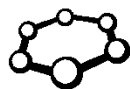




Oddělení funkční genomiky a proteomiky

Národní centrum pro výzkum biomolekul

Přírodovědecká fakulta MU



CEITEC



Charakterizace proteinů hmotnostní spektrometrií

C7250

Část V

Zbyněk Zdráhal

Výzkumná skupina Proteomika, CEITEC-MU

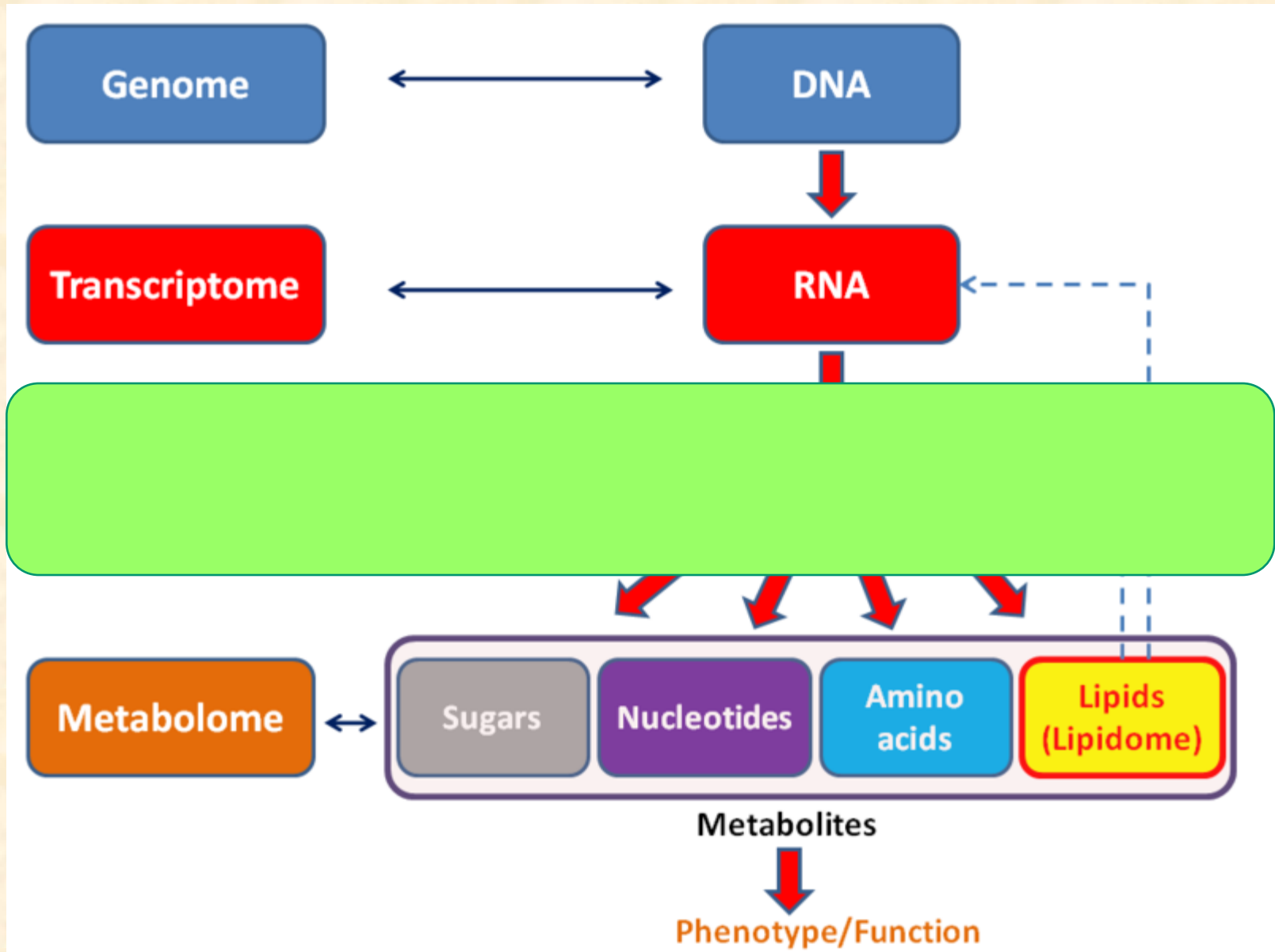
Centrální laboratoř-Proteomika, CEITEC-MU

Funkční genomika a proteomika, NCBR PŘF

zdrahal@sci.muni.cz



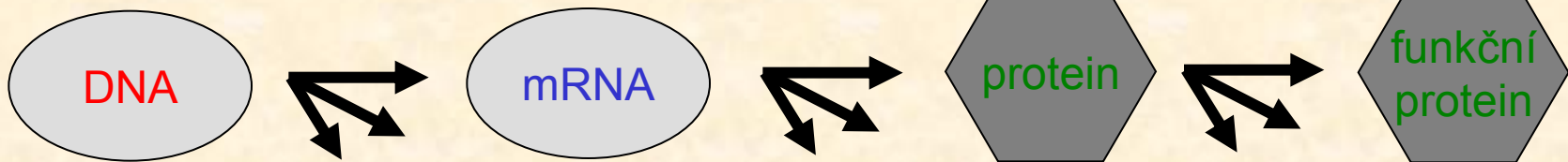
Proteomické aplikace MS



Proteomika – disciplína zabývající se analýzou proteomu

co se může stát

co se opravdu děje



transkripce
 posttranskripční úpravy
 (alternativní sestřih aj.)

translace

Posttranslační úpravy
 posttranslační modifikace
 (fosforylace, glykosylace aj.)

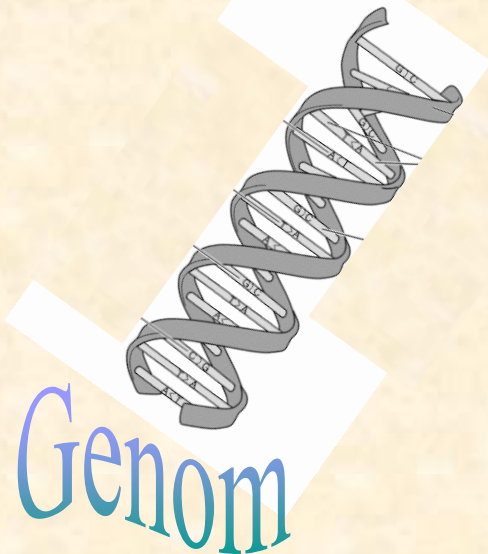
Proteinové komplexy

Proteomika - Proč?

- z každého genu může vzniknout několik proteinů, resp. jejich forem, které nelze indikovat na základě analýzy DNA resp. mRNA
- neexistuje přímá korelace mezi obsahem mRNA a výsledným obsahem proteinů
- funkční význam proteinu závisí velmi často na jeho interakci s jinými proteiny či DNA/RNA
- na úrovni proteinů lze zachytit epigenetické faktory regulace exprese genu



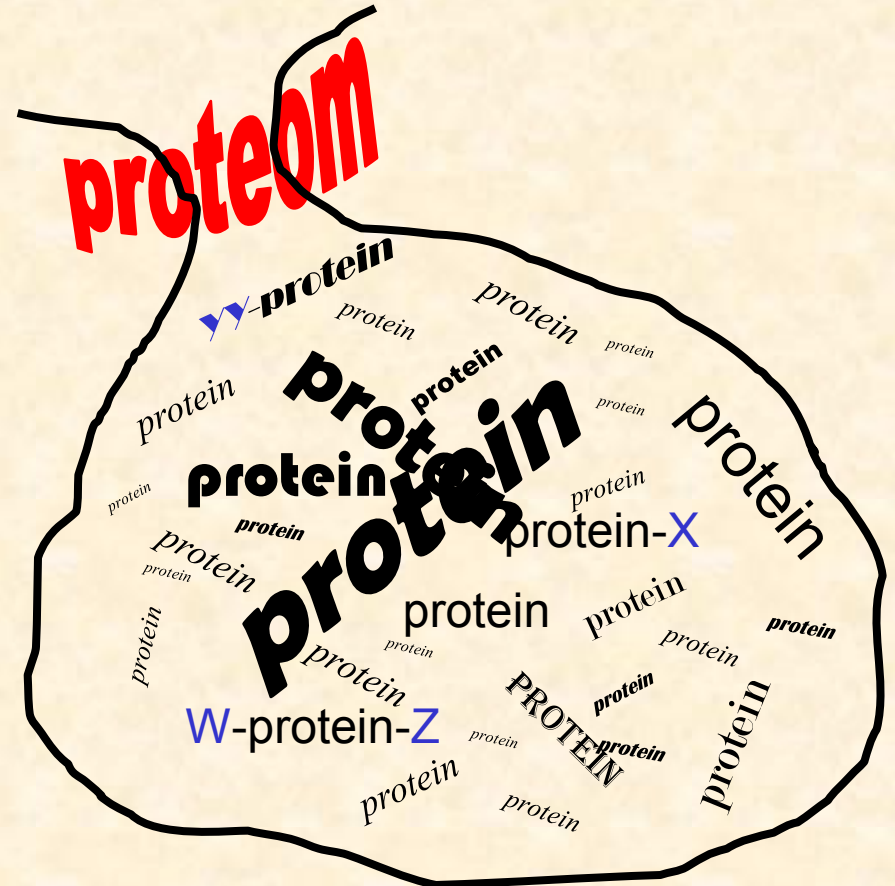
The Desperate Man, Gustave Courbet, 1844-45



X

Analýza proteomu

charakterizace všech proteinů
včetně všech jejich forem v buňce
(tkáni, organismu) v daném čase
za daných podmínek



Genom

versus

Proteom

relativně stabilní
sekvence DNA

soubor proteinů v buňce v
daném stavu a čase, včetně
jejich posttranslačních

NCBI nr 20081017	7 124 886 sequences	(2 457 960 432 residues)
NCBI nr 20151125	77 306 371 sequences	(28 104 191 422 residues)
NCBI nr 20171125	135 744 157 sequences	(49 805 139 192 residues)

zavedeny (PCR)

citlivých a spolehlivých technik
k identifikaci a kvantifikaci

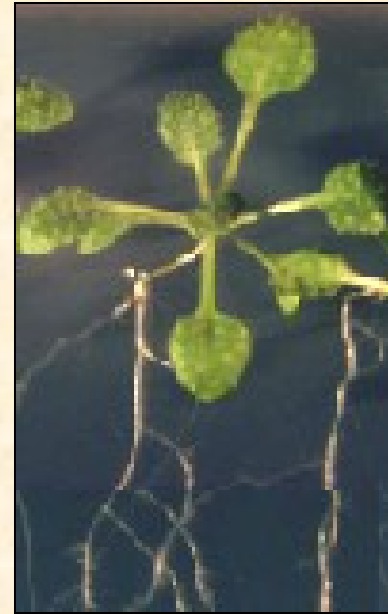
Počet organismů	31.12. 02	2.6. 04	9.10. 06	17.10. 08	7.12. 12	7.12. 15
Genom hotov	116	192	431	862	3995	7747
Genom započat	586	906	1748	2371	15018	33572
	702	822	2179	3233	19013	41319

zdroj: <http://www.genomesonline.org/>

Arabidopsis thaliana



Huseníček rolní



Genom 0.135×10^9 bp, ~ 27 000 genů



32 000 proteinů

člověk - genom 3.3×10^9 bp, ~ 21 000 genů

<http://www.uniprot.org/taxonomy/complete-proteomes>

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/G/GenomeSizes.html>

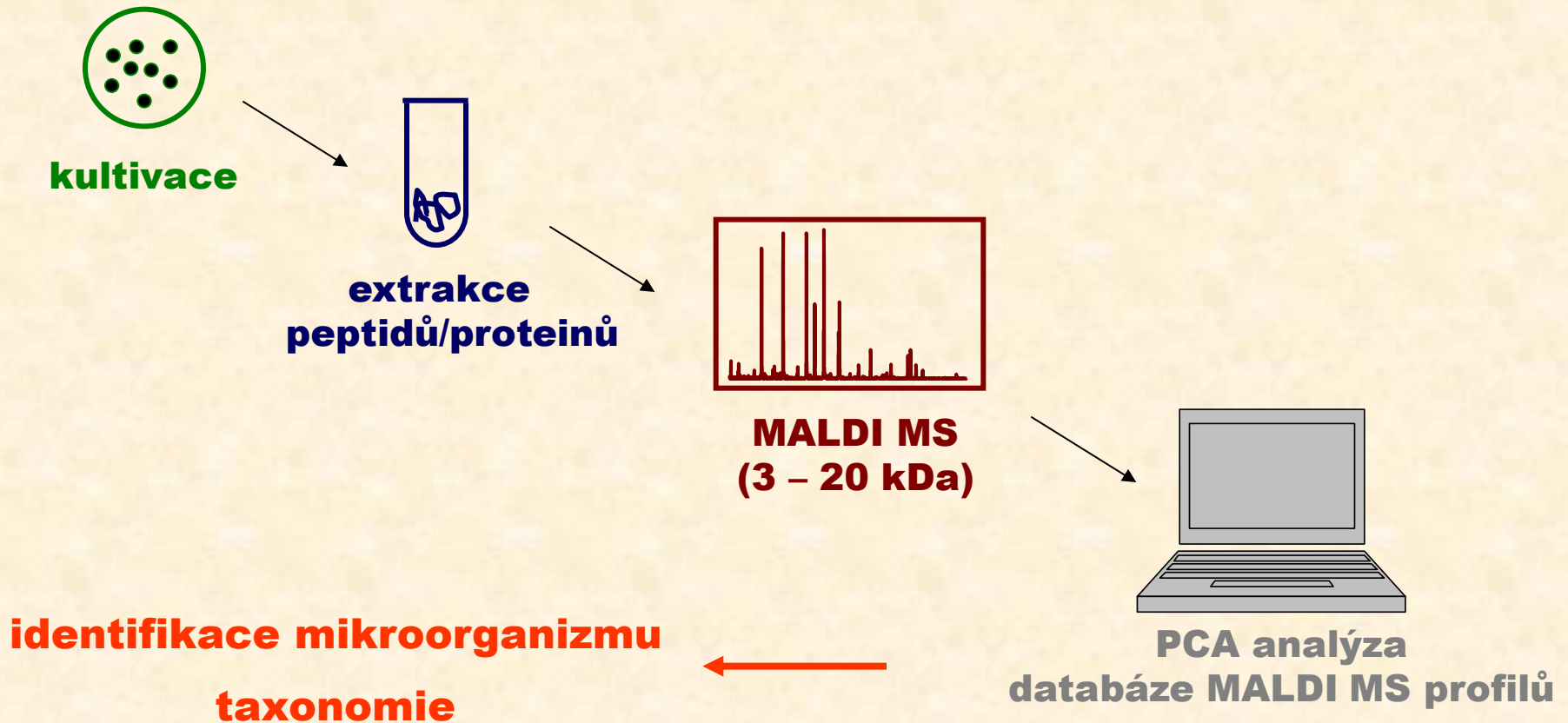
V tomto okrese je
EVOLUCE
PŘÍSNĚ
ZAKÁZÁNA
Vyhláška č. 8



