

PROTEOMIKA 2025

- Proteomika, Metody práce s bílkovinami
- Separační metody, digesce a principy ID bílkovin pomocí MS
- Principy hmotnostní spektrometrie, instrumentace
- Hmotnostní spektrometrie v proteomice, analýza PTM
- ID proteinů, DDA, DIA, databáze, FDR
- Kvantifikace, isotopy, LFQ, cílená proteomika
- Design experimentu, zpracování dat, bioinformatika
- Příprava vzorků, Proteomika membránových proteinů, (Petrák 1/12)
- **Proteinové komplexy, speciální metody, klinická proteomika, (Petrák 8/12)**

PROTEOMIKA 2025

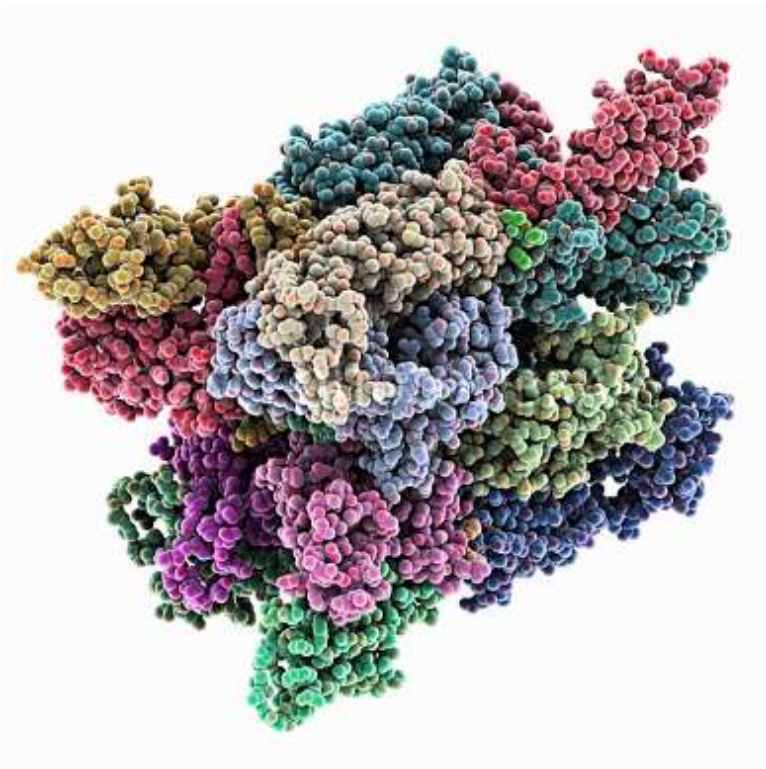
Proteinové komplexy

**Speiciální izotopové
metody**

Klinická proteomika

Biomarkery

ANALÝZA PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ



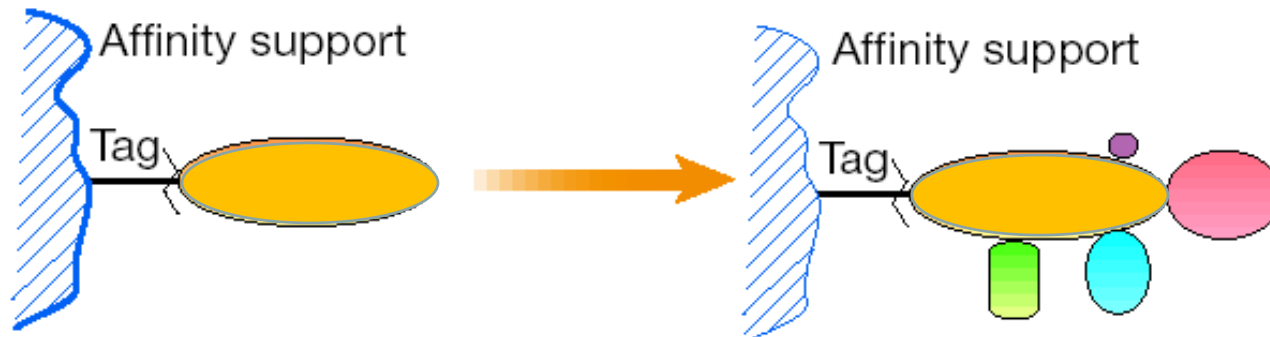
Afinitní purifikace komplexů

- s pomocí protilátky
- přes „tagované“ proteiny

Proximity labeling

IMUNOAFINITNÍ IZOLACE PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ

- 1) matrix s **protilátkou** proti jedné složce komplexu
- 2) matrix s **rekombinantním proteinem** (složkou komplexu) nebo jinou „návnadou“



AFINITNÍ MATRIX

Aktivované matrice:

NHS Sepharose.....lze vázat za aminoskupinu (succinimid)

CNBr Sepharose.....lze vázat za aminoskupinu

EAH Sepharoselze vázat protein za karboxyl (karbodiimid)

Thiol sepharose.....lze vázat za SH cysteinu

Matrice s afinitou pro IgG (Fc fragment)

Protein G Sepharose

Protein A Sepharose

Protein A, G magnetic beads

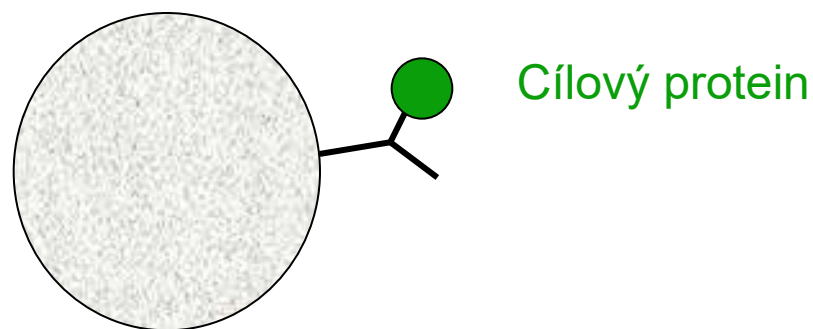
Matrice s afinitou pro glykoproteiny

ConA Sepharose

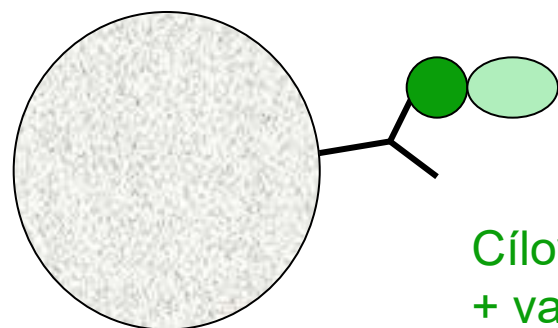
Velké ligandy (DNA, protein) lze vázat přímo na matrix.

Malé ligandy (nukleotid, NADP, hormon...) se váží přes inertní „spacer arm“.

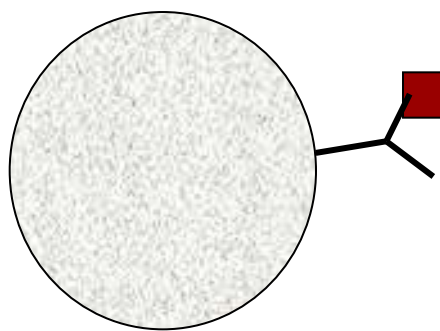
Typy možných interakcí při imunoprecipitaci



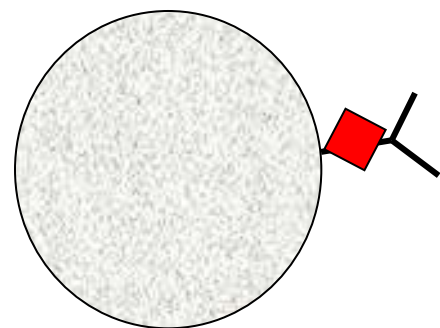
Cílový protein



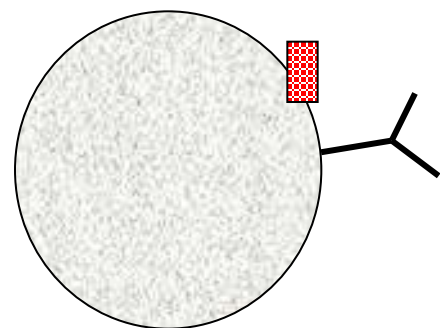
Cílový protein
+ vazebný partner



Křížově reagující
protein
(a jeho partneři)



Protein nespecificky
vázaný **na Ab**
(a jeho partneři)



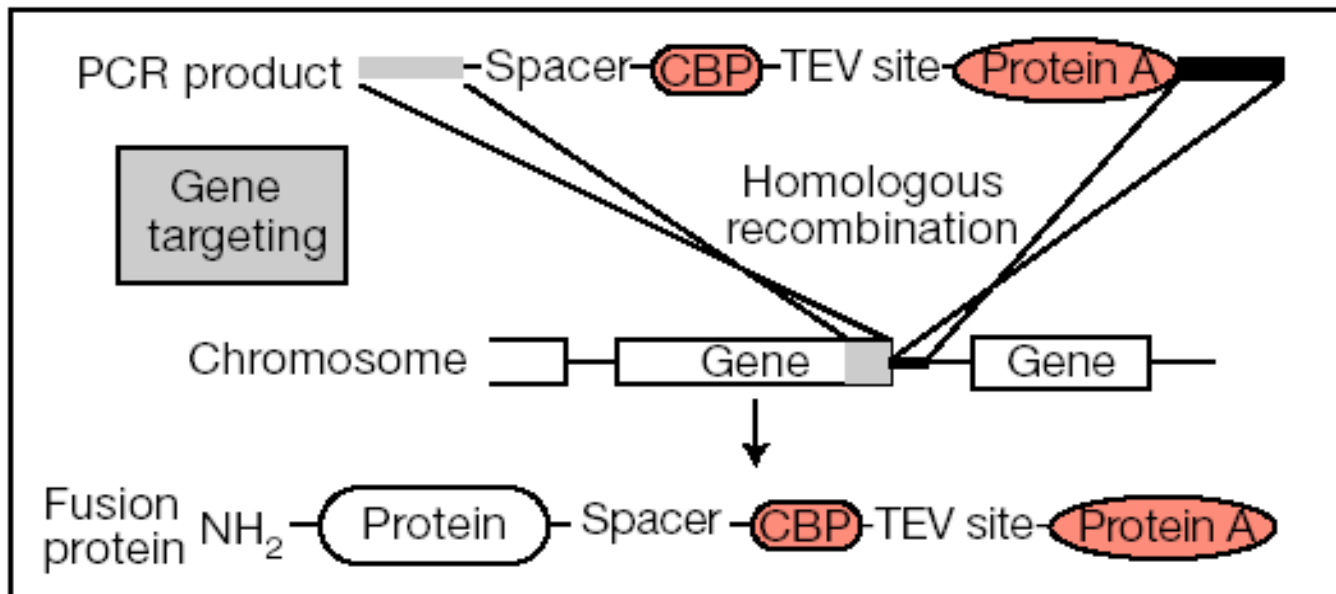
Nespecificky
vázaný **na matici**
(a jeho partneři)

TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)

Anne-Claude Gavin et. al., (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 142-147

CBP- calmodulin-binding protein

TEV – štěpné místo virové proteázy TEV

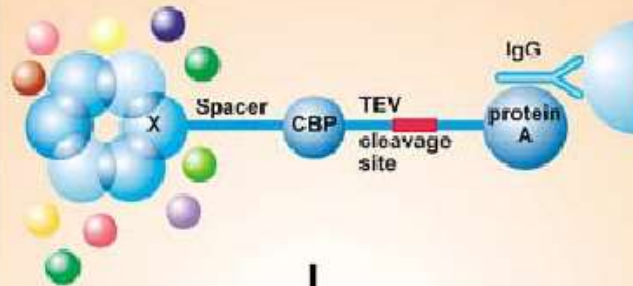


TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)



