

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.

# Proteomika 2024

# PROTEOMIKA

## 2024

- **Proteomika, Metody práce s bílkovinami** (Petrák 7/10)
- **Separační metody, digesce a principy ID bílkovin pomocí MS** (Petrák 14/10)
- **Principy hmotnostní spektrometrie, instrumentace** (Man 4/11 )
- **Hmotnostní spektrometrie v proteomice, analýza PTM** (Man 11/11)
- **ID proteinů, DDA, DIA, databáze, FDR** (Talacko 18/11)
- **Kvantifikace, isotopy, LFQ, cílená proteomika** (Harant 25/11)
- **Design experimentu, zpracování dat, bioinformatika...**(Harant 2/12)
- **Proteomika membránových proteinů, proteinové komplexy** (Petrák 9/12)
- **Klinická proteomika, speciální metody** (Petrák 16/12)

# PROTEOMIKA 2024

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 kvantitativnímu a kvalitativnímu popisu proteomů

### **Expresní/diferenční proteomika**

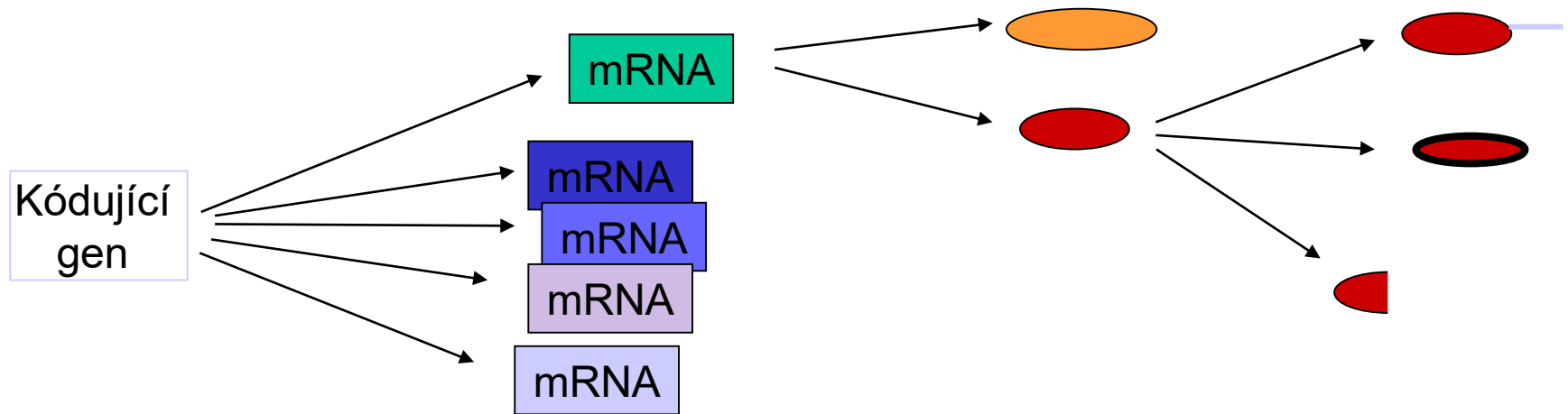
usiluje o (semi) kvantitativní porovnávání proteomů, tj. o identifikaci bílkovin, které jsou odlišně exprimovány (zastoupeny) mezi dvěma nebo více vzorky.

## **Základní úvahy:**

- 1) Počet analytů**
- 2) Koncentrace jednotlivých analytů, dynamický rozsah koncentrací**
- 3) Fyzikálně-chemické vlastnosti, rozpustnost, stabilita, MW....**

# Komplexita proteomu – Kolik je proteinů?

~20 000 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

$\alpha$  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?

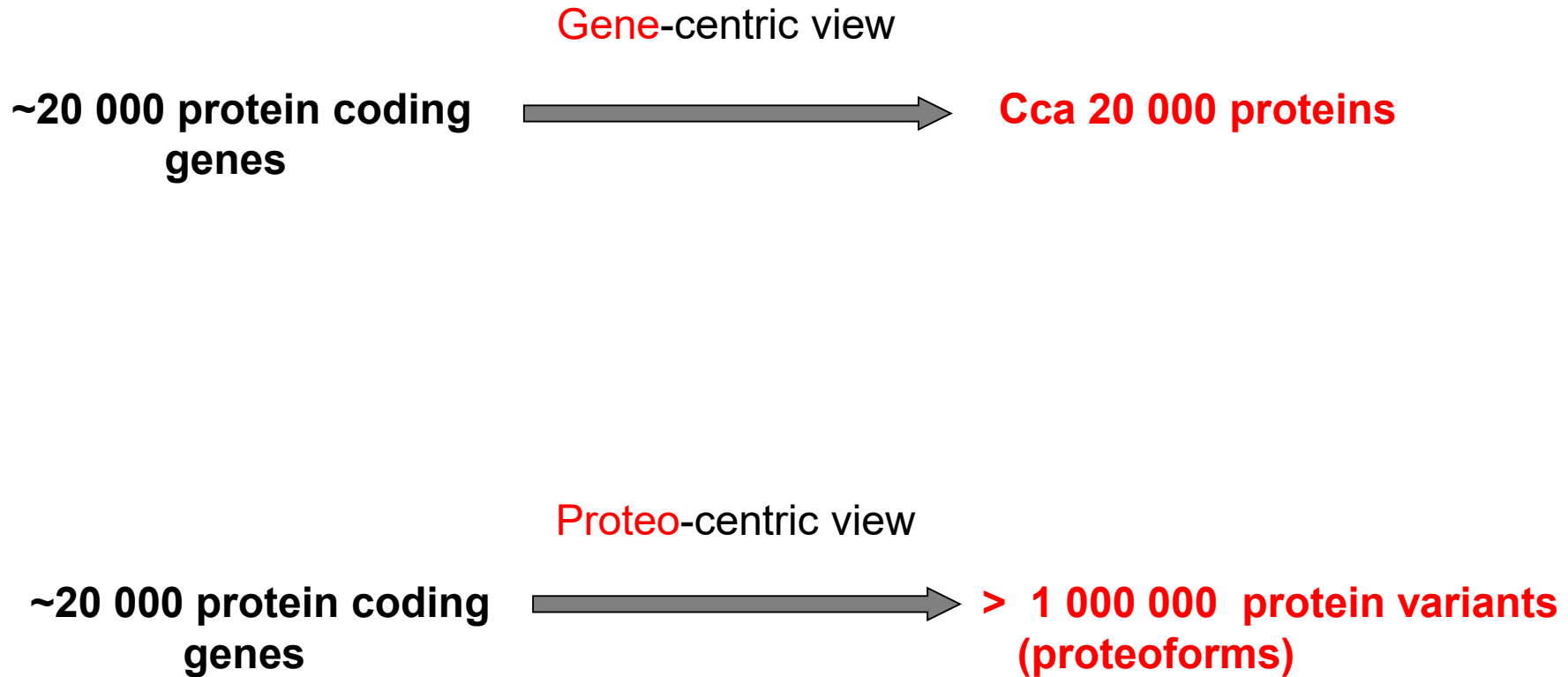
Je **protein** definován kódujícím genem?

Strukturou?

Funkcí?

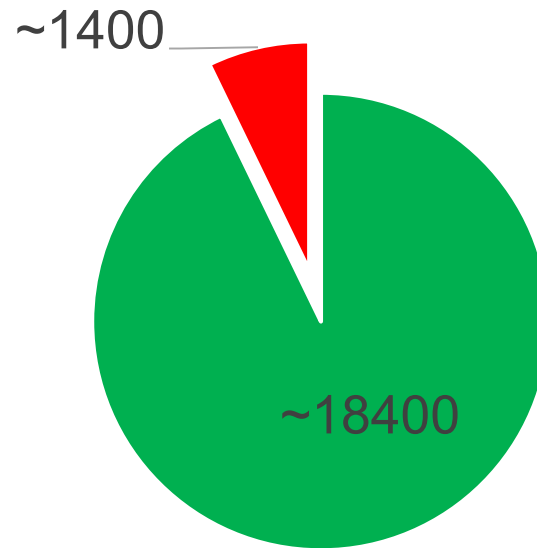


# The human proteome – how many proteins do we have?



# HUPO PROJECT - STATUS 2023

**~19 800 protein-coding genes**



■ Evidence on protein level (93%)

■ „The missing proteins“ (7%)

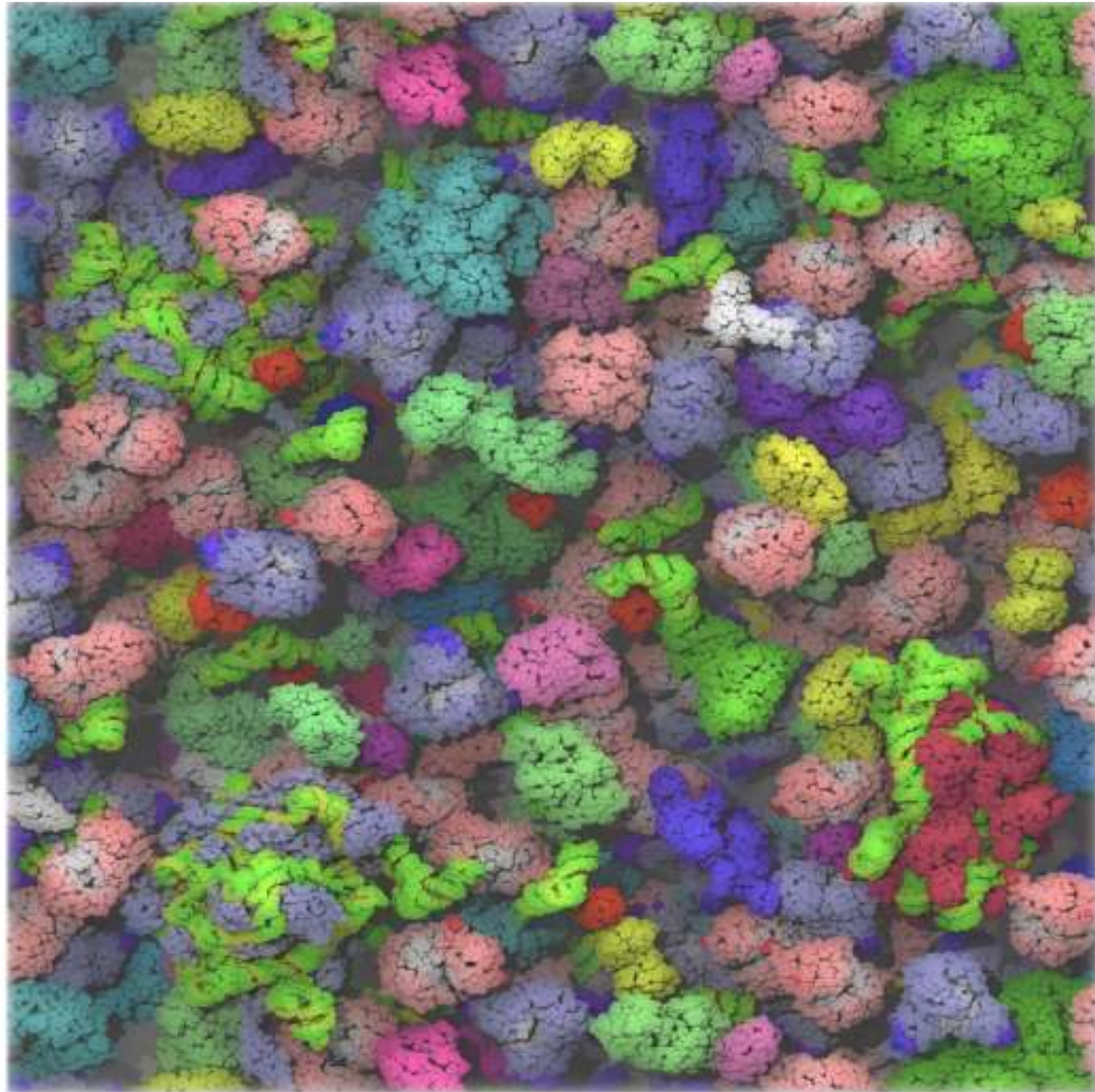
## **Základní úvahy:**

1) **Počet analytů**

2) **Koncentrace jednotlivých analytů, dynamický rozsah koncentrací**

3) **Fyzikálně-chemické vlastnosti, rozpustnost, stabilita, MW....**

It is crowded out there...

