



Laboratoř funkční genomiky a proteomiky
Národní centrum pro výzkum biomolekul
Přírodovědecká fakulta MU
CEITEC-MU



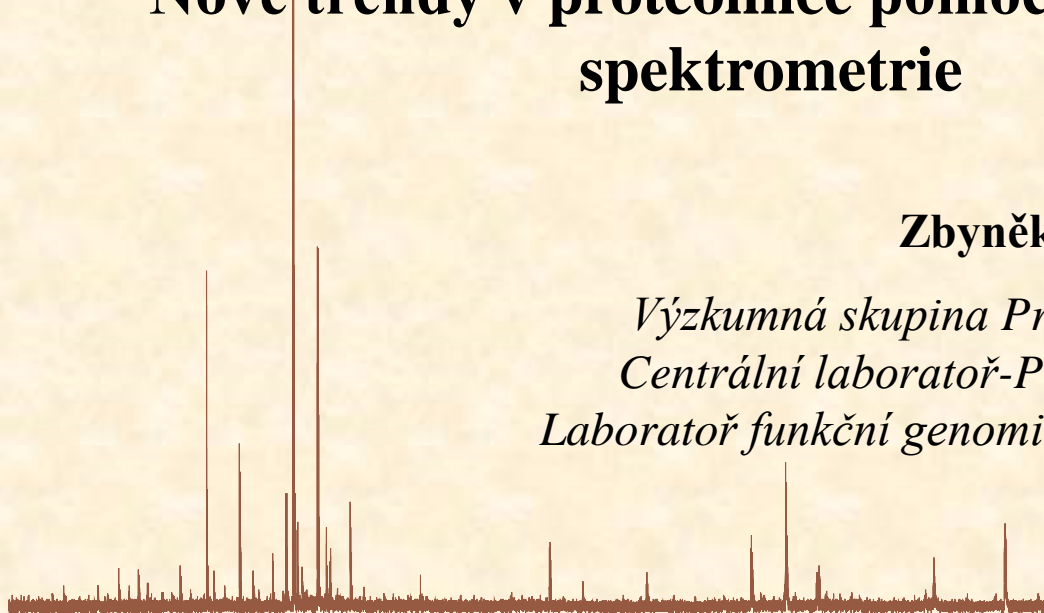
Nové trendy v proteomice pomocí hmotnostní spektrometrie

Zbyněk Zdráhal

Výzkumná skupina Proteomika, CEITEC-MU

Centrální laboratoř-Proteomika, CEITEC-MU

Laboratoř funkční genomiky a proteomiky, NCBR PŘF



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

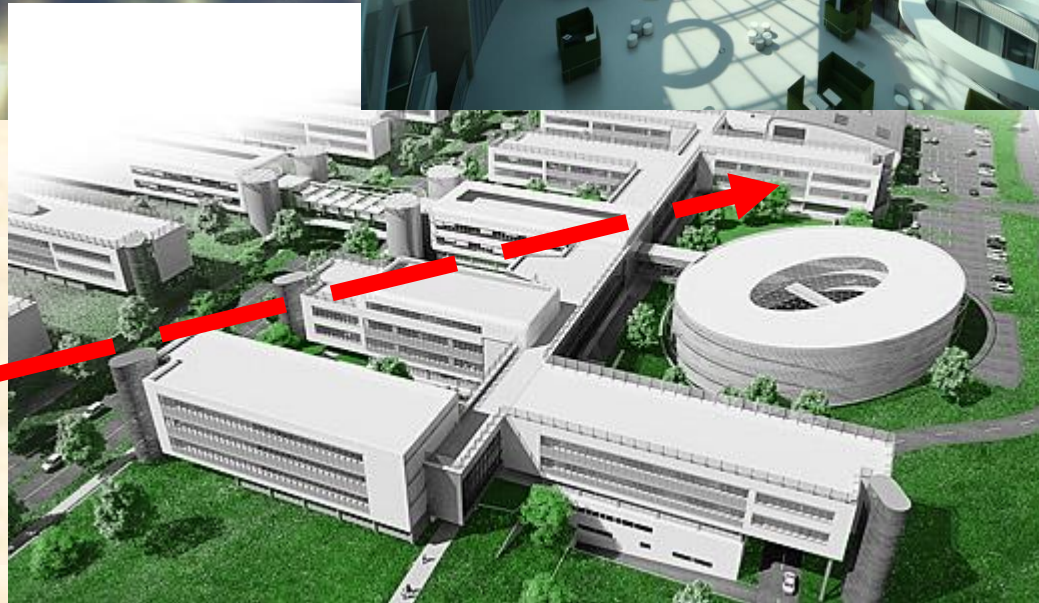


**NÁRODNÍ
PLÁN OBNOVY**



NPO_MUNI_MSMT-16606/2022

CEITEC, Masarykova univerzita



CL a VS Proteomika

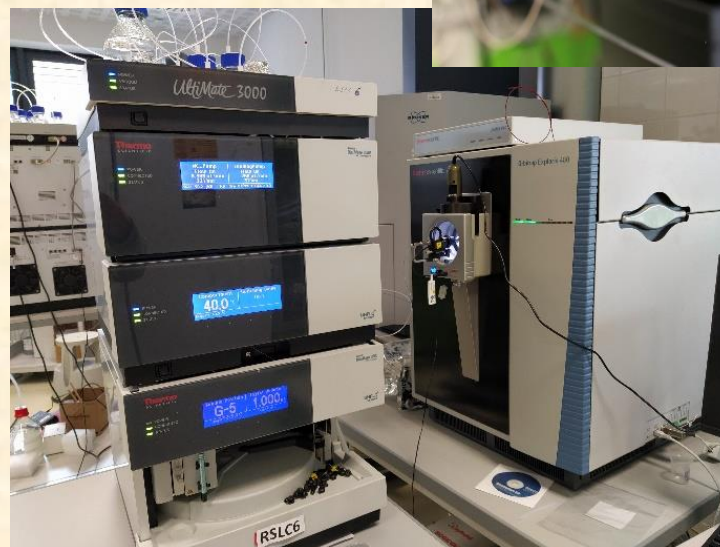
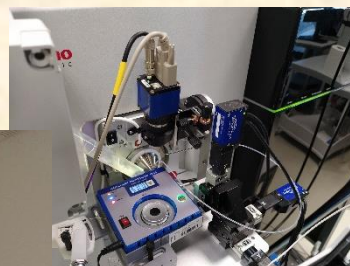


UKB, pavilon E26, 1.NP, místnost 108

Phone: 54949 8258

E-mail: zdrahal@sci.muni.cz

zbynek.zdrahal@ceitec.muni.cz



CL a VS Proteomika



- bakalářské práce
- diplomové práce
- PhD studium

metodika proteomické analýzy (PTMs)

Applicability of Phenylhydrazine Labeling for Structural Studies of Fucosylated *N*-Glycans

Erika Lattová,^{*,†} Jana Skříčková,[‡] and Zbyněk Zdráhal^{†,§}

MCP TECHNOLOGICAL INNOVATION AND RESOURCES

Trimethylacetic Anhydride–Based Derivatization Facilitates Quantification of Histone Marks at the MS1 Level

Authors

Hana Kuchaříková, Pavlína Dobrovolná, Gabriela Lochmanová, and Zbyněk Zdráhal

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09601-7>

OPEN

Dishevelled-3 conformation dynamics analyzed by FRET-based biosensors reveals a key role of casein kinase 1

Jakub Hamoš^{1,†}, María Consuelo Alonso Cañizal^{2,3,4}, Miroslav Jurásek^{5,6}, Jitender Kumar⁵, Cornelia Holler^{7,8}, Alexandra Schambony^{7,8}, Kateřina Hanšková^{5,6}, Ondřej Bernatík¹, Zbyněk Zdráhal^{5,6}, Kristína Gömöryová¹, Tomáš Gybeř¹, Tomasz Witold Radaszkiewicz¹, Marek Kravec¹, Lukáš Trantírek^{5,9}, Jan Rynes⁵, Zankruti Dave¹, Ana Iris Fernández-Llamazares¹⁰, Robert Vácha^{5,6}, Konstantinos Tripsianes⁵, Carsten Hoffmann^{2,3,4} & Vítězslav Bryja^{1,9}

Hafidh et al. *Genome Biology* (2016) 17:81
DOI 10.1186/s13059-016-0928-x

Genome Biology

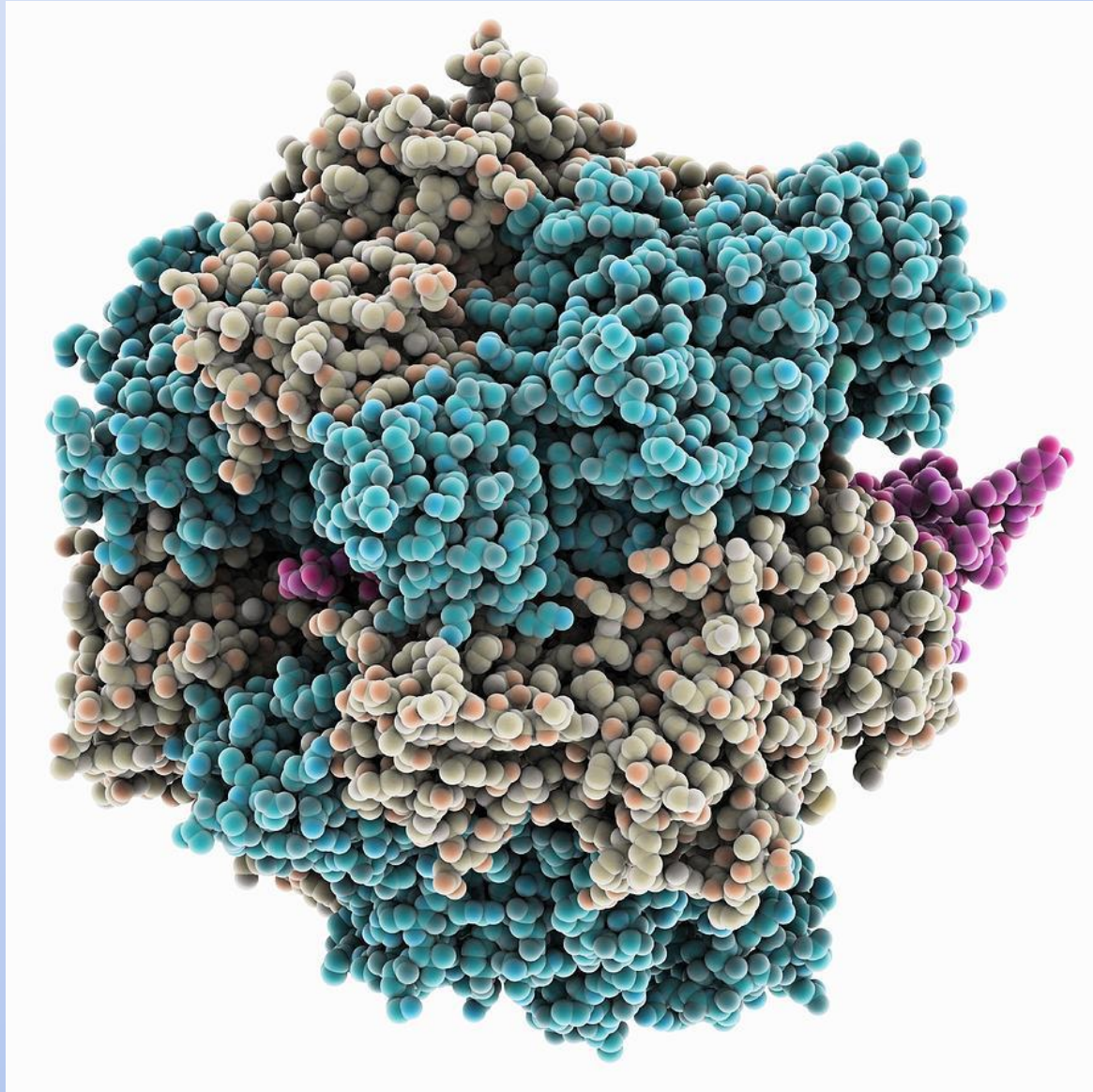
RESEARCH

Open Access



Quantitative proteomics of the tobacco pollen tube secretome identifies novel pollen tube guidance proteins important for fertilization

Said Hafidh[†], David Potěšil^{2,3}, Jan Fila¹, Věra Čapková^{1†}, Zbyněk Zdráhal^{2,3} and David Honys^{1†}



Proteiny jsou základem života

Proteins are responsible for both the structure and the functions of all living organisms.

Genes are simply the instructions for making proteins.

IT IS PROTEINS THAT MAKE LIFE.

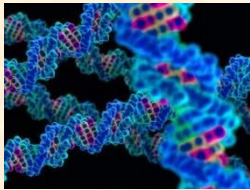
Funkce proteinů

- **Strukturní/stavební** proteiny – kolagen, elastin, keratin
- **Pohybová** funkce – myosin, aktin
- **Transportní** proteiny – hemoglobin, myoglobin, membránové přenašeče
- **Regulační** funkce – hormony (insulin), transkripční faktory
- **Katalytická** – enzymy (proteázy, kinázy, fosfatázy)
- **Obranná** funkce – protilátky (imunoglobuliny)
- **Zásobní** proteiny – ferritin, ovalbumin, kasein

Syntéza proteinů

co se může stát

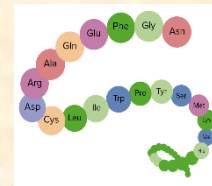
co se děje



DNA



mRNA



protein



funkční protein

transkripce
posttranskripční úpravy
(alternativní sestřih aj.)

translace

Posttranslační úpravy
posttranslační modifikace
(fosforylace, glykosylace aj.)

Proteinové komplexy

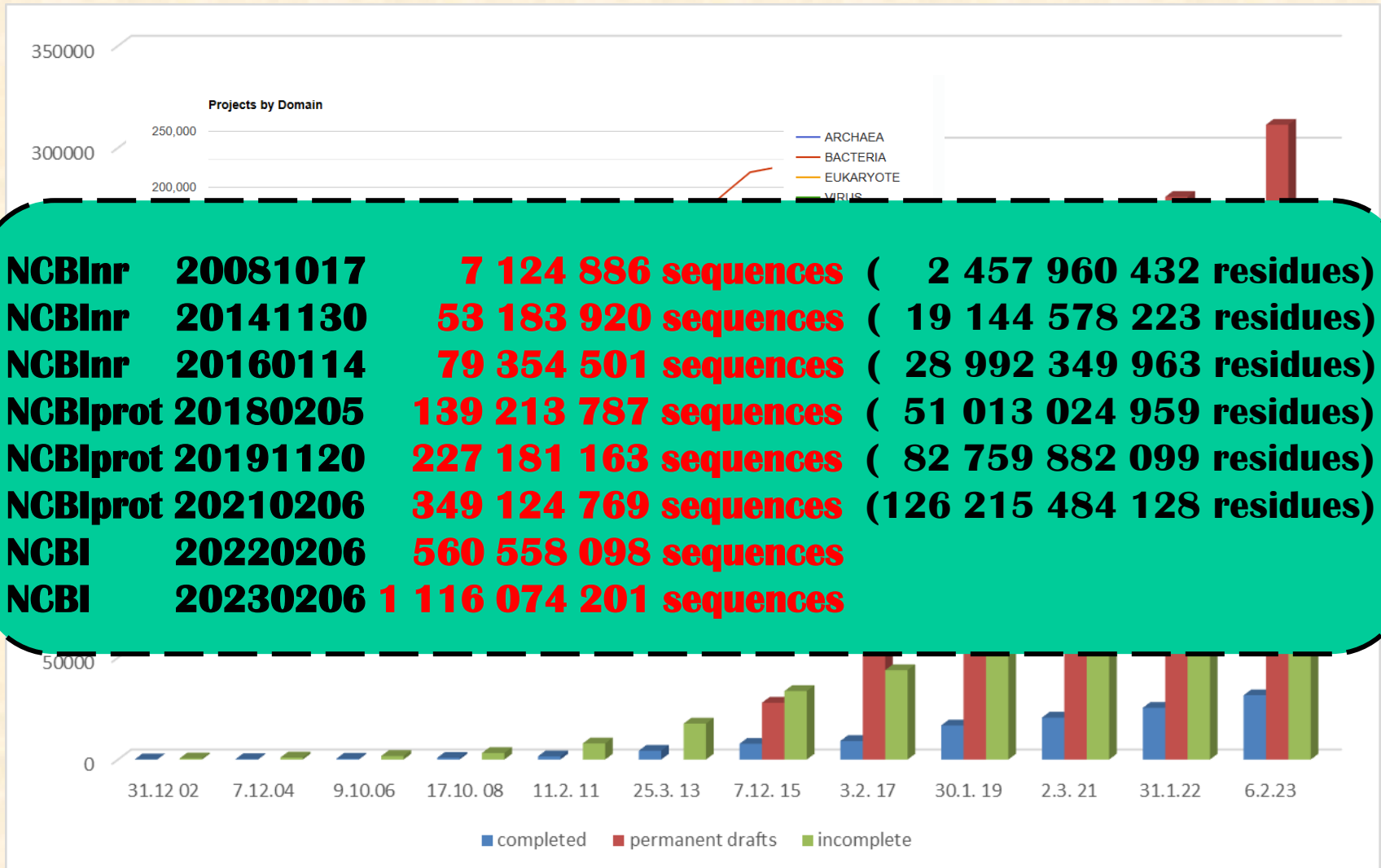
Syntéza proteinů - translace

Nobel Prize in Physiology or Medicine 1968 - R. W. Holley, H. G. Khorana, M. W. Nirenberg

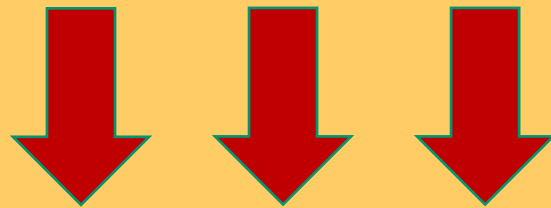
		The Standard Genetic Code			
		U	C	A	G
U	UUU → Phe F	UCU → Ser S	UAU → Tyr Y	UGU → Cys C	U
	UUC → Phe F	UCC → Ser S	UAC → Tyr Y	UGC → Cys C	C
	UUA → Leu L	UCA → Ser S	UAA → Stop	UGA → Stop	A
	UUG → Leu L	UCG → Ser S	UAG → Stop	UGG → Trp W	G
C	CUU → Leu L	CCU → Pro P	CAU → His H	CGU → Arg R	U
	CUC → Leu L	CCC → Pro P	CAC → His H	CGC → Arg R	C
	CUA → Leu L	CCA → Pro P	CAA → Gln Q	CGA → Arg R	A
	CUG → Leu L	CCG → Pro P	CAG → Gln Q	CGG → Arg R	G
A	AUU → Ile I	ACU → Thr T	AAU → Asn N	AGU → Ser S	U
	AUC → Ile I	ACC → Thr T	AAC → Asn N	AGC → Ser S	C
	AUA → Ile I	ACA → Thr T	AAA → Lys K	AGA → Arg R	A
	AUG → Met M	ACG → Thr T	AAG → Lys K	AGG → Arg R	G
G	GUU → Val V	GCU → Ala A	GAU → Asp D	GGU → Gly G	U
	GUC → Val V	GCC → Ala A	GAC → Asp D	GGC → Gly G	C
	GUA → Val V	GCA → Ala A	GAA → Glu E	GGA → Gly G	A
	GUG → Val V	GCG → Ala A	GAG → Glu E	GGG → Gly G	G

 translation start codon	 hydrophobic amino acids	 negatively charged amino acids	 cysteine
 translation stop codon	 hydrophilic non-charged amino acids	 positively charged amino acids	

Nárůst znalosti genomů



- z každého genu může vzniknout několik proteinů, resp. jejich forem, které nelze indikovat na základě analýzy DNA resp. mRNA
- neexistuje přímá korelace mezi obsahem mRNA a výsledným obsahem proteinů
- funkční význam proteinu závisí velmi často na jeho interakci s jinými proteiny či DNA/RNA
- na úrovni proteinů lze zachytit epigenetické faktory regulace exprese genu



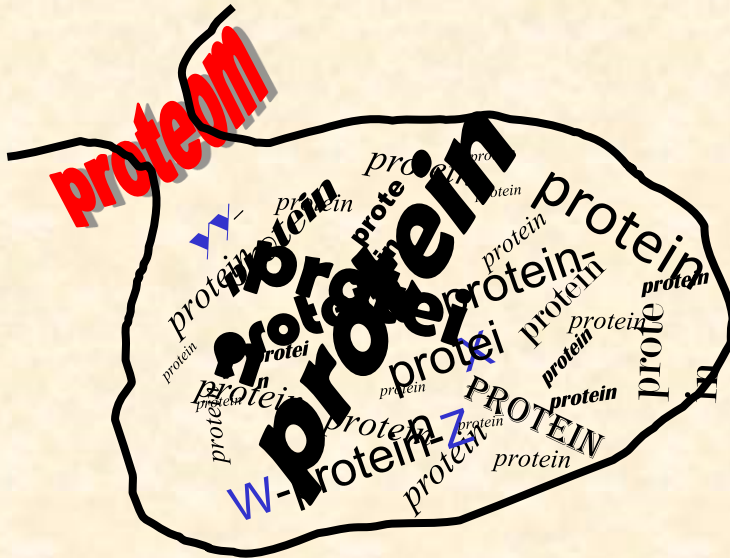
Nutnost studia buněčných procesů na úrovni proteinů

Proteom

soubor všech proteinů produkovaných v buňce, tkáni nebo organismu

the word “proteome” is derived from **PROTE**ins expressed by a gen**OME**, and it refers to **all the proteins produced by an organism**

Marc Wilkins in 1994

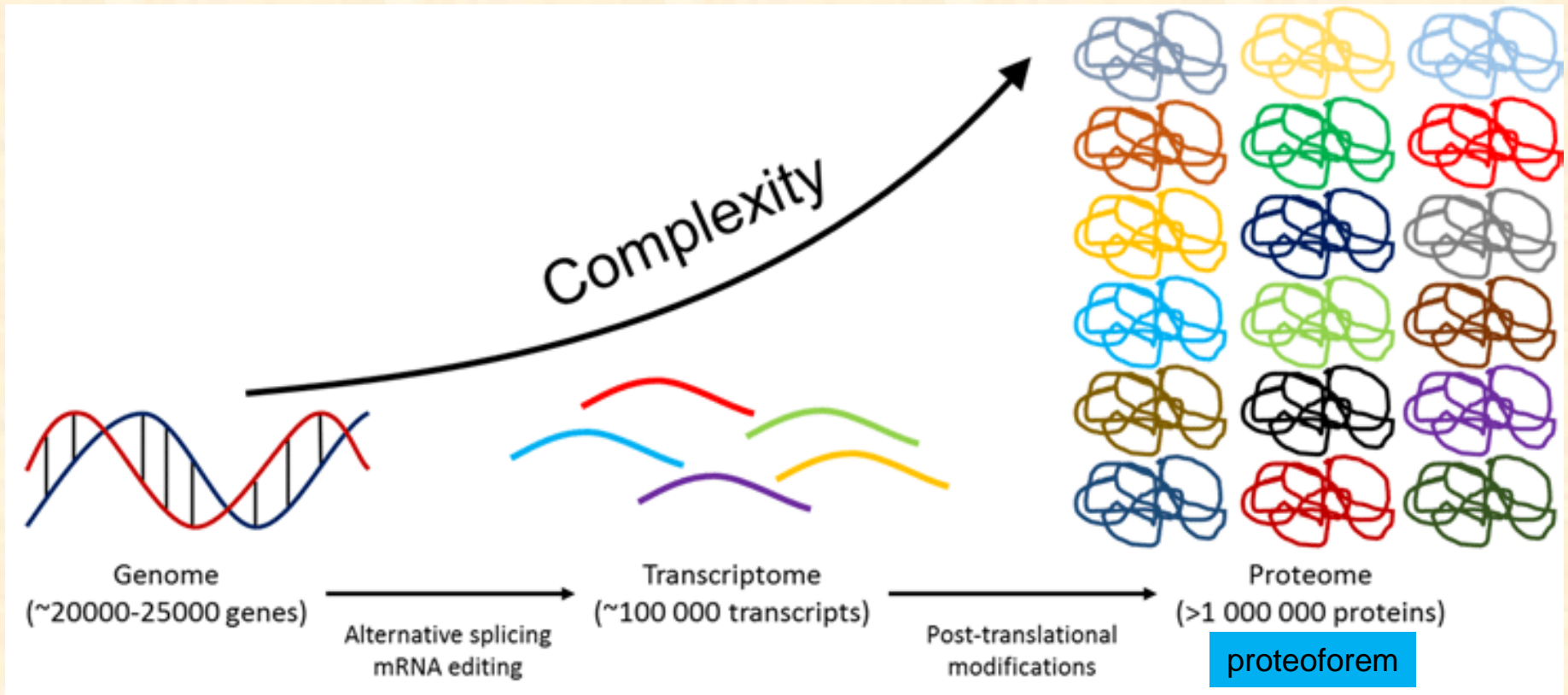


Proteotyp

soubor všech proteinů včetně všech jejich forem v buňce (tkáni, organismu)
v daném čase za daných podmínek

Genom vs Traskriptom vs Proteom

komplexita proteomu



<https://zohergen564s20.weebly.com/post-translational-modifications.html>

počty uvedeny pro člověka (lidskou buňku)

Posttranslační modifikace

komplexita proteomu

Nejznámější druhy PTMs

- fosforylace
- glykosylace
- lipidové modifikace
- metylace
- acetylace
- ubikvitinace

Rozdílné vlastnosti, struktura i velikost

Signální dráhy

Vazba receptorů
imunitní odpověď
signalizace...

