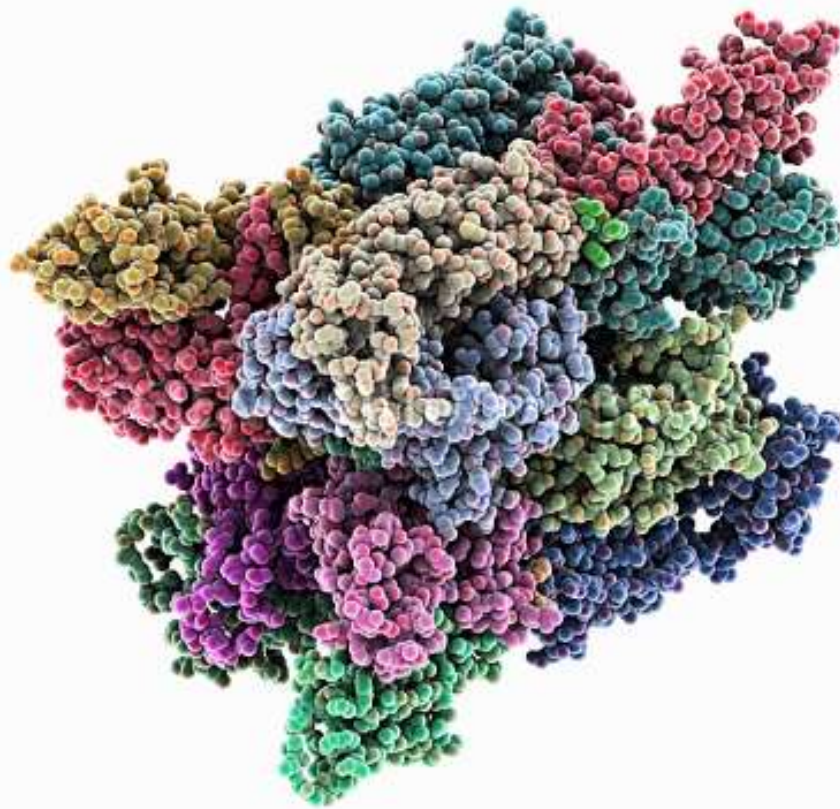


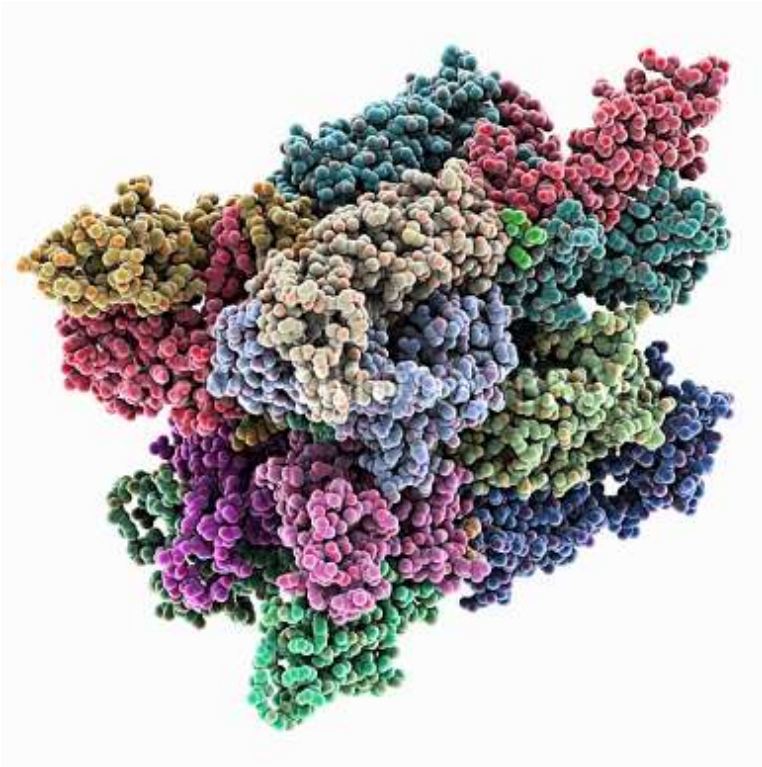
PROTEOMIKA 2024

- Proteomika, Metody práce s bílkovinami (Petrák 7/10)
- Separační metody, digesce a principy ID bílkovin pomocí MS (Petrák 14/10)
- Principy hmotnostní spektrometrie, instrumentace (Man 4/11)
- Hmotnostní spektrometrie v proteomice, analýza PTM (Man 11/11)
- ID proteinů, DDA, DIA, databáze, FDR (Talacko 18/11)
- Kvantifikace, isotopy, LFQ, cílená proteomika (Harant 25/11)
- Design experimentu, zpracování dat, bioinformatika...(Harant 2/12)
- Proteomika membránových proteinů, **proteinové komplexy** (Petrák 9/12)
- **Klinická proteomika, speciální metody** (Petrák 16/12)

ANALÝZA PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ



ANALÝZA PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ



Afinitní purifikace komplexů

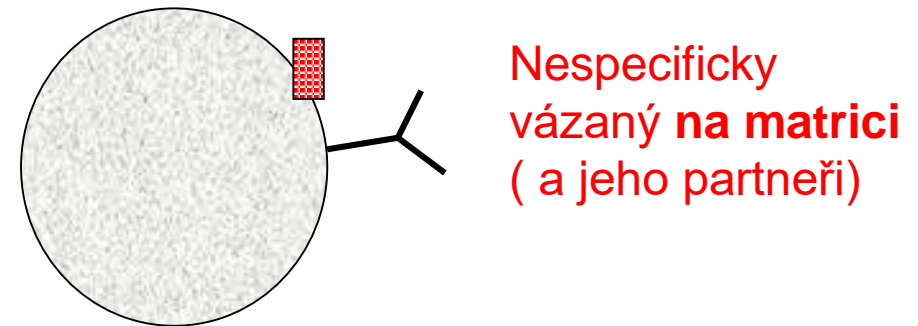
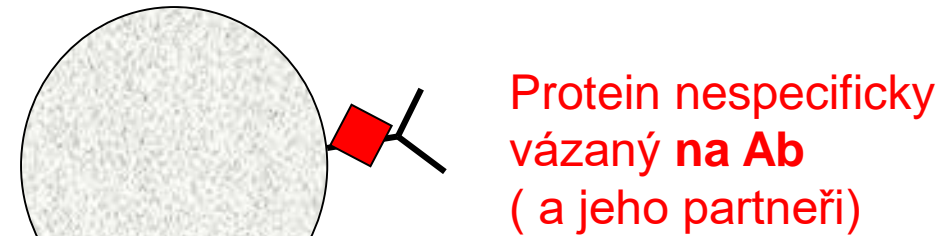
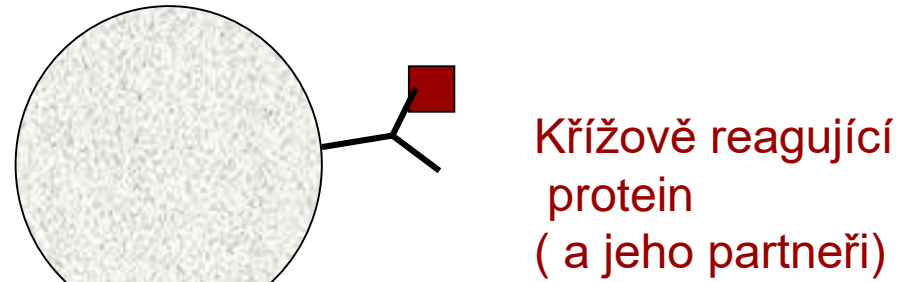
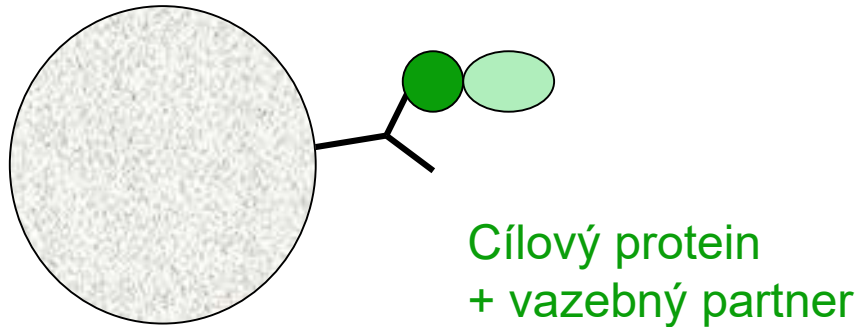
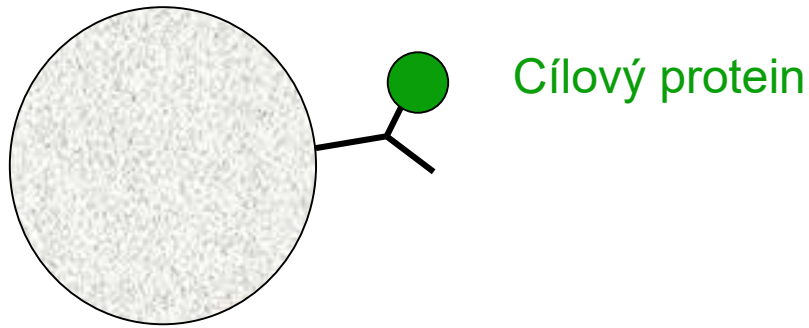
- s pomocí protilátky
- přes „tagované“ proteiny

Proximity labeling

Nativní (vícerozměrné) separace

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

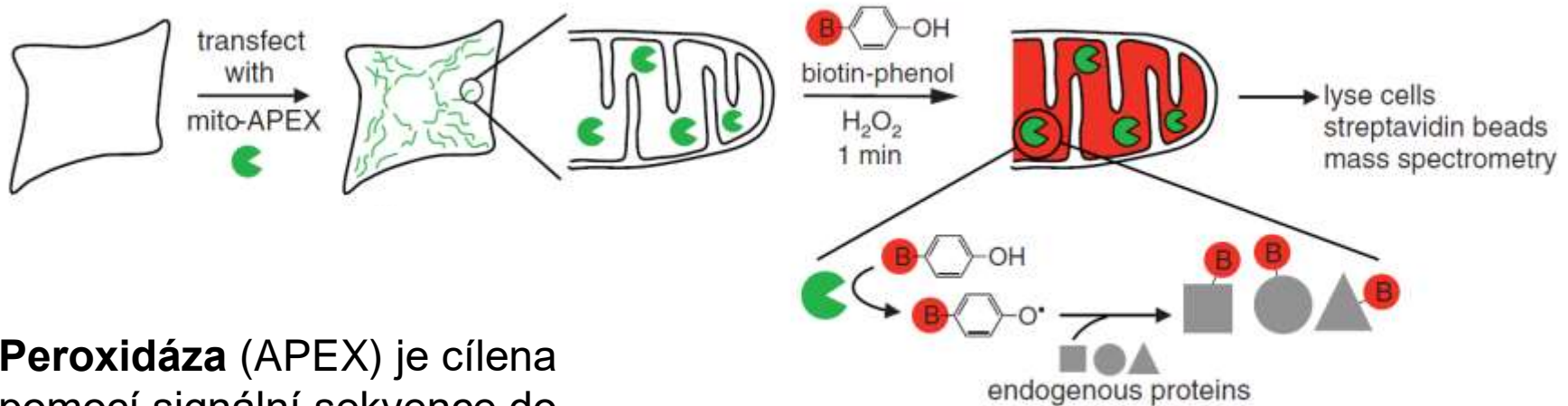
Typy možných interakcí při imunoprecipitaci



Proximity labeling

(k určení lokalizace proteinů, mapování kompartmentu)

