

# PROTEOMIKA 2015

**Pondělí 7/12**

**Label free  
kvantifikace**

**SRM**

**Příprava vzorku pro  
shot-gun  
FASP**

**Proteomika  
membránových  
proteinů**

**Analýza  
proteinových  
komplexů**

# shot-gun metody

## (pros and cons)

- **až 10000 proteinů v jednom experimentu**
- izotopická nebo label free kvantifikace
- náročnost na instrumentaci a (bio)informatiku
- problém s inferencí proteinu (stejně peptidy v různých proteinech)
- analýza PTM je možná
- **ztráta informace o proteoformách**

# Kvaticifikace pomocí MS

MS není kvantitativní, z výšky individuálního signálu ve spektru nelze **přímo** odvozovat abundanci daného peptidu ve vzorku.

Nelze získat (semi) kvantitativní informaci **pouhým porovnáním** dvou různých spekter.

Nebo ano ?

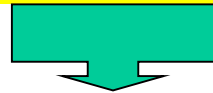
# „Label Free“ MS metody relativní kvantifikace bílkovin

Existuje vztah mezi intenzitou MS signálu peptidu a jeho abundancí



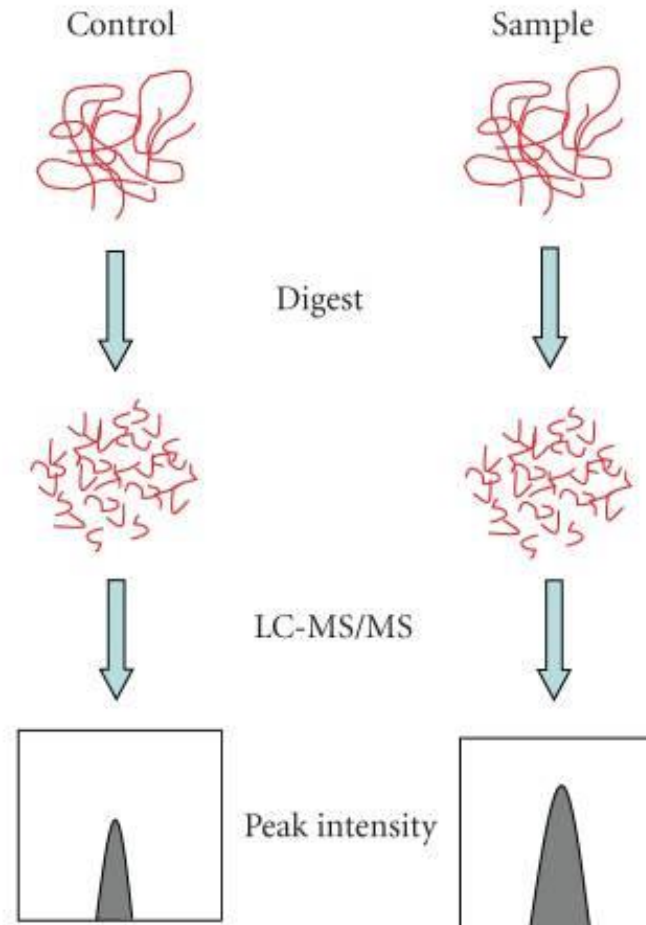
porovnávání iontových intenzit peptidů

Čím více je daného proteinu ve vzorku, tím víc MS/MS spekter naměříme



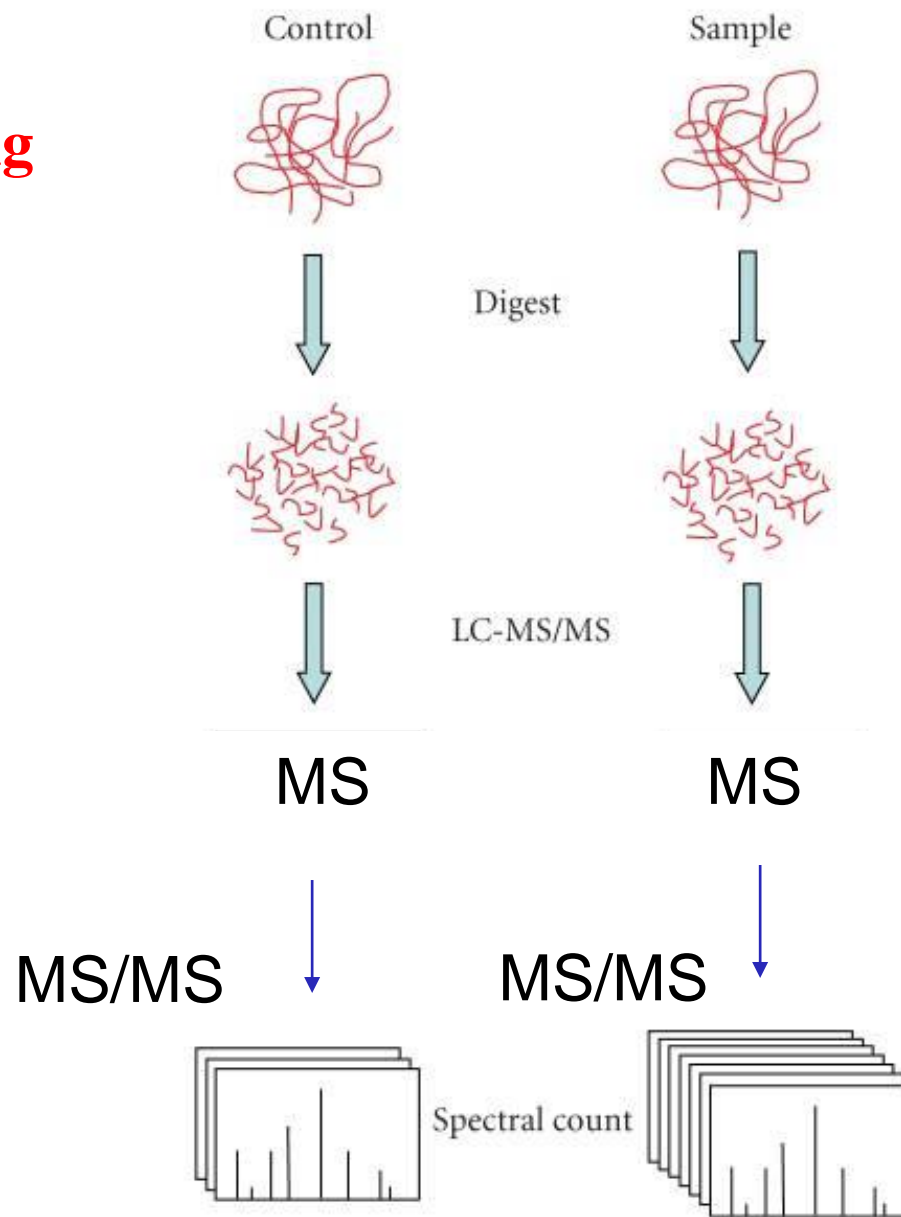
Spectral (a)counting

## Porovnávání iontových intenzit peptidů (AUC)



Existuje vztah mezi intenzitou MS signálu peptidu a jeho abundancí

## Spectral counting (MS/MS)



Čím více je daného proteinu ve vzorku, tím víc jeho MS/MS spekter naměříme

# PROTEOMIKA 2015

**Pondělí 7/12**

**Label free  
kvantifikace**

**SRM**

**Příprava vzorku pro  
shot-gun  
FASP**

**Proteomika  
membránových  
proteinů**

**Analýza  
proteinových  
komplexů**

Když víme co chceme detekovat či kvantifikovat,  
ale nemáme protilátku....

# SRM/MRM

**(Selected Reaction Monitoring, Multiple Reaction Monitoring)**

„Western bez protilátky“



Když víme co chceme detekovat či kvatifikovat, ale nemáme protilátku.....

## SRM/MRM – Single/Multiple reaction monitoring

**Triple quadrupole MS** (2 molekulární filtry a jedna kolizní cela)

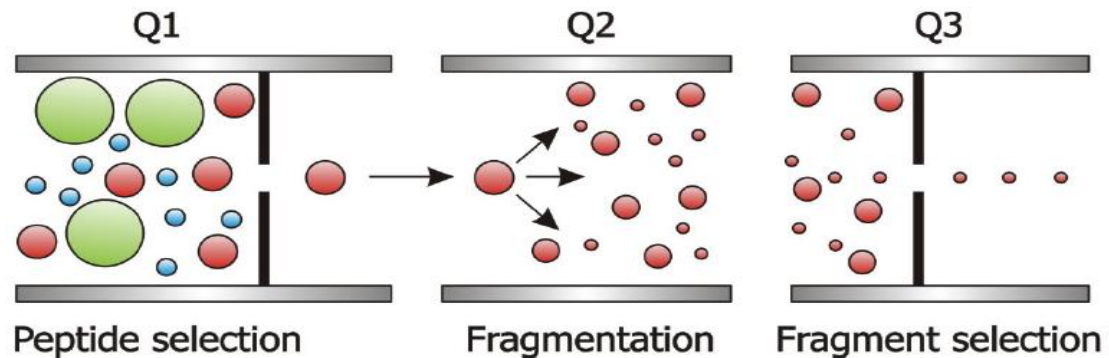
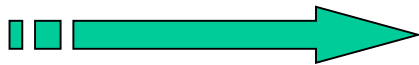
Známý protein k detekci



Reprezentativní peptide  
známé hodnoty  $m/z$



Fragment téhož peptidu  
o známé hodnotě  $m/z$



1. Q1 - Filtr je nastaven na známou  $m/z$  rodičovského peptidu
2. Q2 – Vybraný peptid je fragmentován
3. Q3 - Filtr je nastaven na známou  $m/z$  vybraného fragmentu

# SRM/MRM – Single/Multiple reaction monitoring

## Výběr vhodného peptidu:

Proteotypický peptid – peptid unikátní pro daný protein

- dobře ionizovatelný, pozorovatelný MS
- vhodná velikost, známá retenční doba na LC
- nesmí být náchylný k PTM

Fragment

- hojný, dobře ionizovatelný, pozorovatelný MS

## Absolutní kvantifikace

je možná při použití známé koncentrace izotopicky značeného peptidu identické sekvence (AQUA)

# PROTEOMIKA 2015

**Pondělí 7/12**

**Label free  
kvantifikace**

**SRM**

**Příprava vzorku pro  
shot-gun  
FASP**

**Proteomika  
membránových  
proteinů**

**Analýza  
proteinových  
komplexů**



# Shotgun postupy v proteomice



DIGESCE

Extrémně komplexní  
směs peptidů  
 $10^5$ - $10^7$  různých

1D SDS-PAGE

„In gel“ digesce  
10-50 „řízků“  
a extrakce

Komplexní směs peptidů  
 $10^2$ - $10^6$  různých

2D LC  
SCX-RP

IEF- RP LC

RP LC

ESI -MS/MS  
LC-MALDI MS/MS





Filozofie přípravy vzorků v roztoku:

*Dosáhnout rozbití buněk a maximální rozpustnosti všech bílovin/peptidů při zachování kompatibility se separační metodou a MS analýzou.*

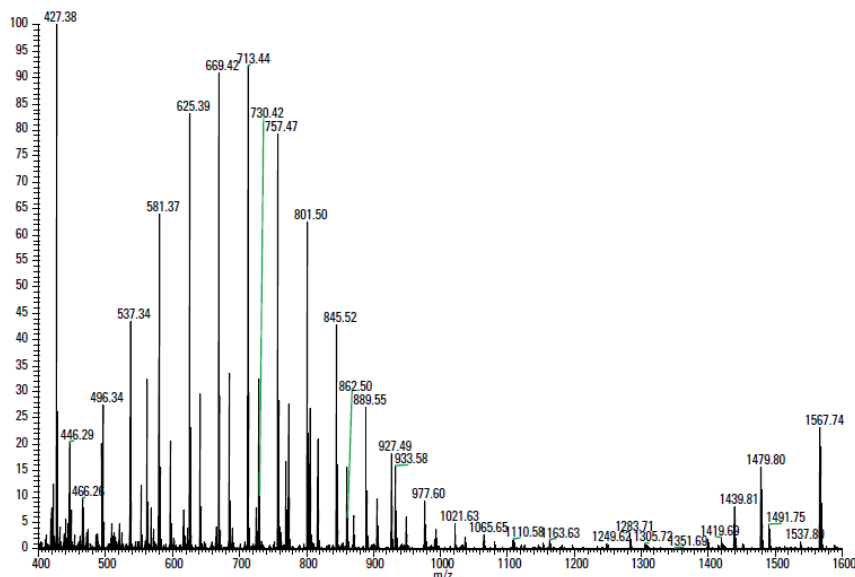
**Detrgenty a močovina umožňují solubilizovat a denaturovat vzorek ale jsou nekompatibilní s digescí a/nebo LC-MS analýzou**

***Jak je využít a jak se jich zase rychle zbavit?***

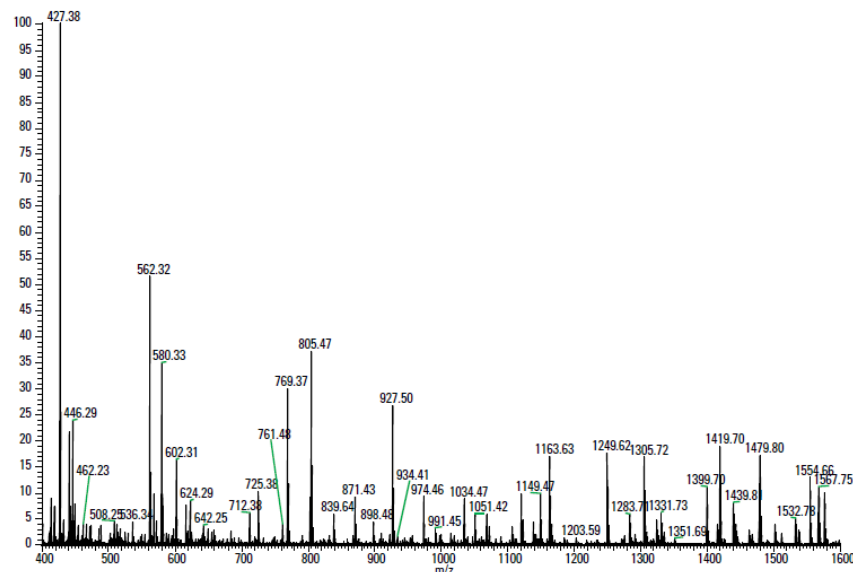
# Odstranění detergentů

**SDS!**  
**Triton X100!**  
Rapigest  
Deoxycholate (SDC)

Kyselinou štěpitelné detergenty \* Precipitace \* Fázová separace \* LC \* **výměna pufry**



**Triton X-100, Unprocessed**



**Triton X-100, Processed**

## Filter Assisted Sample Preparation - FASP

Výměna pufru, koncentrace vzorku, zbavení se detergentu, digesce  
**UNIVERZÁLNÍ ŘEŠENÍ - FASP**



Vhodné filtry s cut off 10-30 kDa

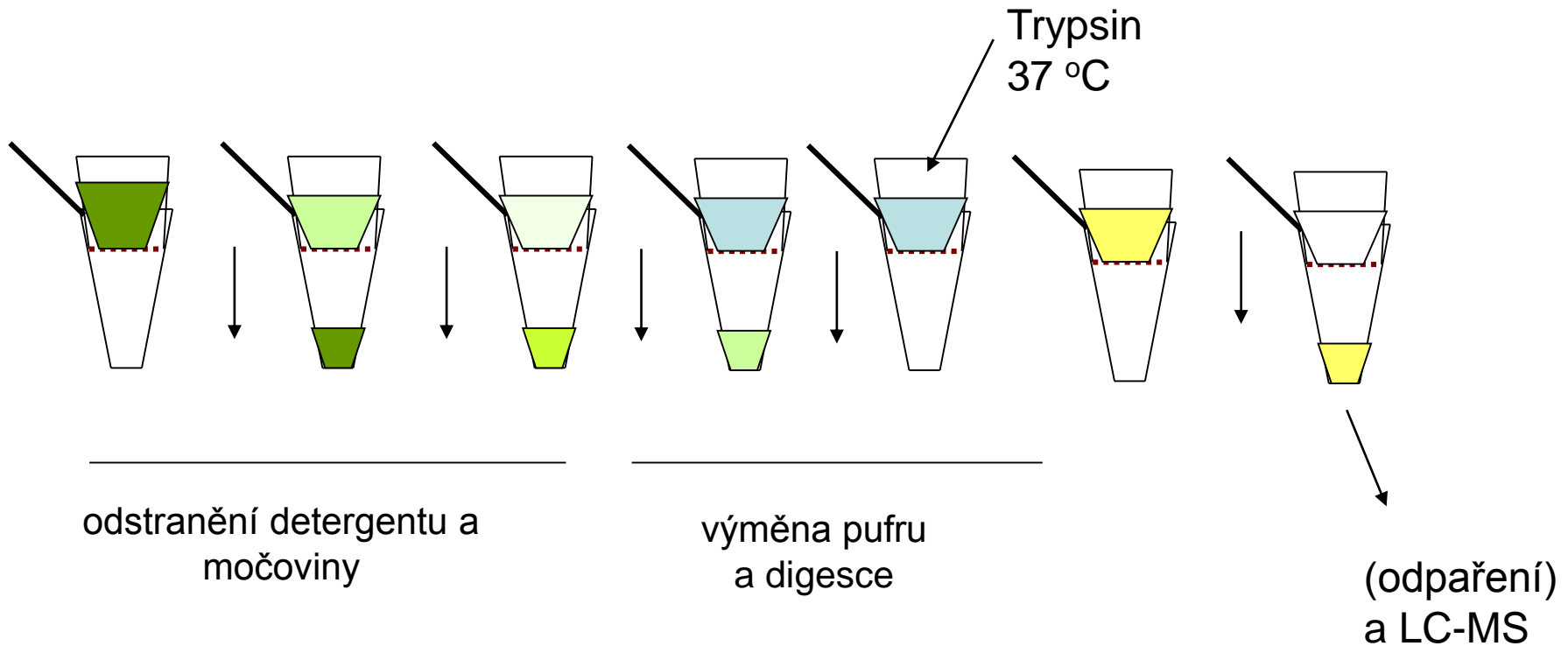
Manza LL, et al. Proteomics. 2005 May;5(7):1742-5.

Wiśniewski JR, et al. Nat Methods. 2009 May;6(5):359-62.

# Filter Assisted Sample Preparation - FASP

Vzorek proteinů s vysokou koncentrací močoviny a/nebo detergentu  
(nelze štěpit trypsinem)

Vhodné filtry s cut off 10-30 kDa





# PROTEOMIKA 2015

**Pondělí 7/12**

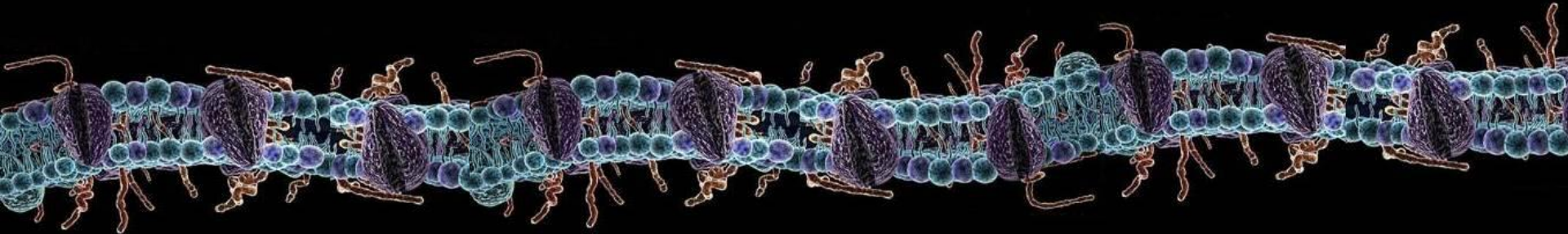
**Label free  
kvantifikace**

**SRM**

**Příprava vzorku pro  
shot-gun  
FASP**

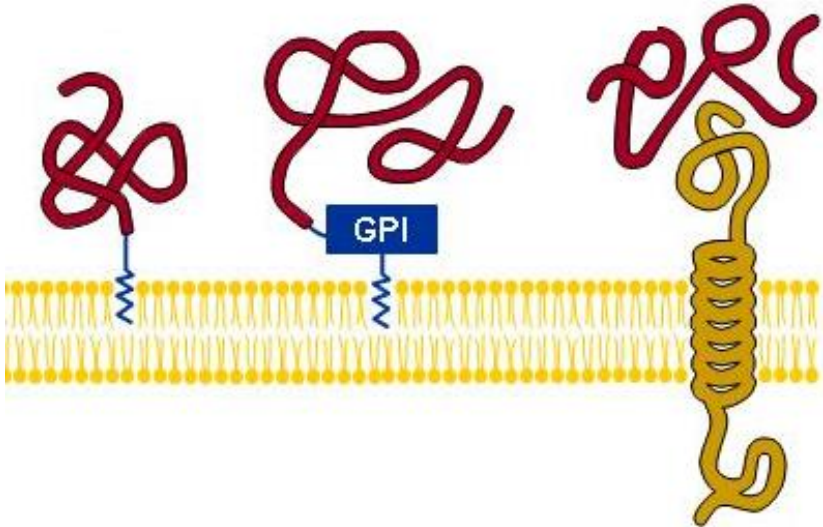
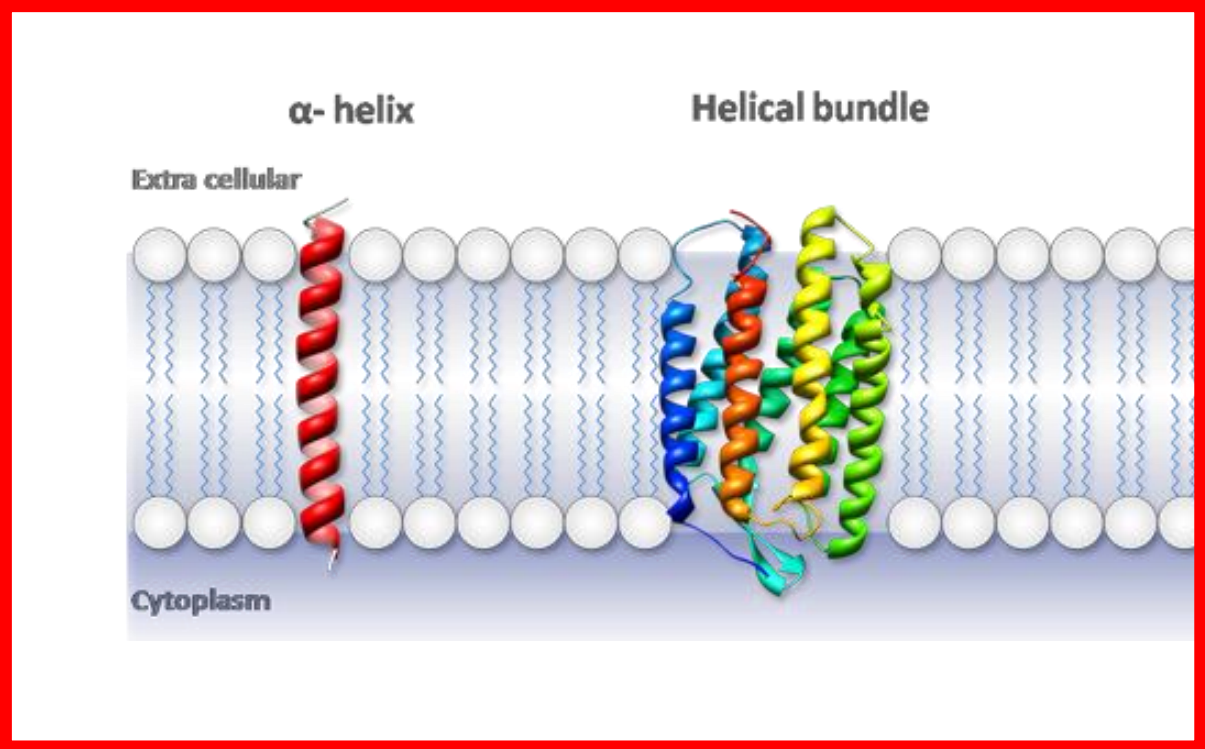
**Proteomika  
membránových  
proteinů**

