



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



# Nové trendy v proteomice pomocí hmotnostní spektrometrie

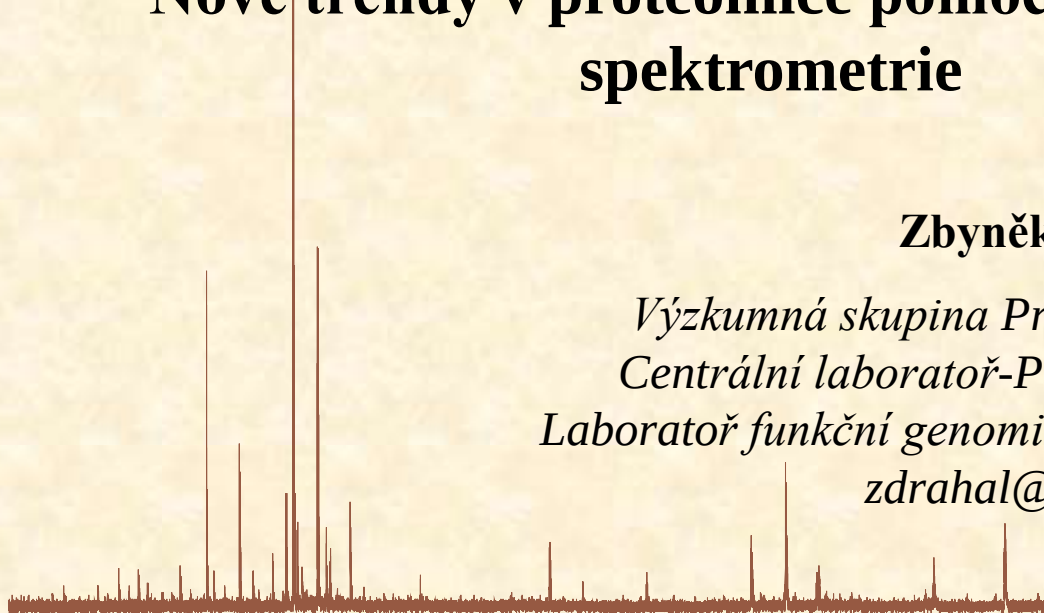
**Zbyněk Zdráhal**

*Výzkumná skupina Proteomika, CEITEC-MU*

*Centrální laboratoř-Proteomika, CEITEC-MU*

*Laboratoř funkční genomiky a proteomiky, NCBR PŘF*

*zdrahal@sci.muni.cz*



Financováno  
Evropskou unií  
NextGenerationEU

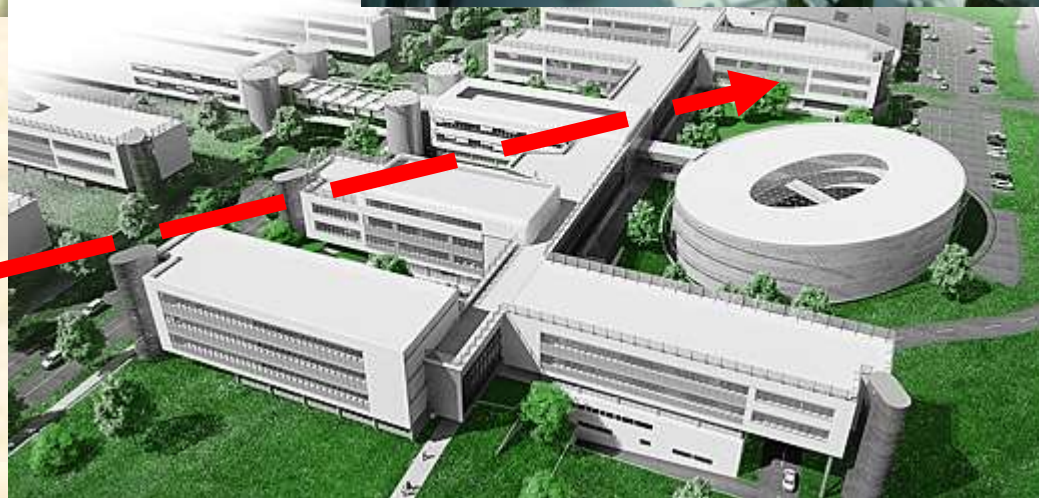
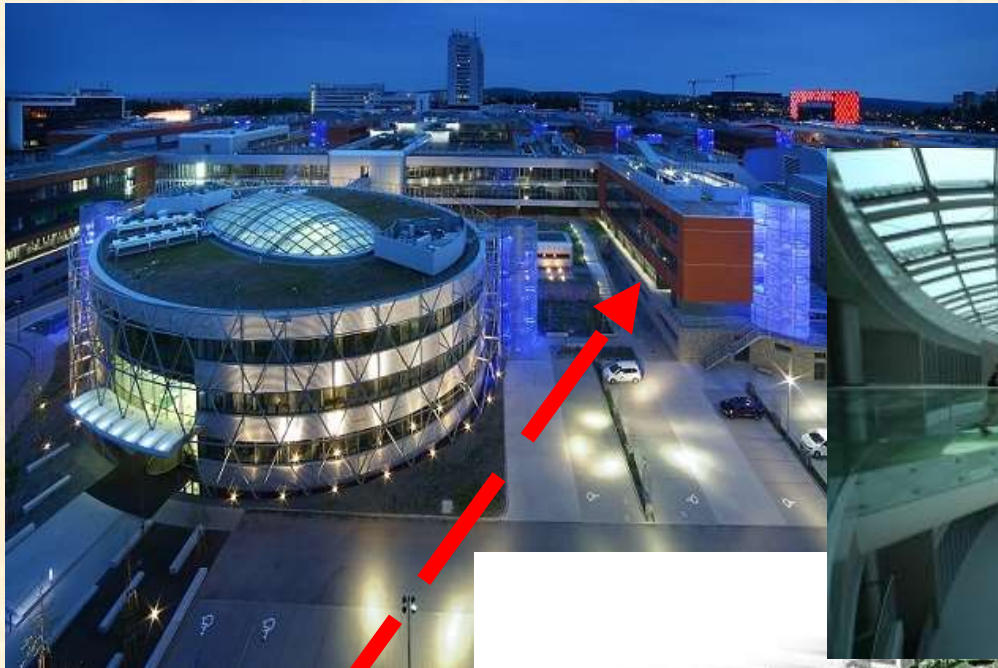


Národní  
plán  
obnovy

MSMT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

**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](mailto:zdrahal@sci.muni.cz)  
[zbynek.zdrahal@ceitec.muni.cz](mailto:zbynek.zdrahal@ceitec.muni.cz)

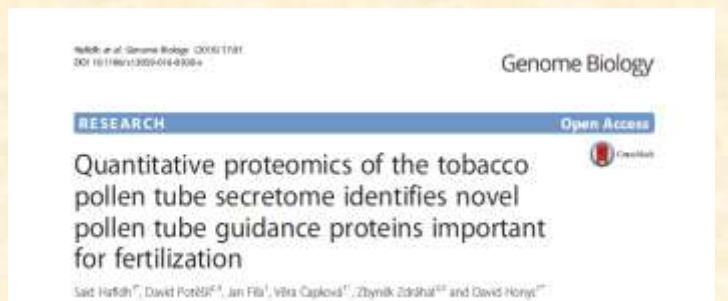
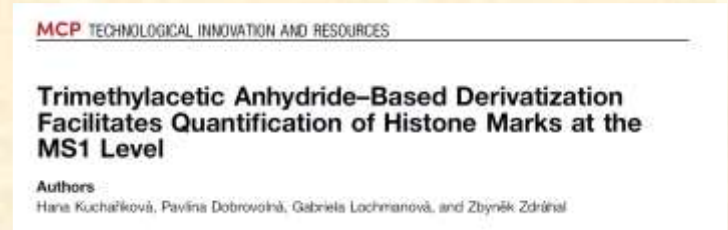


# CL a VS Proteomika

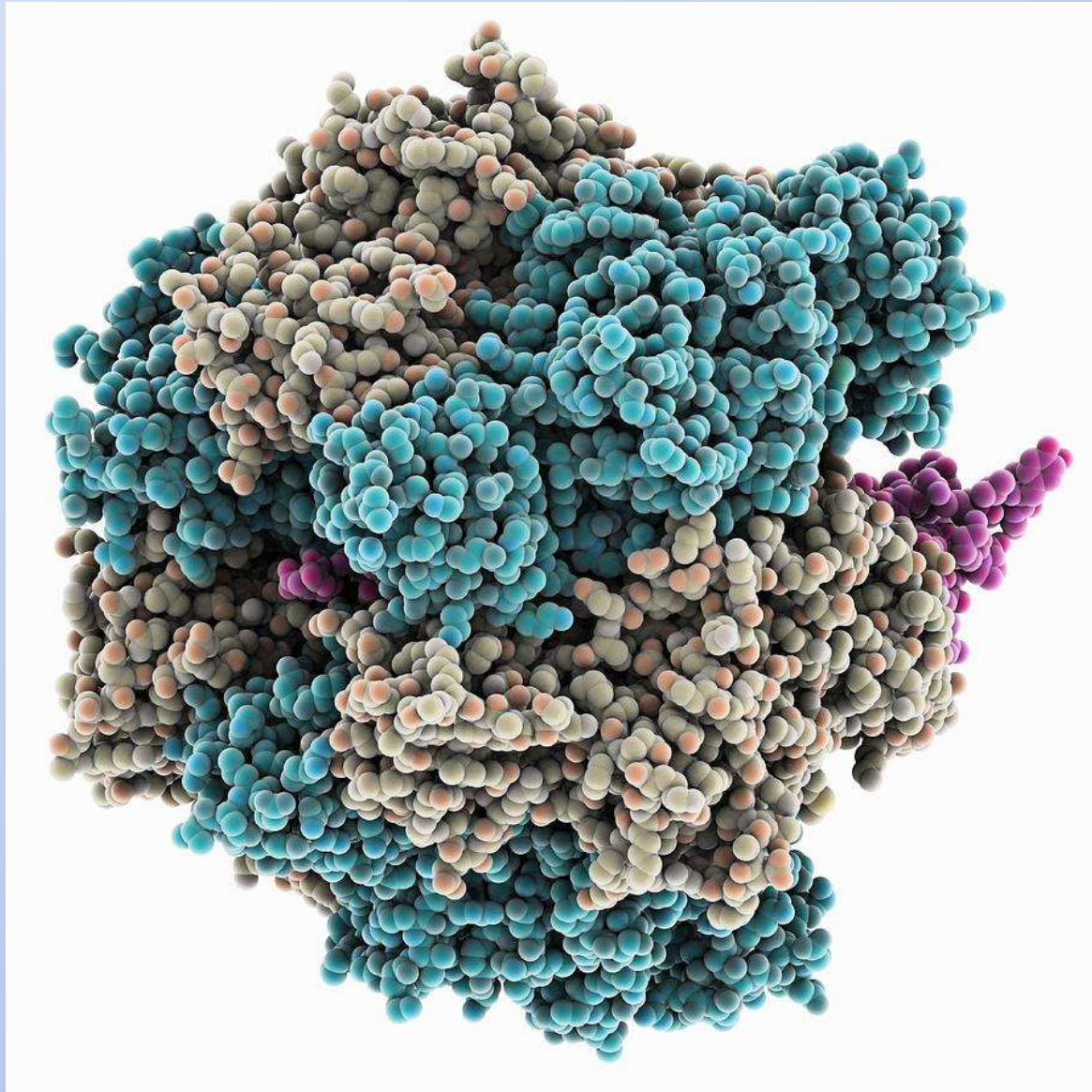


- bakalářské práce
- diplomové práce
- PhD studium

metodika proteomické analýzy (PTMs)







*ATPase molecule Photograph by Science Photo Library | Fine Art America*

# **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



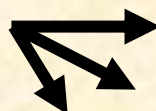
# Syntéza proteinů



DNA



mRNA



protein



funkční protein

transkripce  
posttranskripční úpravy  
(alternativní sestřih aj.)

translace

**Posttranslační úpravy**  
posttranslační modifikace  
(fosforylace, glykosylace aj.)

**Proteinové komplexy**



# Syntéza proteinů - translace

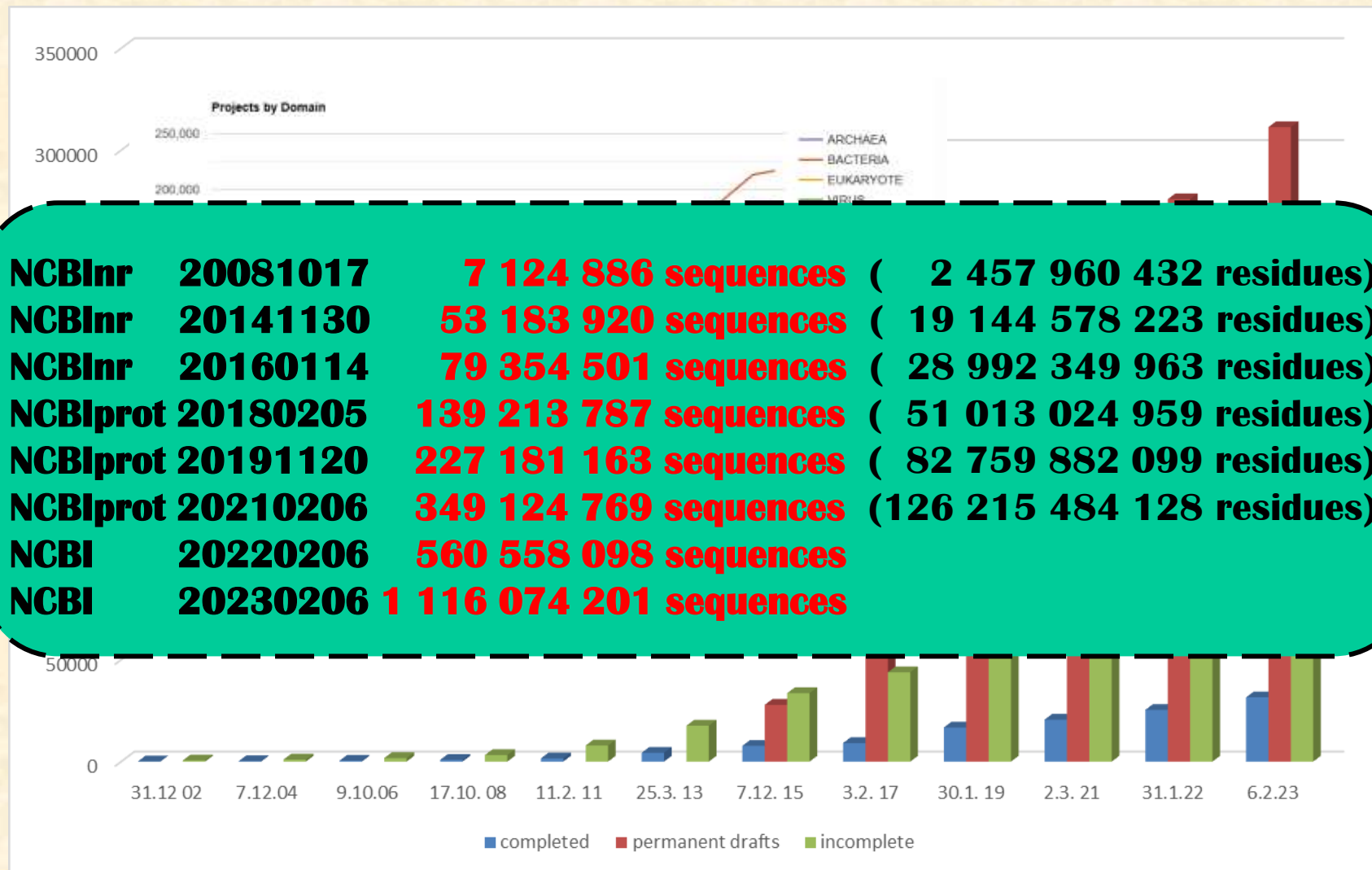
*Nobel Prize in Physiology or Medicine 1968 - R. W. Holley, H. G. Khorana, M. W. Nirenberg*

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

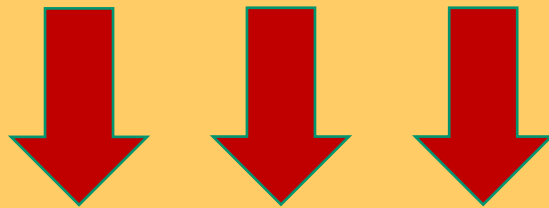
 translation start codon
  hydrophobic amino acids
  negatively charged amino acids
  cysteine

