



BIOCEV

Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy
of Sciences and Charles University in Vestec

Kvantifikace, isotopy, cílená proteomika

Karel Harant

harant@natur.cuni.cz



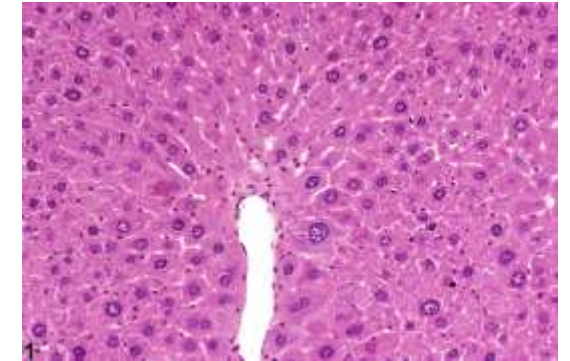
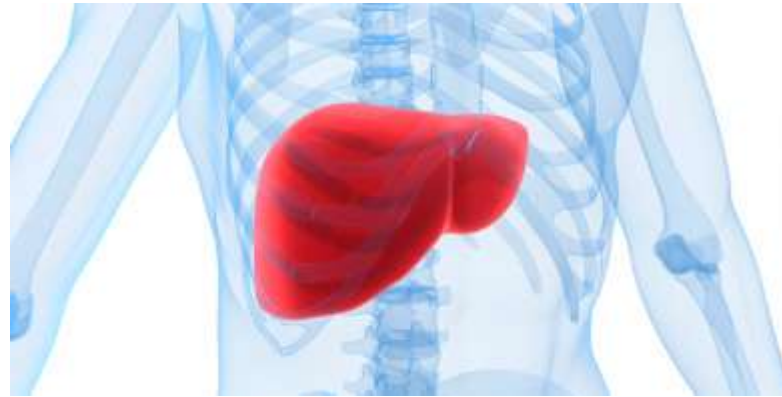
CHARLES UNIVERSITY
Faculty of science

Separáční strategie v shotgun experimentech

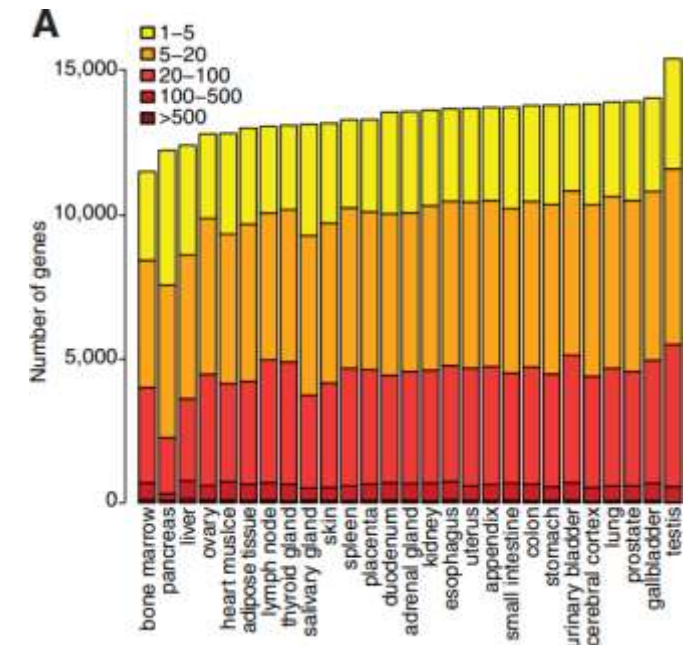
Kolik různých proteinů může být ve vzorku



