



# Proteomika a Systémová biologie

# Obsah

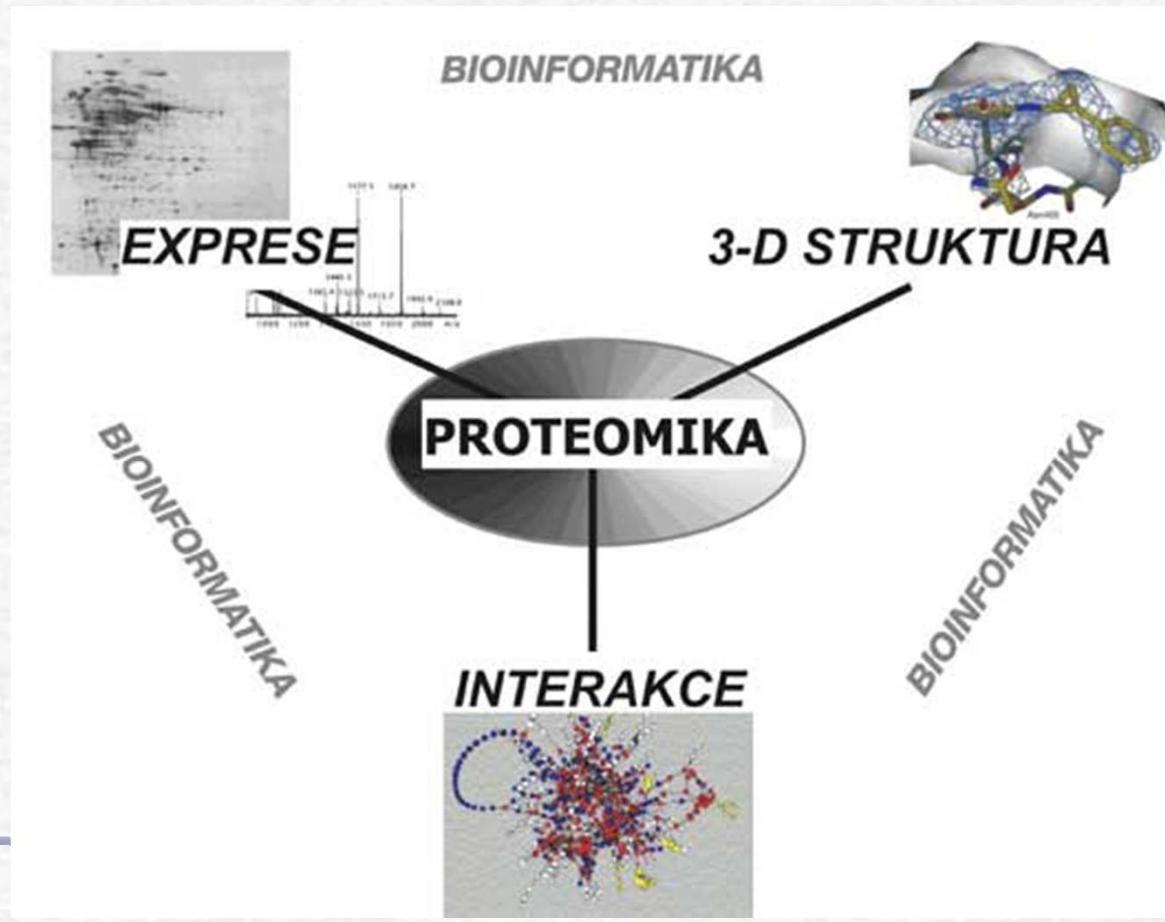
- Co je to proteomika
- Nástroje proteomiky
  - DNA čipy
  - Gelová elektroforéza a hmotnostní spektrometrie
  - Proteinové čipy
- Systémová biologie
  - Biologické sítě
  - Dynamika biologických systémů

# Proteomika

- Obor, který se zabývá globálním hodnocením exprese genetické informace na úrovni bílkovin (**proteomem**), rovněž však zkoumá strukturu a interakce proteinů.
- HUPO** (*Human Proteome Organization*)
- Cílem je identifikaci všech proteinů kodovaných lidským genomem s následným stanovením
  - jejich exprese v různých buňkách daného organismu (*expresní proteomika*) v čase
  - jejich subcelulární lokalizace v různých organelách
  - jejich posttranslačních modifikací
  - jejich vzájemných interakcí (*strukturní proteomika*)
  - vztahu mezi strukturou a funkcí (*funkční proteomika*).

# Proteomika

- Bioinformatika hraje zásadní roli ve všech sférách proteomiky



# Proteomika

## PROTEOM

- Kompletní sada bílkovin přítomných v daném okamžiku v buňce, nebo tkáni, zahrnující veškeré jejich modifikace, vzájemné interakce, lokalizaci a metabolický obrat.

## PROTEOMIKA

- kvantitativní a kvalitativní charakterizace úplné sady bílkovin organely, buněčné linie, tkáně nebo organismu
- kvantitativní a kvalitativní porovnání proteomu za různých podmínek

# Proč proteomika?

## Genom:

- lidský genom obsahuje 20-25.000 genů
- genom je konstantní celek

• Nelze určit funkci proteinu na základě sekvence DNA nebo mRNA

• Nelze popsat molekulární mechanismy pomocí studia genomu

• 200 typů ***posttranslacních modifikací***

• Existuje ***alternativní translace***

• Špatná korelace hladin mRNA a skutečných hladin bílkovin

## Proteom:

- lidské tělo obsahuje miliony proteinů (několik set tisíc)
- exprese proteinů v rámci jednoho organismu se liší



- Protože proteiny a nikoliv geny vytvářejí fenotyp

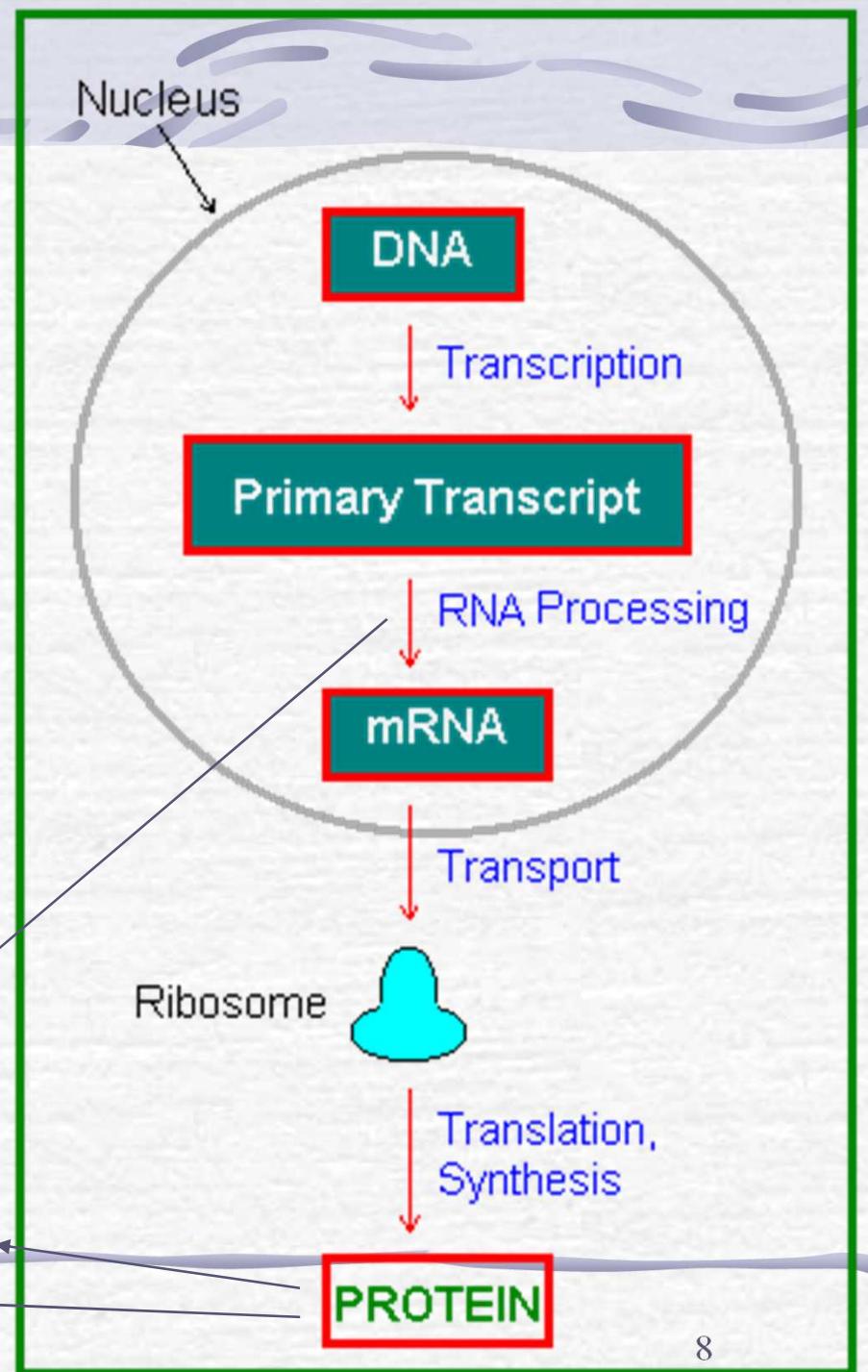
# Diverzita proteinů

- Posttranslační modifikace
  - Připojení funkčních skupin (acetát, fosfát, lipid, cukry)
  - Modifikace aminoskupin
  - Srušturní změny (tvorba disulfidických vazeb)
- Alternativní sestřih
- Alternativní zavinutí

Alternativní sestřih

Posttranslační modifikace

Alternativní zavinutí



# Nástroje proteomiky

- RNA / cDNA čipy – problematické využití
  - Zjištění úrovně exprese jednotlivých genů
- Dvourozměrná elektroforéza
  - Zjištění proteinového složení vzorku
- Hmotnostní spektrometrie
  - Složení jednoho proteinu
- Proteinový čip

# DNA čipy

## ✓ Využití:

- odhalení vzorů v expresi proteinů (které geny jsou exprimovány více a které méně, jaké jsou závislosti v expresi různých genů)
- odhalení chybějících nebo zmutovaných genů

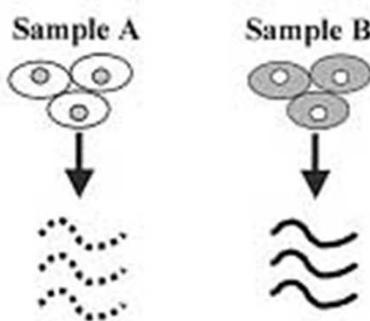
## ✓ Využití procesu paralelní hybridizace

## ✓ Čip

- sklíčko se sondami (vybrané úseky DNA)
- sondy uspořádané do pravidelné mřížky



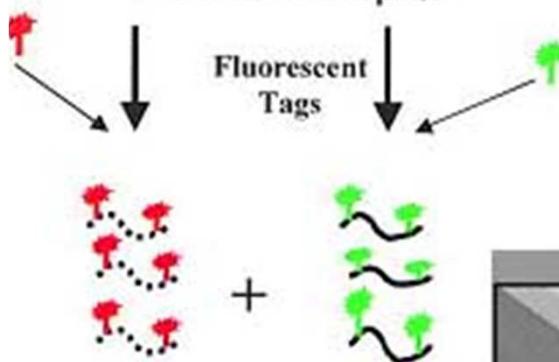
### A. RNA Isolation



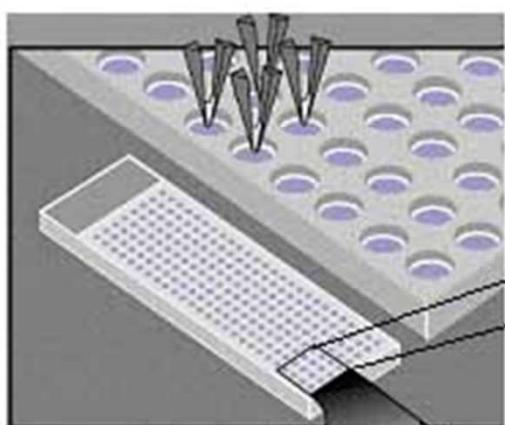
### B. cDNA Generation

### C. Labeling of Probe

Reverse Transcriptase

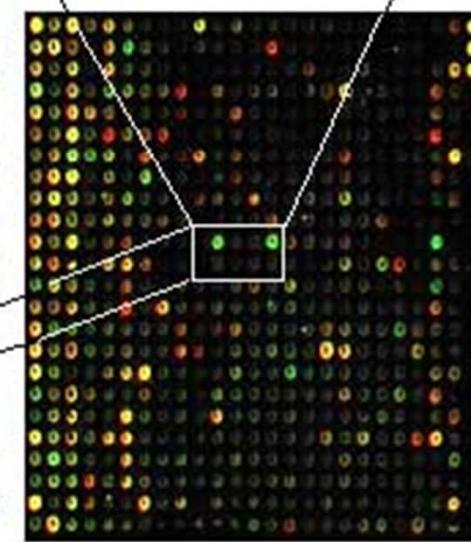
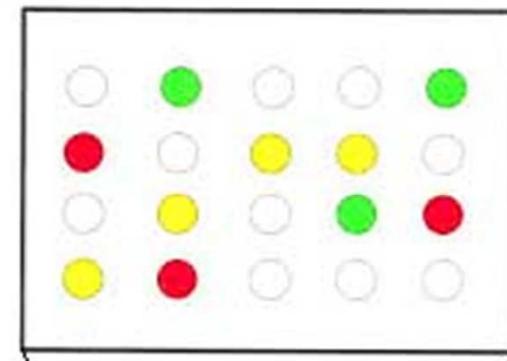


