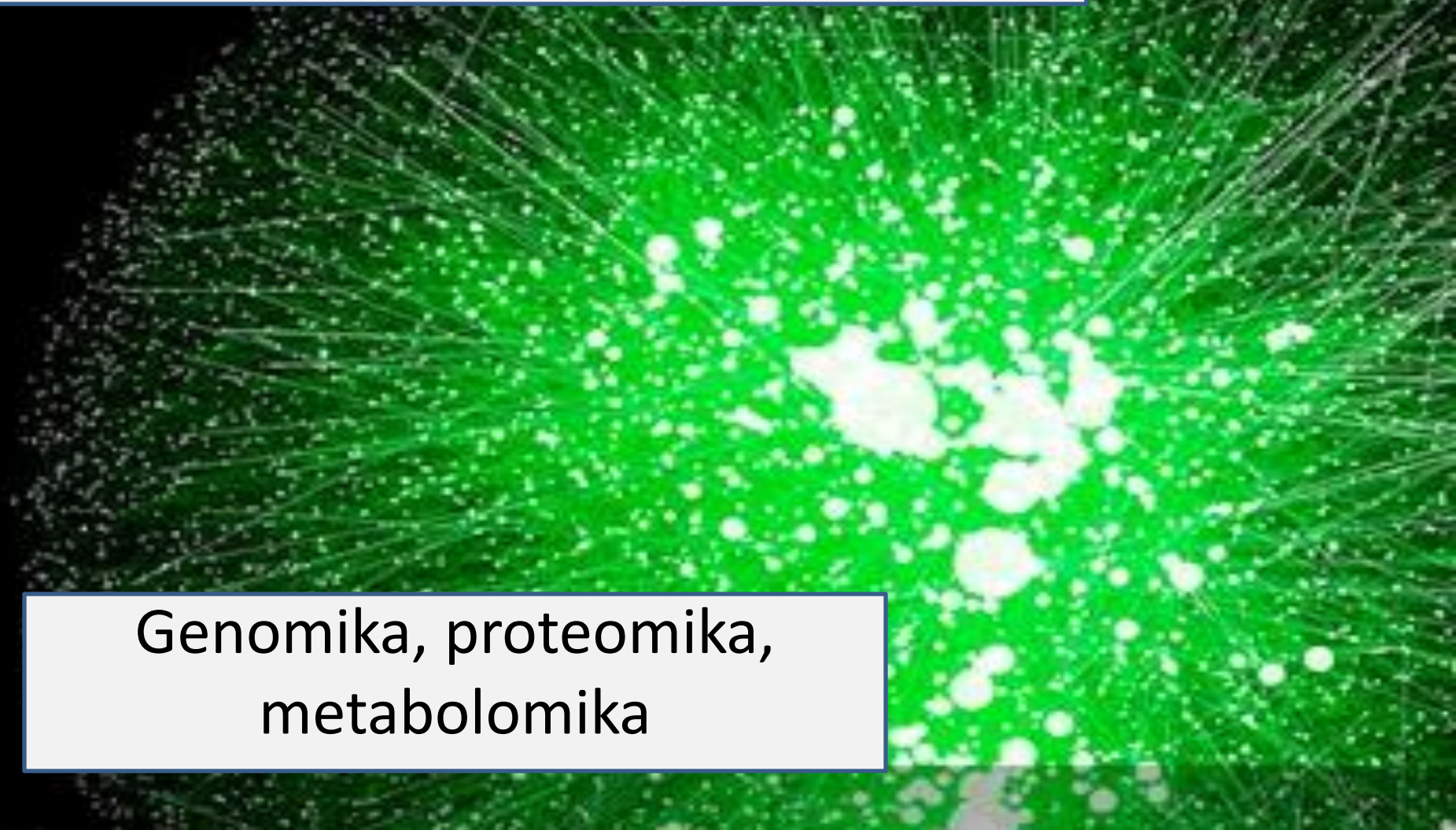
7. Rendszerszemléletű biológia a kémikus szemével



Genomika, proteomika, metabolomika

7. Rendszerszemléletű biológia

- Redukcionista vs. *Holisztikus* szemlélet
- A ***rendszerszemléletű biológia*** *(systems biology)* a biológiai jelenségeket hálózati rendszerként értelmező megközelítés
- Paradigmaváltás a szemléletmódban, a rész helyét az egészben, a rész kapcsolatát az egésszel keresi (komplex interakciók vizsgálata, emergens tulajdonságok)
- Multidiszciplináris tudomány, kialakulása köszönhető:

  -a hatalmas mennyiségű tudás (adatbázisok) szabad és gyors áramlásának

  -nagyteljesítményű technológiák (pl. chip array) kialakulásának (gyors információgyűjtés)

  -a bioinformatika fejlődésének (információhalmaz feldolgozása)

Bioinformatika

- Nem kizárólag nagymennyiségű adat statisztikai feldolgozásáról szól
- Komplex (globális) következtetéseket szeretnénk
- Mintázatok, emergens tulajdonságok felismerése, hálózatok kialakítása
- Az eredmények behelyezése a már ismert tudásbázisba,a tudásbázisok integrációja (pl. egy genetikai elem eddig nem ismert funkciójára is rájöhetünk)

Bioinformatika

- Az összefüggések prioritását is vizsgálni kell
  - – pl. mennyi az esély arra, hogy ha A változik B, C is egyidejűleg módosul
  - – ezek a módosulások közvetlenül vagy áttételesen következnek-e be
  - – milyen közbenső, esetleg gyógyszerrel célba vehető elemek léteznek; milyen mértékű és milyen irányú, s reverzibilis vagy irreverzibilis-e a változás (Pl. reakció-útvonalak felismerését, az útvonal-analízist, útvonal-térképezést)
- Egyes adatcsoportok kiemelése szükséges (klaszterek)(pl. egyes betegcsoportok mely génjei reagálnak hasonlóan a kezelésre)

Bioinformatika

- Egyes paramétercsoportok közös tulajdonságainak definiálása, oksági hálók kialakítása
- E kérdések megválaszolása megfelelő tervezést igényel
- Alkalmazás pl. gyógyszertervezés (pl. hol lehet hatni, mire hat még)
- Gyógyszerek együttes tesztelése, optimális méréssszámhoz kísérletek tervezése
- *In silico* kutatás – pl. nemzetközi adatbázisokhoz kapcsolódva
- Kísérleti és a tudásbázisból eredő adatok bioinformatikai elemzésével értelmezni tudjuk a komplex jelenséget