B First affinity purification

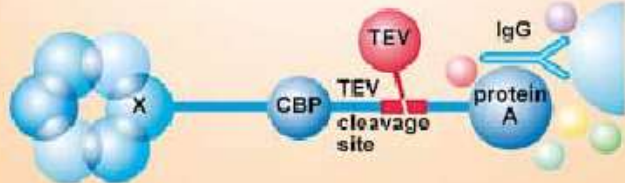
Protein A-IgG Interaction



Wash

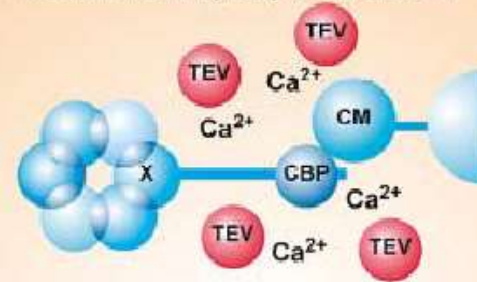


TEV cleavage



Second affinity purification

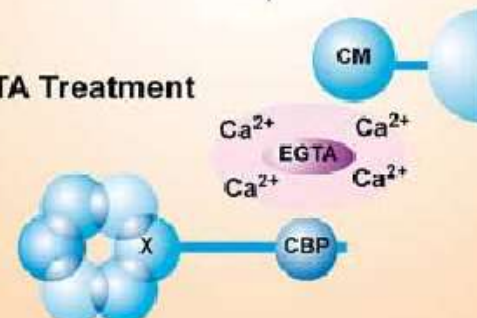
CBP-Calmodulin (CM) Interaction



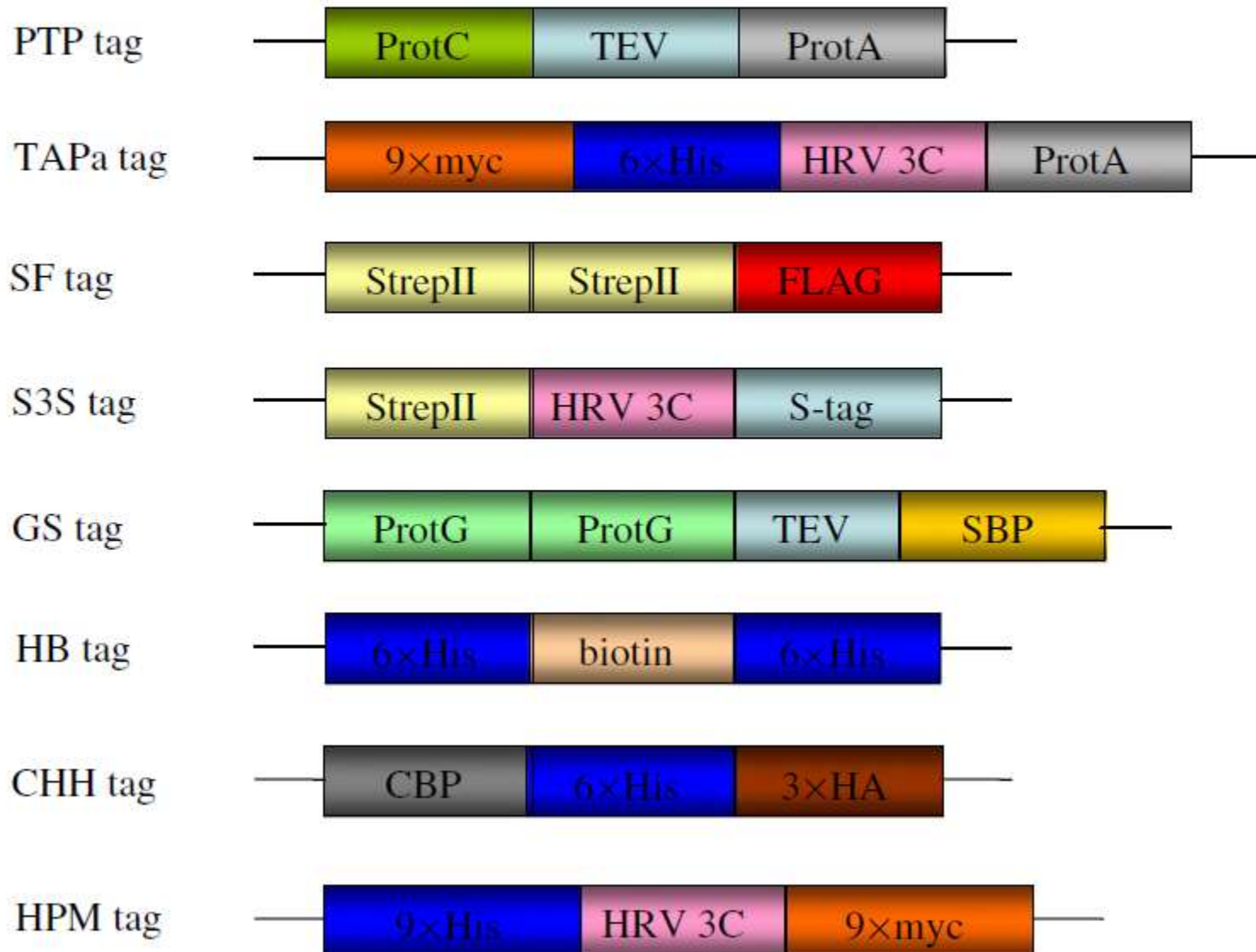
Wash



EGTA Treatment



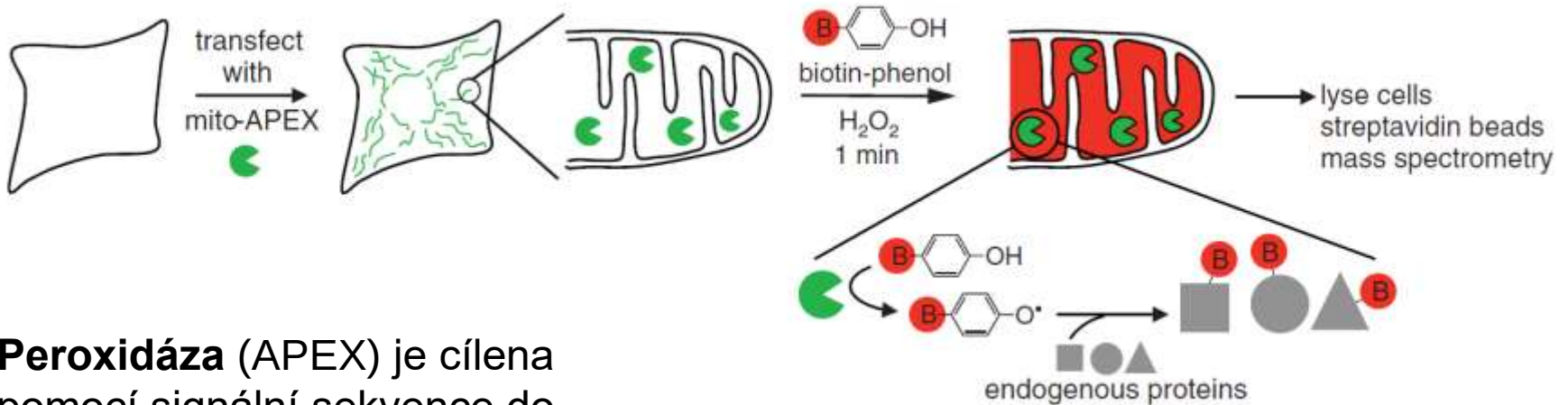
TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)



Proximity labeling

(k určení lokalizace proteinů, mapování kompartmentu)

APEX APEX2

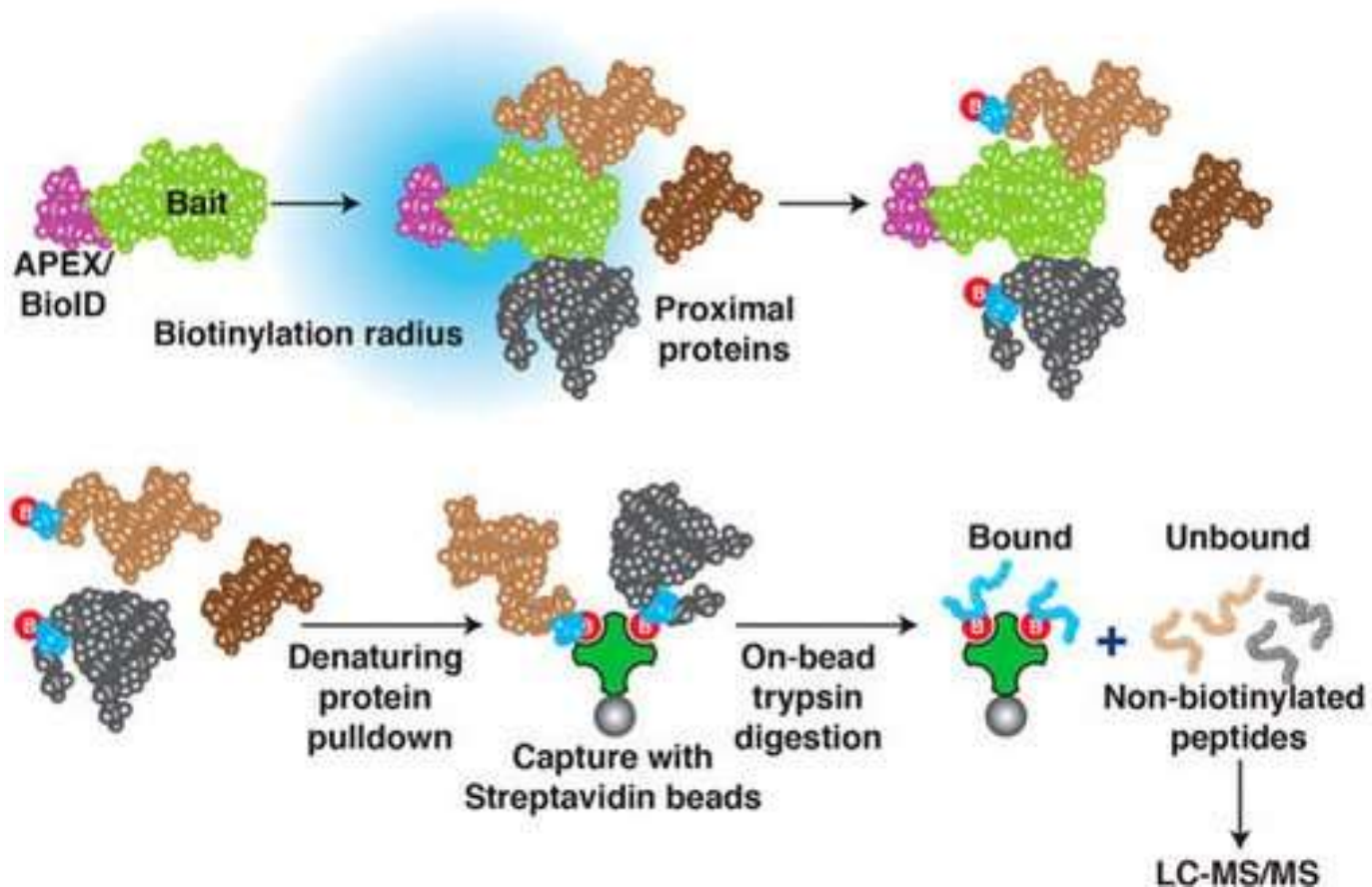


Peroxidáza (APEX) je cílena pomocí signální sekvenky do cílového kompartmentu (vnitřní membrána MT, ER....a pod) kde v přítomnosti **biotin-fenolu** „označí“ proteiny v okolí (Tyr). Označené proteiny se izolují streptavidinem.

Toxicita peroxidu, problematické zajištění substrátu

Proximity labeling

BioID



Protein zájmu je exprimován jako **fuzní protein s bakteriální biotin ligázou** která v přítomnosti biotinu „označí“ proteiny v nejbližším okolí. Označené proteiny se izolují streptavidinem. **Pomalá rekční kinetika**, dostatečná biotinylace v řádu hodin.

Proximity labeling

TurboID a split-TurboID

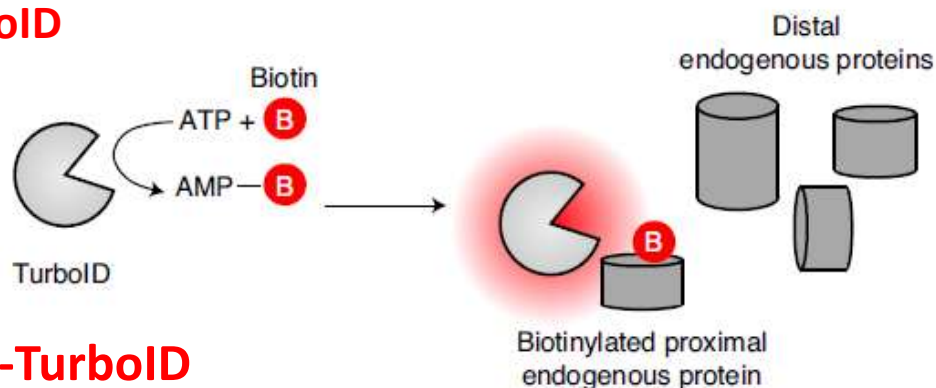
Mutantní kvasničné biotin ligázy – cílená mutagenese a selekce

