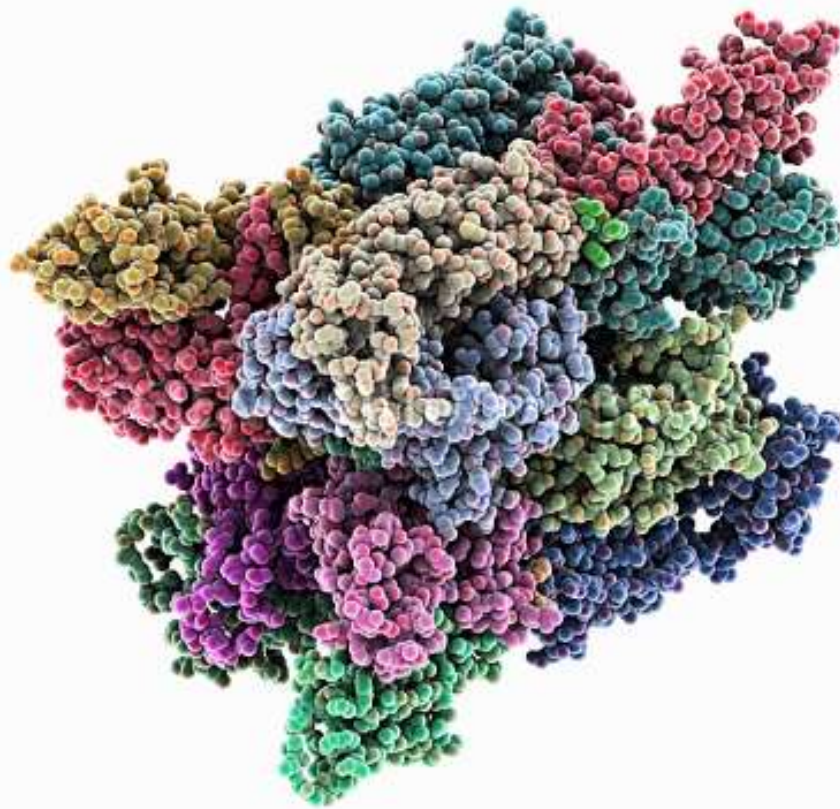


PROTEOMIKA

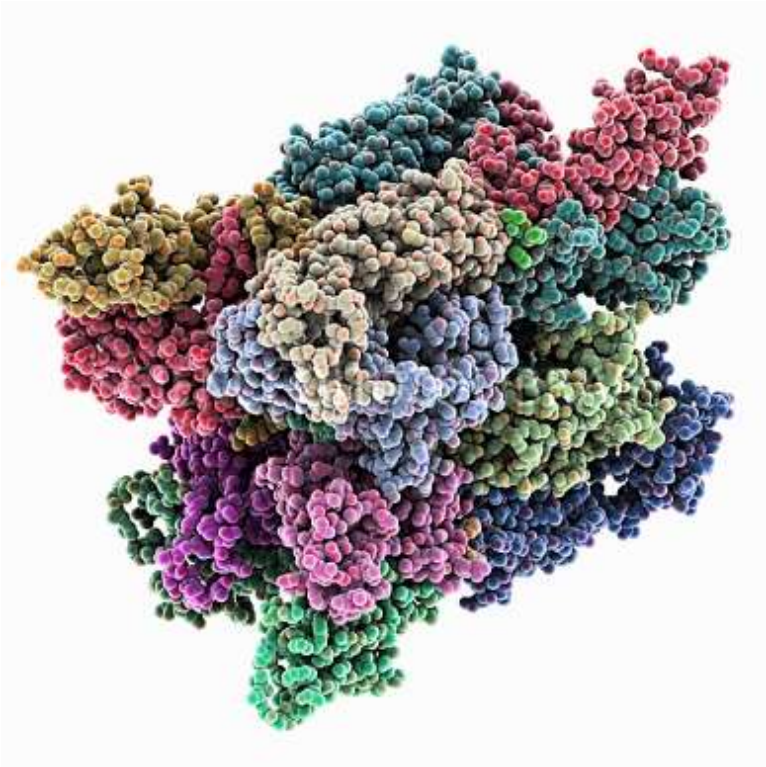
2023

- Proteomika, Metody práce s bílkovinami (Petrák 16/10)
- Separační metody, digesce a principy ID bílkovin pomocí MS (Petrák 23/10)
- Principy hmotnostní spektrometrie, instrumentace (Man 30/10)
- Hmotnostní spektrometrie v proteomice, analýza PTM (Man 6/11)
- ID proteinů, DDA, DIA, databáze, FDR (Talacko 13/11)
- Kvantifikace, isotopy, LFQ, cílená proteomika (Harant 20/11)
- Design experimentu, zpracování dat, statistika, bioinformatika (Harant 27/11)
- Proteomika membránových proteinů, **proteinové komplexy** (Petrák 4/12)
- **Klinická proteomika, speciální metody** (Petrák 11/12)

ANALÝZA PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ



ANALÝZA PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ



Afinitní purifikace komplexů

- s pomocí protilátky
- přes „tagované“ proteiny
- identifikace pomocí LC-MS/MS

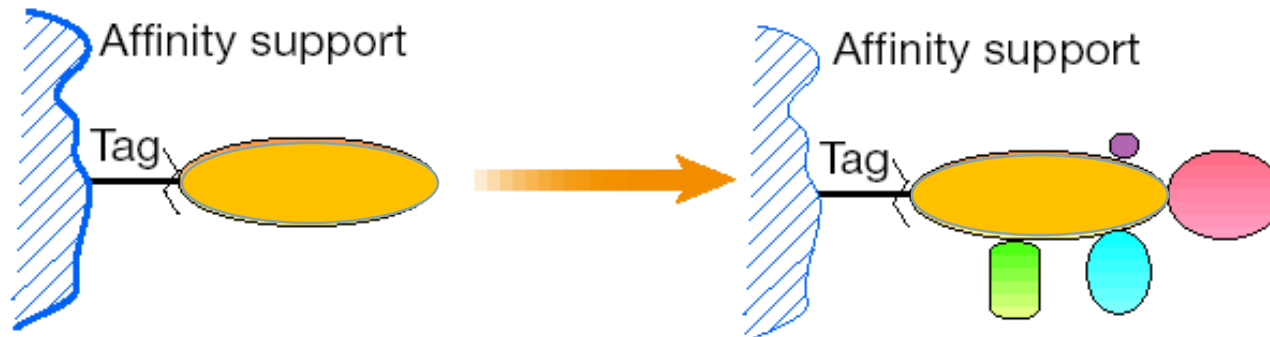
Proximity labeling

Nativní (vícerozměrné) separace

- Blue native/2D elektroforéza
- Clear native/2D elektroforéza

IMUNOAFINITNÍ IZOLACE PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ

- 1) matrix s **protilátkou** proti jedné složce komplexu
- 2) matrix s **rekombinantním proteinem** (složkou komplexu) nebo jinou „návnadou“



AFINITNÍ MATRIX

Aktivované matrice:

NHS Sepharose.....lze vázat za aminoskupinu (succinimid)

CNBr Sepharose.....lze vázat za aminoskupinu

EAH Sepharoselze vázat protein za karboxyl (karbodiimid)

Thiol sepharose.....lze vázat za SH cysteinu

Matrice s afinitou pro IgG (Fc fragment)

Protein G Sepharose

Protein A Sepharose

Protein A, G magnetic beads

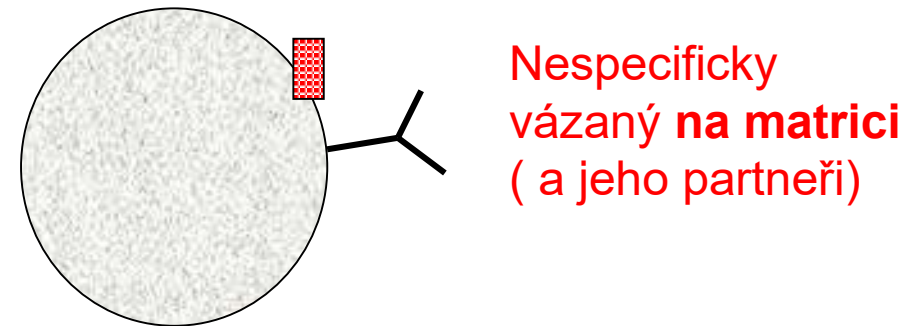
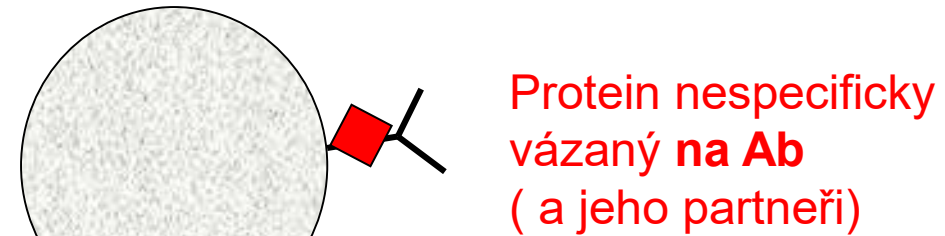
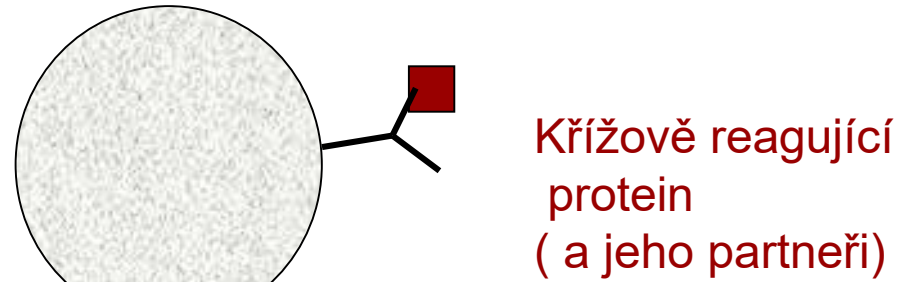
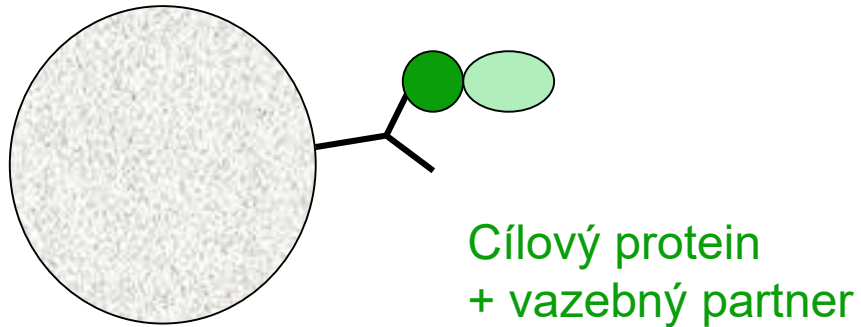
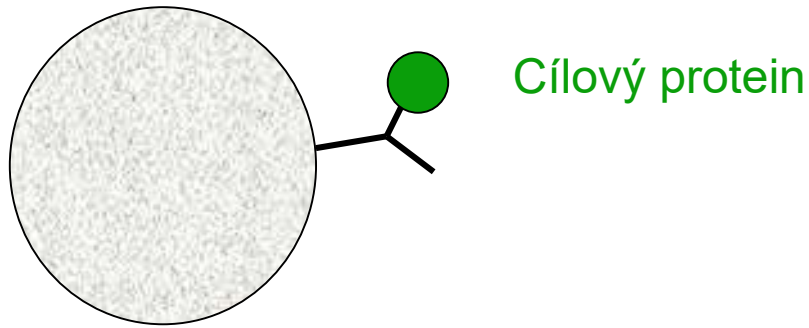
Matrice s afinitou pro glykoproteiny

ConA Sepharose

Velké ligandy (DNA, protein) lze vázat přímo na matrix.

Malé ligandy (nukleotid, NADP, hormon...) se váží přes inertní „spacer arm“.

Typy možných interakcí při imunoprecipitaci

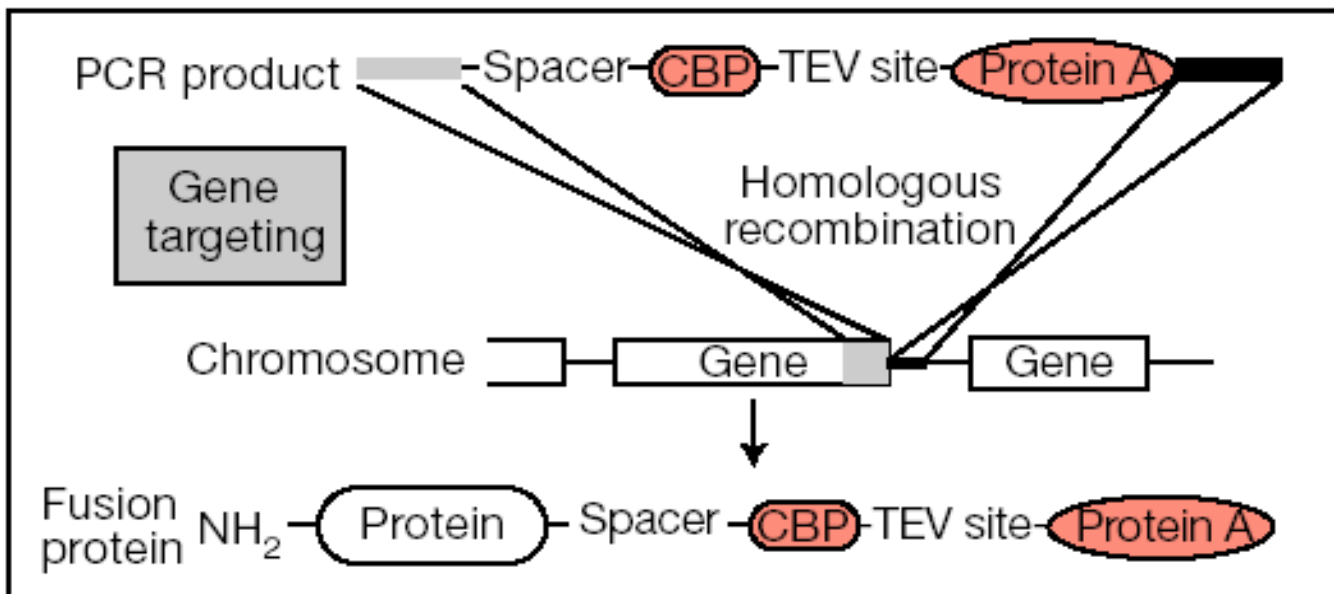


TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)

Anne-Claude Gavin et. al., (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 142-147

CBP- calmodulin-binding protein

TEV – štěpné místo virové proteázy TEV



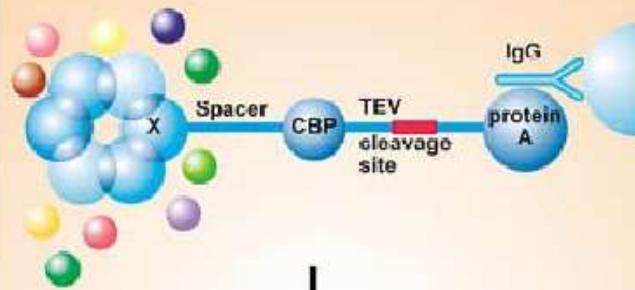
1739 ORF

TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)



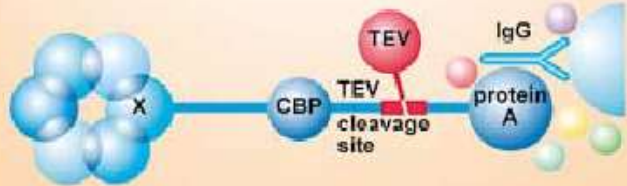
B First affinity purification

Protein A-IgG Interaction



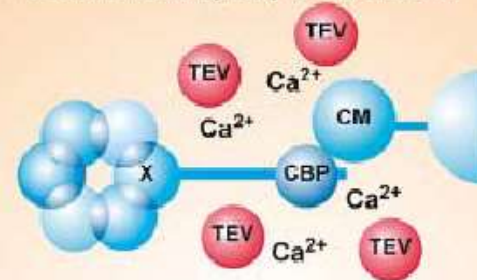
Wash

TEV cleavage



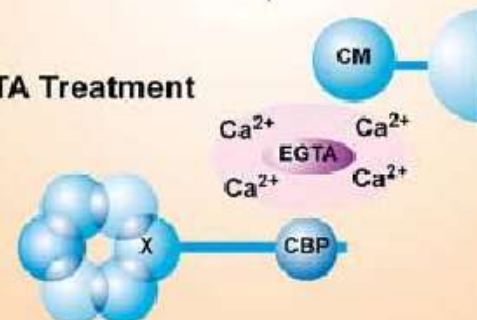
Second affinity purification

CBP-Calmodulin (CM) Interaction



Wash

EGTA Treatment



TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)

Strategy	Failed	Success rate	
PCR of the TAP cassette	ORFs processed: 1,739		4562 (red) 6466 (teal)
Transformation of yeast cells (homologous recombination)	Positive homologous recombinations: 1,548	191 89%	
Selection of positive clones	Expressing clones: 1,167 (membrane protein 293)	381 75%	
Large-scale cultivation			
Cell lysis Tandem affinity purification	TAP purifications: 589	285 62%	2357 (red) 1993 (teal)
One-dimensional SDS-PAGE			
MALDI-TOF protein identification			
Bioinformatic data interpretation	Identified complexes: 232		547 (red) 491 (teal)