Rendszerszemléletű biológia, mint paradigma

- Redukcionista szemlélet: egy adott gént kiemelve a környezetéből vizsgálok – hipotézis, kísérlettervezés, kivitelezés, értékelés
- Holisztikus szemlélet: kb. mindent vizsgálok egyszerre, mintha nem lenne szükség hipotézisre, csak az adatok / eredmények értékelésére
- Fontos tudni, hogy mit akarok vizsgálni, mi a módszerem, melyek az adott módszer korlátai, milyen következtetéseket tudok levonni az eredmények halmazából (ez segíti a hipotézisalkotást)
- Ludwig von Bertalanffy a rendszerelmélet „atyja”
- Hegyi Krisztina pedig a magyar elnevezés „anyja”

Rendszerszemléletű biológia, mint tudományterület

- Biológiai komponensek egymásra hatásait vizsgálja (pl. enzimek-metabolitok szerveződése anyagcserefolyamattá)
- Protokollok sorozata (hipotézis, széleskörű vizsgálat, matematikai/bioinformatikai elemzés, kísérleti ellenőrzés, modell finomítás)
- Genomika, proteomika, metabolomika
- HTS, MS, proteinchip,

Genomika

- Egy sejt / szervezet teljes génkészlete (DNS állományban tárolt információja) a ***genom***
- A genomot, a gének kölcsönhatását vizsgáló tudomány
- Teljes genom-meghatározás (DNS szekvencia), gének azonosítása (annotáció), géntérképezés
- A géncsoportok, hálózatok komplex, egységes mintázatvizsgálata
- Funkcionális genomika: a genomika dinamikus aspektusaival foglalkozik (pl. transzkripció, transzláció)
- Nagy teljesítményű technikák (high throughput screening) segítségével genomméretű vizsgálatokat (egyszerre több száz gént is) vizsgál

Genomika

- Az egész genom vizsgálata
  - Kódoló és nem kódoló szakaszok működése
  - Génvariációk, génkópiák azonosítása
  - Funkcióvizsgálat génmódosításokkal (természetes vagy mesterséges)
- Funkcióvizsgálatok
  - Mutáció, pontmutáció (SNP)
  - Génexpresszió

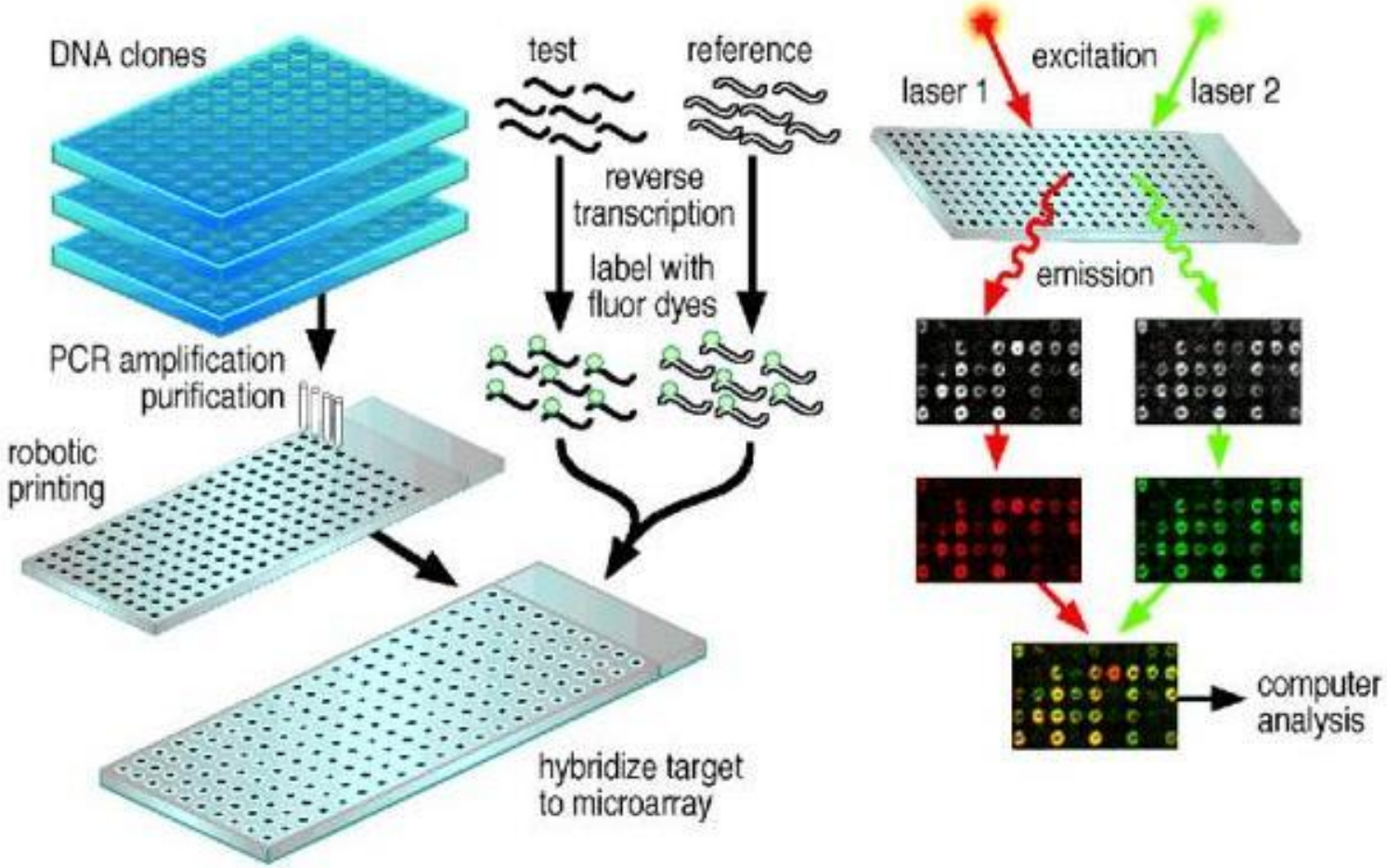
Genomika

- DNS szintű vizsgálatok
  - Génkölcsönhatások (gének páronkénti kiiktatásával vizsgálják azok fenotípusra gyakorolt hatását)
  - Gének funkcionális azonosítása (ENCODE project, fehérje kódoló, miRNS-t kódoló, transzkripciós szabályzó helyek)
- RNS szint (génexpresszió)
  - mRNS szekvenálás
  - Microarray (mRNS – cDNS – próba hibridizáció)

