

The background features a complex network of nodes and edges, with nodes represented by small, multi-colored spheres (pink, green, blue) and edges as thin white lines. Overlaid on this network are several thick, 3D-rendered ribbons in shades of green and blue, which are twisted and looped, resembling protein secondary structures like alpha-helices and beta-strands. The overall aesthetic is scientific and digital, set against a dark blue gradient background.

Proteomika 2023

PROTEOMIKA

2023

- **Proteomika, Metody práce s bílkovinami** (Petrák 16/10)
- **Separační metody, digesce a principy ID bílkovin pomocí MS** (Petrák 23/10)
- **Principy hmotnostní spektrometrie, instrumentace** (Man 30/10)
- **Hmotnostní spektrometrie v proteomice, analýza PTM** (Man 6/11)
- **ID proteinů, DDA, DIA, databáze, FDR** (Talacko 13/11)
- **Kvantifikace, isotopy, LFQ, cílená proteomika** (Harant 20/11)
- **Design experimentu, zpracování dat, bioinformatika...**(Harant 27/11)
- **Proteomika membránových proteinů, proteinové komplexy** (Petrák 4/12)
- **Klinická proteomika, speciální metody** (Petrák 11/12)

PROTEOMIKA 2023

Prezentace z loňských přednášek + doporučená literatura na adrese:

<http://petraklab.cz/teaching>

Scopes Robert, Protein purification. Principles and Practice
Springer-Verlag, 3rd edition

Zkouška:

Písemná esej na zadané téma a ústní zkouška

- **Proteomika, protein, proteom, proteoforma**
- **Počet analytů a jejich koncentrace**
- **Důležité vlastnosti proteinů a AMK**
- **Práce s bílkovinami**
 - Dezintegrace tkání a buněk, detergenty
 - Rozpustnost, srážení, denaturace, koncentrace
 - Značení a imobilizace bílkovin

Proteom –Kompletní sada bílkovin přítomná v daný okamžik v studovaném organismu, tkáni, buňce nebo organele. Zahrnuje PTM, změny lokalizace, jejich metabolický obrat a interakce bílkovin.

Proteomika – soubor metod, konceptů a přístupů používaných ke kvatitativnímu a kvalitativnímu popisu proteomů

Expresní/diferenční proteomika

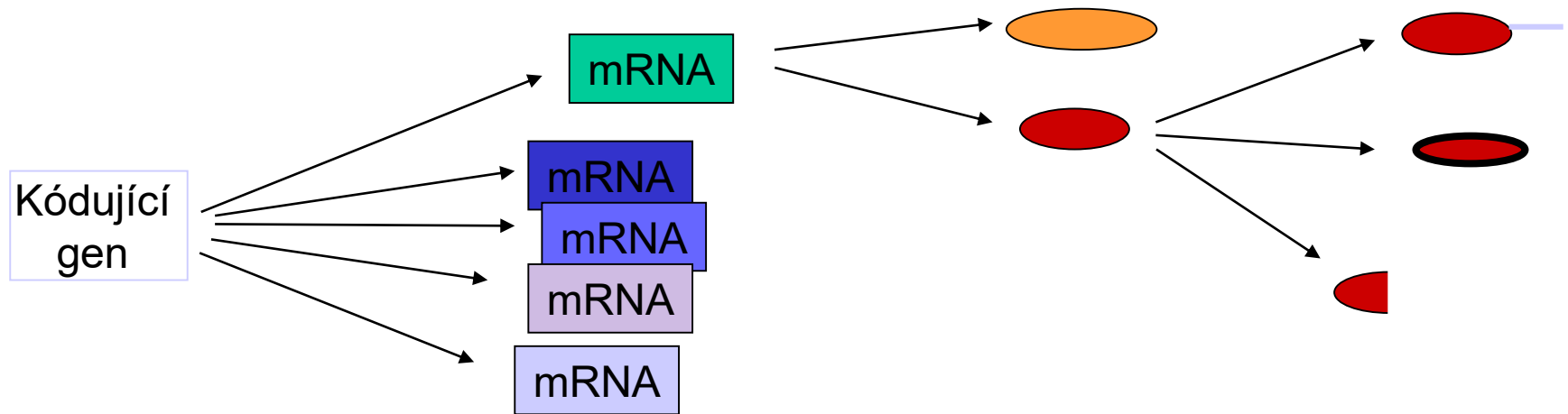
usiluje o (semi) kvantitativní porovnávání proteomů, tj. o identifikaci bílkovin, které jsou odlišně exprimovány (zastoupeny) mezi dvěma nebo více vzorky.

General considerations:

- 1) Number of the analytes**
- 2) Concentrations of the individual analytes, dynamic range**
- 3) Physico-chemical properties – solubility, stability, size....**

Komplexita proteomu – Kolik je proteinů?

~20 500 lidských genů → ? mRNA ? → ??? Proteinů ???
4-6 různých



JAK JE DEFINOVÁN PROTEIN?

GENOCENTRICKÝ vs. PROTEOCENTRICKÝ POHLED

PROTEIN a **PROTEOFORMA**

Jak je definován protein?

alfa ENOLÁZA

ENO1 mRNA

α enoláza (434 AA, cytosolický enzym)
plasminogenový receptor (na PM)

MBP-1 (340 AA, jaderný, DNA vazebný)

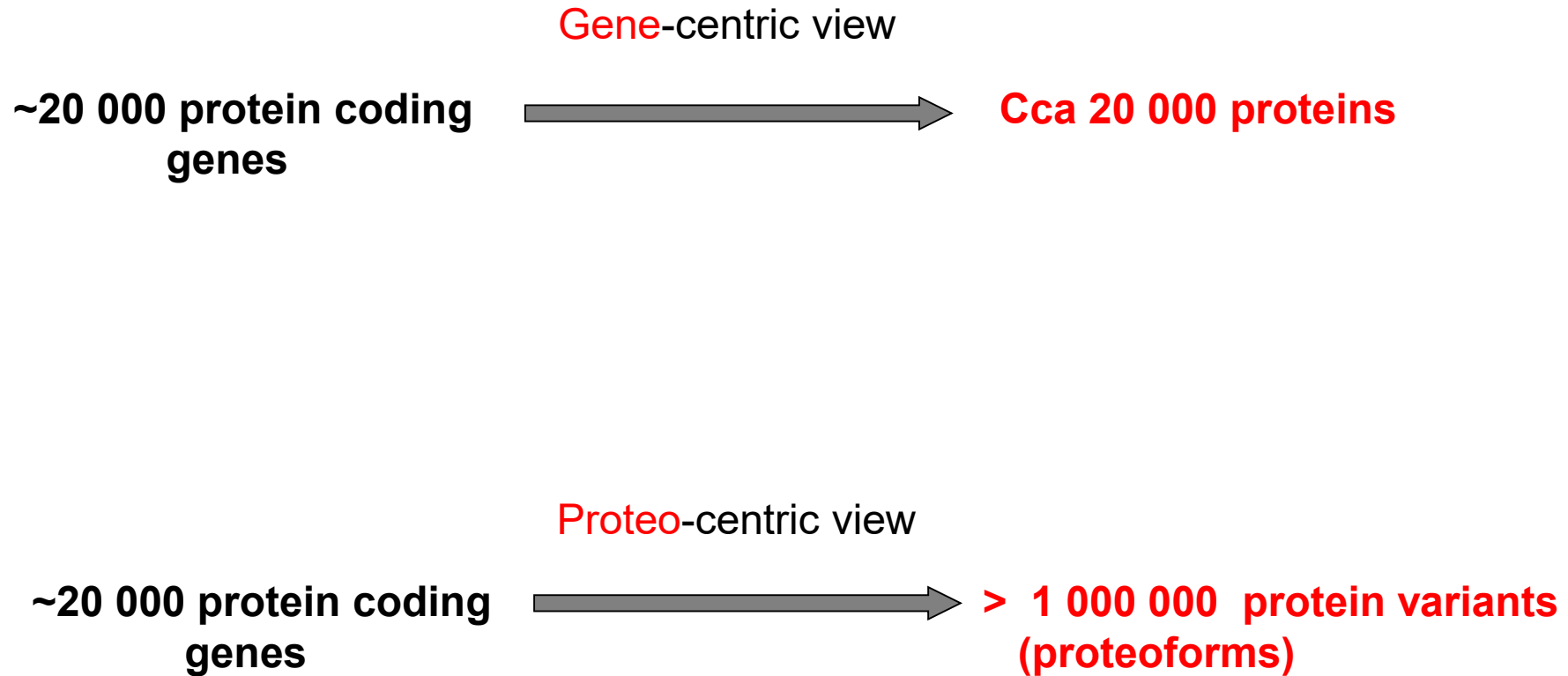
Jsou DVĚ molekuly, lišící se strukturou, funkcí a lokalizací
JEDNÍM proteinem?

Je **protein** definován kódujícím genem?

Strukturou?

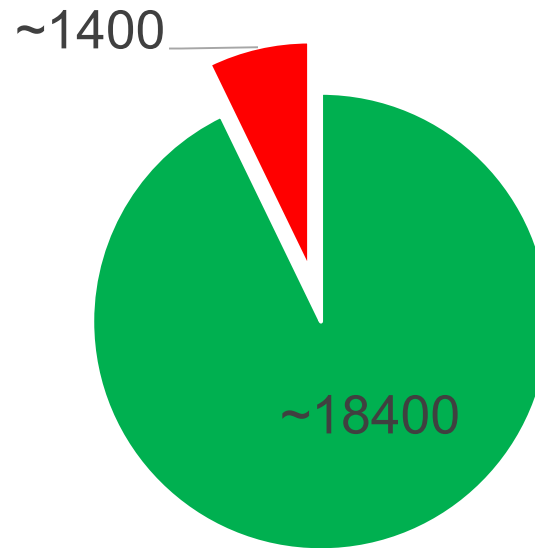
Funkcí?

The human proteome – how many proteins do we have?