### D. Hybridization to Array



### E. Imaging

Sample A > B (Red circle)  
Sample B > A (Green circle)  
Sample A = B (Yellow circle)

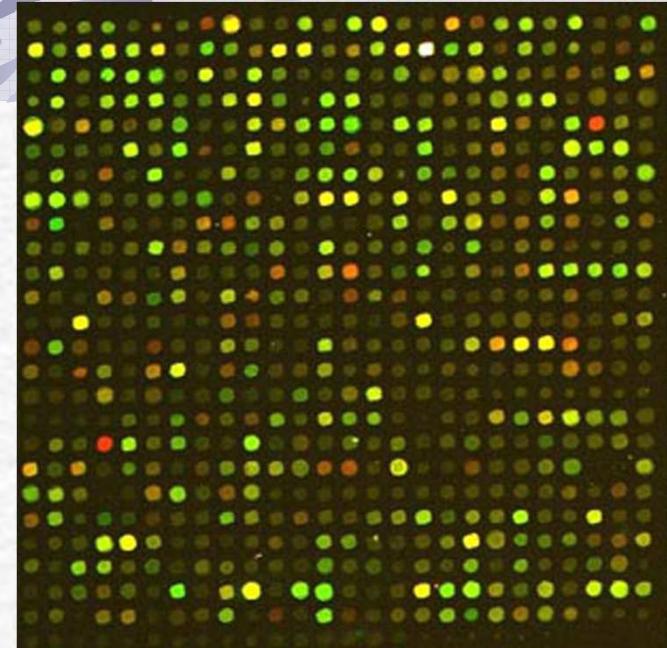


# DNA čipy

- 3 typy
  - Čipy pro zjišťování genové exprese
  - Čipy pro zjišťování mutací (SNPs)
  - Čipy pro odhalení chybějících genů
- Použití:
  - Nanesení obarveného vzorku tkáně na čip (cDNA)
  - Navození podmínek vhodných pro hybridizaci
  - Scanování výsledků pomocí laseru
  - Zpracování výsledků
- Animace

# DNA čipy a bioinformatika

- „ Návrh sond – oligonukleotidů, které:
  - jsou charakteristické pro jednotlivé geny
  - nebudou vytvářet sekundární strukturu
  - budou hybridizovat za stejných podmínek
  - Zasahují do dvou exonů
- „ Analýza obrazu mikročipu
  - filtrování šumu, intenzita jednotlivých bodů
- „ Analýza výsledků jednotlivých experimentů
  - správa ohromného množství dat
- „ Odhalení skupin genů, jejichž exprimace je zvýšena nebo snížena za určitých podmínek
  - shlukování



# Využití DNA čipů

- ✓ Diagnostika onemocnění
- ✓ Výběr vhodné léčby
- ✓ Zjišťování chybějících genů nebo zmutovaných genů
- ✓ Odhalení sklonů k různým onemocněním
- ✓ Výzkum procesů probíhajících v buňce
- ✓ Hledání cílových kandidátů (proteinů) pro nová léčiva
- ✓ Výzkum rezistence bakterií

# Problémy

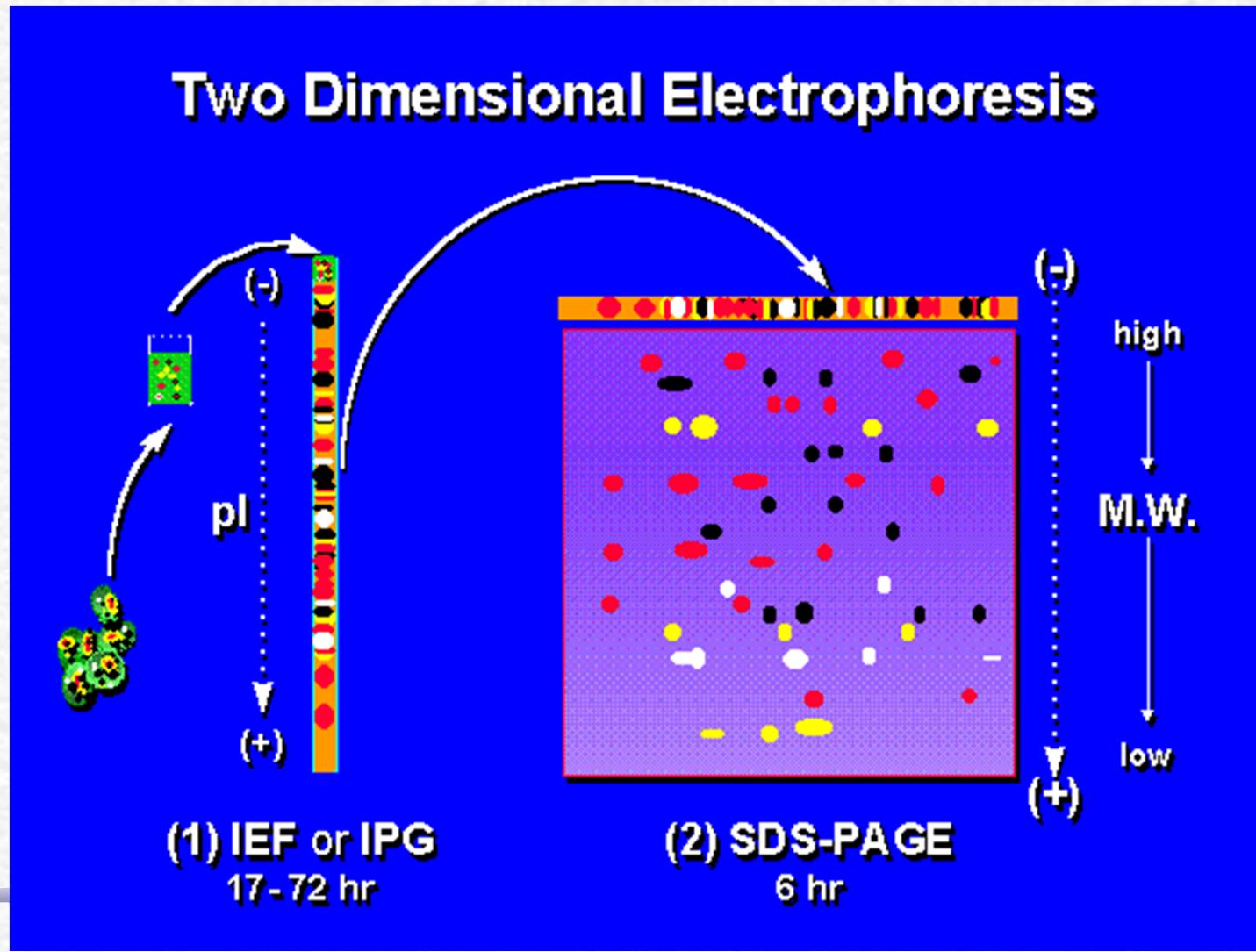
- ▶ Pracuje s mRNA a ne s proteiny
  - ne všechny mRNA jsou určeny pro překlad do proteinu
  - míra transkripce konkrétní, protein-kódující RNA zdaleka ne vždy odpovídá míře exprese či dokonce aktivity kódovaného proteinu díky mnoha faktorům (mRNA, RNA sestřih, posttranslační modifikace proteinů, atd.)
- ▶ Lze detekovat přítomnost nebo absenci dané mRNA (případně relativní míru exprese) nelze ale určit absolutní míru exprese



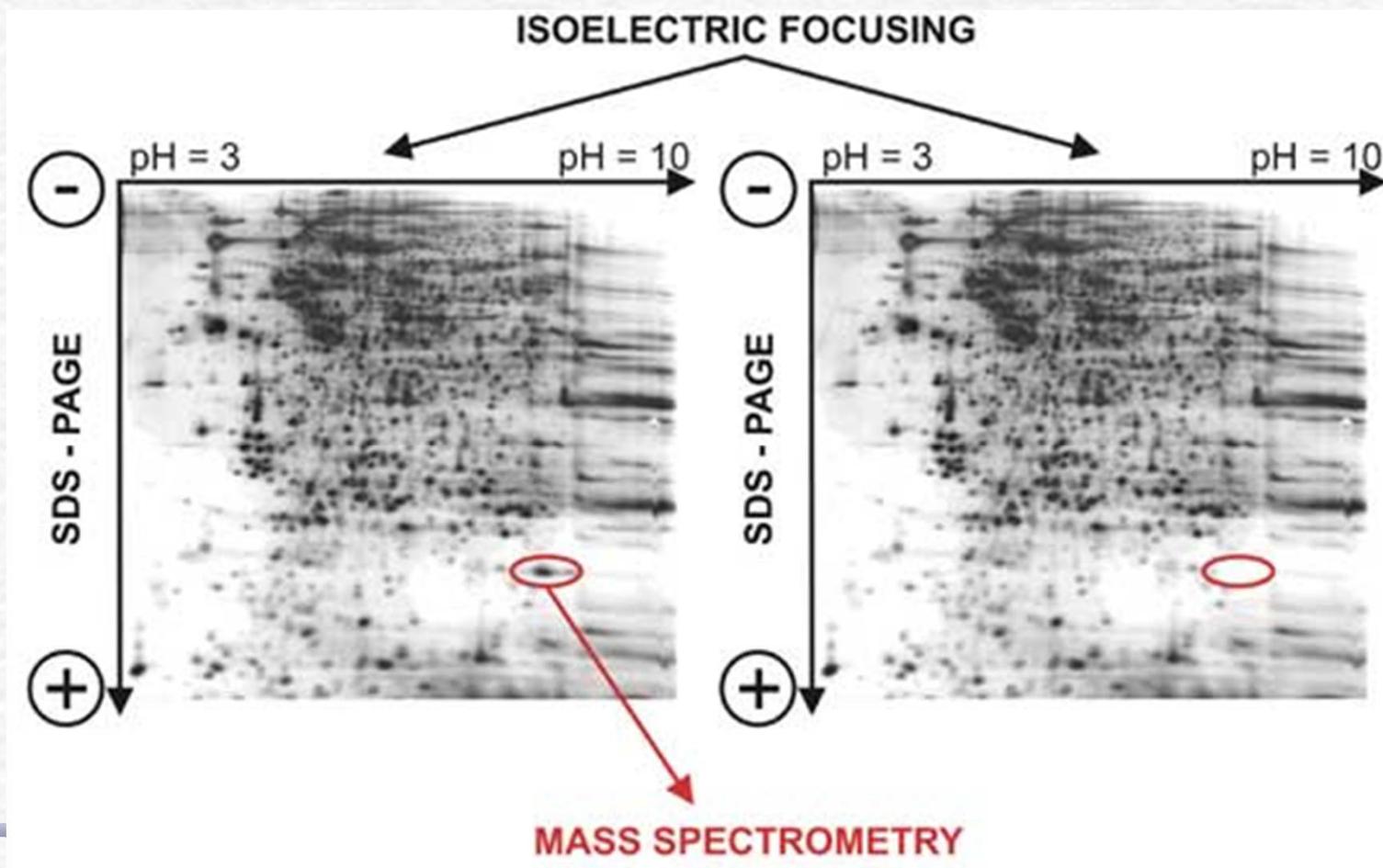
# 2D Gelová elektroforéza

- Metoda pro separaci proteinů
- Rozlišení až 10000 proteinů
- Proteiny jsou rozděleny podle:
  - Jejich izoelektrického bodu (pH, při které je součet nábojů proteinu nulový)
  - Jejich velikosti
- Barvící nebo značící metody
- Výsledek: mapa proteinů
  - Lze porovnávat pro různé vzorky