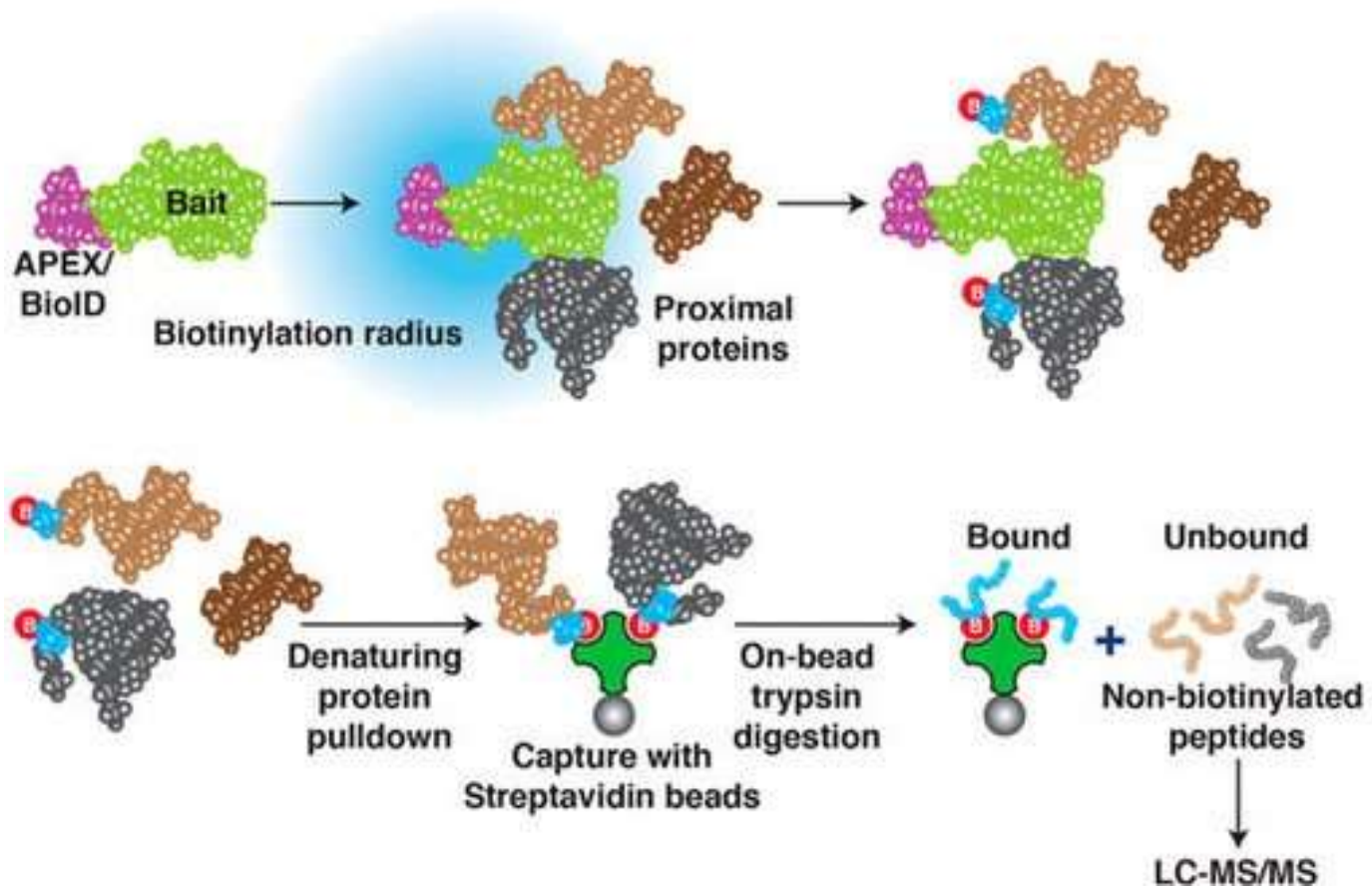
APEX APEX2



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

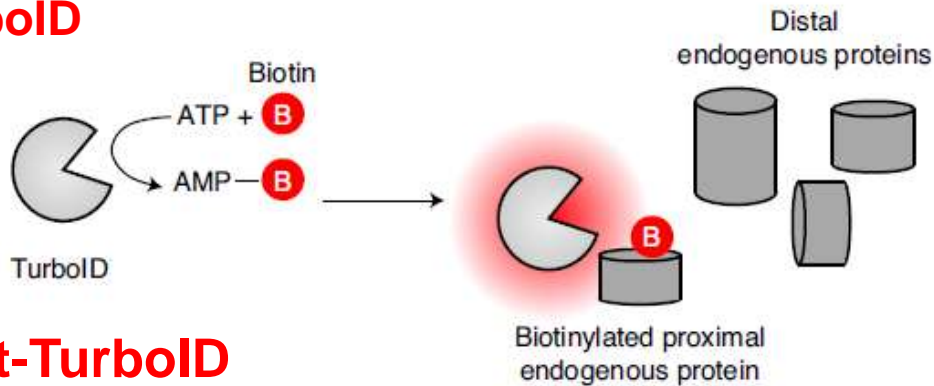
Mutantní kvasničné biotin ligázy – cílená mutagenese a selekce

Aktivovný biotin difunduje z aktivního místa do bezprostředního okolí

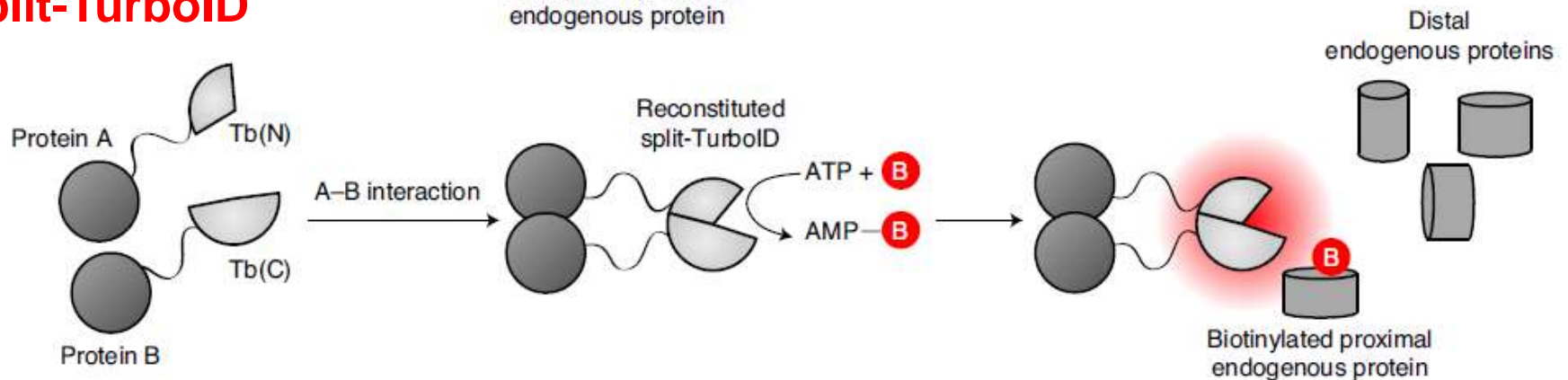
Jeden nebo dva fúzní proteiny

s rychlou kinetikou v řádu minut, nižší toxicita

TurboID



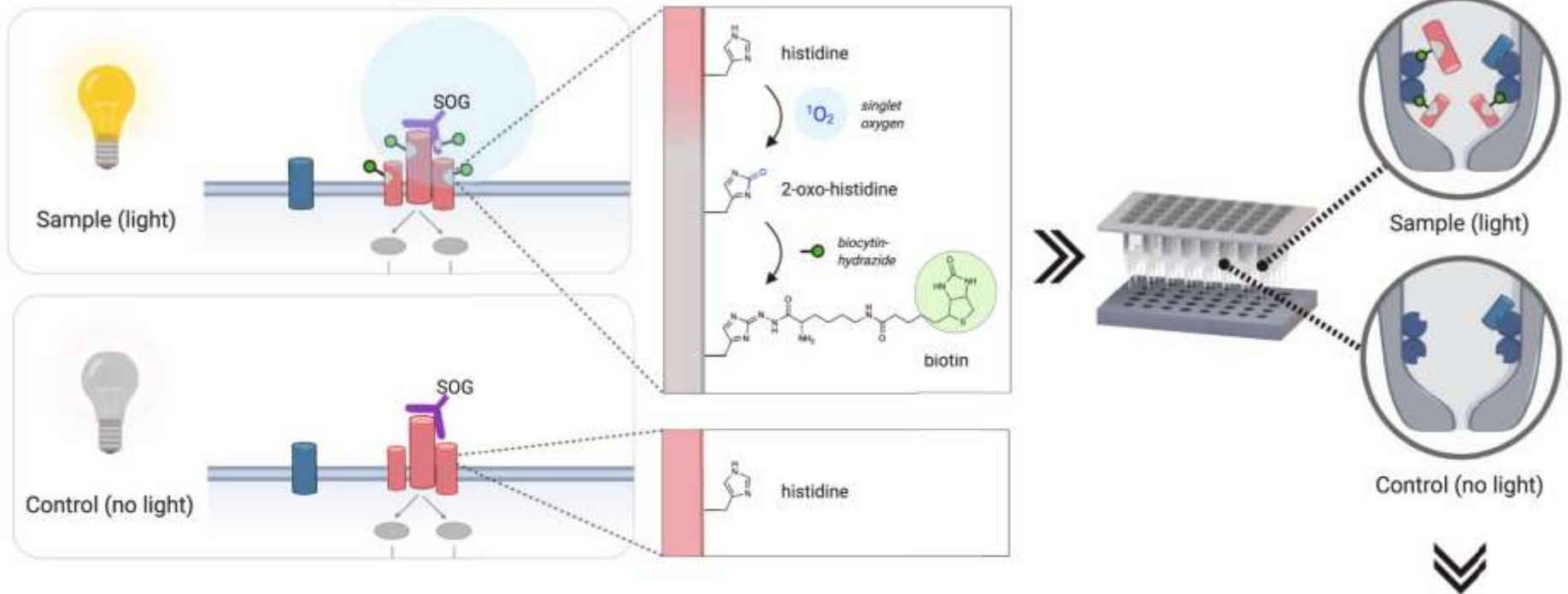
split-TurboID



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

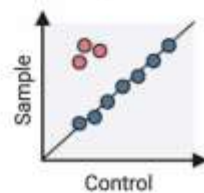
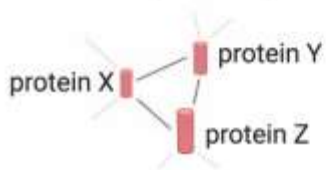