HUPO PROJECT - STATUS 2022

~19 800 protein-coding genes



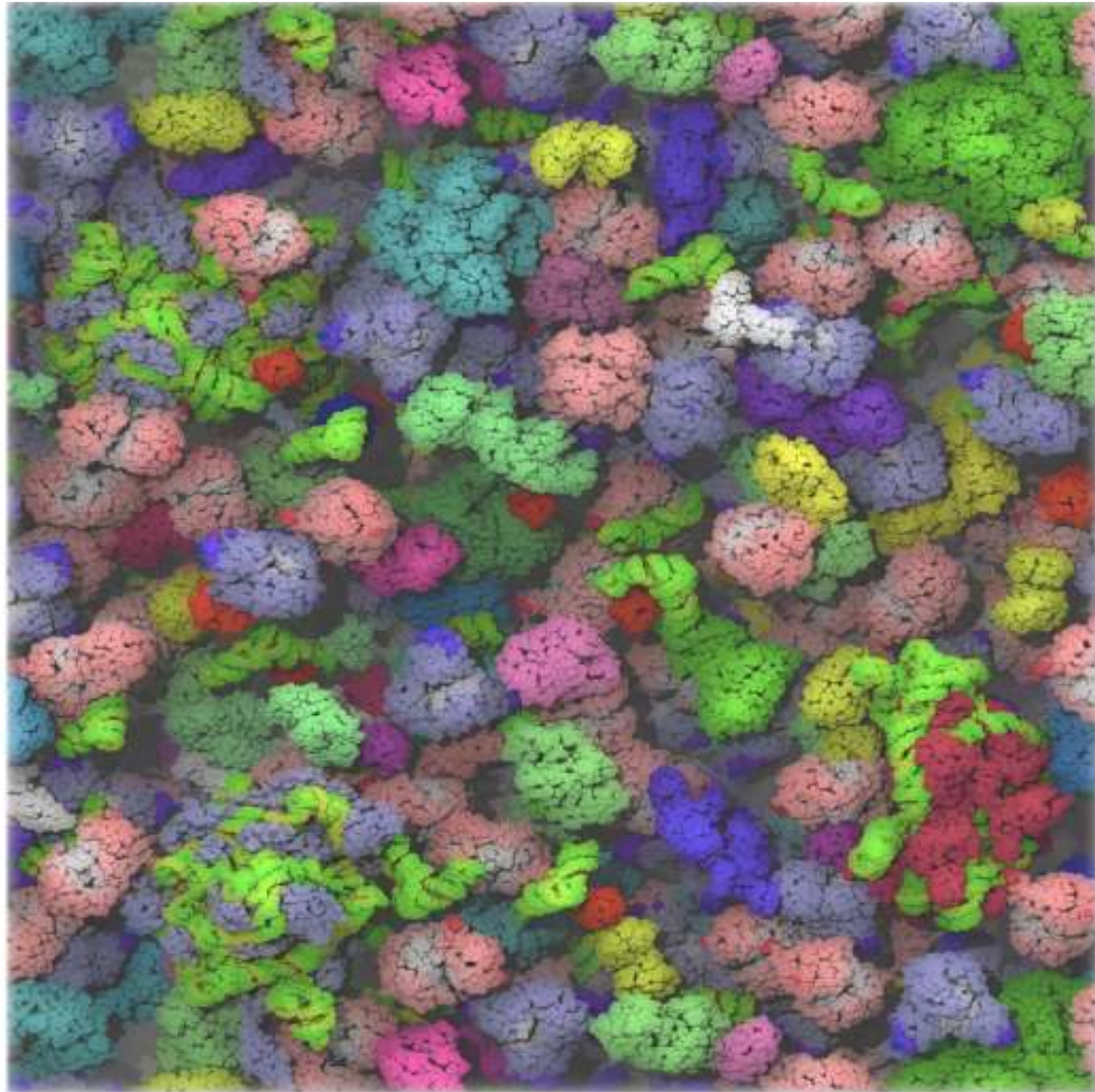
■ Evidence on protein level (93%)

■ „The missing proteins“ (7%)

General considerations:

- 1) Number of the analytes
- 2) Concentrations of the individual analytes, dynamic range
- 3) Physico-chemical properties – solubility, stability, size....

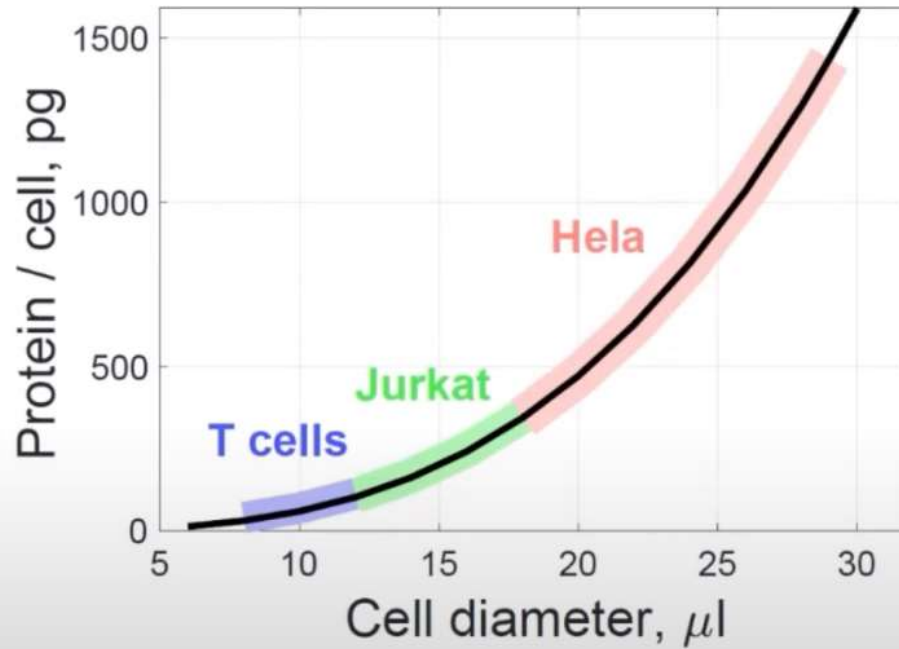
It is crowded out there...



Koncentrace proteinu v buňce

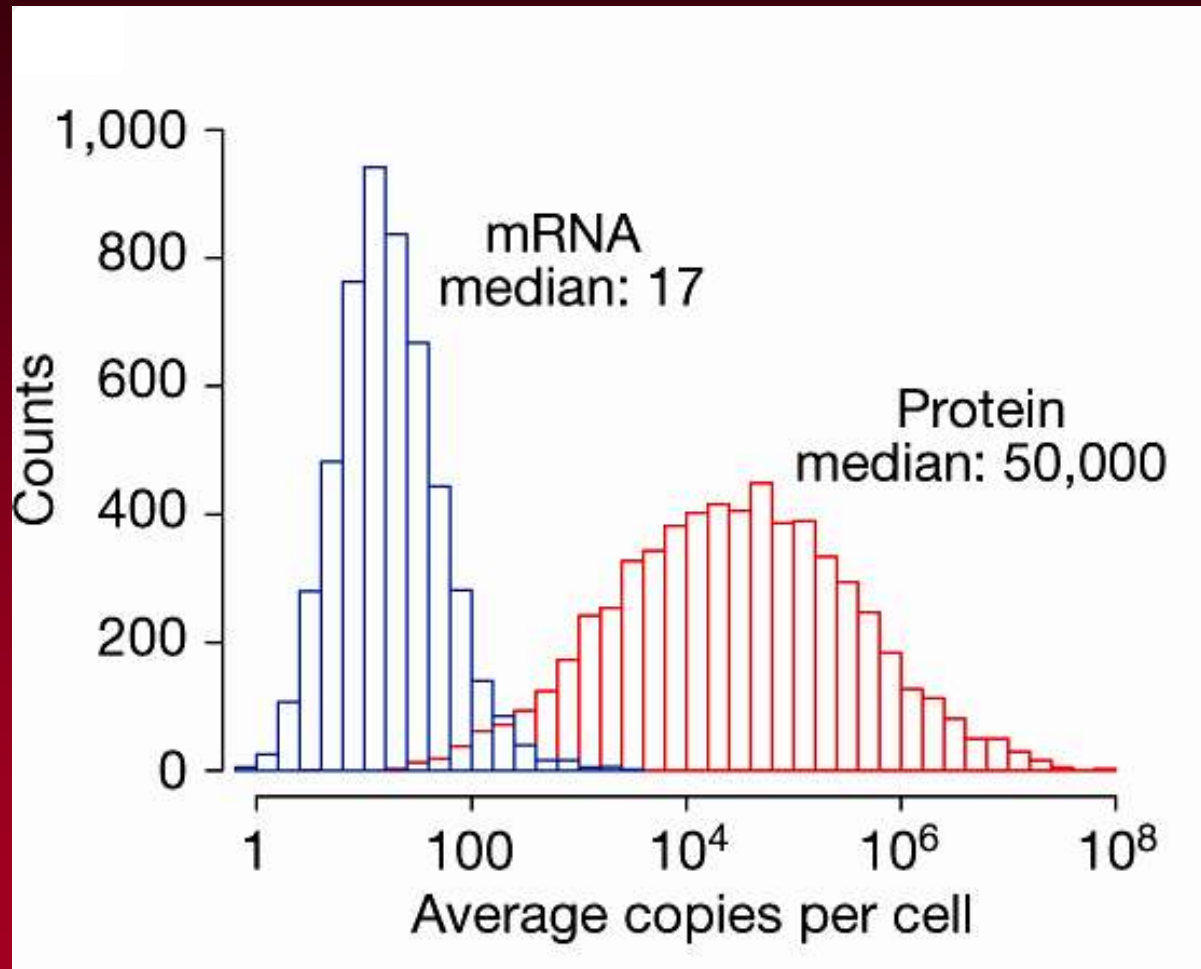
3×10^6 molekul/ μm^3

$10^9 - 10^{10}$ molekul/buňku (cca 80-1200 pg/buňku)
Nižší miliardy proteinových molekul/buňku

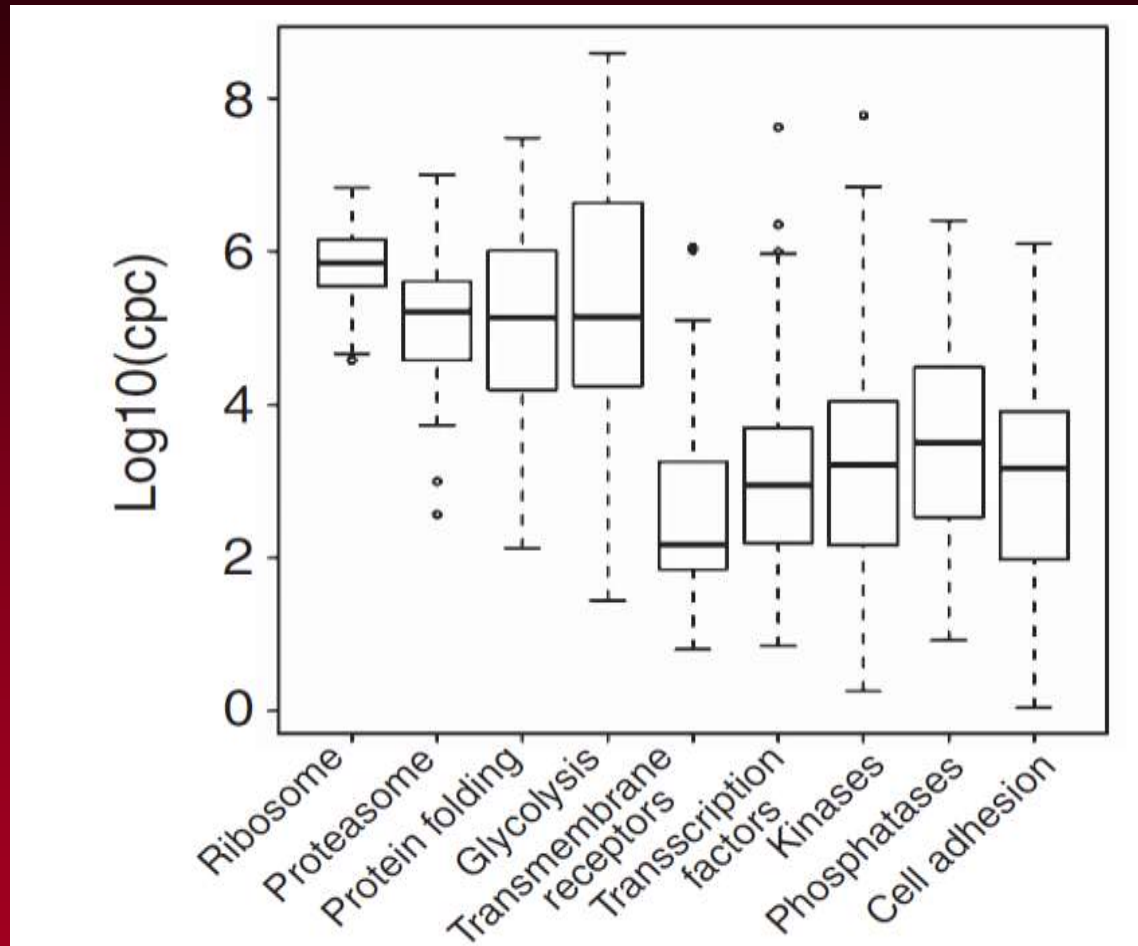


¹Estimates based on R Milo, *Bioessays*, 2013

Rozpětí koncentrace/počtu kopií jednotlivých proteinů na buňku (10^{-10} - 10^8)