20 000
genů



V jedné tkáni je přepisováno kolem 12 000 genů

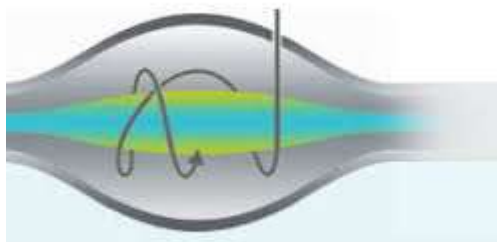




Izolace proteinů
Štěpení trypsinem

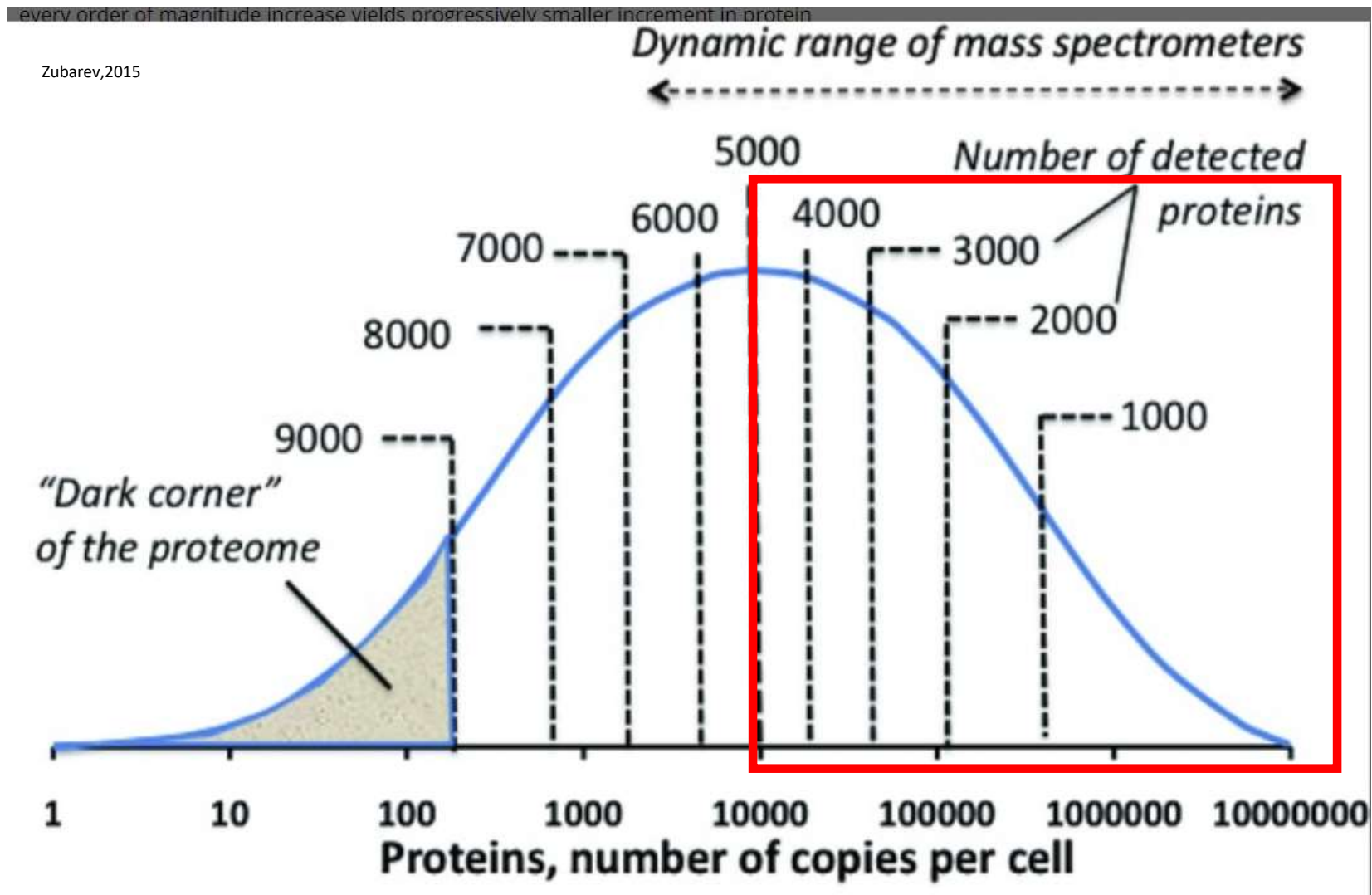


separace - RP C18 kyselého pH



MS detekce

Pokrytí proteomu : 5000 identifikací (DDA metoda)





Frakcionace vzorku
RP C18 pH10
nebo
iontoměnič



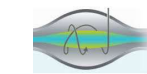
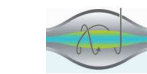
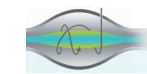
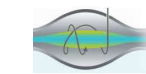
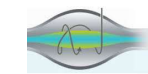
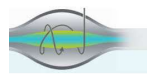
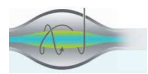
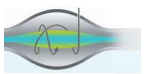
8 frakcí



