

PROTEOMICKÉ PŘÍSTUPY V EXPERIMENÁLNÍ ONKOLOGII

Pavel Bouchal

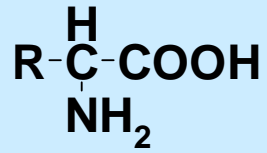
Analýza genové exprese: protein, nebo mRNA?

Protein: „proteom“ (PROTEin complement expressed by a genOME)

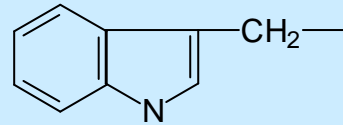
- informace o skutečných efektech buněčných procesů – (což není případ mRNA)
- proteiny jsou oproti mRNA chemicky velmi heterogenní – různá hydrofobicita aminokyselin – stanovení genové exprese na úrovni proteinu je složitější

mRNA: „transkriptom“

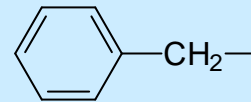
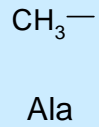
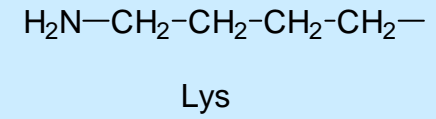
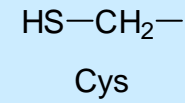
- hladiny mRNA neodpovídají plně hladinám proteinů (degradace mRNA-čas, splice varianty, posttranslační modifikace proteinů)
- stanovení genové exprese je snadnější ve srovnání s proteiny



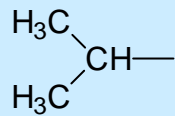
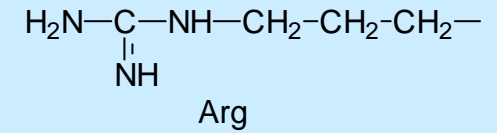
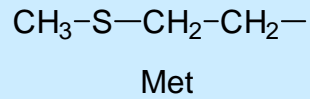
PŘEHLED AMINOKYSELIN



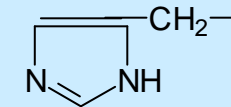
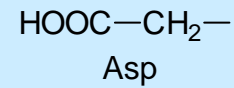
Trp



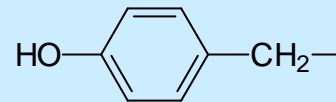
Phe



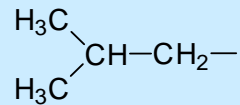
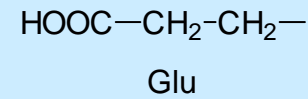
Val



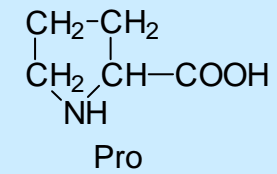
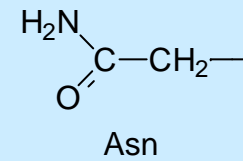
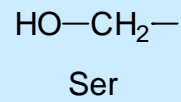
His



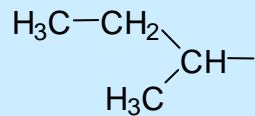
Tyr



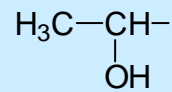
Leu



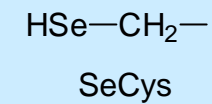
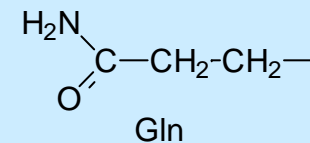
Pro



Ile



Thr



Analýza genové exprese: metody k dispozici

Proteinové metody

- Separace proteinů (elektroforéza, chromatografie) nebo peptidů-před MS
- Identifikace proteinů: hmotnostní spektrometrie (MS), nebo imunochemie - protilátky
- Protilátky: proti konkrétnímu proteinu (variantě), velmi specifické (ale někdy crossreaktivita!), velmi citlivé
- MS: identifikace i několika tisíc proteinů současně, méně citlivé

mRNA metody

- nejprve přepis mRNA → cDNA (reverzní transkriptáza)
- qRT-PCR – analýza exprese 1 genu – PCR amplifikace
- více genů: čipové metody (expresní čipy-i pro celý genom): na principu hybridizace nebo se zahrnutím PCR (citlivější)

Analýza genové exprese: protein, nebo mRNA?

- Co si tedy vybrat?

... nejlépe obojí (potvrzení na více biologických úrovních), kvantifikace na úrovni proteinu je ale zásadní, např. tedy:

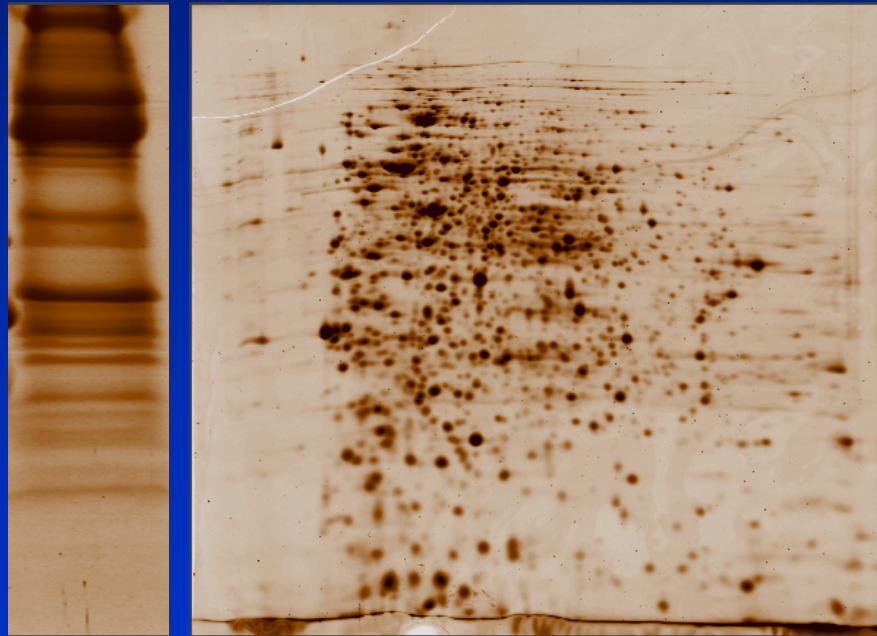
Proteomika

Western blot

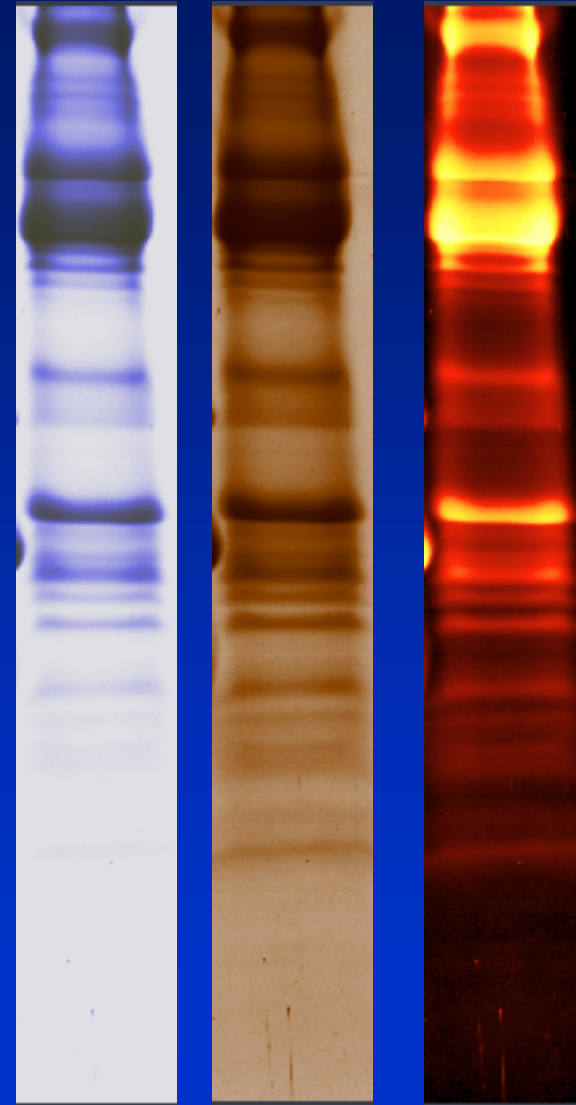
qRT-PCR

Imunohistochemie

Proteinové metody: rozlišení a citlivost



Rozlišení →



Citlivost →

Nejpoužívanější proteomické přístupy a jejich kombinace

(osnova další části přednášky)

- Dvourozměrná gelová elektroforéza (2-DE)
- Hmotnostní spektrometrie
- SELDI-TOF MS
- SILAC značení
- iTRAQ-2DLC-MS/MS
- MRM
- Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie
- Protilátkové arrays (cell arrays, tissue arrays)

Příprava vzorku pro 2-DE

Homogenizace a solubilizace



Buněčné linie: stačí sonikace v lyzačním pufru

Tkáně: mechanická homogenizace + sonikace v lyzačním pufru

Plazma, sérum: nechat stát v lyzačním pufru

Inhibice proteas (Complete™, PMSF)!!!

Inhibice fosfatas (Na₂VO₃, NaF)!!

Odstranění nukleových kyselin (benzonasa)!!

Odstranění dalších interferujících látek (je-li třeba) !

Nízká iontová síla (10 mM soli)!!!!