Rozpětí koncentrace/počtu kopií jednotlivých proteinů na buňku (10^{-10^8})

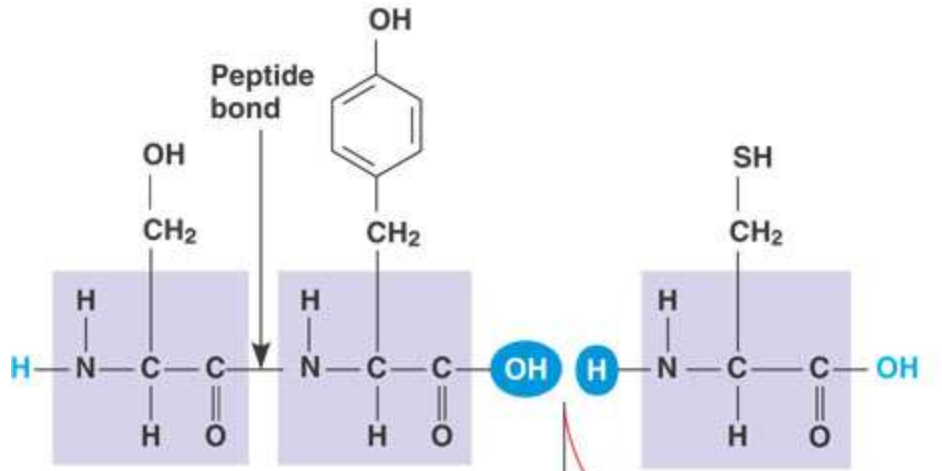


Desítky kopií až desítky milionů kopií na buňku

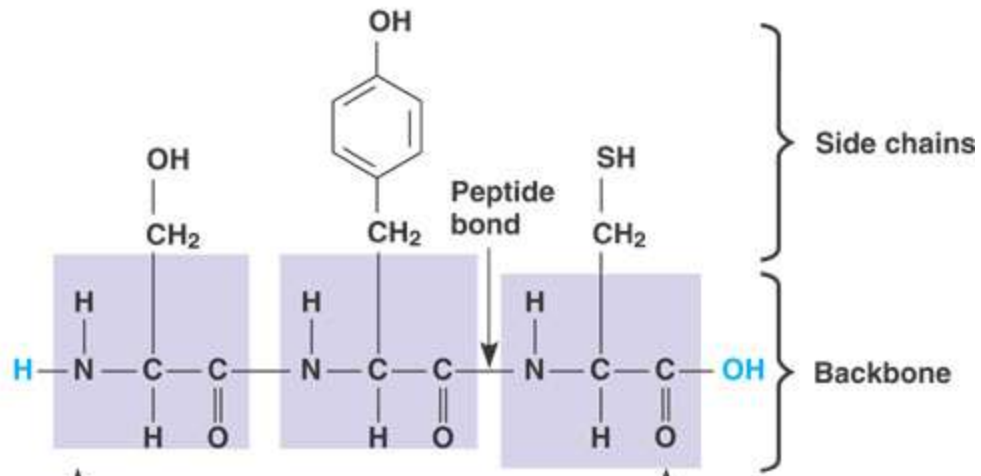
General considerations:

- 1) Number of the analytes
- 2) Concentrations of the individual analytes, dynamic range
- 3) **Physico-chemical properties – solubility, stability, size....**

- Proteomika, protein, proteom, proteoforma
- Počet analytů a jejich koncentrace
- **Důležité vlastnosti proteinů a AMK**
- **Práce s bílkovinami**
 - Dezintegrace tkání a buněk, detergenty
 - Rozpustnost, srážení, denaturace, koncentrace
 - Značení bílkovin

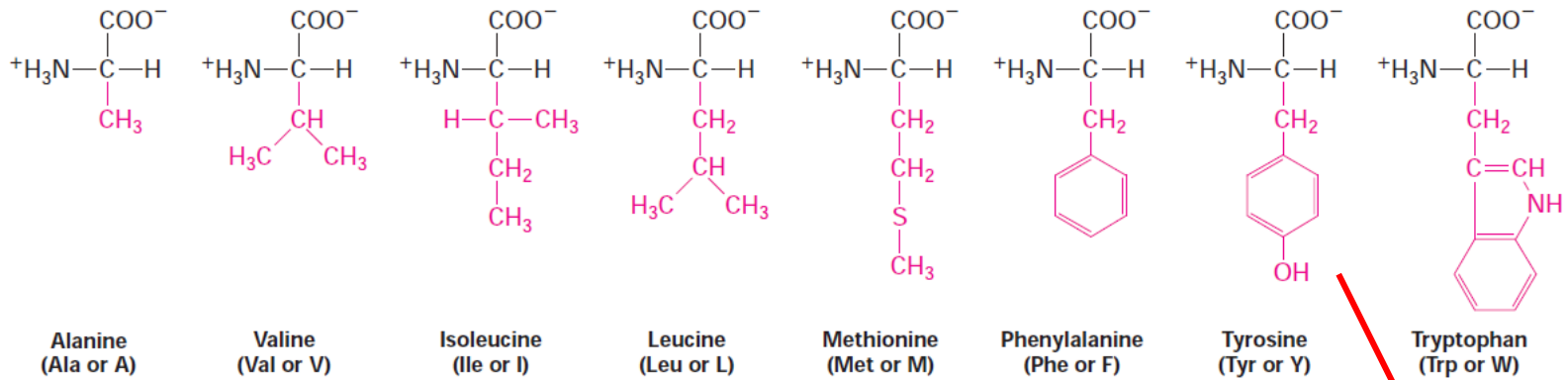


(a) Ser-Tyr Cys

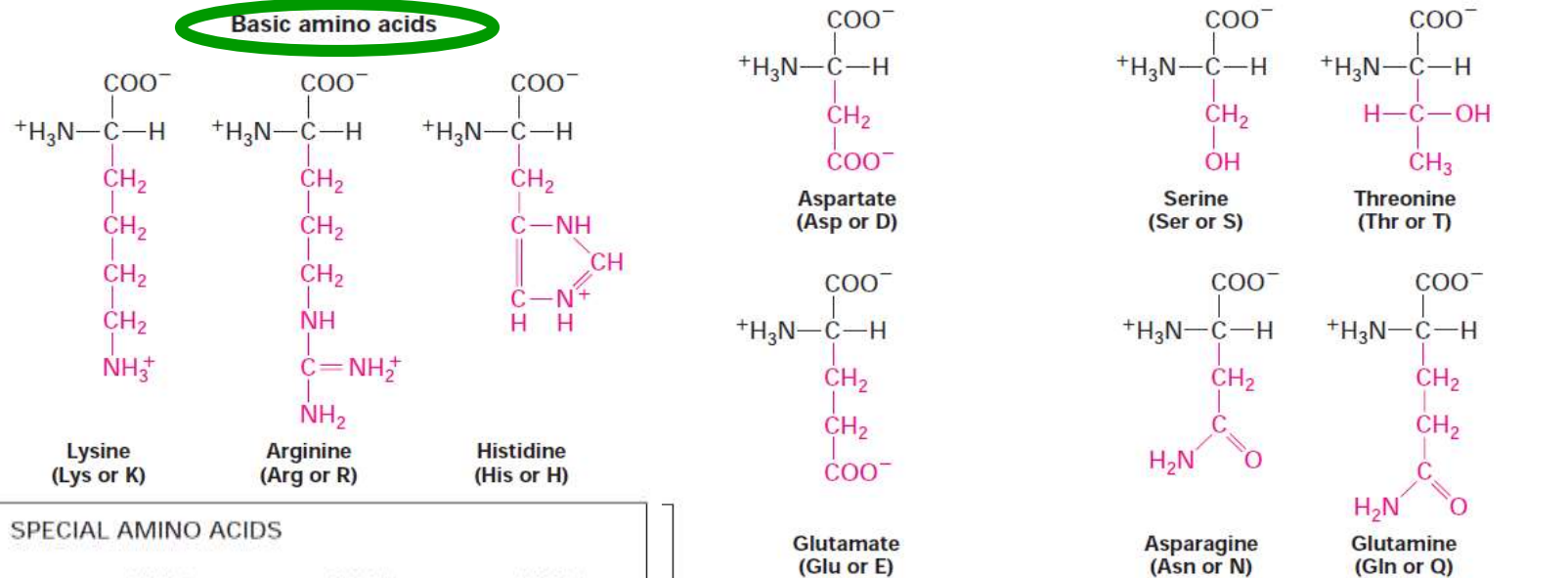


(b) Amino end (N-terminus) Carboxyl end (C-terminus)

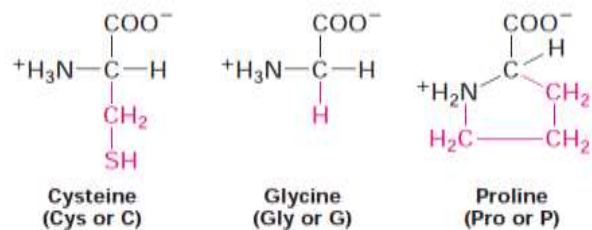
HYDROPHOBIC AMINO ACIDS



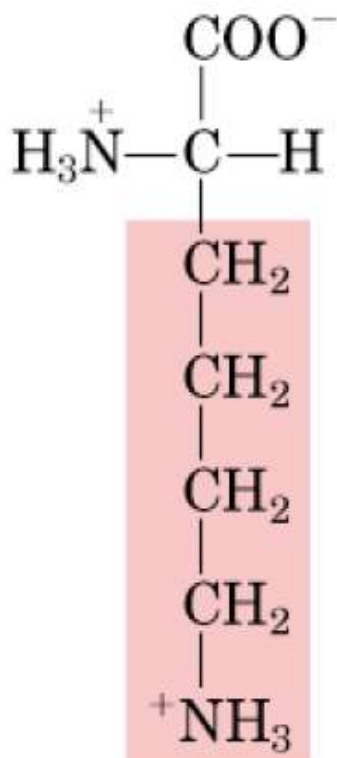
HYDROPHILIC AMINO ACIDS



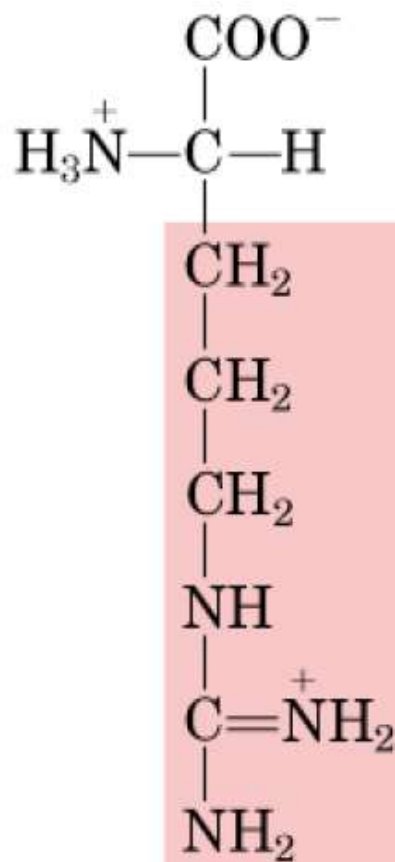
SPECIAL AMINO ACIDS



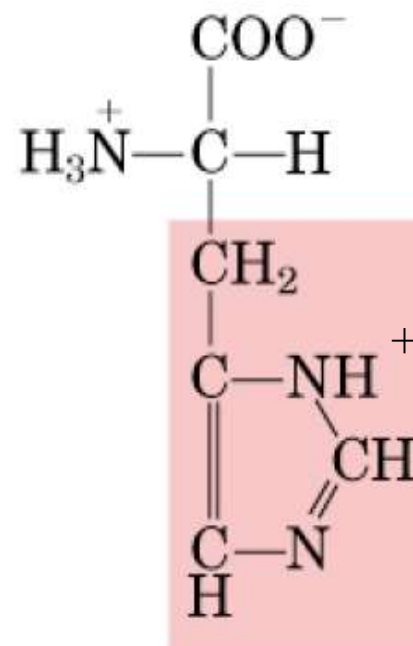
KLADNĚ NABITÉ AMINOKYSELINY (pH 7)