Interakce
proteinů s
membránou

Degradace
proteinů

Regulace
exprese genů

[Insulin signaling](#)

Posttranslační modifikace

komplexita proteomu

počet druhů PTMs

> 400

počet PTMs

≈ 90 000 (experimentálně identifikovaných)

≈ 230 000 (predikce)

(SwissProt, per ≈ 530 000 proteinů)

G. A. Khoury et al., Sci. Rep. 1, 90; (2011); <http://selene.princeton.edu/PTMCuration>

...PTMs are known to act alone and in combination **to regulate nearly all aspects of protein function...**

...Post-translational modifications (PTMs) occur on **nearly all proteins**. Many domains within proteins are **modified on multiple amino acid sidechains** by diverse enzymes to create a myriad of possible protein species. **How these combinations of PTMs lead to distinct biological outcomes is only beginning to be understood...**

A. P. Lothrop, M. P. Torres, S. M. Fuchs, FEBS Letters. 587 (2013) 1247–1257

Protein p53

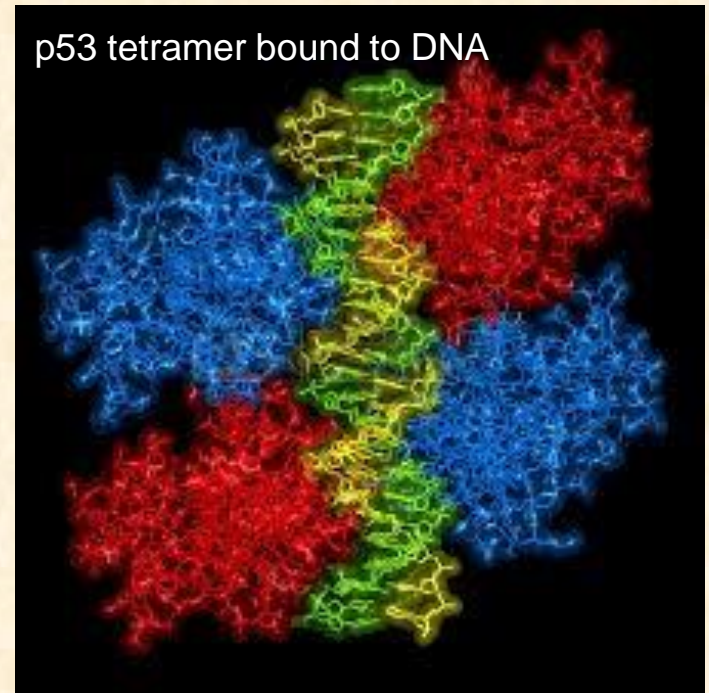
p53 exerts **irreplaceable anti-neoplastic functions** at homeostasis and thus is considered to be '**the guardian of the genome**'.

p53 is able to coordinate a regulatory network that supervises and responds to a variety of stress signals:

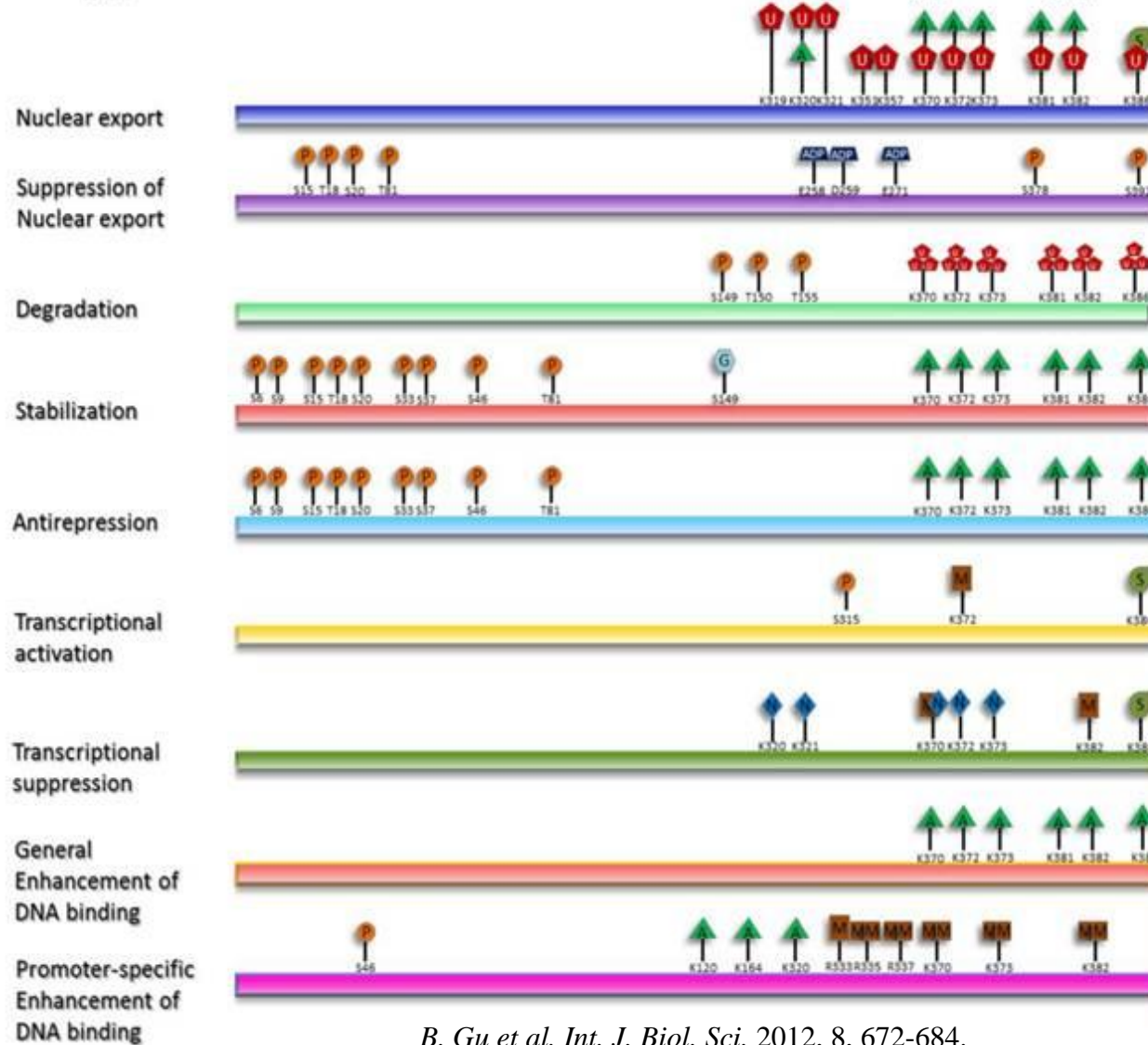
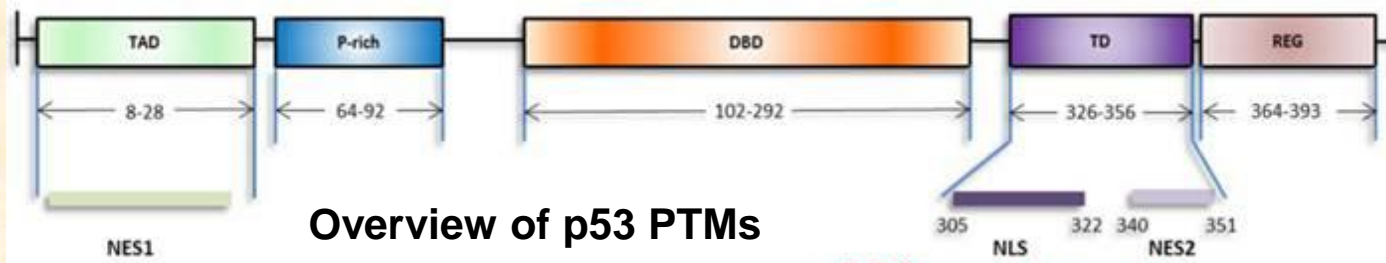
- DNA damage
- aberrant oncogenic activation
- telomere erosion
- ribosomal stress
- loss of cell-cell or cell-matrix adhesion
- hypoxia

Mutations of p53 or disruptions of p53 coordination,

to a lesser extent, can disturb the normal physiological balance, if genome disarrangement reaches a critical value **it leads to cancer**



<https://www.promegaconnections.com/when-good-proteins-go-bad/>



- phosphorylation
- acetylation
- methylation
- mono-ubiquitination
- poly-ubiquitination
- SUMOylation
- O-GlcNAcylation
- Neddylation
- dimethylation
- ADP-ribosylation

Genom vs Proteom

rela



???)

<https://www.discovery.org/education/2019/11/19/needle-in-a-haystack-school-innovation/>

4 z

<https://wallhere.com/en/wallpaper/1482761>

pot
(PC



<https://news.artnet.com/art-world/artist-hunts-needle-in-haystack-in-paris-168135>



inspirováno obrázkem prof. B. Domona



Proteomika

Proteomika – disciplína zabývající se analýzou proteomu

Proteomics is the large-scale study of proteins.

More inclusive definition **combines protein studies with analyses that have a genetic readout such as mRNA analysis, genomics, and the yeast two-hybrid analysis** (Pandey A, Mann M Nature. 2000 Jun 15; 405(6788):837-46)

Vznik a rozvoj proteomiky byl a je podmíněn vývojem:

- **sekvenování DNA a takto databází proteinových sekvencí**
- **hmotnostně spektrometrické instrumentace**
- **SW nástrojů pro zpracování MS dat**

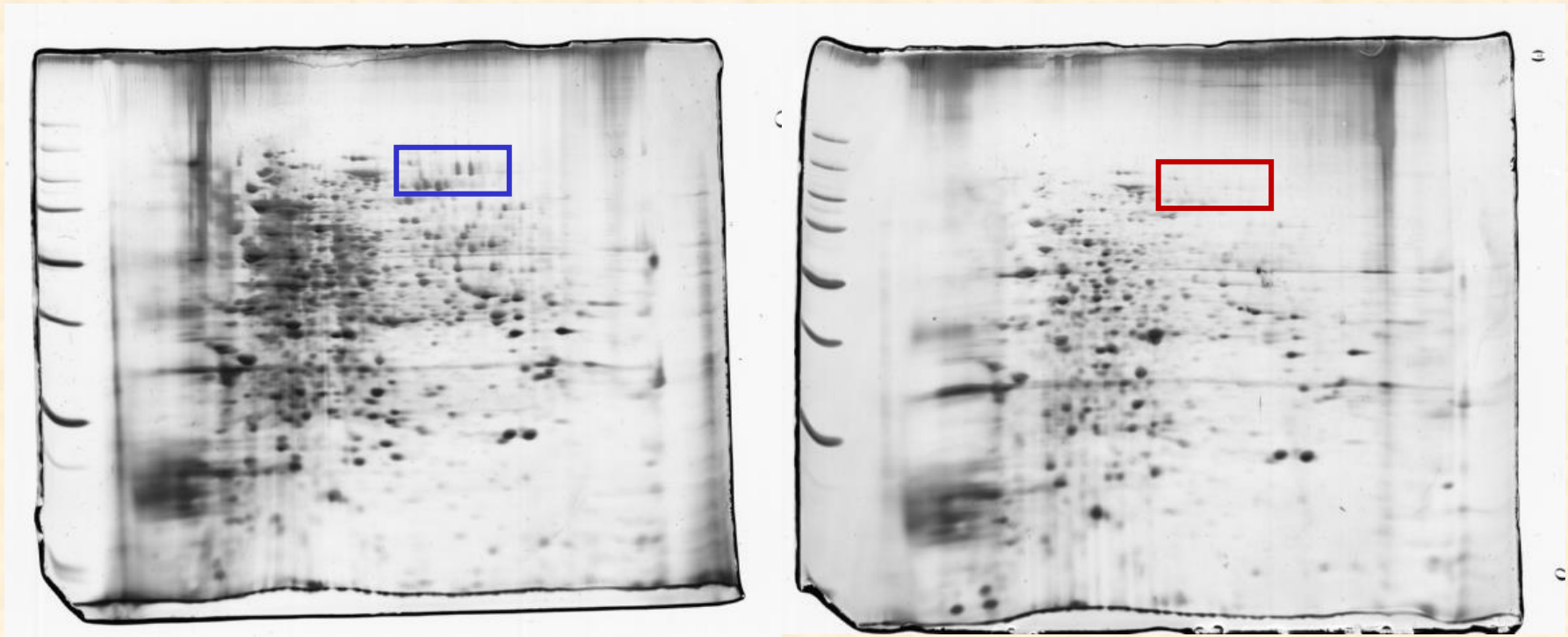
Diferenční (expresní) proteomika

Kvalitativní a kvantitativní srovnání proteomů (proteotypů)

- určení změn v regulaci proteinů a jejich forem (PTMs), které nastaly v důsledku vnitřních či vnějších podnětů.

kontrola

stres



Rhodotorula glutinis

Diferenční (expresní) proteomika

Dnes – LC-MS/MS

1	Header		
2		PGs	proteins
3	total	11844	16019
4	shown	8654	8654
5	PG ID	Accession	Description



Down-regulated

1	Header		
2		PGs	proteins
3	total	11844	16019
4	shown	428	428
5	PG ID	Accession	Description

Up-regulated

1	Header		
2		PGs	proteins
3	total	11844	16019
4	shown	858	858
5	PG ID	Accession	Description

Pathway analysis

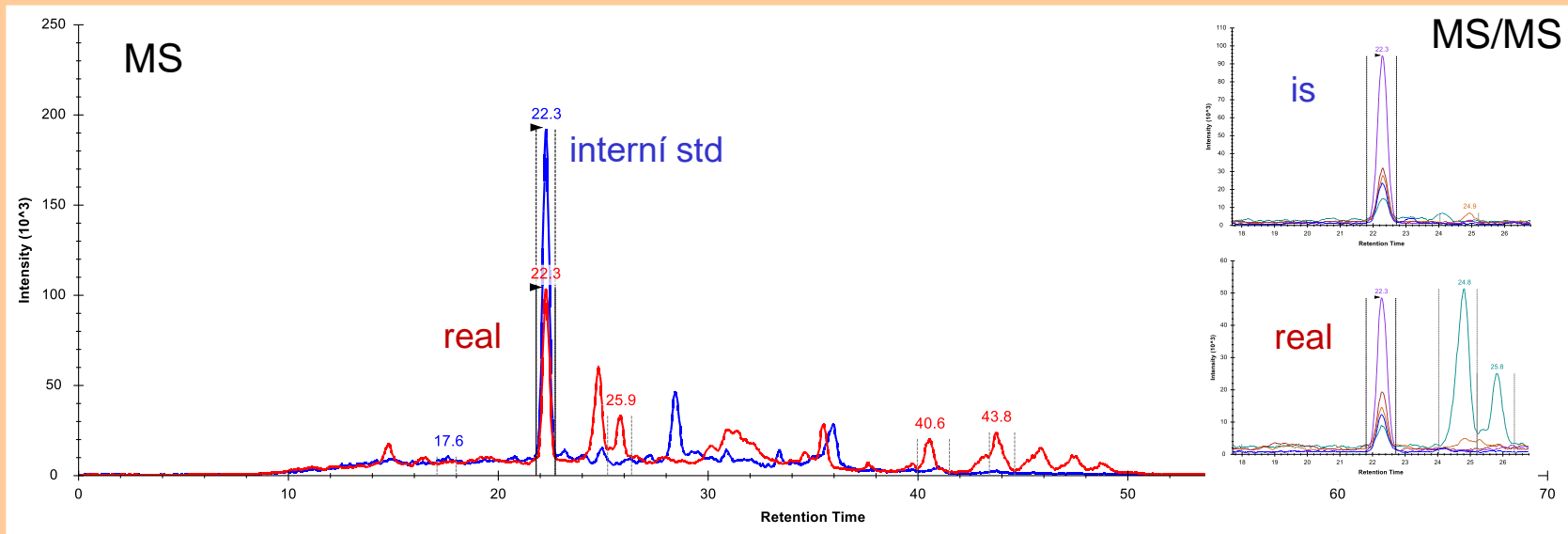


Odpověď organismu na stimul

Cílená proteomika

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

Stanovení enterotoxinu (*S. aureus*)

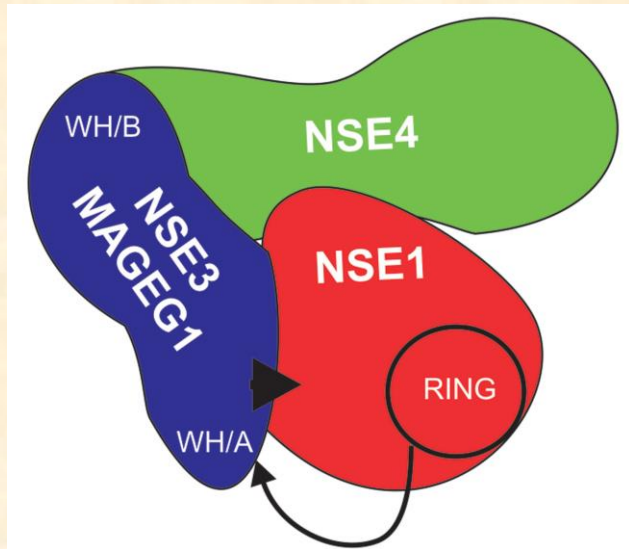


LC-MS/MS (MRM)

Funkční proteomika

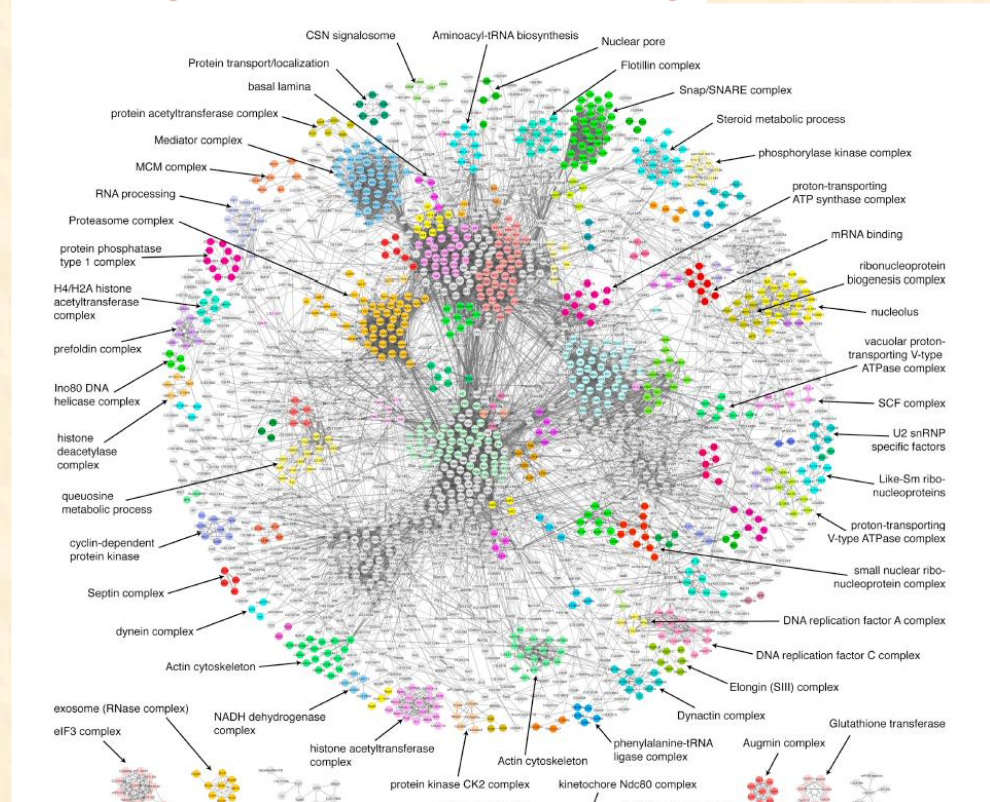
Studium interakcí proteinů (proteinových komplexů) a jejich funkční význam.

- identifikace interakčních partnerů
- vznik a architektura proteinových komplexů
- interakce proteinů s jinými molekulami (RNA, DNA, metabolity aj.)



*L. Kozakova et al.,
Cell Cycle, 14 (6), 920-930 (2015)*

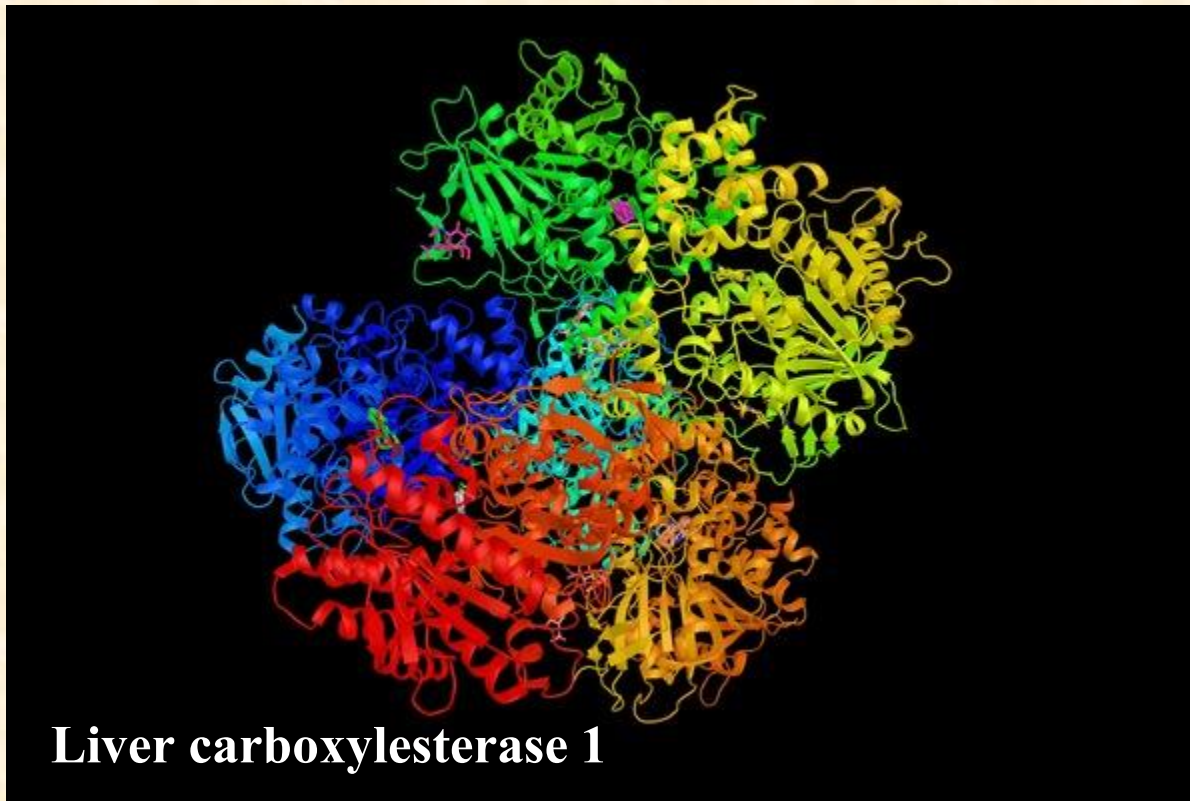
A *Drosophila* Protein Interaction Map



K.G. Guruharsha et al., Cell, 147, 690-703 (2011)

Strukturní proteomika

Studium vyšších úrovní proteinové struktury (terciární, kvarterní) a vztahu struktury k funkci proteinu.



<https://www.shutterstock.com/search/ces1>

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

Náročnost analýzy proteomu

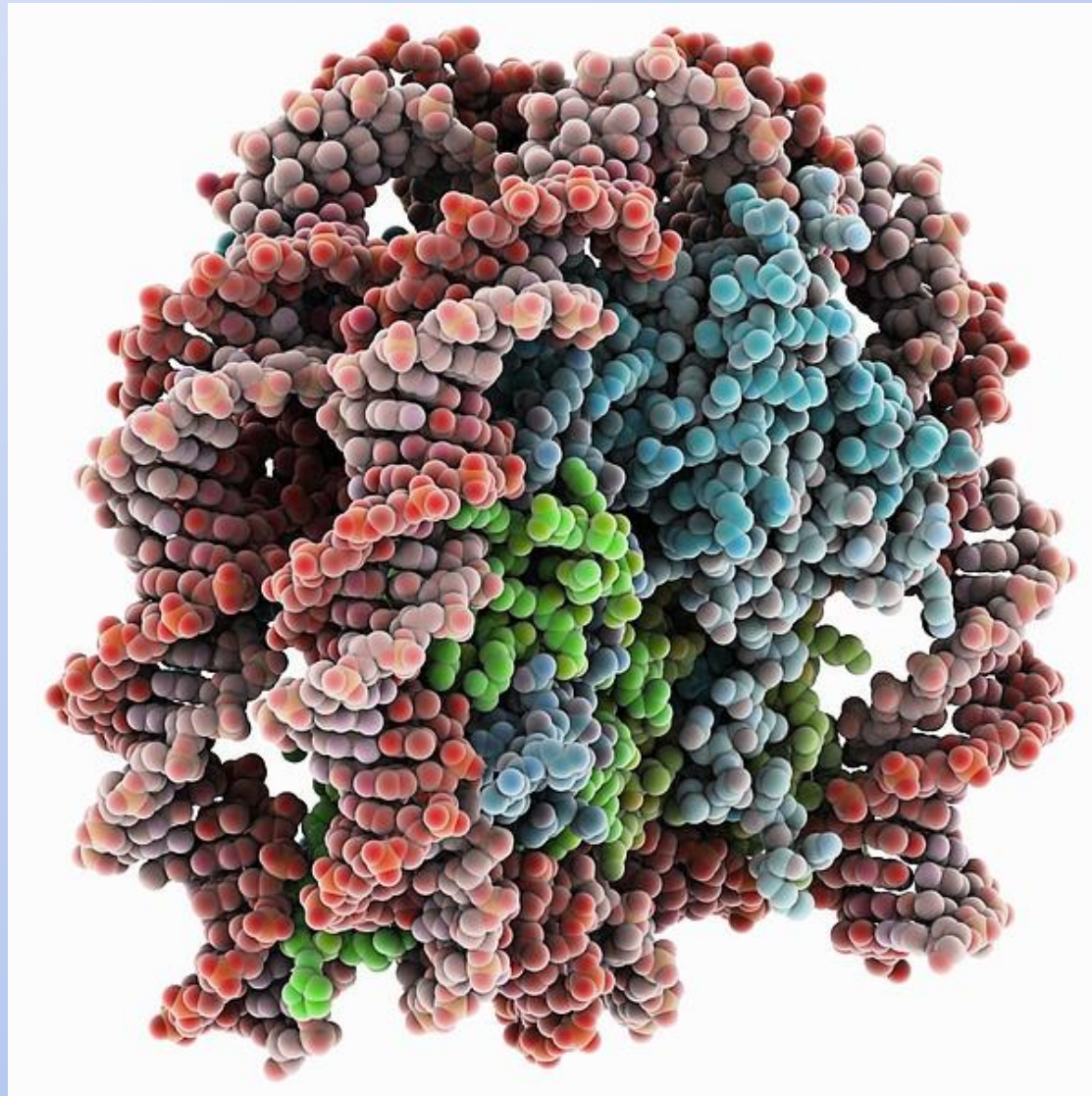


Proteinové komplexy – složení, stechiometrie, uspořádání podjednotek....

Proteoformy – deseti tisíce forem proteinů (PTMs, zkrácené formy, mutace...)