**Analýza  
proteinových  
komplexů**



## **MEMBRÁNOVÉ PROTEINY**

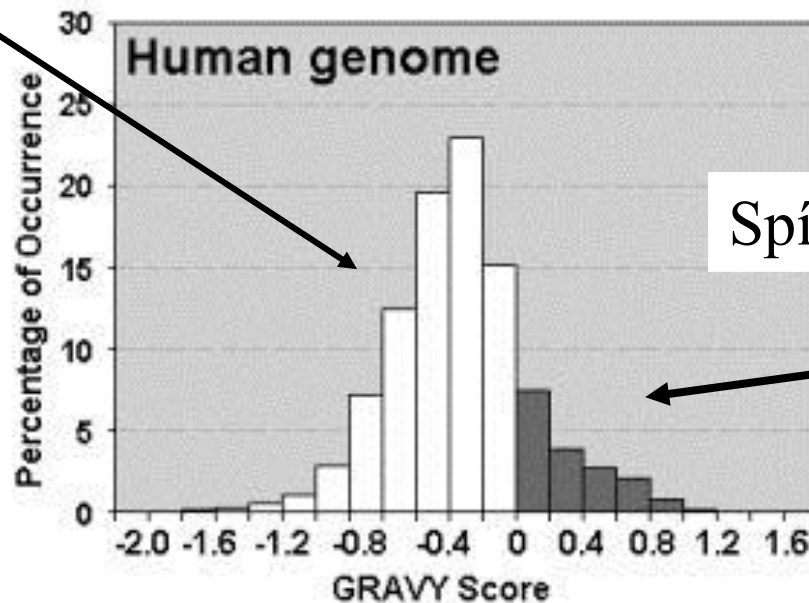
- **Vysoká biologická důležitost**
- **cca 25 % všech bílkovin**
- **Nízké koncentrace a vysoká hydrofobicita**
- **Cíle poloviny existujících léčiv**
- **Vyžadují specifické přístupy**
- **Nedostatečně pokryty klasickými proteomickými analýzami**



# Hydrofobicita proteinu

**GRAVY SCORE** – Grand average hydropathy  
(součet „hydrofobicity“ (-4.6 až 4.6) jednotlivých aminokyselin  
dělený počtem aminokyselin)

Spíš rozpustné



Spíš transmembránové

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

# 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

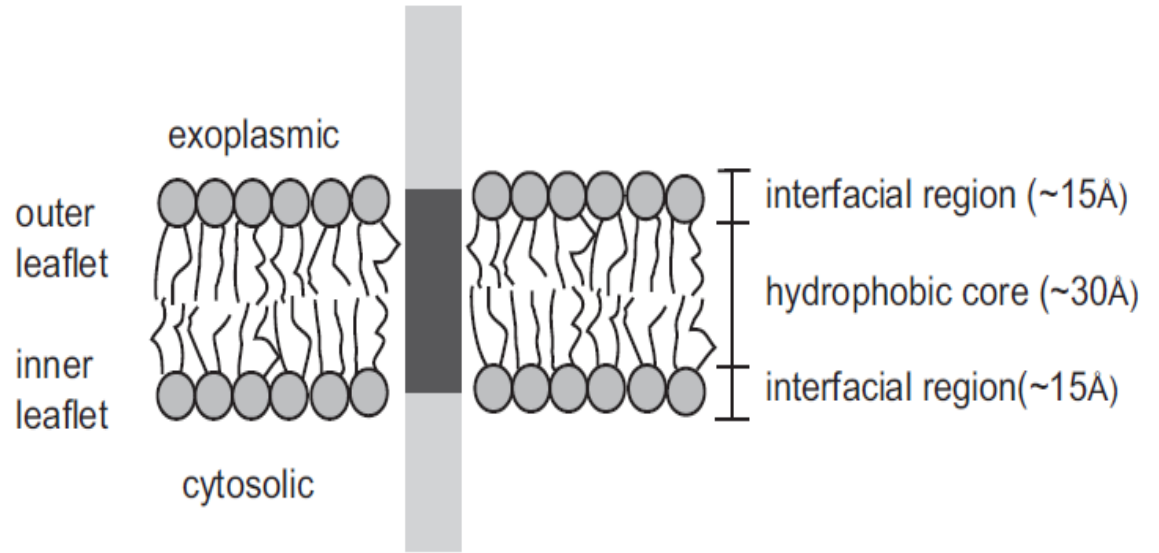
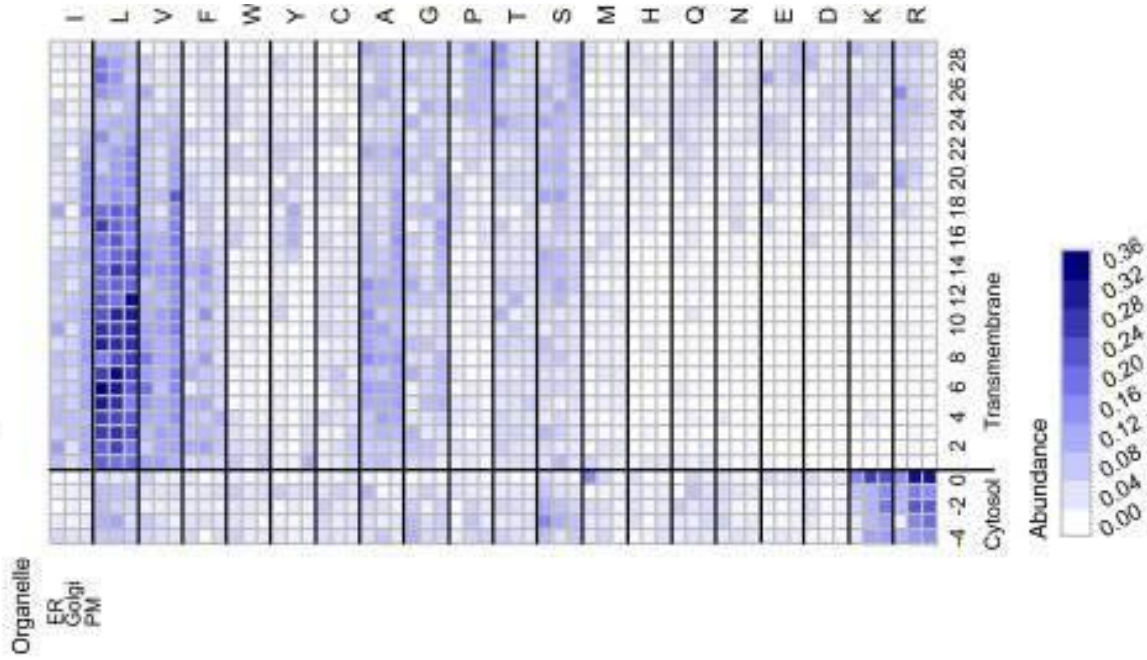
**GRAVY SCORE** – Grand average  
hydropathy  
(součet „hydrofobicity“ (-4.5 až 4.5)  
jednotlivých aminokyselin dělený  
počtem aminokyselin)

**Aminokyseliny typické pro  $\alpha$ -helixy:**

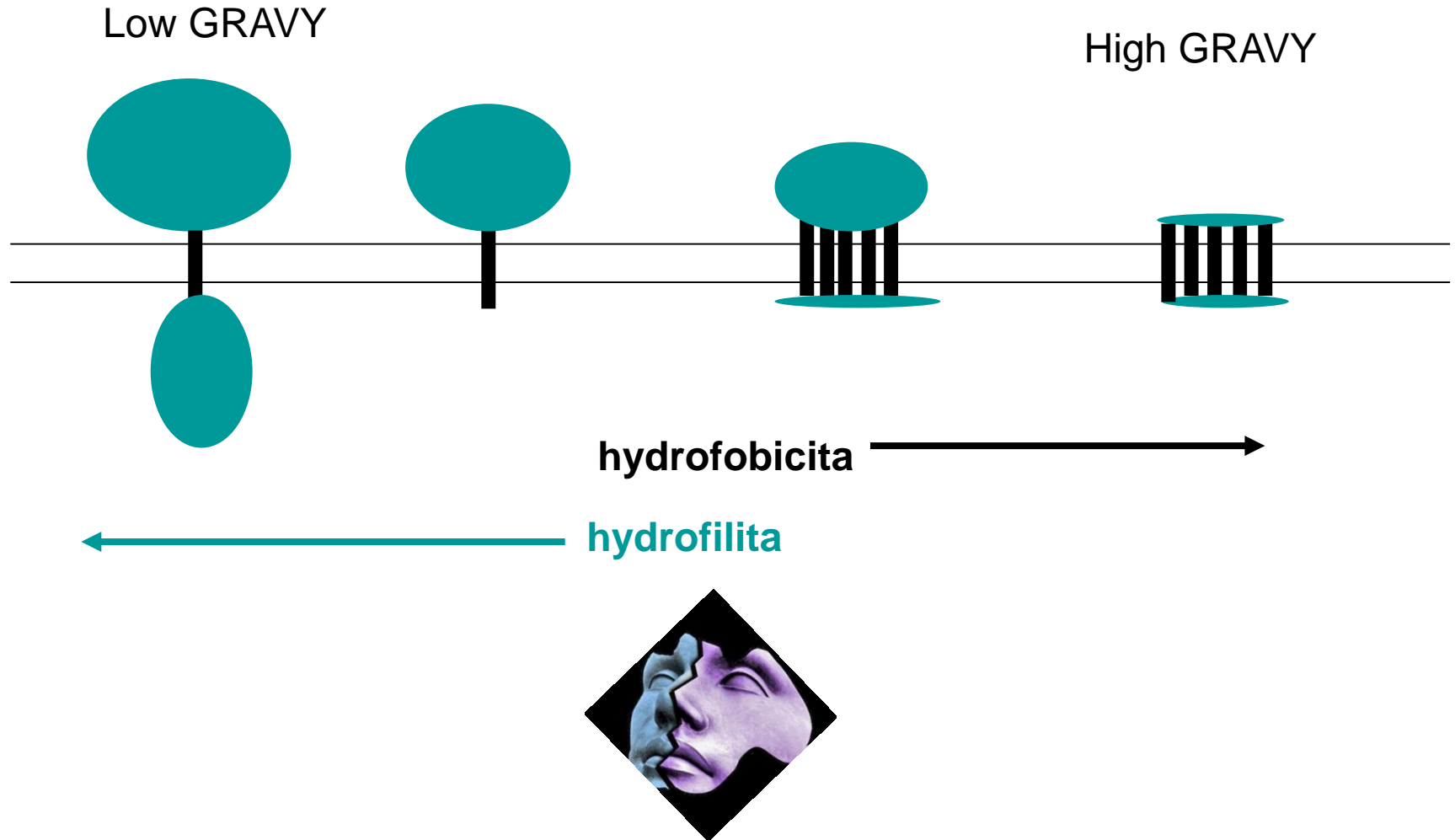
„FAMILY VW“ (+S)

# „Positive inside“ rule

## B TMD composition - Vertebrates



# Amfipatie a různý stupeň hydrofobicity/hydrofility TM proteinů



Problém v polárním i nepolárním rozpouštědle !

# STRATEGIE MEMBRÁNOVÉ PROTEOMIKY

Izolace membránové frakce

**NEBO**

Izolace MP na základě povrchového značení  
a afinitní chromatografie



# Překonávání amfipatie a nízké abundance TM proteinů

## Izolace (obohacení) membrán

- centrifugace
- koloidní silica
- povrchové značení a izolace

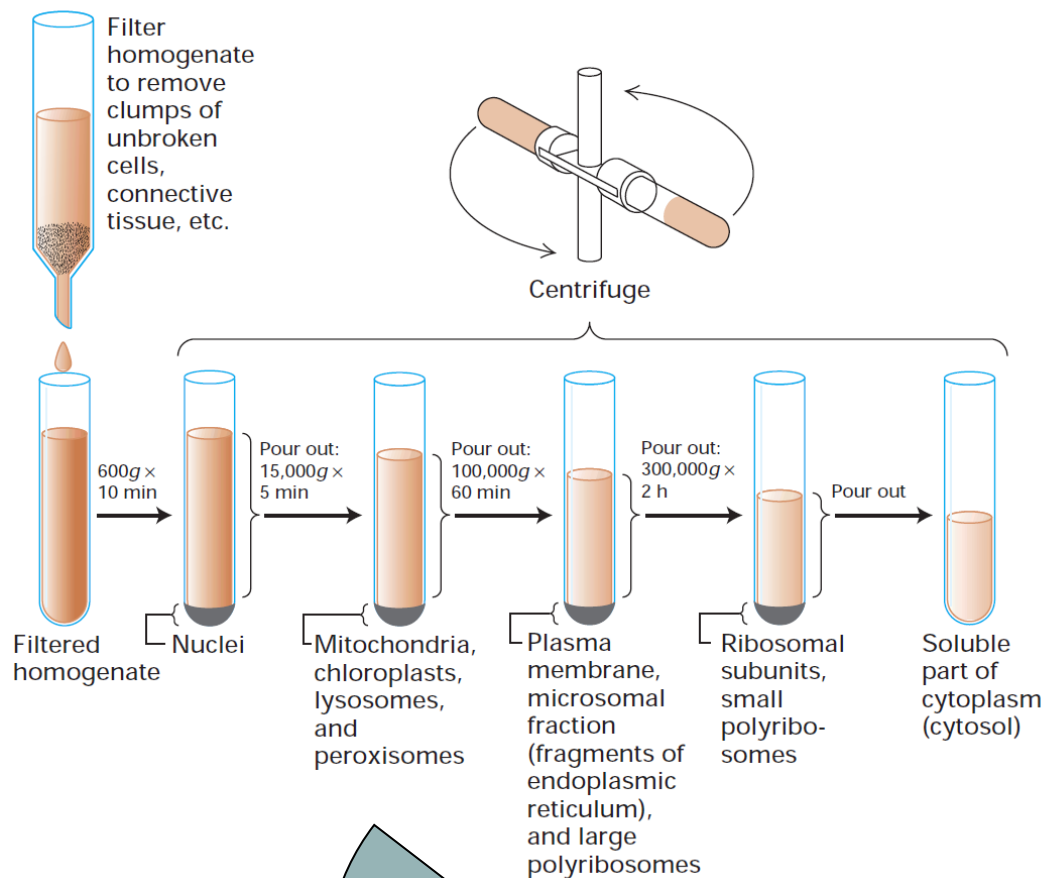
## Obohacení/izolace TM proteinů

- „carbonate stripping“ - uhličitan sodný, vysoké pH
- delipidace (MetOH/chloroform)
- fázová separace (Triton X 114)
- izolace povrchově značených (Ab, biotin)

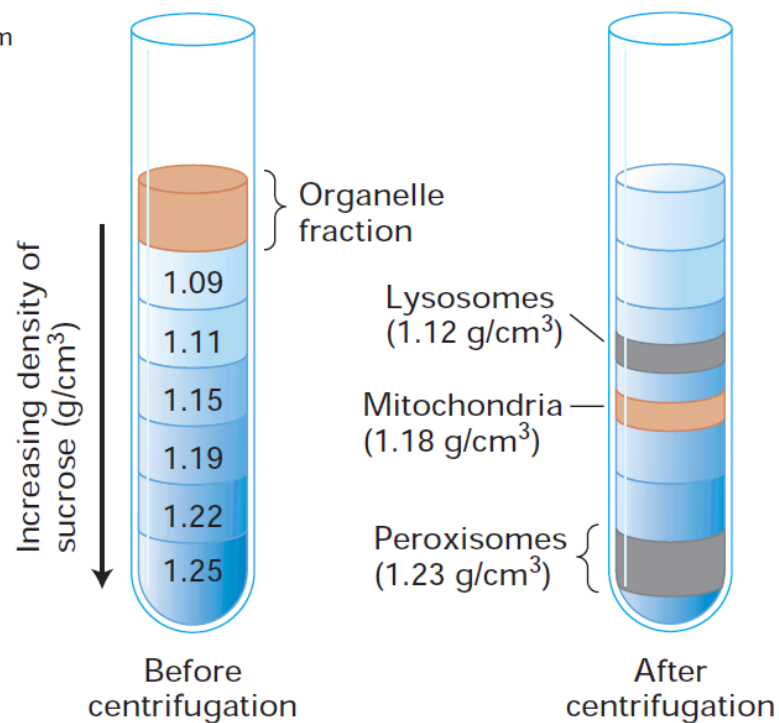
## Solubilizace TM

- chaotropy
- detergenty (versus MS!)
- organická rozpouštědla

# Obohacení „membránových“ frakcí



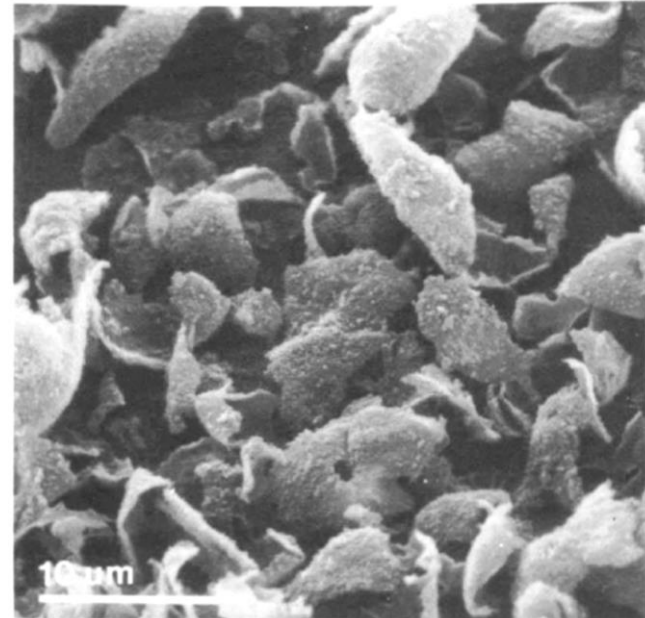
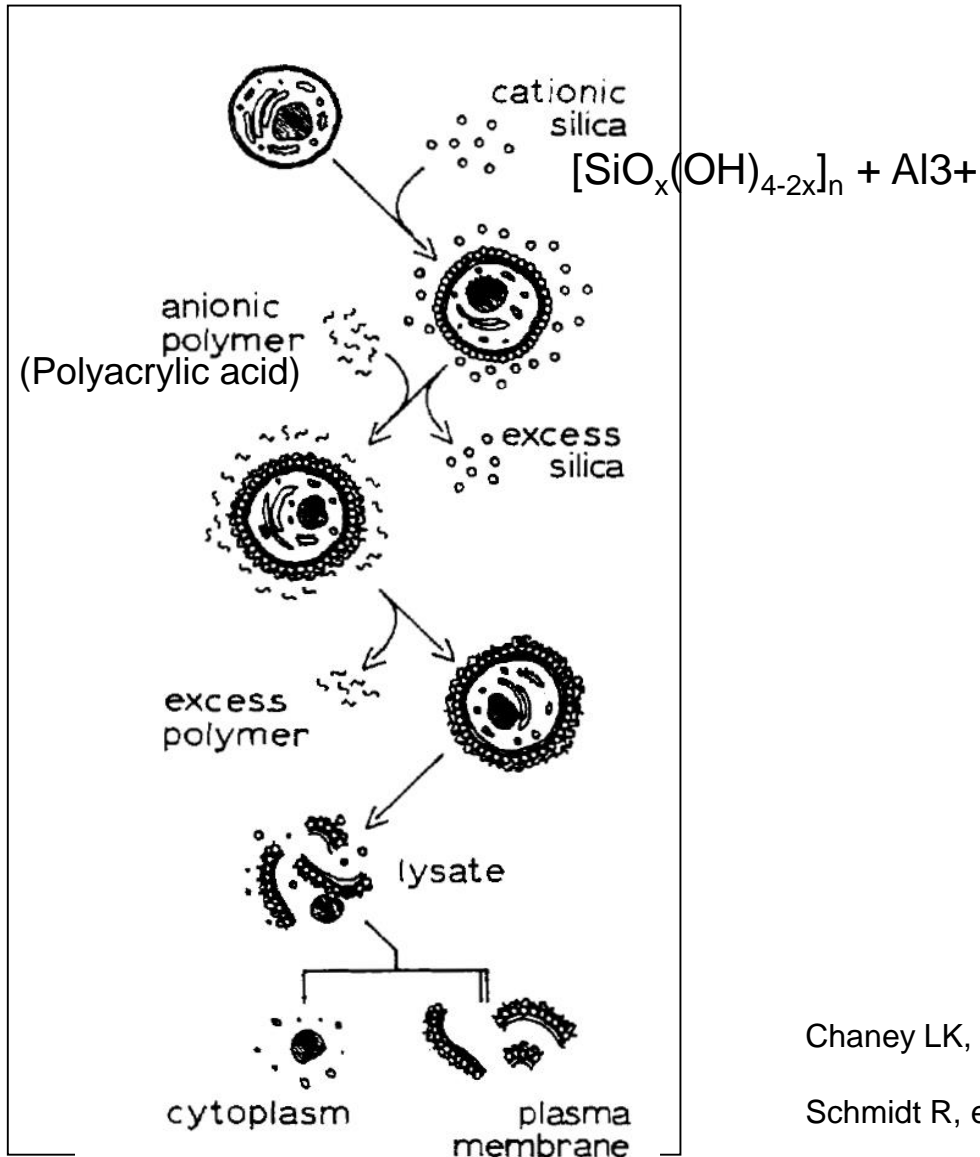
- + majoritní cytosolické proteiny
- + cytoskelet
- + proteiny asociované s membránou



# ENRICHMENT - Isolation of membrane-rich fraction

## Peeling of plasma membrane by cationic silica beads

Interakce anionického povrchu PM s kladně nabitým povrchem



Chaney LK, Jacobson BS. J Biol Chem. 1983 Aug 25;258(16):10062-72.