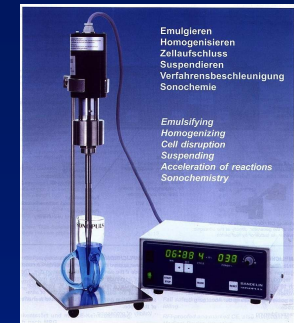
Analýza „subproteomů“

cytoplasma, ribosomy: diferenciální centrifugace

membránová frakce: diferenciální centrifugace, extrakce detergenty (TX-114) nebo extrakce Na₂CO₃

Precipitace vzorku (zakoncentrování, delipidace): aceton, trichloroctová kyselina

Solubilizace vzorku ~1h/lab T, NEZAHŘÍVAT nad 37 °C, pak centrifugace (~16000 g, 20 min, 4°C)



Solubilizace vzorku

- **CHAOTROPNÍ ČINIDLA** denaturují proteiny
7 M močovina, 2 M thiomočovina
- **DETERGENTY** obalují hydrofobní části bílkovin a tím zvyšují jejich rozpustnost
2-4% CHAPS nebo 1% ASB 14 nebo 1% C7BzO; 0,5-1% TRITON X-100
- **REDUKČNÍ ČINIDLA** štěpí disulfidické vazby -S-S- mezi cysteiny
50-100 mM dithiothreitol
- **AMFOLYTY** pufrují pH a také zlepšují rozpustnost proteinů
Pharmalyte, Bio-Lyte, Ampholyte (0,2-2%)

Příklady:

7 M močovina, 2 M thiomočovina, 4 % CHAPS, 70 mM DTT, 2% amfolyty
nebo

7 M močovina, 2 M thiomočovina, 1 % C7BzO, 70 mM DTT, 2% amfolyty
nebo

7 M močovina, 2 M thiomočovina, 1 % ASB 14, 1% TRITON X-100, 70 mM DTT,
2% amfolyty (směs pro membránové proteiny)

Příprava vzorku z buněčné linie: praktický příklad protokolu

-k peletu buněk přidat lyzační pufr (7M močovina, 4% thiomočovina, 1% C7BzO, 40 mM Tris, 70 mM DTT, 2% Pharmalyte 3/10, Complete Mini 1 tbl/10 ml, 5 mM NaF, 0.2 mM NaVO₃)

-desintegrace ultrazvukem 60 x 0.1 s

-solubilizace 75 min/lab T; po 60 min přidat 150 U benzonasy

-centrifugace 16000 g/20 min/4 °C

-stanovení bílkoviny

-150 µg proteinu (pro barvení stříbrem) precipitovat 7,5 násobkem acetonu přes noc / -20°C

-centrifugace 16000 g/20 min/4 °C

-resolubilizace peletu v rehydratačním pufru (7M močovina, 2M thiomočovina, 1% C7BzO, 70 mM DTT, 2% Pharmalyte 3/10)

-nanesení na IPG strip

Modifikace dle :

Bouchal P., Zdráhal Z., Helánová Š., Janiczek O., Hallberg K.B., Mandl M., Proteomics 2006, 6, 4278-4285

Příprava vzorku: obecné doporučení

„AS SIMPLE
AS POSSIBLE“

1. rozměr: isoelektrická fokusace (IEF)

Separace podle pl. Počítají se volthodiny (Vh)

- **IPG-IEF** (proužky s imobilizovaným pH gradientem) – dobrá reprodukovatelnost, napětí až 10000 V, současný standard, komerčně dostupné
Základní pH gradienty 3-10, 3-10 NL, 3-11 NL, 4-7, 6-11
Gradienty v úzkém rozsahu i jedné jednotky pH
Dávkování vzorku: in-gel rehydratace (standard)
cup loading (bazické gradienty, např. pH 6-11)
- **CA-IEF** - IEF s nosnými amfolyty (vytvářejí gradient pH v trubičkových gelech)
– obtížná manipulace, nedobrá reprodukovatelnost, katodický drift, již málo používané
- **NEpHGE** (nerovnovážený systém pro analýzu bazických a kyselých proteinů; trubičkové gely) – obtížná kontrola chování gradientu, již málo používané

Aparatury na IEF

CA-IEF



IPG-IEF



IPG-IEF



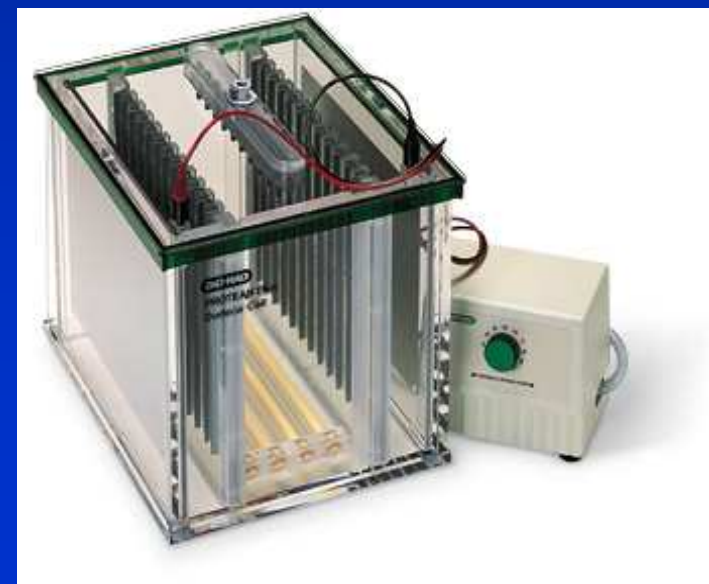
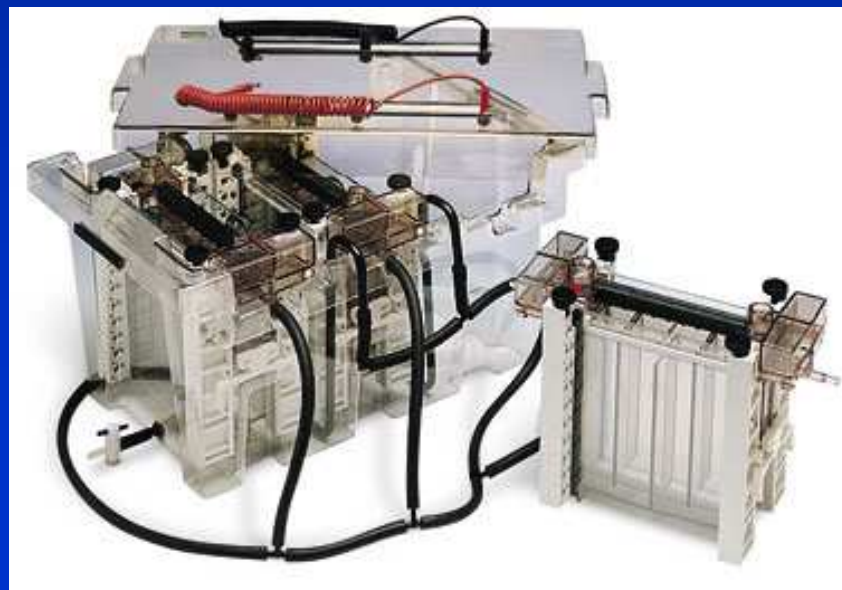
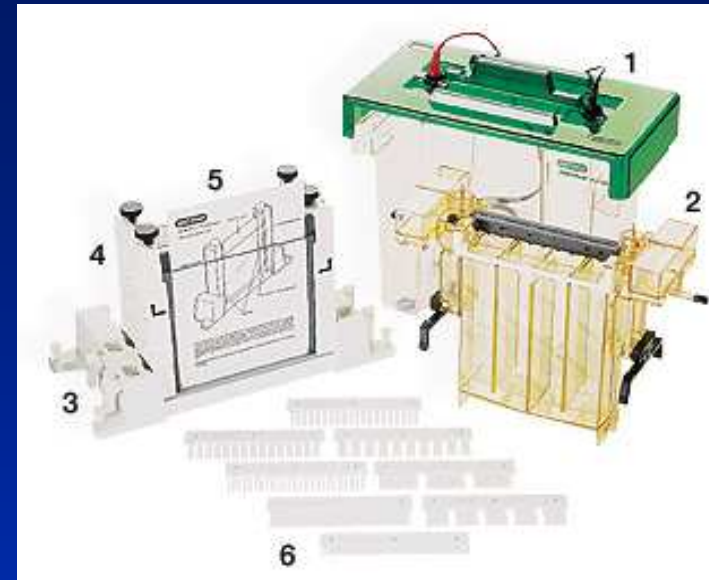
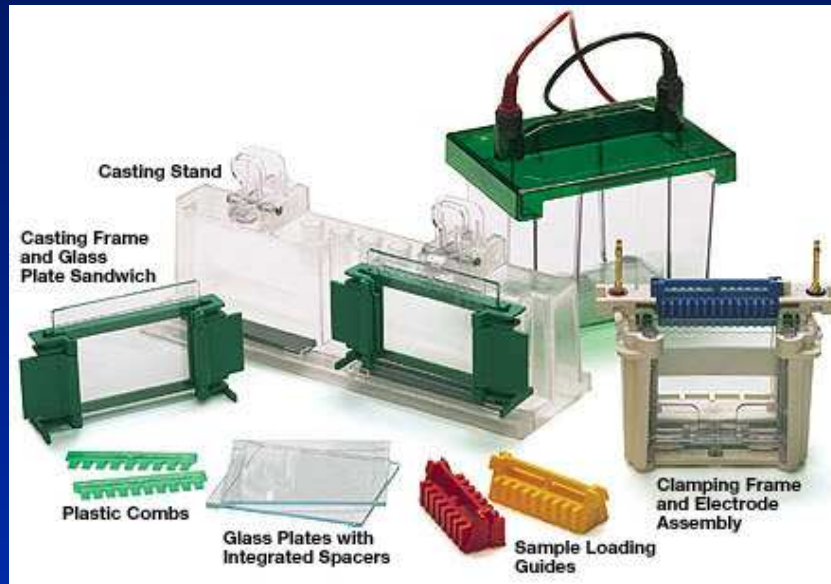
IPG-IEF



2. rozměr: SDS-PAGE

- Ekvilibrace IPG proužků před SDS-PAGE: obalení proteinů SDS – (uděluje proteinům uniformní náboj na jednotku hmotnosti), další redukce (DTT) a alkylace (jodacetamid)
- SDS-PAGE (malý i velký formát)
 - 10 až 12 % (homogenní) M_r 15000-100000
 - 8-16% (porozitní gradient) M_r 10000-150000 reprodukovatelnost!
- Pufrové systémy:
 - tris-glycin-SDS (= „Laemmli“) - standard
 - tricinový (pro nízkomolekulární proteiny, M_r 1000-25000)

Aparatury na SDS-PAGE



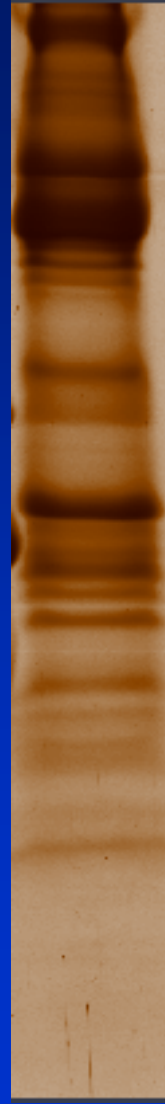
Barvení gelů

| | relat. citlivost |
|--|------------------|
| • Stříbrem: analytické (problémy s MS!) | + + + |
| • Coomassie brilliant blue (mikropreparativní) | + |
| koloidní CBB | + + |
| • SYPRO Ruby/Orange –fluorescenční (analyt.+mikroprep.) | + + (+) |
| • Phosphoimaging (analyt., inkorporace značeného izotopu během biosyntézy proteinů) | + + + |
| • DIGE (diferenční gelová elektroforéza) (fluorescenční obarvení 2+1 (referenční) vzorků před 2-DE analýzou (Cy2, Cy3, Cy5), všechny vzorky v 1 gelu, vizualizace: 3 různé λ (referenční) - laserový skener | + + (+) |