Kvantita – široké rozpětí koncentrací

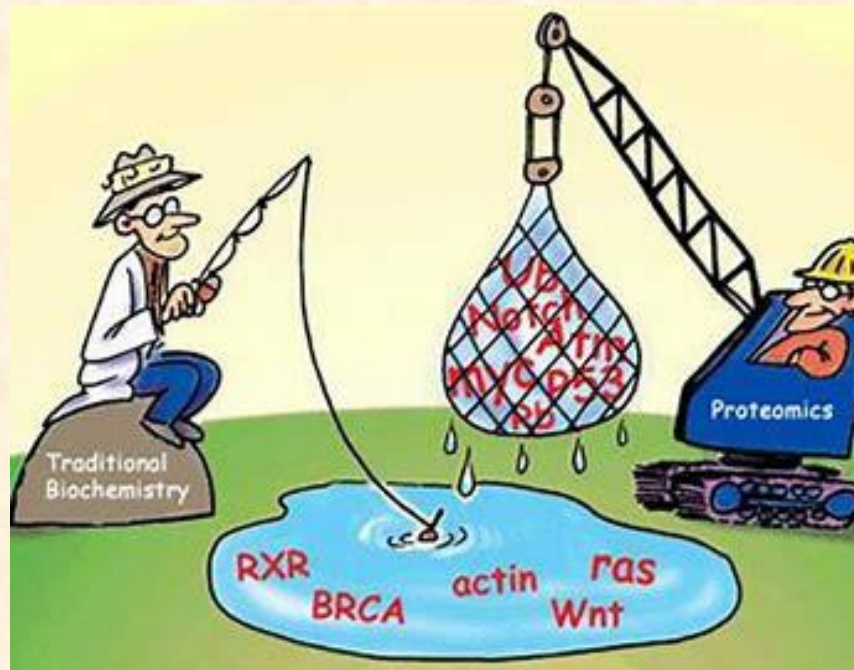
Kvalita – tisíce proteinů (identifikace)



Hmotnostní spektrometrie

hlavní technologie pro analýzu proteomu

umožňuje současnou kvalitativní i kvantitativní charakterizaci tisíců proteinů

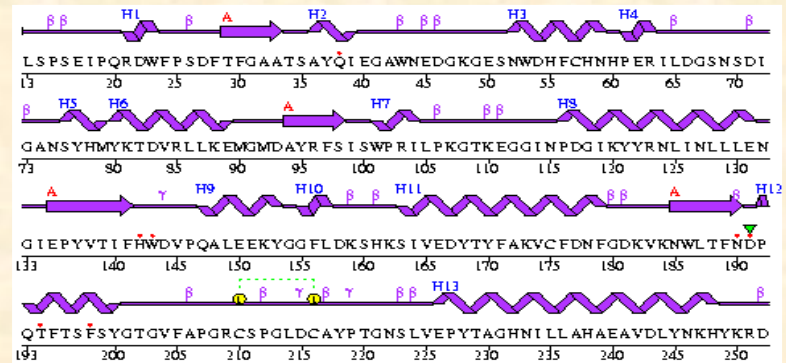


Struktura proteinu

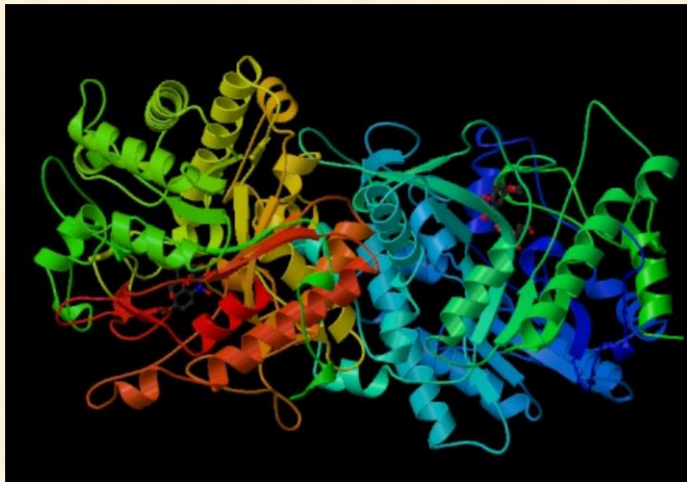
Primární struktura (pořadí aminokyselin):

MAPLLAAMNHAAHPGLRSHLVGPNNESFSRHLLPSSSPQSSKRRCNLSFTTRSAR
 VGSQNGVQMLSPEIQRDWFPSDFTFGAATSAYQIEGAWNEDGKGESNWDHFCHNH
 PERILDGSNSDIGANSYHMYKTDVRLLEKMGMDAYRFSISWPRI L PKGTKEGGINPD
 GIKYYRNLINLLENGIEPYVTIFHWDVPQALEEKYGGFLDKSHKSIVEDYTYFAKV
 CFDNFGDKVKNWLT FNEPQTF TFSYGTGVFAPGR CSPGLDCAYPTGNSLVEPYTAG
 HNILAHAEAVDLYNKHYKRDDTRIGLAFDVMGRVPYGT SFLDKQAEERSWDINL GW
 FLEPVVRGDY PFSMRSLARERLPFFKDEQKEKLAGSYNMLGLNYT SRFSKNIDISP
 NYSVPLNTDDAYASQEVNGPDGKPIGPPMGNPWIYMYPEGLKDLLMIMKNKYGNPPI
 YITENGIGDVDTKETPLPMEALNDYKRLDYIQRH IATL KESIDLGSNVQGYFAWSL
 LDNFEWFAGFTERYGIVYVDRNNNCTRYMKE SAKWLKEFNTAKKPSKILTPA

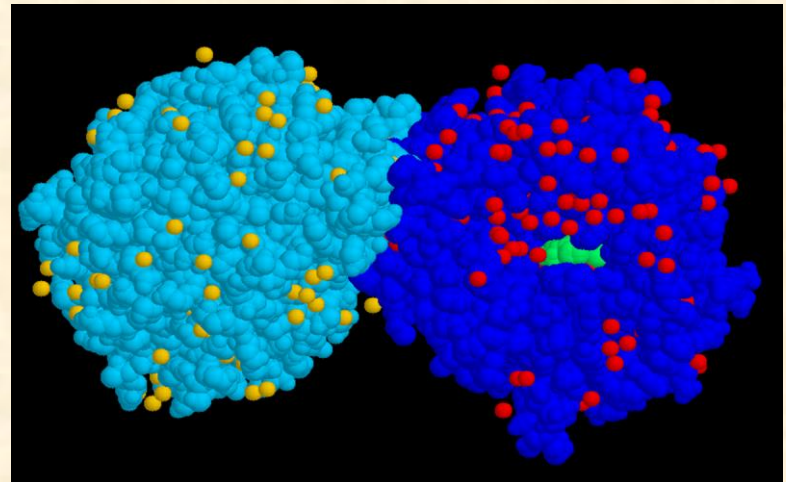
Sekundární struktura



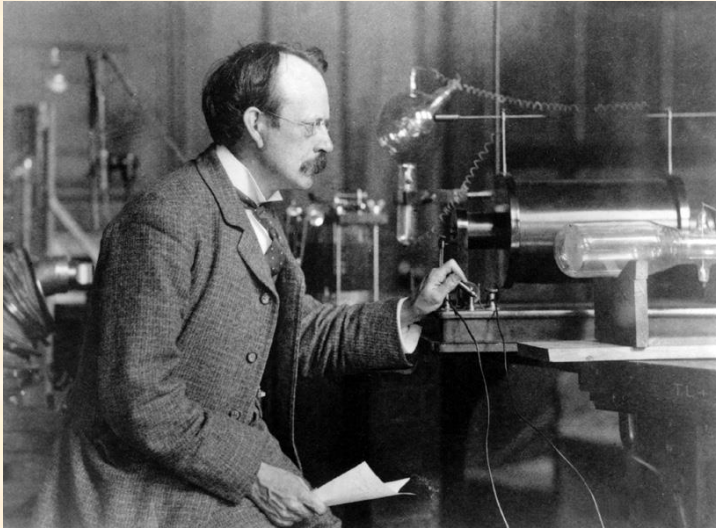
Terciární (prostorová) struktura



Kvarterní struktura



Historie hmotnostní spektrometrie



Thomson J.J. (1856 – 1940)

On the Masses of the Ions in Gases at Low Pressures

Philosophical Magazine, 1899, 48:295, p.547-567

1906 – Nobelova cena za fyziku

for theoretical and experimental investigations on the conduction of electricity by gases

J.J. Thomson working with his cathode ray tube (<https://www.probashionline.com/jj-thomson-nobel-prize-factory/>)

Thomson's investigations into the action of electrostatic and magnetic fields on the nature of so called "anode rays" or "canal rays" would eventually result in the invention of the **mass spectrometer** (then called a *parabola spectrograph*) by **Francis Aston (Nobel Prize for Chemistry 1922)**, **a tool which allows the determination of the mass-to-charge ratio of ions and which has since become an ubiquitous research tool in Chemistry.**

„ ... By this means there is attained what is known as a mass spectrogram, that is to say a series of lines in which each line corresponds to a certain atomic weight.“

Dr. H.G. Soderhaum – 1922

P.S. syn a sedm jeho studentů získalo Nobelovu cenu

Historie hmotnostní spektrometrie

První český hmotnostní spektrometr - 1953

V. Čermák, V. Hanuš, Č. Jech, J. Cabicar

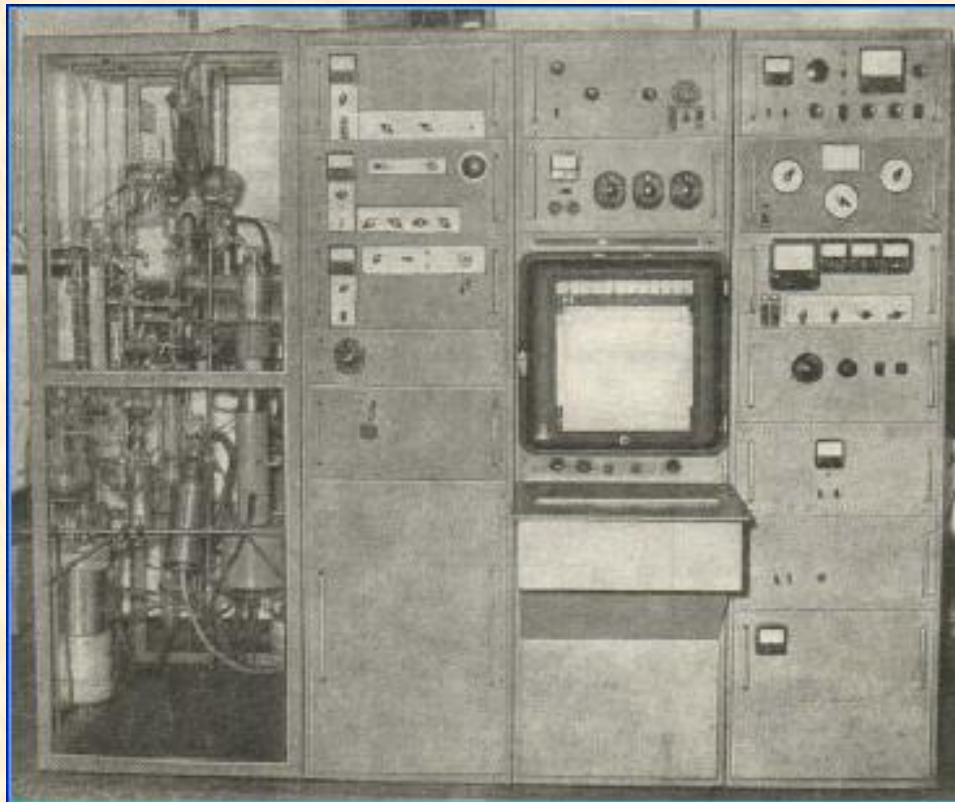
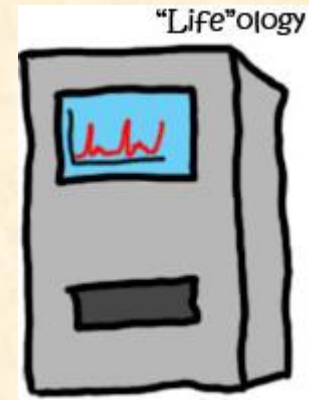


Foto převzato z přednášky dr. M. Poláška

Hmotnostní spektrometrie - dnes



Orbitrap Astral™ (Thermo)

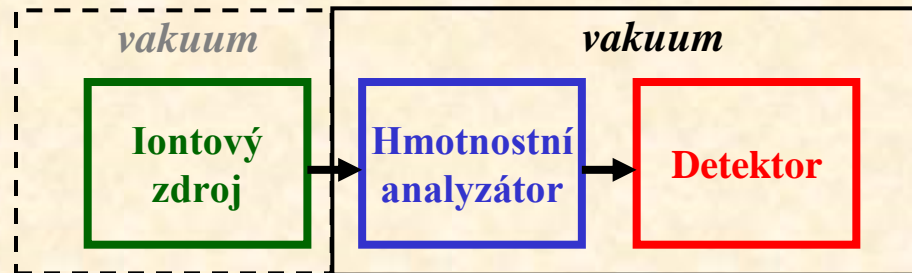


timsTOF Ultra (Bruker)



Princip hmotnostní spektrometrie (MS)

měření poměru relativní molekulové hmotnosti a počtu nábojů (m/z) iontů analyzované látky



m - hmotnost iontu
 z - počet nábojů

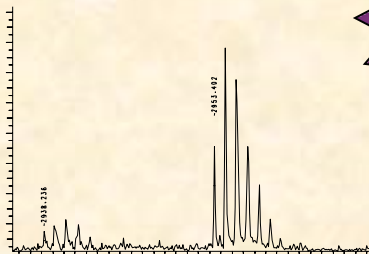
základní operace:

- ionizace molekul analyzované látky
- separace iontů podle jejich poměru m/z
- detekce iontů

výsledek:

● hmotnostní spektrum - závislost intenzity iontů na jejich m/z

a.i.



m/z



určení hmotnosti iontů,
určení molekulárního iontu

hmotnosti celé molekuly

Průlom v MS proteinů

Nové „šetrné“ ionizační techniky (polovina 80. let 20. století)

základní předpoklad pro široké využití MS pro analýzu biomolekul

(Nobelova cena 2002)



Koichi Tanaka
Shimadzu Corp., Kyoto, Japan

MALDI

ionizace laserovou desorpcí za účasti matrice

KARAS M., HILLENKAMP F.

*Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses
Exceeding 10000 Daltons*

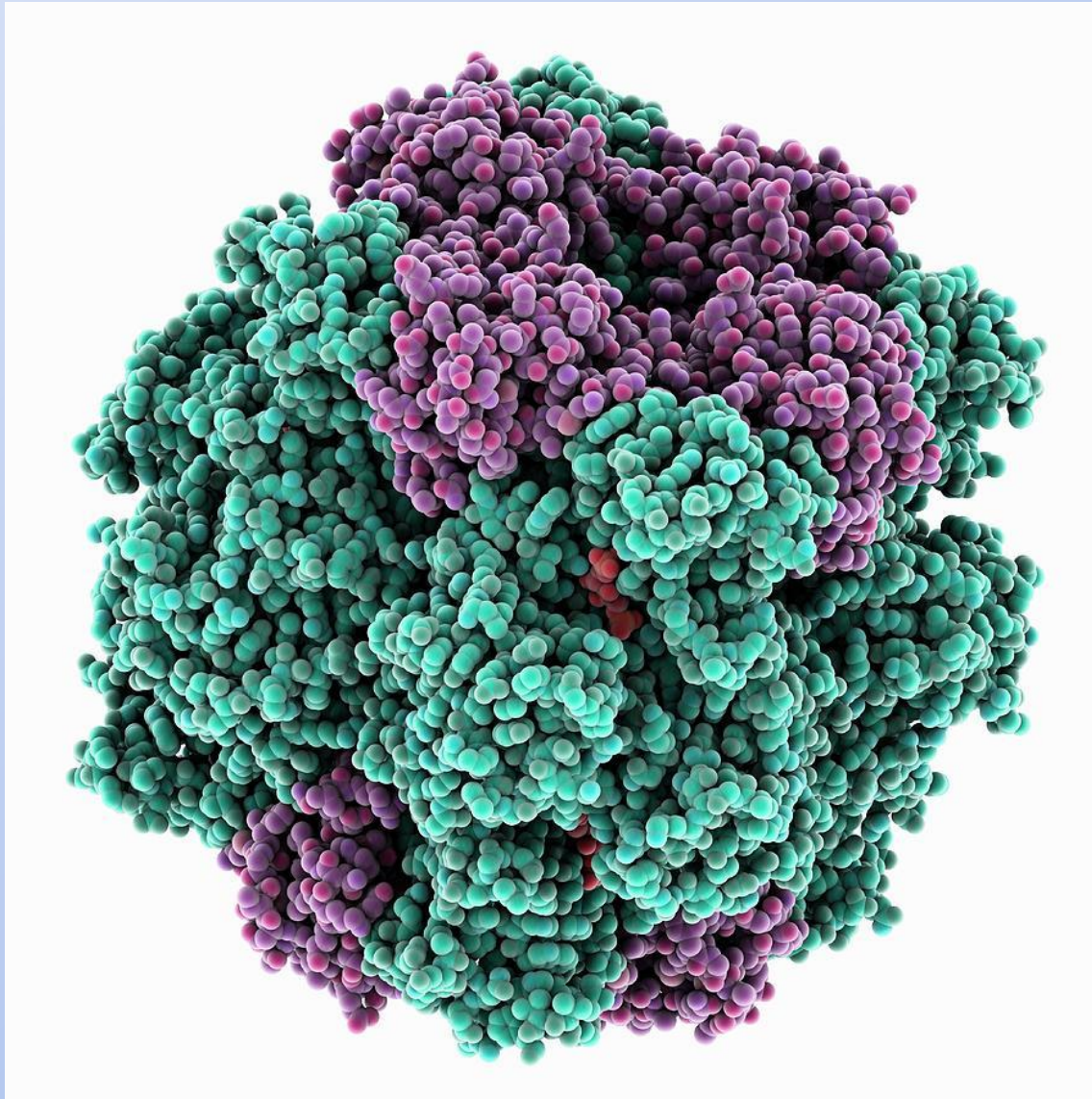
Anal. Chem., 60 (20): 2299-2301 (1988)



John B. Fenn
Virginia Commonwealth University,
Richmond, USA

ESI

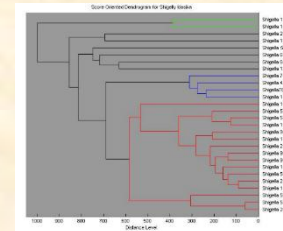
ionizace elektrosprejem



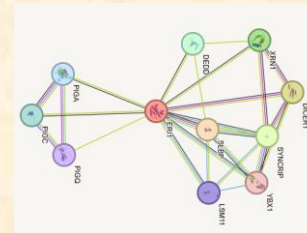
Tobacco Rubisco Molecule Photograph by Laguna Design/science Photo Library

Možnosti hmotnostní spektrometrie v proteomice

- **Analýza intaktních molekul**
(MW, MALDI-MS profilování)

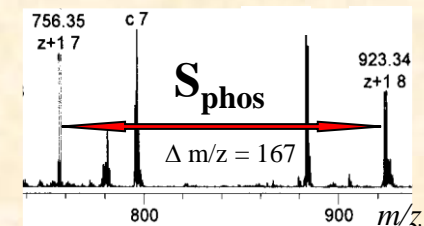


- **Identifikace proteinů**
(i de novo sekvenace)

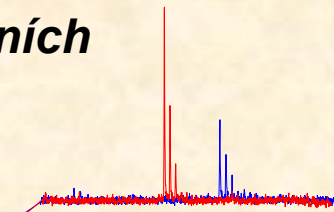


- **Charakterizace interakcí proteinů**
(proteinové komplexy)

- **Charakterizace proteinových modifikací**

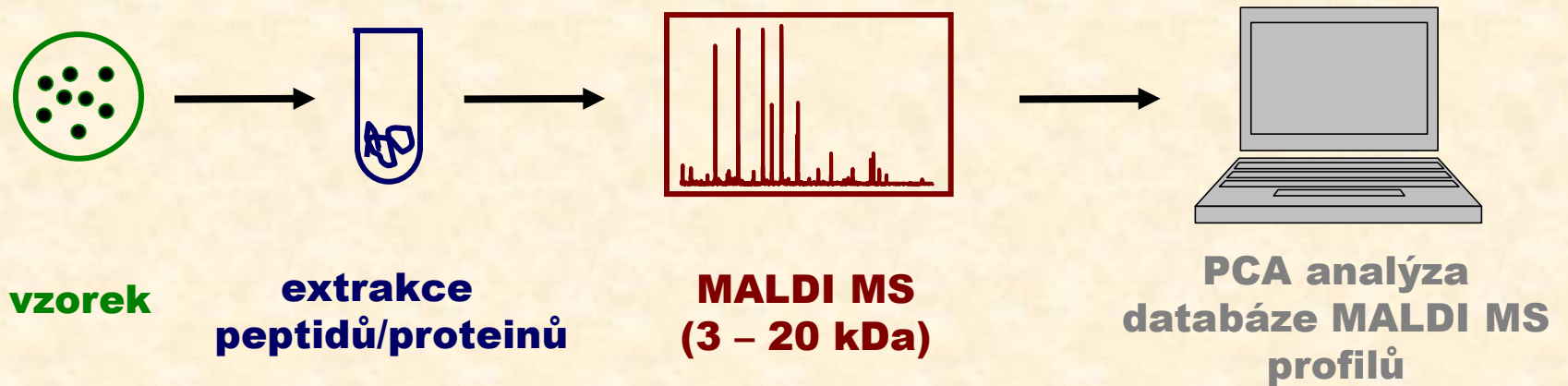


- **Kvantifikace jednotlivých proteinů i komplexních směsí**
(relativní a absolutní kvantifikace)



Aplikace s využitím analýzy intaktních molekul

MALDI-MS profilování













- **identifikace mikroorganismů**
- **třídění vzorků (kontrola kvality potravin)**
- **diagnostika chorob**



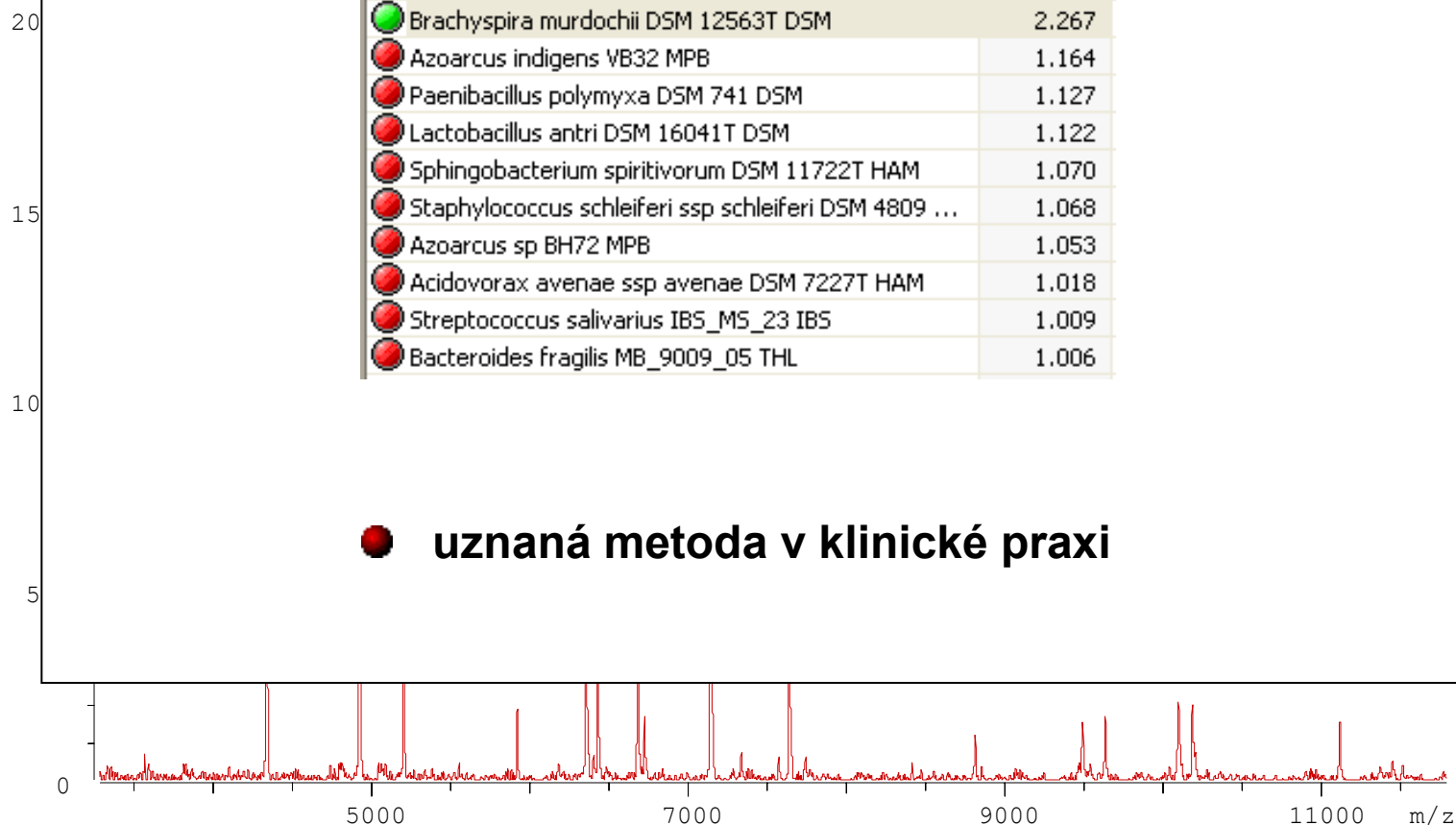
Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-MS



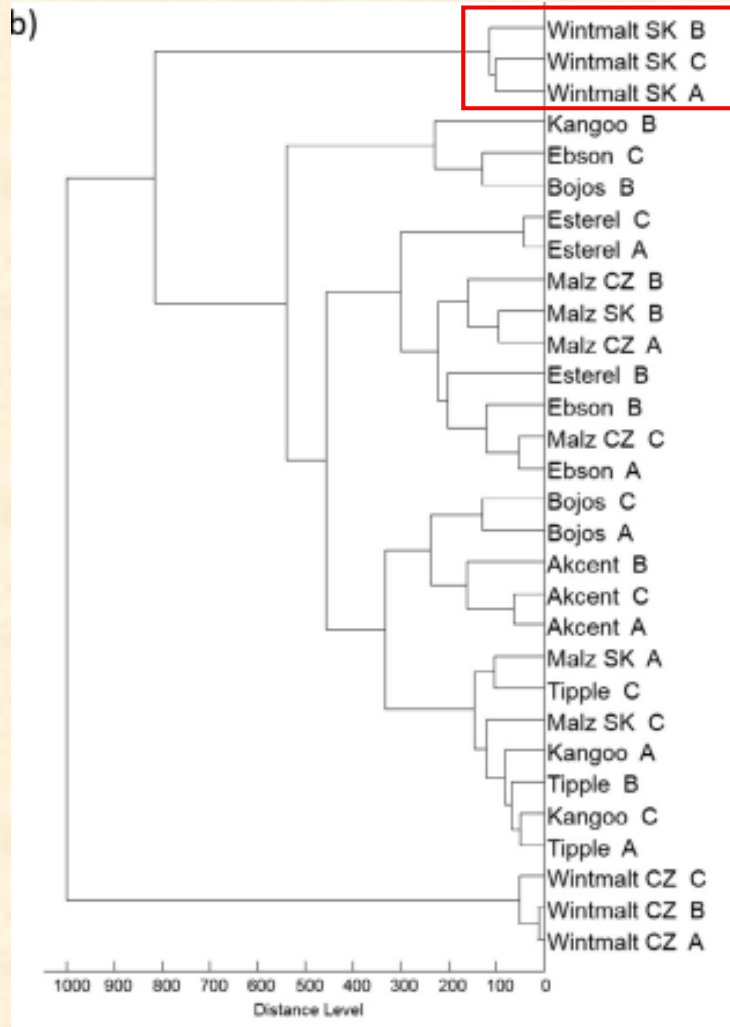
identifikace na základě srovnání naměřeného profilu s profilem z databáze

Detected Species	Lo...
 <i>Brachyspira murdochii</i> DSM 12563T DSM	2.267
 <i>Azoarcus indigens</i> VB32 MPB	1.164
 <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 741 DSM	1.127
 <i>Lactobacillus antri</i> DSM 16041T DSM	1.122
 <i>Sphingobacterium spiritivorum</i> DSM 11722T HAM	1.070
 <i>Staphylococcus schleiferi</i> ssp <i>schleiferi</i> DSM 4809 ...	1.068
 <i>Azoarcus</i> sp BH72 MPB	1.053
 <i>Acidovorax avenae</i> ssp <i>avenae</i> DSM 7227T HAM	1.018
 <i>Streptococcus salivarius</i> IBS_MS_23 IBS	1.009
 <i>Bacteroides fragilis</i> MB_9009_05 THL	1.006