# 2D Gelová elektroforéza



# 2D Gelová elektroforéza

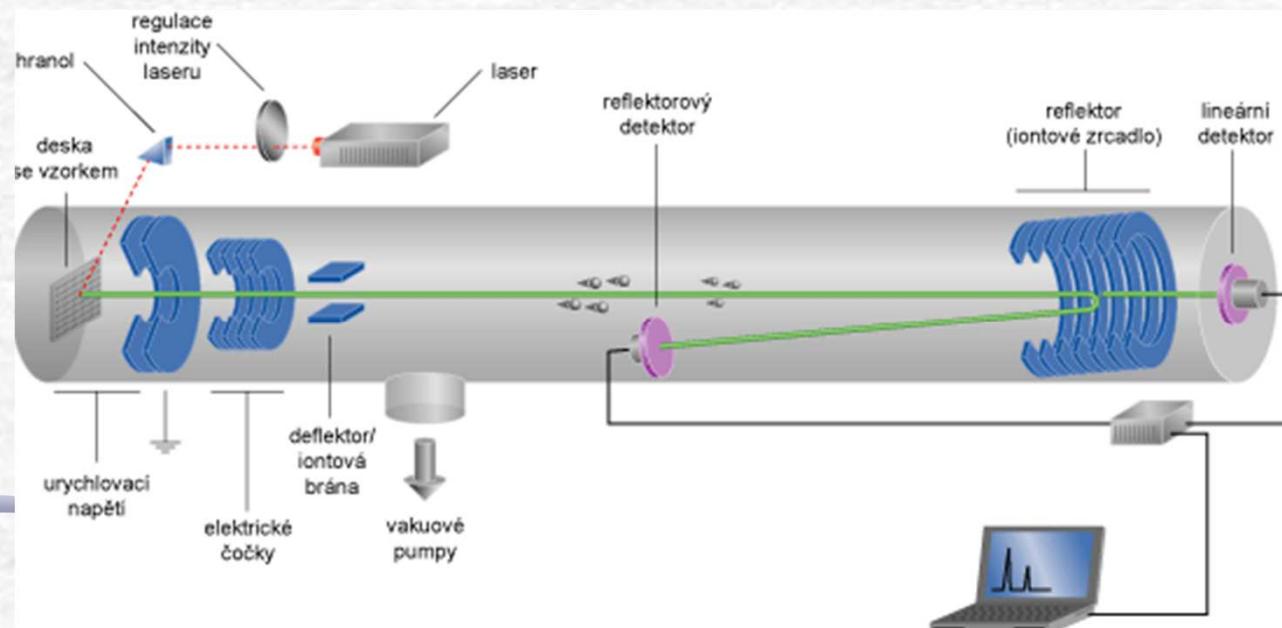


# Problémy

- ☞ **omezená reprezentativnost** vzorku (velmi zásadité proteiny, proteiny málo rozpustné ve vodné fázi a membránové proteiny)
- ☞ **sensitivita** (proteiny přítomné ve velmi nízkých koncentracích - speciální typy barvení)
- ☞ **reproducibilita**
- ☞ špatná **automatizovatelnost**

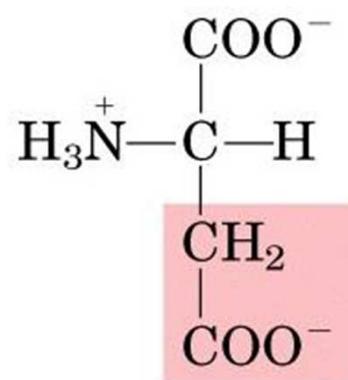
# Hmotnostní spektrometrie

- ✓ Měření molekulární hmotnosti látek
- ✓ Založena na rozdělení nabitéch částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli
- ✓ Využití v proteomice:
  - **Identifikace proteinu** – štěpení proteinu trypsinem (lys-arg) a měření hmotnosti jednotlivých fragmentů
  - **Sekvenování proteinu** – štěpení peptidů na menší fragmenty

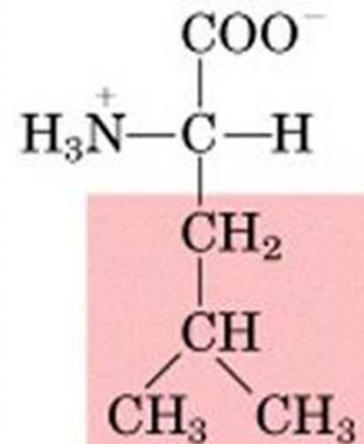


# Sekvenování proteinu

- Cíl: nalézt peptid, který nejvíce odpovídá změřenému hmotnostnímu spektru

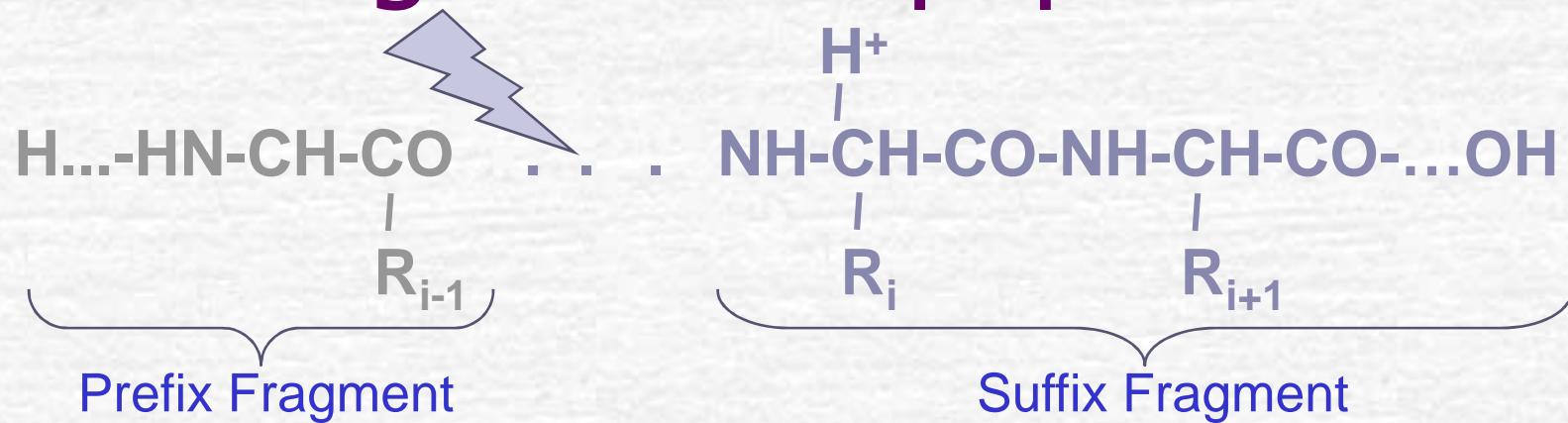


Aspartate



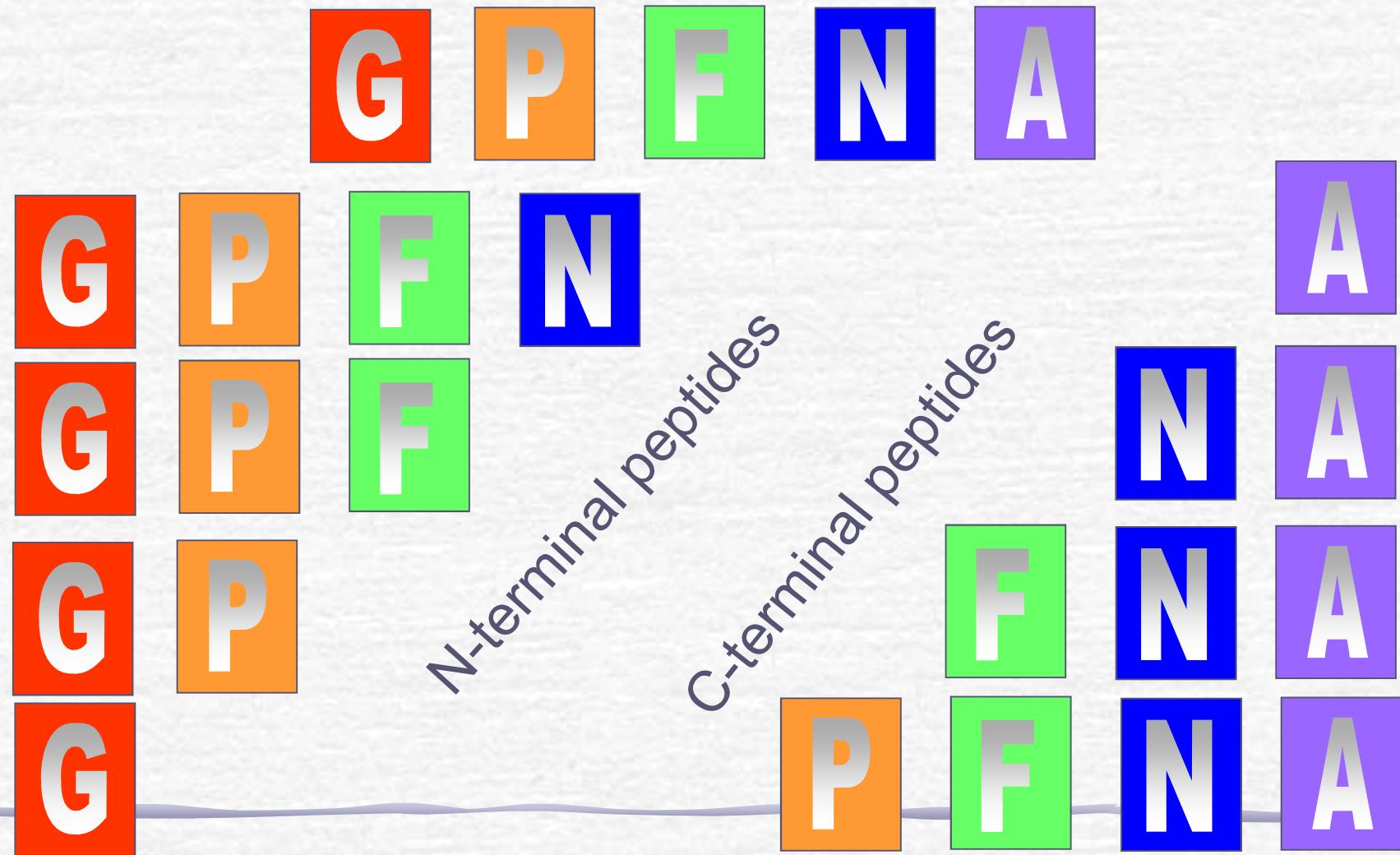
Leucine

# Fragmentace peptidů



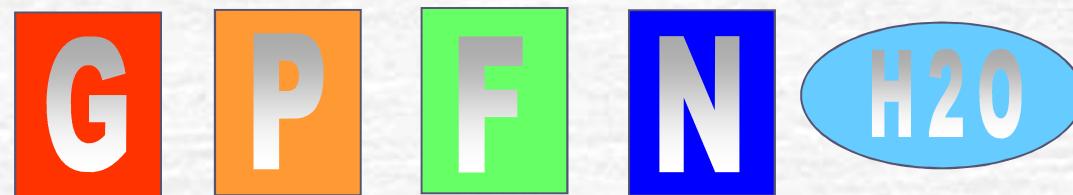
- Nejčastěji podél páteře proteinu
- Fragmenty mohou ztrácte neutrální chemické skupiny ( $\text{NH}_3$  and  $\text{H}_2\text{O}$ ) – různá hmotnost, různé ionty ve spektru