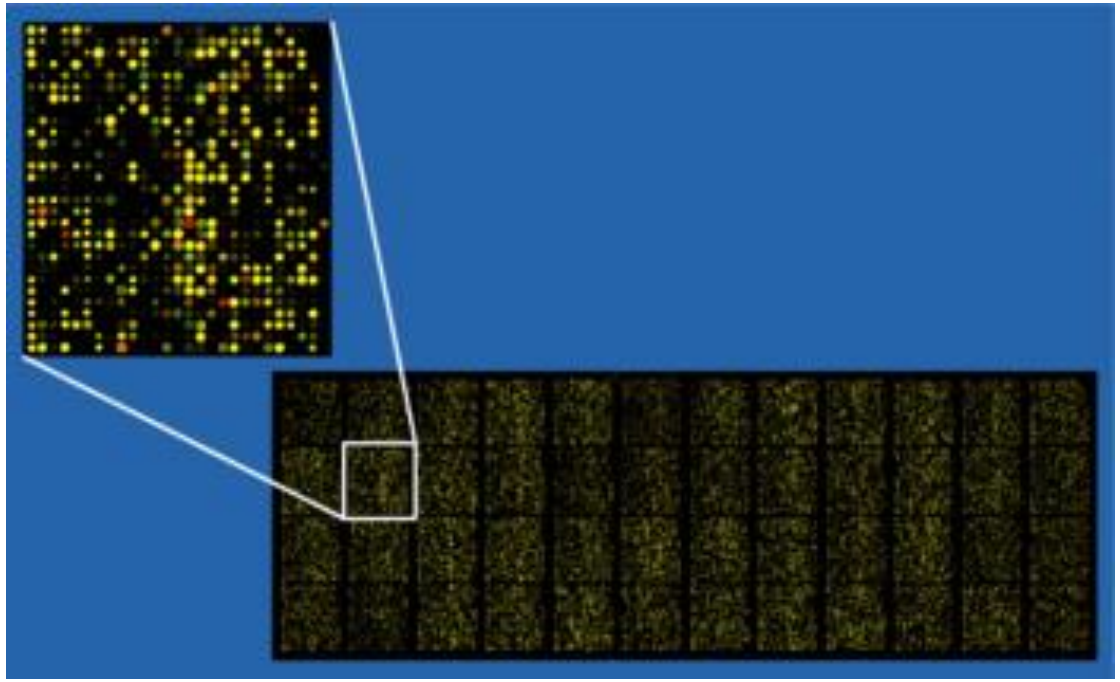
Microarray technika

- Különböző sejttípusokból vett RNS (cDNS) minták azonosítására, mennyiségére képes információt adni
- DNS-RNS (cDNS-DNS) hibridizáción alapul
- A sejtekből kinyerik az mRNS-t, átírják cDNS-re (stabil), fluoreszcens jelzéssel látják el (pl. a különböző sejtekből származókat különböző színnel)
- A chip felületére meghatározott mintázat szerint (array) ismert próba DNS-t rögzítenek (pico-mólnyi mennyiségben) – robotok végzik a felvitelt (imprinting)
- A próba-DNS-t meghatározott helyekre (spot) viszik fel, ezek mérete kisebb, mint 200 mikron (egy chipen több ezer spot

Microarray gene expression



Microarray gene expression



Az intenzitásokból lehet következtetni pl. mRNS koncentrációra (mRNS-cDNS módszernél)

De, akár genomanalízisre is jó, pl. génkópiák azonosítására is alkalmas (denaturált DNS- mintákból)

Proteomika

- Genomika: Gén-expresszió, DNS polimorfizmus vizsgálata→ egyedi diagnózis, egyedi gyógyszertervezés

DE! nem ad információt a funkcióról

- Proteomika: Fehérjeszintézis, funkcionális fehérjék, a „dolgozók” → biomarkerek diagnózishoz, célmolekulák gyógyításhoz

A proteom komplexitása

- Sokféle lehetőség az mRNS „szabászatban”
- Sokféle szintézis utáni módosítás (foszforiláció, glikoziláció)
- Nagyságrenddel több a funkcionális fehérje, mint gén
- Sokféle fehérje-fehérje interakció