 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**

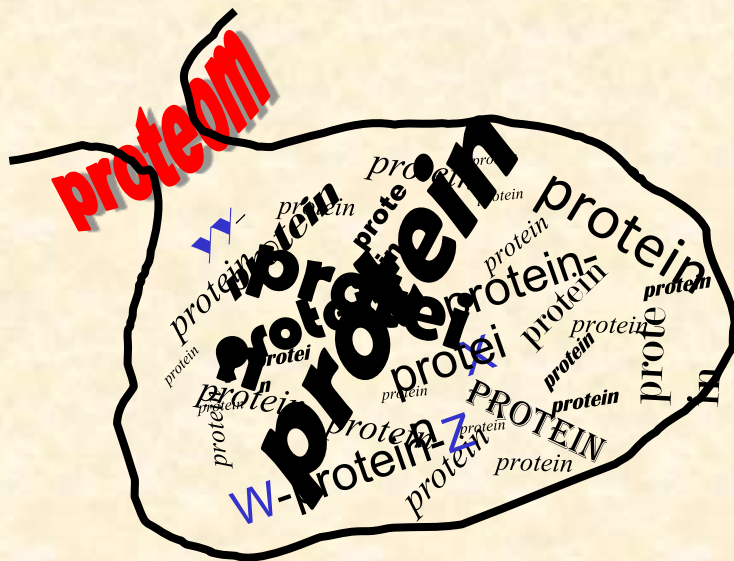


# Proteom

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*

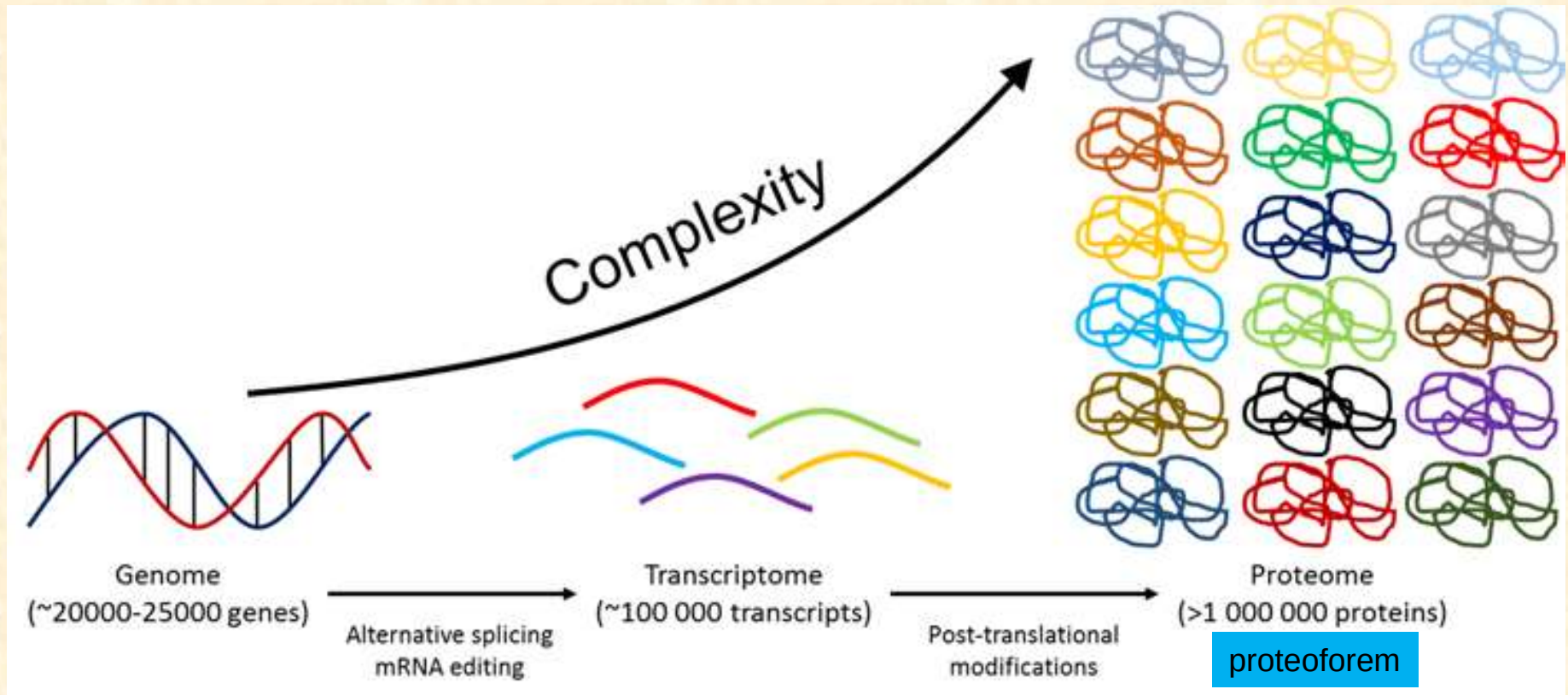


# Proteotyp

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

# Genom vs Traskriptom vs Proteom

komplexita proteomu



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*

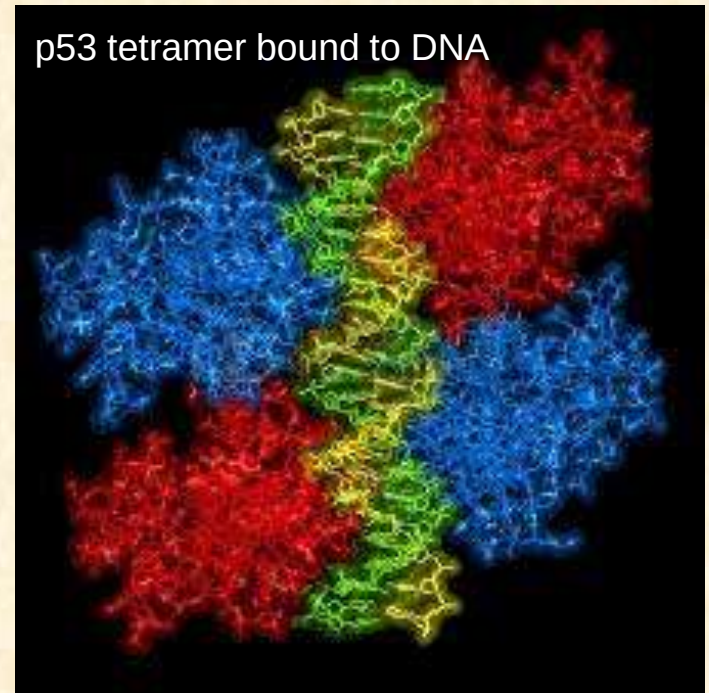
## Protein p53

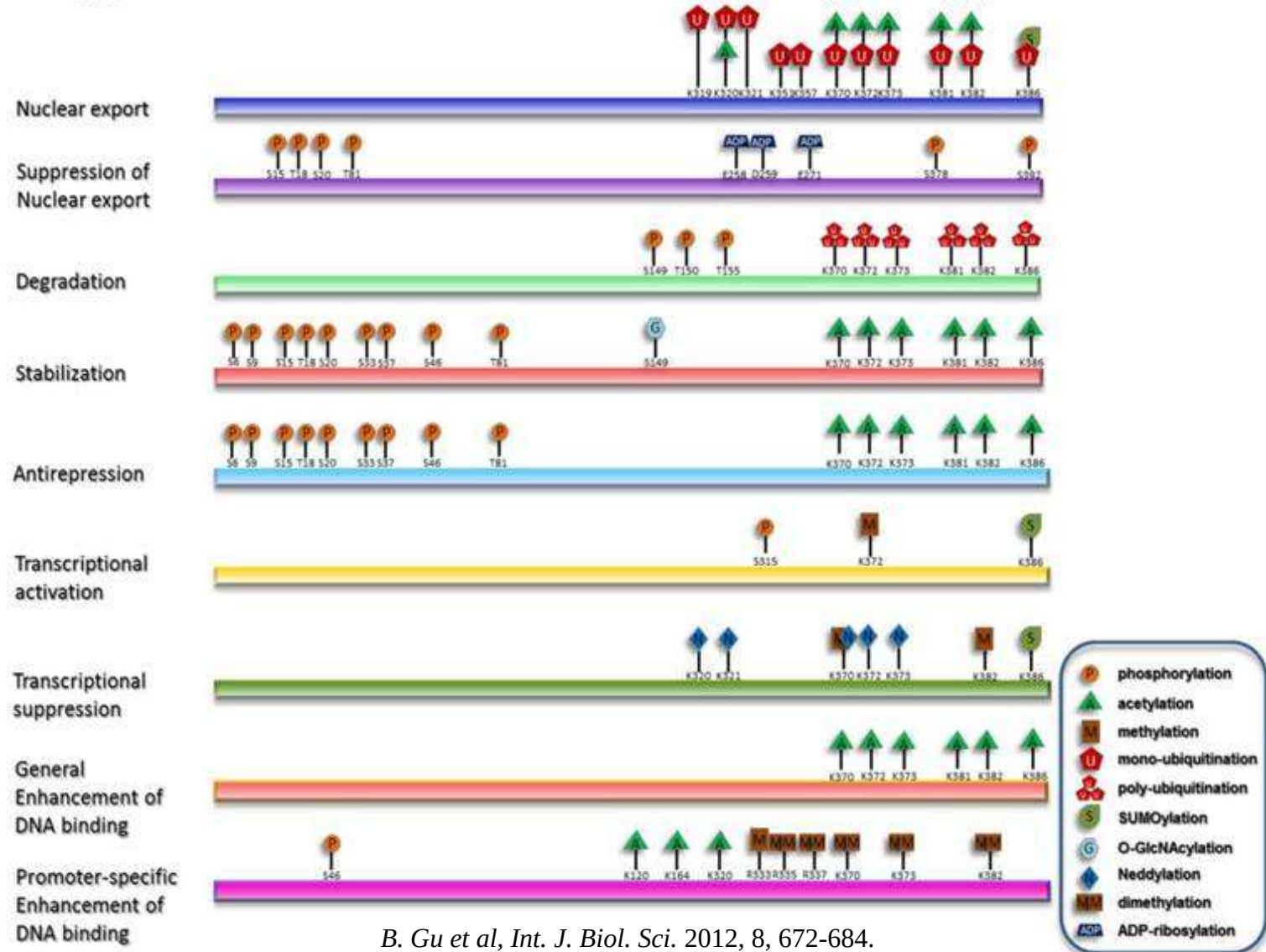
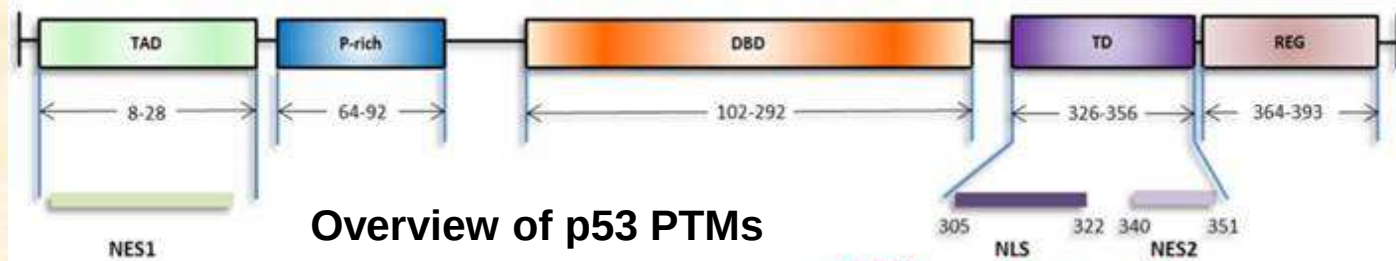
p53 exerts **irreplaceable anti-neoplastic functions** at homeostasis and thus is considered to be '**the guardian of the genome**'.

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**







# Genom vs Proteom



stejný genom



# Genom vs Proteom

rela

4 z

pot  
(PC



???)



*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**



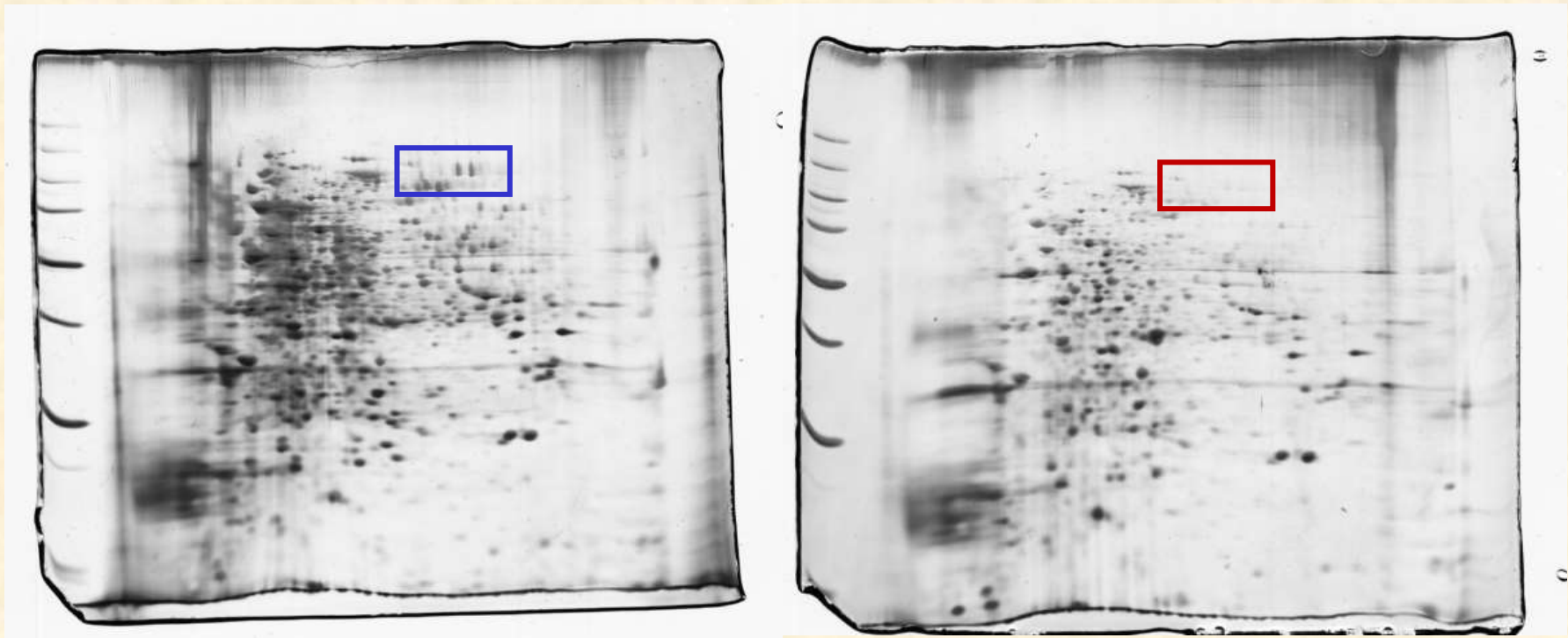
## Diferenční (expresní) proteomika

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*

spolupráce s prof. Márovou, FCH VUT Brno

# 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

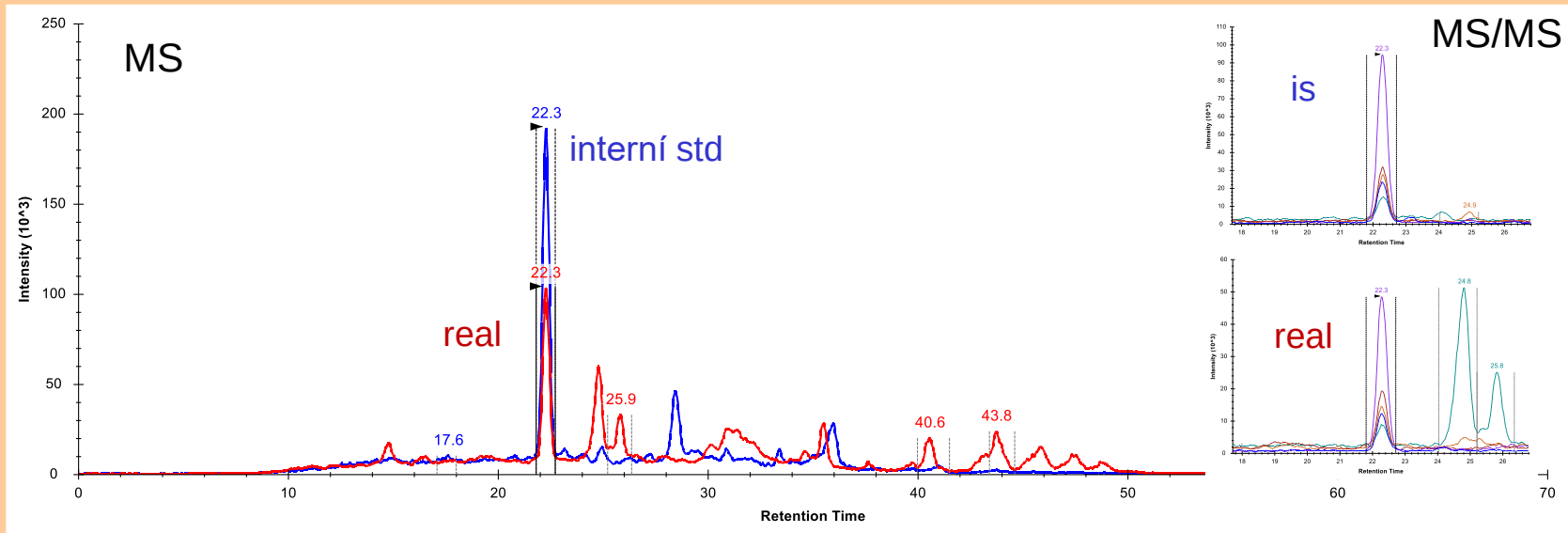
Odpověď organismu na stimul



# Cílená proteomika

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

## Stanovení enterotoxinu (*S. aureus*)



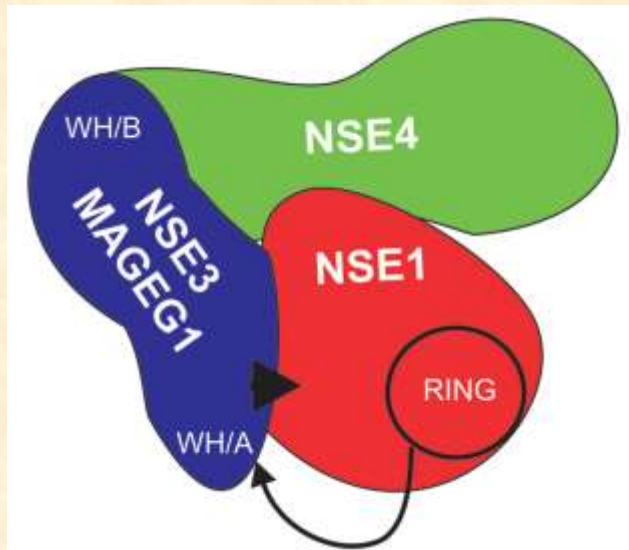
LC-MS/MS (MRM)



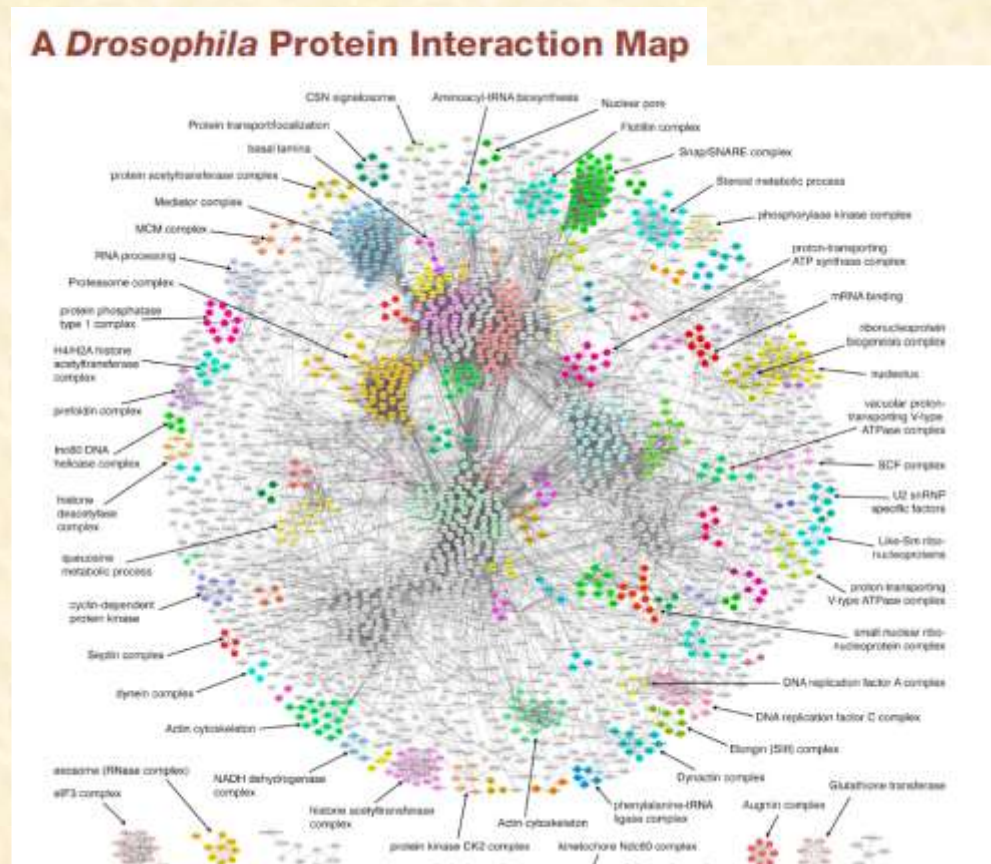
# Funkční proteomika

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.)

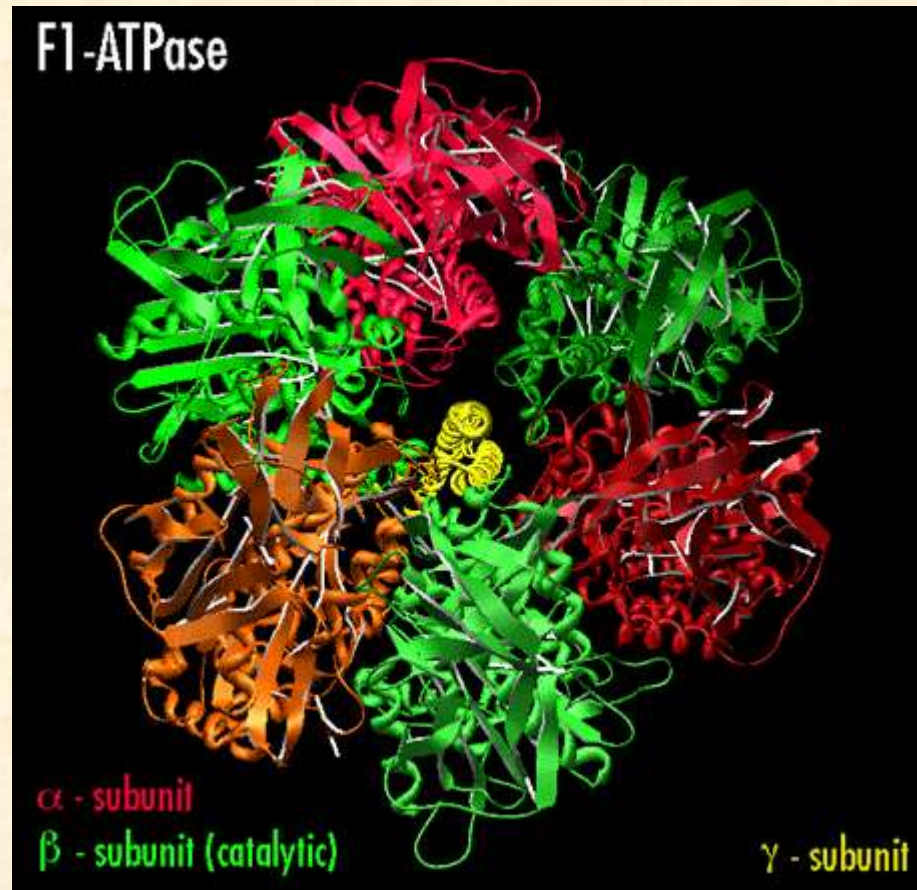


L. Kozakova et al.,  
*Cell Cycle*, 14 (6), 920-930 (2015)



## Strukturní proteomika

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



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

# Náročnost analýzy proteomu



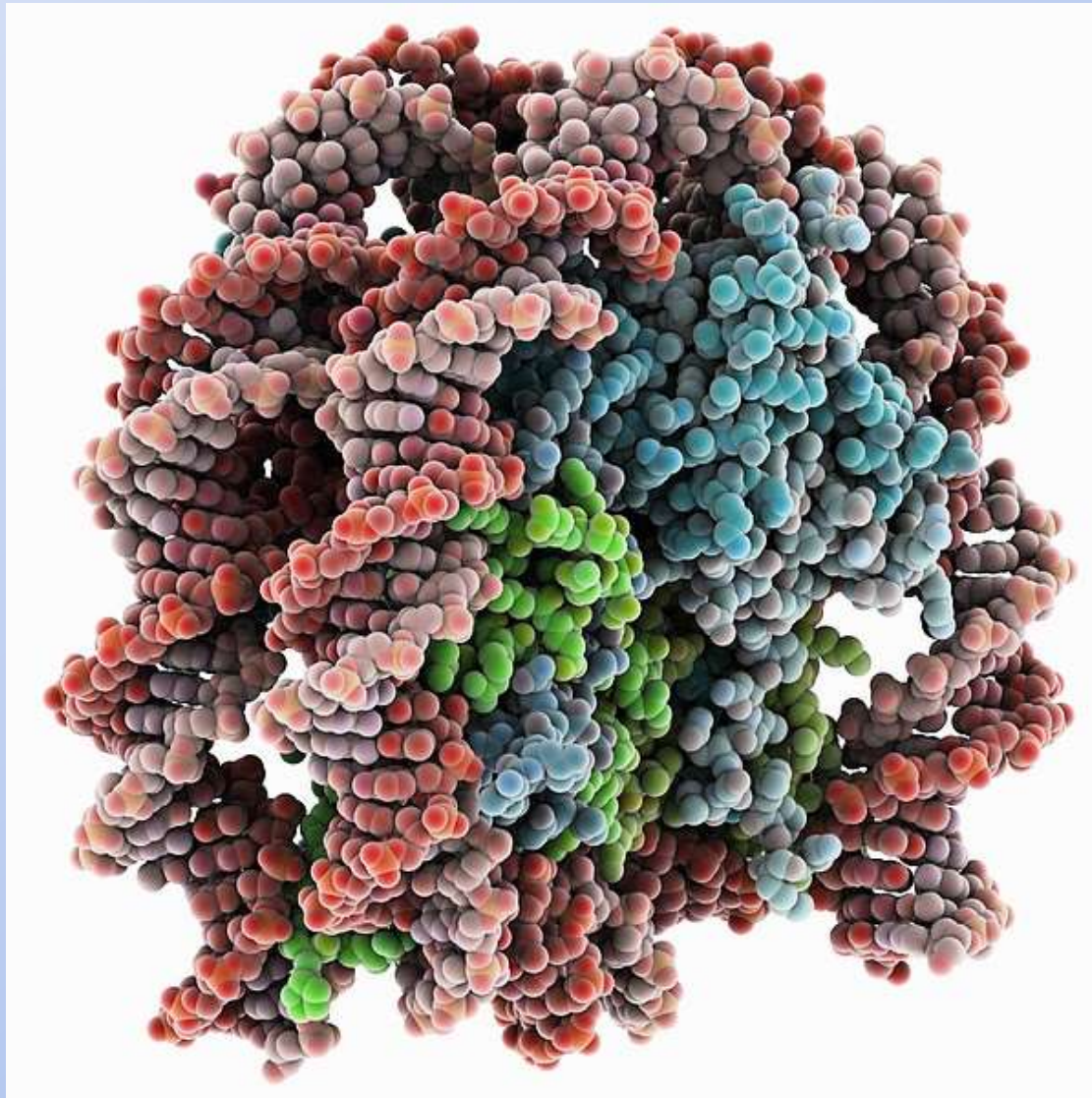
Proteinové komplexy– složení, stechiometrie, uspořádání podjednotek....

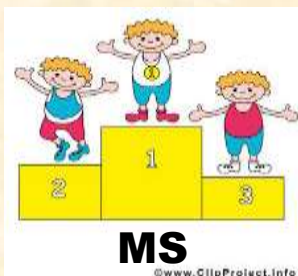
Proteoformy– deseti tisíce forem proteinů (PTMs, zkrácené formy, mutace...)