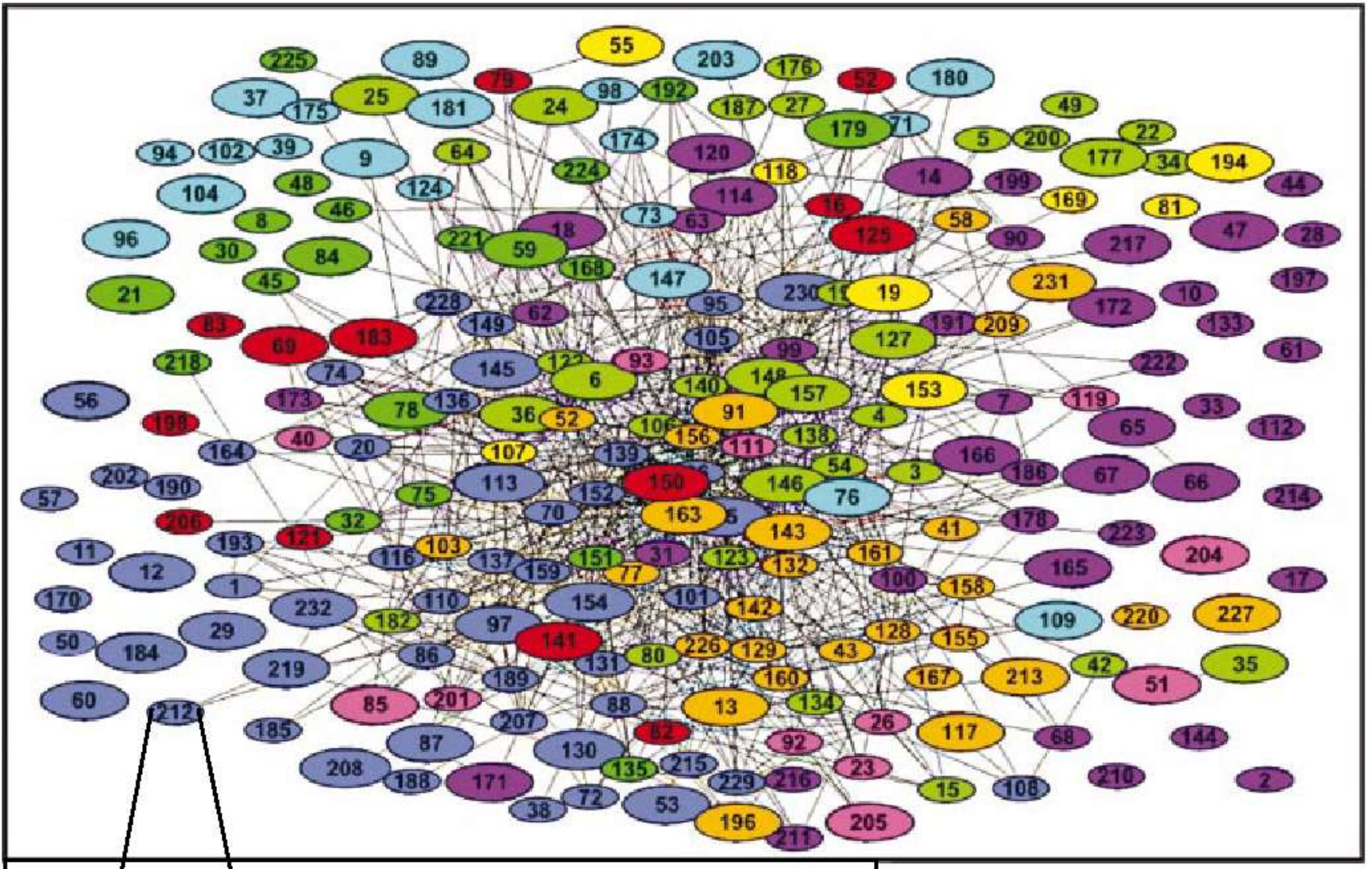
Komplexy (v průměru 5-7 komponent)

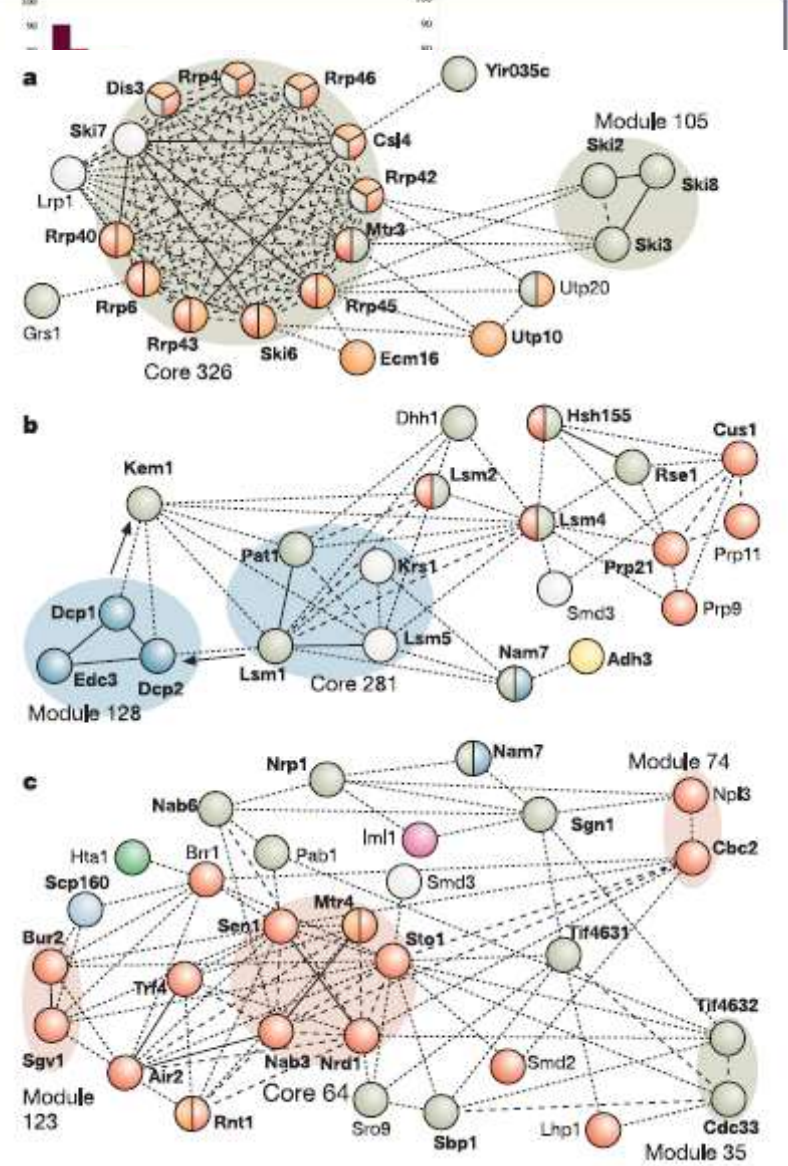
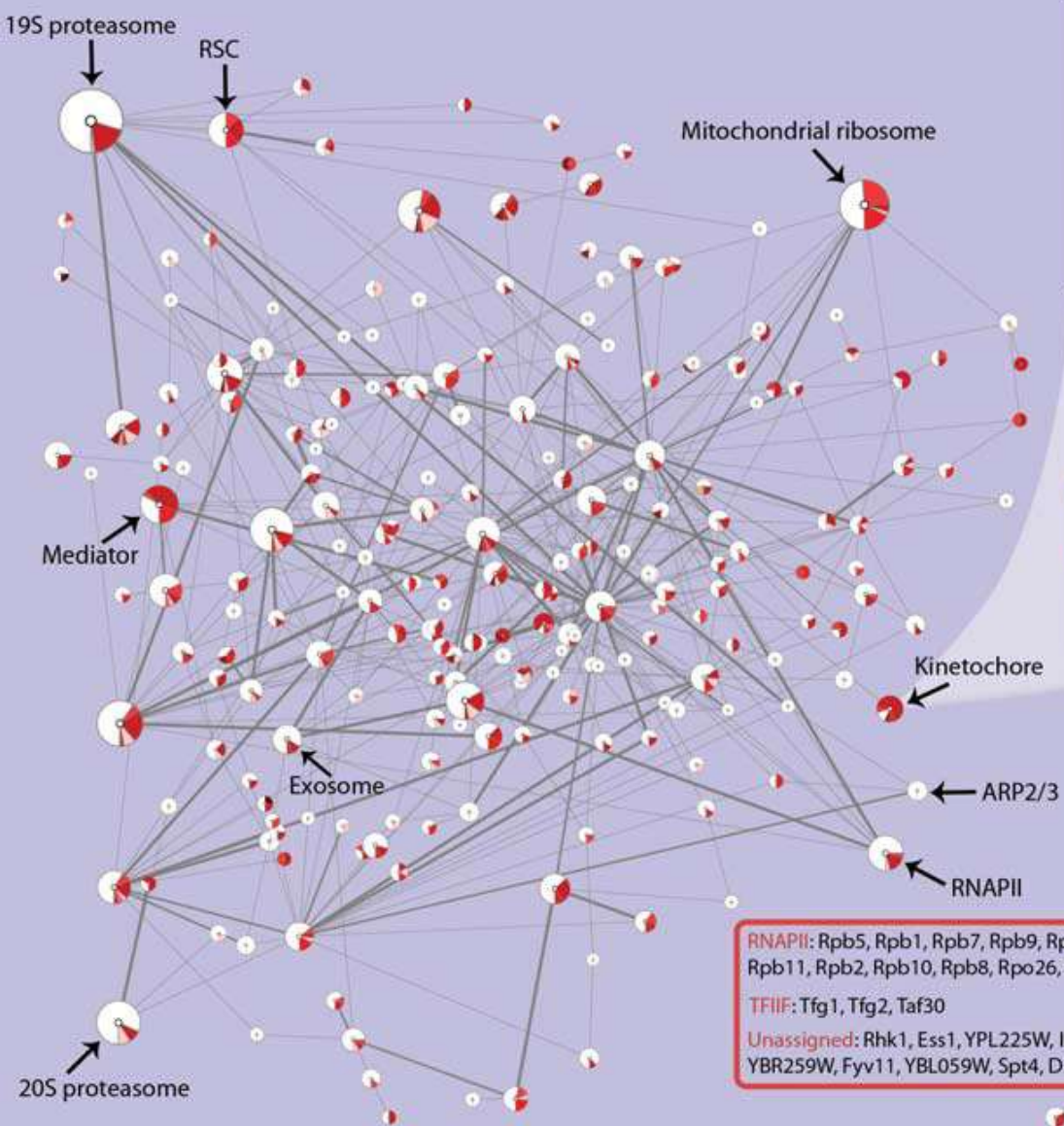
Gavin 2002
Nature

Gavin 2006
Nature

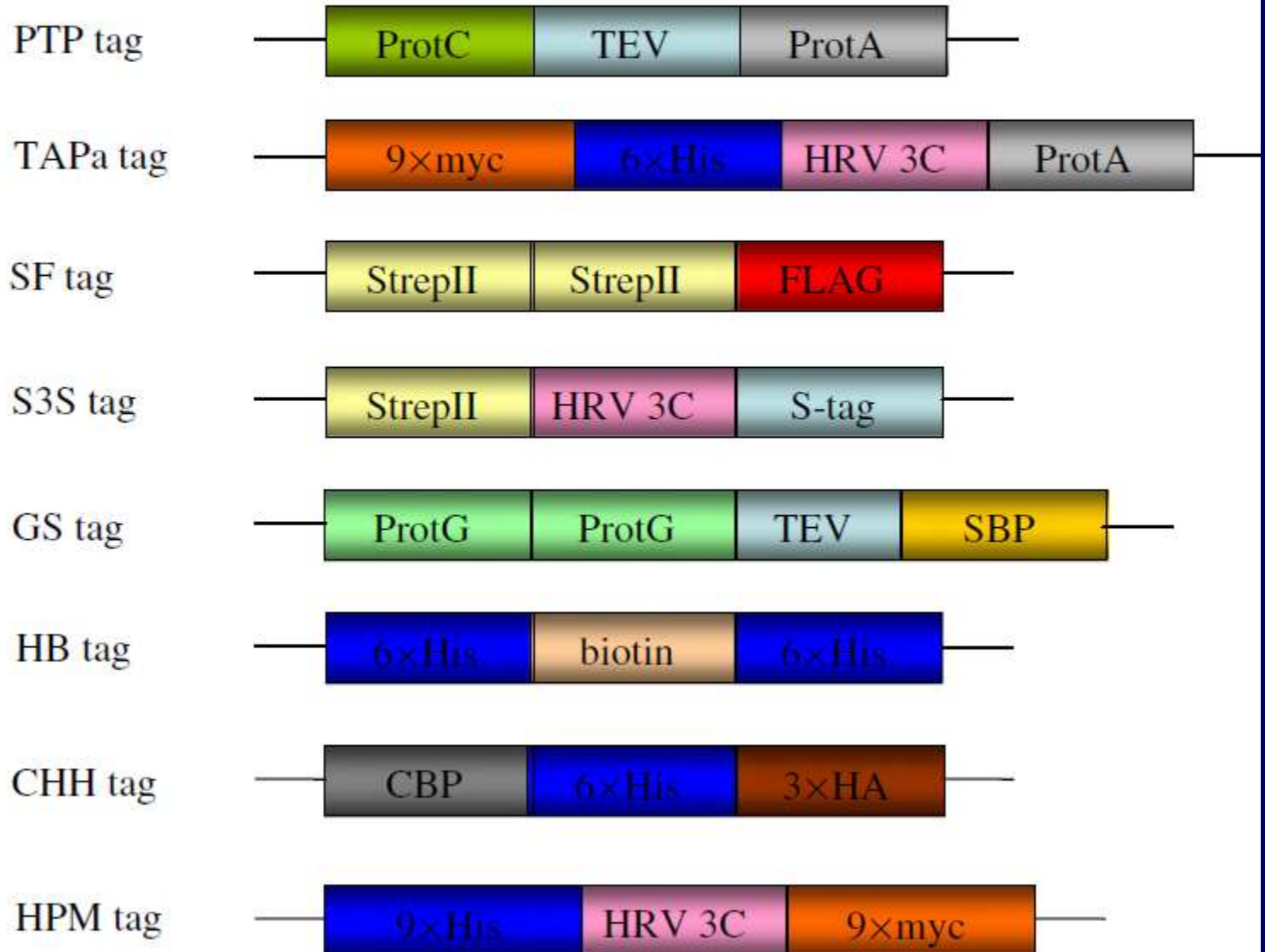
Krogan 2006
Nature

TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)

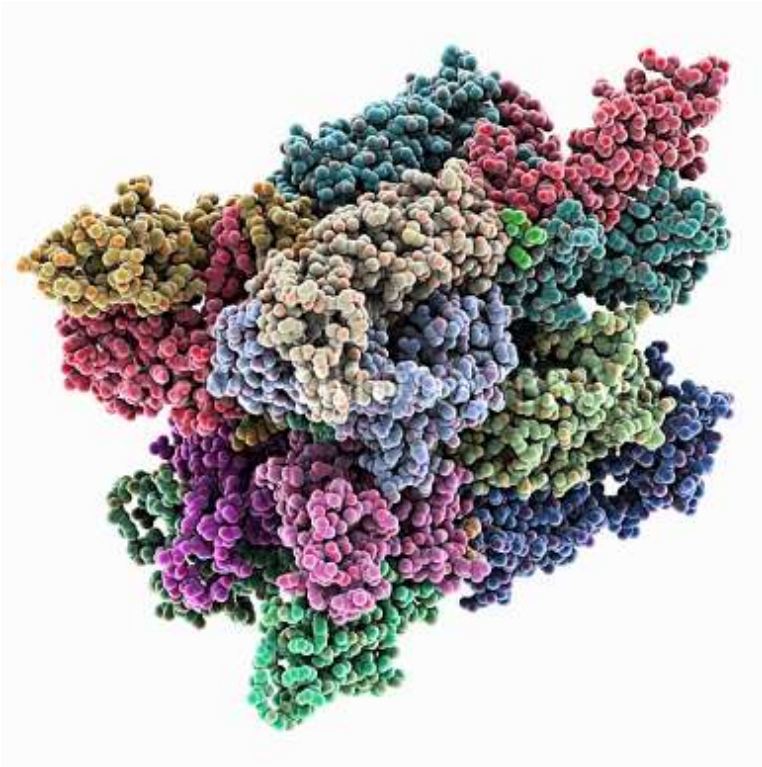




TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)



ANALÝZA PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ



Afinitní purifikace komplexů

- s pomocí protilátky
- přes „tagované“ proteiny

Proximity labeling

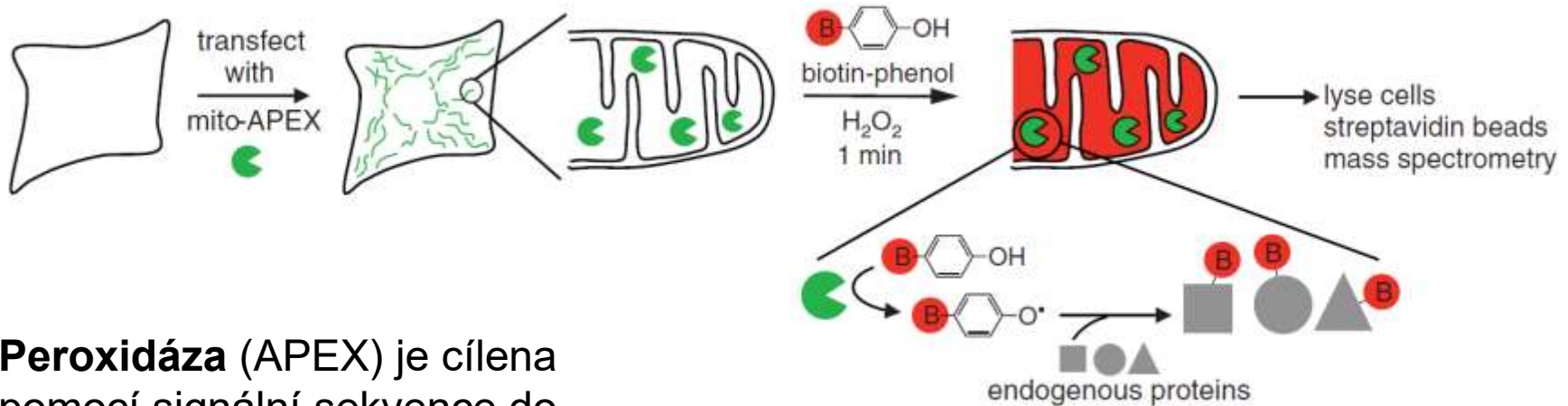
Nativní (vícerozměrné) separace

- Blue native/2D elektroforéza
- Clear native/2D elektroforéza

Proximity labeling

(k určení lokalizace proteinů, mapování kompartmentu)