Lysine



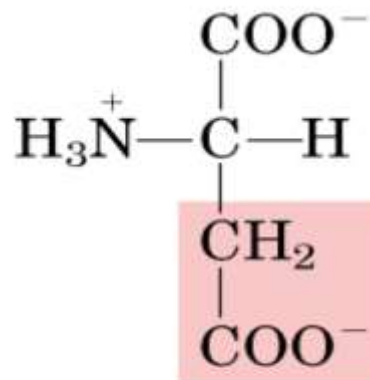
Arginine



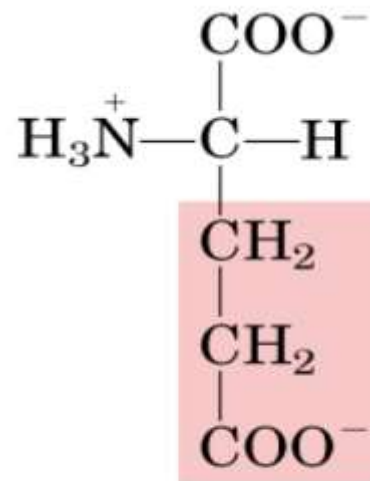
Histidine

ZÁPORNĚ NABITÉ AMINOKYSELINY

pH 7

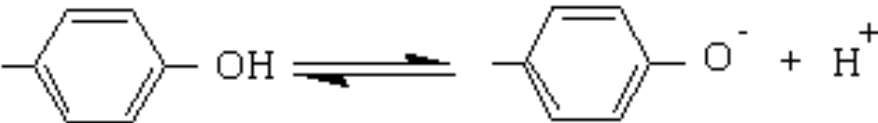
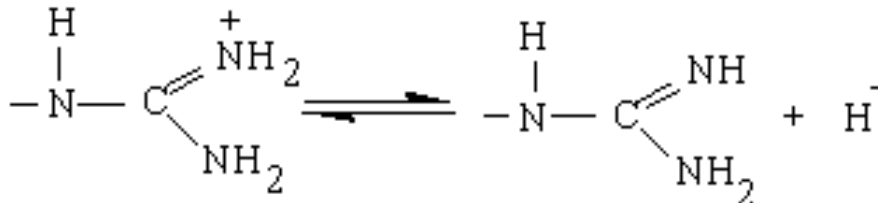


Aspartate



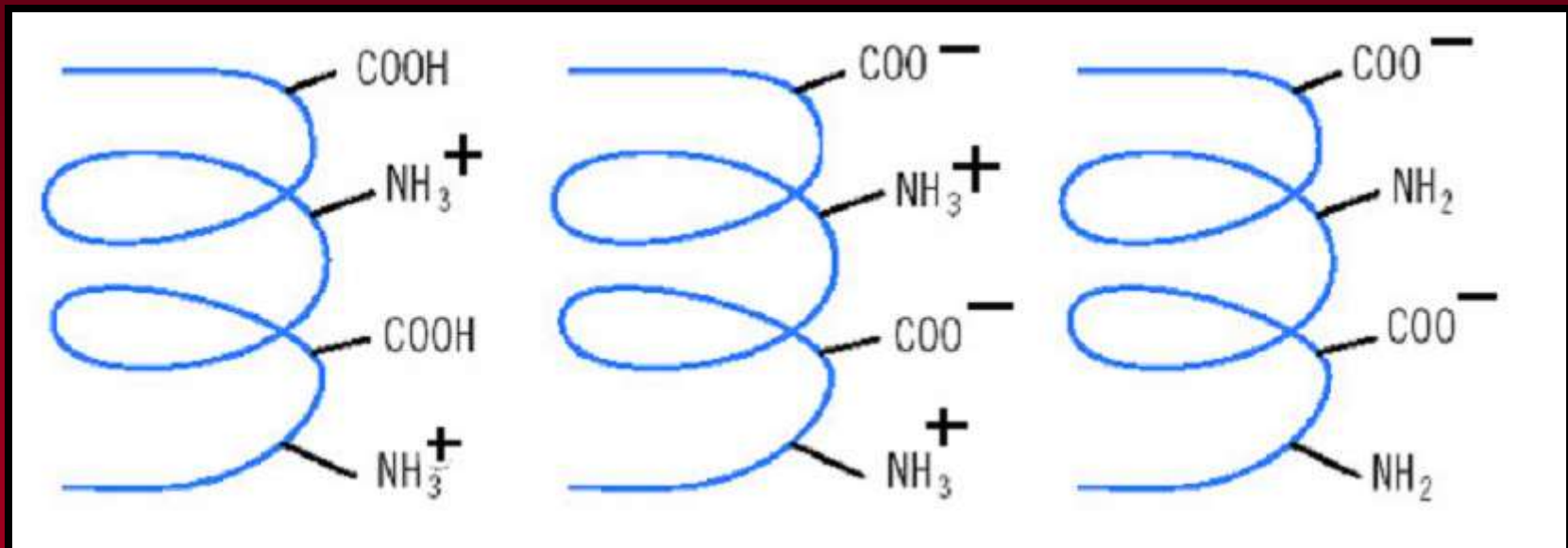
Glutamate

Další skupiny ionizovatelné v bazickém prostředí

Cysteine	$-\text{SH} \rightleftharpoons \text{S}^- + \text{H}^+$	8.5
Tyrosine		10.0
Lysine	$-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$	10.0
Arginine		12.0

Izoelektrický bod bílkovin

- Celkový náboj proteinu (net charge) je součtem všech jeho negativních i pozitivních nábojů.
- Kyselé a zásadité skupiny polypeptidu jsou protonovány a deprotonovány v závislosti na pH prostředí.

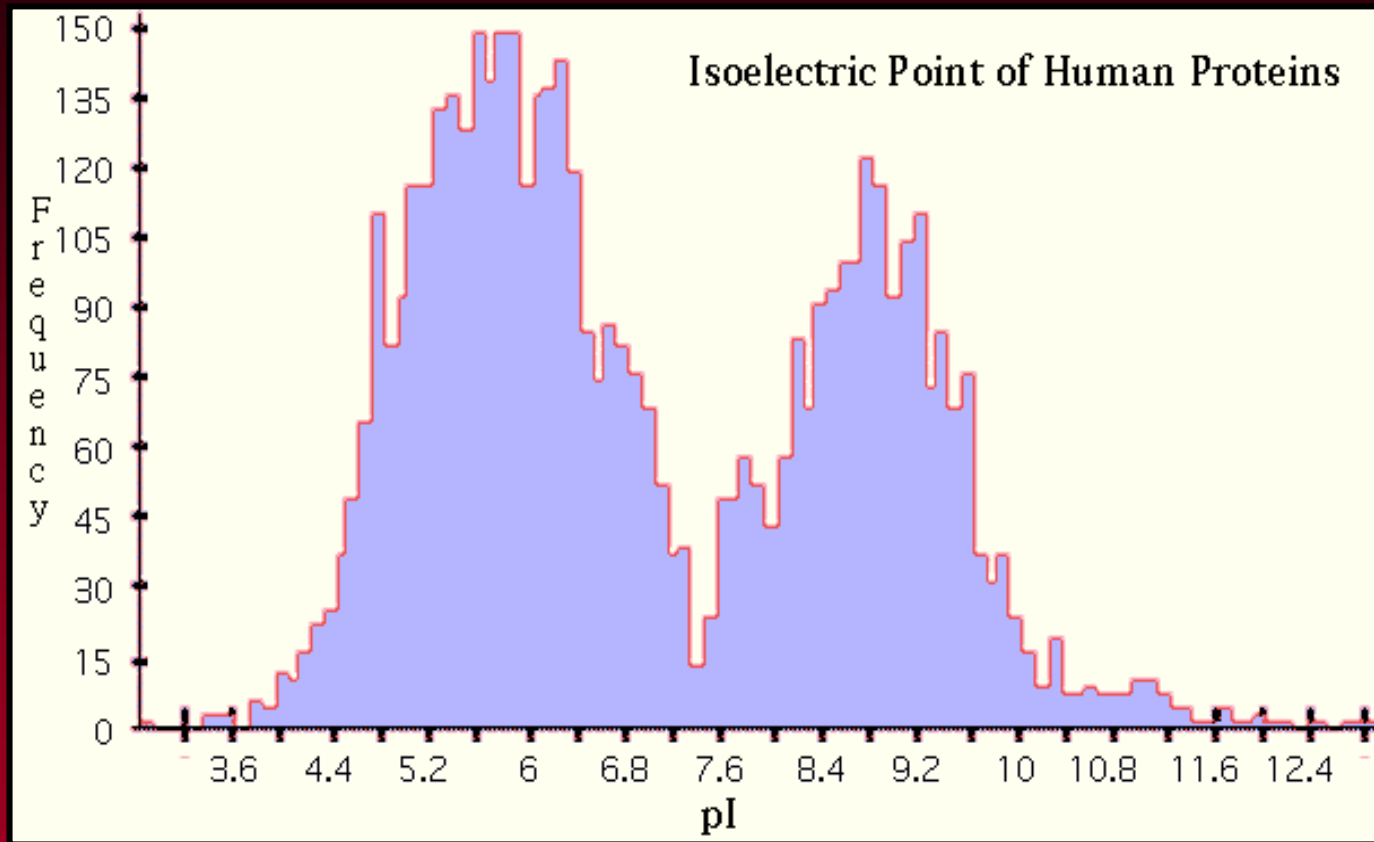


pH < pI

pH = pI

pH > pI

Izoelektrický bod bílkovin



Proteiny mají nejnižší rozpustnost v oblasti pH kolem jejich izoelektrického bodu !!!
Kontaminace, ztráty, degradace, modifikace, reproducibilita