cell surface proximity network

relative quantification

DDA / DIA LC-MS/MS

release of proteolytic peptides



PROTEOMIKA 2024

**Zvláštní aplikace
izotopových metod**

Klinická proteomika

Biomarkery

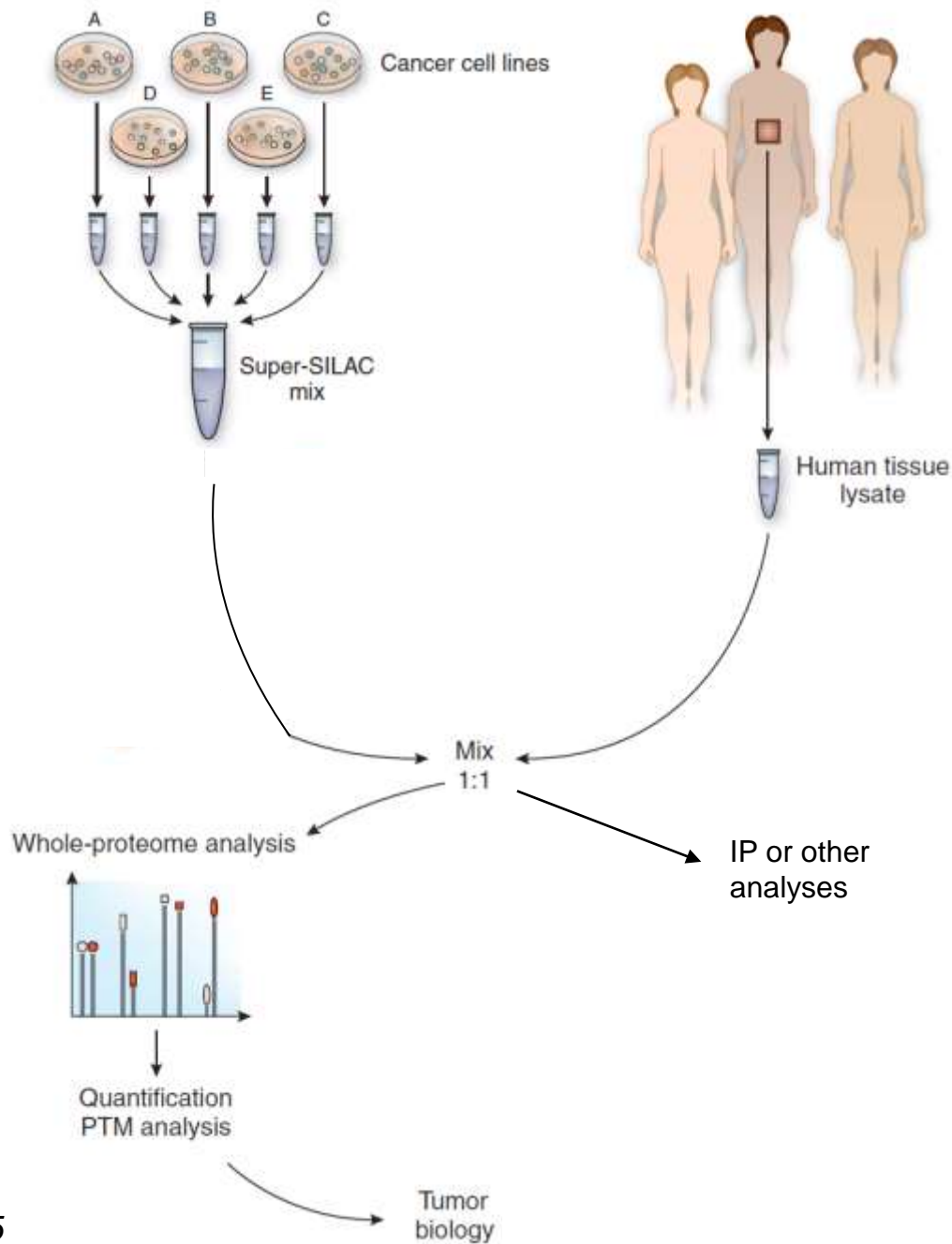
OLINK/SOMAScan

Speciální využití metod založených na inkorporaci stabilních izotopů

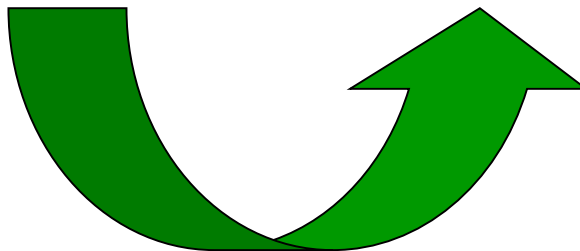
- Využití vzorku značeného SILAC jako srovnávacího standardu (**Super-SILAC**)
- Pulsed SILAC
- Pulse-chase SILAC
- Teplotní profilování (thermal profiling)

SUPER-SILAC

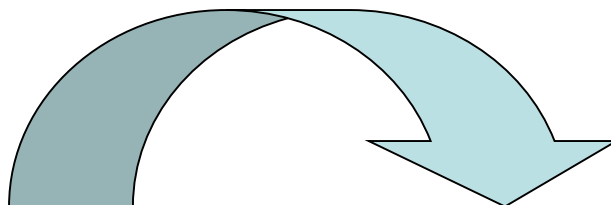
Expresní proteomika
pacientských nádorových
vzorků. Jako kontrolní
standard slouží
homogenát ze směsi
buněčných linií
odvozených ze stejného
typu nádoru naznačených
metabolicky „heavy“ Arg
a/nebo Lys.



Translace

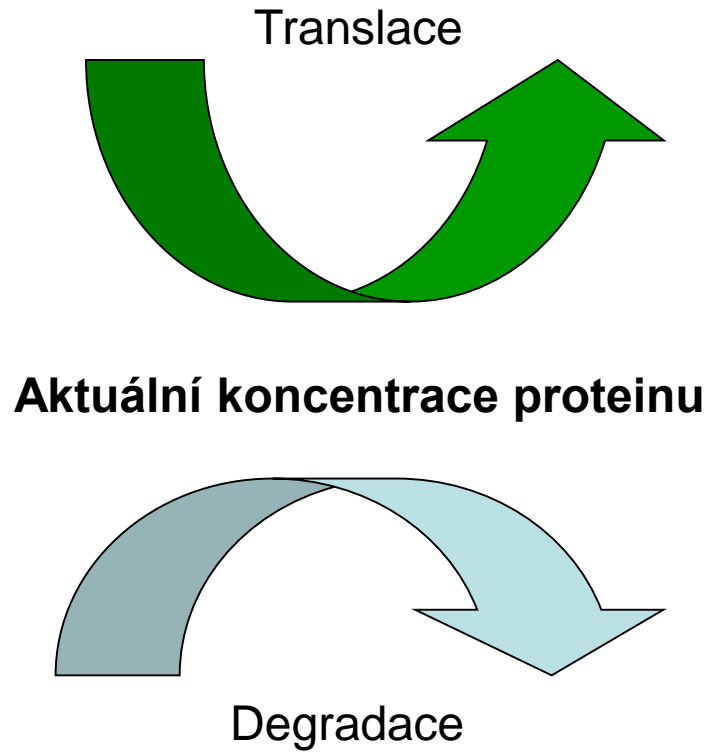


Aktuální koncentrace proteinu

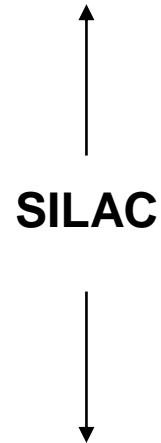


Degradace

Přibývá jedna izotopová značka



Pulsed SILAC
Pulse-chase SILAC

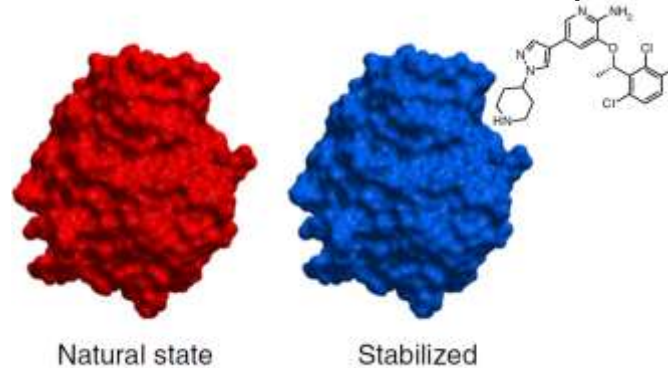


Pulse-chase SILAC

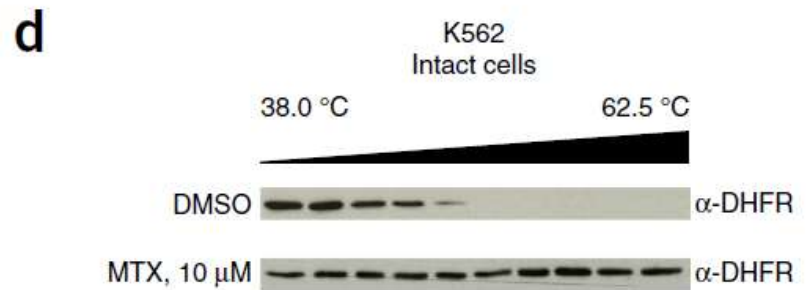
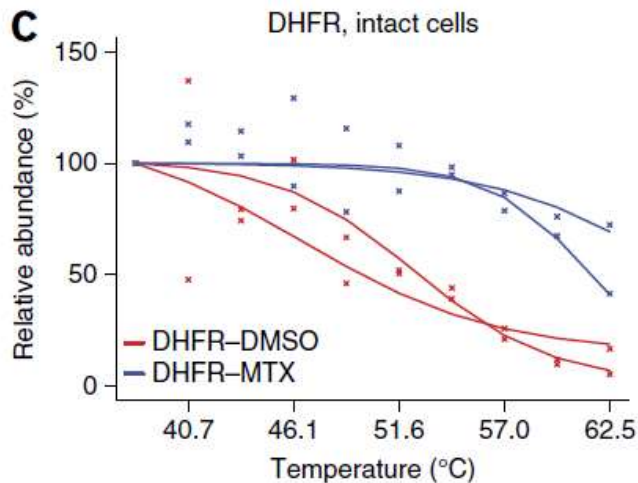
Ubývá druhá izotopová značka

THERMAL PROFILING

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



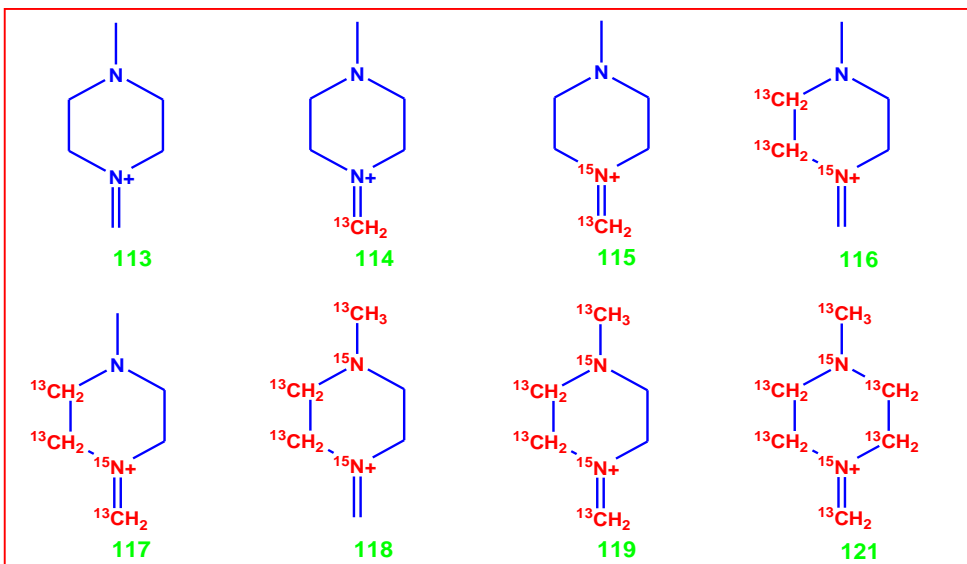
Lze monitorovat změnu teploty denaturace (teplota kdy dojde k precipitaci a „vypadnutí z roztoku“)



