

# PROTEOMIKA

## 2015

- Proteomika, proteiny, co a proč. Metody práce s bílkovinami
- Separační metody, 2-DE
- 2-DE detaily a záludnosti, identifikace bílkovin pomocí MS
- Principy hmotnostní spektrometrie
- Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie
- Shot-gun strategie, kvantitativní metody
- Proteomika membránových proteinů, proteinové komplexy
- Klinická proteomika, zvláštní metody
- Proteomické čtení, ukázkové studie

- Co je proteomika ? Proteom? Protein?
- Experimentální strategie proteomiky
- Vlastnosti AMK a proteinů

## **METODY PRÁCE S PROTEINY**

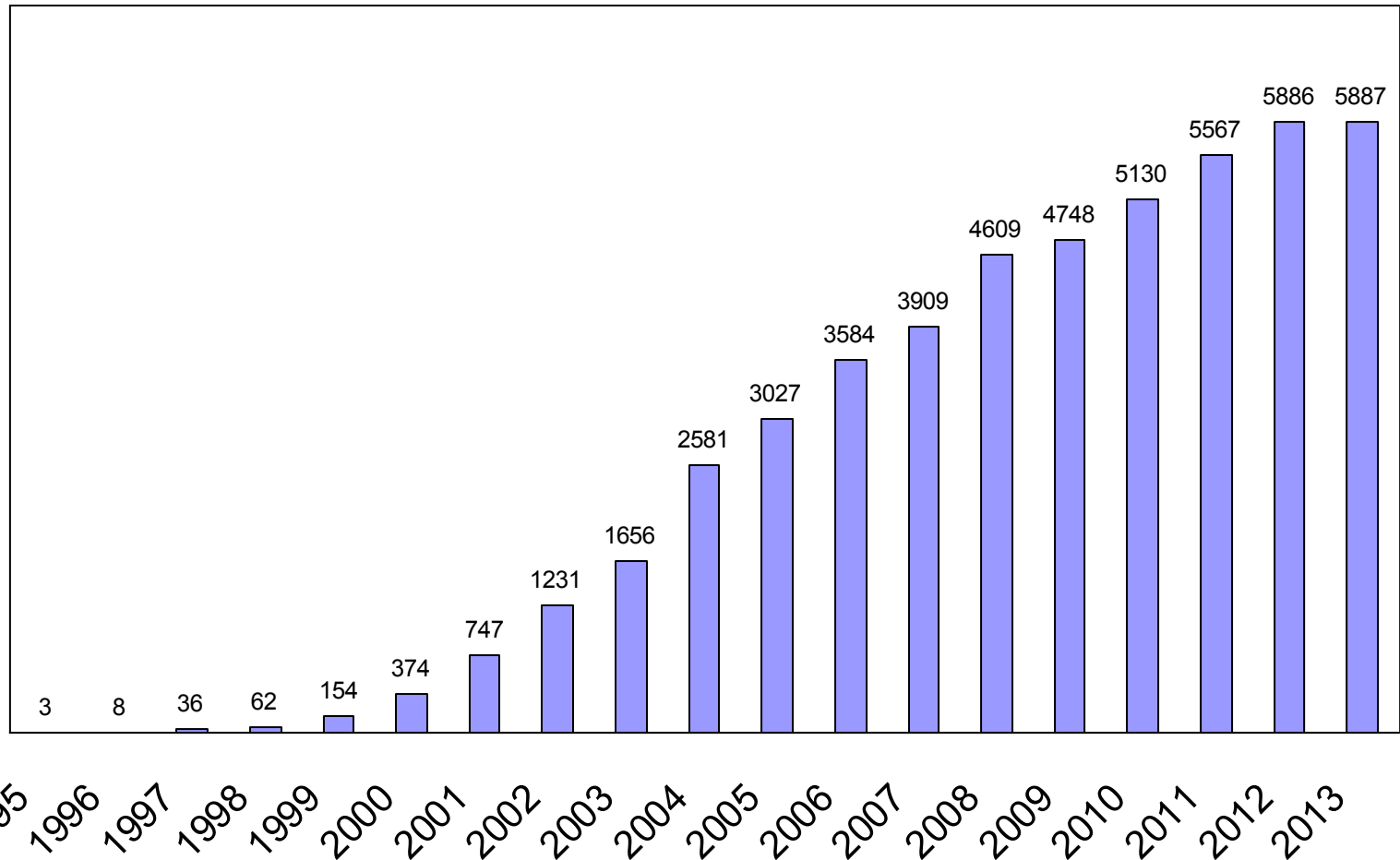
- dezintegrace, lyzace, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- chromatografie
- elektroforéza

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

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

**Expresní/diferenční proteomika** usiluje o semikvantitativní porovnávání proteomů, tj. o identifikaci bílkovin, které jsou odlišně exprimovány (zastoupeny) mezi dvěma nebo více vzorky.

## Počet publikací s proteomickou tématikou (Entrez/PubMed)



# **PROČ PROTEOMIKA KDYŽ MÁME GENOMIKU/TRANSKRIPTOMIKU ?**

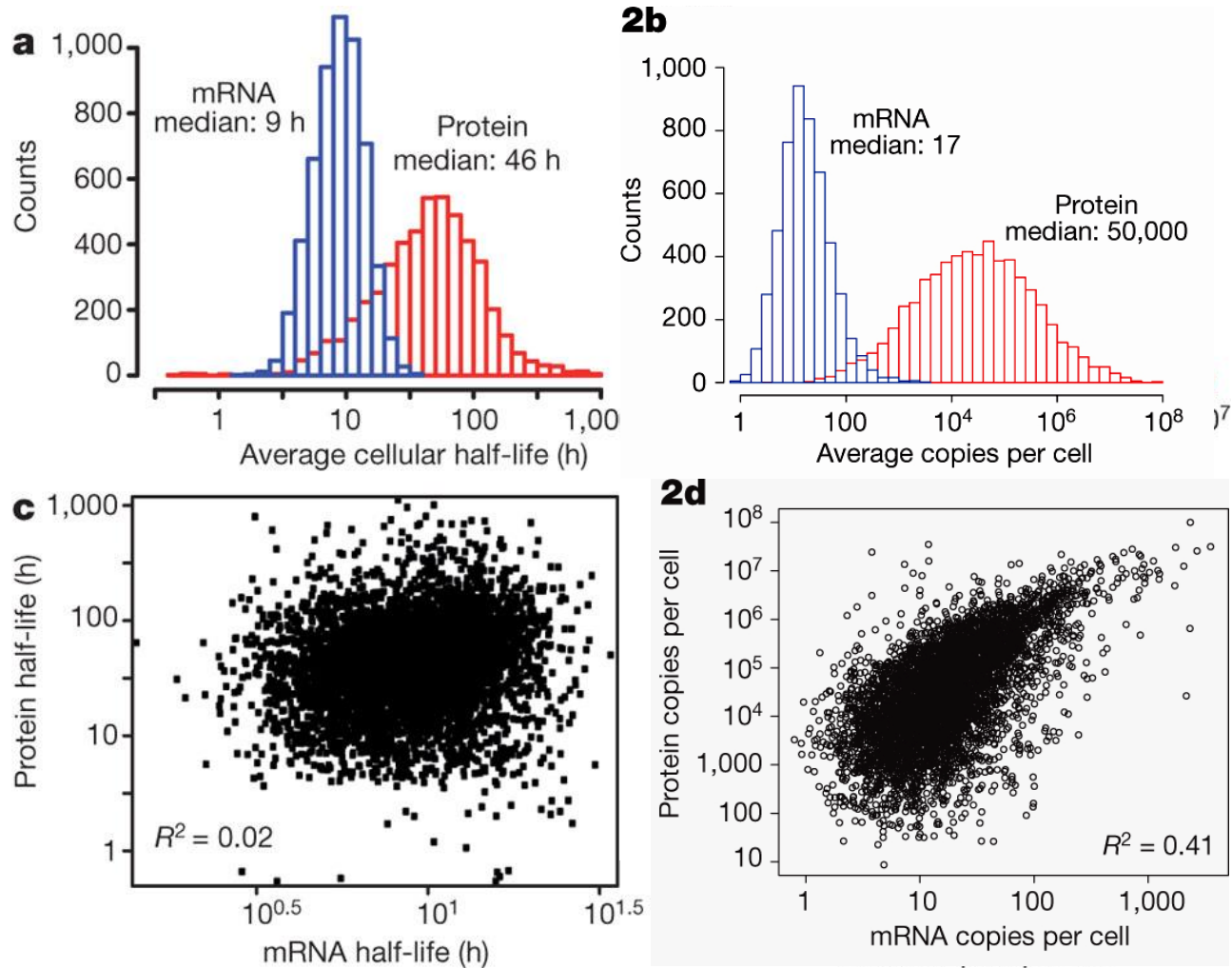
- nelze popsat molekulární mechanismy pomocí studia genomu

**!!! špatná korelace hladin mRNA a skutečných hladin bílkovin !!!**

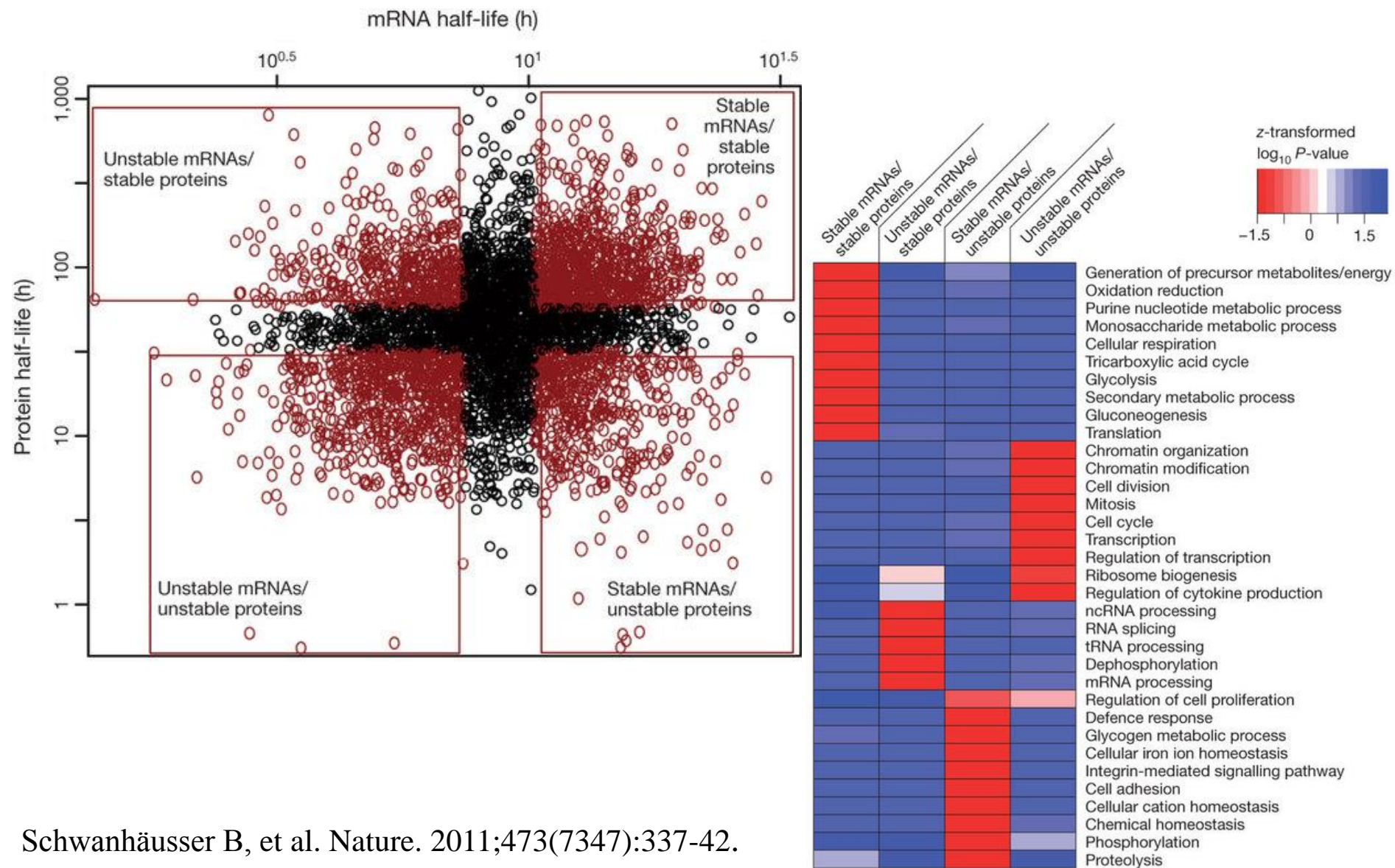
- alternativní sestřih, RNA editing
- vliv mikroRNA+piRNA a RNA-vazebných proteinů
- regulace translace (rychlost, preference – cap, poly (A) a UTR)
- alternativní translace
- cílená degradace proteinu (N'-end rule, PEST sekvence, export)
- více než 200 typů posttranslačních modifikací
- kódující non-coding RNA
- ?