Schmidt R, et al. Biochim Biophys Acta. 1983 Jul 27;732(2):421-7.

# STRATEGIE MEMBRÁNOVÉ PROTEOMIKY

Izolace membránové frakce

**NEBO**

Izolace MP na základě povrchového značení  
a afinitní chromatografie

Analýza intaktních  
proteinů

1D SDS



digesce



LC-MS/MS

**jen 30-65% ID  
je membránových**

# Can we target only one aspect of the TMP personality?

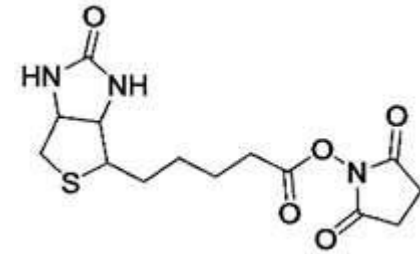
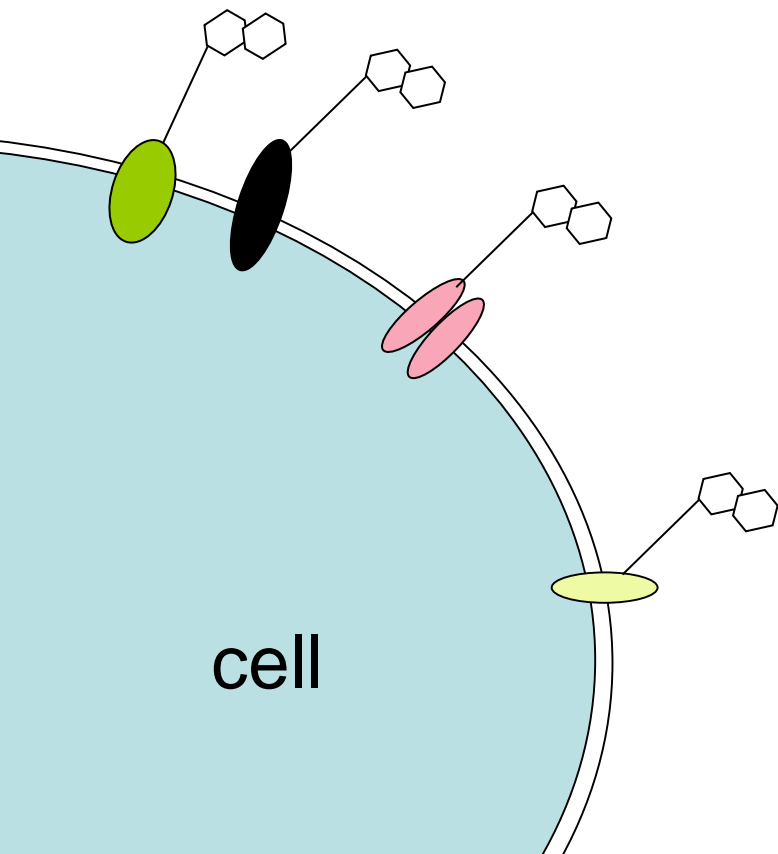
***Only the hydrophilic domains ?***



„shaving“ extracellular domains of TMPs from intact cells by trypsin



# Surface labeling of TMPs and affinity purification



Biotin

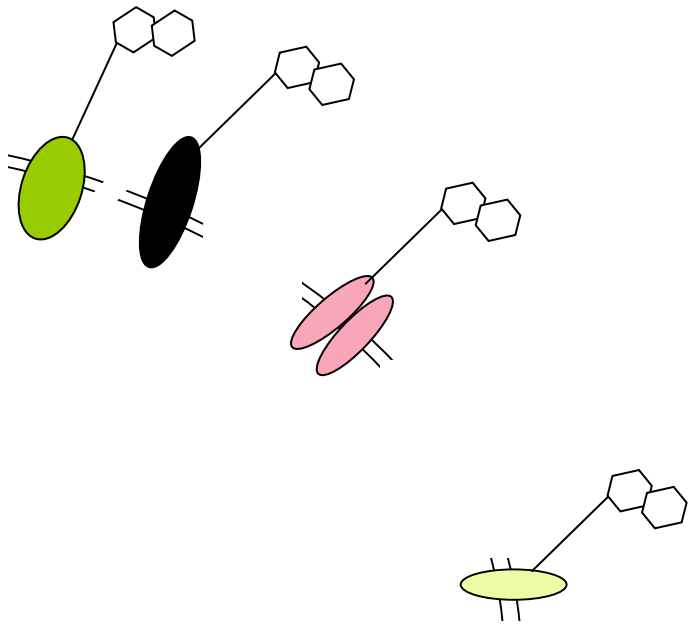
Succinimide

Labeling of amines

Labeling of oxidized sugars

# Surface labeling of TMPs and affinity purification

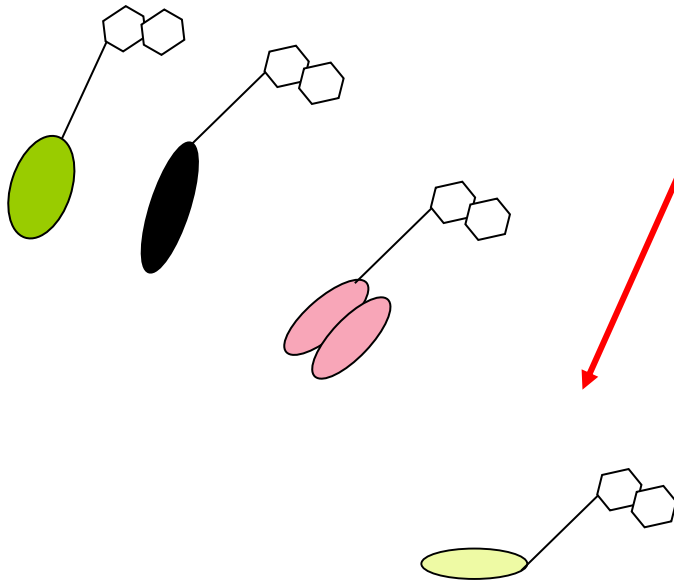
Solubilization by a detergent



# Surface labeling of TMPs and affinity purification

Solubilization by a detergent

**Trypsin** (cleaves after Arg, Lys)

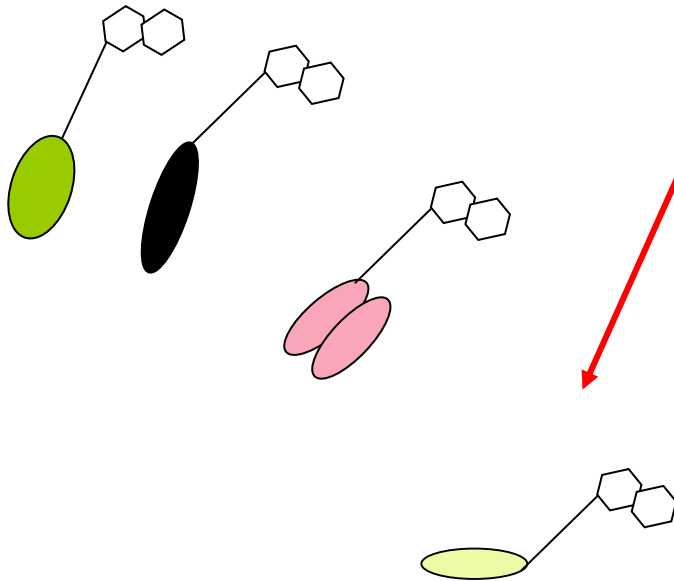




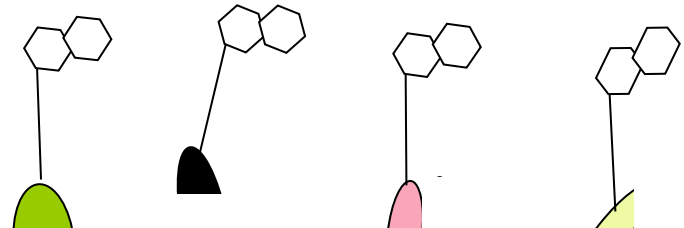
# Surface labeling of TMPs and affinity purification

Solubilization by a detergent

**Trypsin** (cleaves after Arg, Lys)



Affinity (streptavidin) isolation of surface **peptides**



# STRATEGIE MEMBRÁNOVÉ PROTEOMIKY

Izolace membránové frakce

**NEBO**

Izolace MP na základě povrchového značení  
a afinitní chromatografie

Analýza intaktních  
proteinů

1D SDS



digesce



LC-MS/MS

**jen 30-65% ID  
je membránových**

Analýza  
hydrofilních peptidů

Oholení  
rozpuštěných  
peptidů z povrchu  
buněk



LC-MS/MS

**až 80% ID  
je membránových  
(ale jen PM!)**

# Can we target only one aspect of the TMP personality?

***Only the hydrophilic domains***



„shaving“ extracellular domains of TMPs from intact cells by trypsin



***Only the hydrophobic domains?***



digestion of all extra- and intra-cellular domains and associated proteins by a protease. **Analysis of the TM domains protected by the membrane**

# STRATEGIE MEMBRÁNOVÉ PROTEOMIKY

Izolace membránové frakce

**NEBO**

Izolace MP na základě povrchového značení  
a afinitní chromatografie

Analýza intaktních  
proteinů

1D SDS



digesce



LC-MS/MS

Analýza  
hydrofilních peptidů

Oholení  
rozpuštěných  
peptidů z obou  
povrchů



LC-MS/MS

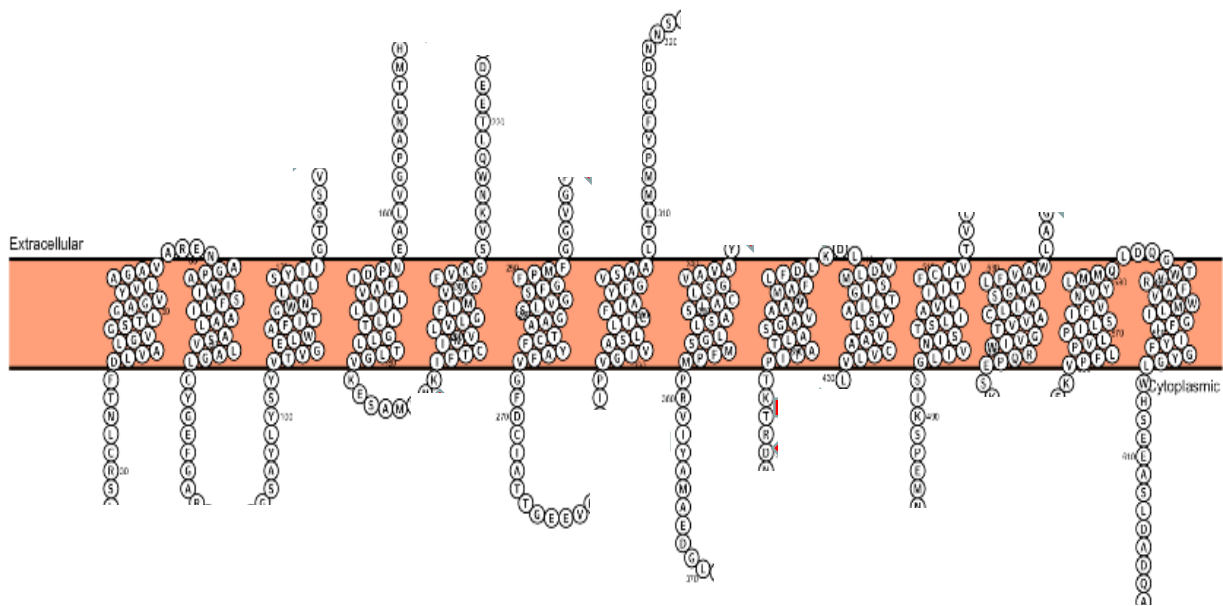
Analýza  
TM peptidů

Digesce všech  
přístupných peptidů  
a analýza  
nenaštěpených TM  
peptidů skrytých v  
membráně



LC-MS/MS

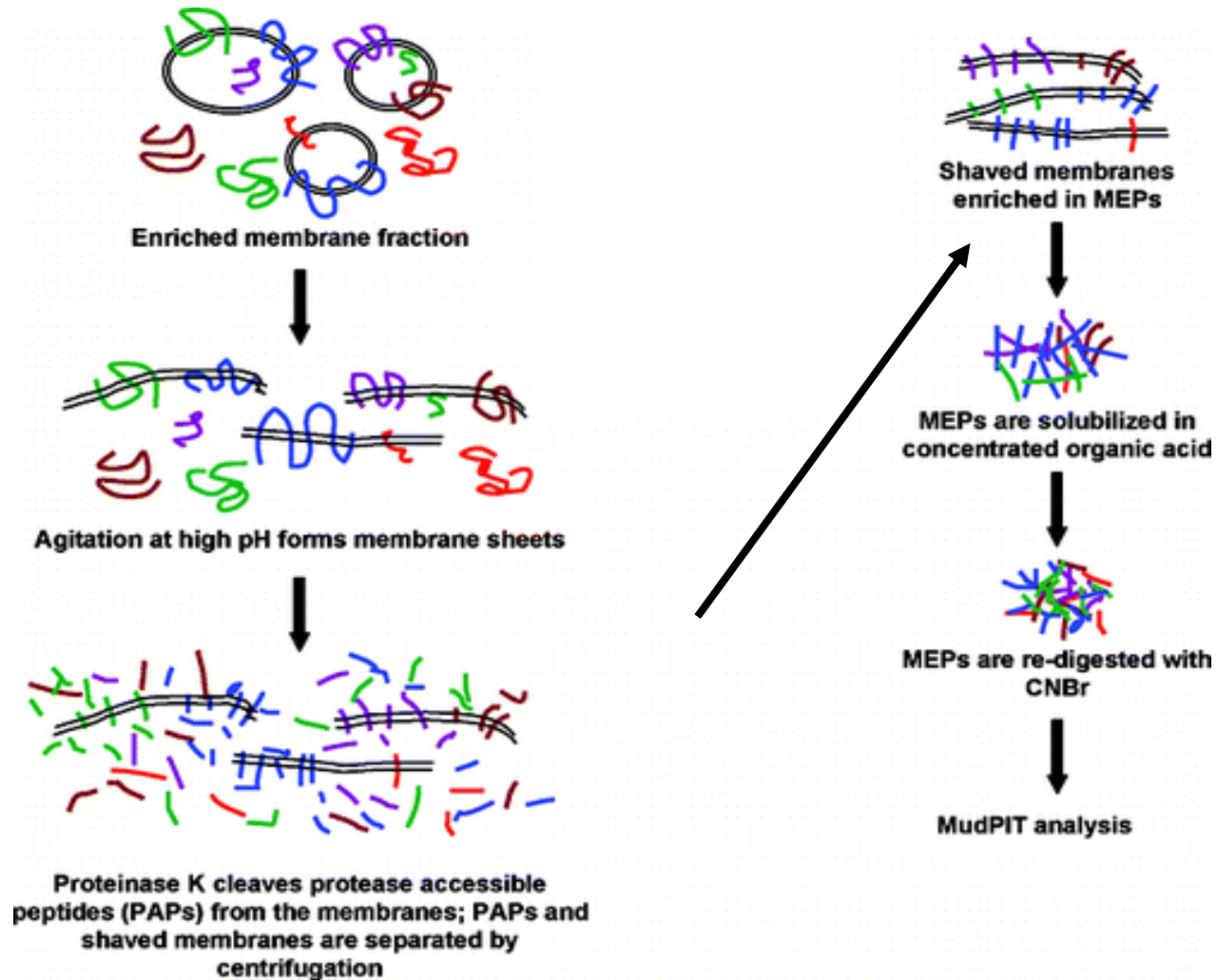
**jen 30-65% identifikovaných proteinů membránových**



Wu CC, et al., Nature Biotechnology 2003, 21(5):532-8.  
 Blackler AR, et al., Journal of Proteome Research 2008, 7:3028-3034

# Analýza transmembránových domén

A Shotgun Proteomic Method for the Identification of Membrane-Embedded Proteins and Peptides. Christine Wu et al., JPR, 2008, 7:3028-3034



**Proteomic analysis of TMPs in Mino lymphoma cells**  
**Analysis of membrane-protected domains**

# Proteomic analysis of TMPs in Mino lymphoma cells

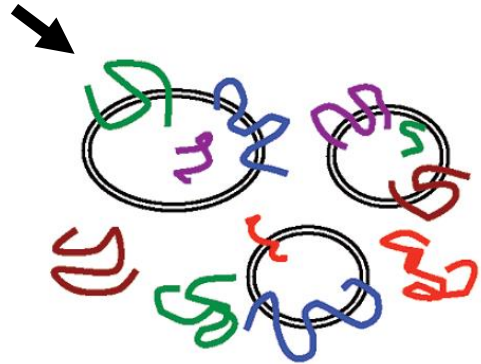
## Analysis of membrane-protected domains

### Mechanical cell disruption

(needle+hypotonia)

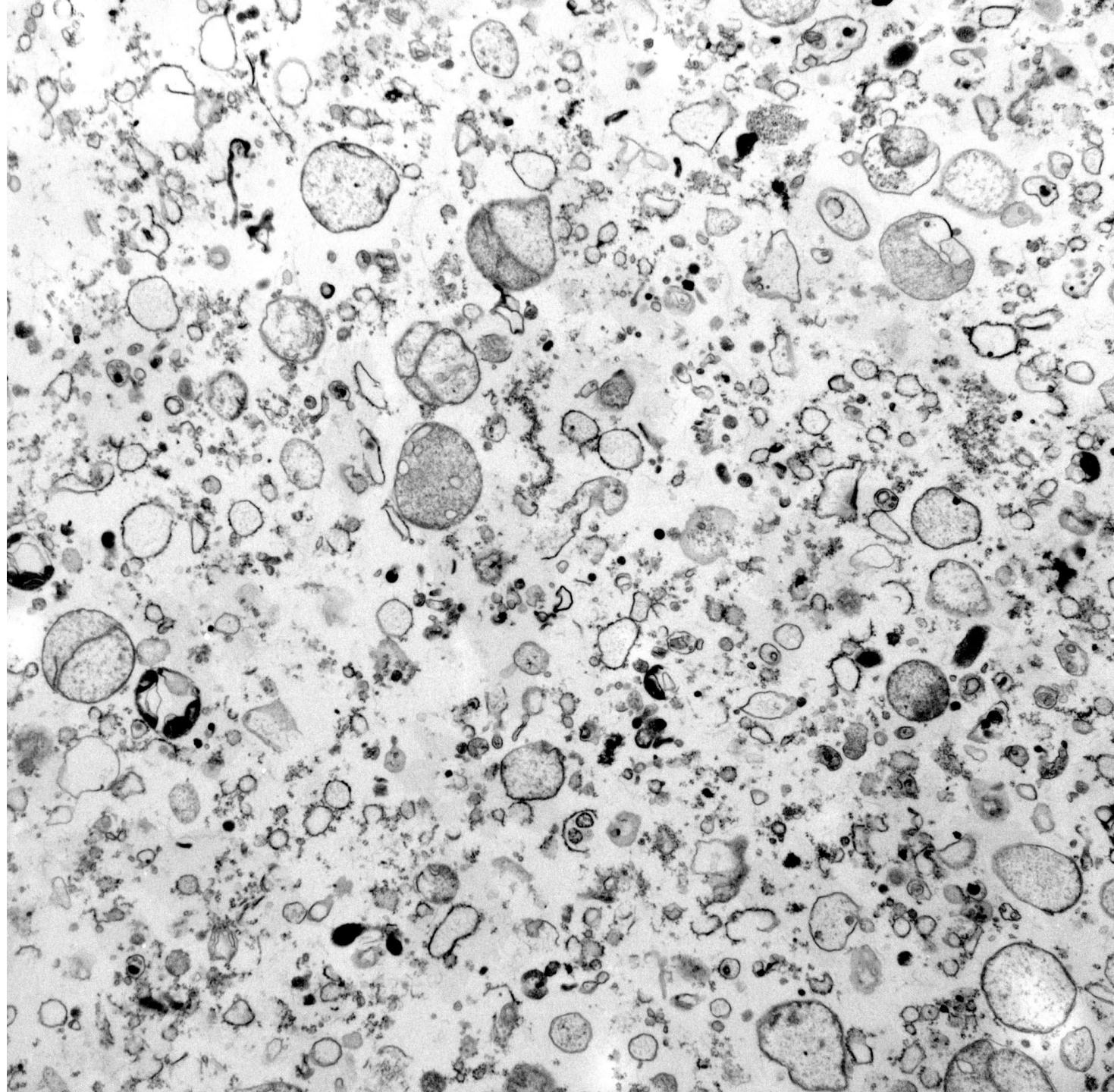
Cfg 500xg

Cfg 18 000xg



Enriched membrane fraction





on ice  
pH 7.4

# Proteomic analysis of TMPs in Mino lymphoma cells

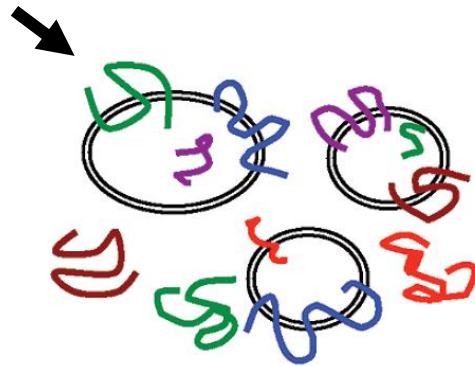
## Analysis of membrane-protected domains