 **uznaná metoda v klinické praxi**



Třídění sladových ječmenů pomocí MALDI-MS

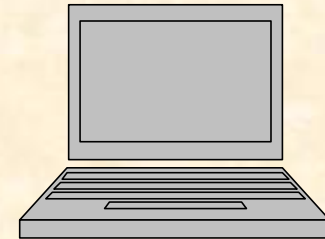
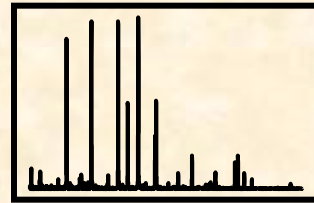
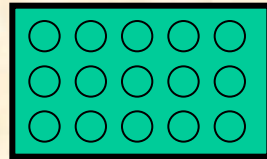


- Kontrola kvality dodaných sladových ječmenů
- Rychlá alternativa k zavedeným technikám



Pacient

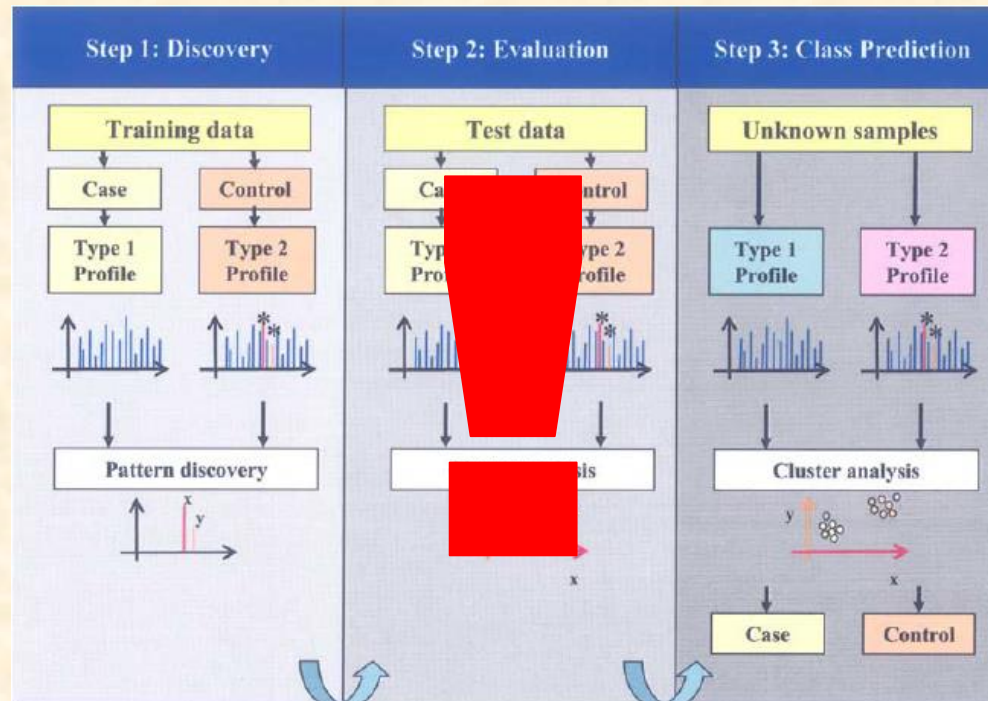
Analýza profilů –včasná detekce chorob (peptide profiling, pattern profiling)

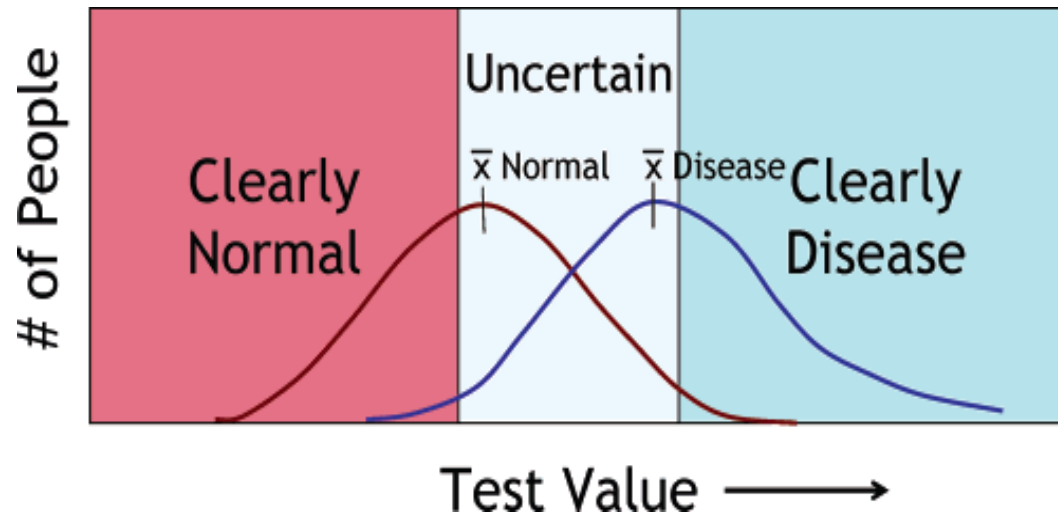


**žádná či minimální
úprava vzorku**
*(ionex, IMAC, afinitní
sorbent)*

MALDI MS, SELDI MS
(3 – 20 kDa)

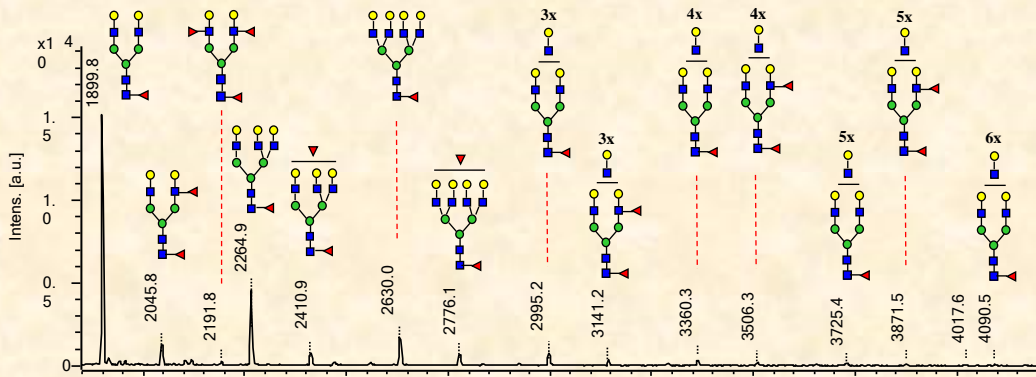
klastrová analýza



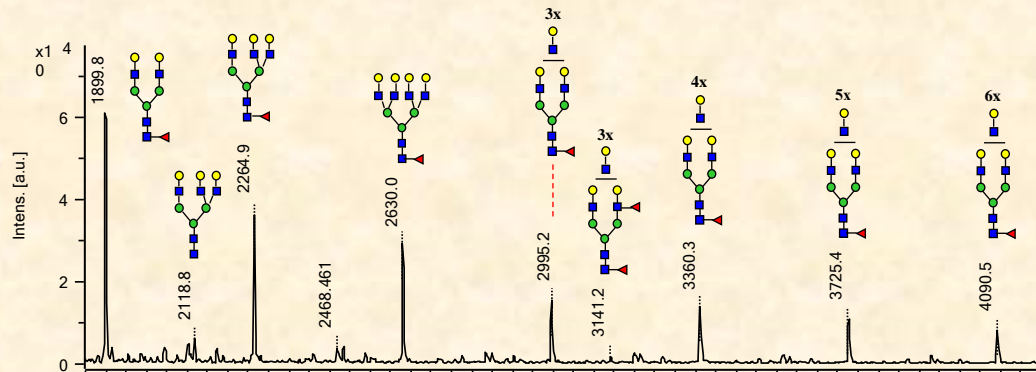


J. LaBaer et al., J. Proteome Res., 4 (4) 1053-1059 (2005).

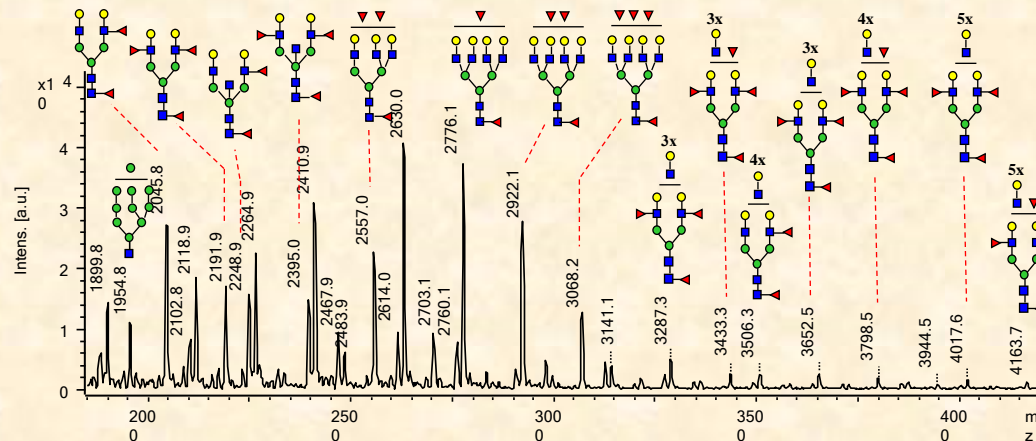
MALDI-MS profilování glykanů



NSCLC - Bronchoalveolar Carcinoma



Bronchoalveolar Adenocarcinoma

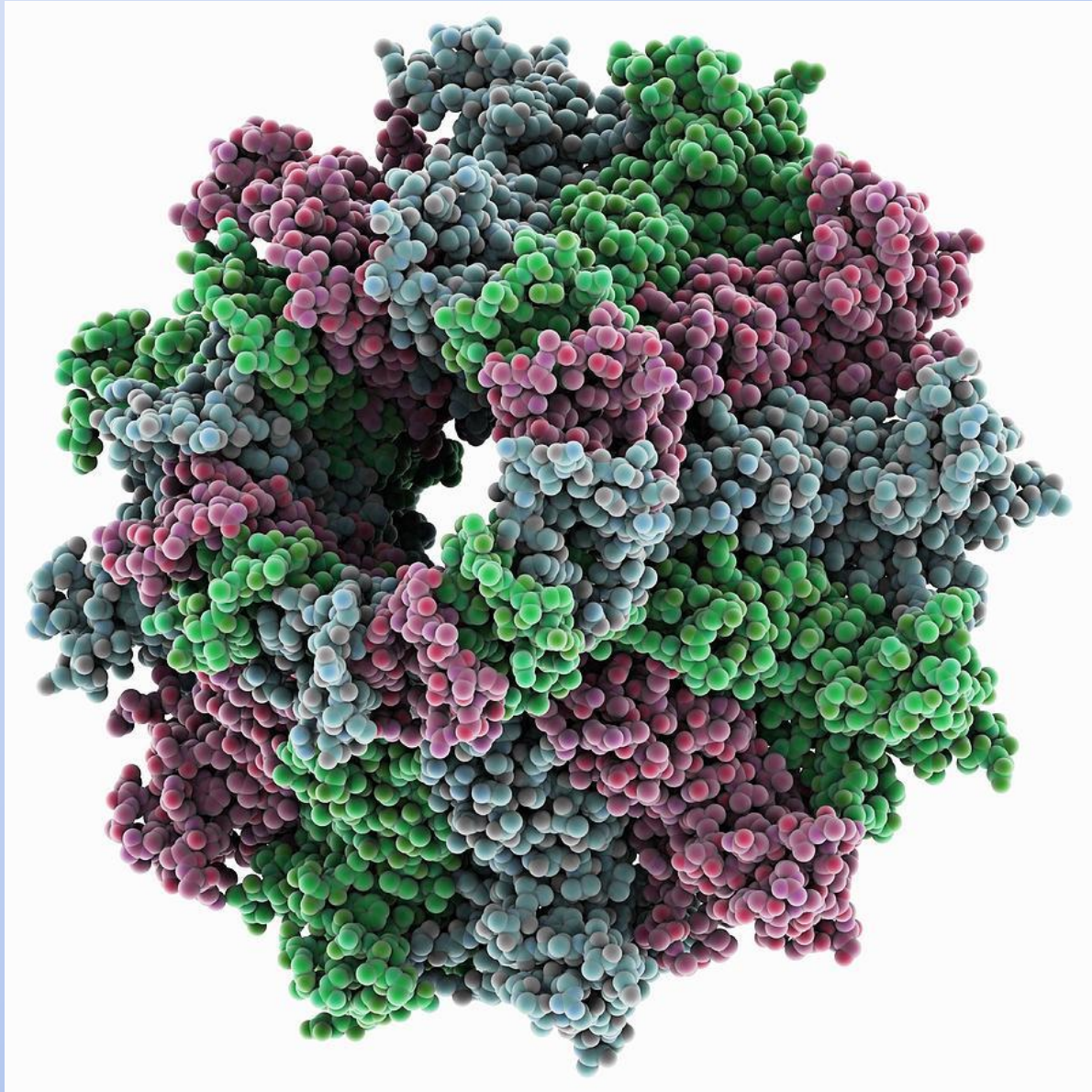


Large Cell Carcinoma

MALDI-TOF-MS spectra of N-glycans after desialylation

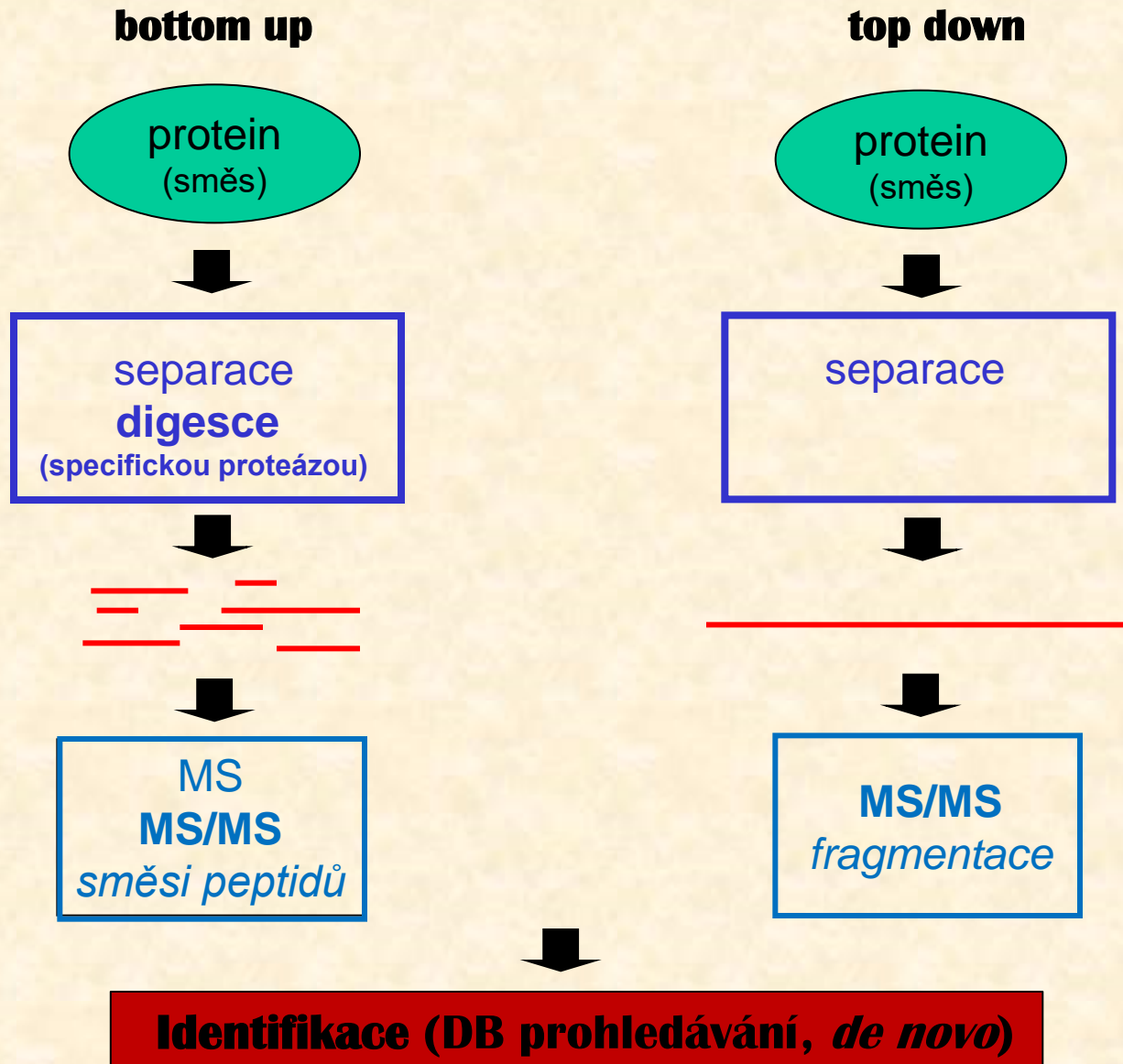
● Man; ● Gal; ■ GlcNAc; ▼ Fuc

Lattová E., J. Proteome Res., 15 (8), 2777-2786 (2016)



Identifikace proteinů

Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií

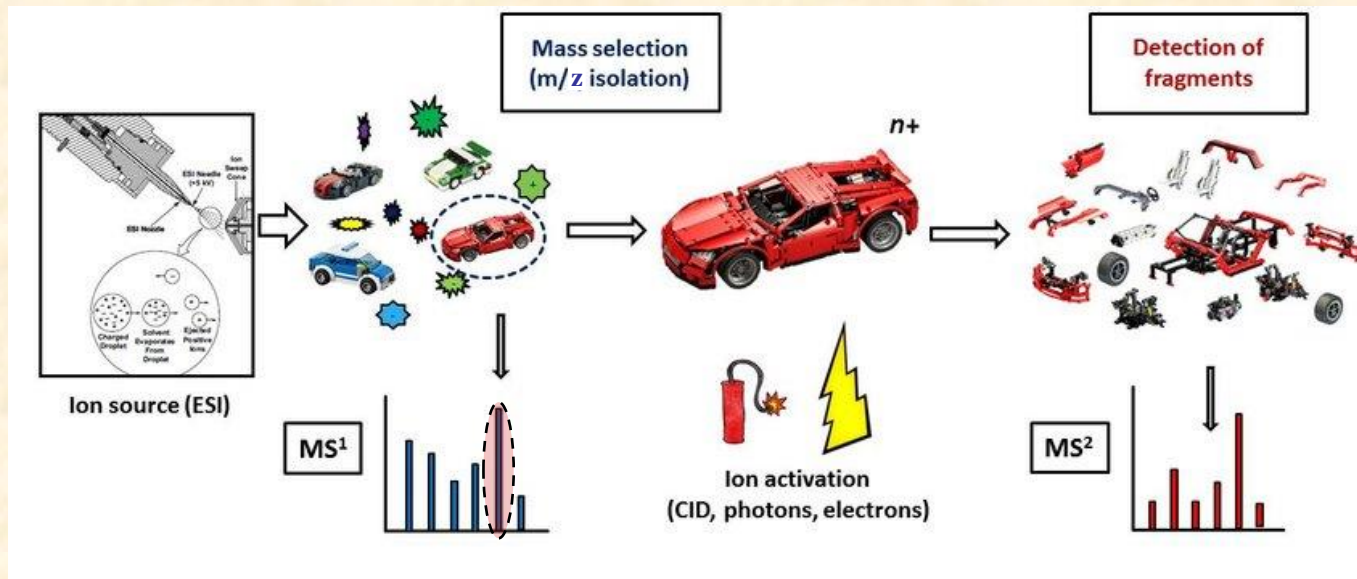


MS a MS/MS

MS

MS/MS

tandemová hmotnostní spektrometrie
MS²



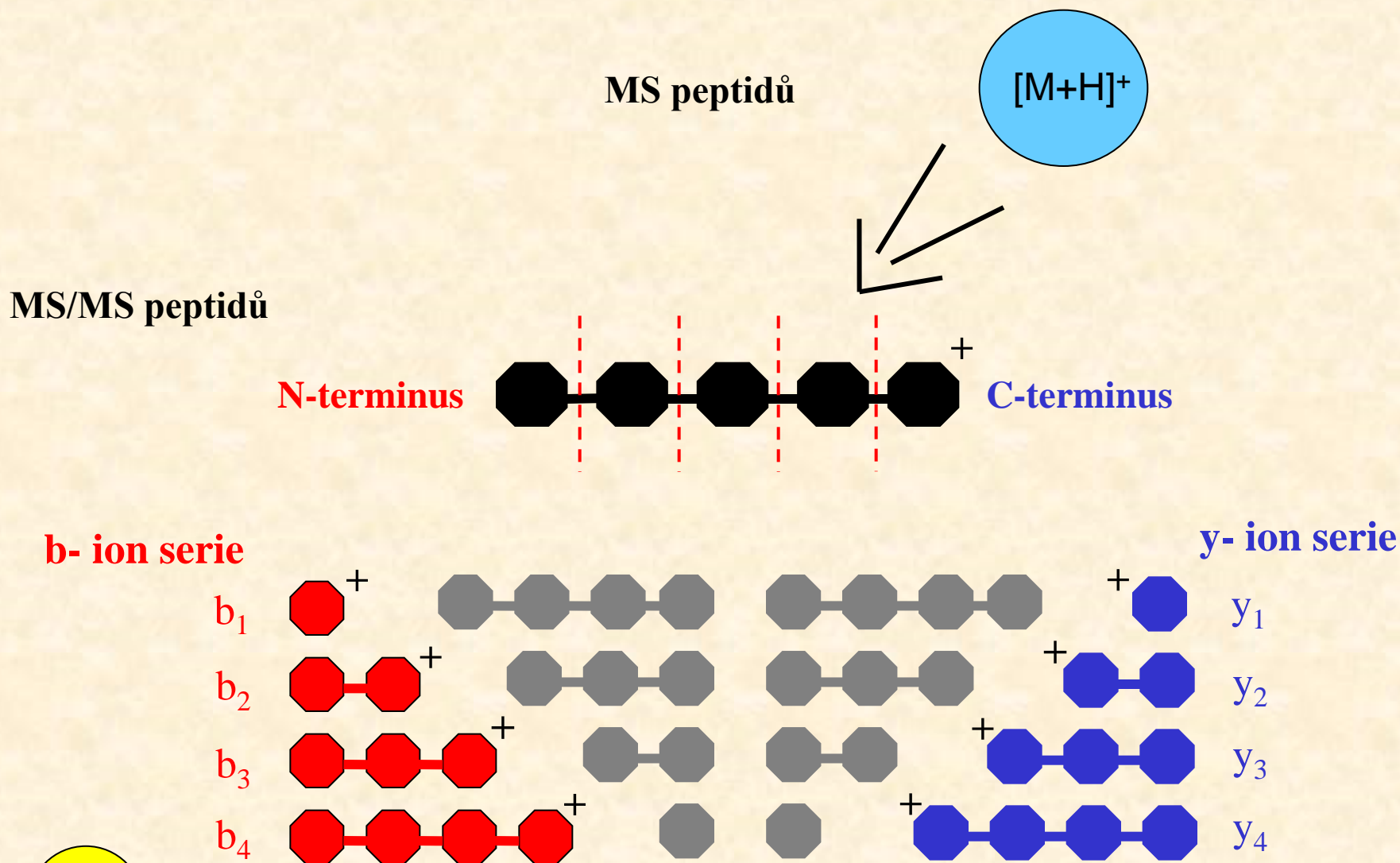
m/z celého iontu (peptidu)

*m/z fragmentů
vzniklých fragmentací celého iontu
(peptidu)*

precursor (parent) ions

product (daughter) ions

Fragmentace peptidů – MS/MS

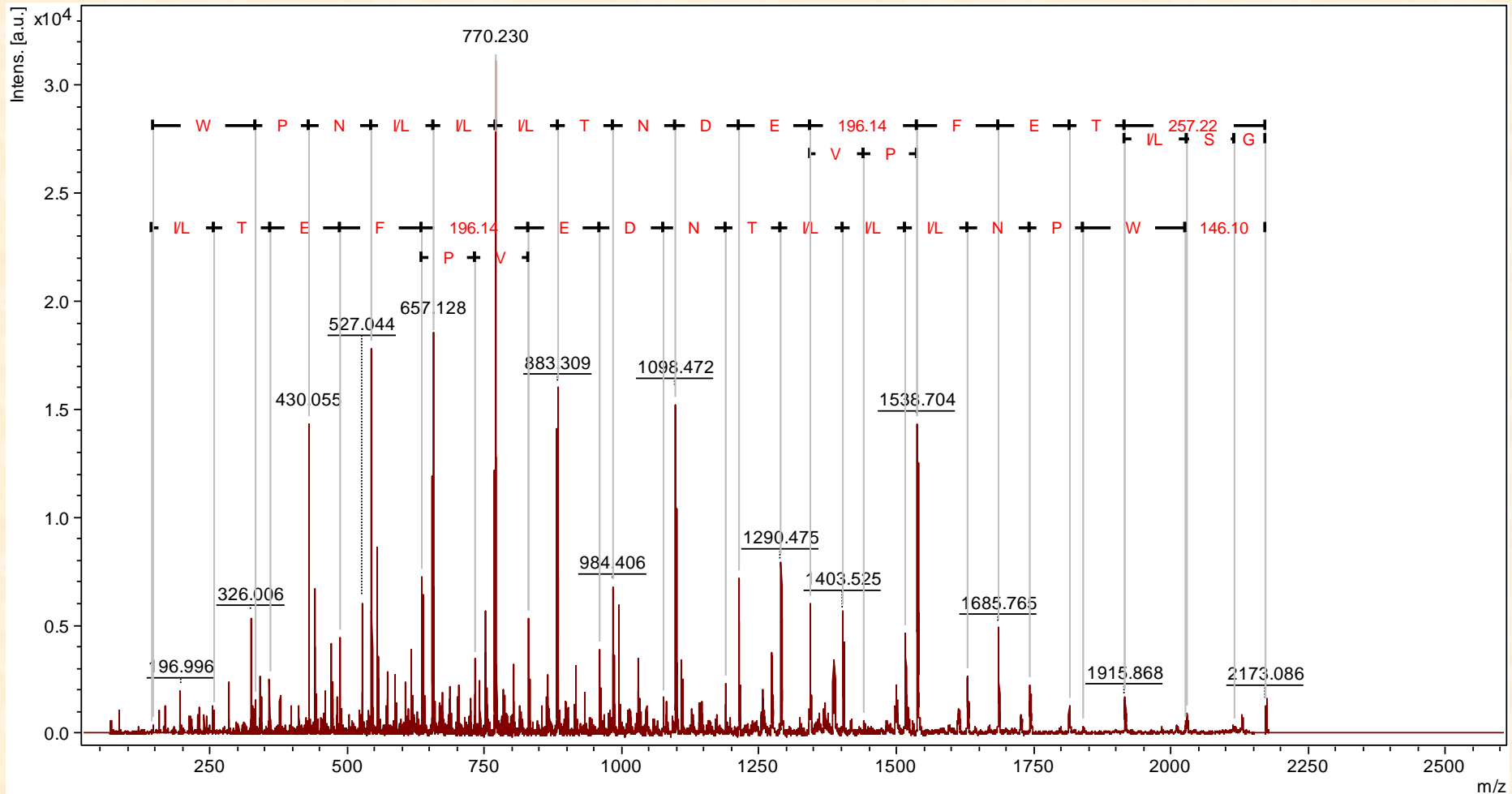


fragmentační mapy pro jednotlivé peptidy



Myodes glareolus

Fragmentace peptidů – MS/MS



Ověření sekvence a určení izoform OBP proteinů

Identifikace proteinů
Analýza komplexních směsí

Základní schéma proteomické analýzy

Vzorek

GIGO

Úprava vzorku

- *správně naplánovaný experiment*

nutnost vícekových postupů

- *izolace proteinů*
- *separace / frakcionace*
- *postupy pro oddělení modifikované frakce od zbytku vzorku*
- *derivatizace, enzymatická úprava...*

!!! zachování původního stavu !!!