APEX APEX2

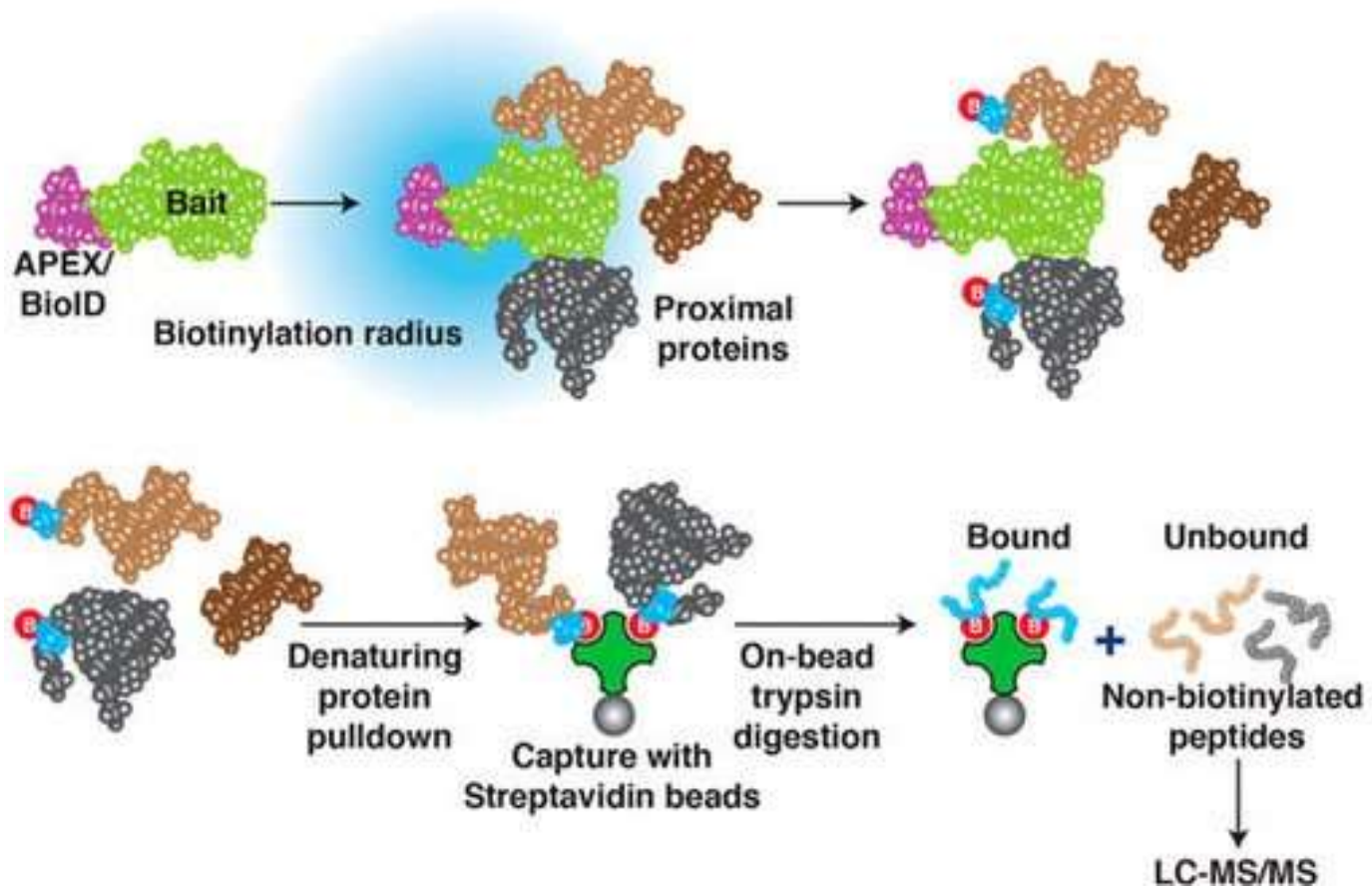


Peroxidáza (APEX) je cílena pomocí signální sekvence do cílového kompartmentu (vnitřní membrána MT, ER....a pod) kde v přítomnosti **biotinfenolu** „označí“ proteiny v okolí (Tyr). Označené proteiny se izolují streptavidinem.

Toxicita peroxidu, problematické zajištění substrátu

Proximity labeling

BioID



Protein zájmu je exprimován jako **fuzní protein s bakteriální biotin ligázou** která v přítomnosti biotinu „označí“ proteiny v nejbližším okolí. Označené proteiny se izolují streptavidinem. **Pomalá rekční kinetika**, dostatečná biotinylace v řádu hodin.

Proximity labeling

TurboID a split-TurboID

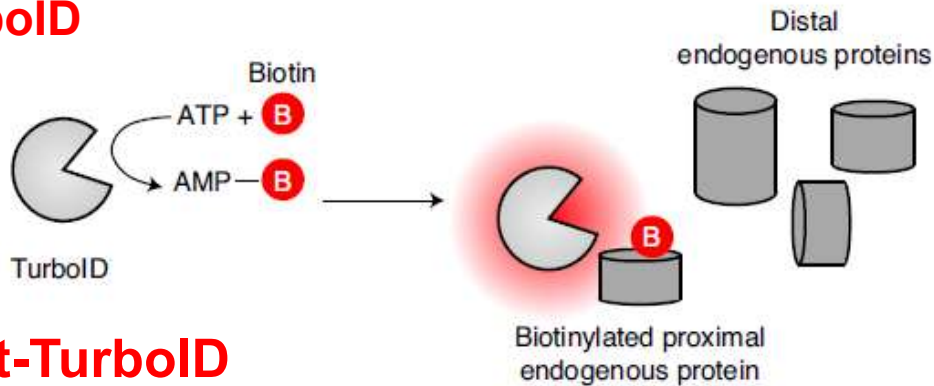
Mutantní kvasničné biotin ligázy – cílená mutagenese a selekce

Aktivovný biotin difunduje z aktivního místa do bezprostředního okolí

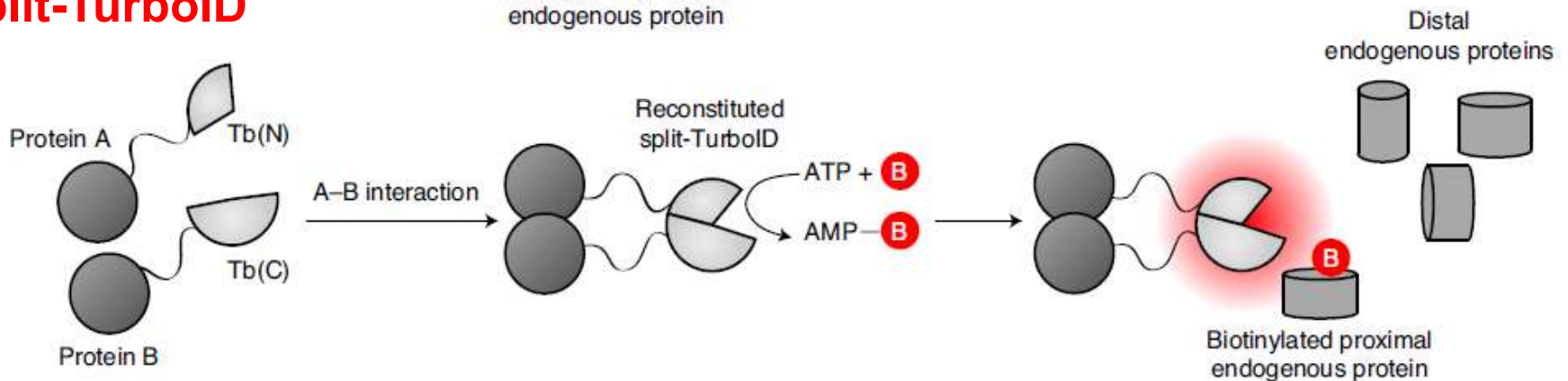
Jeden nebo dva fúzní proteiny

s rychlou kinetikou v řádu minut, nižší toxicita

TurboID



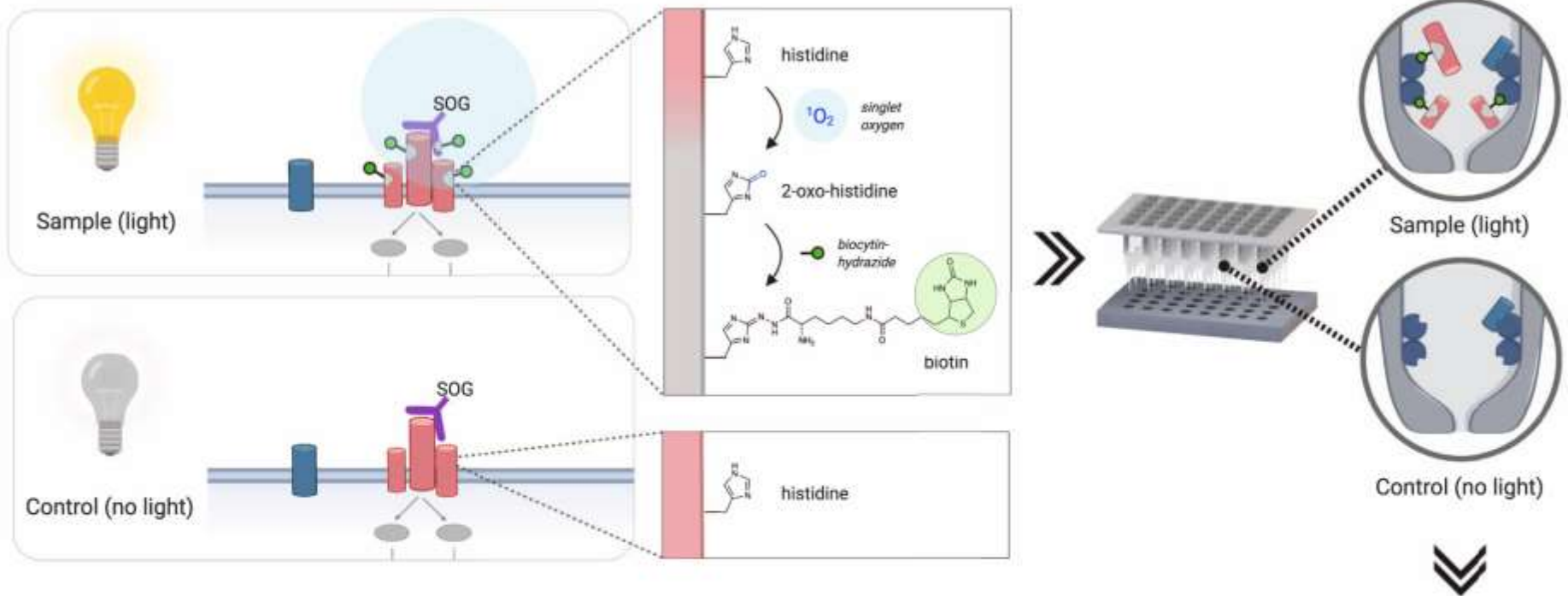
split-TurboID



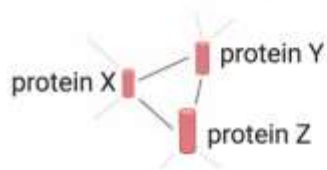
LUX-MS značení okolních histidinů po jejich oxidaci
 (v okolí generátoru singletového kyslíku - SOG)
 Pro mapování proteinových komplexů na povrchu buňky

ligand-guided and light-activated protein proximity labeling

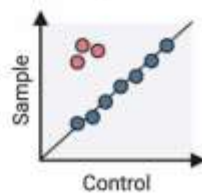
high-throughput protein capture & processing



cell surface proximity network



relative quantification



DDA / DIA LC-MS/MS



release of proteolytic peptides



PROTEOMIKA 2023

**Zvláštní aplikace
izotopových metod**

Klinická proteomika

MALDI imaging

OLINK/SOMAScan

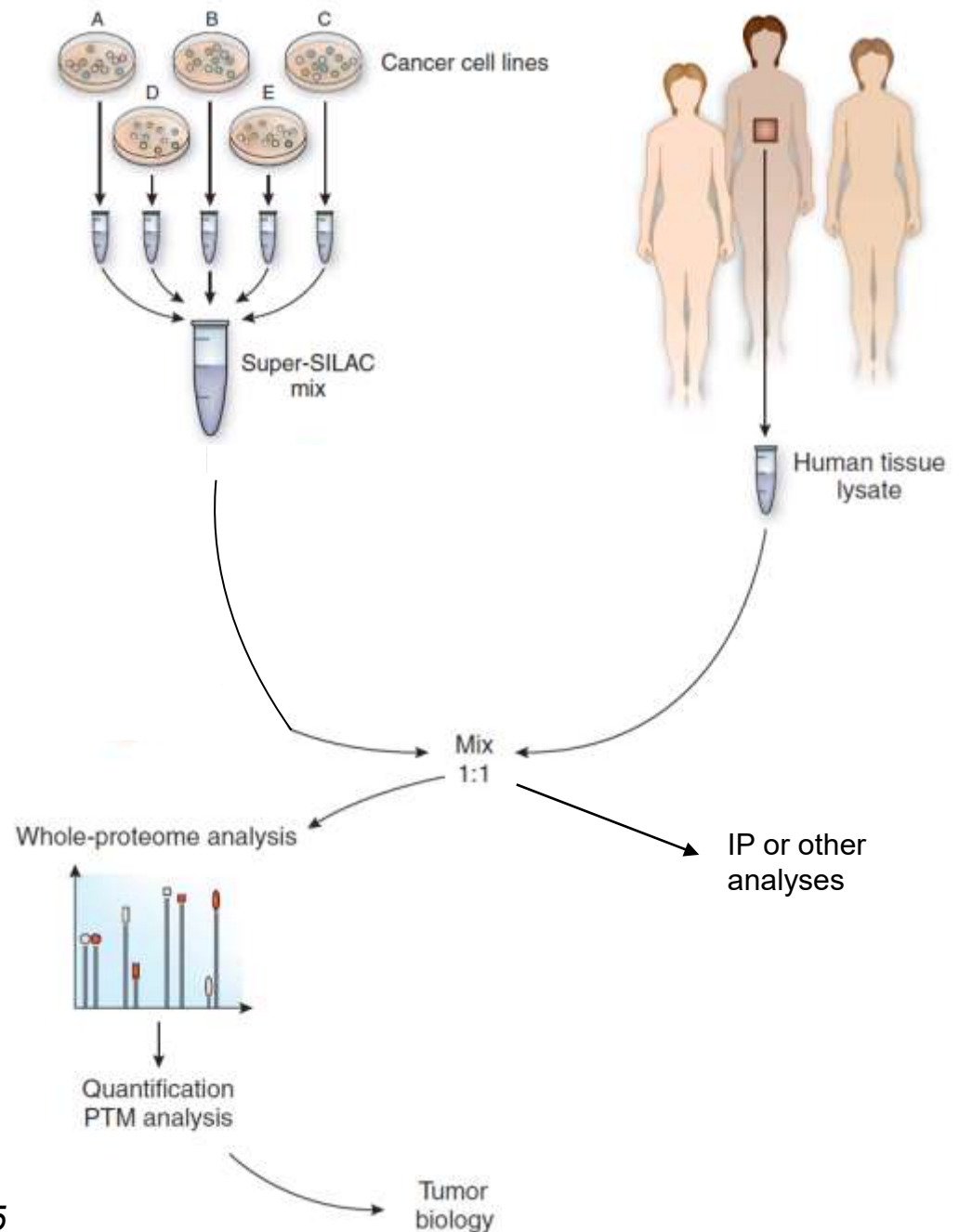
TOP-DOWN

Speciální využití metod založených na inkorporaci stabilních izotopů

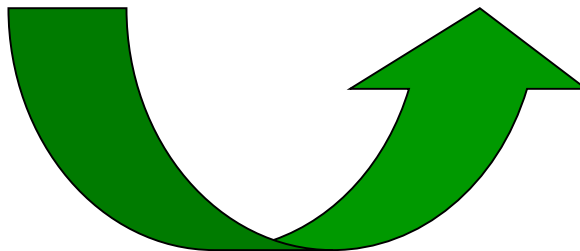
- Využití vzorku značeného SILAC jako srovnávacího standardu (**Super-SILAC**)
- Pulsed SILAC
- Pulse-chase SILAC
- Teplotní profilování (thermal profiling)

SUPER-SILAC

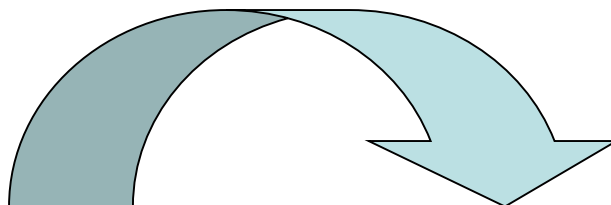
Expresní proteomika
pacientských nádorových
vzorků. Jako kontrolní
standard slouží
homogenát ze směsi
buněčných linií
odvozených ze stejného
typu nádoru naznačených
metabolicky „heavy“ Arg
a/nebo Lys.