FR

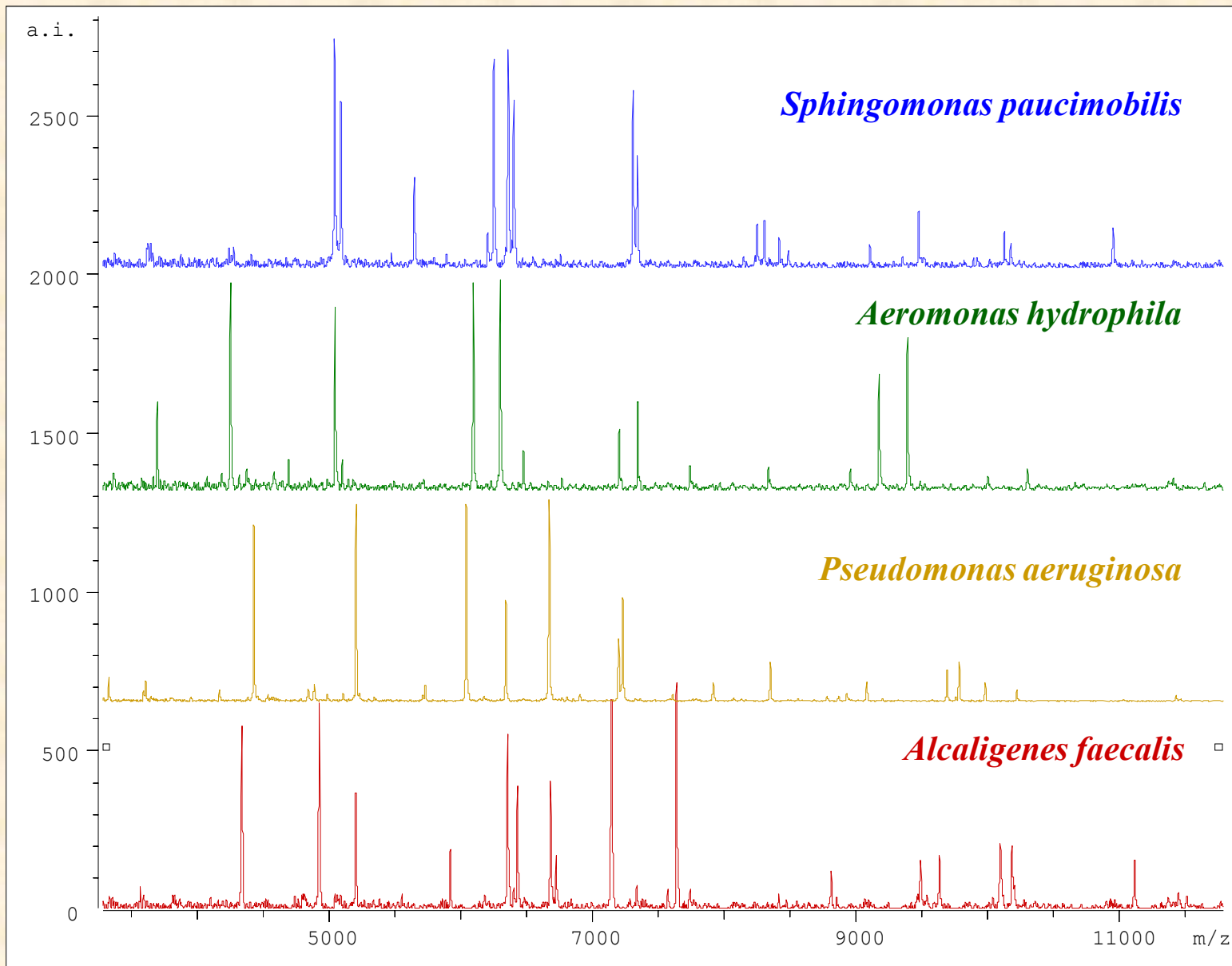
Analýza MS profilů

Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-MS



MALDI-MS spektra (profily) vybraných bakterií











C7250



Grafické vyjádření podobnosti MALDI-MS profilů bakterií

Staphylococcus saprophyticus CCM 3317 CCM

identifikace na základě srovnání naměřeného profilu s profilem z databáze

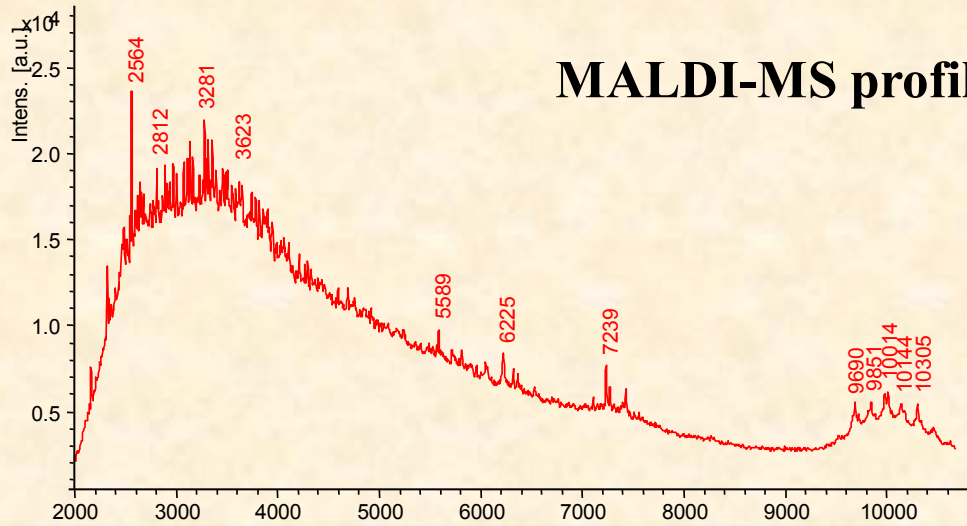
Detected Species	Lo...
 Brachyspira murdochii DSM 12563T DSM	2.267
 Azoarcus indigens VB32 MPB	1.164
 Paenibacillus polymyxa DSM 741 DSM	1.127
 Lactobacillus antri DSM 16041T DSM	1.122
 Sphingobacterium spiritivorum DSM 11722T HAM	1.070
 Staphylococcus schleiferi ssp schleiferi DSM 4809 ...	1.068
 Azoarcus sp BH72 MPB	1.053
 Acidovorax avenae ssp avenae DSM 7227T HAM	1.018
 Streptococcus salivarius IBS_MS_23 IBS	1.009
 Bacteroides fragilis MB_9009_05 THL	1.006

 **uznaná metoda v klinické praxi**

Campylobacter fetus subsp fetus CCM 5683 CCM

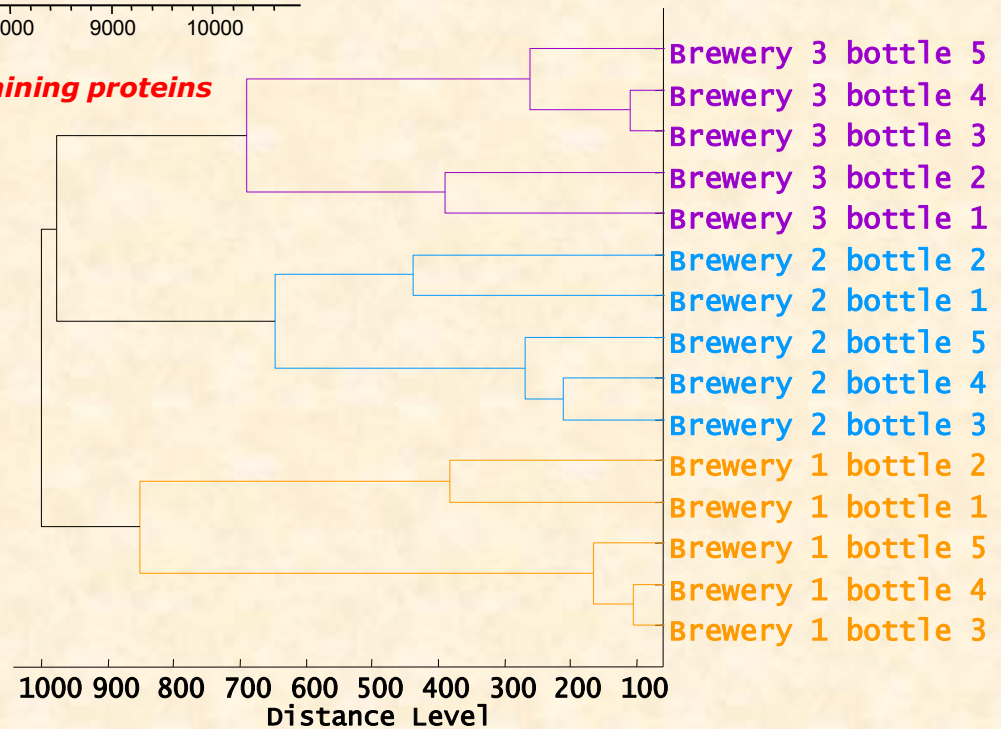
1000 900 800 700 600 500 400 300 200 100 0
Distance Level

MALDI-MS profilování piva

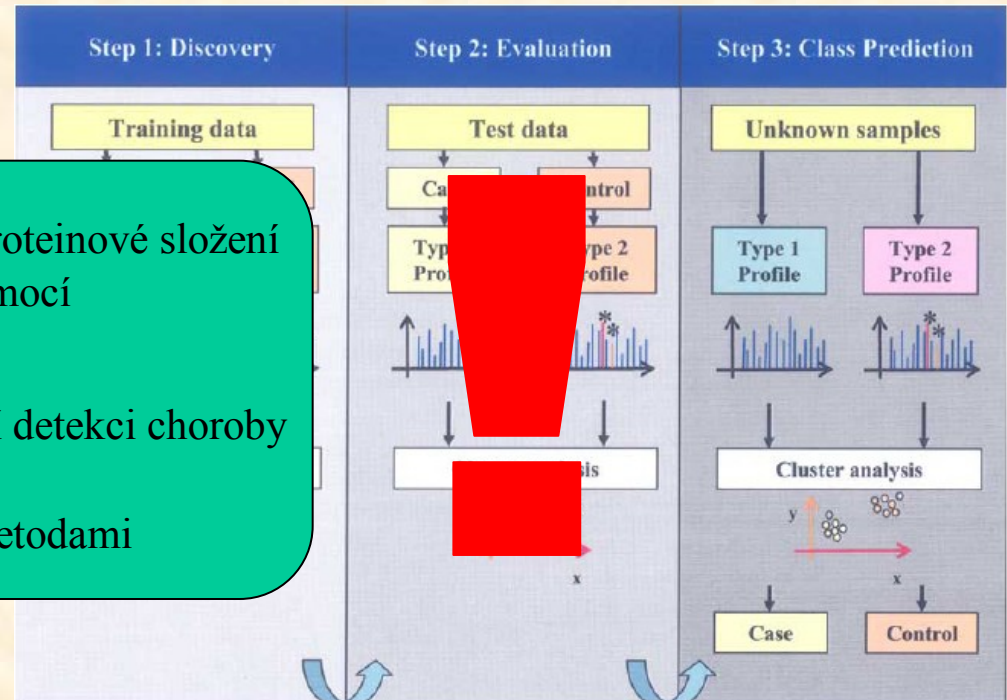
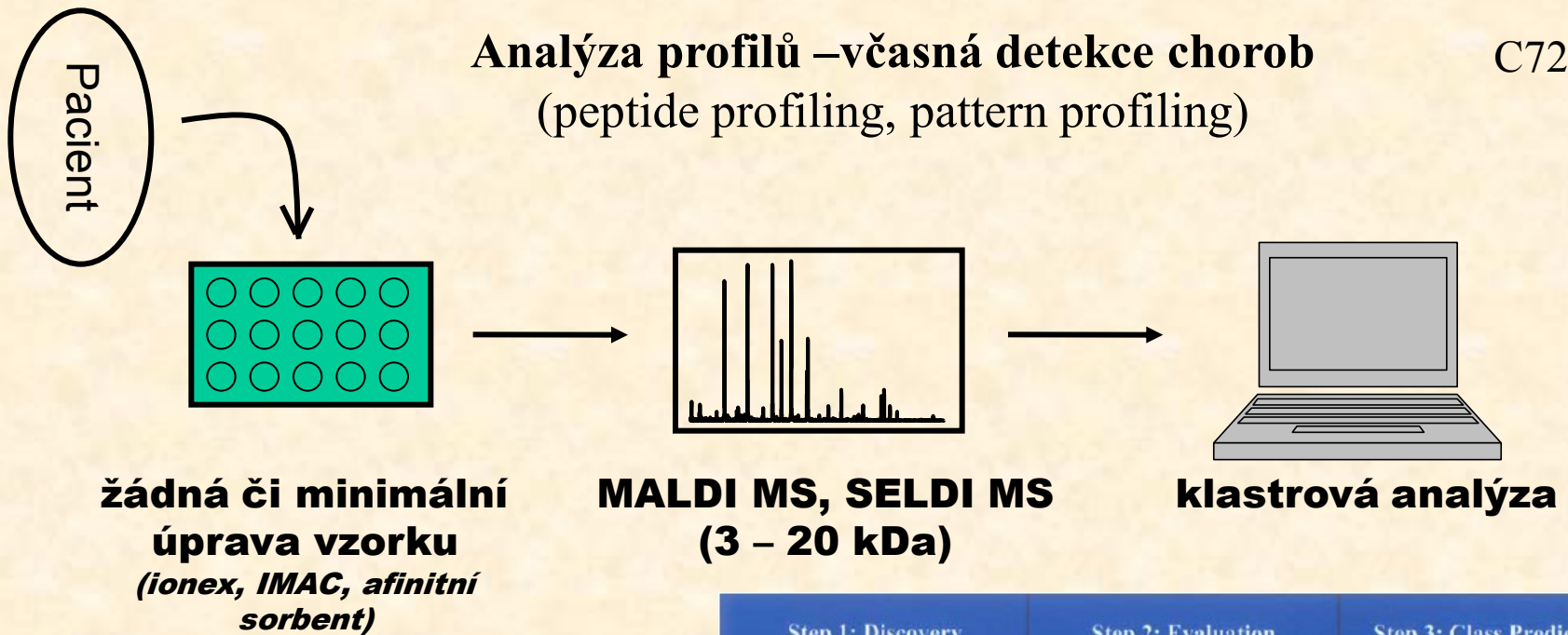


MALDI-TOF MS fingerprint containing proteins

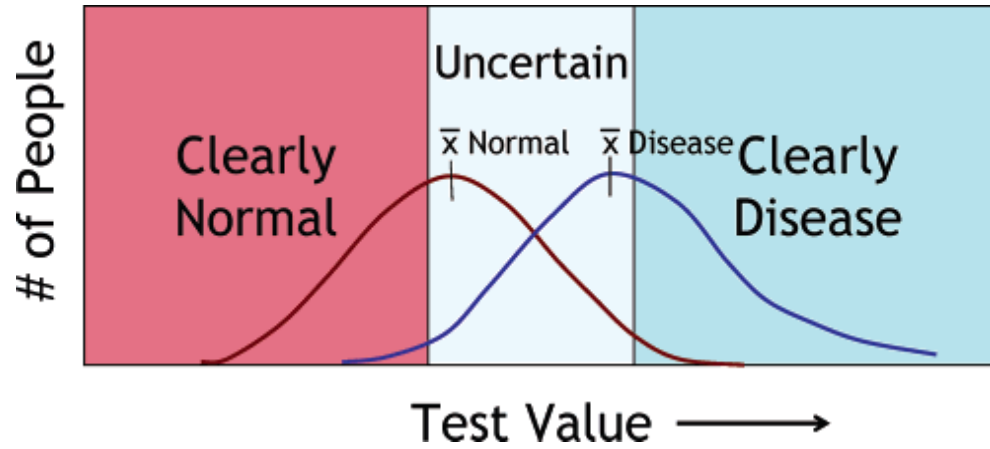
spolupráce s FCH VUT Brno
prof. Márová



Analýza profilů –včasná detekce chorob (peptide profiling, pattern profiling)



- velké množství faktorů ovlivňujících proteinové složení nesouvisejících s diagnostikovanou nemocí
velká variabilita profilů
- nastavení limitů pro pozitivní/negativní detekci choroby
- kombinace s dalšími diagnostickými metodami



J. LaBaer et al., J. Proteome Res., 4 (4) 1053-1059 (2005).



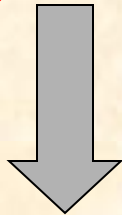
M. Ehmman et al., Pancreas, 34 (2) 205-214 (2007).

Využití MS pro vyhledávání biomarkerů

přímá MS analýza vzorků
(MALDI MS, SELDI MS)

Pattern profiling

srovnávání peptidového (proteinového)
složení vzorku „zdravého“ a nemocného
(bez identifikace, statistická analýza)



včasná diagnostika chorob

specifita biomarkeru !!!