Detekce rozpustného proteinu v supernatantu

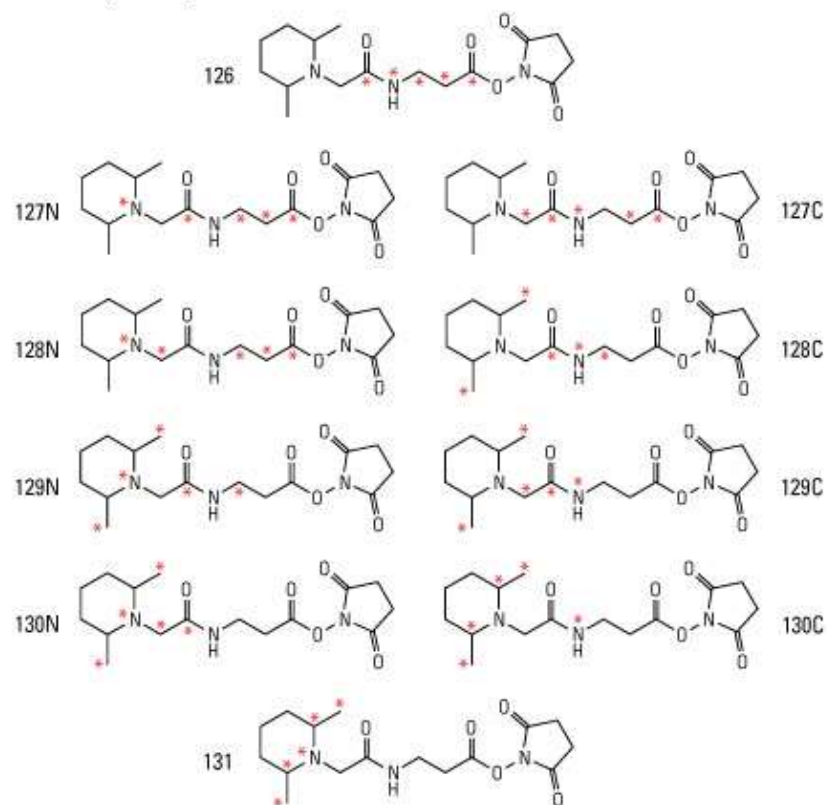
THERMAL PROFILING

iTRAQ 8plex Reagents

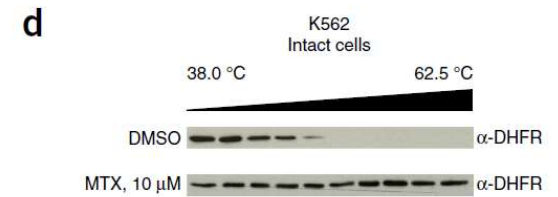
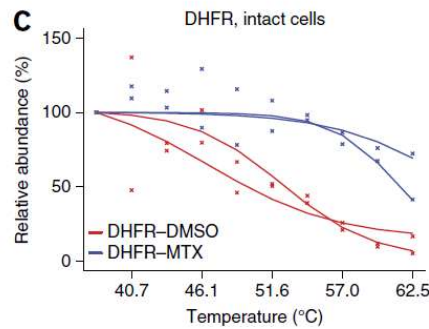
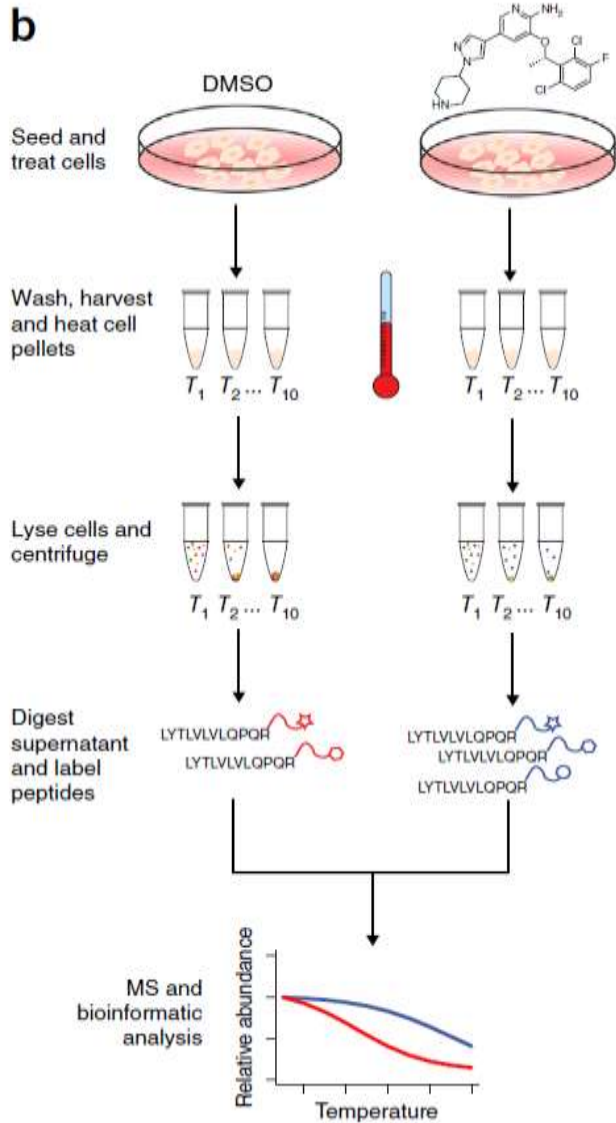


TMT 10 plex reagents

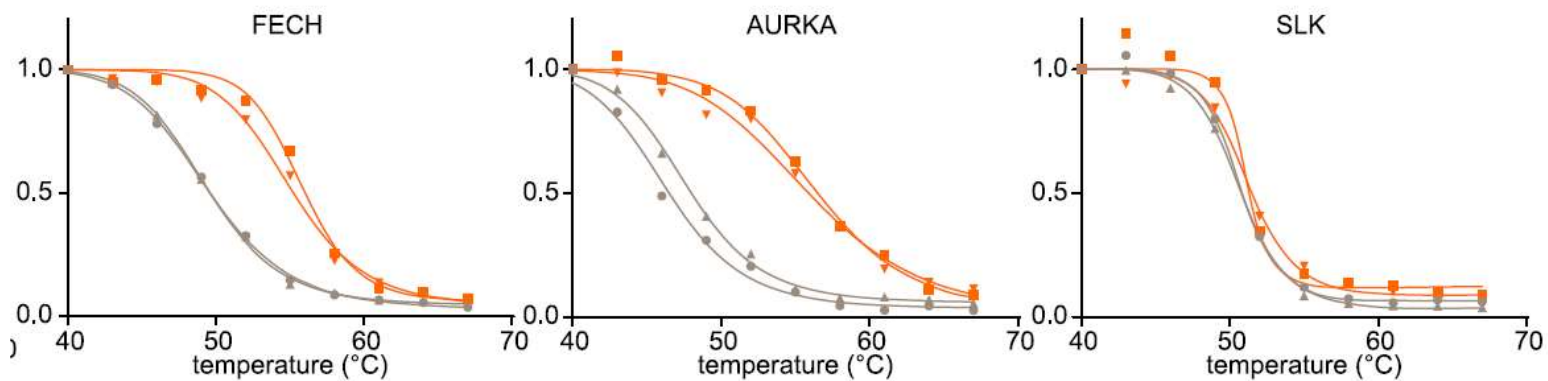
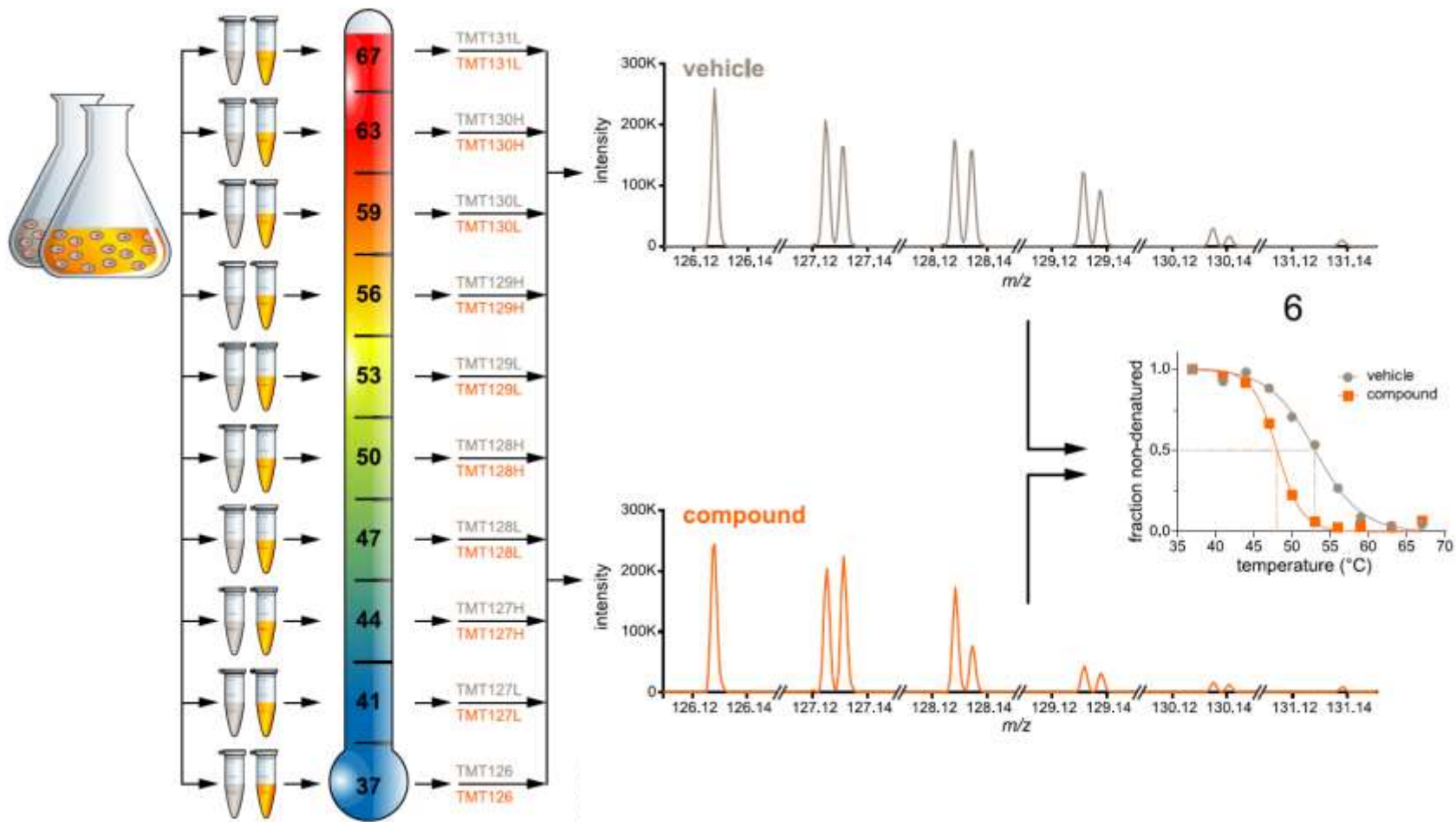
B. TMT10plex Reagents (TMT¹⁰)



THERMAL PROFILING



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



KLINICKÁ PROTEOMIKA

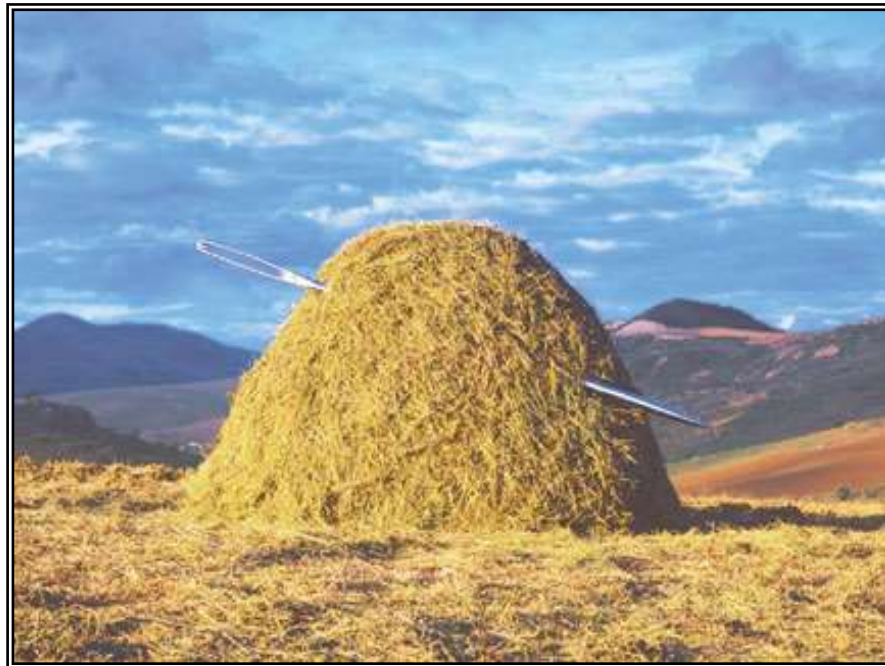
PLAZMA A SÉRUM a jiné tělní tekutiny



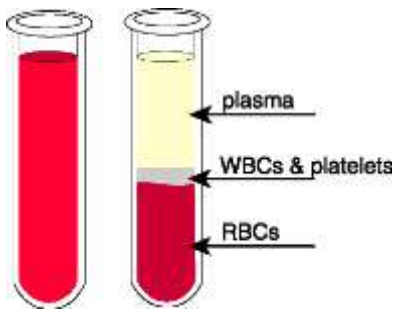
Co je to biomarker ?