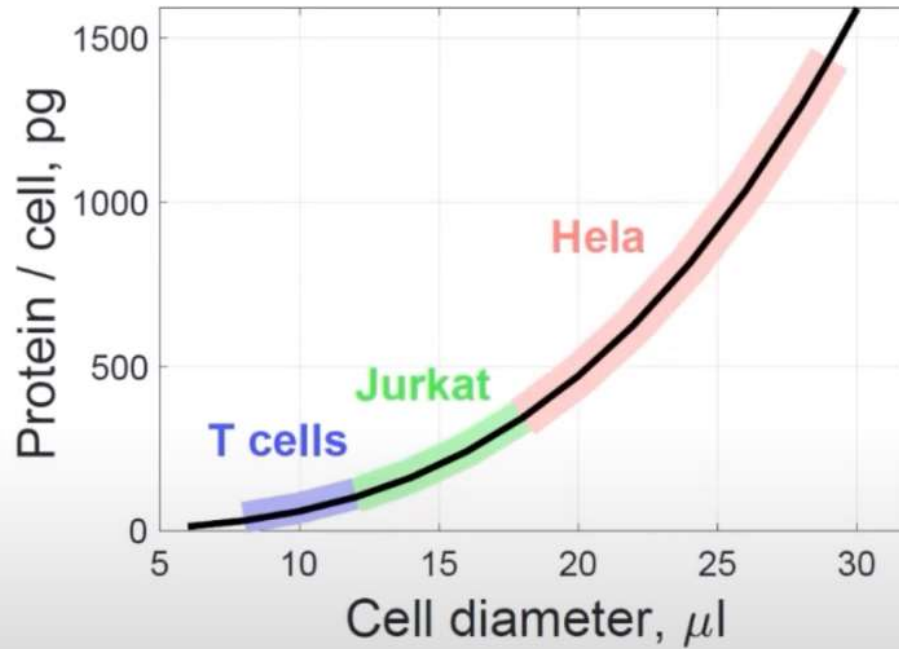


# Koncentrace proteinu v buňce

$3 \times 10^6$  molekul/ $\mu\text{m}^3$

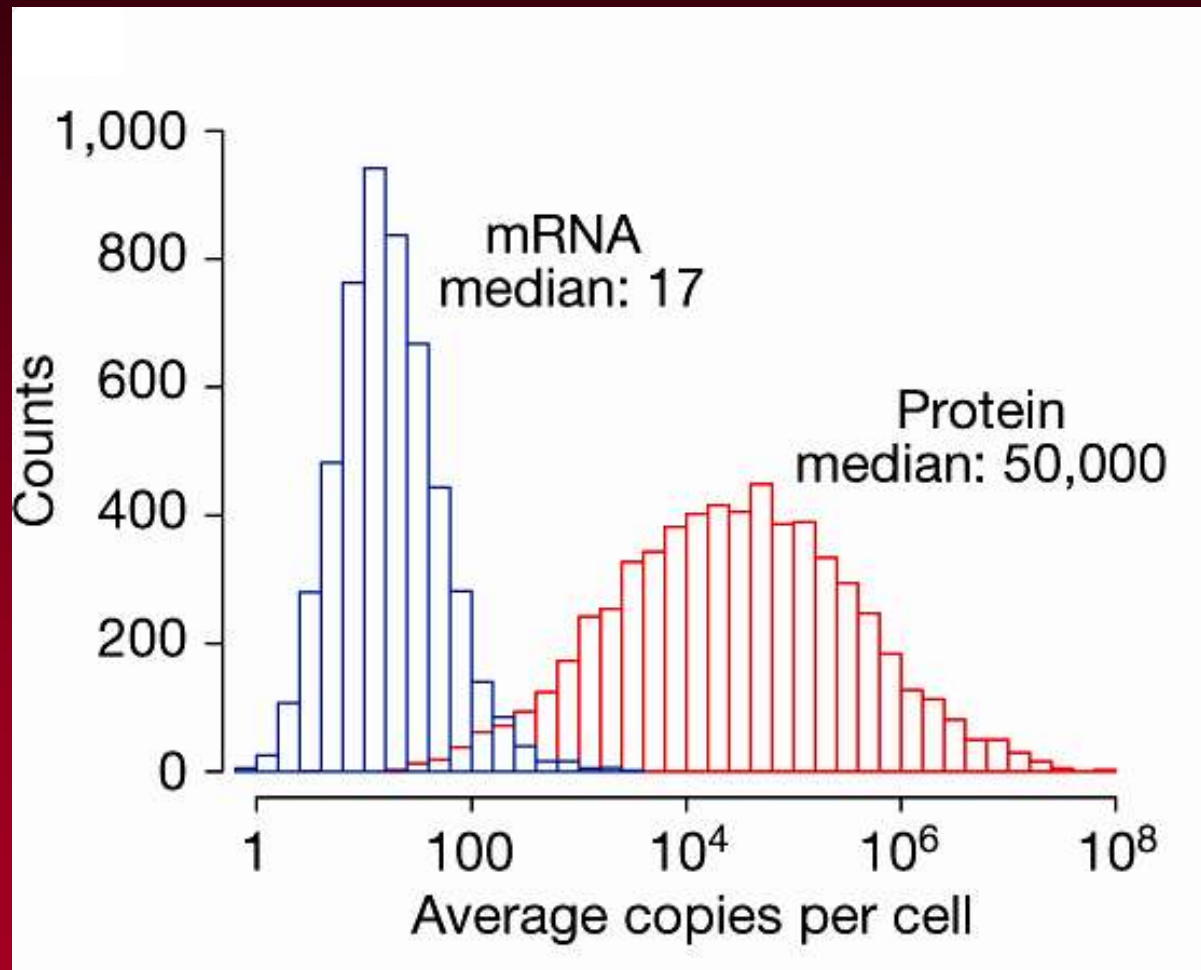
(cca 100-1200 pg/buňku)

Nižší miliardy proteinových molekul/buňku

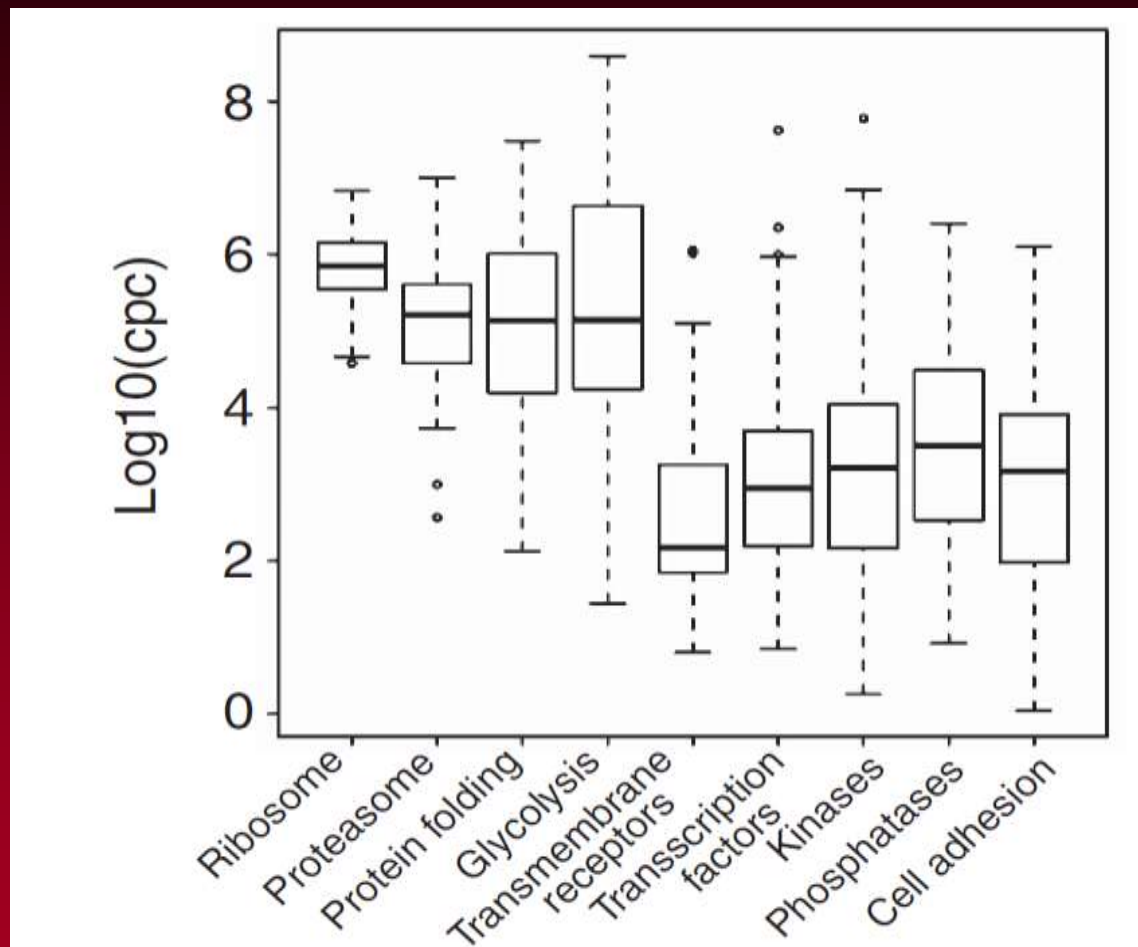


<sup>1</sup>Estimates based on R Milo, *Bioessays*, 2013

# Rozpětí koncentrace/počtu kopií jednotlivých proteinů na buňku ( $10$ - $10^8$ )



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



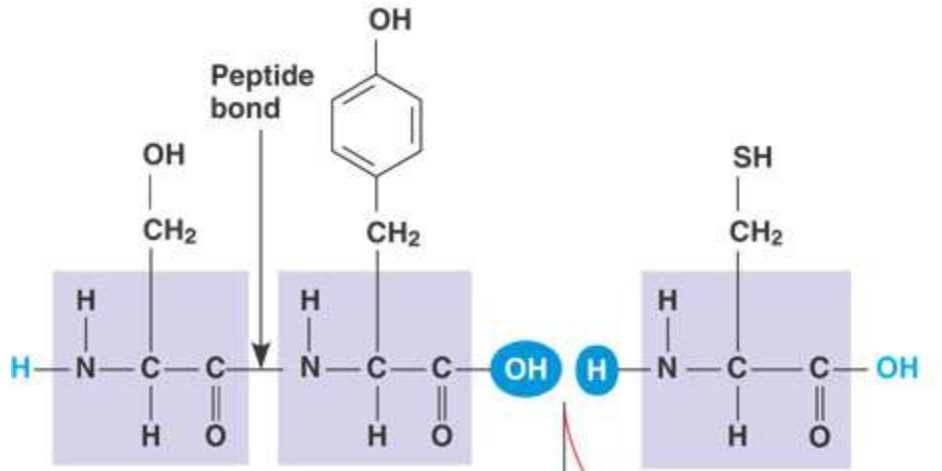
Desítky kopií až desítky milionů kopií na buňku

## **Základní úvahy:**

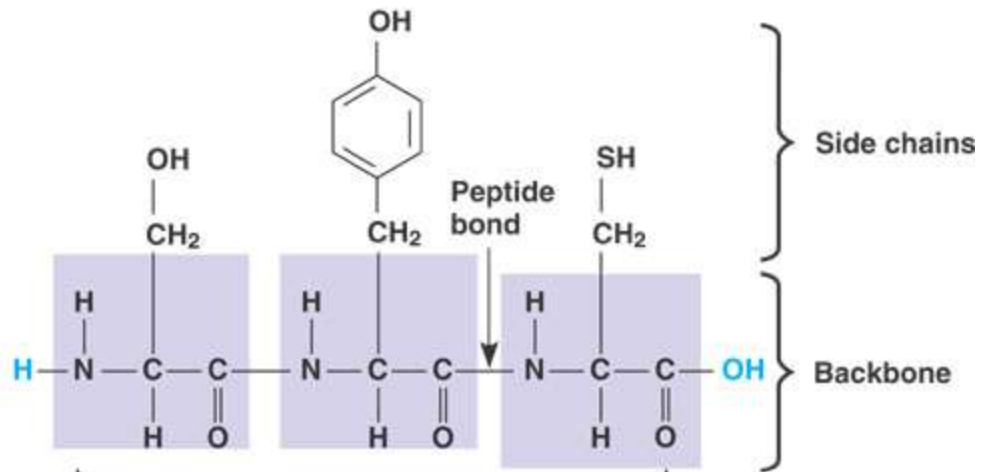
- 1) Počet analytů
- 2) Koncentrace jednotlivých analytů, dynamický rozsah koncentrací
- 3) **Fyzikálně-chemické vlastnosti, rozpustnost, stabilita, MW....**