Aktivovný biotin difunduje z aktivního místa do bezprostředního okolí

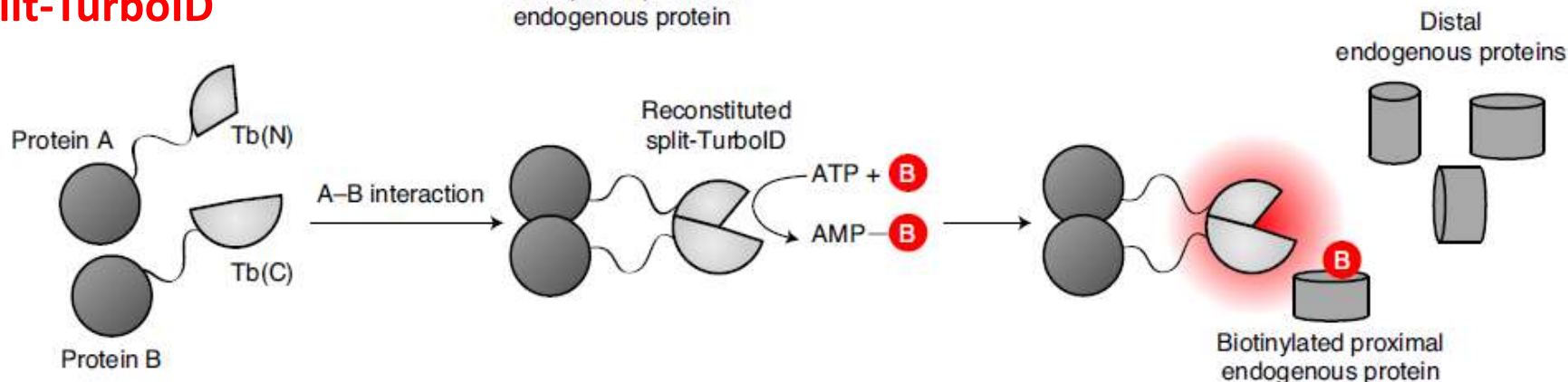
Jeden nebo dva fúzní proteiny

s rychlou kinetikou v řádu minut, nižší toxicita

TurboID



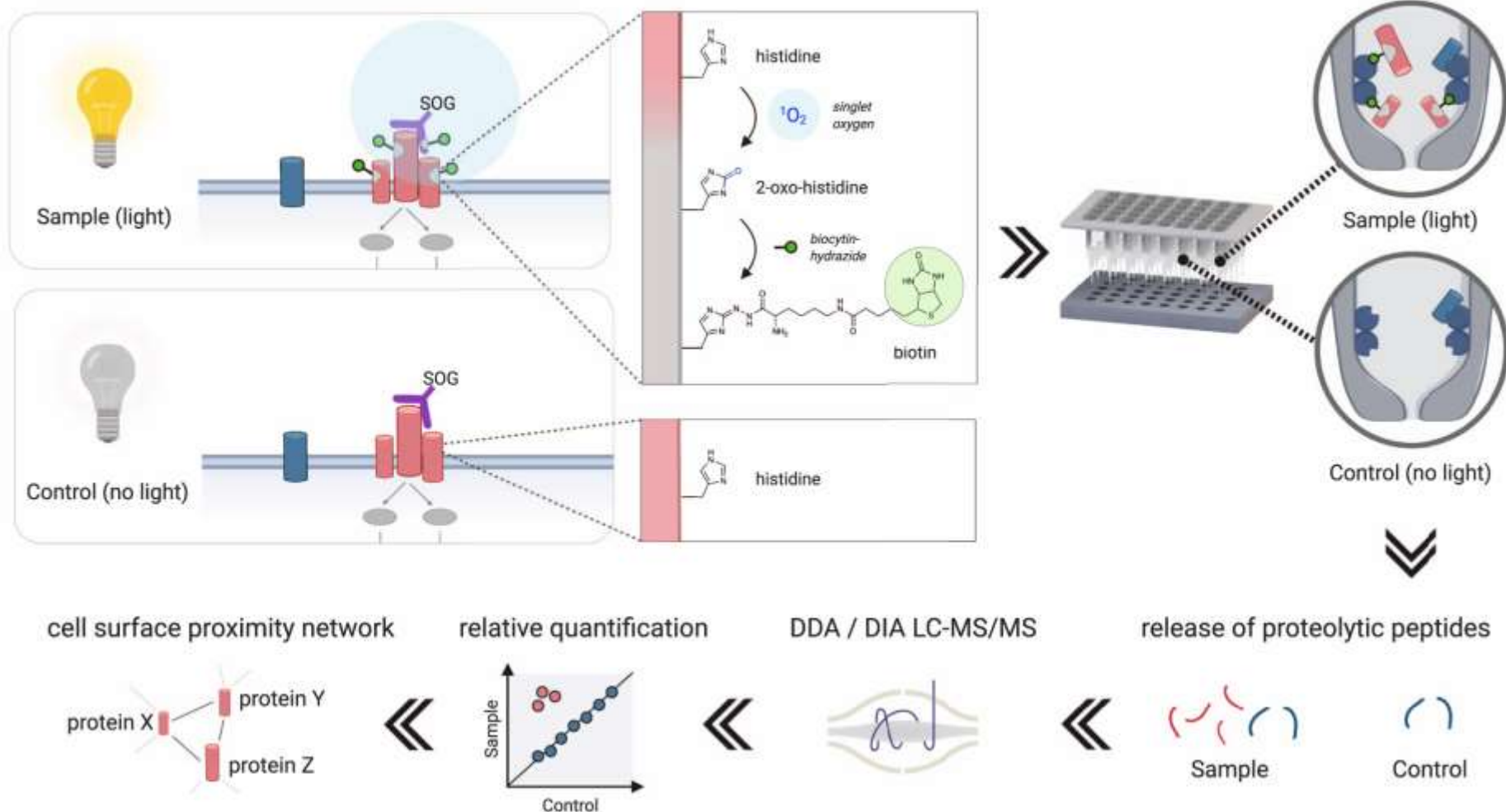
split-TurboID



LUX-MS značení okolních histidinů po jejich oxidaci
(v okolí generátoru singletového kyslíku - SOG)
Pro mapování proteinových komplexů na povrchu buňky

ligand-guided and light-activated protein proximity labeling

high-throughput protein capture & processing



Pro mapování proteinových komplexů na povrchu buňky

ligand-guided and light-activated protein proximity labeling



PROTEOMIKA 2025

Proteinové komplexy

**Speiciální izotopové
metody**

Klinická proteomika

Biomarkery

Speciální využití metod založených na inkorporaci stabilních izotopů

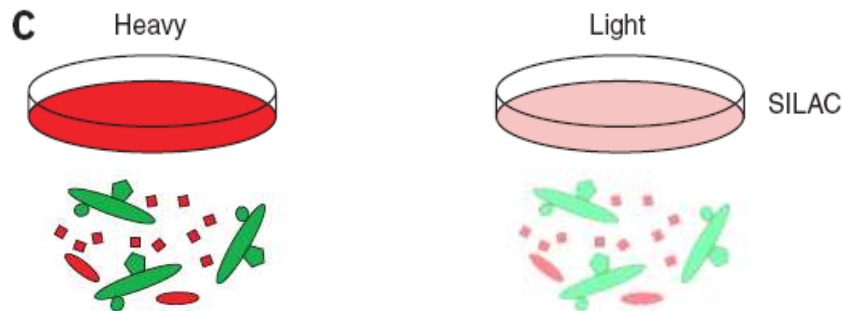
- Využití vzorku značeného SILAC jako srovnávacího standardu (**Super-SILAC**)
- Pulsed SILAC
- Pulse-chase SILAC
- Teplotní profilování (thermal profiling)

SILAC – Stable Isotope Labeling with Aminoacids in Culture

HEAVY
1-2 AA značené
stabilním izotopem

^{13}C -lysine

^{13}C -arginine

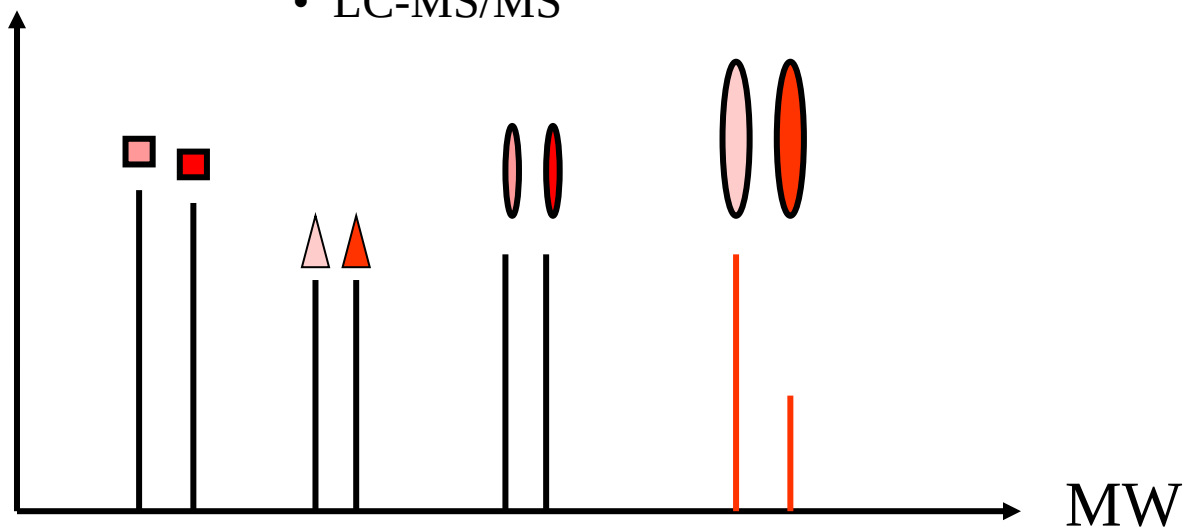


LIGHT
běžné AA

- smíchání
- subcell. frakcionace
- separace
- štěpení trypsinem
- LC-MS/MS

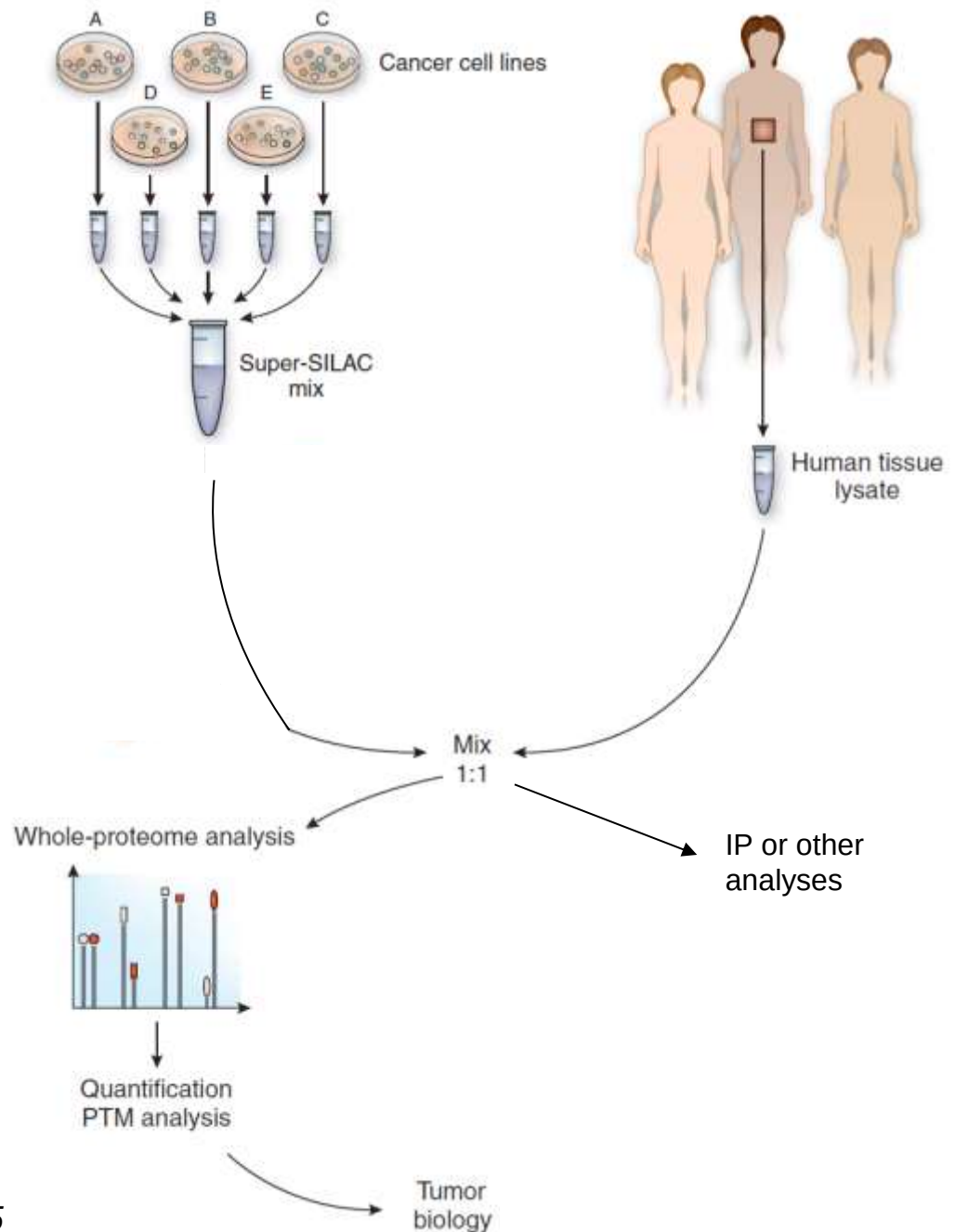
Bezsérové systémy
nebo dializované
sérum !

Kvantifikace MS
Identifikace MS/MS

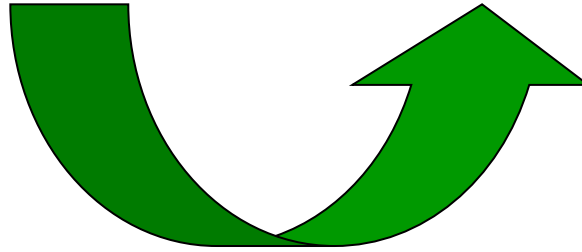


SUPER-SILAC

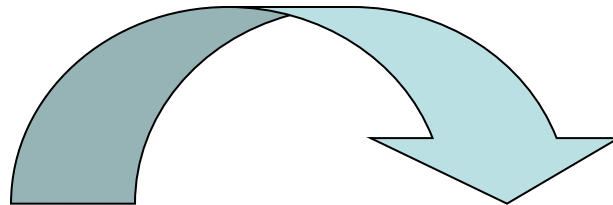
Expresní proteomika
pacientských nádorových
vzorků. Jako kontrolní
standard slouží
homogenát ze směsi
buněčných linií
odvozených ze stejného
typu nádoru naznačených
metabolicky „heavy“ Arg
a/nebo Lys.



Translace

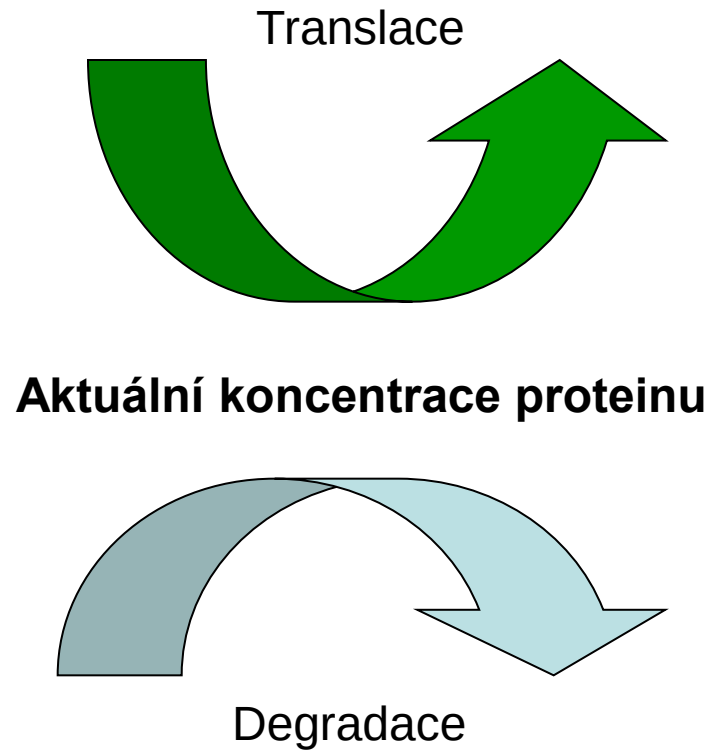


Aktuální koncentrace proteinu



Degradace

Přibývá jedna izotopová značka



Pulsed SILAC
Pulse-chase SILAC

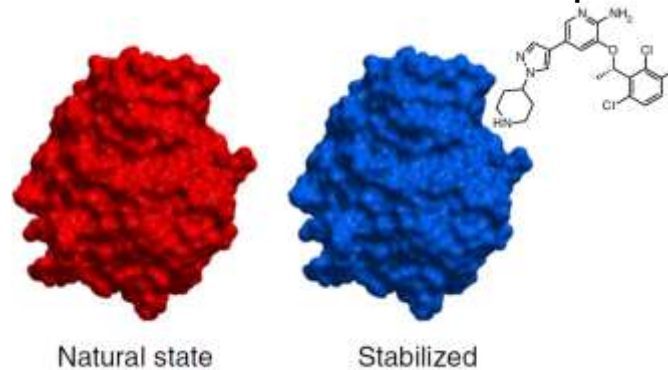


Pulse-chase SILAC

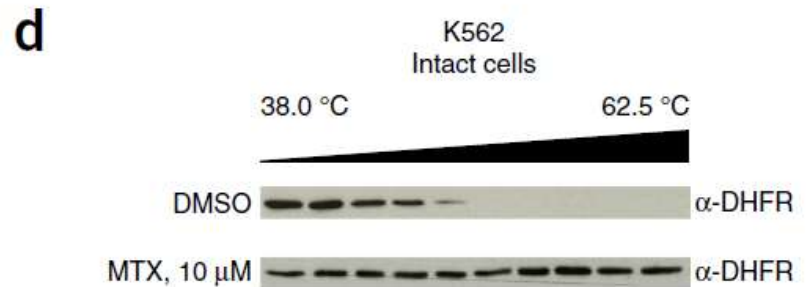
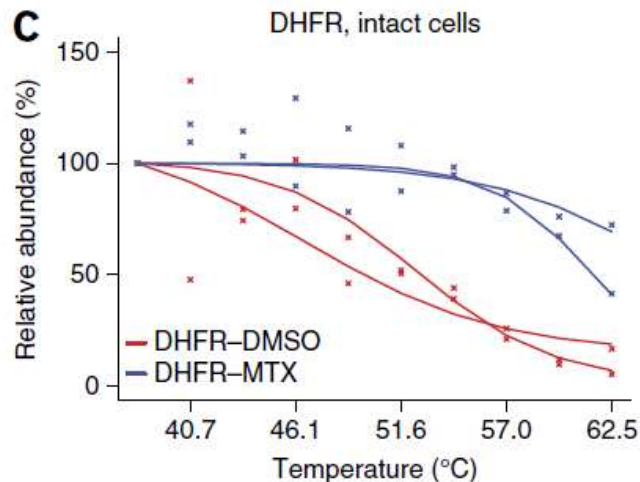
Ubývá druhá izotopová značka

THERMAL PROFILING

Vazba ligandu zvyšuje teplotní stabilitu PROTEINU, posouvá se teplota denaturace.