**PROTOŽE PROTEINY A NIKOLIV GENY PŘEDSTAVUJÍ FENOTYP !**

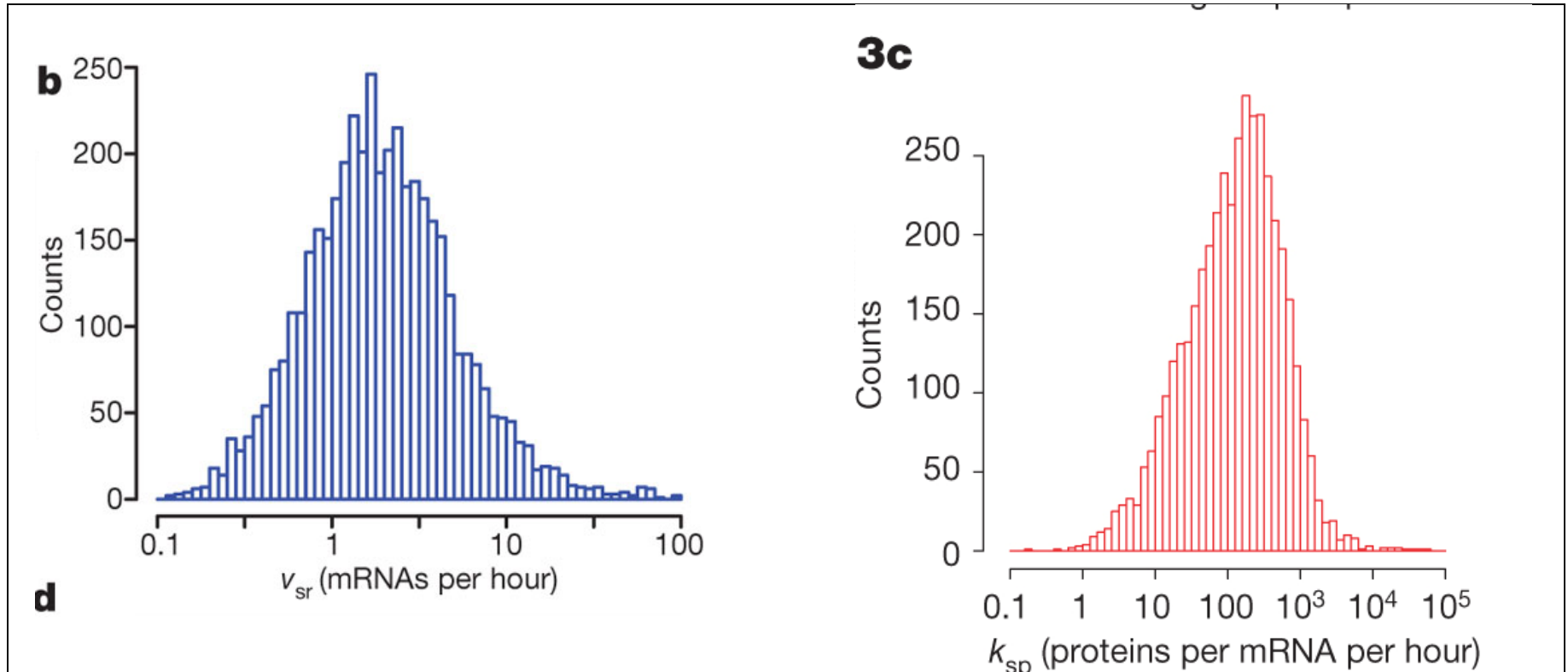
# Vztah koncentrace a stability mRNA/protein



# Stabilita mRNA/stabilita proteinu

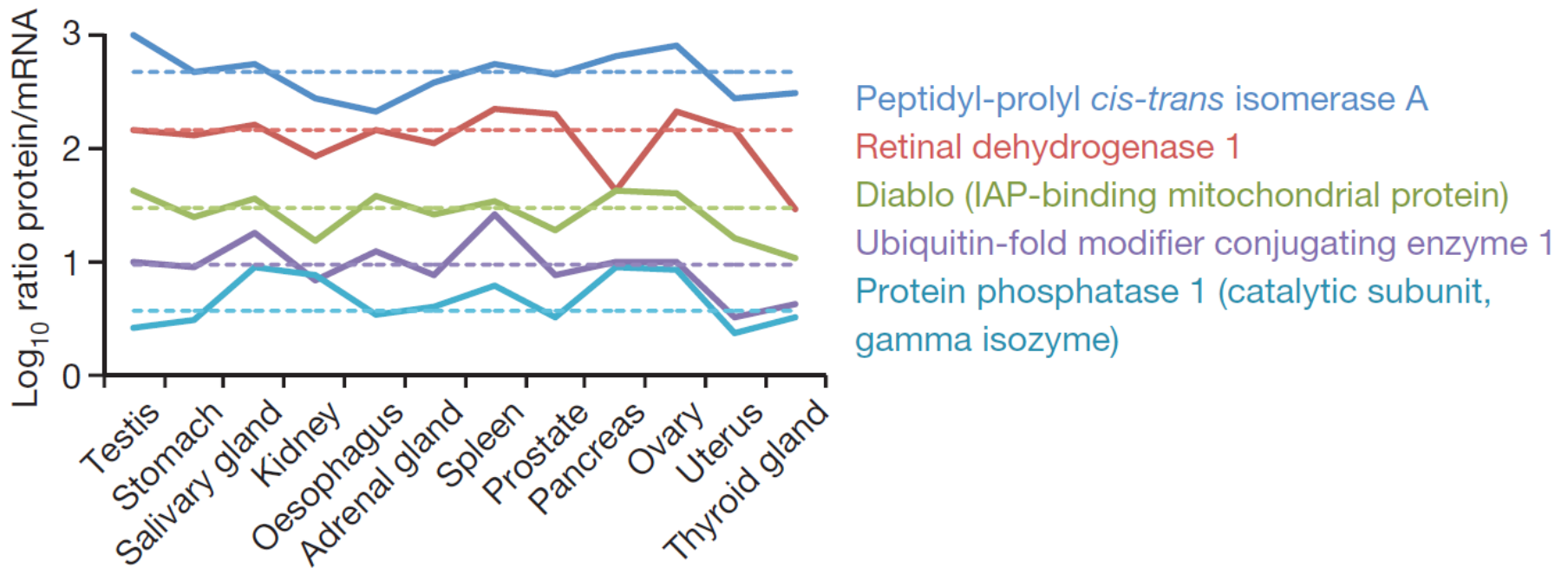


# Rychlost transkripce a translace





# Kolik kopií proteinu vznikne z jedné molekuly mRNA?



# Komplexita proteomu – Kolik je proteinů?

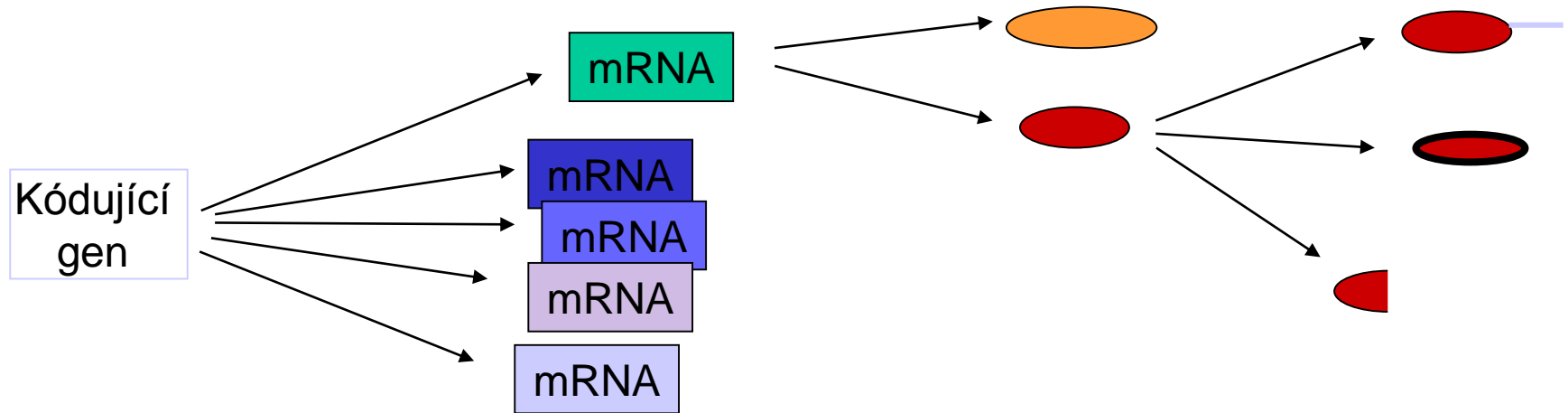
~20 600 lidských genů



Existence proteinu  
prokázána pro ~18000

# Komplexita proteomu – Kolik je proteinů?

~20 600 lidských genů → ? mRNA ?  
x 10 variant → ??? Proteinů ???



**JAK JE DEFINOVÁN PROTEIN?**

GENOCENTRICKÝ vs. PROTEOCENTRICKÝ POHLED

PROTEIN a **PROTEOFORMA**

# Jak je definován protein?

a 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?

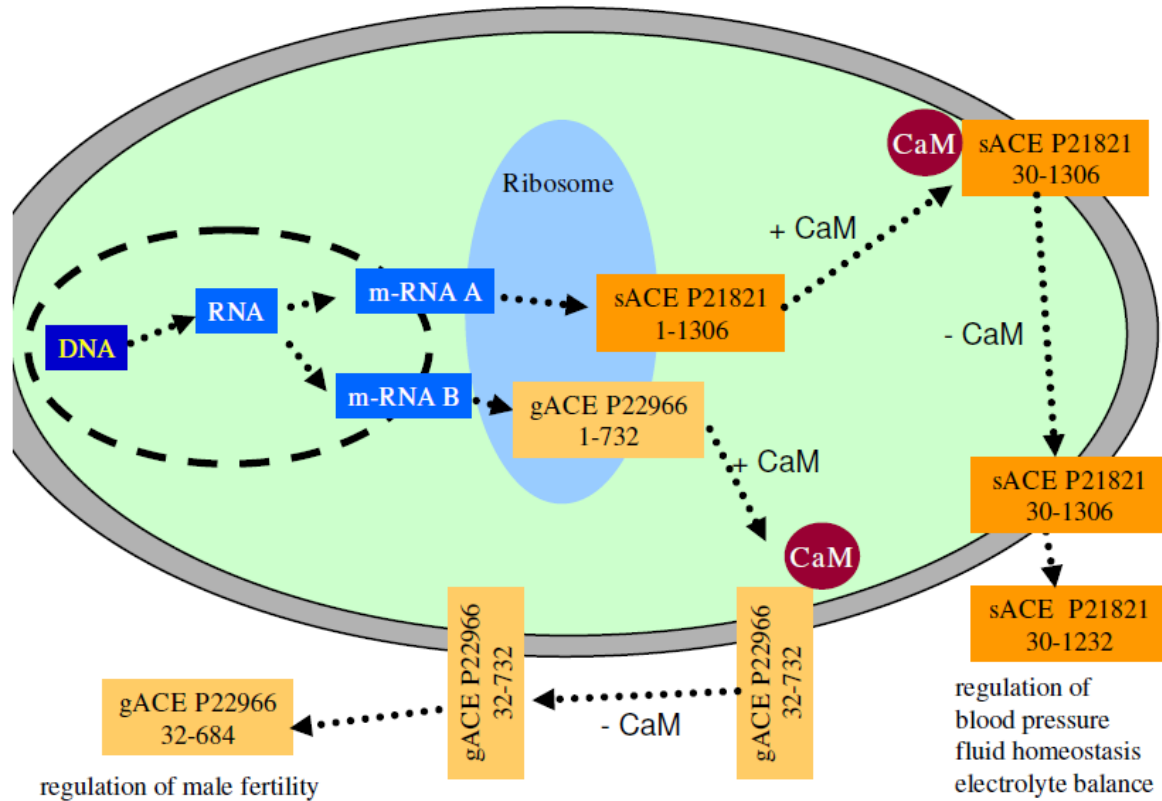
Funkcí?

