**Odstranění majoritních
proteinů**
(plus analýza depletovaných?)



(Frakcionace)
LC-MS



běžná identifikace 500-1500 proteinů

Kvantifikace iTRAQ, TMT, štěpění v 018, label free

Rýžování zlata nebo přebírání odpadků ?

Dosud identifikované „biomarkery“ jsou
Relativně hojné sérové bílkoviny nebo
jejich fragmenty !

Fibrinopeptid A
Transferin
C3a, C3f, C4
fibrinogen
haptoglobin
alpha 1-antitrypsin
transthyretin
serum amyloid A
Hb alpha, beta
apolipoprotein A-I, A-II...apod.

....až na vzácné výjimky



Jaký protein má potenciál nádorového markeru ?

- *Fragmenty bílkovin pocházející přímo z nádoru nebo okolní tkáně (navázané na nosič ?)*
- *Fragmenty vzniklé štěpením sérových proteinů nádorovými proteázami (navázané na nosič ? Nebo vzniklé ex-vivo ?)*
- *Proteiny odrážející systémovou odpověď na nádor (protilátky...)*
 - *další?*

Další proměnné

- *renální filtrace versus nosiče*
- *vhodná negativní kontrola, výběr skupiny*
- *odběr a zpracování vzorků, plastik*
 - *???*

PROTEOMIKA 2015/2016

Pondělí 14/12

**Zvláštní aplikace
izotopových metod**

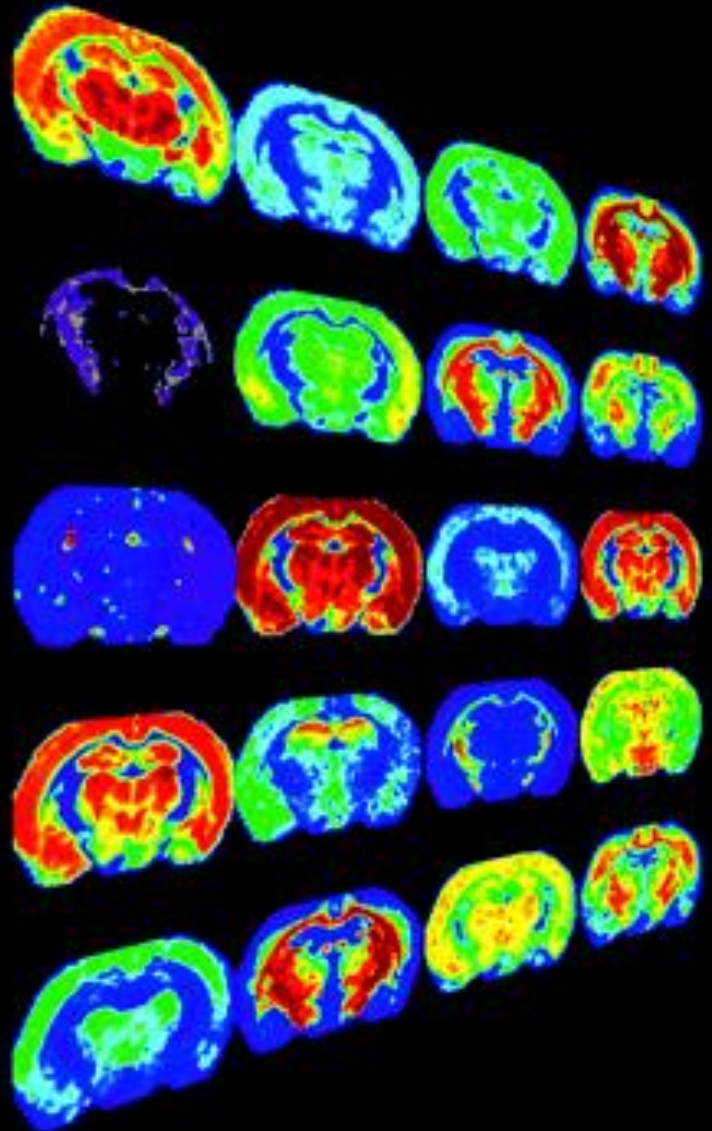
Klinická proteomika

MALDI imaging

Protein arrays

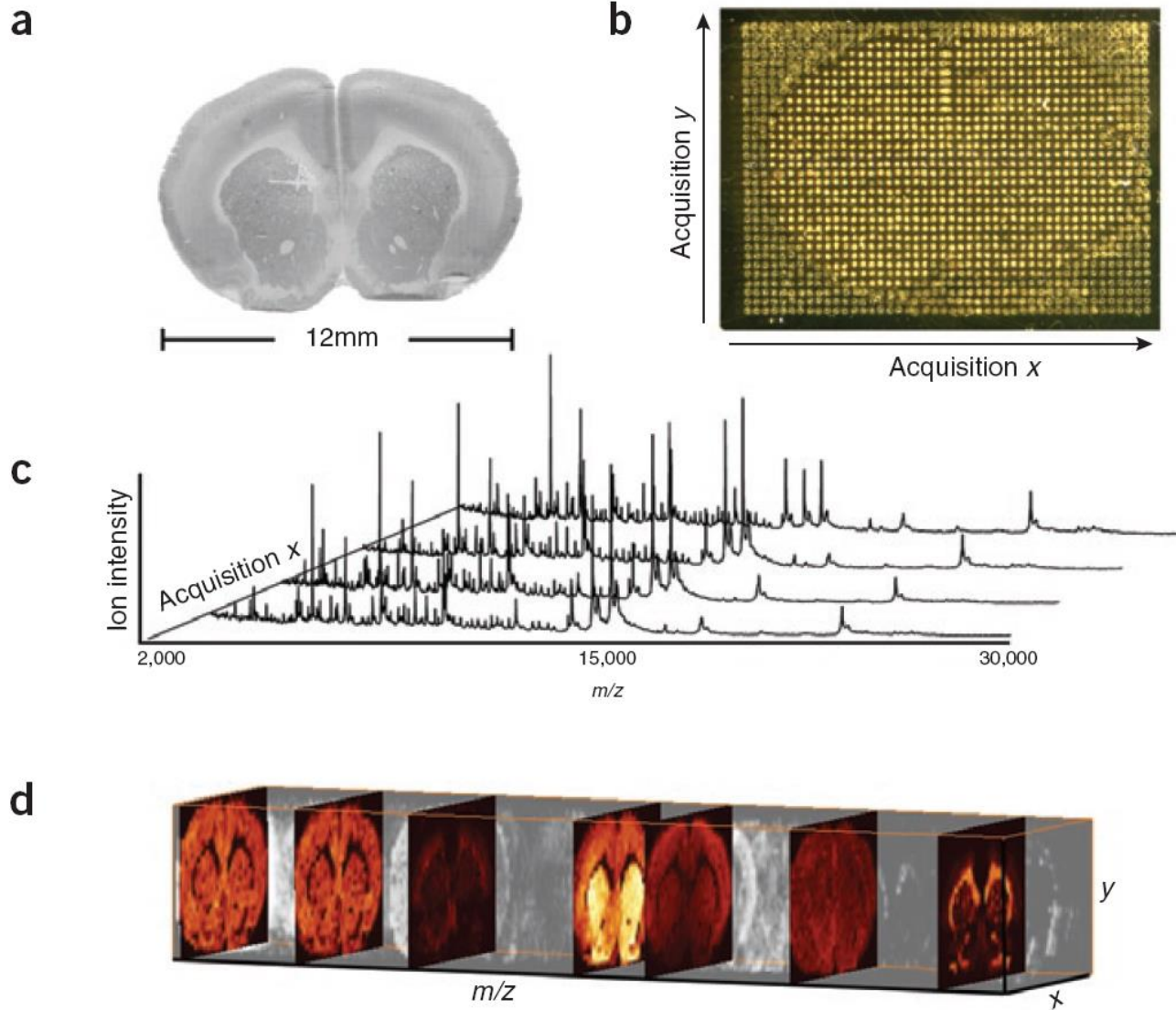
TOP-DOWN

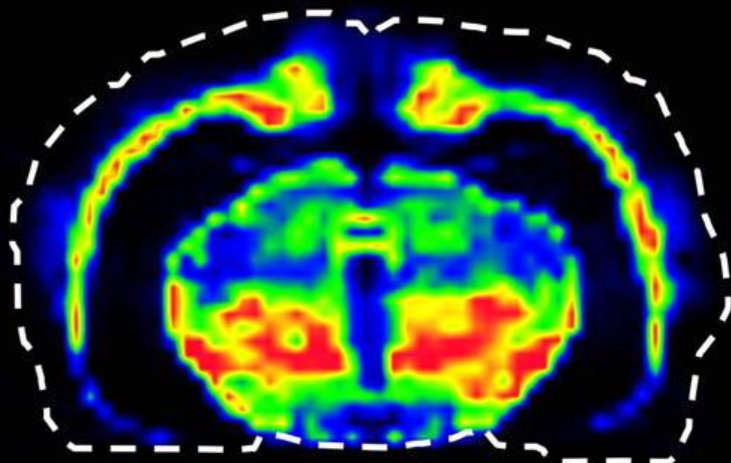
???