Kvantita – široké rozpětí koncentrací

Kvalita – tisíce proteinů (identifikace)







# Hmotnostní spektrometrie

*hlavní technologie pro analýzu proteomu*

umožňuje současnou kvalitativní i kvantitativní charakterizaci tisíců proteinů



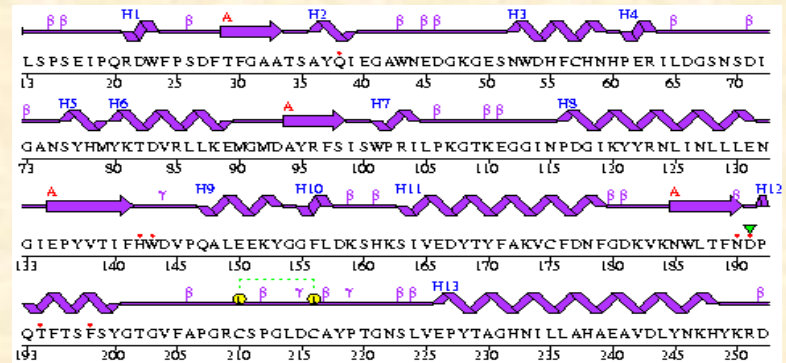


# Struktura proteinu

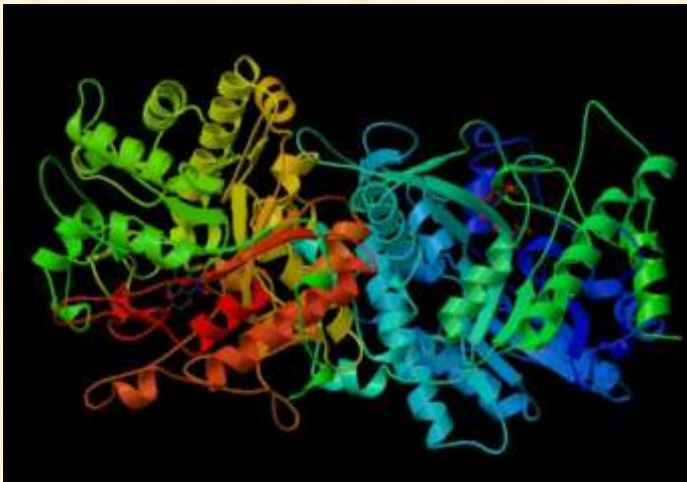
## Primární struktura (pořadí aminokyselin):

MAPLLAAAMNHAAHPGLRSHLVGPNNESFSRHLPSSSPQSSKRRCNLSFTTRSAR  
VGSQNGVQMLSPSEIPQRDWFPSDFTFGAATSAYQIEGAWNEDGKGESNWDHFCHNH  
PERILDGSNSDIGANSYHMYKTDVRLLEMGMDAYRFSISWPRIPLPGTKEGGINPD  
GIKYRNLINLLENGIEPYVTIFHWDVPQALEEKYGGFLDKSHKSIVEDYTYFAKV  
CFDNFGDKVKNWLTNEPQTFTSFSGYGTGVFAPGRCSPLDCAYPTGNSLVEPYTAG  
HNILLAHAEAVDLYNKHYKRDDTRIGLAFDVMGRVPYGTSLFDKQAEERSWDINLGW  
FLEPVVRGDYPFSMRSLARERLPFFKDEQKEKLAGSYNMLGLNYYTSRFSKNIDISP  
NYSFVLNTDDAYASQEVNGPDGKPIGPPMGNPWIYMYPEGLKDLLMIMKNKYGNPPI  
YITENGIGDVDTKETPLPMEALNDYKRLDYIQRHIALTKESIDLGSNVQGYFAWSL  
LDNFEWFAGFTERYGIVYVDRNNNCTRYMKESAKWLKEFNTAKKPSKILTPA

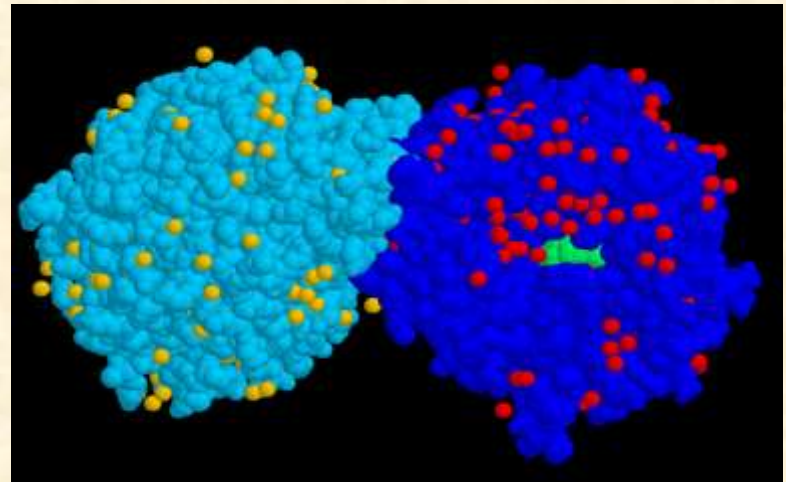
## Sekundární struktura



## 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*

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.“*

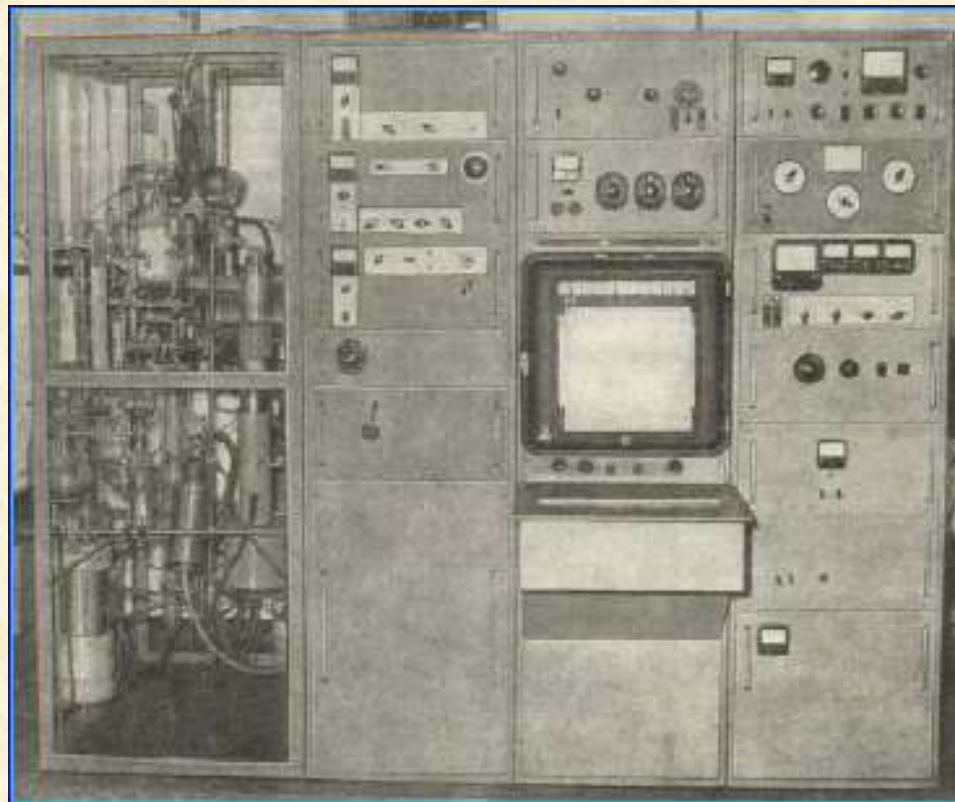
Dr. H.G. Soderhaum – 1922

*P.S. syn a osm jeho mladších kolegů získalo Nobelovu cenu*

# Historie hmotnostní spektrometrie

První český hmotnostní spektrometr - 1953

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

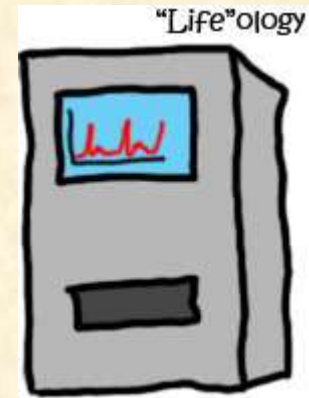


*Foto převzato z přednášky dr. M. Poláška*

# Hmotnostní spektrometrie - dnes



*Orbitrap Astral™ (Thermo)*



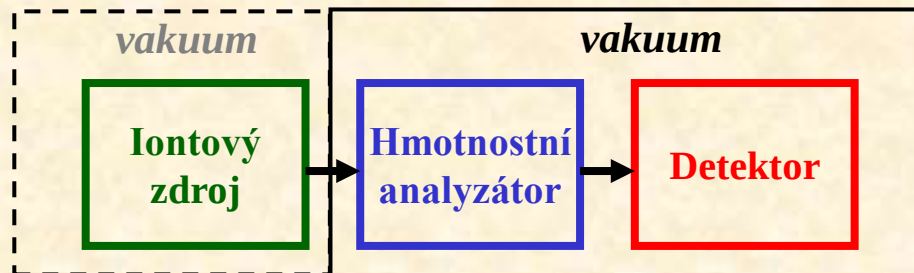
*timsTOF Ultra (Bruker)*





# Princip hmotnostní spektrometrie (MS)

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



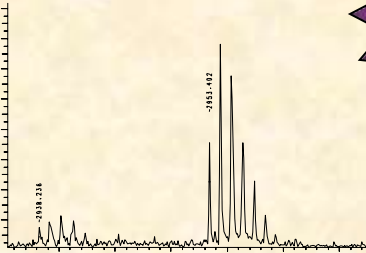
$m$  - hmotnost iontu  
 $z$  - počet nábojů

*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.  **Data** určení hmotnosti iontů,  
poměru hmotnosti k náboji 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*

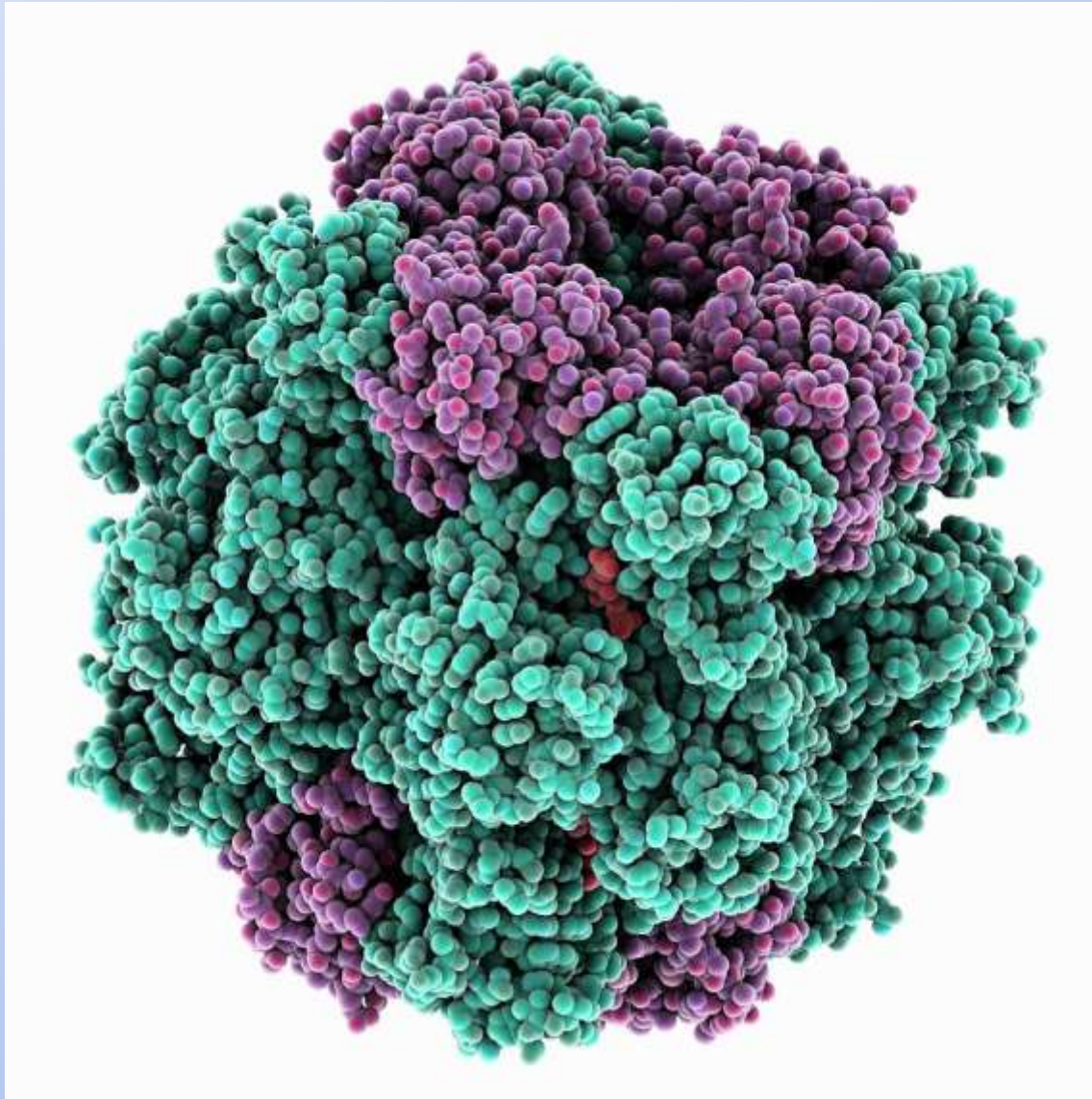
Anal. Chem., 60 (20): 2299-2301 (1988)



**John B. Fenn**  
Virginia Commonwealth University,  
Richmond, USA

## ESI

ionizace elektrosprejem

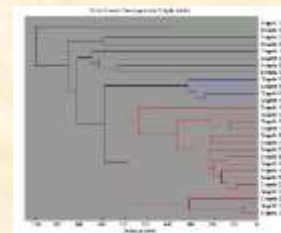


*Tobacco Rubisco Molecule Photograph by Laguna Design/science Photo Library*



# Možnosti hmotnostní spektrometrie v proteomice

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

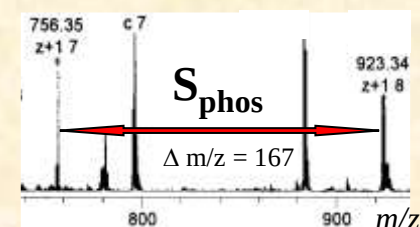


- **Identifikace proteinů**  
(i de novo sekvenace)

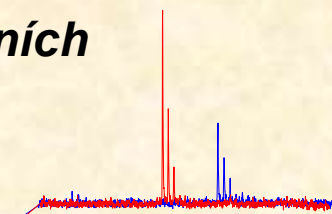


- **Charakterizace interakcí proteinů**  
(proteinové komplexy)

- **Charakterizace proteinových modifikací**

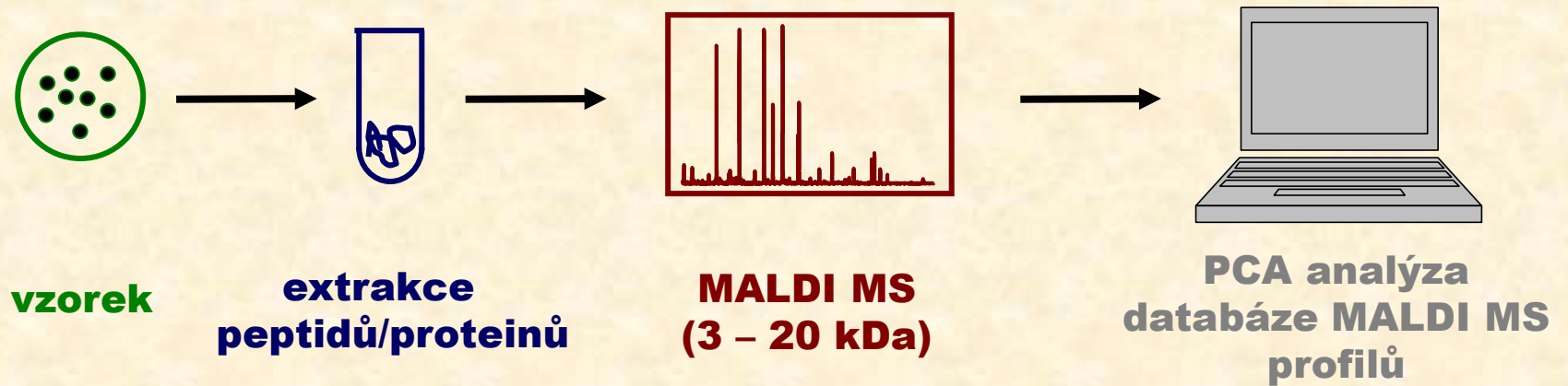


- **Kvantifikace jednotlivých proteinů i komplexních směsí**  
(relativní a absolutní kvantifikace)



## **Aplikace s využitím analýzy intaktních molekul**

# MALDI-MS profilování



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





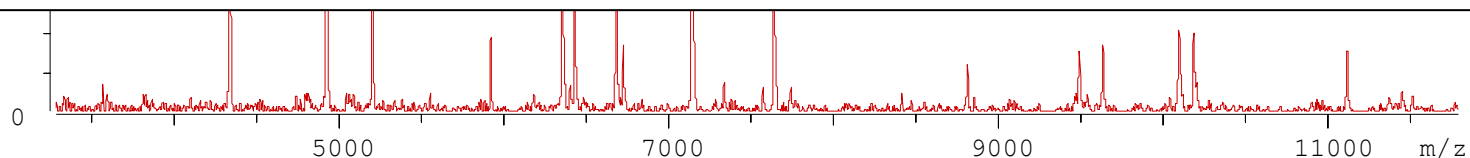
# Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-MS



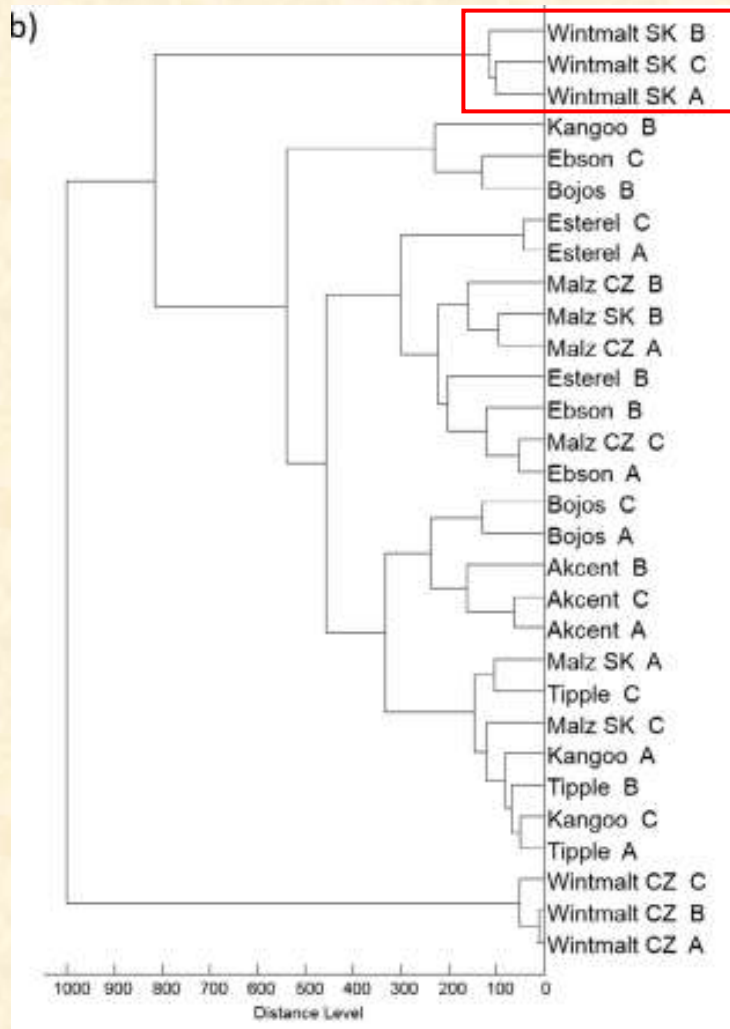
identifikace na základě srovnání naměřeného profilu s profilem z databáze

| 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

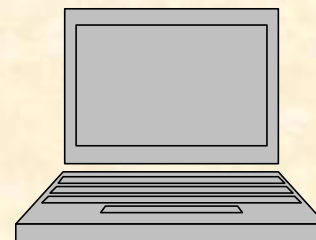
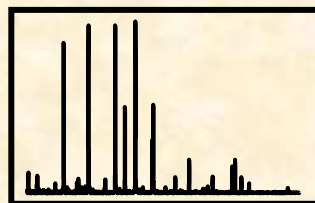
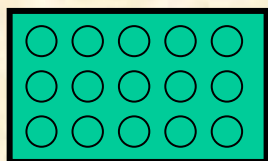


- Kontrola kvality dodaných sladových ječmenů
- Rychlá alternativa k zavedeným technikám



Pacient

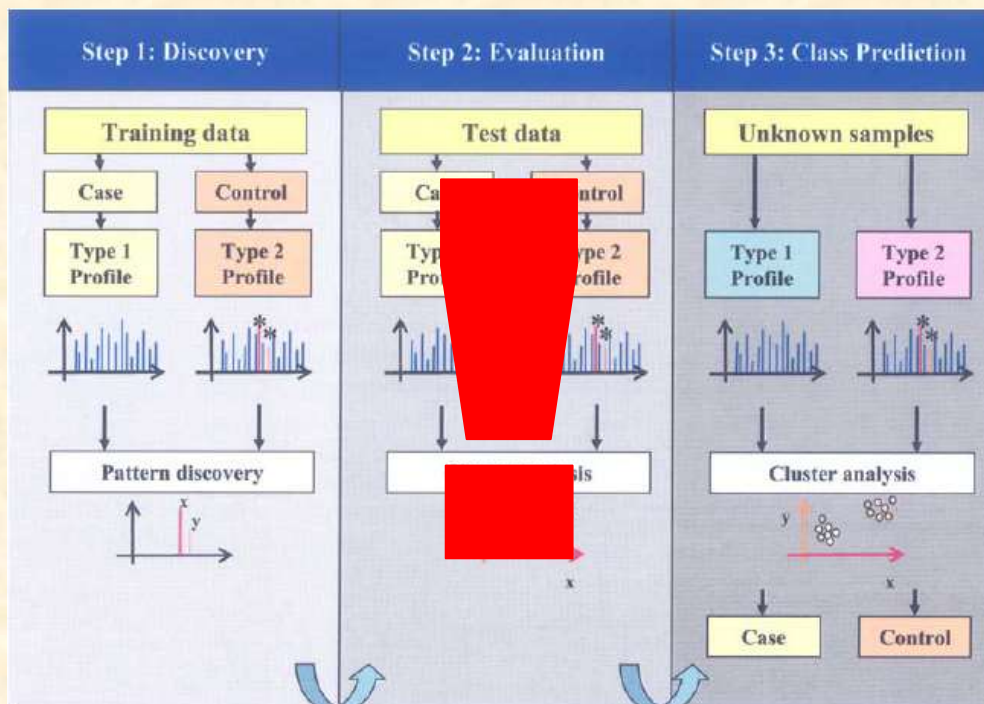
## Analýza profilů –včasná detekce chorob (peptide profiling, pattern profiling)

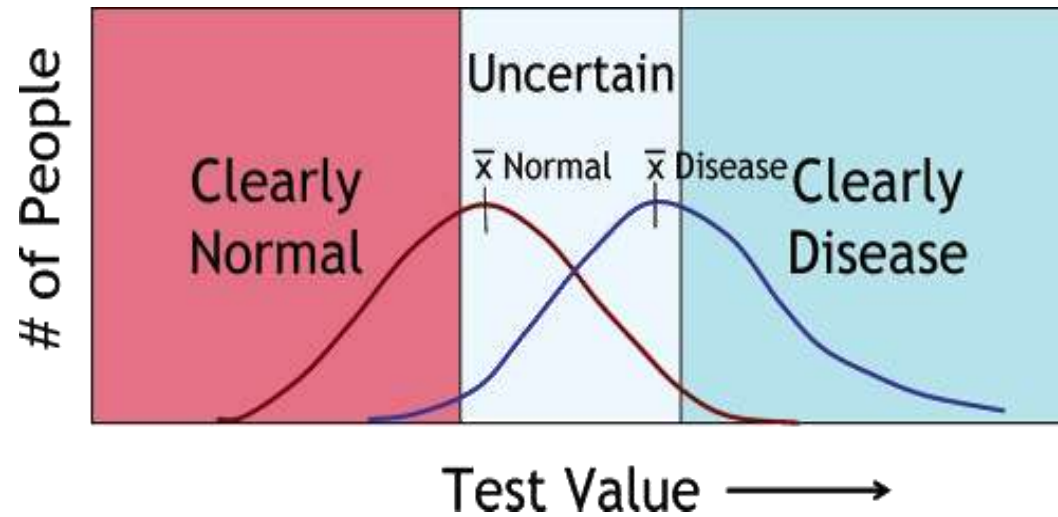


**žádná či minimální  
úprava vzorku**  
(*ionex, IMAC, afinitní  
sorbent*)

**MALDI MS, SELDI MS**  
(3 – 20 kDa)

**klastrová analýza**

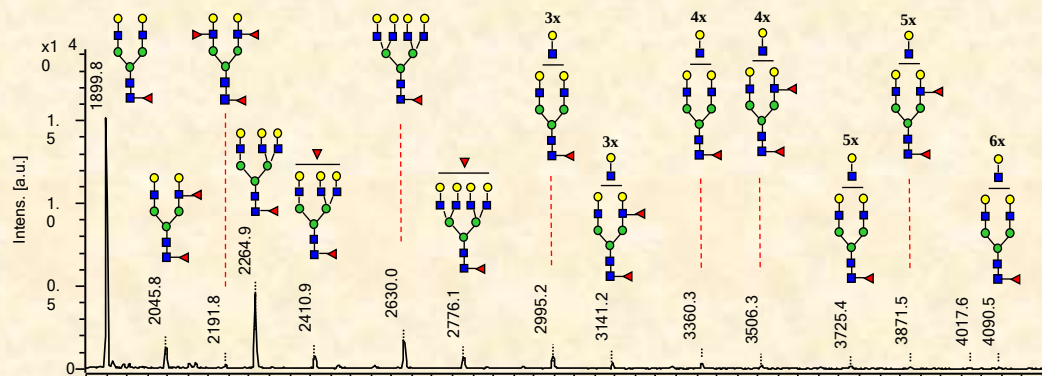




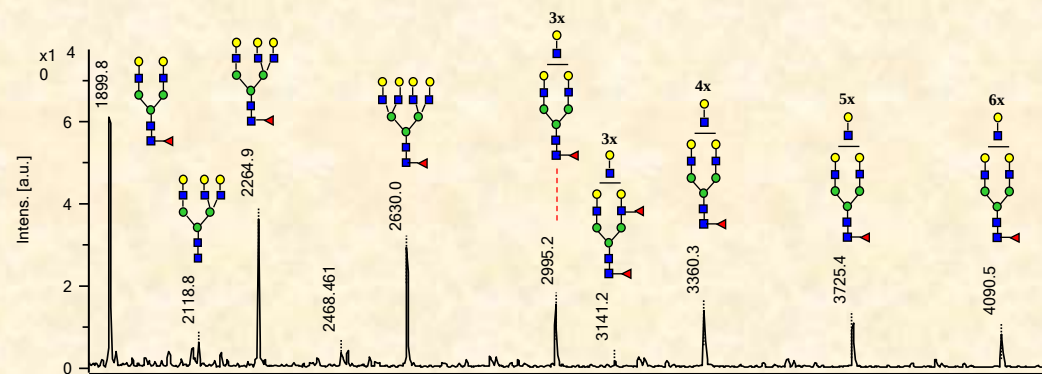
*J. LaBaer et al., J. Proteome Res., 4 (4) 1053-1059 (2005).*