# Jak je definován protein?

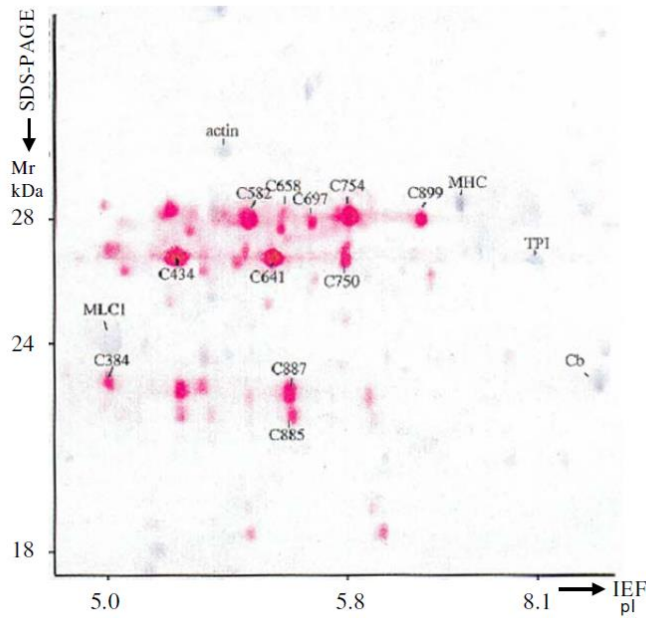
Angiotensin converting enzyme (ACE)

Nejméně dva tkáňové specifické transkripty

Dva odlišné membránové proteiny, dva rozpustné cirkulující proteiny s odlišnou funkcí



# Jak je definován protein? Protein versus proteoforma



**HSP27** – nejméně 30 proteoformem

**Enolase 1** – 38 proteoformem

**Heat shock cognate 71 kDa protein** – 31

**Vimentin** – 29

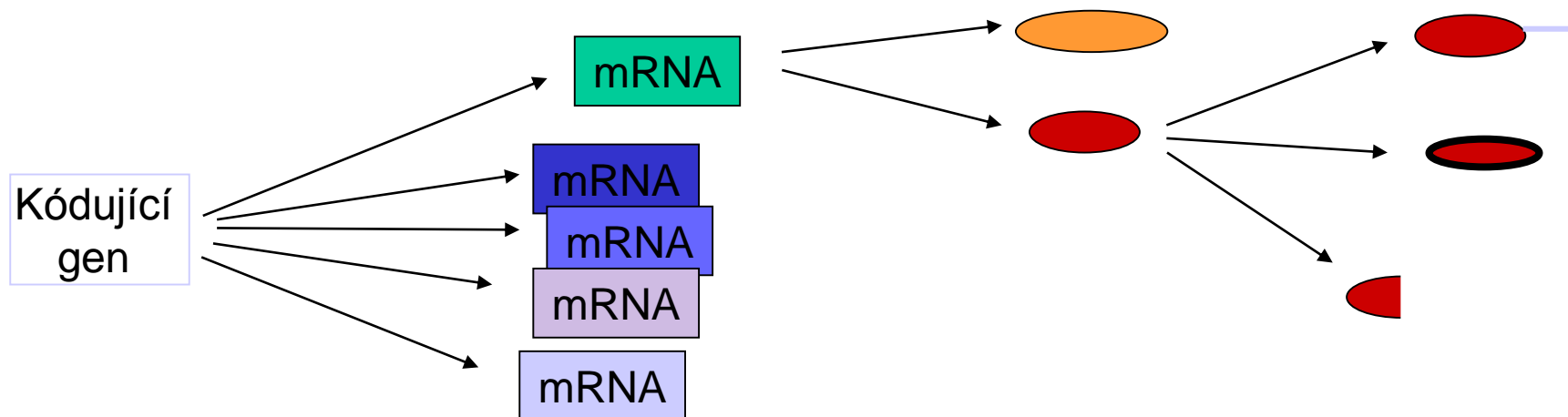
atd...

Thiede B, et al. Mol Cell Proteomics. 2013 Feb;12(2):529-38.

Jungblut PR, et al, 2008 Chem Cent J. 2008 Jul 18;2:16.

# Komplexita proteomu – Kolik je proteinů?

~20 600 lidských genů → ? mRNA ? → ??? Proteinů ???



3 PROTEOFORMY versus 1 PROTEIN nebo 1 „PROTEIN GROUP“



**Lidský  
proteom ?**

18 000  
identifikovaných

**Lidský  
proteom ?**

18 000  
identifikovaných



# Nejnovější a nejdetailnější „mapa“ lidského proteomu



**Wilhelm M, et al Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. Nature. 2014 May 29;509(7502):582-7.**

**Kim MS, et al. A draft map of the human proteome. Nature. 2014 May 29;509(7502):575-81.**

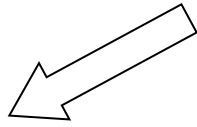
- Co je proteomika ? Proteom? Protein?
- Experimentální strategie proteomiky
- Vlastnosti AMK a proteinů

## **METODY PRÁCE S PROTEINY**

- dezintegrace, lyzace, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- chromatografie
- elektroforéza

# PROTEOMICKÝ EXPERIMENT

„KLASICKÁ“  
STRATEGIE



Elektroforéza, chromatografie a jejich kombinace

Separace směsi **BÍLKOVIN**

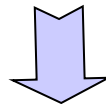
Štěpení vybraných  
bílkovin + čištění  
peptidů

Měření přesné hmotnosti peptidů  
( a jejich fragmentů)

Získání hmotnostních  
spekter

Porovnání hmotností sady  
peptidů (jejich fragmentů) s  
údaji o všech dostupných  
ORFs v databázích

Identifikace bílkovin



# PROTEOMICKÝ EXPERIMENT

„KLASICKÁ“  
STRATEGIE



Štěpení všech  
bílkovin (trypsin)

Elektroforéza, chromatografie a jejich kombinace

Separace směsi **BÍLKOVIN**

Separace směsi **PEPTIDŮ**

Štěpení vybraných  
bílkovin + čištění  
peptidů

Měření přesné hmotnosti peptidů  
( a jejich fragmentů)

Získání hmotnostních  
spekter

„SHOT-GUN“  
STRATEGIE

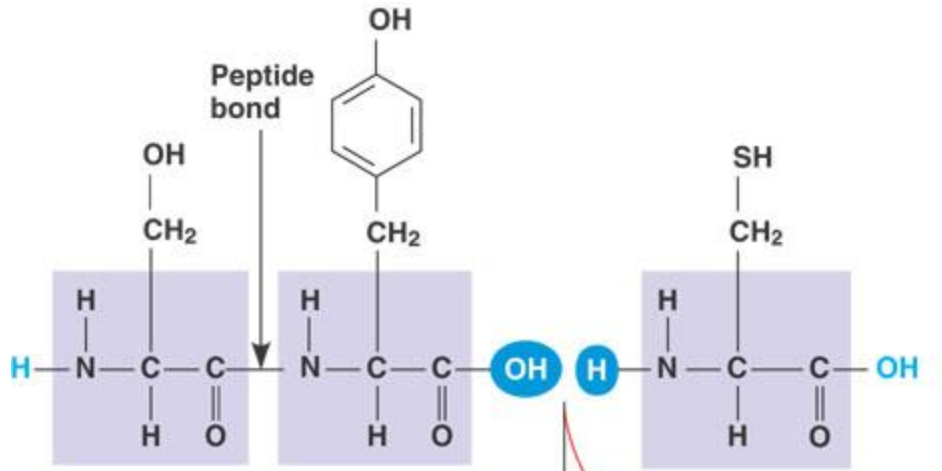
Porovnání hmotností sady  
peptidů (jejich fragmentů) s  
údaji o všech dostupných  
ORFs v databázích

Identifikace bílkovin (+ kvantifikace)

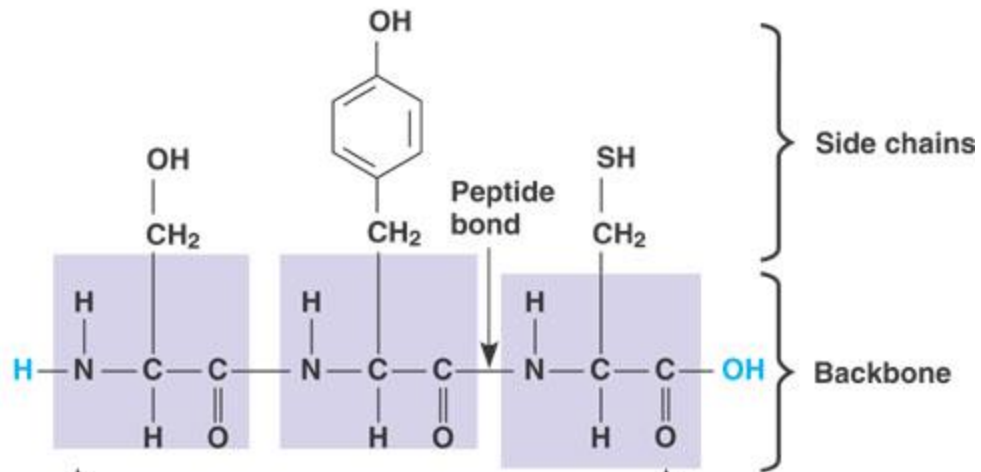
- Co je proteomika ? Proteom? Protein?
- Experimentální strategie proteomiky
- Vlastnosti AMK a proteinů

## **METODY PRÁCE S PROTEINY**

- dezintegrace, lyzace, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- chromatografie
- elektroforéza

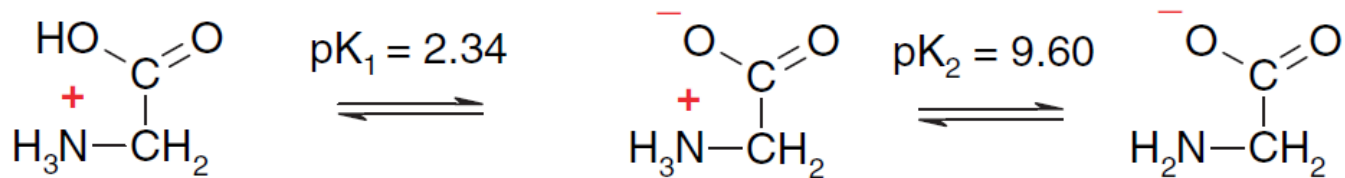


(a) Ser-Tyr Cys



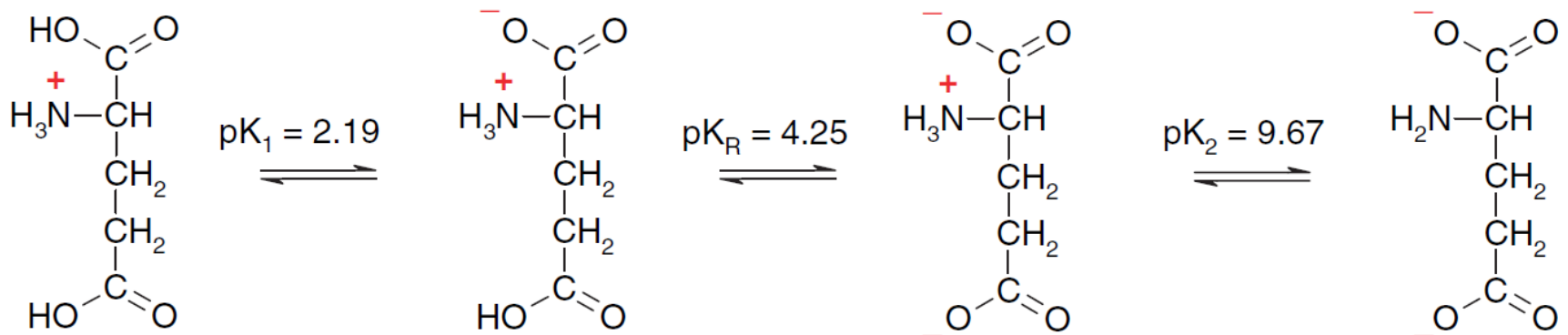
(b) Amino end (N-terminus) Carboxyl end (C-terminus)