Translace

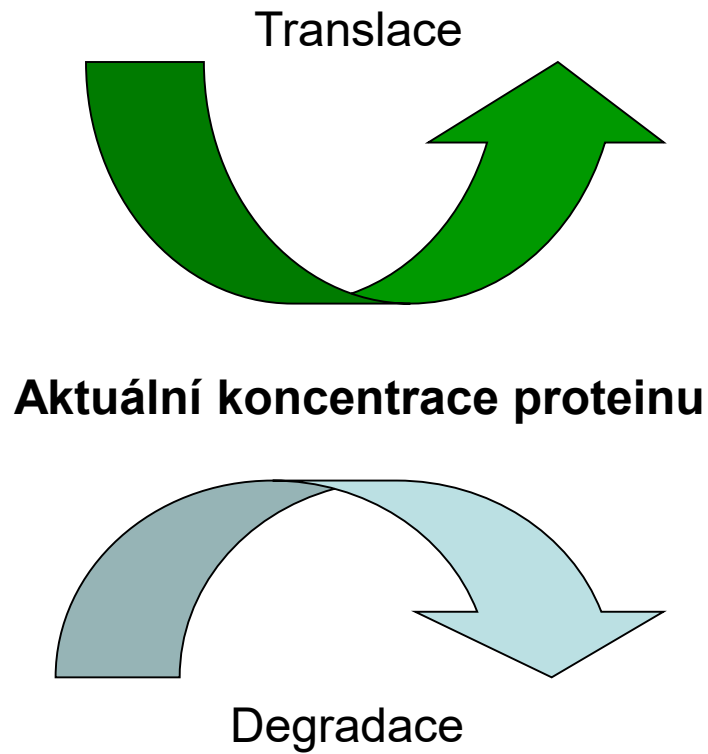


Aktuální koncentrace proteinu

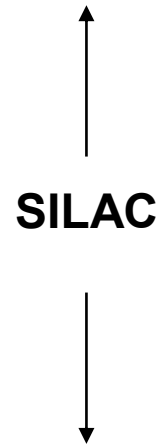


Degradace

Přibývá jedna izotopová značka



Pulsed SILAC
Pulse-chase SILAC

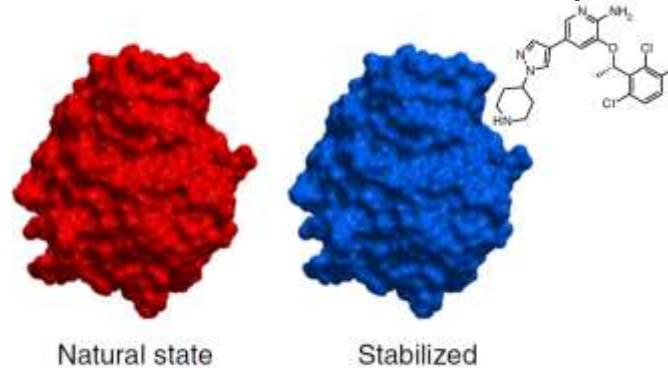


Pulse-chase SILAC

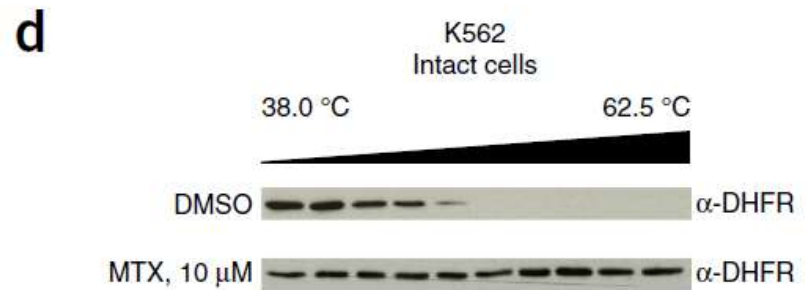
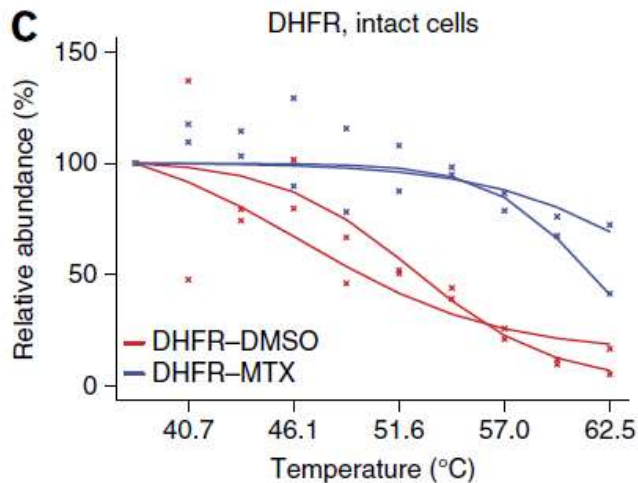
Ubývá druhá izotopová značka

THERMAL PROFILING

Vazba ligandu zvyšuje teplotní stabilitu PROTEINU, posouvá se teplota denaturace.



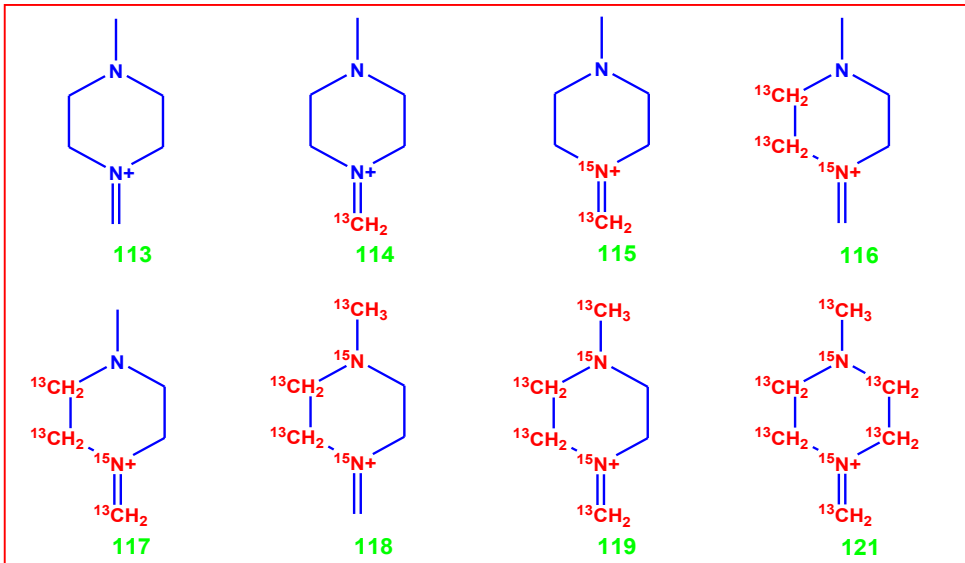
Lze monitorovat změnu teploty denaturace (teplota kdy dojde k precipitaci a „vypadnutí z roztoku“)



Detekce rozpustného proteinu v supernatantu

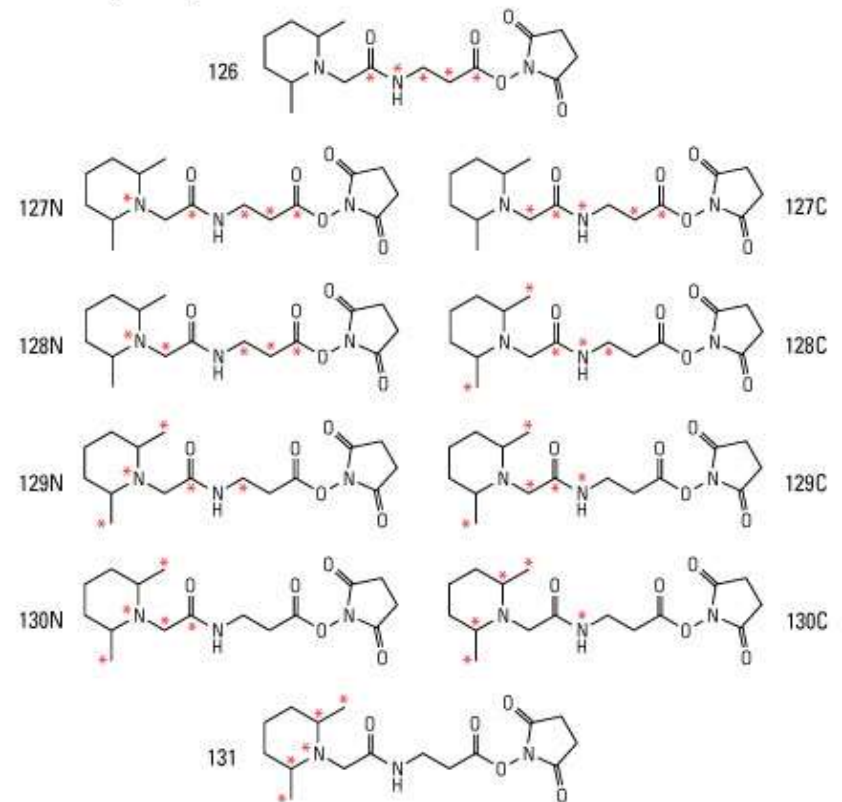
THERMAL PROFILING

iTRAQ 8plex Reagents

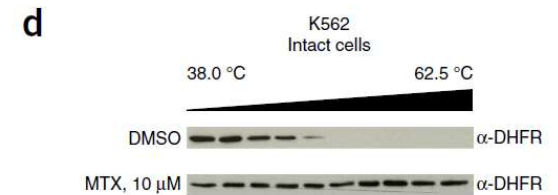
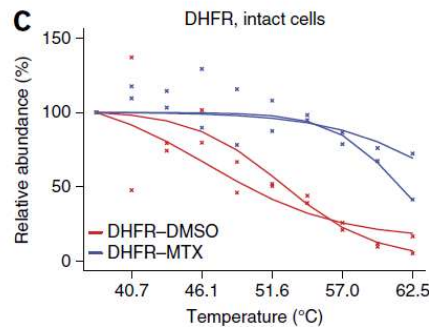
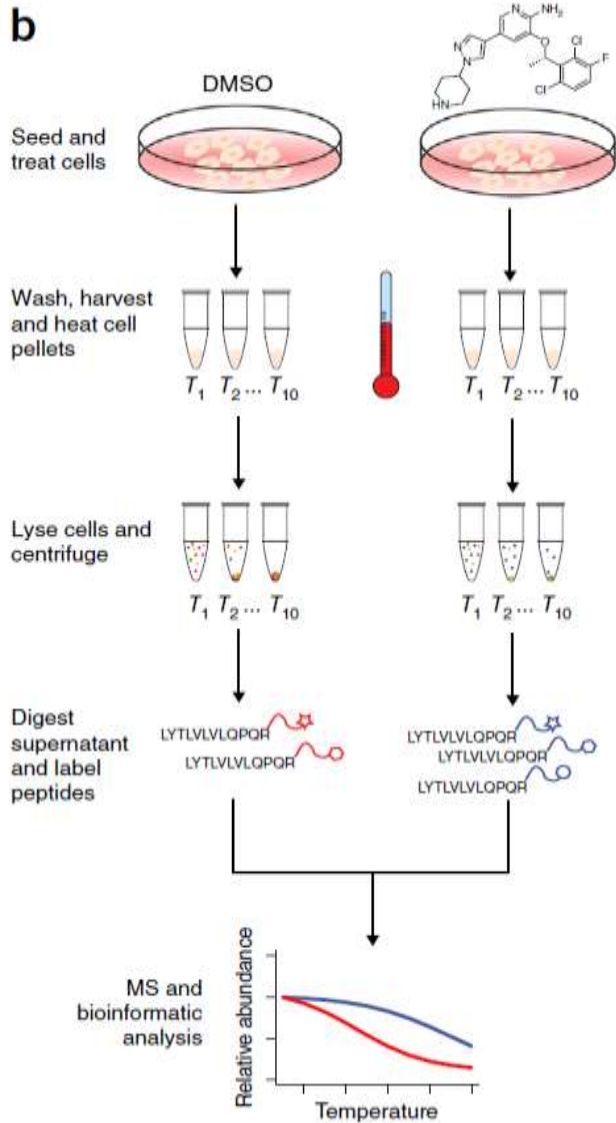


TMT 10 plex reagents

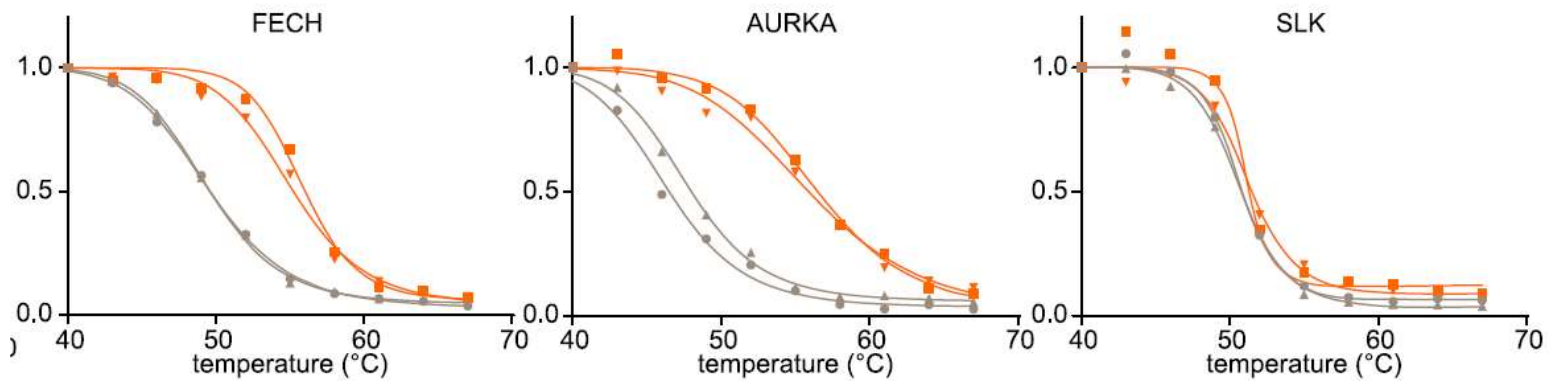
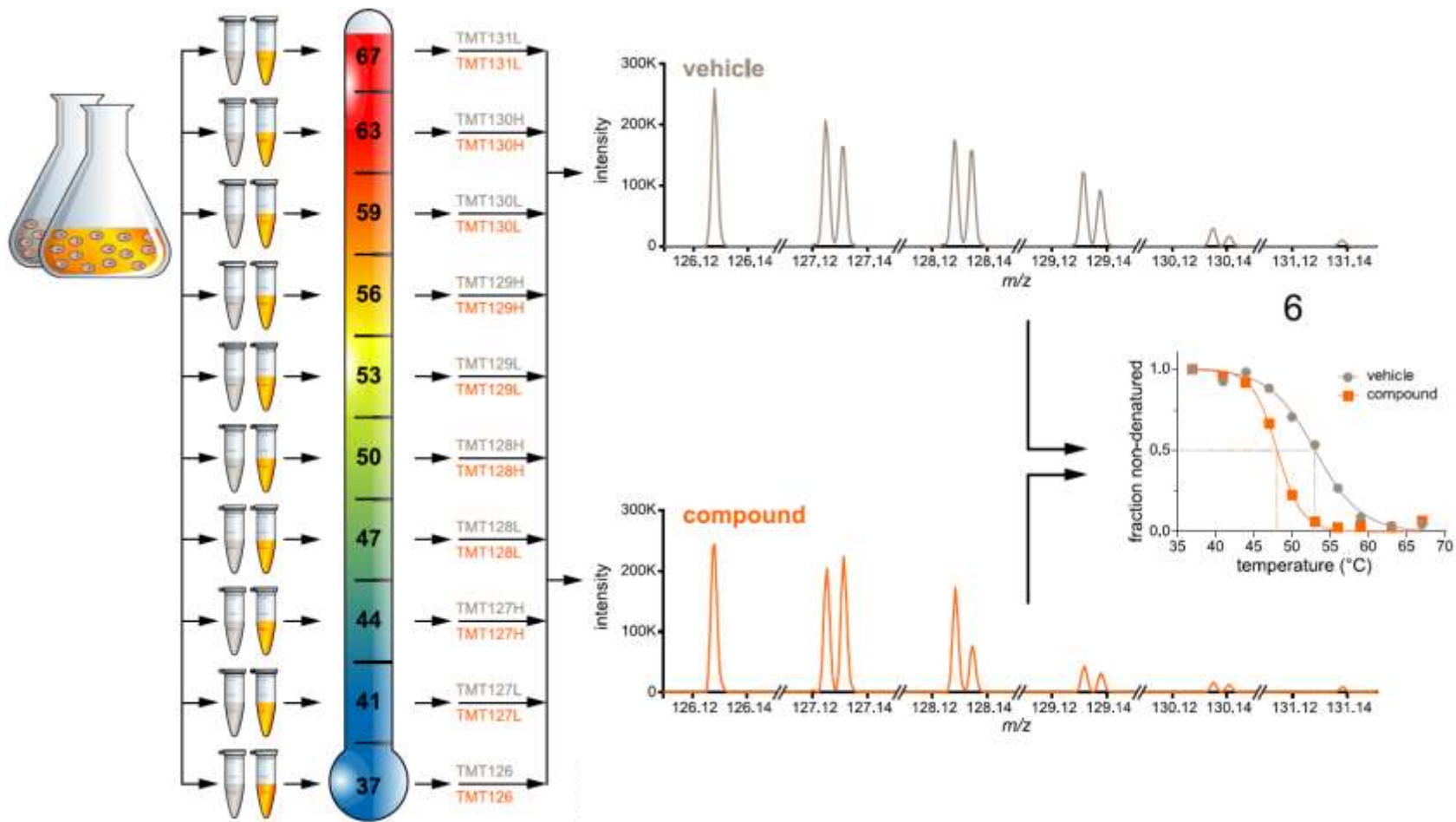
B. TMT10plex Reagents (TMT¹⁰)



THERMAL PROFILING



Huber KV, et al. Nat Methods. 2015 12(11):1055-7.
Savitski MM et al. Science. 2014;346(6205):1255784.



KLINICKÁ PROTEOMIKA

PLAZMA A SÉRUM a jiné tělní tekutiny

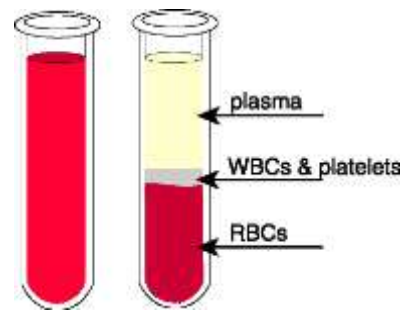


Co je to biomarker ?