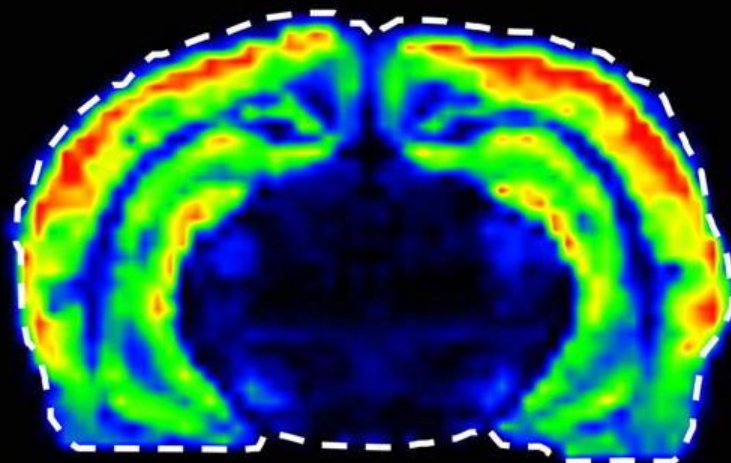
MALDI IMAGING

MALDI IMAGING

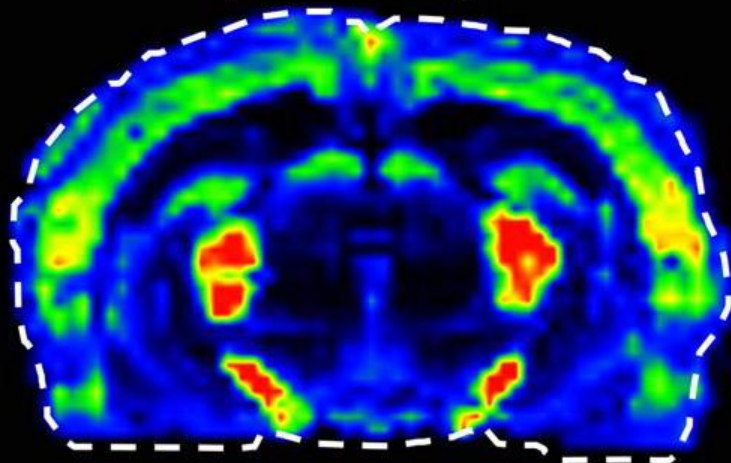




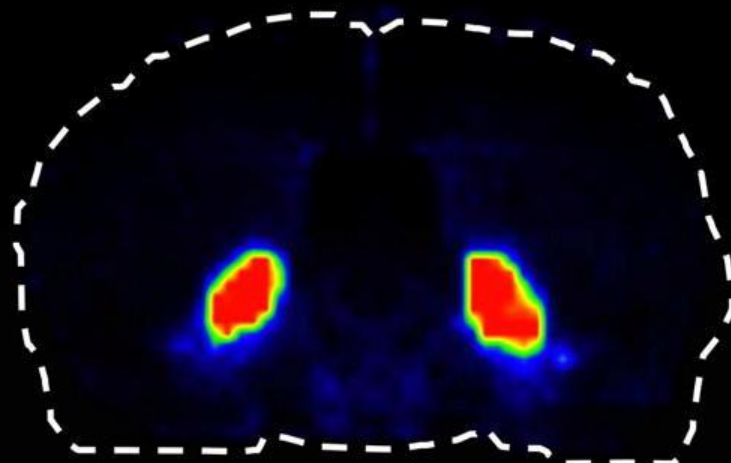
**Myelin Basic Protein
(isoform 4)**



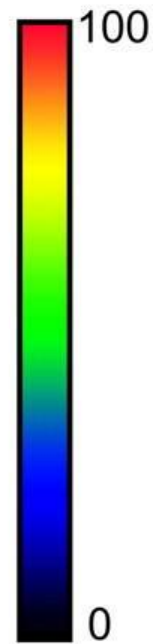
Neurogranin



PEP-19



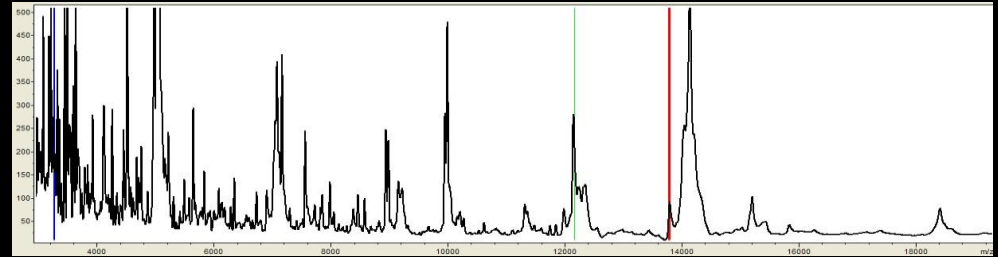
Proenkephalin A



Relative
Intensity

70 μm Image of Rat Cerebellum

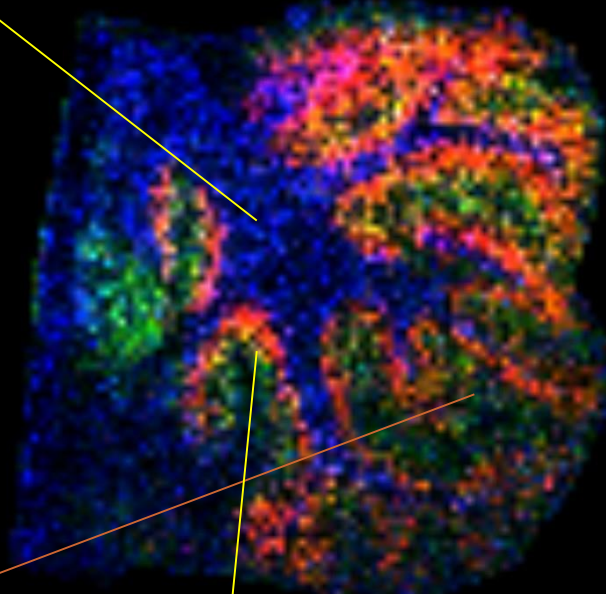
White matter



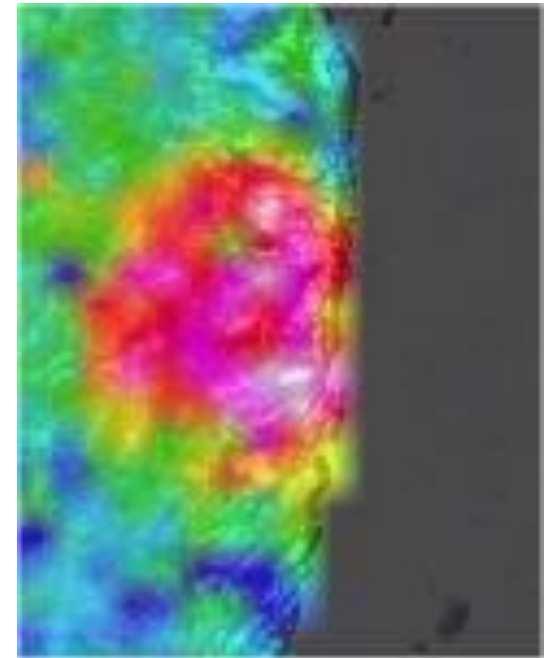
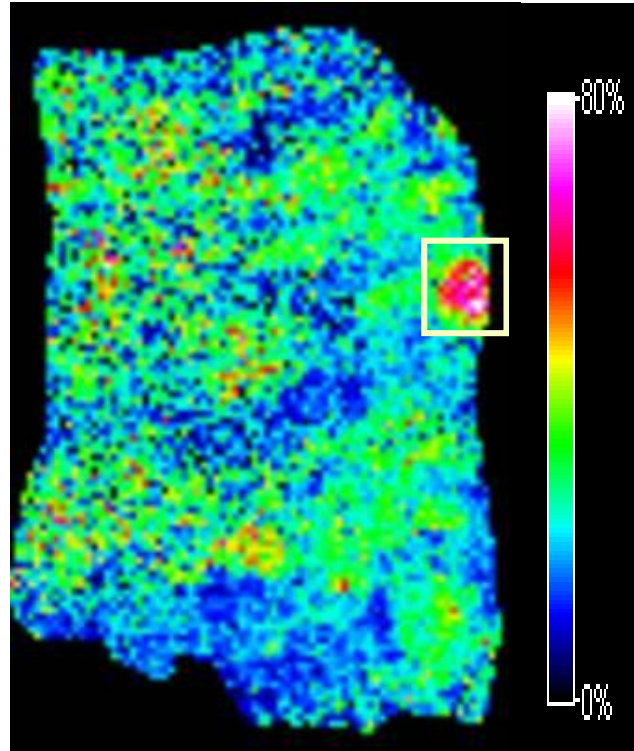
Grey matter

Granule cells

70 μm resolution

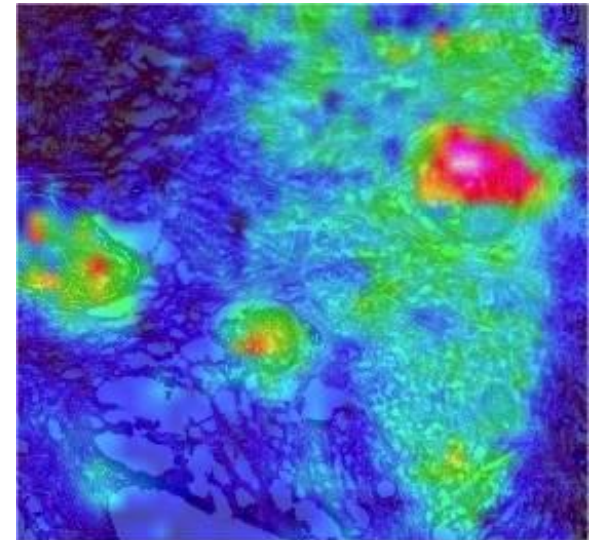
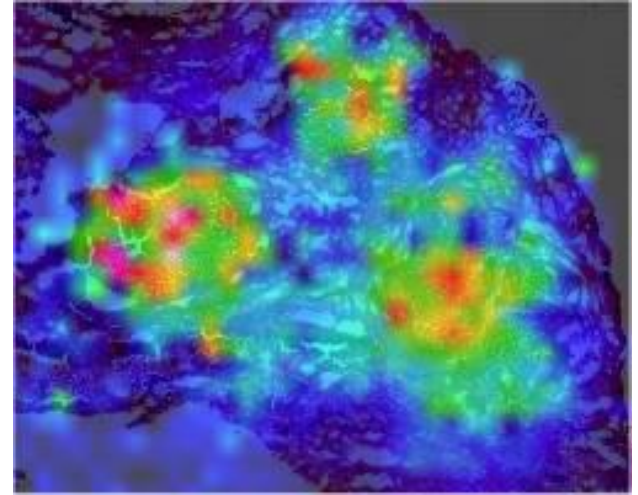
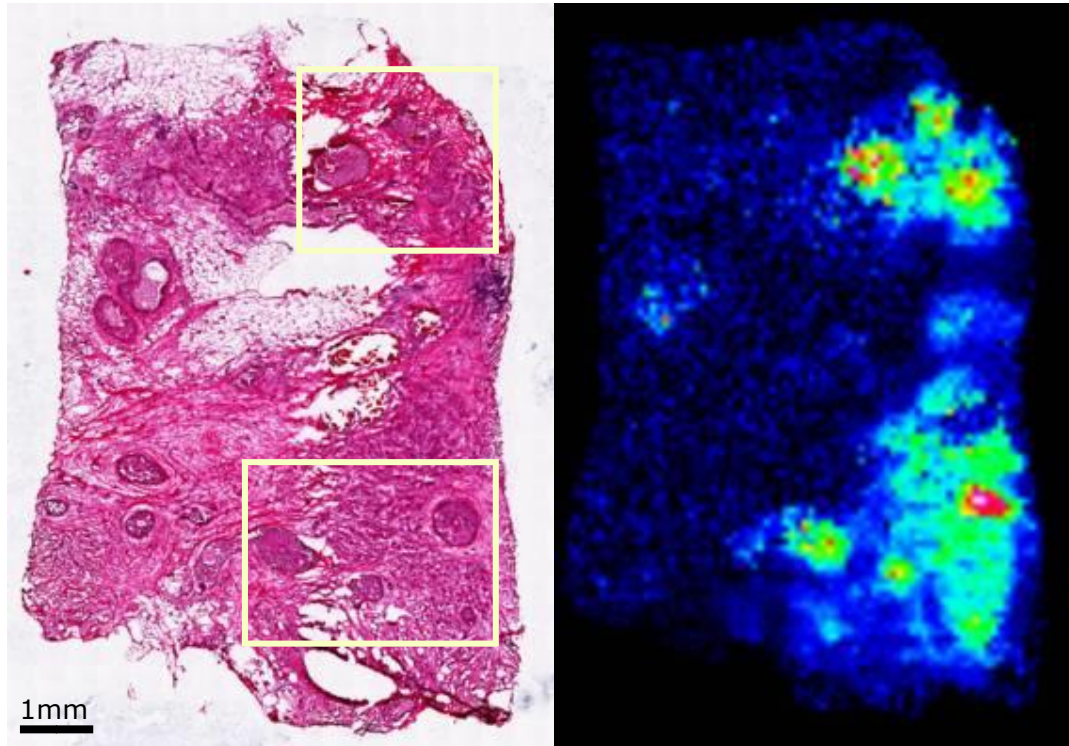


MALDI Imaging of Breast Cancer



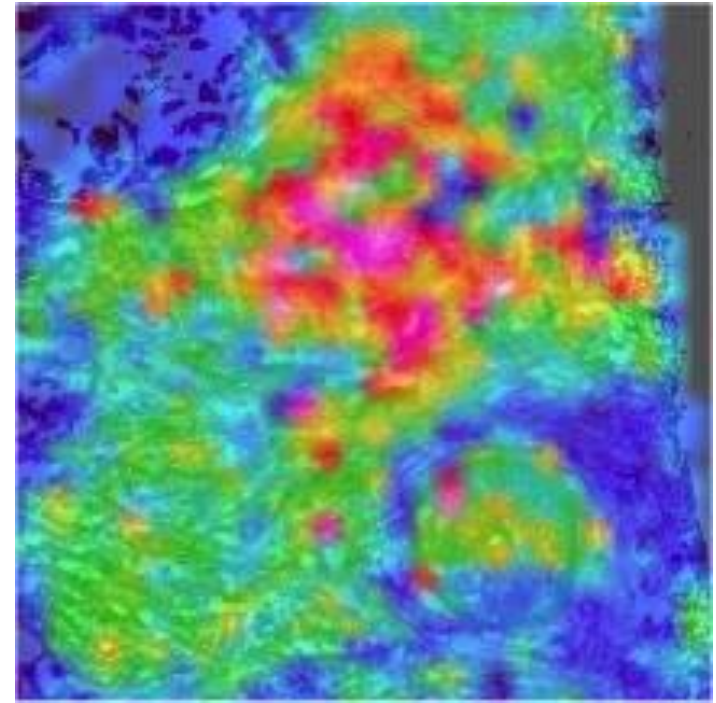
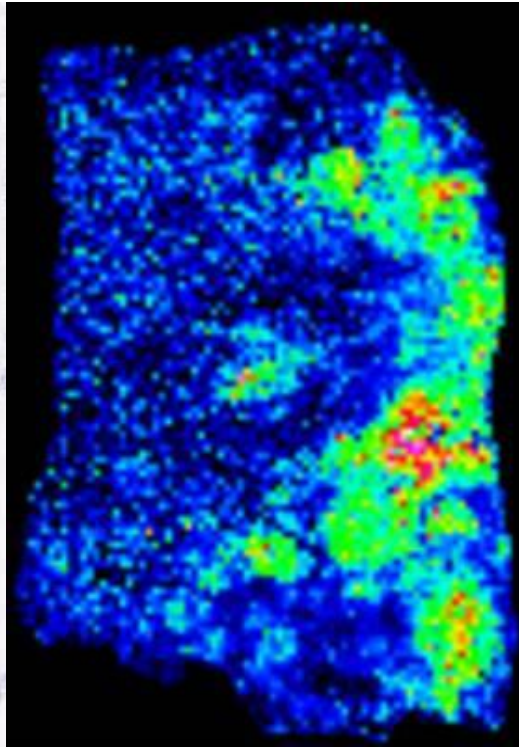
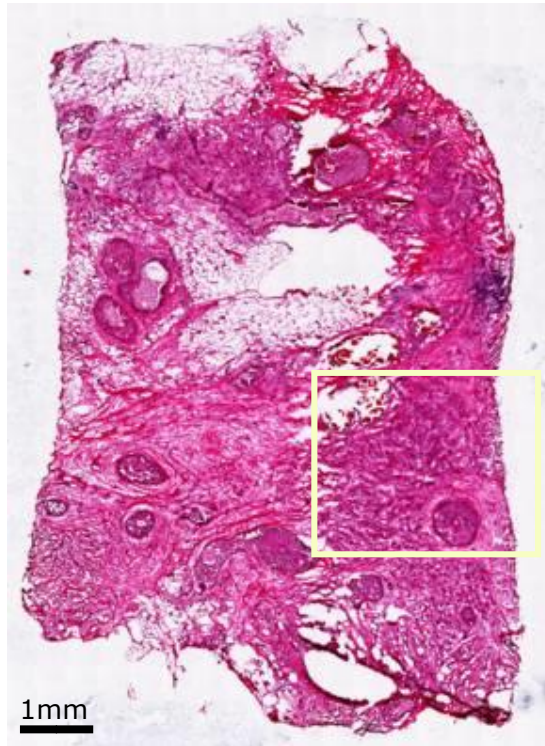
Lymphocyte infiltration