MS analýza

- *správné nastavení sběru dat*
- *(účinná on-line separace)*

Vyhodnocení dat

- *správné postupy zpracování dat*
- *kritické zhodnocení spolehlivosti získaných dat*
- *ověření nezávislou metodou*



Komplexita vzorku

Pro získání kompletnější informace

Nutnost spojení MS se separací/frakcionací

**zjednodušení extrémně komplexní směsi
oddělit specifickou skupinu proteinů/peptidů**

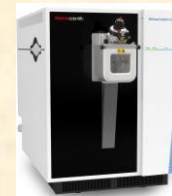
před MS analýzou

Základní kombinace – LC-MS/MS

Kapalinová chromatografie
(LC)

+

Hmotnostní spektrometr
(MS/MS)



nutnost kombinovat různé separační techniky – vícerozměrná separace

Frakcionace/separace

Nejběžnější separační techniky v proteomice

elektroforetické techniky:

- isoelektrická fokusace (v gelu, v roztoku)
- SDS PAGE
- 2D gelová elektroforéza (DIGE)
- kapilární elektroforéza

chromatografické techniky:

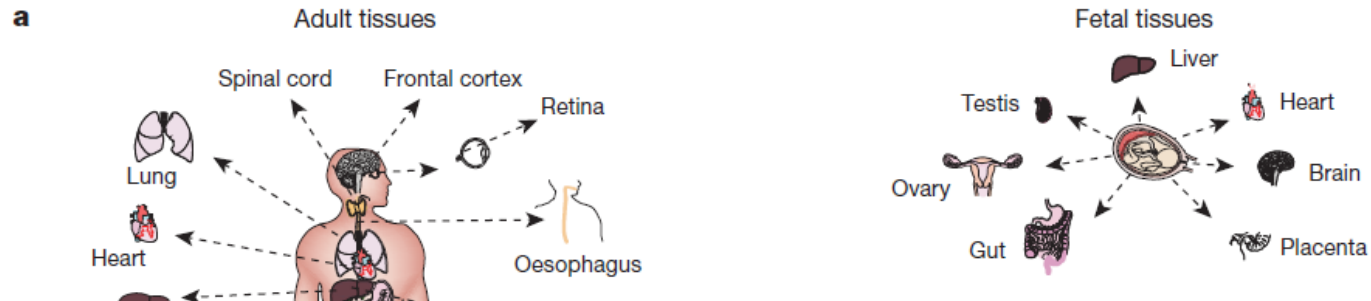
- kapalinová chromatografie
 - reverzní fáze
 - iontoměnič
 - molekulové síto
 - afinitní (IMAC, MOAC, protilátka)
 - HILIC (hydrophilic interaction chromatography)

• off-line

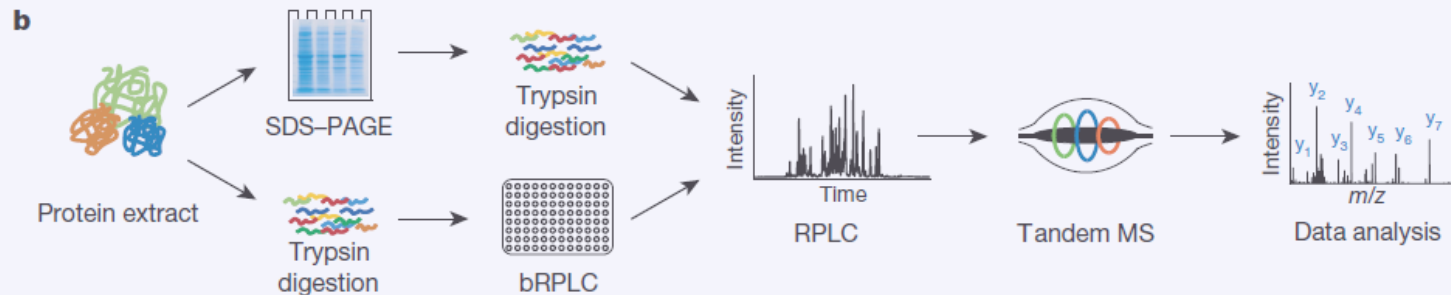
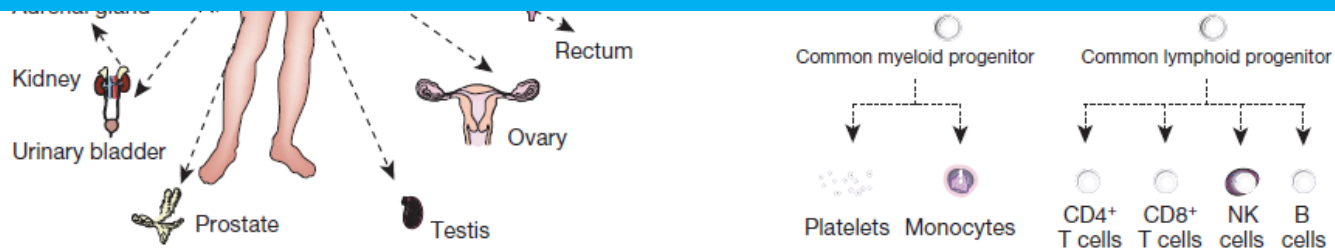
• on-line

A draft map of the human proteome

Min-Sik Kim et al., Nature 509, 575-581 (2014) [doi:10.1038/nature13302](https://doi.org/10.1038/nature13302)



**293 000 non redundant peptides
corresponding to proteins encoded by 17294 genes**

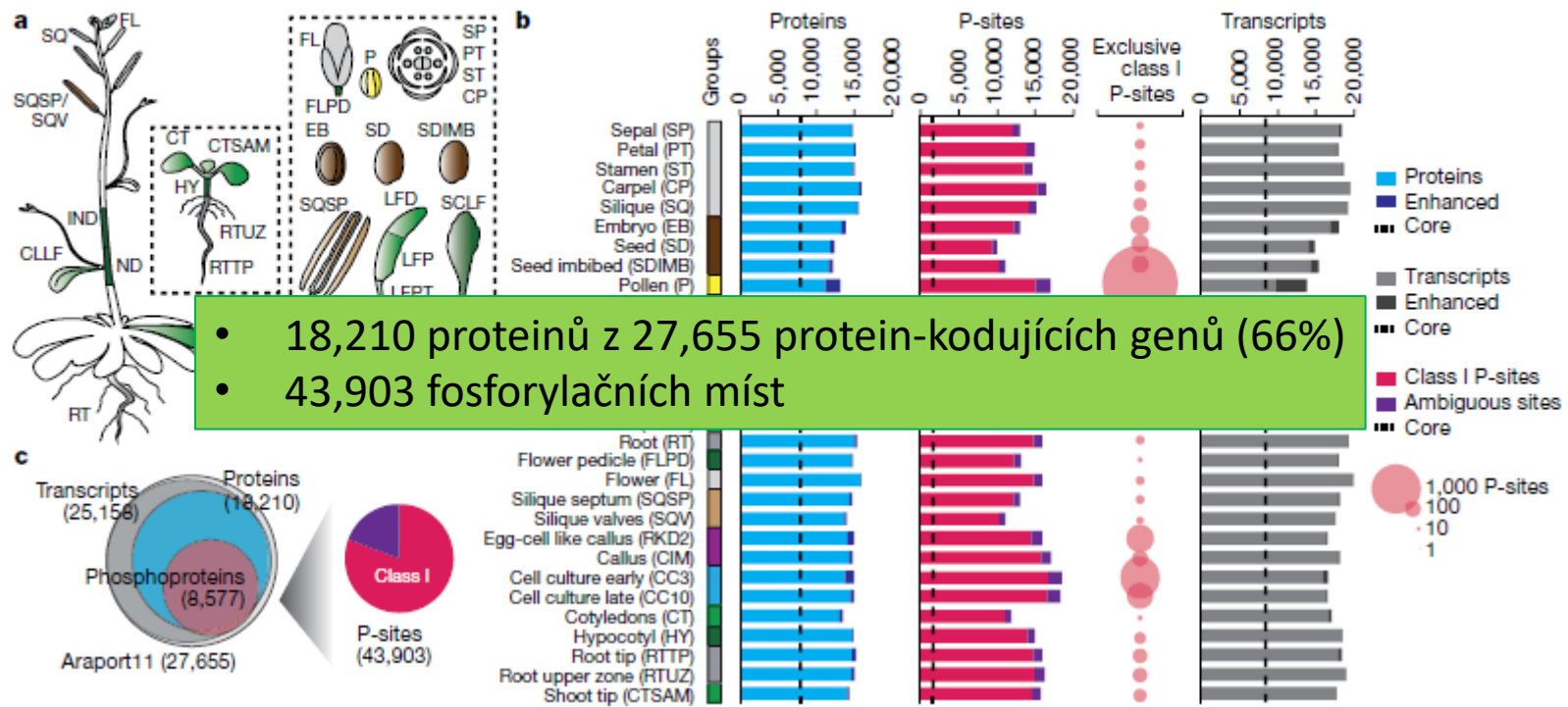


Mapování proteomu *A. thaliana*

- 30 typů tkání
- vedle proteomiky také fosfoproteomika a transkriptomika

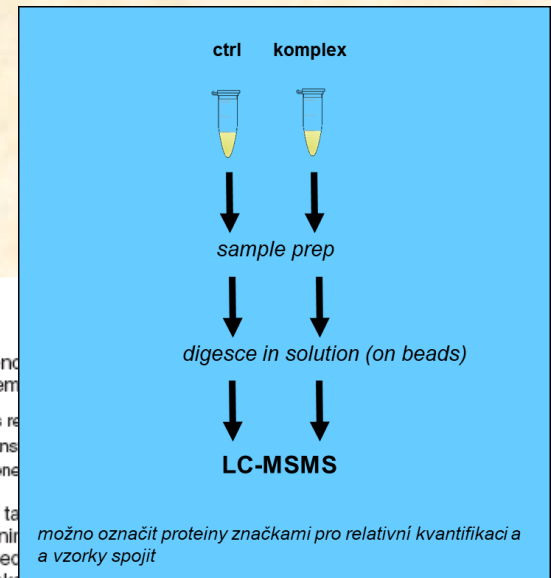
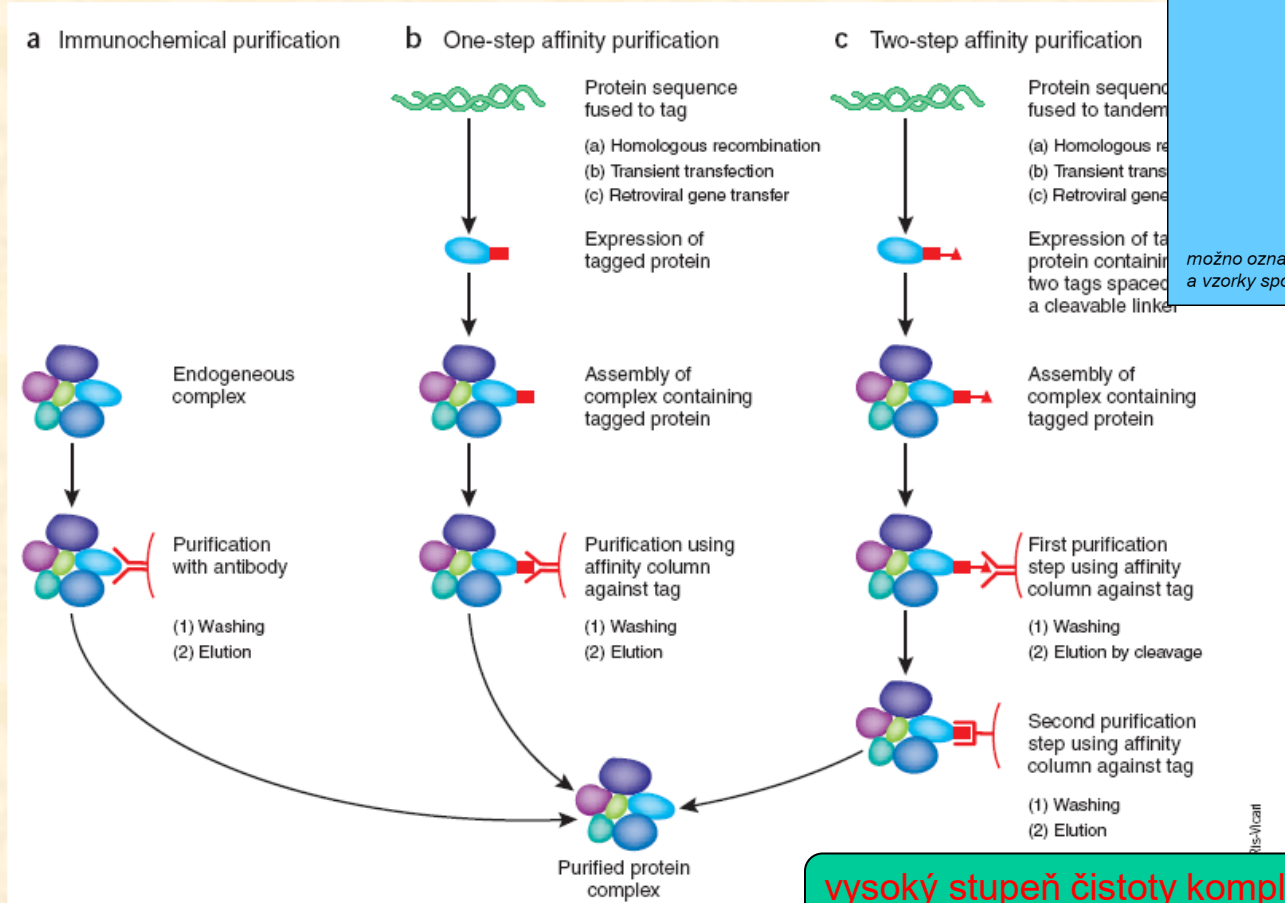


Article



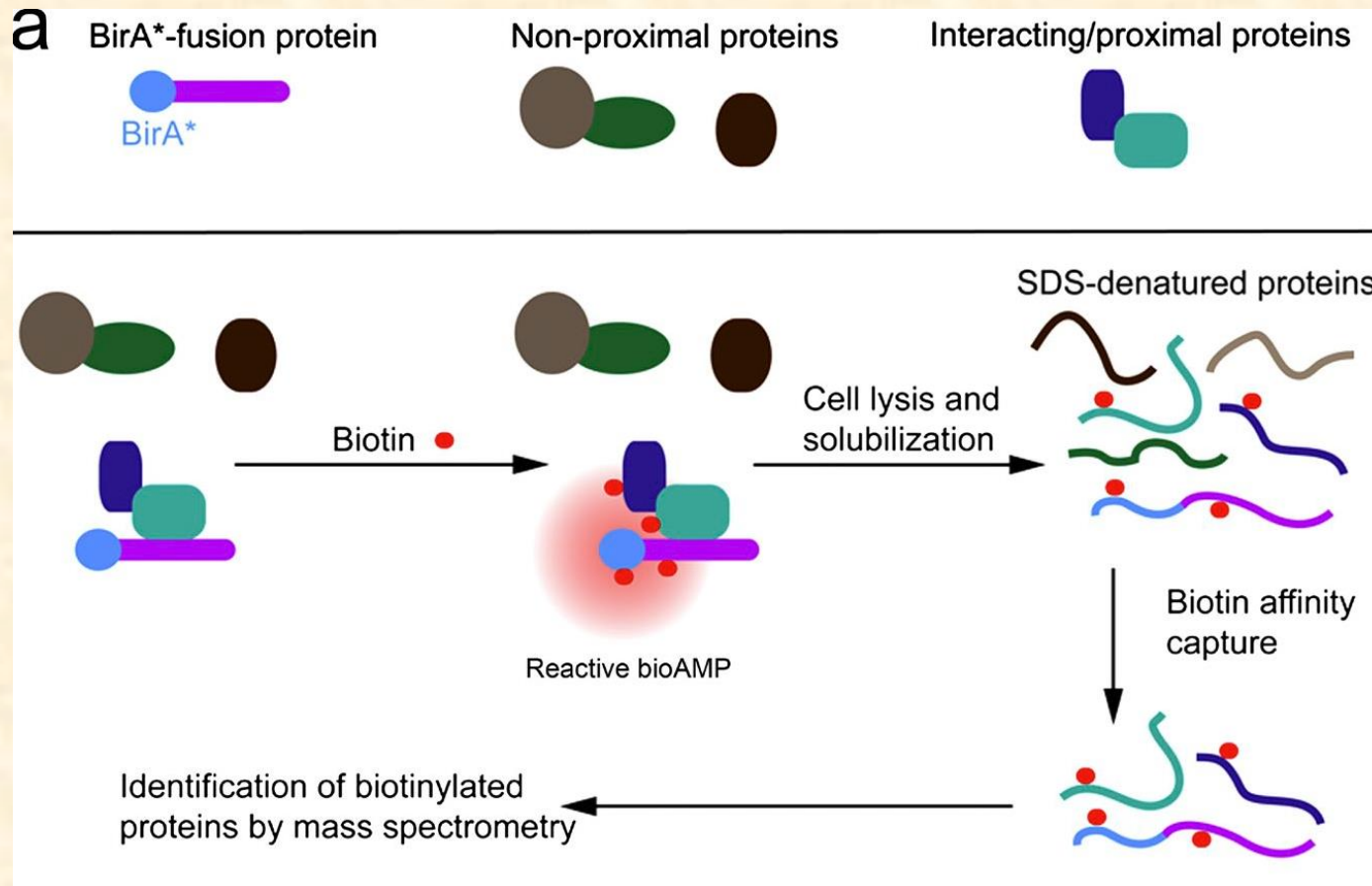
• 18,210 proteinů z 27,655 protein-kodujících genů (66%)
 • 43,903 fosforylačních míst

Analýza proteinových komplexů



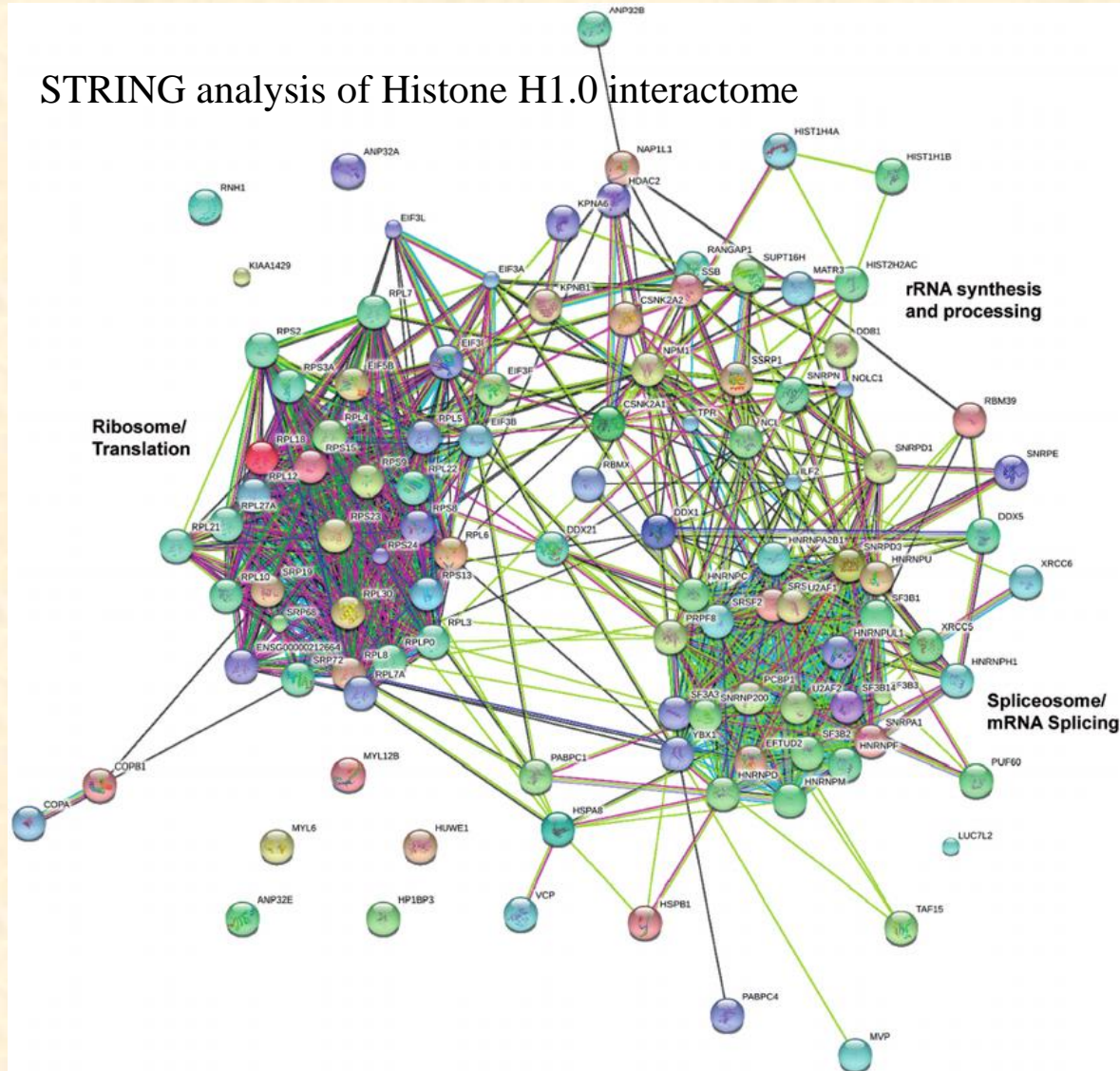
vysoký stupeň čistoty komplexu
ztráta slabě vázaných členů komplexu

Analýza proteinových komplexů BioID



Analýza proteinových komplexů

STRING analysis of Histone H1.0 interactome



Kvantifikace proteinů

Kvantifikace proteinů pomocí MS

Přístupy:

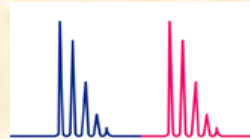
✘ Absolutní kvantifikace

stanovení koncentrace ve vzorku pomocí standardu o známé koncentraci

✘ Relativní kvantifikace

poměrné zhodnocení změny koncentrace proteinu ve srovnávaných vzorcích

Metody:



❖ s izotopicky odlišnými značkami

stejné proteiny/peptidy jsou ve vzorcích odlišeny značkami o různé hmotnosti a takto mohou být měřeny současně

❖ bez izotopického značení (label free)

metody absolutní a relativní kvantifikace založené na statistickém vyhodnocení MS, resp. MS/MS dat

výhodou je možnost srovnání neomezeného počtu vzorků a absence derivatizační reakce či izotopicky značených standardů

The quantitative and condition-dependent *Escherichia coli* proteome

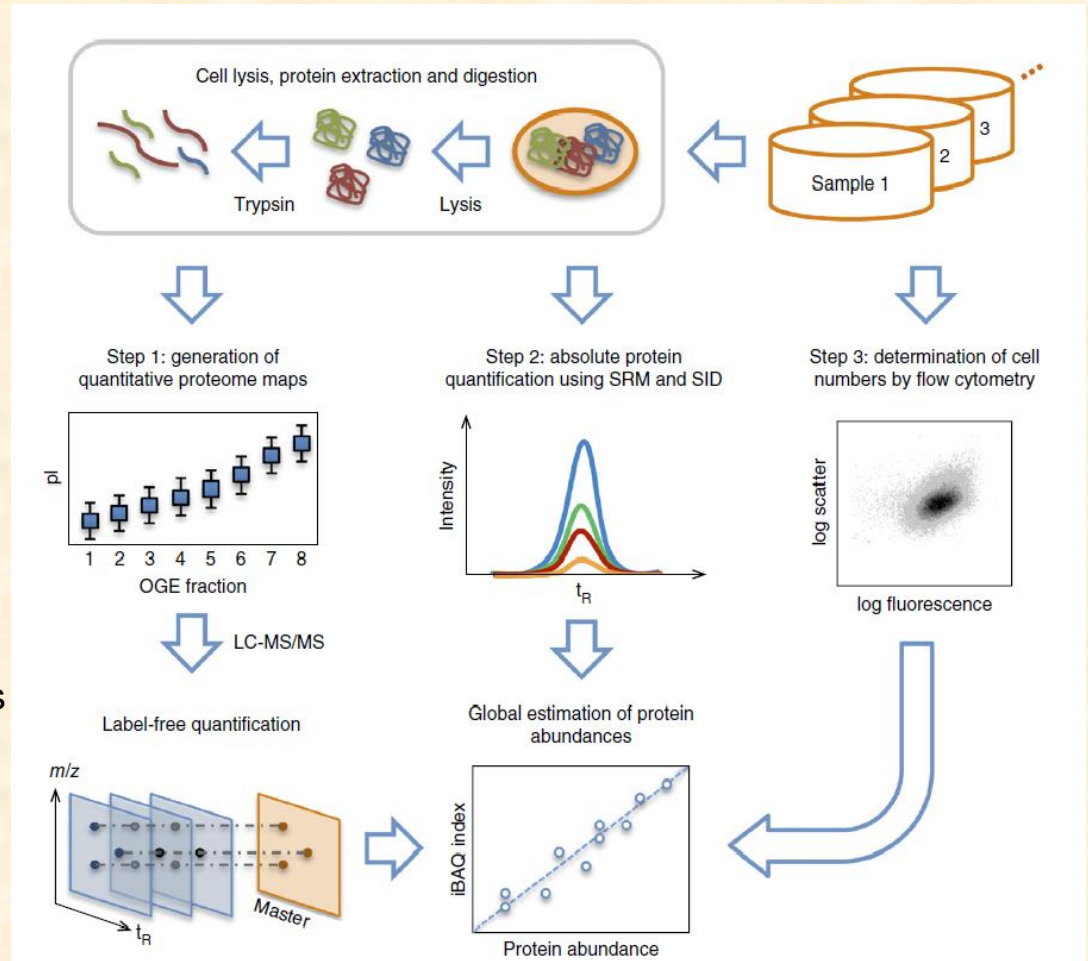
22 different growth conditions in biological triplicates.