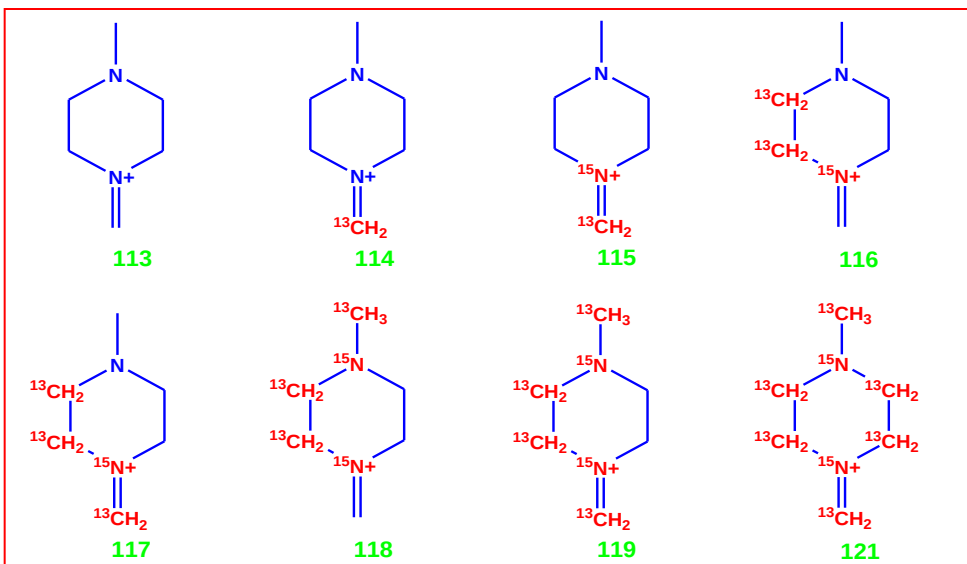
Lze monitorovat změnu teploty denaturace (teplota kdy dojde k precipitaci a „vypadnutí z roztoku“)



Detekce rozpustného proteinu v supernatantu

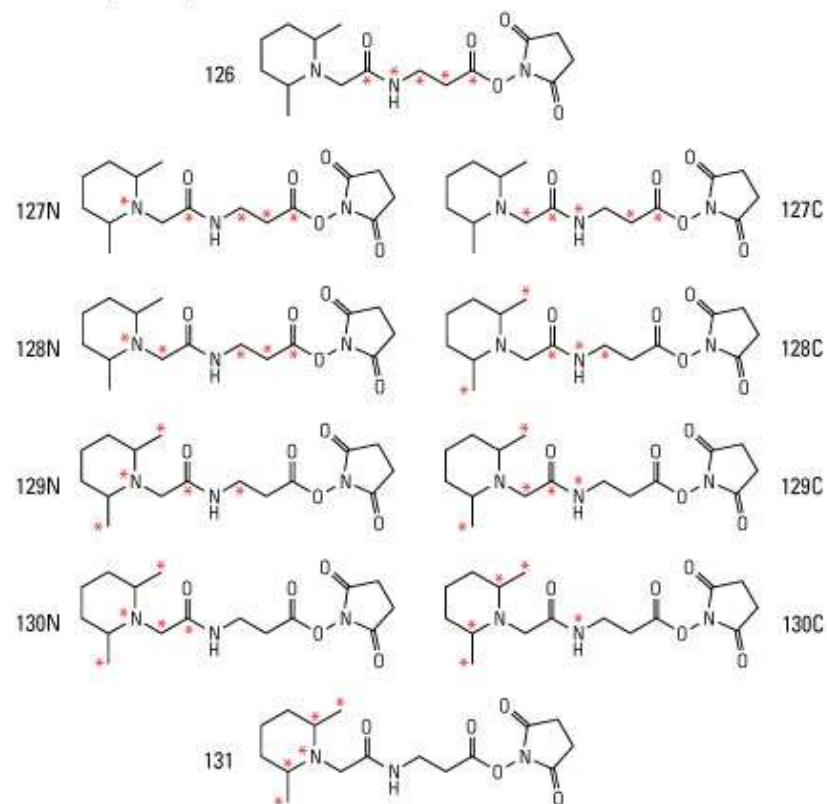
THERMAL PROFILING

iTRAQ 8plex Reagents

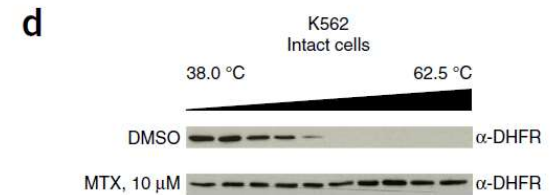
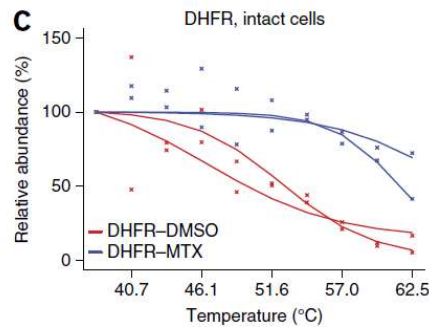
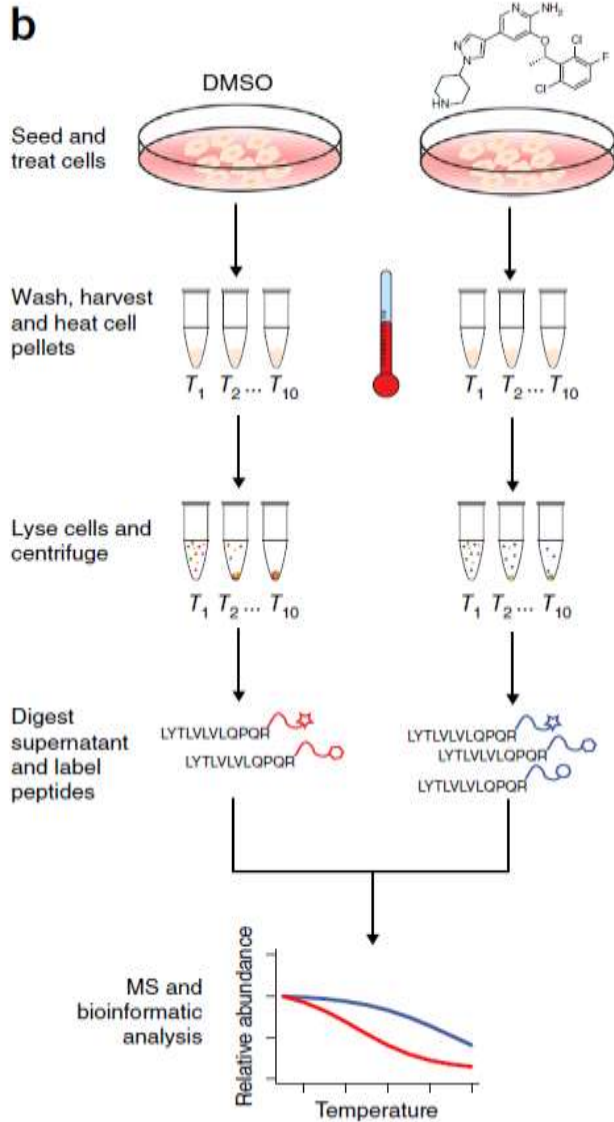


TMT 10 plex reagents

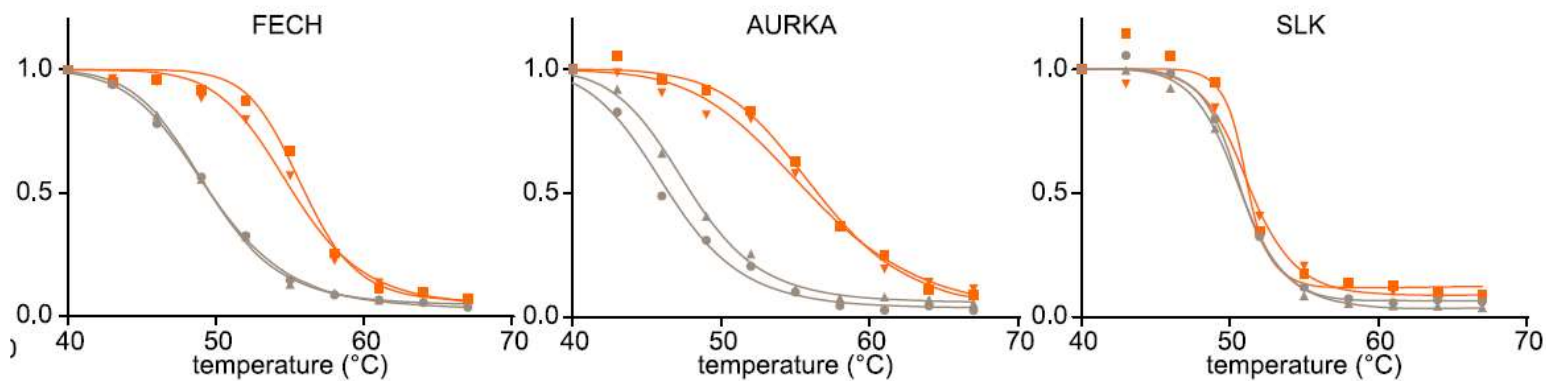
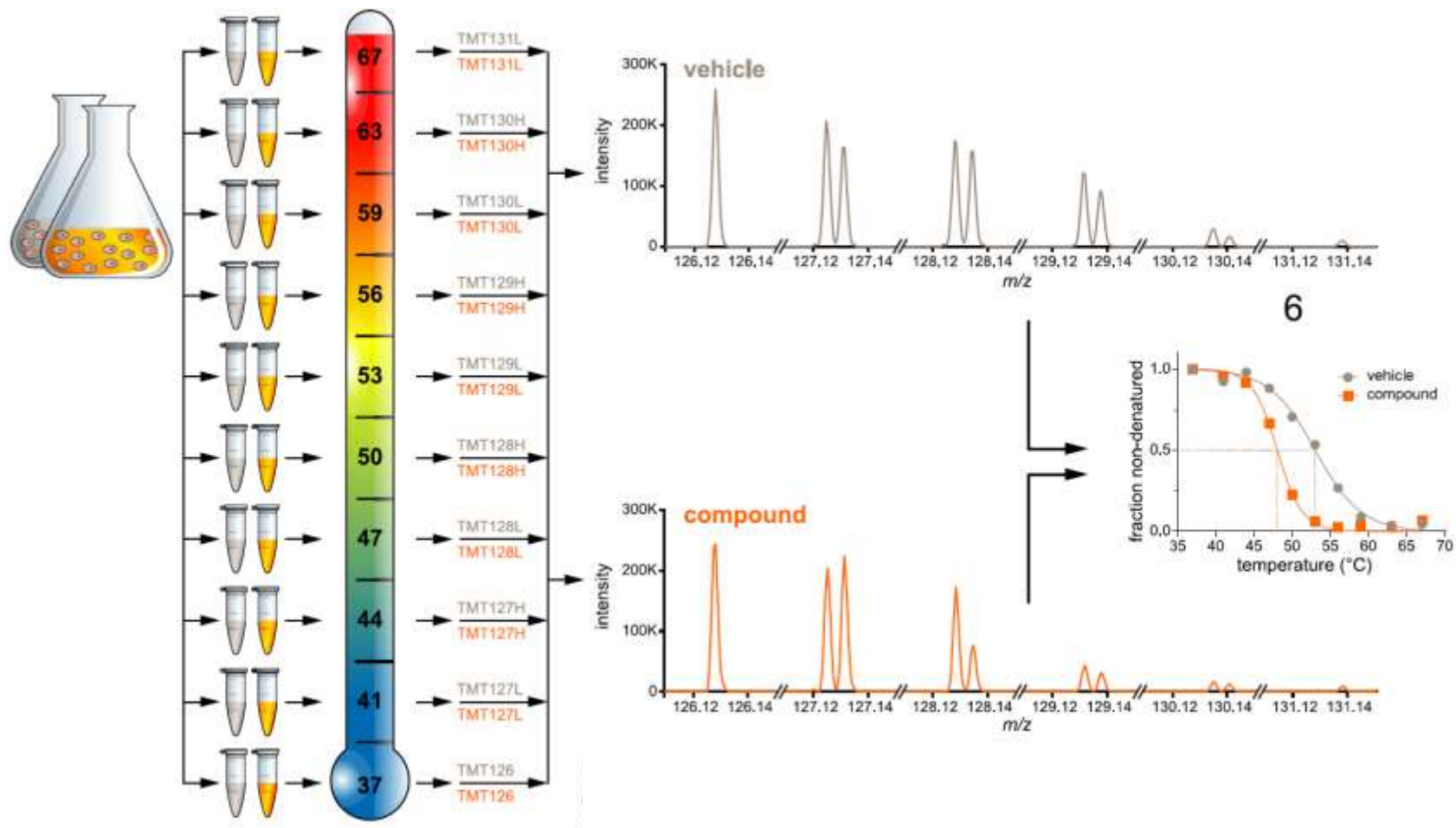
B. TMT10plex Reagents (TMT¹⁰)



THERMAL PROFILING



Huber KV, et al. Nat Methods. 2015 12(11):1055-7.
Savitski MM et al. Science. 2014;346(6205):1255784.