### Mechanical cell disruption

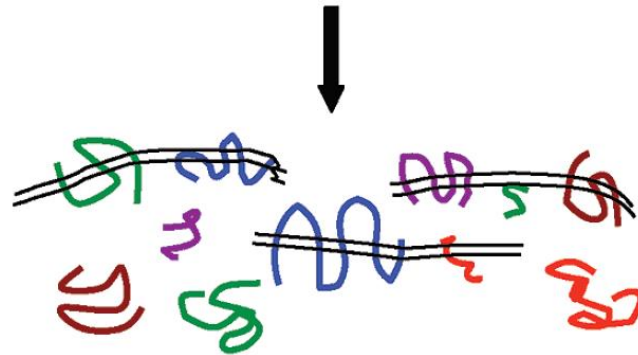
(needle+hypotonia)

Cfg 500xg

Cfg 18 000xg

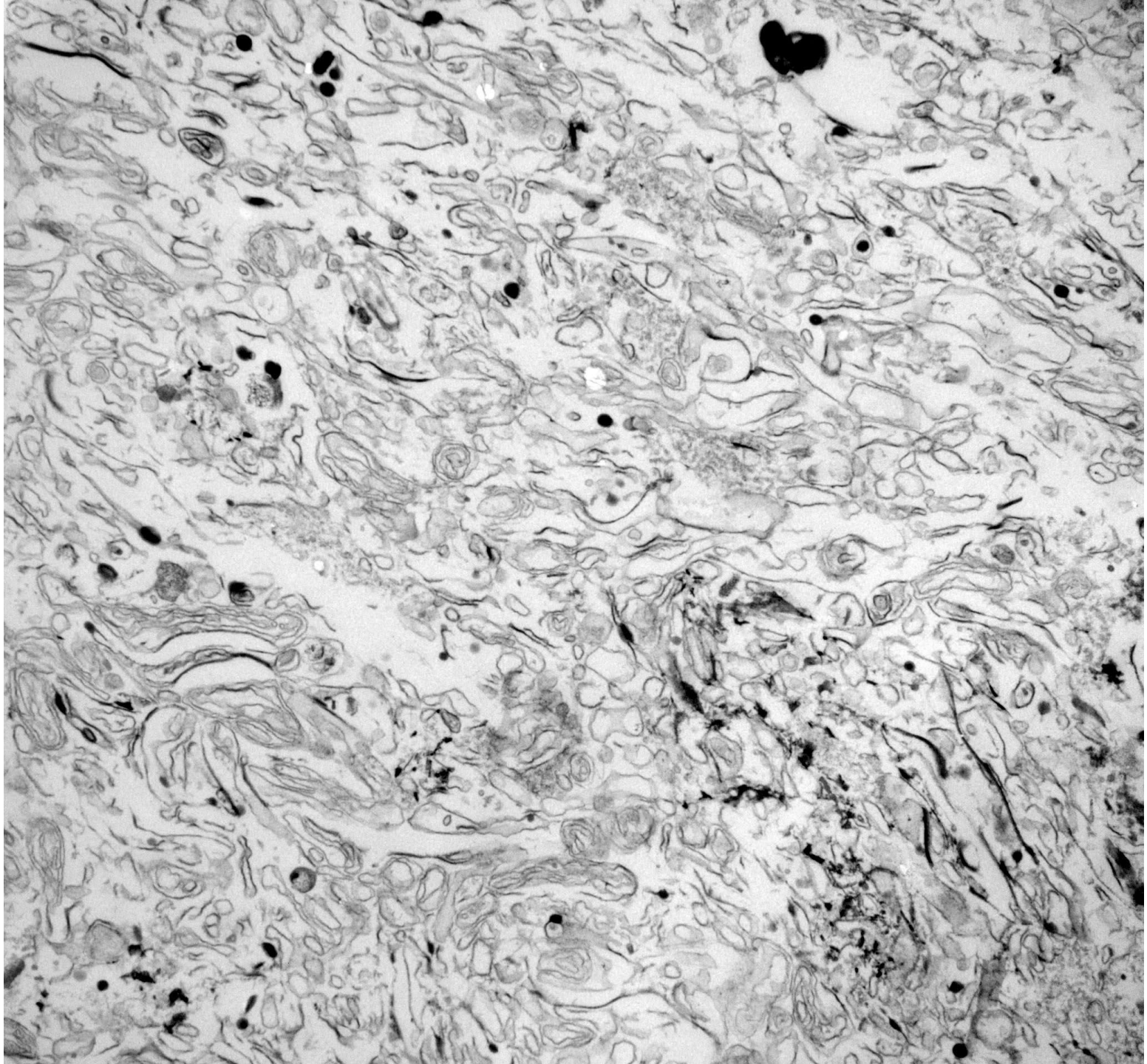


Enriched membrane fraction



Agitation at high pH disrupts sealed vesicles





on ice  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
pH 11

# Proteomic analysis of TMPs in Mino lymphoma cells

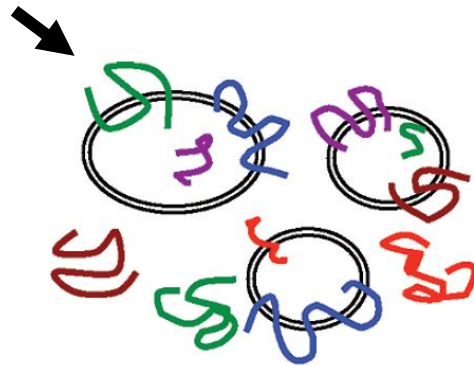
## Analysis of membrane-protected domains

### Mechanical cell disruption

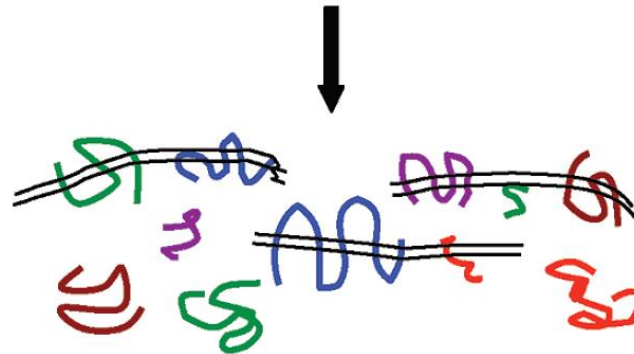
(needle+hypotonia)

Cfg 500xg

Cfg 18 000xg

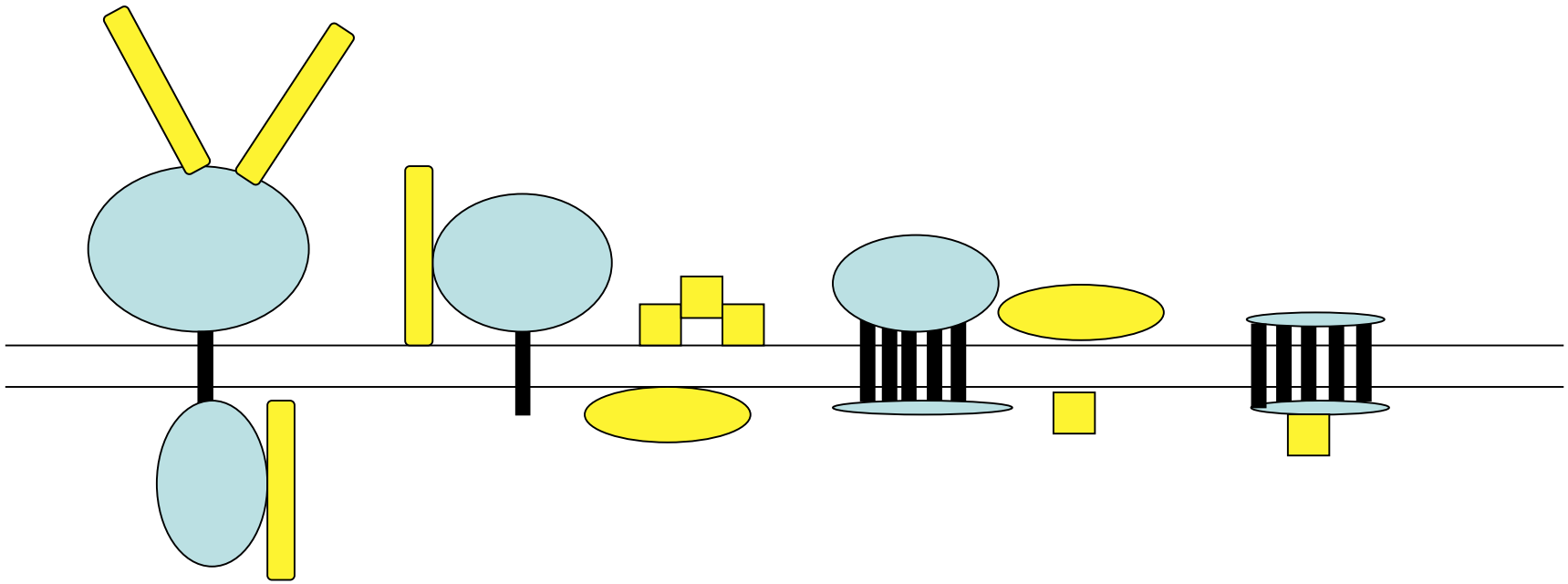


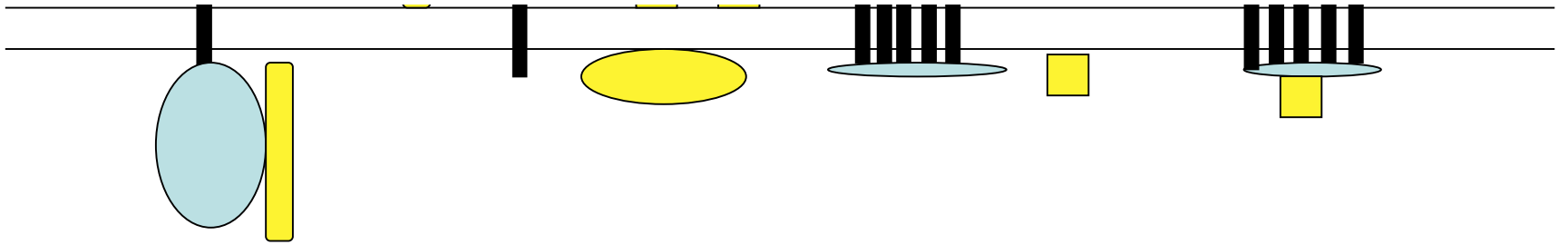
Enriched membrane fraction

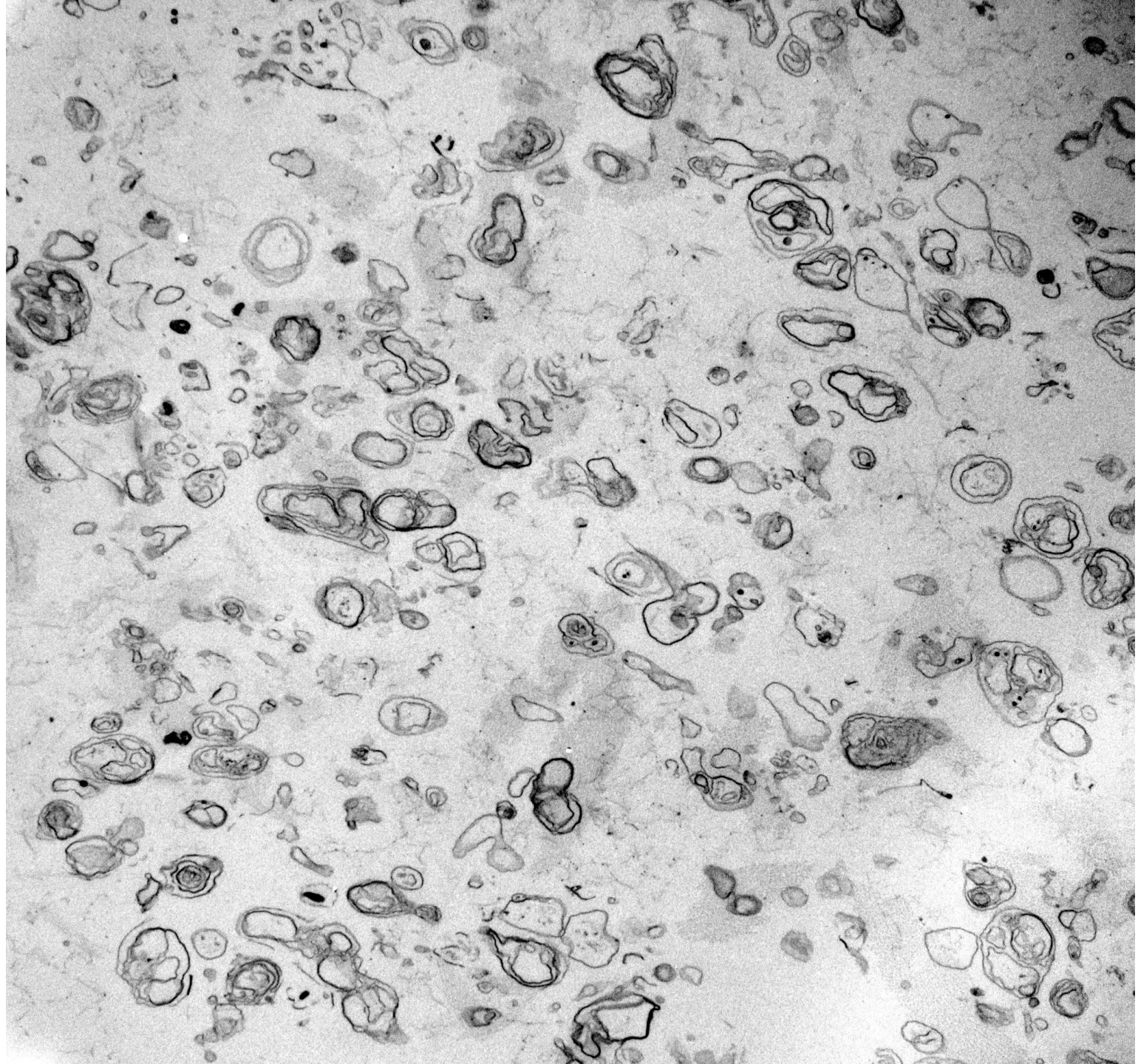


Agitation at high pH disrupts sealed vesicles

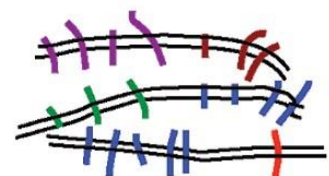
add trypsin







**37 °C  
pH 8,5  
trypsin  
overnite**



**Shaved membranes**



**TMDs are solubilized in  
concentrated organic acid**



**TMDs are re-digested with  
CNBr (Met)**



**delipidation**



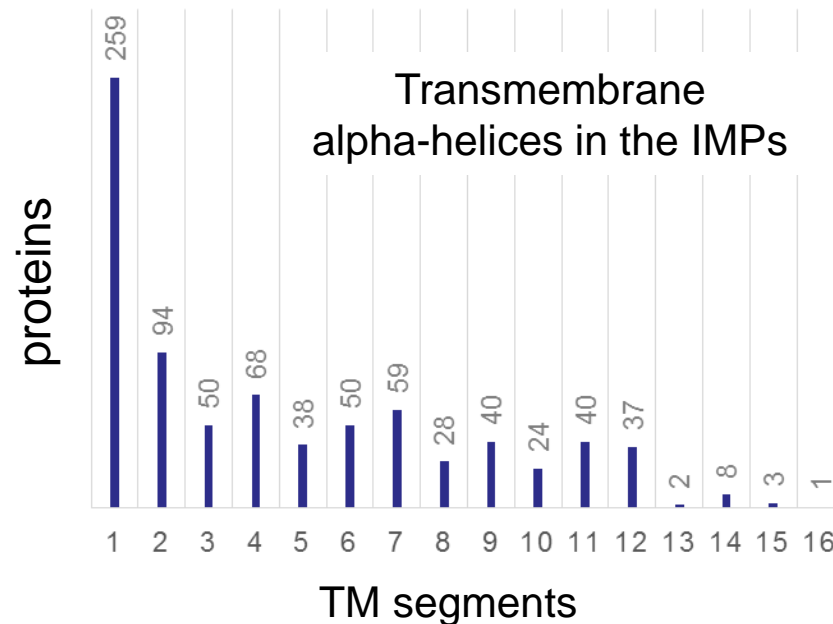
**LC-MS/MS**



# Proteomic analysis of TMPs in Mino lymphoma cells

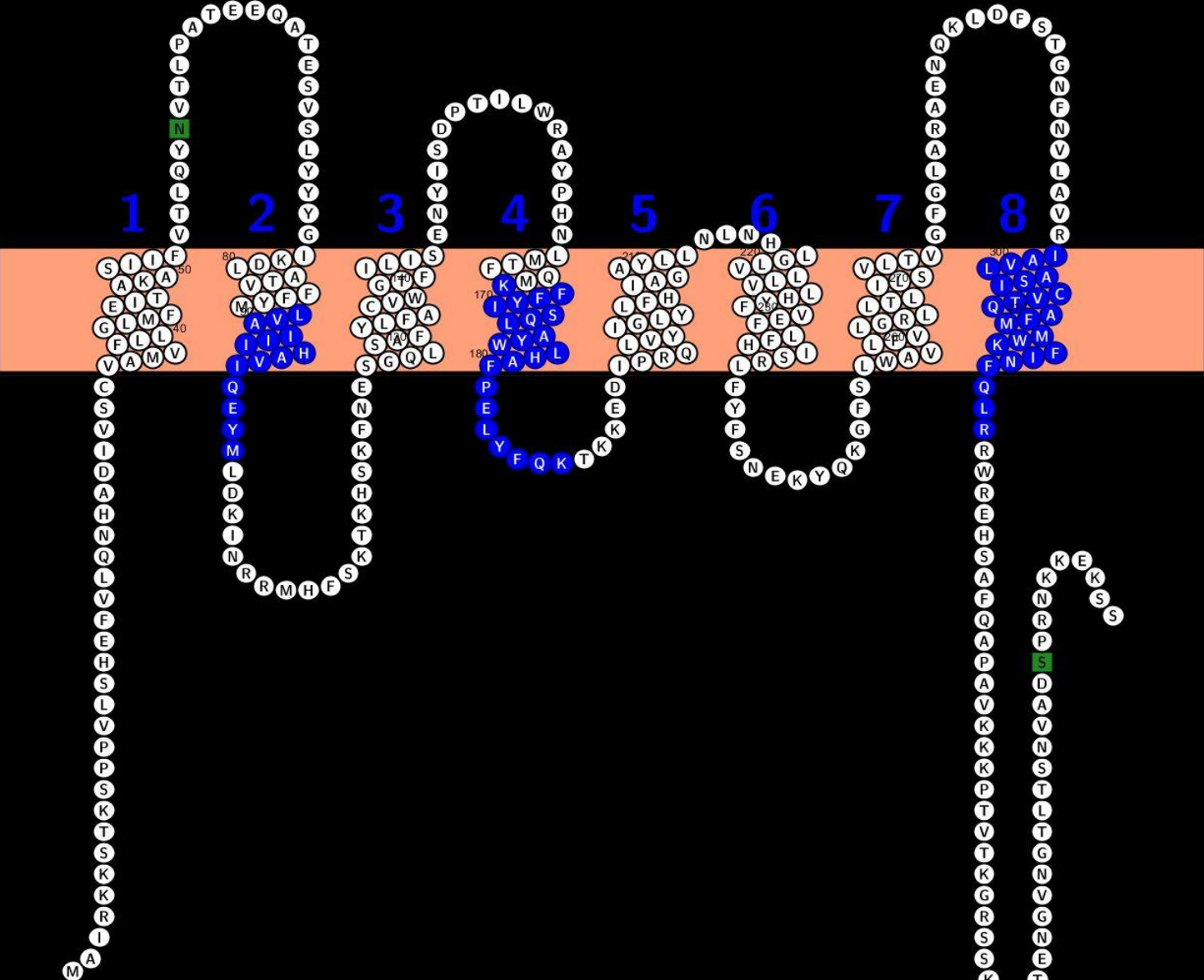
## Analysis of membrane-protected domains