Identifikace biomarkerů

Separace
GE, LC

srovnávání peptidového (proteinového)
složení vzorku „zdravého“ a nemocného

MS
MS/MS

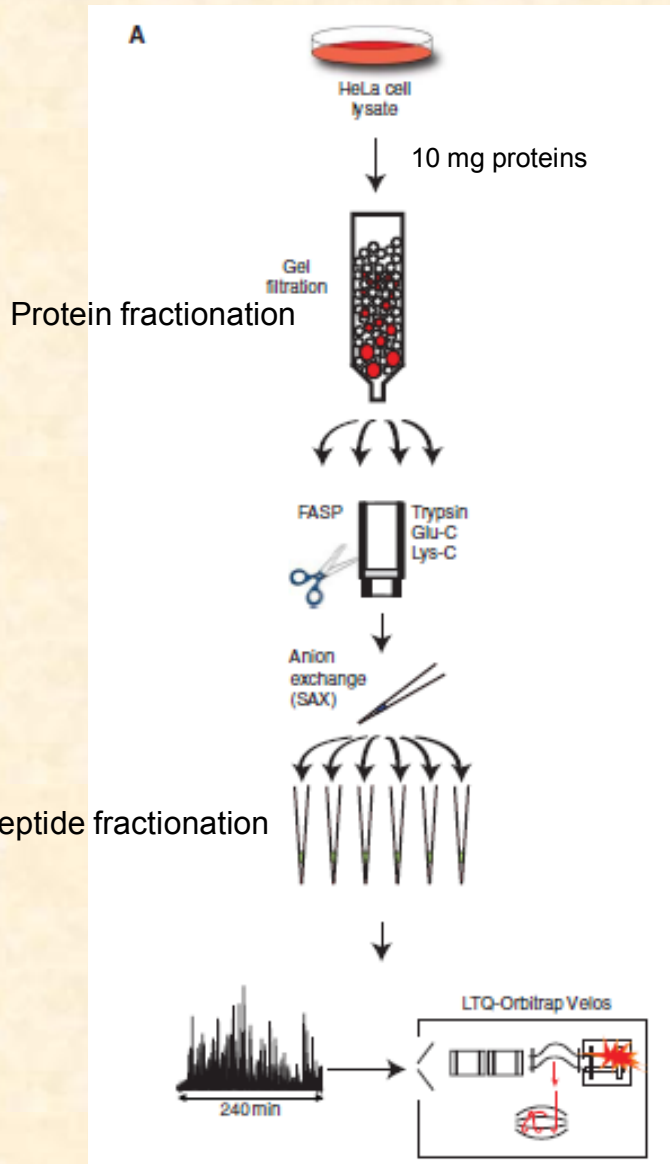
identifikace rozdílových proteinů



specifická protilátka
Imunodetekce
SRM, SWATH/Protein arrays



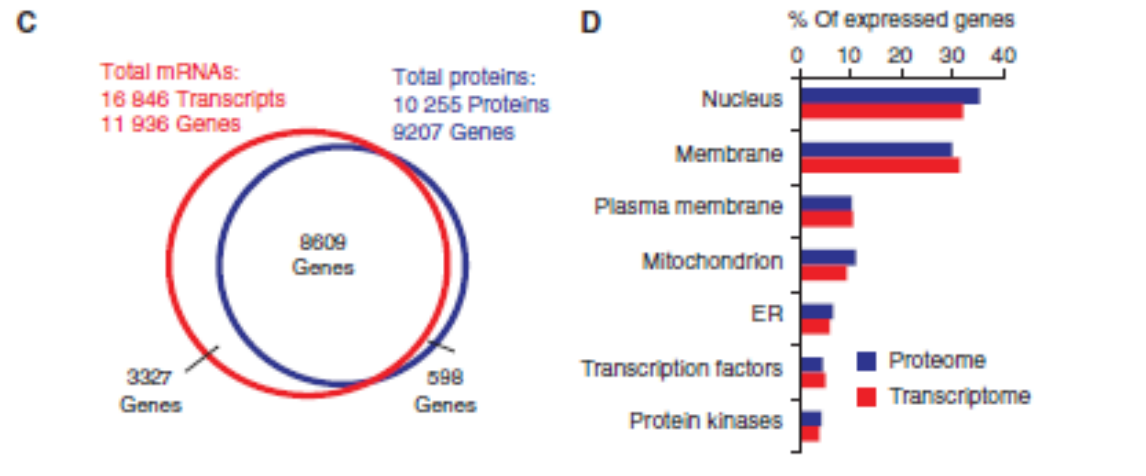
Comparison of human cancer cell line proteome and transcriptome



B

Experiment	Proteins	Peptides	MS measurement time
Exp 1	10 596	187 006	21 days
Exp 2	10 255	163 784	12 days

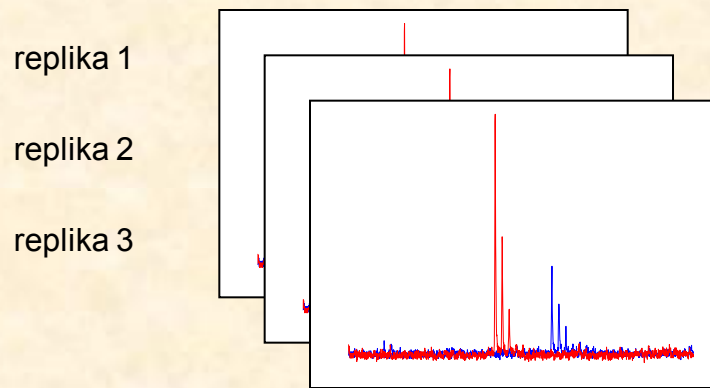
126 frakci
72 frakci



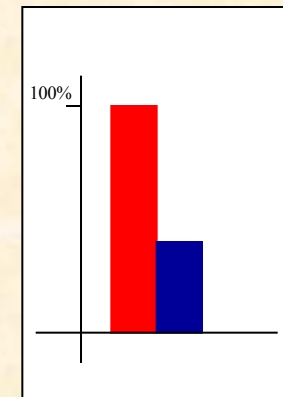


Relativní kvantifikace proteomu pomocí MS

- ☀ **Pomocí izotopických značek**
(srovnání omezeného počtu vzorků)



Kvantifikace proteinu



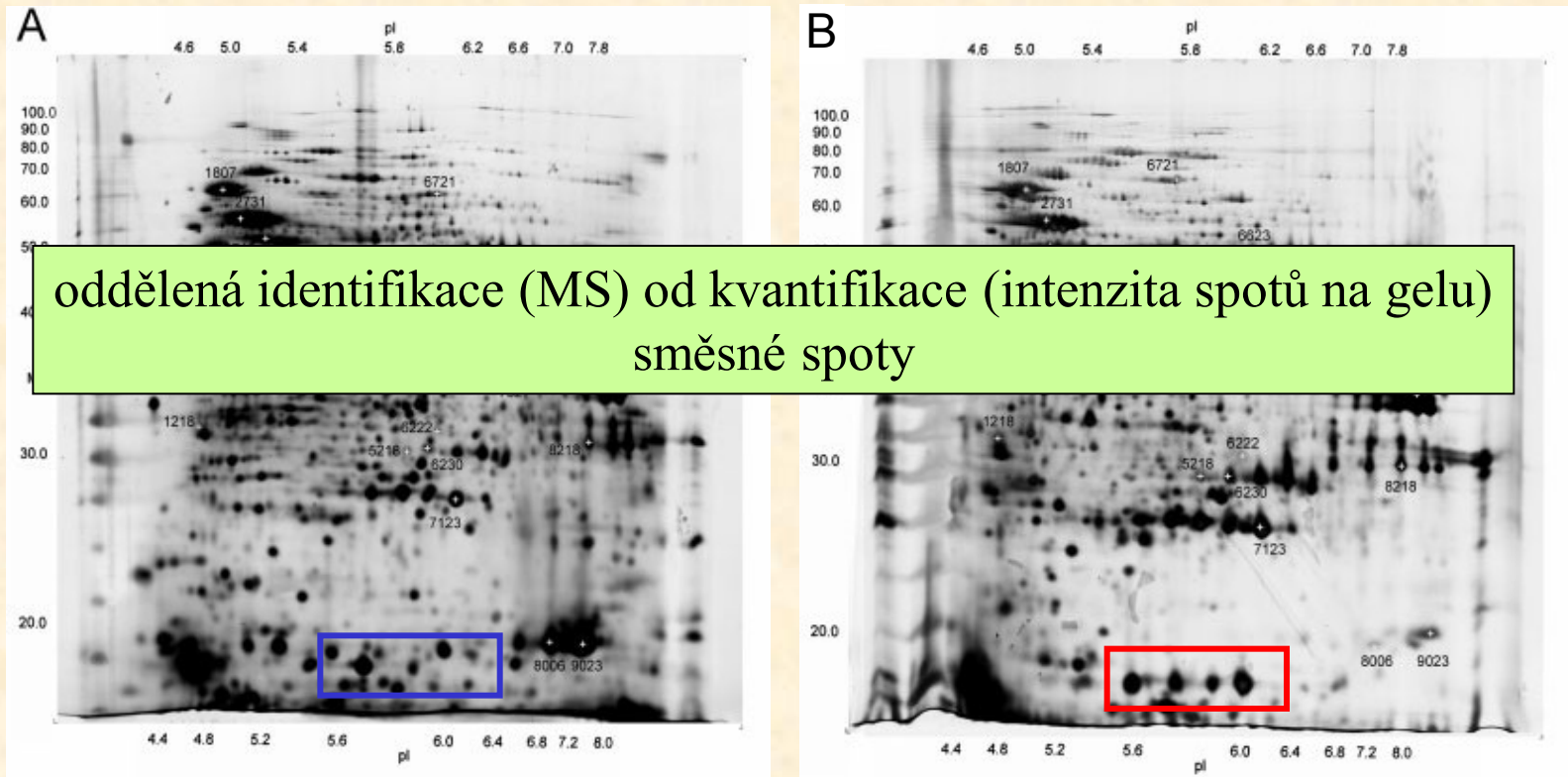
- ☀ **Pomocí „label-free“ přístupy**
(srovnání neomezeného počtu vzorků, menší přesnost)

Cílená kvantifikace vybraných proteinů pomocí MS

- ☀ MRM, SWATH

Charakterizace změn proteomu *diferenční proteomika*

analýza obrazu 2-D gelů
LC-MS/MS vybraných spotů s rozdílnou intenzitou



Acidithiobacillus ferrooxidans grown on ferrous iron (A) and elemental sulfur (B)

spolupráce s Ústavem biochemie PřF MU
P. Bouchal et al., *Proteomics* 2006, 6, 4278–4285.

Vyhledávání markerových proteinů u kuřat infikovaných salmonelou relativní kvantifikace



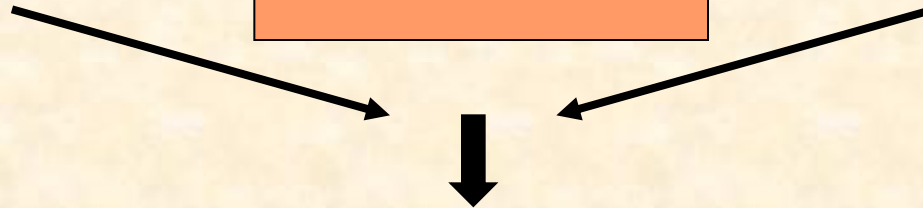
kontrola



po infekci



**vzorky stěny střeva
proteinové izoláty
digesce trypsinem
reduktivní alkylace**



**LC-MS/MS
data processing**

- identifikováno více než 2300 proteinů
- kvantifikační údaj pro více než 1900

Accession	Description	infikovaný/ kontrola
363741657	PREDICTED: syntenin-2-like [Gallus gallus]	41.032
118095649	objasnění molekulárních mechanismů nalezení markerových proteinů pro časnou diagnostiku	34.036
4927286		33.575
112491068		30.221
56118294		25.497
363741459		PREDICTED: protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E [Gallus gallus]



ověření pomocí real-time PCR

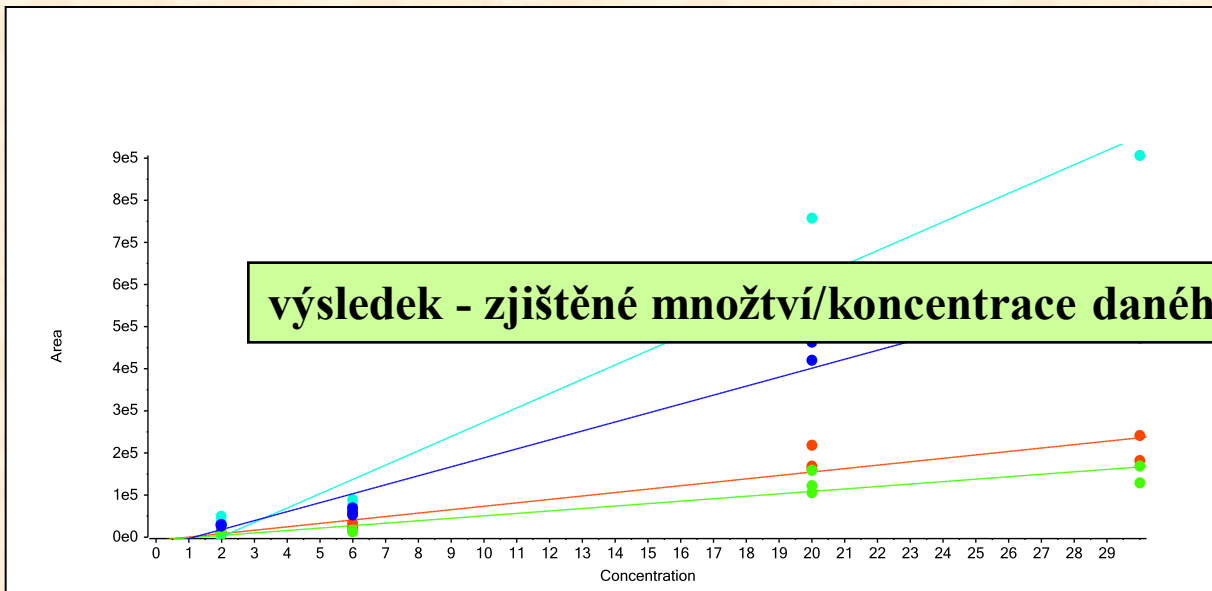
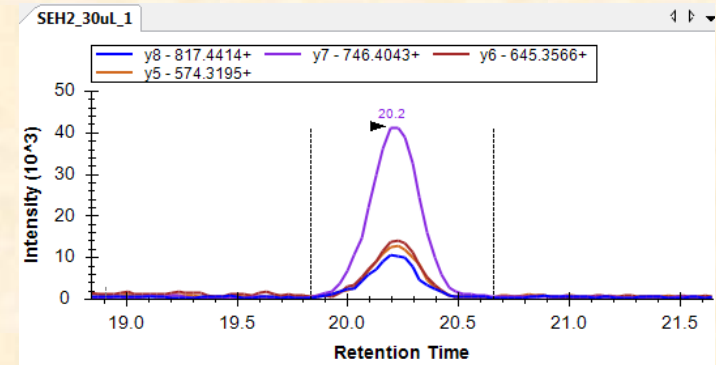
*spolupráce s VÚVet Brno
Matulova M. et al., Vet. Res., 44:37 (2013)*

Kvantifikace enterotoxinů

cílená analýza vybraného proteinu

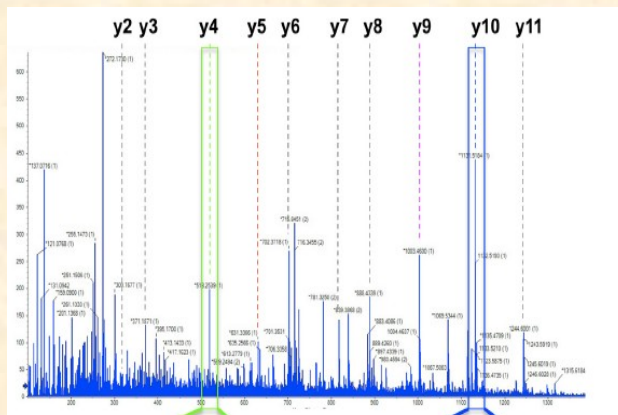
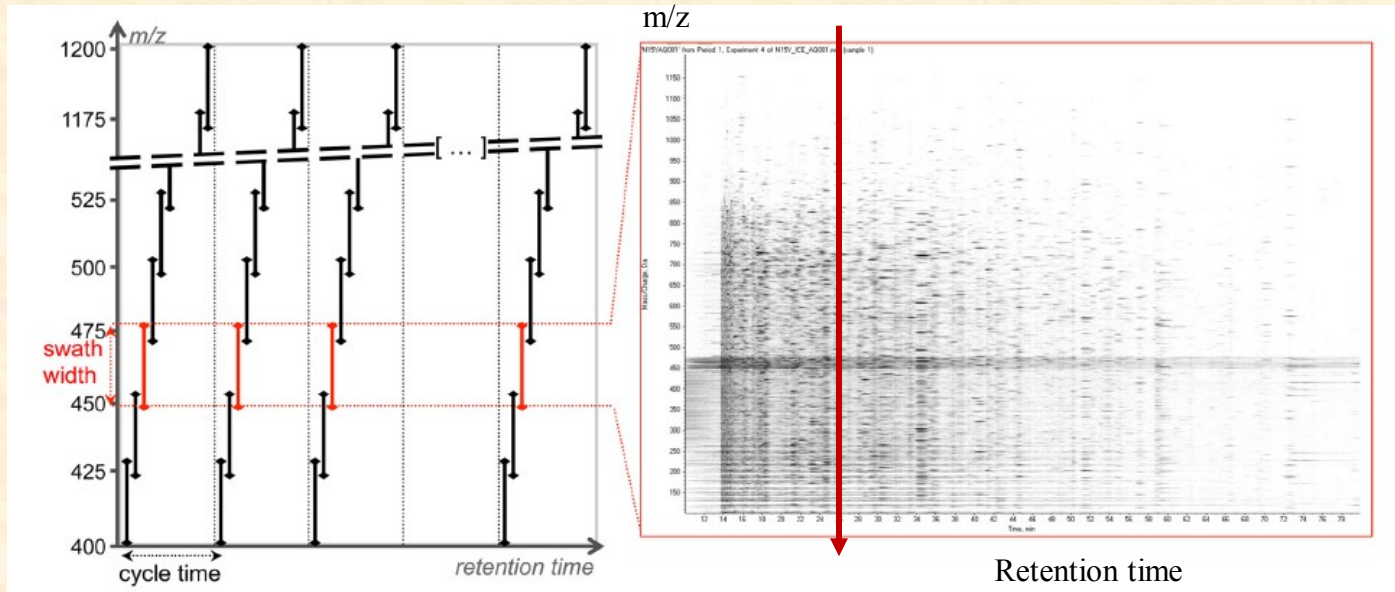
MRM