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

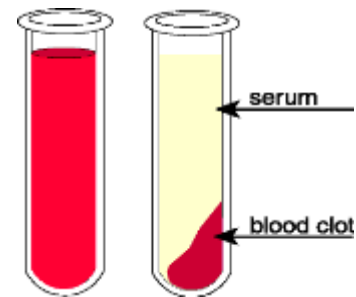
*Měl by být přístupný ve snadno získatelné
tkáni či tělní tekutině.*





Krevní plazma a sérum

60-80 g/L

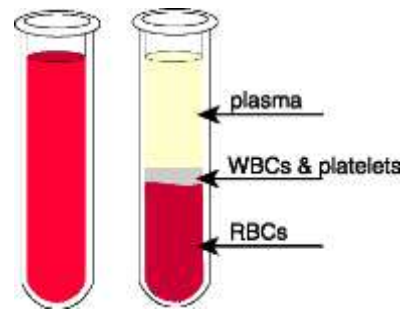


- Dosud spolehlivě identifikováno zhruba 8000 bílkovin

- Extrémní rozdíly v koncentracích (10 řádů)

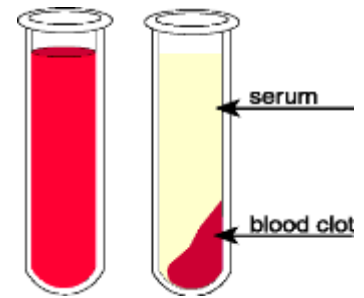
Albumin 50 000 000 000 pg/ml

Interleukin 6 5 pg/ml



Krevní plazma a sérum

60-80 g/L

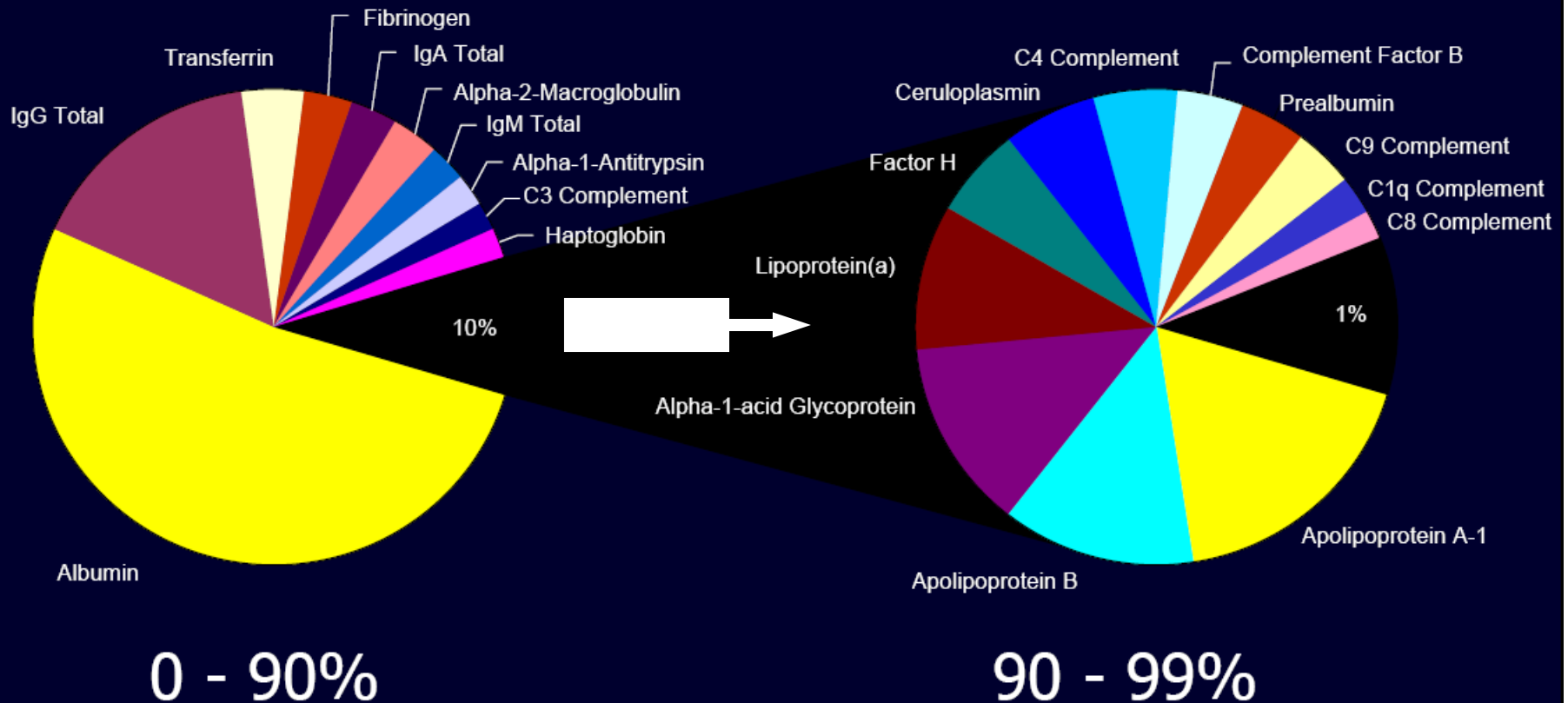


- Dosud spolehlivě identifikováno zhruba 8000 bílkovin
- **Extrémní rozdíly v koncentracích (10 řádů)**

Albumin	50 000 000 000 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**

Major Plasma Proteins

99% of plasma protein mass





A pie chart on a black background. The chart is almost entirely a large blue circle. A very thin, light blue slice is cut out from the right side. A black arrow points from the text below to this slice.

22 most abundant proteins

the interesting 1%
of plasma proteome

Afinitní mechanismy deplece majoritních proteinů

- **Imunodeplece nejkonzentrovanejších proteinů**

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

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

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

- **„Ekvalizace“**

knihovna náhodných hexapeptidů sloužících jako ligandy

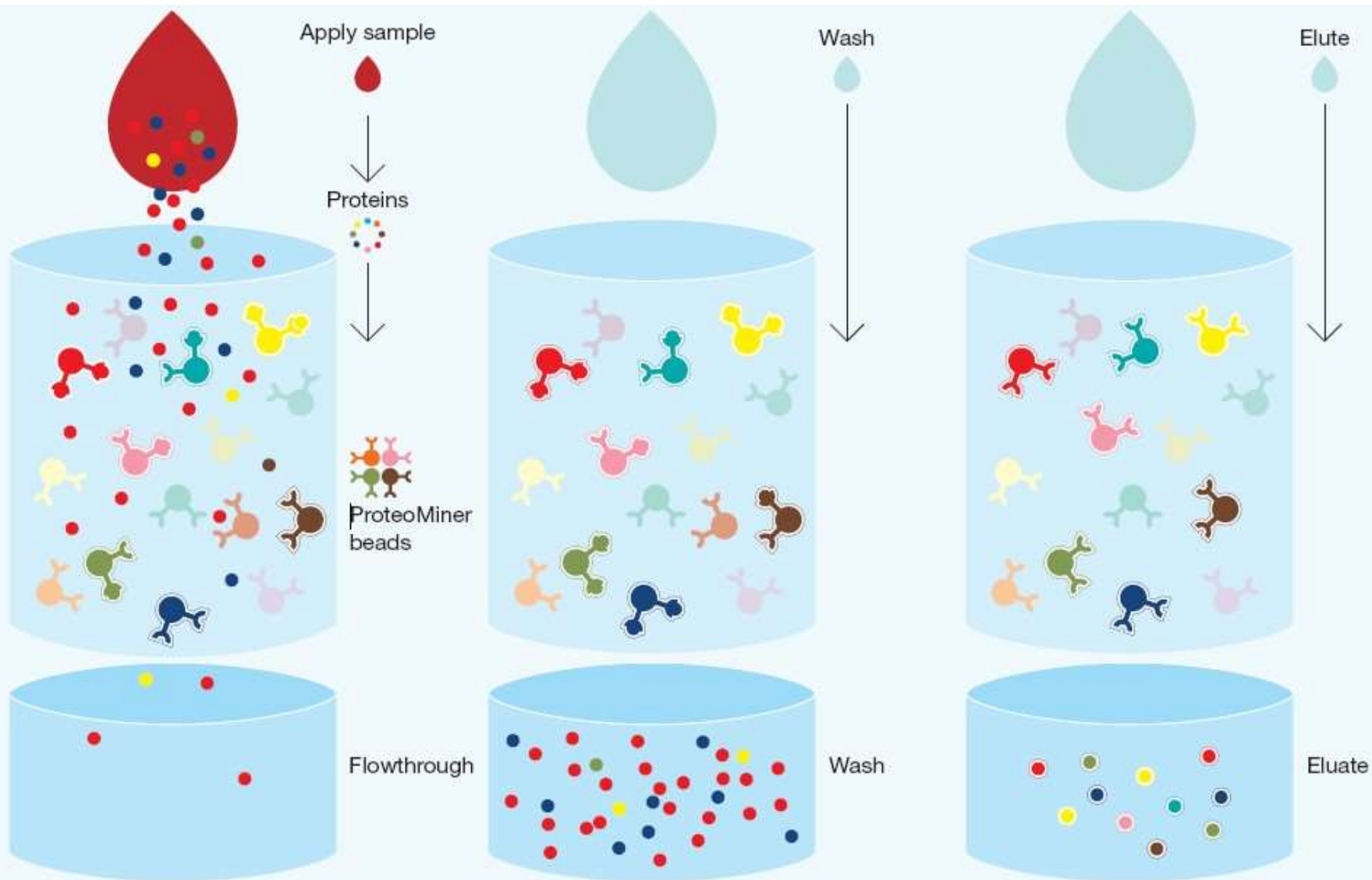
„ProteoMiner“

Při depleci jsou odstraňovány asociované proteiny a peptidy!

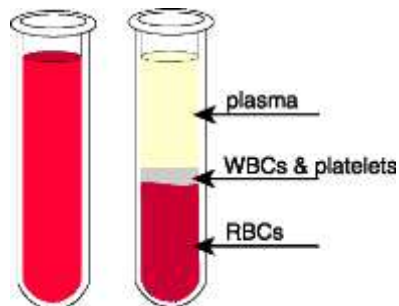
Cena!

Reproducibilita!

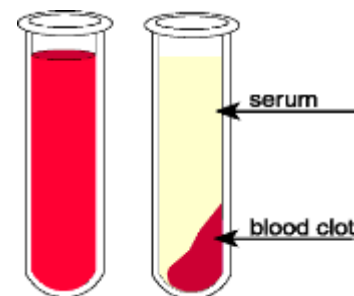
Knihovna náhodných hexapeptidů sloužících jako ligandy „ProteoMiner“



Krevní plazma a sérum



60-80 g/L



- Dosud spolehlivě identifikováno zhruba 8000 bílkovin

- **Extrémní rozdíly v koncentracích (10 řádů)**

Albumin 50 000 000 000 pg/ml

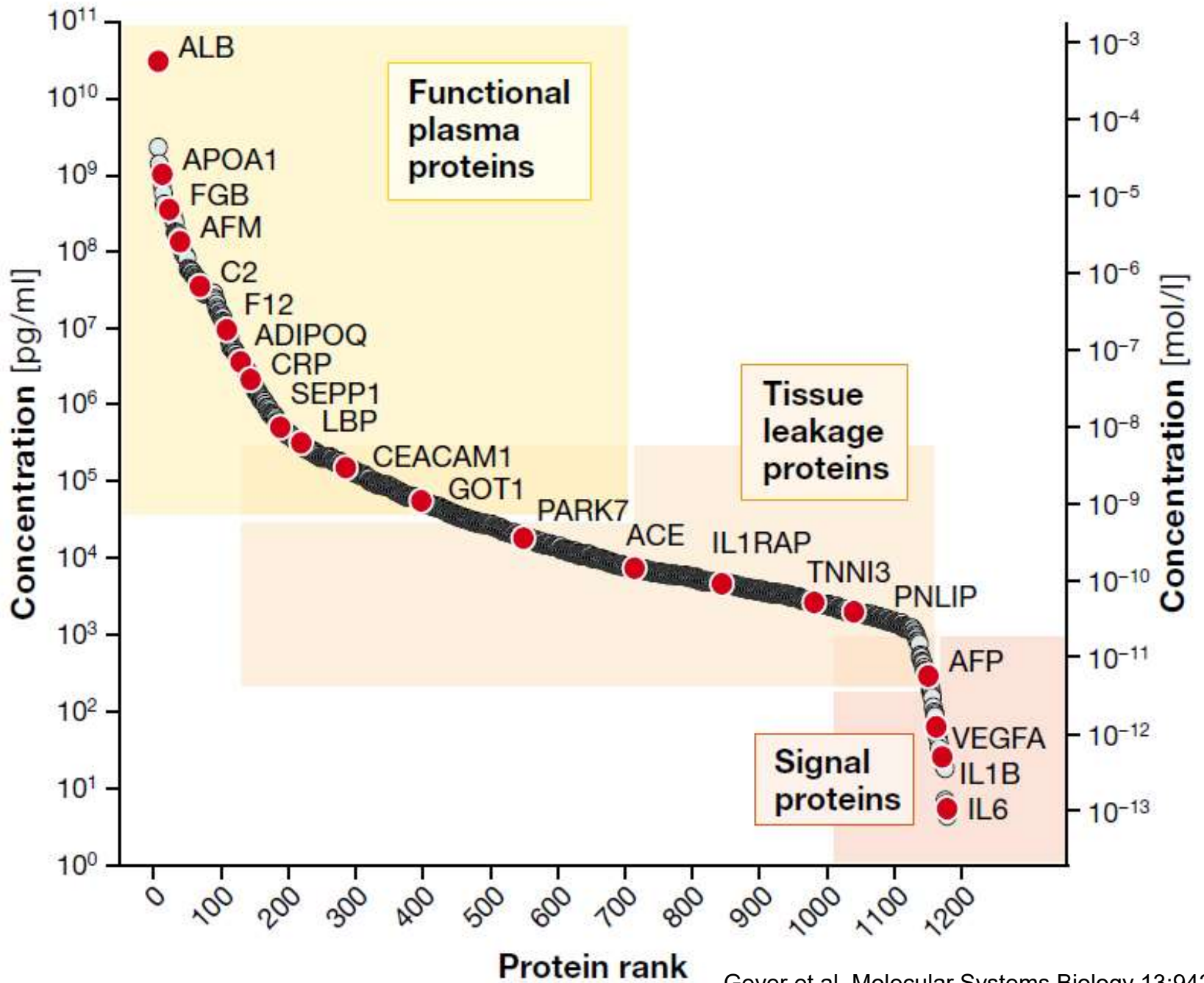
Interleukin 6 5 pg/ml

- **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, vliv odběru**



Další tělní tekutiny:

Moč: 0-0,2 mg/ml (roste např. při onemocnění ledvin)

Mozkomíšňní mok: 0,5-1 mg/ml (lumbální punkce)

Plodová voda: 3-4 mg/ml (aminocentéza, porod)

Sliny: 0,8-1,5 mg/ml

Slzy: 4-6 mg/ml

Dechový kondenzát: 1 μ g/ml

Pot, hlen, výpotky, synoviální tekutina, nitrooční tekutina...

Alternativy k MS-proteomice plazmy/séra
založené na protilátkách nebo aptamerech

- **OLINK**
- **Soma Scan**

OLINK

Proximity extension assay

(pokud se na protein navážou dvě specifické protilátky, dojde ke vzniku unikátní DNA reportérové sekvence, která je amplifikována PCR a jejíž výsledné množství je funkcí koncentrace detekovaného proteinu)



IMMUNO REACTION



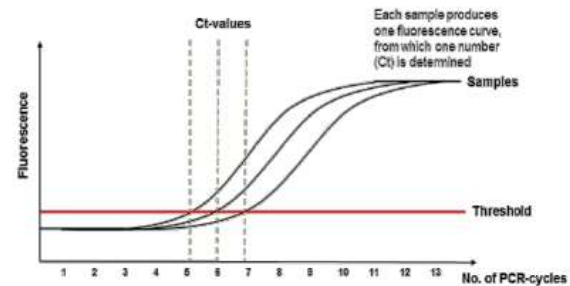
EXTENSION REACTION



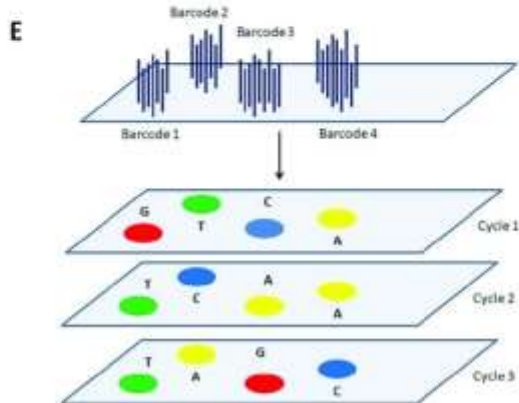
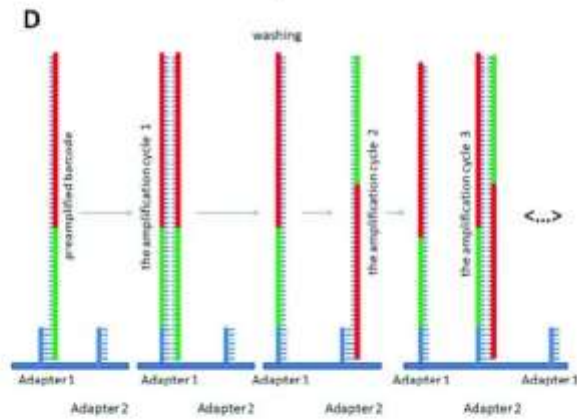
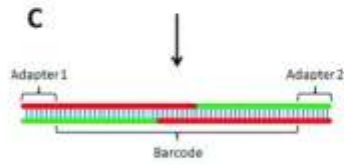
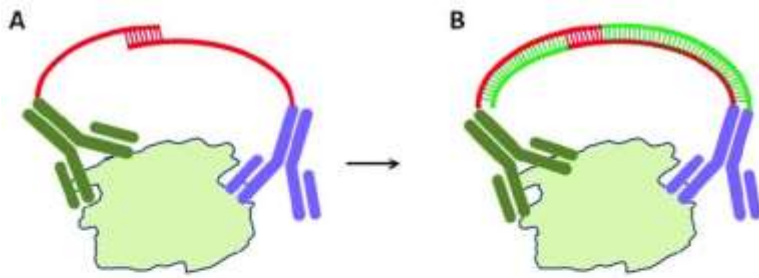
PRE-AMPLIFICATION