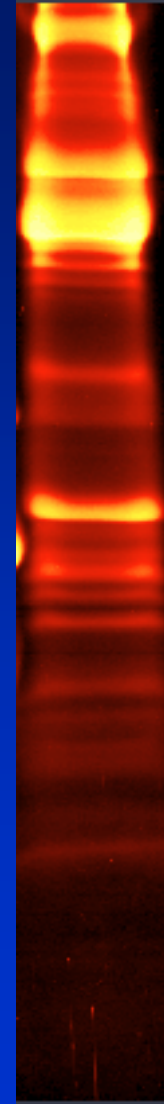
Srovnání barvení gelů



Coomassie

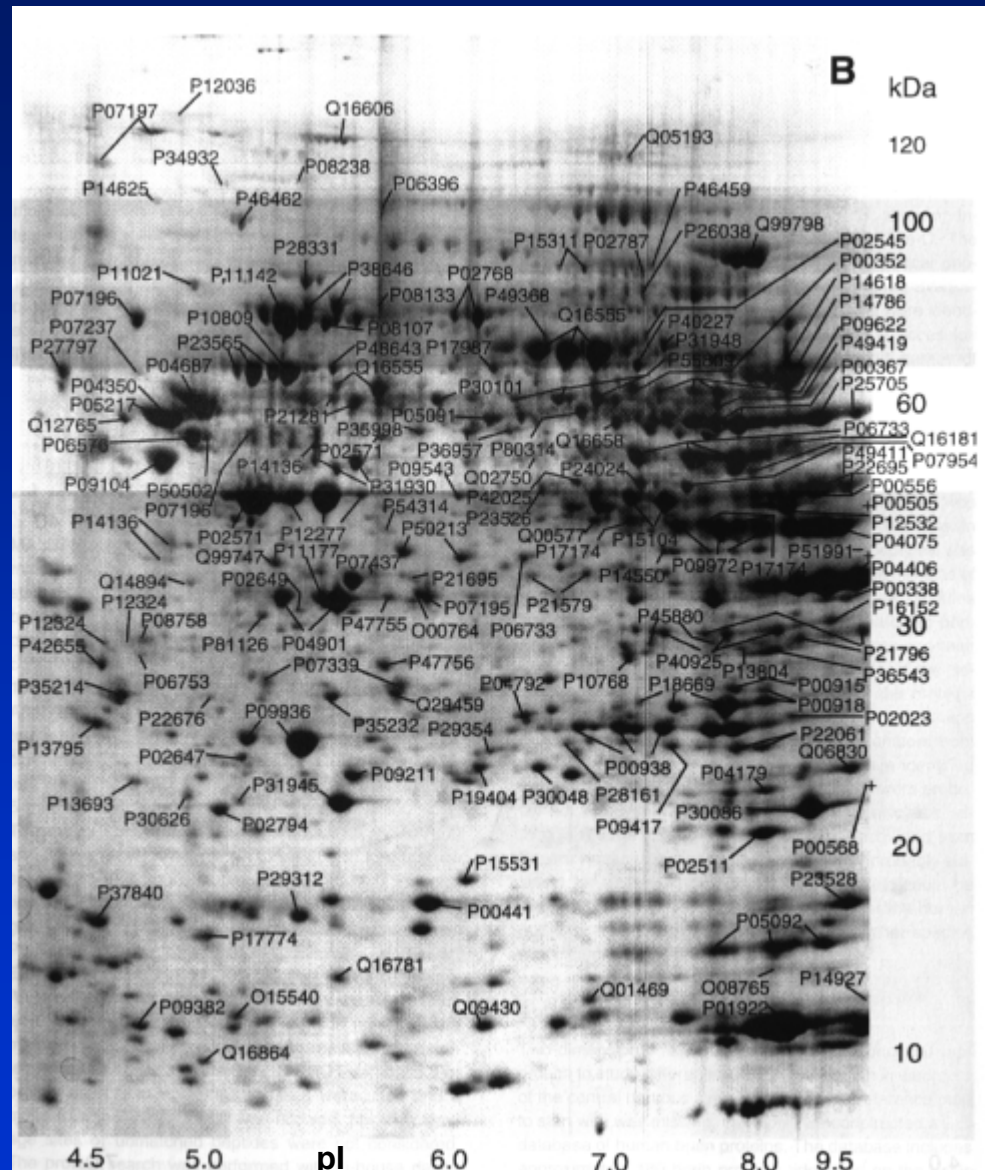


Stříbro



Sypro Ruby

2-D proteinová mapa



Langen H. *et al.*: 2-DE map of human brain proteins. *Electrophoresis* 20, 907 (1999)

Obrazová analýza 2-DE gelů

- Odečtení pozadí a detekce spotů
- Manuální kontrola a korekce detekovaných spotů
- Vzájemné přiřazování odpovídajících si spotů na různých gelech v jedné sadě (matchsetu) – MATCHING
- Kvantitativní a statistická analýza dat
- Tvorba obrazových 2-D databází

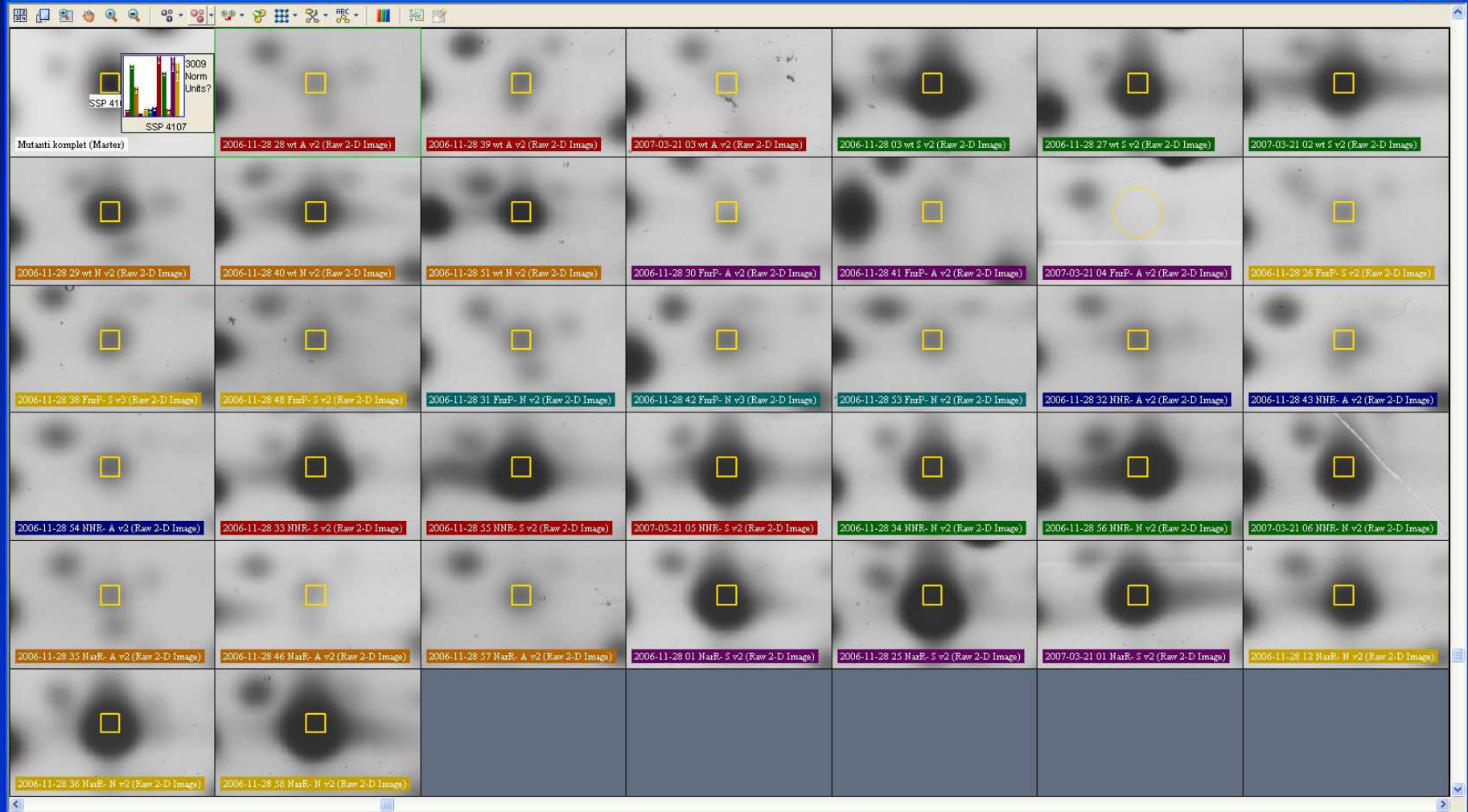
PDQUEST (Bio-Rad)

IMAGE MASTER (GE Healthcare)