Hydrofobicita proteinu

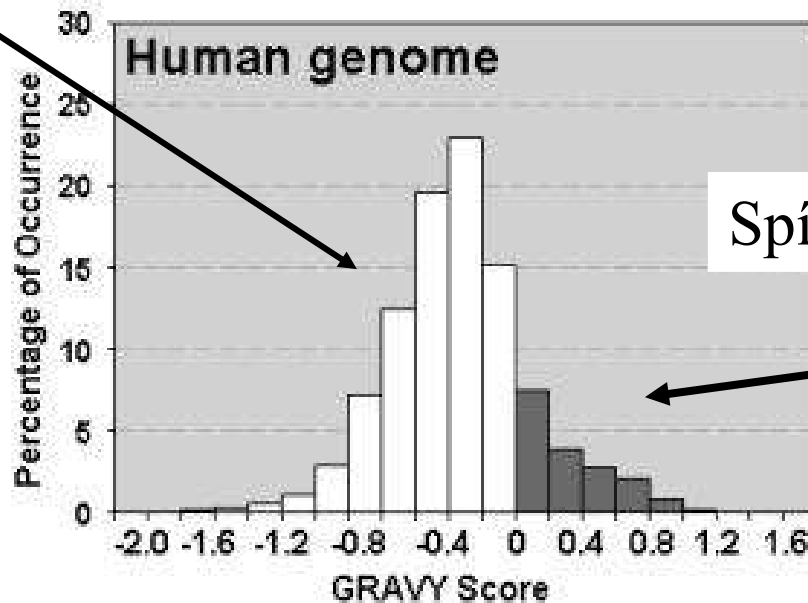
Amino Acid Name	One Letter Code	Hydropathy Score
Isoleucine	I	4.5
Valine	V	4.2
Leucine	L	3.8
Phenylalanine	F	2.8
Cysteine	C	2.5
Methionine	M	1.9
Alanine	A	1.8
Glycine	G	-0.4
Threonine	T	-0.7
Tryptophan	W	-0.9
Serine	S	-0.8
Tyrosine	Y	-1.3
Proline	P	-1.6
Histidine	H	-3.2
Glutamic acid	E	-3.5
Glutamine	Q	-3.5
Aspartic acid	D	-3.5
Asparagine	N	-3.5
Lysine	K	-3.9
Arginine	R	-4.5

GRAVY SCORE – Grand average
hydropathy
(součet „hydrofobicity“ (-4.5 až 4.5)
jednotlivých aminokyselin dělený
počtem aminokyselin)

Hydrofobicita proteinu

GRAVY SCORE – Grand average hydrophathy
(součet „hydrofobicity“ (-4.5 až 4.5) jednotlivých aminokyselin dělený počtem aminokyselin)

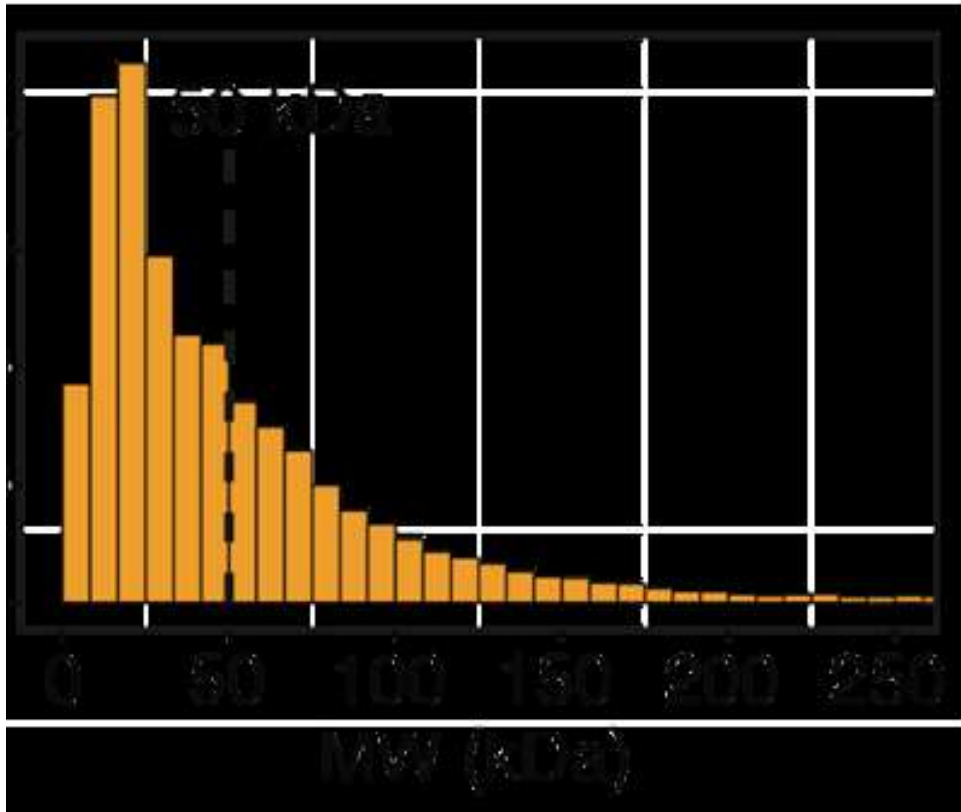
Spíš rozpustné



Spíš transmembránové

Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) J.Mol.Biol. 157, 105-132

Velikost proteinu (MW)



Titin
34 000 AA
Cca 3,8 MDa

Vypočteno na základě AA sekvence, nezapočítány PTM

- Proteomika, protein, proteom, proteoforma
- Počet analytů a jejich koncentrace
- Důležité vlastnosti proteinů a AMK
- **Práce s bílkovinami**
 - Dezintegrace tkání a buněk, detergenty
 - Rozpustnost, srážení, denaturace, koncentrace
 - Značení bílkovin

METODY PRÁCE S PROTEINY

- dezintegrace, lýza, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- separace proteinů

Dezintegrace buňky, homogenizace tkáně

FYZIKÁLNÍ

- Mechanické homogenizátory
- Mlýny a tlaková zařízení
- Glass beads
- Sonikace
- Hypotonie
- Zamražení



Frakcionace
buněčných organel

FYZIKÁLNE-CHEMICKÉ, CHEMICKÉ

- Detergenty
- Organická rozpouštědla
- Enzymatická příprava protoplastů (lysozym, zymoláza, celuláza)

Dounce homogenizer



Potter-Elvehjem homogenizer



Ultrazvukový
homogenizátor



Bead beater

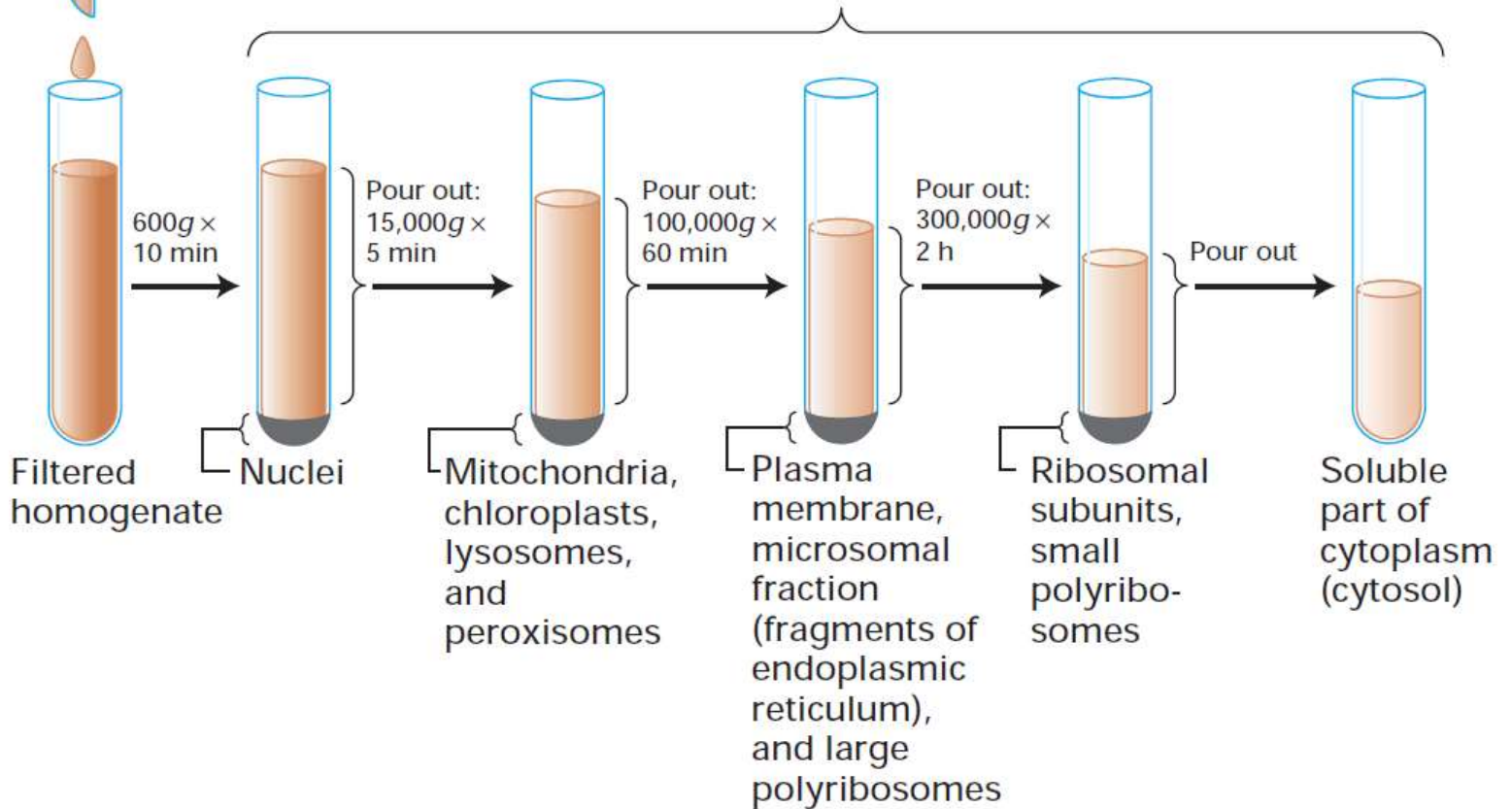
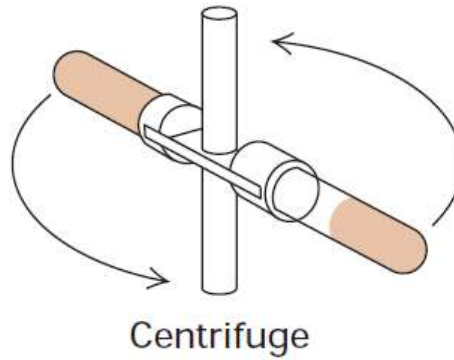
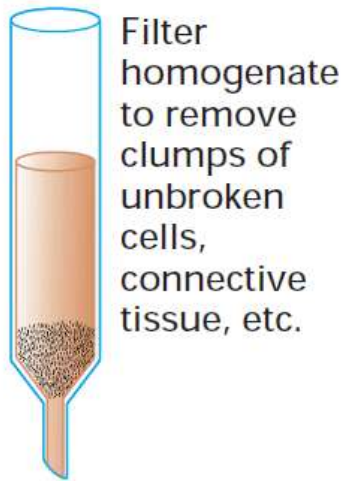