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

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

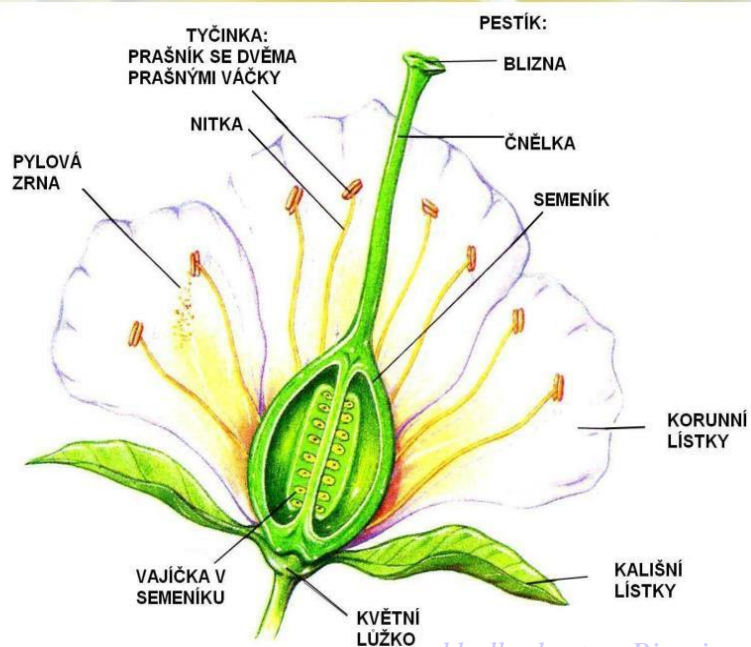
41 proteins related to glycolytic pathway, tricarboxylic acid cycle enzymes and others was selected to absolute quantification

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

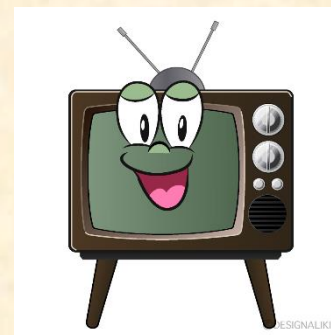


Charakterizace rozsahu a dynamiky regulace translace během vývoje pylu a následném opylení

Obecná stavba květu:



skladba kvetu - Bing images



Britannica.com

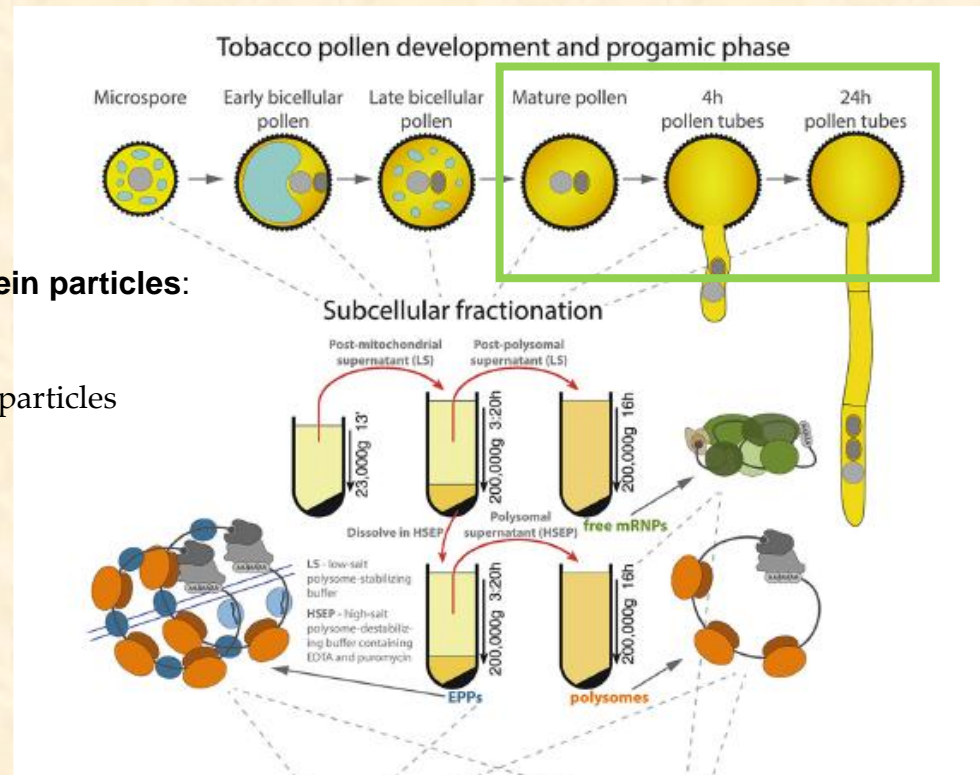
Charakterizace rozsahu a dynamiky regulace translace během vývoje pylu a následném opylení



the three types of mRNA-containing ribonucleoprotein particles:

- **POL** - translating polysomes
- **RNP** - free ribonuclear particles
- **EPP** - long-term storage EDTA/puromycin-resistant particles

6 vývojových stádií – transkriptomická analýza
3 vývojová stádia – proteomická analýza



- **9317** identifikovaných proteinových skupin napříč všemi vzorky
- **2,089** vybráno pro kvantifikaci (na základě přísných kritérií).

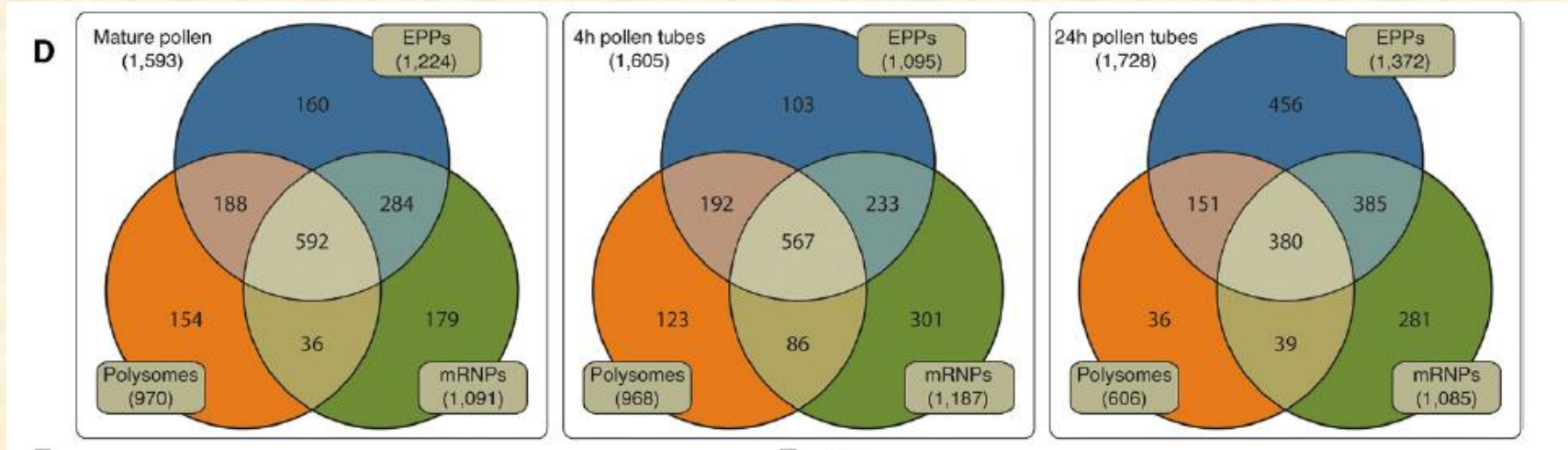
cRNA synthesis and
array hybridization
Agilent 44K Genome Array

Data normalisation and analysis
CLC Main Workbench

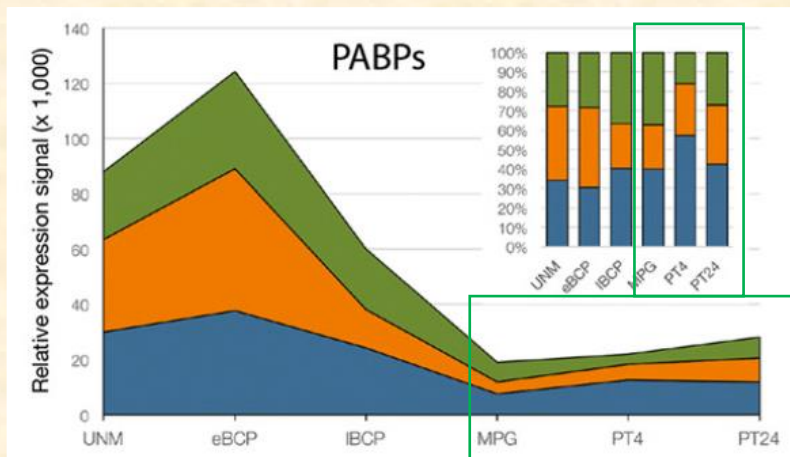
Trypsin digestion and
gel-free LC MS/MS
Orbitrap Elite hybrid spectrometer

Data analysis
Mascot, UniRef100 database

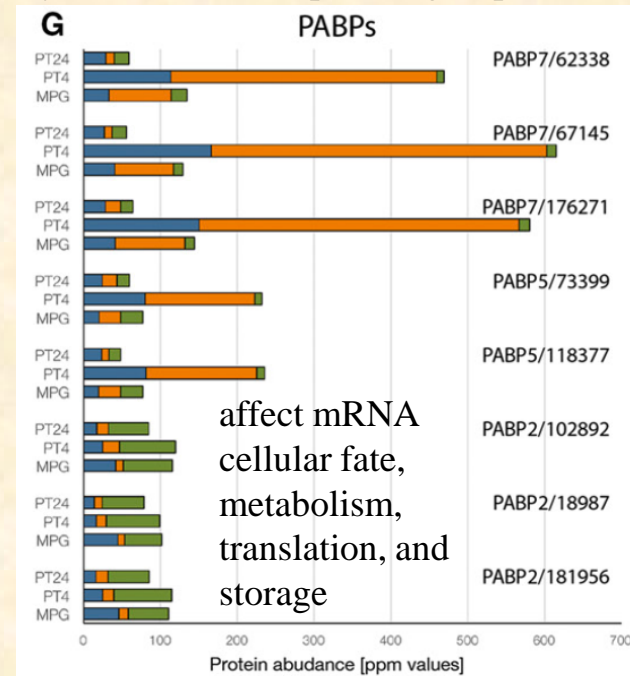
Charakterizace rozsahu a dynamiky regulace translace během vývoje pylu a následném opylení



Overall abundance of PABP transcripts

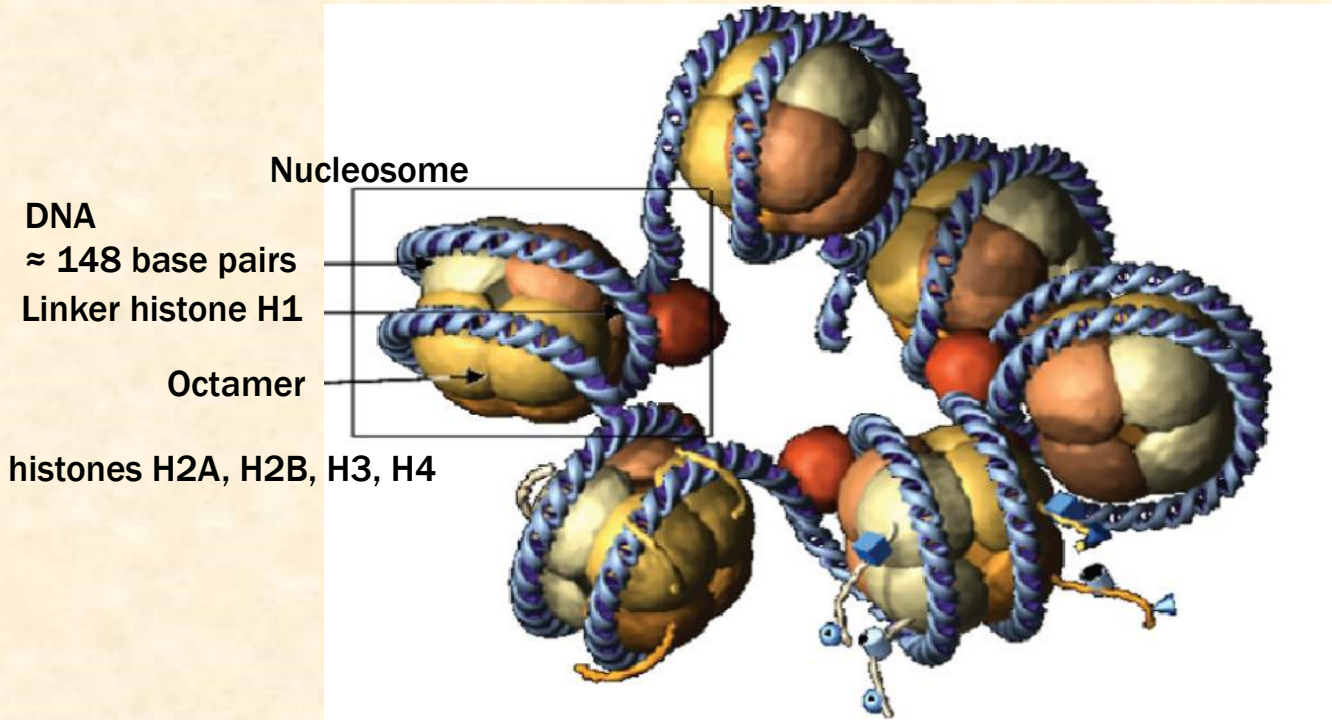


Dynamics of seven protein groups associated with PABPs



Charakterizace posttranslačních modifikací

Chromatin scheme



Inactive chromatin
(heterochromatin)
compacted = DNA not accessible
no transcription

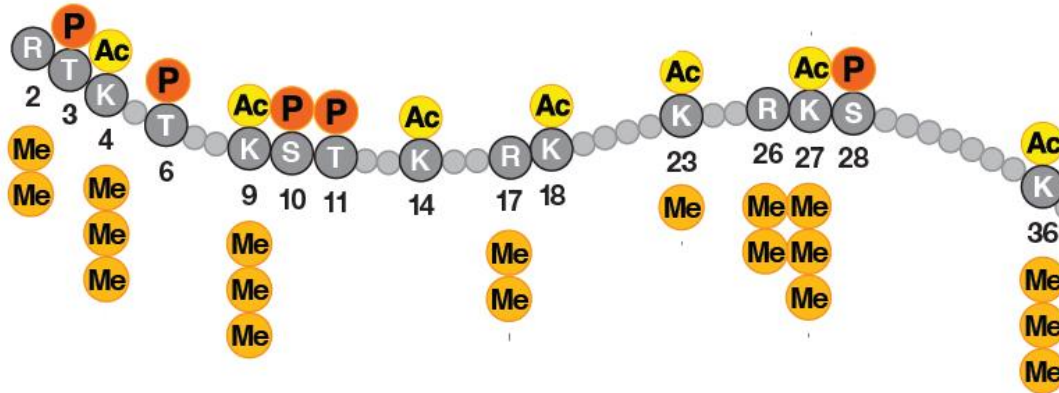
Chemical modifications of histones

Active chromatin
(euchromatin)
open form = DNA accessible
transcription regulation

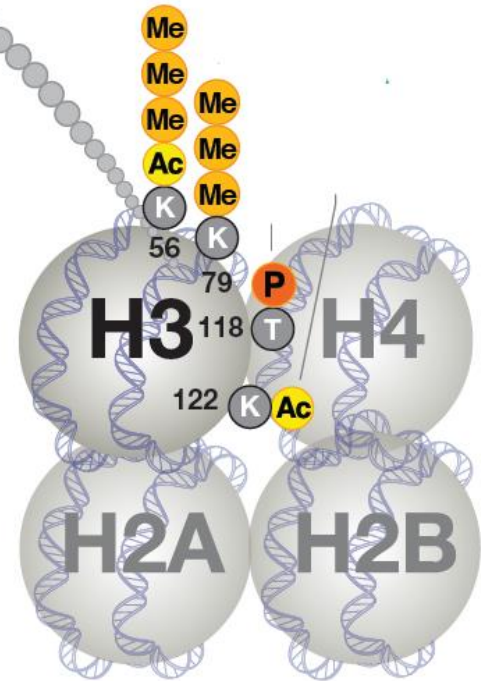
Modification state of histones is orchestrated by set of enzymes, such as histone acetyltransferases (HATs), histone deacetylases (HDACs); histone methyltransferases; histone demethylases and ubiquitin-specific proteases

Martinet and Bertrand, *Cancer Management and Research* 3:117–141 (2011)
Spotswood and Turner, *J. Clin. Invest.* 110:577–582 (2002)

Histone H3 most frequent PTMs

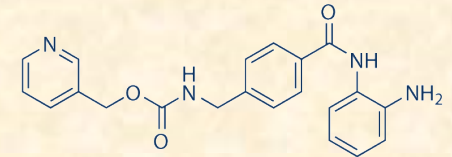


Ac – acetylase
 Me – metylace
 P - fosforylace



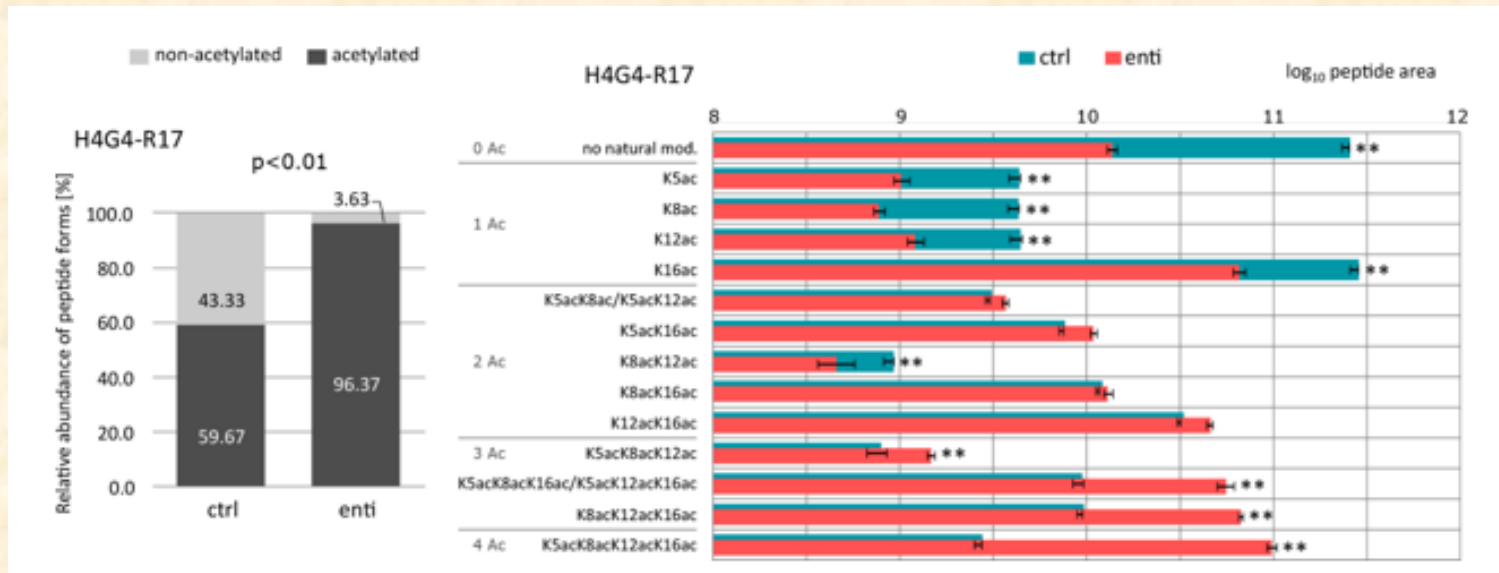
Hodnocení účinku inhibitorů histondeacetyláz

HDAC inhibitors – potential for cancer treatment



Entinostat (MS-275)

Pyridin-3-ylmethyl 4-((2-aminophenyl)carbamoyl)benzylcarbamate



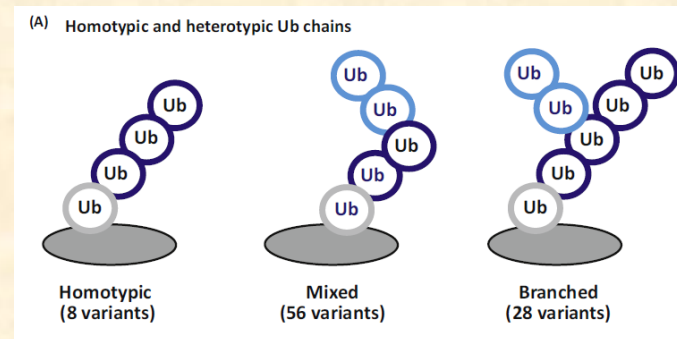
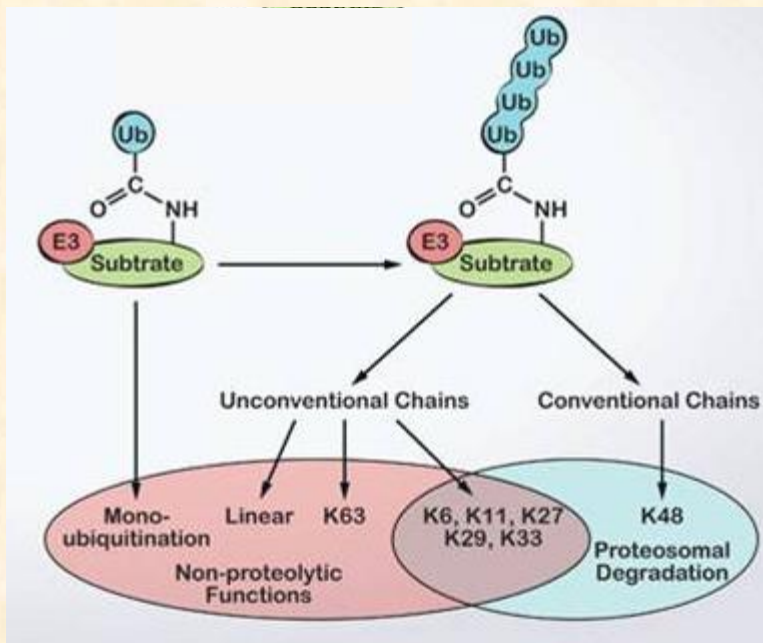
MEC1 – buněčná linie odvozená z buněk pacienta s chronickou lymfocytární leukémií (B-CLL)

Ubikvitinace

Protein ubiquitination regulates many cellular processes including transcription, endocytosis, cell cycle control, signal transduction, stress response, DNA repair as well as **proteasomal-mediated degradation**

ubikvitin – protein 8.5 kDa (76 AMK)

MQIFV**K**TLTG**K**TITLEVEPSDTIENVKAK**I**QD**K**EGIPPDQQRLIFAG**K**
 QLEDGRTLSDYNIQ**K**ESTLHLV LRLRG**G**



Stolz A. et al., *Trends in Cell Biology*, 28 (1), 1-3 (2018)

Charakterizace ubikvitinací

Schéma experimentu pomocí imunoprecipitace

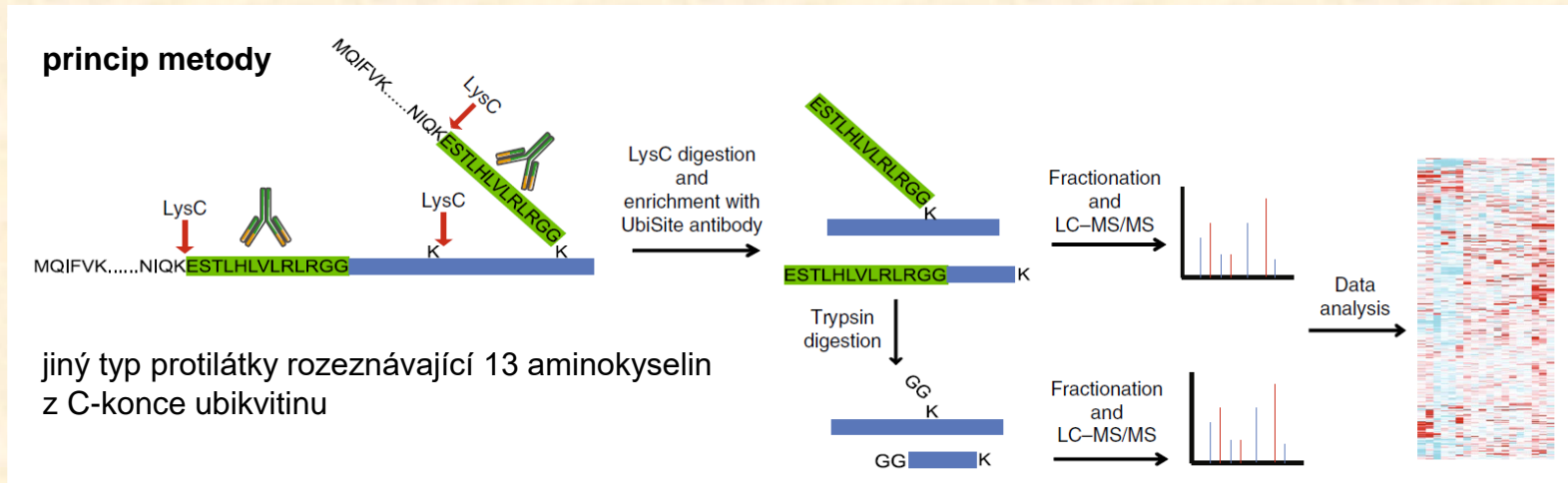
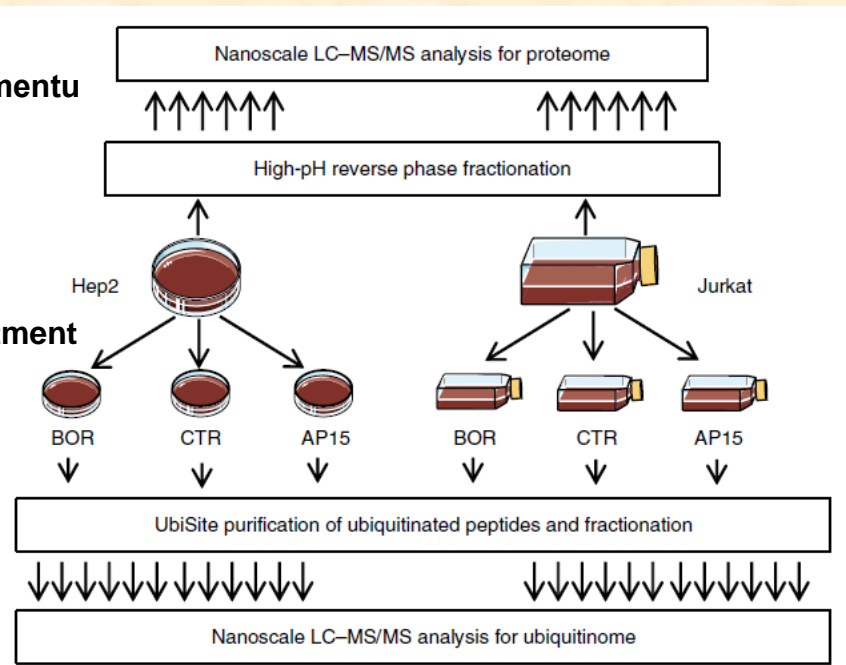


schéma experimentu

two human cell lines
Hep2
Jurkat

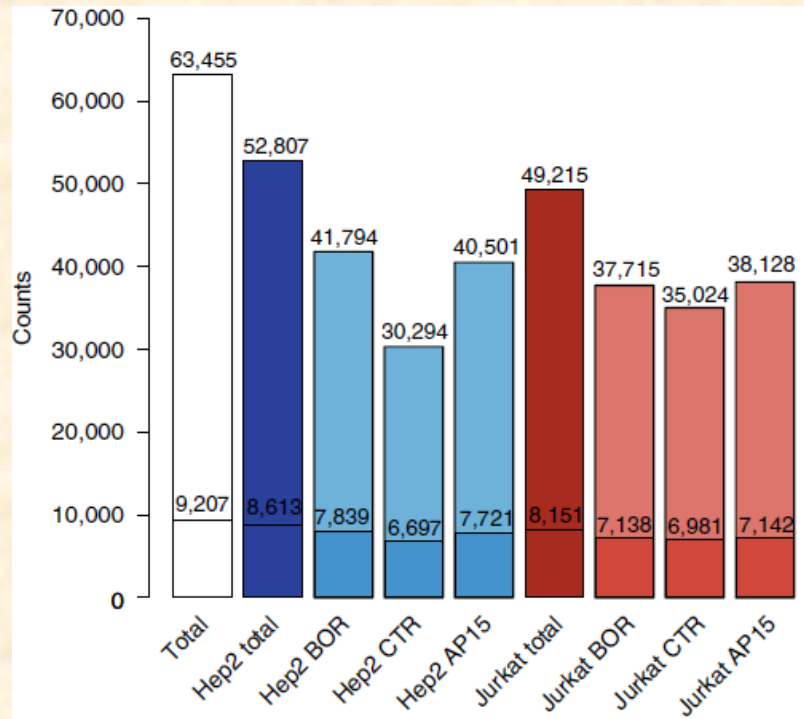
proteasomal inhibitors treatment

BOR - bortezomib
AP15 - b-AP15



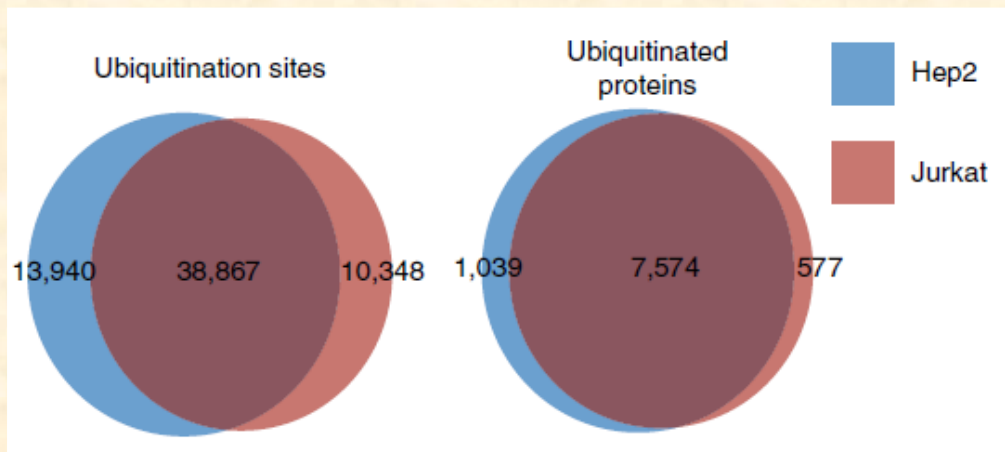
Charakterizace ubikvitinací

Schéma experimentu pomocí imunoprecipitace II



Numbers of ubiquitination sites and ubiquitinated proteins identified in the two cell lines ($n = 3$ independent biological replicates).