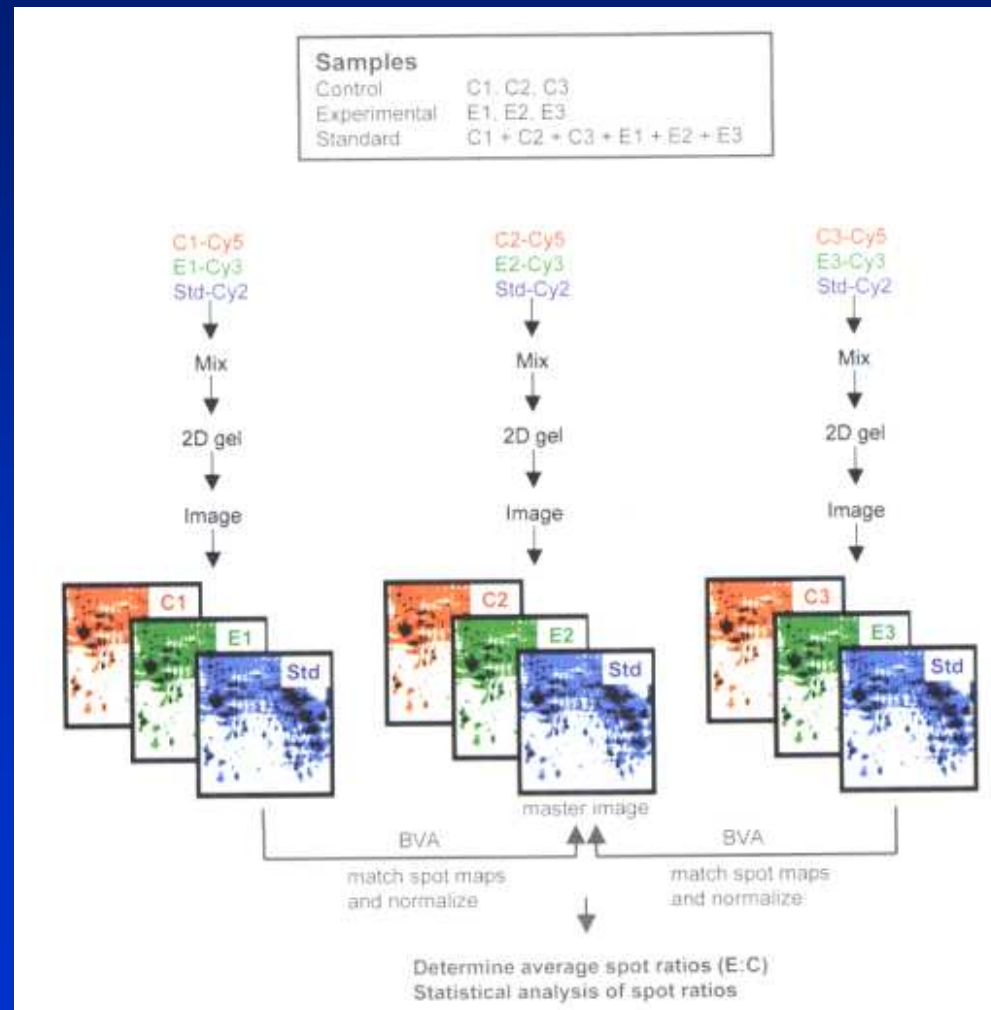
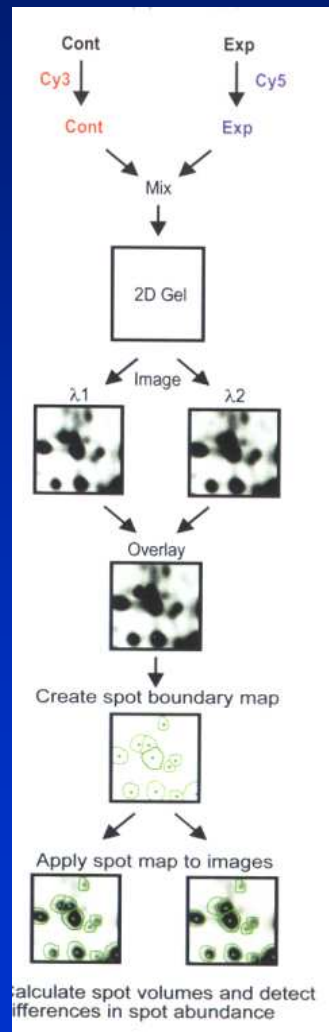
DeCyder (2-D DIGE, GE Healthcare)

a další

Mutanti komplet (Experiment)



2-D DIGE (diferenční 2-D elektroforéza)



Literatura k 2-DE

Görg A., Weiss W., Dunn MJ., Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004, 4, 3665–3685

Westermeier R., Naven T., Höpker H.R., *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design*, 2nd Edition. Wiley 2008, ISBN: 978-3-527-31941-1

... pro ty, kteří ji budou prakticky využívat

Ke zkoušce:

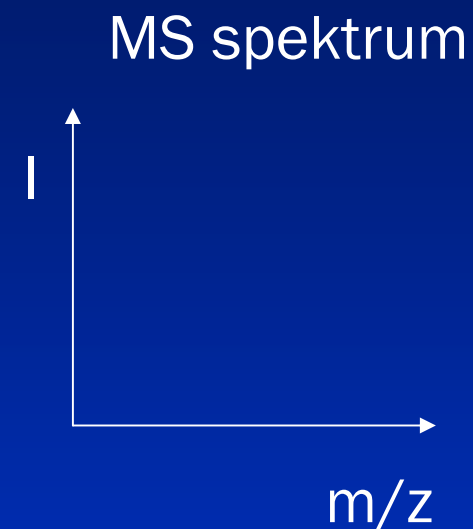
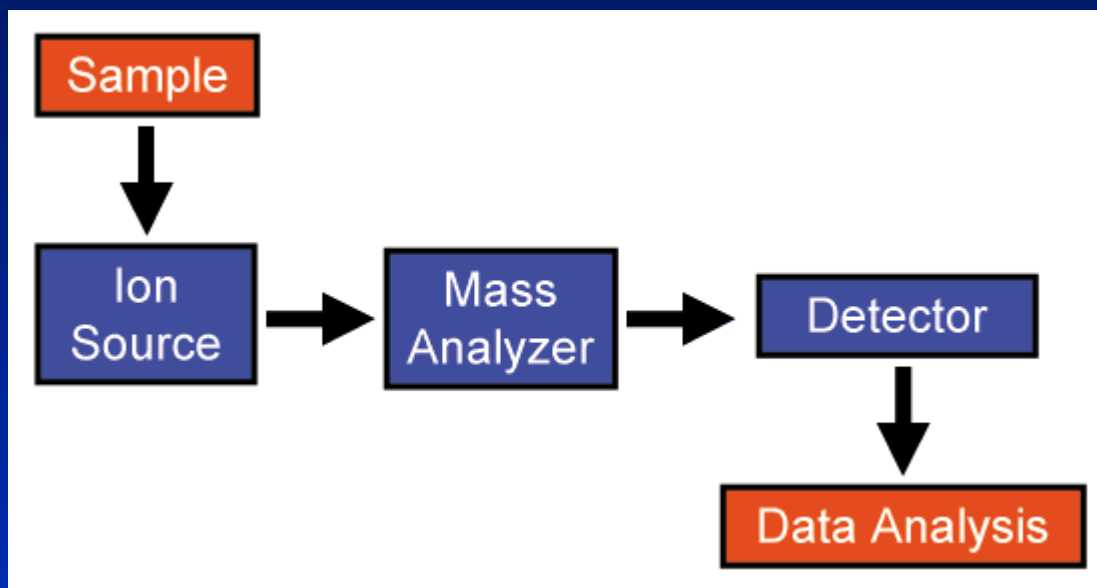
Příprava vzorku: homogenizace; denaturanty a jejich účinek

Základní princip separace

Které metody barvení se používají a jejich srovnání

Princip 2-D DIGE

Hmotnostní spektrometrie



Iontové zdroje:

MALDI (matrix-assisted laser desorption-ionization)

ESI (electrospray ionization)

Analyzátoři:

TOF (time-of-flight)

IT (ion trap-iontová past)

Q3 (trojitý kvadrupól)

Kombinace analyzátorů -> hybridní systémy

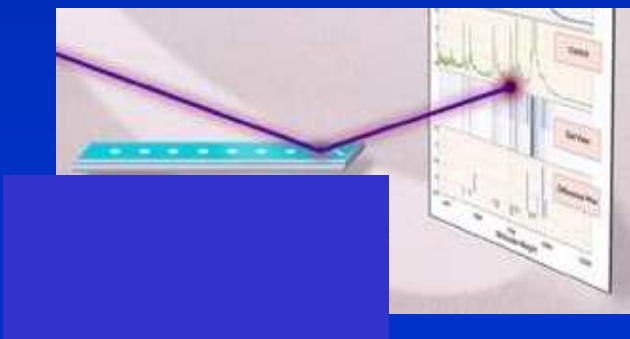
Iontové zdroje: MALDI vs. ESI

MALDI (matrix-assisted laser desorption-ionization)

Krystalizace proteinu s matricí

Ionizace laserem - ionizace probíhá z pevné fáze

Většinou 1-2x nabité ionty



ESI (electrospray ionization)

On-line napojení kapalinové chromatografie na MS (LC-MS/MS)

Ionizace elektrosprejem - ionizace probíhá z kapalně fáze

Vícenásobně nabité ionty



Co umožňuje „běžná“ hmotnostní spektrometrie

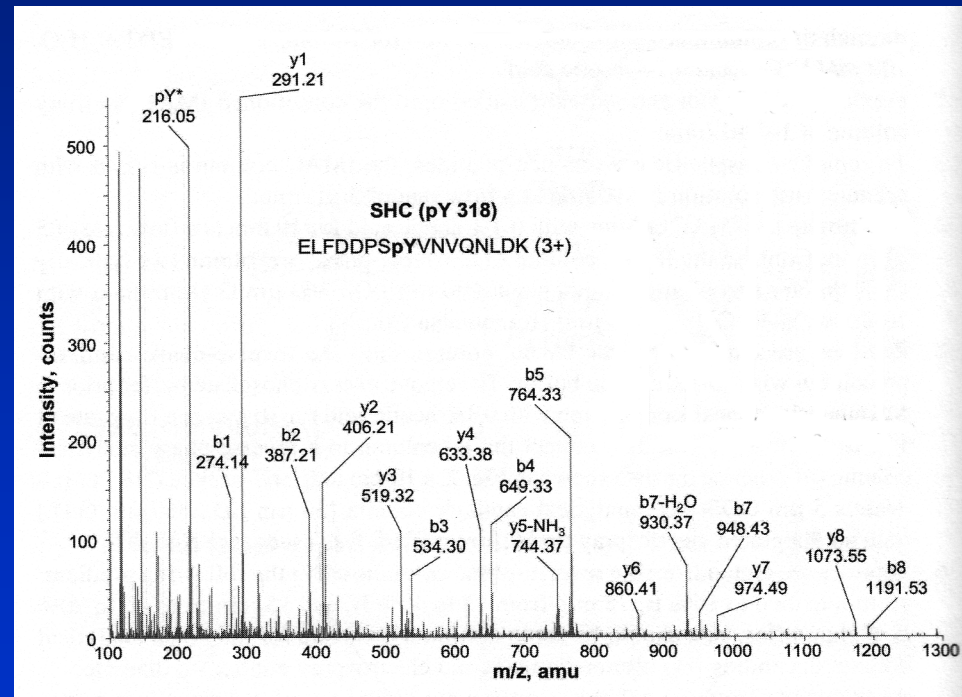
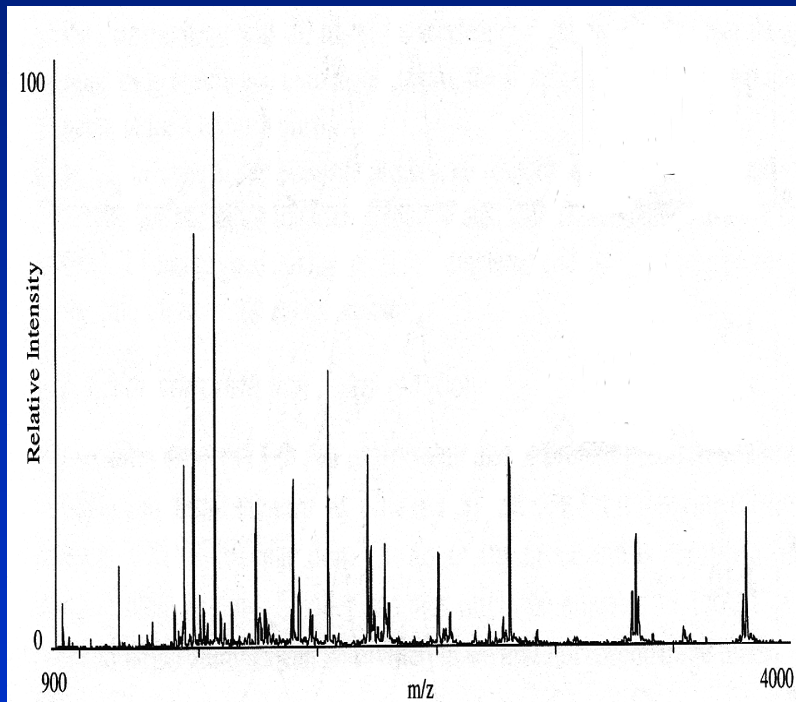
- Identifikace proteinů z gelu a roztoku:
Štěpení trypsinem na peptidy → MS spektrum → peptide mass fingerprinting v **MS** módu
peptidy ve hmotnostním spektrometru lze dále fragmentovat → částečná sekvenace peptidů → peptide mass fingerprinting v **MS/MS** módu (přesnější identifikace)
identifikace probíhá na základě srovnání s databázemi
- Kvantifikace proteinů a peptidů:
kvantifikace proteinů: **SELDI**-TOF MS, MALDI imaging
kvantifikace peptidů v MS módu: **SILAC**, ICAT
kvantifikace peptidů v MS/MS módu: **iTRAQ**, **MRM**