# GLYCIN $pI = 5.97$



## K. GLUTAMOVÁ

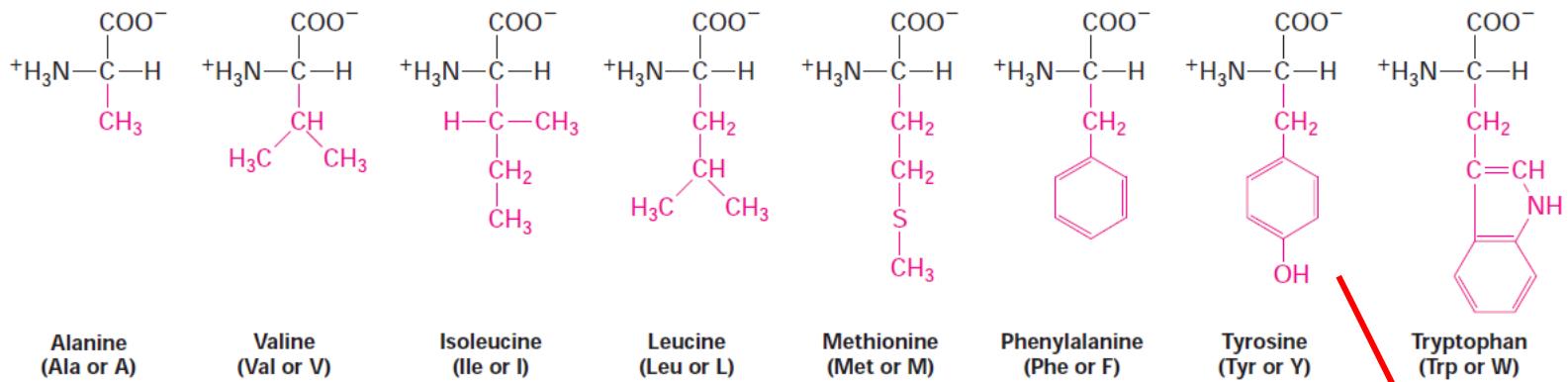
$pI = 3.22$



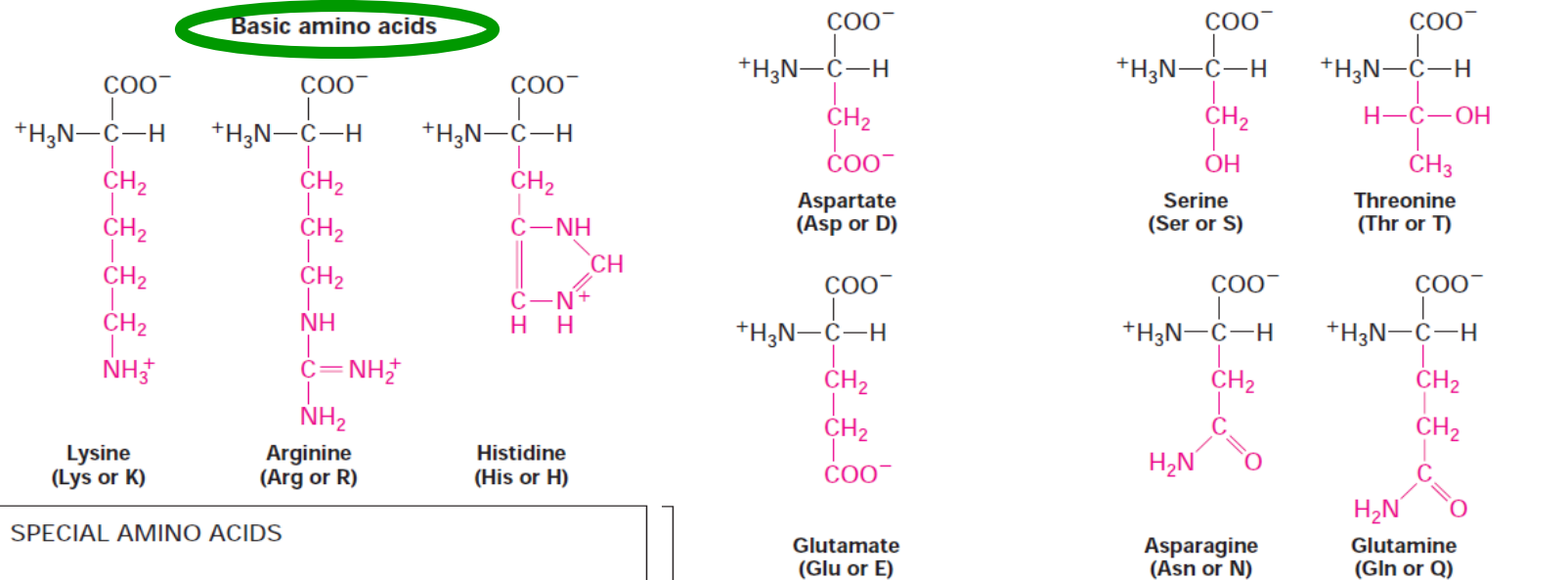
Kyselá a zásadité skupiny polypeptidu jsou protonovány a deprotonovány v závislosti na pH prostředí.

**Izoelektrický bod (pI) AMK**

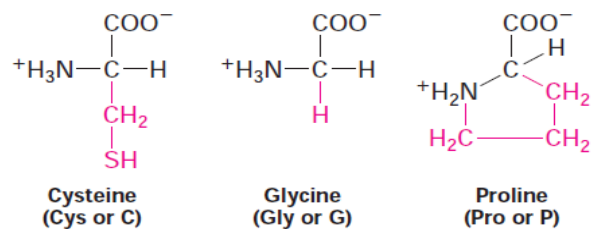
## HYDROPHOBIC AMINO ACIDS



## HYDROPHILIC AMINO ACIDS

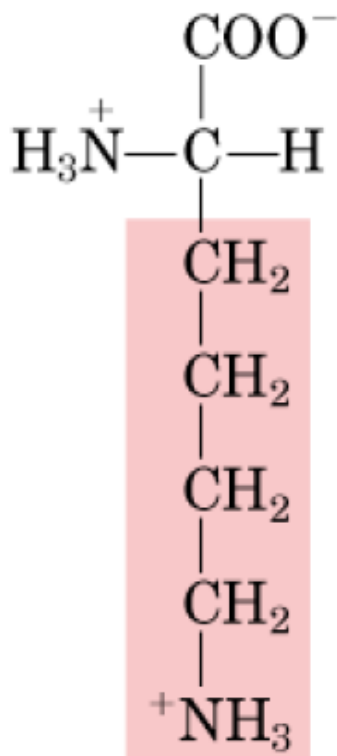


## SPECIAL AMINO ACIDS

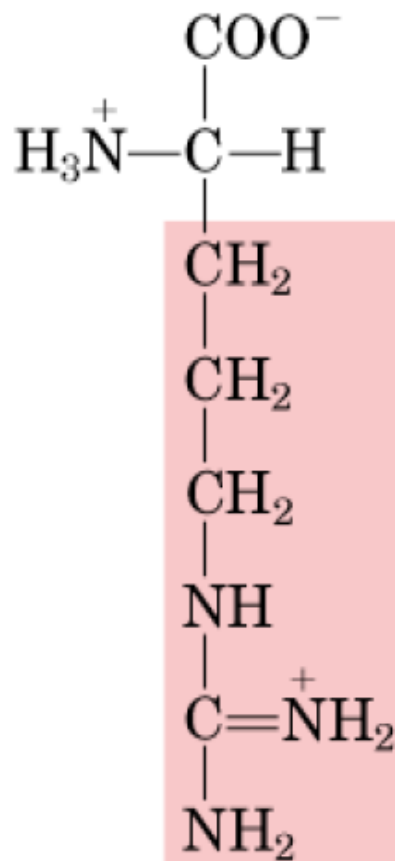




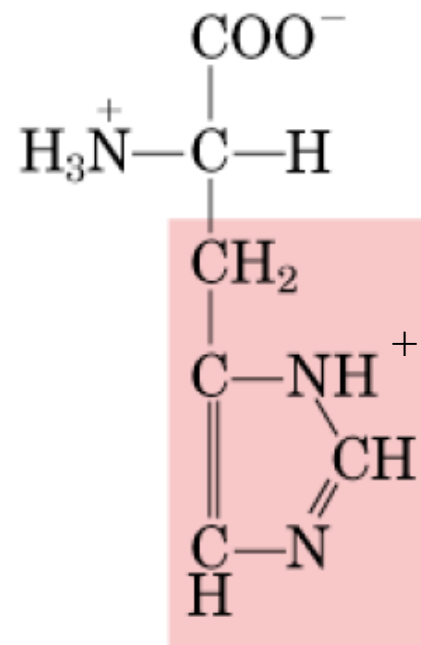
## KLADNĚ NABITÉ AMINOKYSELINY (pH 7)



Lysine



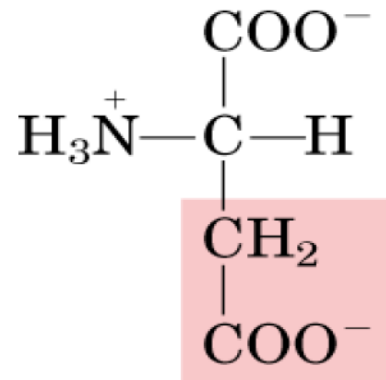
Arginine



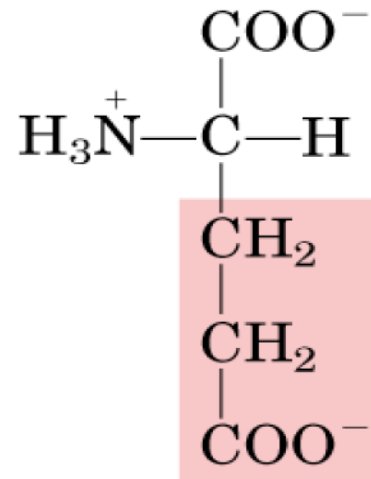
Histidine

## ZÁPORNĚ NABITÉ AMINOKYSELINY

pH 7

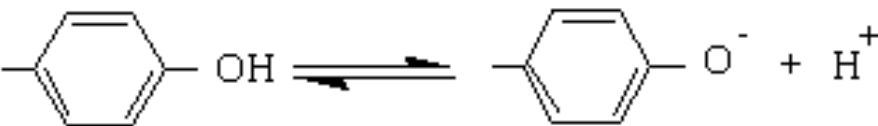
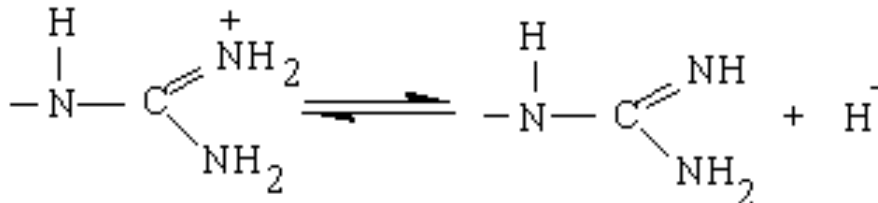