MALDI Imaging of Breast Cancer



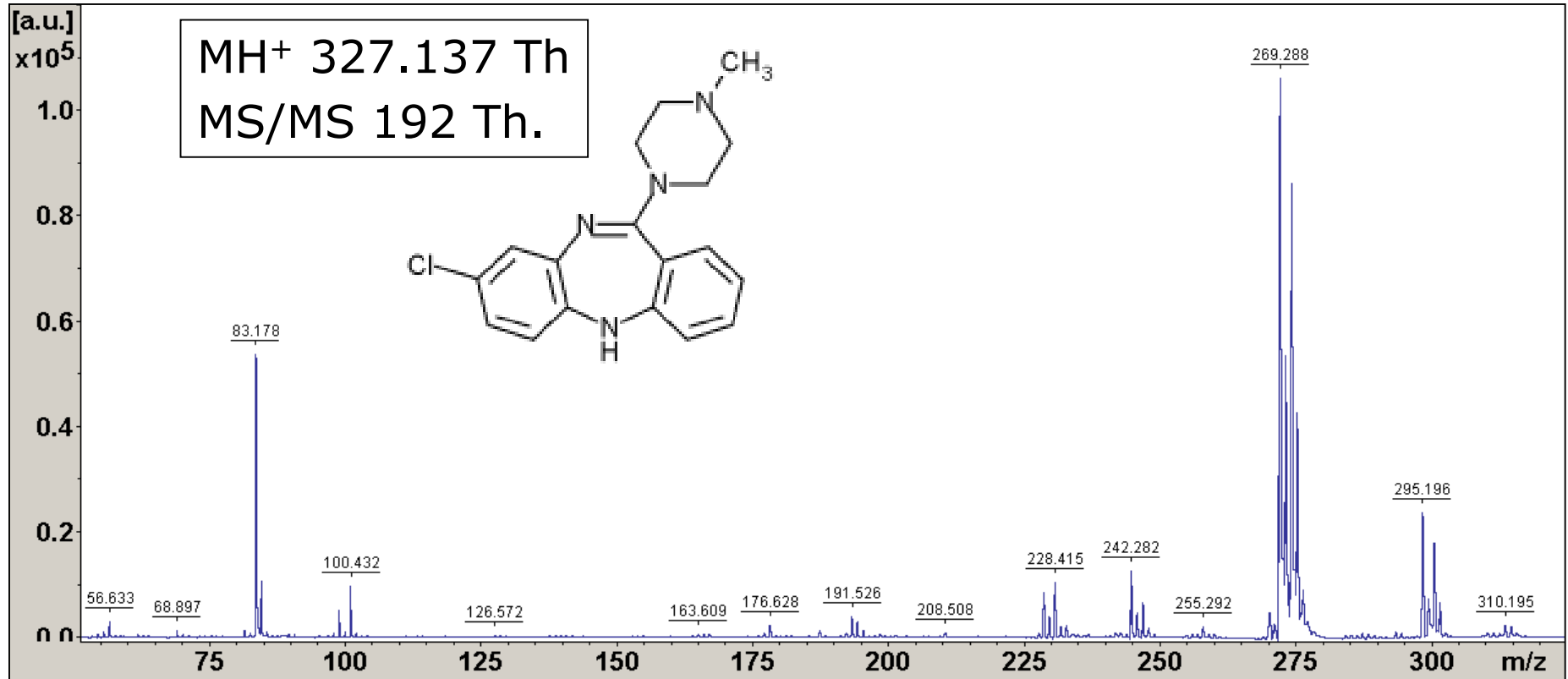
Carcinoma in situ

MALDI Imaging of Breast Cancer



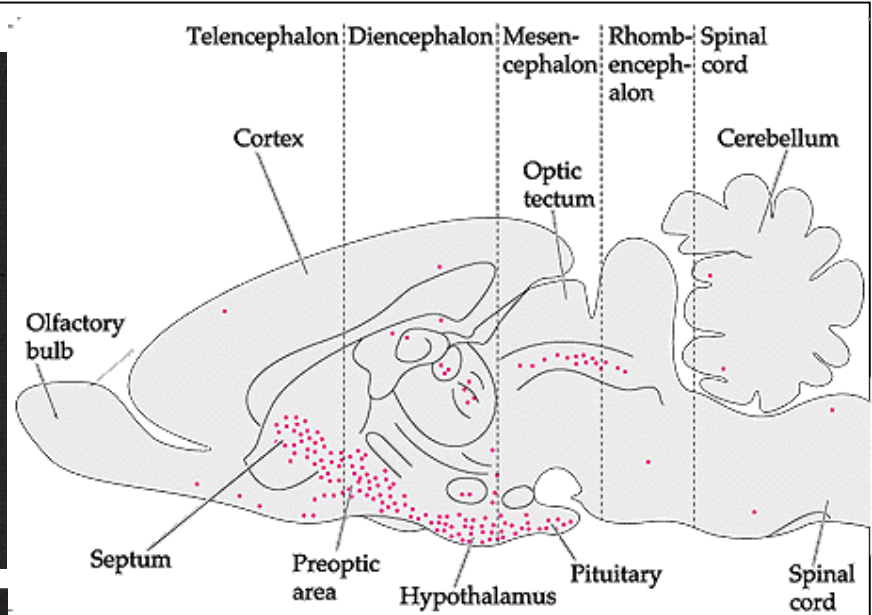
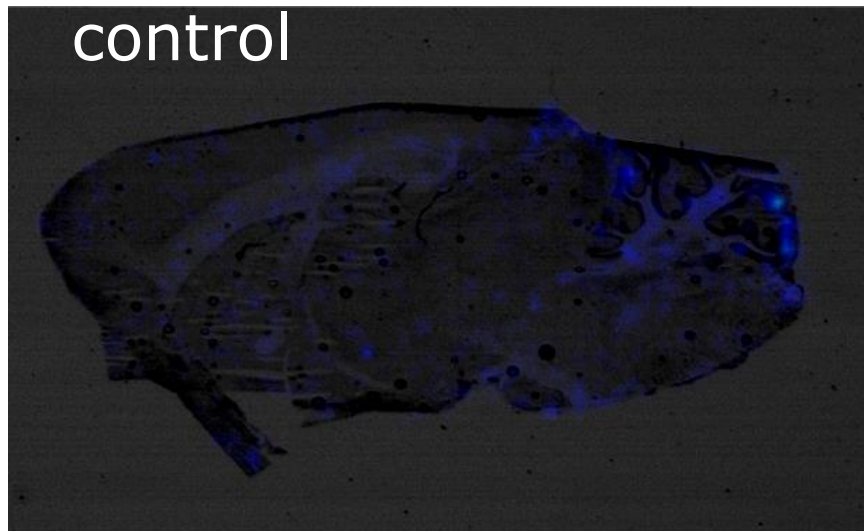
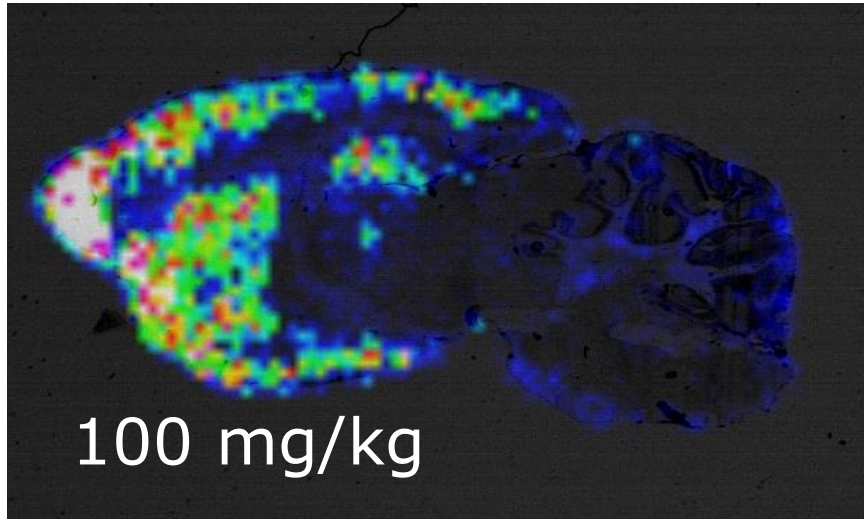
Invasive Tumor

Clozapine Drug Imaging



Binds to cortical D₁-like dopamin receptors

Clozapine Dosed Rat Brain (100 mg/kg) MS/MS



PROTEOMIKA 2014-2015

Pondělí 15/12

**Zvláštní aplikace
izotopových metod**

Klinická proteomika

MALDI imaging

Protein arrays

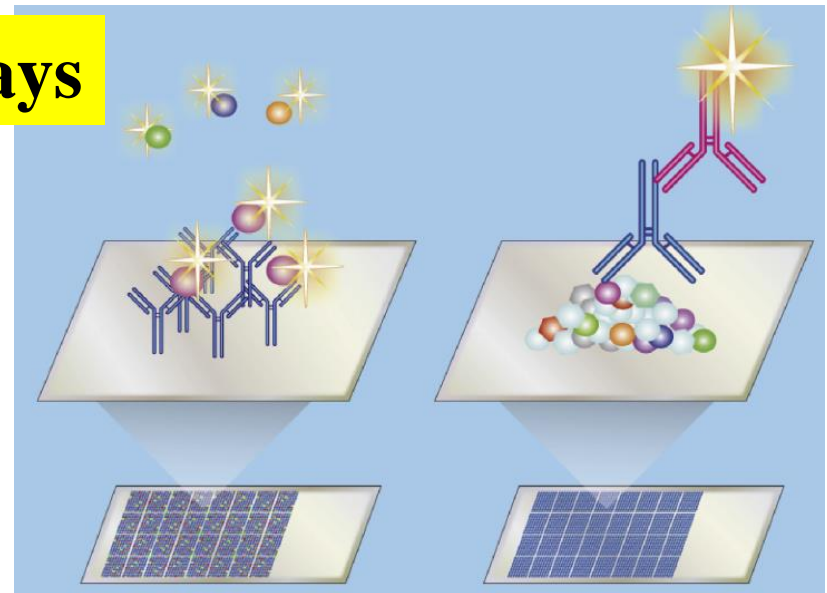
TOP-DOWN

???