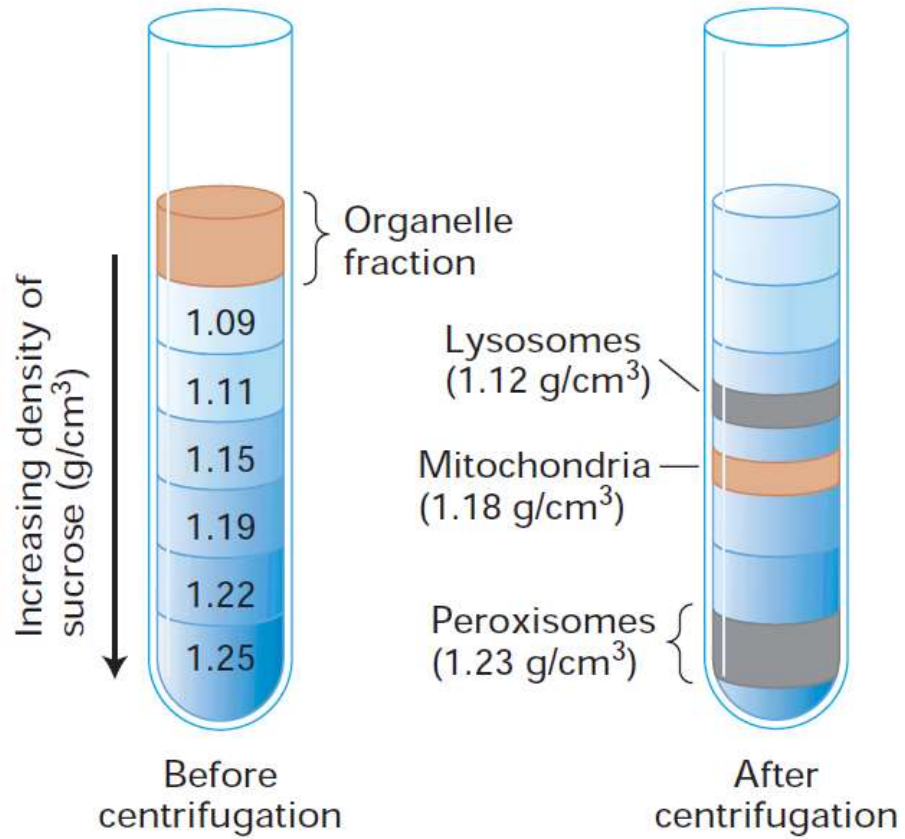
Střížný
homogenizátor



Třecí miska







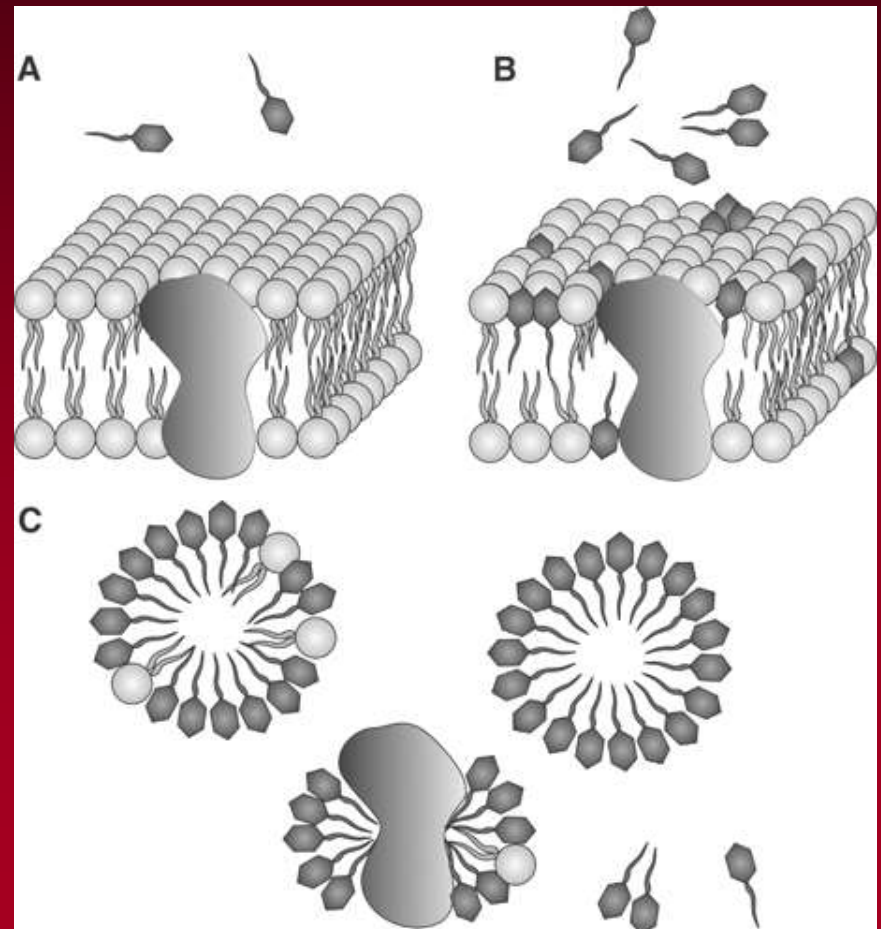
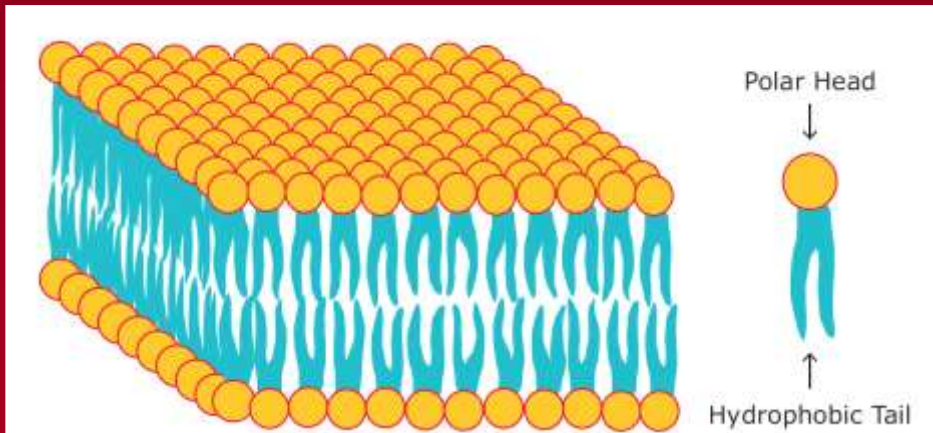
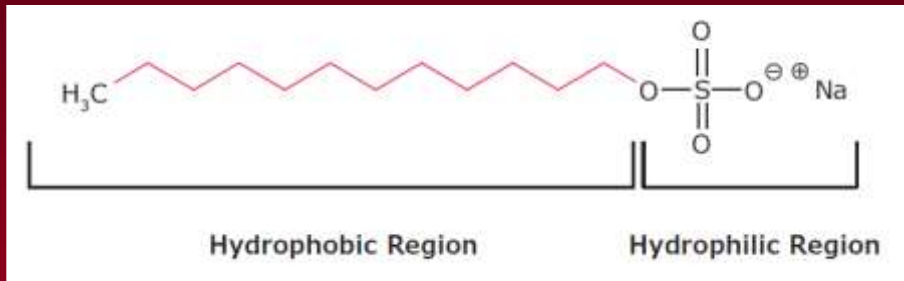
METODY PRÁCE S PROTEINY

- dezintegrace, lýza, frakcionace
- **detergenty a jejich vlastnosti**
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- separace proteinů

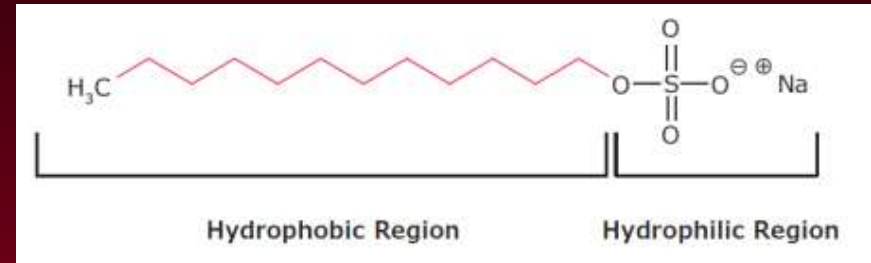
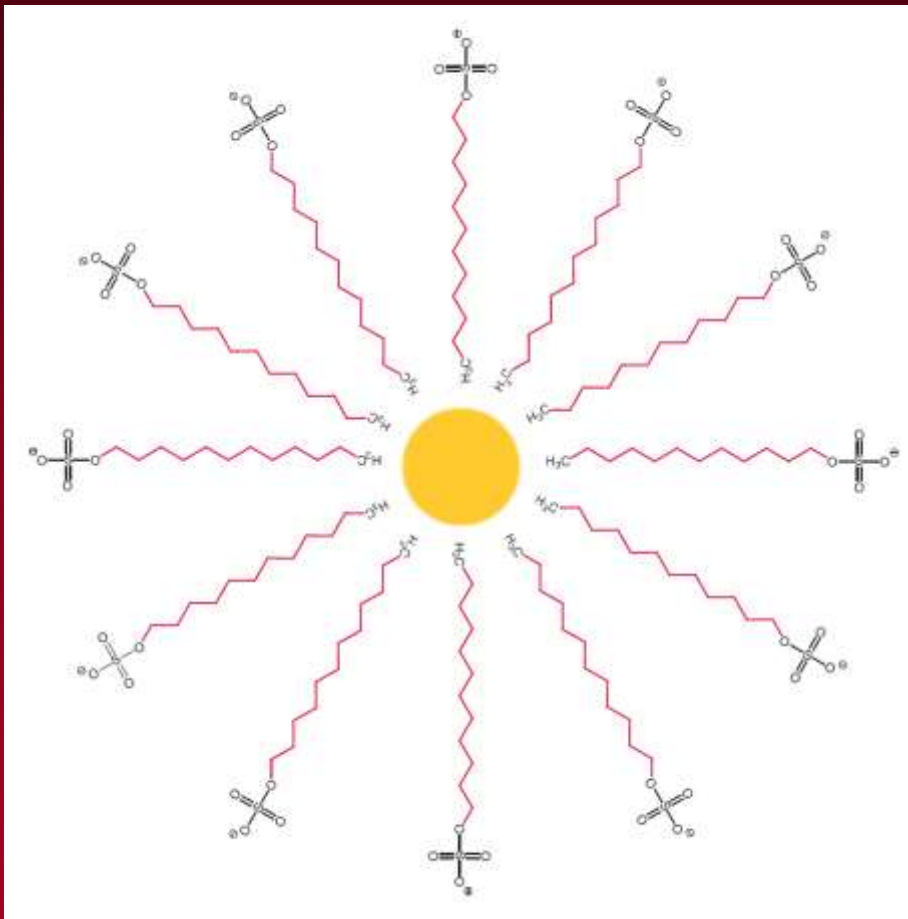
Detergenty

- amfifilní molekuly vytvářející ve vodě micely
- interagují s hydrofobní částí proteinů i s vodou
- **dezintegrují membrány a solubilizují proteiny**

