



Proteomika 2025

PROTEOMIKA 2025

- **Proteomika, metody práce s bílkovinami** (Petrák 6/10)
- **Separační metody, digesce a principy ID bílkovin pomocí MS** (Petrák 13/10)
- **Principy hmotnostní spektrometrie, instrumentace** (Man 20/10)
- **Hmotnostní spektrometrie v proteomice, analýza PTM** (Man 27/10)
- **ID proteinů, akvizice dat DDA, DIA, databáze, FDR** (Talacko 3/11)
- **Kvantifikace, isotopy, LFQ, cílená proteomika** (Harant 10/11)
- **Design experimentu, zpracování dat, bioinformatika...**(Harant 24/11)
- **Proteomika membránových proteinů, proteinové komplexy** (Petrák 1/12)
- **Klinická proteomika, speciální metody** (Petrák 8/12)

PROTEOMIKA 2025

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. (Wilkins 1996)

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.

Current proteomic workflow LC-MS/MS



proteins



trypsin...

peptides



Micro or nano-LC
1D or 2D

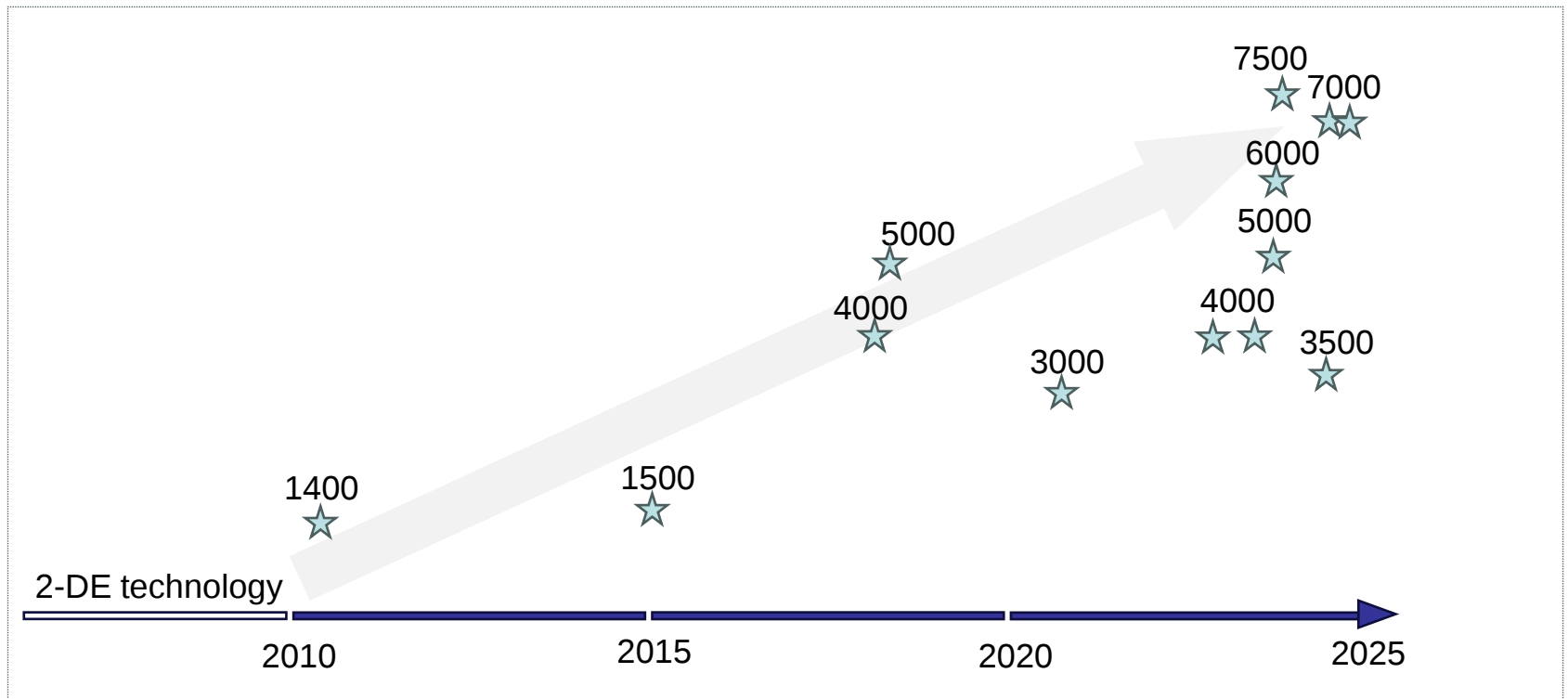


Mass spectrometry



**Peptide/protein
identification and quantification**

Number of proteins identified in a proteomic experiment



- 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

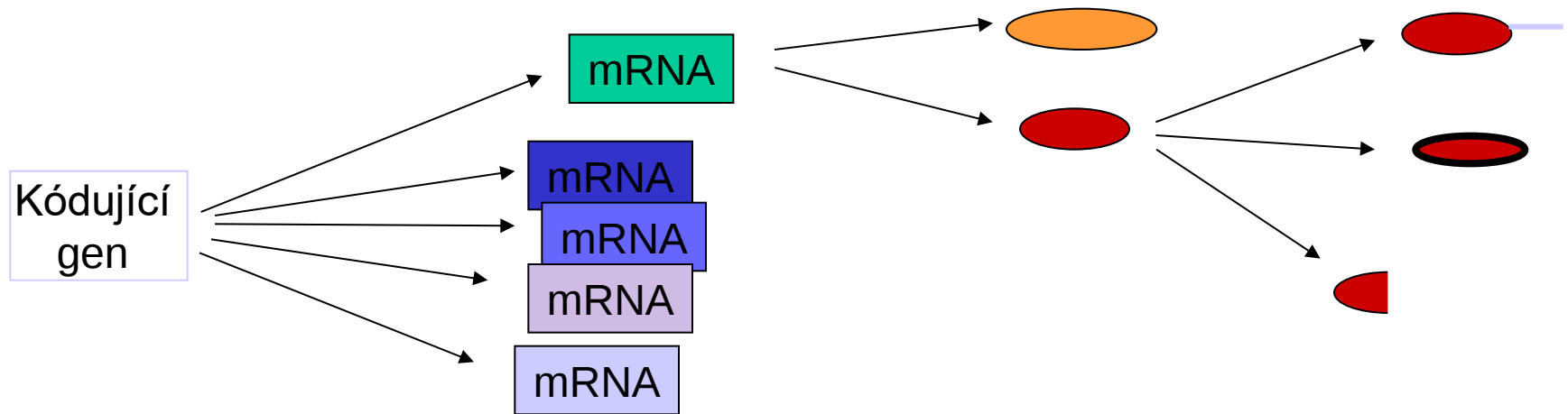
Základní úvahy:

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



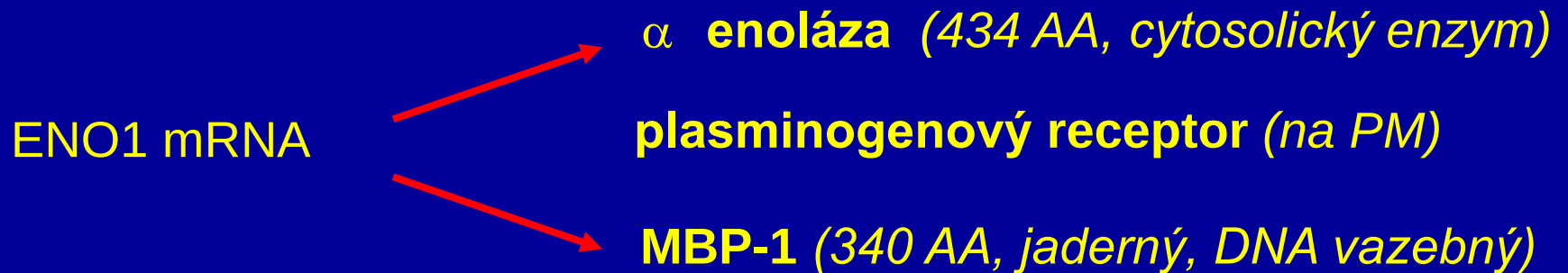
JAK JE DEFINOVÁN PROTEIN?

GENOCENTRICKÝ vs. PROTEOCENTRICKÝ POHLED

PROTEIN a **PROTEOFORMA**

Jak je definován protein?

alfa ENOLÁZA



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?

Gene-centric view

~20 000 protein coding
genes



Cca 20 000 proteins

Proteo-centric view

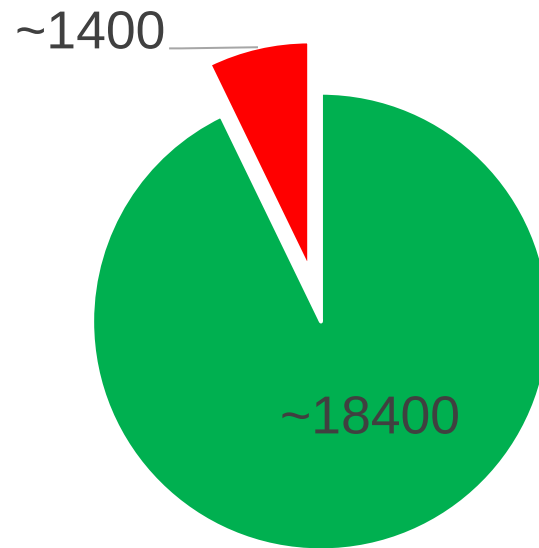
~20 000 protein coding
genes



> 1 000 000 protein variants
(proteoforms)

HUPO PROJECT - STATUS 2023

~19 800 protein-coding genes



■ Evidence on protein level (93%)

■ „The missing proteins“ (7%)

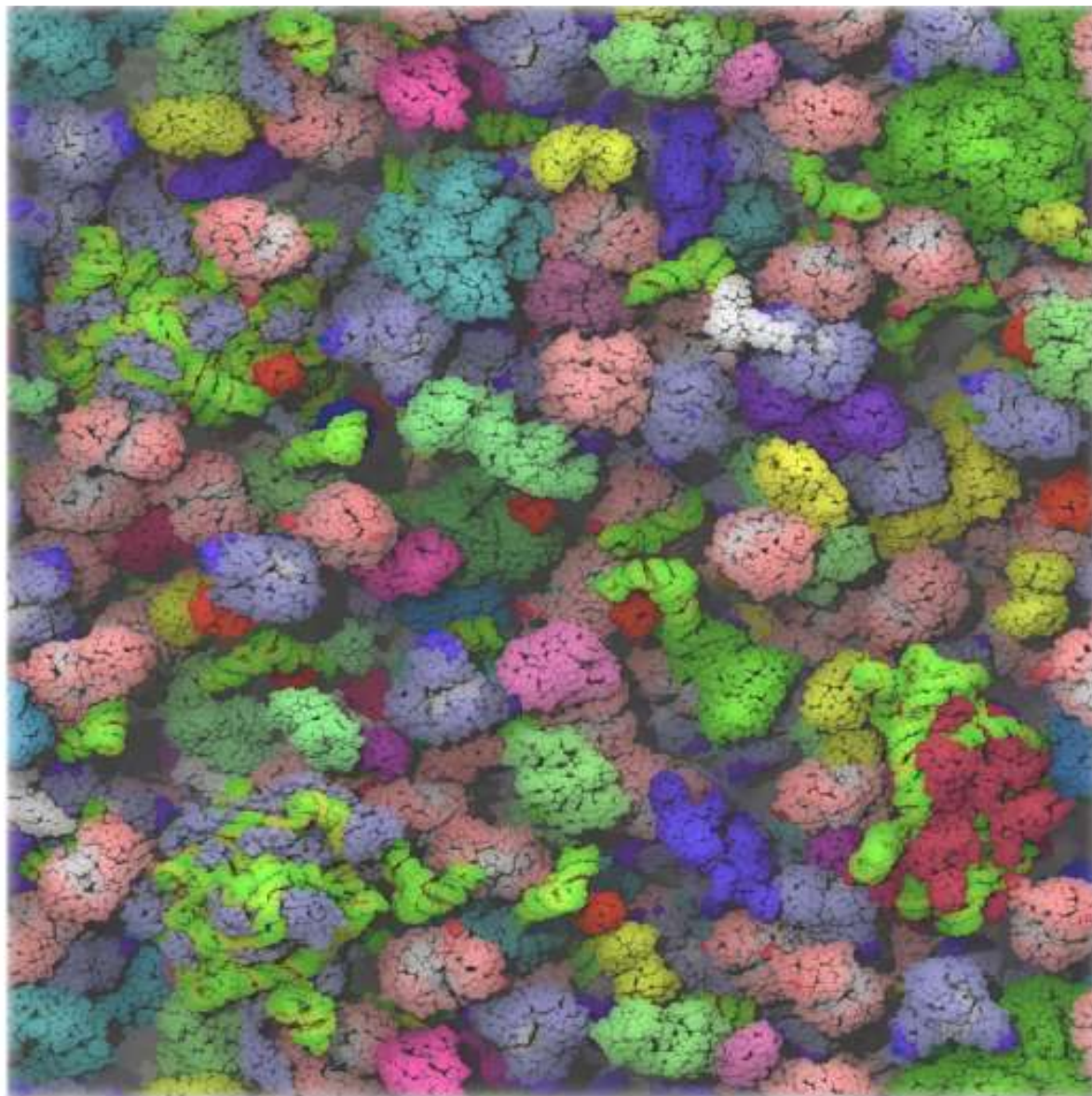
Základní úvahy:

1) Počet analytů

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

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

It is crowded out there...