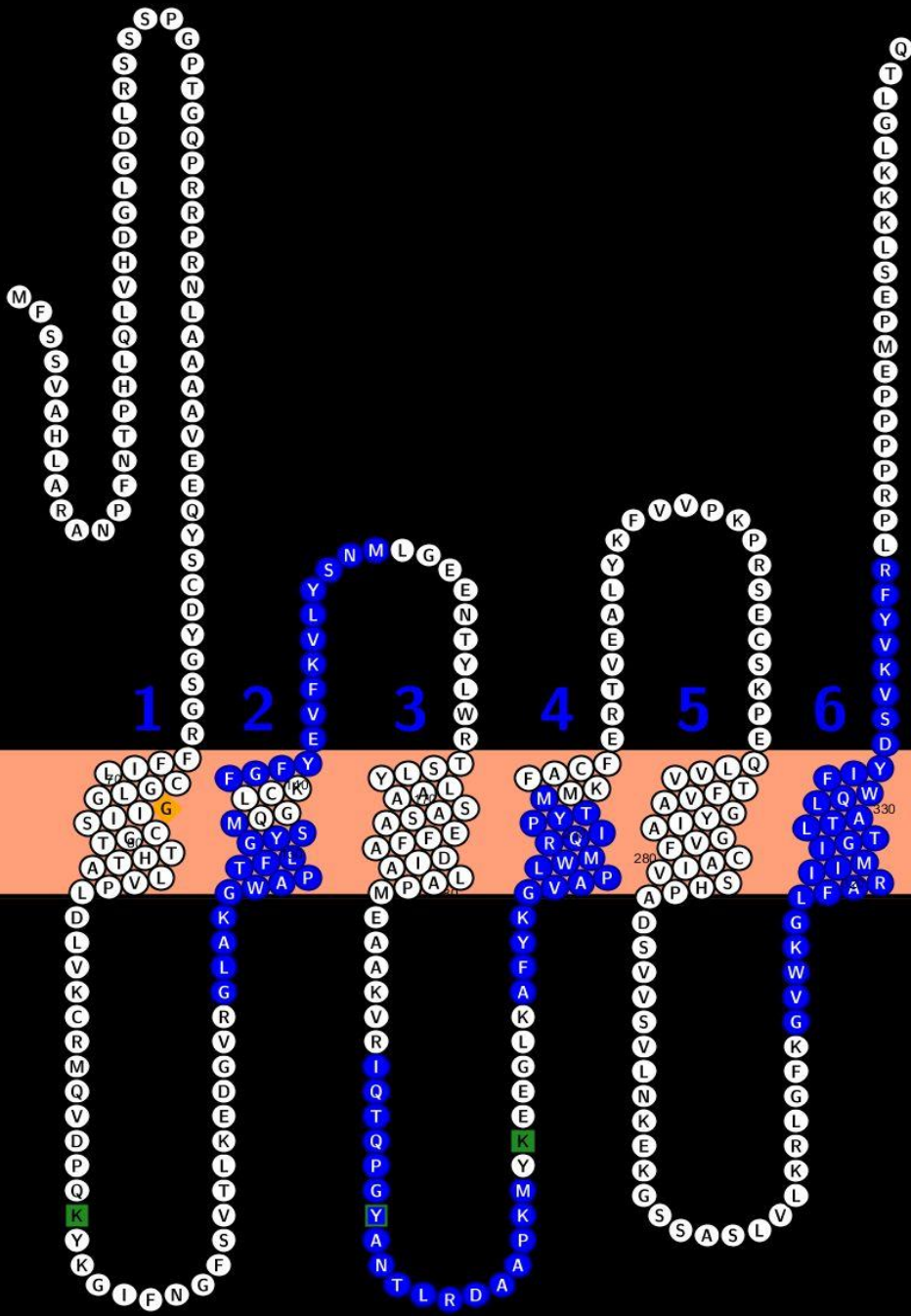
- 1224 proteins identified
- **802 (65,5%) integral membrane proteins** from all cell compartments



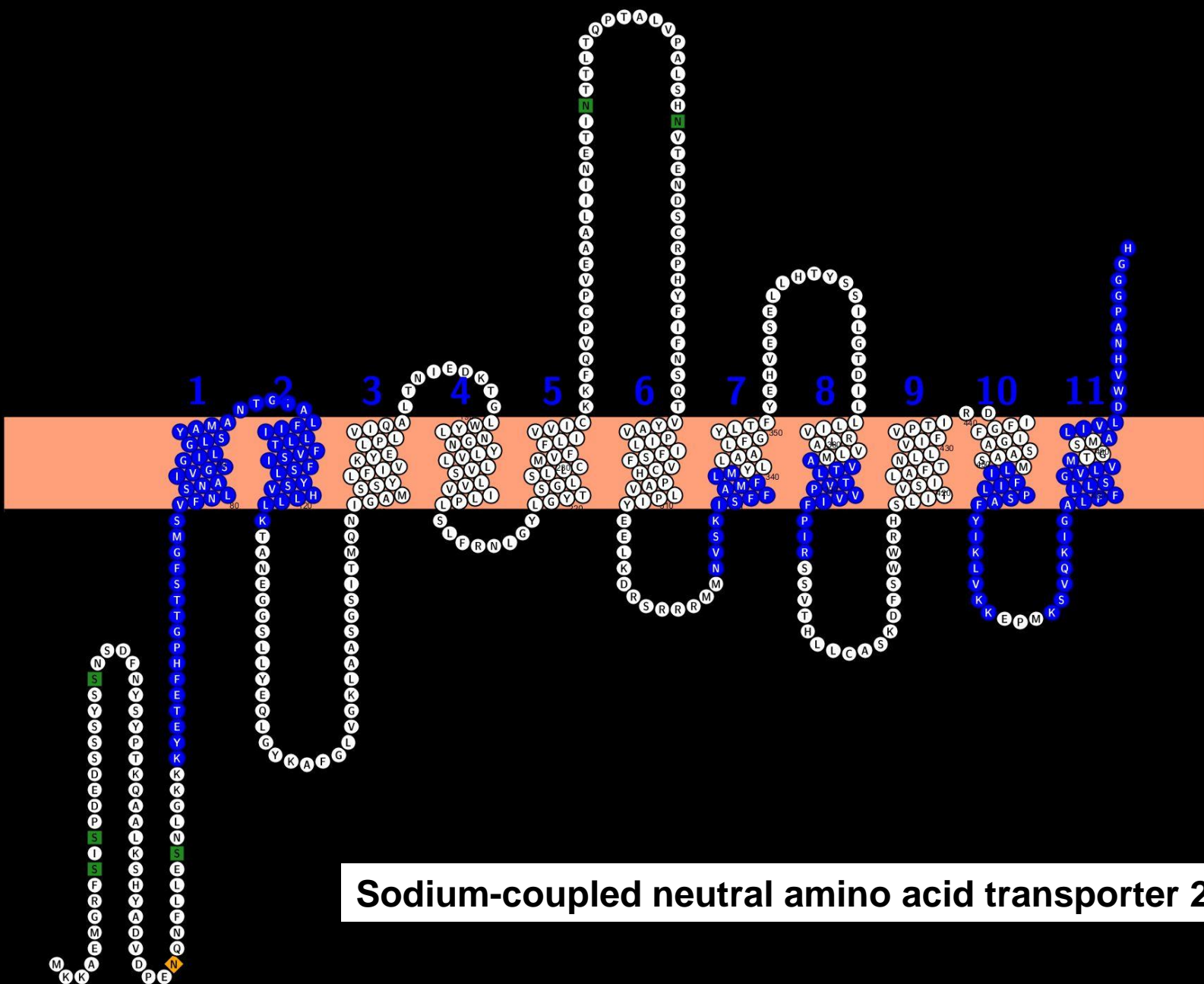
118 proteins - no previous evidence on protein level  
127 proteins – unknown biological function

# Translocating chain-associated membrane protein 1



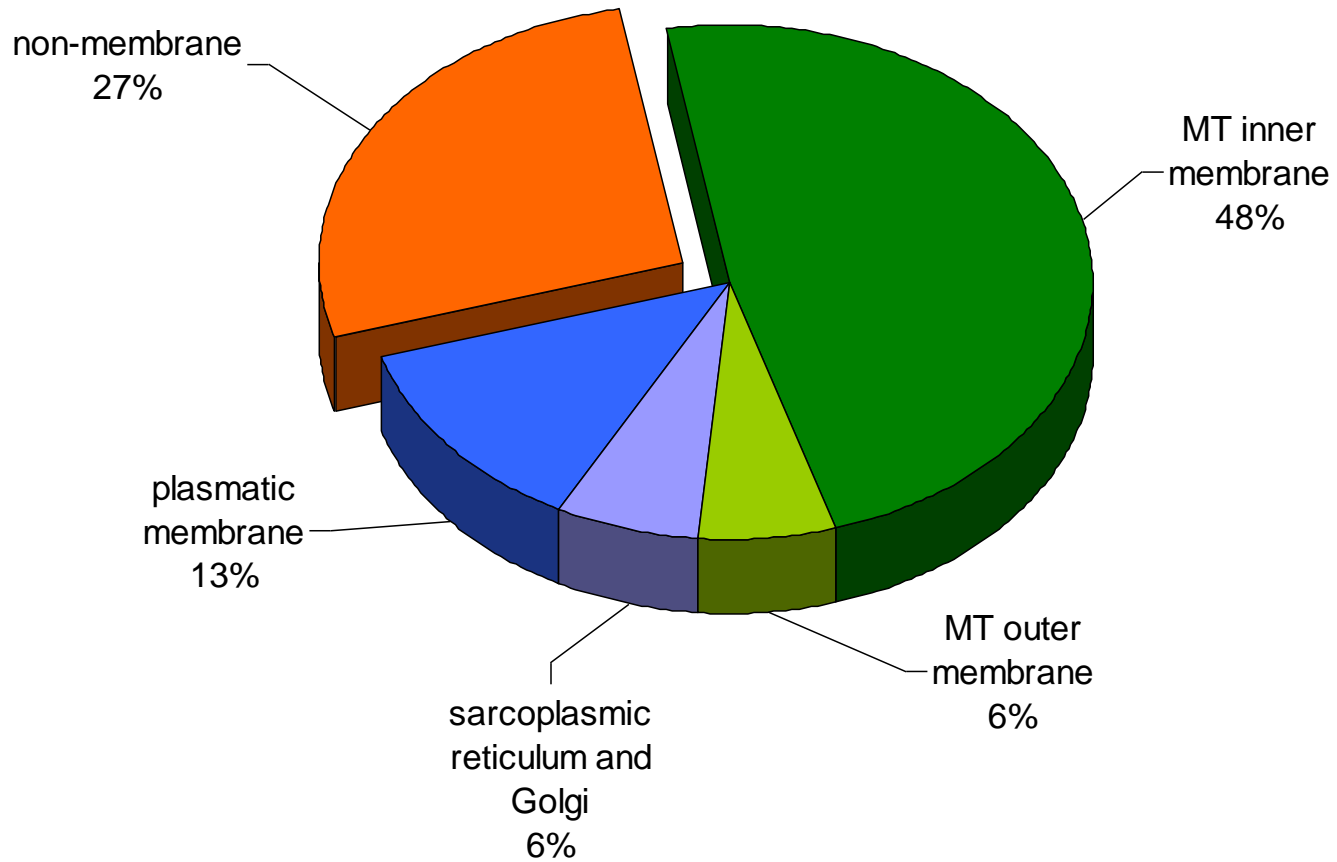


Phosphate carrier protein  
SLC25A3



**Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2**

# Membrane proteome of rat heart



# Conclusions

- new proteomic method for **maximum enrichment and ID of TMPs**
- the method **accesses all cellular compartments**
- avoids extensive cellular fractionation
- applicable also to animal tissues
- enables identification of proteins inaccessible for conventional methods
- can be made quantitative via SILAC

# STRATEGIES FOR MEMBRANE PROTEOMICS

## Isolation of intact TMPs

Only 30-50 % of identified proteins are TMPs  
Abundant contamination prevents identification of TMPs  
Preferential identification of more hydrophilic proteins  
2-DE does not work!

## Analysis of hydrophilic domains

Up-to 80 % of identified proteins are TMPs.  
Applicable only to plasma membrane of intact cells.  
Proteins with small or none surface domains are excluded.

## Analysis of transmembrane domains

**Up-to 80 % of identified proteins are TMPs**  
**Can be used also in tissue samples. Covers all types of cellular membranes.**

# PROTEOMIKA 2015

**Pondělí 7/12**

**Label free  
kvantifikace**

**SRM**

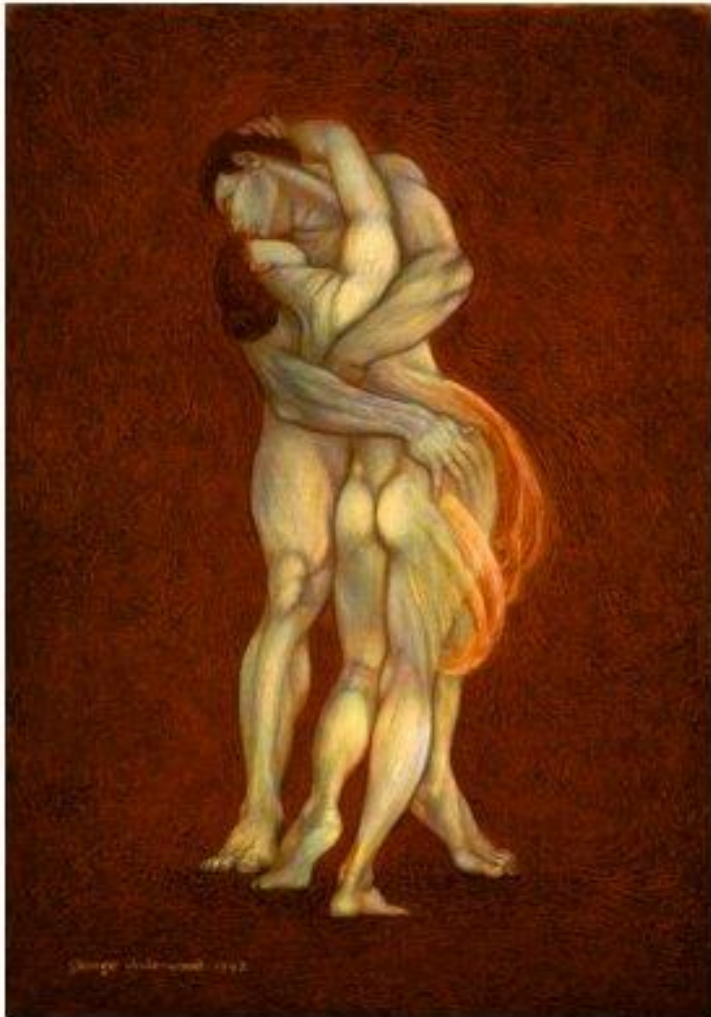
**Příprava vzorku pro  
shot-gun  
FASP**

**Proteomika  
membránových  
proteinů**

**Analýza  
proteinových  
komplexů**



# ANALÝZA PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ



## **Nativní vícerozměrné separace**

- Blue native/2D elektroforéza
- Clear native/2D elektroforéza
- Nativní LC proteinů-nativní ELFO

## **Afinitní purifikace komplexů**

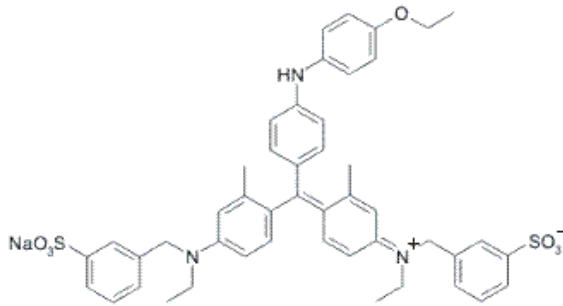
- Tandemová afinitní purifikace (TAP)

**QUICK-** SILAC+RNAi knock-down

# BLUE NATIVE ELECTROPHORESIS

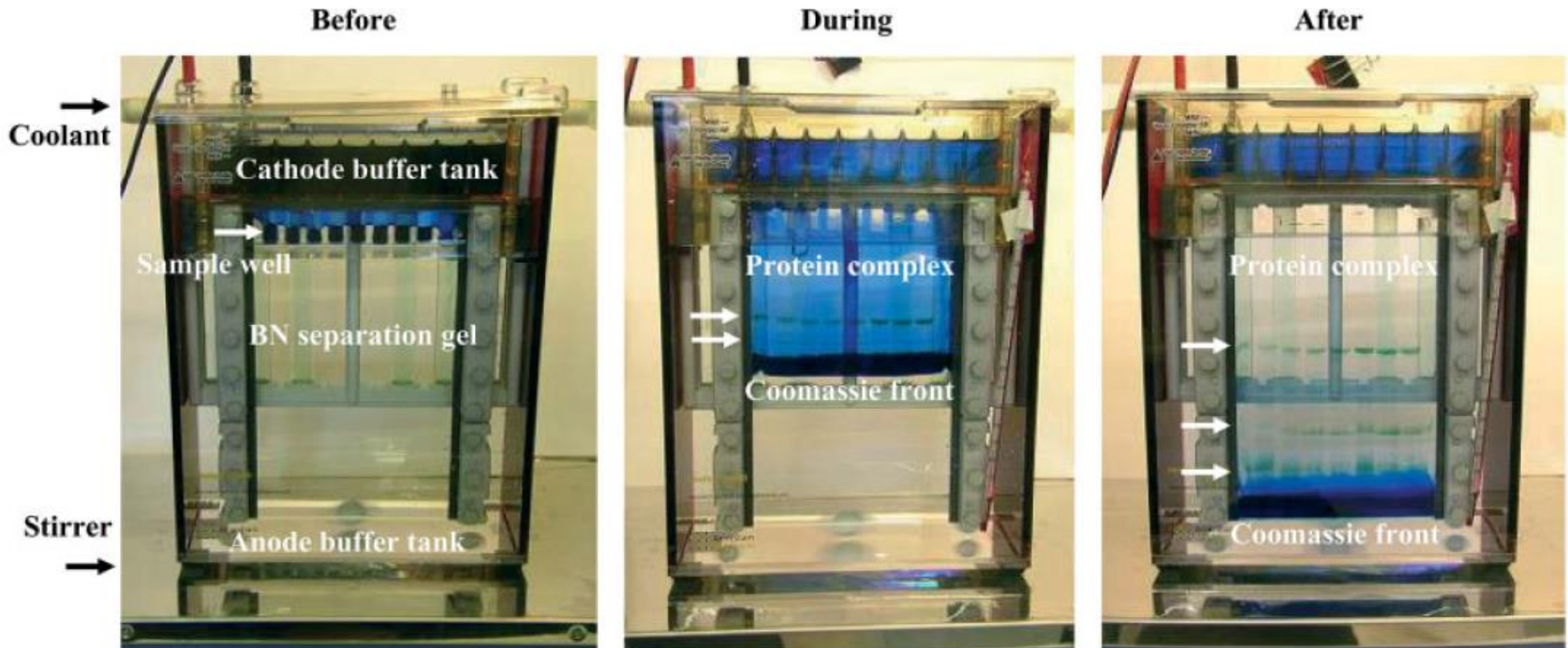


# BLUE NATIVE ELECTROPHORESIS



## Coomassie G250

- serves as substitute for detergents
- binds on the surface of all membrane and some soluble proteins
- negative charge shift.