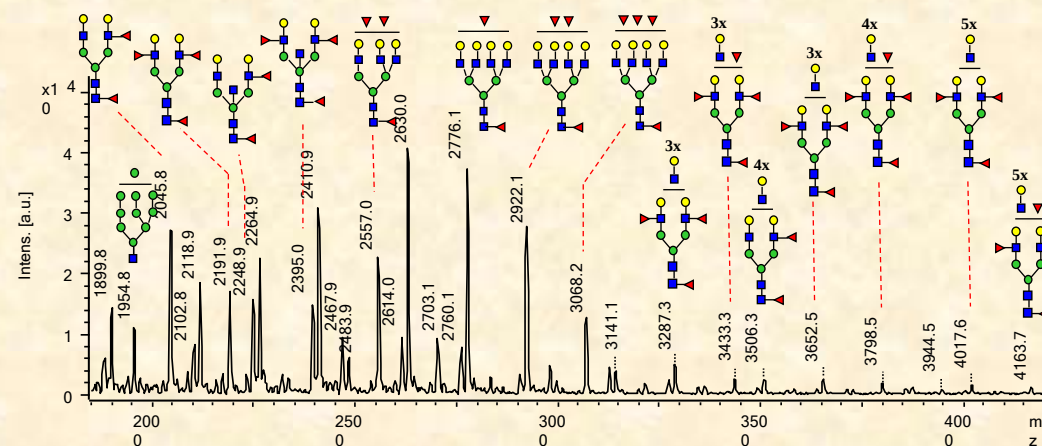
# MALDI-MS profilování glykanů



*NSCLC - Bronchoalveolar Carcinoma*



*Bronchoalveolar Adenocarcinoma*

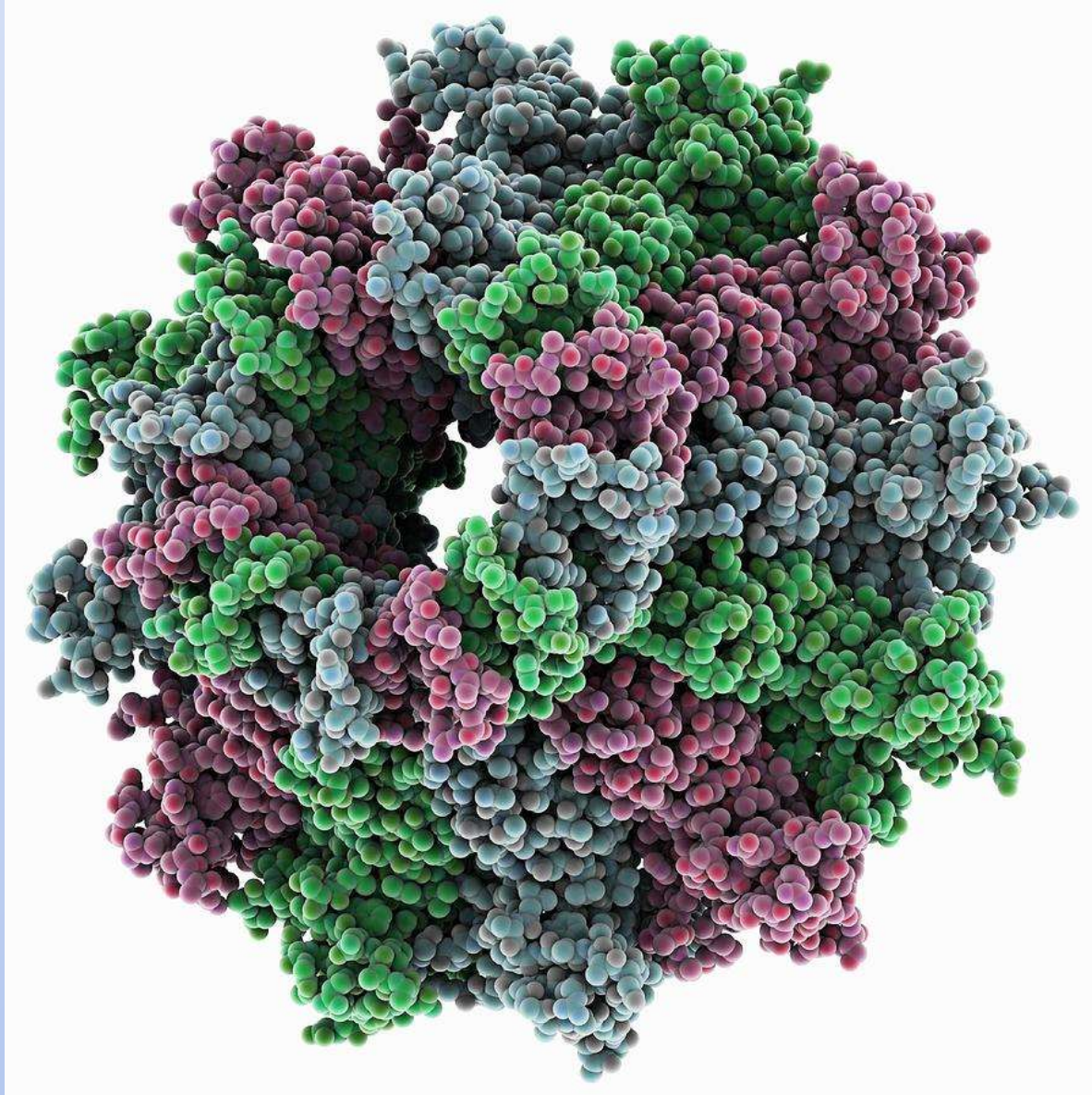


*Large Cell Carcinoma*

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

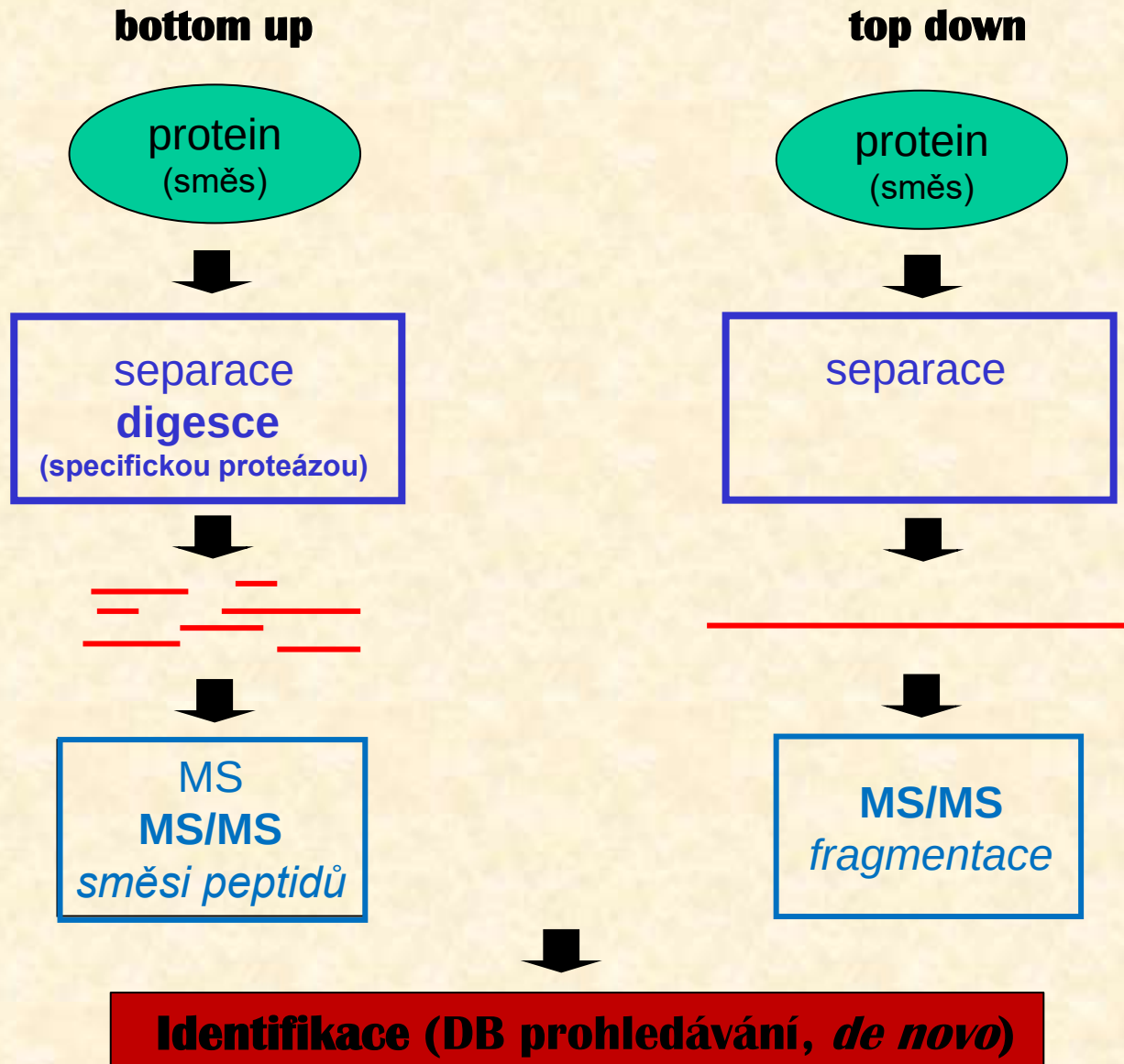
● Man; ● Gal; ■ GlcNAc; ▼ Fuc

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



# **Identifikace proteinů**

# Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií





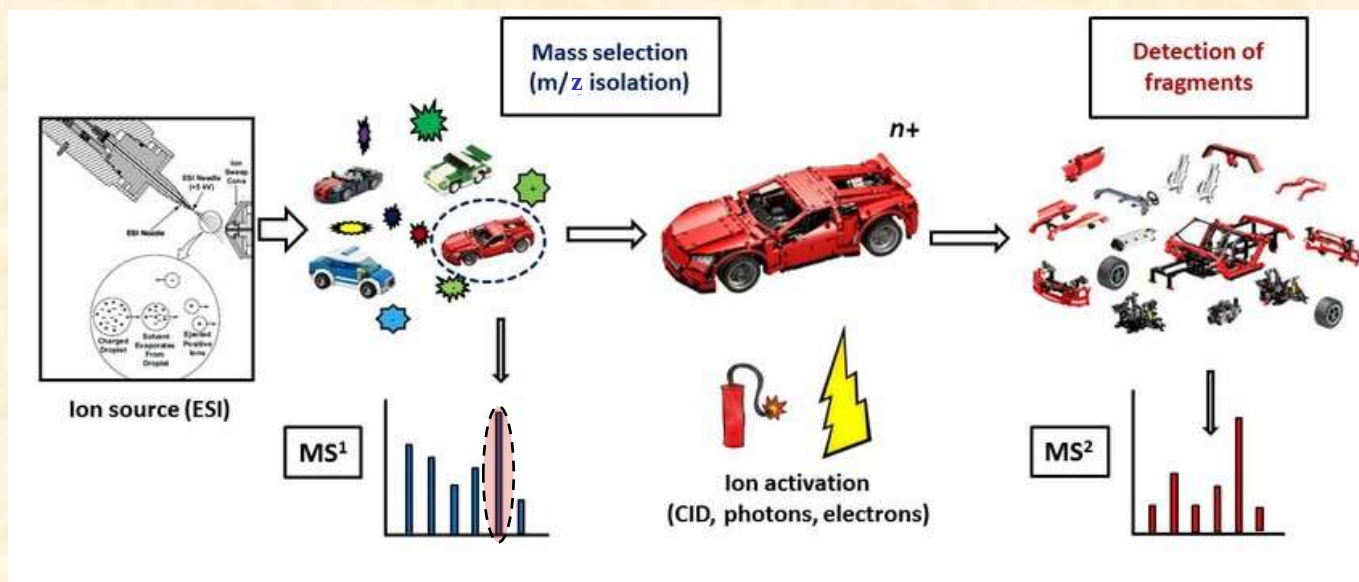
# MS a MS/MS

MS

MS/MS

tandemová hmotnostní spektrometrie

MS<sup>2</sup>



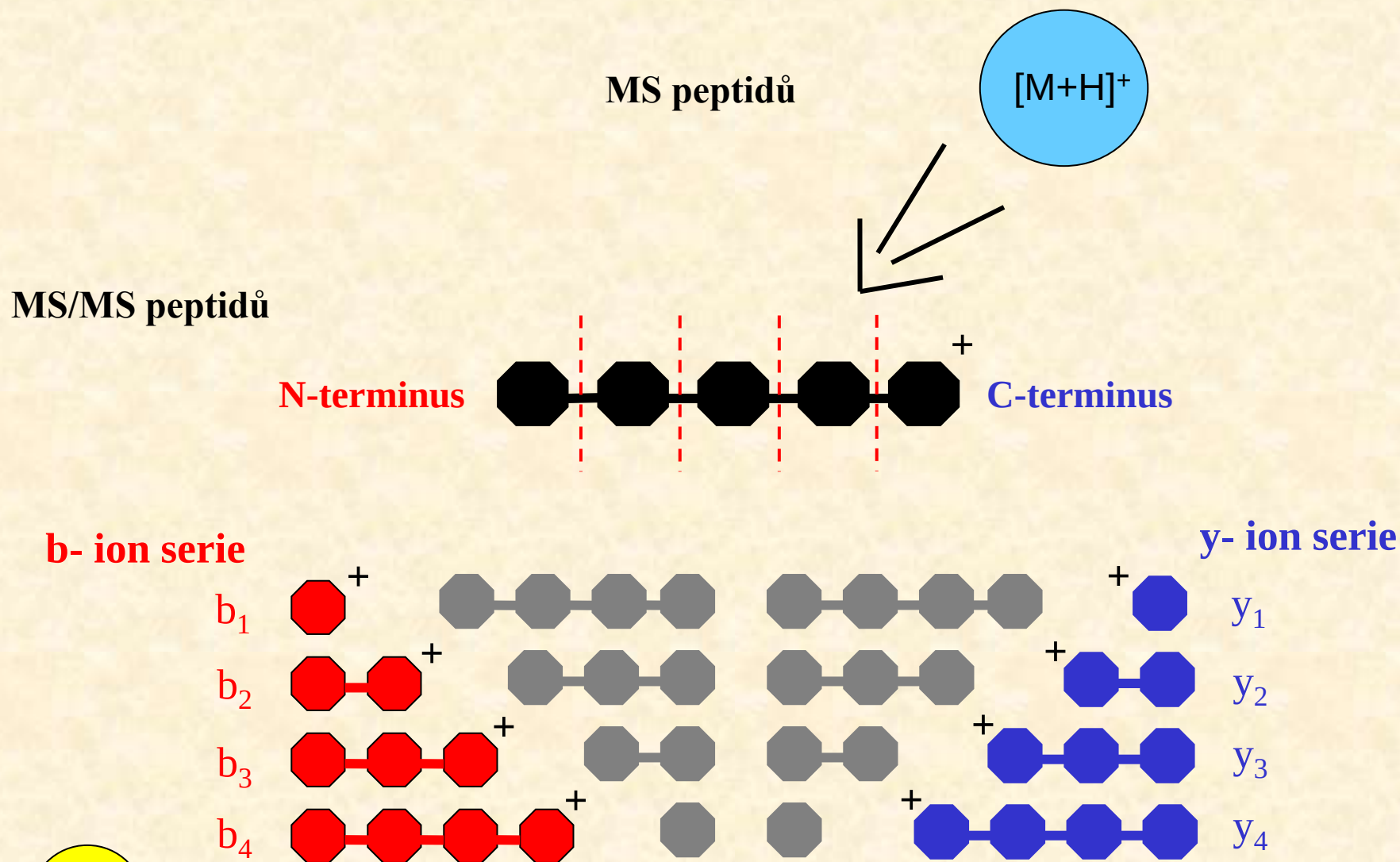
*m/z celého iontu (peptidu)*

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

*precursor (parent) ions*

*product (daughter) ions*

# Fragmentace peptidů – MS/MS

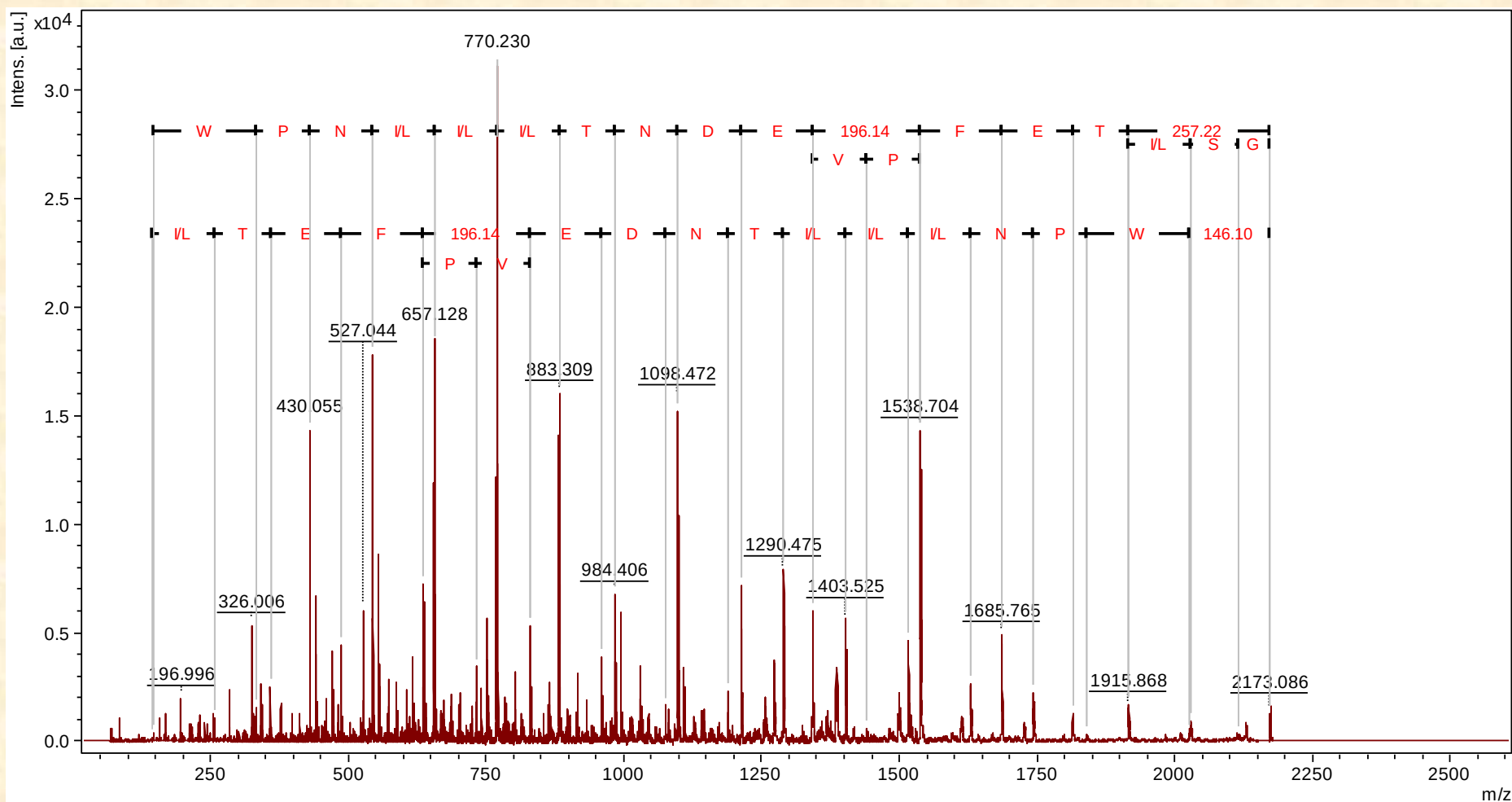


fragmentační mapy pro jednotlivé peptidy

# Fragmentace peptidů – MS/MS



*Myodes glareolus*



Ověření sekvence a určení izoform OBP proteinů

# **Identifikace proteinů**

## **Analýza komplexních směsí**



# Základní schéma proteomické analýzy

**Vzorek**

**GIGO**

**Úprava vzorku**

- *správně naplánovaný experiment*

nutnost vícekrokových 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:

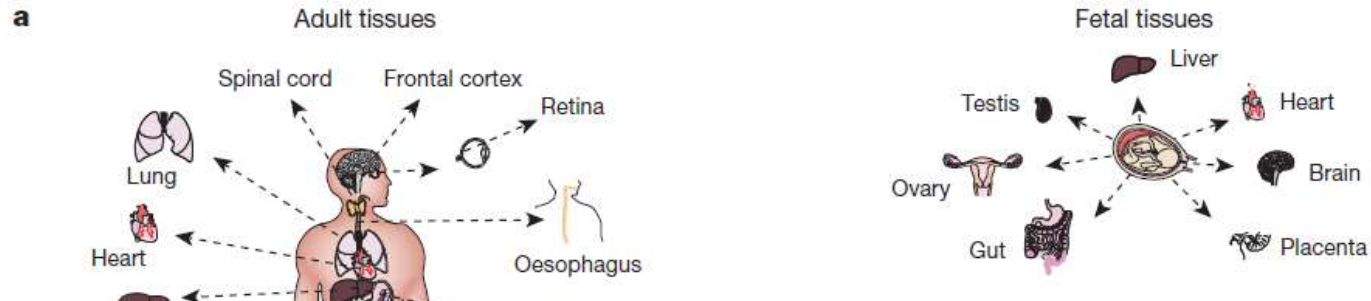
- ✿ kapalinová chromatografie
  - reverzní fáze
  - iontoměnič
  - molekulové síto
  - afinitní (IMAC, MOAC, protilátka)
  - HILIC (hydrophilic interaction chromatography)

✿ off-line

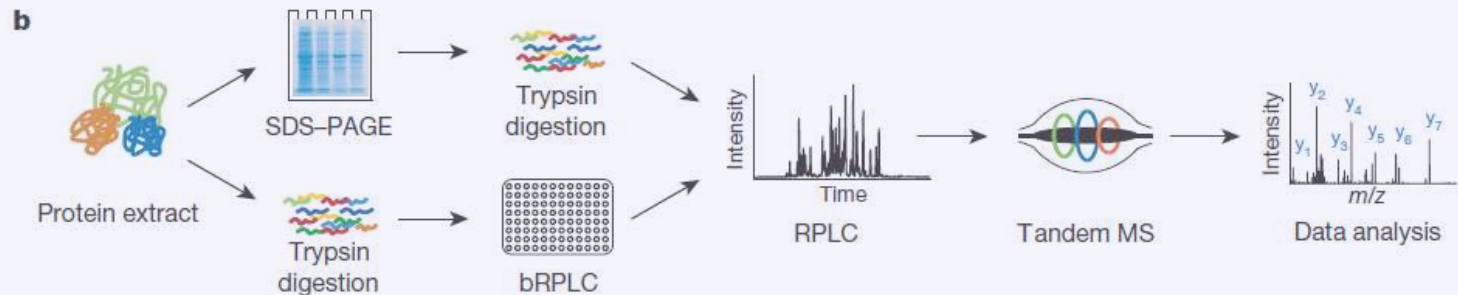
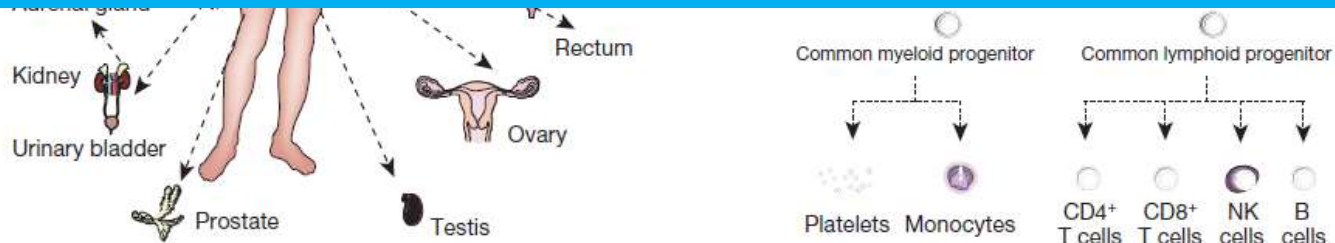
✿ on-line