MS

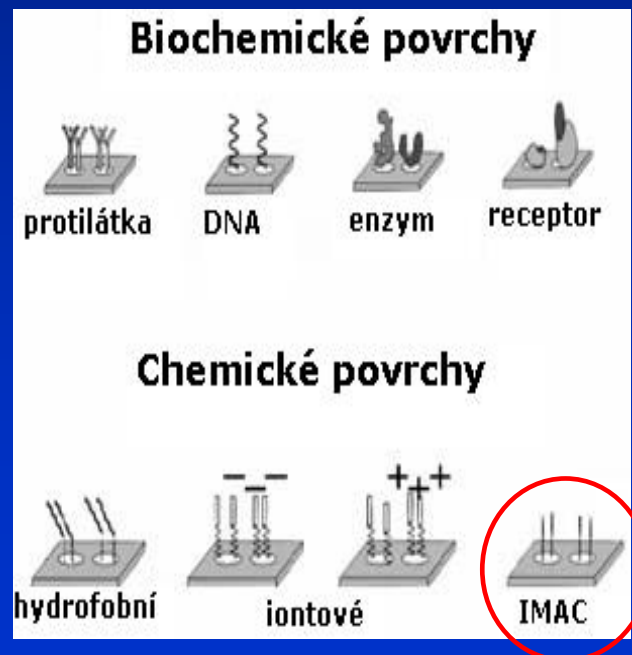
versus

MS/MS



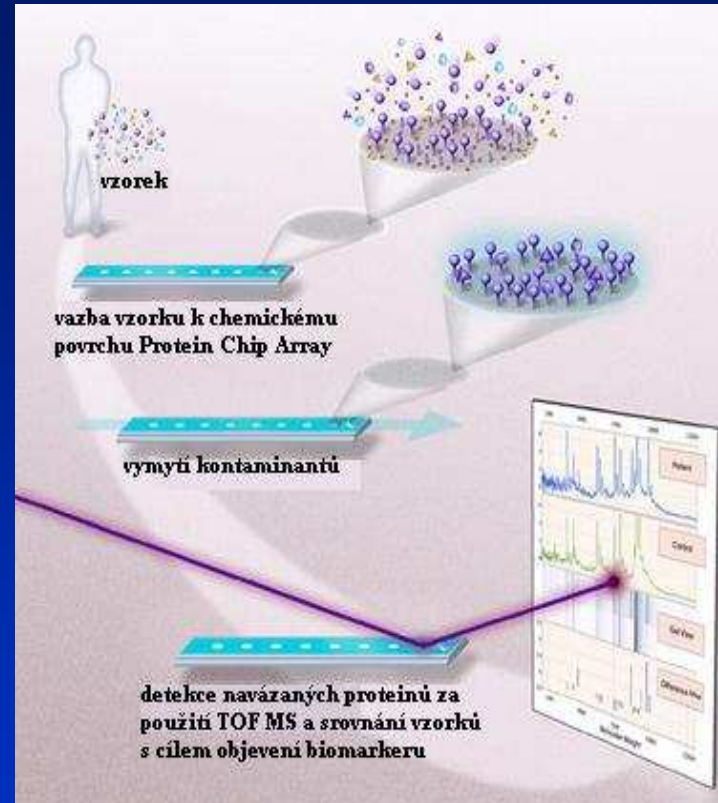
SELDI-TOF MS

- Surface – enhanced laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry
- Příprava vzorku: podobně jako pro 2-DE
- Surface=povrch čipu, na nějž se proteiny vážou na základě chemické nebo biochemické interakce

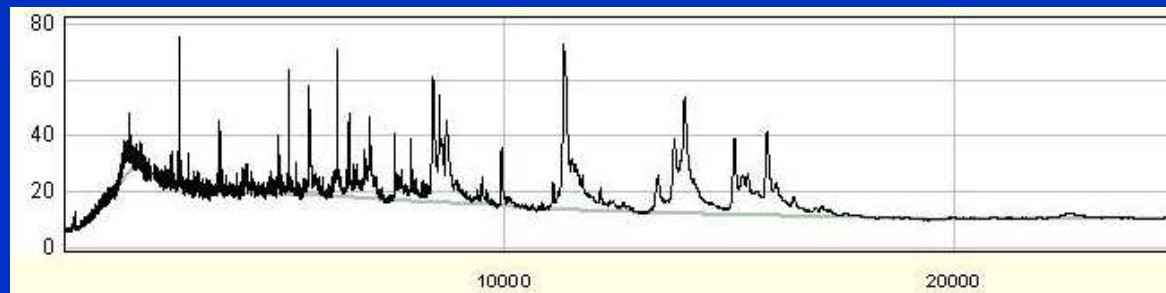


Cu^{2+}

SELDI – TOF MS



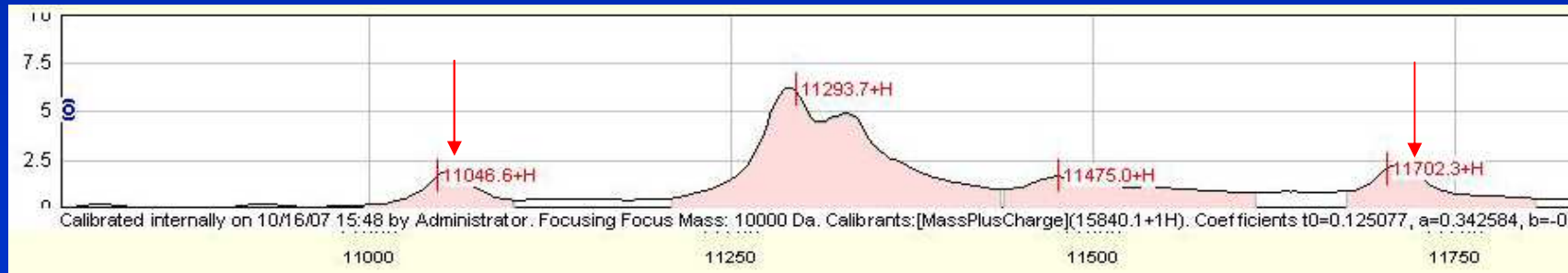
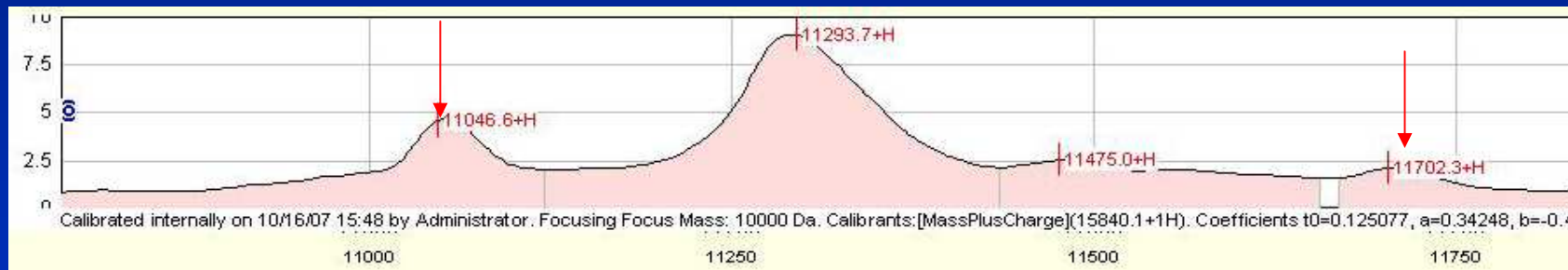
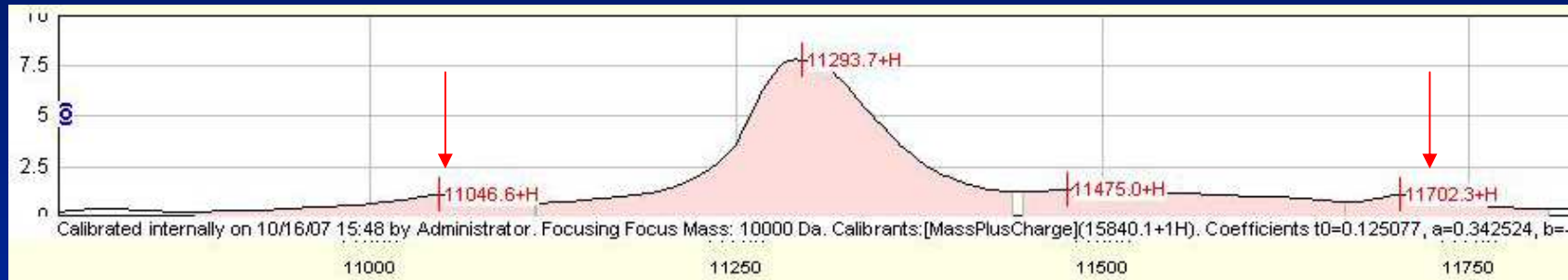
SELDI-TOF MS pracuje pouze v MS módu, detekuje celé intaktní proteiny