- 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

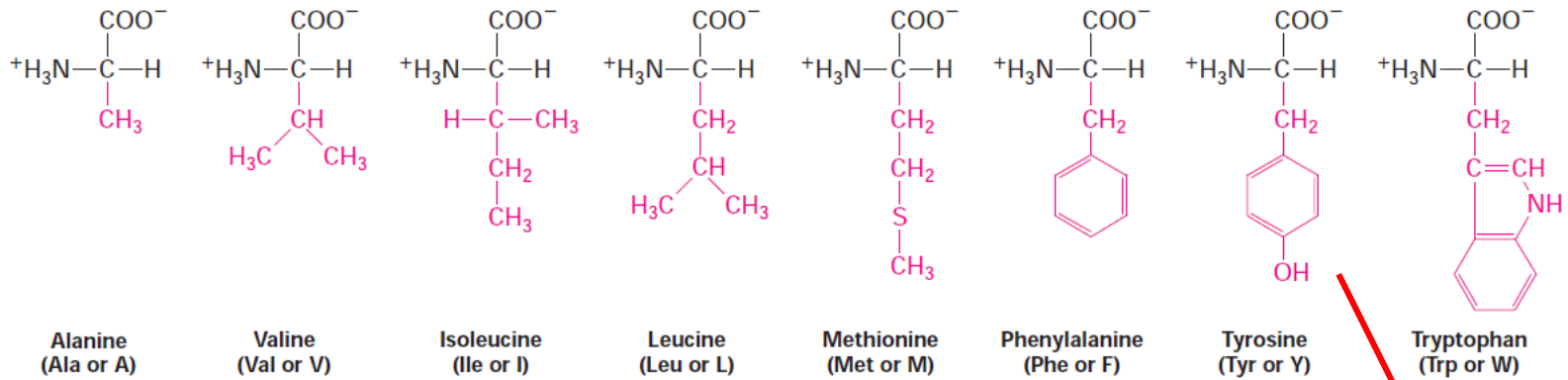


(a) Ser-Tyr Cys

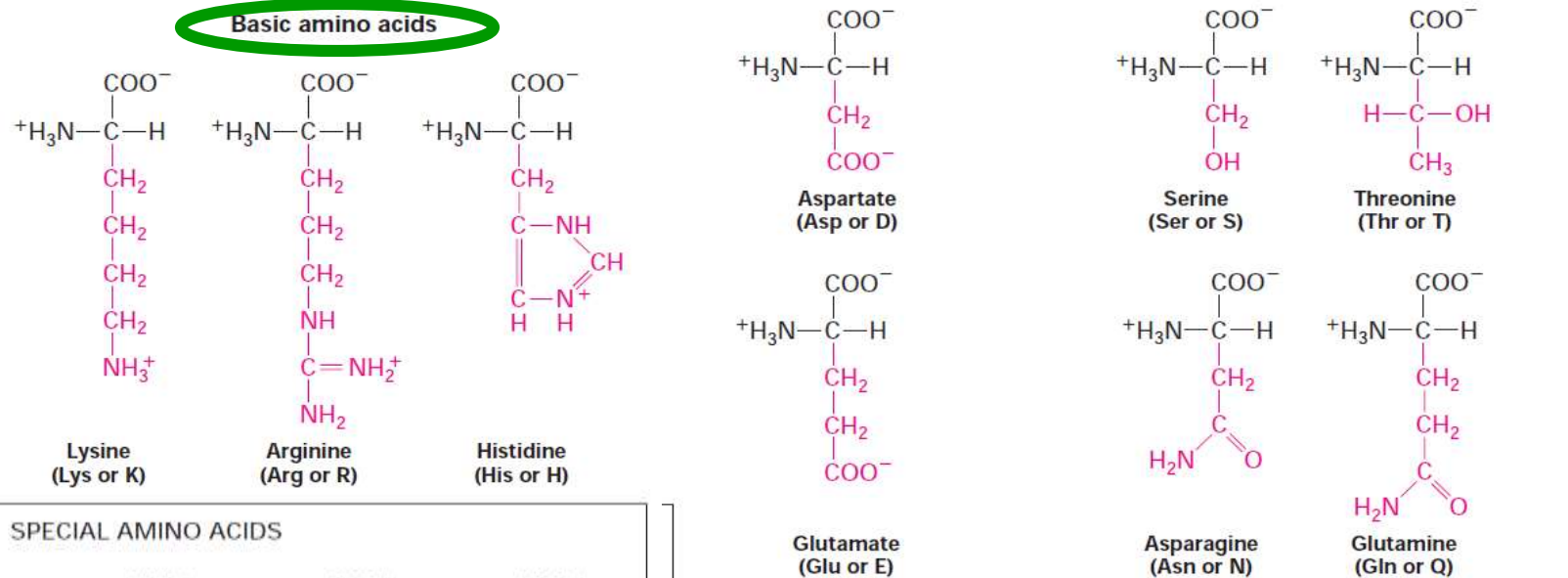


(b) Amino end (N-terminus) Carboxyl end (C-terminus)

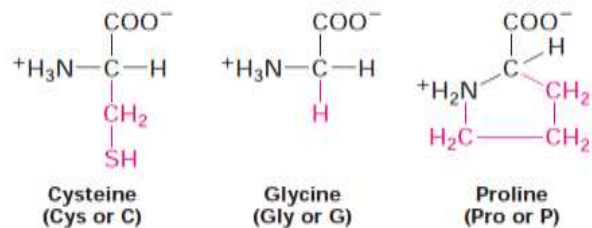
## HYDROPHOBIC AMINO ACIDS



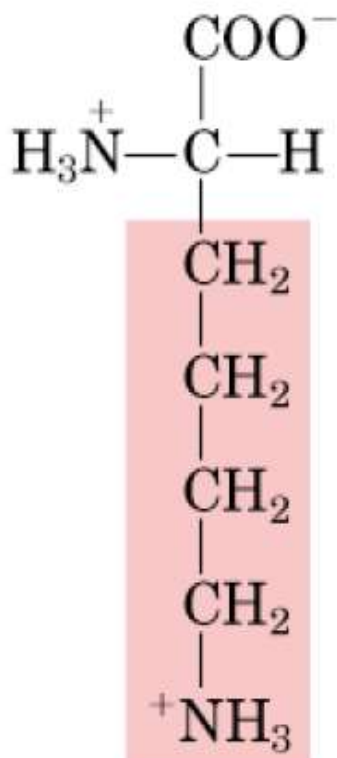
## HYDROPHILIC AMINO ACIDS



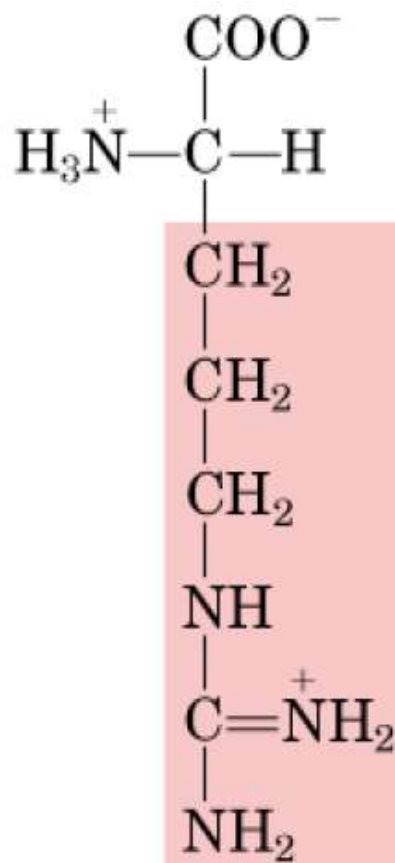
## SPECIAL AMINO ACIDS



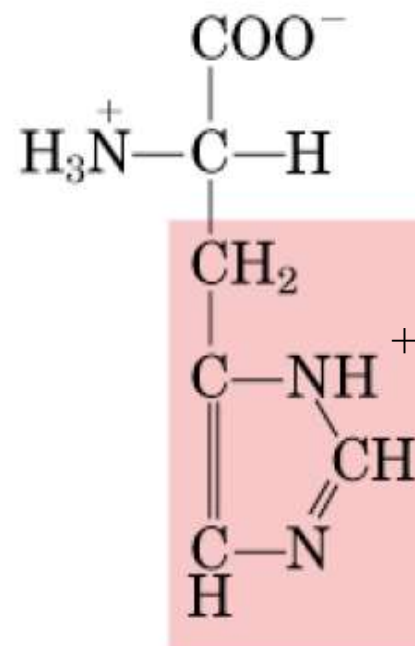
# KLADNĚ NABITÉ AMINOKYSELINY (pH 7)



Lysine



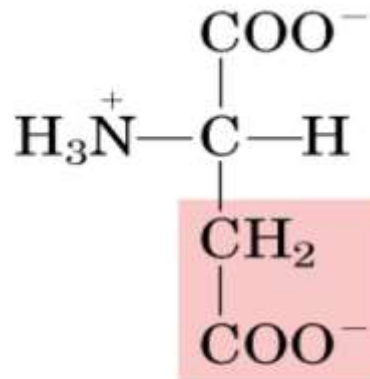
Arginine



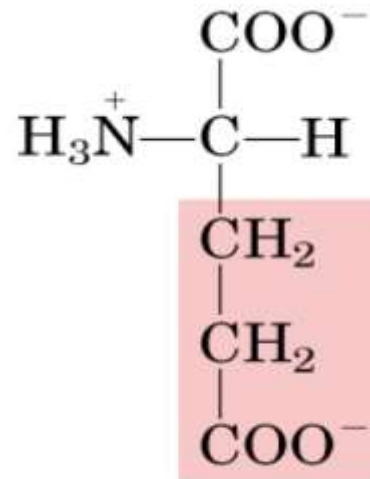
Histidine

## ZÁPORNĚ NABITÉ AMINOKYSELINY

pH 7

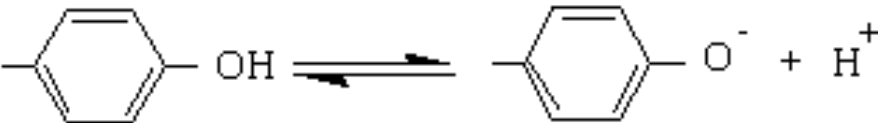
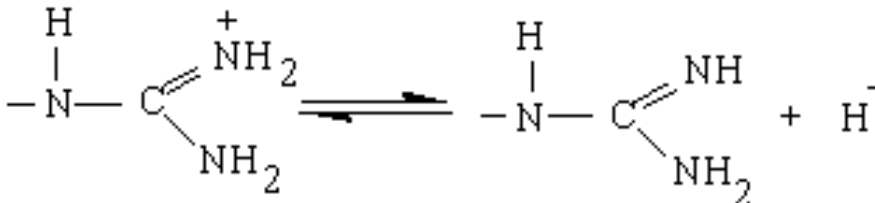