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

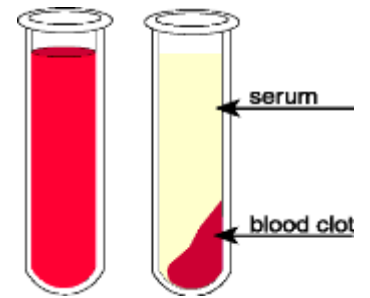
*Měl by být přístupný ve snadno získatelné
tkáni či tělní tekutině.*



Krevní plazma a sérum



60-80 g/L



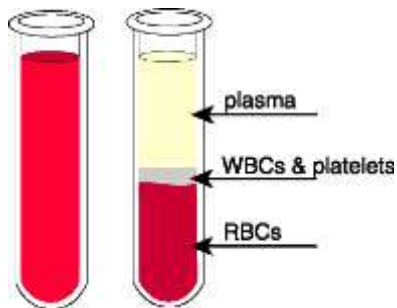
- Dosud spolehlivě identifikováno zhruba 8000 bílkovin

- Extrémní rozdíly v koncentracích (10 řádů)

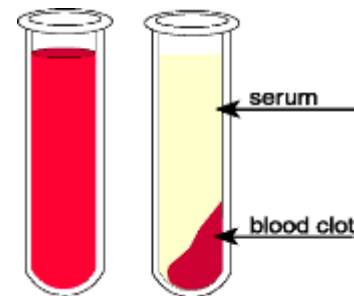
Albumin 50 000 000 000 pg/ml

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

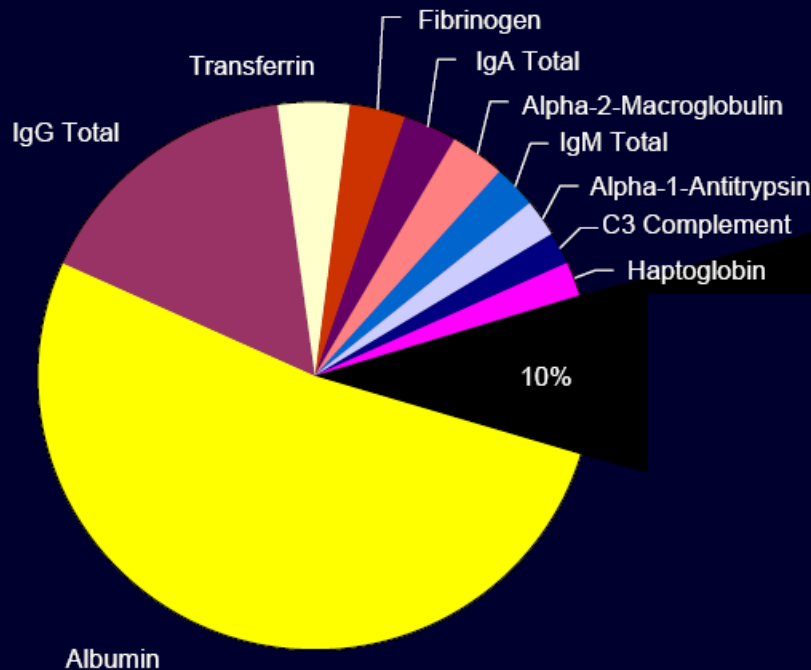
Interleukin 6 5 pg/ml

- **10 hlavních proteinů představuje cca 90% bílkoviny**

(Albumin, IgG, IgA, Tf, alpha-2 makroglobulin, haptoglobin...)