Numbers on the top of bars indicate identified ubiquitination sites; numbers within bars indicate identified proteins.



Overlap of ubiquitination sites and ubiquitinated proteins between Hep2 and Jurkat cells.

Numbers indicate the number of identified ubiquitination sites (left) or proteins (right).

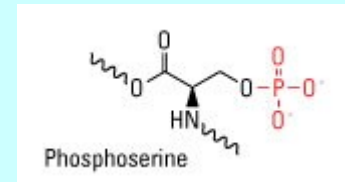
Fosforylace

Protein Phosphorylation is of Fundamental Importance in Biological Regulation

in eukaryotes predominantly on

S, T, Y

1800 : 200 : 1



Hunter, T., and Sefton, B.M., PNAS 77, 1311–1315 (1980)

- S, T, Y represent of 17% of the total amino acids in an average human protein
- it results in about **700 000** potential phosphorylation sites

Ubersax, J.A. et al., Nature 425, 859–864 (2003)

- another estimate

human	13 000 phosphoproteins	230 000 sites
mouse	11 000	156 000
yeast	3 000	40 000

Vlastaridis P. GigaScience. 6 (2): 1–11 (2017)

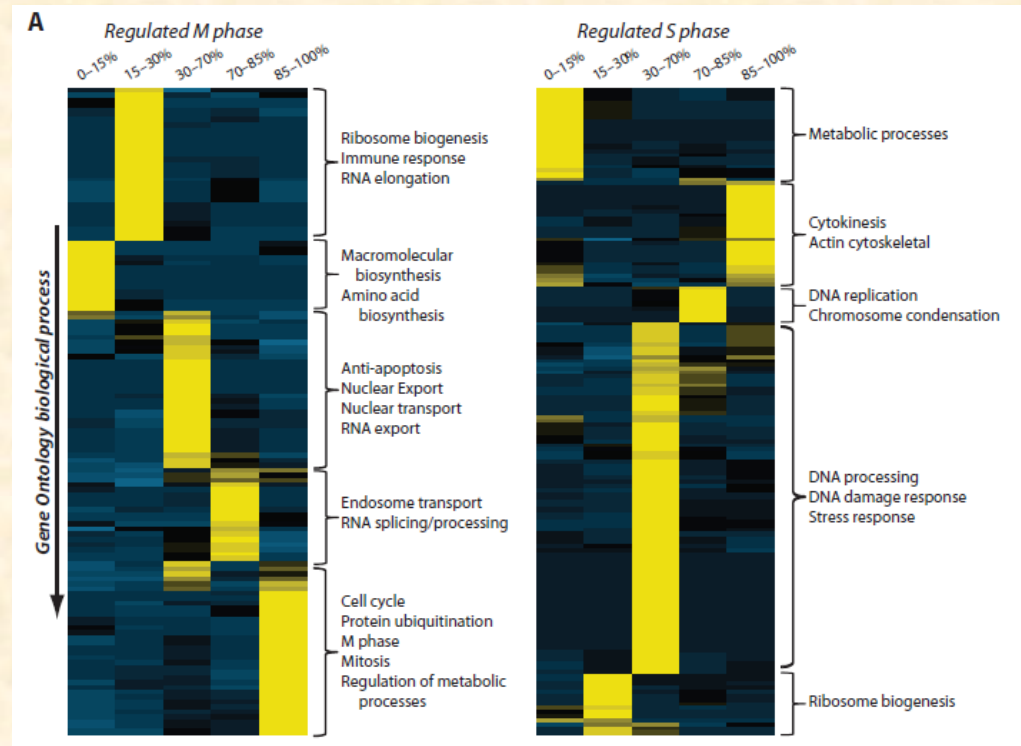
Analýza fosfoproteomu

změny během buněčného cyklu

Olsen J.V. et al., *Sci. Signal.*, 3 (104) ra3 (2010)

- quantified 6027 proteins
- quantified 20,443 unique phosphorylation sites

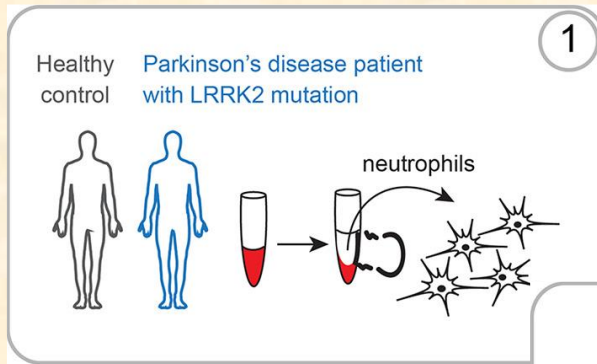
- HeLa buňky
- SILAC značení
- TiO₂ frakcionace
- LC-MS/MS (Orbitrap)



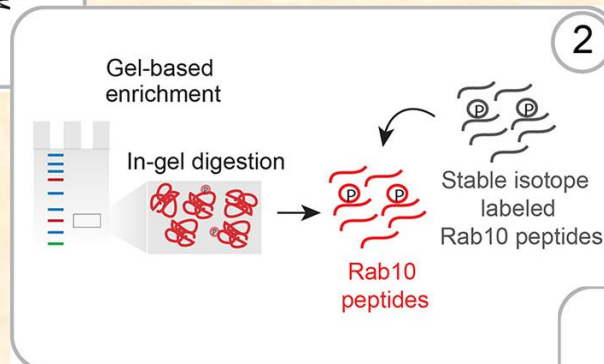
The panels show the phenotypic phosphoproteome comparison organized by GO biological process for mitotic (left) and S phase (right) cells. Proteins involved in metabolic processes have high-occupancy phosphorylation sites during mitosis, but low-occupancy sites during S phase (color scale: yellow, high overrepresentation; dark blue, high underrepresentation).

Změna fosforylace Rab10 u pacientů s Parkinsonovou nemocí

assay to measure increased phospho Rab levels using synthetic stable isotope-labeled analogues for both phosphorylated and non-phosphorylated tryptic peptides surrounding Rab10-Thr73

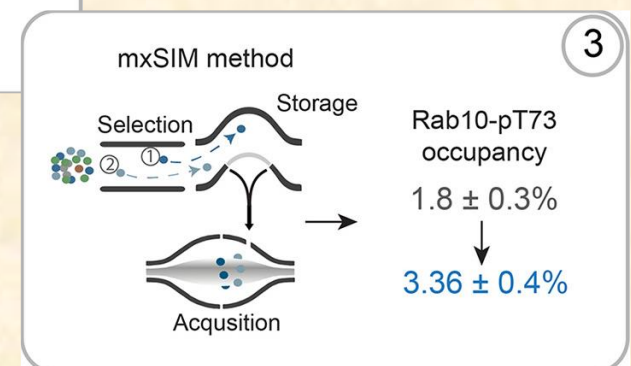


Fosforylace na Thr73



LOD – 50 amol (~ 50 fg)

Zvýšená úroveň fosforylace cca 2x



MALDI-MS zobrazování

Princip MALDI-MS zobrazování

- systematické scanování plochy vzorku bod po bodu
- obraz odpovídá plošné distribuci jednotlivých m/z
tj. **distribuci peptidů resp. proteinů**

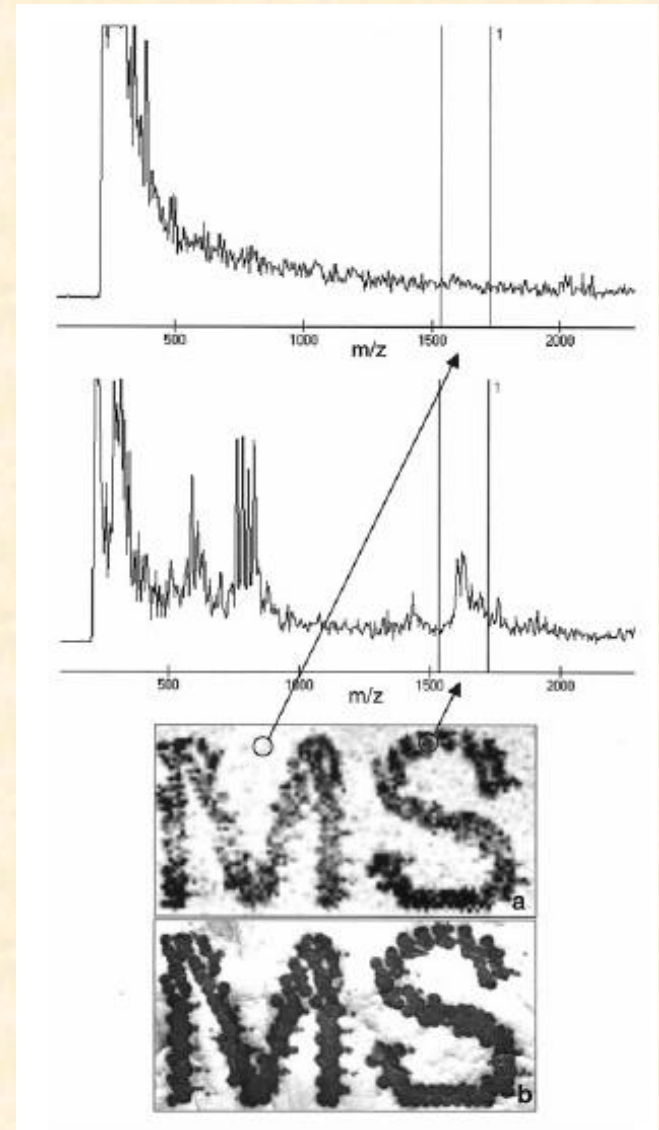
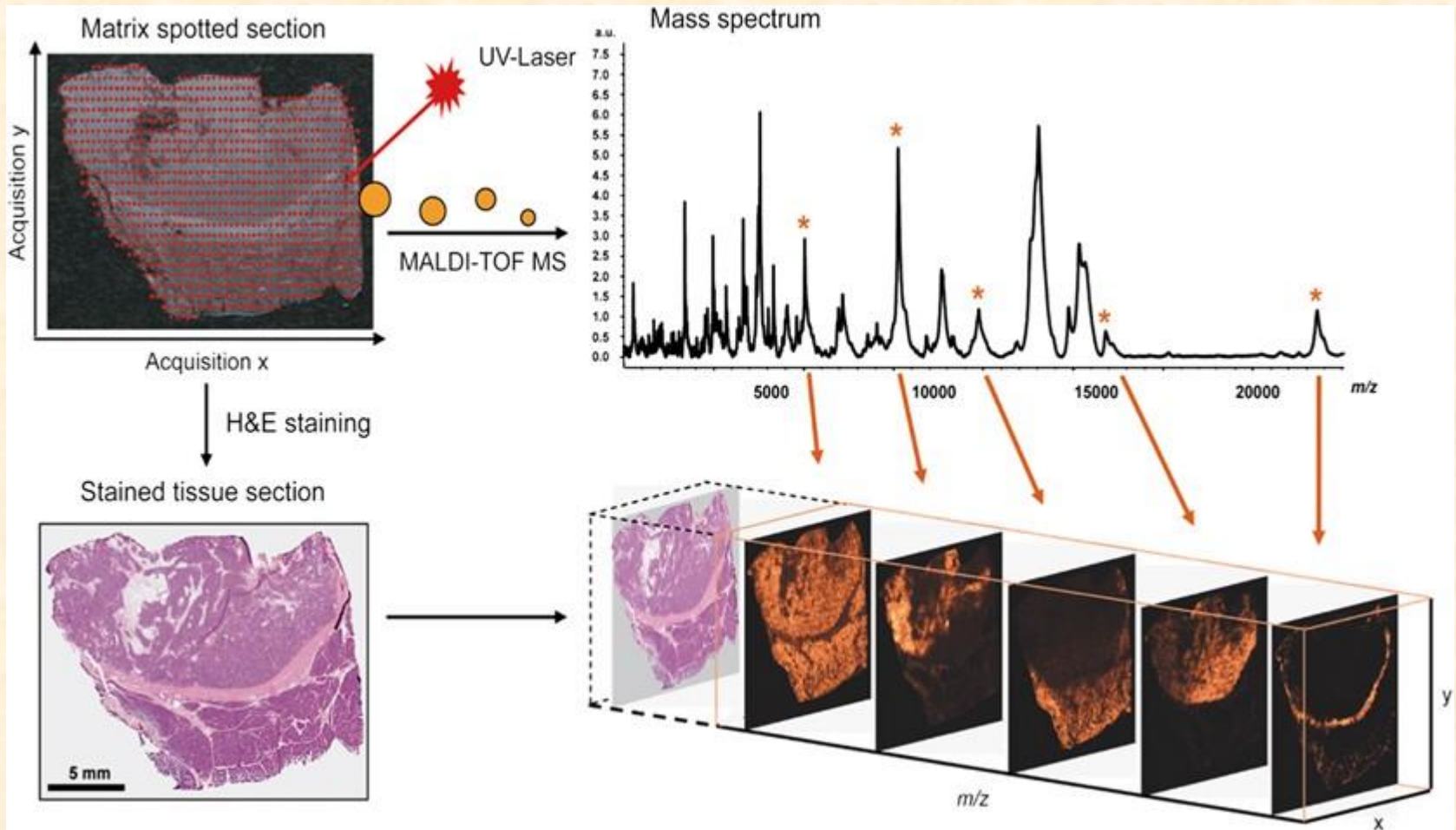
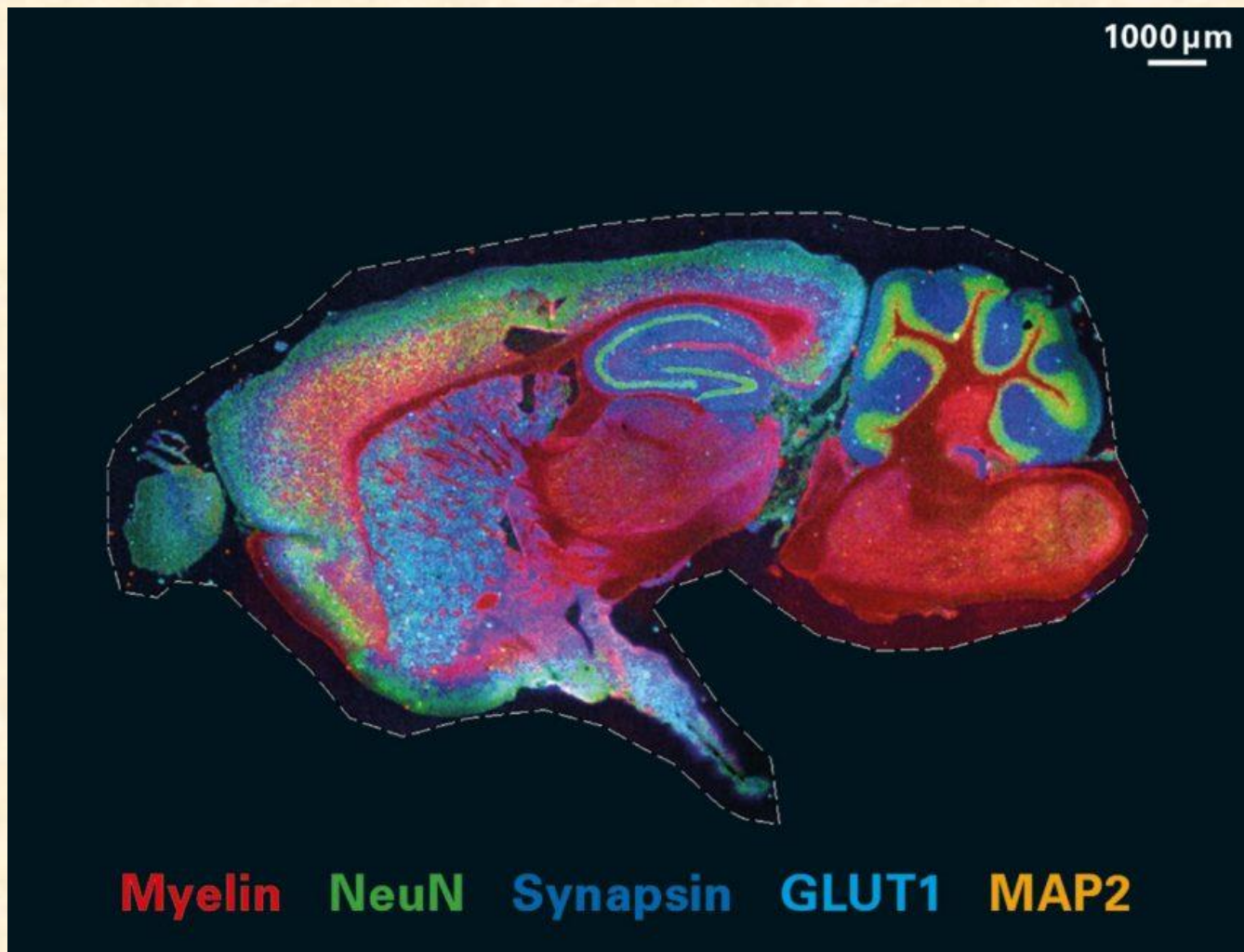


Figure 3. Neurotensin was added to the ink of a printer. The mass spectrometry image (a) (100×50 pixels, 3×1.5 mm) obtained of the protonated neurotensin peak matches with the optical image (b).

MALDI-MS zobrazování



MALDI-MS zobrazování

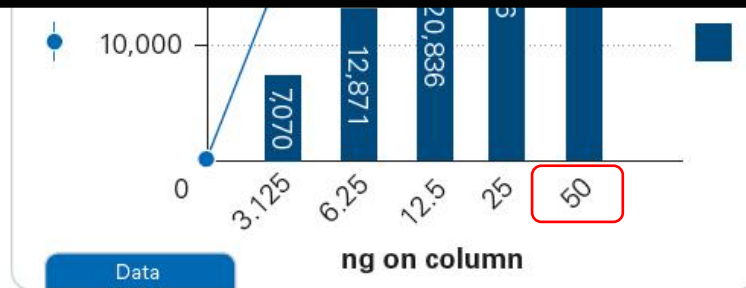
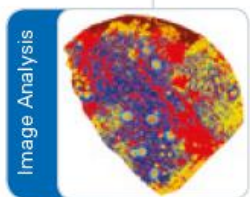
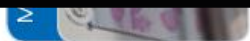


SpatialOMx Workflow

SpatialOMx is the combination of using MALDI Imaging and ESI to unlock a 5th dimension and show the distribution of target compounds. On the timsTOF fleX, use the MALDI source to map the distribution of molecules in your sample and identify regions of interest. After extracting and preparing the sample for LCMS, use the ESI source for the highest level of identifications



An average cell measures approximately 10 μm in diameter. Using MALDI guided laser microdissection (LCM) for example, a 50 μm LCM tissue section will contain roughly 25 cells; enough for bottom-up proteomics analysis on the timsTOF fleX. One instrument that gives you the capability to do both – high spatial resolution, high speed MALDI and high sensitivity ESI analysis.



Další vývoj...



- **Dokonalejší popis proteomu**
základní výzkum, pochopení molekulárních procesů...
- **Charakterizace proteomu jedné buňky**
základní výzkum, postižení heterogenity tkání, variability jednotlivých populací buňky
- **Zvýšení průtočnosti proteomické analýzy**
praktické aplikace, především klinická praxe

Dokonalejší popis proteomu

- rozvoj hmotnostně spektrometrické instrumentace
- rozvoj postupů proteomické analýzy

Vzorek

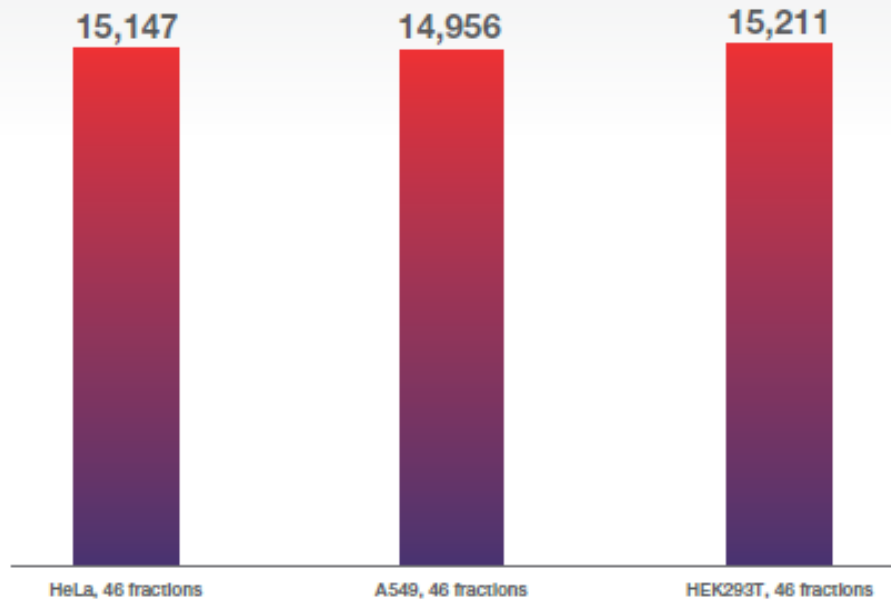
GIGO

Úprava vzorku

MS analýza

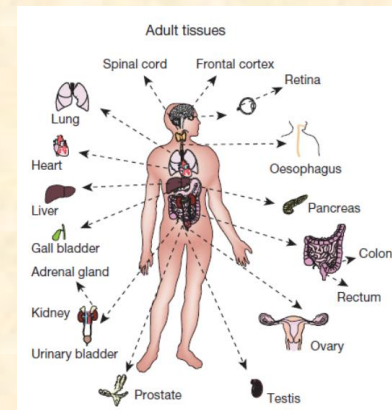
Vyhodnocení dat

Near whole-proteome depth of coverage in 4.5 hours

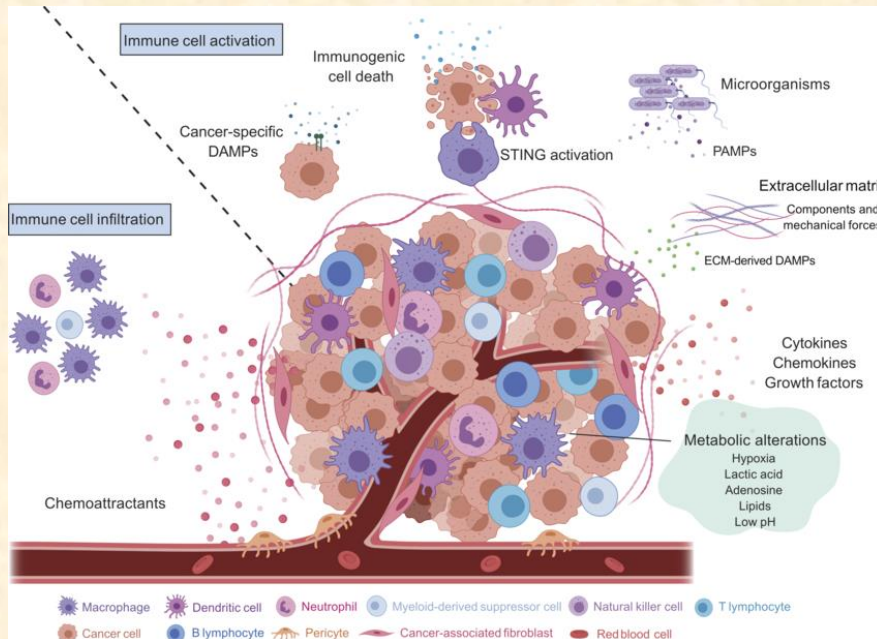


Thermo application note

- tři buněčné linie ($\sim 10 \mu\text{g}$)
- 46 frakcí
- 200 ng/frakce
- LC-MS/MS (5,5 min)

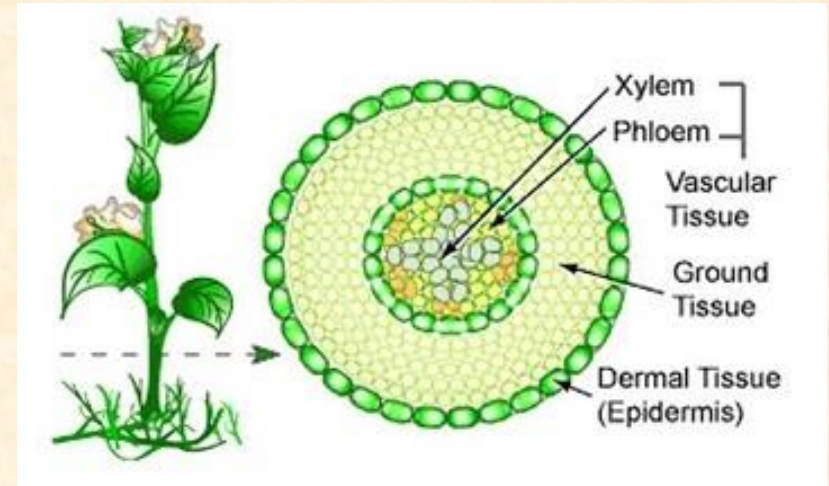


Proteomika jedné buňky Proč?