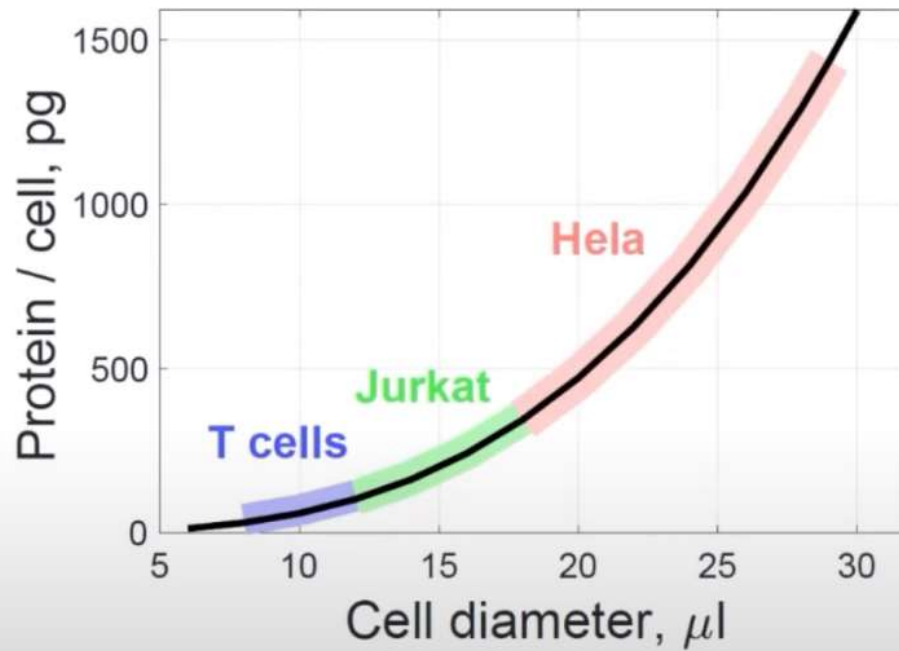


Koncentrace proteinu v buňce

3×10^6 molekul/ μm^3

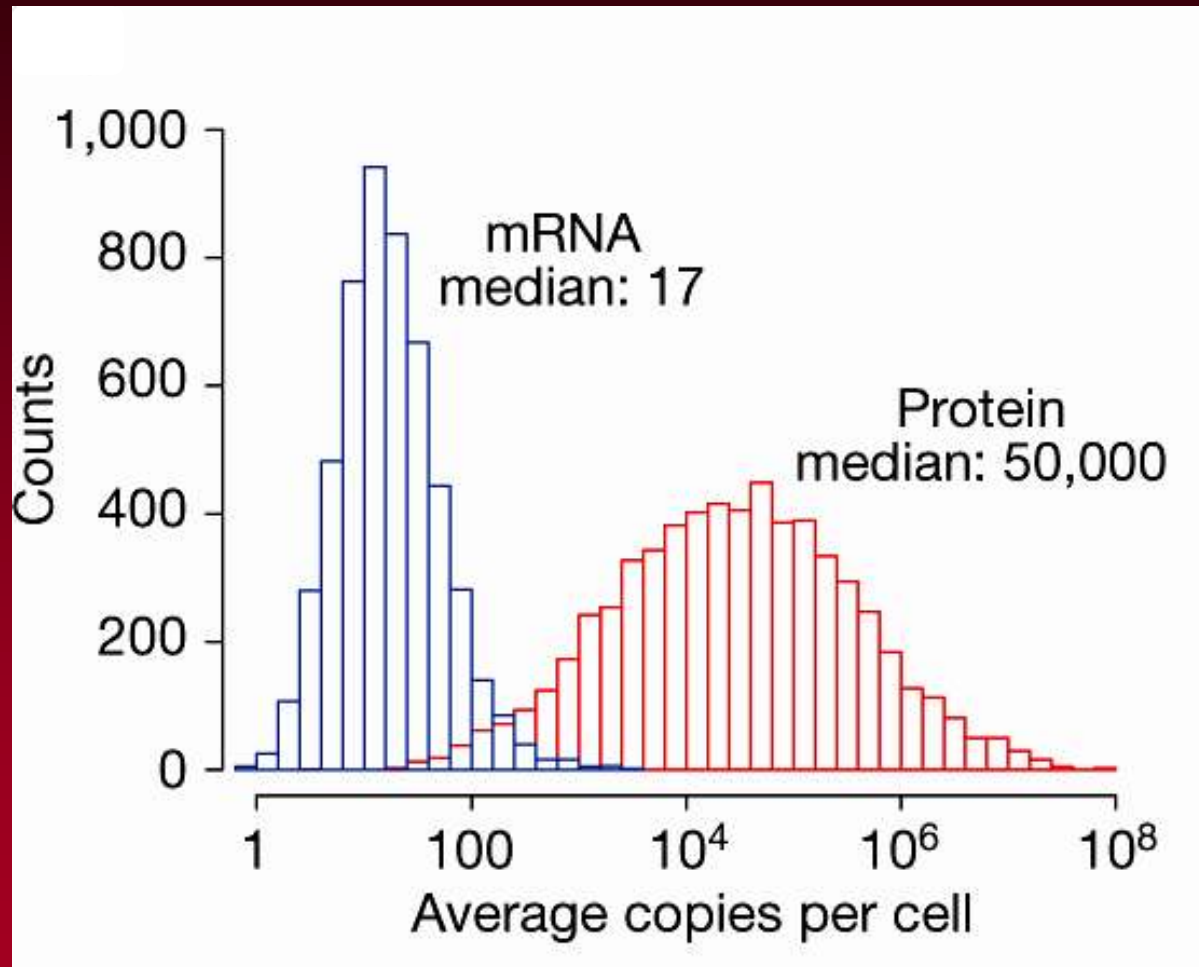
(cca 100-1200 pg/buňku)

Nižší miliardy proteinových molekul/buňku

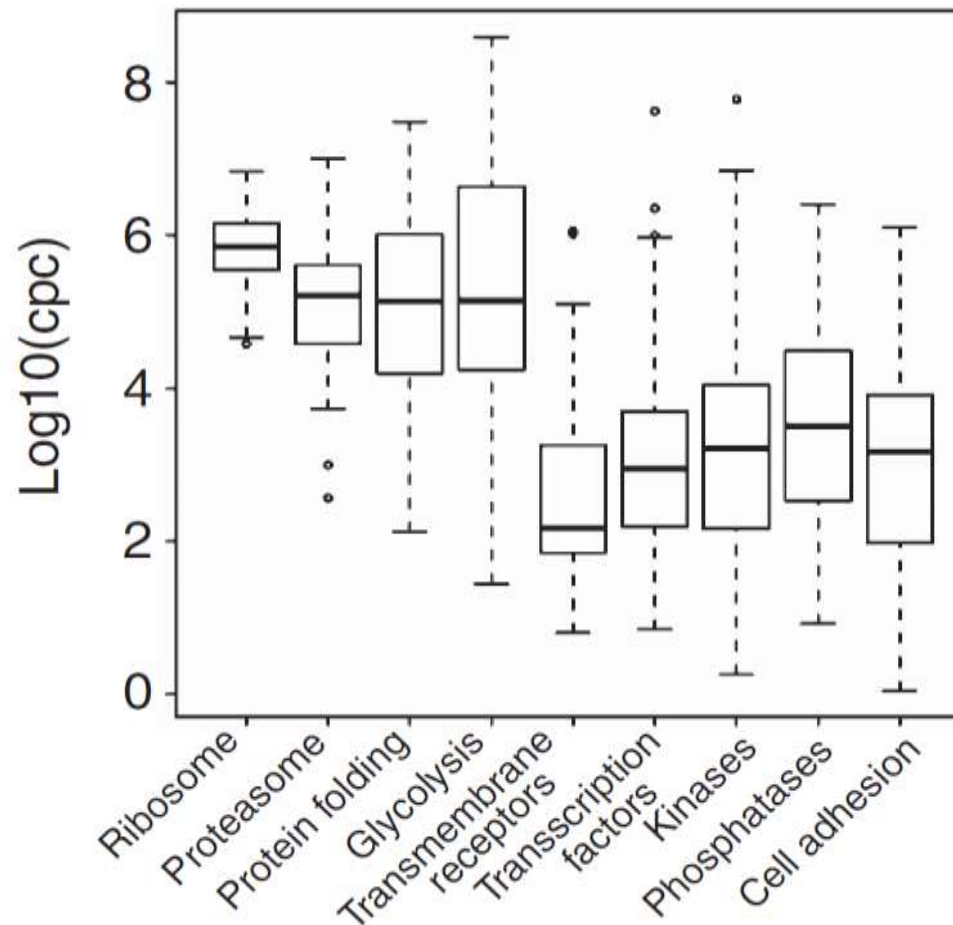


¹Estimates based on R Milo, *Bioessays*, 2013

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

Základní úvahy:

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



Ser-Tyr

Cys



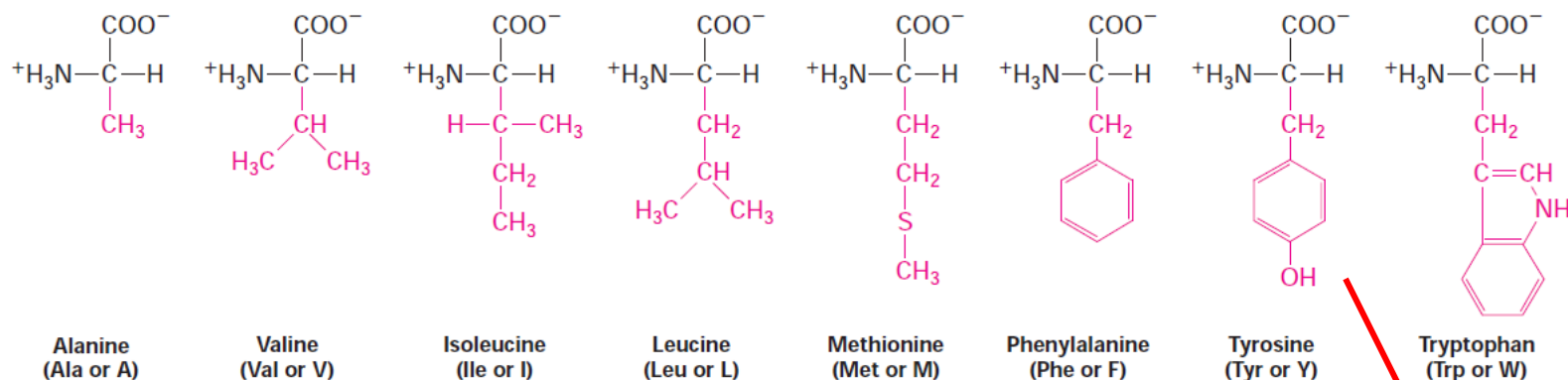
**Amino end
(N-terminus)**

**Carboxyl end
(C-terminus)**

Side chains

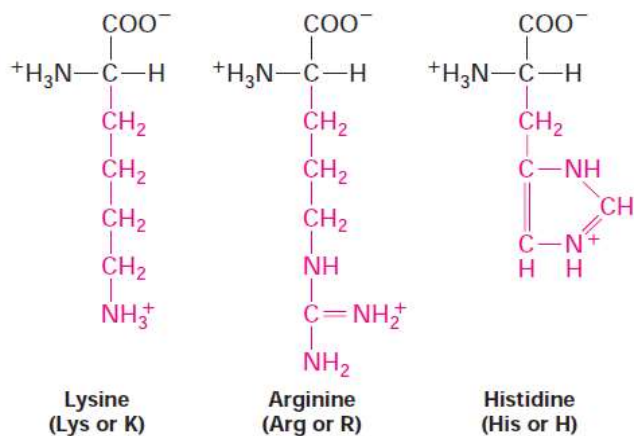
Backbone

HYDROPHOBIC AMINO ACIDS

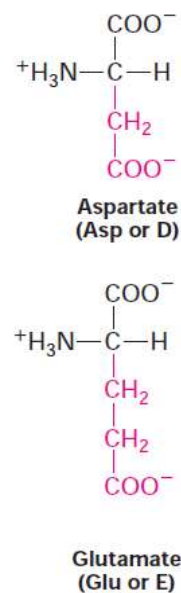


HYDROPHILIC AMINO ACIDS

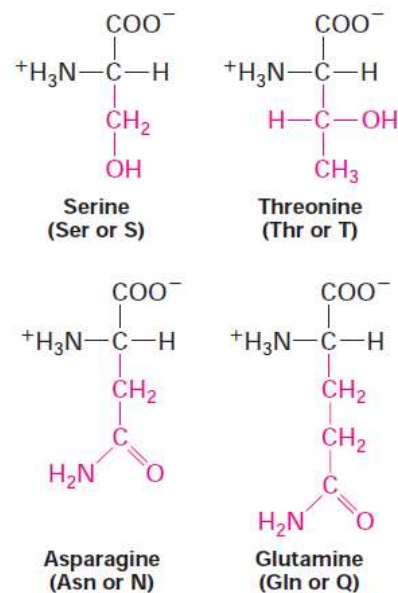
Basic amino acids



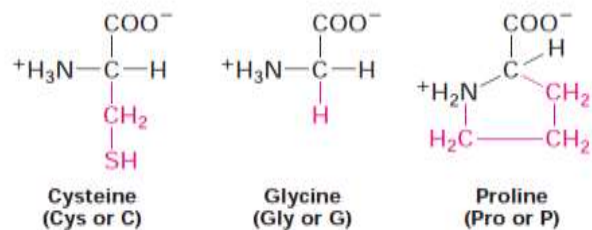
Acidic amino acids



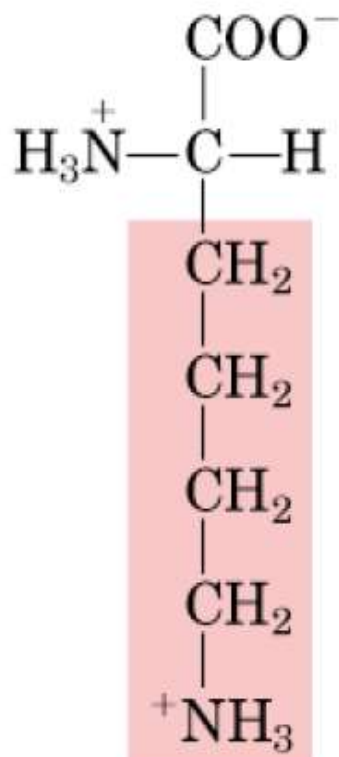
Polar amino acids with uncharged R groups



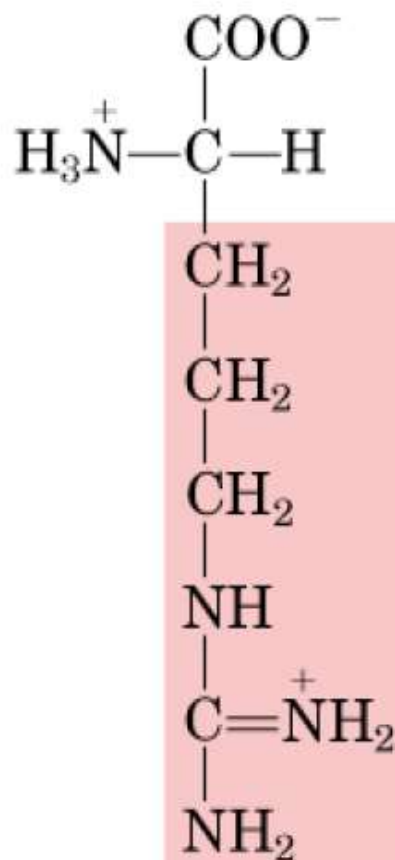
SPECIAL AMINO ACIDS



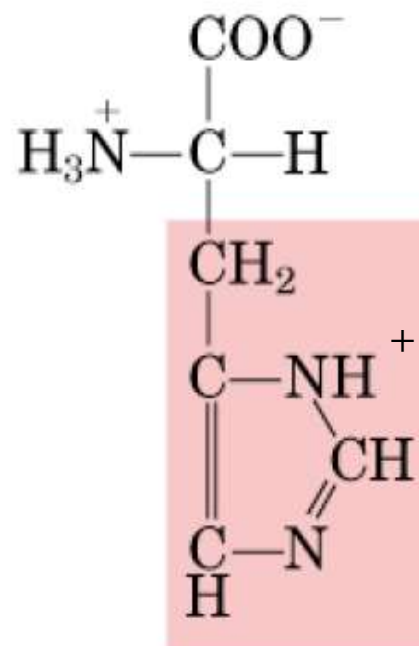
KLADNĚ NABITÉ AMINOKYSELINY (pH 7)
(náboj postranního řetězce)



Lysine



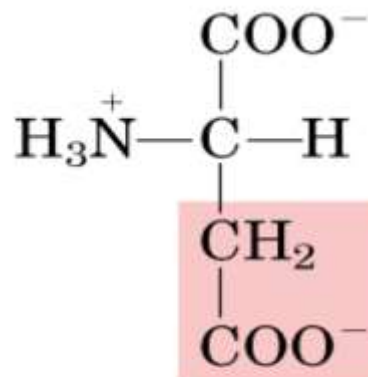
Arginine



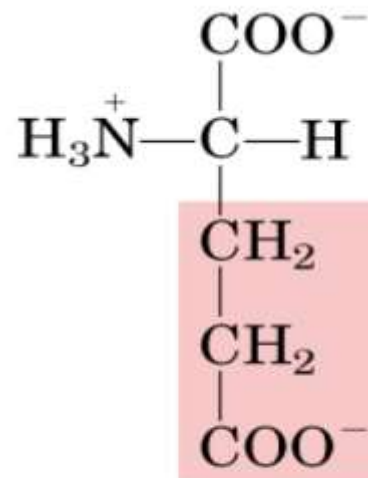
Histidine

ZÁPORNĚ NABITÉ AMINOKYSELINY (náboj postranního řetězce)

pH 7



Aspartate



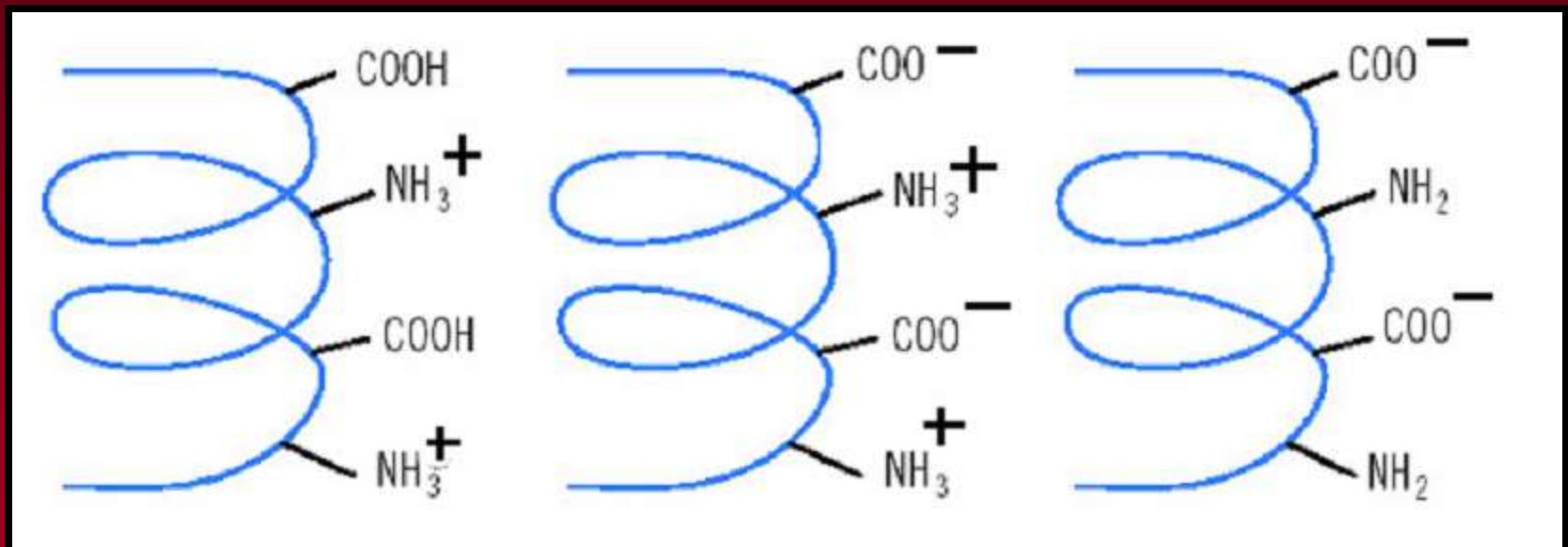
Glutamate

Další skupiny disociující v bazickém prostředí

Cysteine	$-\text{SH} \rightleftharpoons \text{S}^- + \text{H}^+$	8.5
Tyrosine	$\text{—C}_6\text{H}_4\text{—OH} \rightleftharpoons \text{—C}_6\text{H}_4\text{—O}^- + \text{H}^+$	10.0
Lysine	$\text{—NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$	10.0
Arginine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{—N—C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH}_2^+ \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{—N—C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array} \end{array} + \text{H}^+$	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.