# 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**



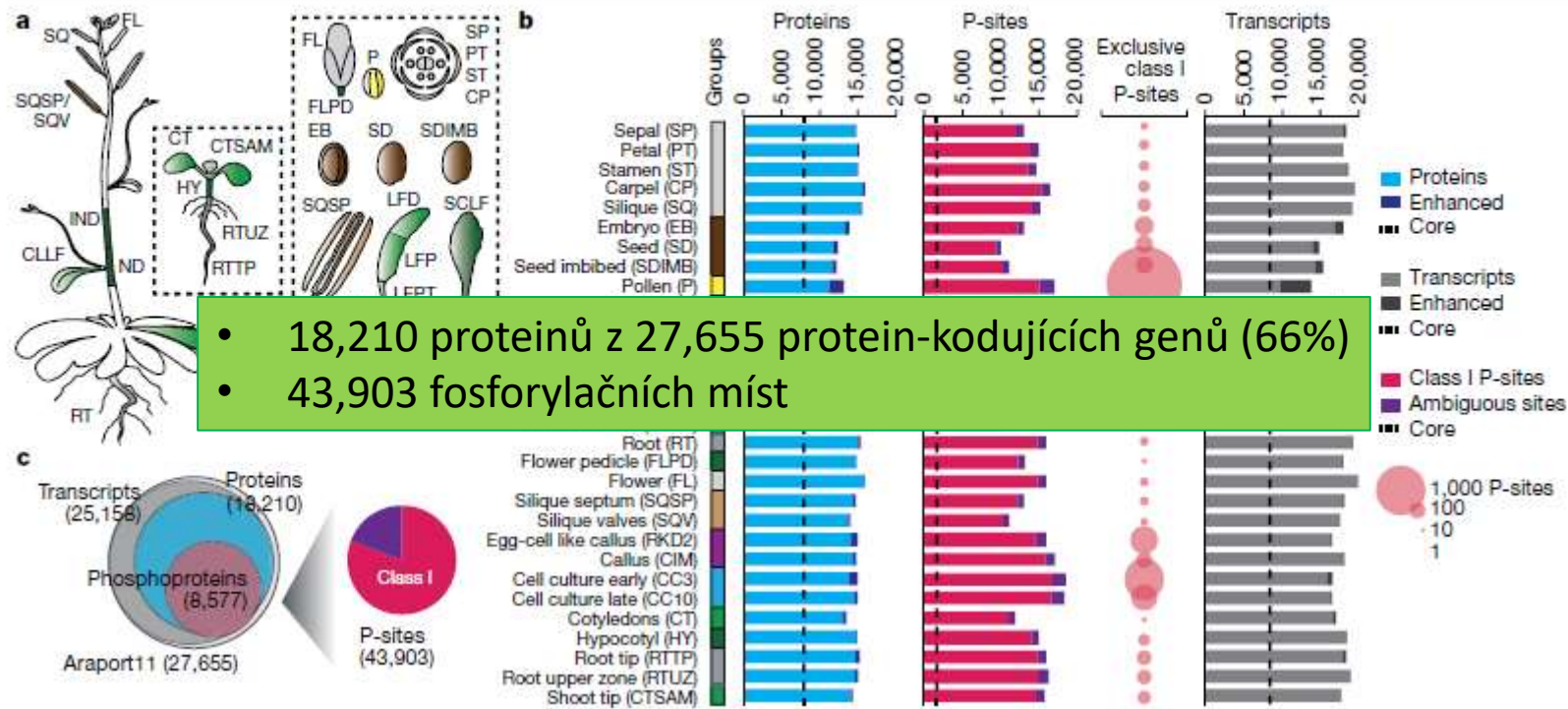


# Mapování proteomu *A. thaliana*

- 30 typů tkání
- vedle proteomiky také fosfoproteomika a transkriptomika

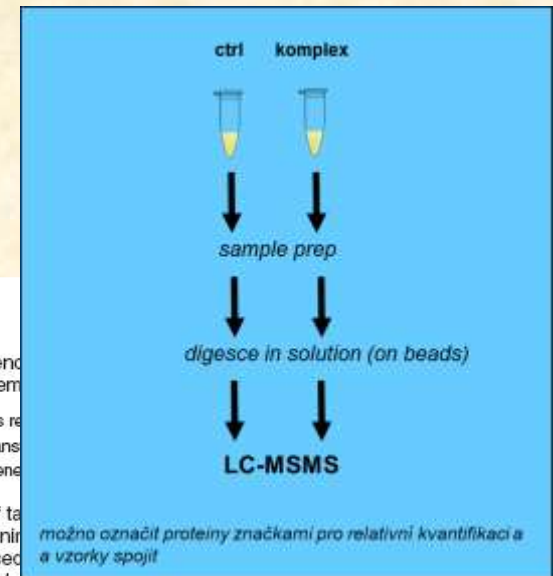
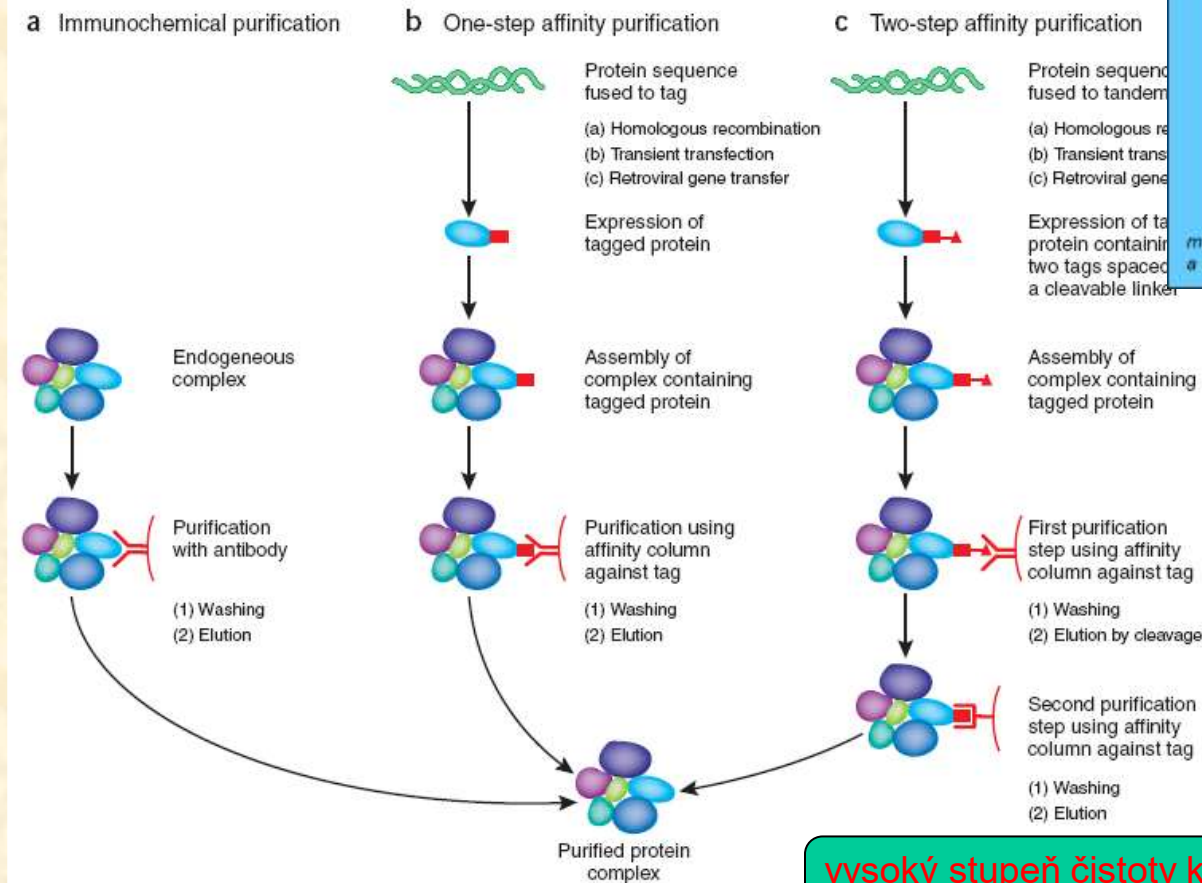


## Article



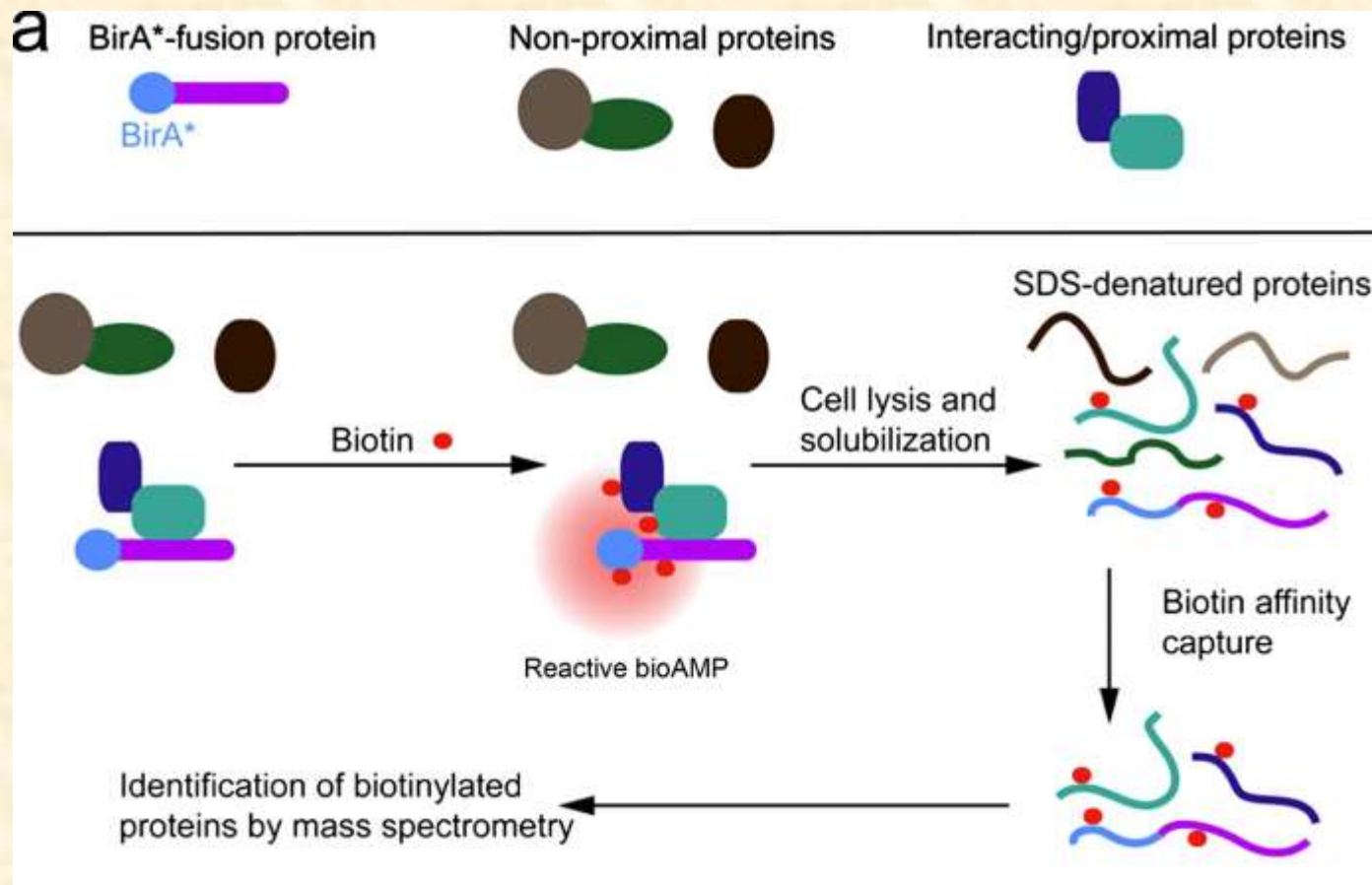
- 18,210 proteinů z 27,655 protein-kodujících genů (66%)
- 43,903 fosforylačních míst

# Analýza proteinových komplexů



vysoký stupeň čistoty komplexu  
ztráta slabě vázaných členů komplexu

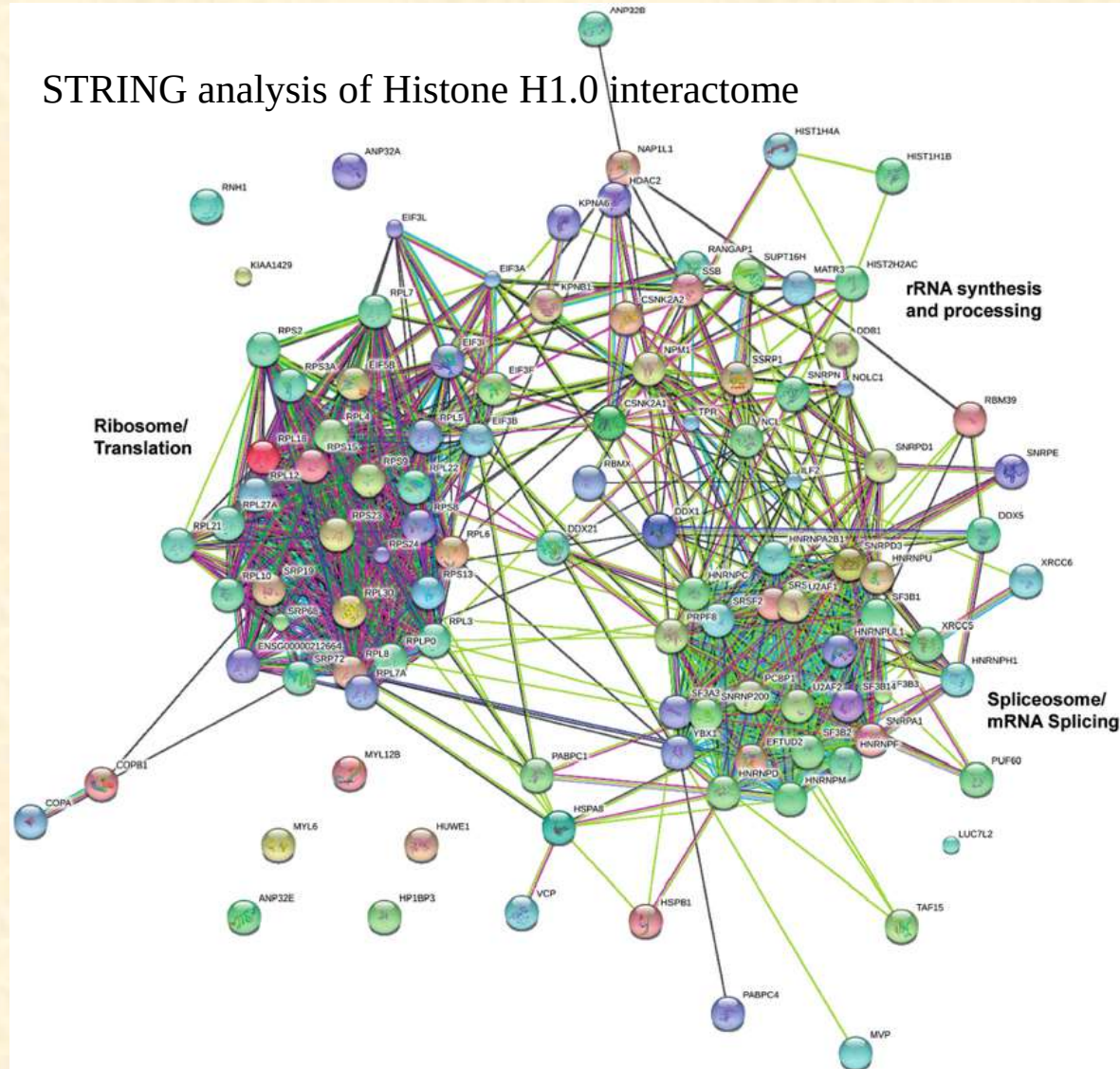
# Analýza proteinových komplexů BioID





# Analýza proteinových komplexů

STRING analysis of Histone H1.0 interactome





# **Kvantifikace proteinů**

# Kvantifikace proteinů pomocí MS

## Přístupy:

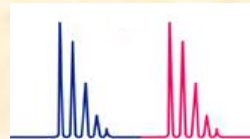
### ✖ Absolutní kvantifikace

stanovení koncentrace ve vzorku pomocí standardu o známé koncentraci

### ✖ Relativní kvantifikace

poměrné zhodnocení změny koncentrace proteinu ve srovnávaných vzorcích

## Metody:



### ❖ s izotopicky odlišnými značkami

stejně 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

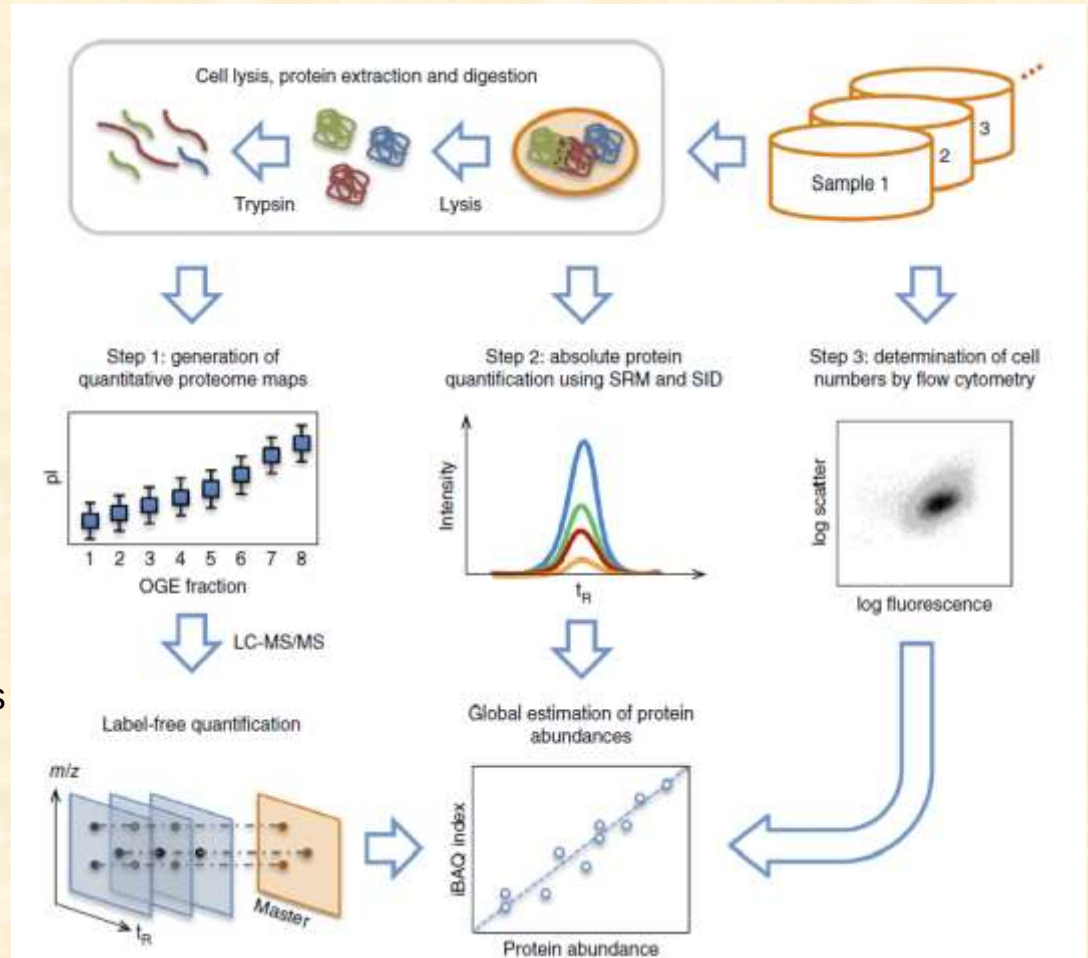
**22 different growth conditions** in biological triplicates.

- (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.