**Schägger, H. & von Jagow, G. (1991).**

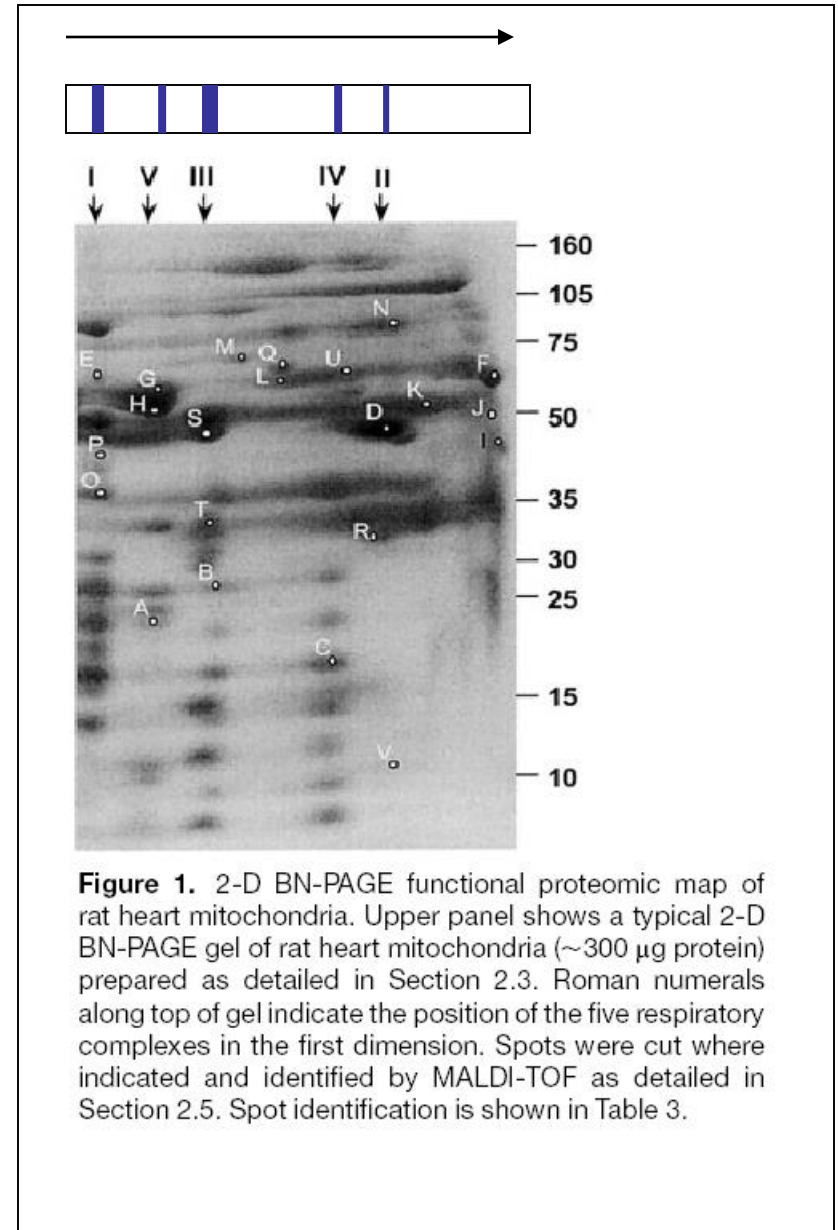
Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, 223-231.

## 2D (BN-SDS) PAGE

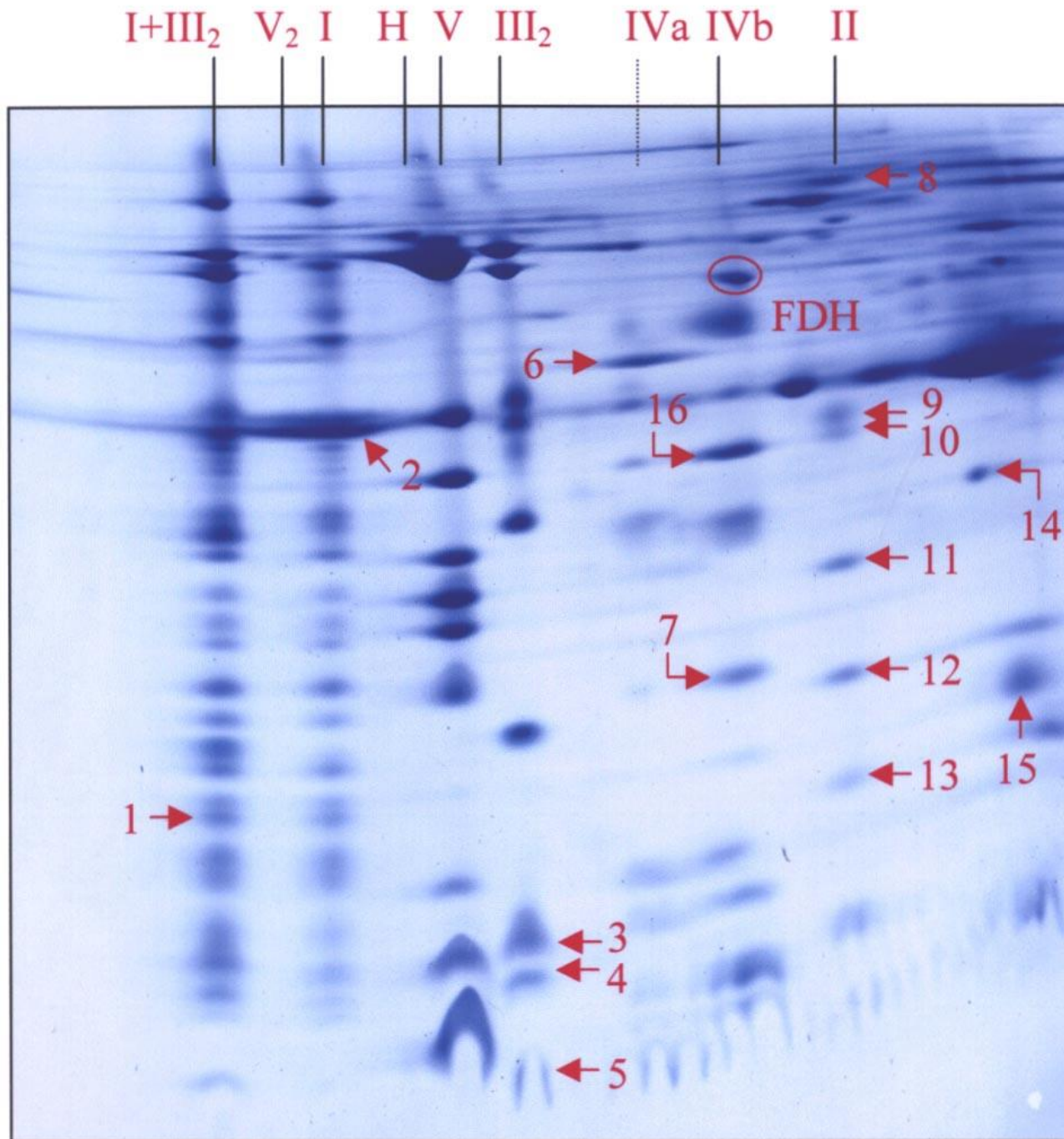
**sample :**  
added Coomassie brilliant  
blue G-250 in aminocaproic acid (0.5  
M).

**cathode buffer:**  
Tricine (50 mM),  
BisTris (15 mM), and Coomassie  
brilliant blue G-250 (0.02% w/v).

**anode buffer :**  
BisTris (50 mM).



**Figure 1.** 2-D BN-PAGE functional proteomic map of rat heart mitochondria. Upper panel shows a typical 2-D BN-PAGE gel of rat heart mitochondria (~300  $\mu$ g protein) prepared as detailed in Section 2.3. Roman numerals along top of gel indicate the position of the five respiratory complexes in the first dimension. Spots were cut where indicated and identified by MALDI-TOF as detailed in Section 2.5. Spot identification is shown in Table 3.



*Arabidopsis thaliana*  
 mitochondrial  
 proteome by  
**Blue-native 2-DE**

# BLUE NATIVE ELECTROPHORESIS

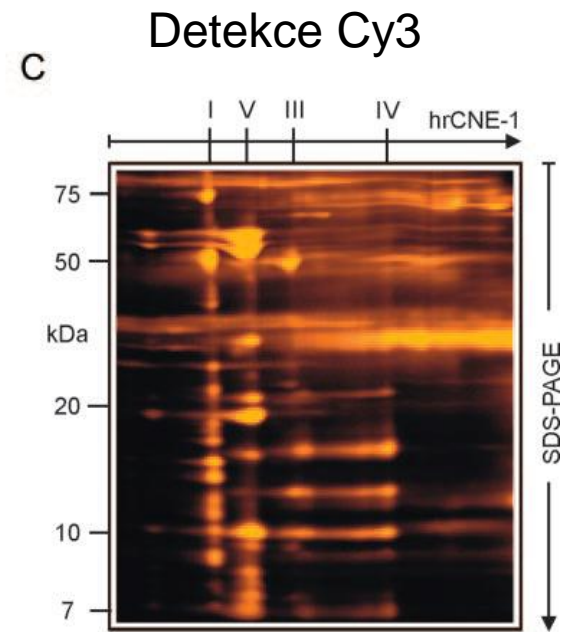


**Interferuje s  
fluorescenční detekcí a  
enzymatickými eseji**

**!!!**

# High-resolution CLEAR NATIVE ELECTROPHORESIS

CBB je nahrazena  
anionickým detergentem  
(např. deoxycholát)



**2D CN-SDS PAGE**

Wittig et al. Mol Cell Proteomics 6, 7: 1215-1225 (2007)

# ANALÝZA PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ



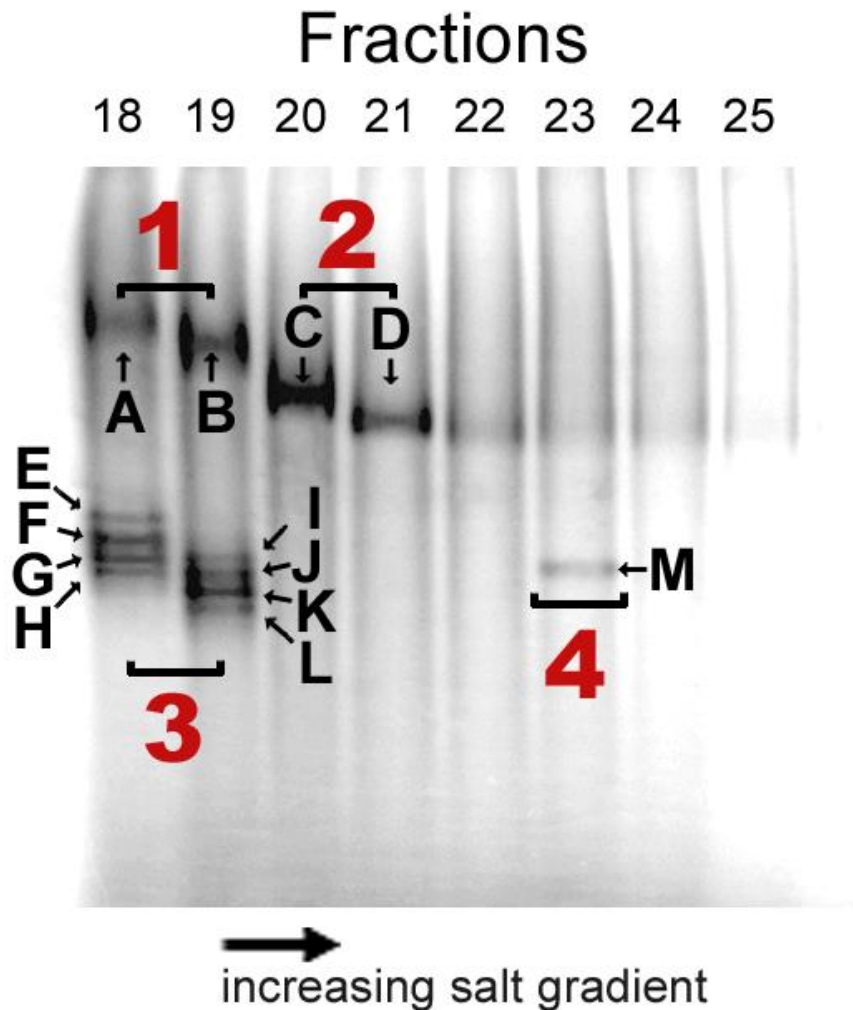
## **Nativní vícerozměrné separace**

- 2-DE blue native elektroforéza
- Clear native elektroforéza
- **Nativní LC proteinů-nativní ELFO**



## Analýza železo (hem)-vážících proteinových komplexů v erytroidních buňkách

- Metabolic labeling of MEL cells by  $^{59}\text{Fe}$ -hemin
- ↓
- Anion exchange liquid chromatography
- ↓
- Native electrophoresis in presence of Triton X100
- ↓
- MS analysis (Ion trap - LC-MS/MS)



**Native electrophoretic separation of radioactive fractions 18-25.**

**A total 13 protein complexes (bands A-M) were analyzed**

**33 individual proteins were identified.**

# Radioaktivní frakce z chromatografie děleny ELFO a jednotlivé bandy naštěpeny a analyzovány MS

**Hb** – hemoglobin

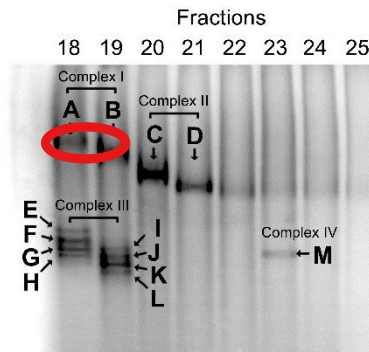
( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\delta$  chains)

**Prx I** – peroxiredoxin I

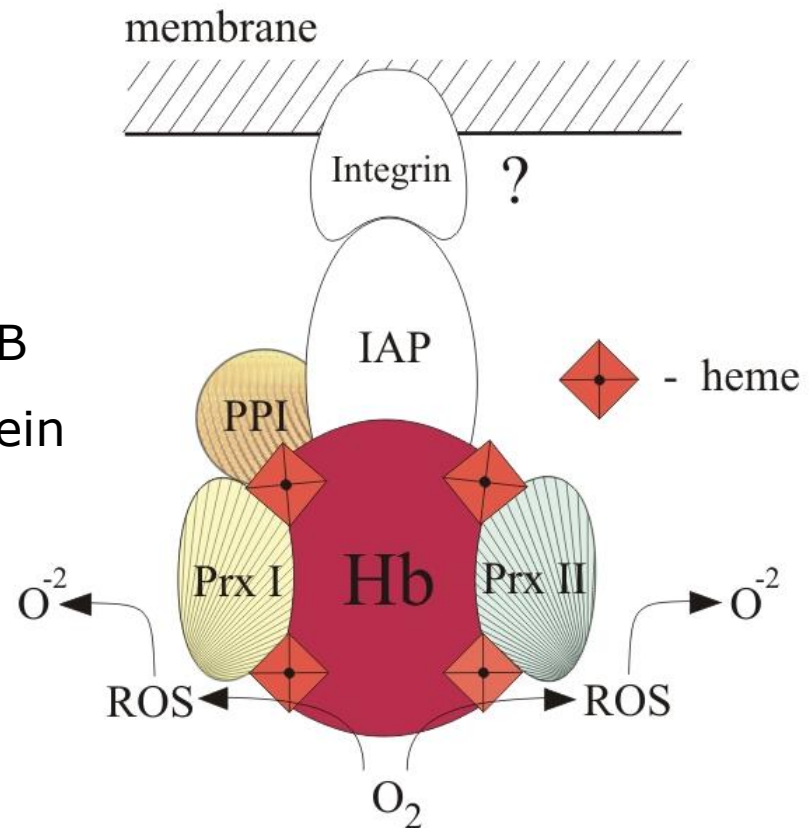
**Prx II** – peroxiredoxin II

**PPI** - peptidylprolyl isomerase B

**IAP** – integrin-associated protein



## Complex 1



**Ft** – ferritin

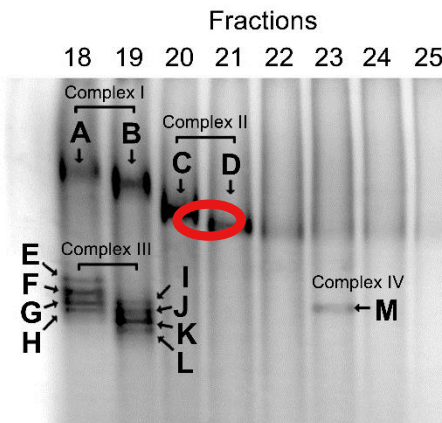
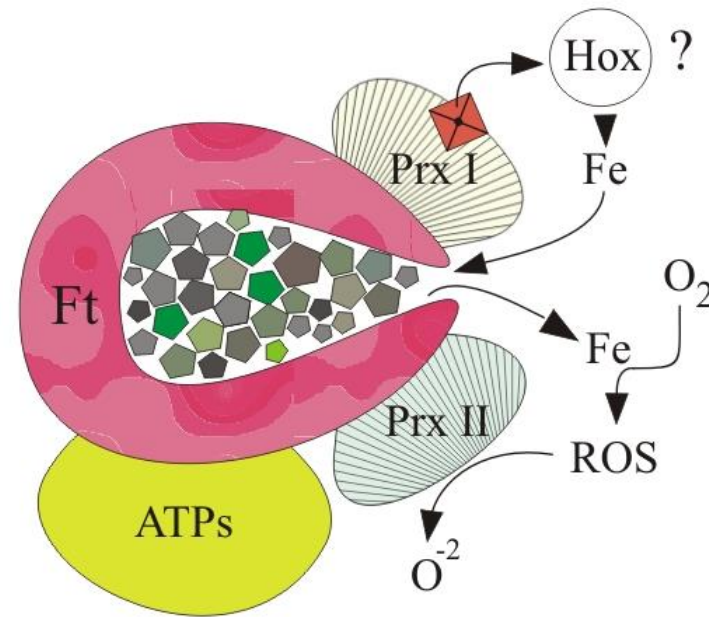
**Prx I** – peroxiredoxin I

**Prx II** – peroxiredoxin II

**Hox** – heme-oxygenase

**ATPs** – ATP synthase

## Complex 2



**Hb** – hemoglobin

( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\delta$  chains)

**Prx I** – peroxiredoxin I

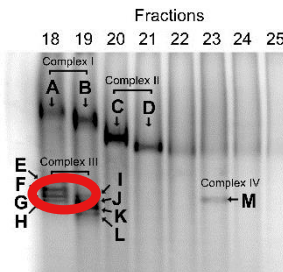
**Prx II** – peroxiredoxin II

**CA II** – carbonic anhydrase II

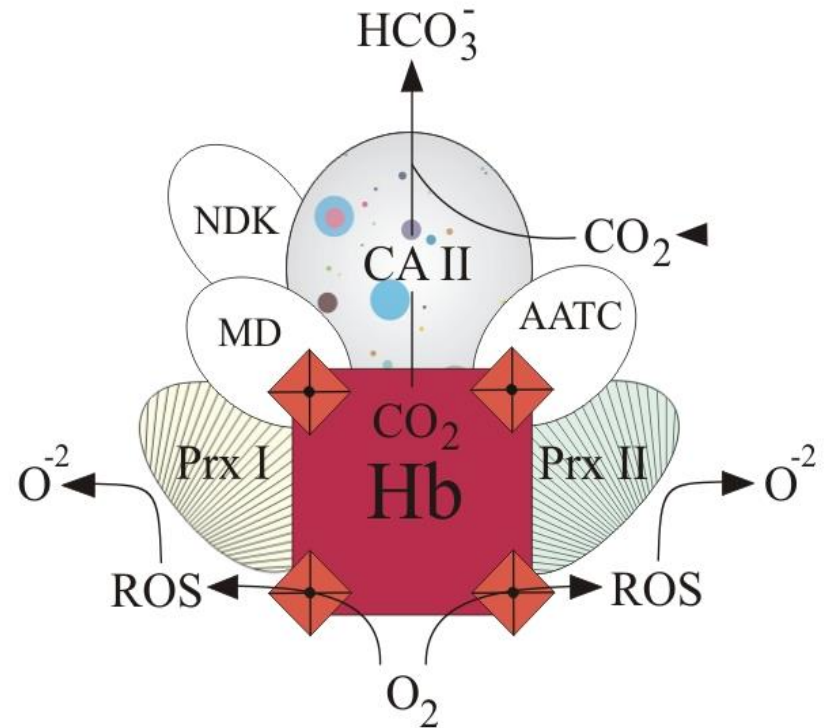
**MD** – cyt. malate dehydrogenase

**AAT** – aspartate amino transferase

**NDK** – nucleoside diphosphate kinase



# Complex 3



**Prx II** – peroxiredoxin II

**Prx IV** – peroxiredoxin IV

**NAC** – Nascent polypeptide-associated complex

**HSP 2** – heat shock protein 2

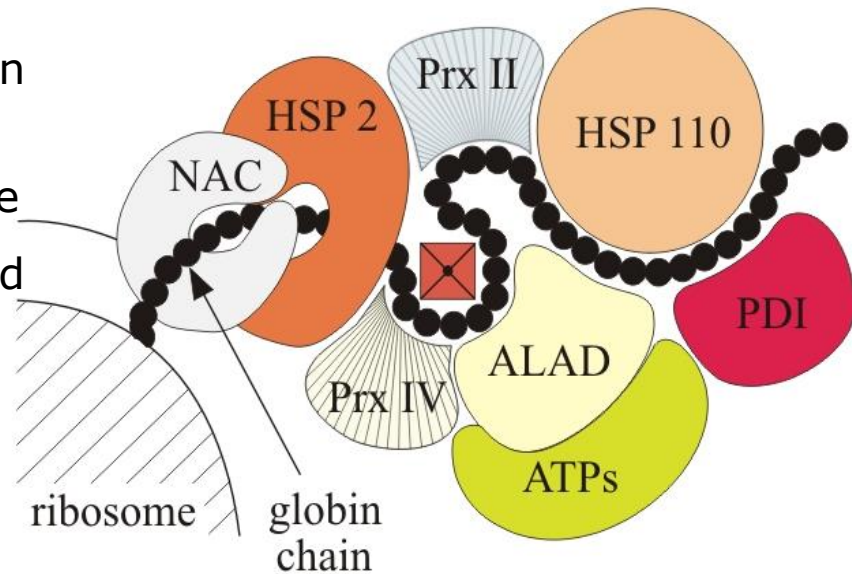
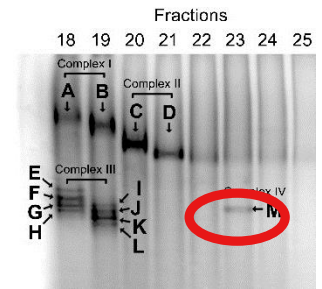
**HSP 110** – heat shock protein 110