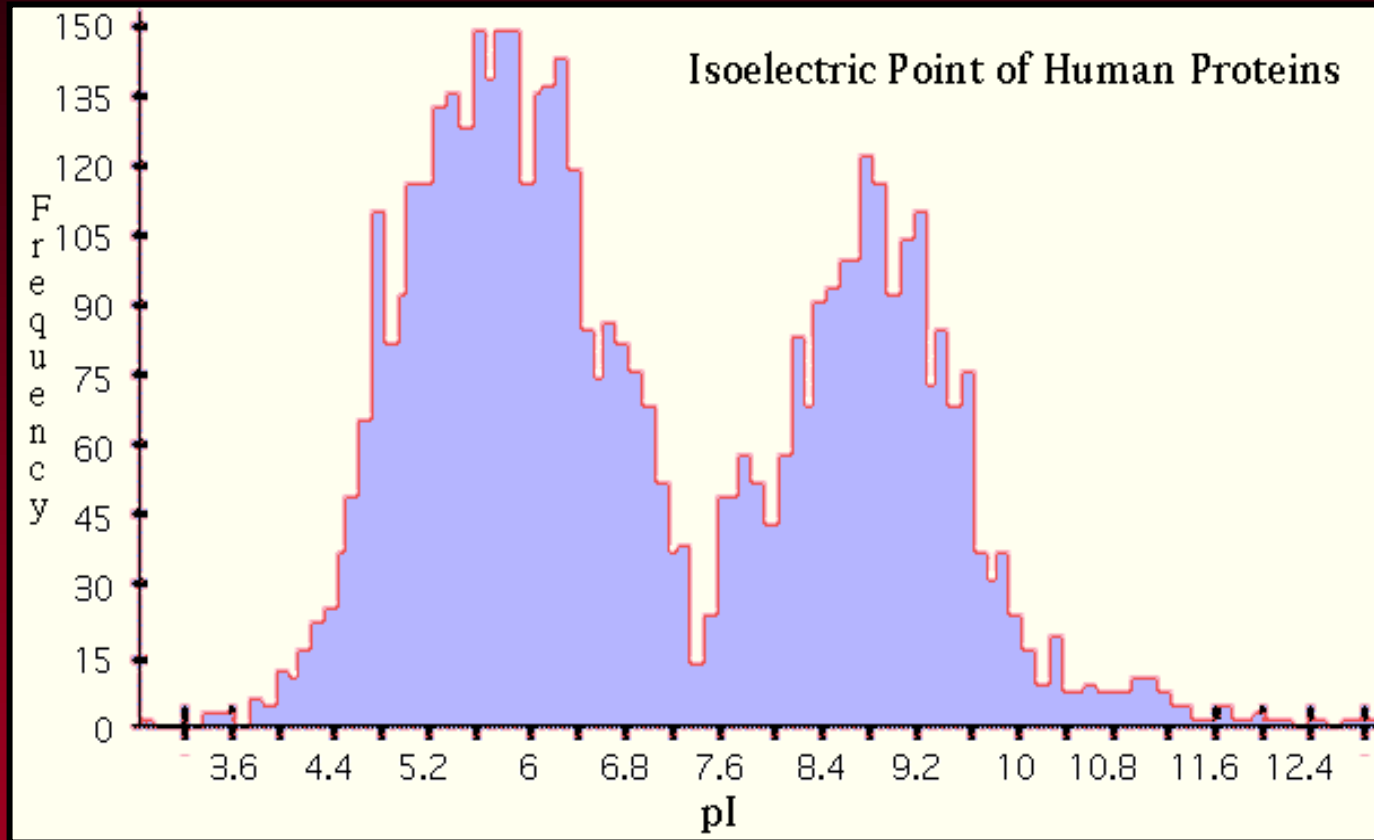


pH < pI

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

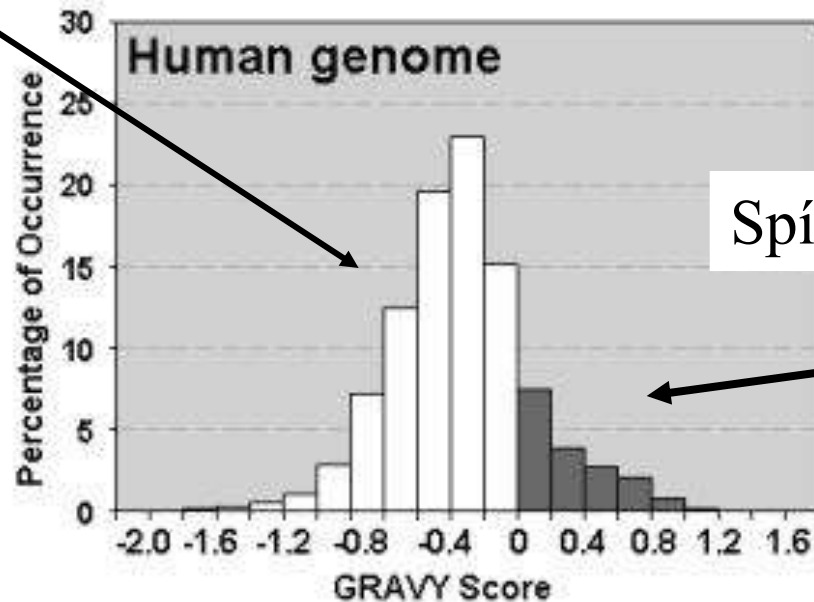
Amino Acid Name	One Letter Code	Hydropathy Score
Isoleucine	I	4.5
Valine	V	4.2
Leucine	L	3.8
Phenylalanine	F	2.8
Cysteine	C	2.5
Methionine	M	1.9
Alanine	A	1.8
Glycine	G	-0.4
Threonine	T	-0.7
Tryptophan	W	-0.9
Serine	S	-0.8
Tyrosine	Y	-1.3
Proline	P	-1.6
Histidine	H	-3.2
Glutamic acid	E	-3.5
Glutamine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