# Fragmentace peptidů



# Fragmentace peptidů

Peptide



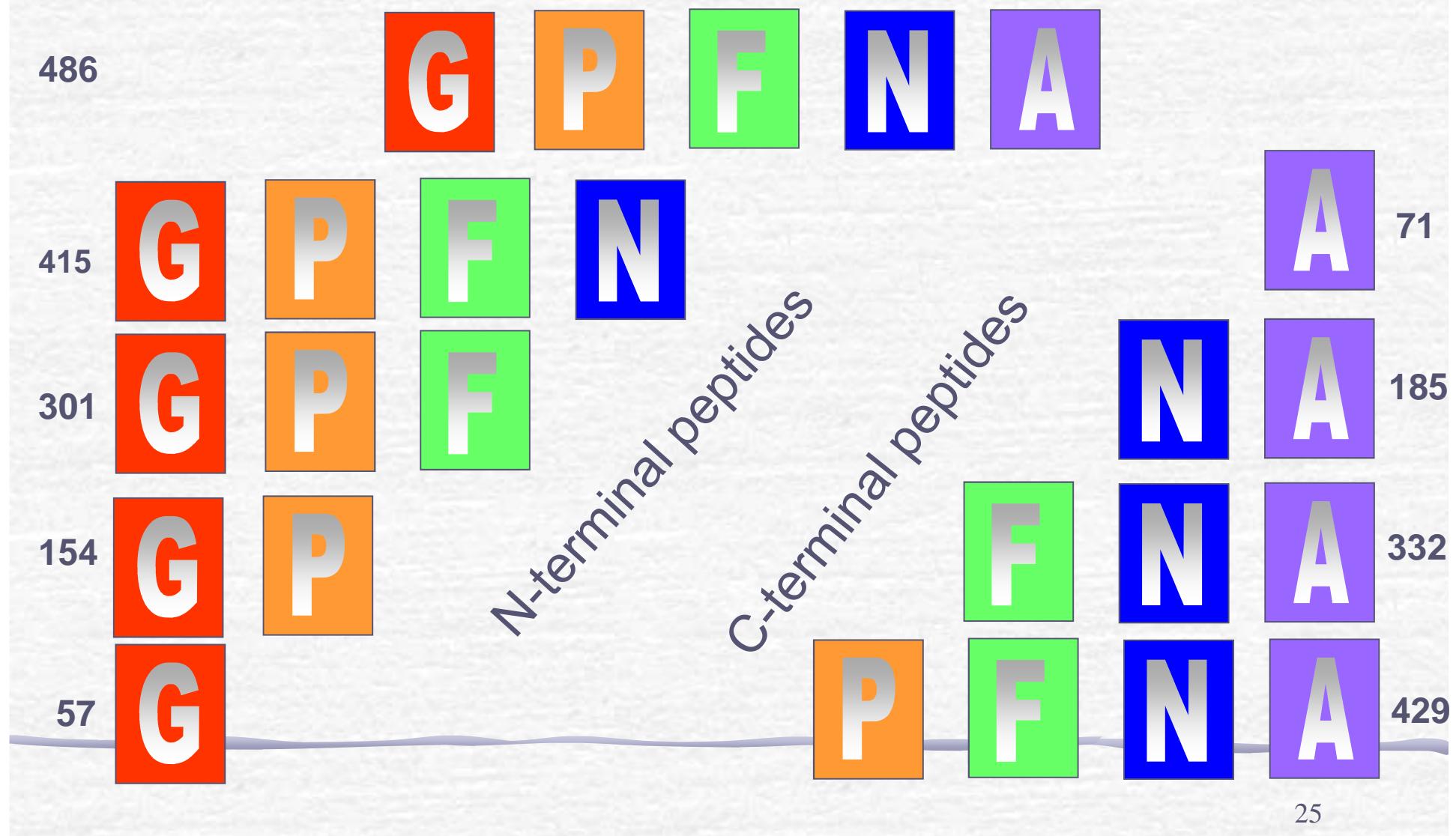
Mass (D)    57 + 97 + 147 + 114 = 415

Peptide

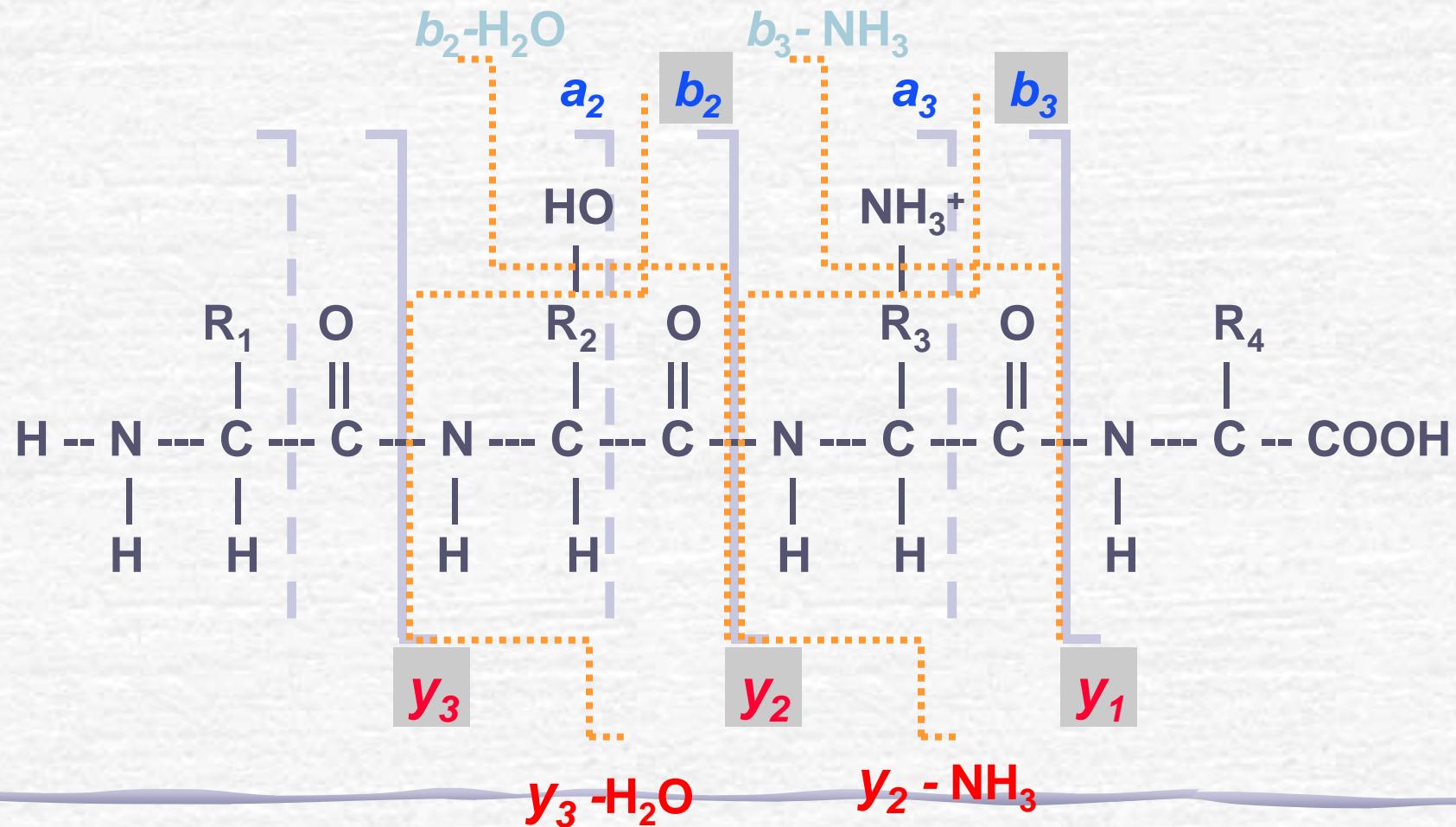


Mass (D)    57 + 97 + 147 + 114 - 18 = 397

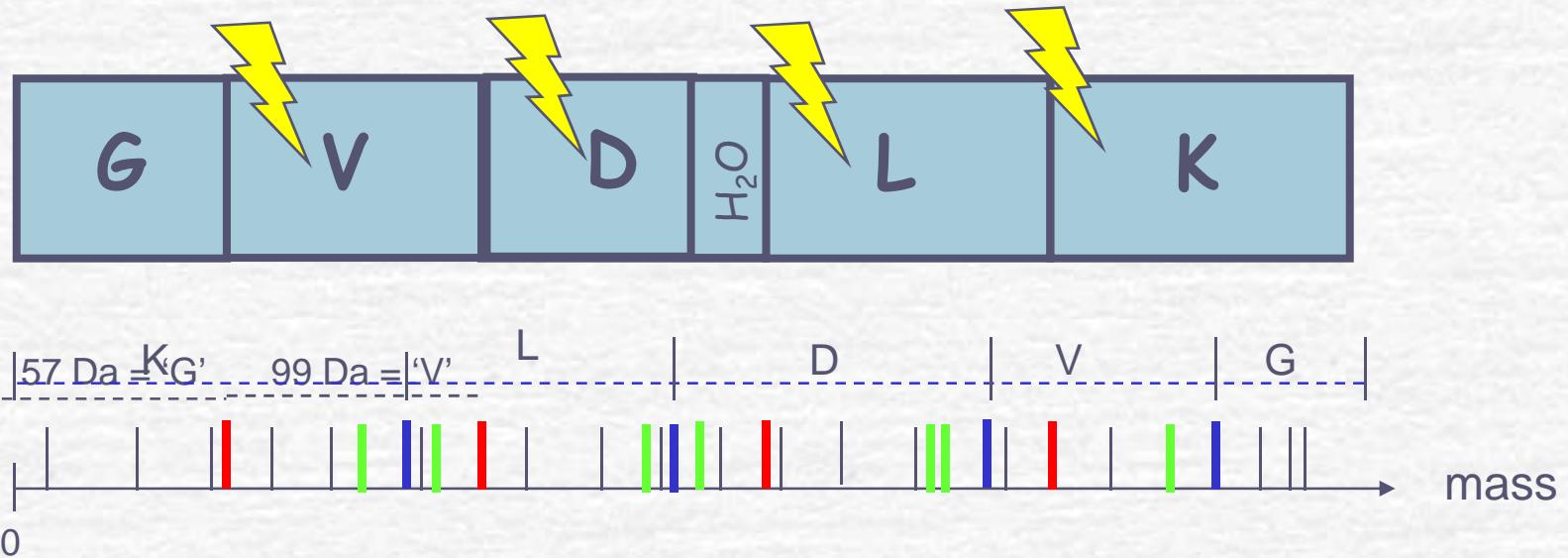
# Fragmentace peptidů



# Fragmentace peptidů



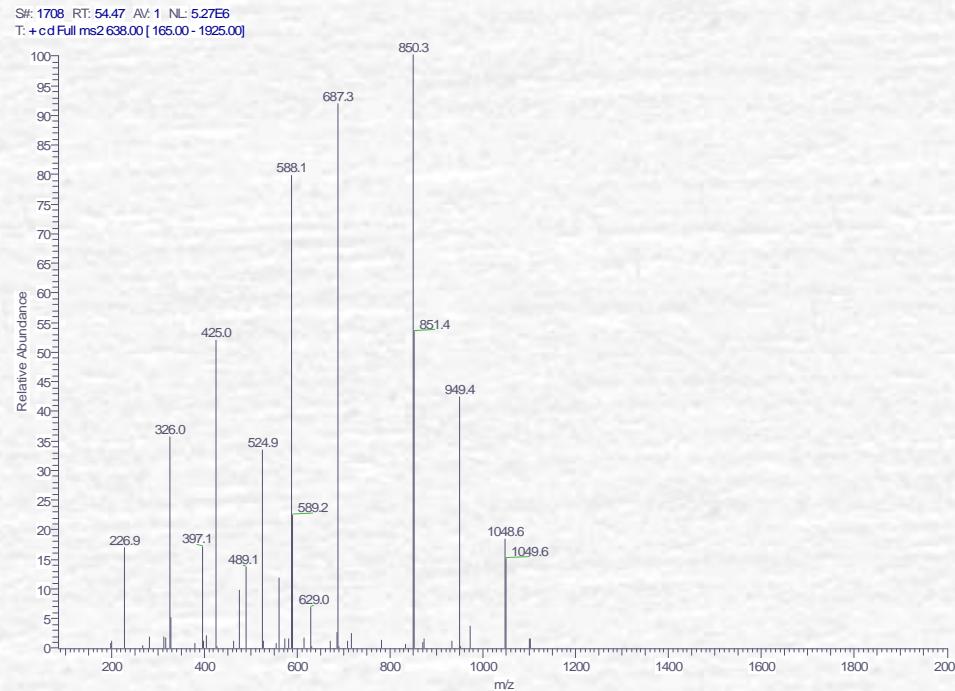
# Hmotnostní spektrum



## ✓ Vrcholy v hmotnostním spektru:

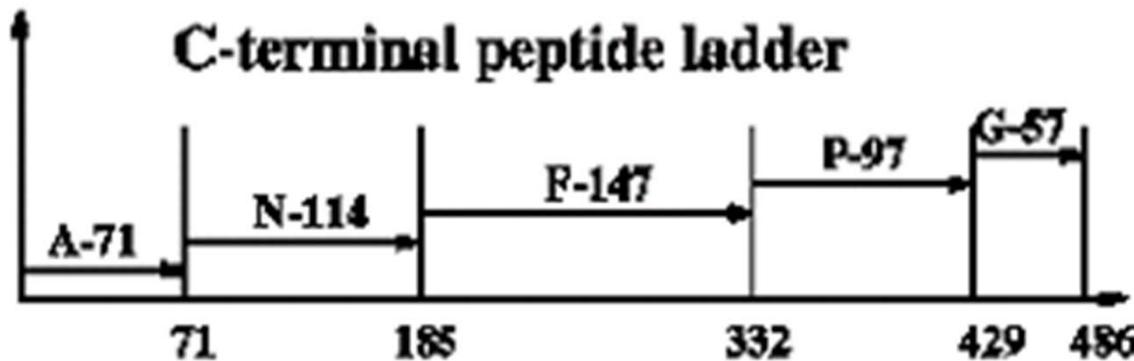
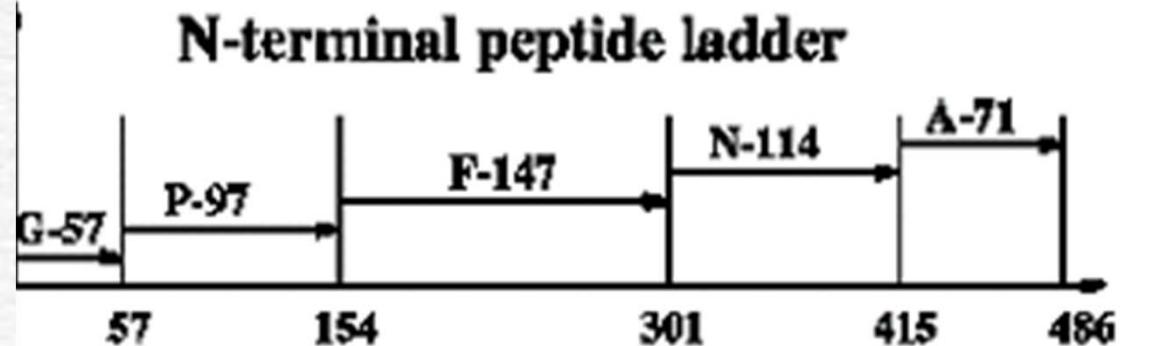
- Prefixové a sufixové fragmenty, fragmenty bez ztrát, šum, chybějící vrcholy