Aspartate



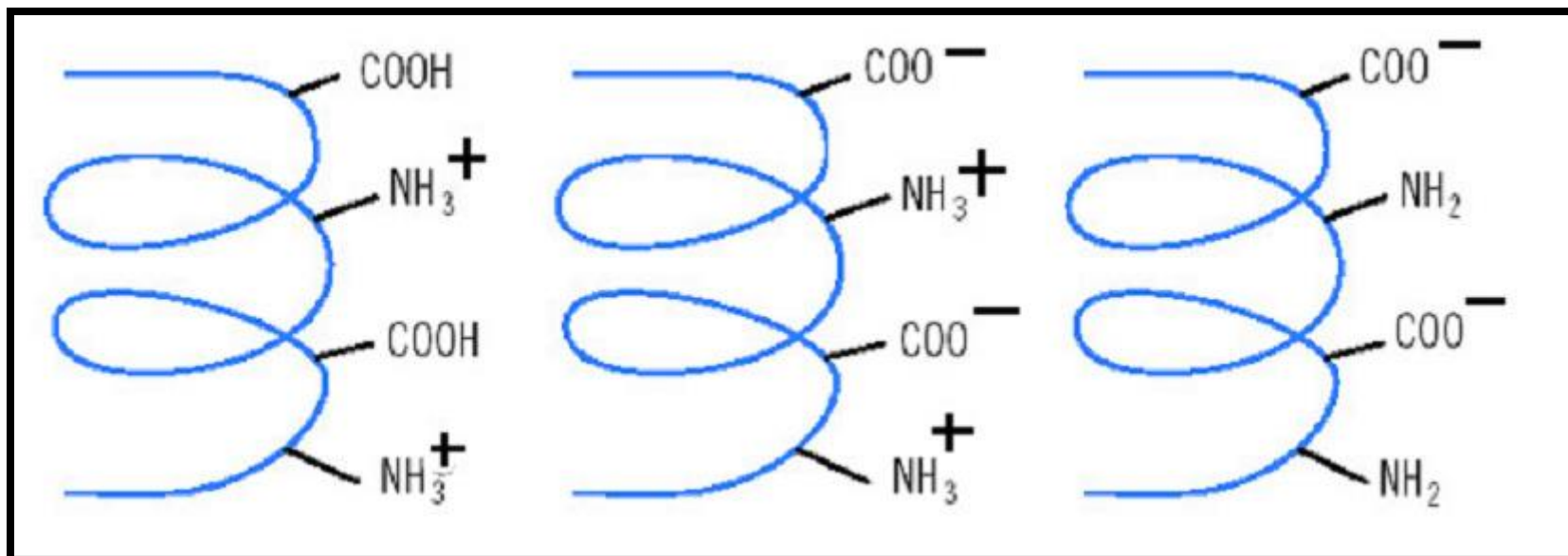
Glutamate

## Další skupiny ionizovatelné v bazickém prostředí

Cysteine	$-\text{SH} \rightleftharpoons \text{S}^- + \text{H}^+$	8.5
Tyrosine	 $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH} \rightleftharpoons \text{C}_6\text{H}_5\text{O}^- + \text{H}^+$	10.0
Lysine	$-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$	10.0
Arginine	 $\text{H}-\text{N}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}_2^+ \rightleftharpoons \text{H}-\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{NH}_2 + \text{H}^+$	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.

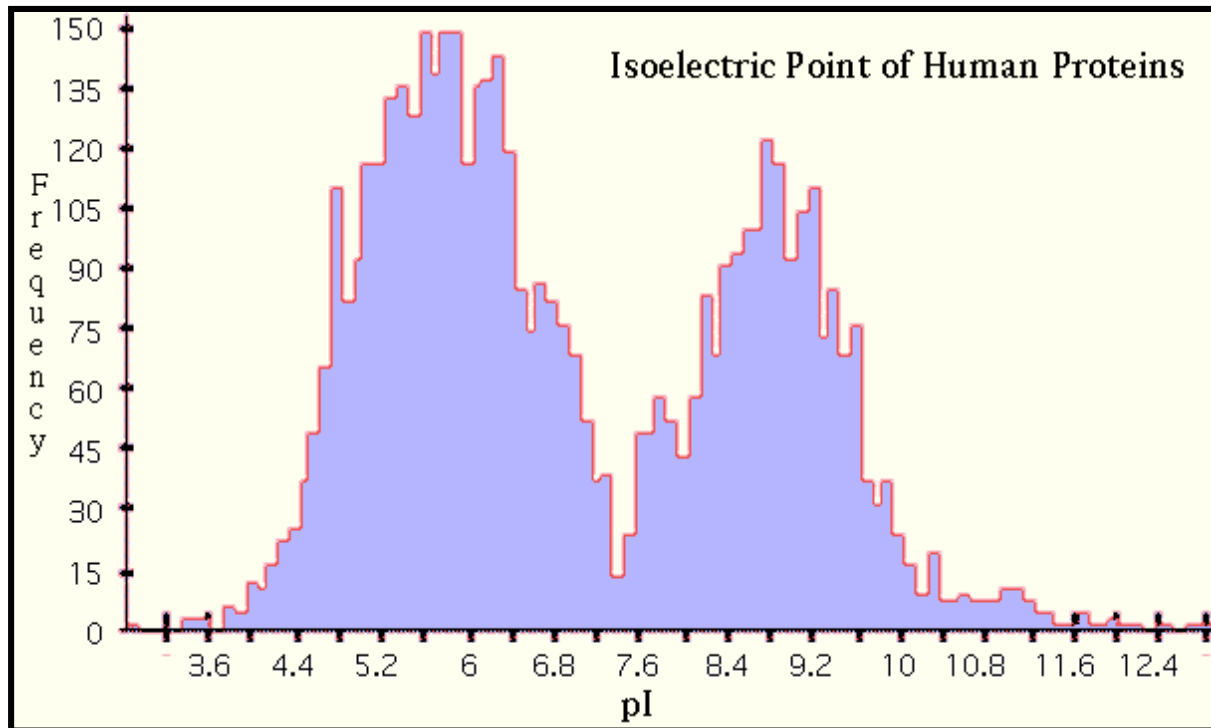


pH < pI

pH = pI

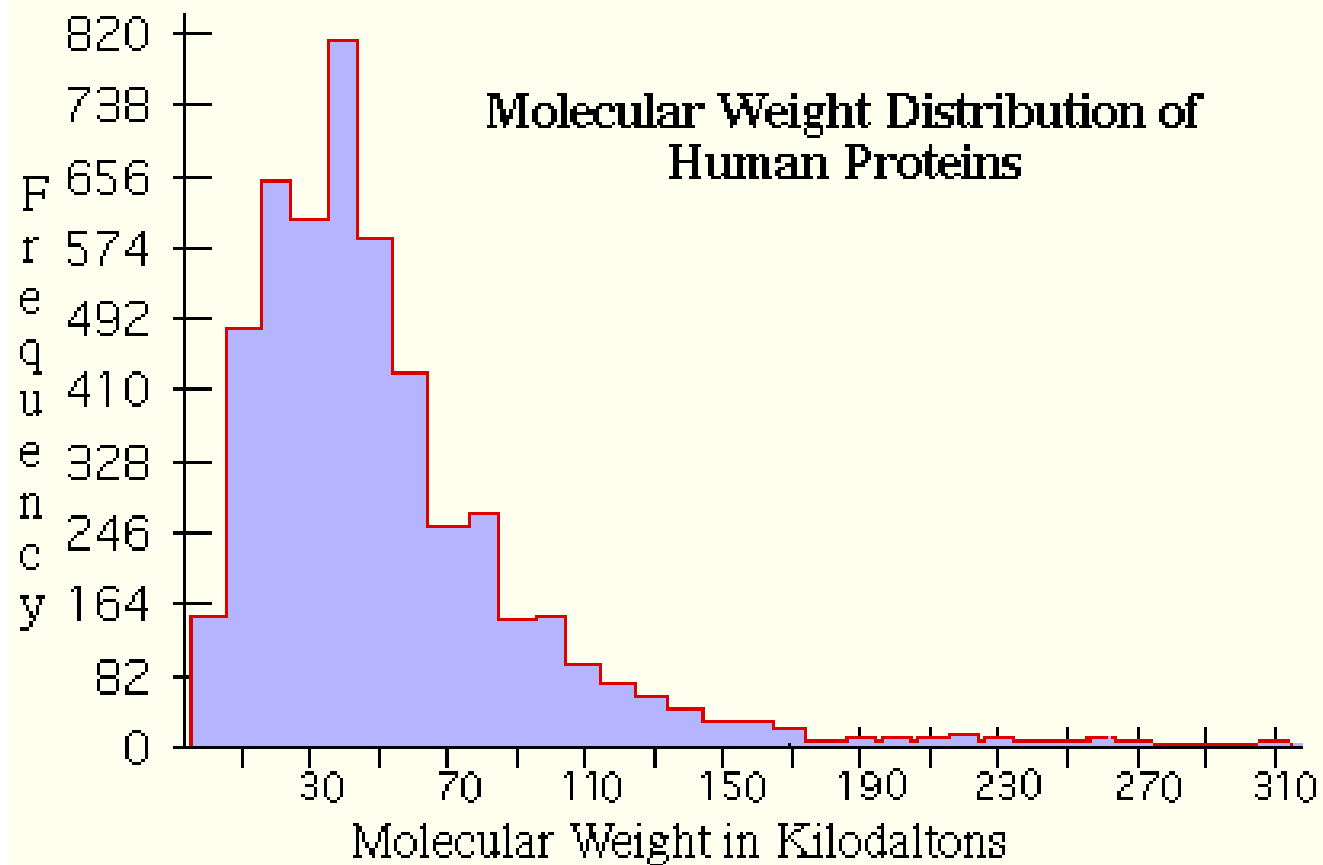
pH > pI

# Izoelektrický bod bílkovin

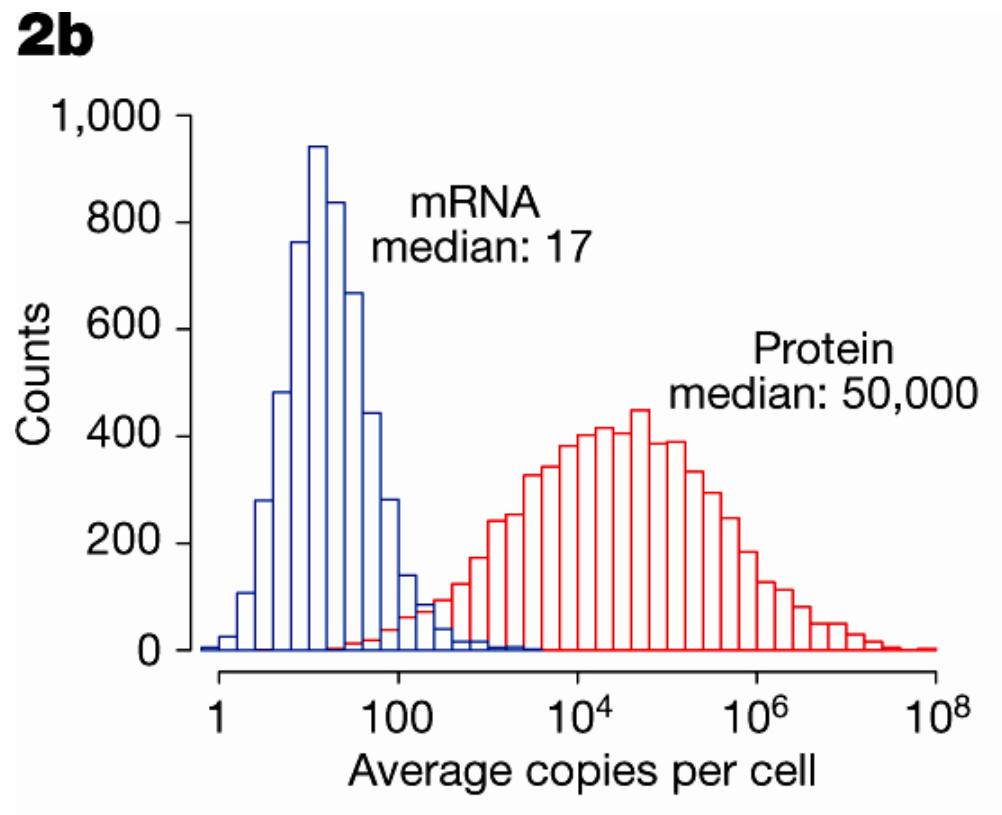


**Proteiny mají nejnižší rozpustnost v oblasti pH kolem jejich izoelektrického bodu !!!**  
**Kontaminace, ztráty, degradace, modifikace, reproducibilita**