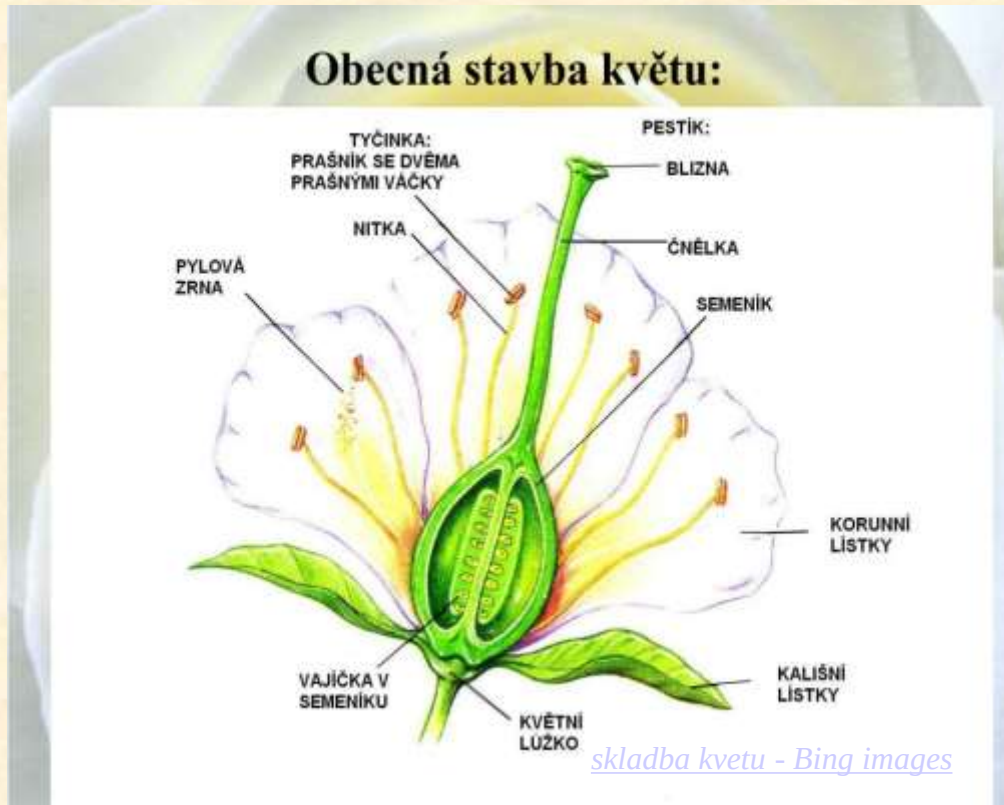
cellular protein concentrations  
for **55% of predicted *E. coli* genes** (>2,300 proteins)

**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



Britannica.com



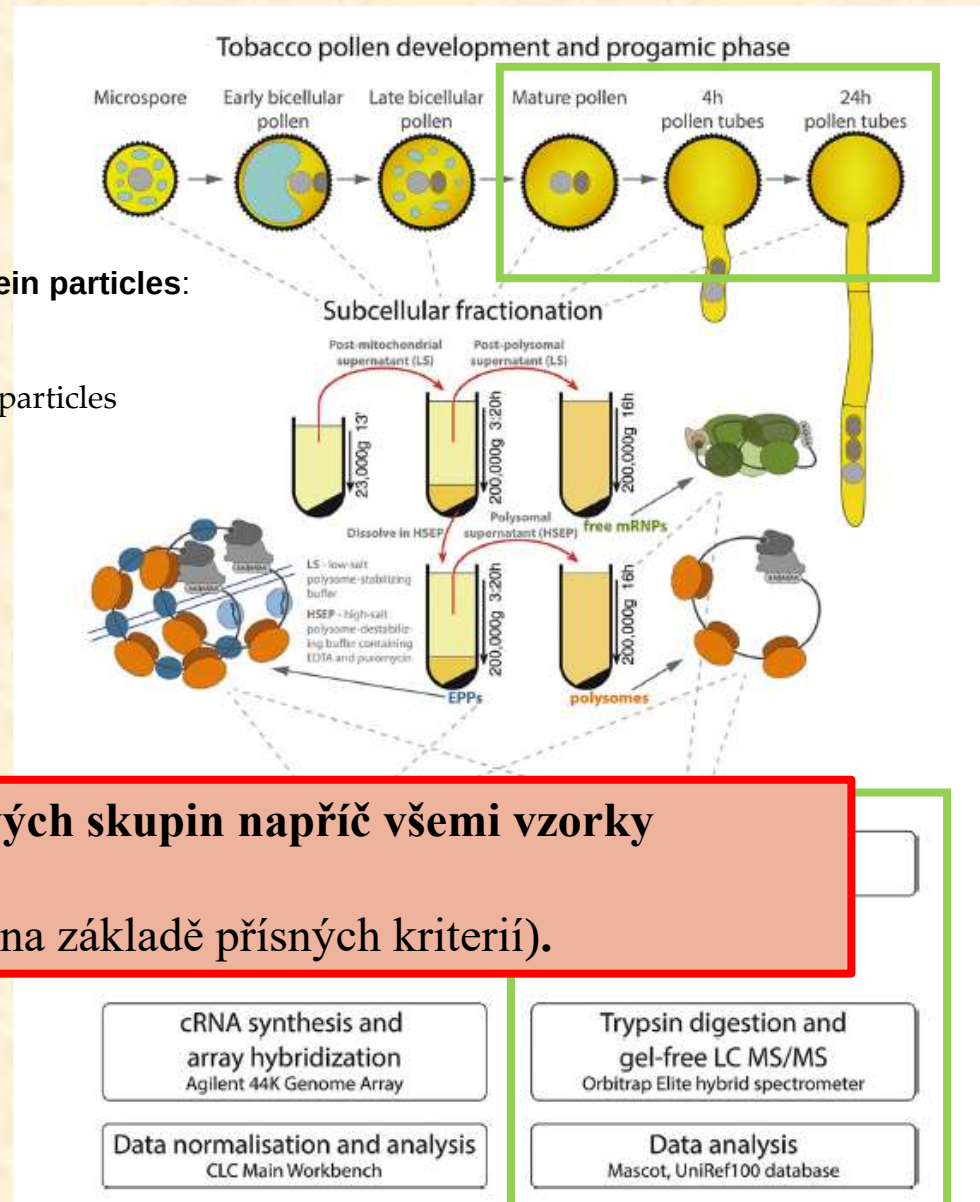
# Charakterizace rozsahu a dynamiky regulace translace během vývoje pylu a následném opylení



the **three types of mRNA-containing ribonucleoprotein particles**:

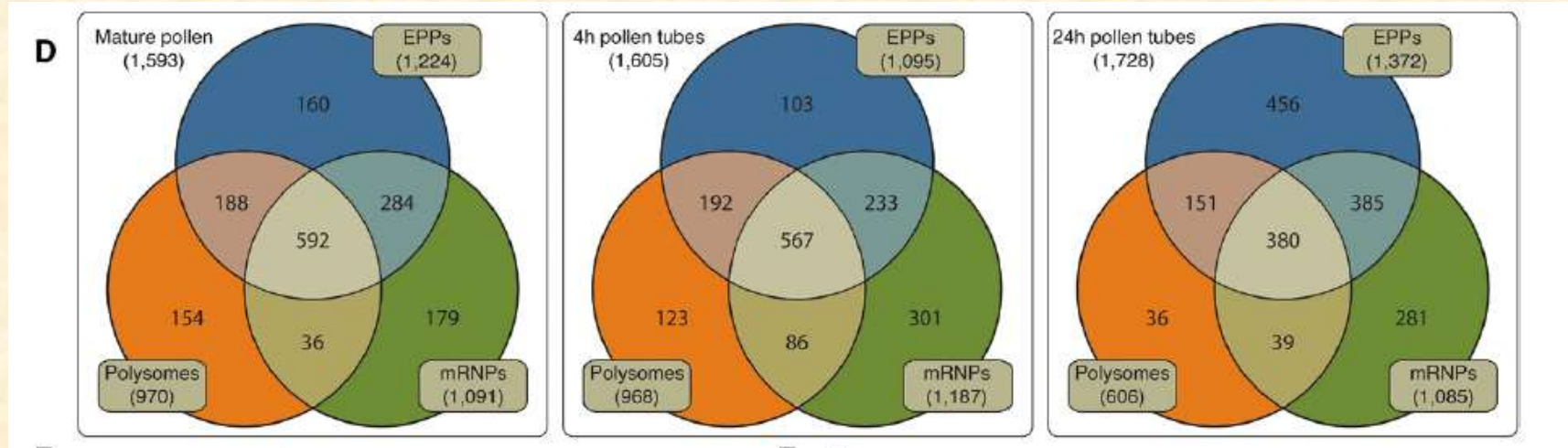
- **POL** - translating polysomes
- **RNP** - free ribonuclear particles
- **EPP** - long-term storage EDTA/puromycin-resistant particles

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



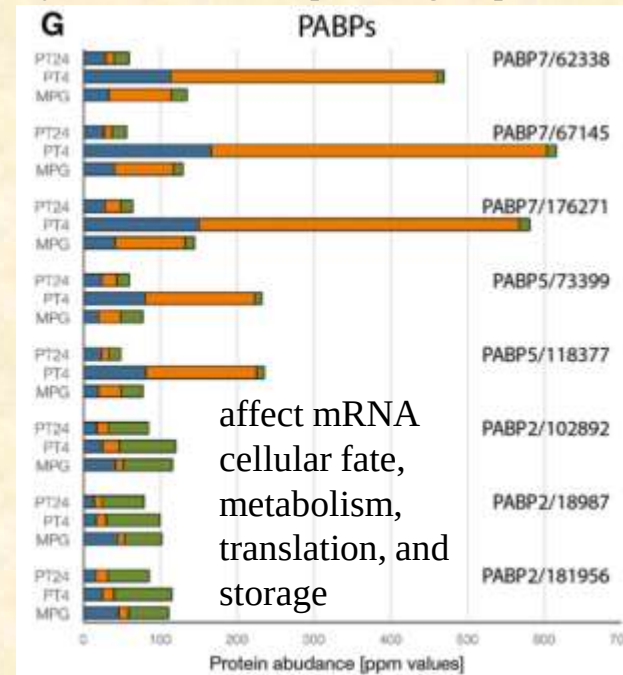
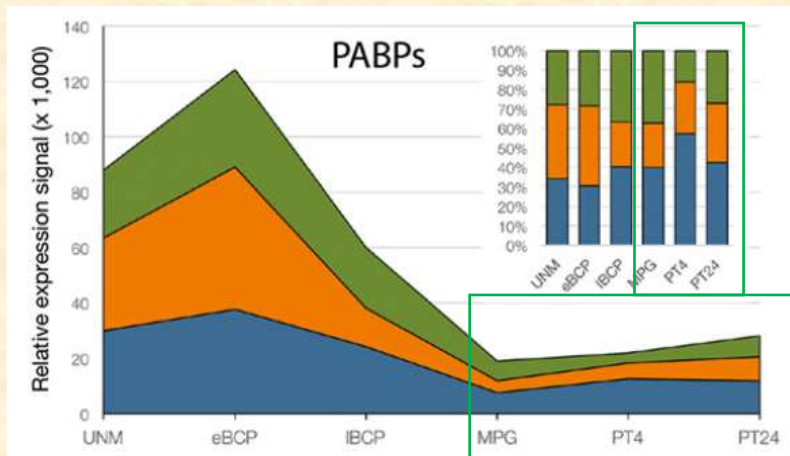
- **9317 identifikovaných proteinových skupin napříč všemi vzorky**
- **2,089 vybráno pro kvantifikaci (na základě přísných kritérií).**

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



Dynamics of seven protein groups associated with PABPs

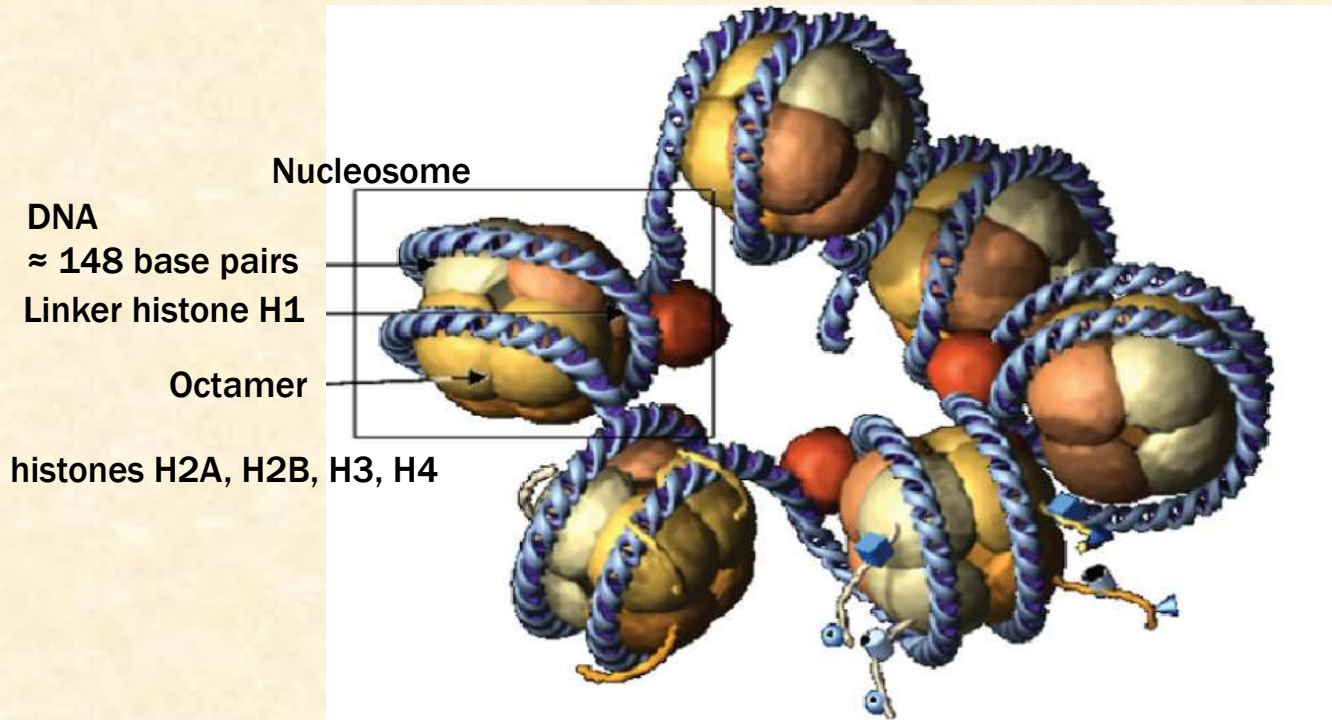
Overall abundance of PABP transcripts



affect mRNA  
cellular fate,  
metabolism,  
translation, and  
storage

# **Charakterizace posttranslačních modifikací**

# Chromatin scheme



Inactive chromatin  
(heterochromatin)

compacted = DNA not accessible  
no transcription

Chemical modifications of histones

Active chromatin  
(euchromatin)

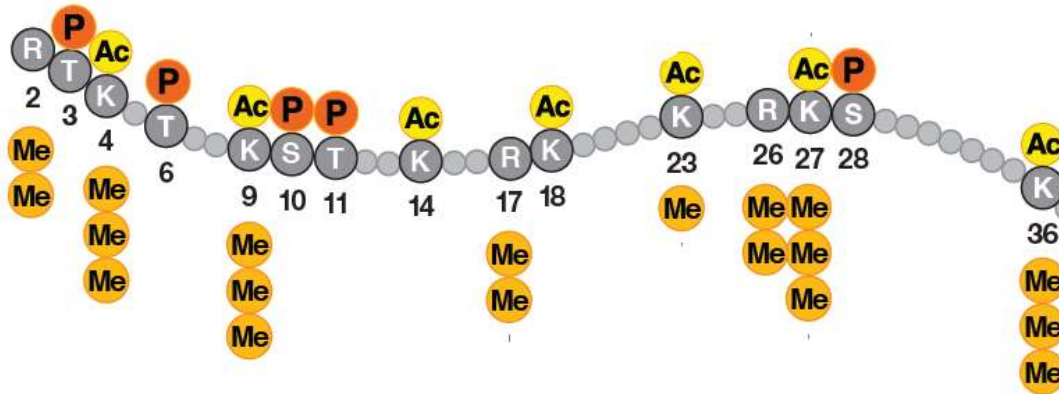
open form = DNA accessible  
transcription regulation

*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*

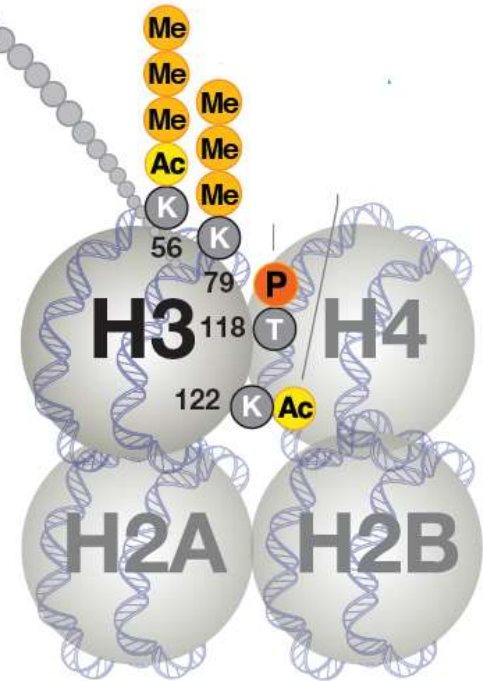
Martinet and Bertrand, *Cancer Management and Research* 3:117–141 (2011)  
Spotswood and Turner, *J. Clin. Invest.* 110:577–582 (2002)



## Histone H3 most frequent PTMs

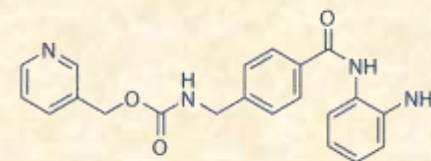


Ac – acetylase  
 Me – metylace  
 P - fosforylace



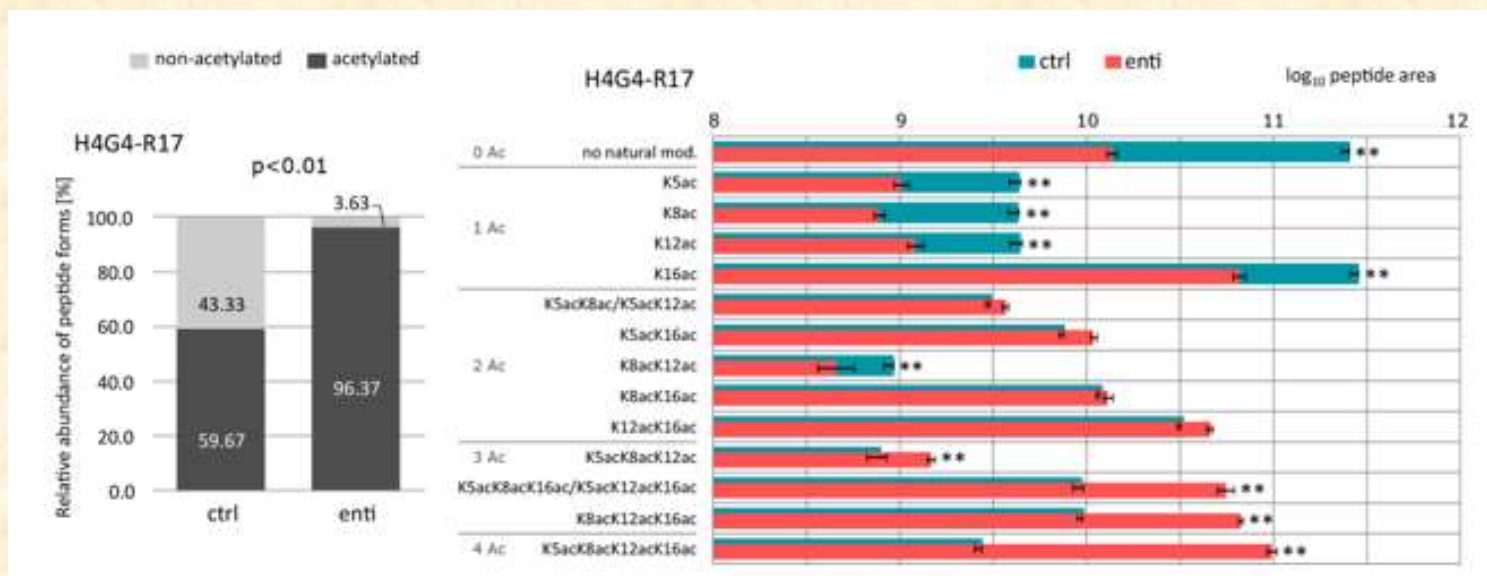
# Hodnocení účinku inhibitorů histondeacetyláz

*HDAC inhibitors – potential for cancer treatment*



Entinostat (MS-275)

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



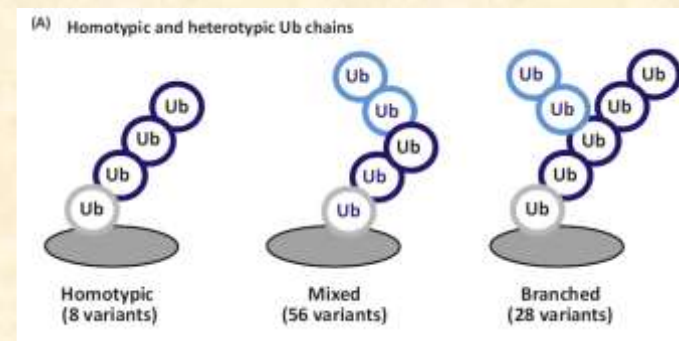
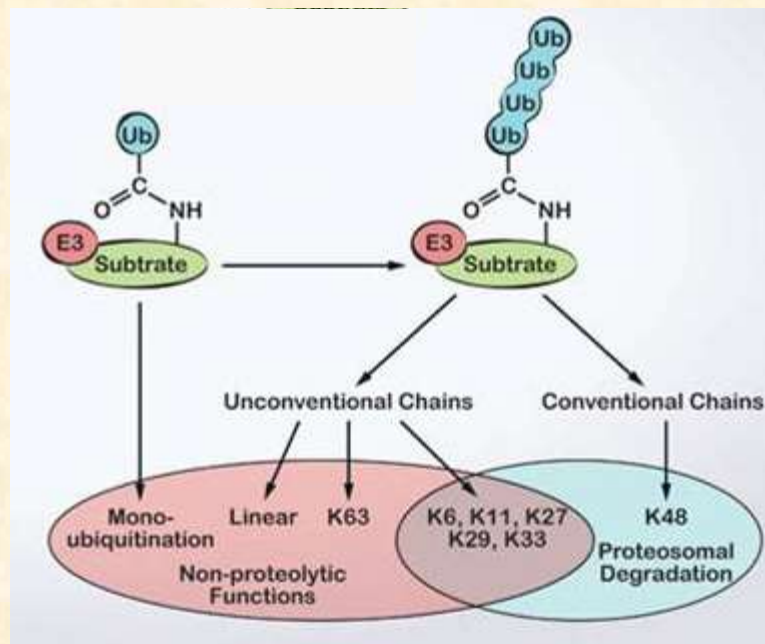
**MEC1** – buněčná linie odvozená z buněk pacienta s chronickou lymfocytární leukémií (B-CLL)

# 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)

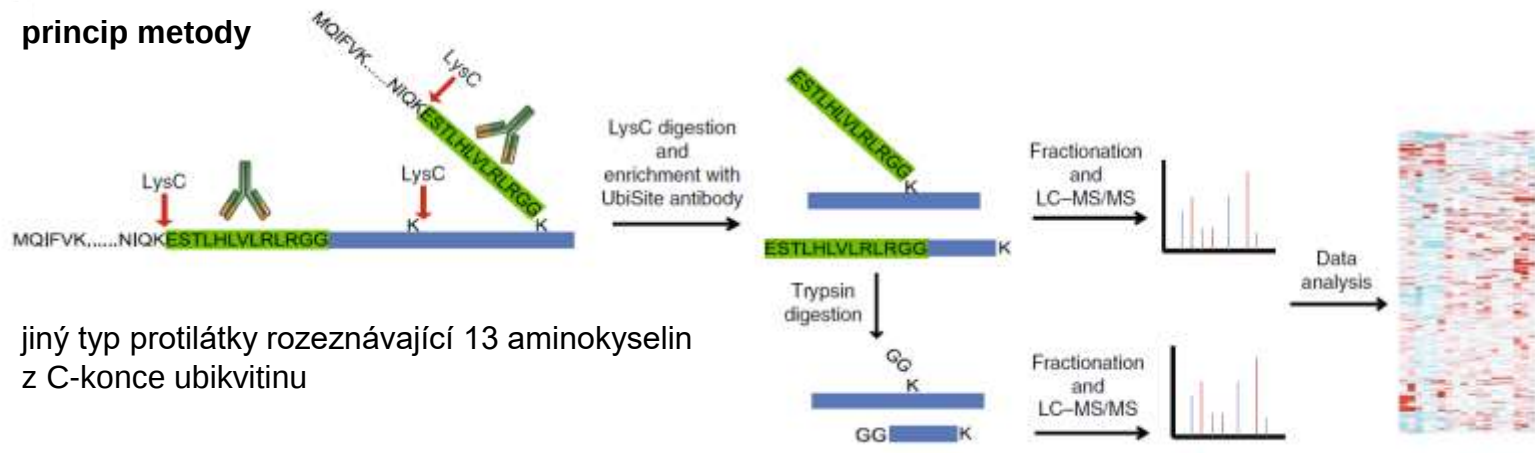
MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGK  
 QLEDGRTLSDYNIQKESTLHLV LRLRGG