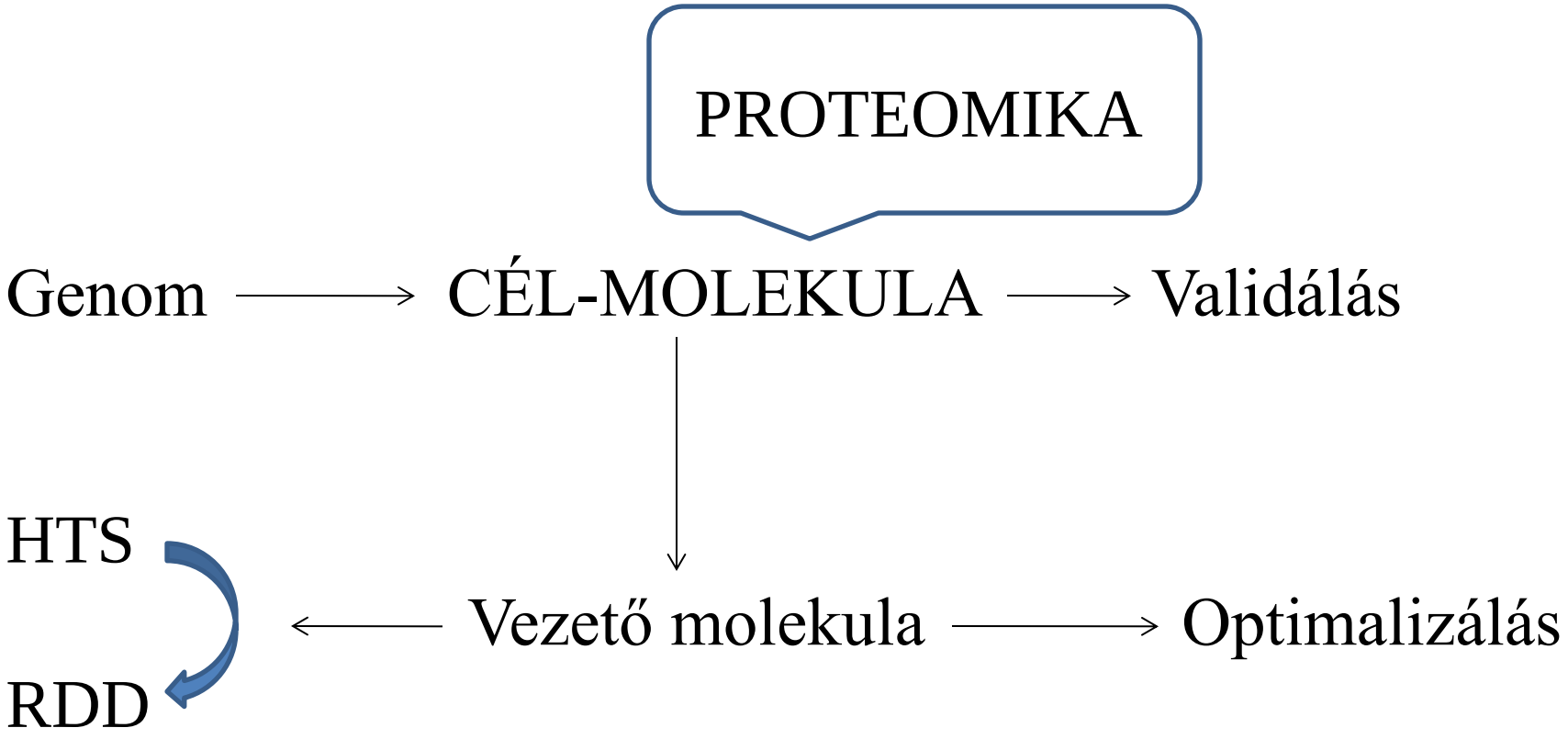
A proteomika célkitűzései

- Fehérjék karakterizálása és katalogizálása
- Fehérje expresszió összehasonlítása különböző körülmények között (egészséges-beteg, stressz)
- Fehérjefunkciók azonosítása
- Fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata
- Jelátviteli utak elemzése
- Fehérjék térszerkezete
- Fehérje adatok bioinformatikai elemzése

A proteomika helye a biokémiában

Proteomika	Klasszikus fehérjekémia
• Rendszerbiológiai szemlélet	• Hipotézis irányított kérdés
• Rész helye az egészben	• Egy funkció vizsgálata
• Fehérjefunkciók komplex sejtkörnyezetben	• Izolált fehérje funkciója

Proteomika és hatóanyag tervezés



A proteom vizsgálata

- Fehérjék elválasztása lizátumból
- A szétválasztott fehérjék karakterizálása
- Kutakodás a meglévő adatbázisokban a kapott adatok alapján

A proteomika eszközei

- 2D gélelektroforézis
- Tömegspektrometria (MS)
- ProteinChip™
- Protein microarray-k

2D elektroforézis

- Fehérjék szétválasztása két független tulajdonság alapján
  - molekulatömeg
  - izoelektromos pont
- 1. dimenzió: izoelektromos fókuszálás
  - Amfolitok és elektromos áram segítségével pH gradienst hoznak létre a gélben
  - A fehérjék az izoelektromos pontjukig vándorolnak (nettó töltés 0)

2D elektroforézis

- 2. dimenzió: Az izoelektromos pont szerint szétválasztott fehérjék kiválasztott sávjait SDS-gélre viszik át és gél-elektroforézissel tovább szeparálják egymástól

- csíkok helyett foltok

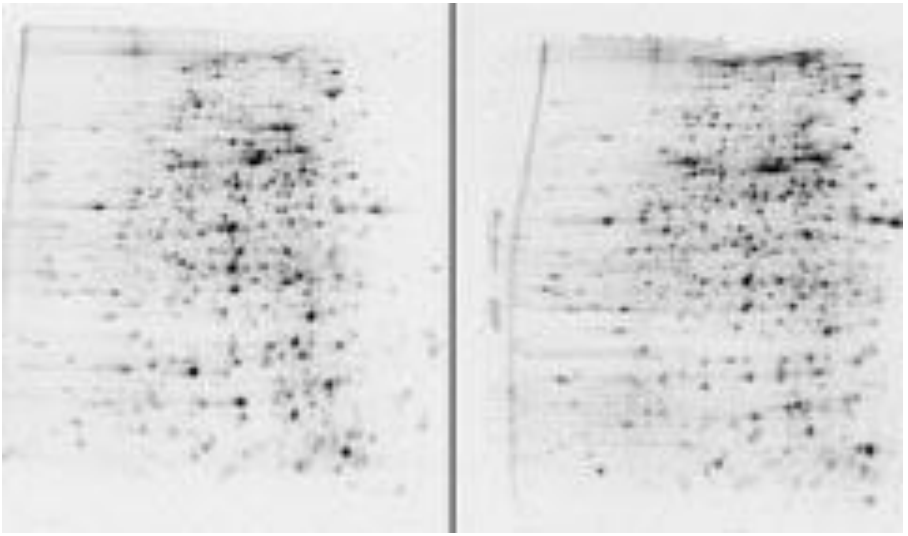
Elvárások:

- Maximális reprodukálhatóság → referencia térképek
- Optimális felbontás
- Nagy kapacitás → tisztítási, mikropreparatív célok
- Egyszerű, automatizált → nagyléptékű analízis

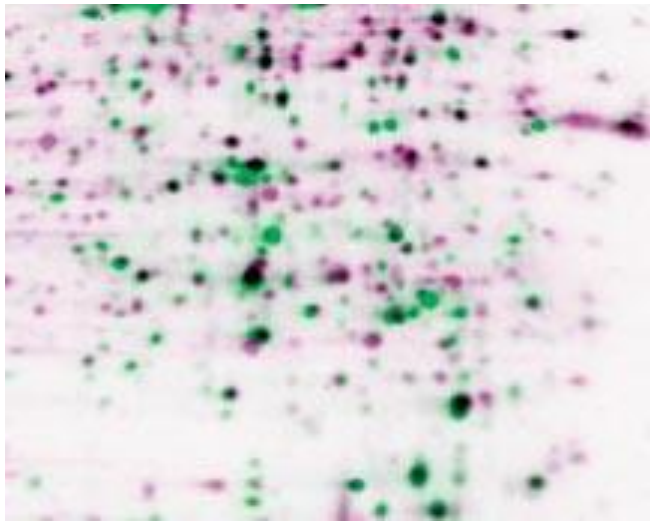
2D adatok elemzése

- Pontok vizualizálása: pl. festés (Coumassie, ezüst)
- Pontok detektálása
- Mennyiségi elemzés
- Mintázatok illesztése
- Adatbázis létrehozása
- Automatizálás
- Viszonypontok kijelölése
- Pontok illesztése → kontroll-kezelt összehasonlítás, expressziós mintázat, betegség-összefüggések

2D képek és illesztésük



Fehérje expressziós mintázat 2D gélelektroforézissel: különböző körülmények között lévő sejtekből



Számítógépes összehasonlításuk: a zöld ill. lila a különböző körülmények fehérjemintázata, fekete: különböző mennyiségű fehérjék, szürke: azonos mennyiségű fehérje

Tömegspektrometriás analízis

- Előkészítés:

  - fehérjék darabolása (pl. tripszines emésztés)

  - tisztítás (pl. gélelektroforézis)

- Tömegspektrometriás analízis - MALDI-TOF

- A peptidkészlet tömegprofilja, fehérje ujjlenyomat (adattár)