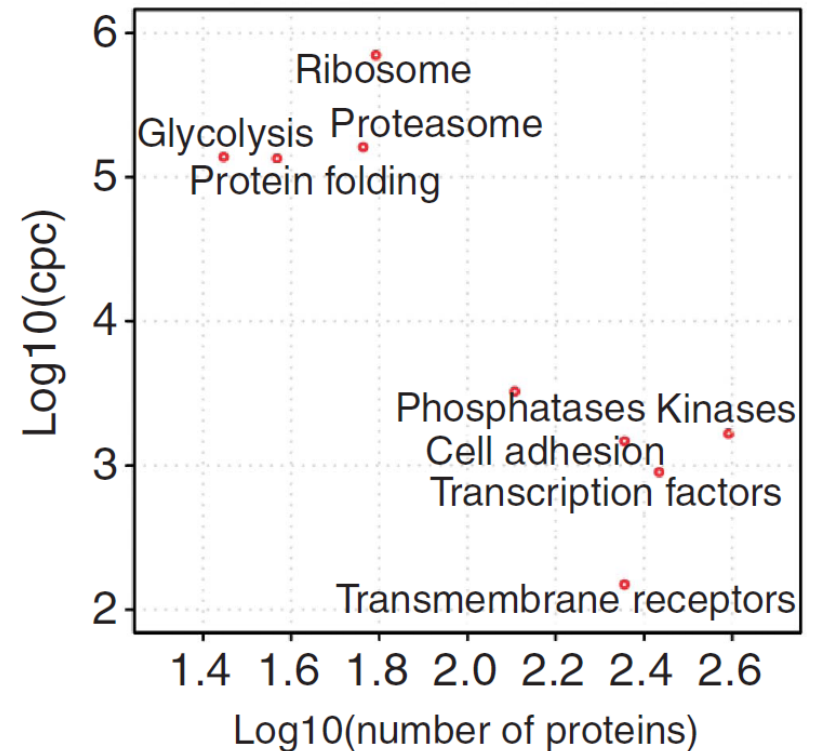
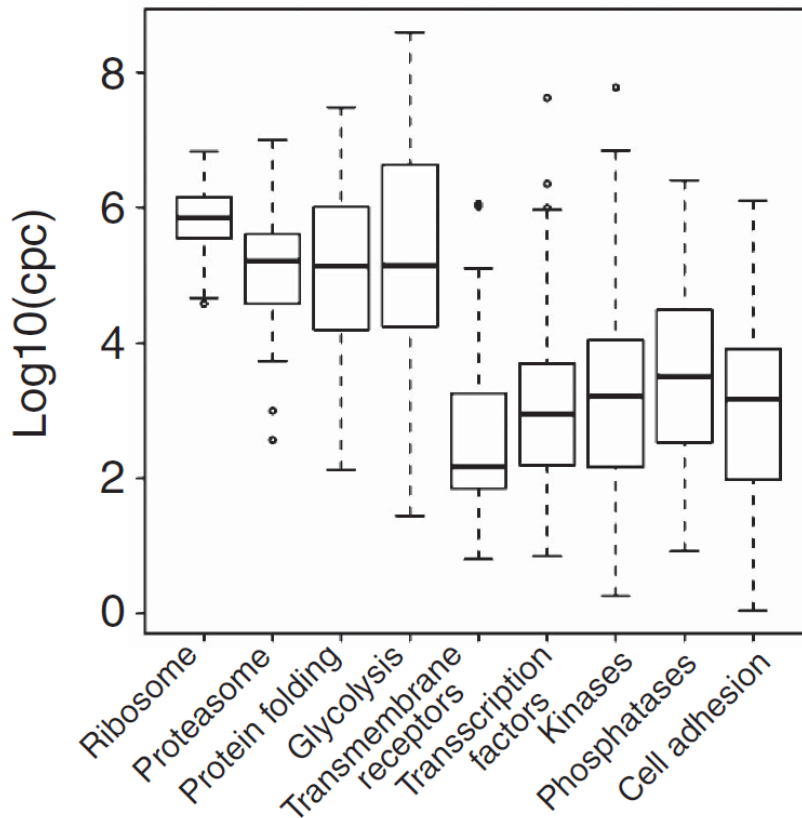
# Velikost proteinu (MW)



# 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



# Hydrofobicita proteinu

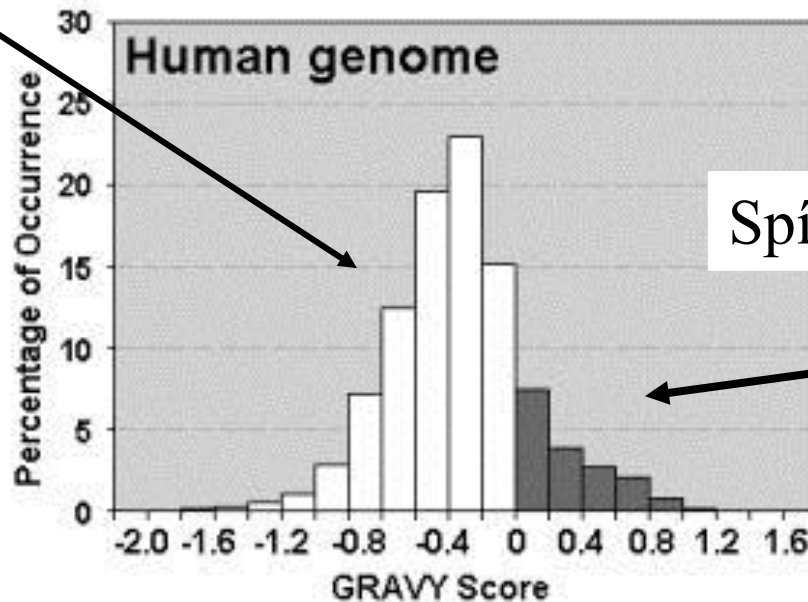
Amino Acid Name	One Letter Code	Hydropathy Score
Isoleucine	I	4.5
Valine	V	4.2
Leucine	L	3.8
Phenylalanine	F	2.8
Cysteine	C	2.5
Methionine	M	1.9
Alanine	A	1.8
Glycine	G	-0.4
Threonine	T	-0.7
Tryptophan	W	-0.9
Serine	S	-0.8
Tyrosine	Y	-1.3
Proline	P	-1.6
Histidine	H	-3.2
Glutamic acid	E	-3.5
Glutamine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

- Co je proteomika ? Proteom? Protein?
- Experimentální strategie proteomiky
- Vlastnosti AMK a proteinů

## **METODY PRÁCE S PROTEINY**

- dezintegrace, lyzace, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- chromatografie
- elektroforéza

# Dezintegrace buňky, homogenizace tkáně



## FYZIKÁLNÍ

- Mechanické homogenizátory
- Mlýny a French press
- Glass beads
- Sonikace
- Hypotonie
- Zamražení
- Kavitace