# Hmotnostní spektrum

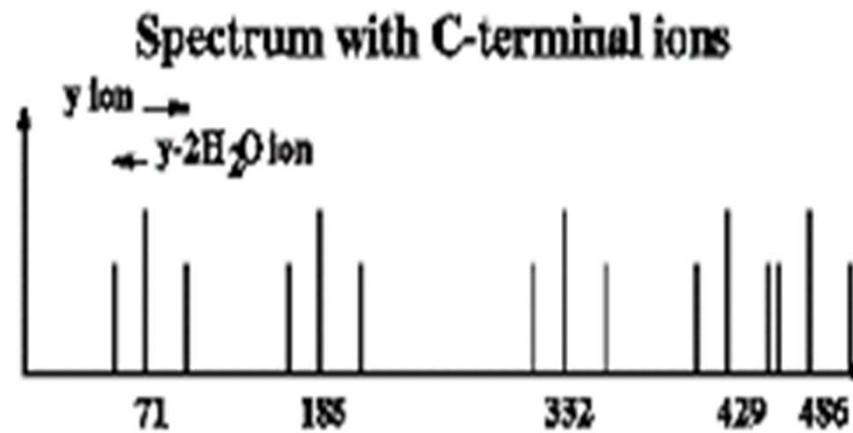
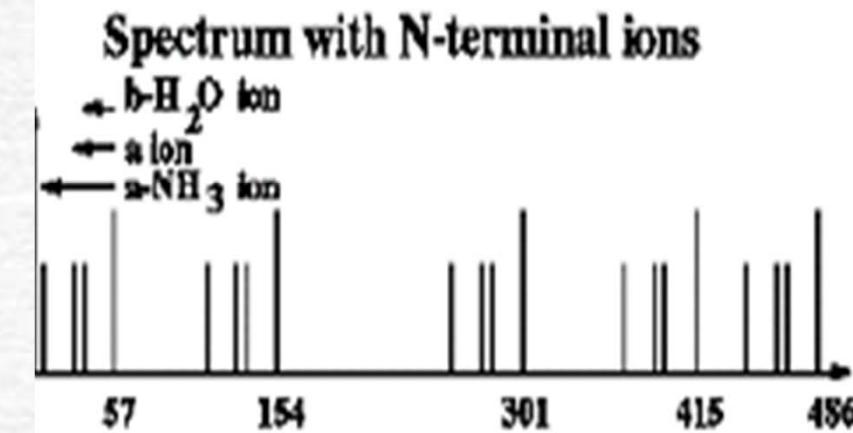
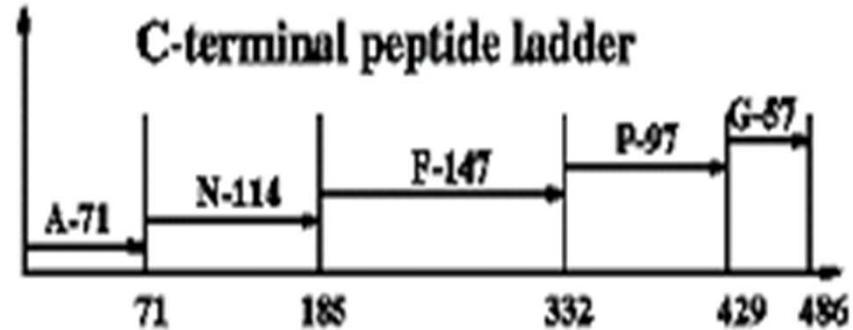
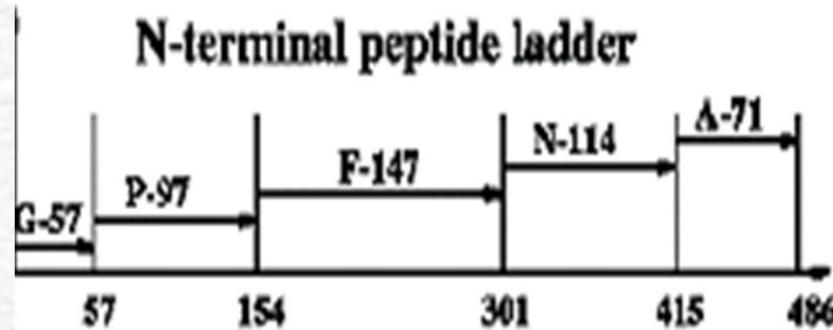


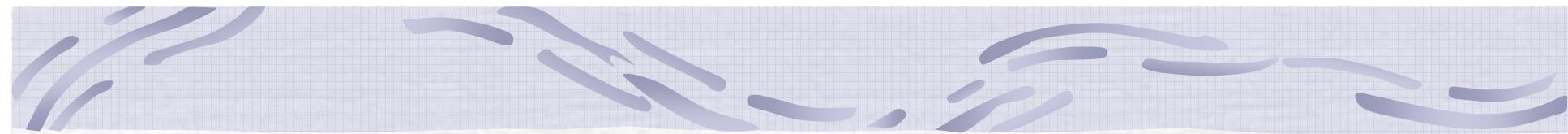
Úkol: zrekonstruovat sekvenci AK (peptid) z množiny hmotností iontů fragmentů