SDS

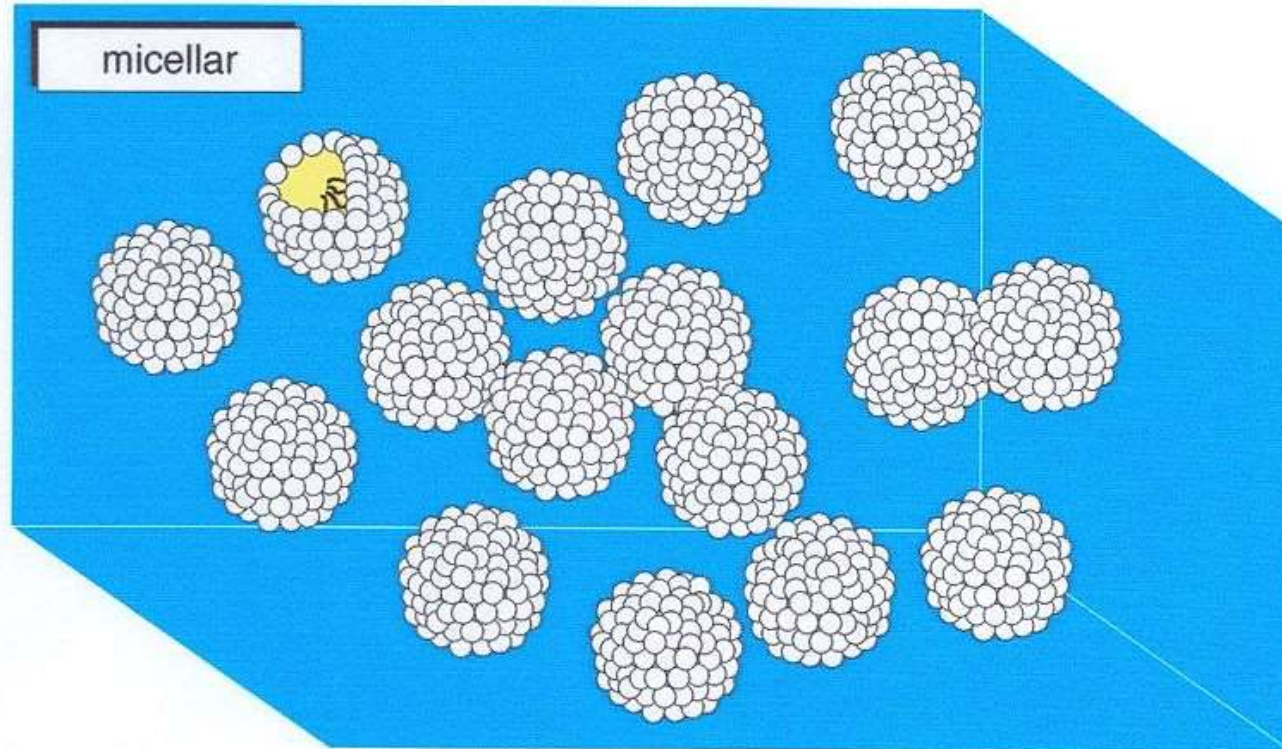


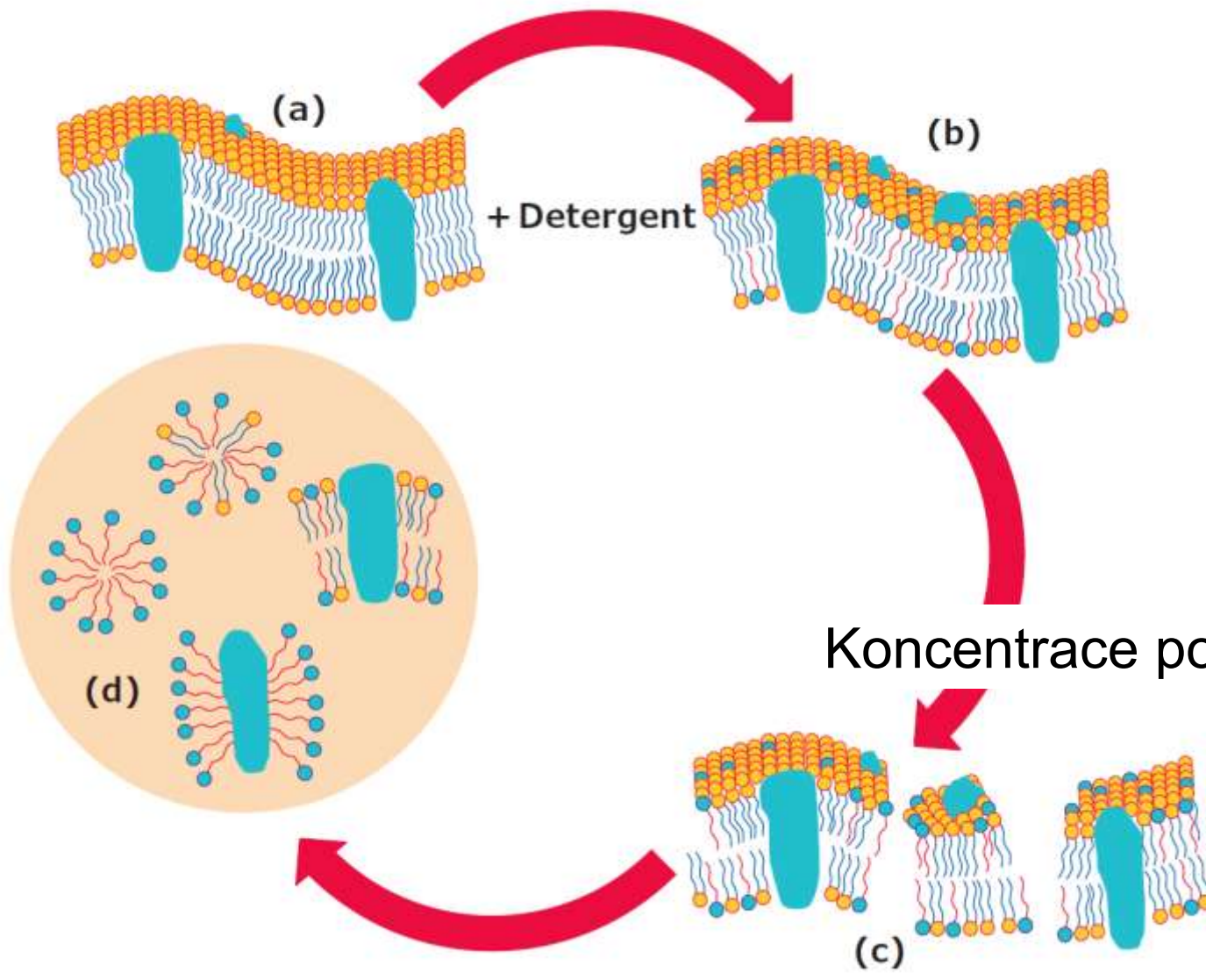
CMC (kritická micelární koncentrace) –koncentrace volného detregentu při jejímž překročení se vytvářejí micely definované velikosti (62 molekul pro SDS, 18 kDa)



CMC (kritická micelární koncentrace) –koncentrace volného detregentu při jejímž překročení se vytvářejí micely definované velikosti (62 molekul pro SDS, 18 k)

Roste s T a klesá s I.





Koncentrace nad CMC

Koncentrace pod CMC

Properties of common detergents.

Agg.# = Aggregation number, which is the number of molecules per micelle.

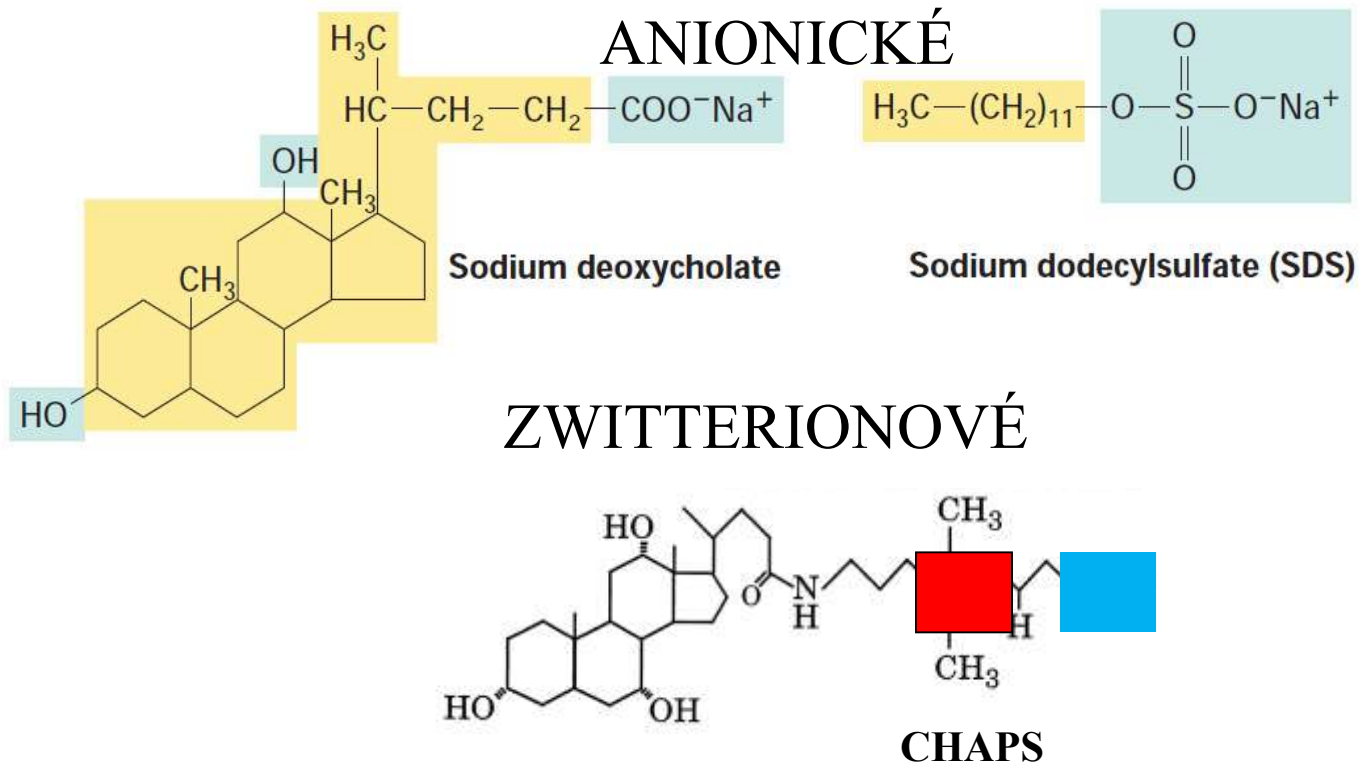
CMC – Critical Micellar Concentration

Detergent	Type	Agg.#	MW mono (micelle)	CMC mM (%w/v)	Cloud Point °C	Dialyzable
Triton X-100	Nonionic	140	647 (90K)	0.24 (0.0155)	64	No
Triton X-114	Nonionic	–	537 (–)	0.21 (0.0113)	23	No
NP-40	Nonionic	149	617 (90K)	0.29 (0.0179)	80	No
Brij-35	Nonionic	40	1225 (49K)	0.09 (0.0110)	>100	No
Brij-58	Nonionic	70	1120 (82K)	0.08 (0.0086)	>100	No
Tween 20	Nonionic	–	1228 (–)	0.06 (0.0074)	95	No
Tween 80	Nonionic	60	1310 (76K)	0.01 (0.0016)	–	No
Octyl glucoside	Nonionic	27	292 (8K)	23-24 (~0.70)	>100	Yes
Octyl thioglucoside	Nonionic	–	308 (–)	9 (0.2772)	>100	Yes
SDS	Anionic	62	288 (18K)	6-8 (0.17-0.23)	>100	No
CHAPS	Zwitterionic	10	615 (6K)	8-10 (0.5-0.6)	>100	Yes
CHAPSO	Zwitterionic	11	631 (7K)	8-10 (~0.505)	90	Yes

Detergenty

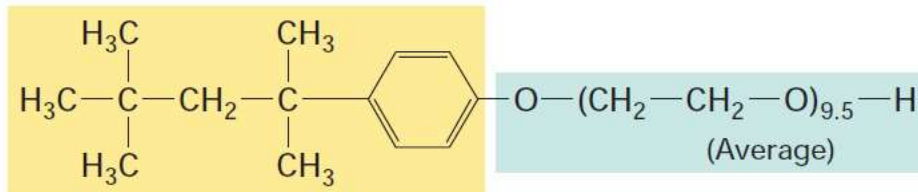
- **Ionogenní** (SDS, CHAPS, deoxycholate...)