Subfrakcionace

## FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ, CHEMICKÉ

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

Dounce homogenizer



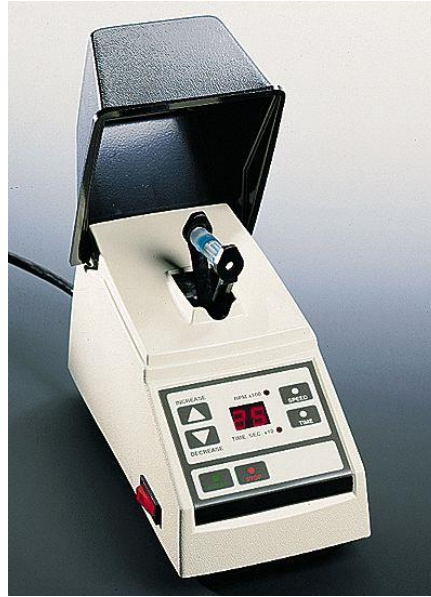
Potter-Elvehjem homogenizer



Ultrazvukový  
homogenizátor



Bead beater



French  
press

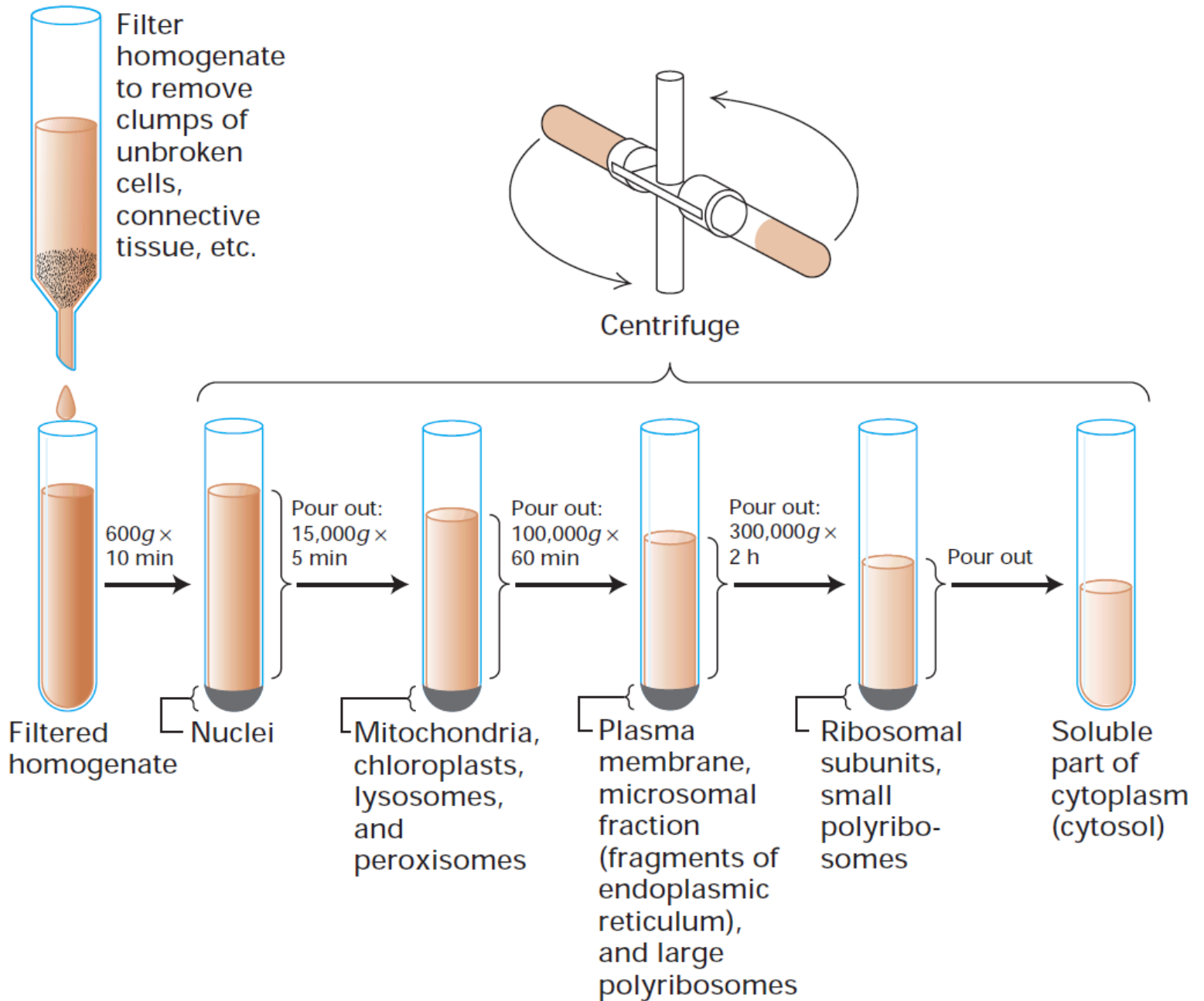


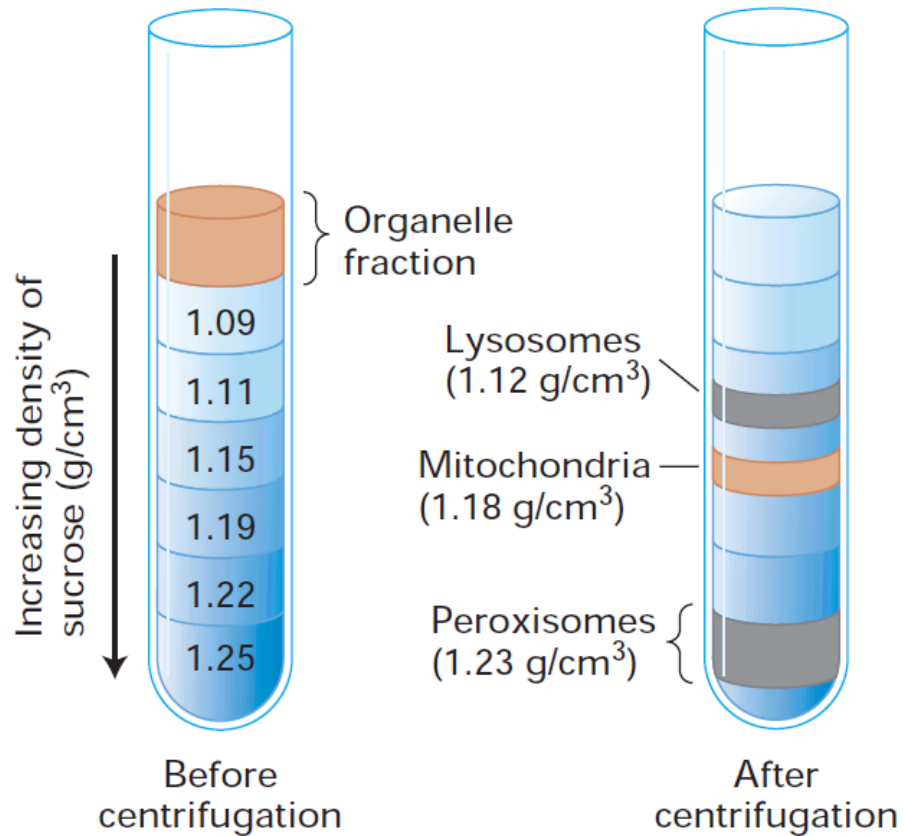
Tissue tearor



Třecí miska









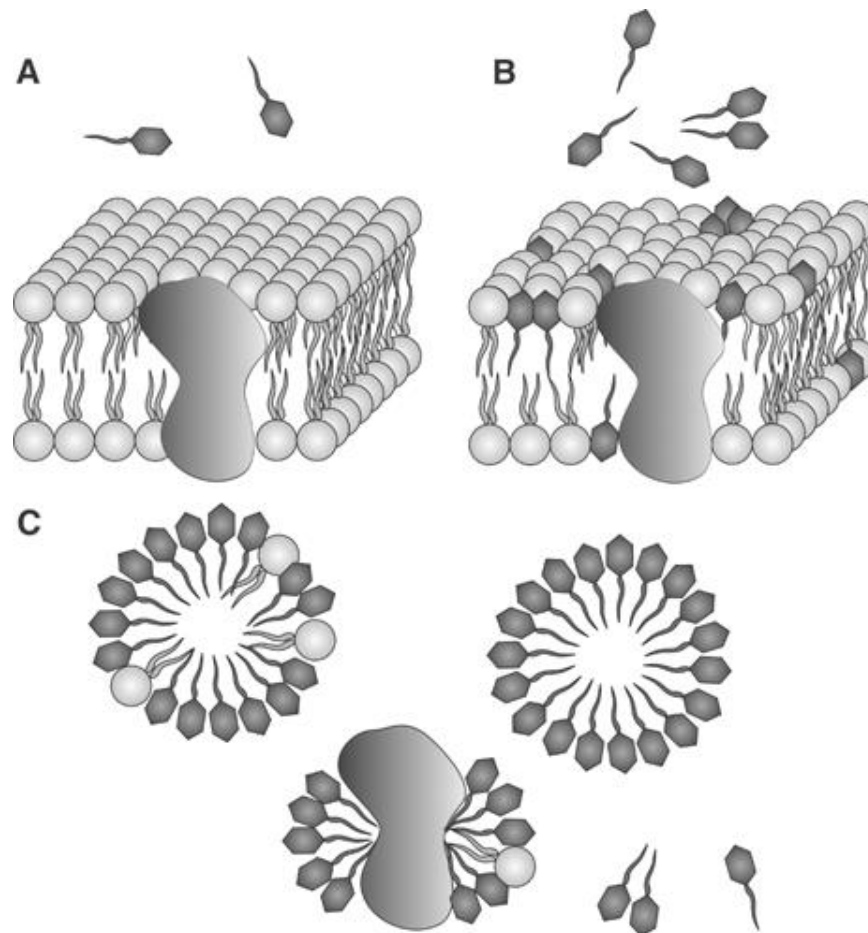
- Co je proteomika ? Proteom? Protein?
- Experimentální strategie proteomiky
- Vlastnosti AMK a proteinů

## **METODY PRÁCE S PROTEINY**

- dezintegrace, lyzace, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- chromatografie
- elektroforéza

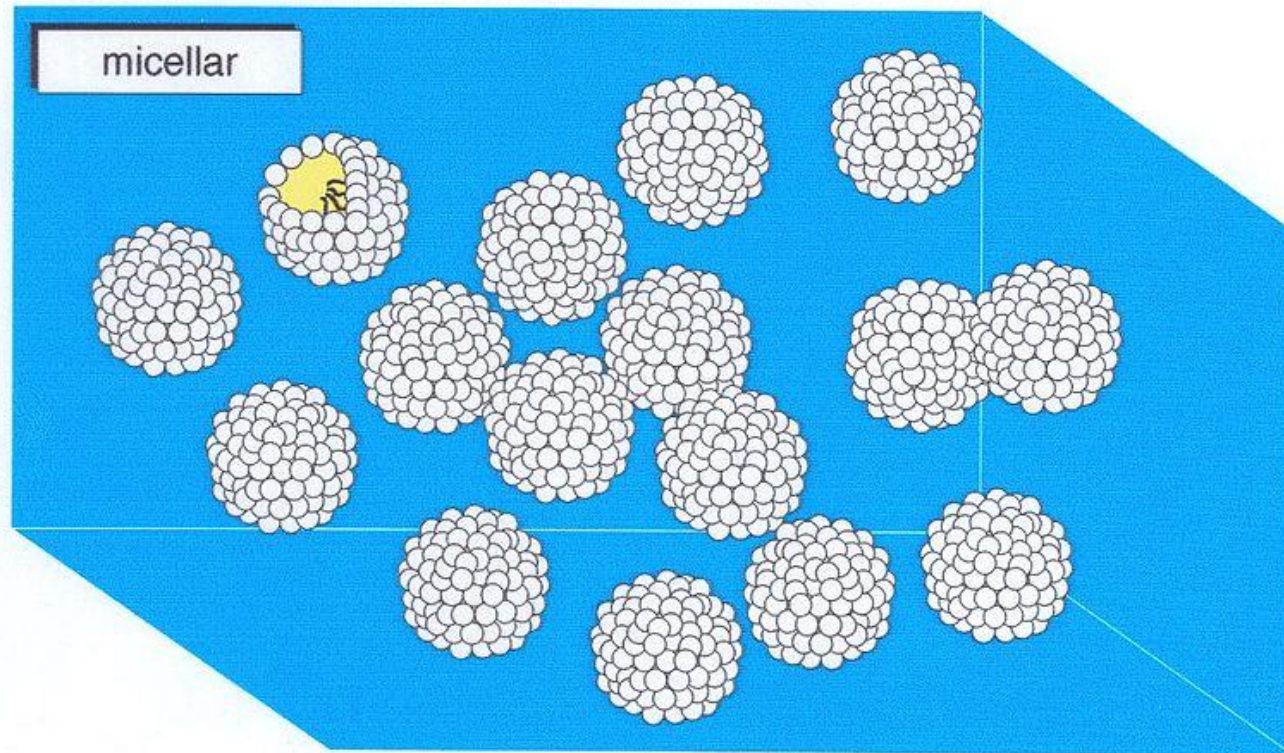
# Detergenty

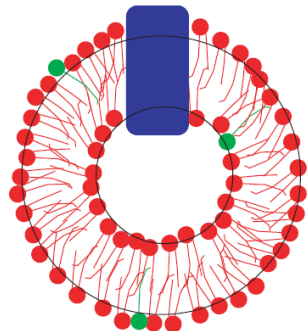
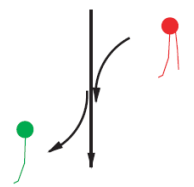
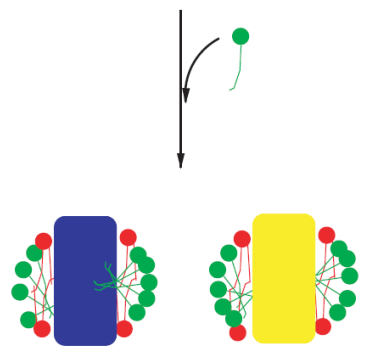
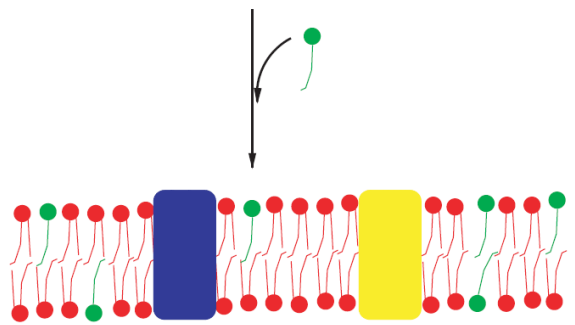
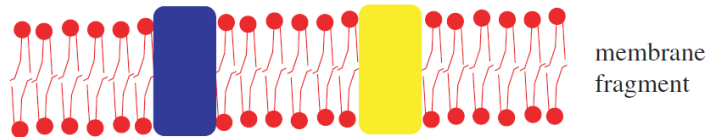
- amfifilní molekuly vytvářející ve vodě micely
- interagují s hydrofobní částí proteinů i s vodou
- dezintegrují membrány a solubilizují proteiny



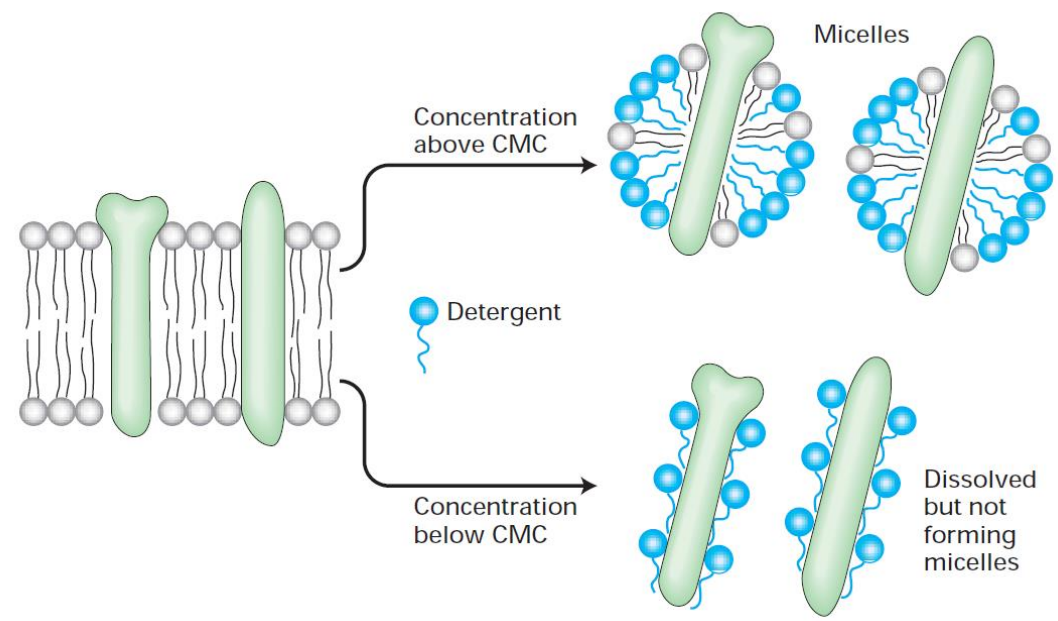
CMC (kritická micelární koncentrace) –koncentrace volného detregentu při jejímž překročení se vytvářejí micely definované velikosti (140 molekul pro Triton X-100)

Roste s T a klesá s I.