DETECTION



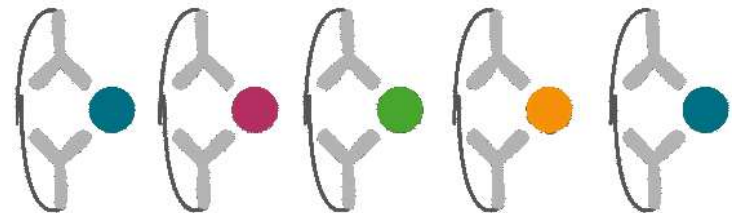
QC and GENERATION OF NPX

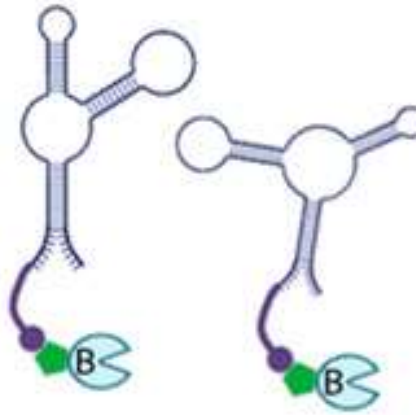


Detekce PCR nebo NGS

V různých tematických panelech (po 48, 96 nebo 386 protilátkových párech)

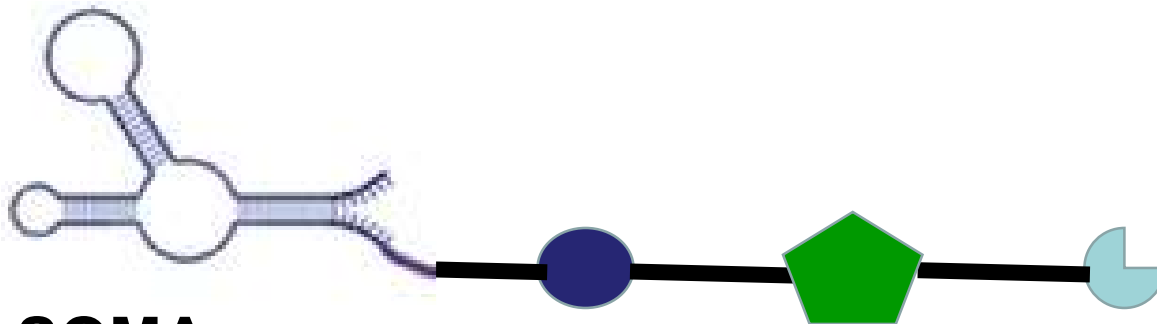
celkem 5400 proteinů





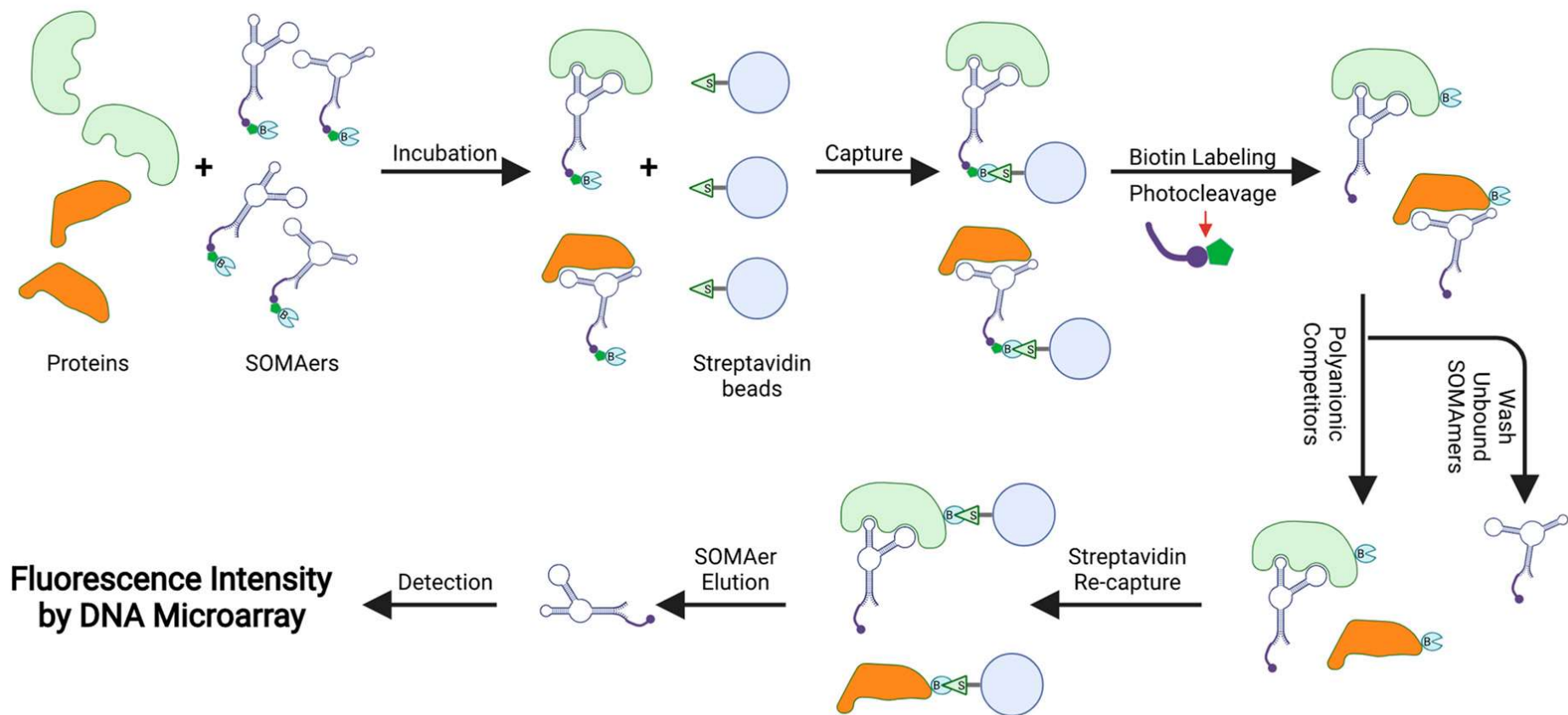
SOMAScan

Specifická vazba aptamerů (ssDNA, modifikované nukleotidy)
na protein a následná
detekce fluoroforu na aptamerech



SOMAmer

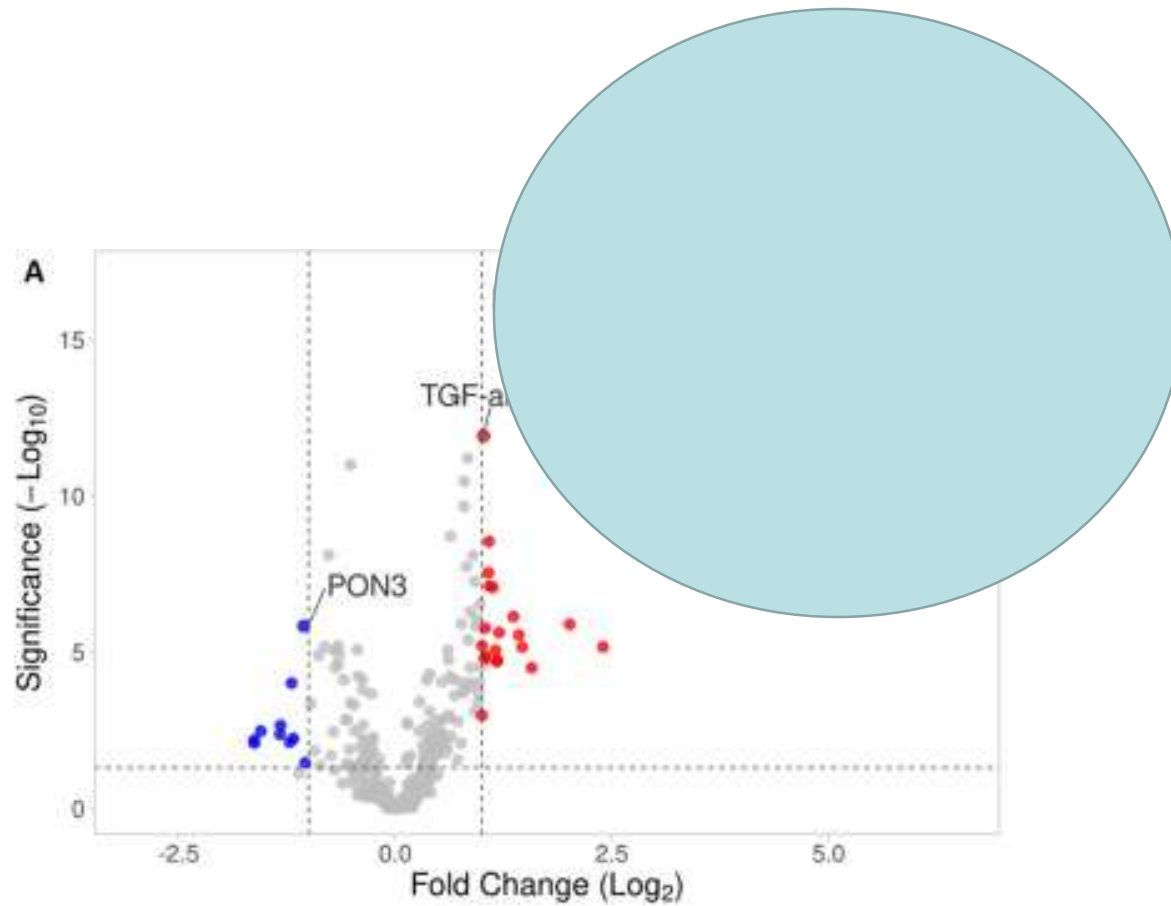
Aptamer-fluorofor-fotocleavage site-biotin



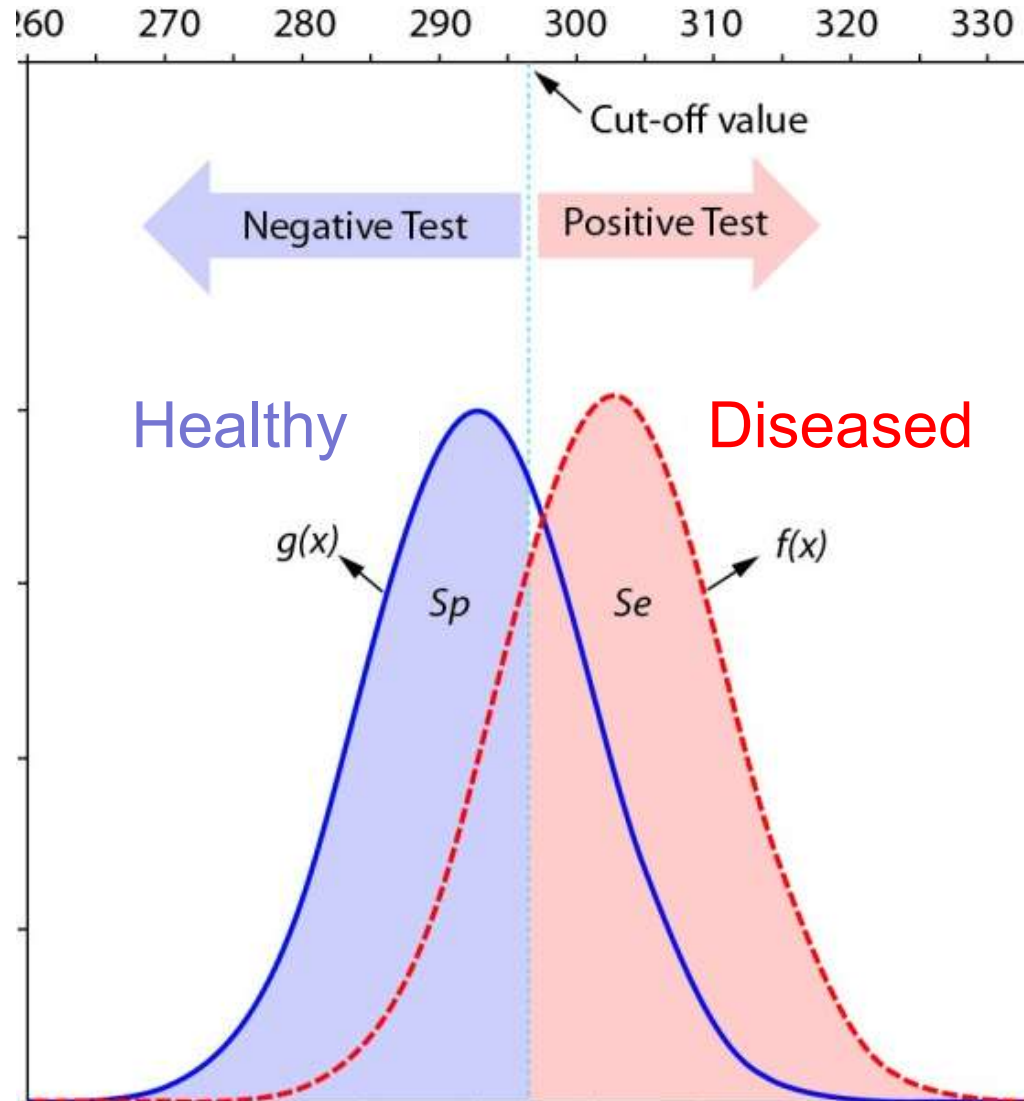
SOMAScan

1300 proteinů v jedné anályze
celkem až 7000 proteinů

Potenciální sérové markery identifikované OLINK



Protein XY concentration (ng/mL)



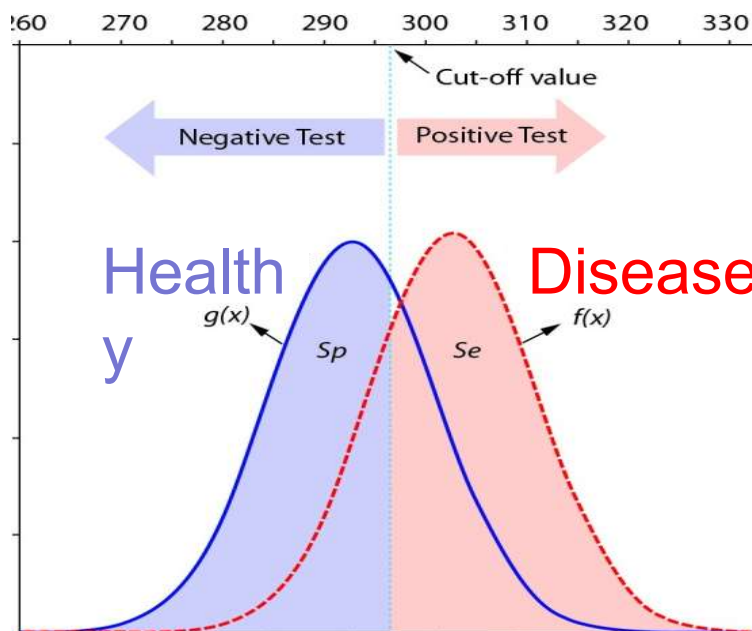
Senzitivita and Specificita biomarkeru

$$Se = \frac{\text{red circle}}{\text{red circle} + \text{light blue circle}}$$

Kolik procent nemocných test zachytí ?

$$Sp = \frac{\text{light blue circle}}{\text{light blue circle} + \text{red circle}}$$

Kolik procent ze zdravých bude mít negativní test?