- Fehérje azonosítás szekvenálás nélkül: emésztés *in silico* is → összehasonlítás az adatbázissal kb 4-5 peptid stimmeljen, min. 20% szekvencia átfedés legyen, nagy pontosság és nagy felbontás

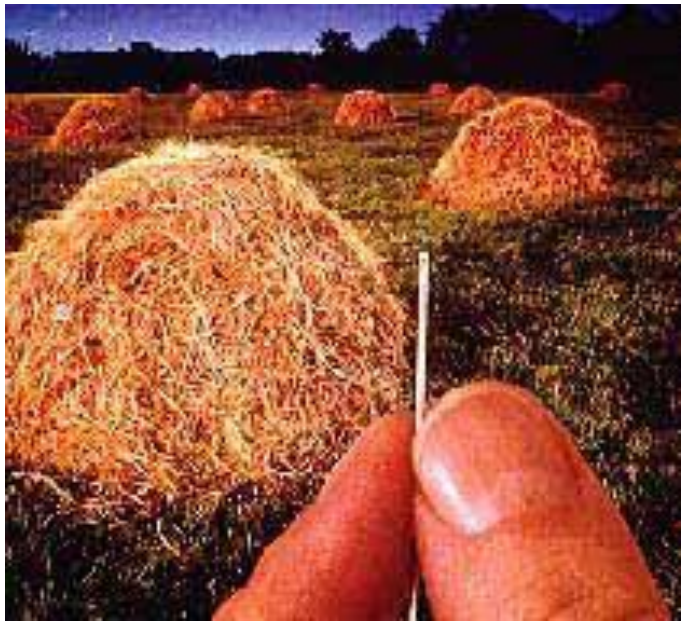
- Fehérje azonosítás szekvenálással: post-source decay tandem MS

Tömegspektrometriás analízis korlátai

- Nem egyenlő mértékben ionizálódnak az adott fragmensek
- Kevés fehérjére nem alkalmazható
- Nagyon tiszta mintára van szükség

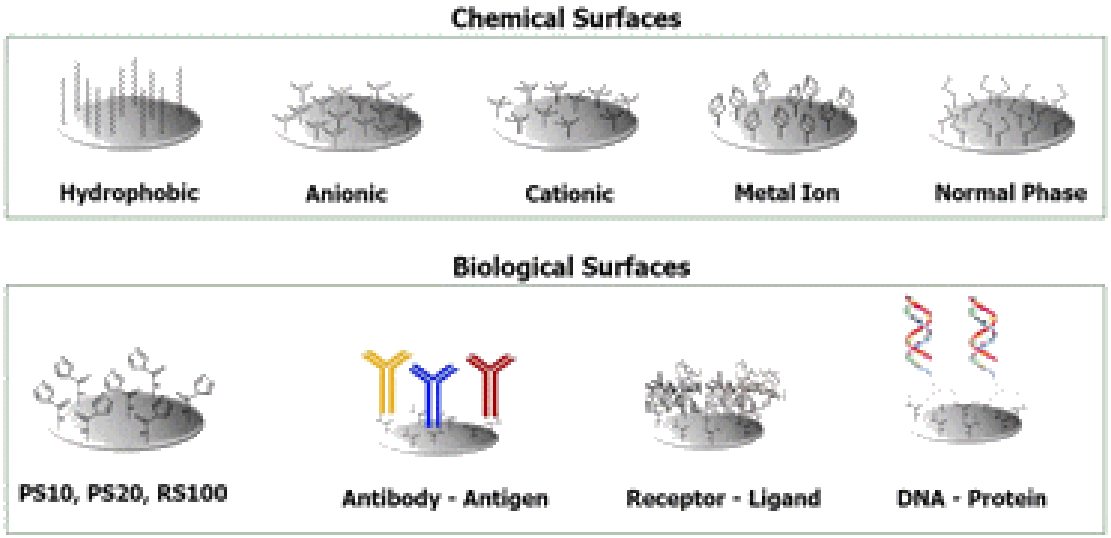
Proteinchip technológia

- Fehérje-halászat, tisztítás, analízis és feldolgozás
- Kis mennyiségű mintára is alkalmas (atto, femtomól)
- „Tű a szénakazalban”



Proteinchip technológia

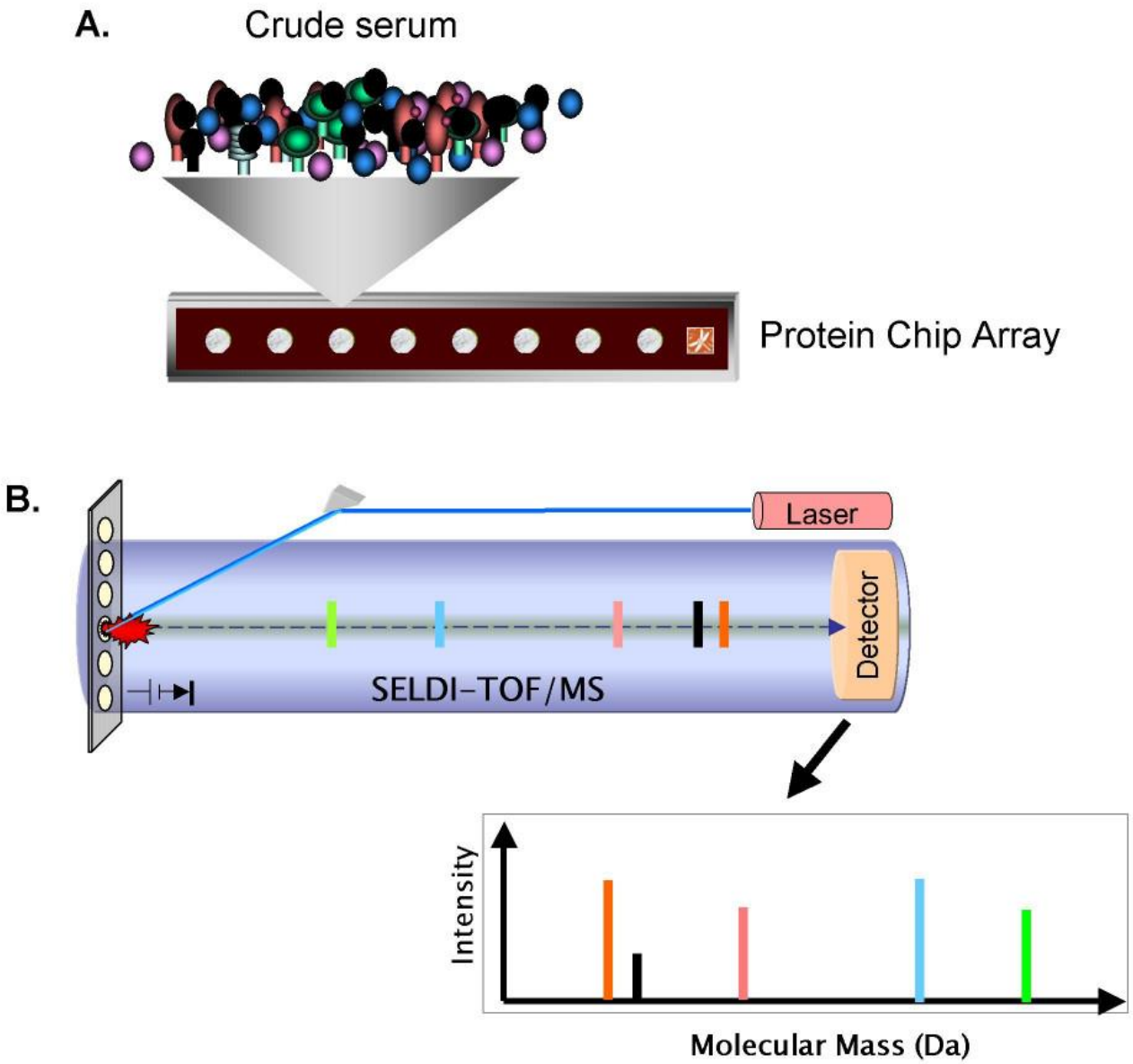
- Chip: különböző felülettel kaphatók (hidrofób, hidrofil, kation, anion-cserélő stb.)
- Egy chipen 8 lyuk, különböző affinitással (pl. receptor, ellenanyag, DNS, fehérje)
- Akár 1 µl durva minta (lizátum, szérum) is felvihető
- Az adott fehérje a neki jó helyen kötődik (ami nem az lemosódik)