Major Plasma Proteins

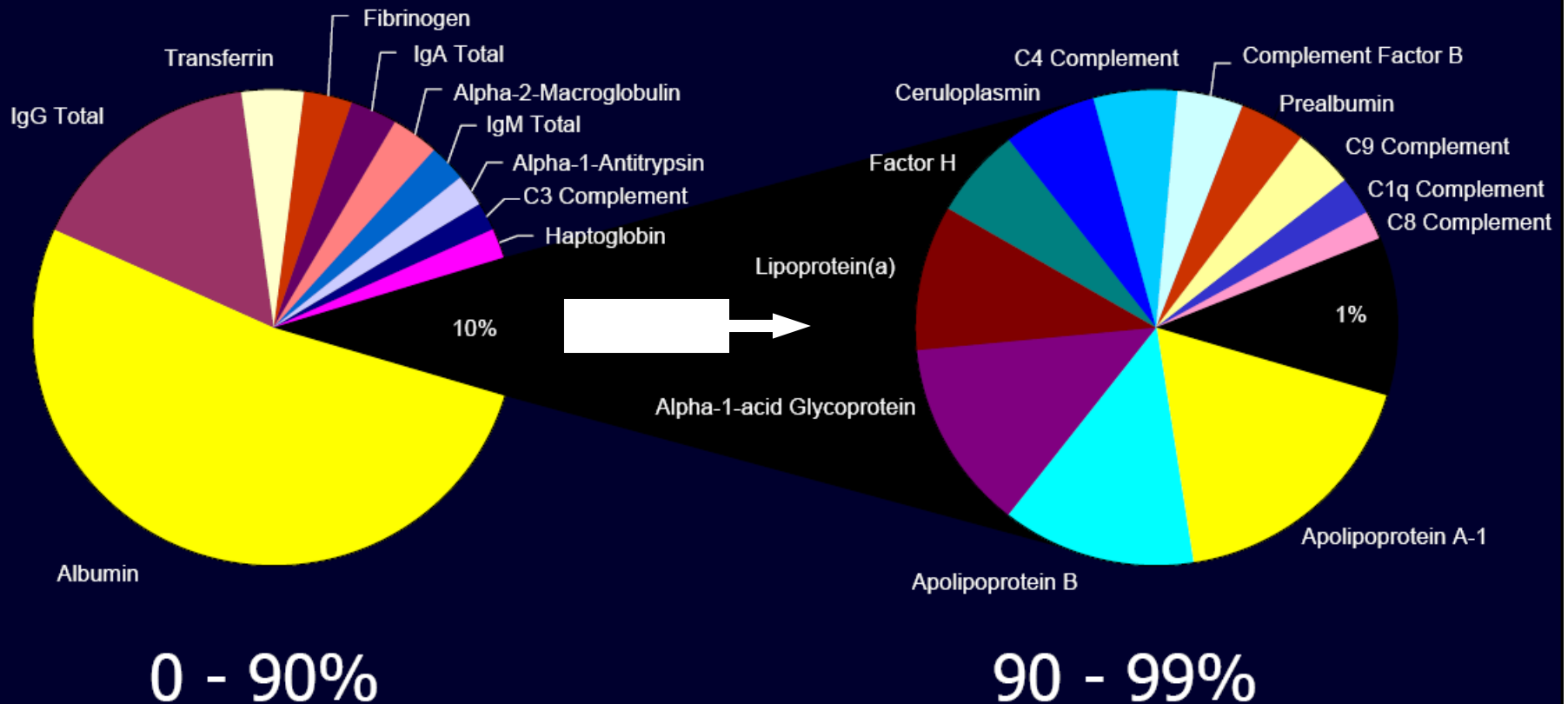
99% of plasma protein mass



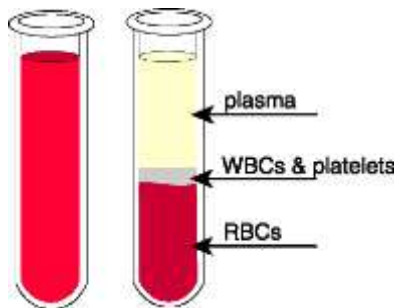
0 - 90%

Major Plasma Proteins

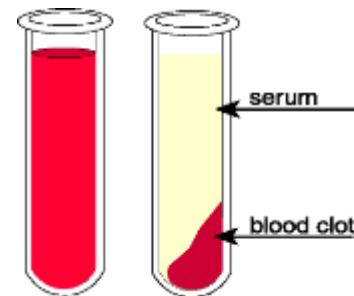
99% of plasma protein mass



Krevní plazma a sérum



60-80 g/L



- Dosud spolehlivě identifikováno zhruba 8000 bílkovin

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

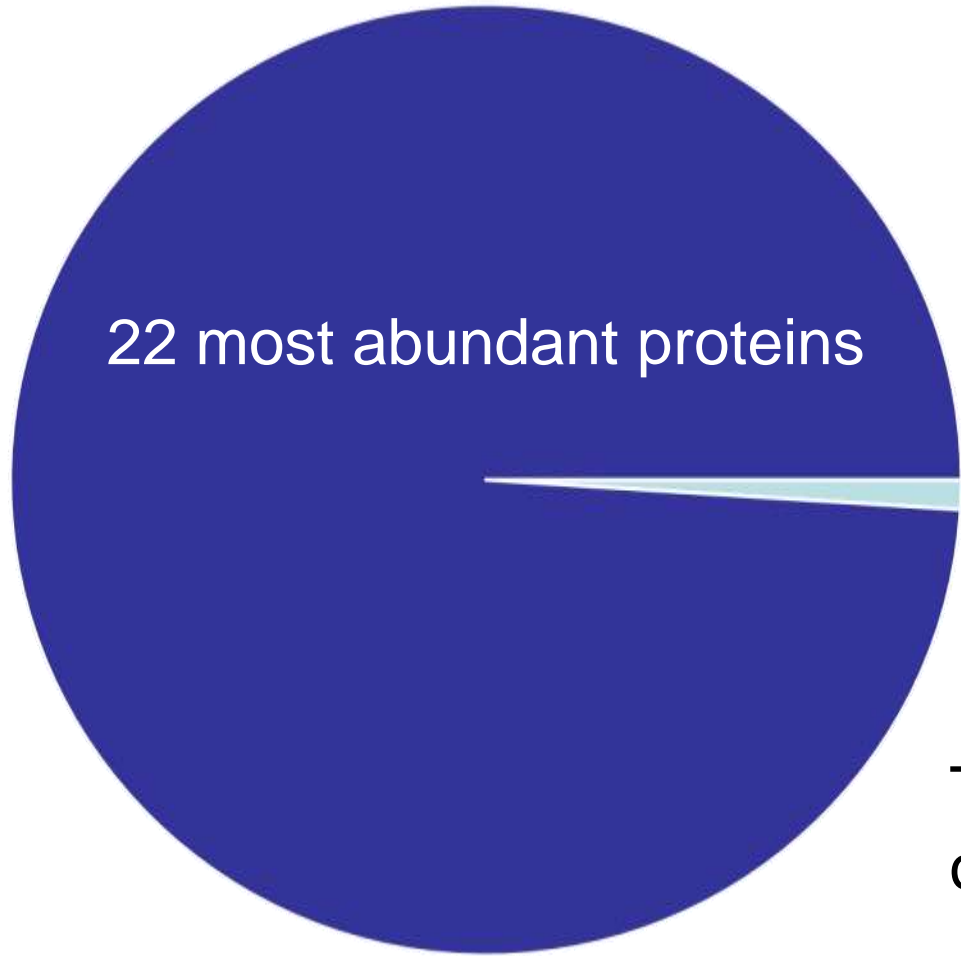
Albumin 50 000 000 000 pg/ml

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**



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

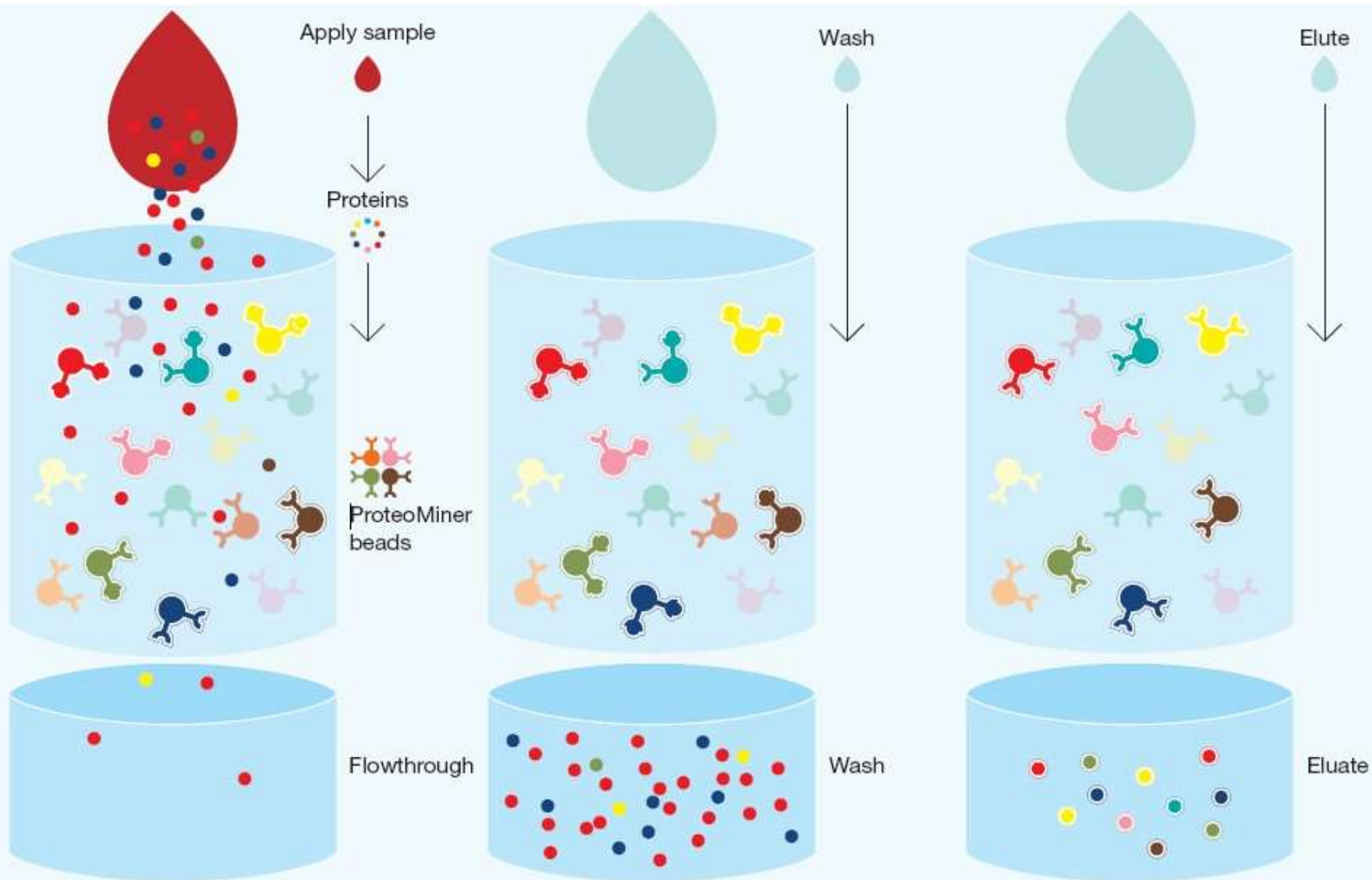
„ProteoMiner“

Při depleci jsou odstraňovány asociované proteiny a peptidy!

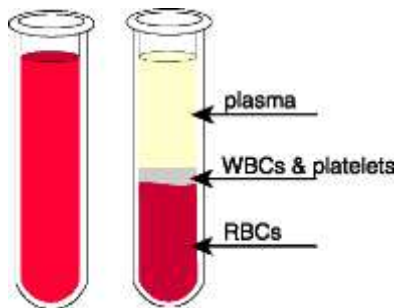
Cena!

Reproducibilita!

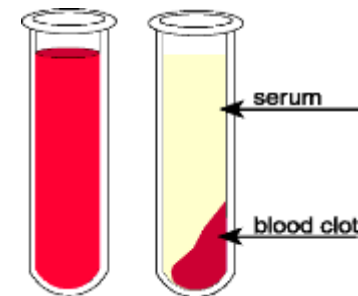
Knihovna náhodných hexapeptidů sloužících jako ligandy „ProteoMiner“



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)

Mozkomíšní 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



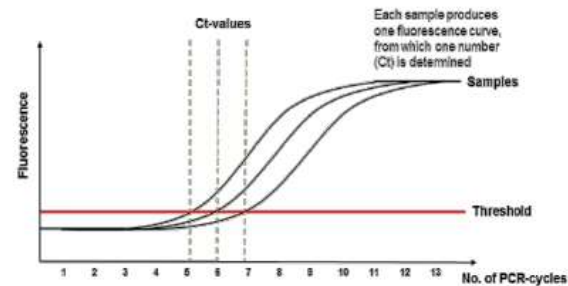
EXTENSION REACTION



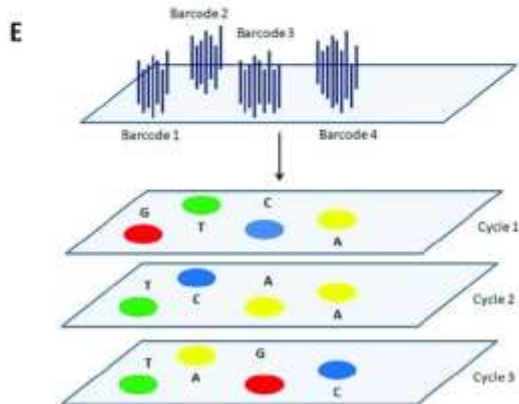
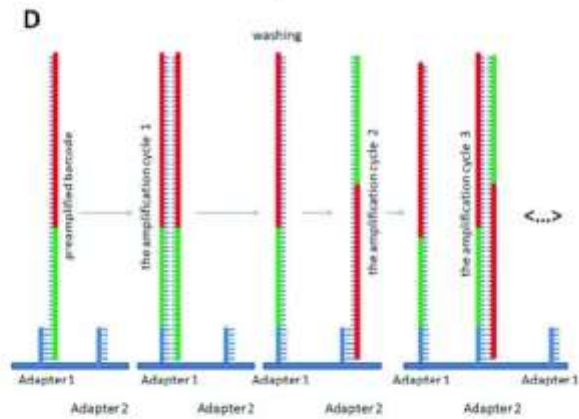
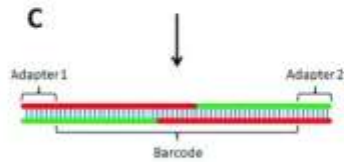
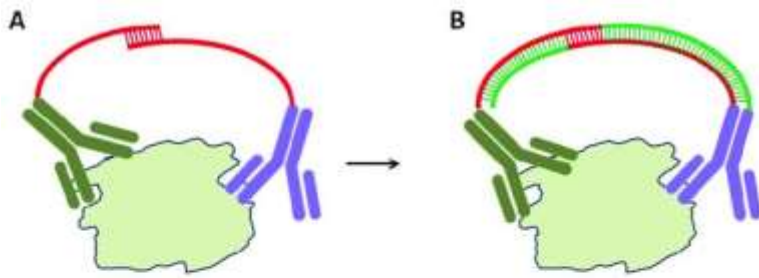
PRE-AMPLIFICATION