**PDI** – protein disulfide isomerase

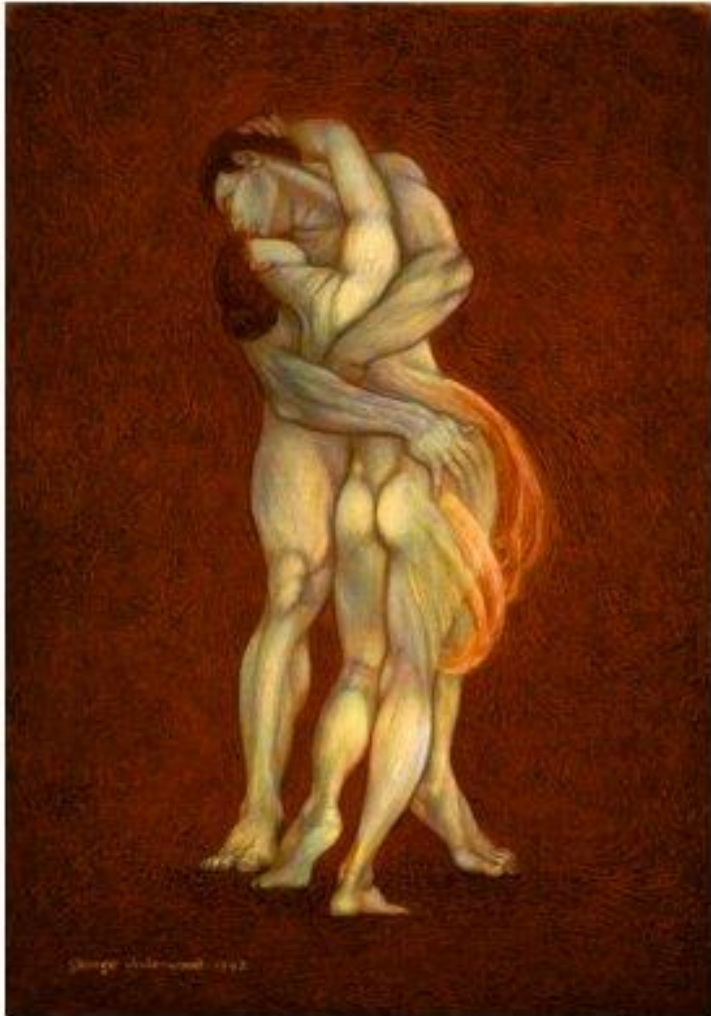
**ALAD** – delta aminolevulinic acid dehydratase

**ATPs** – ATP synthase

## Complex 4



# ANALÝZA PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ



## Nativní vícerozměrné separace

- Blue native/2-D elektroforéza
- Clear native/2D elektroforéza
- Nativní LC proteinů-nativní ELFO

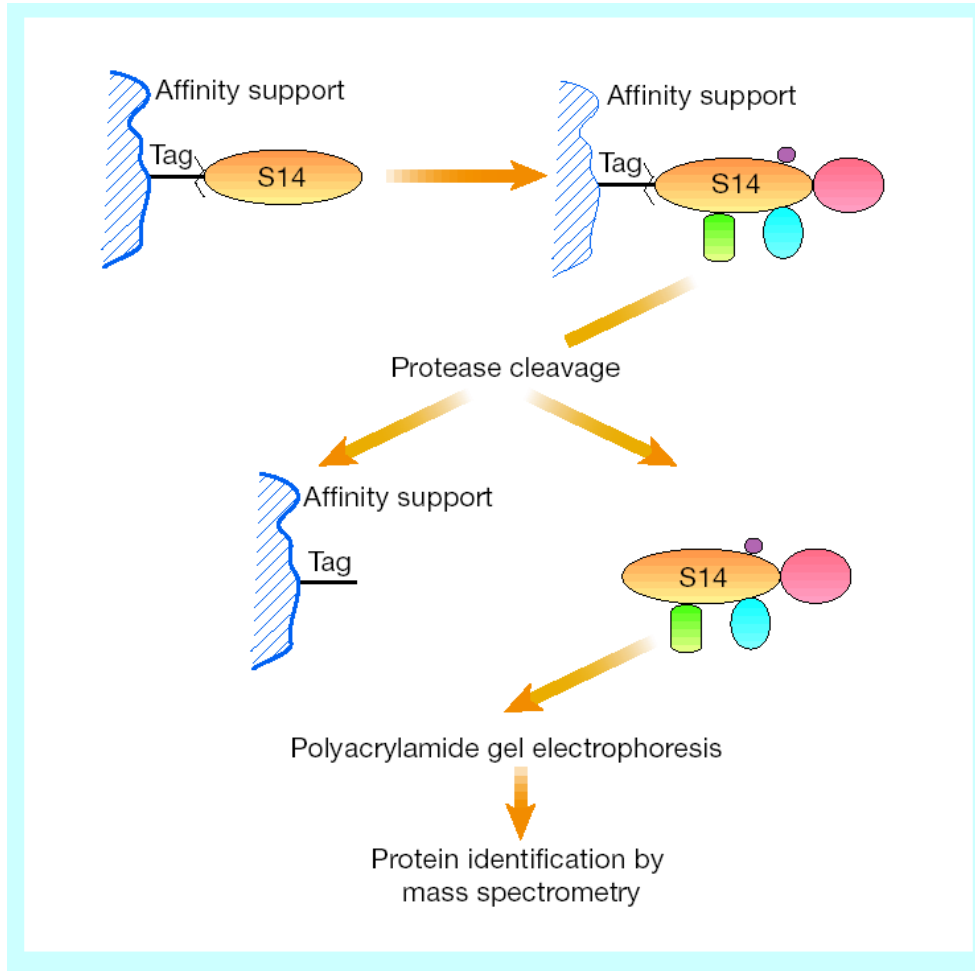
## Afinitní purifikace komplexů

- Tandemová afinitní purifikace (TAP)

**QUICK-** SILAC+RNAi knock-down

# IMUNOAFINITNÍ IZOLACE PROTEINOVÝCH KOMPLEXŮ

- 1) matrix s protilátkou proti jedné složce komplexu
- 2) matrix s rekombinantním proteinem (složkou komplexu)



Navázání rekombinantního proteinu s „tagem“ na matrix

Eluce specifickou endopeptidázou (**trombin**) štěpící v „tagu“

„Tag“ (lalůček, přívěšek, značka) - AA sekvence vložená do rekombinantního proteinu sloužící k izolaci, detekci, zakotvení apod...



# AFINITNÍ MATRIX

## Aktivované matrice:

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

CNBr Sepharose.....lze vázat za aminoskupinu

EAH Sepharose .....lze 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

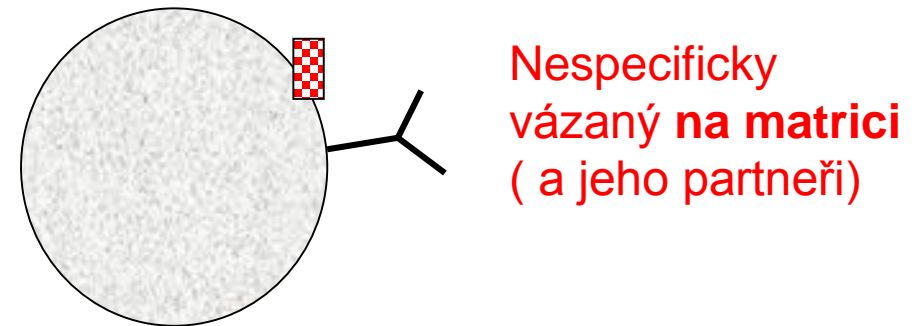
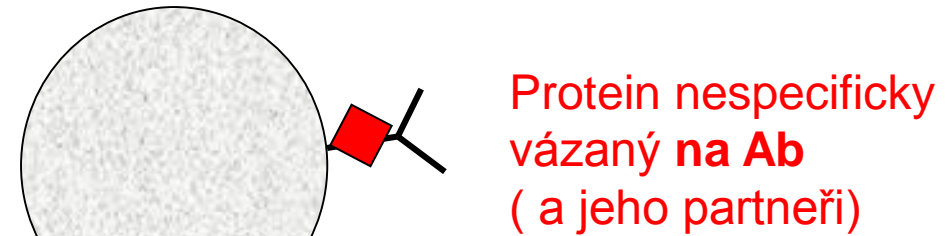
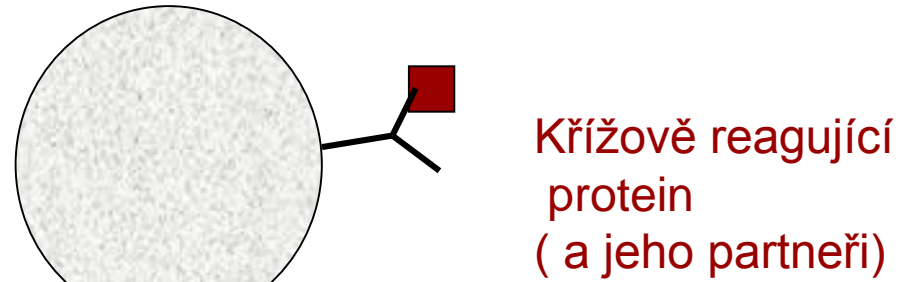
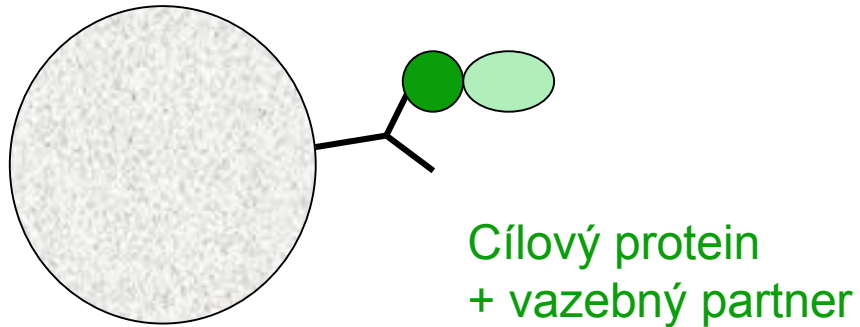
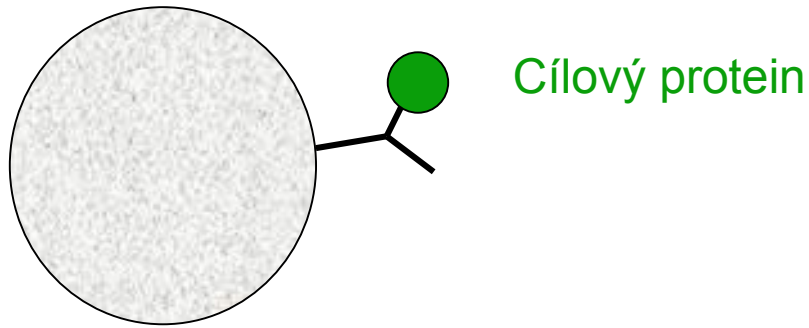
## Matrice s afinitou pro glykoproteiny

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

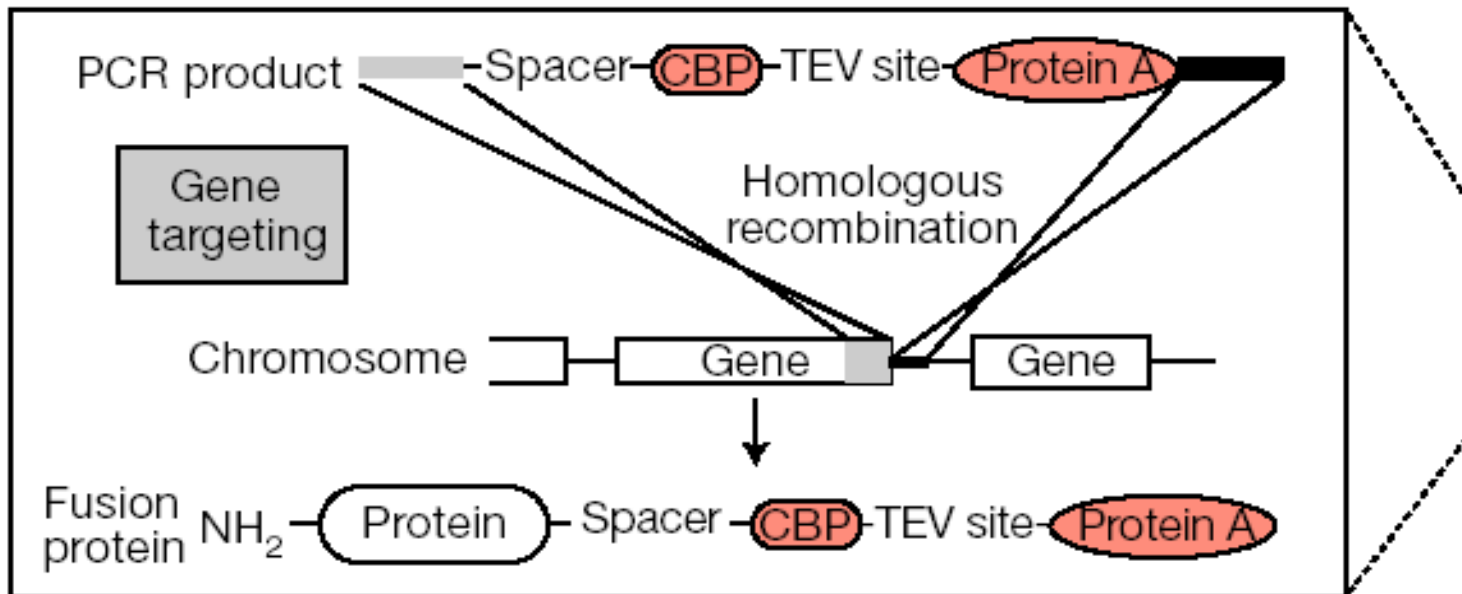


# TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)

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

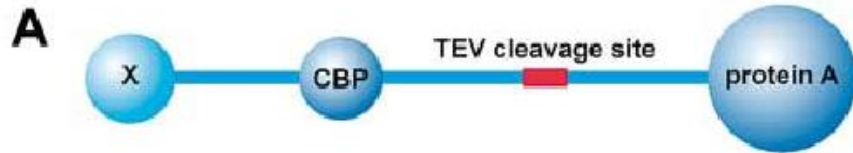
CBP- calmodulin-binding protein

TEV – štěpné místo virové proteázy TEV



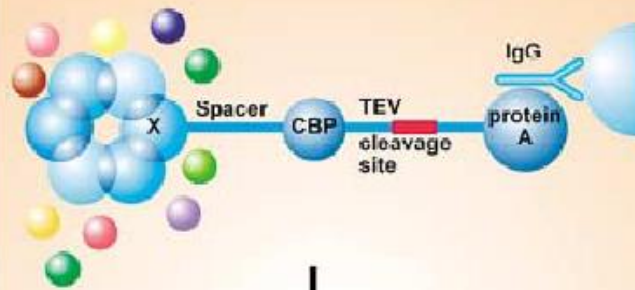
1739 ORF

# TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)



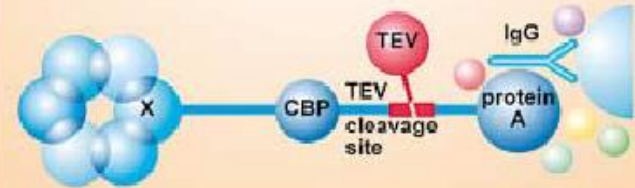
**B** First affinity purification

Protein A-IgG Interaction



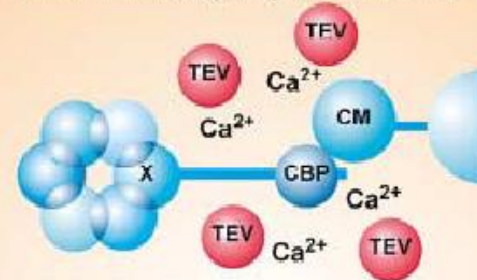
Wash

TEV cleavage



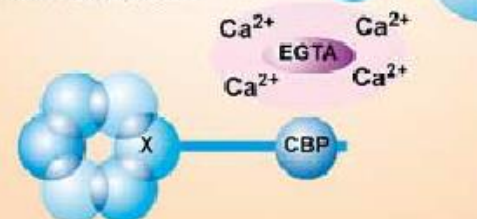
Second affinity purification

CBP-Calmodulin (CM) Interaction



Wash

EGTA Treatment



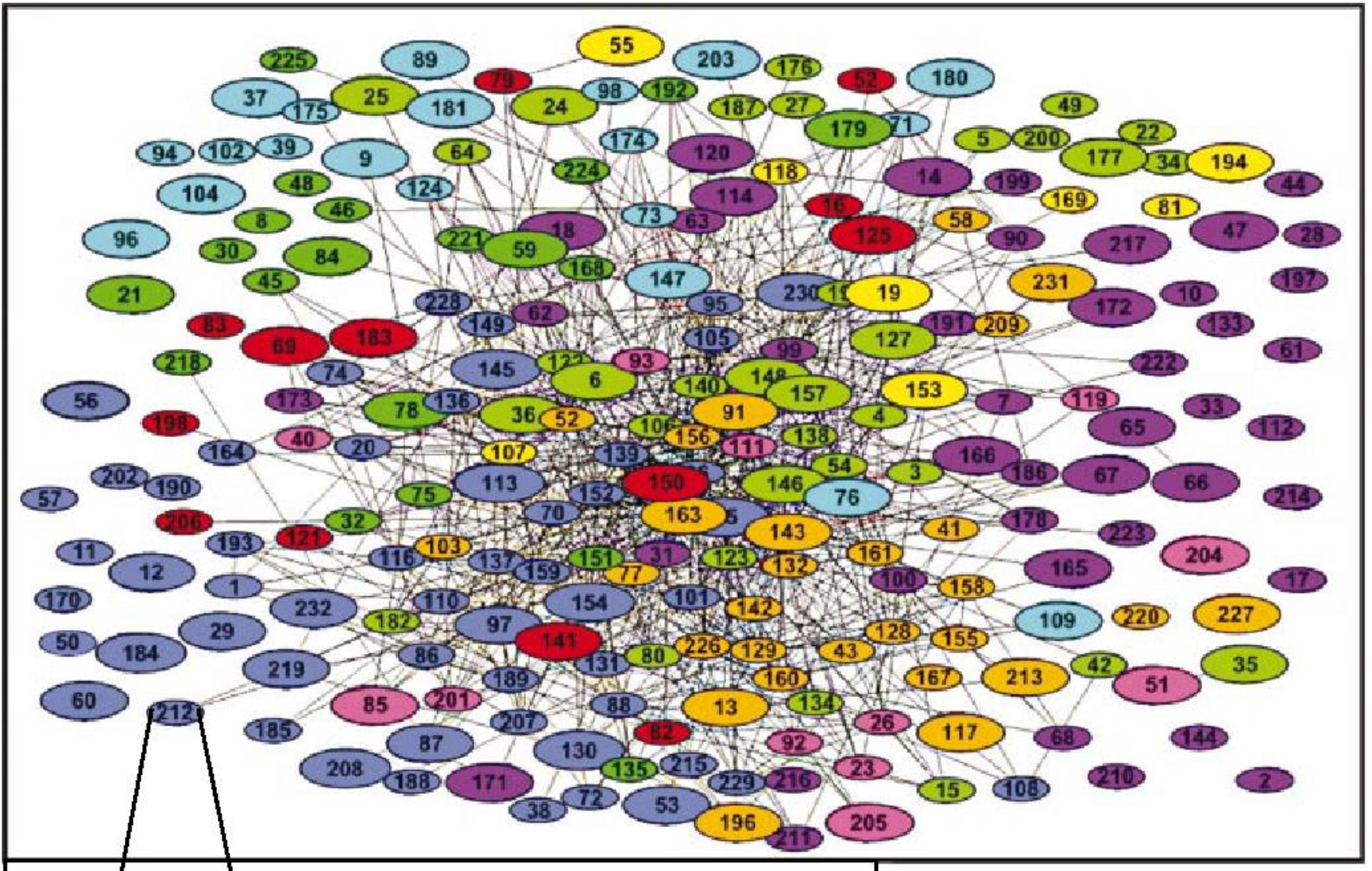
# TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)