SELDI MS spektrum

Kvantifikace pomocí SELDI-TOF MS

Princip: Srovnání ploch píků mezi spektry - např. z různých pacientů



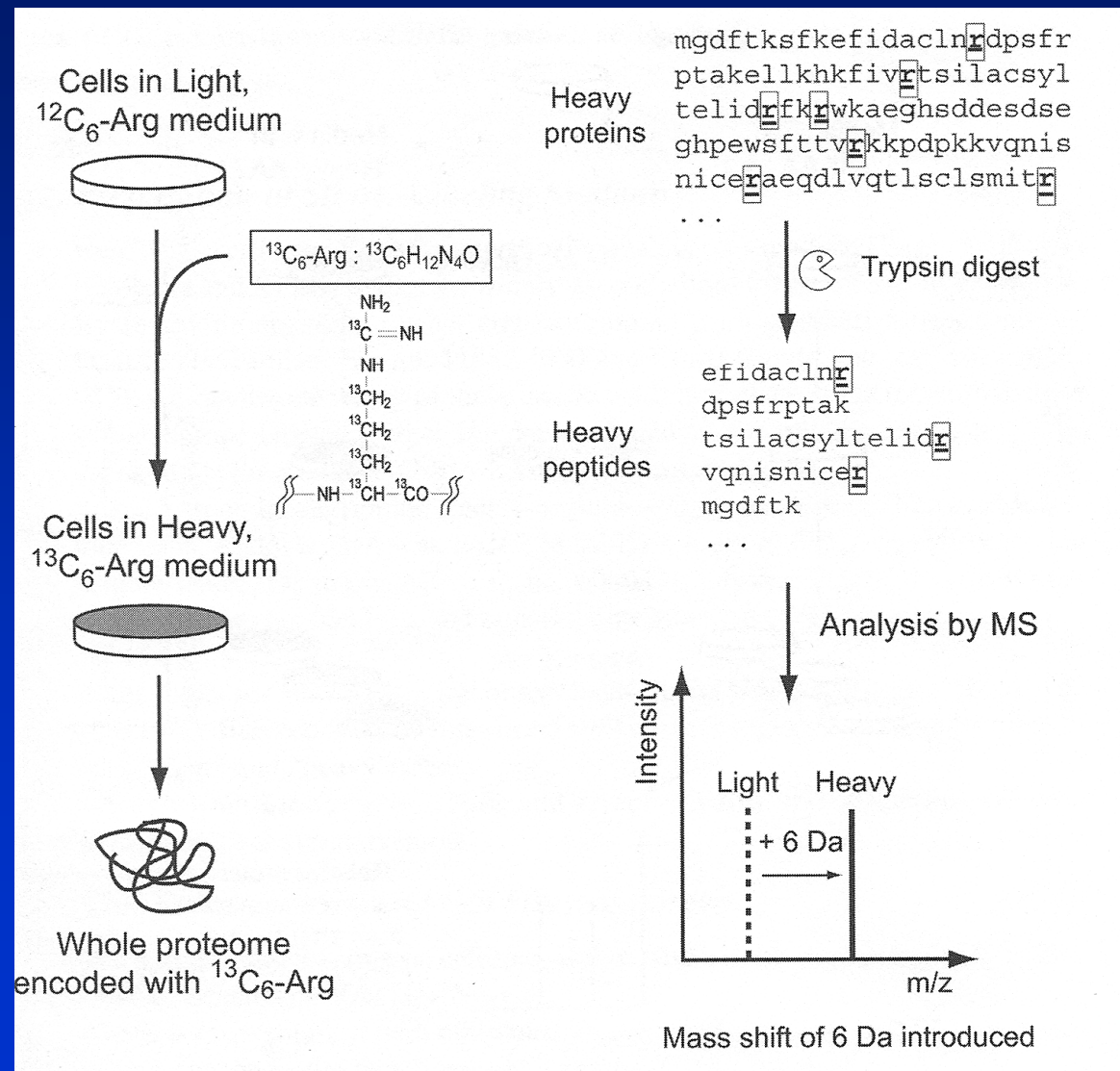
Identifikace proteinů=problém!

kombinací separačních přístupů a externího MS/MS- zdlouhavá, často se nedaří. Je třeba mít štěstí

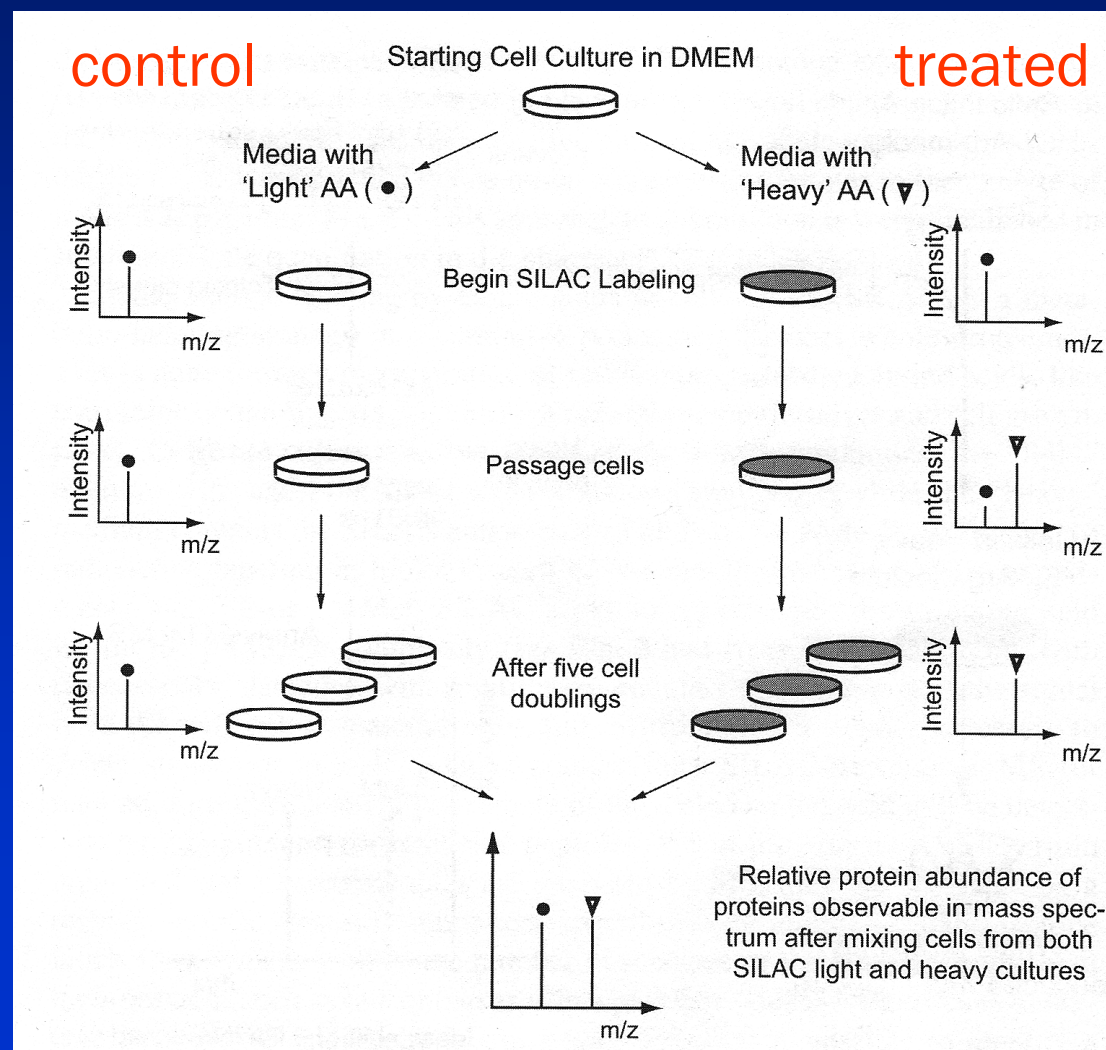
Kvantifikace s použitím SILAC značení

SILAC=
Stable isotope labeling
by amino acids
in cell culture

Značené AK k dispozici:
Lys, Arg



Kvantifikace s použitím SILAC značení



iTRAQ – 2DLC-MS/MS

iTRAQ = Isobaric tags for relative and absolute quantitation

Postup:

- Příprava vzorku (např. 0.1% SDS) – až 8 kvantitativně srovnávaných vzorků v 1 analýze
- Redukce a alkylace
- Digesce trypsinem
- Značení (iTRAQ značky: 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121)
- Smíchání 8 značených digestů
- Separace peptidů (SCX, IPG, ZIC-HILIC, ...)
- Kvantifikace a identifikace proteinů (LC-MS/MS nebo MALDI-MS/MS)