- výběr peptidů vhodných pro kvantifikaci
- absolutní kvantifikace pomocí AQUA peptidů



SWATH MS

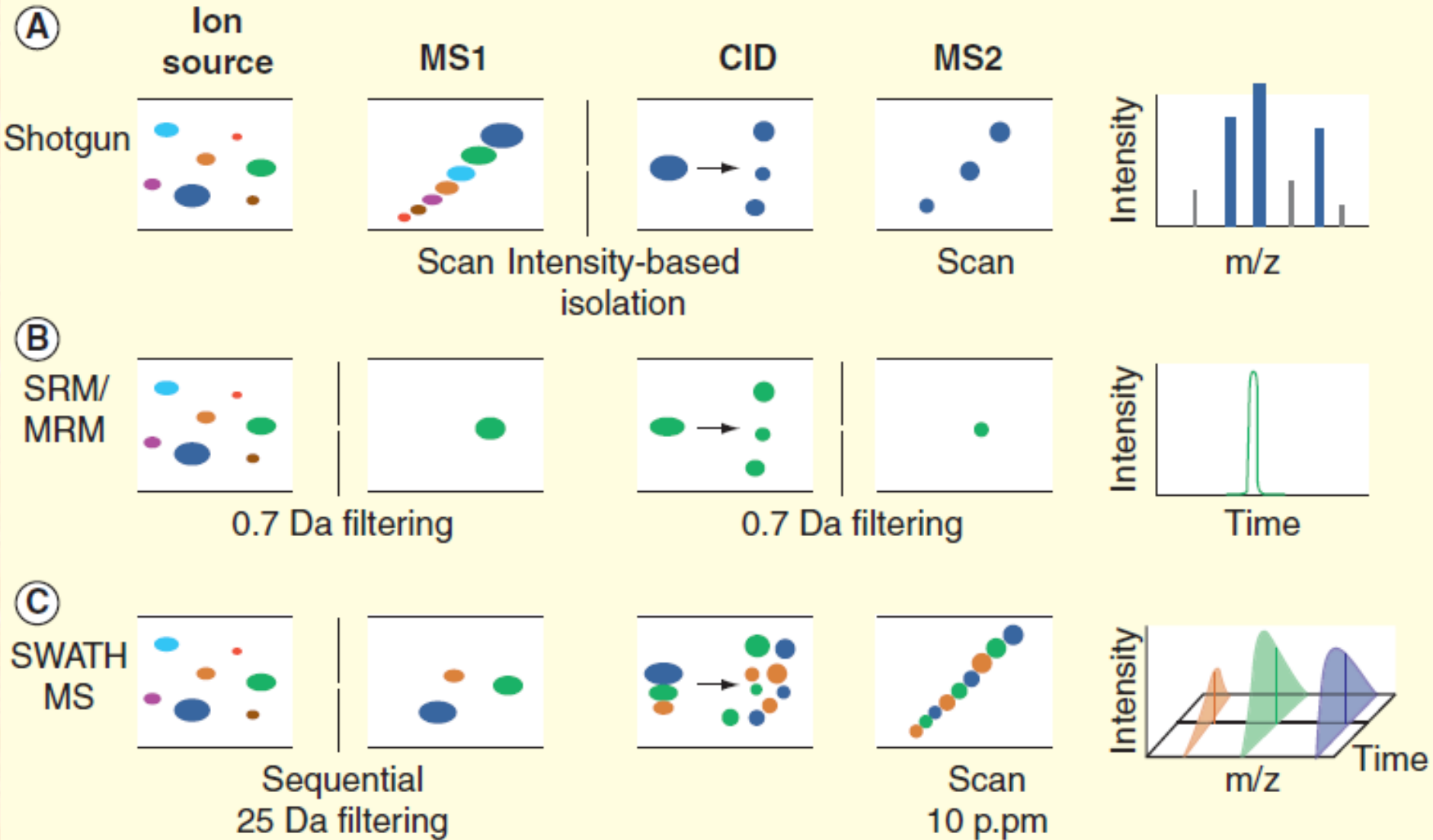
Q-TOF, MS/MS < 10 ppm



celé MS/MS spektrum

- 🌐 klasické DB prohledávání **nelze**
- 🌐 srovnání s knihovny ref. MS/MS spekter
- 🌐 Relativní i absolutní kvantifikace

Shotgun vs SRM vs SWATH



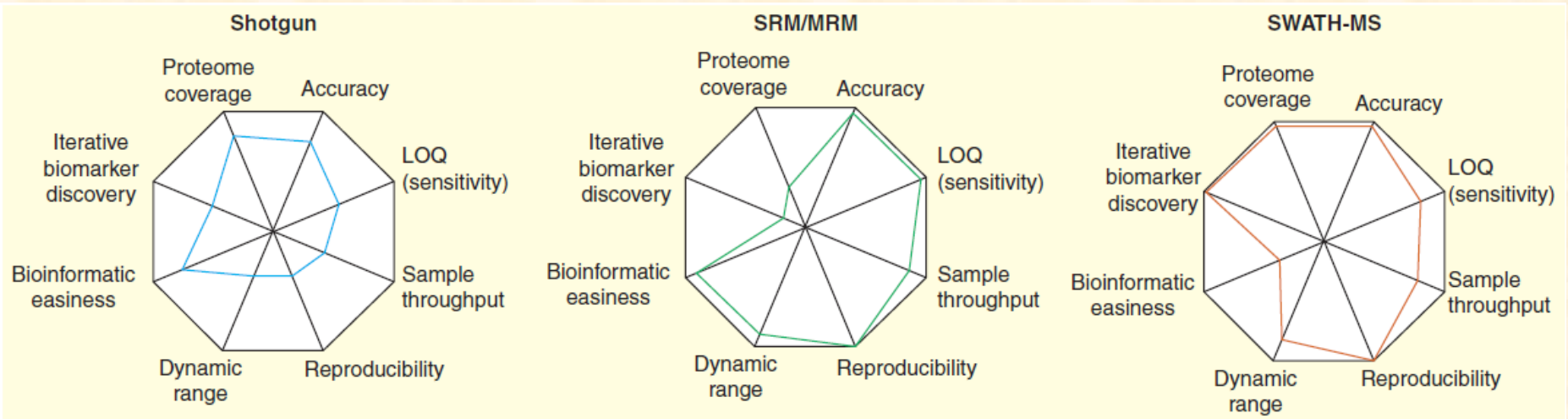
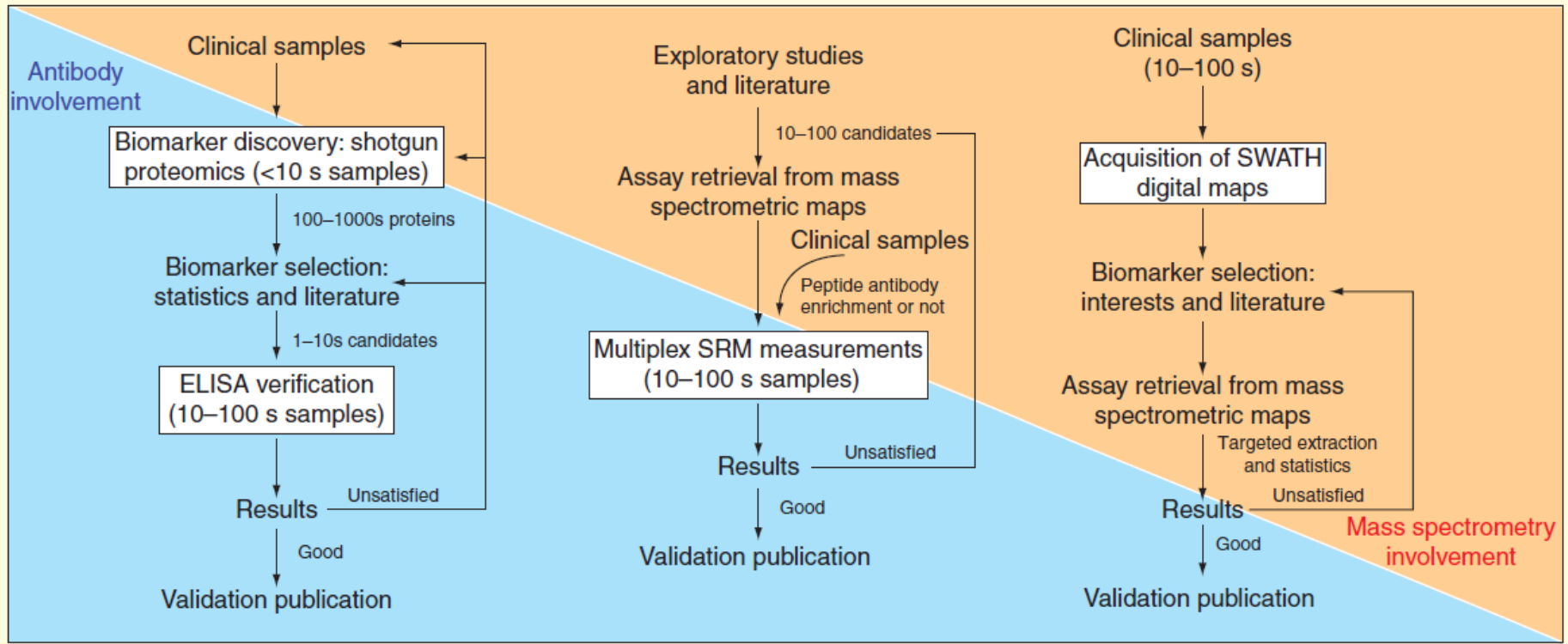


Figure 3. Performance profiles comparing technical advantages and disadvantages of shotgun proteomics, SRM and SWATH MS. In the radar chart, analytical variables are presented on axes starting from the same point and each variable is represented by a spoke. The length of a spoke indicates the magnitude of the variables. Note that SWATH-MS combines the strengths of shotgun and SRM technologies; however, requires more powerful bioinformatic tools for data analysis. LOQ: Limit of quantification; MRM: Multiple reaction monitoring; MS: Mass spectrometry; SRM: Selected reaction monitoring.

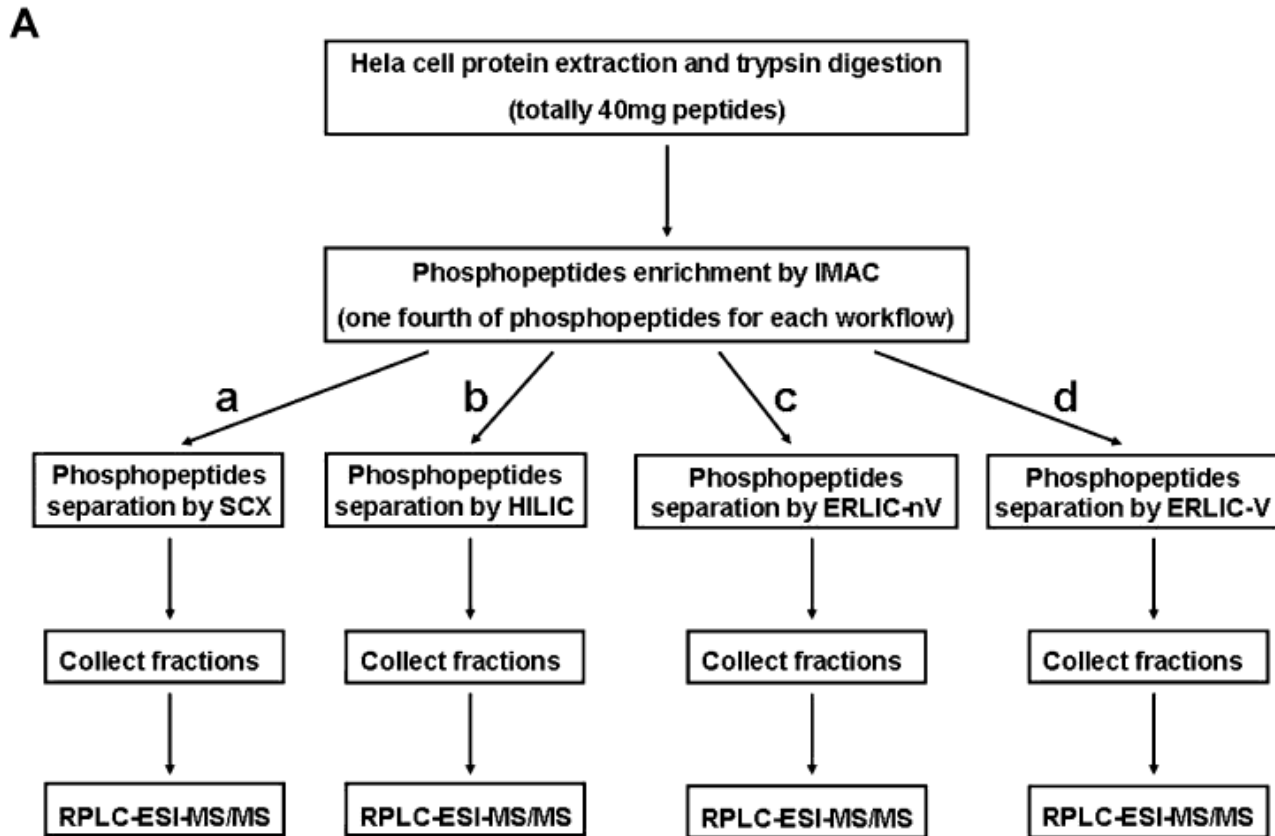




COPYRIGHT JOHN GREGORY

AIRLINERS.NET

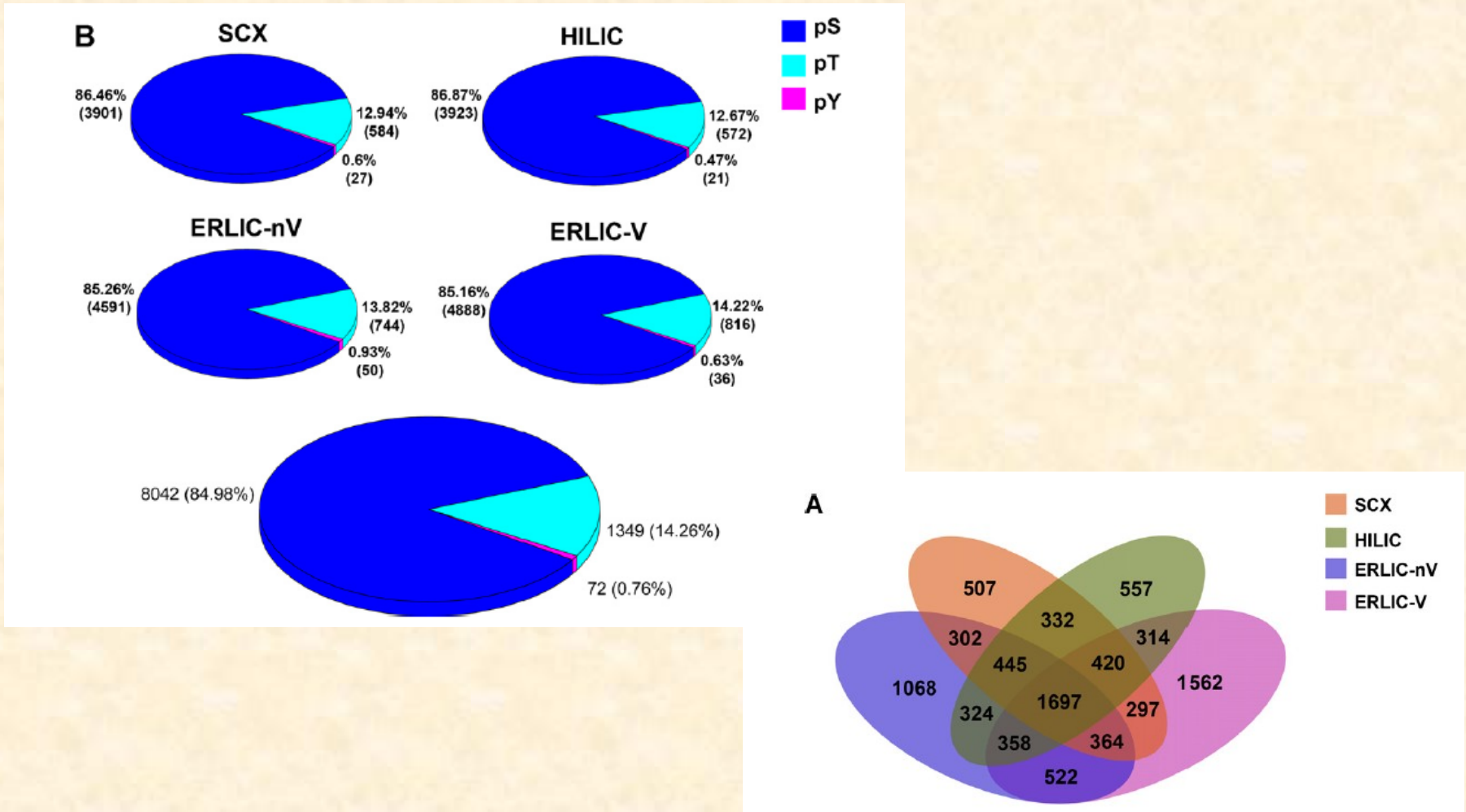
Analýza fosfoproteomu – různé typy frakcionace