Proteinchip technológia - analízis

- Felület-erősített lézer deszorpciós-ionizációs (SELDI) módszerrel ionizálás (közben kristályosítják a fehérjéket, így kerülnek a vákuumcsőbe (MS)
- TOF detektálás
- Tömegmintázat megkapható

Proteinchip technológia

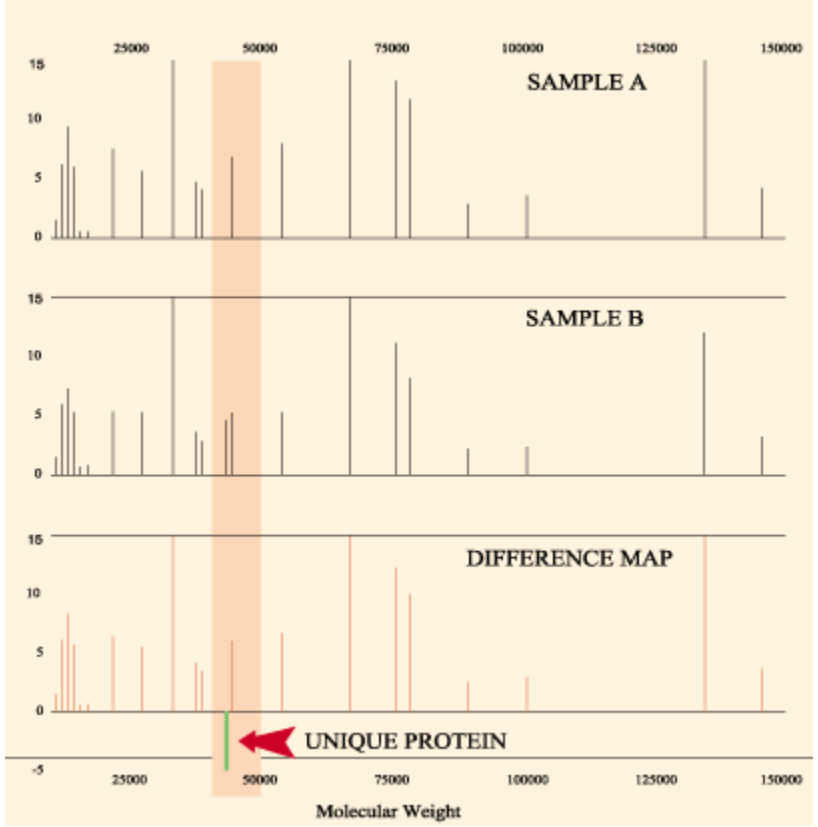


Proteinchip technológia - alkalmazások

- Fehérje felfedezés
- Fehérje tisztítás
- Fehérje azonosítás – peptidtérképezés, bio / betegség markerek
- Fehérje karakterizálás (epitóp térképezés, foszforilációs, glikolizációs analízis)
- Assay fejlesztés, pl. fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatára

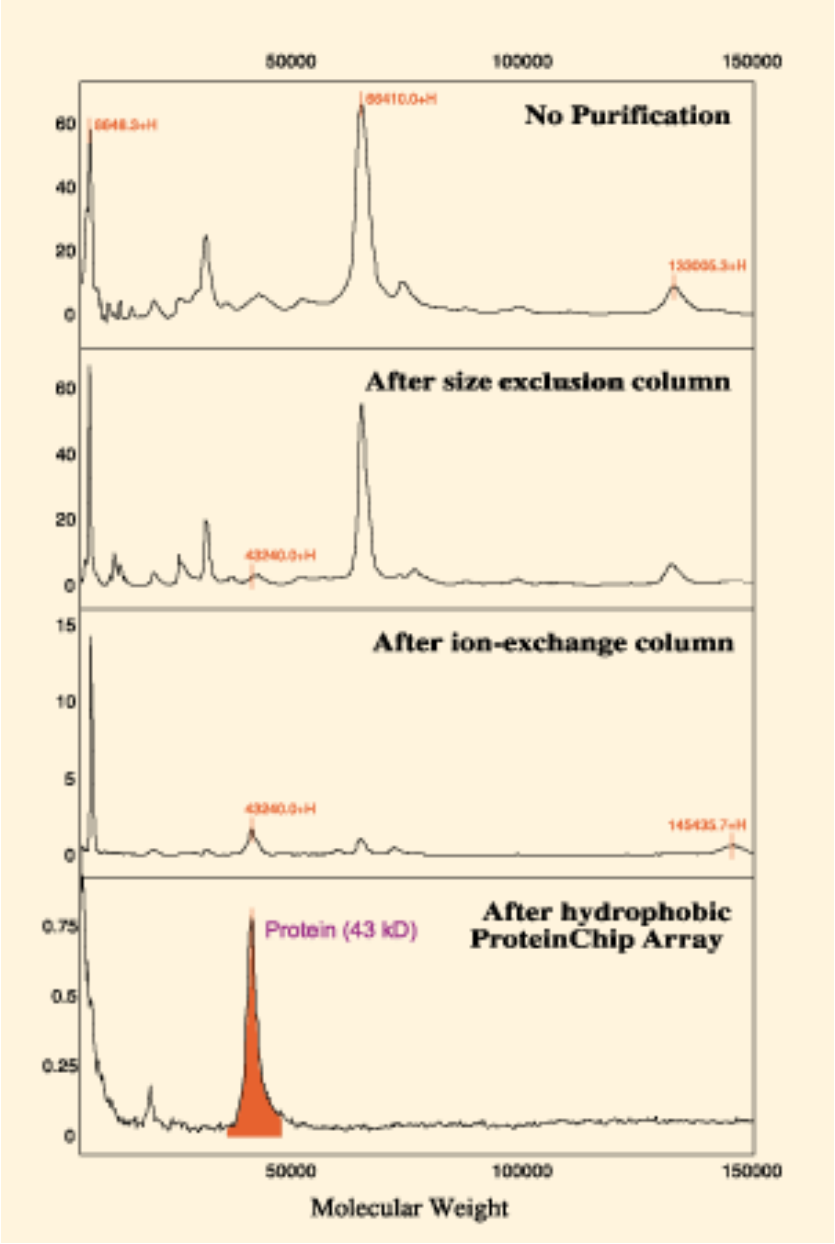
Fehérje felfedezés, biomarker keresés

- 2 szérum minta cseppentése, (beteg-egészséges / kezelt-kezeletlen) mosás, leolvasás
- B kivonása A-ból szoftver segítségével
- Egyedi fehérje azonosítása



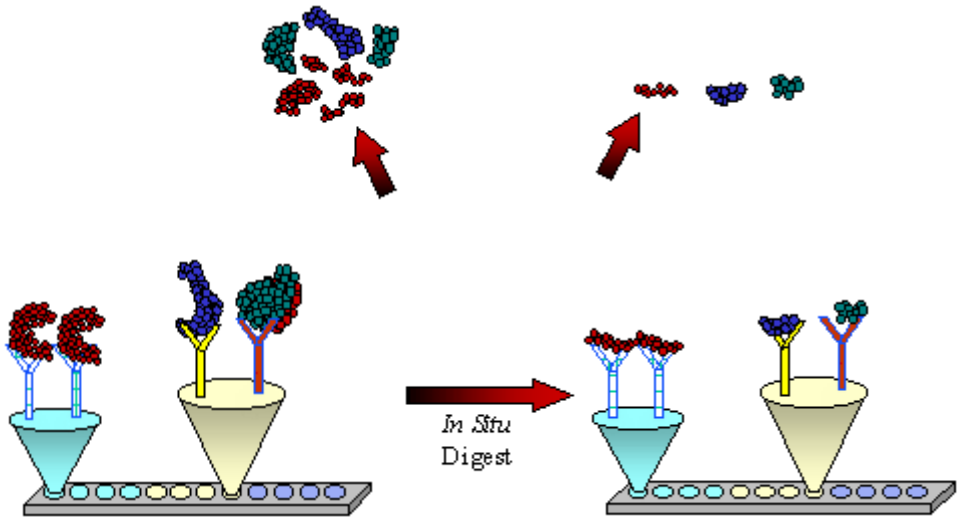
Fehérje tisztítás

- Mikroliternyi mennyiség
- Mikrokromatográfiás előtisztítás
- Egyre erőteljesebb mosás a csipen
- Homogén tisztaság pikomól mennyiségben
- Néhány óra hónapok helyett



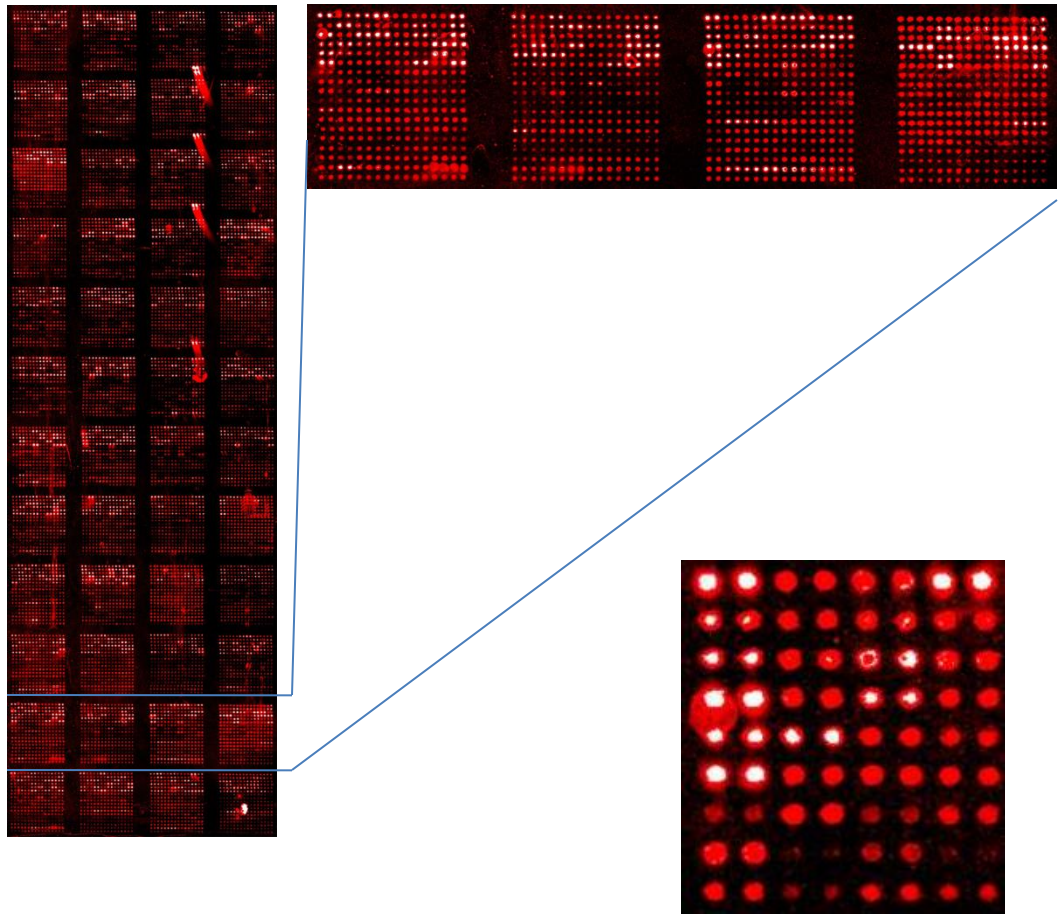
Epitóp térképezés

- Ellenanyag kötése a chip felszínére
- *In situ* emésztés
- Nem kötődött fragmensek lemosása
- Kötődött fragmensek leolvasása