DETECTION



QC and GENERATION OF NPX



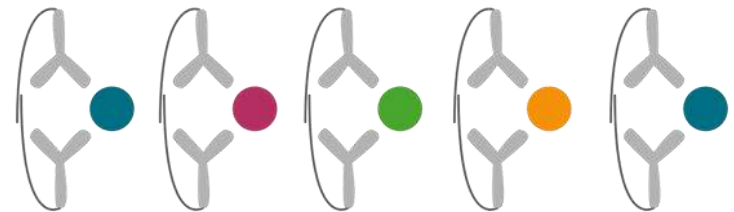
OLINK

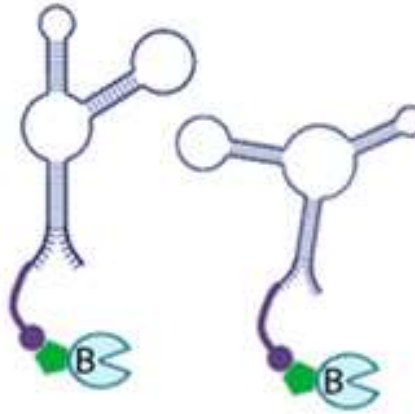
Proximity extension assay

Detekce PCR nebo NGS

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

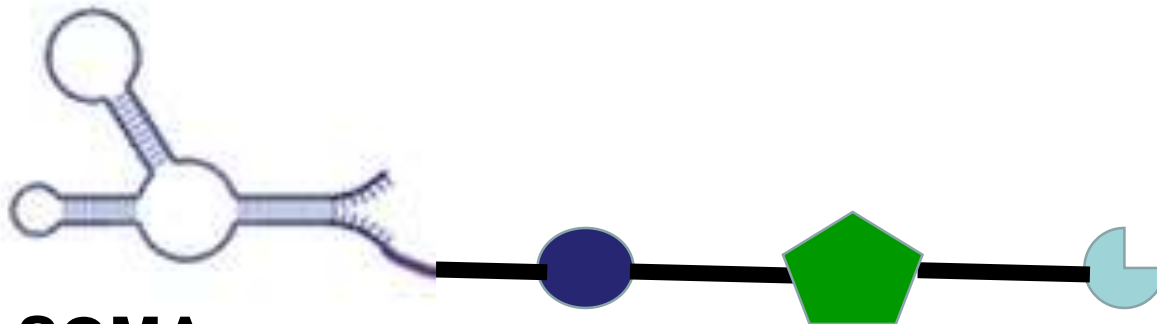
celkem 5400 proteinů





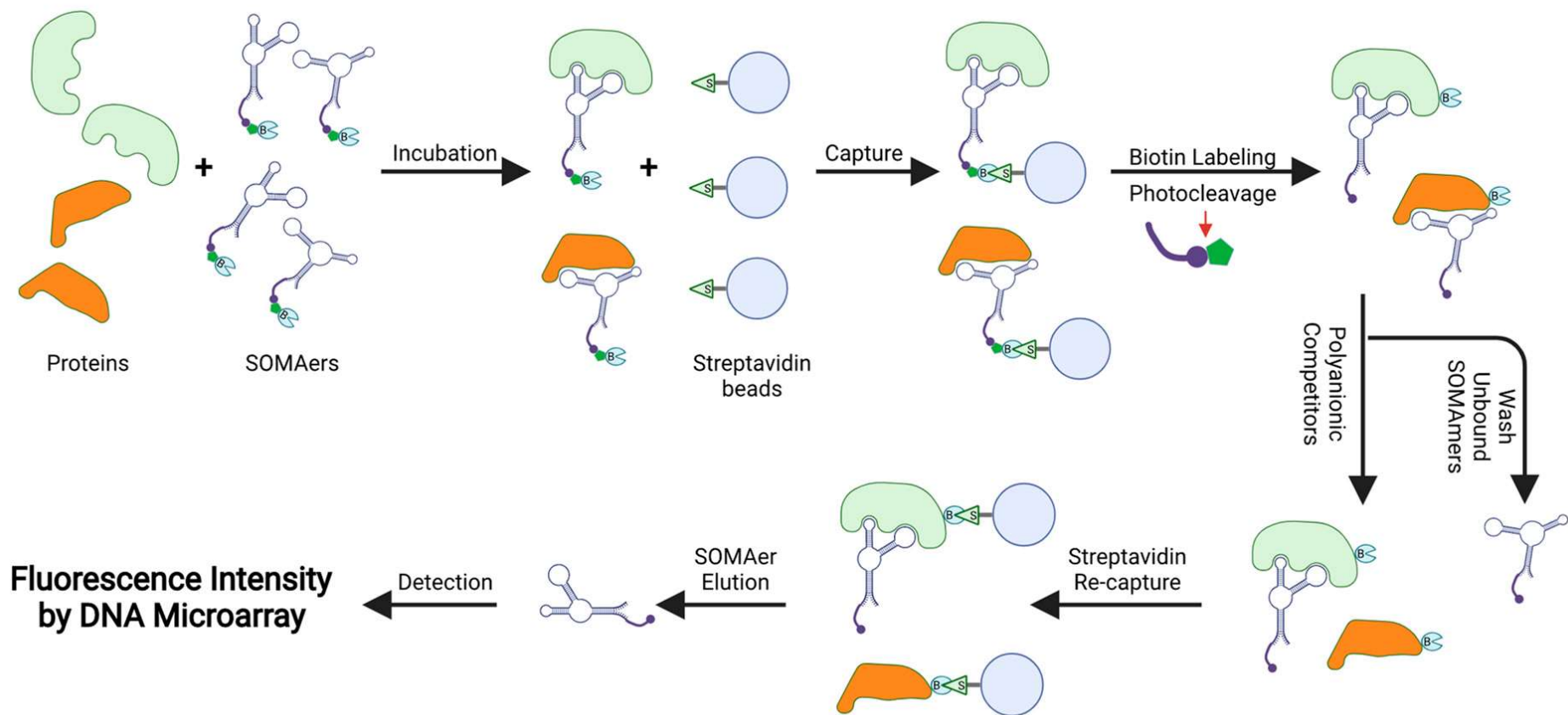
SOMAScan

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



SOMAmer

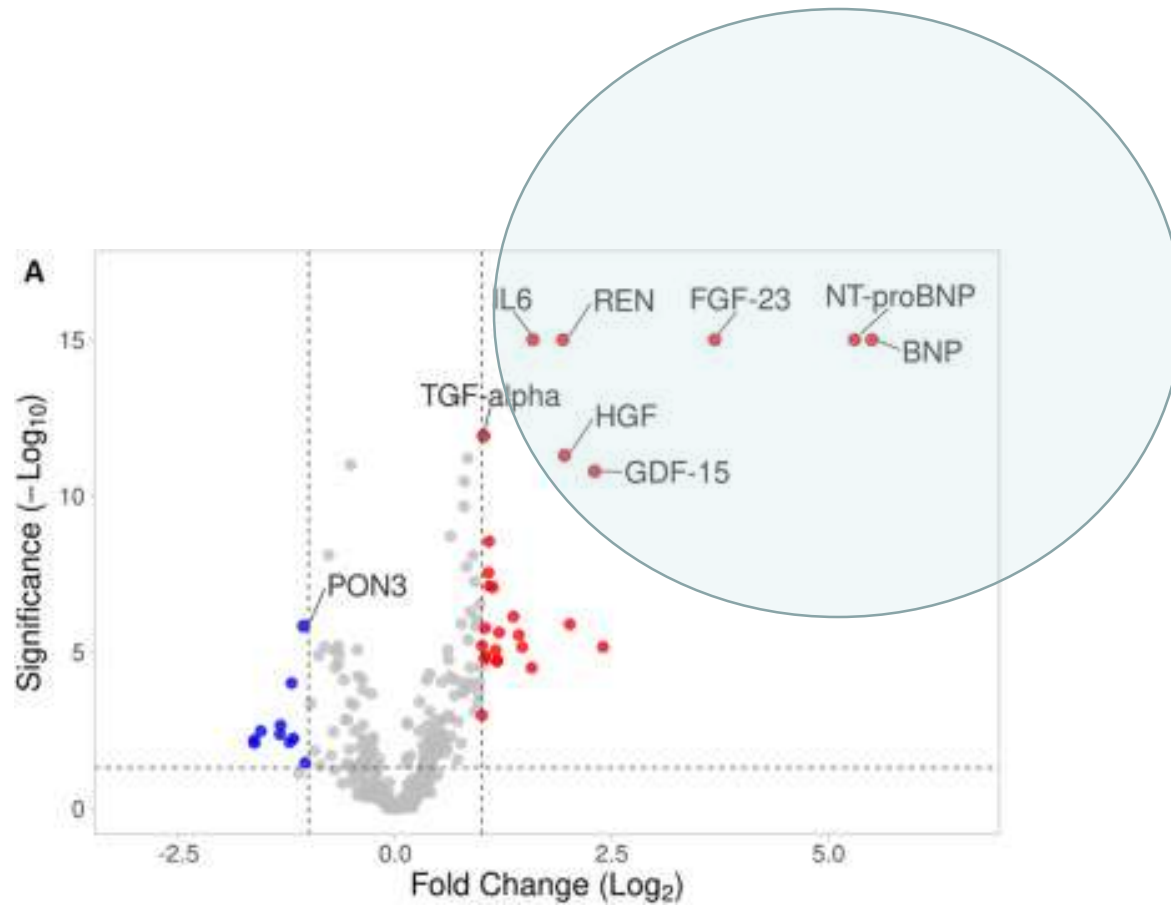
Aptamer-fluorofor-fotocleavage site-biotin



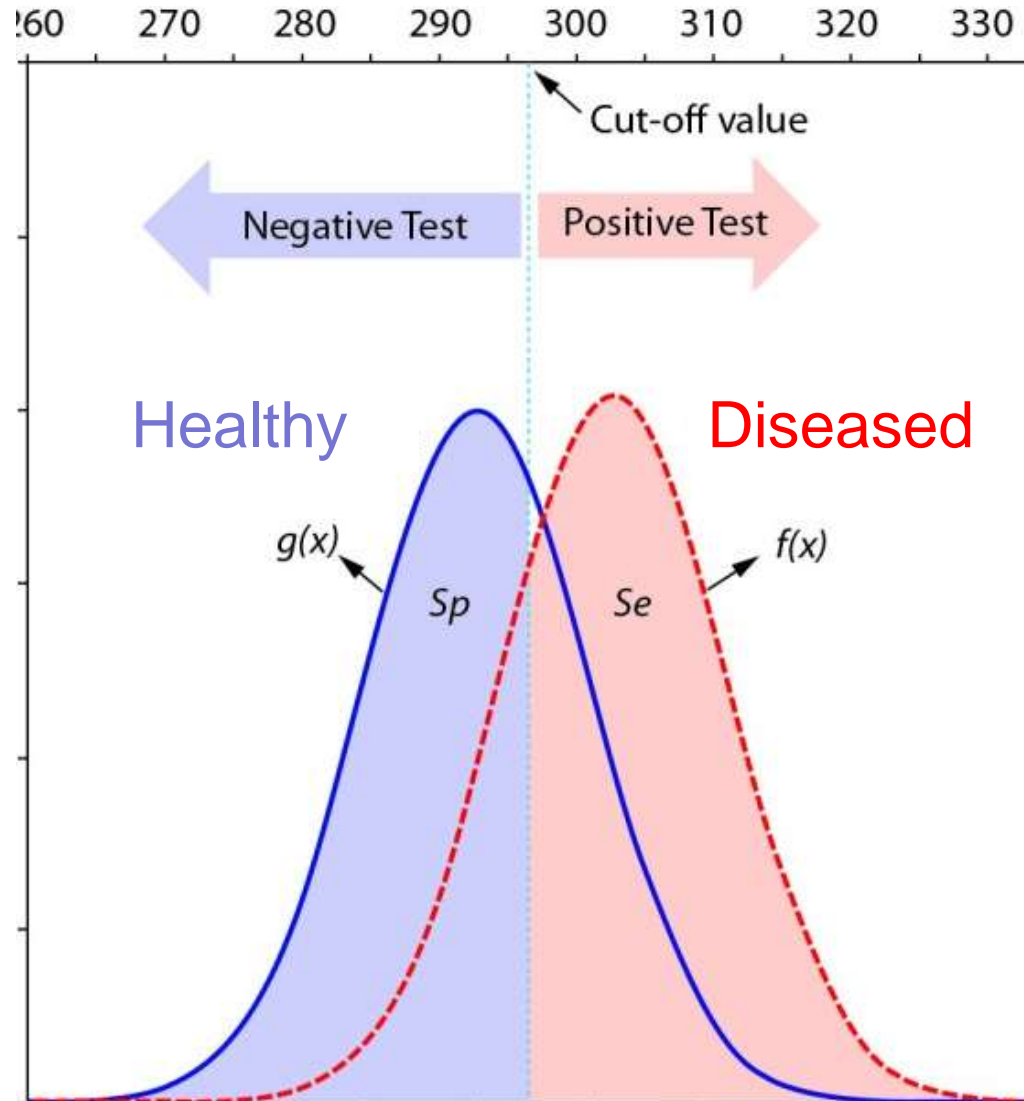
SOMAScan

1300 proteinů v jedné anályze
celkem až 7000 proteinů

Potenciální sérové markery identifikované OLINK



Protein XY concentration (ng/mL)



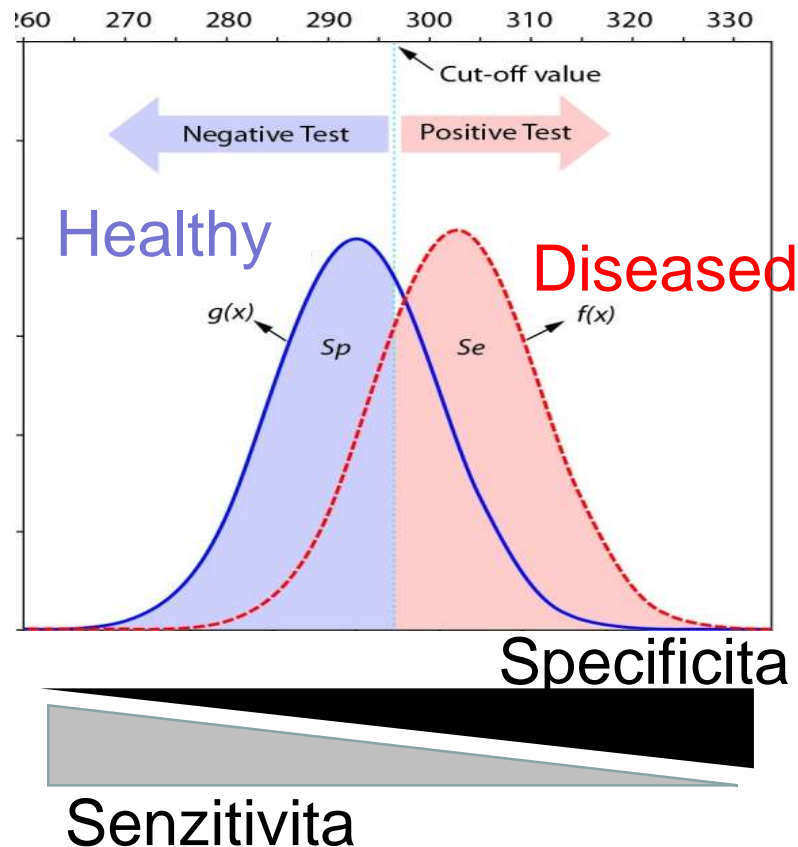
Senzitivita and Specificita biomarkeru

$$Sp = \frac{TN}{TN + FP}$$

Kolik procent ze
zdravých bude mít
negativní test?