# Charakterizace ubikvitinací

## Schéma experimentu pomocí imunoprecipitace

### princip metody

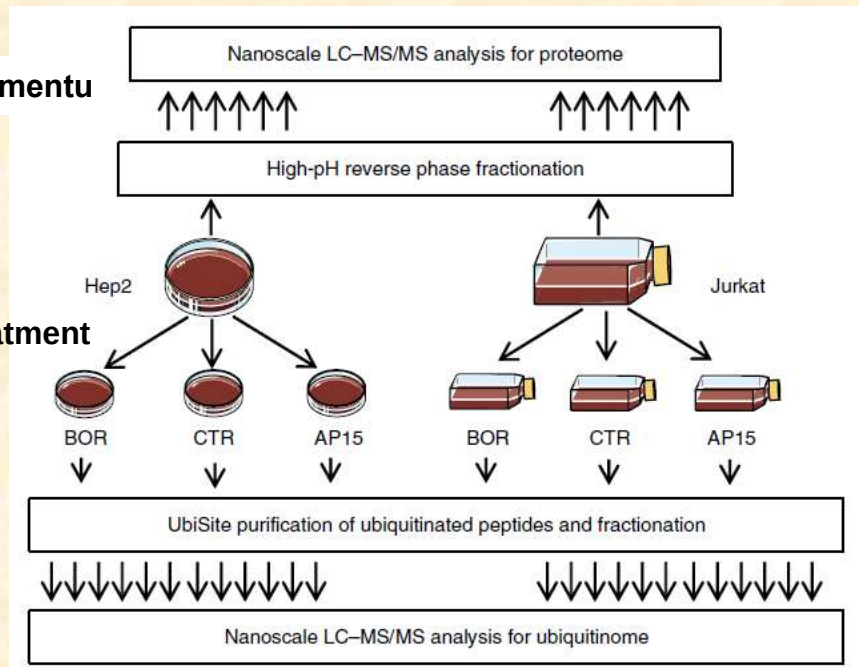


### schéma experimentu

two human cell lines  
Hep2  
Jurkat

### proteasomal inhibitors treatment

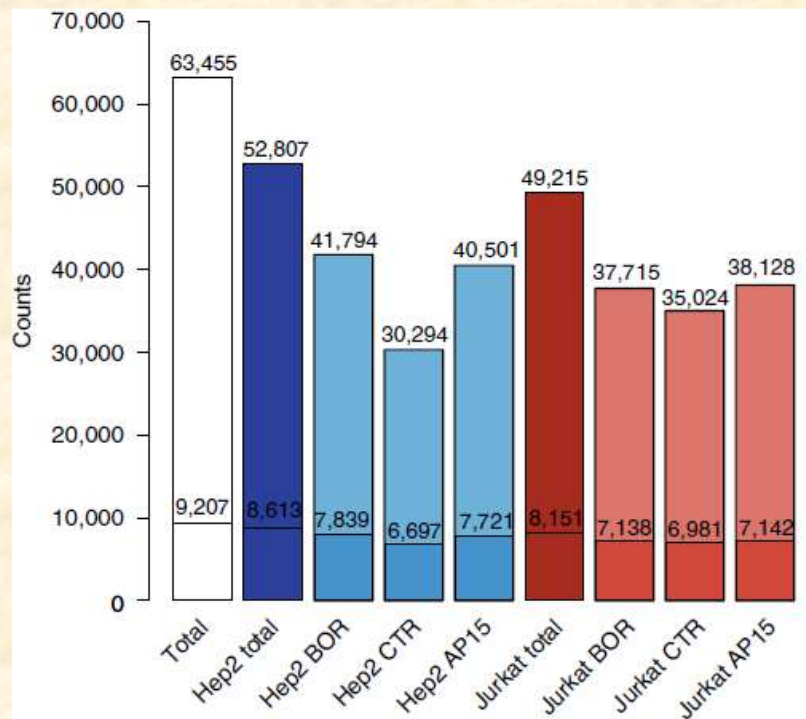
BOR - bortezomib  
AP15 - b-AP15





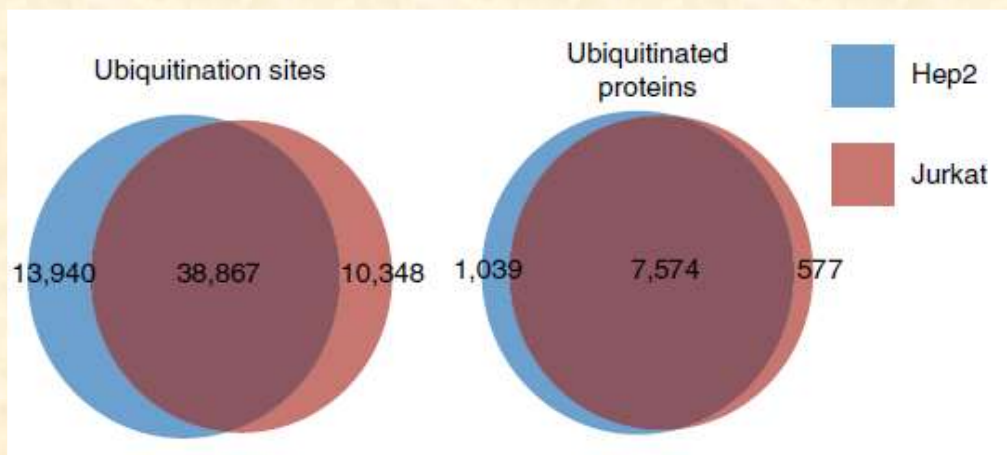
# Charakterizace ubikvitinací

## 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).

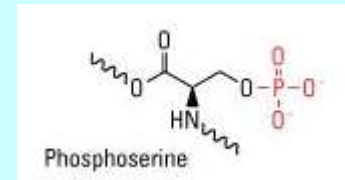
# Fosforilace

## 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)*

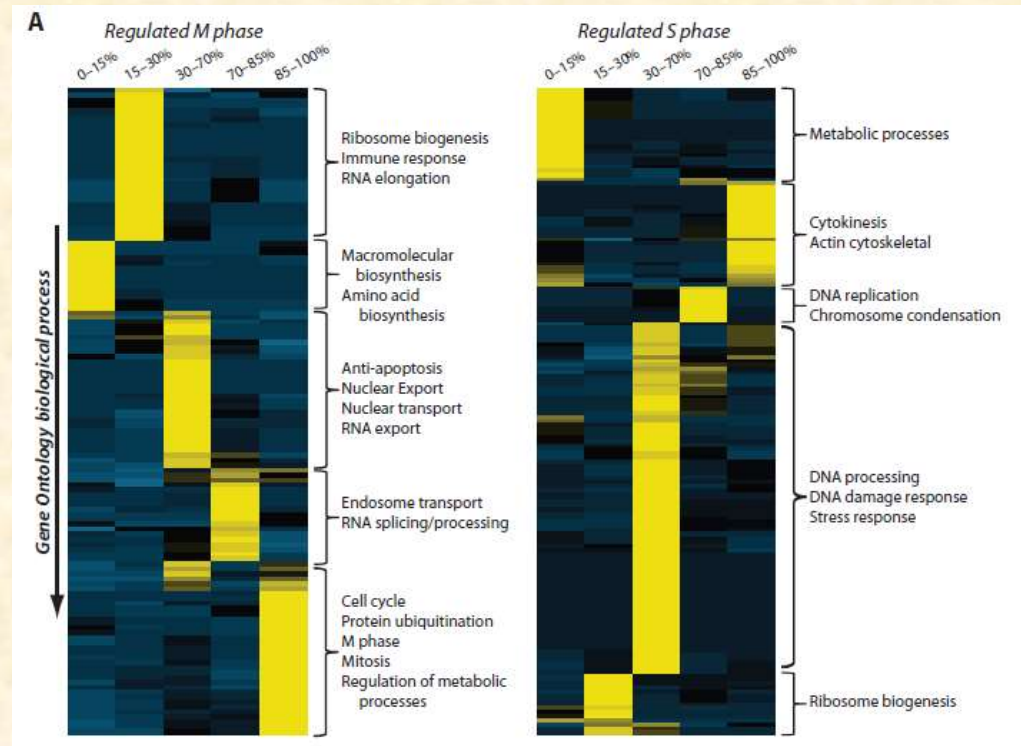
# Analýza fosfoproteomu

změny během buněčného cyklu

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

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

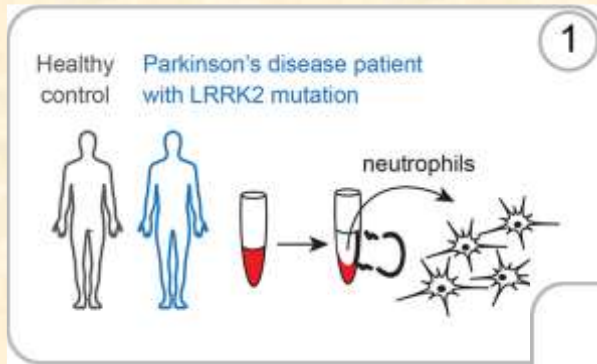
- HeLa buňky
- SILAC značení
- TiO<sub>2</sub> frakcionace
- LC-MS/MS (Orbitrap)



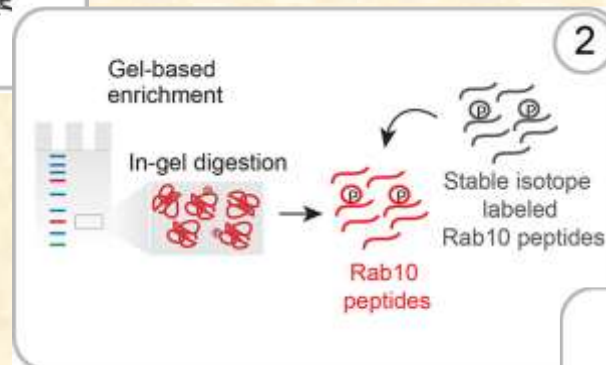
The panels show the phenotypic phosphoproteome comparison organized by GO biological process for mitotic (left) and S phase (right) cells. Proteins involved in metabolic processes have high-occupancy phosphorylation sites during mitosis, but low-occupancy sites during S phase (color scale: yellow, high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

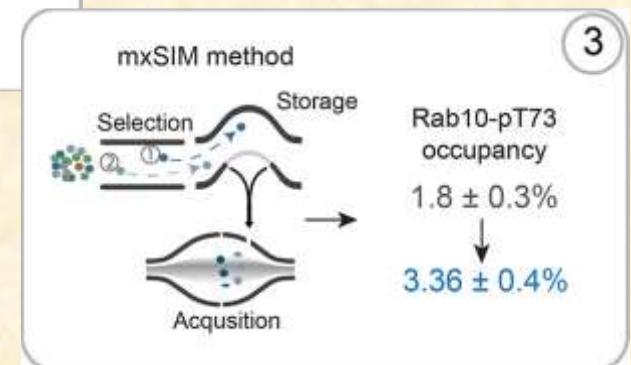


Fosforylace na Thr73



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**

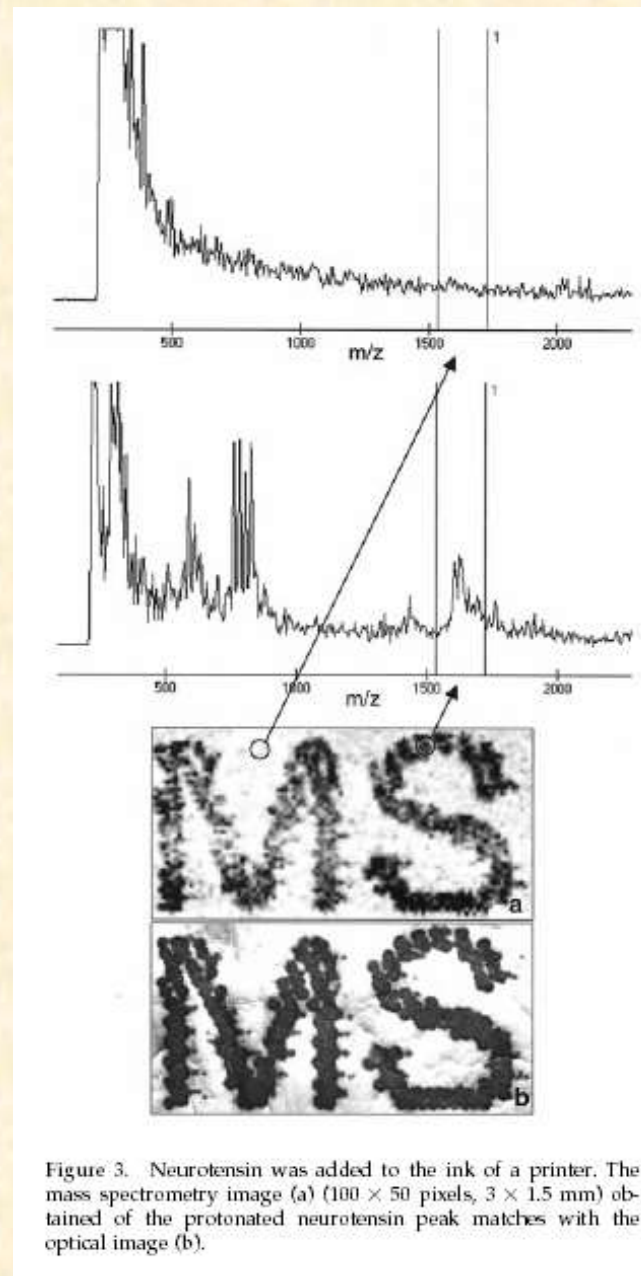
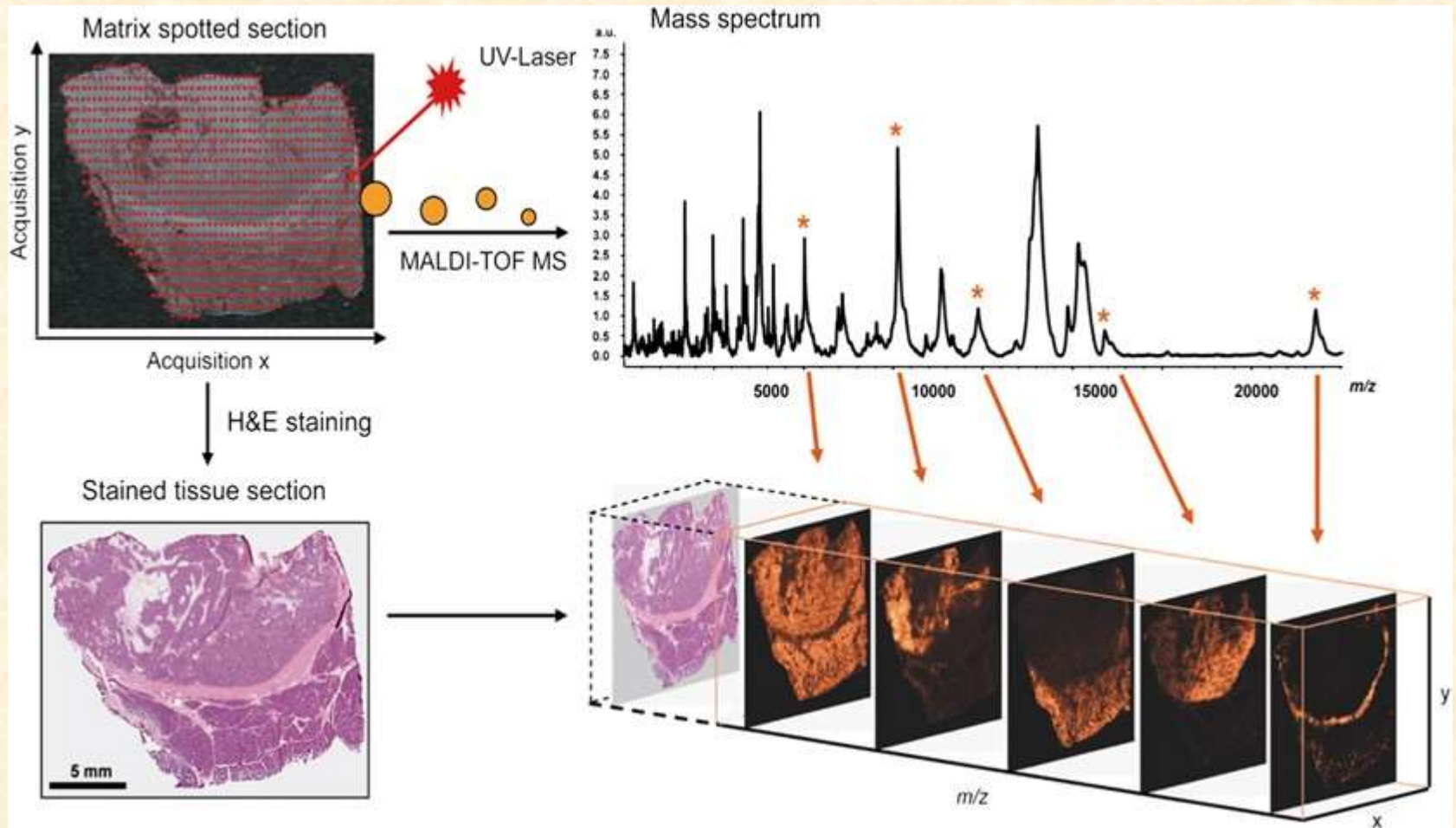
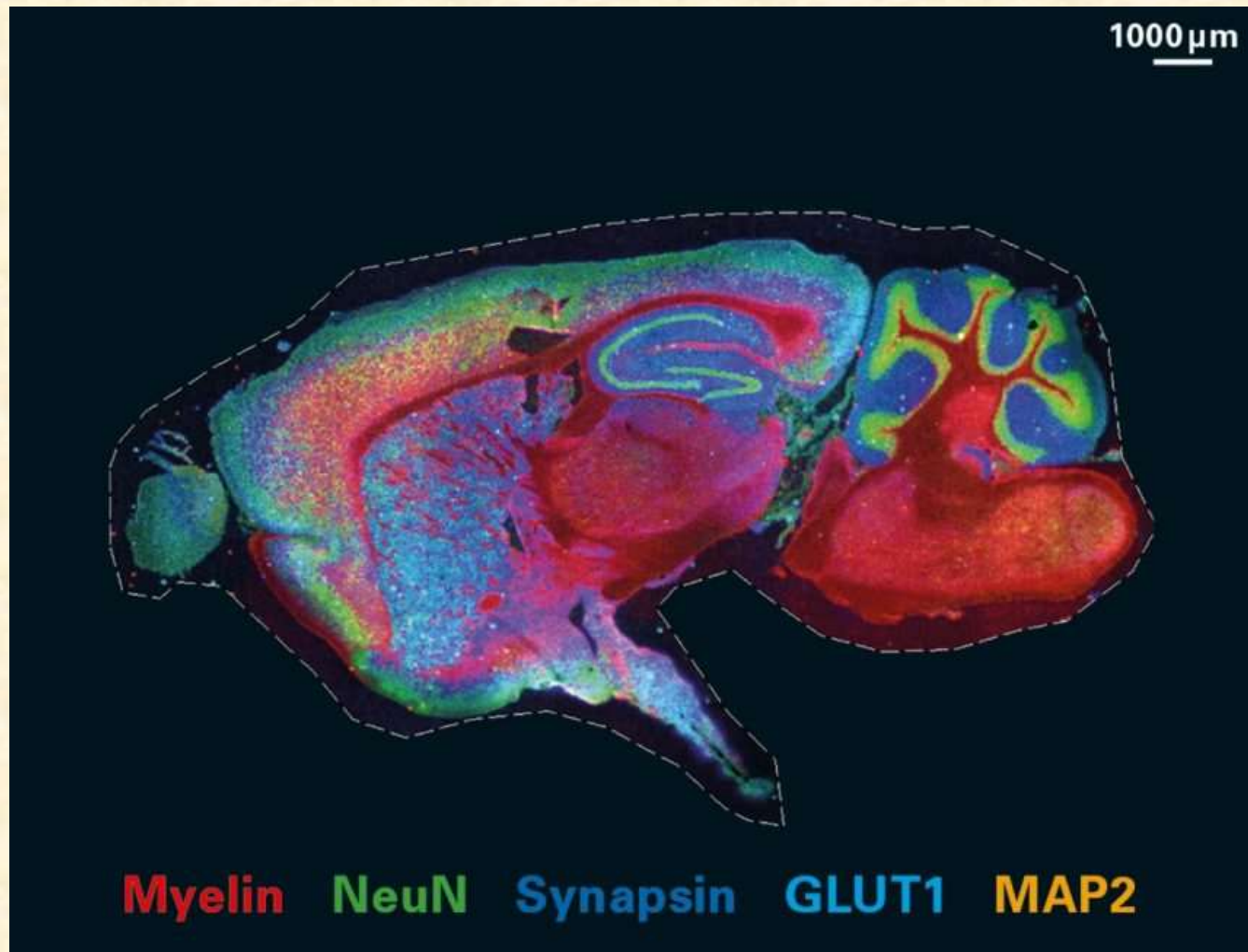


Figure 3. Neurotensin was added to the ink of a printer. The mass spectrometry image (a) ( $100 \times 50$  pixels,  $3 \times 1.5$  mm) obtained of the protonated neurotensin peak matches with the optical image (b).

# MALDI-MS zobrazování



# MALDI-MS zobrazování



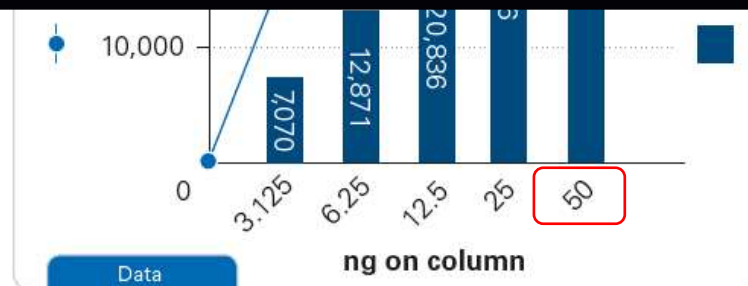
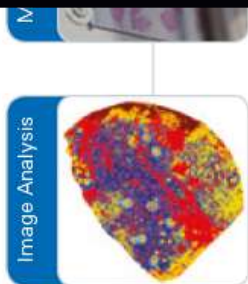


## SpatialOMx Workflow

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  $\mu\text{m}$  in diameter. Using MALDI guided laser microdissection (LCM) for example, a 50  $\mu\text{m}$  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

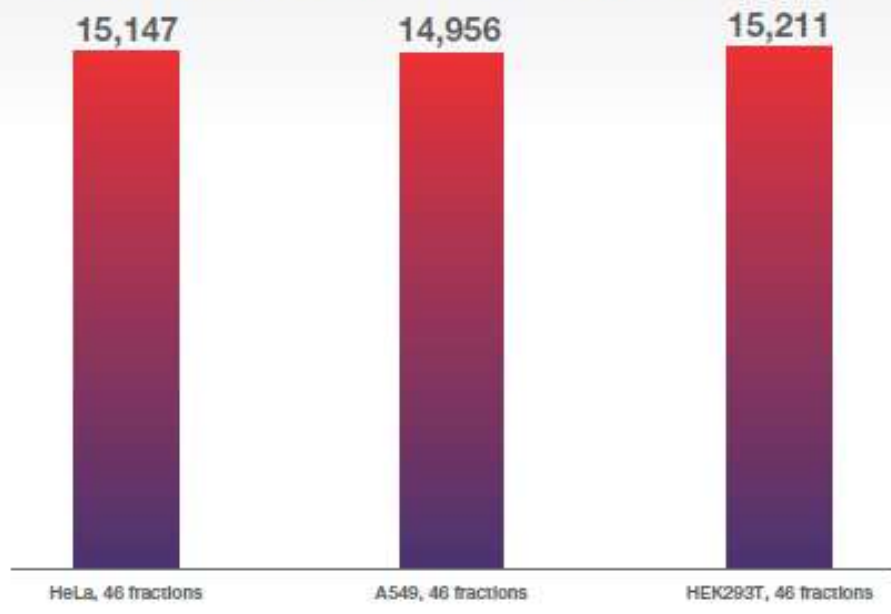
**GIGO**

Úprava vzorku

MS analýza

Vyhodnocení dat

Near whole-proteome depth of coverage in 4.5 hours



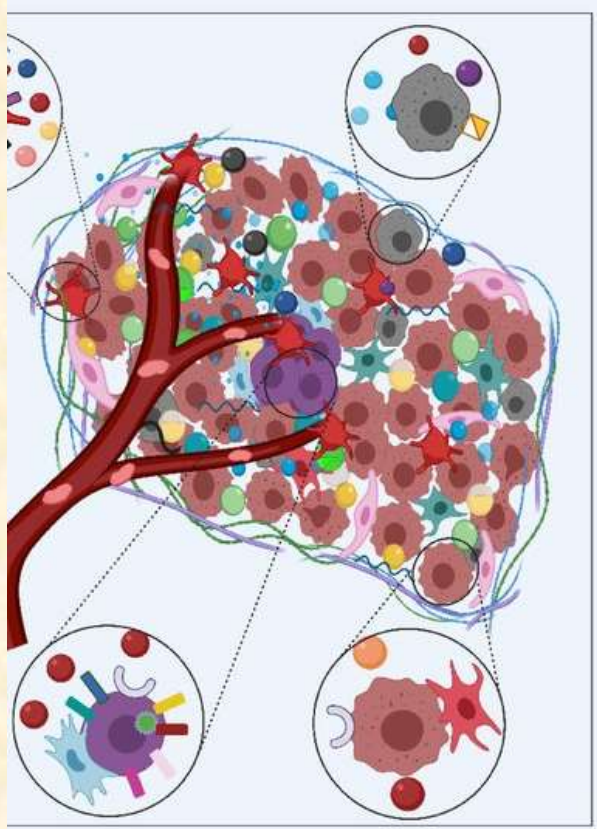
- tři buněčné linie ( $\sim 10 \mu\text{g}$ )
- 46 frakcí
- 200 ng/frakce
- LC-MS/MS (5,5 min)