Proteinové čipy - Protein arrays

- **Protilátky**
- **Rekombinantní (izolované) proteiny**
- **Proteiny syntetizované *in situ***

*Možnosti studia exprese
(přítomnosti), fosforylací
a interakcí protein-protein nebo
protein ligand*



forward arrays

Zakotvená
protilátka nebo
specifický
protein

reverse arrays

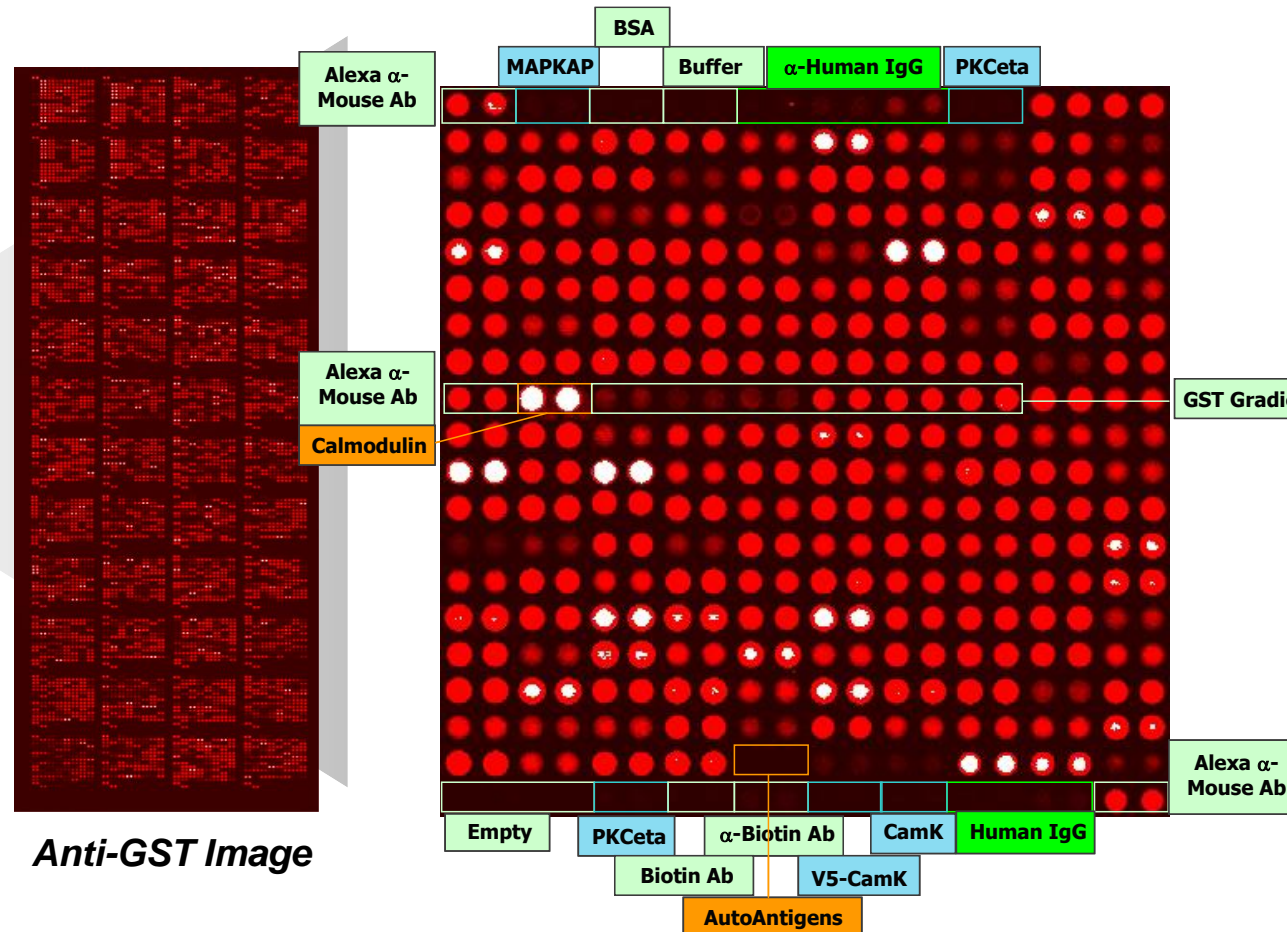
Zakotvený
komplexní analyt.
(lyzát, sérum a pod)

ProtoArray™ Human Protein Microarray v5.0

- ~9,000 human proteins available on a single array
- All clones fully sequenced
- **Baculovirus Expression System**
- **GST tagged**
- Expressed in Sf9 insect cells

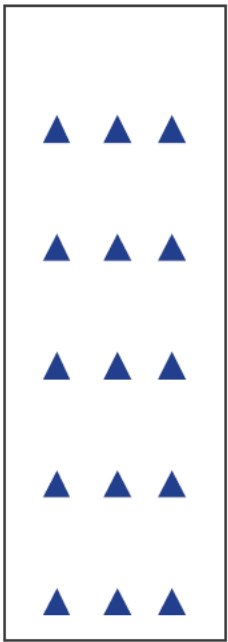
Screen:

- interactions
- antibodies
- kinase substrates

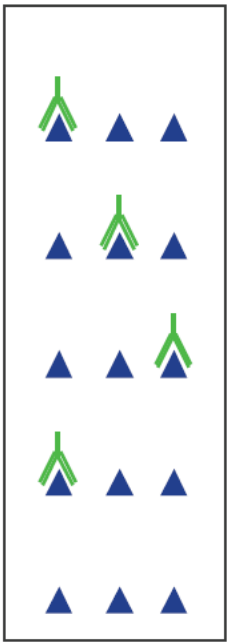


Hledání antigenů v séru

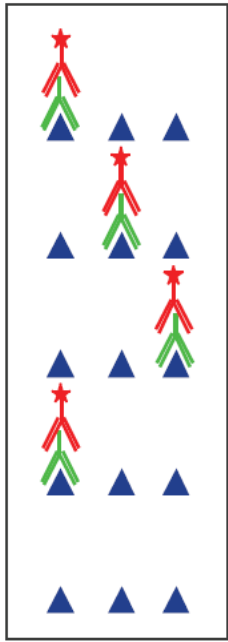
- ▲ ProtoArray® proteins
- Y Dilute serum (primary)
- Y* Fluorescent anti-antibody (secondary)



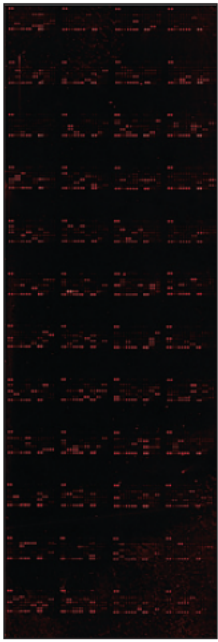
Block, add customer serum



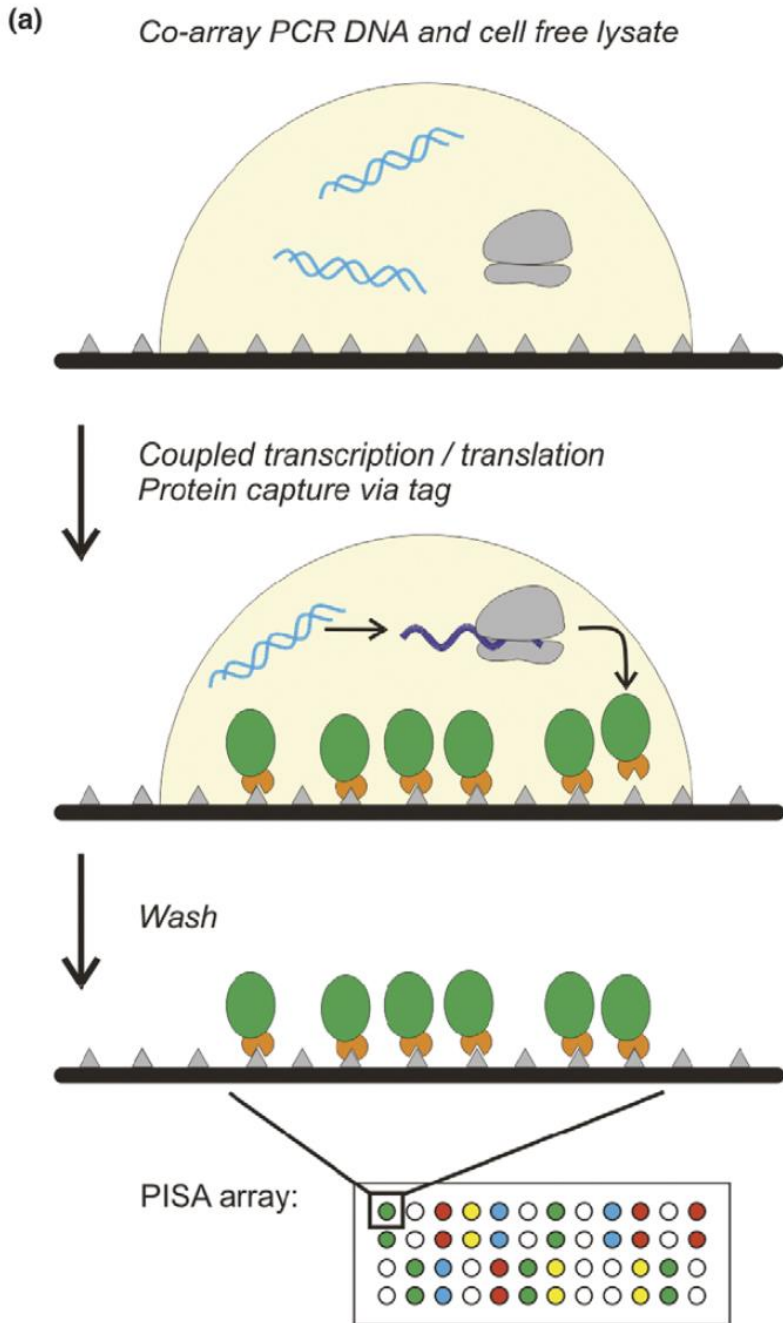
Wash, add Alexa Fluor® 647 dye-labeled antibody for detection



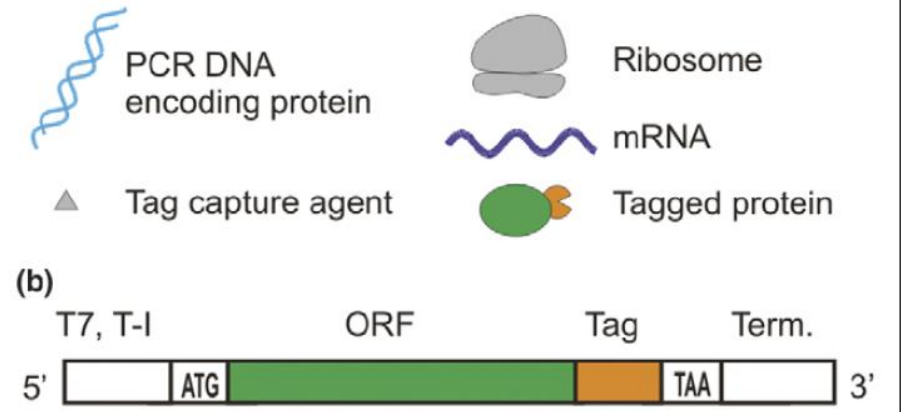
Wash, dry, and scan



PISA ARRAY Protein In Situ Array

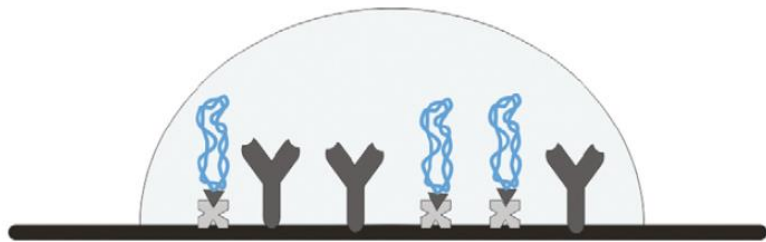


DNA není zakotvená

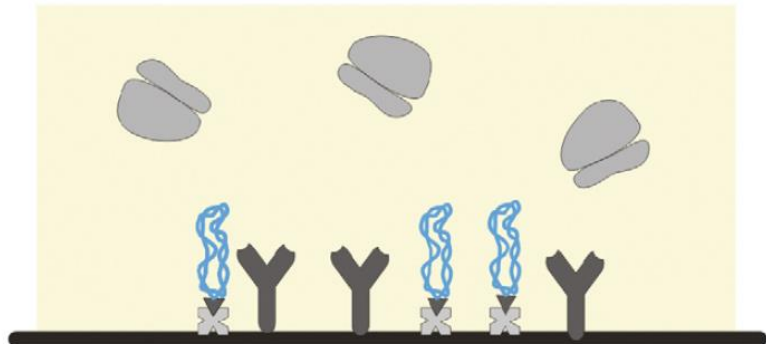


Imobilizace: (His)₆-Ni²⁺

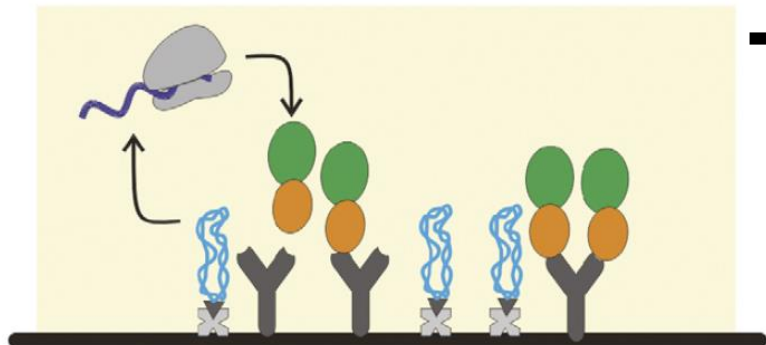
Array avidin, plasmid and capture antibody