Aspartate



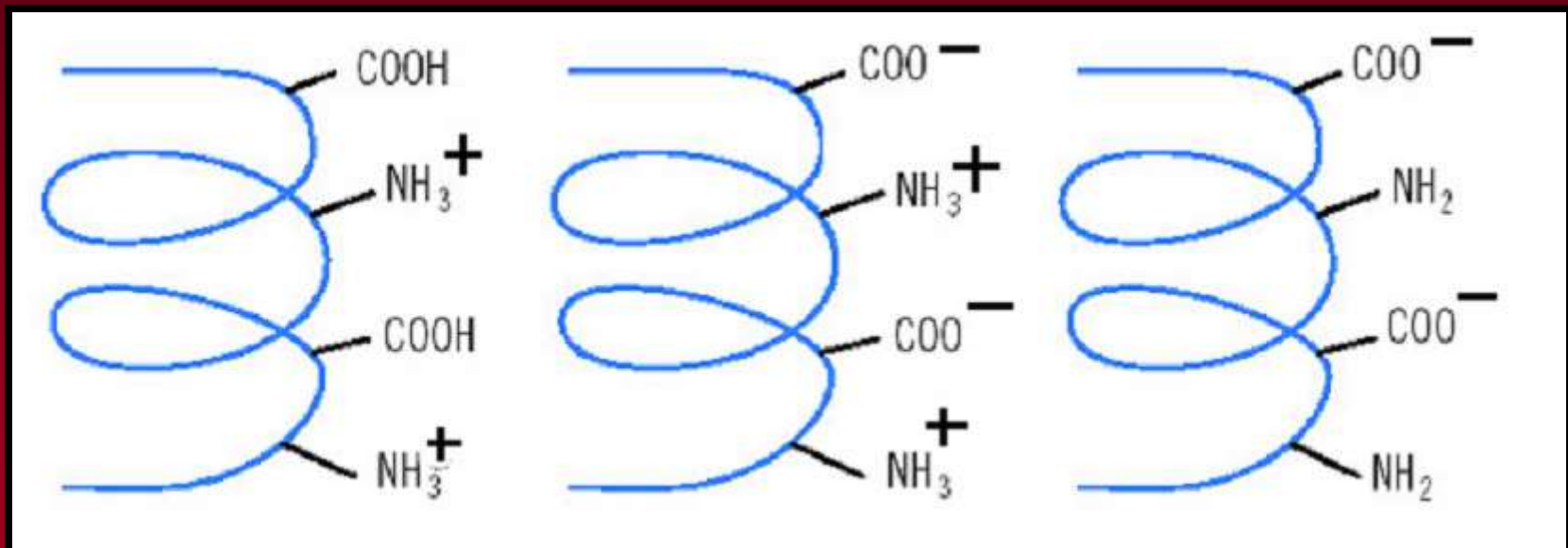
Glutamate

## 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.

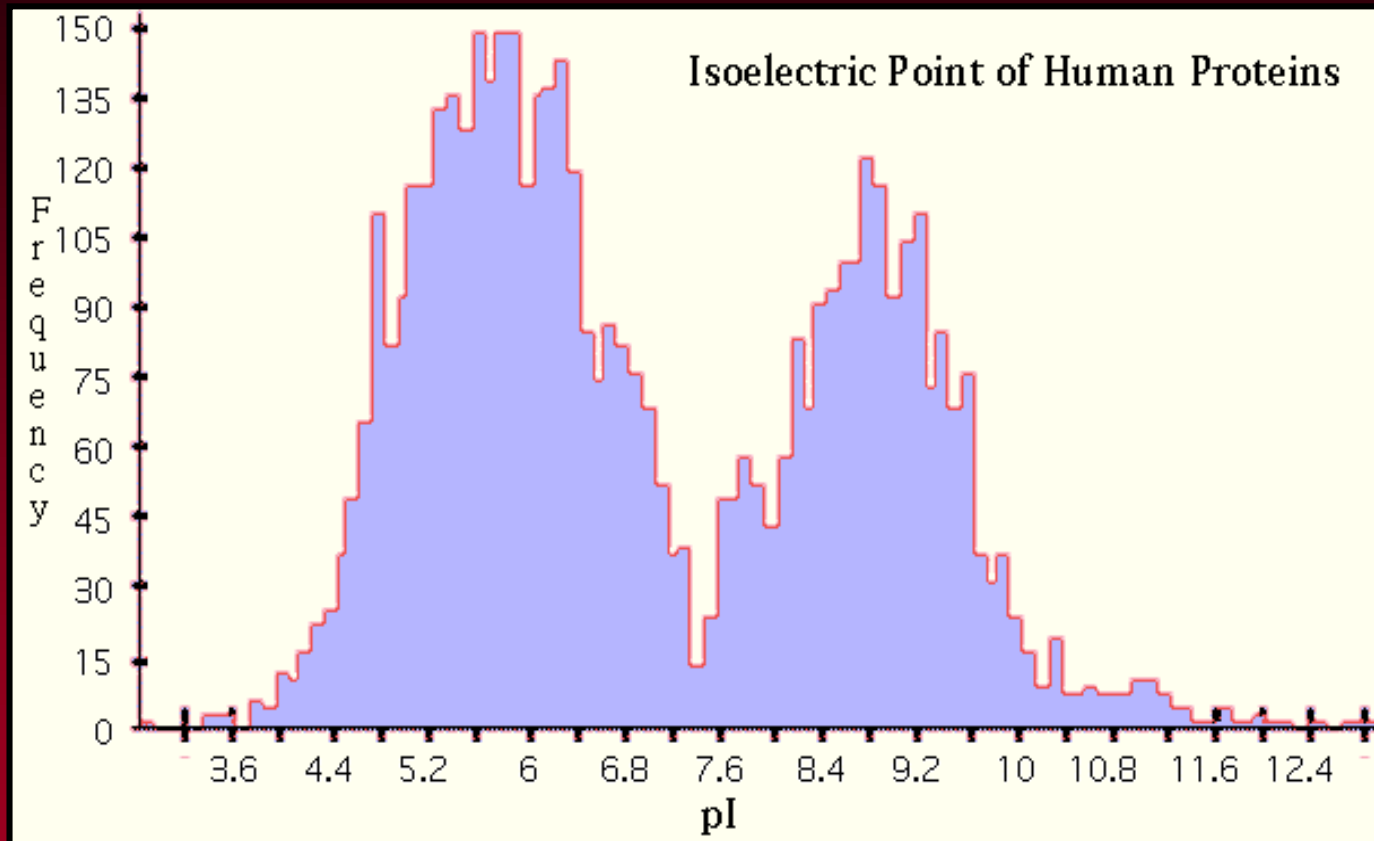


pH < pI

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

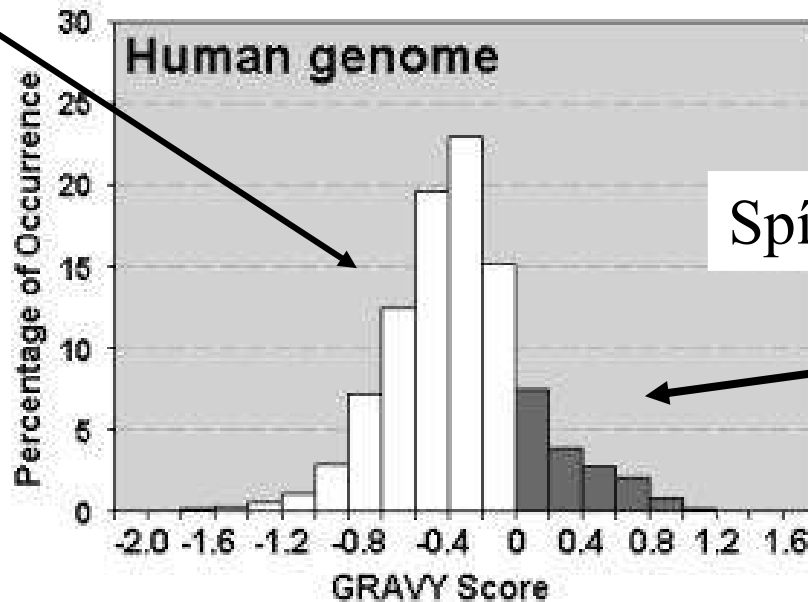
Amino Acid Name	One Letter Code	Hydropathy Score
Isoleucine	I	4.5
Valine	V	4.2
Leucine	L	3.8
Phenylalanine	F	2.8
Cysteine	C	2.5
Methionine	M	1.9
Alanine	A	1.8
Glycine	G	-0.4
Threonine	T	-0.7
Tryptophan	W	-0.9
Serine	S	-0.8
Tyrosine	Y	-1.3
Proline	P	-1.6
Histidine	H	-3.2
Glutamic acid	E	-3.5
Glutamine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

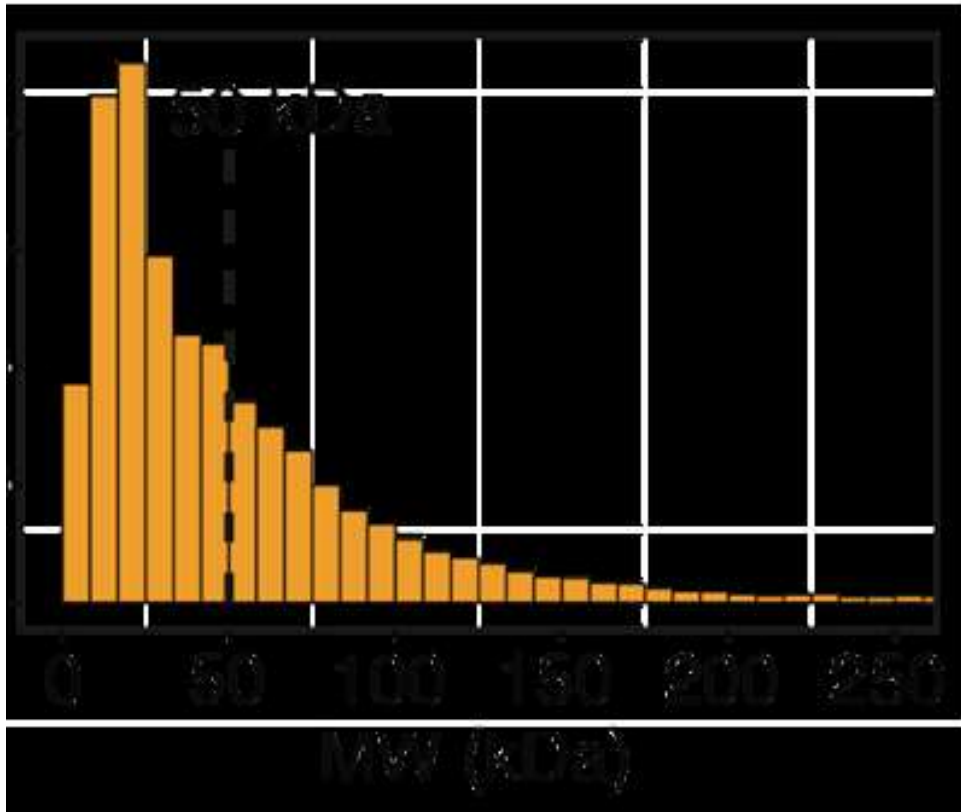
Spíš rozpustné



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



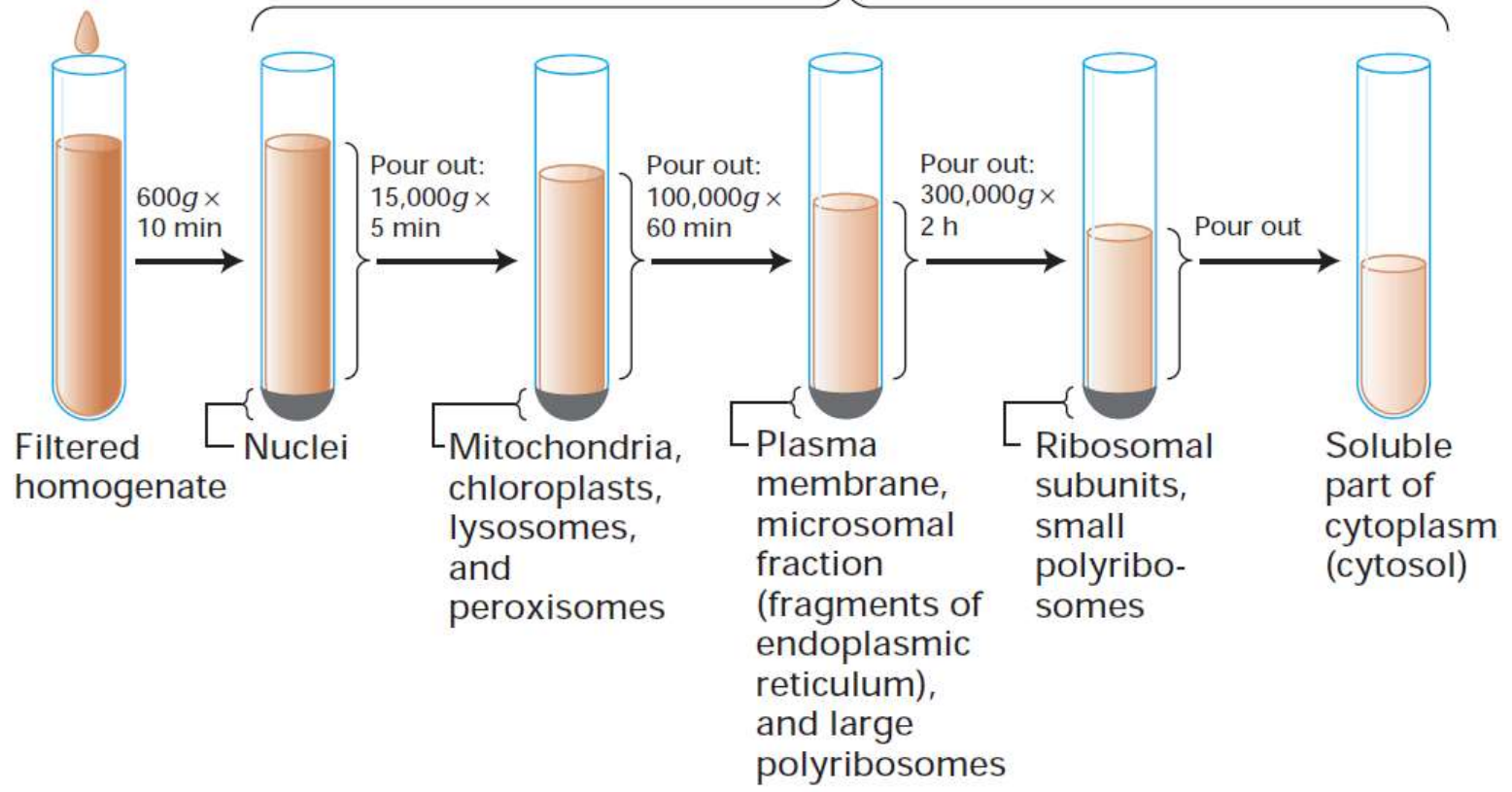
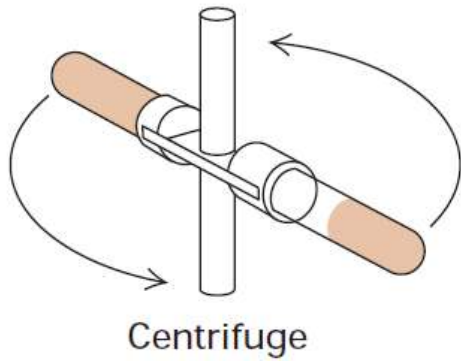
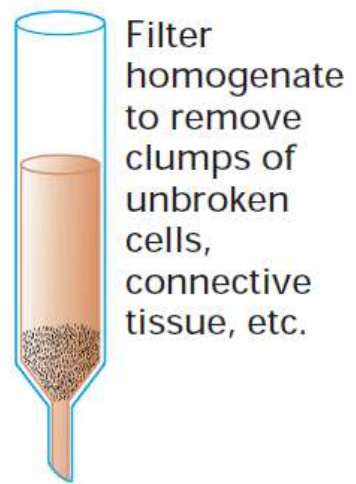
Střížný  
homogenizátor