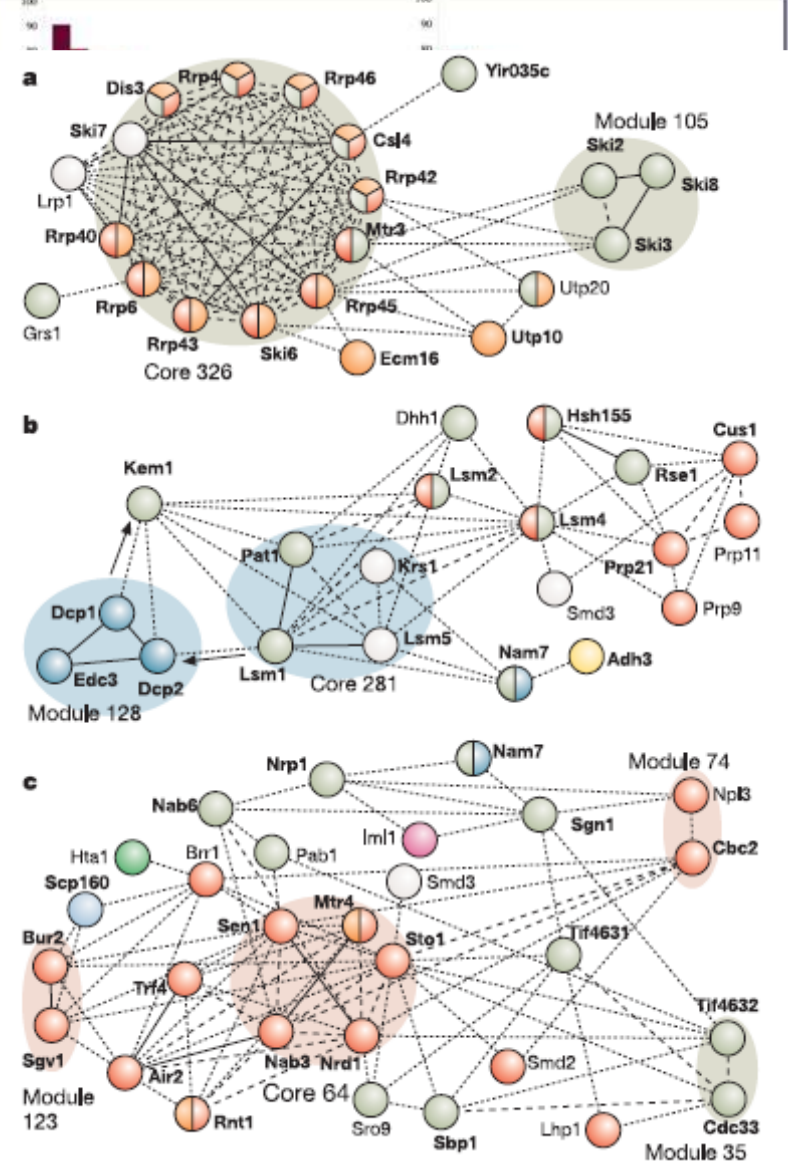
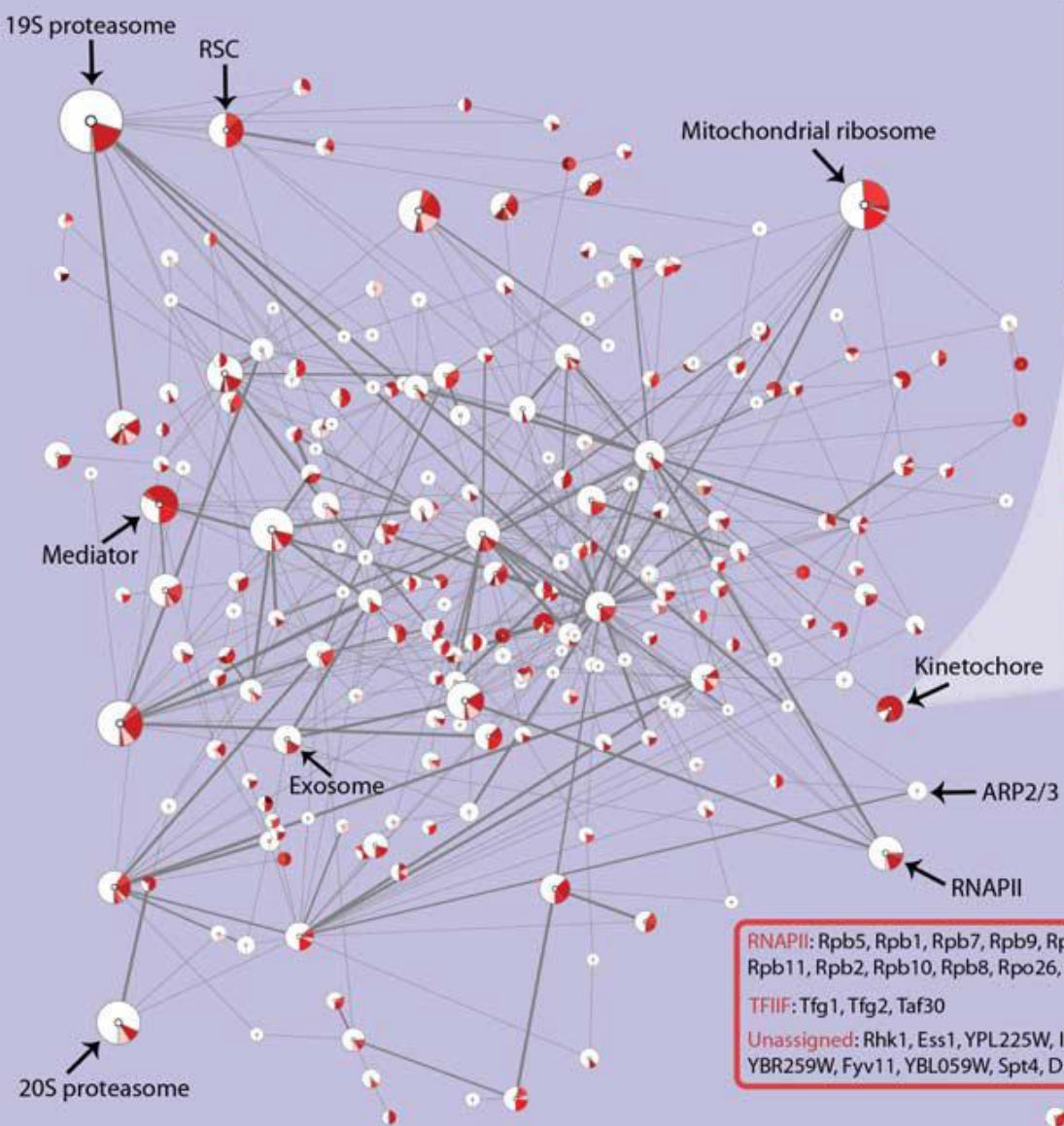
Strategy	Failed	Success rate	
PCR of the TAP cassette	ORFs processed: 1,739		4562 (red) 6466 (teal)
Transformation of yeast cells (homologous recombination)	Positive homologous recombinations: 1,548	191 89%	
Selection of positive clones	Expressing clones: 1,167 (membrane protein 293)	381 75%	
Large-scale cultivation			
Cell lysis Tandem affinity purification	TAP purifications: 589	285 62%	2357 (red) 1993 (teal)
One-dimensional SDS-PAGE			
MALDI-TOF protein identification			
Bioinformatic data interpretation	Identified complexes: 232		547 (red) 491 (teal)

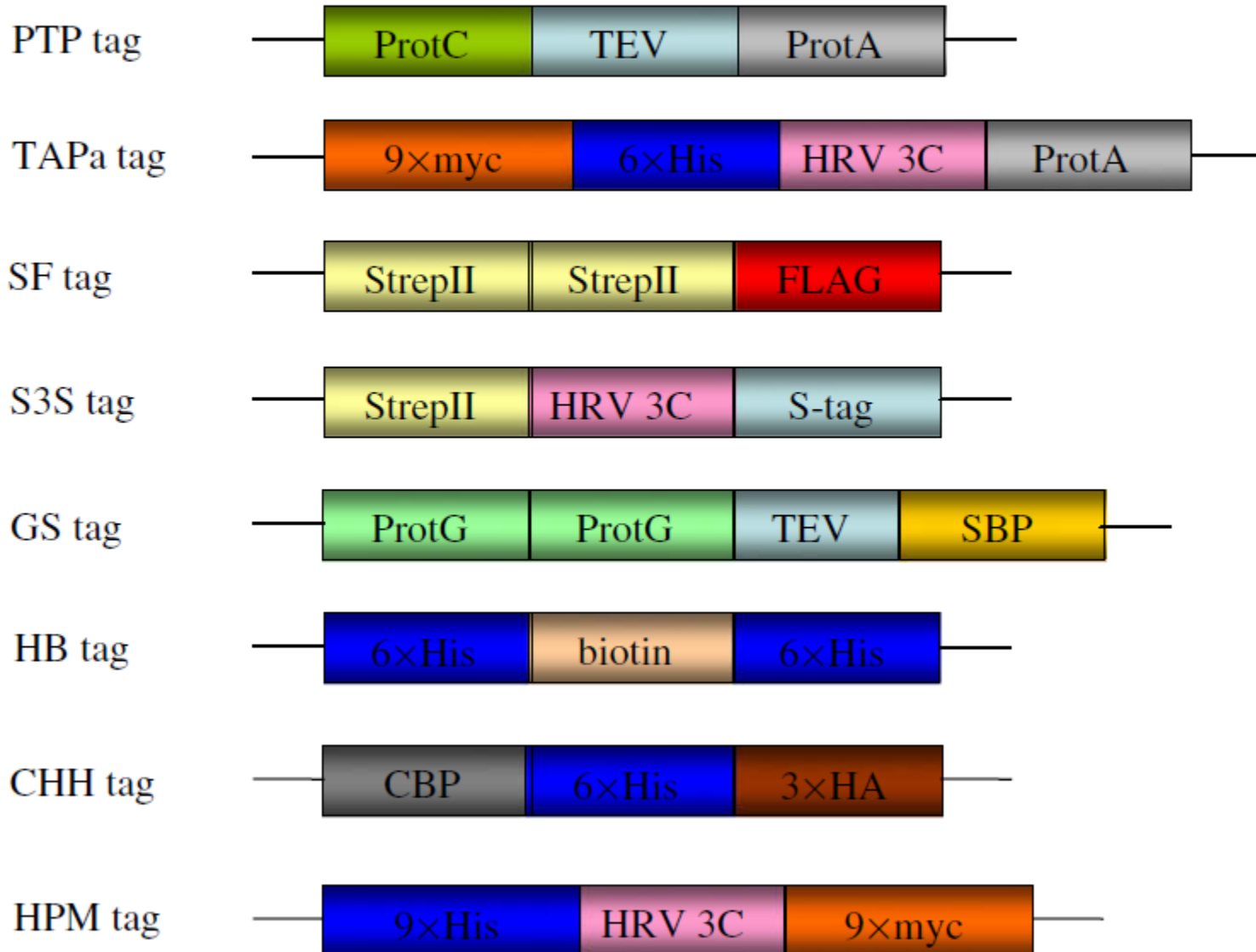
Komplexy (v průměru 5-7 komponent)	Gavin 2002 <i>Nature</i>	Gavin 2006 <i>Nature</i>	Krogan 2006 <i>Nature</i>
------------------------------------	-----------------------------	-----------------------------	------------------------------

# TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)





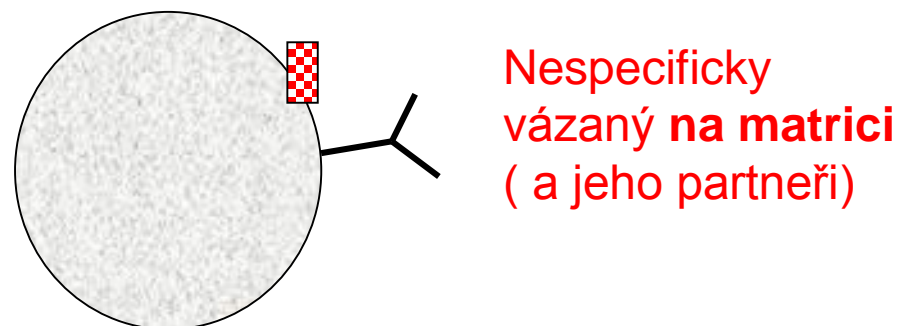
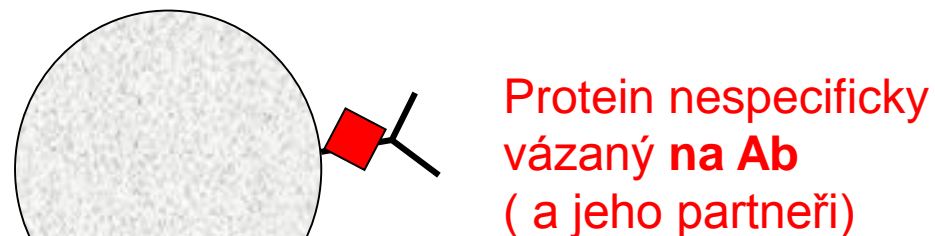
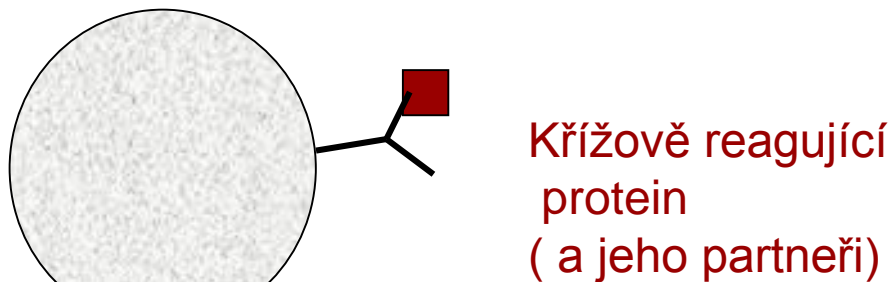
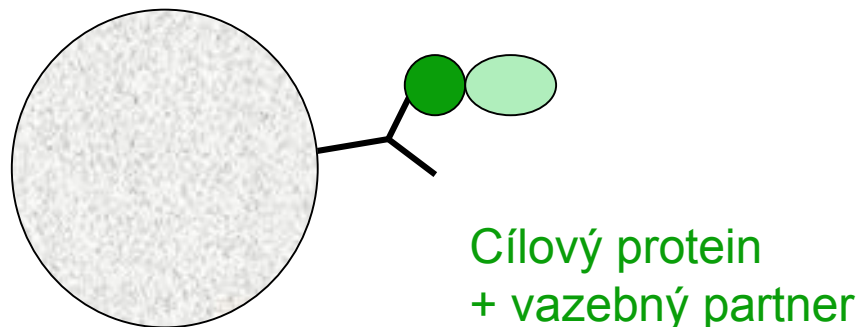
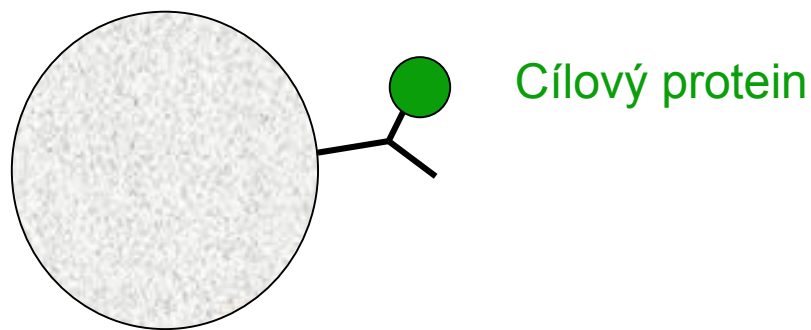
# TANDEMOVÁ AFFINITNÍ PURIFIKACE (TAP)





# QUICK SILAC+RNAi knock-down

## Typy možných interakcí při imunoprecipitaci

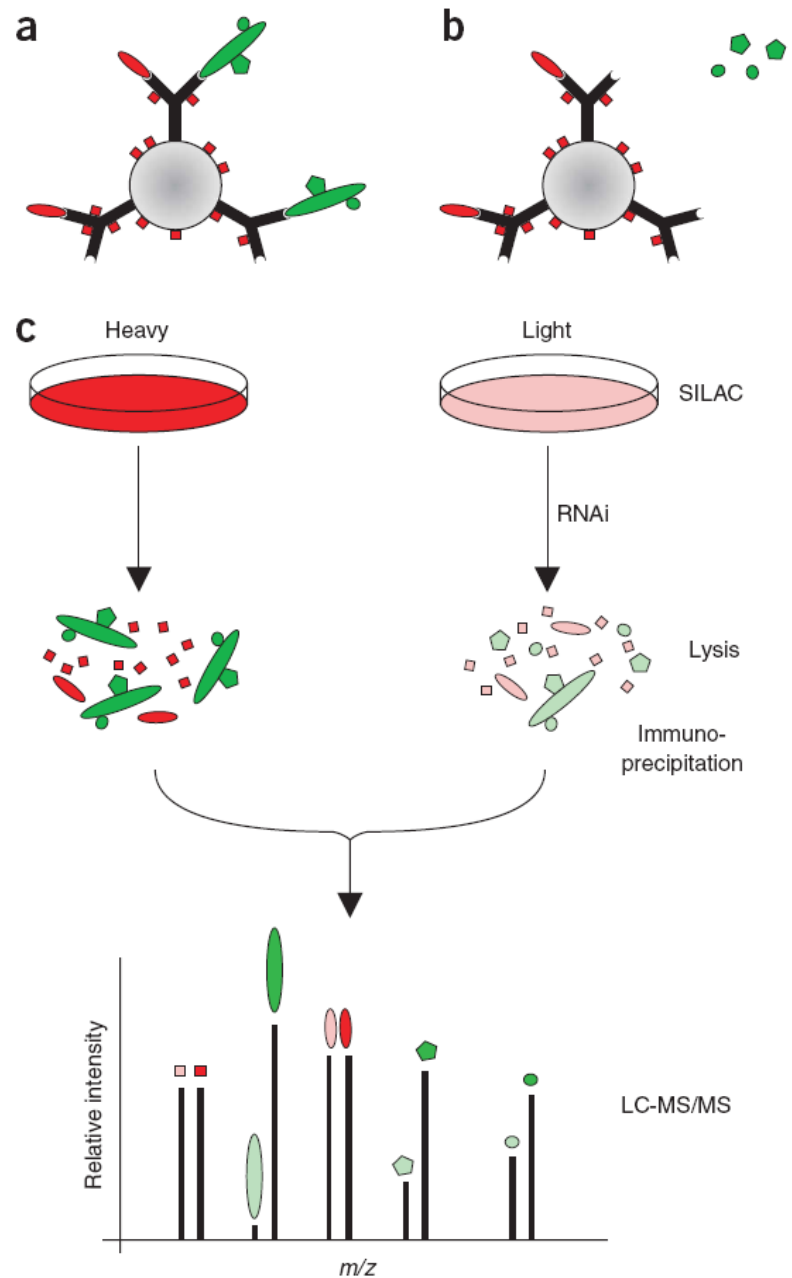


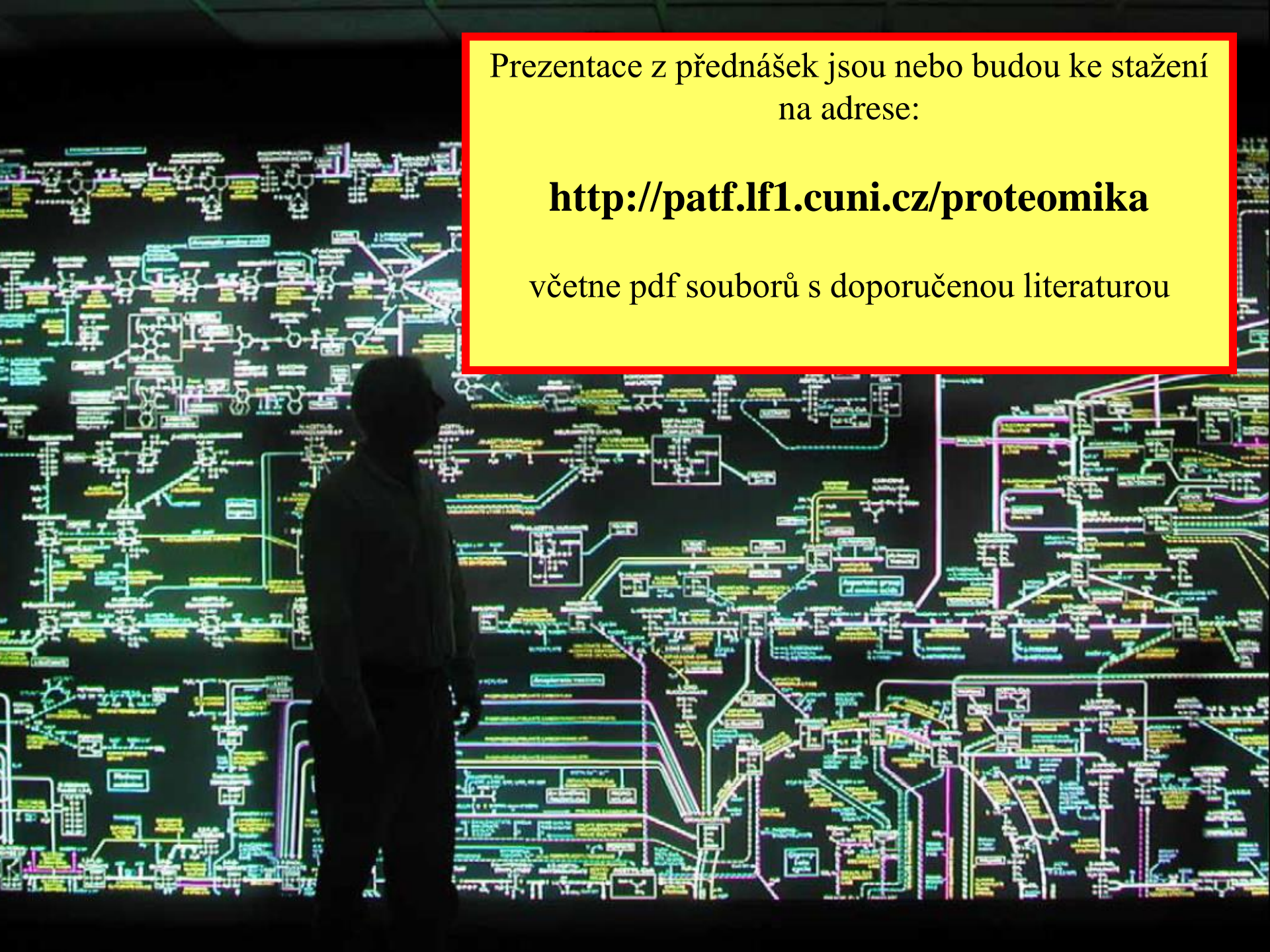
# QUICK SILAC+RNAi knock-down

4 classes of proteins are present in an immunoprecipitate:

- **target proteins**
- **specific interaction partners**
- **nonspecific binders**
- **cross-reactive proteins**

After knocking down expression of the protein of interest, only contaminants remain.



A person is standing in the foreground, looking at a large wall covered in a complex, colorful network diagram. The diagram consists of numerous nodes and connecting lines, representing a proteomic map. The nodes are small boxes and circles, and the lines are colored in various colors like green, blue, red, and yellow. The overall appearance is that of a large-scale biological network.

Prezentace z přednášek jsou nebo budou ke stažení  
na adrese:

**<http://patf.lf1.cuni.cz/proteomika>**

včetně pdf souborů s doporučenou literaturou