Cover entire array with cell free lysate



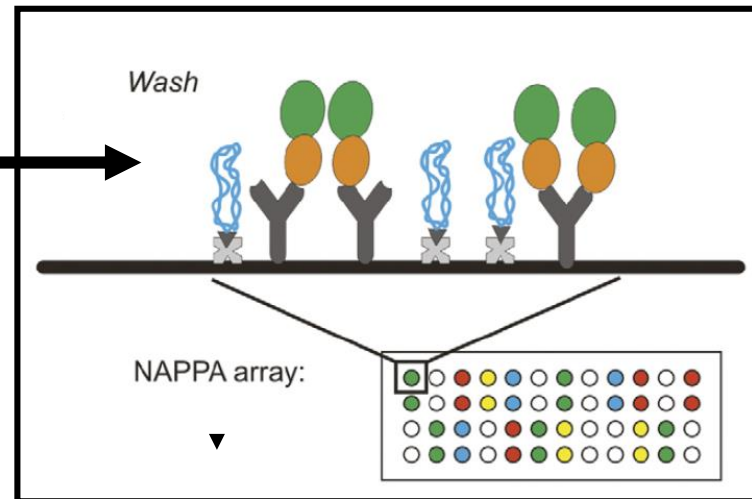
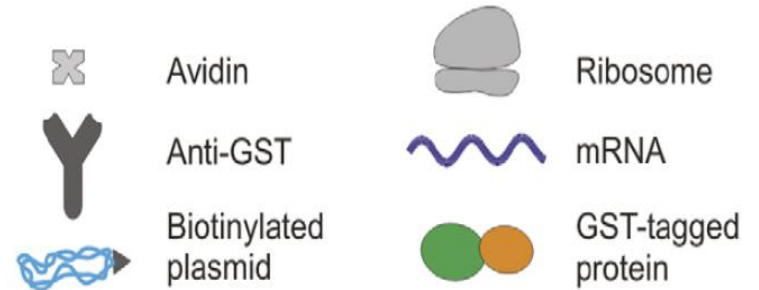
Coupled transcription / translation
Protein capture by proximal antibodies



NAPPA ARRAY

Nucleic Acid Programmable Protein Array

DNA je imobilizovaná



PROTEOMIKA 2014-2015

Pondělí 15/12

**Zvláštní aplikace
izotopových metod**

Klinická proteomika

MALDI imaging

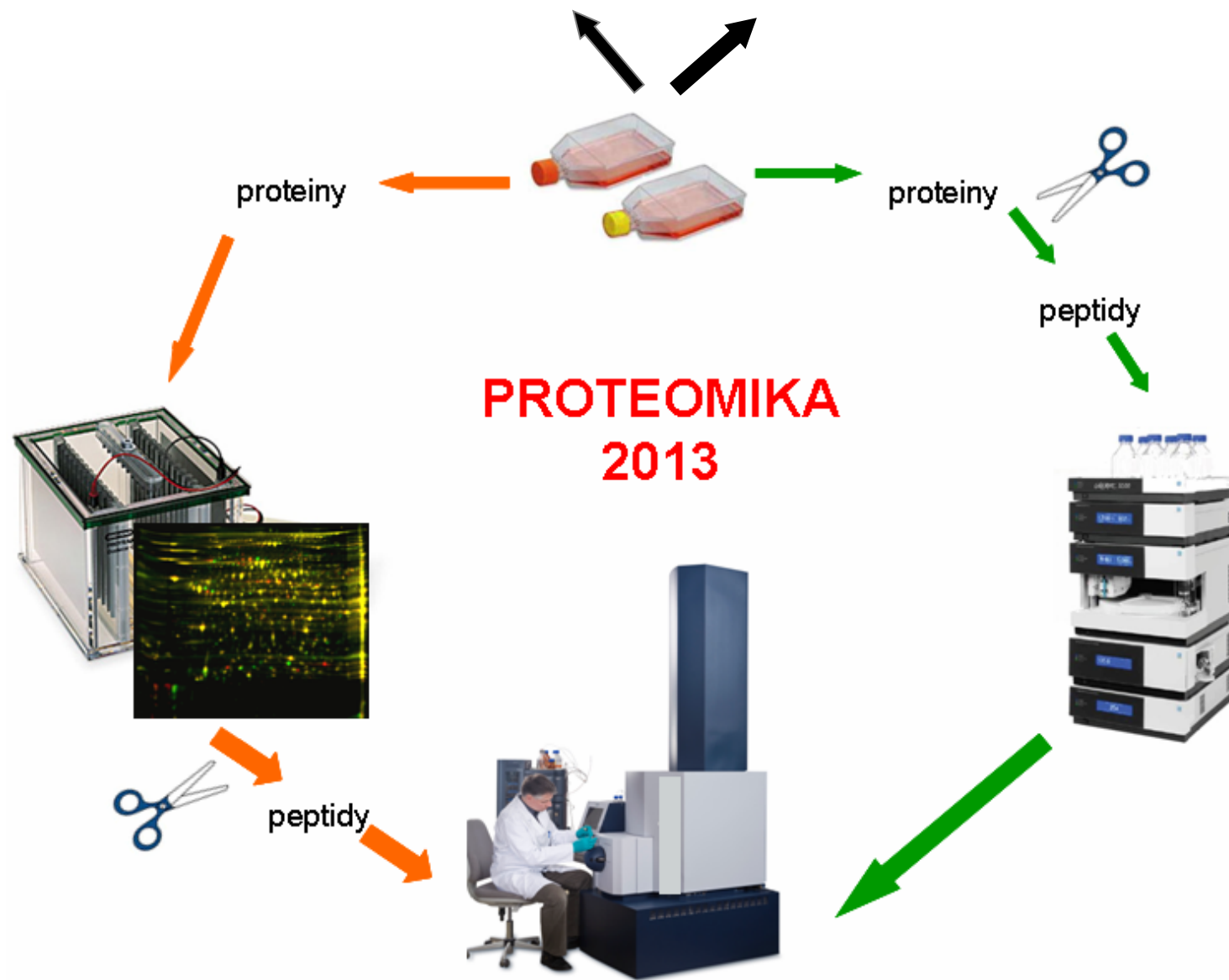
Protein arrays

TOP-DOWN

???

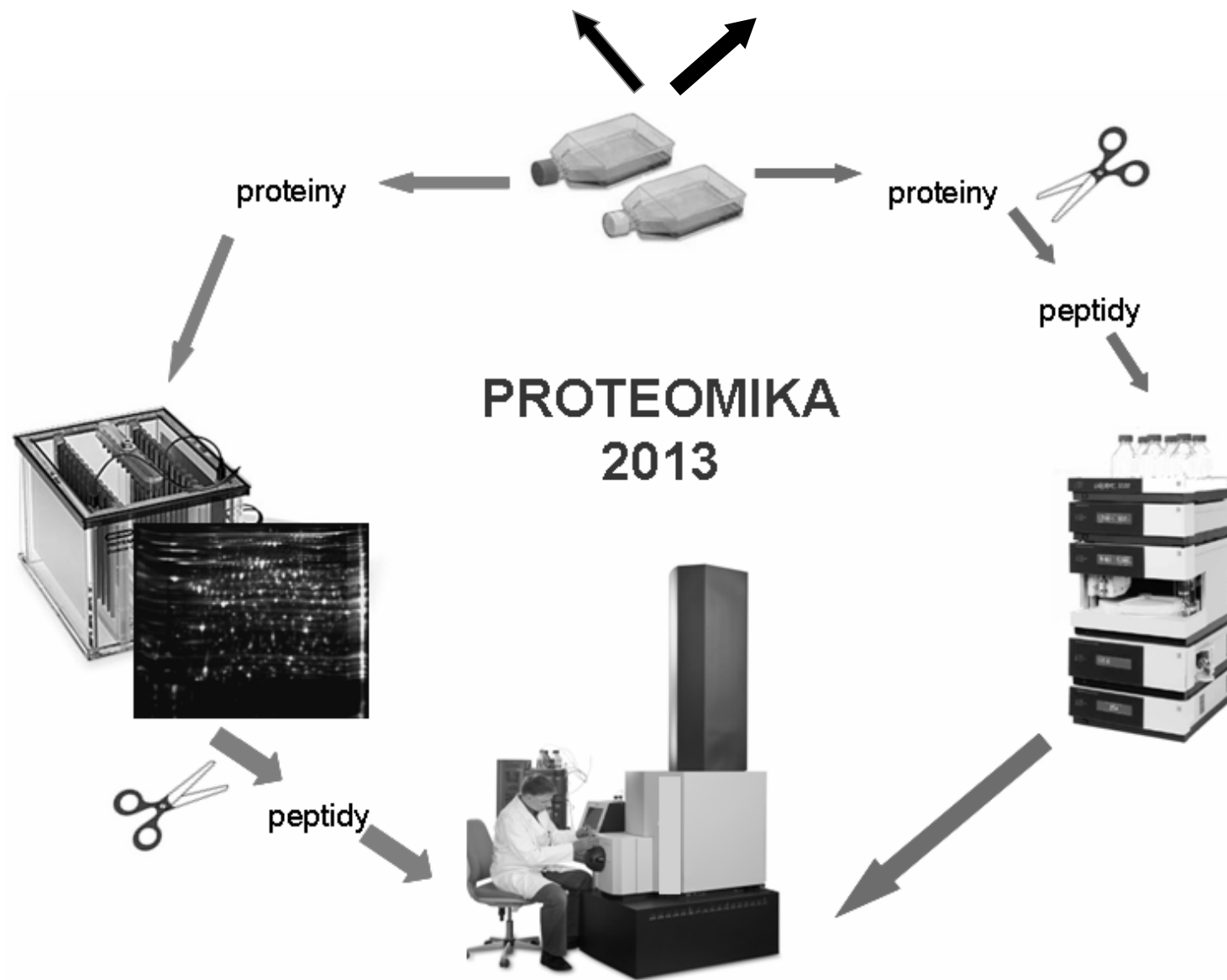
Protein arrays

Cílené metody (aqua, MRM/SRM)



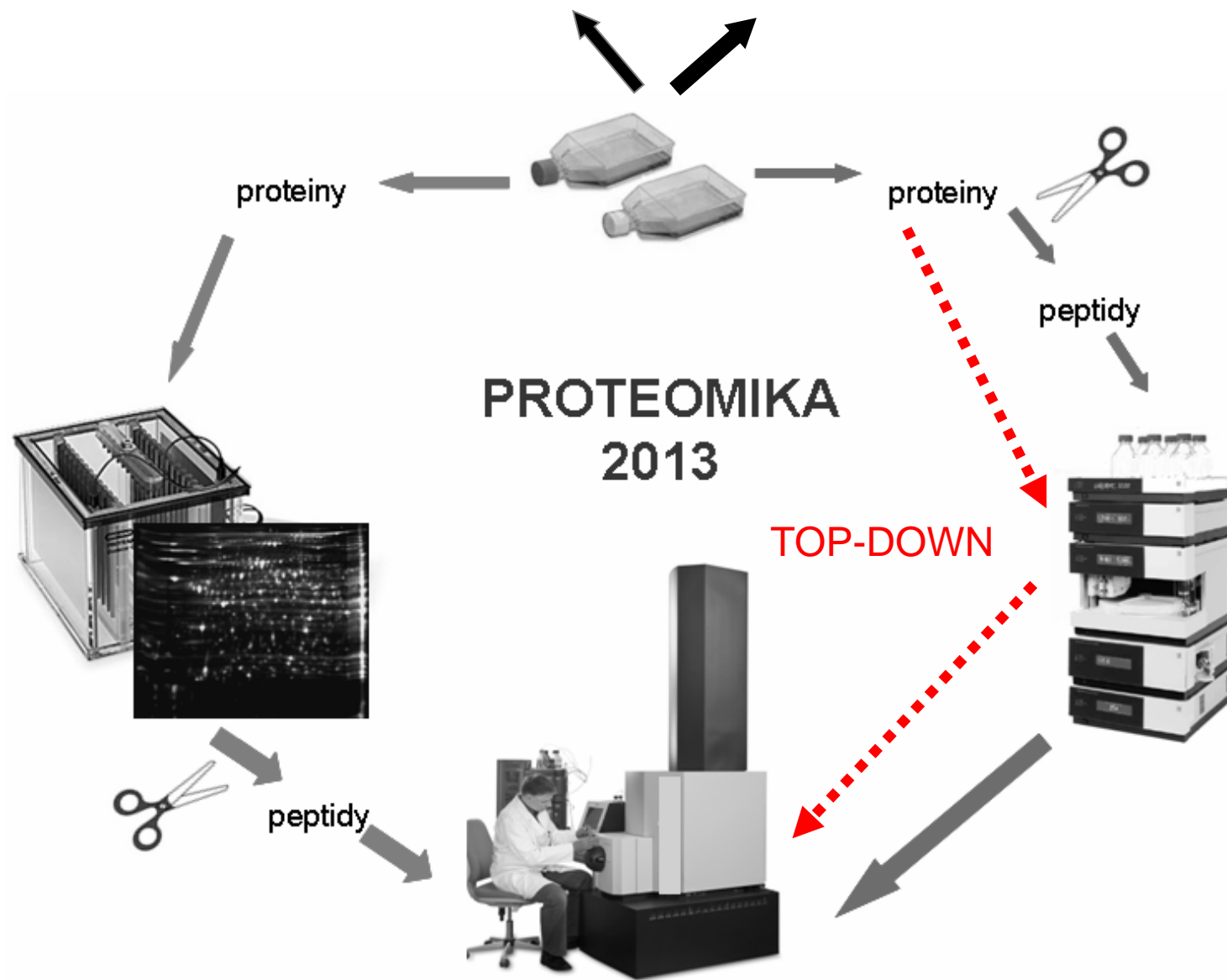
Protein arrays

Cílené metody (aqua, MRM/SRM)