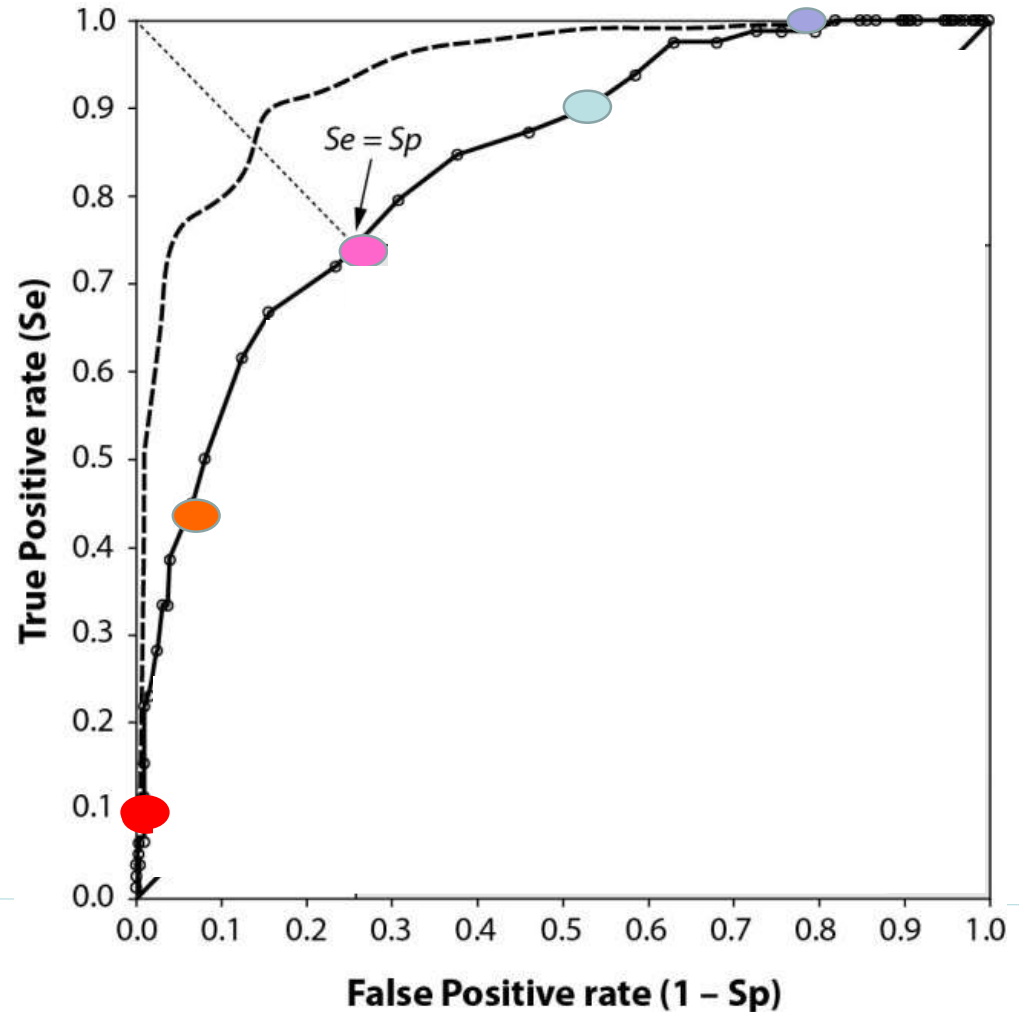
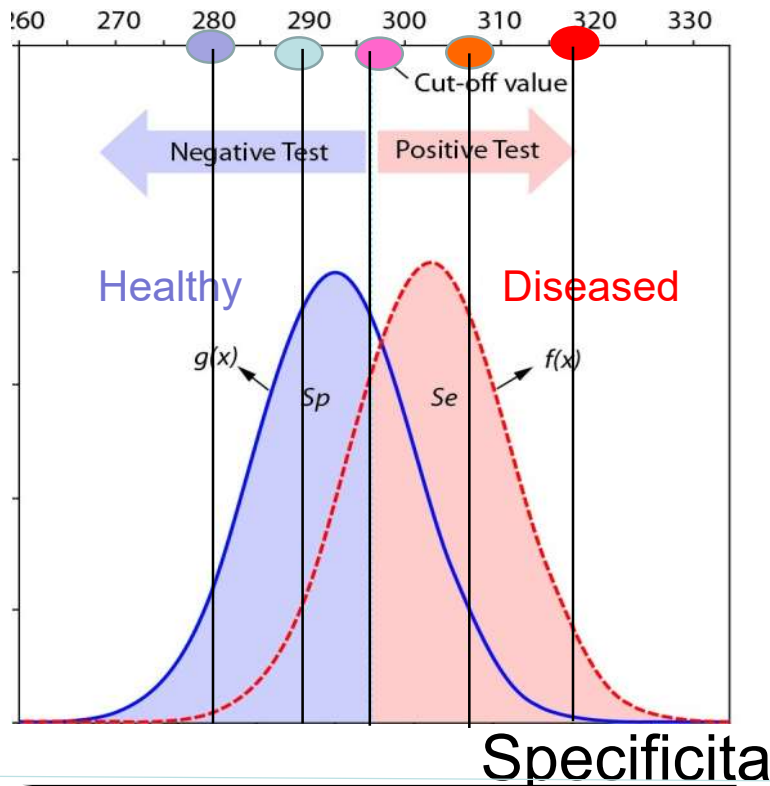
Senzitivita

Specificita



ROC curve of a biomarker

(Receiver Operating Characteristic)

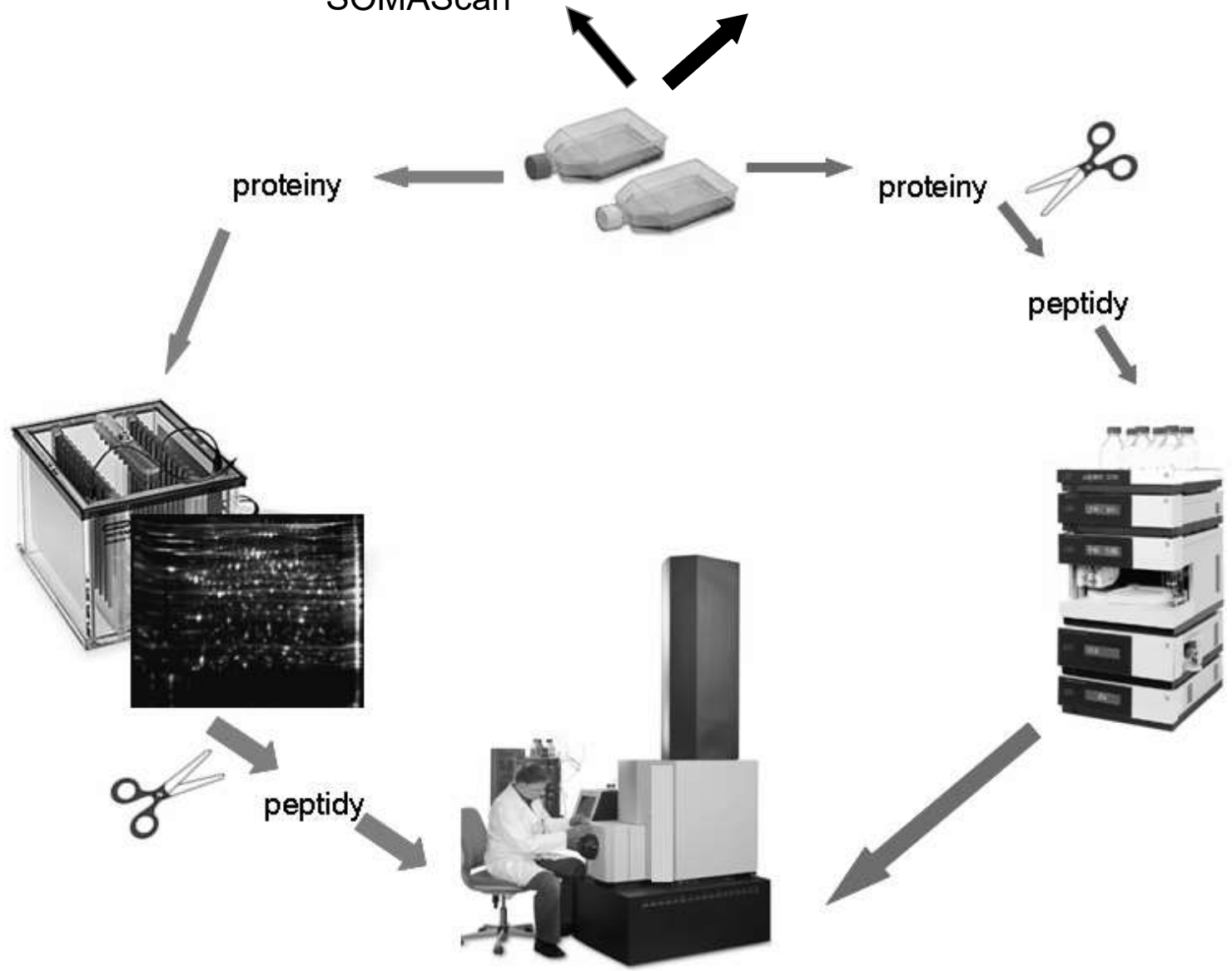


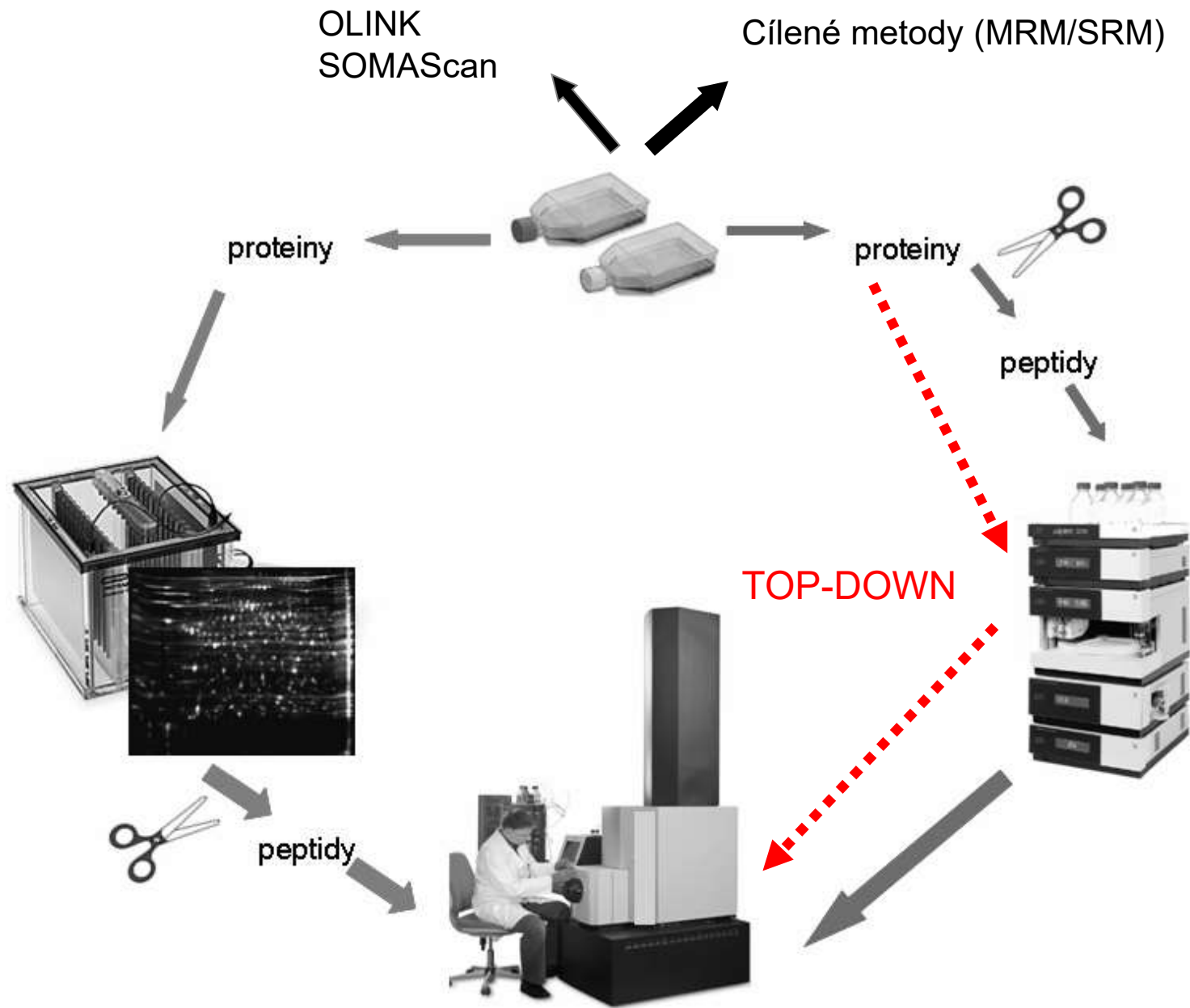
Senzitivita

Specificita

OLINK
SOMAScan

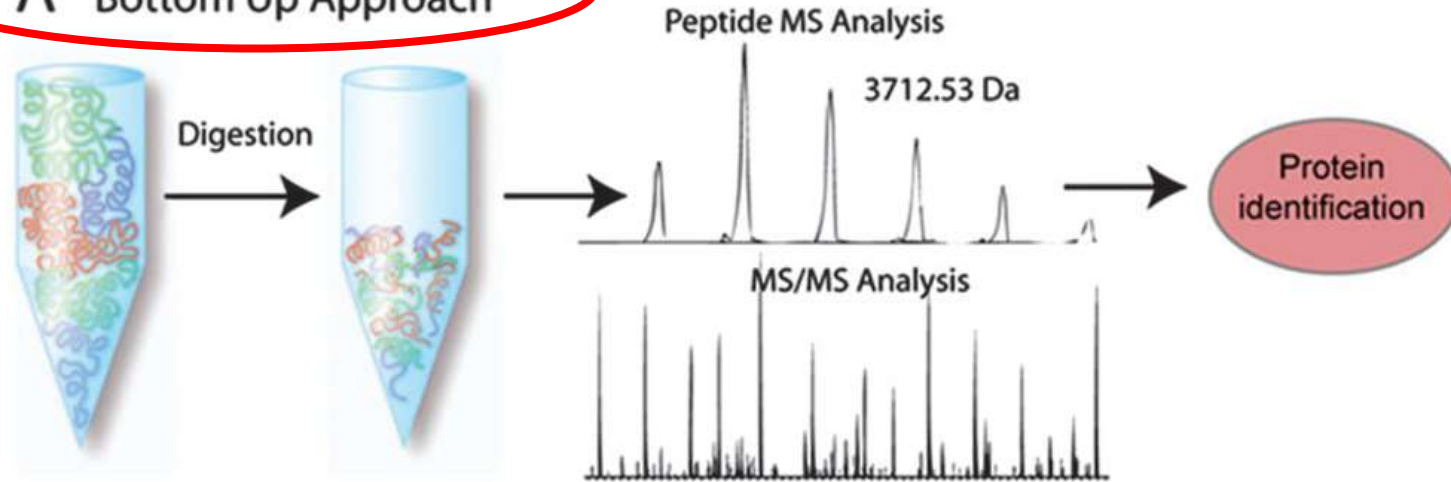
Cílené metody (MRM/SRM)



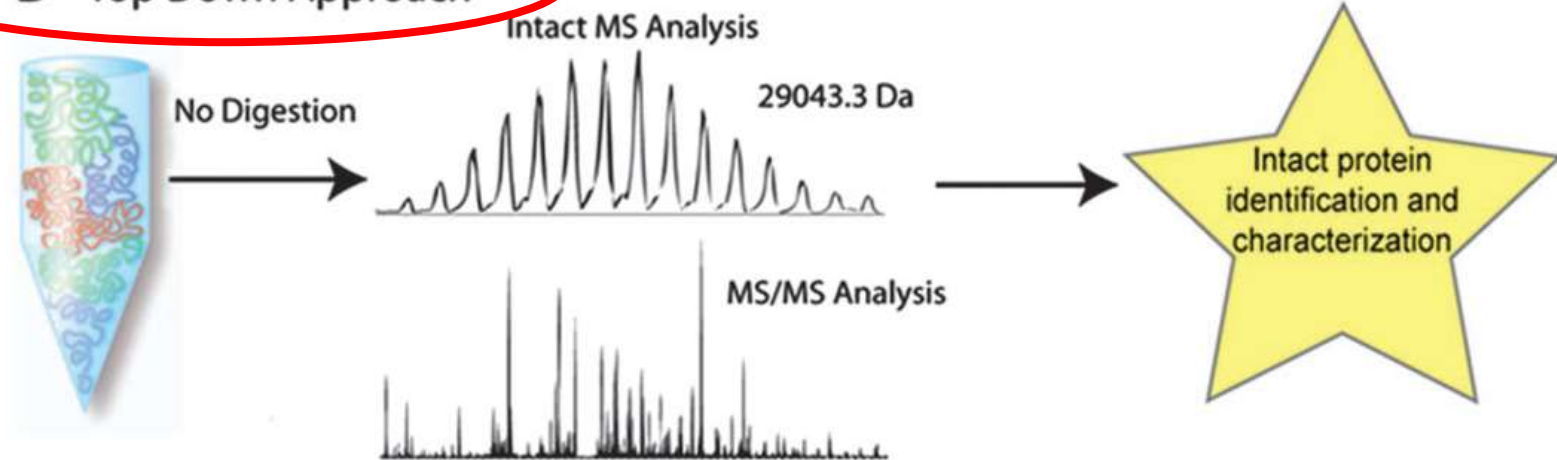


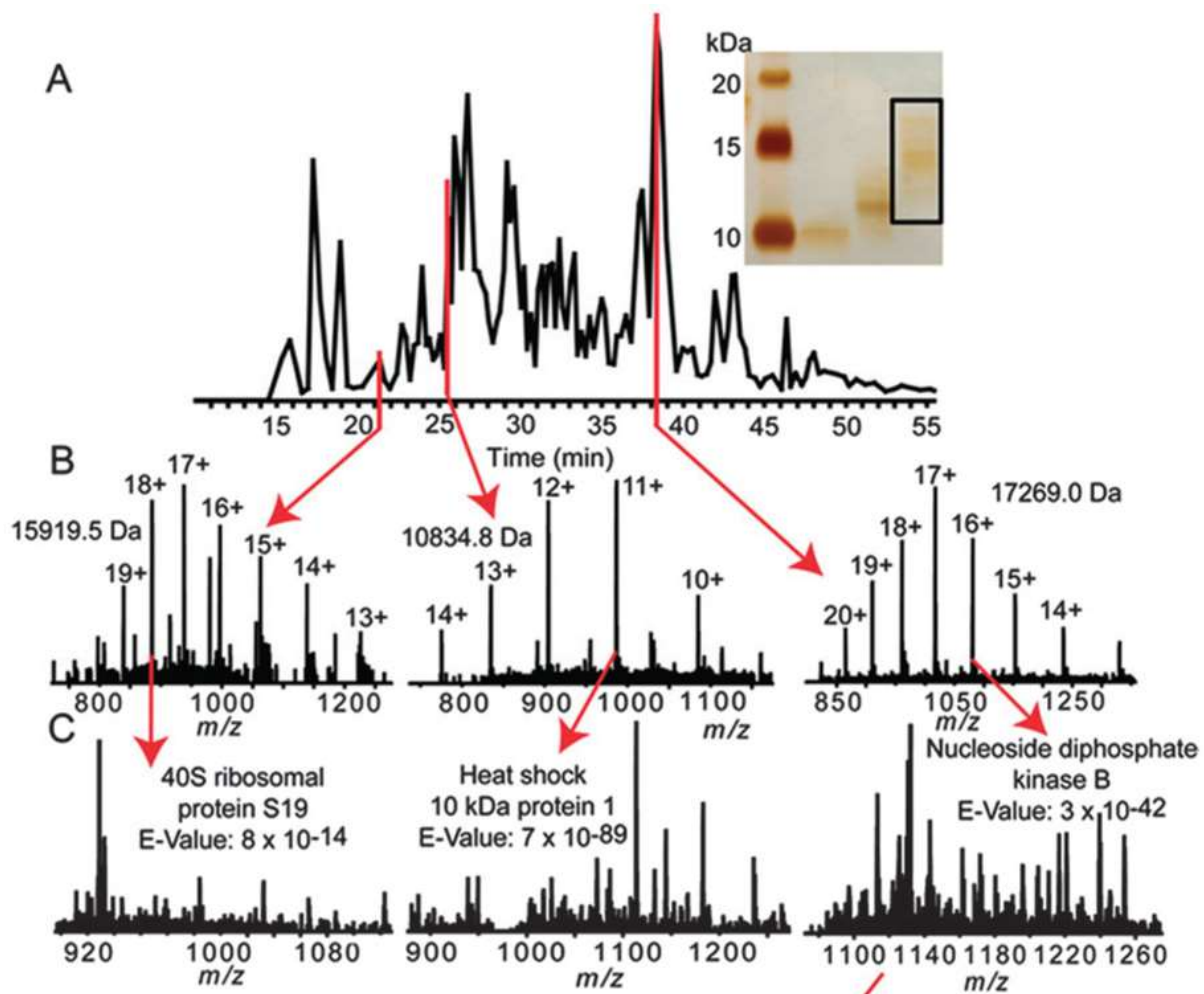
TOP-DOWN přístup – identifikace intaktních proteinů/proteoforem