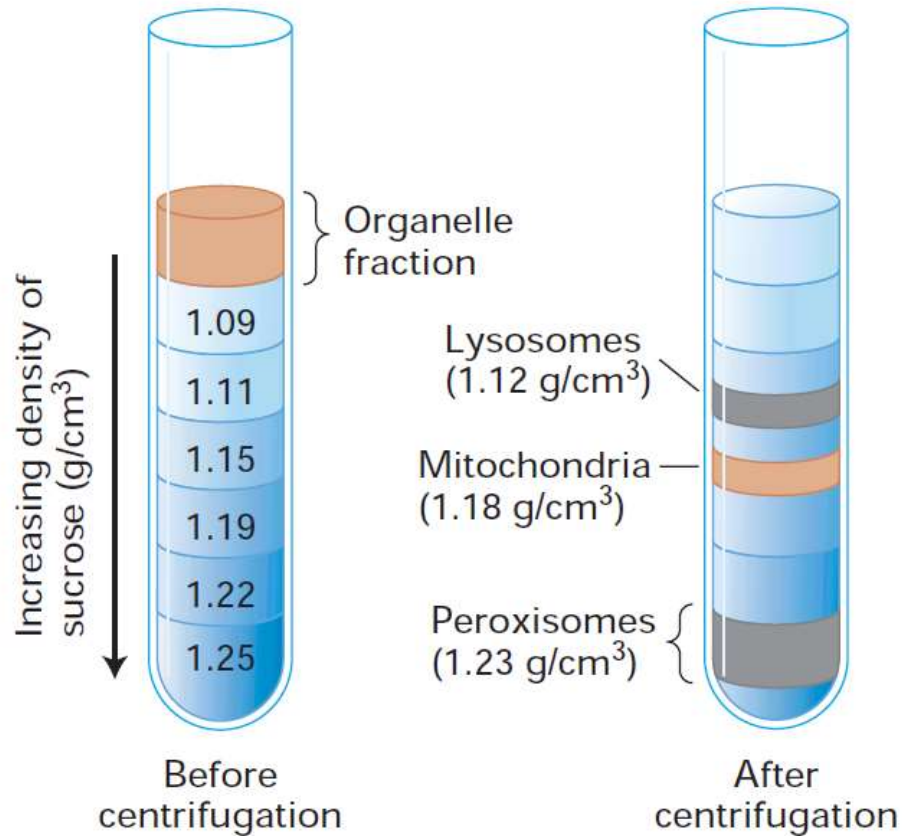


Třecí miska









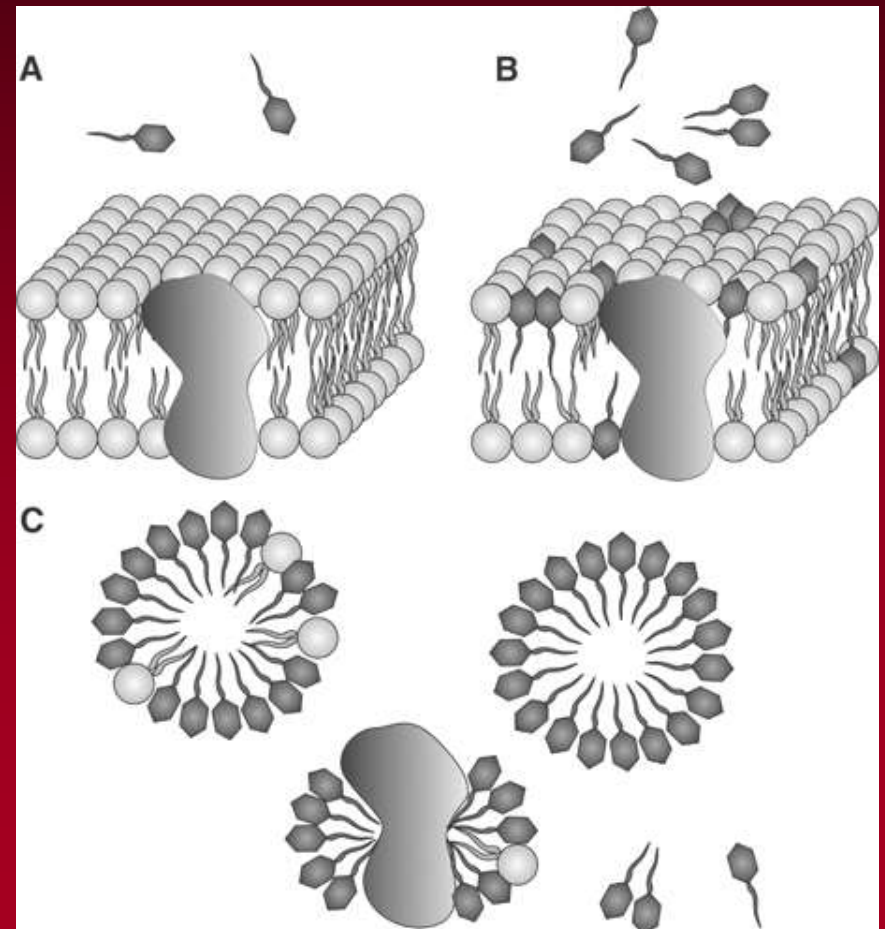
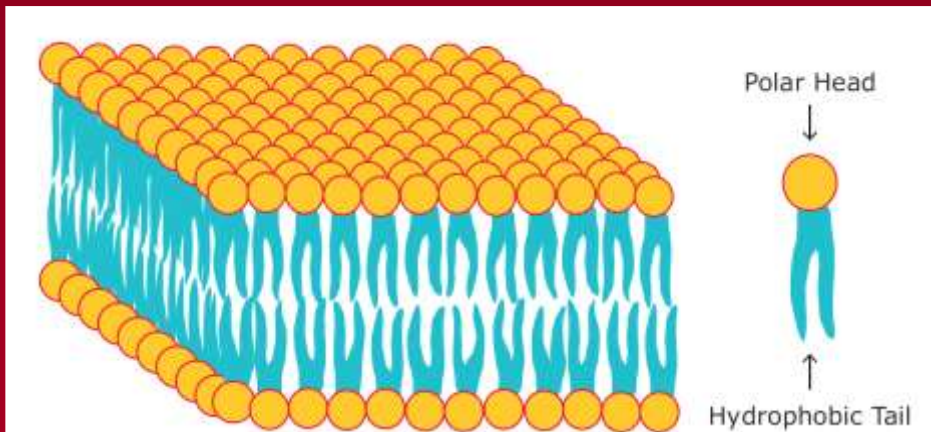
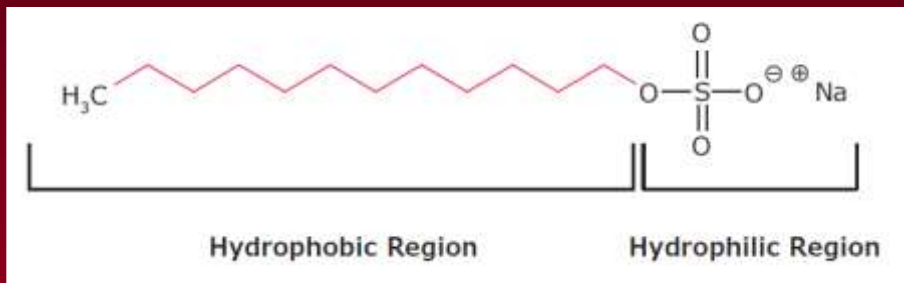
# METODY PRÁCE S PROTEINY

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

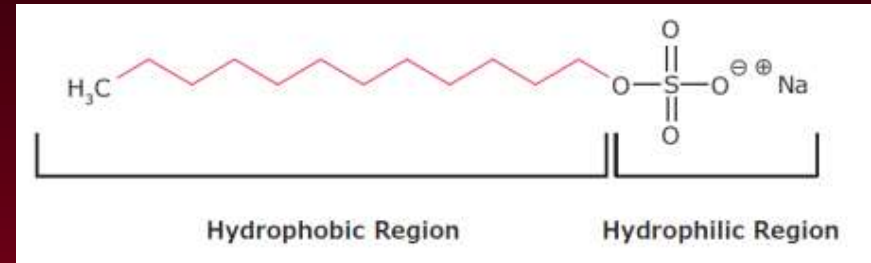
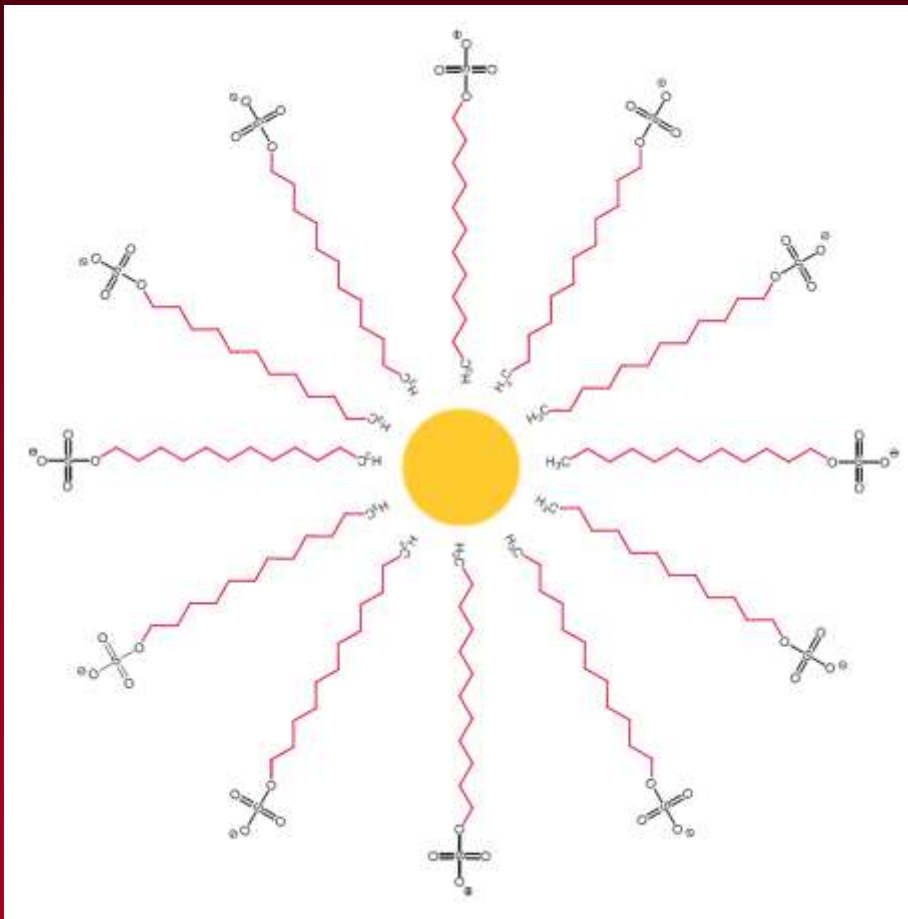
# Detergenty