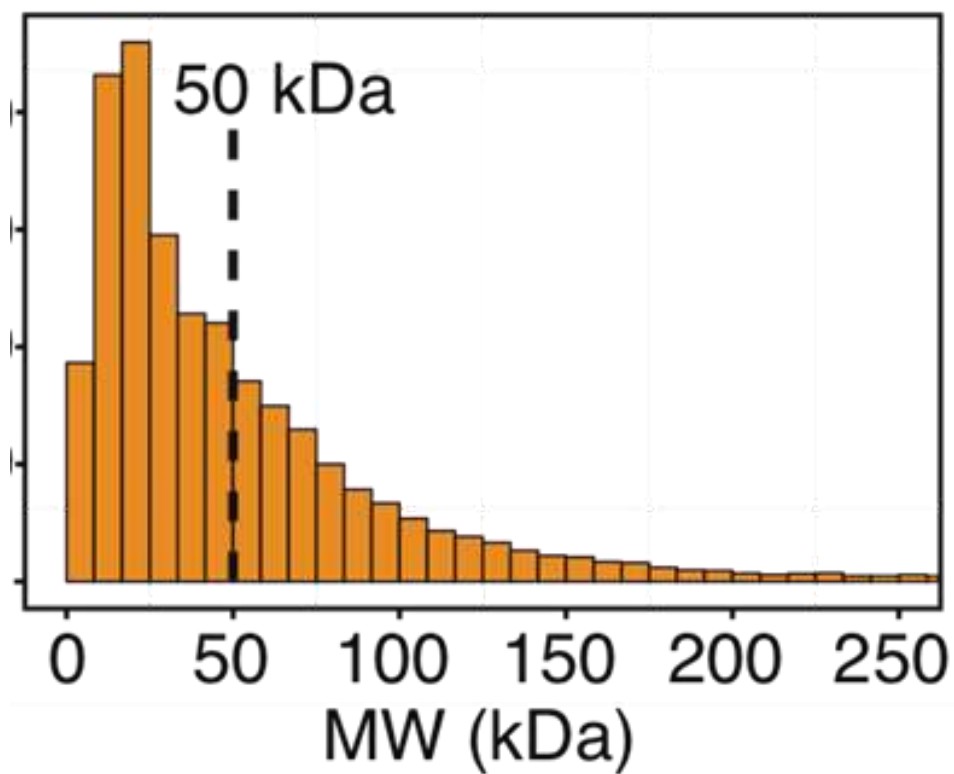
Spíš rozpustné



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

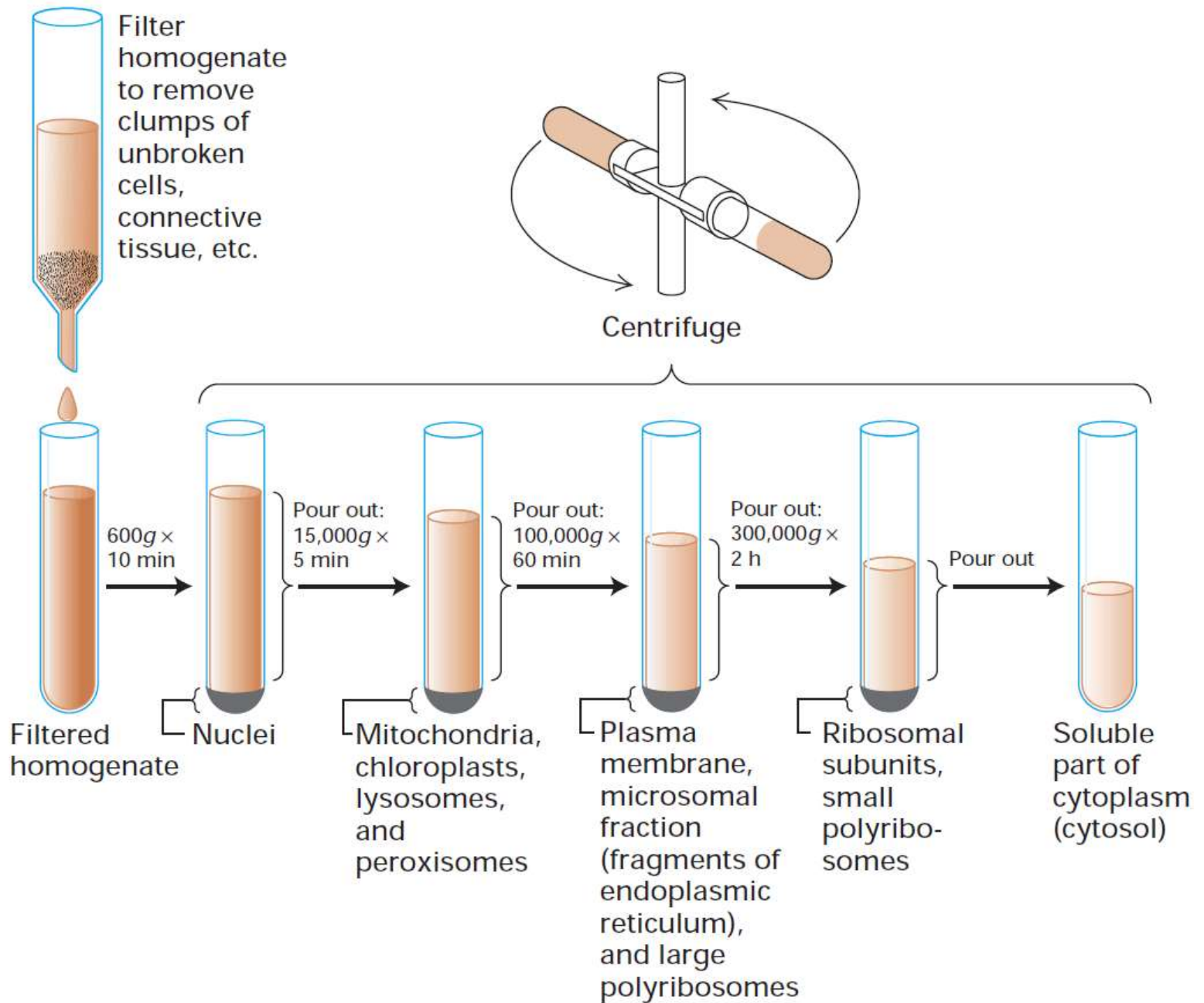


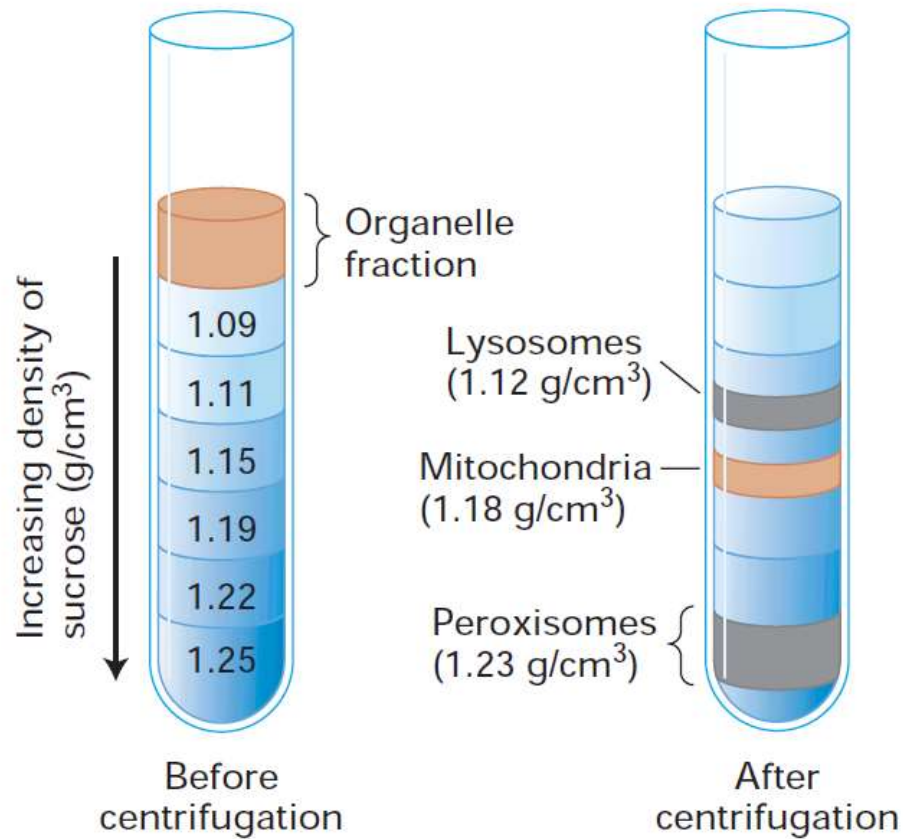
Střížný
homogenizátor



Třecí miska







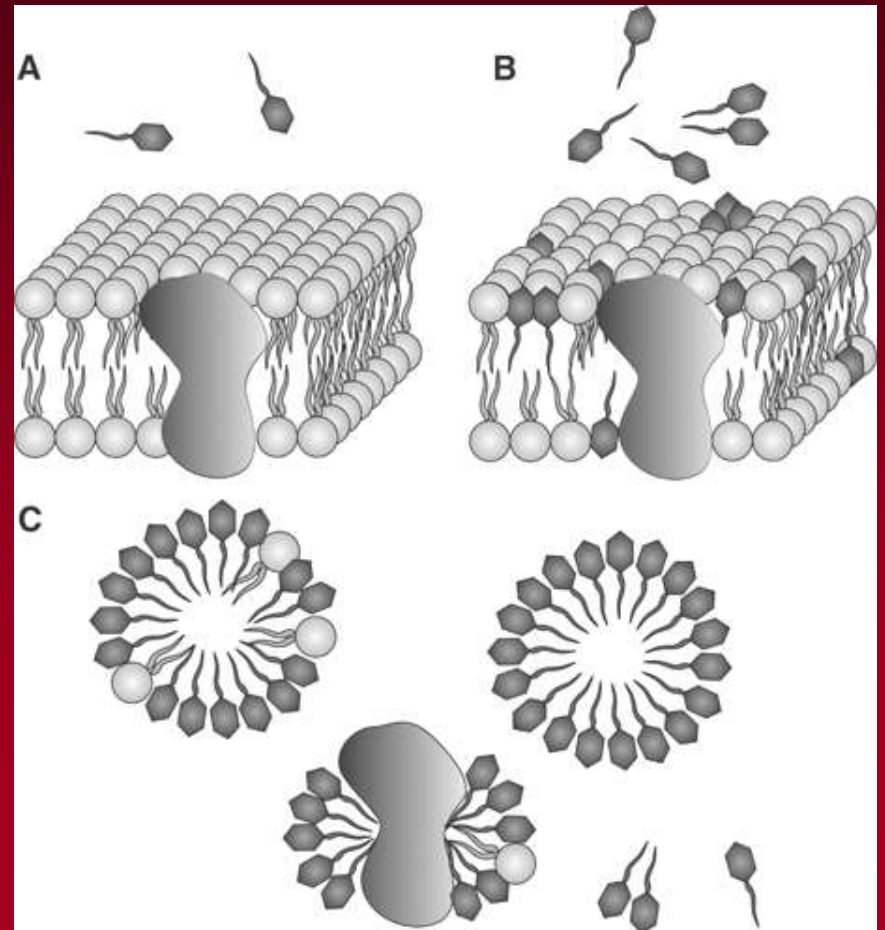
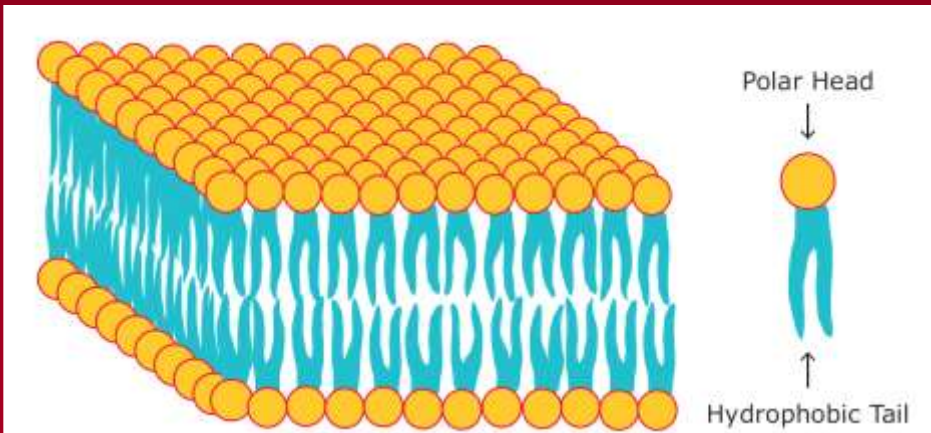
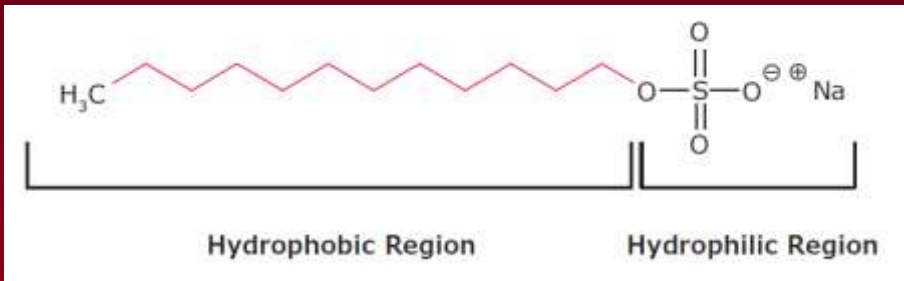
METODY PRÁCE S PROTEINY

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

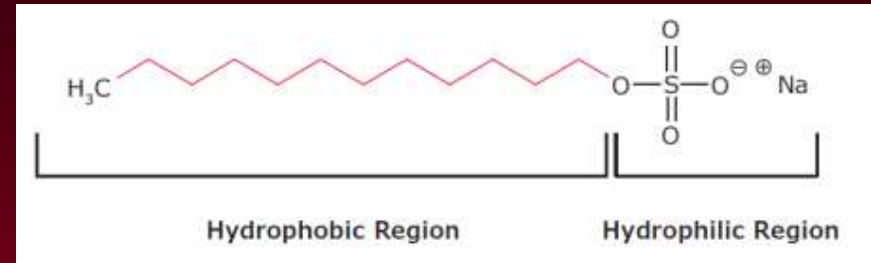
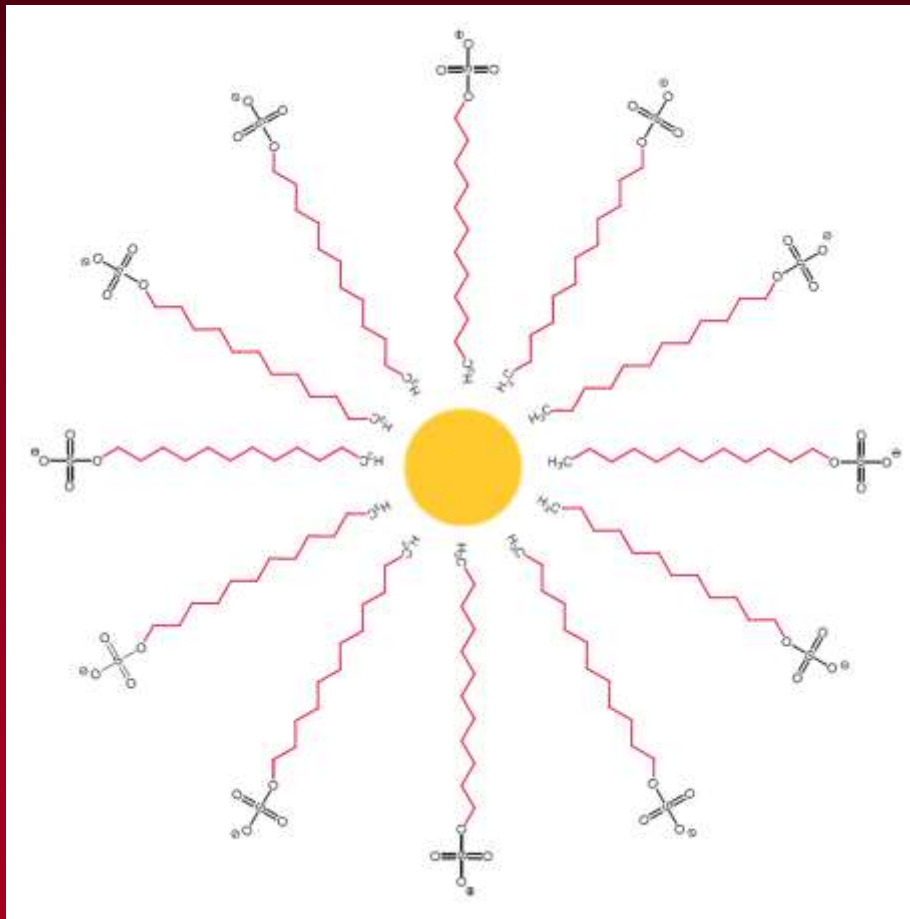
Detergency

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

SDS

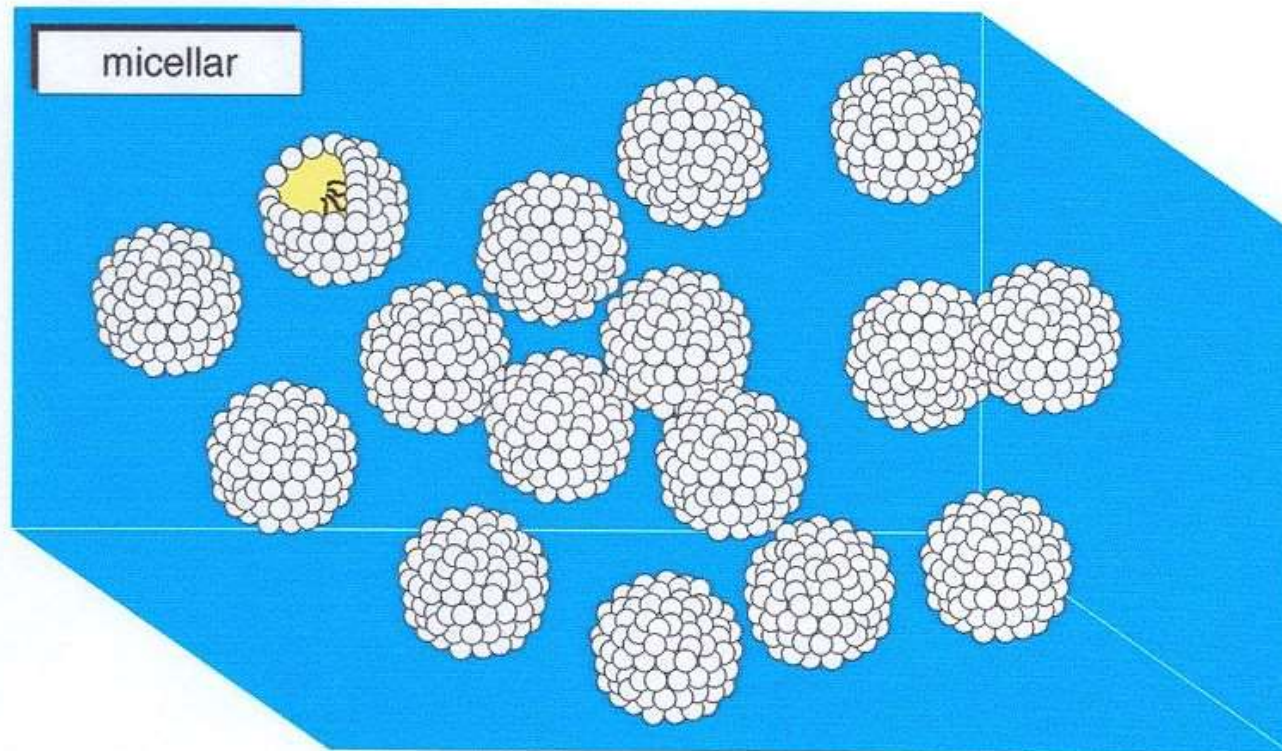


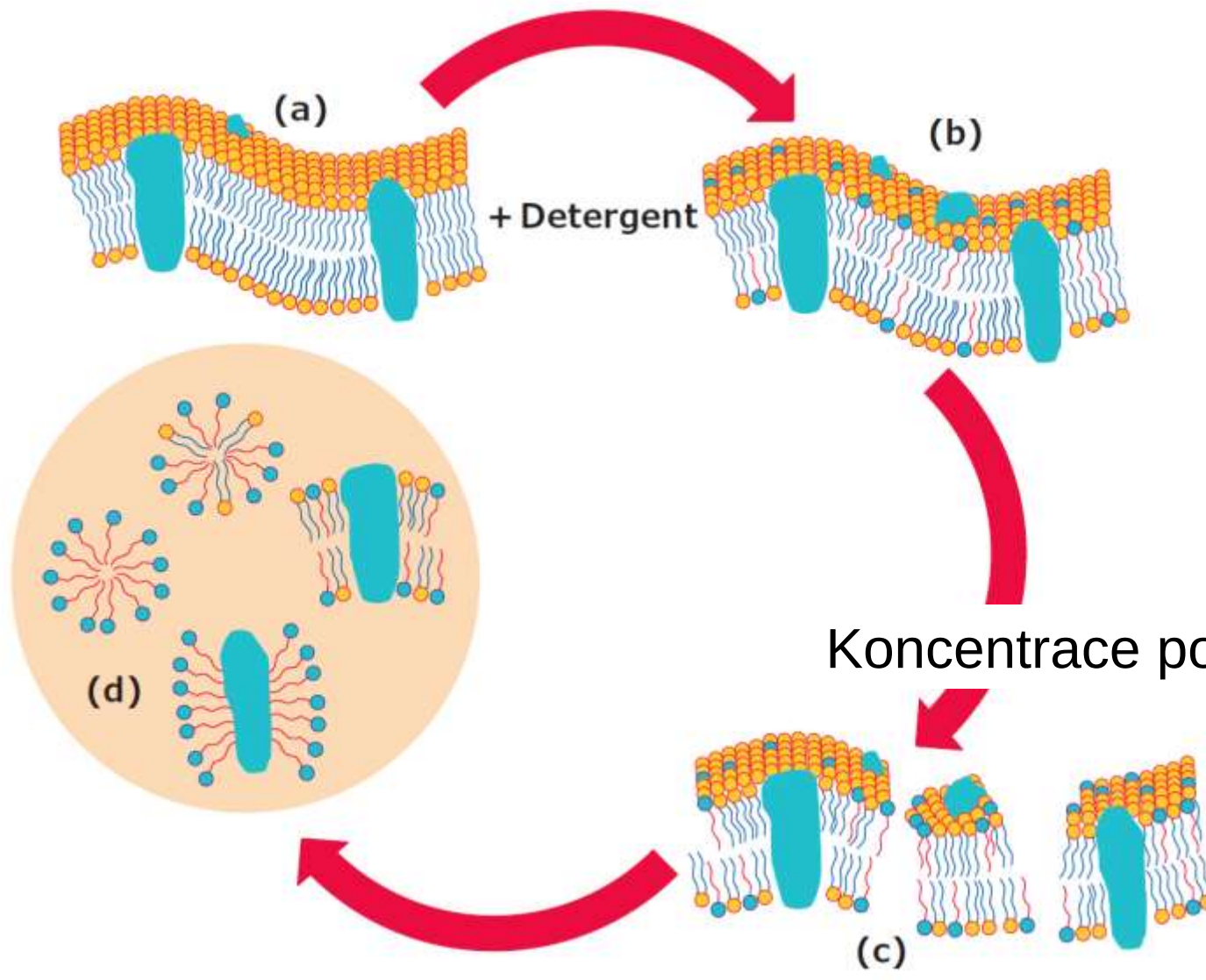
CMC (kritická micelární koncentrace) –koncentrace volného detegentu při jejímž překročení se vytvářejí micely definované velikosti (62 molekul pro SDS, 18 kDa)



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.