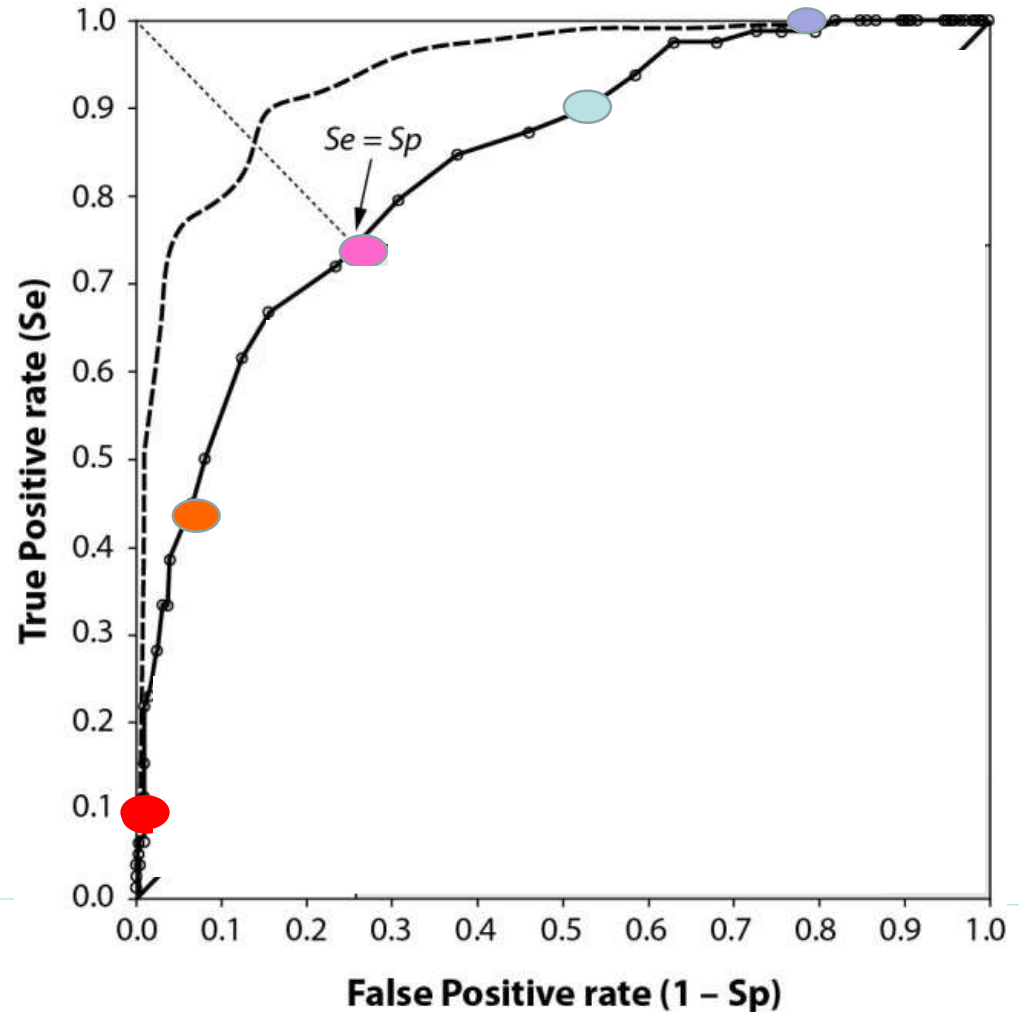
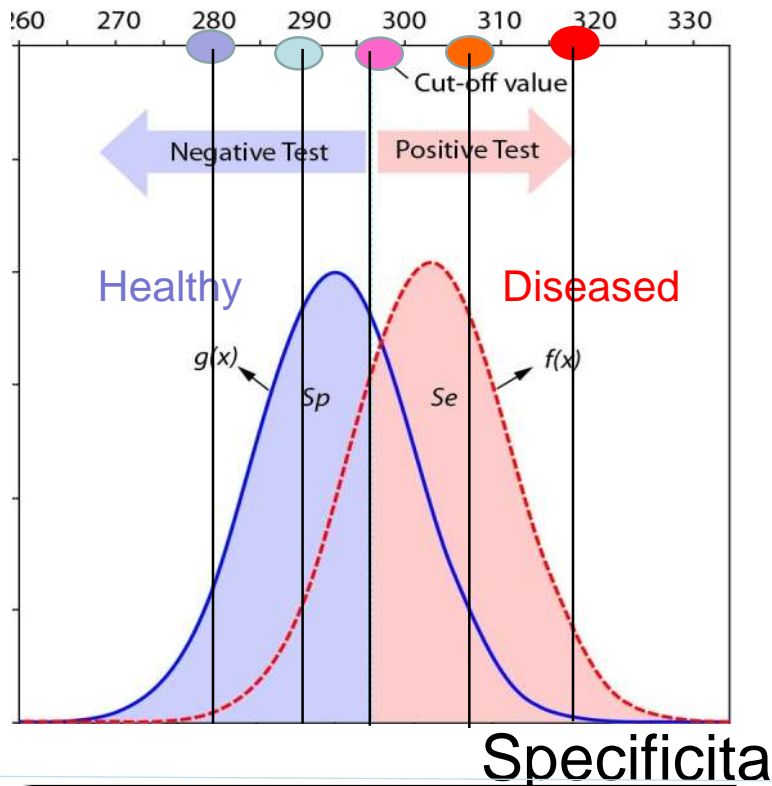
$$Se = \frac{TP}{TP + FN}$$

Kolik procent
nemocných
test zachytí ?



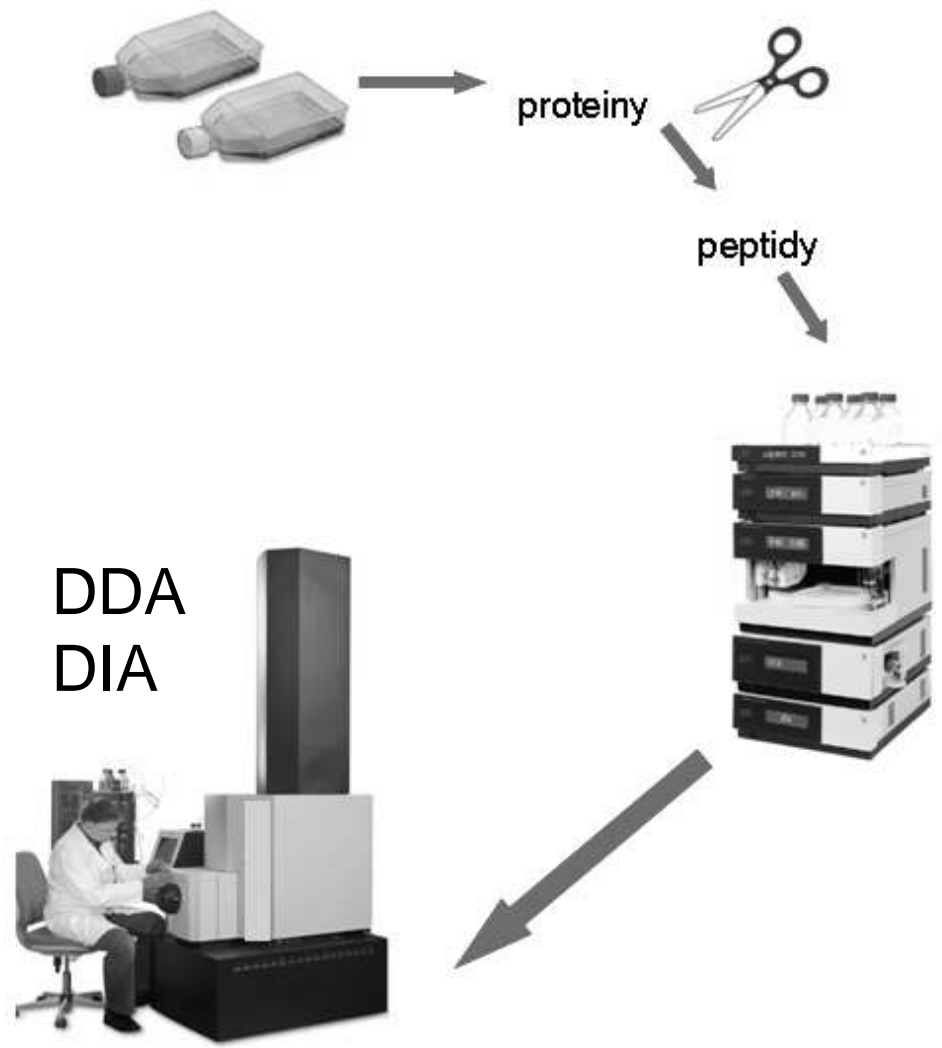
ROC curve of a biomarker

(Receiver Operating Characteristic)



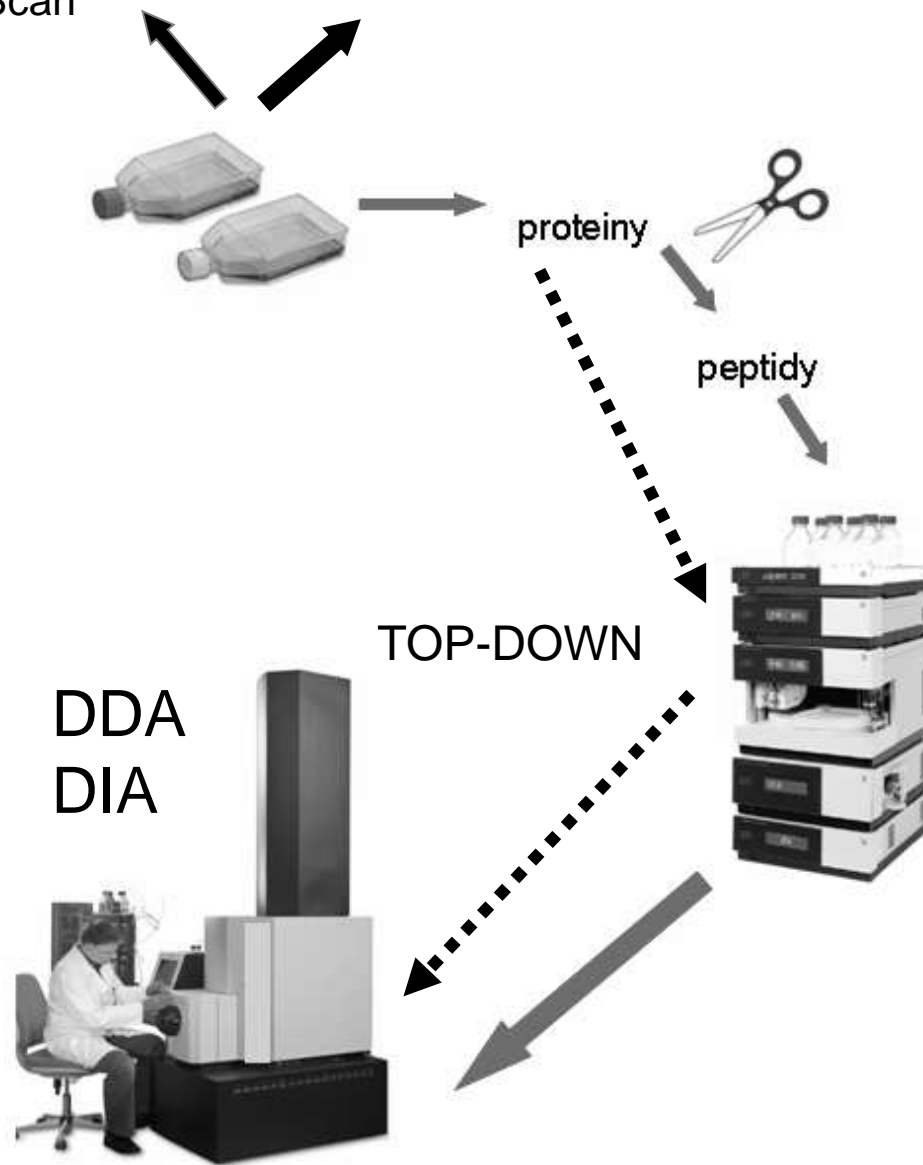
Sensitivita

Specificita



OLINK
SOMAScan

Cílené metody (MRM/SRM)



DDA
DIA

TOP-DOWN

IF 2023

Molecular and Cellular Proteomics (IF 6,1)

Journal of Proteome Research (IF 3.8)

Expert Reviews of Proteomics (IF 3,8)

Proteomics (IF 3,4)

Clinical Proteomics (IF 2,8)

Journal of Proteomics (IF 2,8)

BBA – Proteins and proteomics (IF 2,5)

Cancer Genomics & Proteomics (IF 2,5)

Protomics – Clinical Applications (IF 2,1)

Proteome Science (IF 2.1)

.....

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 připuštění 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.

Zkouška:

6. ledna 2025 9:00 B121

13. ledna 2025 9:00 B121

20. ledna 2025 9:00 B121

5. února 2025 **BIOCEV**