iTRAQ – 2DLC-MS/MS

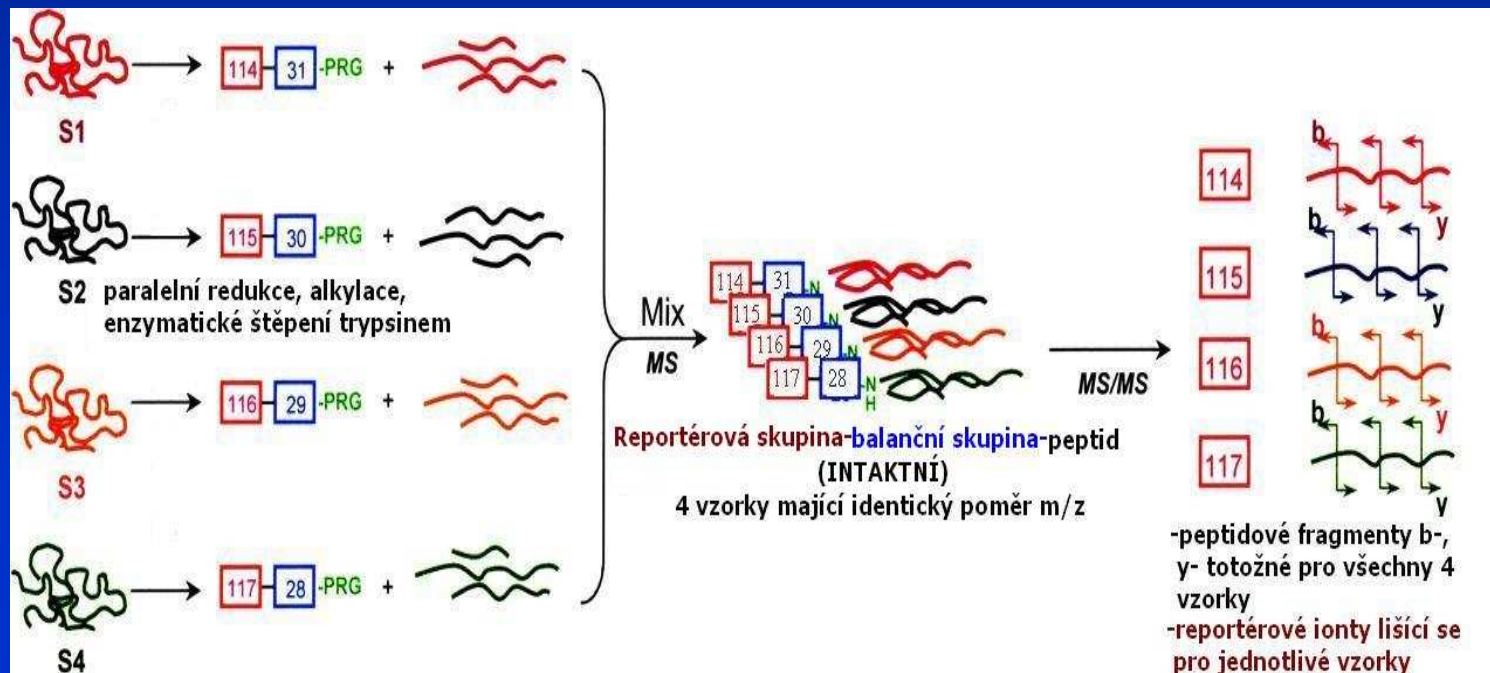
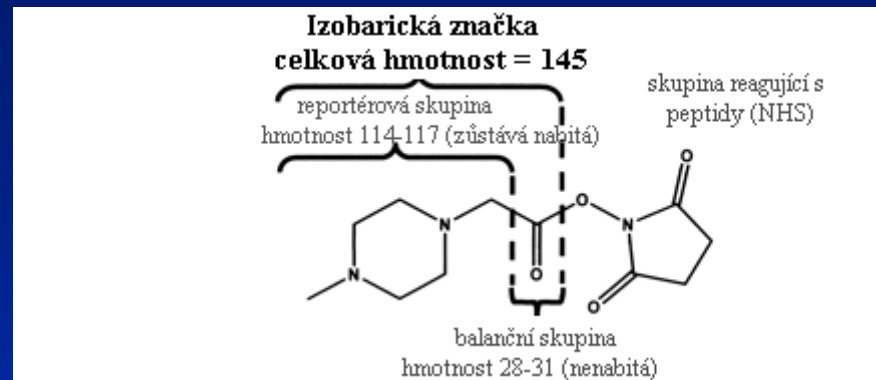
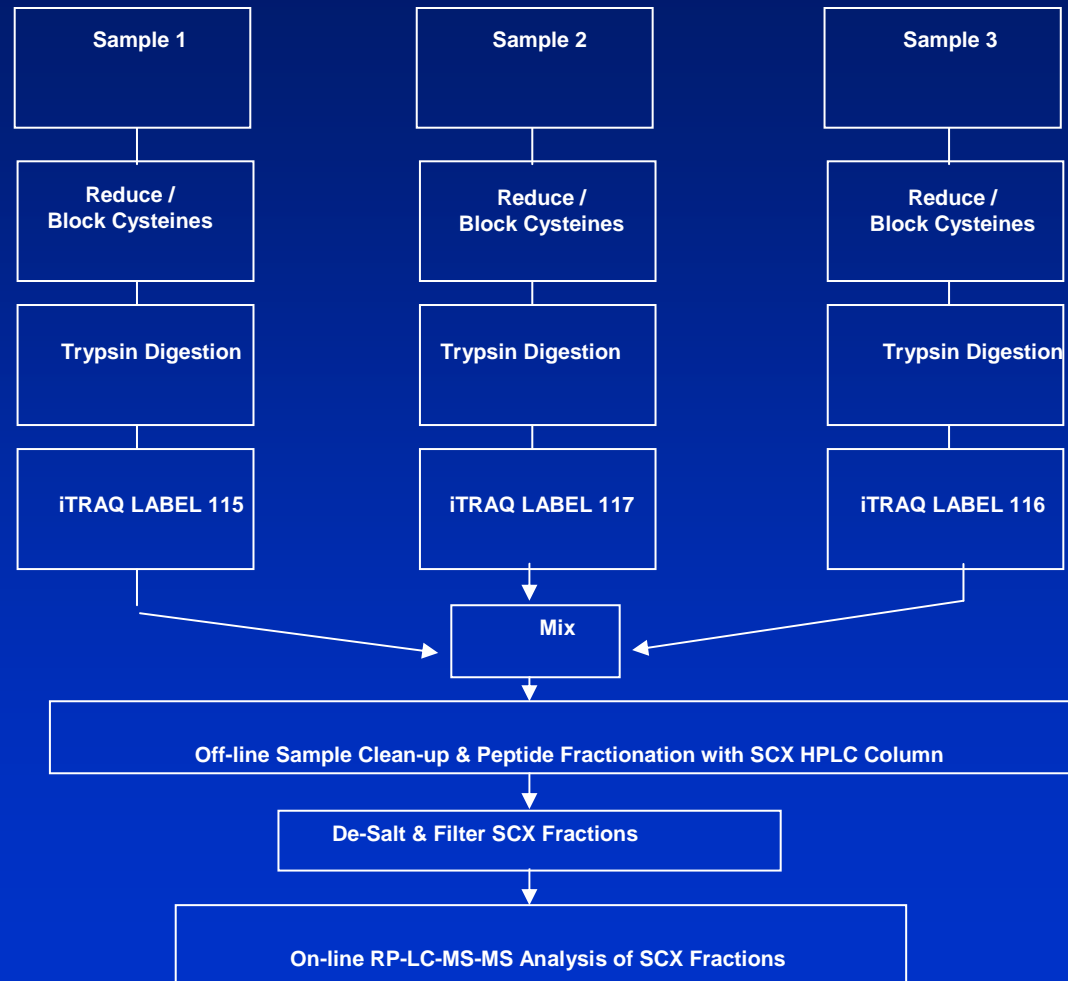
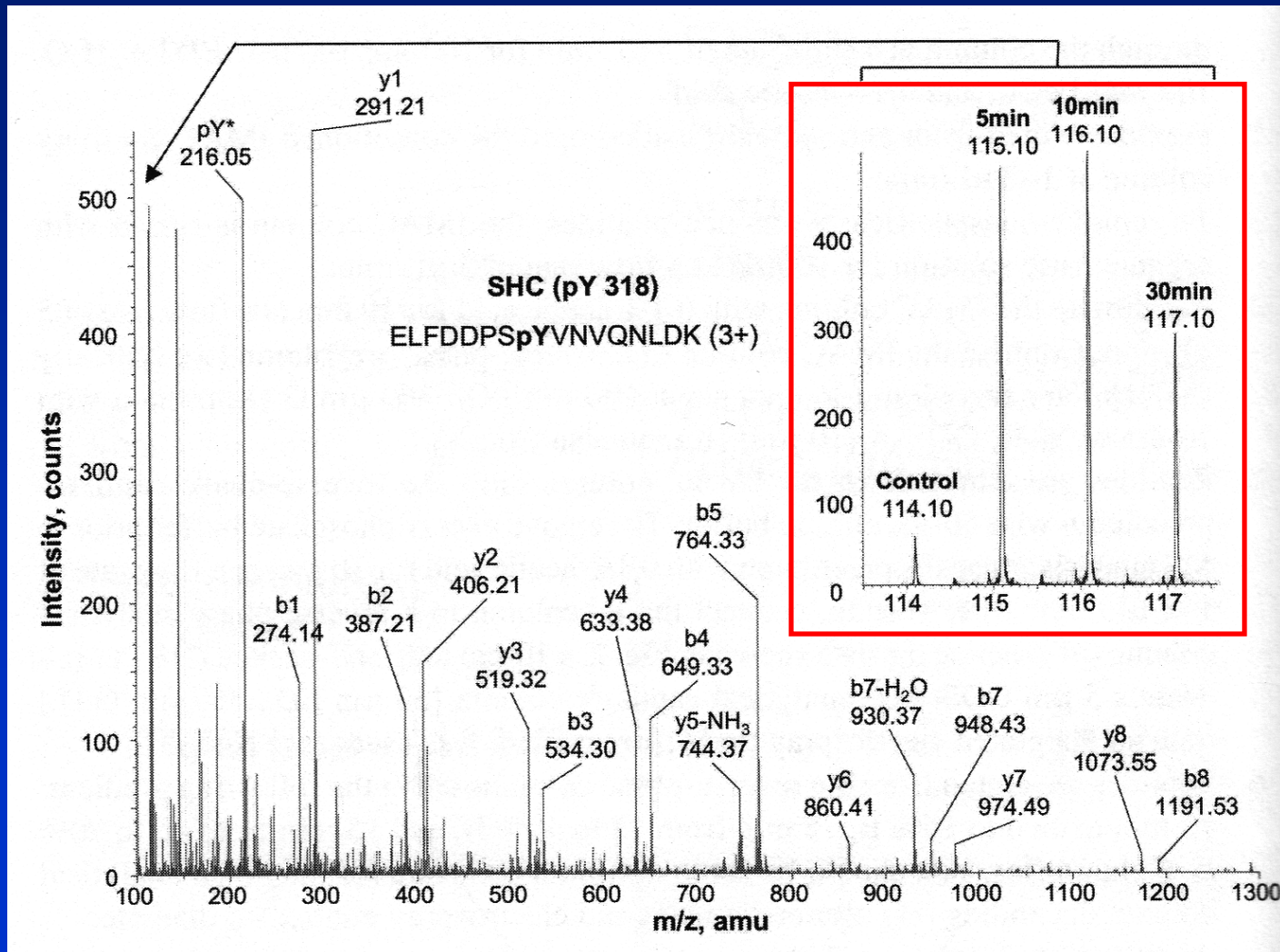


Schéma typického iTRAQ – 2DLC-MS/MS experimentu (zde 3-plex, nyní je možný až 8-plex)