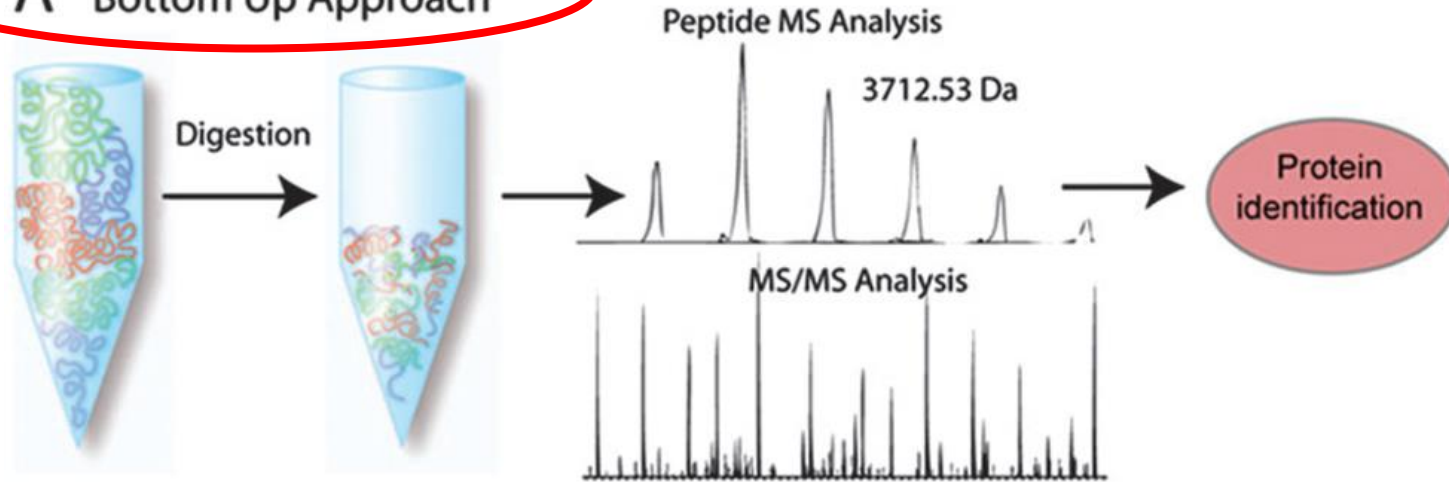
Protein arrays

Cílené metody (aqua, MRM/SRM)

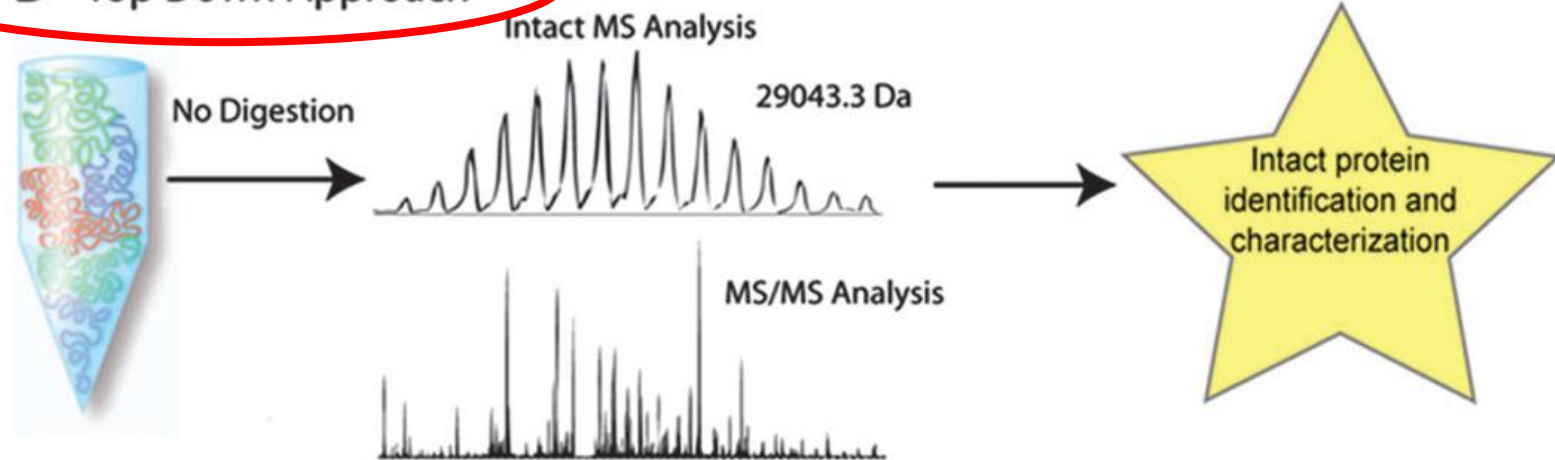


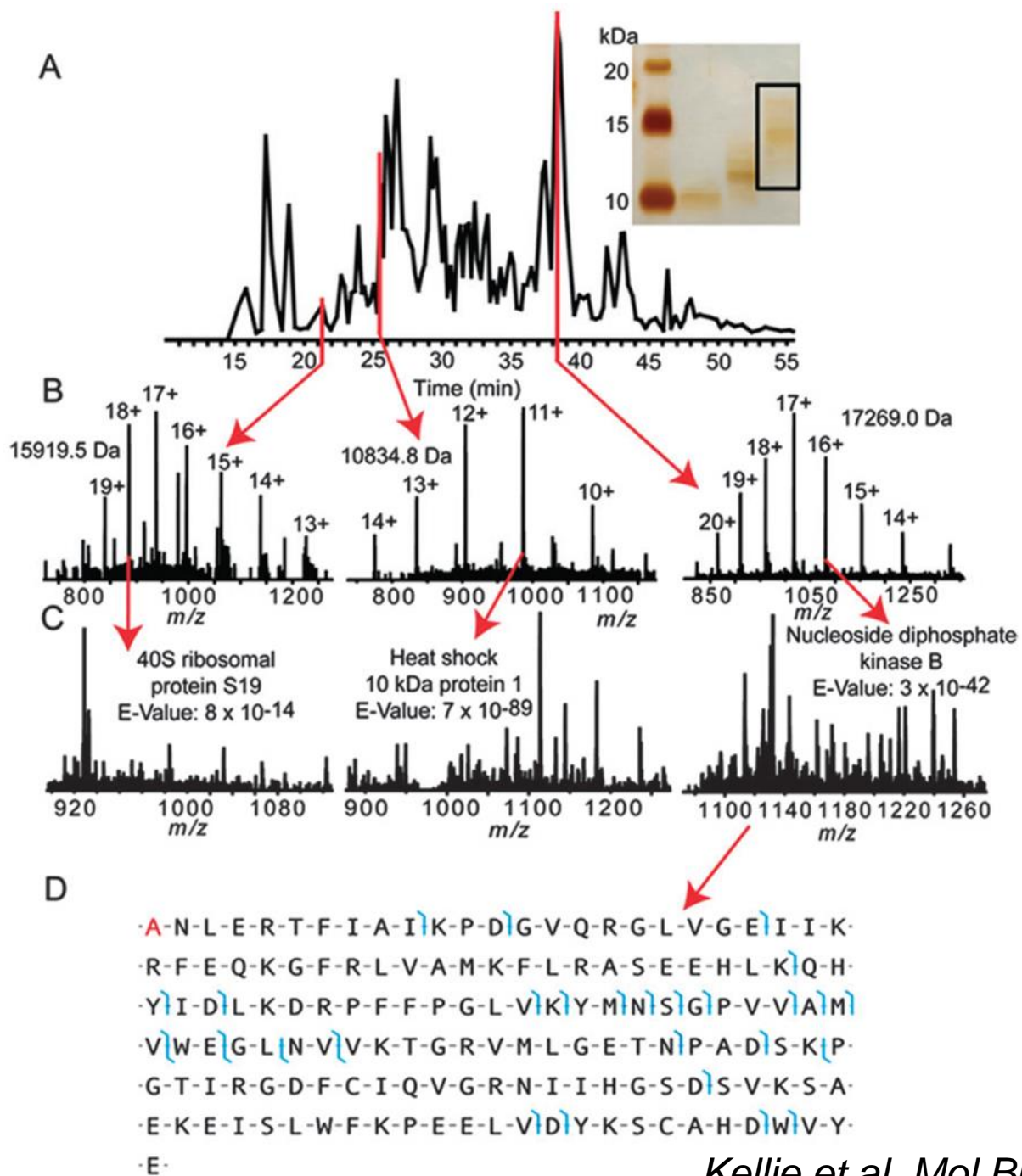
TOP-DOWN přístup – identifikace intaktních proteinů/proteoforem

A Bottom Up Approach



B Top Down Approach

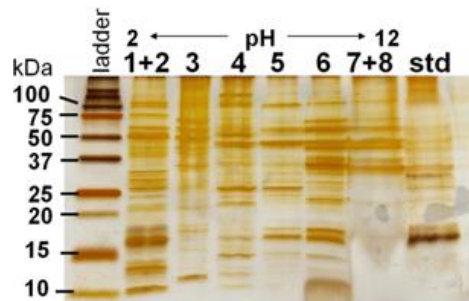
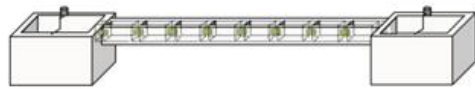




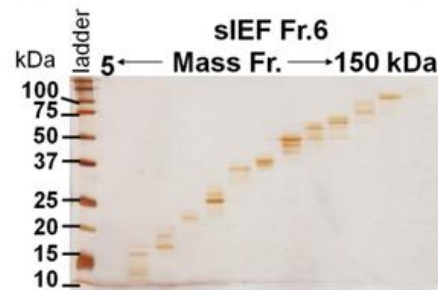
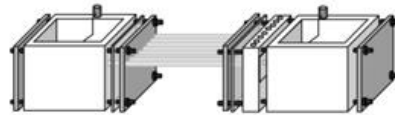
TOP-DOWN identifikace cca 1000 proteinů/3000 proteoforem

Mapping intact protein isoforms in discovery mode
using top-down proteomics

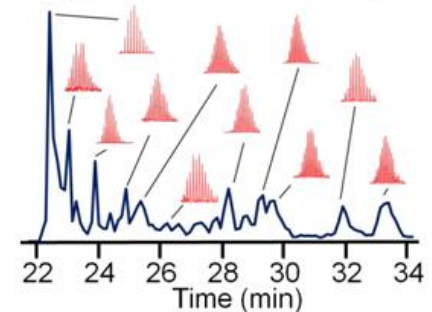
a - Isoelectric Focusing
(5 Fractions)



b - Multiplex GELFrEE
(5 × 9 Fractions)



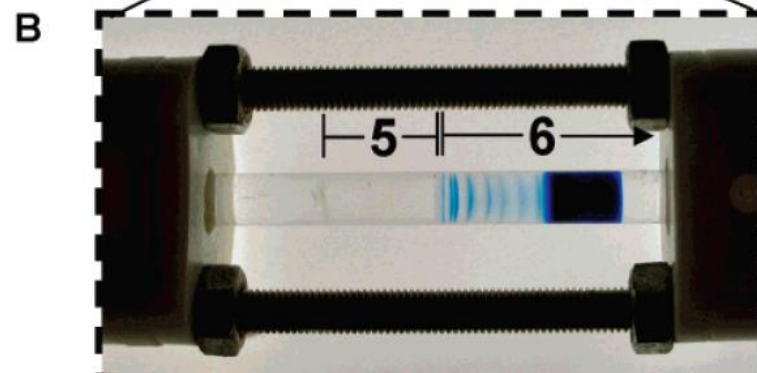
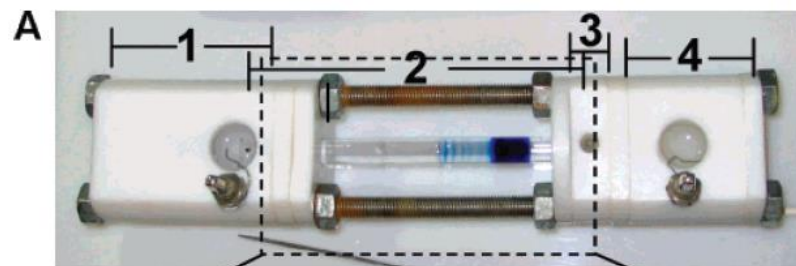
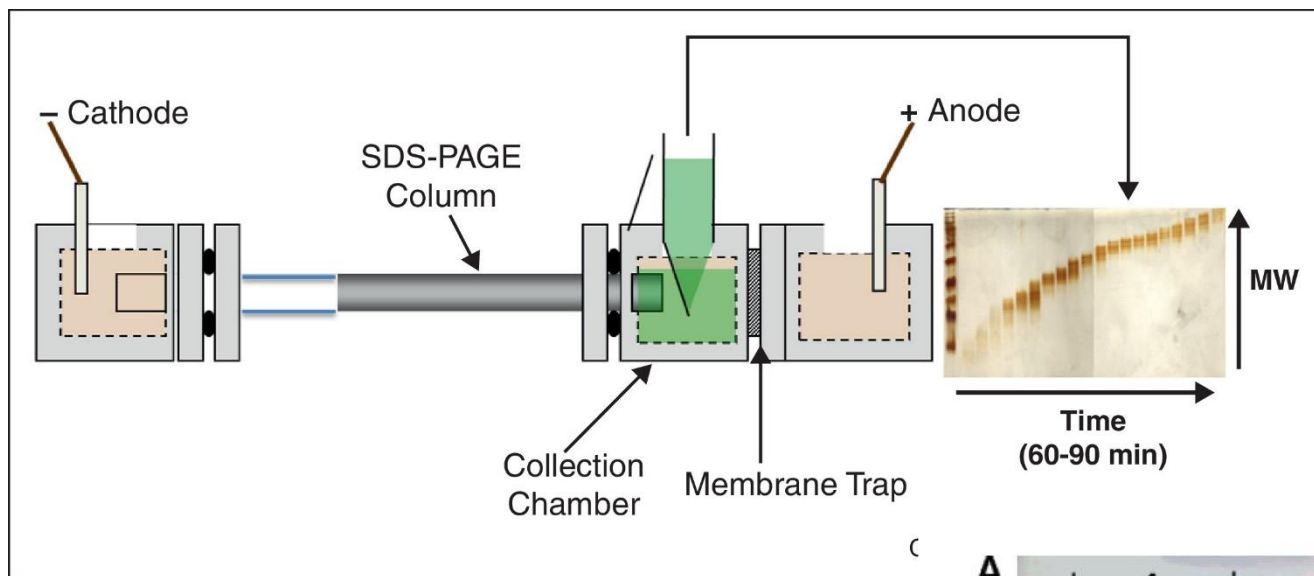
c - NanoCapillary LC-MS
(45 LC MS/MS runs)