ERLIC - Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography

Analýza fosfoproteomu – různé typy frakcionace

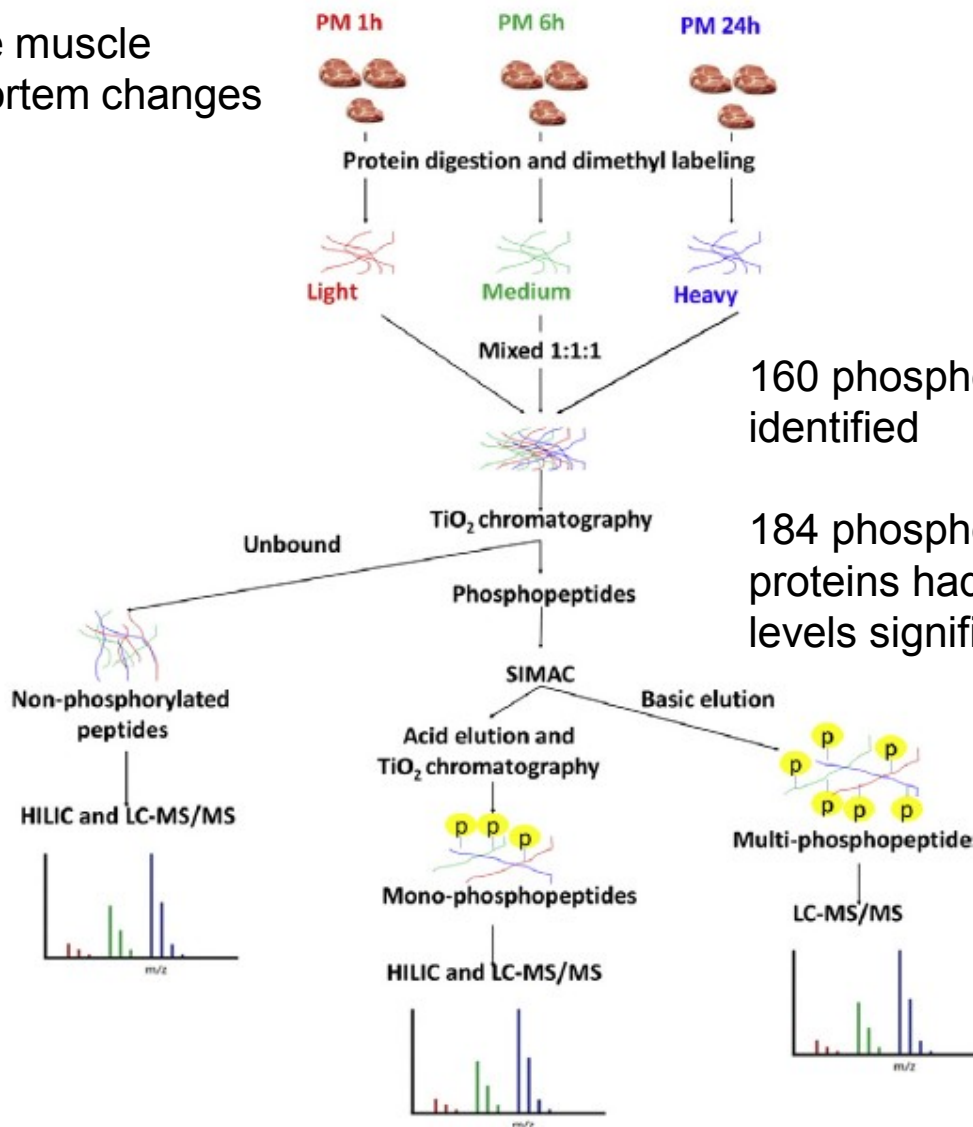
C7250



Each method – over 4000 phosphopeptides

In total – 9069 phosphopeptides – 9463 sites / 3260 proteins

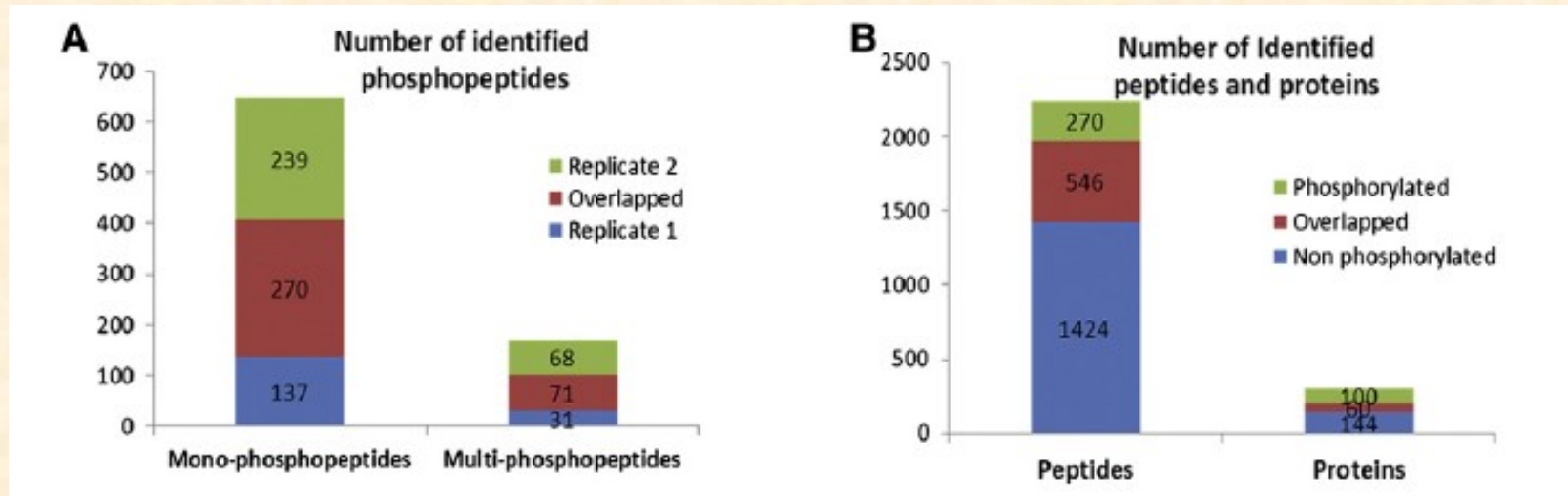
Porcine muscle
Postmortem changes



160 phosphoproteins with 784 sites identified

184 phosphorylation sites on 93 proteins had their phosphorylation levels significantly changed.



Porovnání replikátů



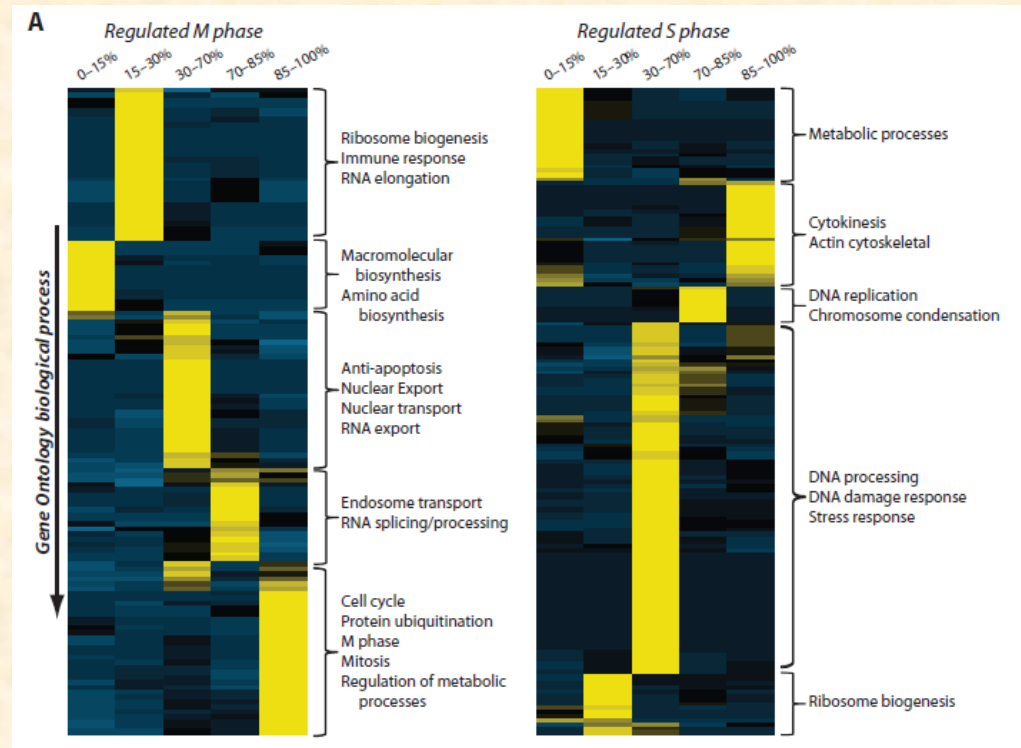
Analýza fosfoproteomu

změny během buněčného cyklu

Olsen J.V. et al., *Sci. Signal.*, 3 (104) ra3 (2010)

-  quantified 6027 proteins
-  quantified 20,443 unique phosphorylation sites

- HELA buňky
- SILAC značení
- TiO₂ frakcionace
- LC-MS/MS (Orbitrap)



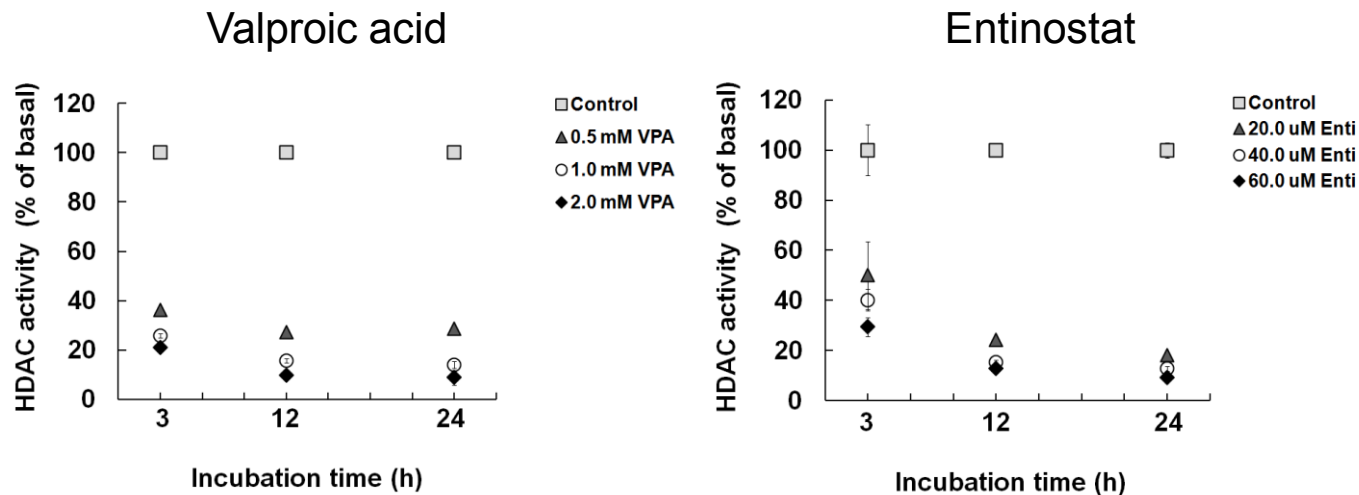
The panels show the phenotypic phosphoproteome comparison organized by GO biological process for mitotic (left) and S phase (right) cells. Proteins involved in metabolic processes have high-occupancy phosphorylation sites during mitosis, but low-occupancy sites during S phase (color scale: yellow, high overrepresentation; dark blue, high underrepresentation).

Hodnocení účinku inhibitorů histonových deacetyláz

● to establish a set of methods

- HDAC Fluorimetric Cellular Activity Assay Kit
- MALDI-MS of N-terminal part of histones (after Glu-C digestion)
- AUT-AU 2-D GE combined with LC-MS/MS analysis

Total HDAC inhibition effect



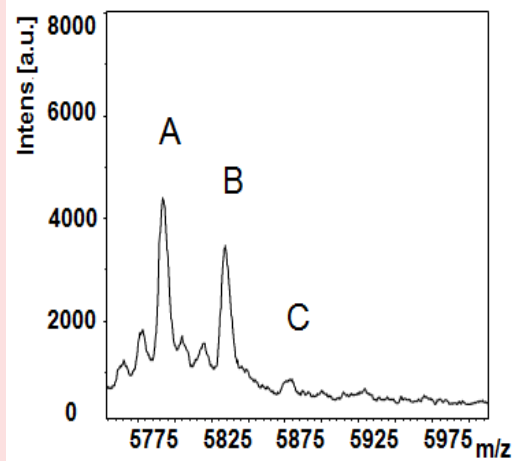
B-CLL MEC-1 cells

Činčárová et al, Mol. Biosyst. (2012)

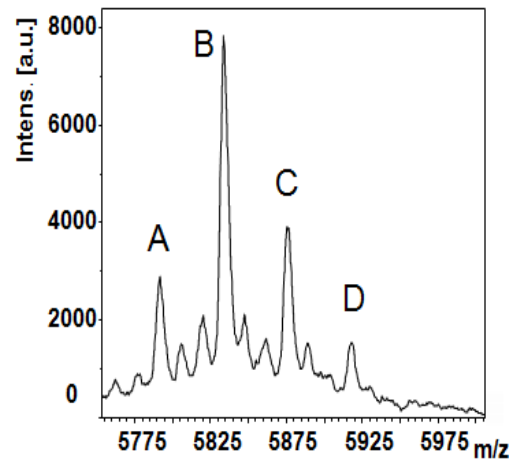
Hodnocení účinku inhibitorů histonových deacetyláz

MALDI-MS of Histone H4 acetylated forms N-terminal fragment (1-53 AA)