buněčná struktura nádoru

Koliaraki V. et al., J. Exp. Med., 217 (4), e20190457 (2020)

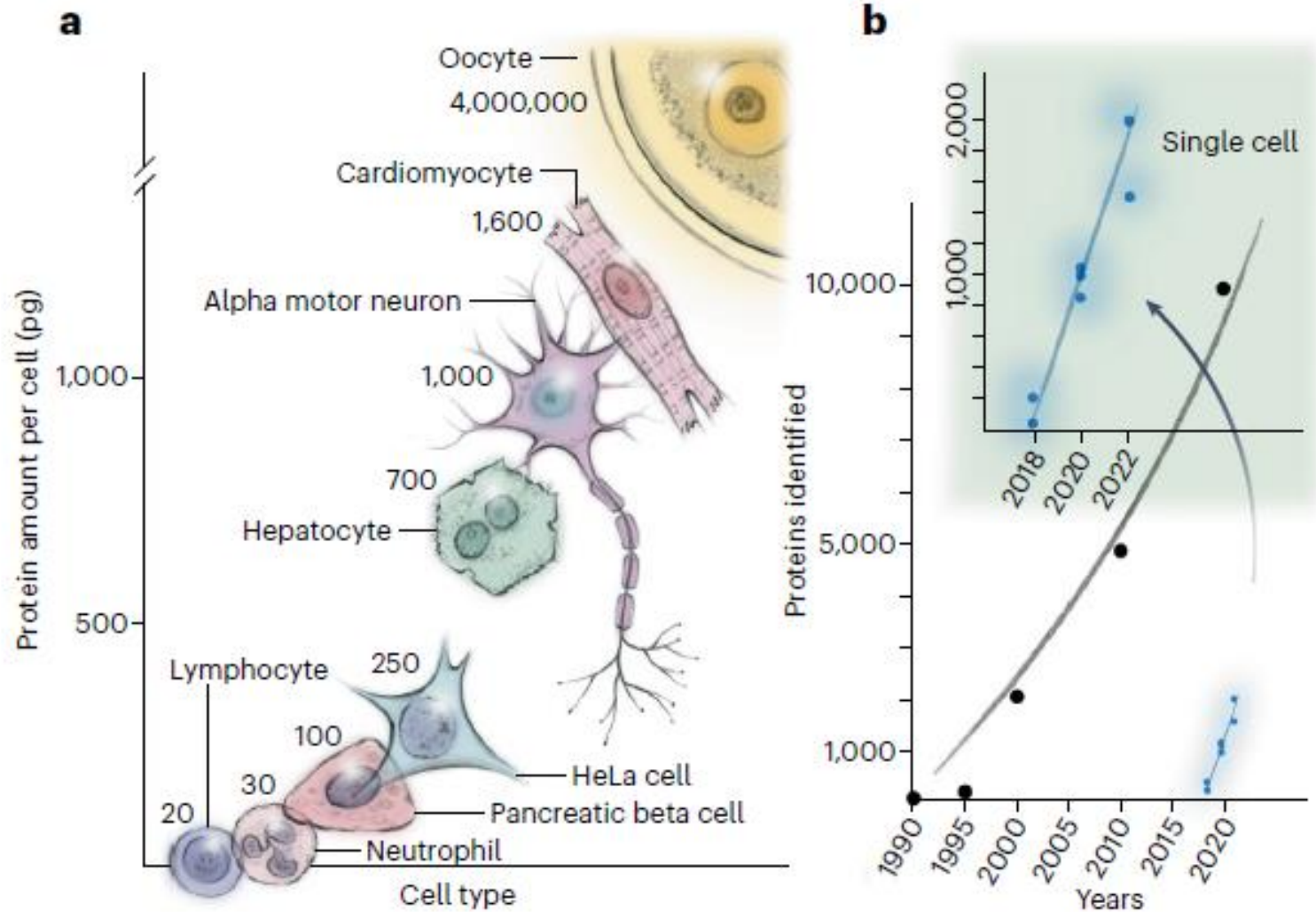


rostlinná pletiva (stonek)

<https://www.phdnest.com/anatomy-of-flowering-plants/>

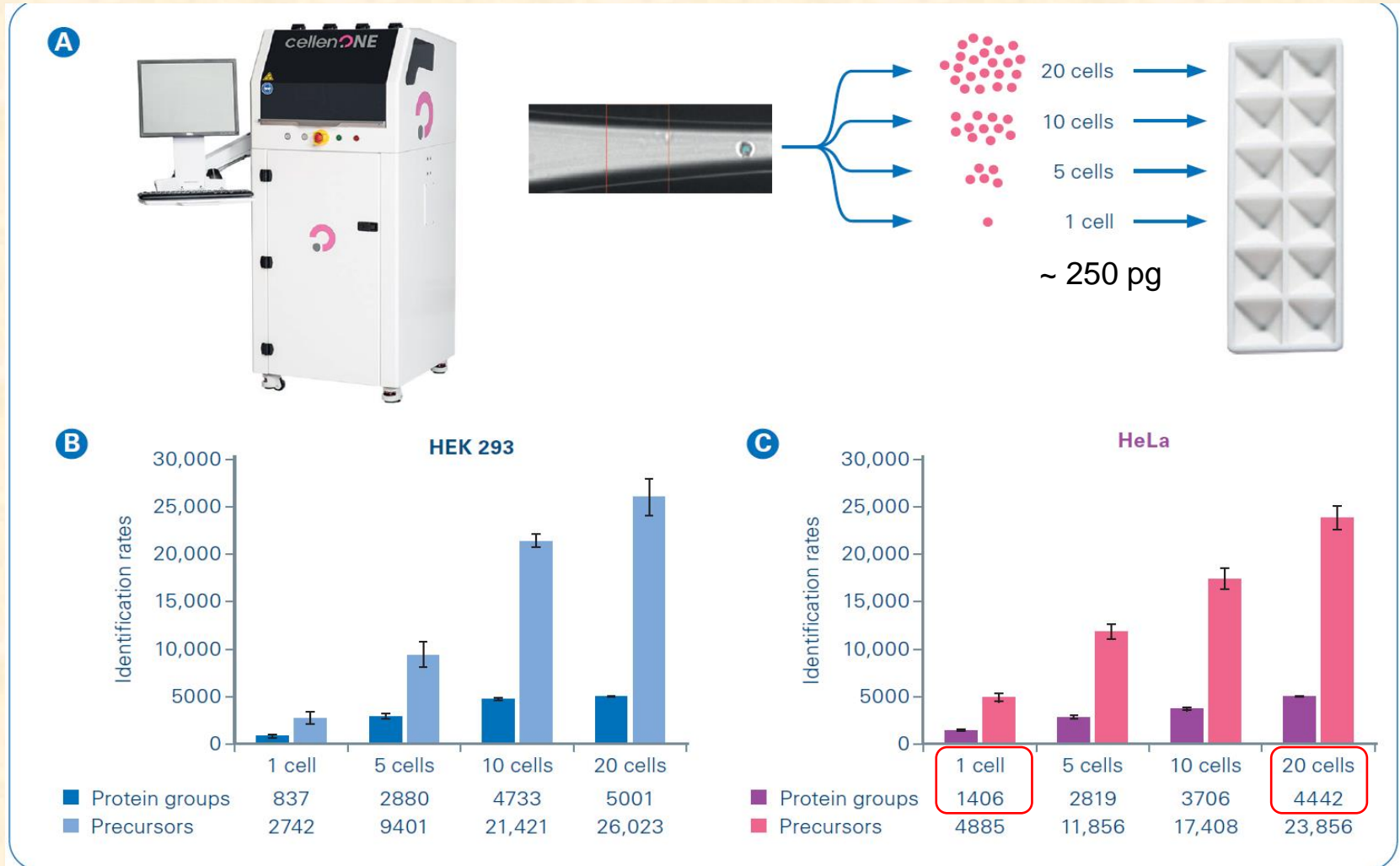
Další krok k hlubšímu poznání molekulární podstaty života.

Proteomika jedné buňky



Proteomika jedné buňky

02/2022



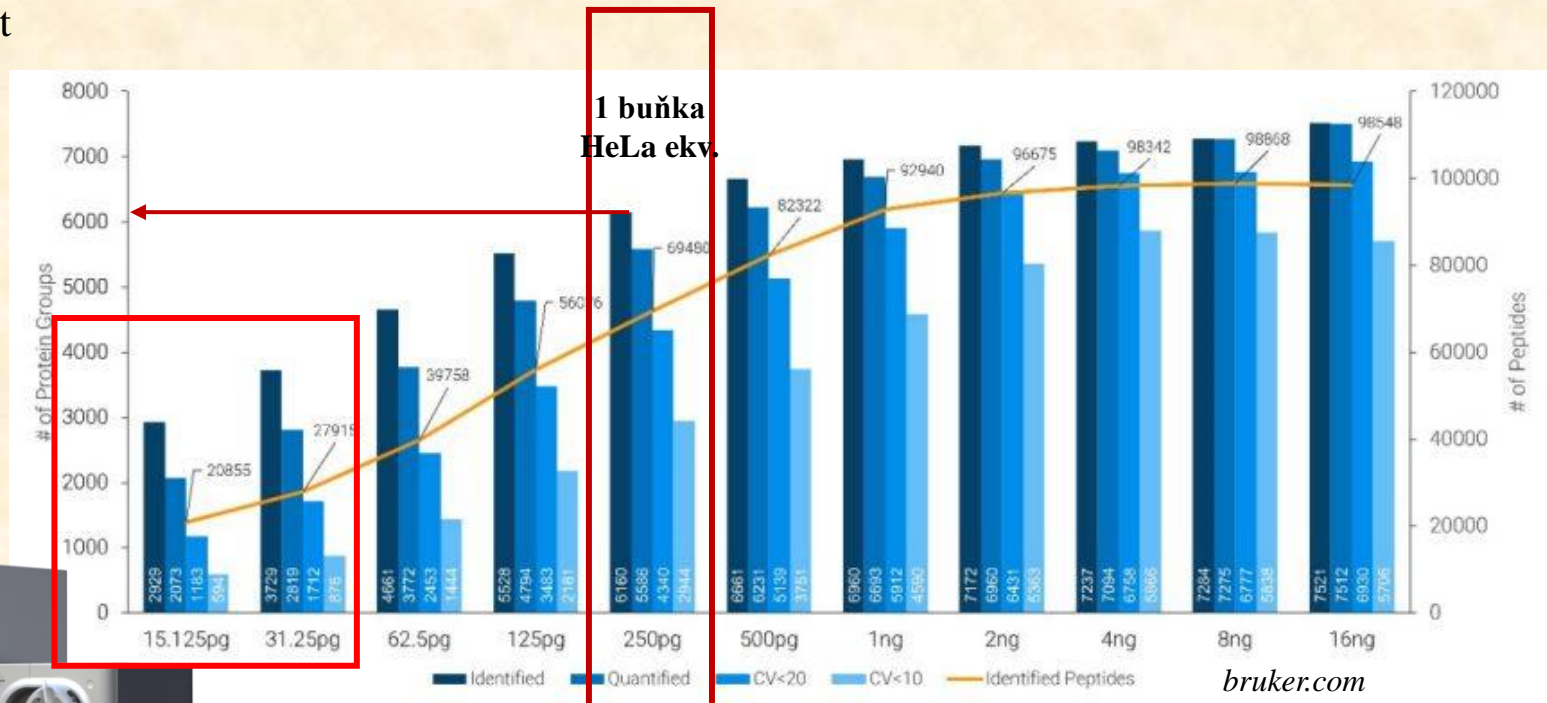
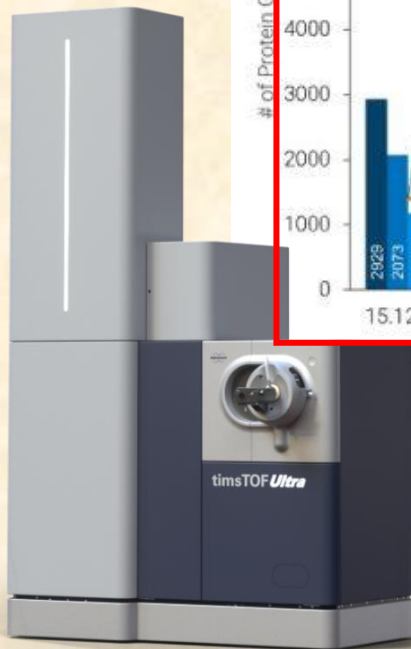
HEK 293 – embryonální buňky odvozené z ledvin plodu

HeLa - nádorové buňky izolované z karcinomu děložního hrdla

Proteomika jedné buňky

nanoElute 2 + TimsTOF Ultra
RP C18 column
(25 cm x 75 µm i.d., 1.6 µm)
22 min gradient
K562 cell line
in triplicates
DIA, ?

06/2023



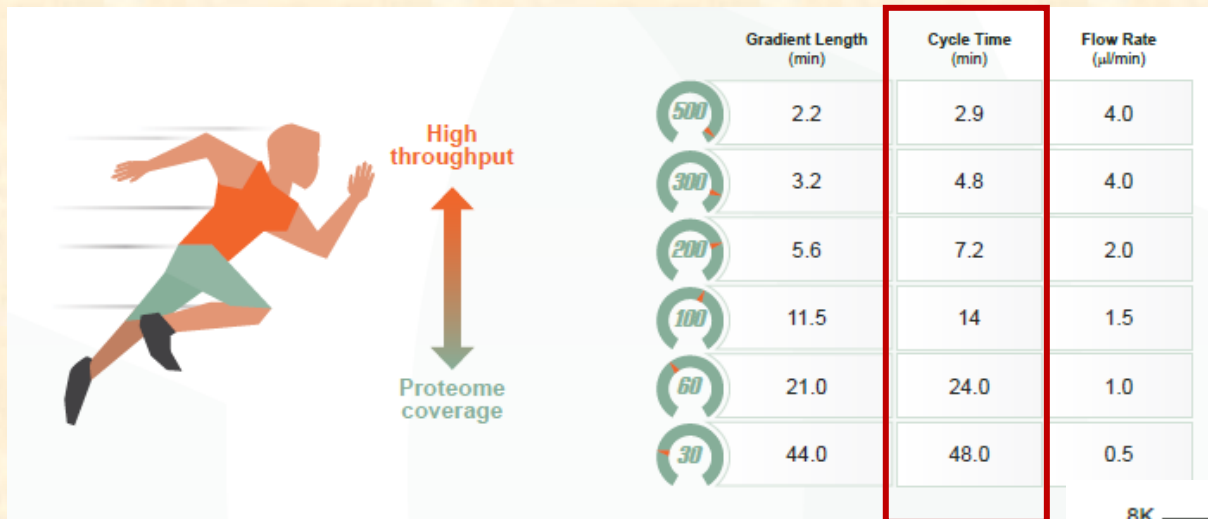
K562 – buněčná linie odvozená od pacientů s chronickou myeloidní leukémií

Bruker.com, 1901442-timstof-ultra-ebook-rev2.pdf

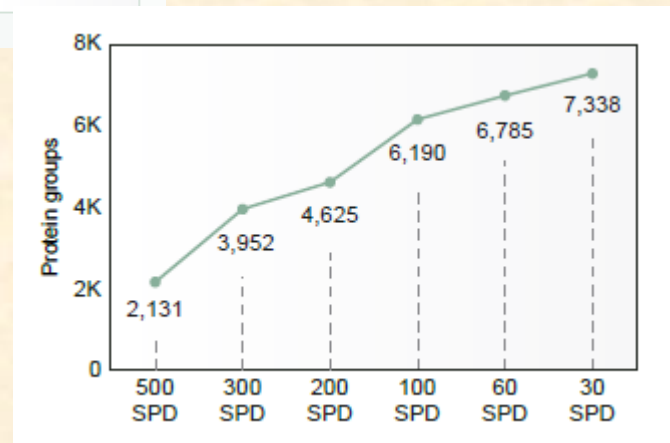
Rychlost proteomické analýzy

klinická praxe

Počet vzorků/den

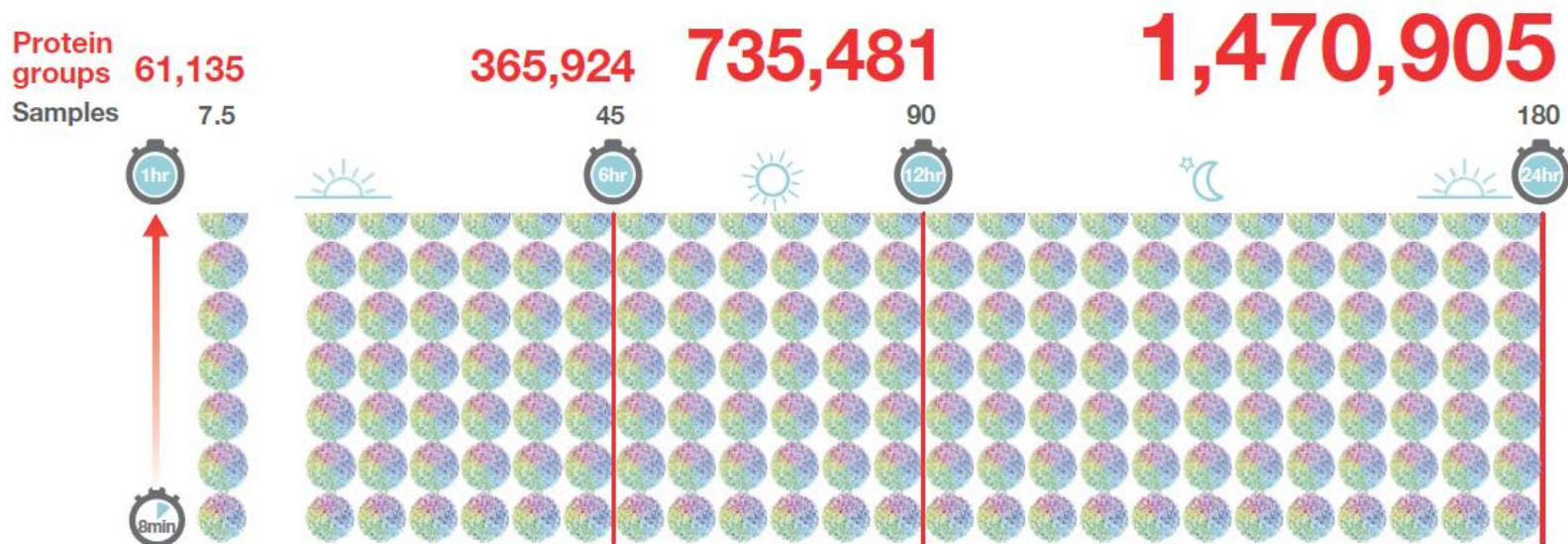


- automatizace přípravy vzorku
- rychlá LC separace
- vysoká rychlost sběru dat v MS



Rychlost proteomické analýzy

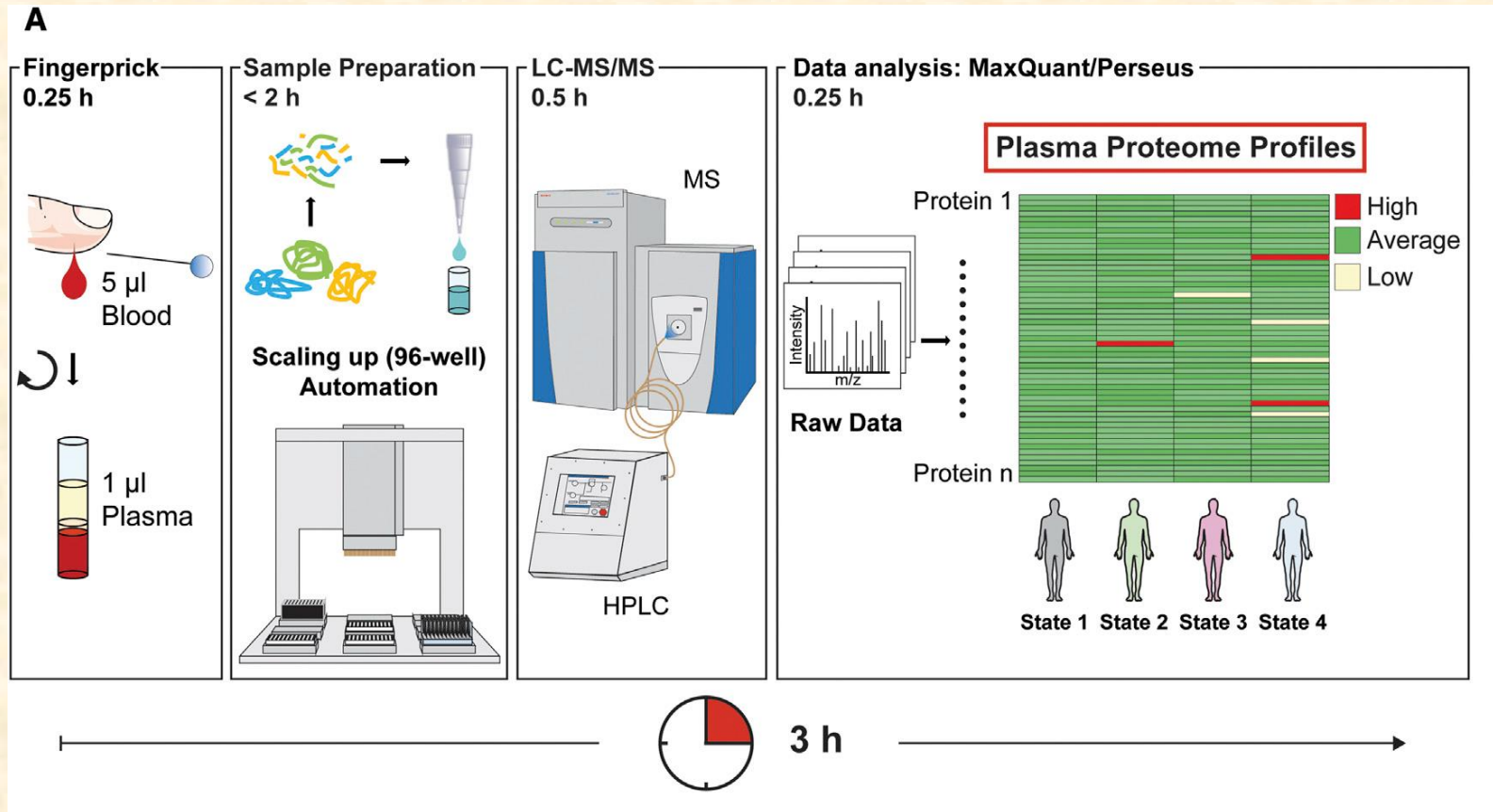
In one day, analyze over 1.4 million protein groups from 180 samples



- 200 ng HeLa digest
- LC-MS/MS (Orbitrap Astral)
- **doba analýzy – 8 min**
- 180 vzorků/den
- **8000 proteinů/vzorek**

Analýza krevní plazmy

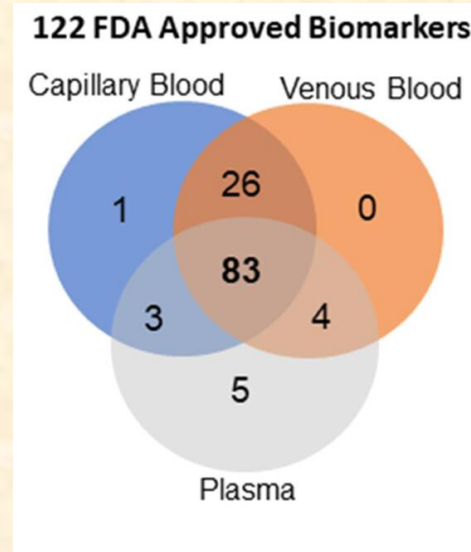
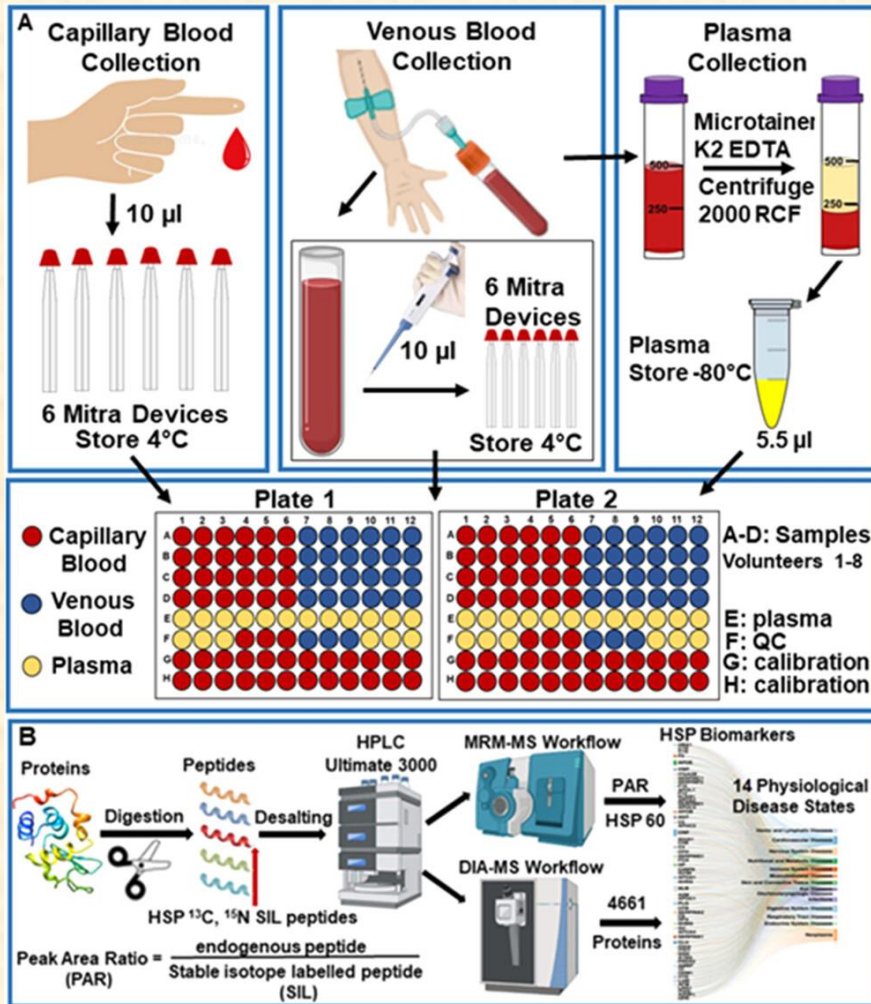
The plasma proteome profile as a proteomic portrait of a person's health state



>40 FDA-approved biomarkers are reproducibly quantified (CV <20% with label-free quantification)

využití v personalizované medicíně

pravidelné sledování panelu proteinových markerů



Whelan S.A. et al., *Anal. Chem.* 95 (29), 11007-11018 (2023)

- Časná detekce
- Účinnost léčby
- Přesnější odhad prognózy
- Odhalení vedlejších účinků léčby



Konec hlášení

COPYRIGHT KEIICHI EGAWA

AIRLINERS.NET