A Bottom Up Approach



B Top Down Approach





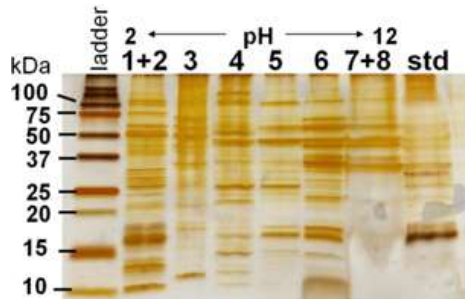
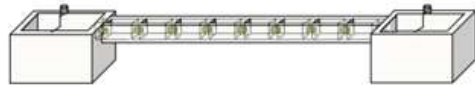
D

·A-N-L-E-R-T-F-I-A-I}K-P-D}G-V-Q-R-G-L-V-G-E}I-I-K-
 ·R-F-E-Q-K-G-F-R-L-V-A-M-K-F-L-R-A-S-E-E-H-L-K}Q-H-
 ·Y}I-D}L-K-D-R-P-F-F-P-G-L-V}K}Y-M}N}S}G}P-V-V}A}M}
 ·V}W-E}G-L}N-V}V-K-T-G-R-V-M-L-G-E-T-N}P-A-D}S-K}P-
 ·G-T-I-R-G-D-F-C-I-Q-V-G-R-N-I-I-H-G-S-D}S-V-K-S-A-
 ·E-K-E-I-S-L-W-F-K-P-E-E-L-V}D}Y-K-S-C-A-H-D}W}V-Y-
 ·E-

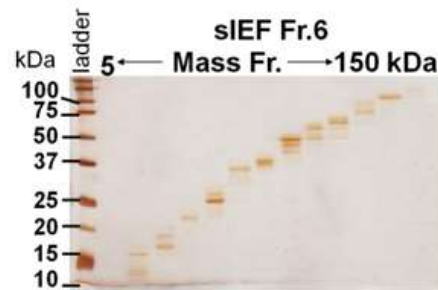
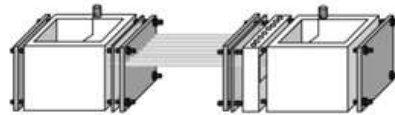
TOP-DOWN identifikace cca 1000 proteinů/3000 proteoforem

Mapping intact protein isoforms using top-down proteomics

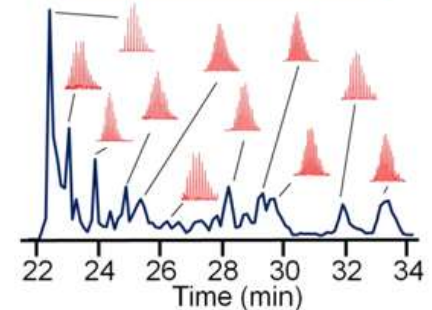
a - Isoelectric Focusing
(5 Fractions)



b - Multiplex GELFrEE
(5 × 9 Fractions)



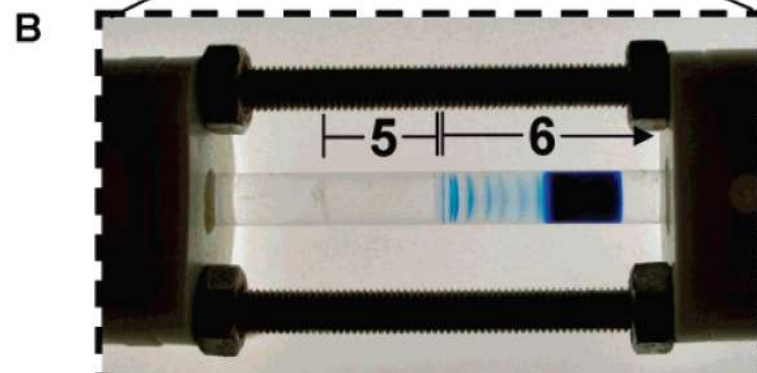
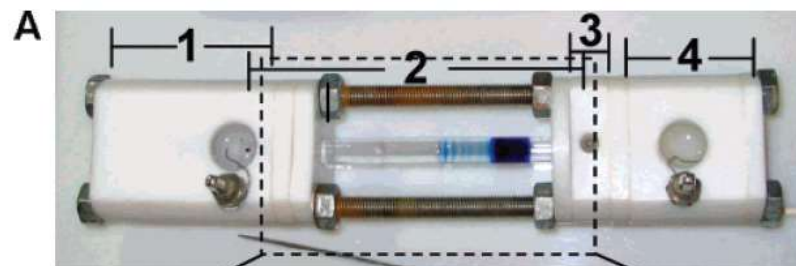
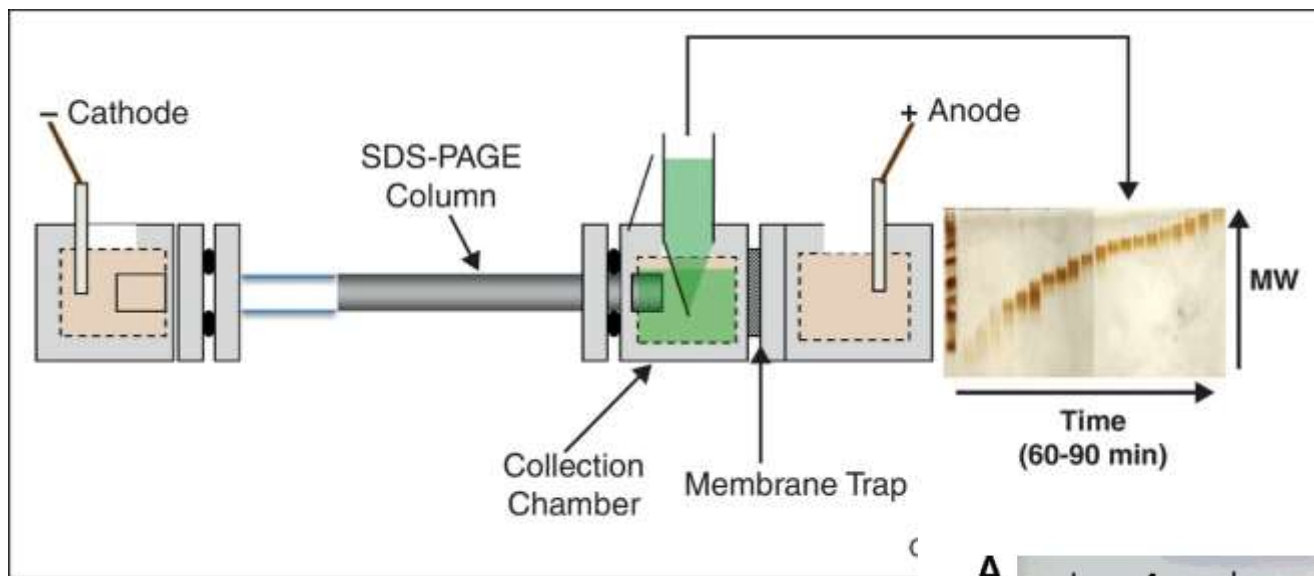
c - NanoCapillary LC-MS
(45 LC MS/MS runs)



(GELFrEE) - gel-eluted liquid fraction entrapment electrophoresis

Tran et al Nature 2011, 480, 254-258

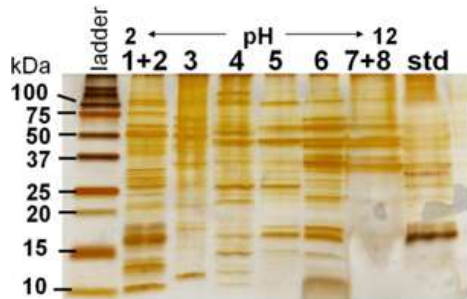
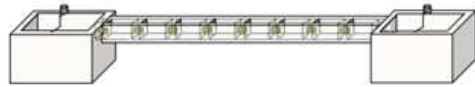
(GELFrEE) - gel-eluted liquid fraction entrapment electrophoresis



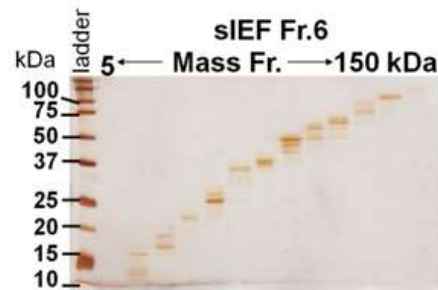
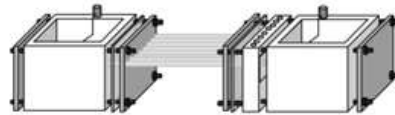
TOP-DOWN identifikace cca 1000 proteinů/3000 proteoforem

Mapping intact protein isoforms using top-down proteomics

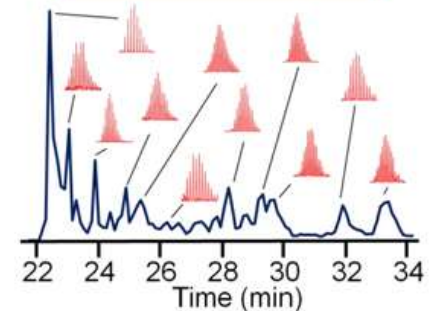
a - Isoelectric Focusing
(5 Fractions)



b - Multiplex GELFrEE
(5 × 9 Fractions)

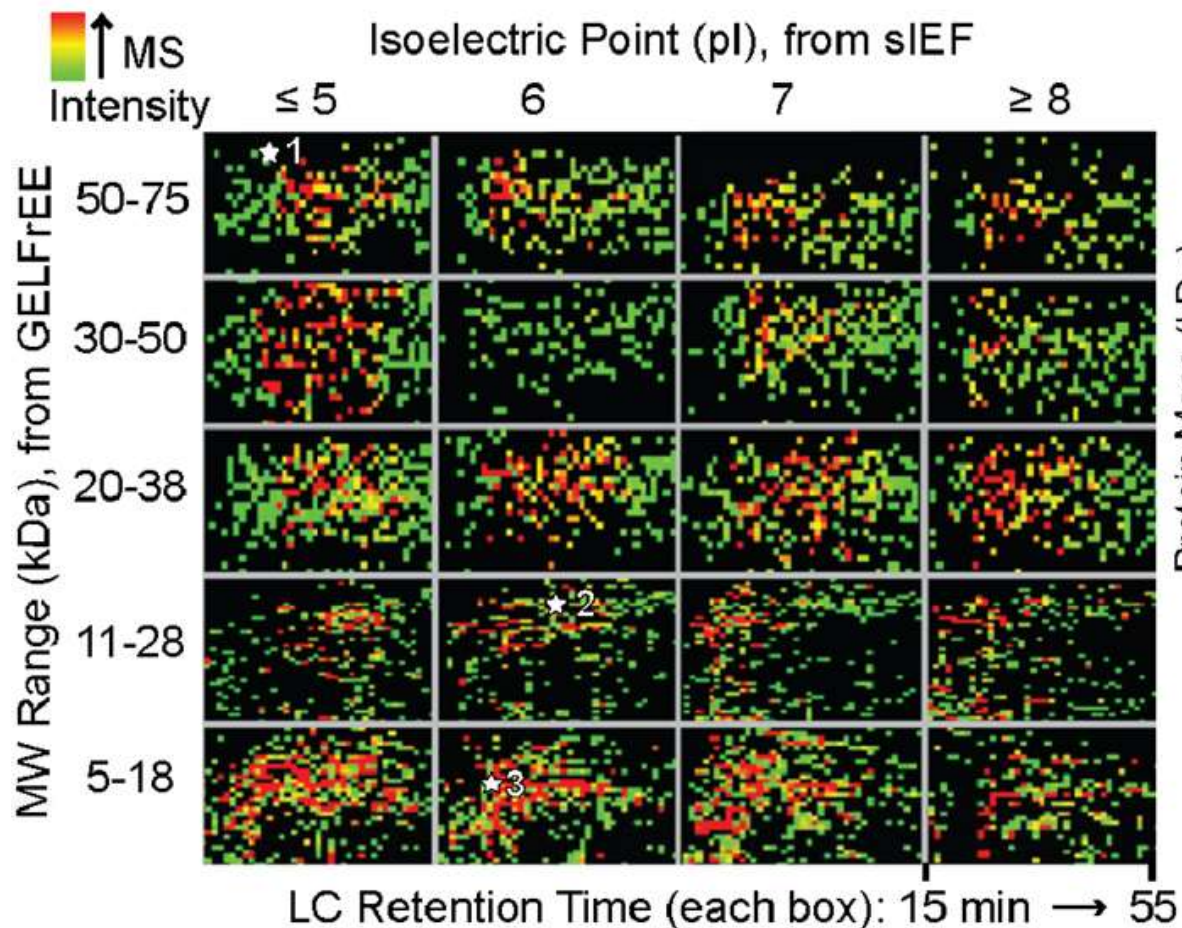


c - NanoCapillary LC-MS
(45 LC MS/MS runs)

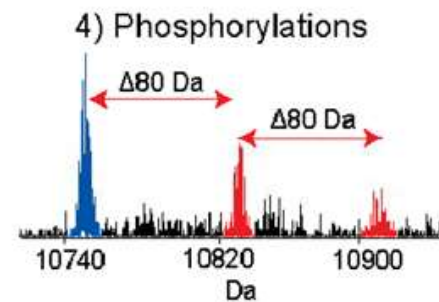
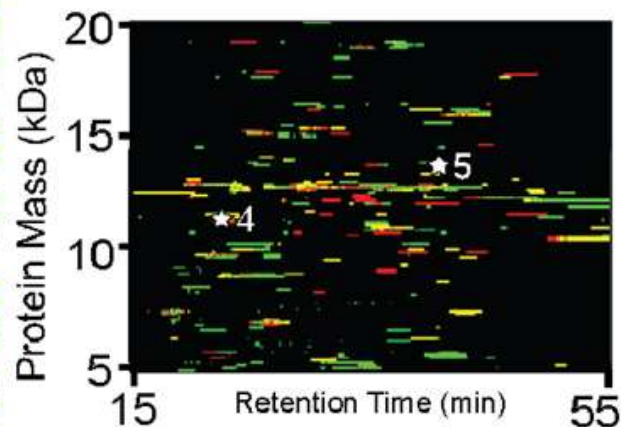
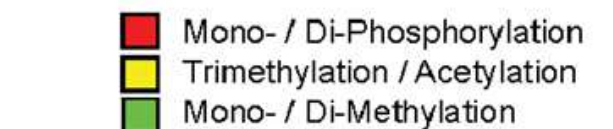


(GELFrEE) - gel-eluted liquid fraction entrapment electrophoresis

a - 2D Gel View



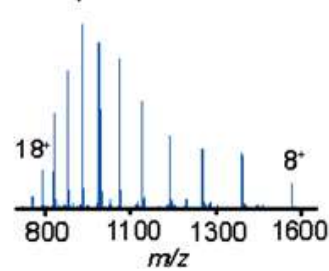
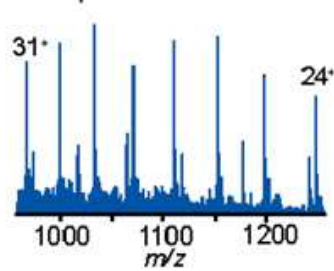
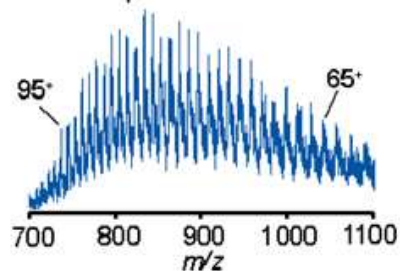
b - Modification View



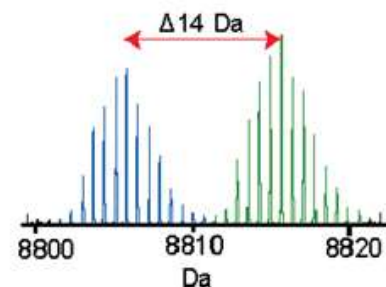
1) GRP 78: 70550 Da
q-value = 10^{-15}

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

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



5) Methylation



IF 2021

Molecular and Cellular Proteomics (IF 7,4)

Journal of Proteome Research (IF 5.37)

Proteomics (IF 5,4)

Clinical Proteomics (IF 5,0)

Journal of Proteomics (IF 3,8)

Expert Reviews of Proteomics (IF 4,2)

BBA – Proteins and proteomics (IF 4,1)

Protomics – Clinical Applications (IF 3,6)

Cancer Genomics & Proteomics (IF 3,4)

Proteome Science (IF 2.9)

.....

HUPO – HUman Proteome Organization

EuPa – European Proteomic Association

Proteomická sekce ČSBMB (www.czproteo.cz)

PROTEOMICKÁ LABORATOŘ 1. LF UK (Clinical Proteomics)



<http://petraklab.cz/>

ZKOUŠKA

Studijní materiály: <https://petraklab.cz/teaching>

Podmínkou přípuštění ke zkoušce je **vypracování eseje** na zadané téma **a odevzdání eseje** (jpetr@lf1.cuni.cz) **nejpozději 2 dny před zkouškou**.
Téma obdržíte po zapsání na zkoušku v SIS.