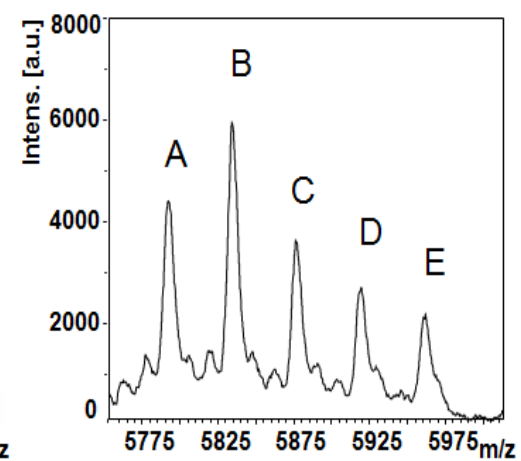
control



Valproic acid



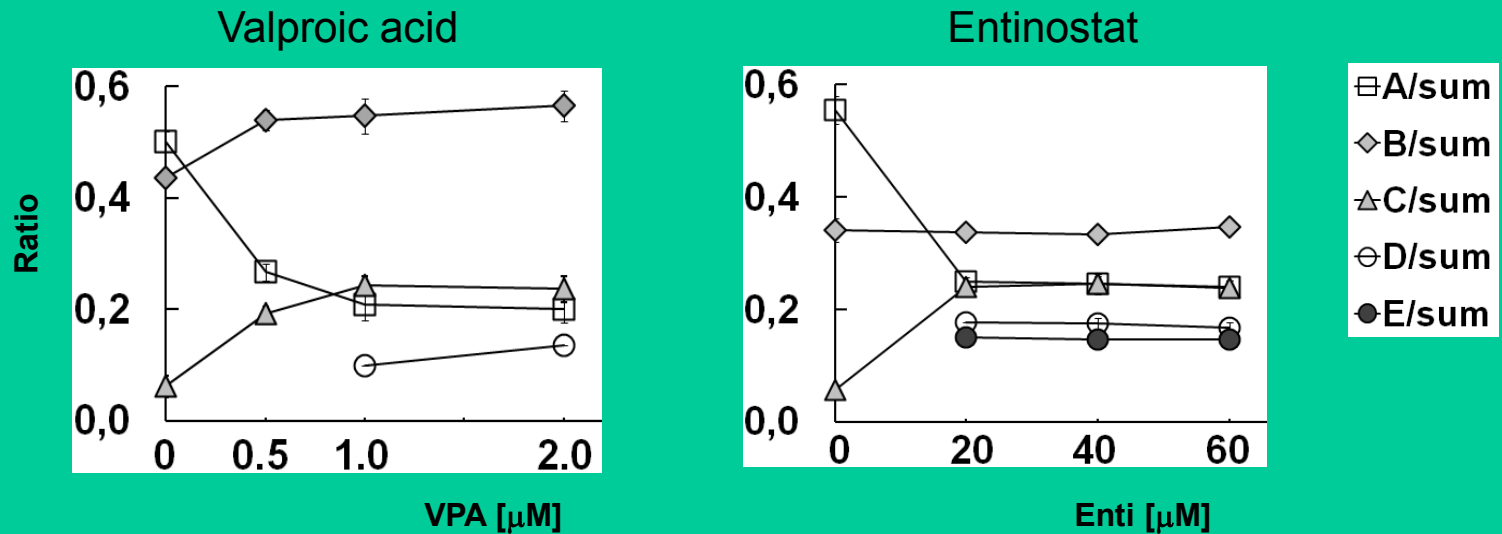
Entinostat



A → E 0 → 4 acetylations

Hodnocení účinku inhibitorů histonových deacetyláz

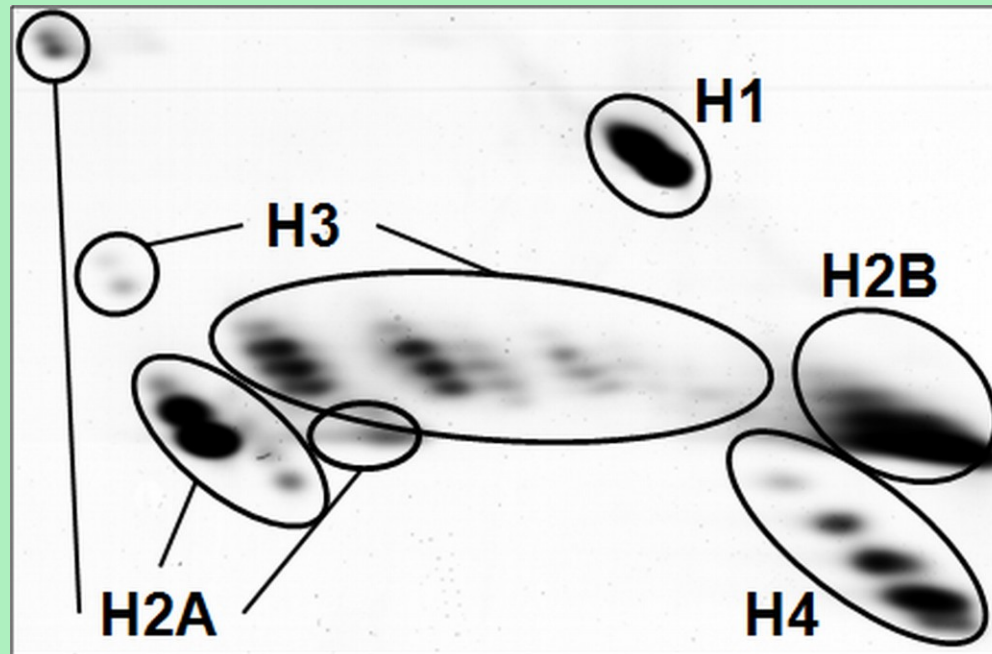
Changes of particular H4 acetylated forms vs inhibitor concentration (24h treatment)



A → E 0 → 4 acetylations

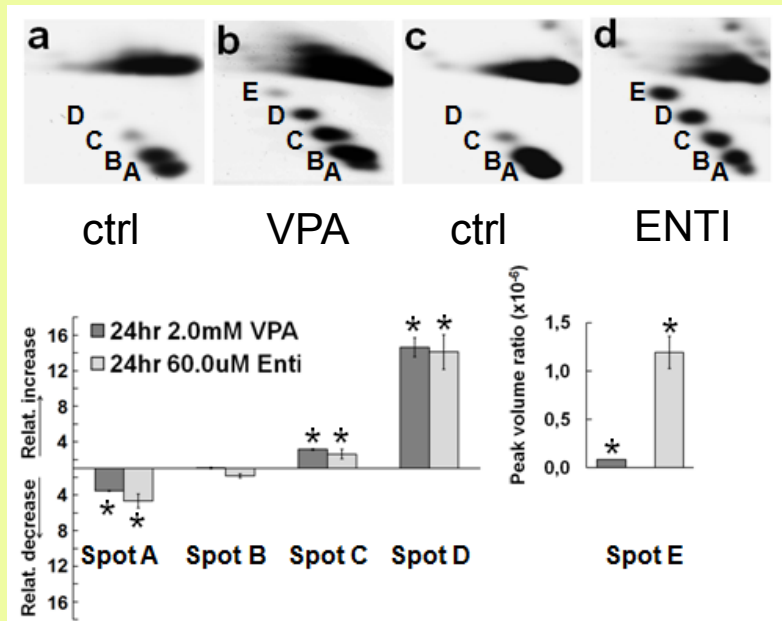
Hodnocení účinku inhibitorů histonových deacetyláz

AUT-AU 2-D GE of histone extract



Hodnocení účinku inhibitorů histonových deacetyláz

AUT-AU 2-D GE of histone extract



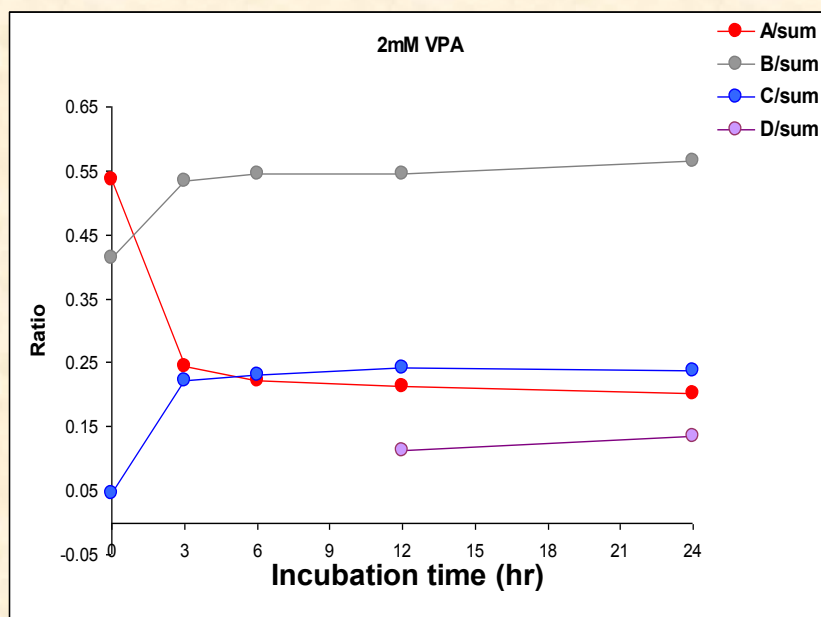
Spot	Relative change	Peptide observed
	VPA	
	Entinostat	
A	-3.53 ± 0.06 -3.60 ± 0.08	GKGGKGLGKGGAK ¹⁷
B	1.06 ± 0.09 -0.80 ± 0.02	GKGGKGLGKGGaAcK ¹⁷
C	3.14 ± 0.10 1.60 ± 0.50	GKGGKGLGacKGGaAcK ¹⁷ GKGGacKGLGKGGaAcK ¹⁷ GacKGGKGLGKGGaAcK ¹⁷
D	14.65 ± 1.07 13.10 ± 1.90	GKGGacKGLGacKGGaAcK ¹⁷ GacKGGacKGLGKGGaAcK ¹⁷ GacKGGacKGLGKGGaAcK ¹⁷
E	> 100 > 100	GacKGGacKGLGacKGGaAcK ¹⁷

A → E 0 → 4 acetylations

Hodnocení účinku inhibitorů histonových deacetyláz

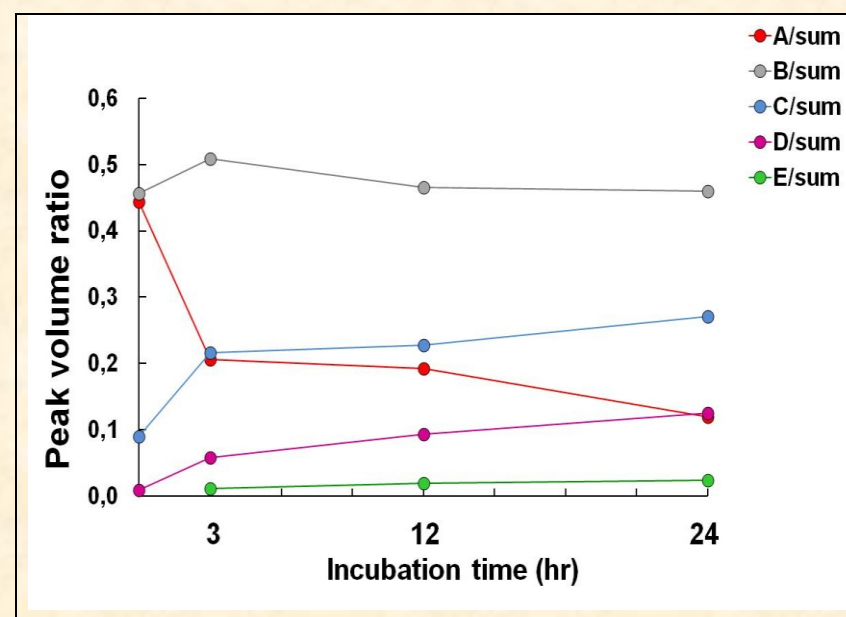
Změny jednotlivých acetylovaných forem v závislosti na čase inkubace
(2 mM VPA)

MALDI-MS



výška píků

2-D AUT-AU GE



intenzita spotů

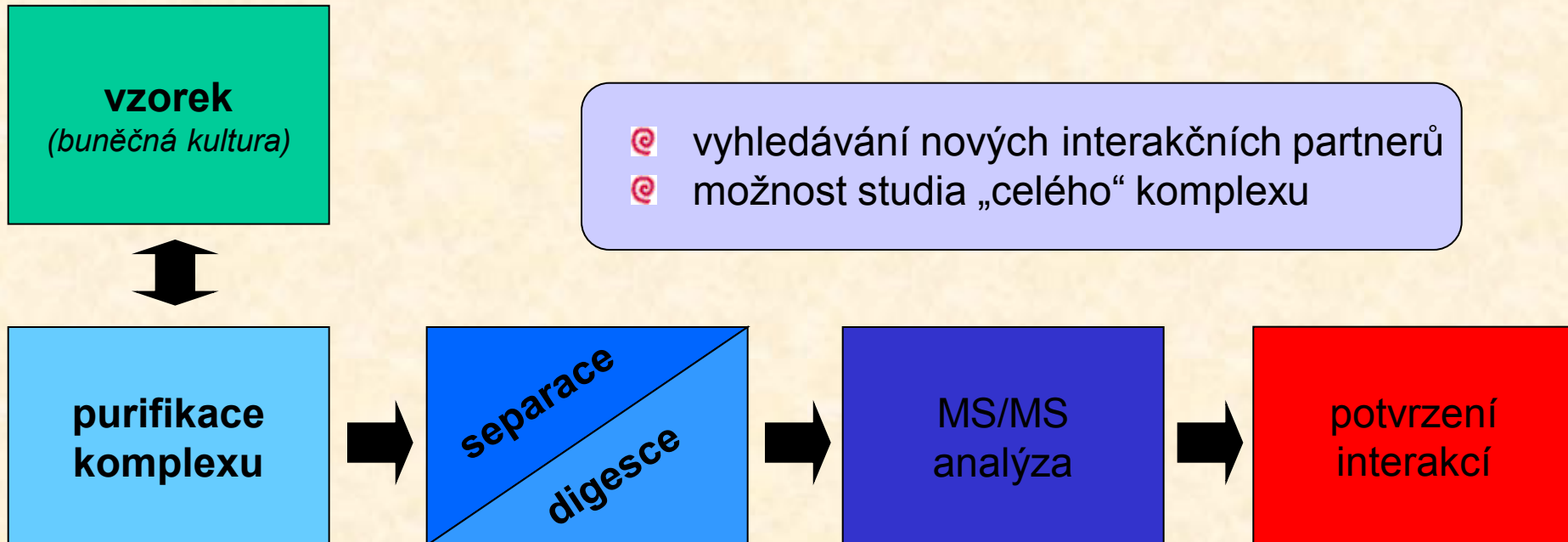


Charakterizace proteinových komplexů

funkční proteomika

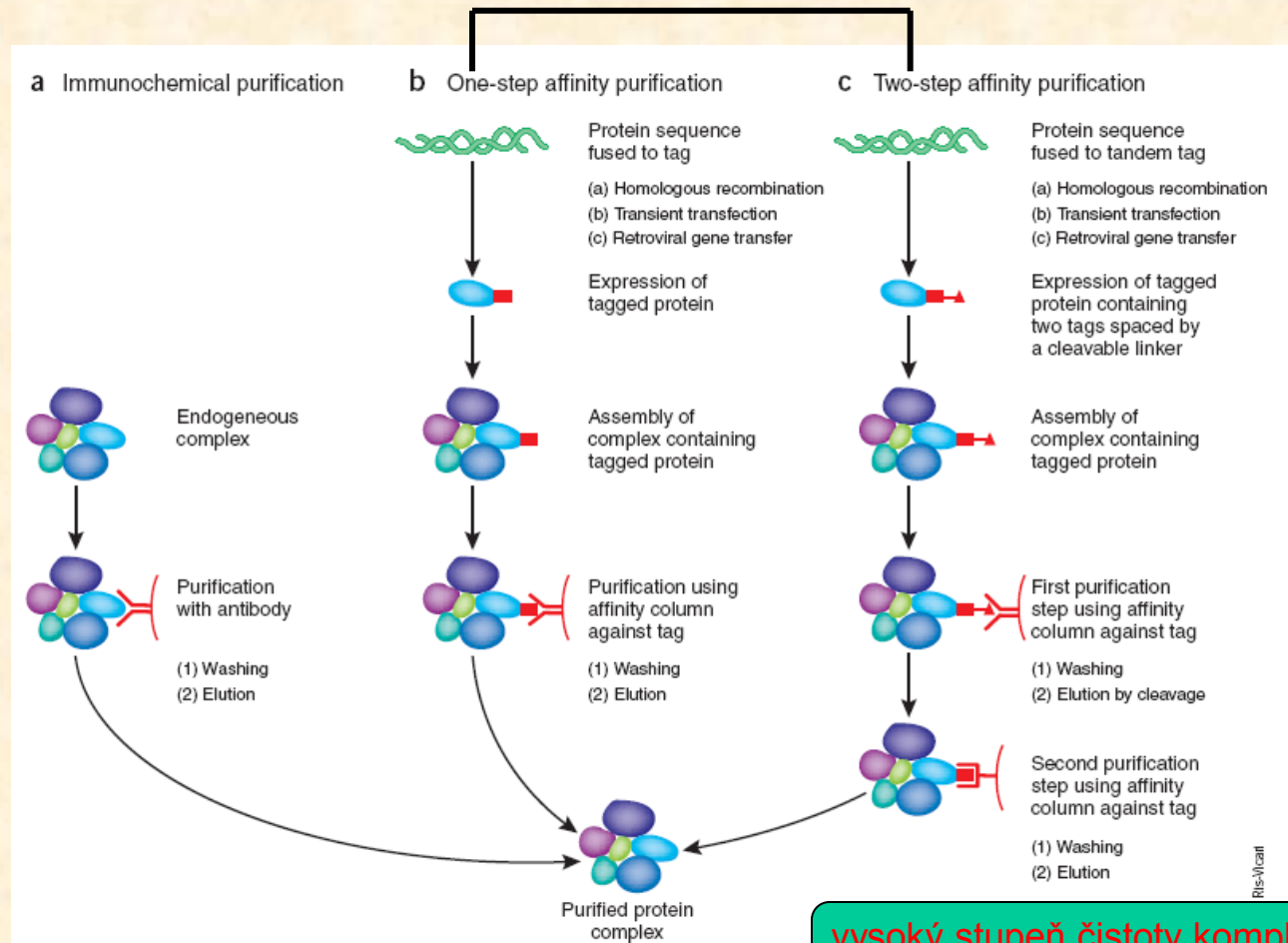
- Ⓢ > 80% proteinů je funkčních až po začlenění do komplexu
- Ⓢ ~ 10000 typů interakcí