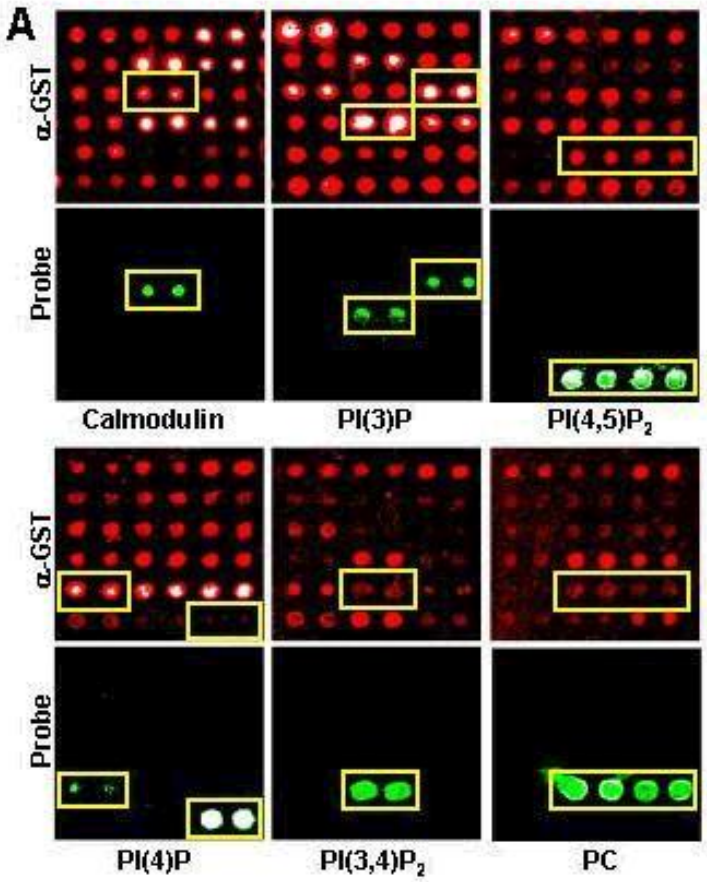
Fehérje-fehérje kölcsönhatások - microarrayk

- 12,938 pont
- Minden pötty ~ 30 fg-50 pg proteint tartalmaz
- Különböző fehérje minták nyomtatva a felszínre (A fehérjéket megtoldották GST-poli-His-taggal, majd Ni^{2+}-en át a felülethez kötötték)



Fehérje-fehérje interakciók elemzése microarray-jel

- Array+biotinilált kalmodulin
- Új kalmodulin-kötő fehérjék felfedezése
- Új inozitol-foszfát-kötő fehérjék felfedezése
- Biotin-(strept)avidin kapcsolat!



Metabolomika

- ***Metabolomika***: egy szervezet összes metabolitjának egyidejű összehasonlító vizsgálata, mennyiségi változások követése
- ***Metabolom***: a szervezet anyagcseréjében részt vevő összes kismolekula
- Metabolitok: az anyagcserefolyamatok köztes-, vagy végtermékei (zsírok, aminosavak, cukrok, antibiotikumok, pigmentek stb)

Metabolomika – elválasztás

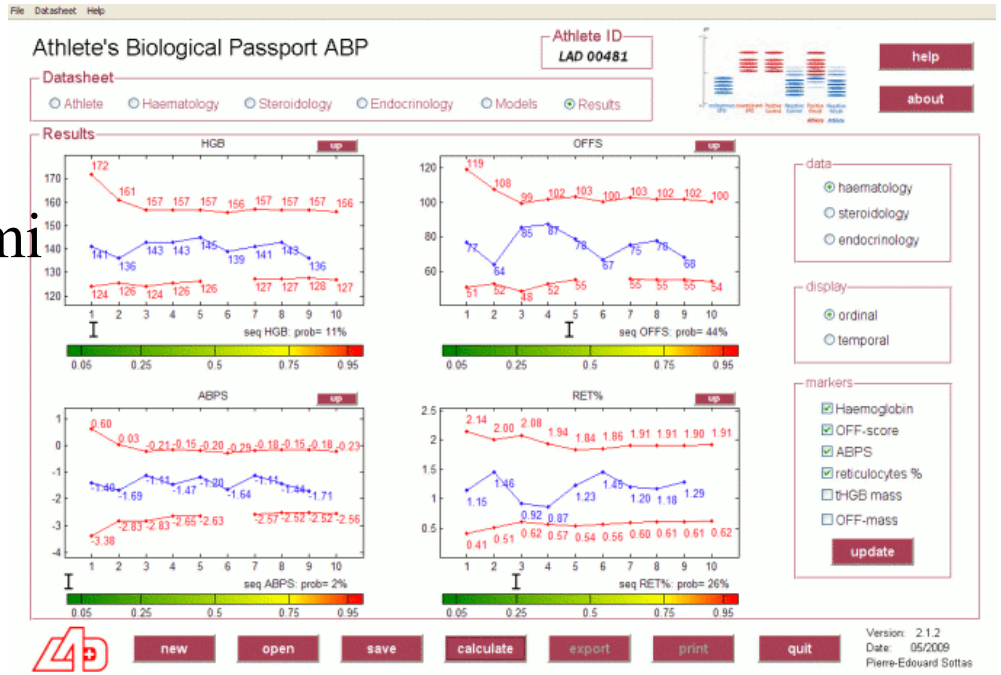
- Gázkromatográfia(GC)
- Kapillárelektroforézis (CE)
- Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)
- Ultrahatékony folyadékkromatográfia (UPLC)

- GC-MS
- HPLC-MS

- Detektálási módszerek
- NMR, MS

Metabolomika – elválasztás

- Adatok értékelése – összehasonlítás, differencia analízis stb.
- Alkalmazások
  - Kábítószer azonosítás (igazságügyi orvos, vegyész)
  - Klinikai toxikológia
  - Táplálkozásgenetika
  - Funkcionális genomika

Biológiai útlevél

- Sportolóknál, dopping-vizsgálatoknál alkalmazzák
- Biomarkerek segítségével építenek fel egy, a sportolóra jellemző hematológiai és szteroid profilt:
- A sportoló így önmaga referenciaértéke is egyben saját határértékeket állapítanak meg, ami rá jellemző
- A gyanús változások orvosi vagy dopping eredetét tisztázzák, ha tudják