(GELFrEE) - gel-eluted liquid fraction entrapment electrophoresis

Tran et al Nature 2011, 480, 254-258

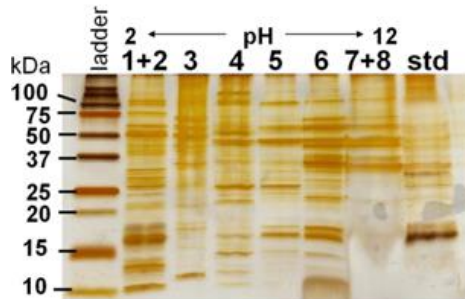
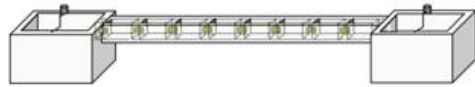
(GELFrEE) - gel-eluted liquid fraction entrapment electrophoresis



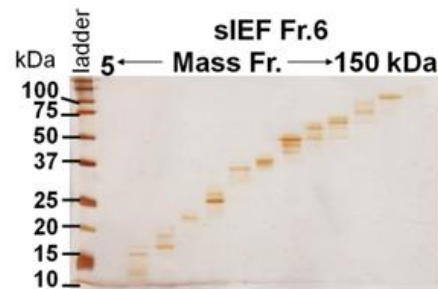
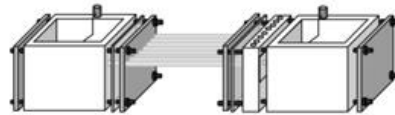
TOP-DOWN identifikace cca 1000 proteinů/3000 proteoforem

Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics

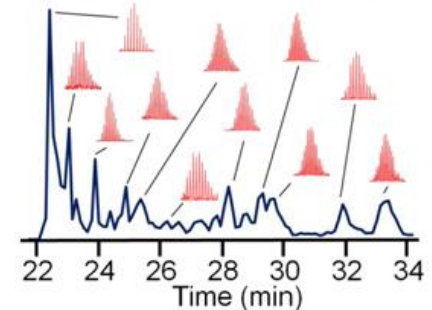
a - Isoelectric Focusing
(5 Fractions)



b - Multiplex GELFrEE
(5 × 9 Fractions)

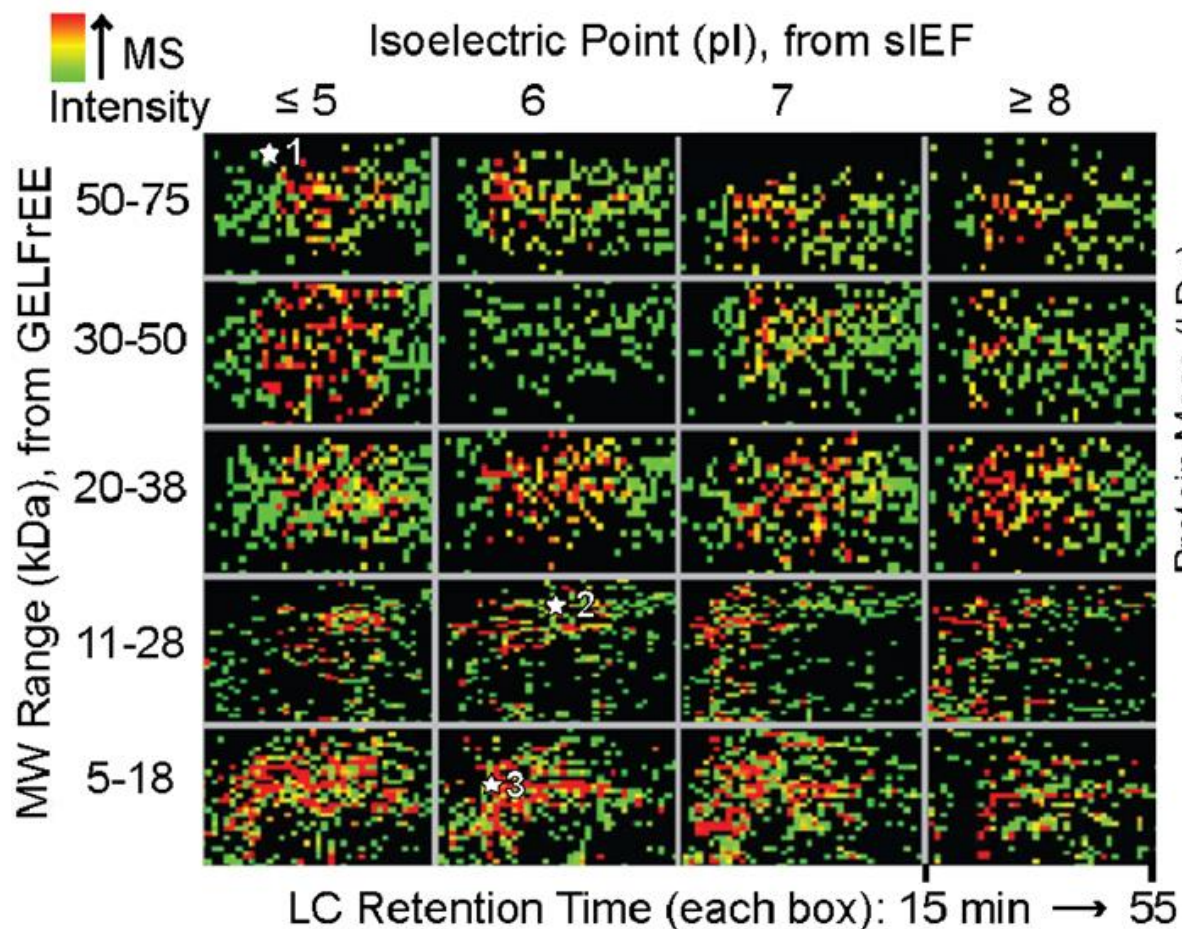


c - NanoCapillary LC-MS
(45 LC MS/MS runs)

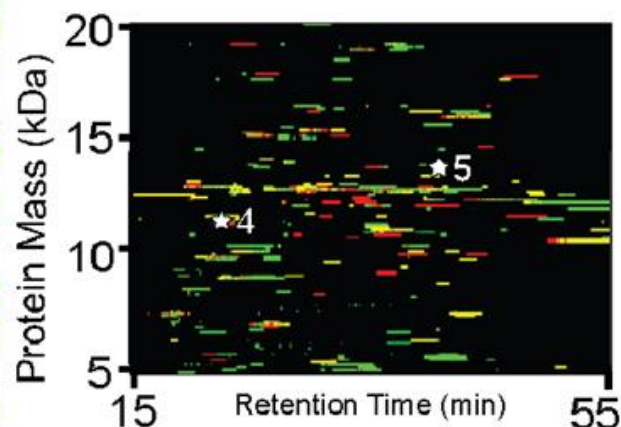
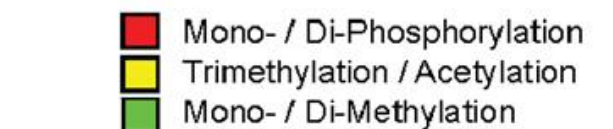


(GELFrEE) - gel-eluted liquid fraction entrapment electrophoresis

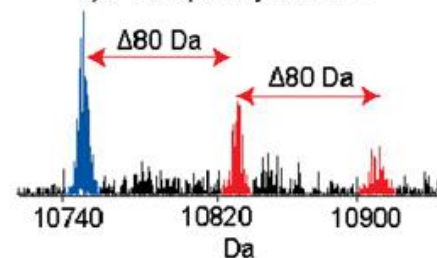
a - 2D Gel View



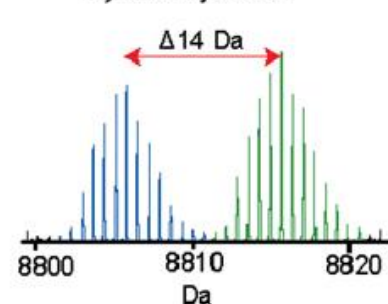
b - Modification View



4) Phosphorylations



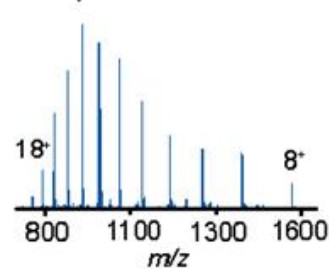
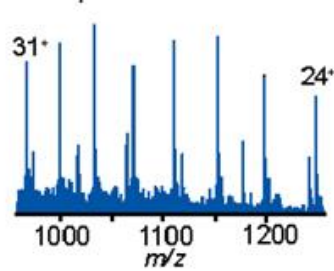
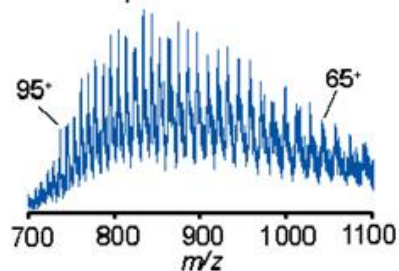
5) Methylation