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

## SDS

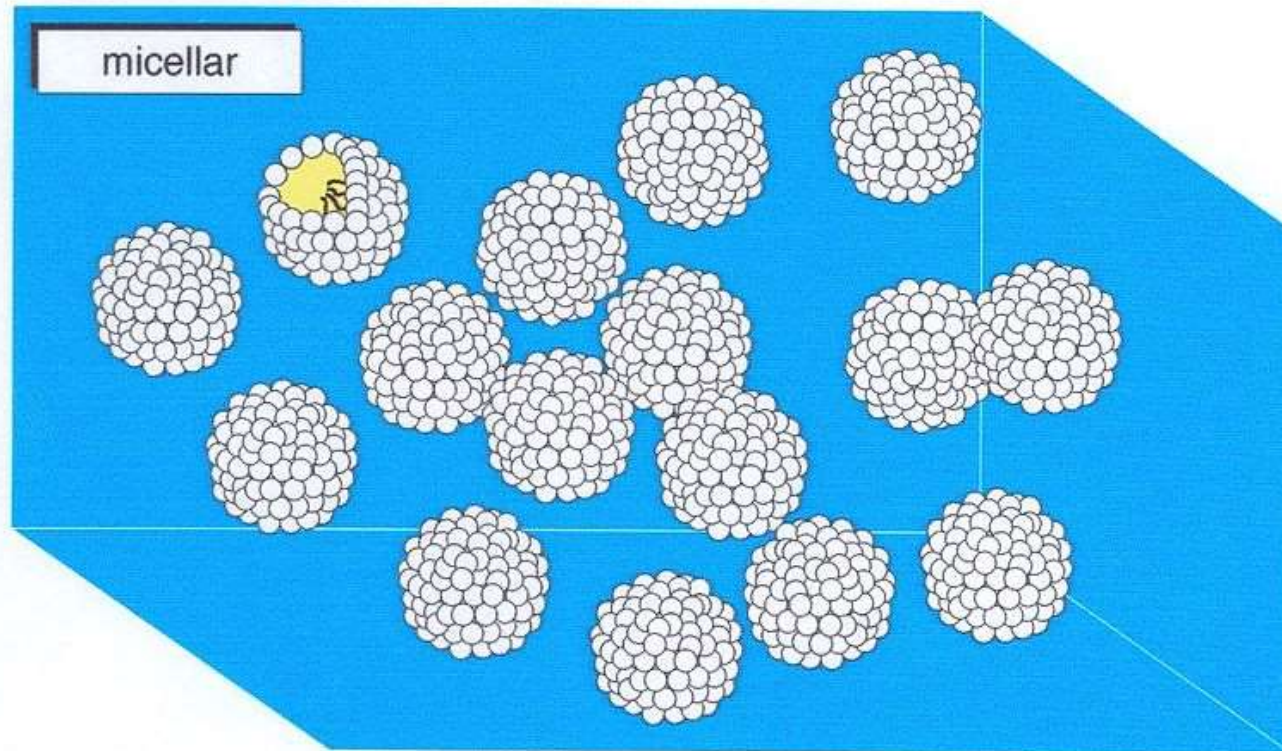


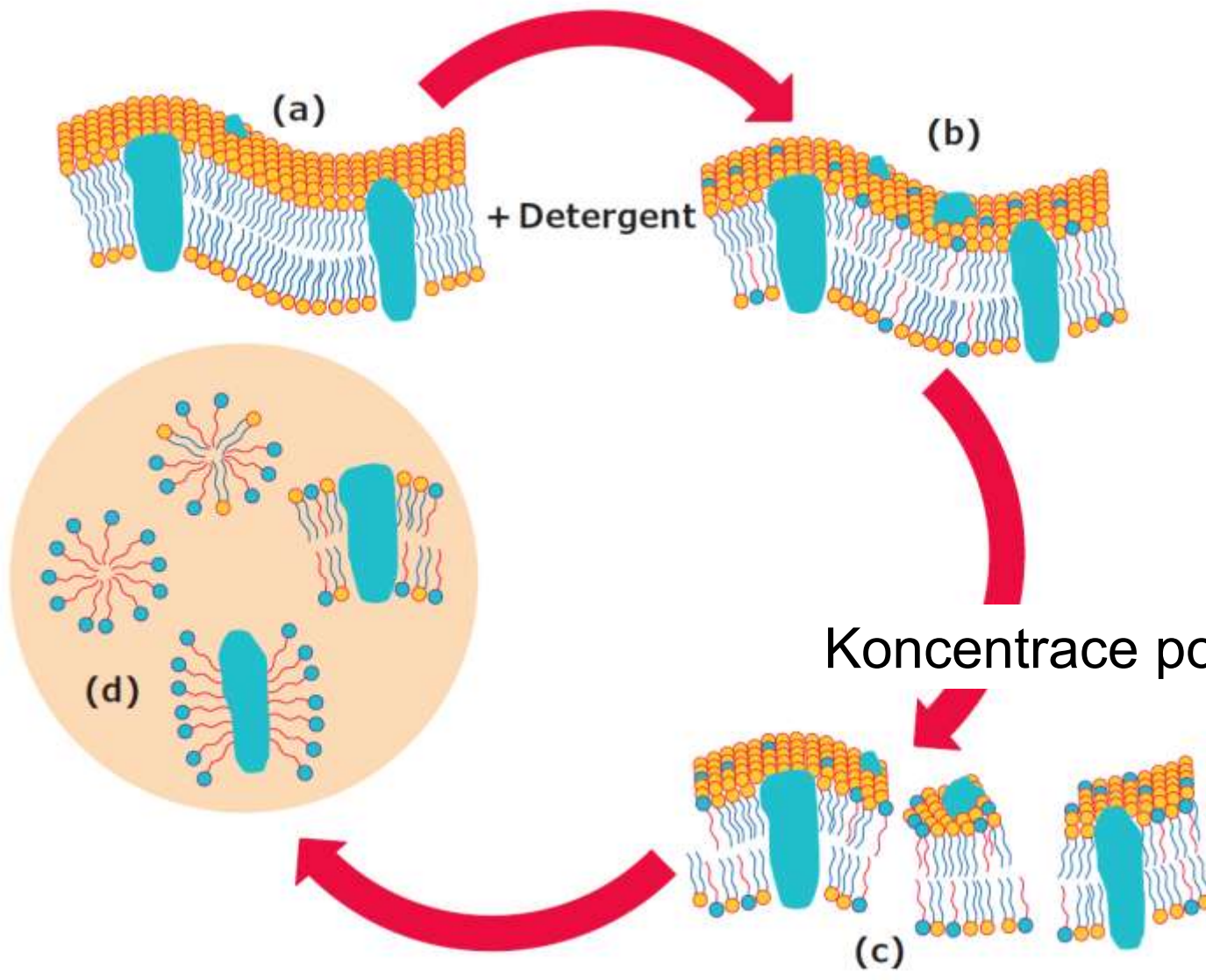
**CMC (kritická micelární koncentrace)** –koncentrace volného detregentu při jejímž překročení se vytvářejí micely definované velikosti (62 molekul pro SDS, 18 kDa)



**CMC (kritická micelární koncentrace)** –koncentrace volného detergentu 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

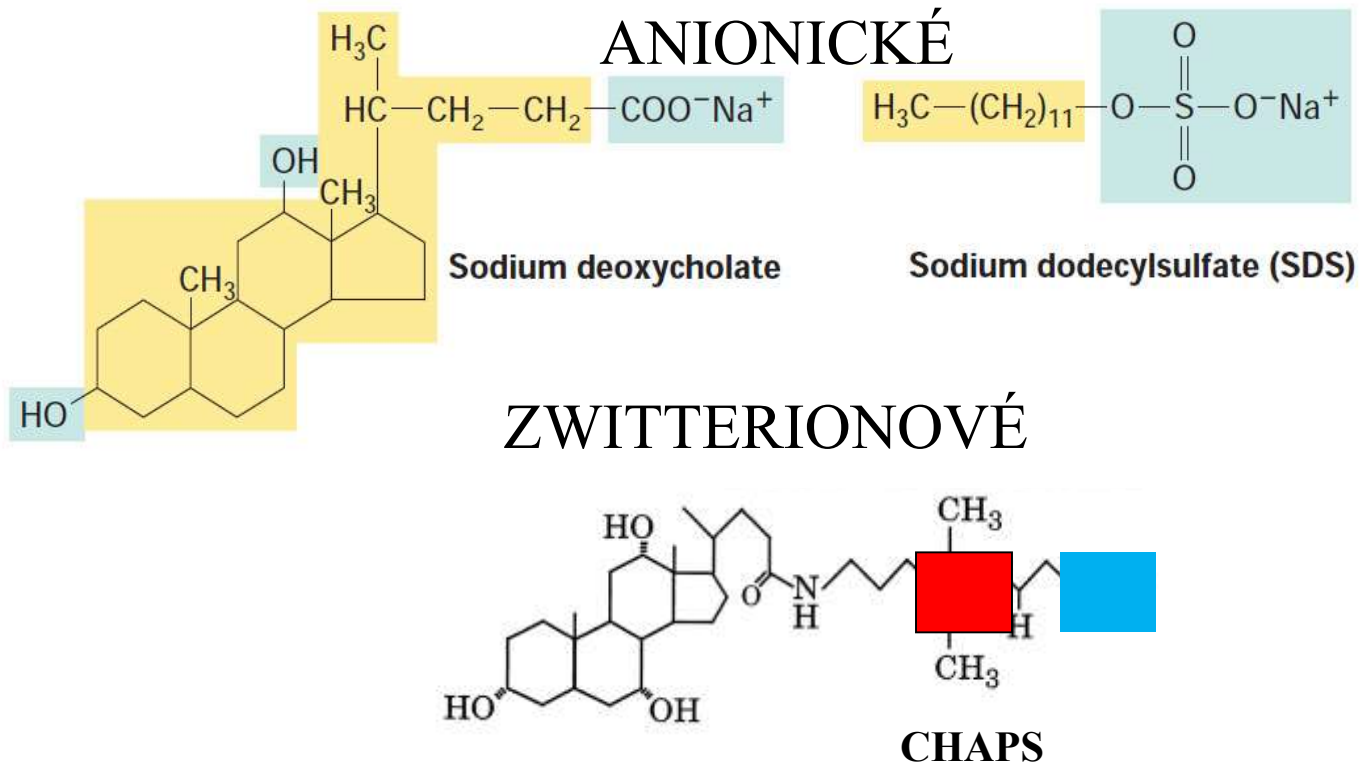
Detergent	Type	Agg.#	MW mono (micelle)	CMC mM (%w/v)	Cloud Point °C	Dialyzable
<b>Triton X-100</b>	Nonionic	140	647 (90K)	<b>0.24 (0.0155)</b>	64	No
<b>Triton X-114</b>	Nonionic	–	537 (–)	<b>0.21 (0.0113)</b>	23	No
<b>NP-40</b>	Nonionic	149	617 (90K)	<b>0.29 (0.0179)</b>	80	No
<b>Brij-35</b>	Nonionic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



# Detergenty

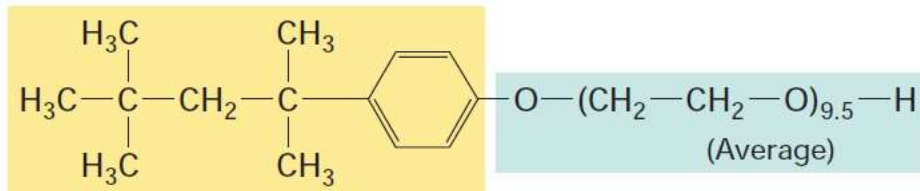
- **Ionogenní** (SDS, CHAPS, deoxycholate...)