+ Detergent

Koncentrace pod CMC

Koncentrace nad CMC

Properties of common detergents.

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

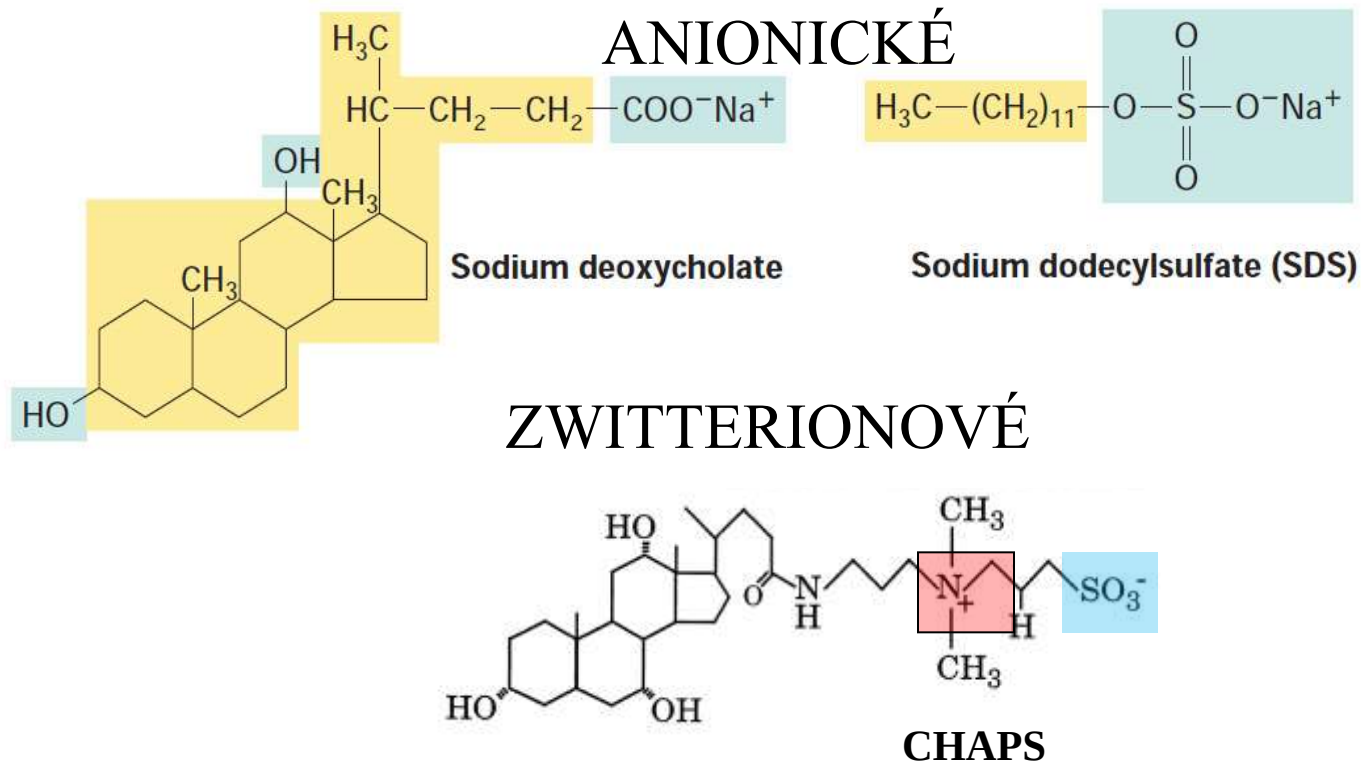
CMC – Critical Micellar Concentration

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

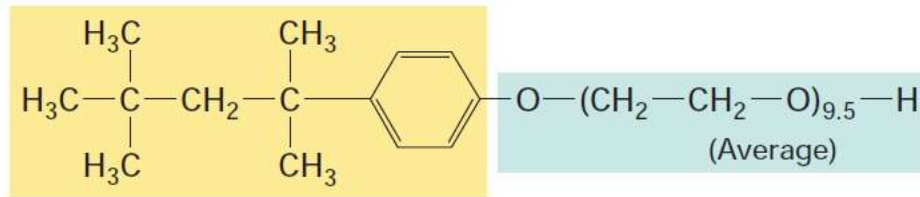
- Ionogenní (SDS, CHAPS, deoxycholate...)

Silnější, většinou denaturující

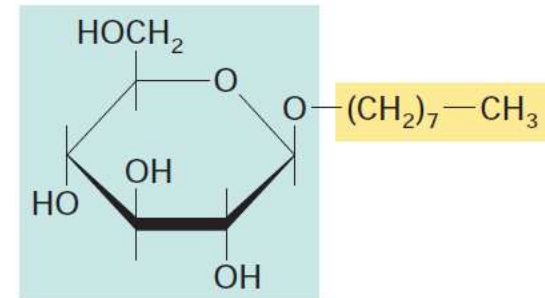


Detergency

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!**

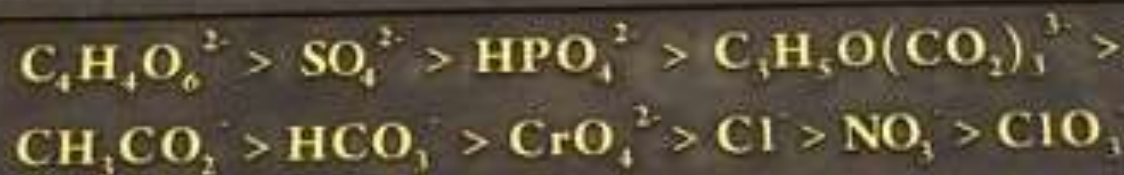
Precipitace v praxi :

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



Franz Hofmeister

VORLESESALE PLECHER CHEMIE PROF. FRANZ HOFMEISTER (1814-1882)
 SEINER KLEINEN ZEITUNGSZEITUNG SEIN VORLESUNGSGEBÄUDE HOFMEISTER
 VORLESUNGSGEBÄUDE UND SEINER VORLESUNGSGEBÄUDE HOFMEISTER



IN DIESEM GEBÄUDE FORSCHTE DER BERÜHMTE CHEMIE-
 PROF. FRANZ HOFMEISTER (1814-1882), WELCHER DIE VERHÄLTNISSE
 DER MINERALIEN IN EINER VORLESUNGSGEBÄUDE UND SEINER VORLESUNGSGEBÄUDE
 HOFMEISTER, SEINER VORLESUNGSGEBÄUDE



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^- I^- ClO_4^- SCN^-

Anions

↑ Precipitate

↓ Denaturation

↑ Protein stability



↓ Precipitate

↑ Denaturation

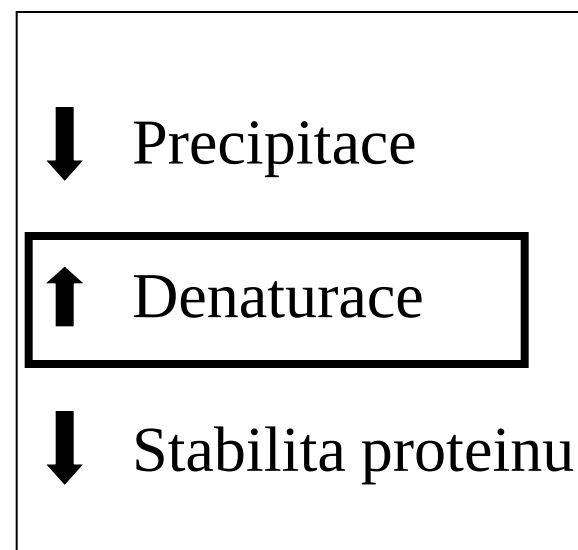
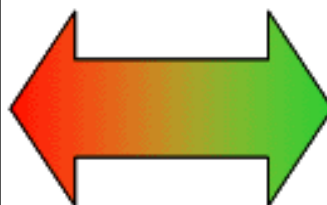
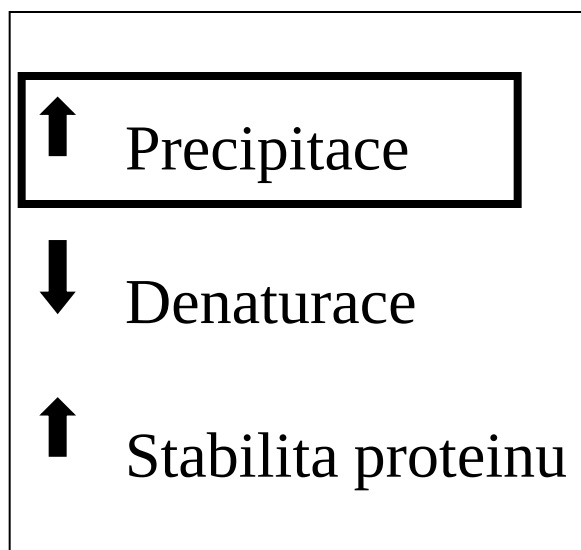
↓ Protein stability



Franz
Hofmeister
(1850-1922)

HOFMEISTER SERIES

Cations								[CH ₆ N ₃] ⁺ . guanidinium ⁺	
NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Li ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺				
Anions									
SO ₄ ²⁻	HPO ₄ ²⁻	acetate ⁻	citrate ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	ClO ₃ ⁻	I ⁻	ClO ₄ ⁻	SCN ⁻



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



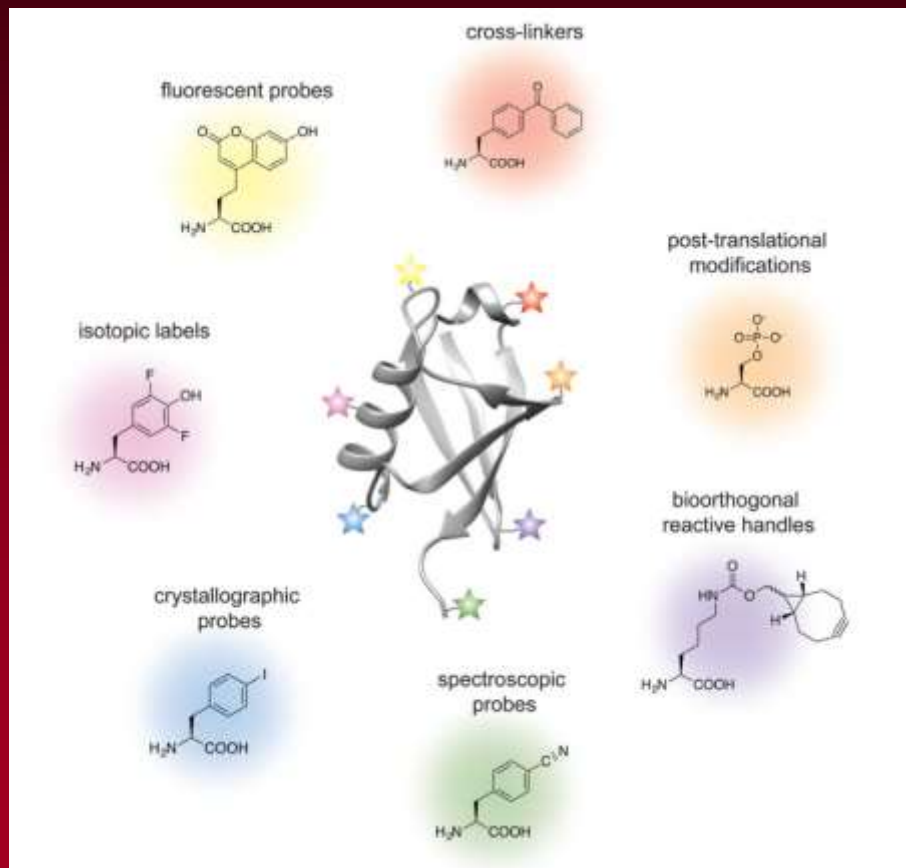
- Komplexy AA s pigmenty (CBB G250)
– dle Bradforda