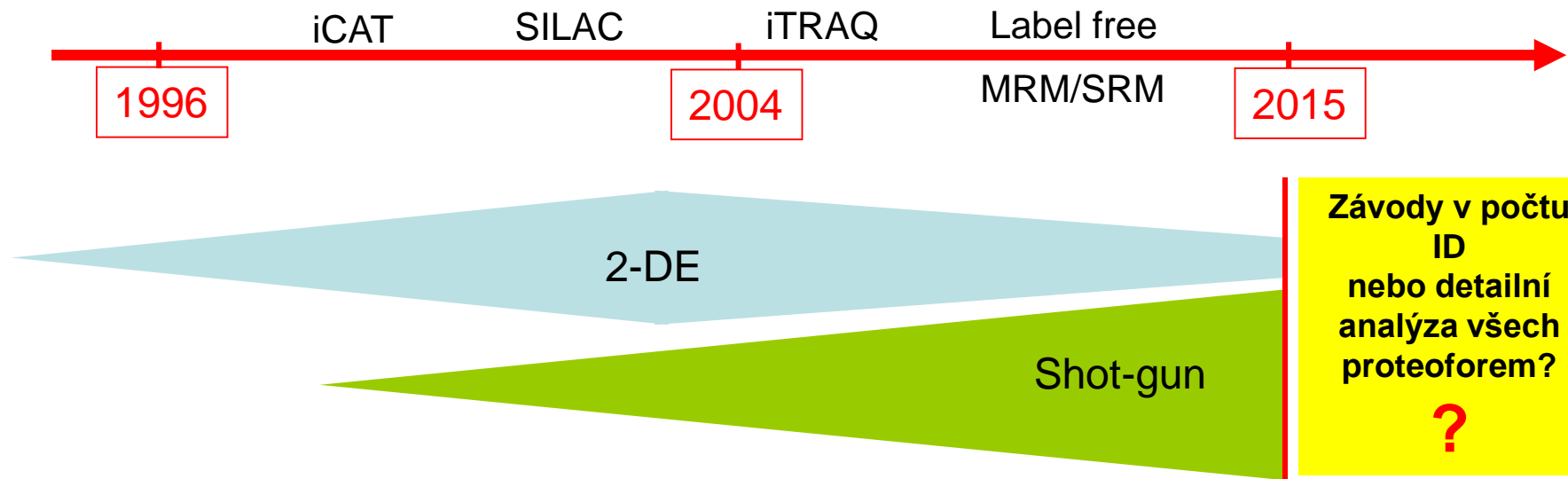
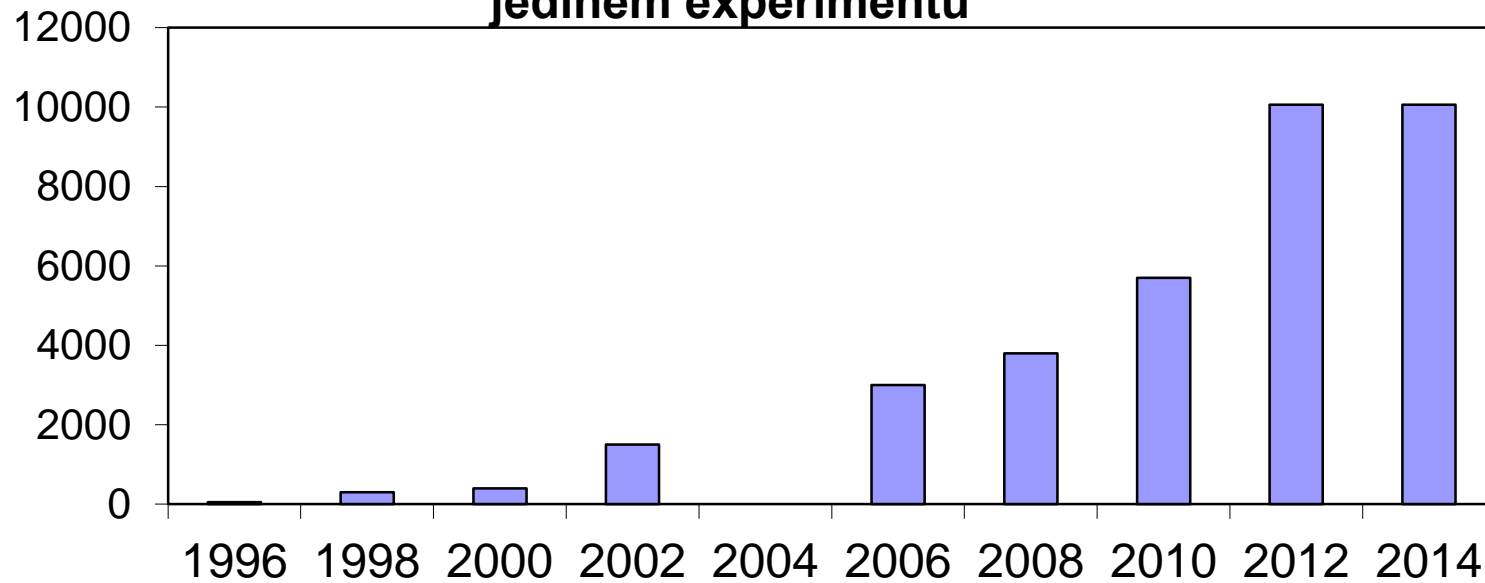
1) GRP 78: 70550 Da
q-value = 10^{-15}

2) Metaxin-2: 30905.7 Da
q-value = 10^{-18}

3) PKC β -1: 13818.0 Da
q-value = 10^{-79}



Maximální počet bílkovin identifikovaných MS v jediném experimentu



PROTEOMIKA 2014-2015

Pondělí 15/12

**Zvláštní aplikace
izotopových metod**

Klinická proteomika

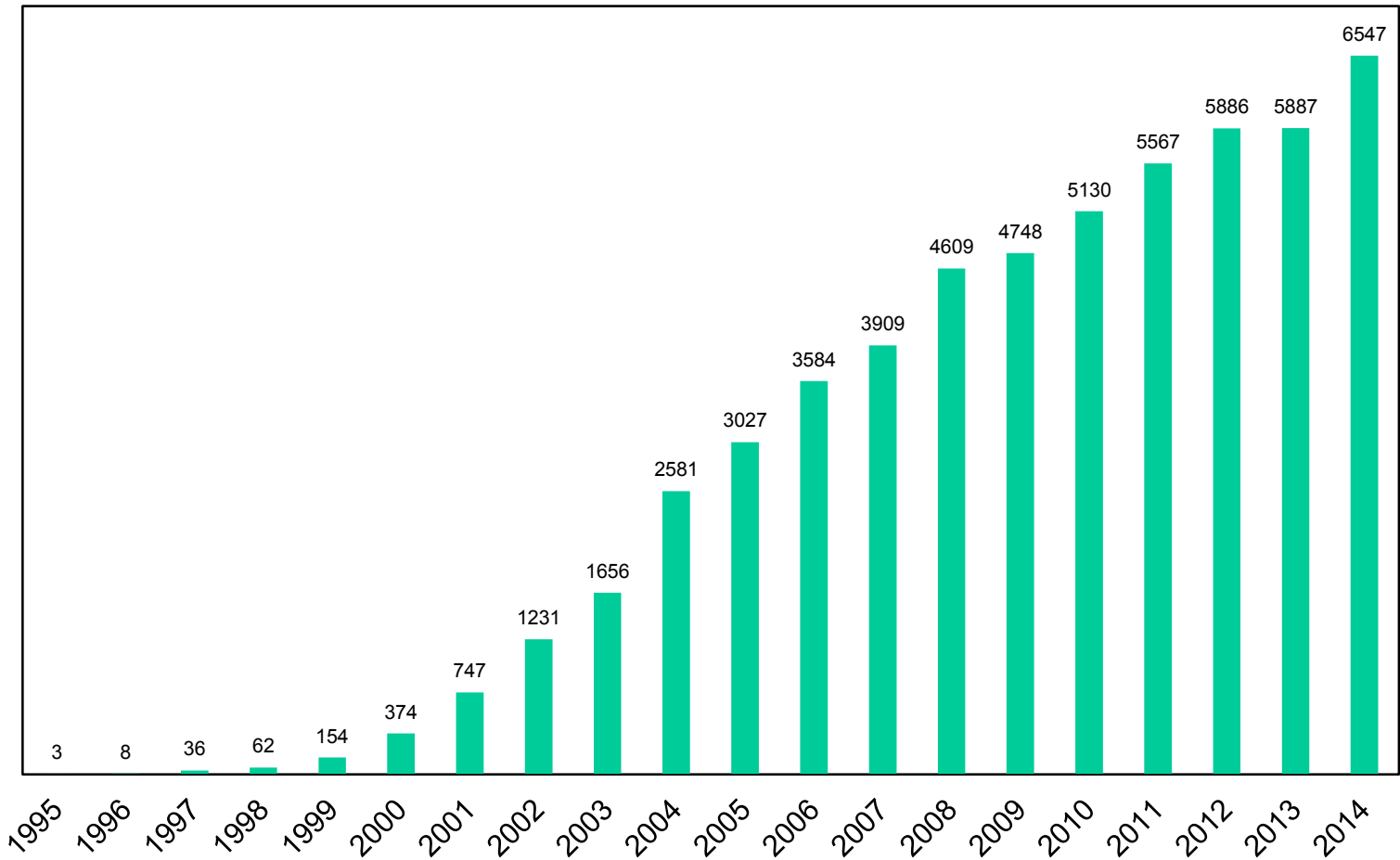
MALDI imaging

Protein arrays

TOP-DOWN

???

Počet publikací s proteomickou tématikou (Entrez/PubMed)



PUBLISH OR PERISH...

Molecular and Cellular Proteomics (IF 6.6)

Journal of Proteome Research (IF 4.2)

Journal of Proteomics (IF 3.9)

Proteomics (IF 3.8)

Expert Reviews of Proteomics (IF 2.9)

Protomics – Clinical Applications (IF 2.9)

BBA – Proteins and proteomics (IF 2.7)

Proteome Science (IF 1.7)

IF 2014

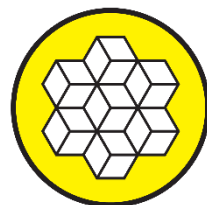
HUPO – HUman Proteome Organization

EuPa – European Proteomic Association

Proteomická sekce ČSBMB (www.czproteo.cz)



Ústav patologické fyziologie 1. LF UK



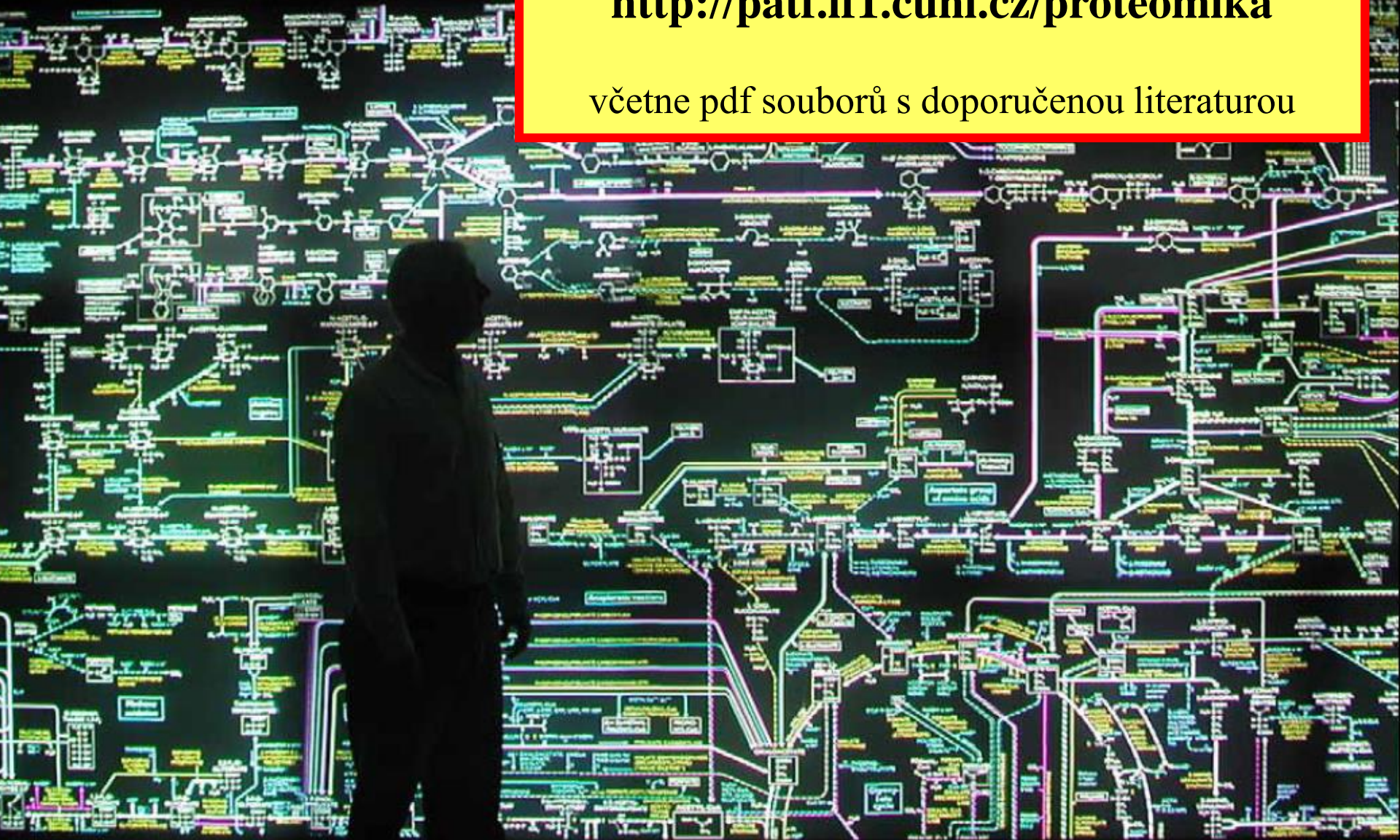
BIOCEV

<http://patofyziologie.lf1.cuni.cz/proteome>

Prezentace z přednášek budou ke stažení na adrese:

<http://patf.lf1.cuni.cz/proteomika>

včetně pdf souborů s doporučenou literaturou



ZKOUŠKA

Podmínkou přípuštění ke zkoušce je **vypracování eseje** na zadané téma **a odevzdání eseje** (jpetr@lf11.cuni.cz) **nejpozději 2 dny před zkouškou.**

Téma obdržíte po přihlášení na zkoušku.

Předpokládané termíny po 10/1/2015 a dále dle potřeby

Zkouška probíhá na Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK,
U Nemocnice 5, Praha 2.

(po schodišti nahoru a doprava za roh)

PRAKTIKA Z PROTEOMIKY - max. 12. zájemců, duben nebo květen