Silnější, většinou denaturující

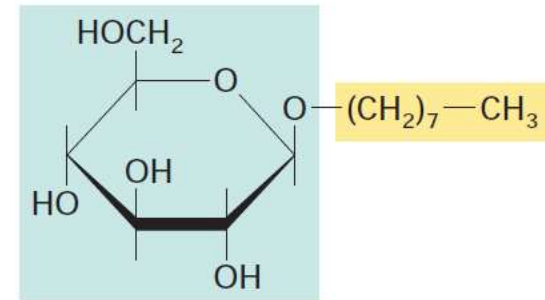


# Detergency

## Neionogenni



**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 BEWÄHRTEM  
WISSEN AUF DEM GEBIETE DER ANORGANISCHEN CHEMIE



IN DIESEM BEZEHRE FORSCHE DER BERÜHMTE CHEMIKER  
HAT ERST BEWÄHRT (1850-1855), WELCHE DIE BEZIEHUNGEN  
DER AMMONIUMSALZEN ZU EINER VORHERSAYTE UND ICH DIE ENTSCHEIDENDE  
BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN BEZIEHUNGEN.



# SALTING-OUT – VYSOLOVÁNÍ

## Lyotropní vlastnosti aminokyselin

Jednotlivé soli se liší schopností precipitovat/denaturovat proteiny

### HOFMEISTER SERIES

#### Cations

$\text{NH}_4^+$     $\text{K}^+$     $\text{Na}^+$     $\text{Li}^+$     $\text{Mg}^{2+}$     $\text{Ca}^{2+}$    guanidinium<sup>+</sup>



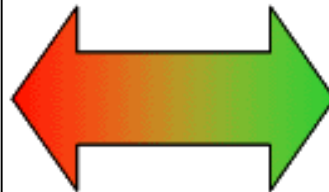
$\text{SO}_4^{2-}$     $\text{HPO}_4^{2-}$    acetate<sup>-</sup>   citrate<sup>-</sup>    $\text{Cl}^-$     $\text{NO}_3^-$     $\text{ClO}_3^-$     $\text{F}^-$     $\text{ClO}_4^-$     $\text{SCN}^-$

#### Anions

↑ Precipitace

↓ Denaturace

↑ Stabilita proteinu



↓ Precipitace

↑ Denaturace

↓ Stabilita proteinu



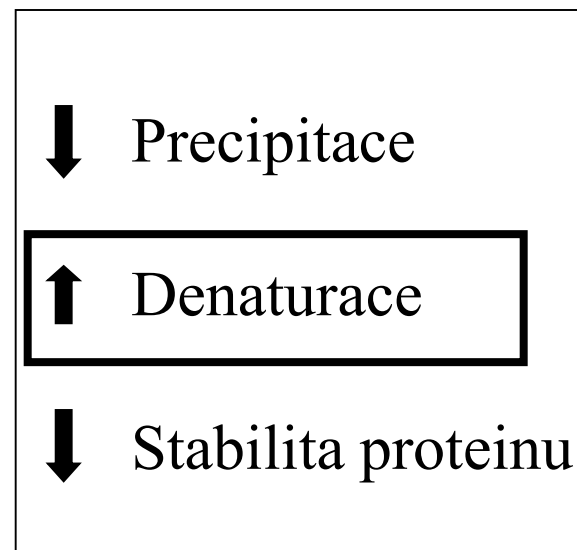
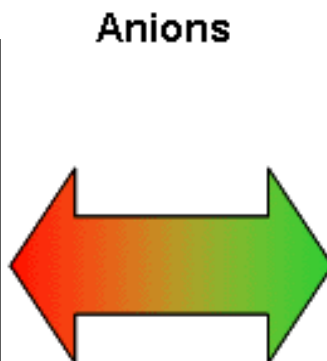
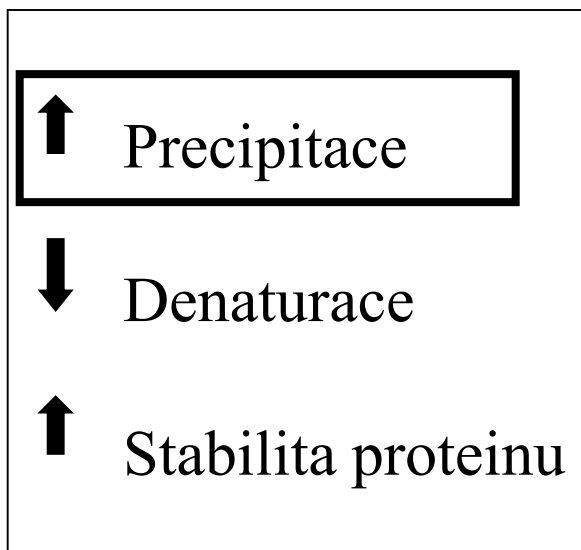
Franz  
Hofmeister  
(1850-1922)

# HOFMEISTER SERIES

Cations									
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	[CH <sub>6</sub> N <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> guanidinium <sup>+</sup>			

Anions									
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	acetate <sup>-</sup>	citrate <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	I <sup>-</sup>	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SCN <sup>-</sup>



Precipitate 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  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^{1+}$  ionty – Biuret, Lowry, **BCA** (kys. bicinchonová)



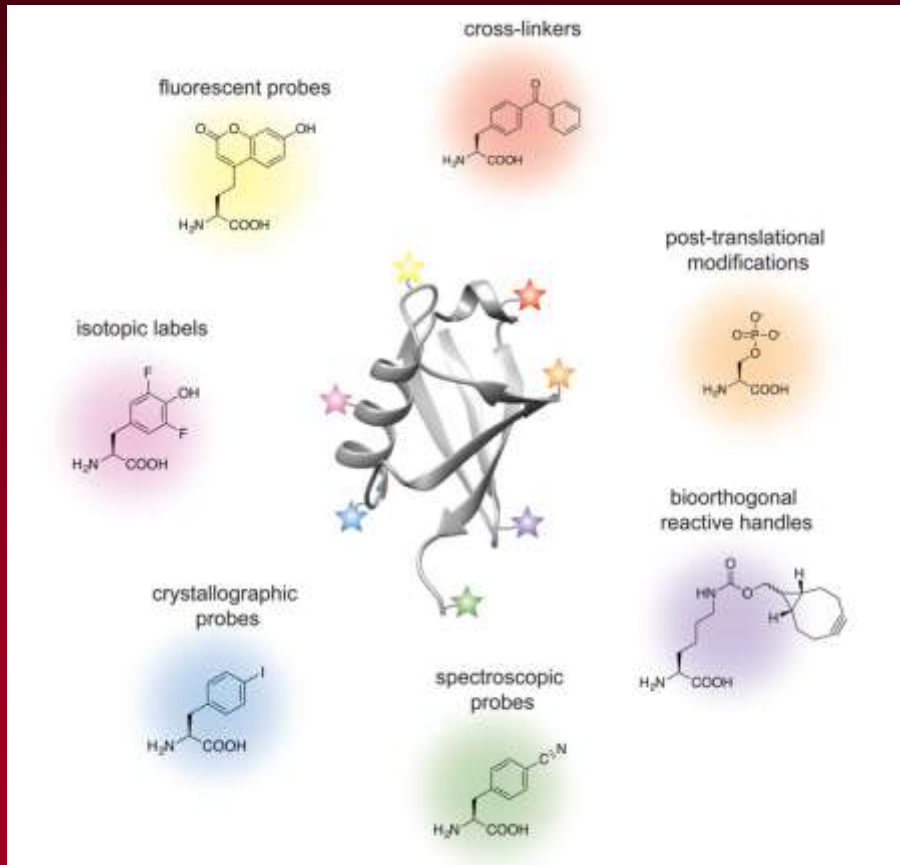
- Komplexy AA s pigmenty (CBB G250)  
– dle Bradforda



# METODY PRÁCE S PROTEINY

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

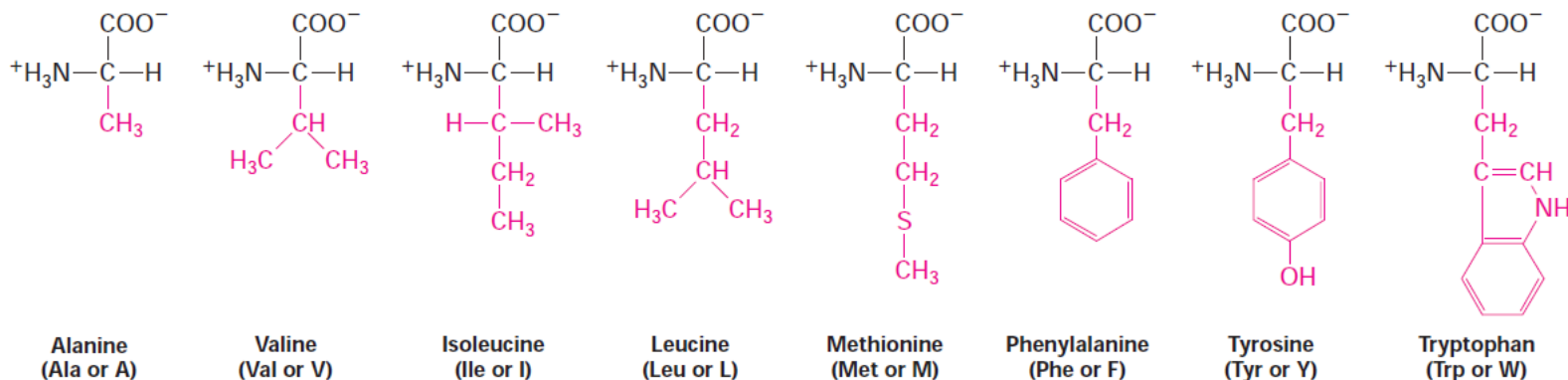
# ZNAČENÍ A ZAKOTVOVÁNÍ PROTEINŮ



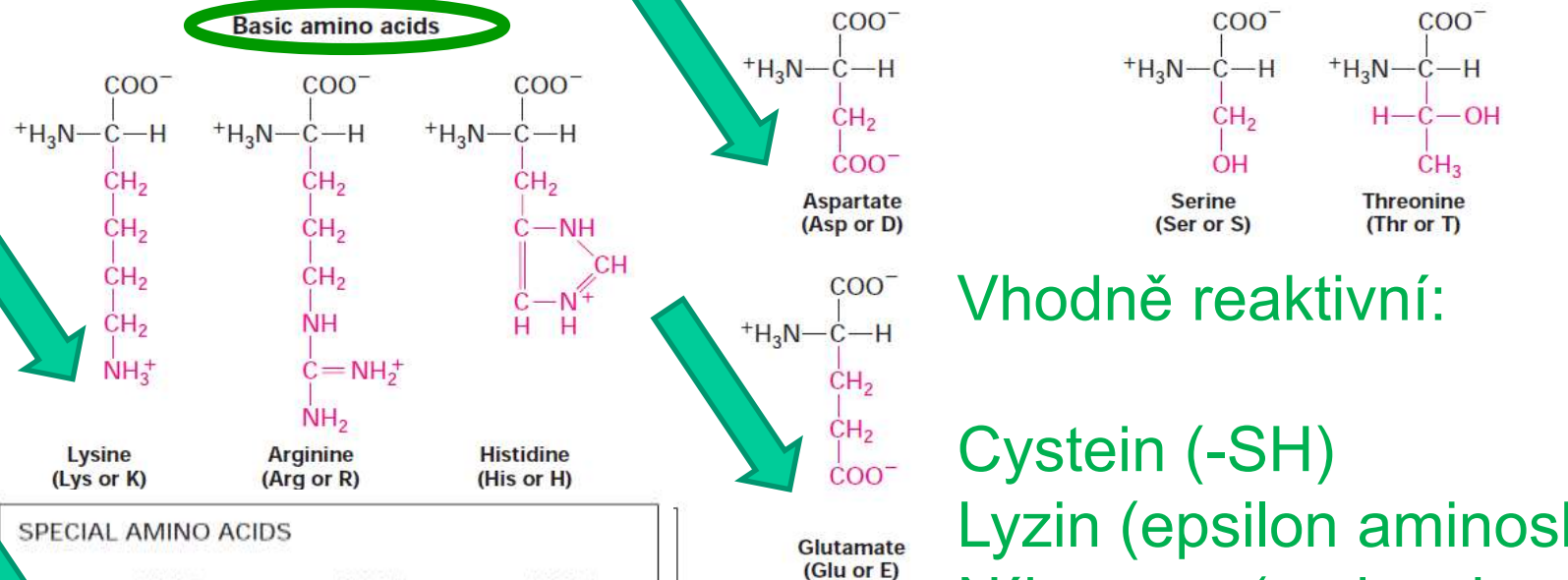
Reaktivní skupiny bílkovin

**sulfhydryl (–SH)**  
**primární amin (–NH<sub>2</sub>)**  
**karboxyl (–COOH)**  
**karbonyl sacharidu (–CHO)**

## HYDROPHOBIC AMINO ACIDS



## HYDROPHILIC AMINO ACIDS



Vhodně reaktivní:

Cystein (-SH)

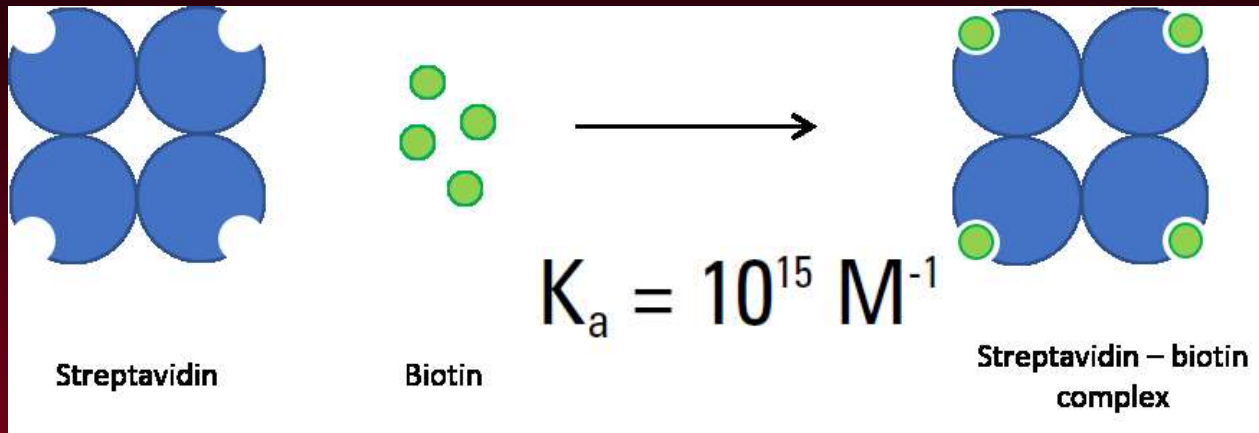
Lyzin (epsilon aminoskupina)

N'konec - (aminoskupina)

C'konec (karboxyl + Asp, Glu)



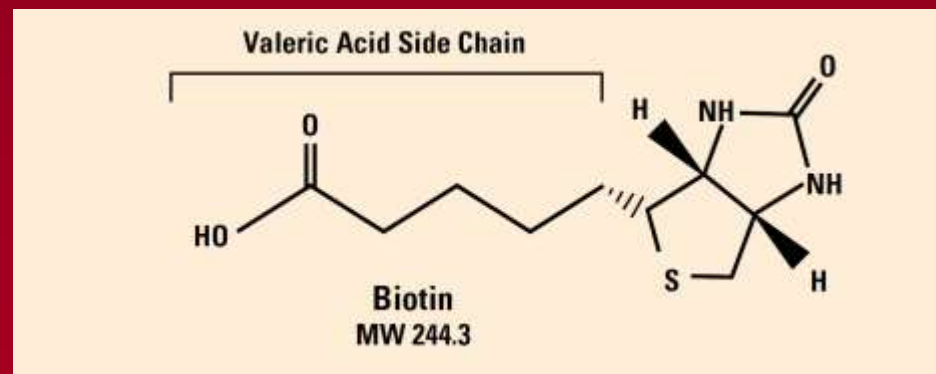
# Vazba Avidin (Streptavidin)-Biotin



Nejsilnější známá nekovalentní interakce  
mezi proteinem a ligandem

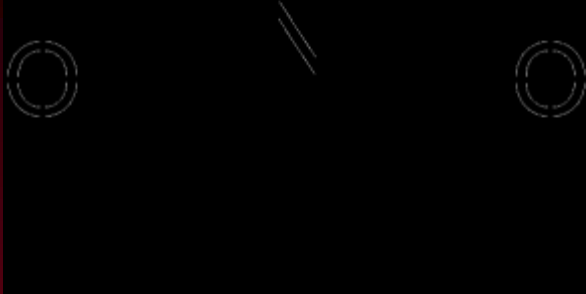
**Avidin (Streptavidin)**, tetramerní proteiny 50-70 kDa

## Biotin

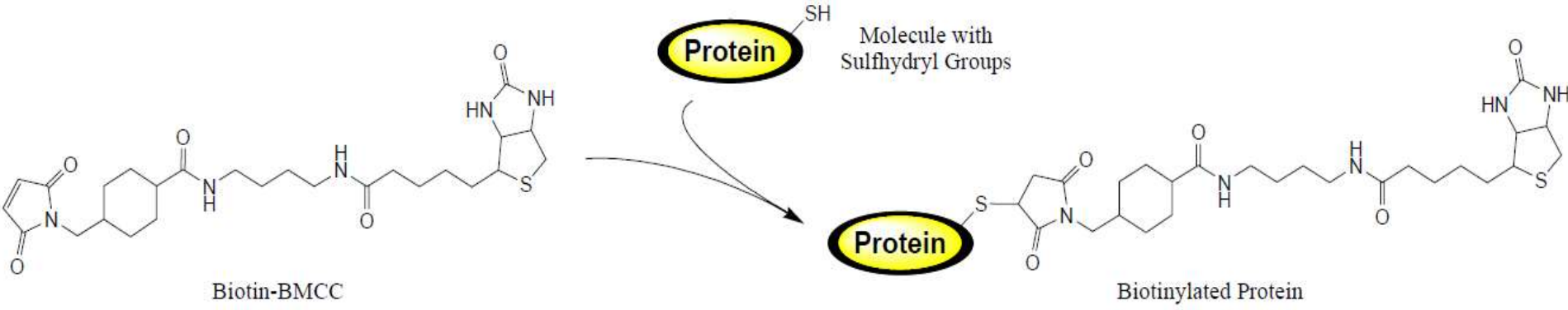


SH-

Cys

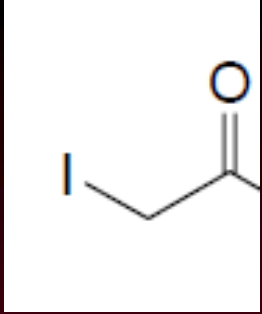


Maleimid

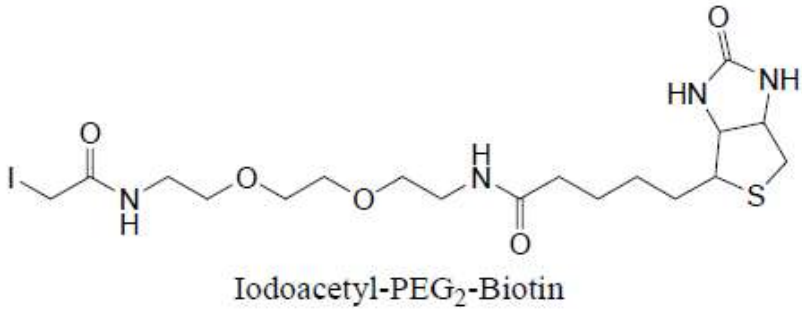


SH-

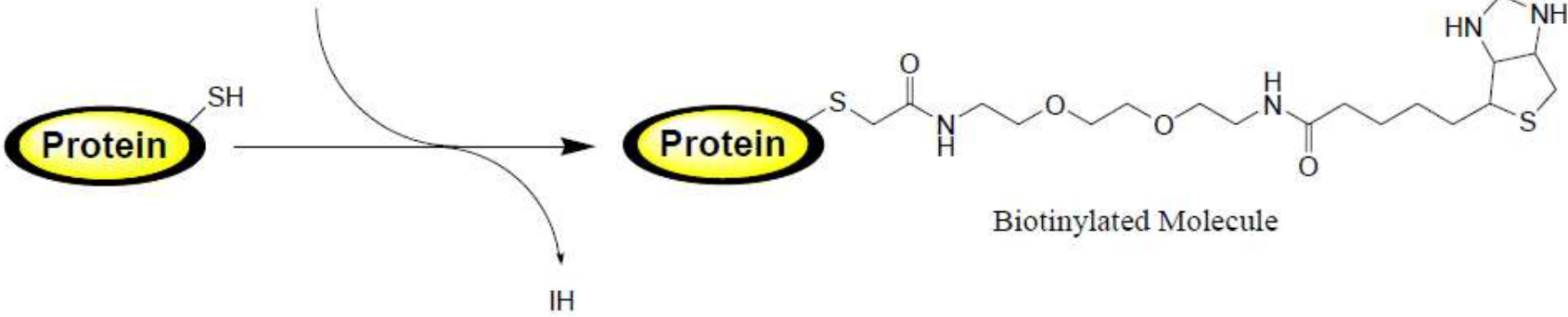
Cys



Iodoacetyl



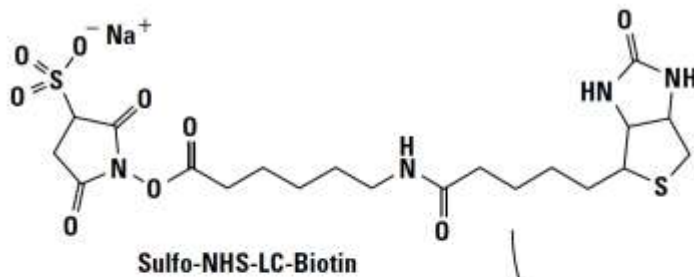
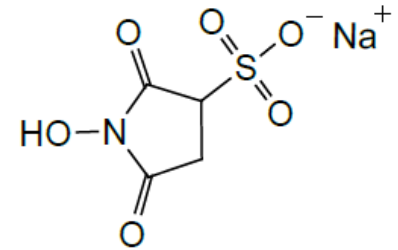
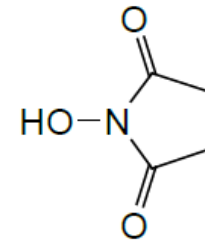
PEG<sub>2</sub>- inertní spacer



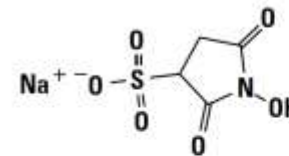


N', epsilon aminoskupina Lys

N-hydroxysukcinimid (NHS)  
sulfo N-hydroxysukcinimid (NHS)

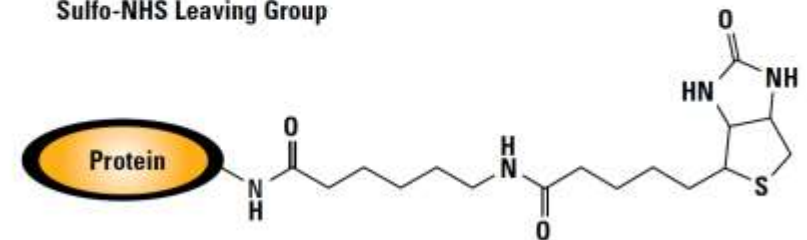


Sulfo-NHS-LC-Biotin



Sulfo-NHS Leaving Group

Protein  
NH<sub>2</sub>  
Molecule with  
Primary Amines

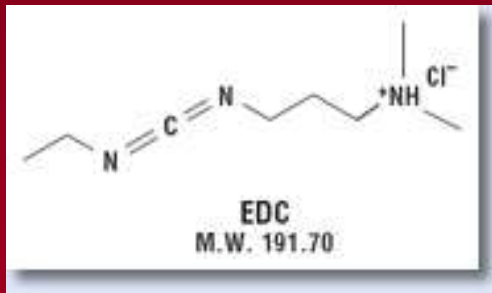
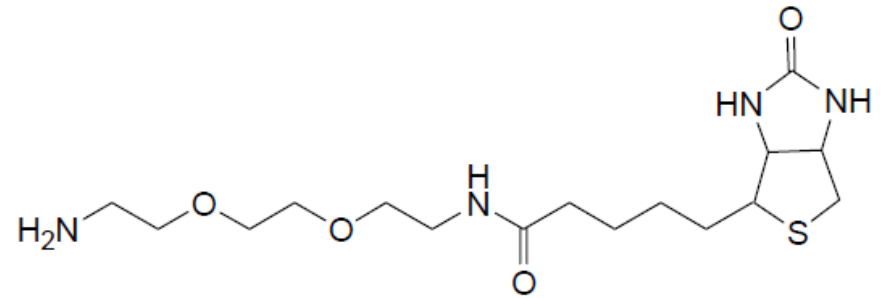


Biotinylated Molecule

COOH-

C', Asp. Glu

Protein-COOH



kroslinker EDC