Aloy P., Russell R. B.: Nat. Biotechnol. 22 (10), 1317-1321 (2004)



Purifikace proteinových komplexů

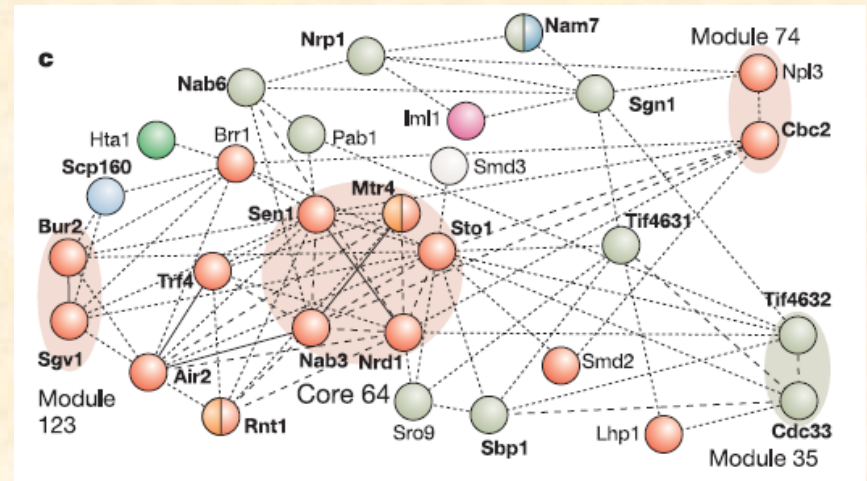
in vivo exprese proteinu se značkou



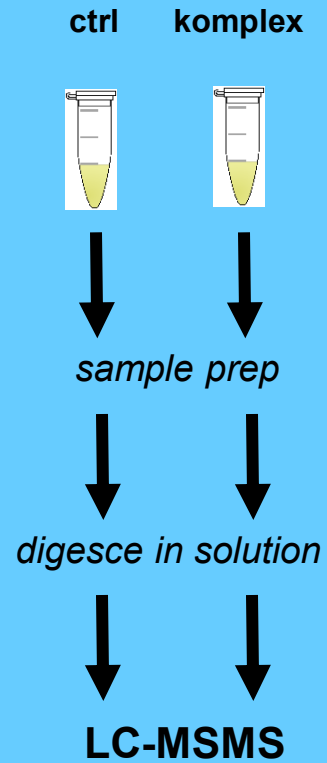
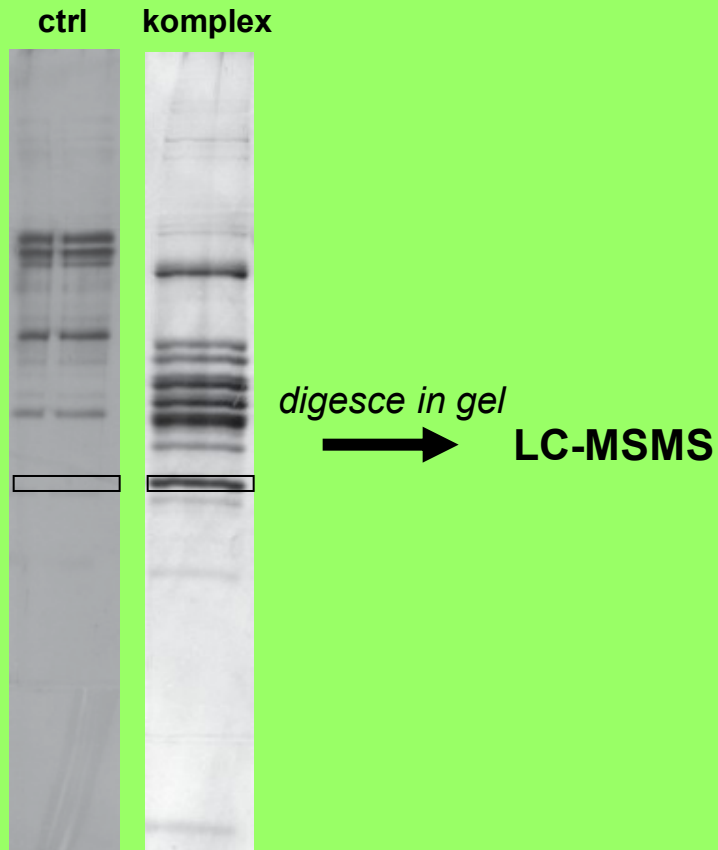
vysoký stupeň čistoty komplexu
ztráta slabě vázaných členů komplexu

Možnosti MS v analýze komplexů

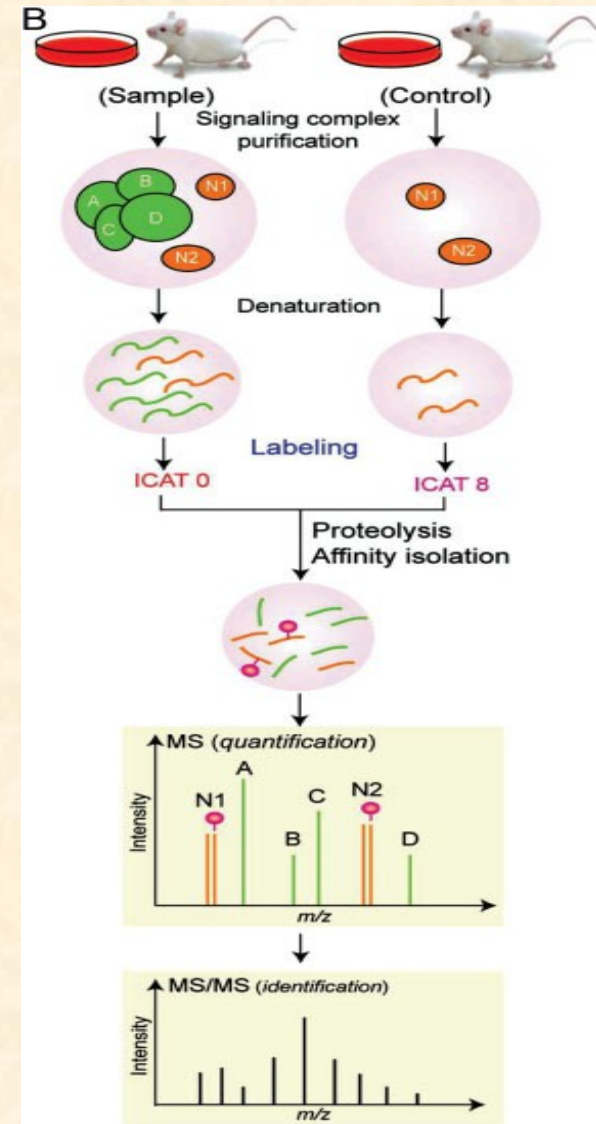
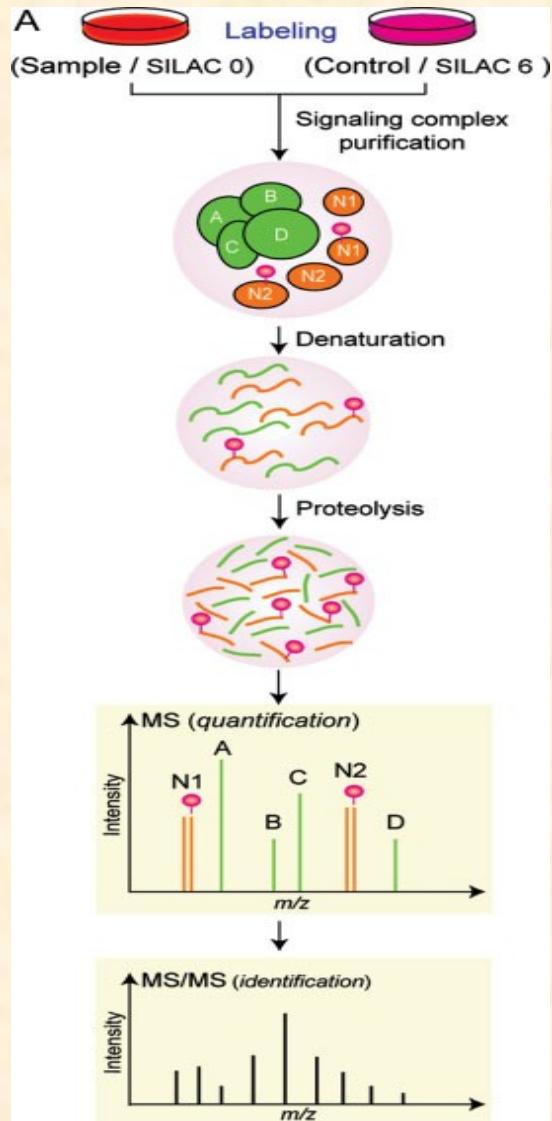
- identifikace jednotlivých členů komplexu včetně posttranslačních modifikací
- validace interakčních partnerů (odlišení nespecifických interakcí)
- určení poměrů jednotlivých členů komplexu (stechiometrie)
- určení prostorové struktury komplexu (cross-linking)



Identifikace jednotlivých členů komplexu



možno označit proteiny značkami pro relativní kvantifikaci a vzorky spojit



nespec. interakce 1:1



COPYRIGHT ANDY GRAF

AIRLINERS.NET

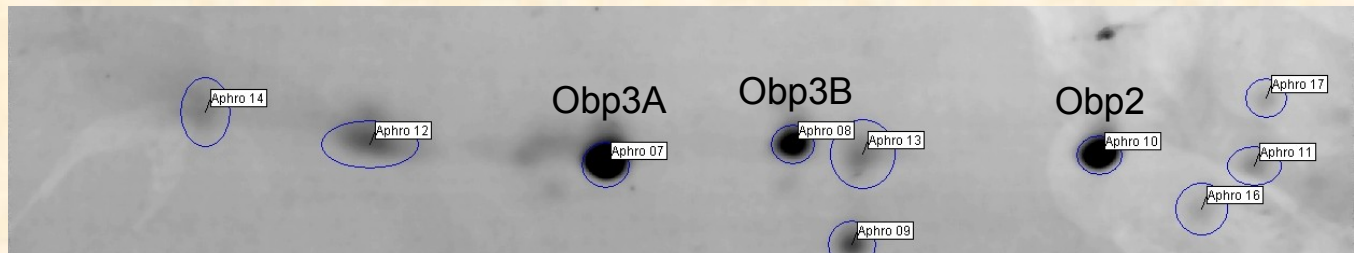
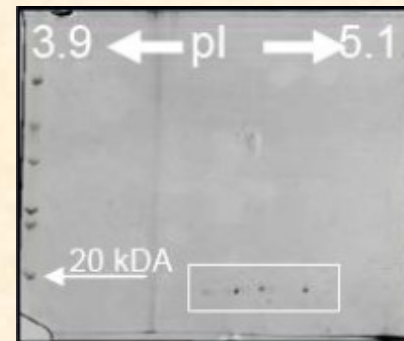
Ověření sekvence a určení izoform OBP proteinů *de novo* sekvenování



Myodes glareolus

- sliny
- 2D gelová elektroforéza
- MS/MS vybraných spotů

- Ⓢ není znám genom
- Ⓢ nejsou protilátky



Ověření sekvence a určení izoform OBP proteinů

RNA analysis

(FS CU Prague)

RNA isolation
cDNA synthesis
PCR with Aphrodisin primers
(hamster)
purification
cloning
sequencing
**initial
aminoacid sequence**

proteomic analysis

(FS CU/Proteomics CF)

protein isolation
2D GE

in-gel digestion
MALDI-MS/MS

de novo
**corrected AA sequence
(Blast, new proteins)**



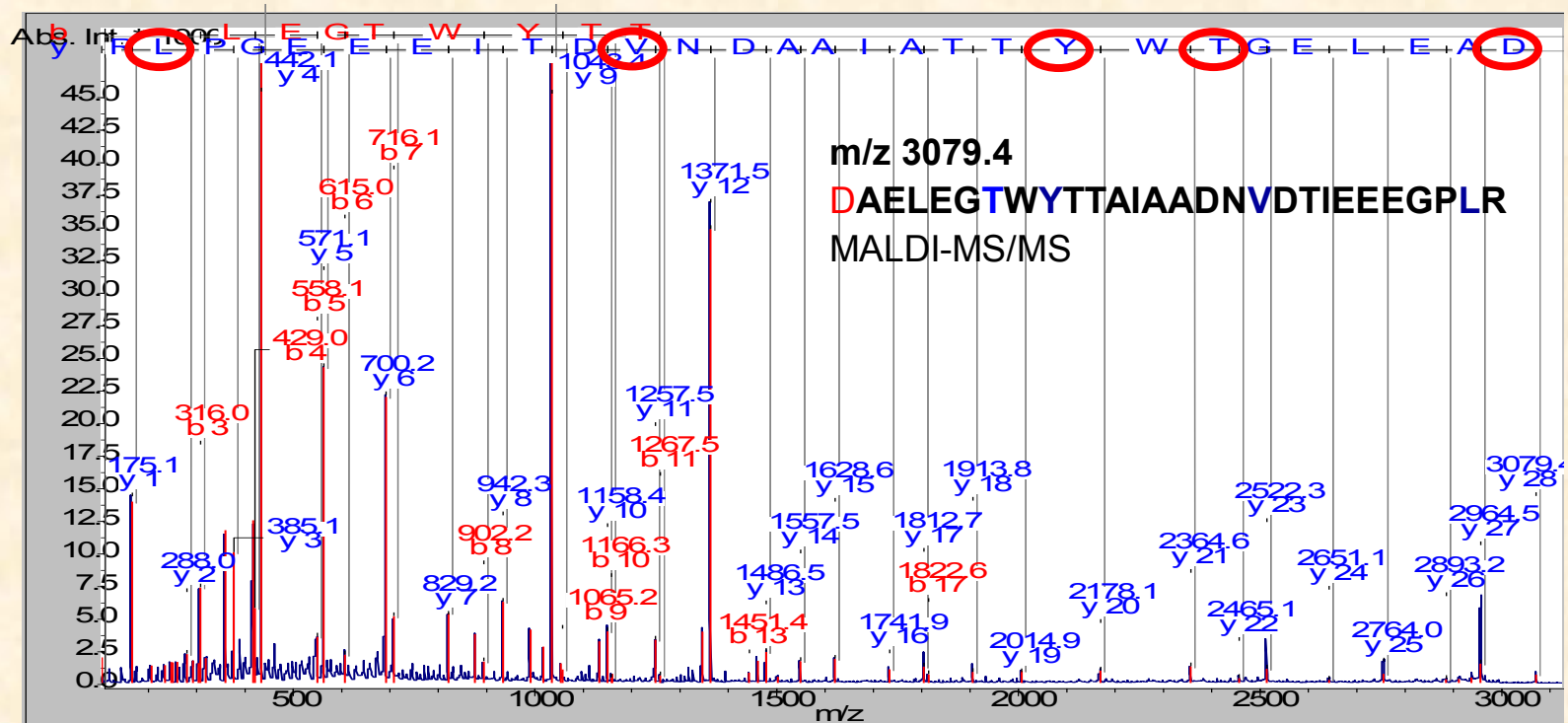
database of OBP protein sequences
identification of protein isoforms

Ověření sekvence a určení izoformem OBP proteinů MALDI-MS/MS a LC-MS/MS manuální interpretace spekter

původní sekvence - QAELEGKWTTAIAADNIDTIEEEGPMR (OBP3)