## Koncentrace nad CMC

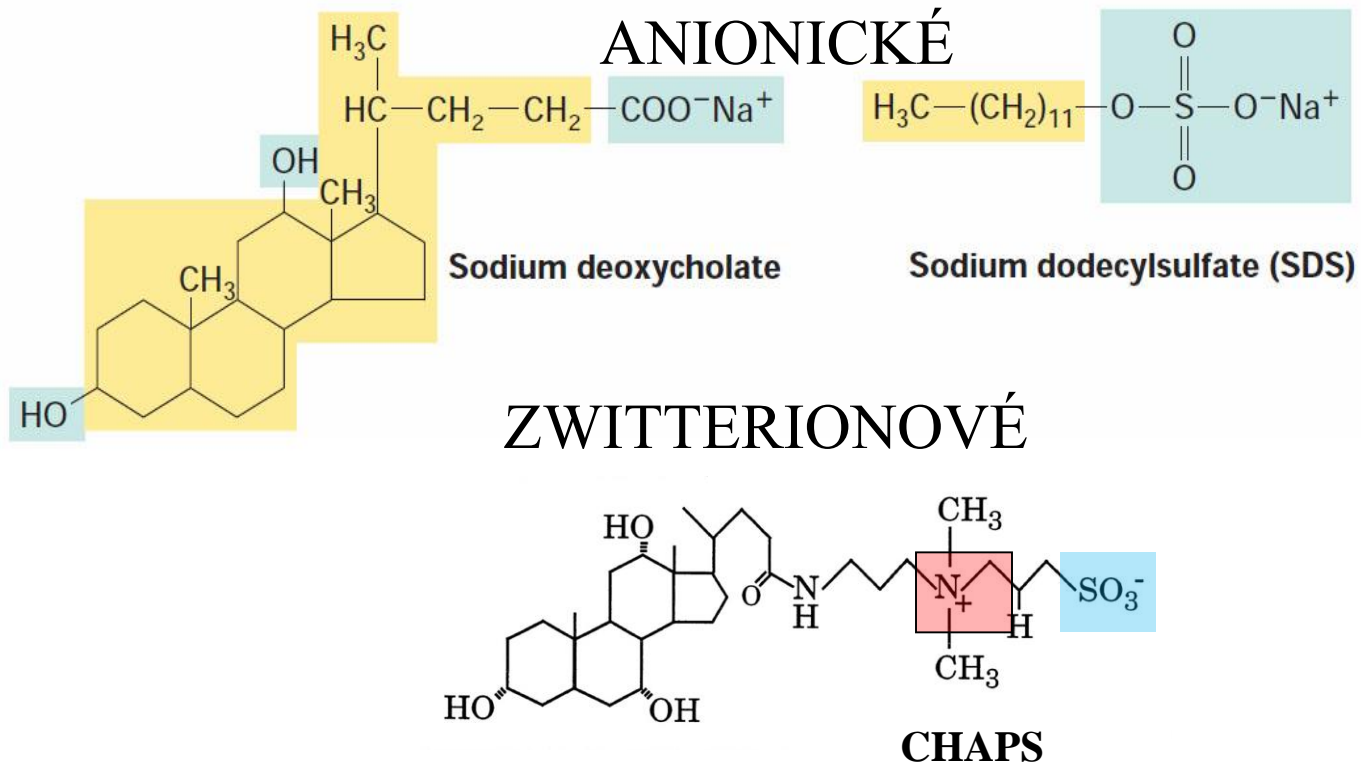


## Koncentrace pod CMC

# Detergenty

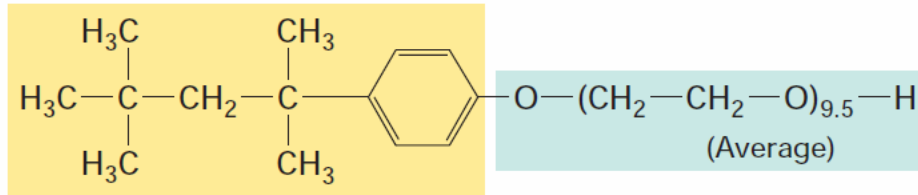
- Ionogenní (SDS, CHAPS, deoxycholate...)

Silnější, často denaturující

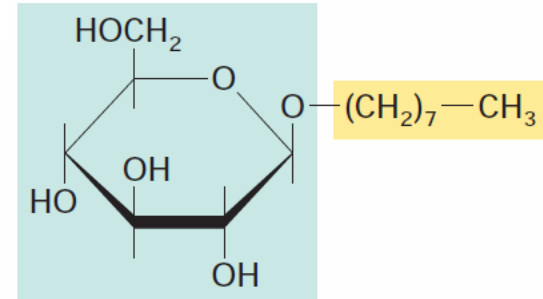


# Detergency

## 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

# Detergenty

CP (cloud point) – teplota při jejímž překročení dochází agregaci micel a k fázové separaci (polyoxyethylenových ) detergentů od vodného pufru



**Triton X114 (22 °C )**

Fázová separace Tritonem X-114 – metoda frakcionace hydrofobních membránových proteinů ohřátím nad CP.  
Poloha detergentové frakce závisí na hustotě pufru.

- Co je proteomika ? Proteom? Protein?
- Experimentální strategie proteomiky
- Vlastnosti AMK a proteinů

## **METODY PRÁCE S PROTEINY**

- dezintegrace, lyzace, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- chromatografie
- elektroforéza



# 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 nabitými úseky

Rozpustnost proteinu závisí na:

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

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

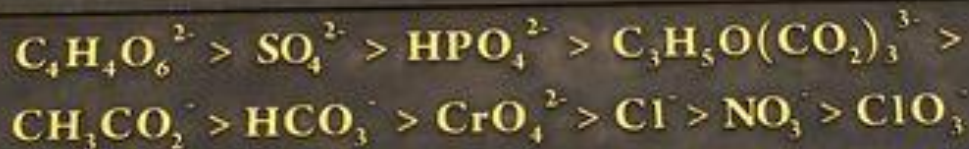
Precipitace v praxi :

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



*Franz Hofmeister*

V TĚTO BUDOVĚ PŮSOBIL CHEMIK PROF. FRANZ HOEPMISTER (1851-1922),  
KTERÝ PŘEDPOVEDĚL, ŽE AMINOKYSLINY SE V BILKOVINÁCH DOJÍ PEPTIDICKOU  
VÁZBOU, A KTERÝ V ROKĚ 1888 NAVRHL HYDROFBNÍ (HOEPMISTEROVU) ŘADU IONŮ:



IN DIESEM GEBÄUDE FORSCHTE DER BERÜHMTE CHEMISER  
PROF. FRANZ HOEPMISTER (1851-1922), WELCHER DIE PEPTIDBINDUNGEN  
DER AMINOSÄUREN IN EIWEISSEN VORHERSAGTE UND 1888 DIE HYDROFBNISCHE  
(HOEPMISTER) REIHE DER IONEN VORSCHUG.



H. ENGLOCH

# SALTING-OUT - VYSOLOVÁNÍ

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

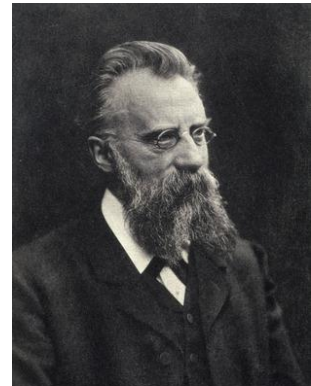
↑ Stabilita proteinu



↓ Precipitace

↑ Denaturace

↓ Stabilita proteinu



Franz  
Hofmeister

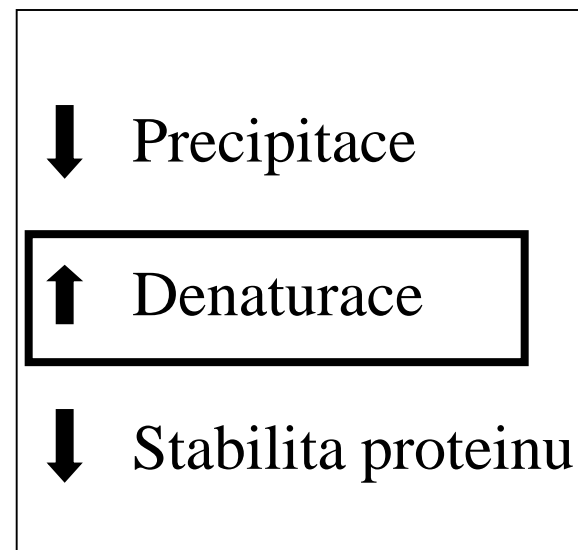
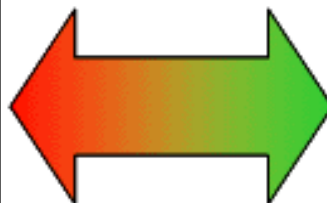
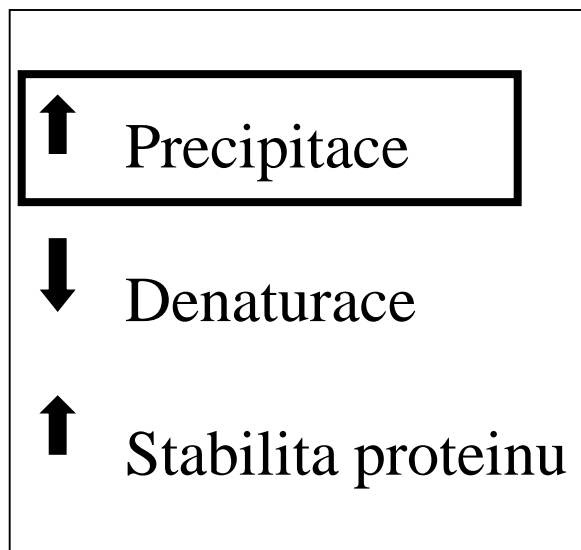
(1850-1922).

# HOFMEISTER SERIES

Cations									
$\text{NH}_4^+$	$\text{K}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{Li}^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$[\text{CH}_6\text{N}_3]^+$ guanidinium <sup>+</sup>			

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



Precipitate s íranem 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 terciální struktury narušením 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

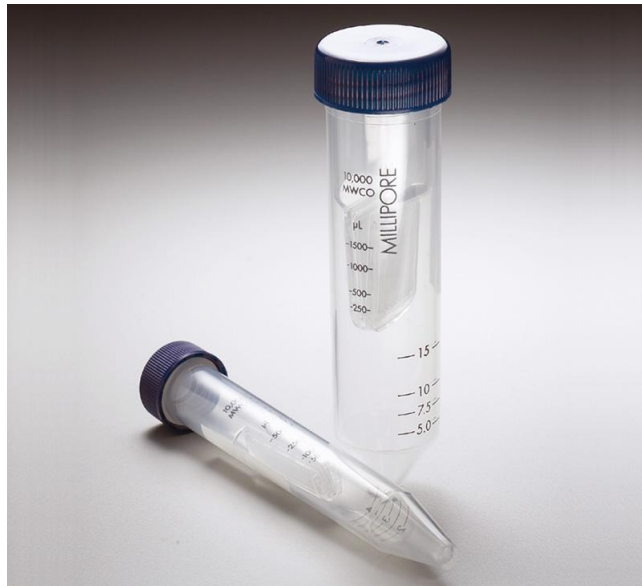
- Co je proteomika ? Proteom? Protein?
- Experimentální strategie proteomiky
- Vlastnosti AMK a proteinů

## **METODY PRÁCE S PROTEINY**

- dezintegrace, lyzace, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- chromatografie
- elektroforéza

# Zahušťování roztoku bílkovin

- precipitací
- odpařením solventu
- dialýzou proti nevodnému solventu (polyvinylpyrrolidon)
- 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



- Co je proteomika ? Proteom? Protein?
- Experimentální strategie proteomiky
- Vlastnosti AMK a proteinů

## **METODY PRÁCE S PROTEINY**

- dezintegrace, lyzace, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- chromatografie
- elektroforéza

# 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 nebo **BCA** (kys. bicinchonová)
- Komplexy AA s pigmenty (CBB G250) – dle Bradfordové

- Co je proteomika ? Proteom? Protein?
- Experimentální strategie proteomiky
- Vlastnosti AMK a proteinů

## **METODY PRÁCE S PROTEINY**

- dezintegrace, lyzace, frakcionace
- detergenty
- srážení, precipitace, denaturace
- koncentrace, filtrace
- stanovení koncentrace
- značení bílkovin
- chromatografie
- elektroforéza