*Thermo application note*

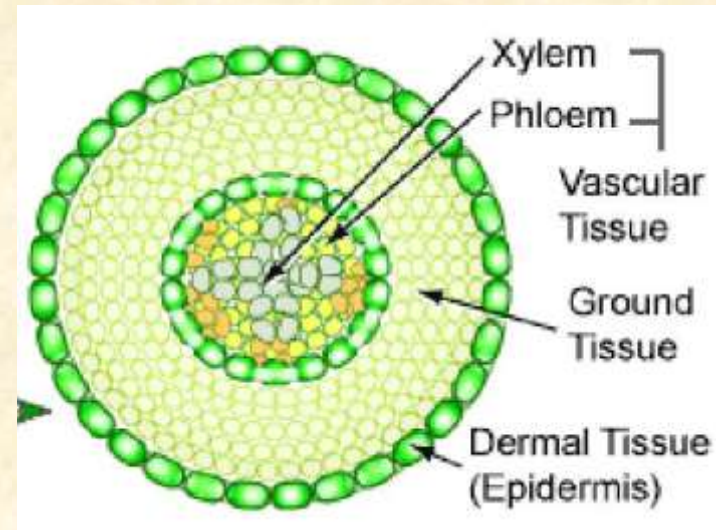


# Proteomika jedné buňky

## Proč?



buněčná struktura nádoru

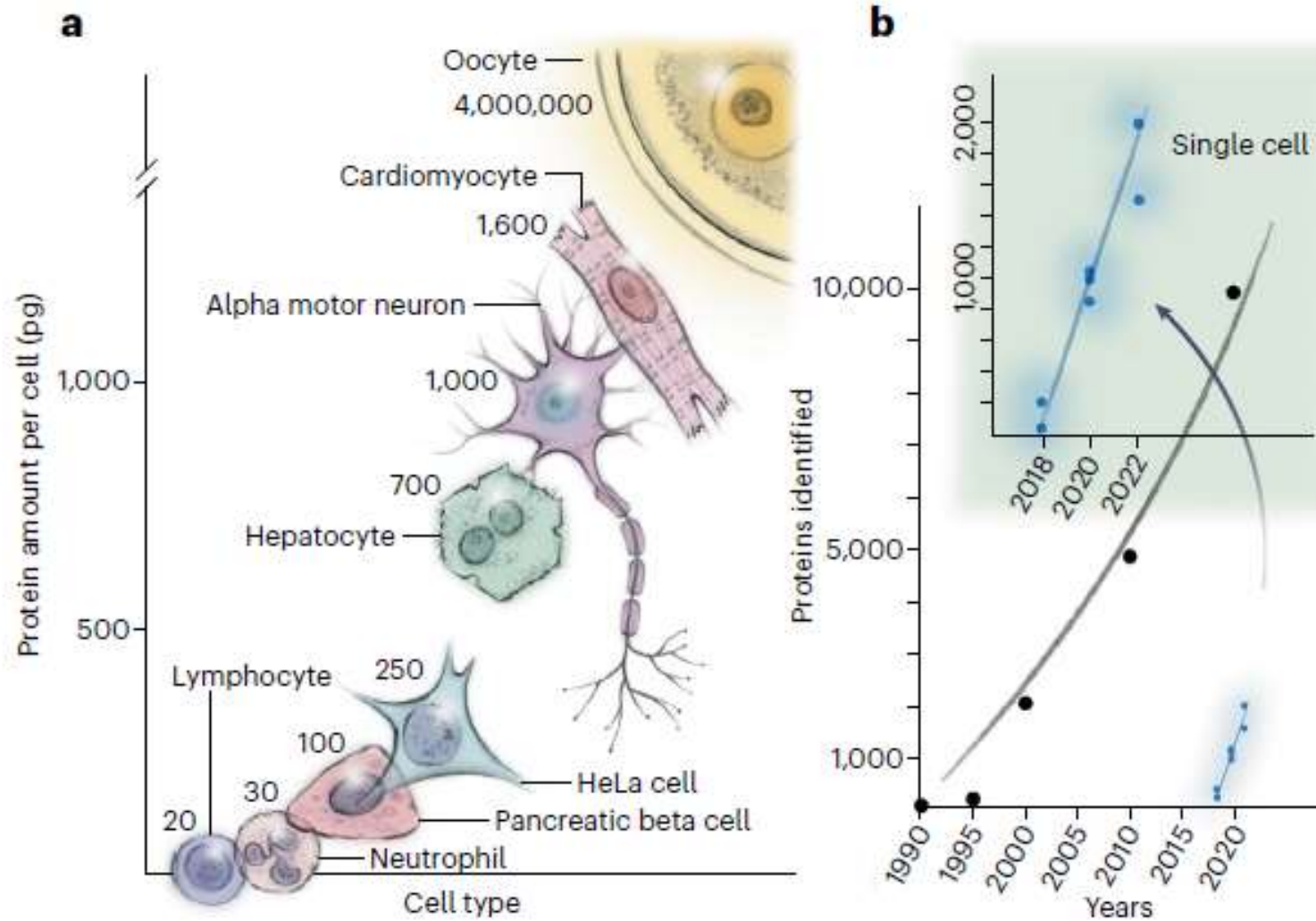


rostinná pletiva (stonek)

**Další krok k hlubšímu poznání molekulární podstaty života.**

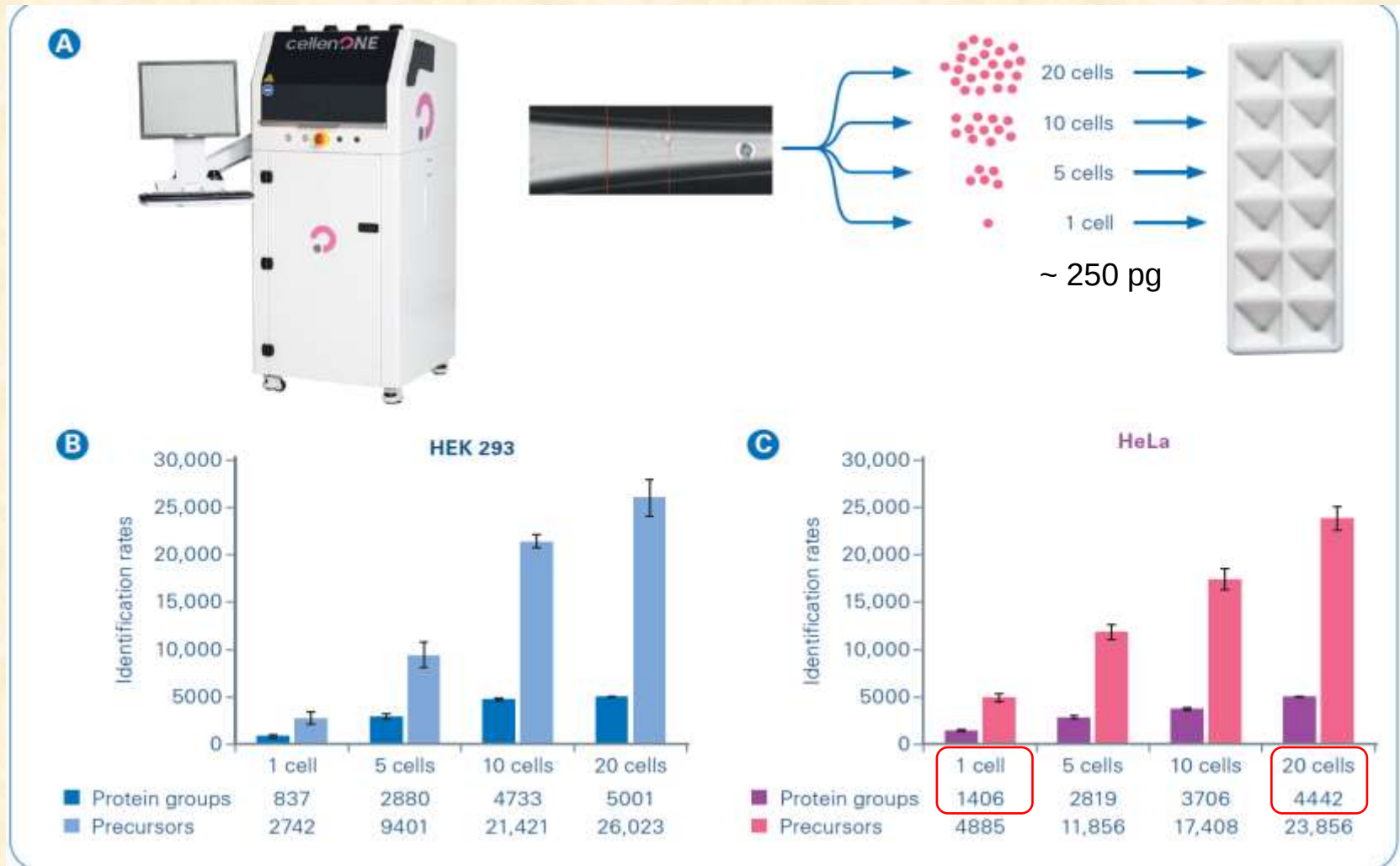


# Proteomika jedné buňky



# Proteomika jedné buňky

02/2022



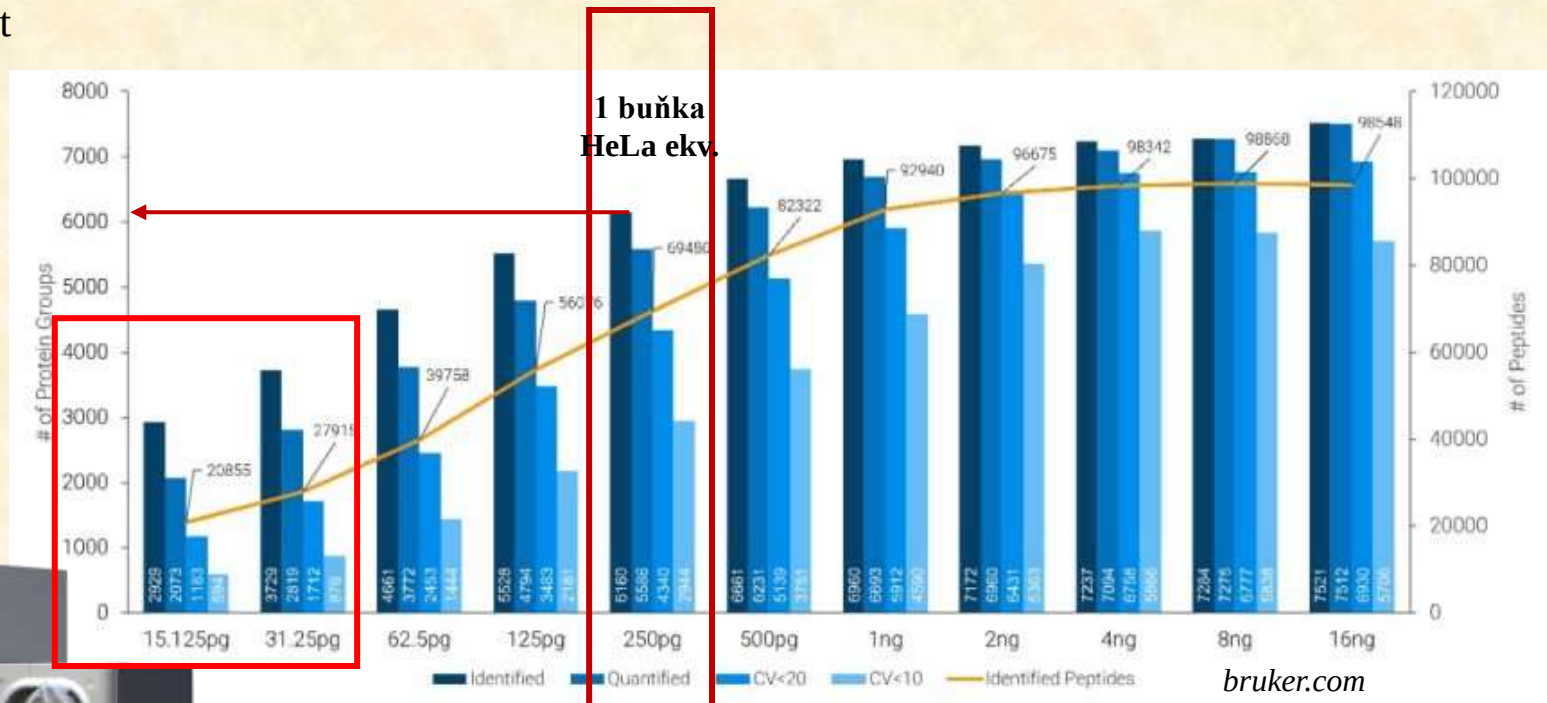
**HEK 293** – embryonální buňky odvozené z ledvin plodu

**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

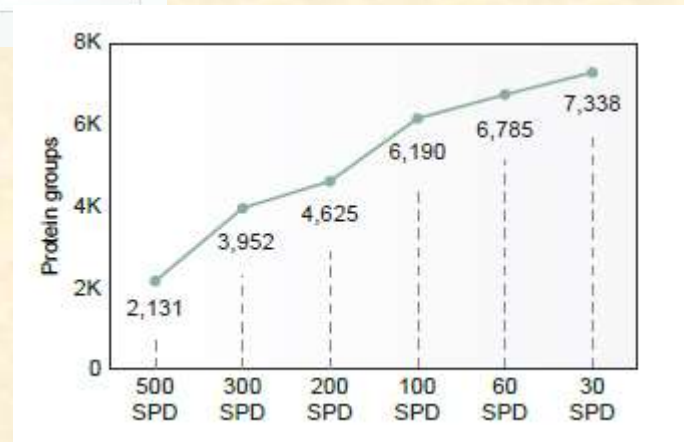
# Rychlost proteomické analýzy

## klinická praxe

Počet vzorků/den



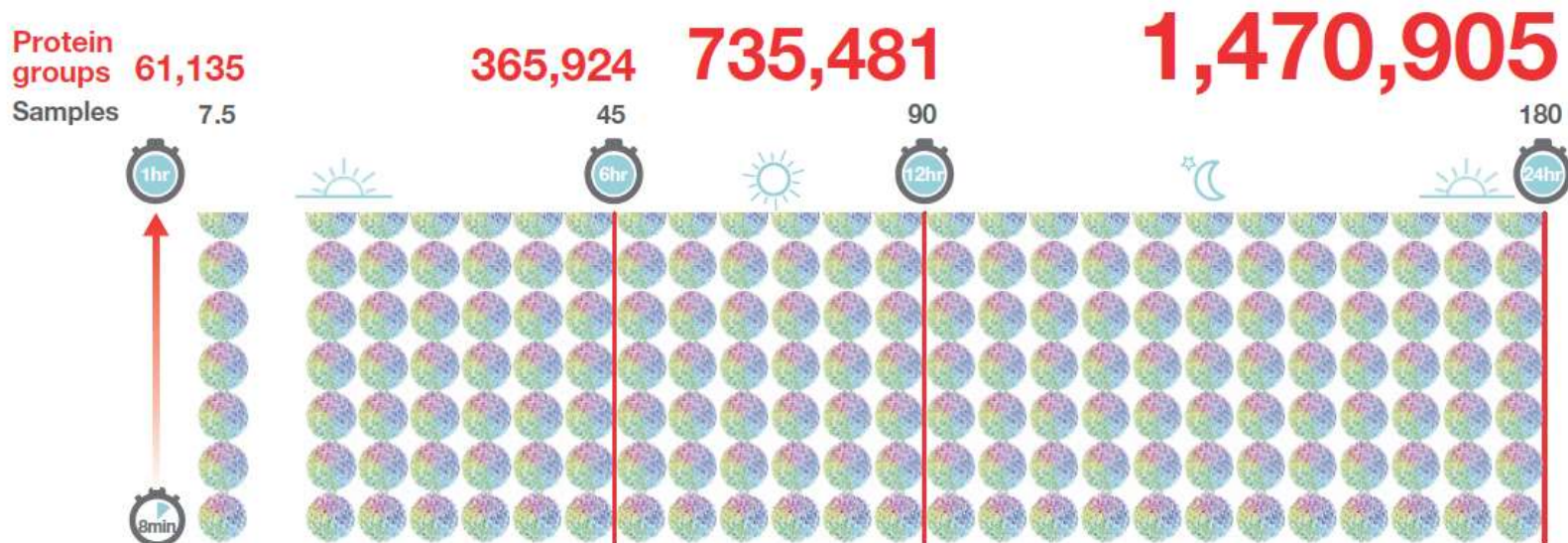
- automatizace přípravy vzorku
- rychlá LC separace
- vysoká rychlost sběru dat v MS





# Rychlost proteomické analýzy

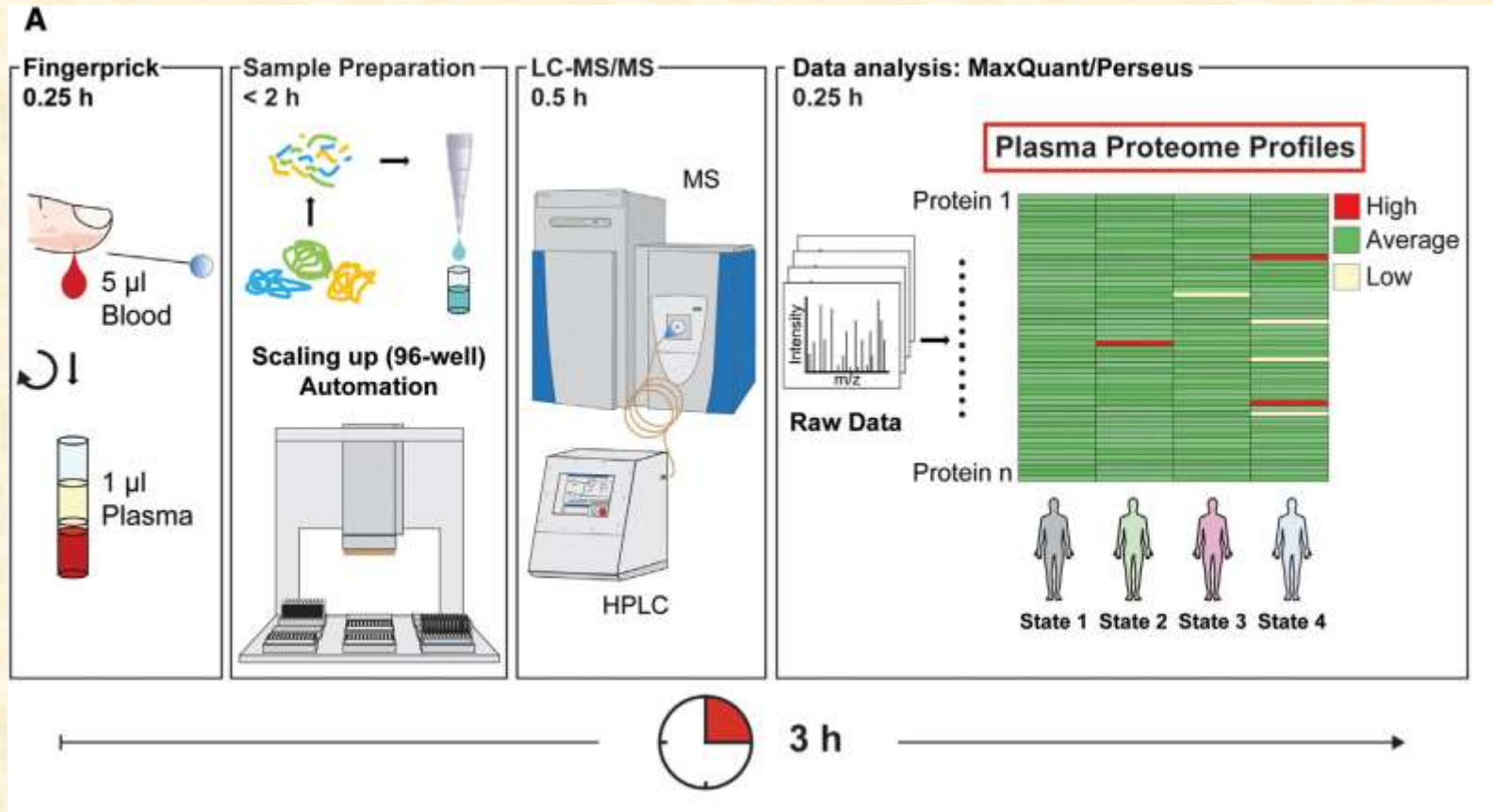
In one day, analyze over 1.4 million protein groups from 180 samples



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

# Analýza krevní plazmy

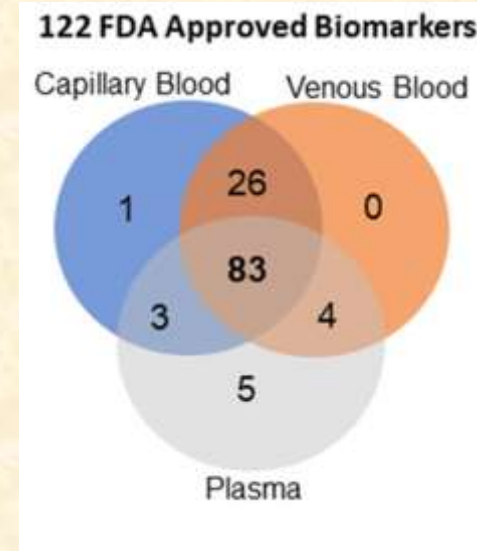
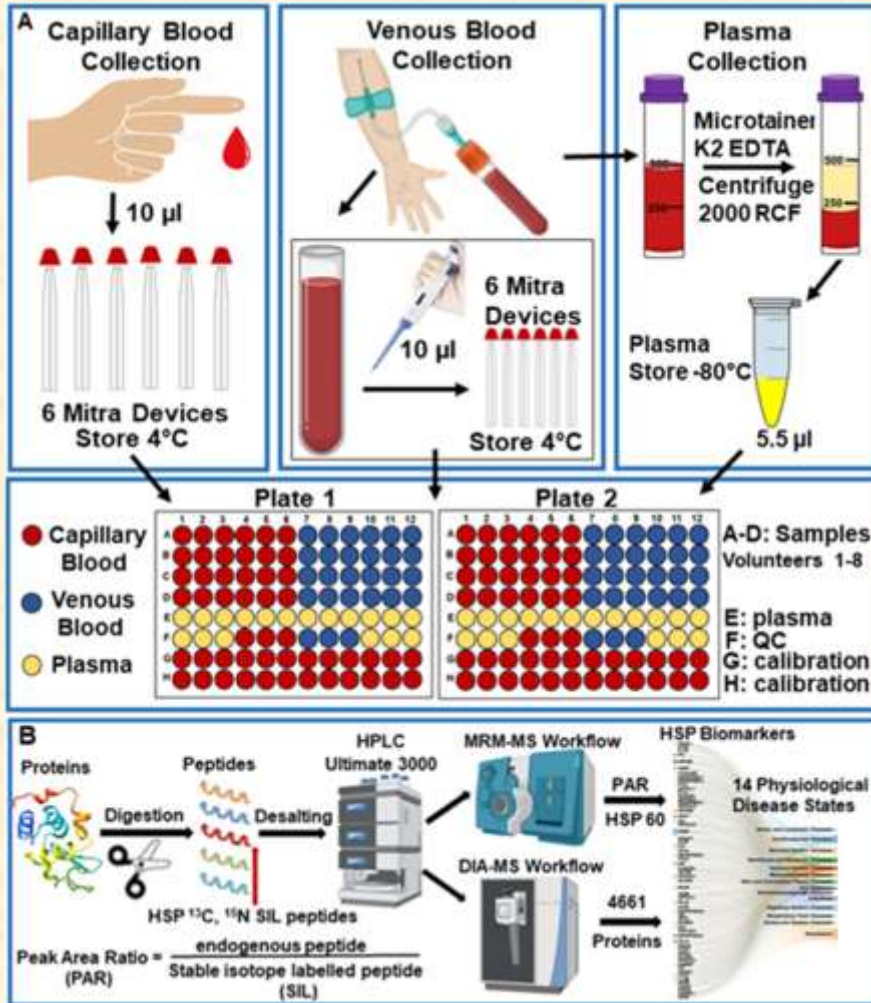
The plasma proteome profile as a proteomic portrait of a person's health state



>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