Silnější, většinou denaturující

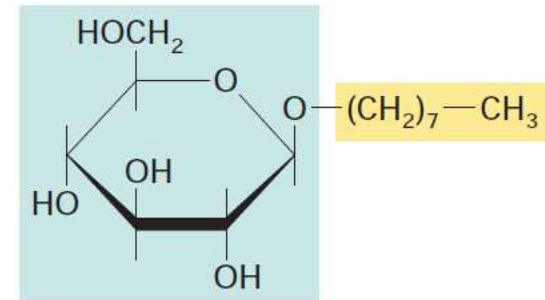


Detergency

Neionogenní



Triton X-100
(polyoxyethylene(9.5)*p*-*t*-octylphenol)



Octylglucoside
(octyl-β-D-glucopyranoside)

Triton X-100
Triton X-114
Tween 20
Tween 40
Nonidet
Digitonin

METODY PRÁCE S PROTEINY

- dezintegrace, lýza, frakcionace
- detergenty a jejich vlastnosti
- **srážení, precipitace, denaturace**
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- separace proteinů

Precipitace bílkovin

Snížení solvatačního potenciálu rozpouštědla vedoucí k tvorbě precipitátu

Rozpustnost proteinu je výsledkem:

- polárních interakcí s vodným rozpouštědlem
- iontových interakcí s přítomnými solemi
- odpuzivých elektrostatických sil mezi shodně nabitými molekulami

Rozpustnost proteinu závisí na:

- struktury proteinu
- pH, I a typu soli, T
- struktury vody v solvatačním obalu

Precipitace je **POTENCIÁLNĚ** spojena s **DENATURACÍ!**

Precipitace v praxi :

- Nízkou iontovou silou
- **Vysolováním (salting-out)**
- **Organickými rozpouštědly**



Franz Hofmeister

VERLEHRENDEN DOCTOR CHIMIE DR. FRANZ HOFMEISTER (1817-1887)
SEINER BEWEGUNG ZU AMMONIUMSALZEN UND VERBUNDENEN MIT BEWISSEN
WASCHEN SEINER VIELFACHEN NACHFOLGER BEWISSENDE (1845-1850)



IN DIESEN SELTENEN FORSCHEN DER BERÜHMTE CHEMIKER
HAT SEINER ELEMENTEN (1850-1855), WELCHE DIE BEZIEHUNGEN
DER AMMONIUMSALZEN IN EINER VORHERSAGEN UND ICH DIE ENTSCHEIDENDE
BEZIEHUNGEN, SEINE DER ICHEN VORBEREITET.



SALTING-OUT – VYSOLOVÁNÍ

Lyotropní vlastnosti aminokyselin

Jednotlivé soli se liší schopností precipitovat/denaturovat proteiny

HOFMEISTER SERIES

Cations

NH_4^+ K^+ Na^+ Li^+ Mg^{2+} Ca^{2+} guanidinium⁺



SO_4^{2-} HPO_4^{2-} acetate⁻ citrate⁻ Cl^- NO_3^- ClO_3^- F^- ClO_4^- SCN^-

Anions

↑ Precipitace

↓ Denaturace

↑ Stabilita proteinu



↓ Precipitace

↑ Denaturace

↓ Stabilita proteinu



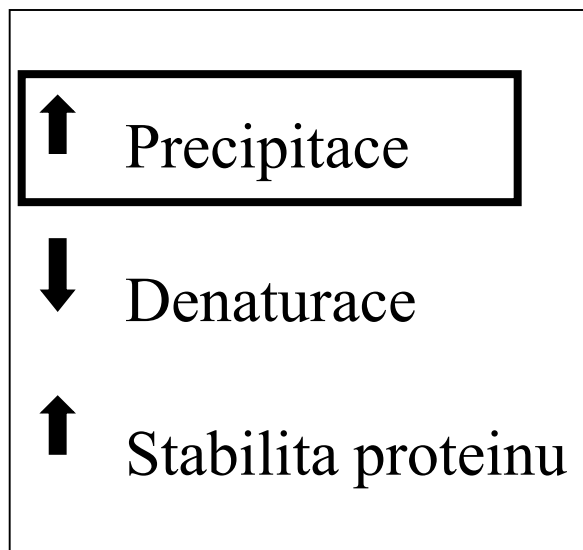
Franz
Hofmeister

(1850-1922).

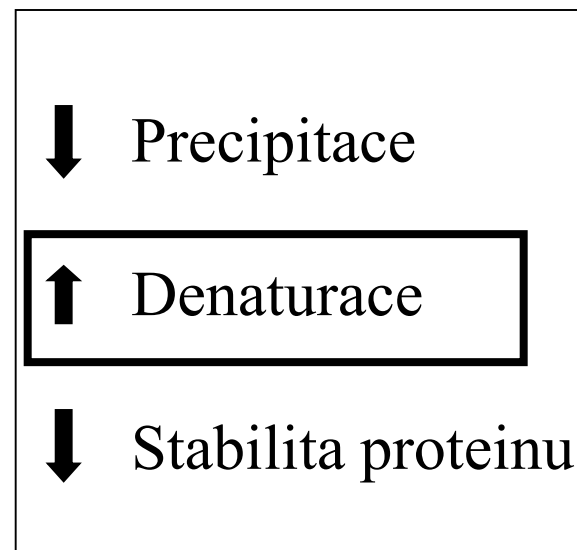
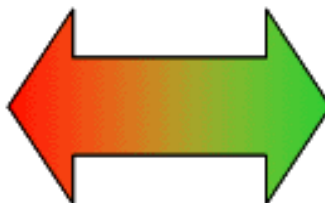
HOFMEISTER SERIES

Cations									
NH_4^+	K^+	Na^+	Li^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	$[\text{CH}_6\text{N}_3]^+$	guanidinium ⁺		

SO_4^{2-}	HPO_4^{2-}	acetate ⁻	citrate ⁻	Cl^-	NO_3^-	ClO_3^-	I^-	ClO_4^-	SCN^-
--------------------	---------------------	----------------------	----------------------	---------------	-----------------	------------------	--------------	------------------	----------------



Anions



Precipitace síranem amonným

Denaturace guanidinium thiokyanátem

PRECIPITACE ORGANICKÝMI ROZPOUŠTĚDLY



Vytěsnění vody ze solvatačního obalu— převáží elektrostatické a van der Waalsovy síly (přitahují se opačně nabitě úseky což způsobí precipitaci)

- Etanol
- Aceton (méně denaturující, více volatilní)

Mělo a by být provozováno v teplotách pod bodem mrazu (prevence denaturace – malá konformační flexibilita, solvent se nedostane dovnitř molekuly)

- Precipitace 10 % kyselinou trichloroctovou (TCA)

Denaturace

Dezintegrace sekundární a terciální struktury narušením S-S, vodíkových a jiných slabých interakcí – ztráta funkce proteinu

- výsledkem je fyzická agregace, „zamotají“ se do sebe
- pokud je I nízká, a pH daleko od pI, protein nemusí precipitovat (odpudivé síly nabitých skupin)
 - **teplotní** (zvýšení pohyblivosti molekul naruší vodíkové můstky)
 - **pH** (změna náboje, vnitřní odpuzování, ztráta solventu)
 - **organickým rozpouštědlem** (vyvázání hydrofobních úseků rozpouštědlem, při nízkých teplotách neproniká organika dovnitř molekul a nedenaturuje je) agregace je způsobena interakcí opačně nabitých úseků na površích
 - **detergenty**

METODY PRÁCE S PROTEINY

- dezintegrace, lýza, frakcionace
- detergenty a jejich vlastnosti
- srážení, precipitace, denaturace
- **koncentrace, filtrace**
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- separace proteinů

Zahušťování roztoku bílkovin

- precipitací
- odpařením solventu
- dialýzou proti nevodnému solventu (polyvinylpyrolidon)
- přidáním suché matrice přijímající vodu (Sephadex)
- (centrifugační) ultrafiltrací na molekulárních filtrech



Filtry s definovaným
filtračním rozsahem pro různé
MW a pro různá rozpouštědla

100 000

30 000

10 000

5 000

3 000

METODY PRÁCE S PROTEINY

- dezintegrace, lýza, frakcionace
- detergenty a jejich vlastnosti
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- **stanovení koncentrace**
- značení a imobilizace bílkovin
- separace proteinů

Stanovení celkové koncentrace proteinu ve vzorku

- UV spektrofotometrie 280 nm (Trp, Tyr)
- UV spektrofotometrie 190-205 nm (peptidická vazba)
- Redukce Cu^{2+} na Cu^{1+} ionty – Biuret, Lowry, **BCA** (kys. bicinchonová)



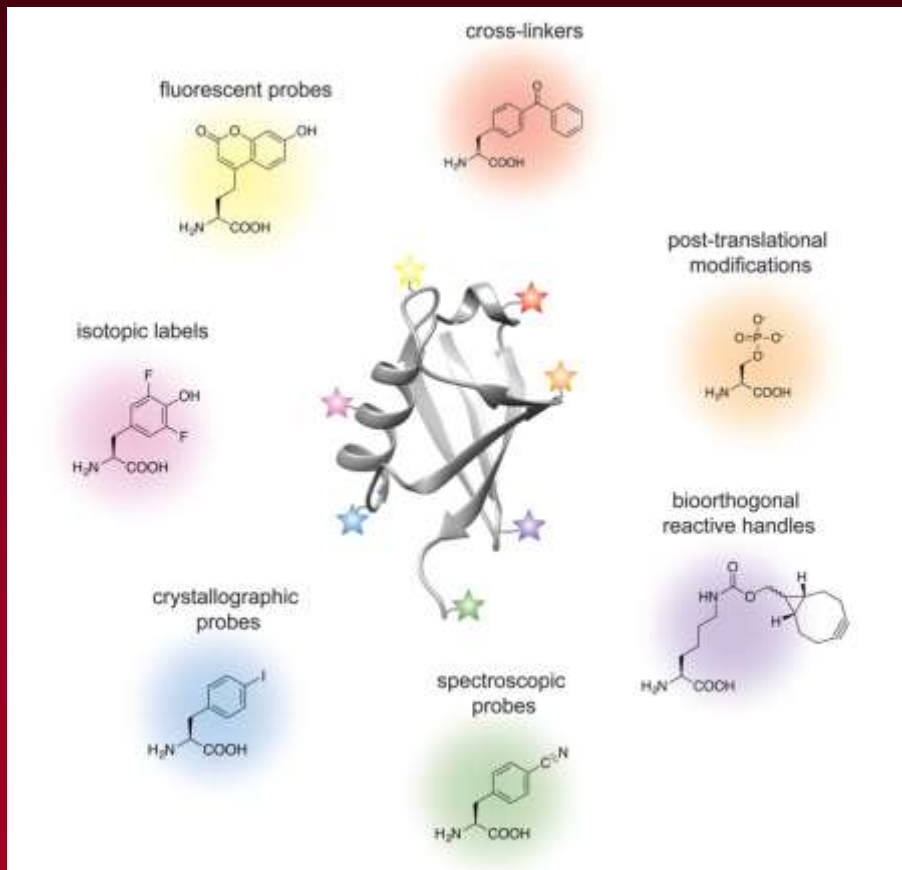
- Komplexy AA s pigmenty (CBB G250)
– dle Bradforda



METODY PRÁCE S PROTEINY

- dezintegrace, lýza, frakcionace
- detergenty a jejich vlastnosti
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- **značení a imobilizace bílkovin**
- separace proteinů

ZNAČENÍ A ZAKOTVOVÁNÍ PROTEINŮ



Reaktivní skupiny bílkovin

sulfhydryl (–SH)

primární amin (–NH₂)

karboxyl (–COOH)

karbonyl sacharidu (–CHO)