PROTEOMIKA 2025

Proteinové komplexy

Speiciální izotopové
metody

Klinická proteomika

Biomarkery

KLINICKÁ PROTEOMIKA

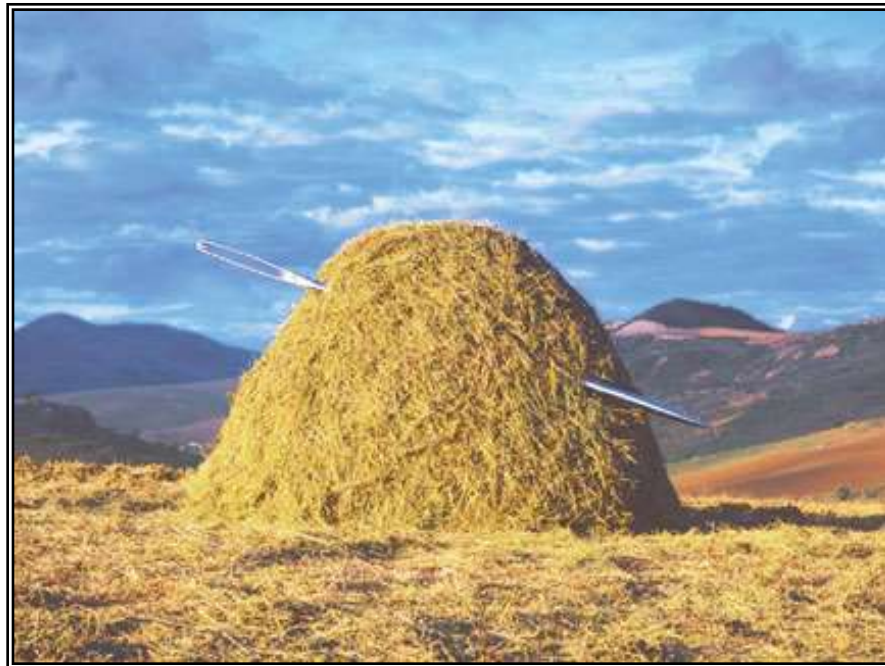
PLAZMA A SÉRUM a jiné tělní tekutiny

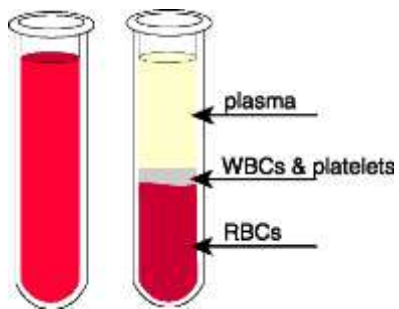


Co je to biomarker ?

*Protein nebo peptid vykazující reprodukovatelné rozdíly
v expresi či struktuře
specifické pro dané onemocnění.*

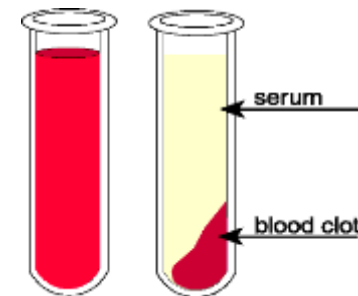
*Měl by být přístupný ve snadno získatelné
tkáni či tělní tekutině.*





Krevní plazma a sérum

60-80 g/L

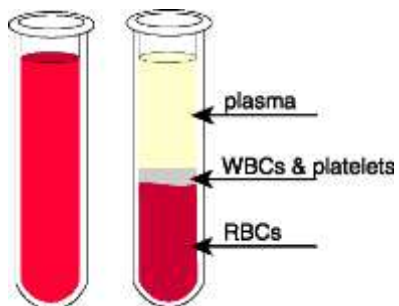


- Dosud spolehlivě identifikováno zhruba 8000 bílkovin

- Extrémní rozdíly v koncentracích (10 řádů)

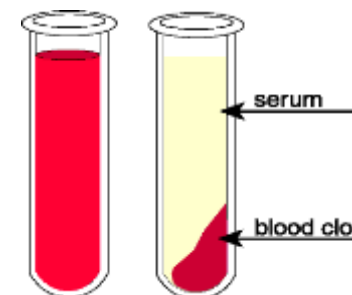
Albumin 50 000 000 000 pg/ml

Interleukin 6 5 pg/ml



Krevní plazma a sérum

60-80 g/L

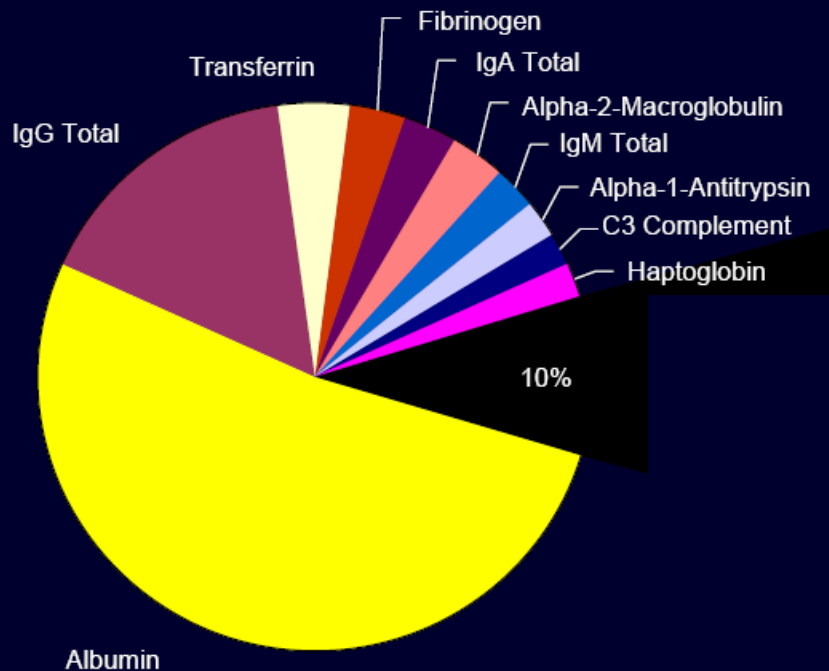


- Dosud spolehlivě identifikováno zhruba 8000 bílkovin
- Extrémní rozdíly v koncentracích (10 řádů)

Albumin	50 000 000 000 pg/ml
Interleukin 6	5 pg/ml
- 10 hlavních proteinů představuje cca 90% celkové bílkoviny
(Albumin, IgG, IgA, Tf, alpha-2 makroglobulin, haptoglobin...)