MS/MS spektrum s iTRAQ reportérovými ionty



MRM a „targeted proteomics“

- MRM=multiple reaction monitoring (=SRM=selected reaction monitoring)
- Metoda kvantifikace peptidů z vybraného proteinu na základě tzv. přechodů (transitions)
- Metoda vysoce selektivní, citlivá, používaná v analýze nízkomolekulárních látek
- Velký potenciál pro validaci výsledků z proteomických studií jako „HMOTNOSTNĚ-SPEKTROMETRICKÝ WESTERN BLOT“ – místo přípravy protilátky by mohl stačit návrh „přechodu“ pomocí software
- Uvádí se teprve do praxe

Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie

- FT-ICR

Fourier-transform ion cyclotron resonance

- Orbitrap

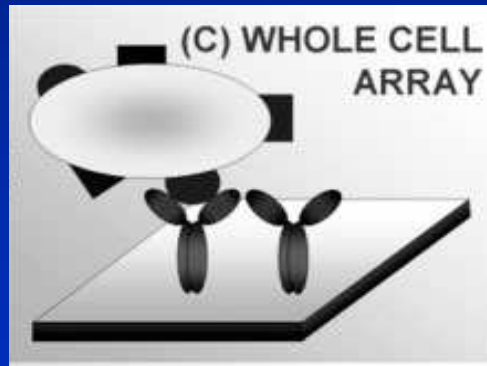
Základní výhoda-

-vysoké rozlišení, díky

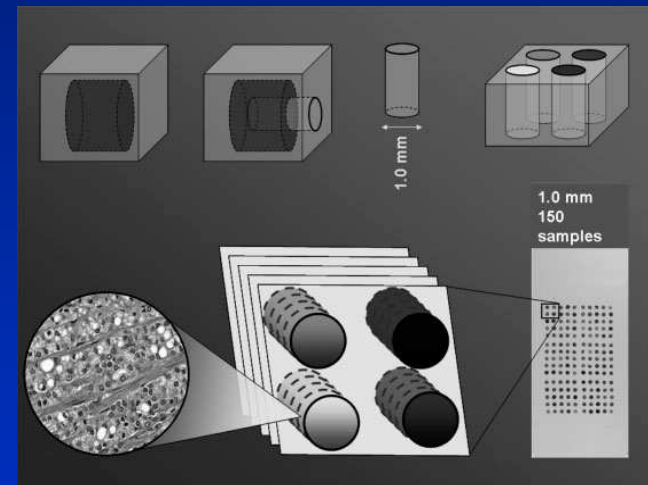
tomu možnost přesné identifikace proteinů



Protilátkové arrays



Cell array



Tissue array
(imunohistochemie)

Srovnání proteomických metod: Výhody a nevýhody

2-DE

SELDI SILAC iTRAQ-2DLC-MS/MS

MRM

+

-

Jak správně naplánovat proteomický experiment v experimentální onkologii

Jaký biologický materiál analyzovat?

- Modelové systémy - buněčné linie
- Tkáně
- Buňky mikodisekované z tkání (LCM – laser captured microdissection)
- Kostní dřeň – leukémie
- Plasma – sérum



Vzorky od pacientů - etická pravidla!!

Statistika

- Při srovnání exprese nutnost paralelní analýzy **minimálně 3+3 replikátů (analytické vs. biologické replikáty)**
- **Normalizace** dat
- Kvantitativně vs. statisticky významný rozdíl: **>2x vs. p-hodnota** (Student t-test, Mann-Whitney test);
- **Korelační analýza** – nutno přizpůsobit design studie
- Korekce na **mnohonásobné testování** (FDR-korekce)
- při srovnávání více než 2 vzorků vhodná **konzultace se statistikem** – často nutnost aplikace pokročilých statistických metod
- Analyzujeme-li vzorky pacientů, soubor musí být dostatečně reprezentativní a klinicky (patologicky) charakterizovaný – **spolupráce s patologem, s lékaři**

Validace dat na dalších biologických úrovních

Screeningové metody:

- 2-DE, iTRAQ-2DLC-MS/MS, SELDI-TOF

Validační metody na proteinové úrovni:

- western blotting, MRM

Validační metody na úrovni mRNA:

- qRT-PCR, (expresní čipy)

Validační metoda na proteinové úrovni – tkáňové řezy:

- Imunohistochemie !!

Problematické skupiny proteinů (2-DE): Extrémně bazické, kyselé, nízko- a vysokomolekulární proteiny

Bazické proteiny (pH > 7) hledat na bazickém gradientu (např. 6-11). V bazické oblasti širokého gradientu pH 3-10 bývá špatné rozlišení. Použít redukční činidlo DeStreak.

Kyselé proteiny: pH gradienty v kyselé oblasti jsou ve vývoji

Pro nízkomolekulární proteiny (<15 kDa) použít ~16% SDS-PAGE + tricinový pufrový systém ve 2.rozměru

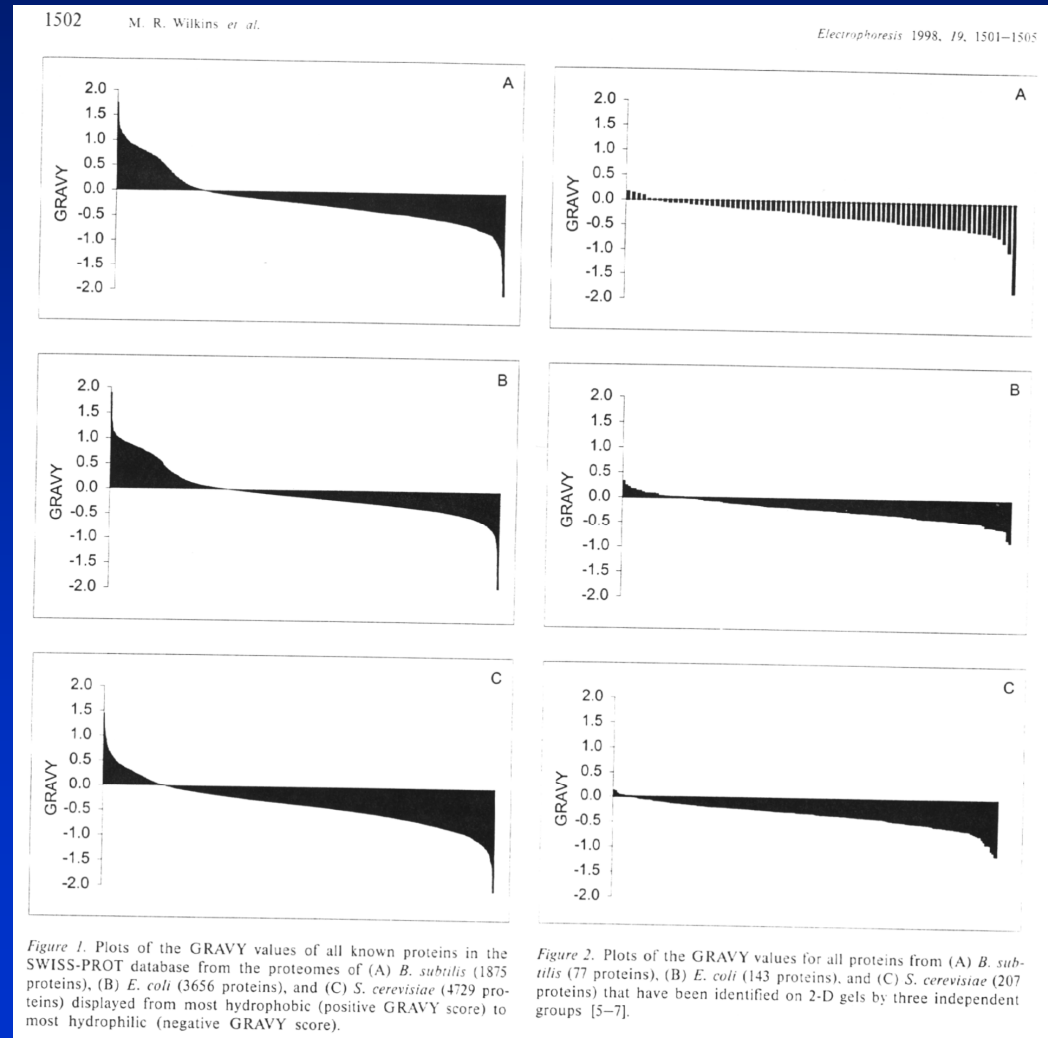
Vysokomolekulární proteiny (>120 kDa): obecně problém, zkusit použít 8 % SDS-PAGE či gradientovou SDS-PAGE ve 2.rozměru

Hydrofobní a membránové proteiny

Jejich nalezení
závisí na

1. úspěšnosti
extrakce z biol.
materiálu
2. použité separační
metodě

TMHMM-transmembrane
hidden Markov model



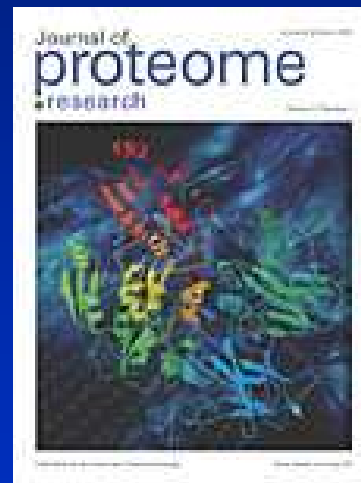
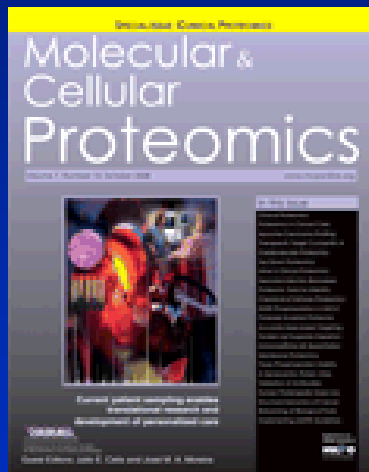
Dynamický rozsah koncentrací proteinů

- Jednotlivé proteiny v celobuněčném vzorku se liší až o 12 řádů v rozsahu koncentrací
- Více koncentrované proteiny zákonitě překrývají ty méně koncentrované
- Málo koncentrované proteiny jsou pod limitem detekce

Náznak řešení:

- Prefrakcionace
- Odstranění nejkonzentrovanejších proteinů (např. albuminu a dalších z krevní plasmy)
- Použití imunochemické detekce
- Kvantifikace na úrovni transkriptu

Další zdroje informací – reviews v předních světových časopisech



+ Quantitative Proteomics by Mass Spectrometry. Methods in Molecular Biology series, No.359, Sechi, S. (Ed.). Humana Press 2007