# Hmotnostní spektrum



# Hmotnostní spektrum

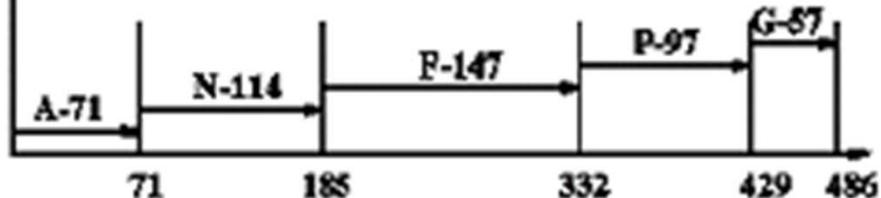




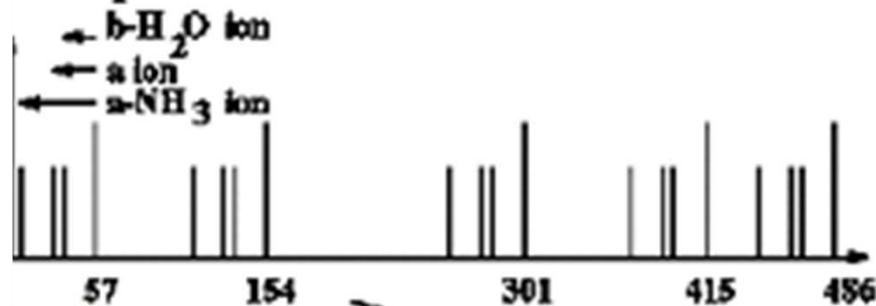
N-terminal peptide ladder



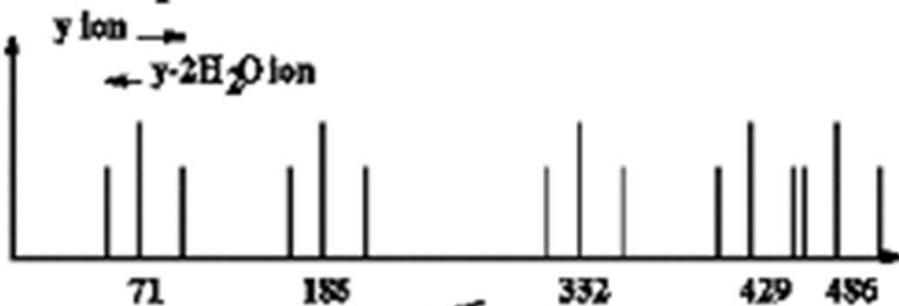
C-terminal peptide ladder



Spectrum with N-terminal ions

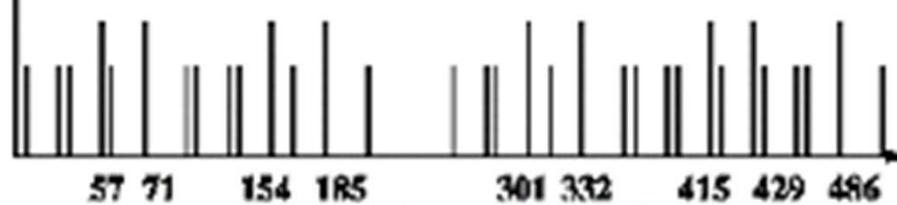


Spectrum with C-terminal ions



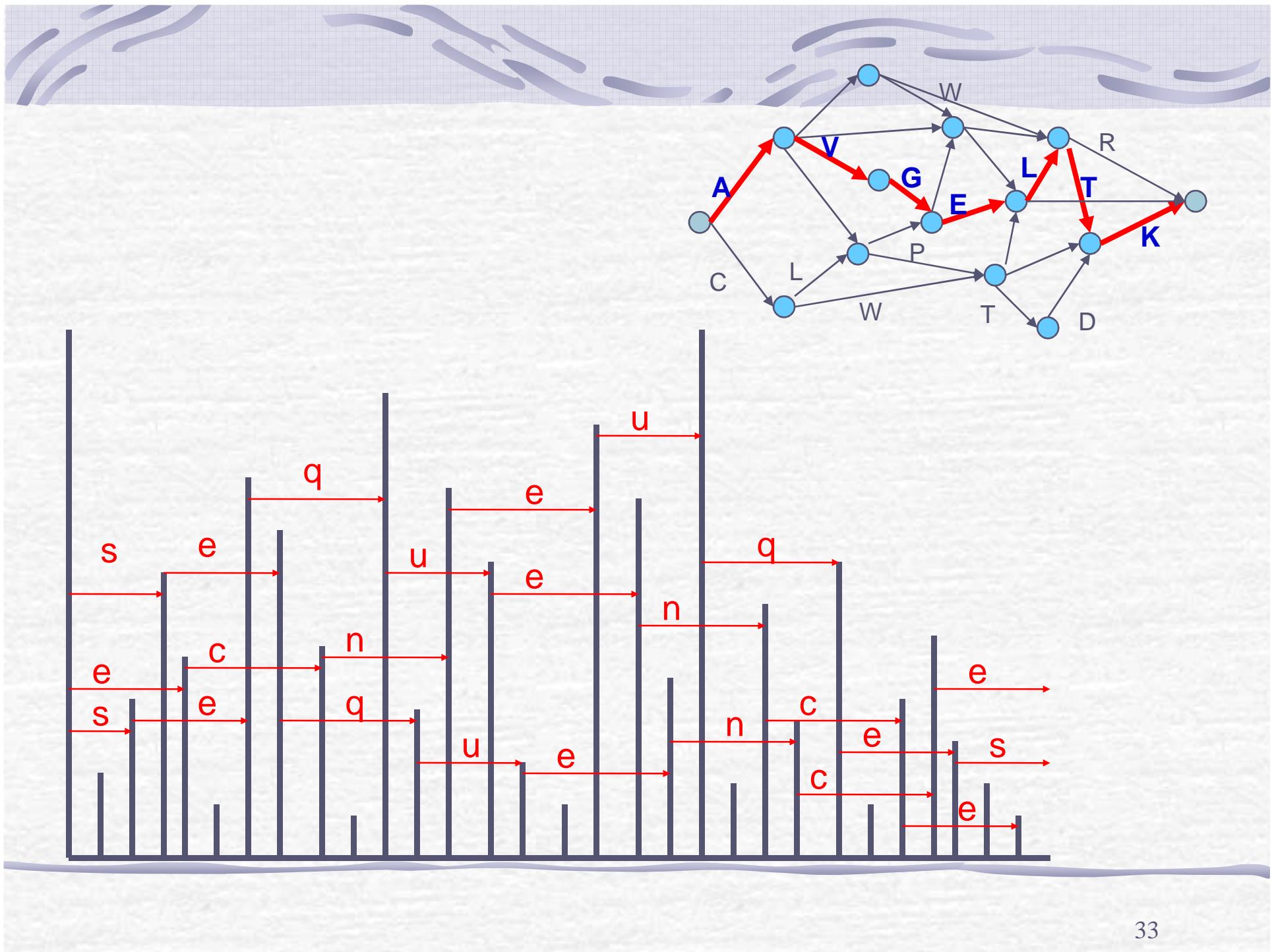
superposition

Theoretical spectrum of peptide GPFNA



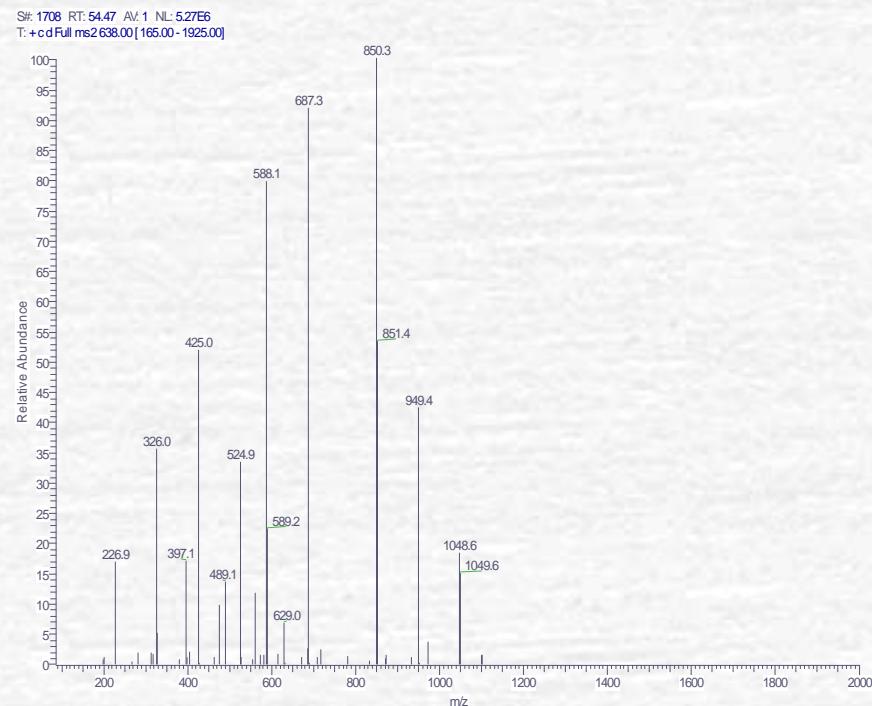
# Sekvenování peptidů

- Převedeno na problém hledání cesty v grafu
- Vrcholy: vrcholy v hmotnostním spektru, které odpovídají možným iontům fragmentů
- Hrany, které spojují vrcholy, jejichž hmotnost se liší o hmotnost nějaké AK, jsou označeny touto AK
- Cesta grafem: sekvence AK



# Identifikace proteinu

- ✓ Zjistíme hmotnostní spektrum cílového proteinu
- ✓ Porovnáme s teoretickými spektry proteinů v databázi
- ✓ Vybereme protein se stejnou celkovou hmotností, který má nejpodobnější spektrum
- ✓ Umožňuje získat pouze sekvence, které už jsou v databázi



# Proteinové čipy

- Velmi podobné DNA/RNA čipům
- Složitější konstrukce vzhledem k větší variabilitě vlastností proteinů – méně rozšířené než DNA/RNA čipy
- Využívají
  - Protilátky nebo antigeny
  - Neproteinové polymerní molekuly, které reagují s určitými skupinami proteinů

# Obsah

- Co je to proteomika
- Nástroje proteomiky
  - DNA čipy
  - Gelová elektroforéza a hmotnostní spektrometrie
  - Proteinové čipy
- Systémová biologie
  - Biologické sítě
  - Dynamika biologických systémů

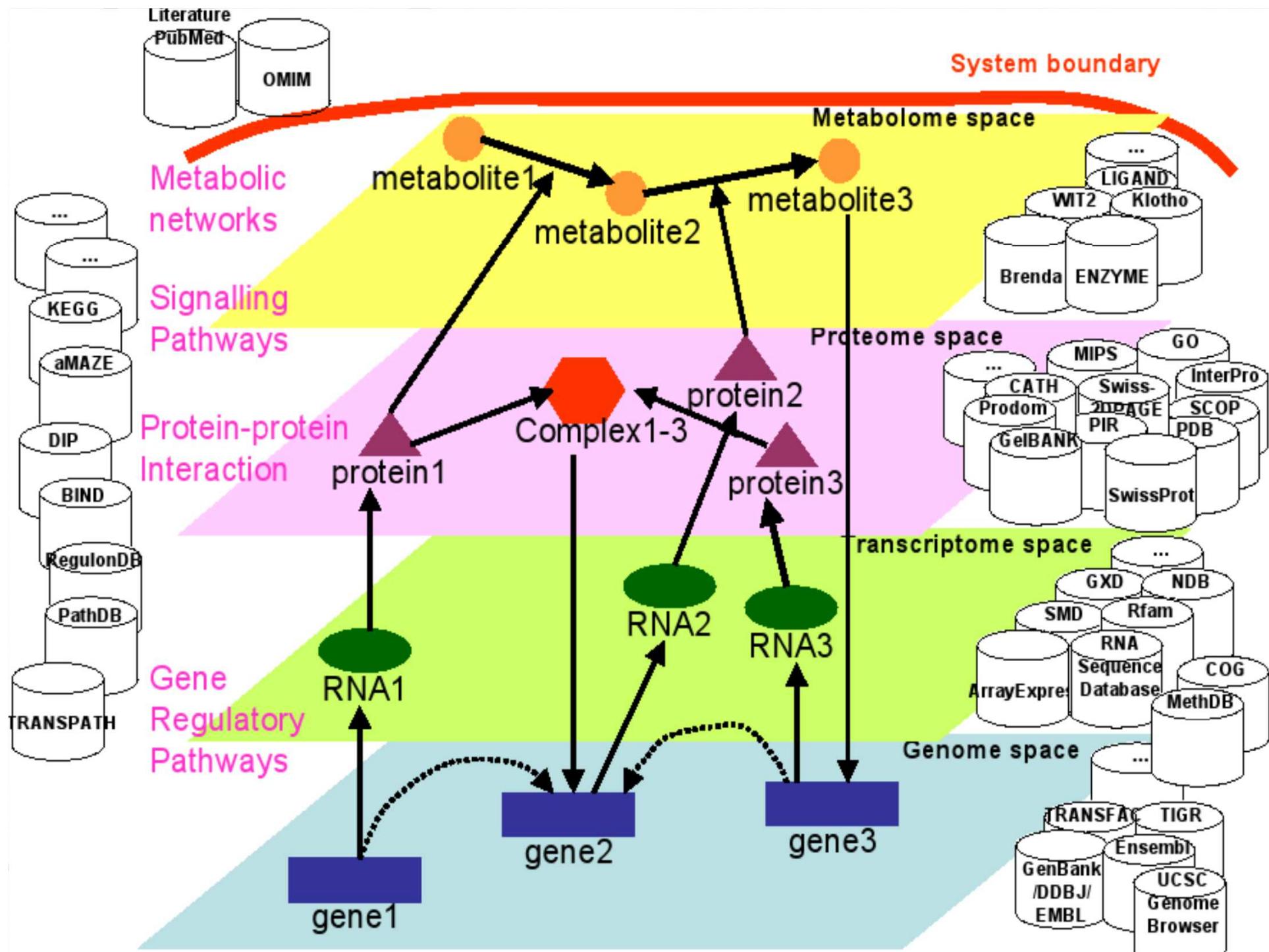


# Systémová biologie

- ✓ Studium komplexních interakcí v biologických systémech
  - ✓ Paradigma: integrace (komplexní pohled)
  - ✓ Organismus chápán jako komplexní systém (biologický systém)
  - ✓ Předmětem studia jsou interakce mezi jeho komponentami
  - ✓ Tvorba metabolických a regulačních sítí
  - ✓ Např. pro každý protein zkoumá jeho vlastnosti, příslušný gen, molekuly kontrolující úroveň jeho exprese a jeho aktivitu a proteiny s nimiž interaguje
- 

# Systémová biologie

- ✓ Kontrolní mechanismy
- ✓ Řídí aktivitu genů a proteinů
- ✓ Nezbytné pro život buňky (organismu)
- ✓ Např. zajistí, že správné množství příslušných proteinů bude interagovat na daném místě v daný čas
- ✓ Robustnost biologického systému
  - přežití organismu v nepříznivých podmínkách
  - umožňuje evoluci organismů
- ✓ Dynamika biologického systému
- ✓ Cíl: vytvořit model organismu (vícevrstvý)

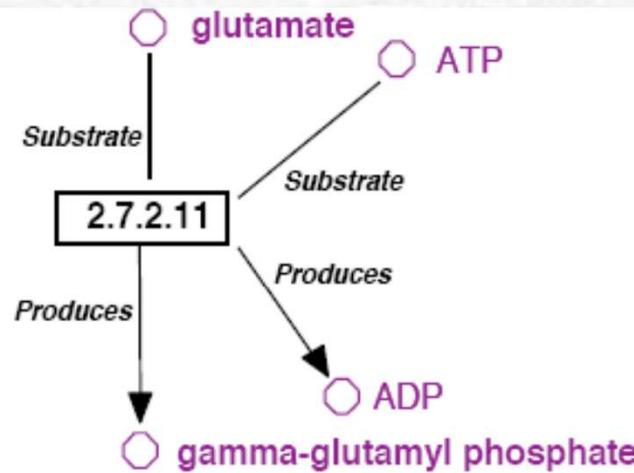


# Biologické sítě a dráhy

- ✓ biochemická interakce molekul popsaná grafem
  - molekulární komponenty – proteiny, DNA, RNA, . . .
  - interakce na různých úrovních (transkripce, metabolismus, . . .)
  - příjem signálu na membráně
- ✓ uzly
  - molekuly/komplexy biochemických látek
  - biochemické reakce
- ✓ hrany
  - regulace (aktivace, represe, katalýza)
  - příslušnost k reakci (produkt, zdroj)
- ✓ dráhy — zaměřené na určitá specifika (látky, reakce)
  - typicky signální dráhy
- ✓ sítě — komplexní interakce
- ✓ různé úrovně abstrakce
- ✓ fyzická síť a logická síť