Major Plasma Proteins

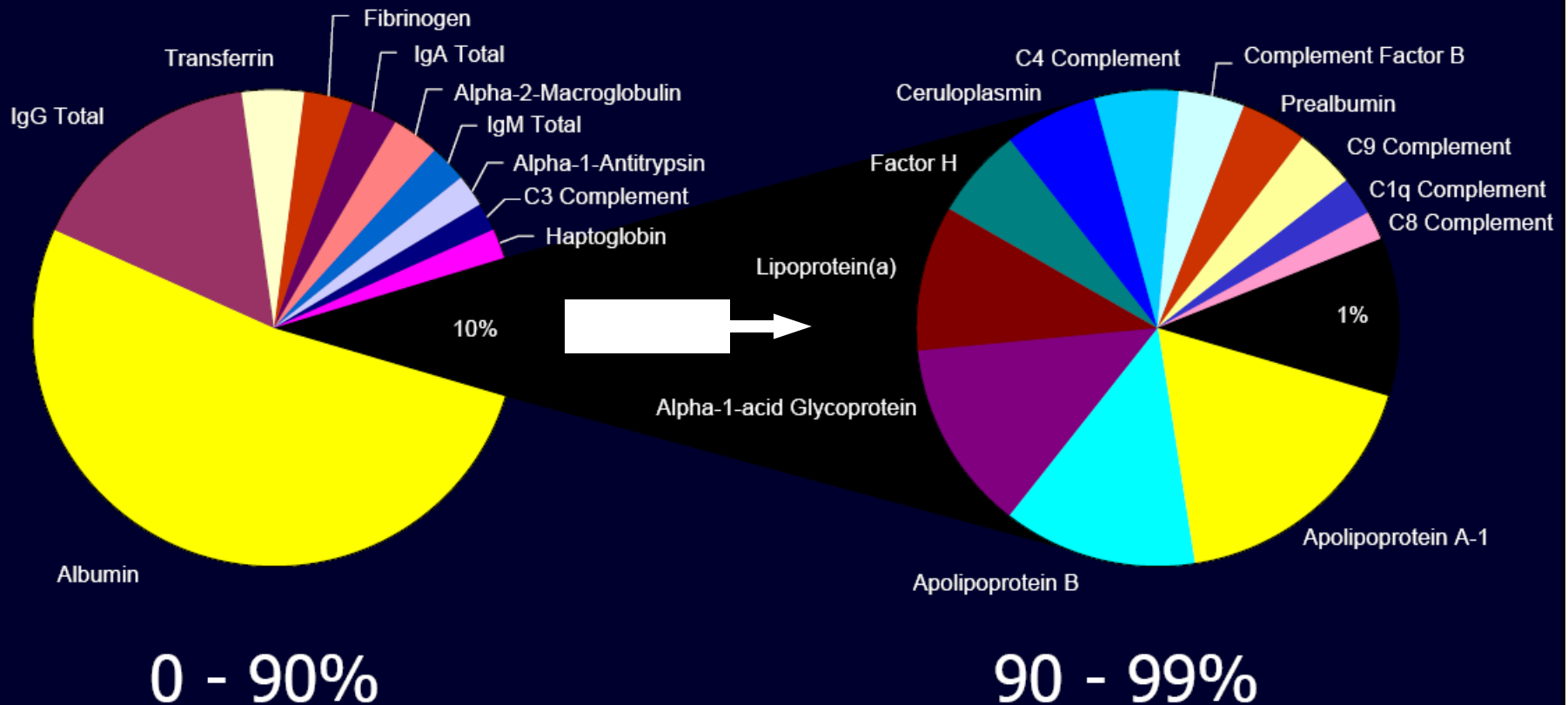
99% of plasma protein mass

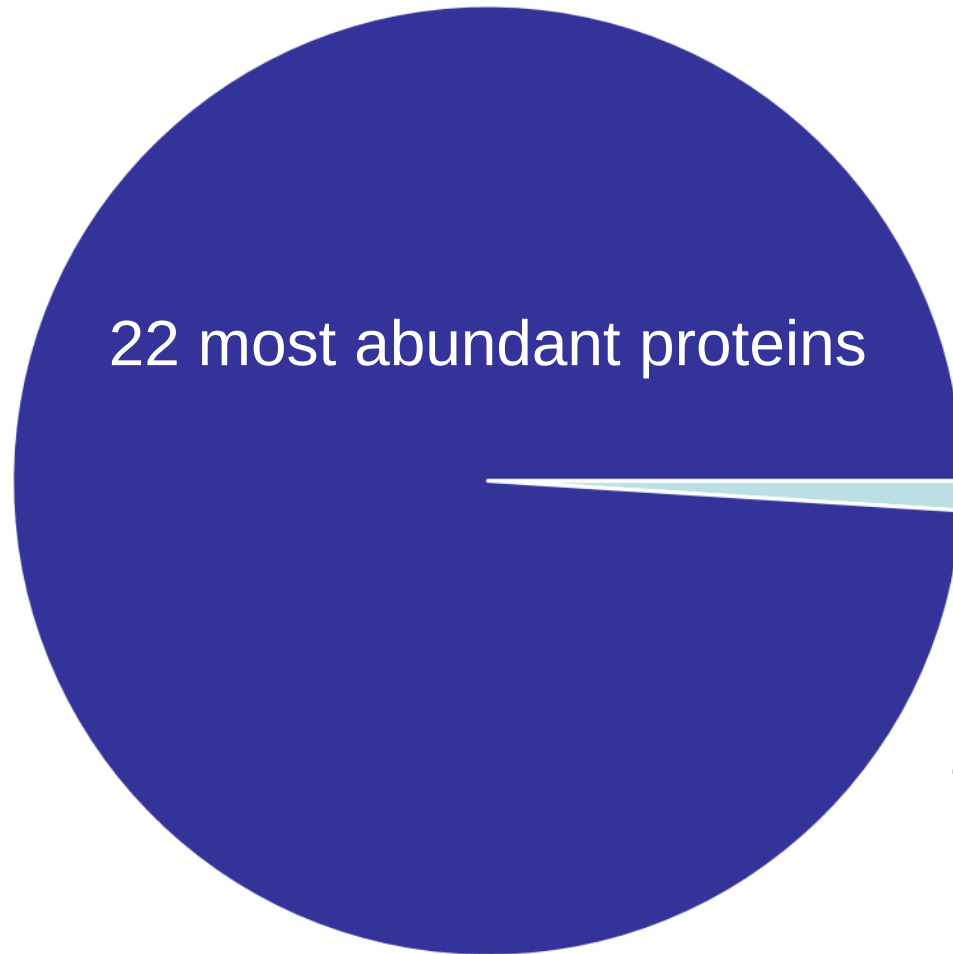


0 - 90%

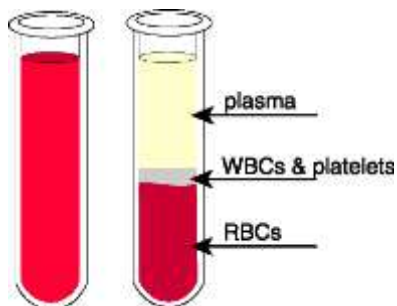
Major Plasma Proteins

99% of plasma protein mass



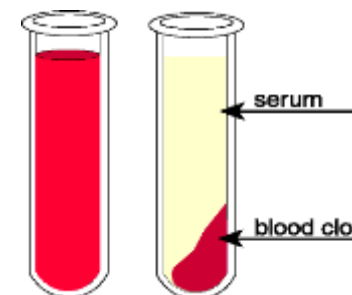


The interesting 1%
of plasma proteome



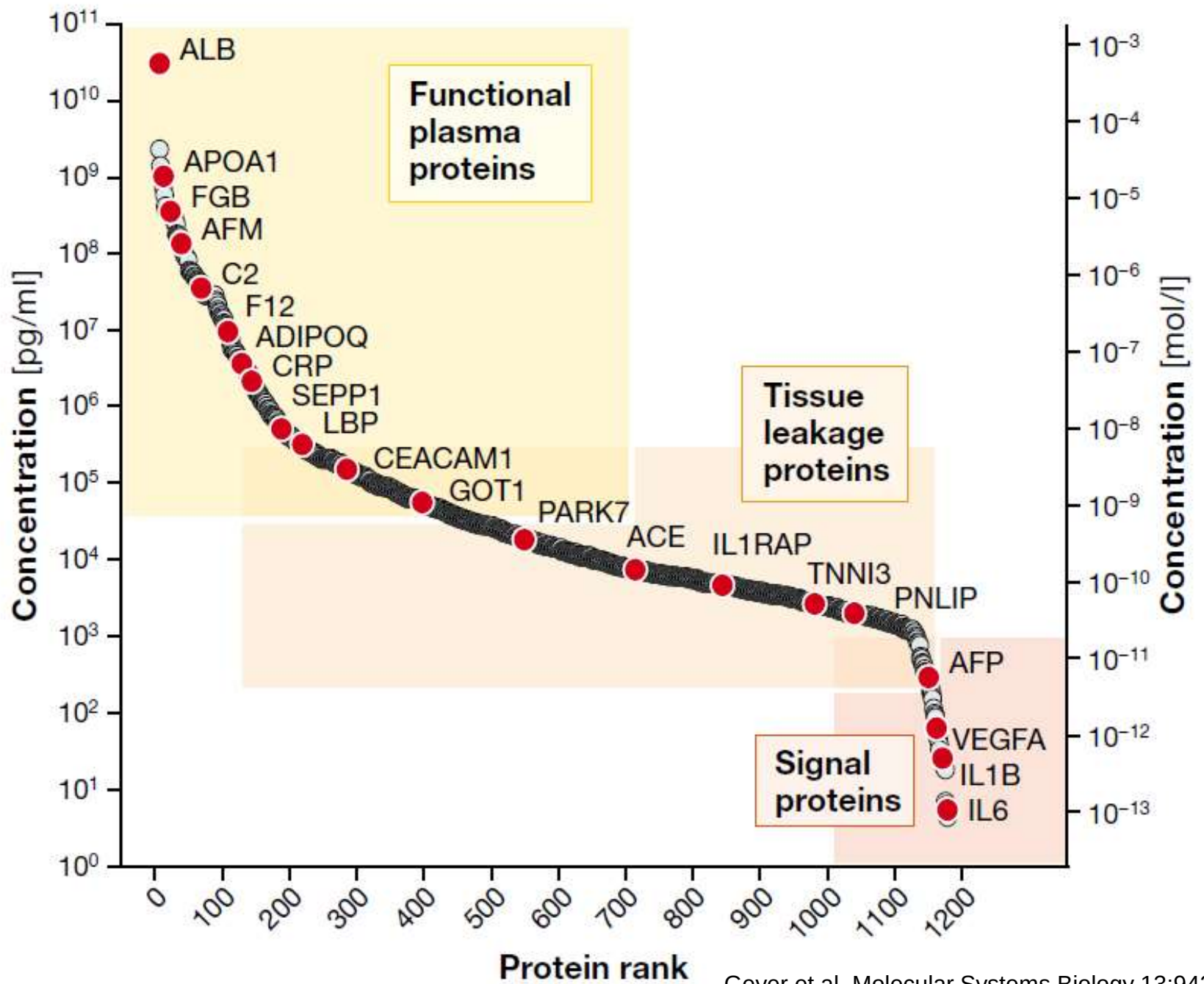
Krevní plazma a sérum

60-80 g/L



- Dosud spolehlivě identifikováno zhruba 8000 bílkovin
- Extrémní rozdíly v koncentracích (10 řádů)

Albumin	50 000 000 000 pg/ml
Interleukin 6	5 pg/ml
- 10 hlavních proteinů představuje cca 90% bílkoviny
(Albumin, IgG, IgA, Tf, alpha-2 makroglobulin, haptoglobin...)
- 22 majoritních proteinů představuje více než 99 % celkové bílkoviny
- Bez frakcionace lze pomocí LC-MS identifikovat 400-700 proteinů



Metody relativní deplece majoritních proteinů

- **Imunodeplece nejkoncentrovanějších proteinů**

„Top6“ „Top10“ „Top12“ „Top14“ „Top20“

(albumin, IgG, transferrin, haptoglobin, antitrypsin, IgG,....)

Protilátky + Cibacron Blue (albumin)+ Protein A, protein G (IgG, IgA)

(800-1600 proteinů)

Při depleci jsou odstraňovány asociované proteiny a peptidy!
Ne všechny proteiny jsou obohaceny při ekvalizaci nebo na nanočásticích!
Cena!
Reproducibilita!

Metody relativní deplece majoritních proteinů

- **Imunodeplece nejkoncentrovanějších proteinů**

„Top6“ „Top10“ „Top12“ „Top14“ „Top20“

(albumin, IgG, transferrin, haptoglobin, antitrypsin, IgG,....)

Protilátky + Cibacron Blue (albumin)+ Protein A, protein G (IgG, IgA)

(800-1600 proteinů)

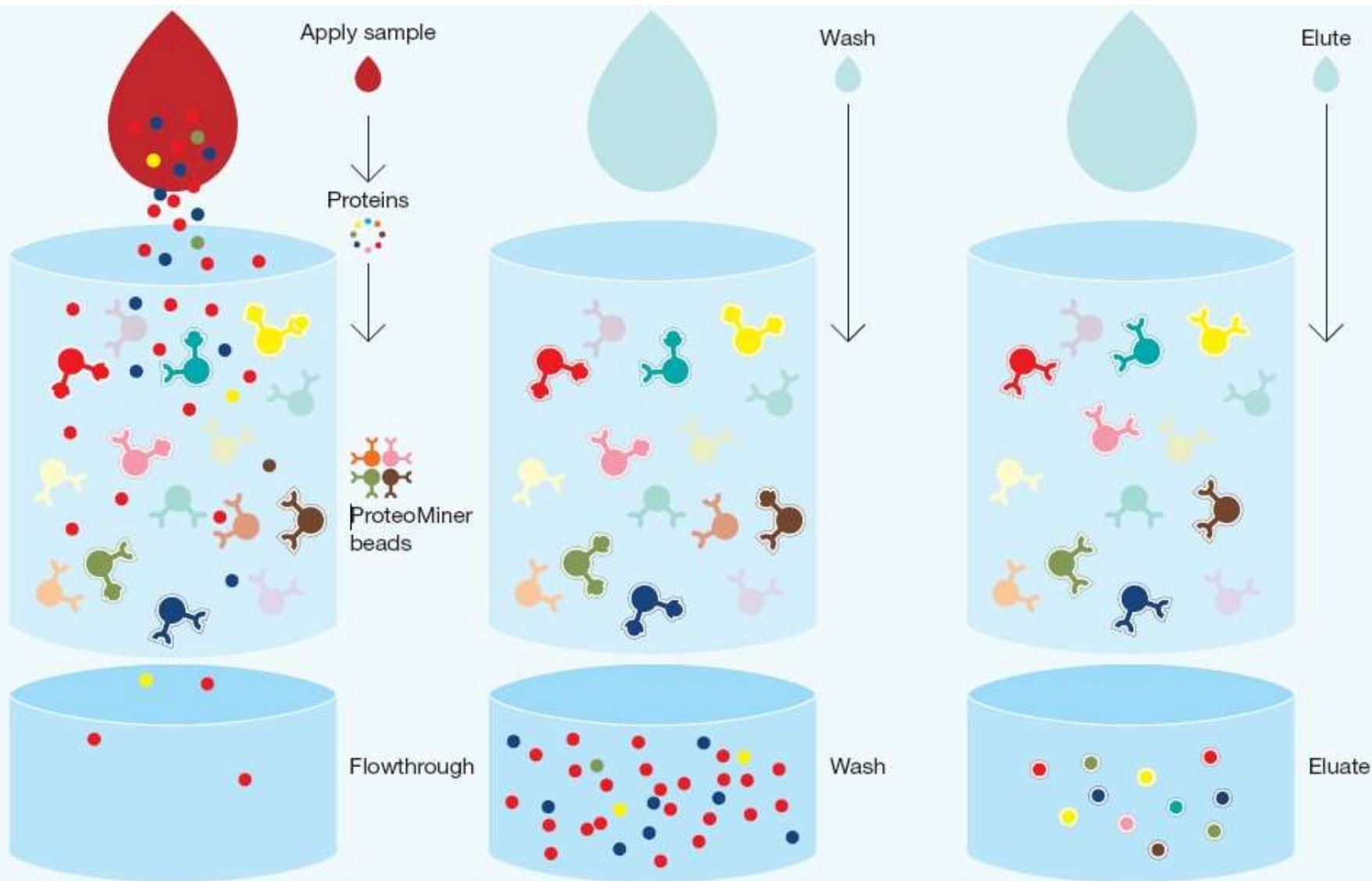
- **„Ekvalizace“**

knihovna náhodných hexapeptidů sloužících jako ligandy

„ProteoMiner“ **(700-1000 proteinů)**

Při depleci jsou odstraňovány asociované proteiny a peptidy!
Ne všechny proteiny jsou obohaceny při ekvalizaci nebo na nanočásticích!
Cena!
Reproducibilita!

Knihovna náhodných hexapeptidů sloužících jako ligandy „ProteoMiner“



Metody relativní deplece majoritních proteinů

- **Imunodeplece nejkoncentrovanějších proteinů**

„Top6“ „Top10“ „Top12“ „Top14“ „Top20“

(albumin, IgG, transferrin, haptoglobin, antitrypsin, IgG,....)

Protilátky + Cibacron Blue (albumin)+ Protein A, protein G (IgG, IgA)

(800-1600 proteinů)

- **„Ekvalizace“**

knihovna náhodných hexapeptidů sloužících jako ligandy

„ProteoMiner“ **(700-1000 proteinů)**



Obohacení na povrchu směsi magnetických nanočástic (protein corona)

„Proteograph XT“ **(až 4500 proteinů!!!)**

Při depleci jsou odstraňovány asociované proteiny a peptidy!
Ne všechny proteiny jsou obohaceny při ekvalizaci nebo na nanočásticích!
Cena!
Reproducibilita!

Alternativy k MS-proteomice plazmy/séra
založené na protilátkách nebo aptamerech

- **OLINK**
- **Soma Scan**

OLINK

Proximity extension assay

(pokud se na protein navážou dvě specifické protilátky, dojde ke vzniku unikátní DNA reportérové sekvence, která je amplifikována PCR a jejíž výsledné množství je funkcí koncentrace detekovaného proteinu)



IMMUNO REACTION



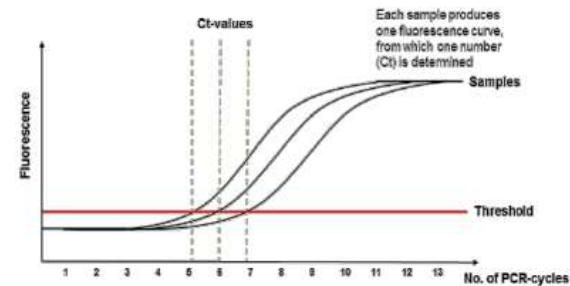
EXTENSION REACTION



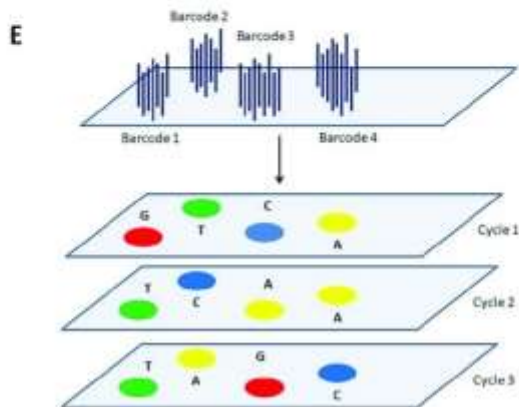
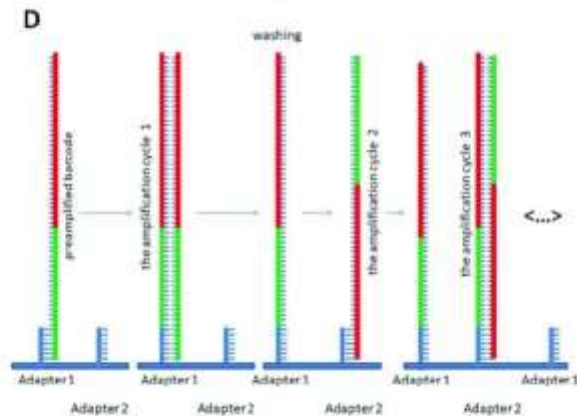
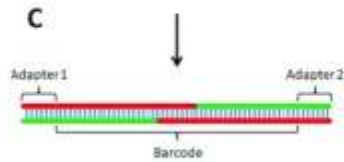
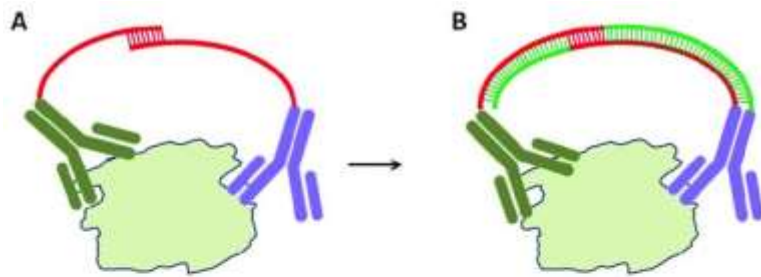
PRE-AMPLIFICATION



DETECTION



QC and GENERATION OF NPX



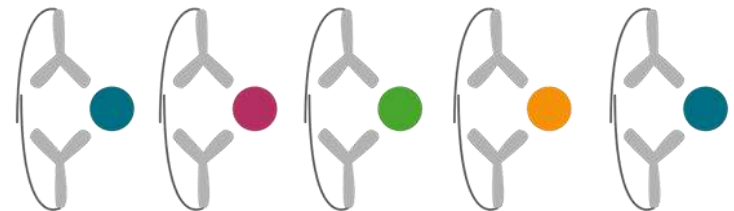
OLINK

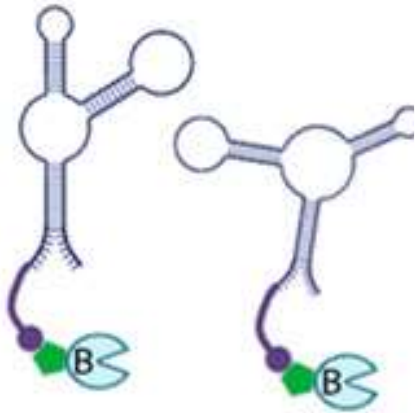
Proximity extension assay

Detekce PCR nebo NGS

V různých tematických panelech (po 48, 96 nebo 386 protilátkových párech)