METODY PRÁCE S PROTEINY

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

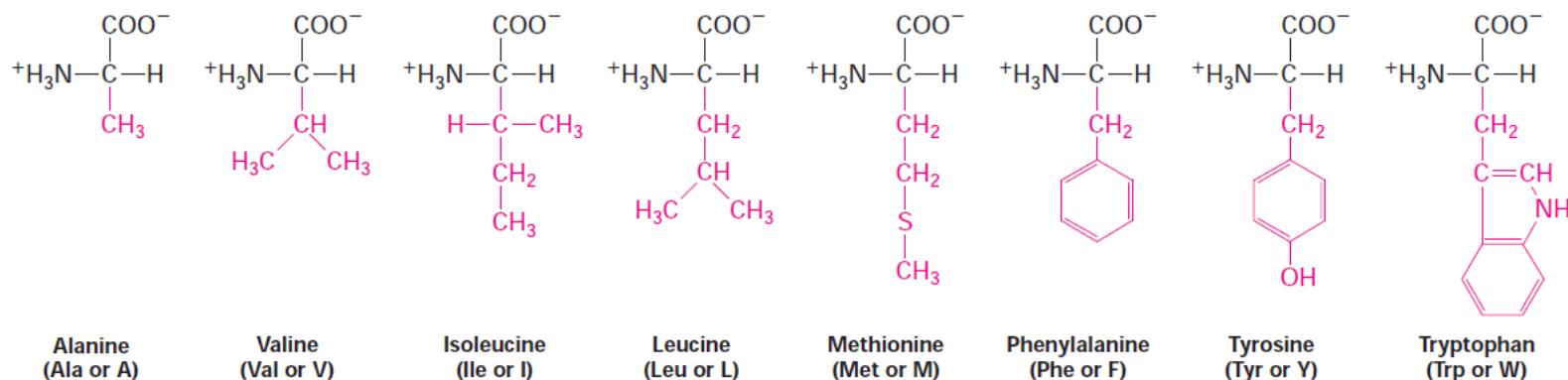
ZNAČENÍ A ZAKOTVOVÁNÍ PROTEINŮ



Reaktivní skupiny bílkovin

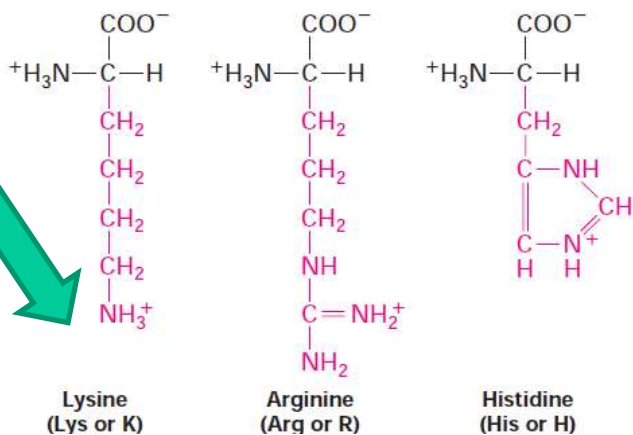
sulfhydryl (–SH)
primární amin (–NH₂)
karboxyl (–COOH)
karbonyl sacharidu (–CHO)

HYDROPHOBIC AMINO ACIDS

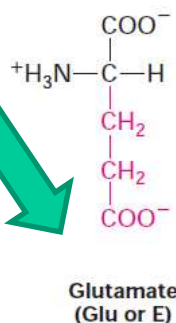
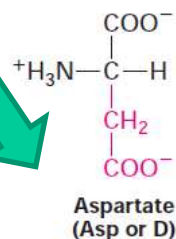


HYDROPHILIC AMINO ACIDS

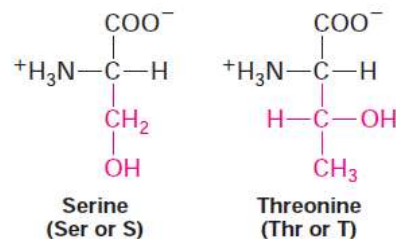
Basic amino acids



Acidic amino acids



Polar amino acids with uncharged R groups



Vhodně reaktivní:

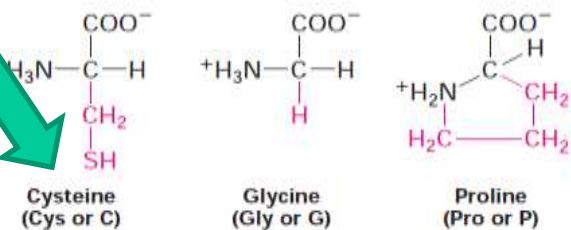
Cysteine (-SH)

Lysine (epsilon aminogroup)

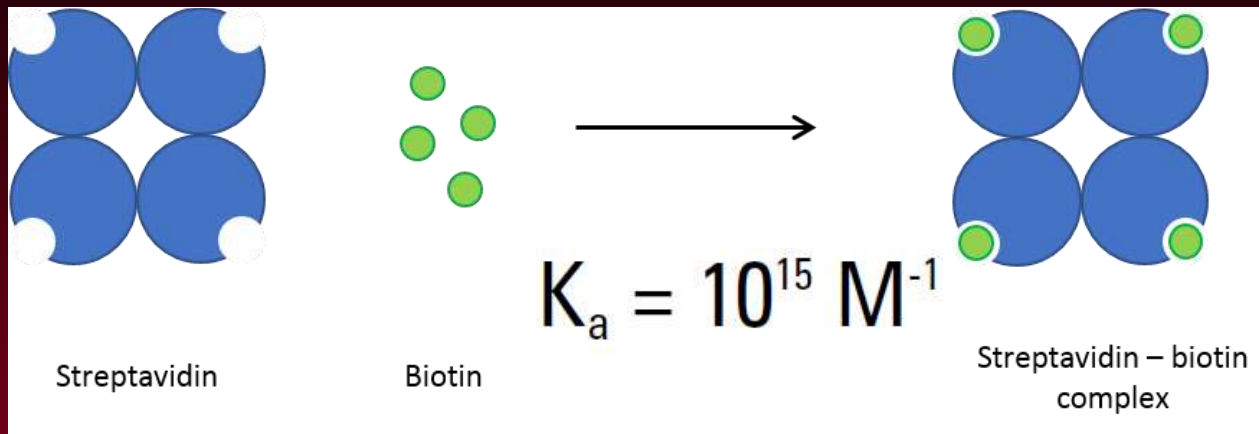
N-terminus - (amino group)

C-terminus (carboxyl + Asp, Glu)

SPECIAL AMINO ACIDS



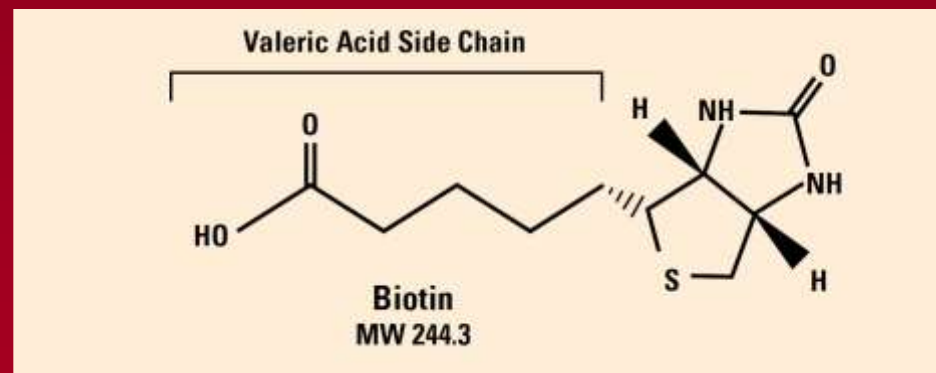
Vazba Avidin (Streptavidin)-Biotin



Nejsilnější známá nekovalentní interakce
mezi proteinem a ligandem

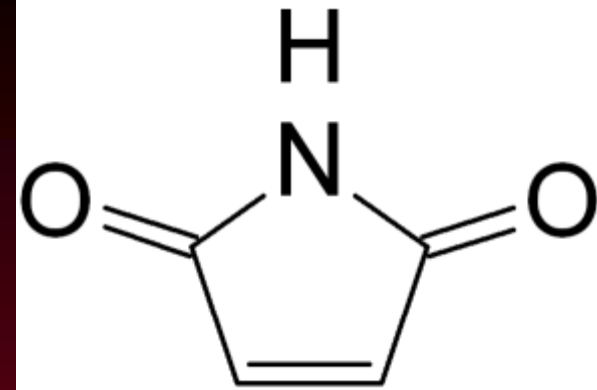
Avidin (Streptavidin), tetramerní proteiny 50-70 kDa