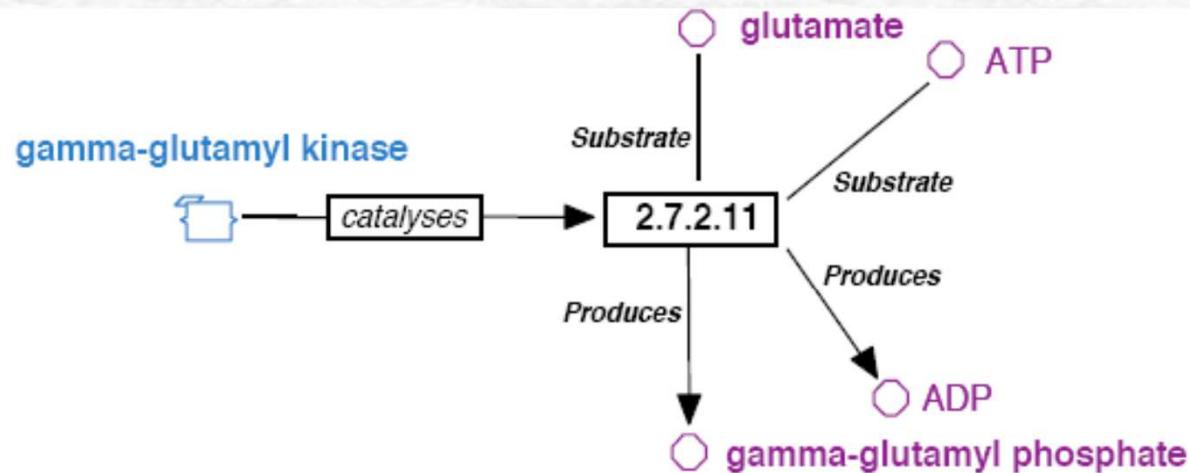
# Biologické sítě

## Reakce



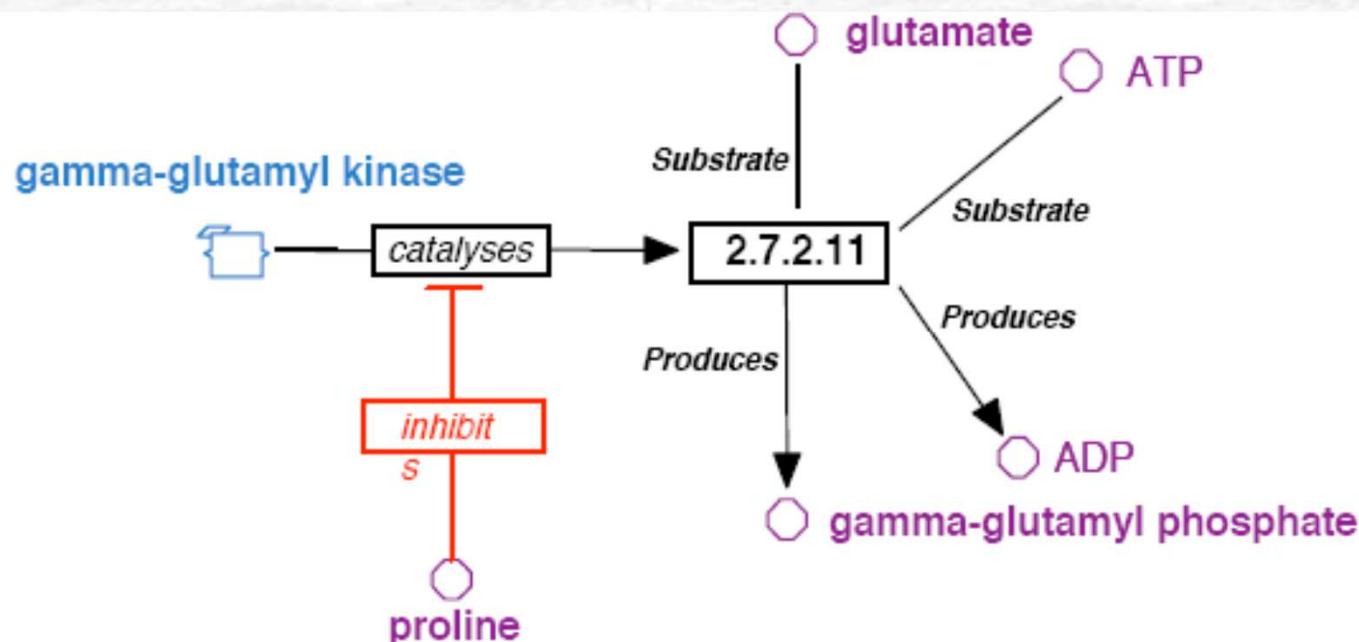
# Biologické sítě

## Enzymová katalýza



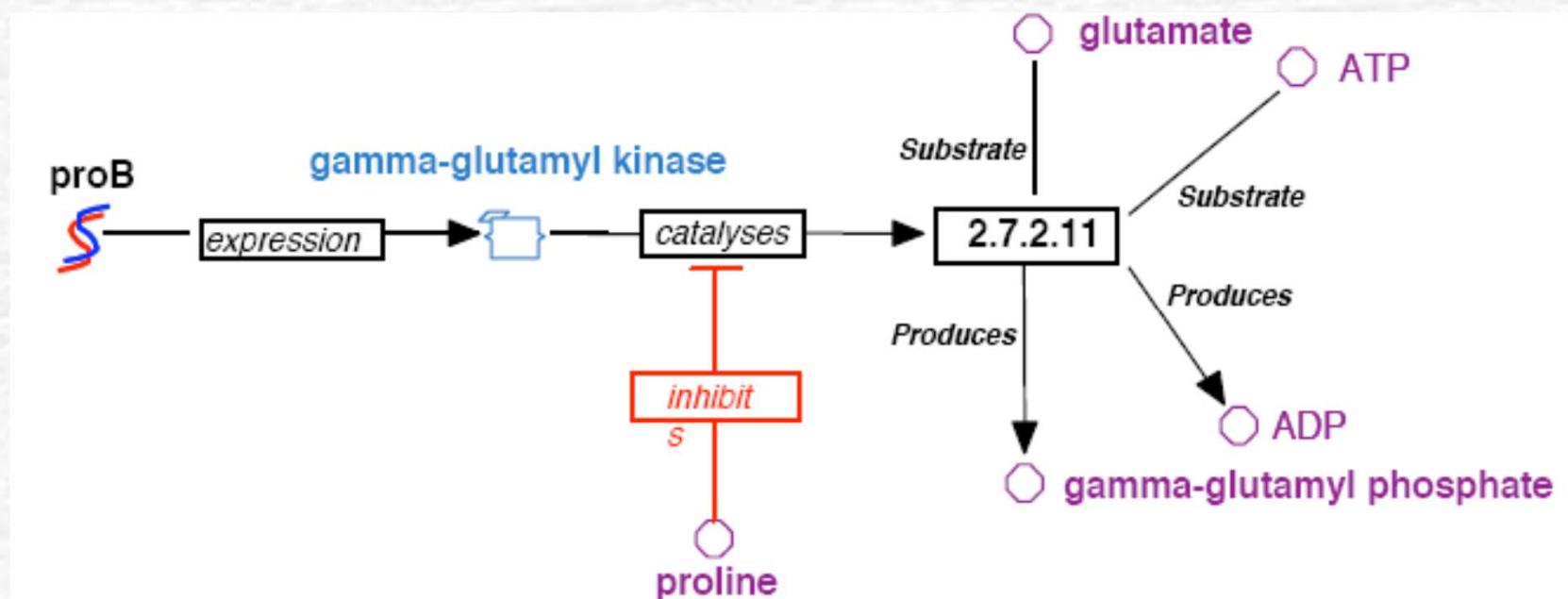
# Biologické sítě

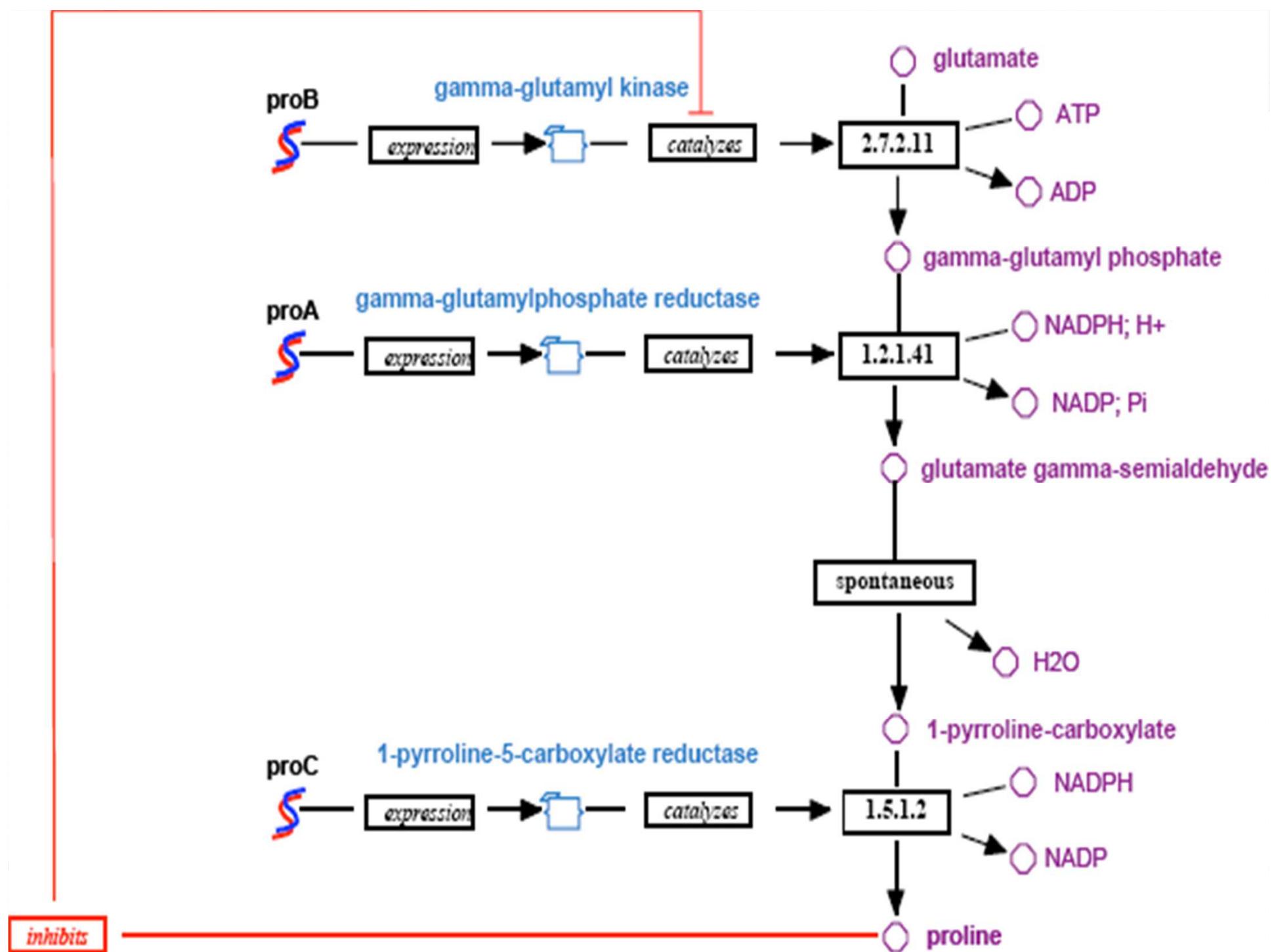
## Aktivace/inhibice



# Biologické sítě

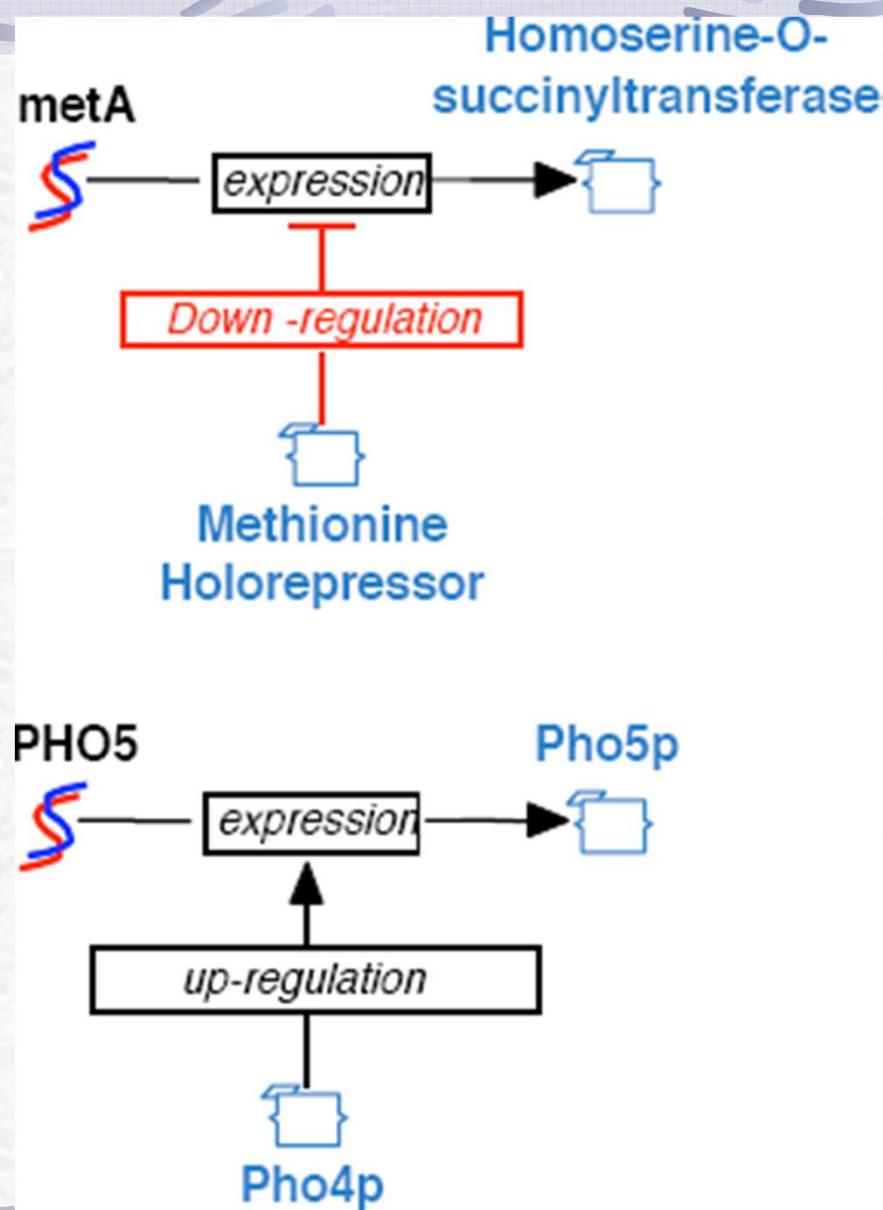
## Transkripce

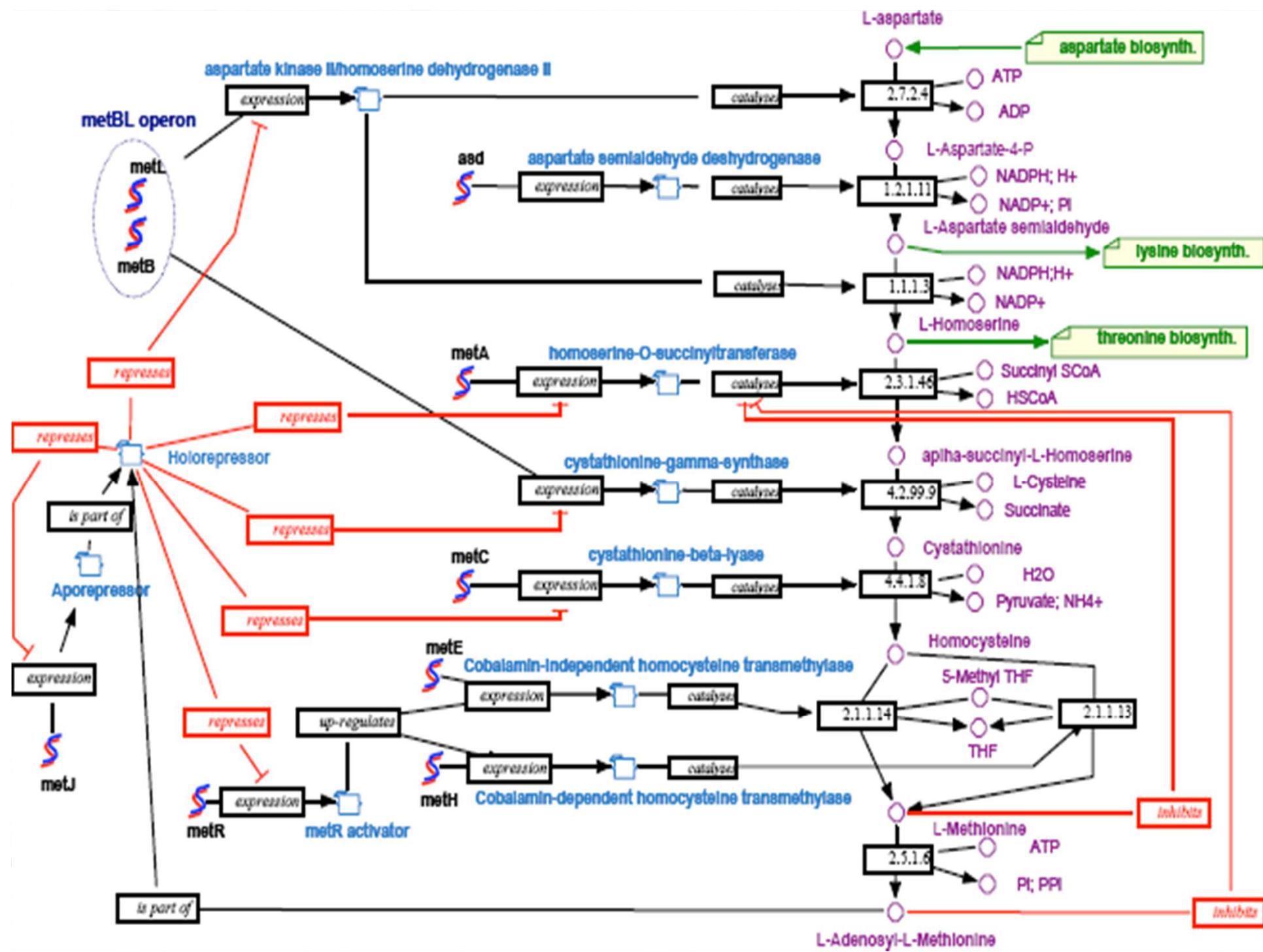


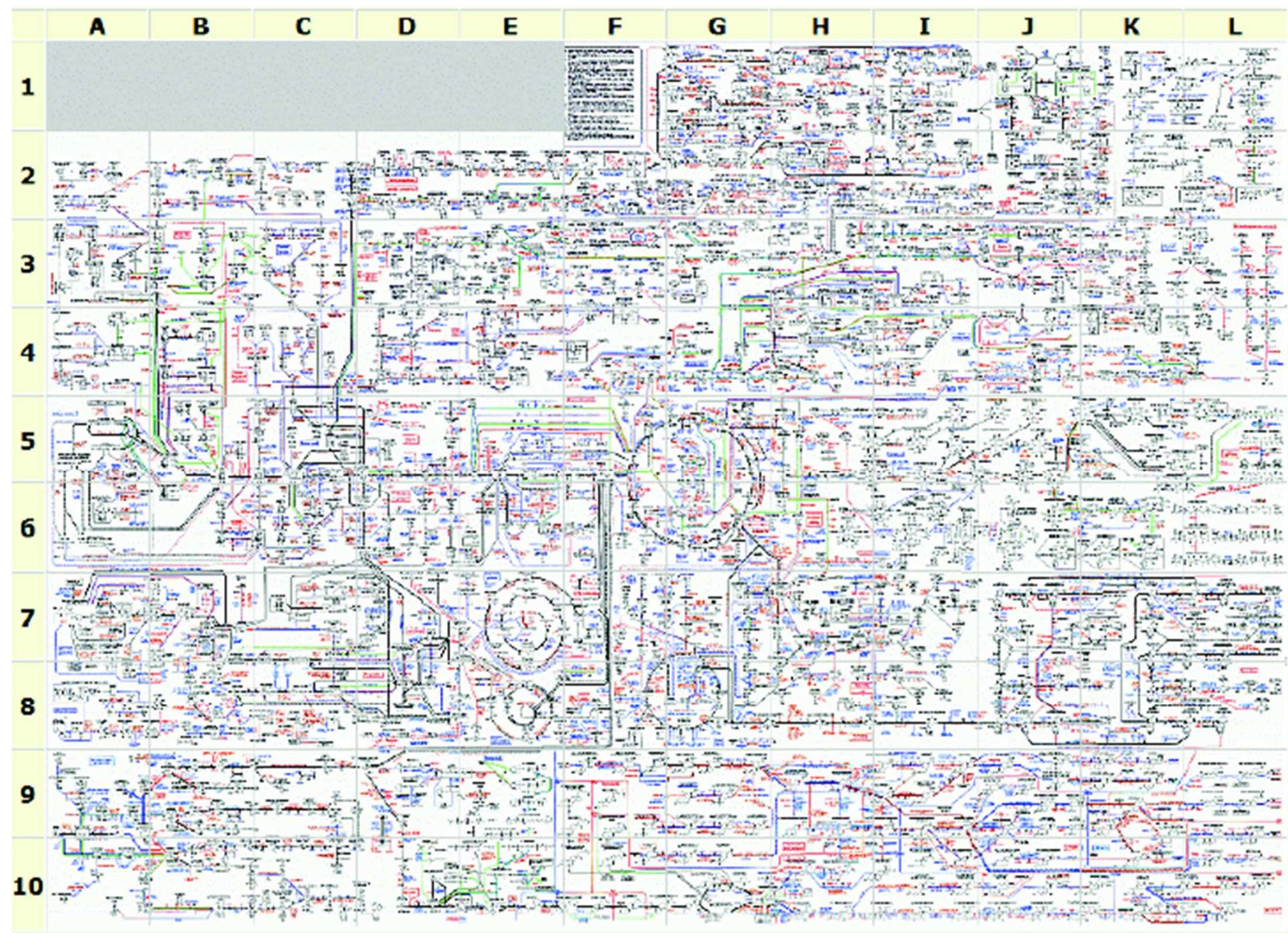


# Biologické sítě

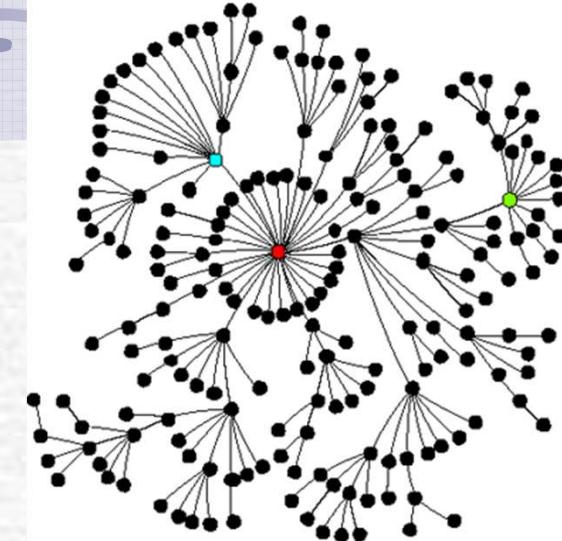
- Transkripční regulace







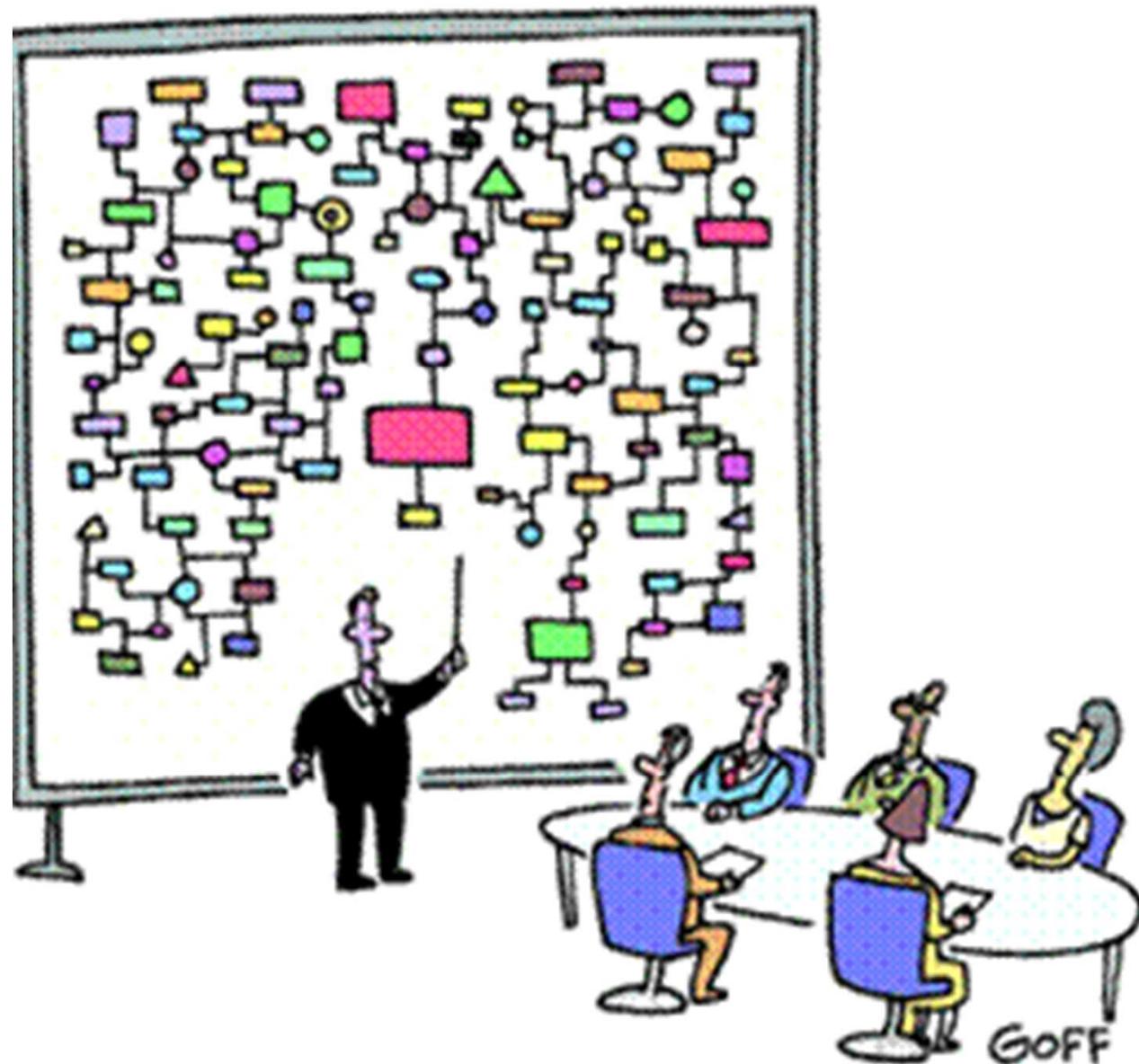
# Biologické sítě



- ✓ Klíčem ke studiu chování organismu, evoluce
- ✓ Představují základní informaci pro tvorbu modelu
- ✓ V průběhu evoluce muže docházet k přidávání/ubírání hran
- ✓ Hvězdicovitý charakter propojení – scale-free networks
  - několik uzel funguje jako hub
  - většina uzel má nízký stupeň konektivity
  - hierarchická topologie
  - robustní vůči náhodným poruchám
- ✓ Zkoumání opakujících se sítových motivů
  - pozitivní/negativní zpětná vazba
  - cykly
- ✓ Hledání alternativních drah (výměna substrátu, produktu)

# Dynamika biologických systémů

- Biologický systém není statický
- Probíhají v něm chemické reakce – syntéza a rozklad látek v čase
- Biologické sítě – statický model systému (co se v buňce může stát)
- Modelování dynamiky systémů – simulace dynamiky reakcí (vývoj substrátů v čase)
  - Spojité / diskrétní
  - Deterministické / stochastické
- Simulace a analýza chování při daných iniciálních podmínkách, predikce chování (hypotézy pro experimenty)



"And that's why we need a computer."

Thanks to Systems  
Biology, we now have  
a clear picture of  
complex diseases!