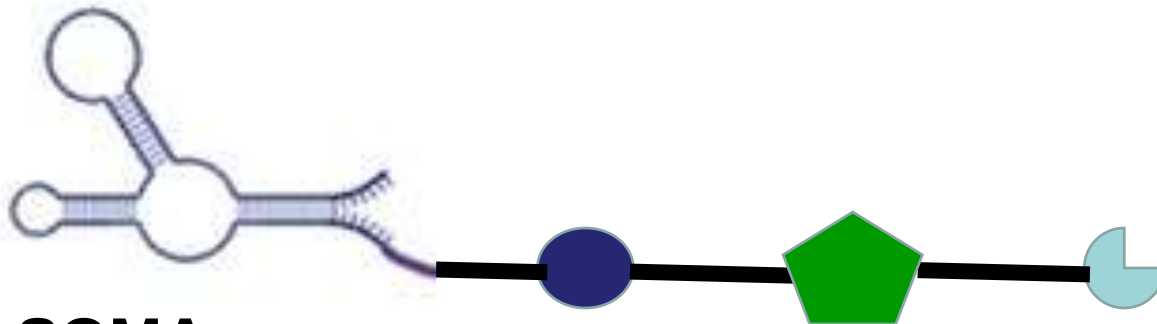
celkem 5400 proteinů





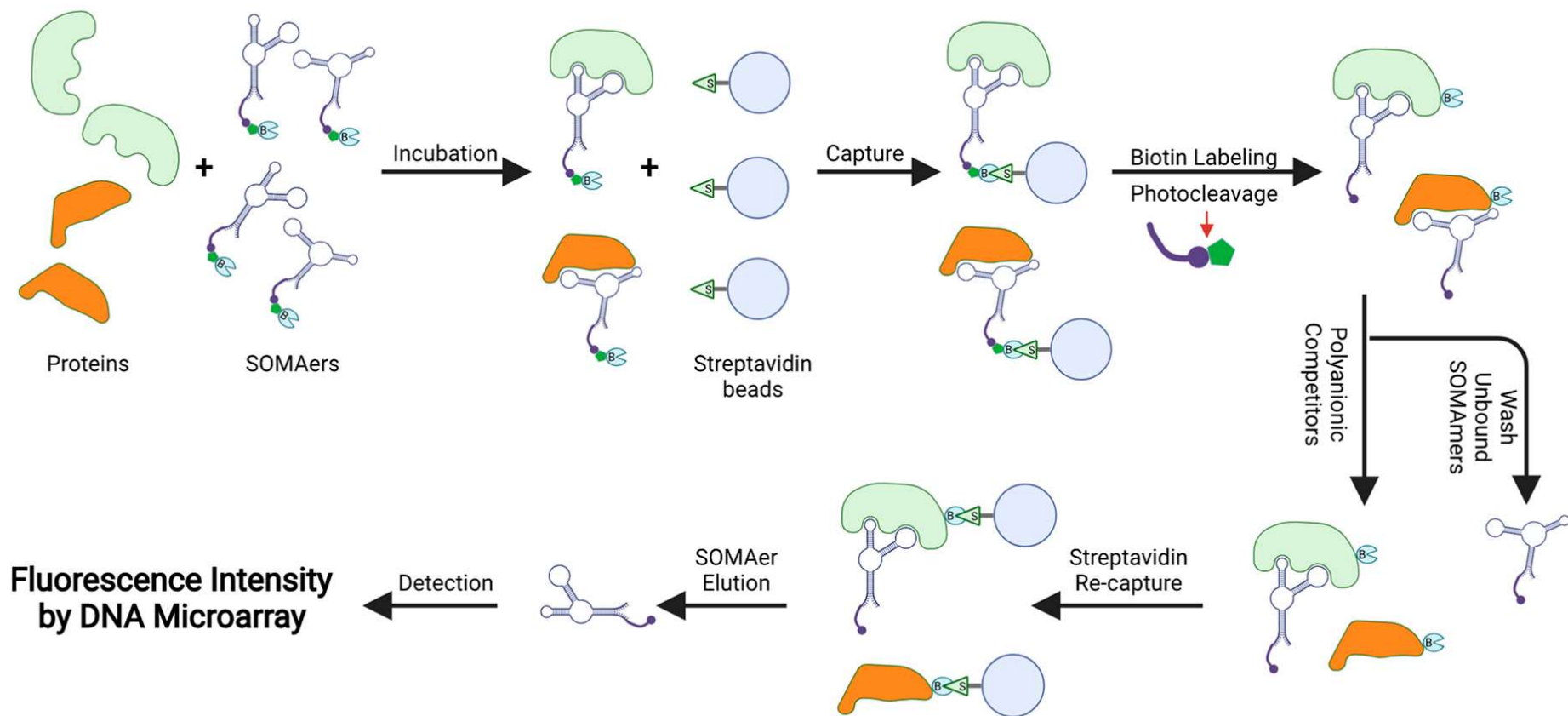
SOMAScan

Specifická vazba aptamerů (ssDNA, modifikované nukleotidy)
na protein a následná
detekce fluoroforu na aptamerech



SOMAmer

Aptamer-fluorofor-fotocleavage site-biotin



SOMAScan

1300 proteinů v jedné analýze
celkem až 7000 proteinů

Další tělní tekutiny:

Moč: 0-0,2 mg/ml (roste např. při onemocnění ledvin)

Mozkomíšní mok: 0,5-1 mg/ml (lumbální punkce)

Plodová voda: 3-4 mg/ml (aminocentéza, porod)

Sliny: 0,8-1,5 mg/ml

Slzy: 4-6 mg/ml

Dechový kondenzát: 1 μ g/ml

Pot, hlen, výpotky, synoviální tekutina, nitrooční tekutina...

PROTEOMIKA 2025

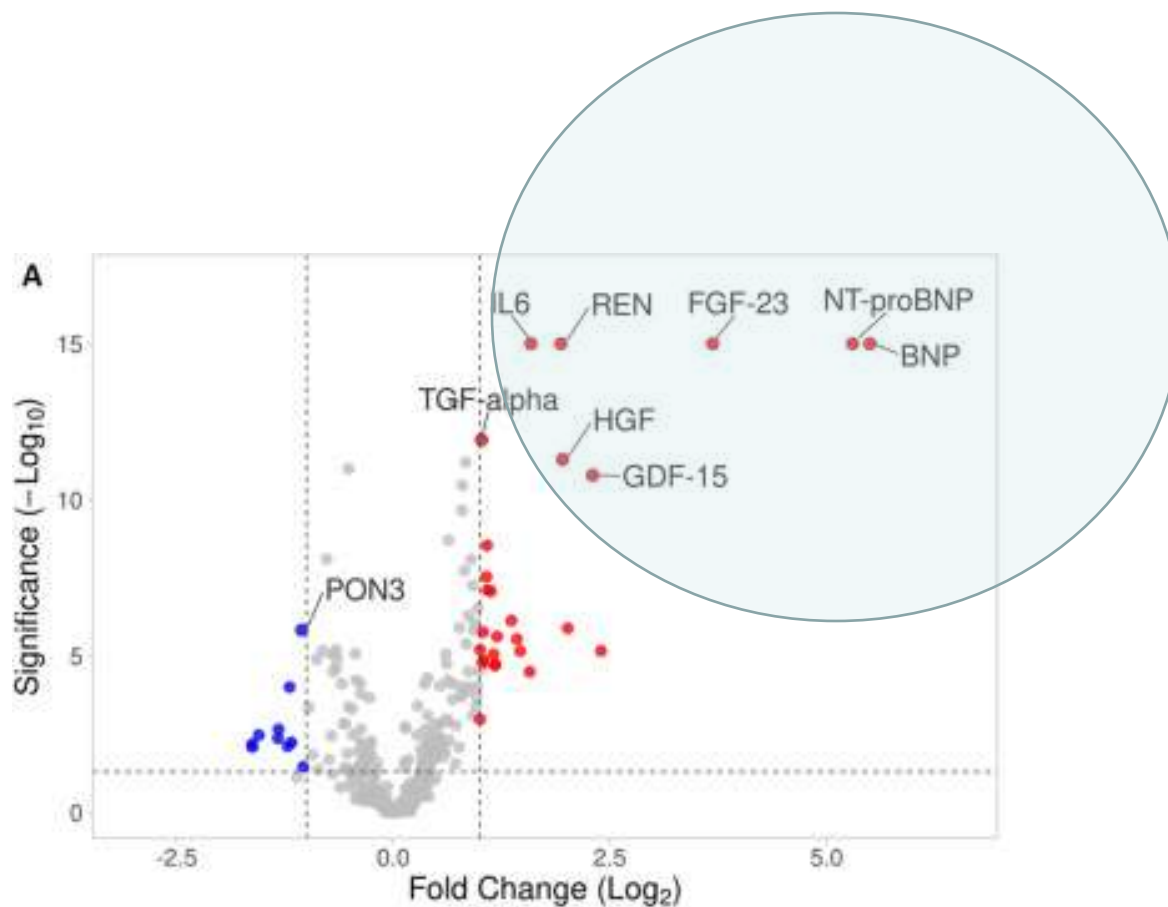
Proteinové komplexy

Speiciální izotopové
metody

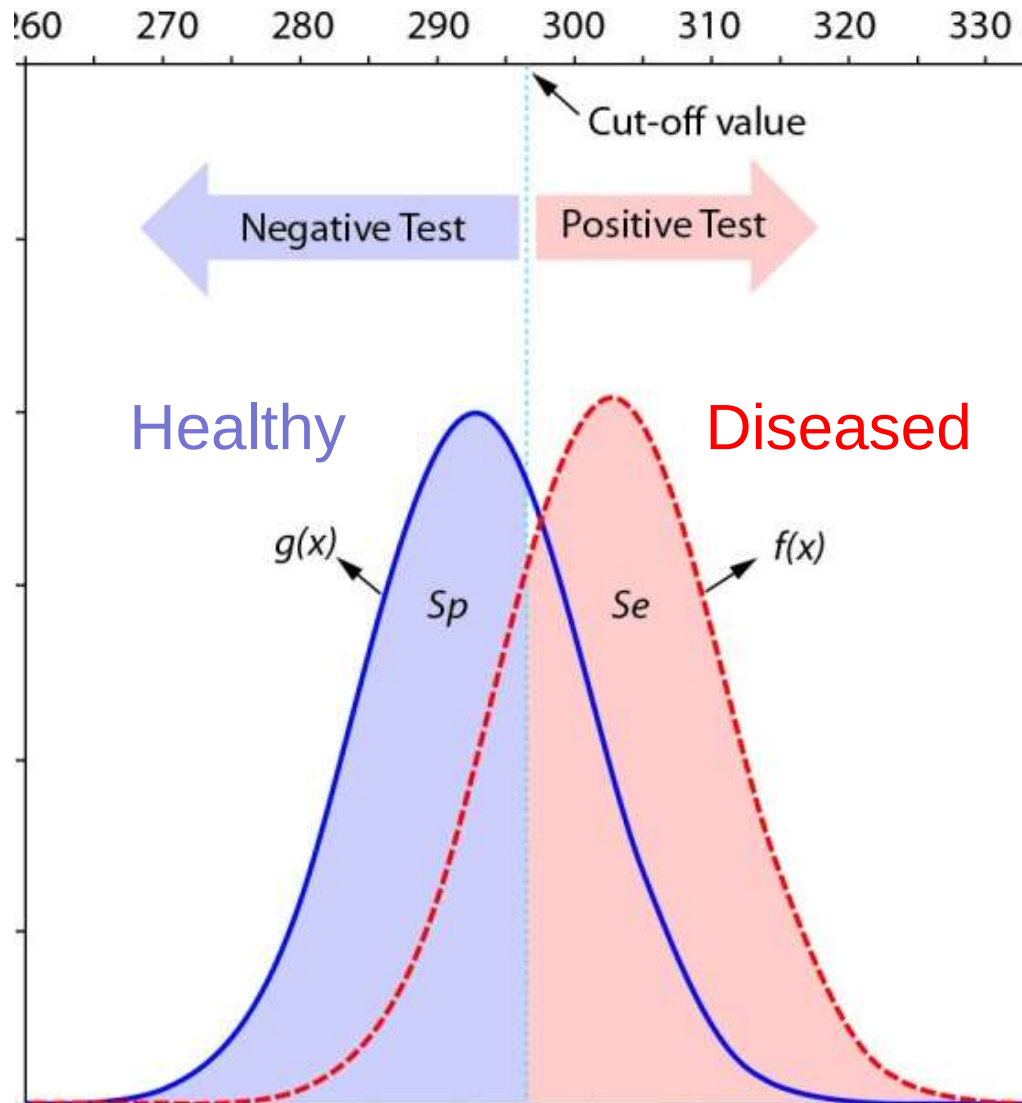
Klinická proteomika

Biomarkery

Potenciální sérové markery identifikované OLINK



Protein XY concentration (ng/mL)



Specificita a Senzitivita biomarkeru

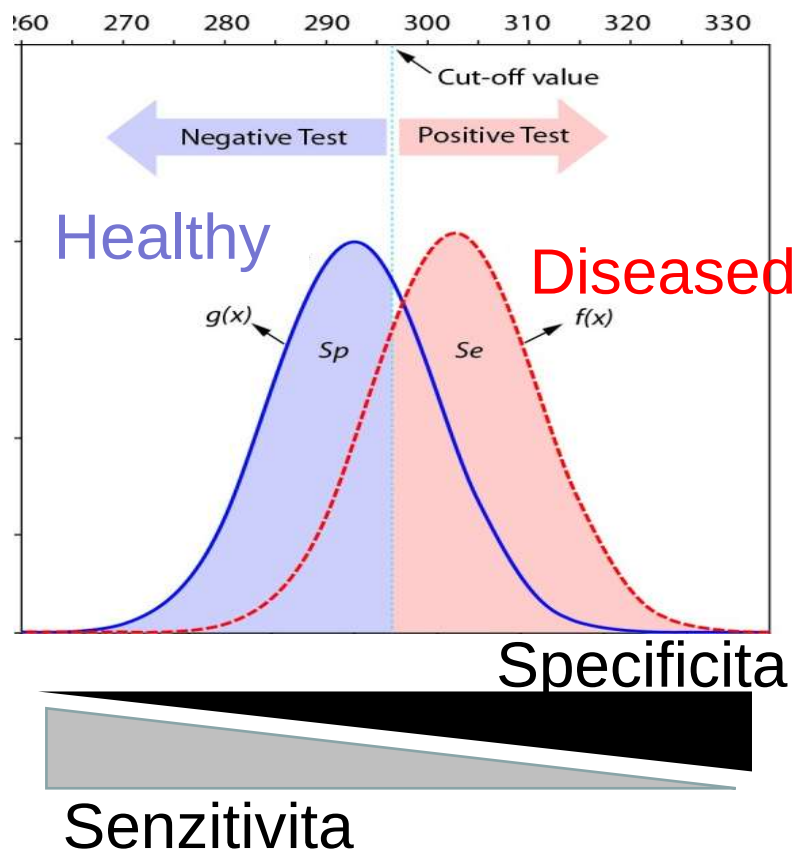
$$Sp = \frac{TN}{TN + FP}$$

Kolik procent ze
zdravých bude mít
negativní test?