Biotin

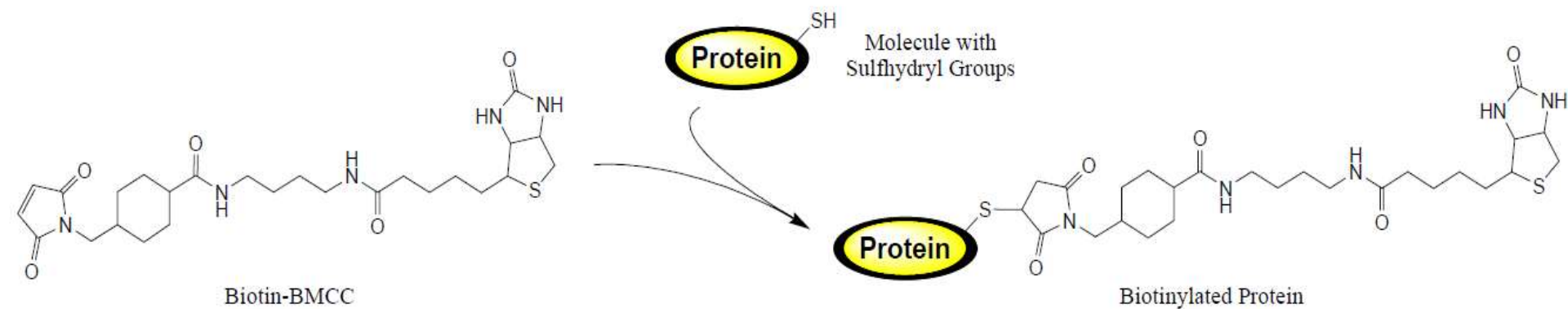


SH-

Cys

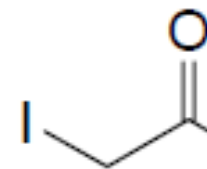


Maleimid

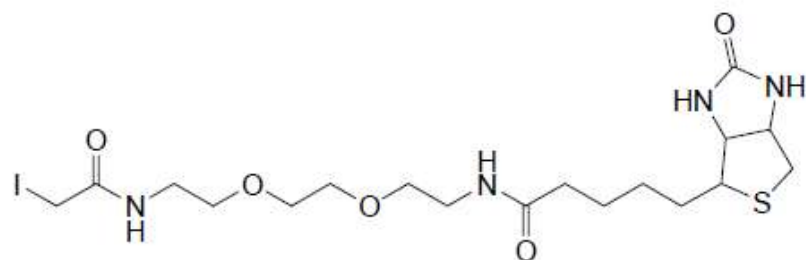


SH-

Cys

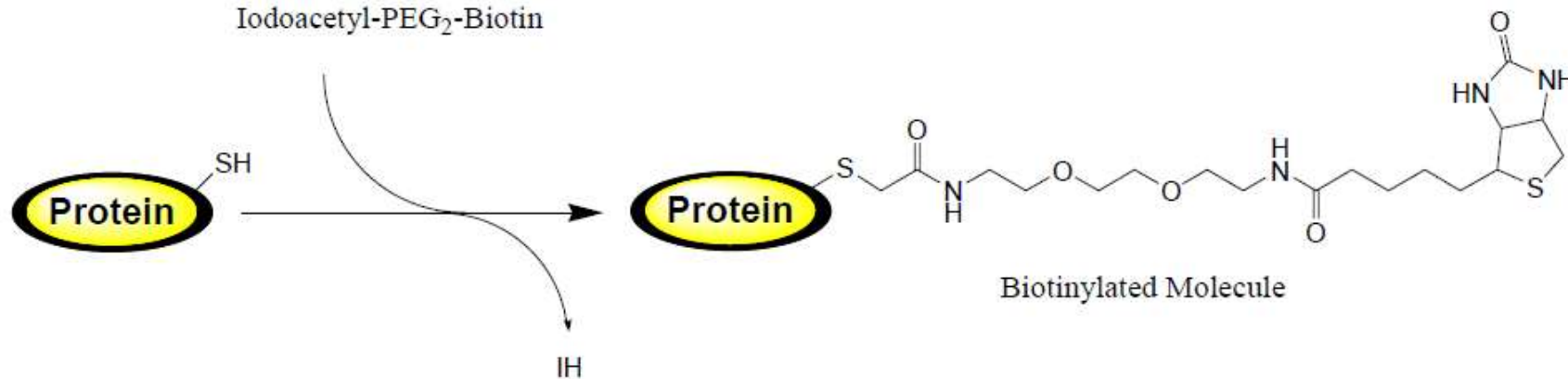


Iodoacetyl



Iodoacetyl-PEG₂-Biotin

PEG₂- inertní spacer



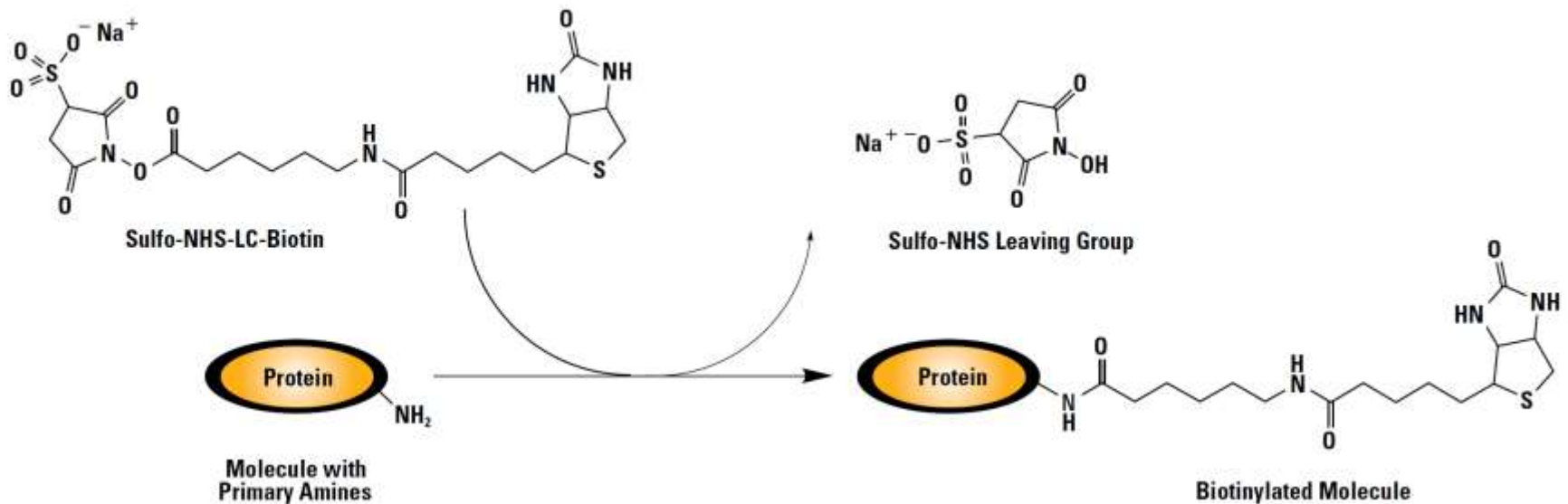
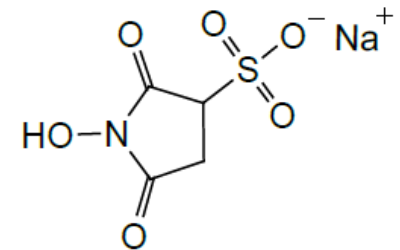
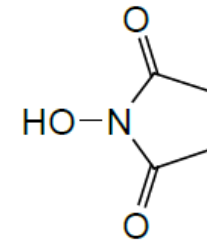
Biotinylated Molecule



N', epsilon aminoskupina Lys

N-hydroxysukcinimid (NHS)

sulfo N-hydroxysukcinimid (NHS)

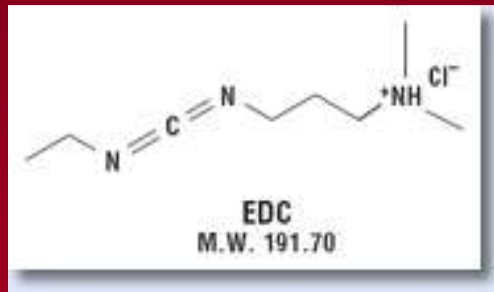
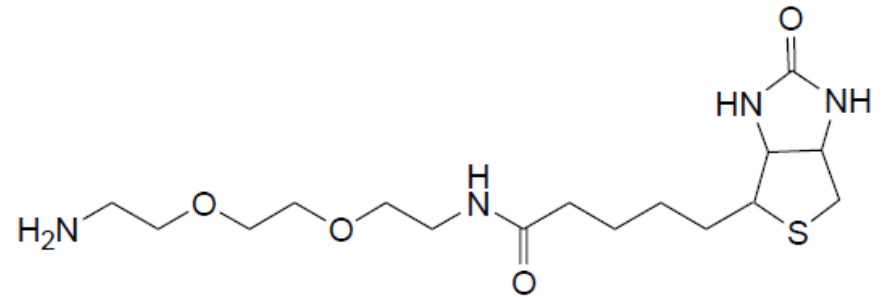


COOH-

C', Asp. Glu

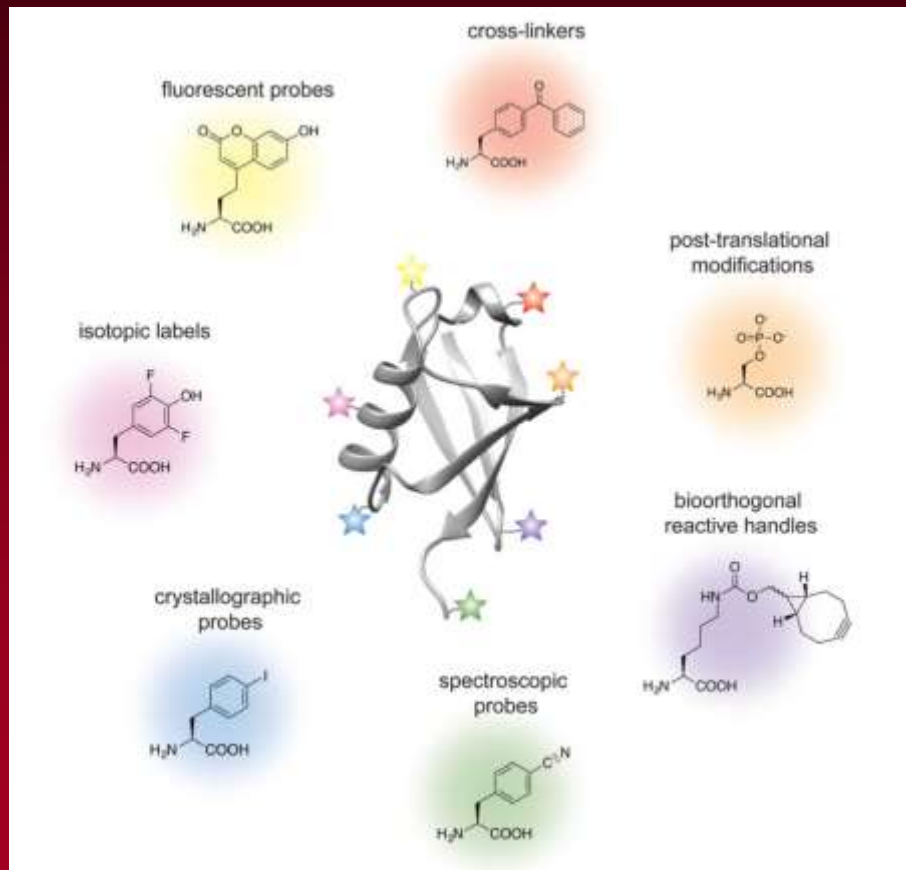
Protein-COOH

+



kroslinker EDC

ZNAČENÍ A ZAKOTVOVÁNÍ PROTEINŮ



Reaktivní skupiny bílkovin

sulfhydryl ($-\text{SH}$)

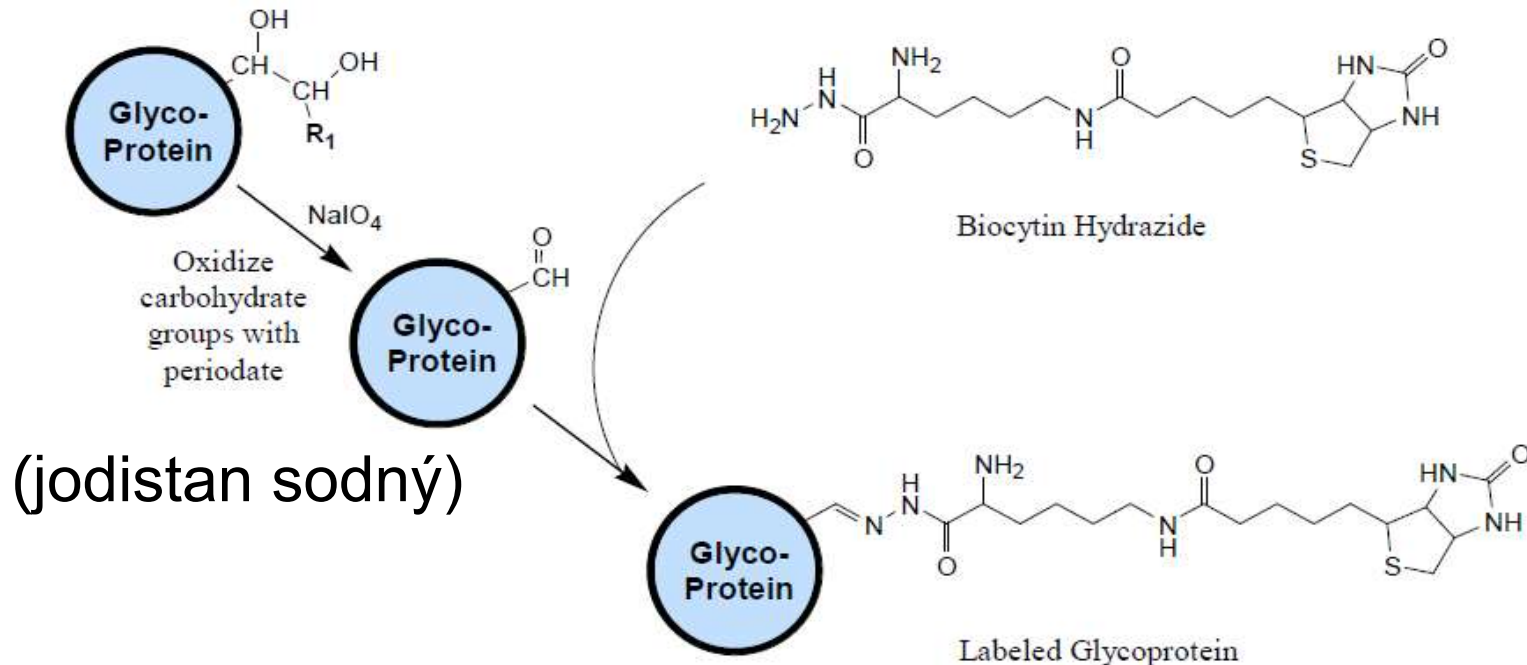
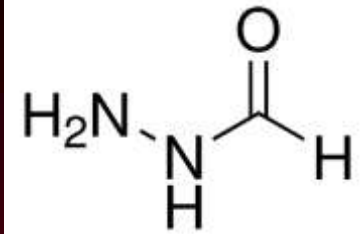
primární amin ($-\text{NH}_2$)

karboxyl ($-\text{COOH}$)

karbonyl sacharidu ($-\text{CHO}$)

Cukry

hydrazid



Biotin Hydrazide **bind to oxidized carbohydrates through the hydrazide group ($-\text{NH}-\text{NH}_2$), forming a hydrazone linkage.** Oxidation of glycoproteins generates reactive aldehydes that react specifically with hydrazide groups.