DAELEG**TWYTTAIAADNV**DTIEEE**GPLR**

HAELEG**TWYTTAIAADNV**DTIEEE**GPLR**



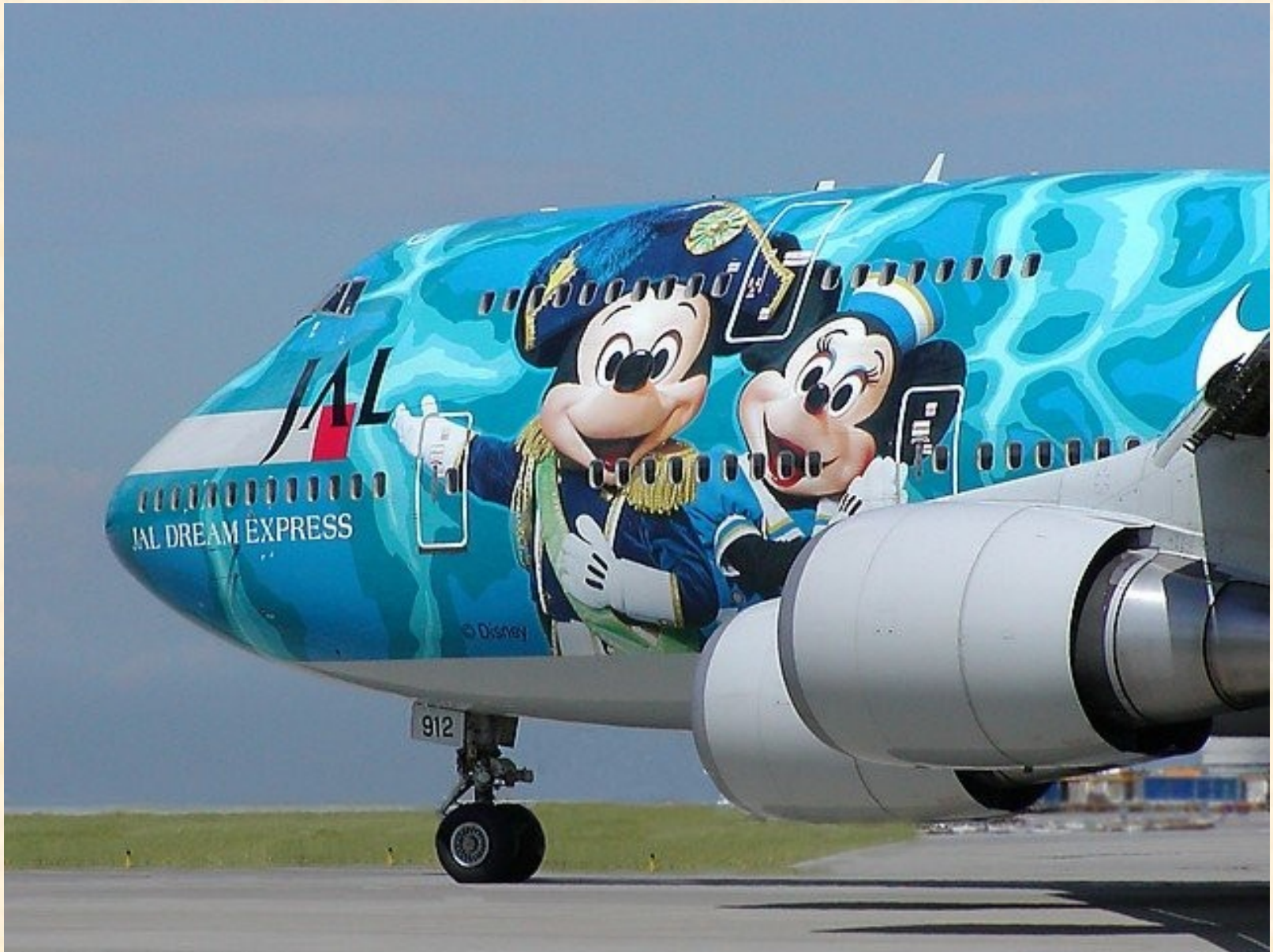


Photo Copyright Avibear


MS Imaging

MALDI-MS imaging

samples:

- fresh frozen tissue sections
- individual cells or clusters of cells isolated by **laser-capture microdissection** or **contact blotting** of a tissue on a membrane target.

MS analysis

- systematické scanování plochy vzorku bod po bodu
- obraz odpovídá plošné distribuci jednotlivých m/z
 distribuci peptidů resp. proteinů

MALDI-MS imaging

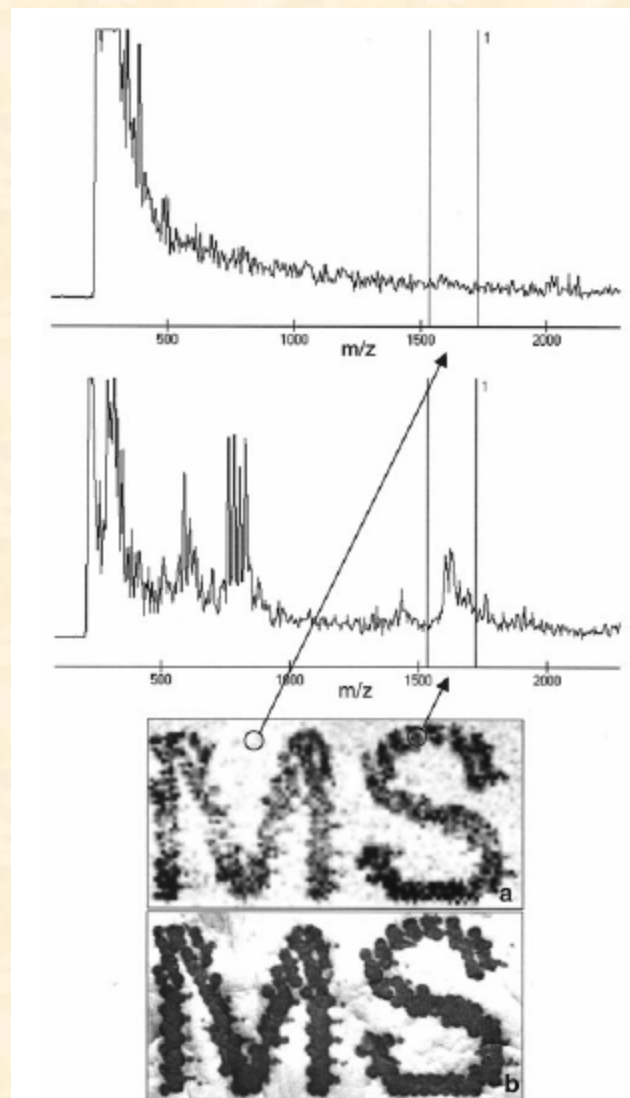
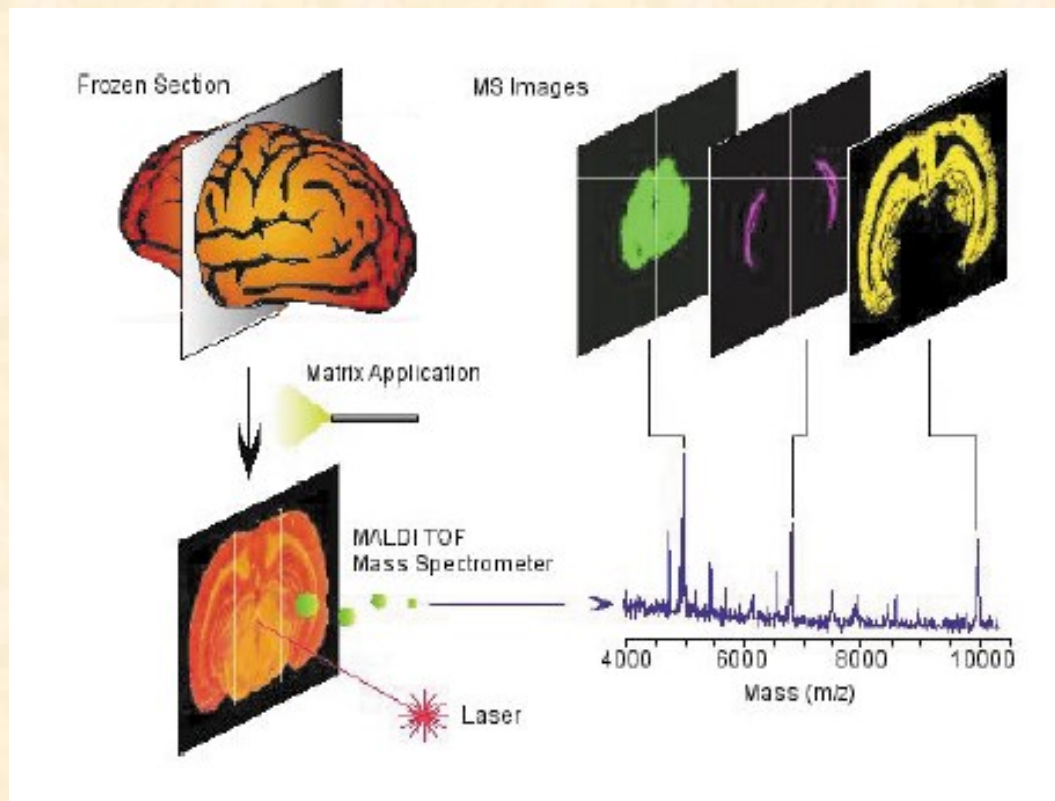


Figure 3. Neurotensin was added to the ink of a printer. The mass spectrometry image (a) (100×50 pixels, 3×1.5 mm) obtained of the protonated neurotensin peak matches with the optical image (b).

MALDI-MS imaging

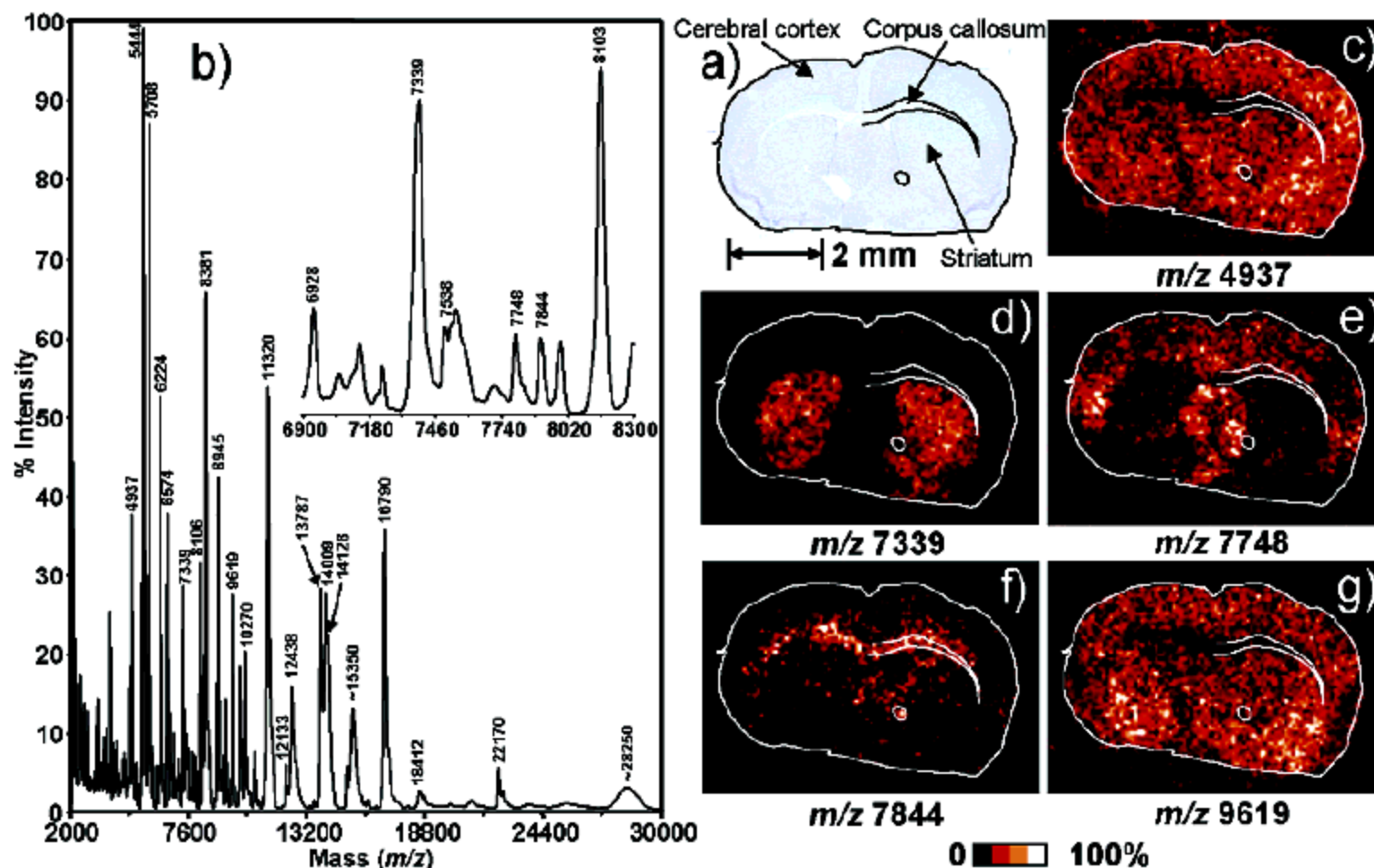
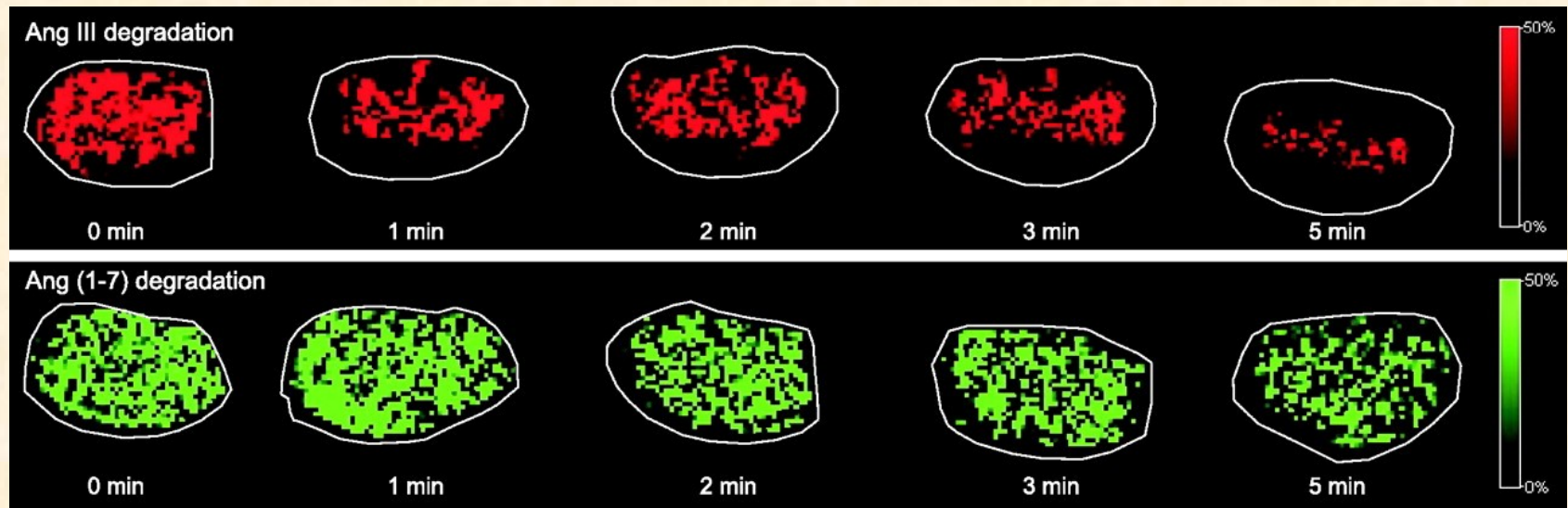


Figure 8. IMS analysis of a 12- μ m coronal mouse brain section. (a) Photomicrograph of a Cresyl Violet-stained section showing different anatomic brain substructures. (b) MALDI-MS protein profile obtained after homogeneous matrix deposition averaging all of the individual spectra acquired from the section. (c–g) Ion density maps obtained at different m/z values with an imaging resolution of 100 μ m. The ion density maps are depicted as pseudocolor images with white representing the highest protein concentration and black the lowest.

MALDI-MS imaging

Degradation of Ang III and Ang-(1-7) in mouse kidney sections.



Konec hlášení