TP – true positive
FN – false negative

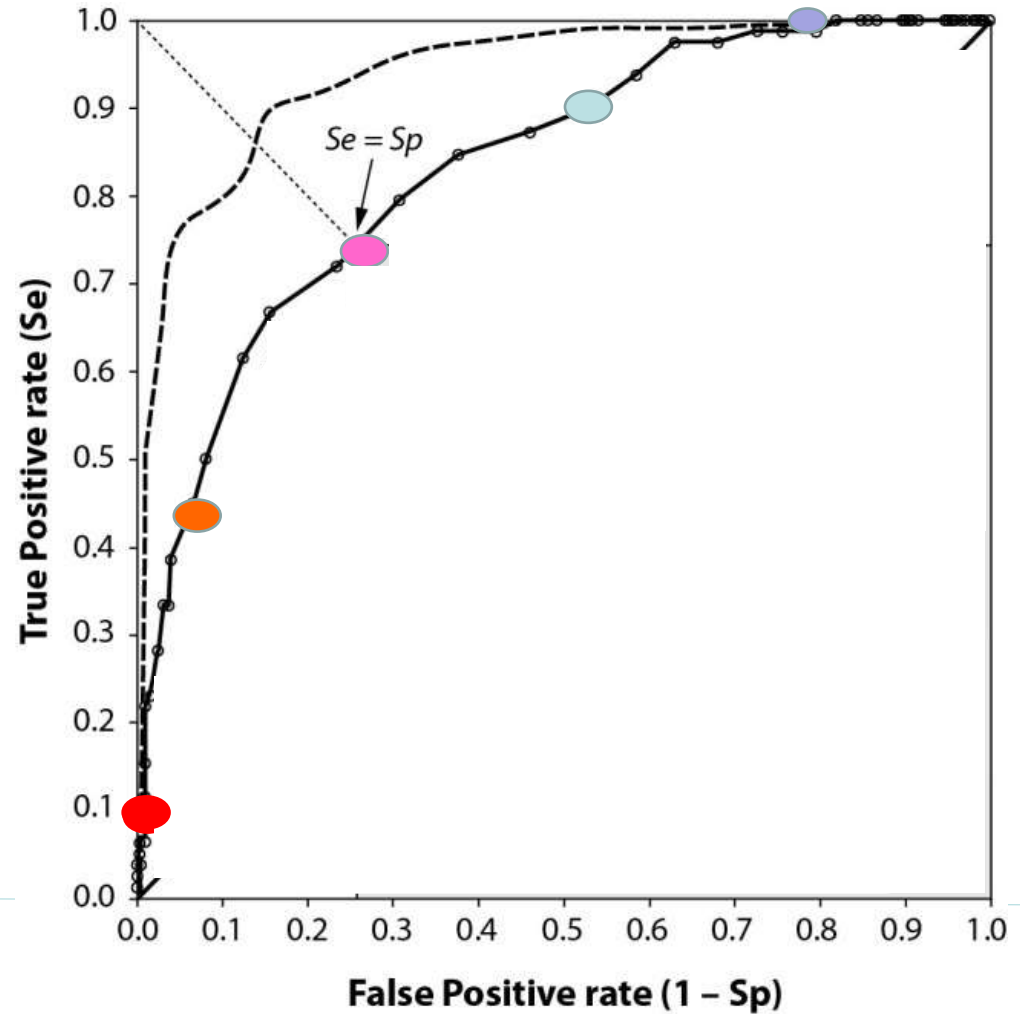
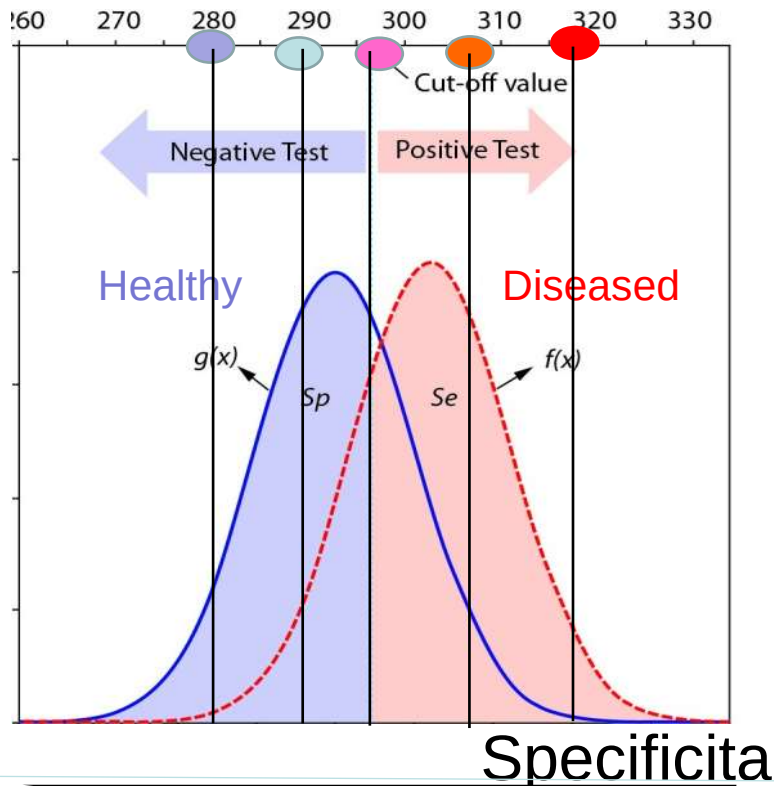
$$Se = \frac{TP}{TP + FN}$$

Kolik procent
nemocných
test zachytí ?



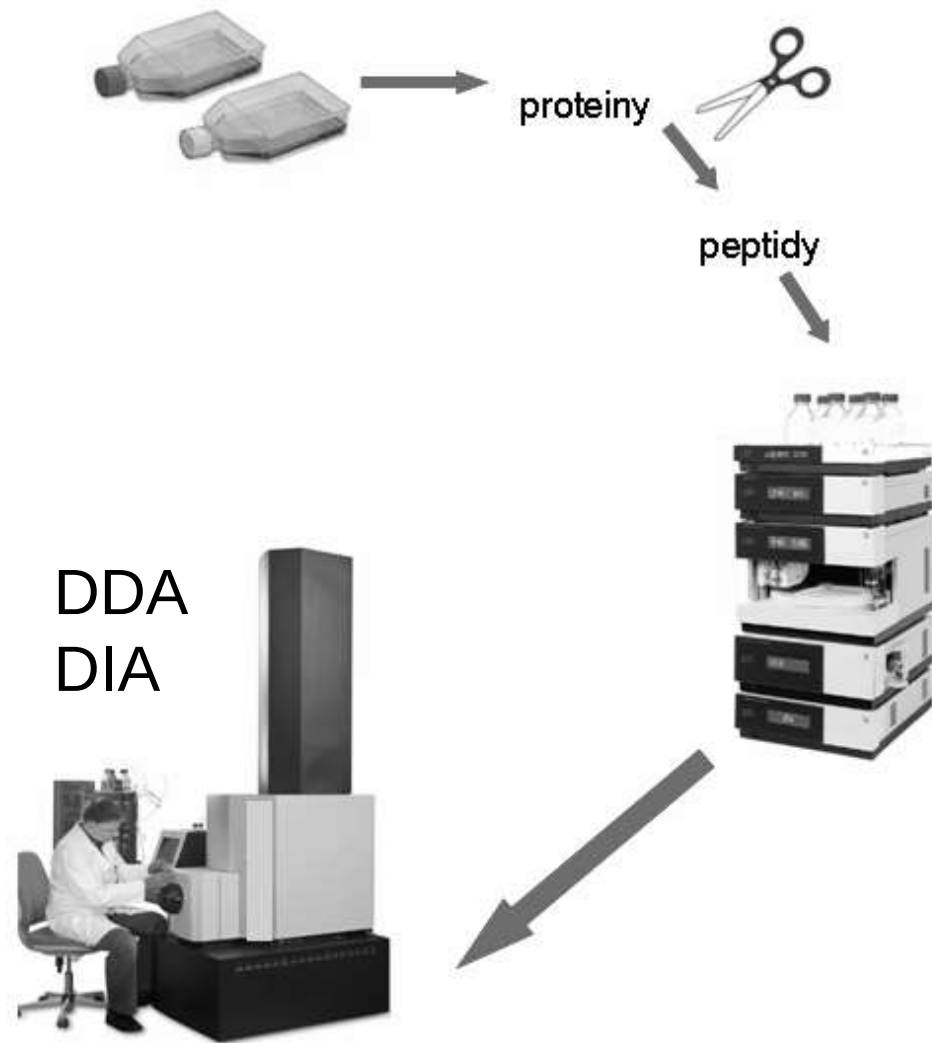
ROC curve of a biomarker

(Receiver Operating Characteristic)



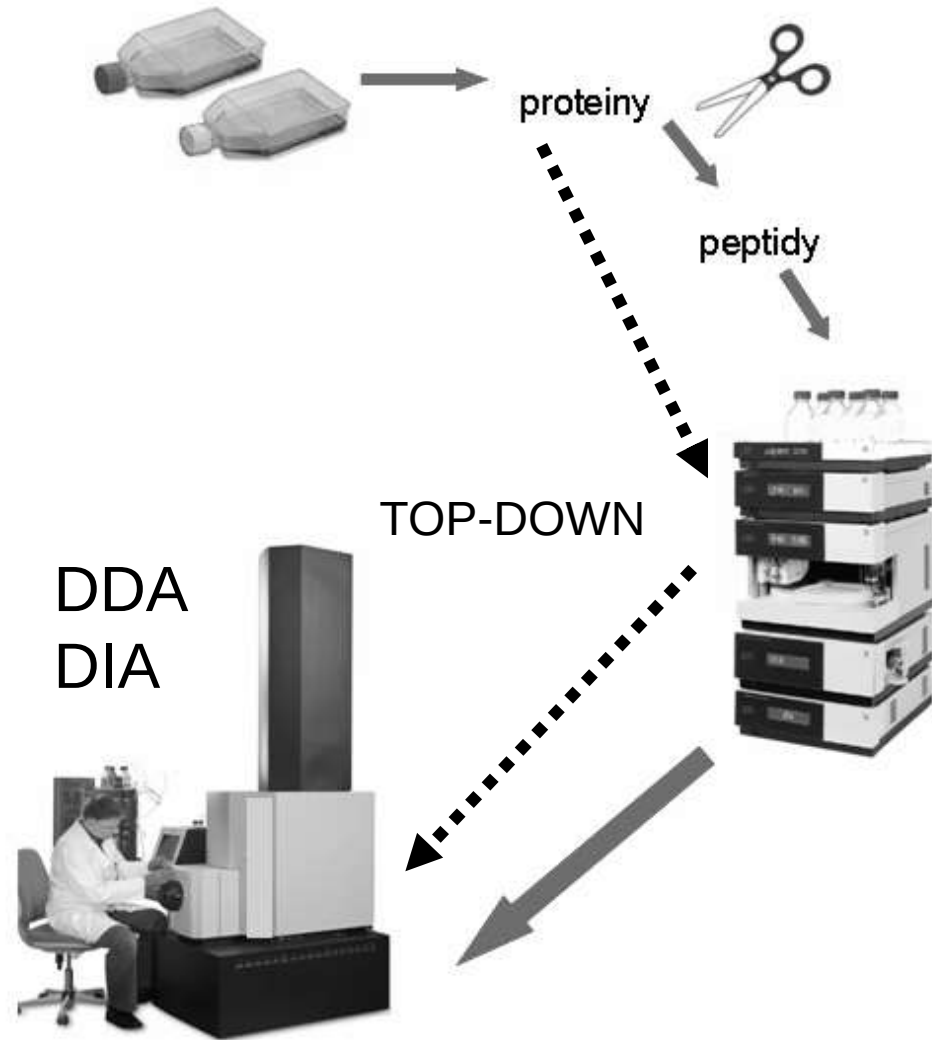
Sensitivita

Specificita



OLINK
SOMAScan

Cílené metody (MRM/SRM)



IF 2023

Molecular and Cellular Proteomics (IF 6,1)

Journal of Proteome Research (IF 3.8)

Expert Reviews of Proteomics (IF 3,8)

Proteomics (IF 3,4)

Clinical Proteomics (IF 2,8)

Journal of Proteomics (IF 2,8)

BBA – Proteins and proteomics (IF 2,5)

Cancer Genomics & Proteomics (IF 2,5)

Protomics – Clinical Applications (IF 2,1)

Proteome Science (IF 2.1)

.....

HUPO – HUman Proteome Organization

EuPa – European Proteomic Association

Proteomická sekce ČSBMB (www.czproteo.cz)

Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii

PROTEOMICKÁ LABORATOŘ 1. LF UK (Clinical Proteomics)



<http://petraklab.cz/>

ZKOUŠKA

Studijní materiály: <https://petraklab.cz/teaching>

Podmínkou přípuštění ke zkoušce je **vypracování eseje** na zadané téma **a odevzdání eseje** (jpetr@lf1.cuni.cz) **nejpozději 2 dny před zkouškou**.
Téma obdržíte po zapsání na zkoušku v SIS.