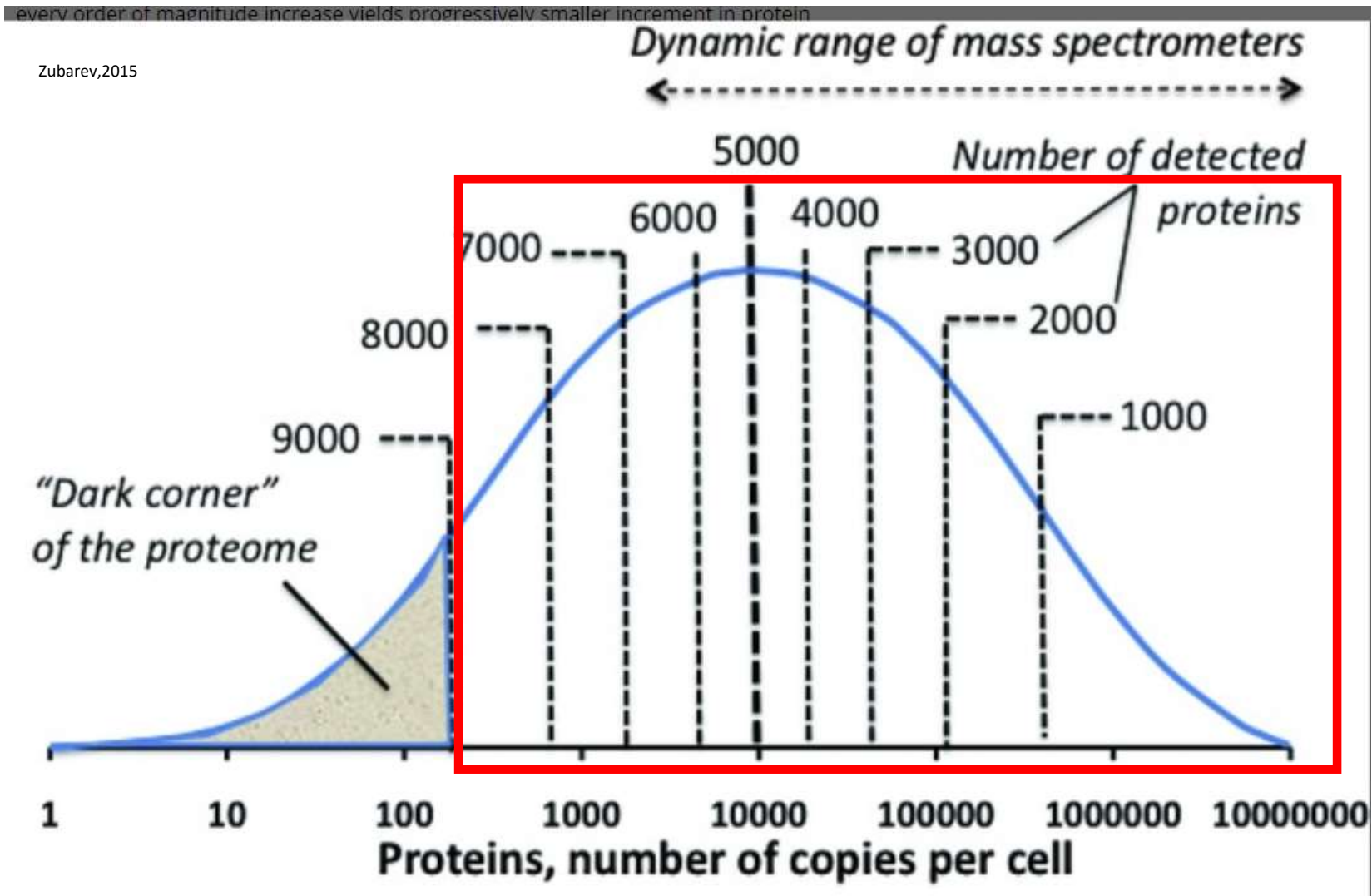
separace -
RP C18 kyselé pH



MS detekce



Pokrytí proteomu : 5000 identifikací (DDA metoda)





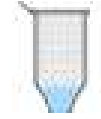
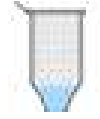
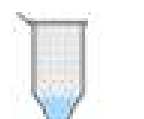
Izolace proteinů



SDS elektroforetická separace



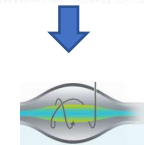
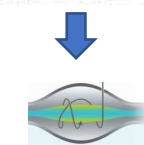
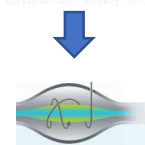
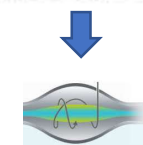
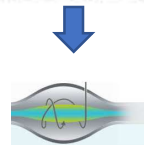
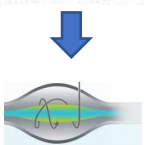
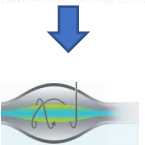
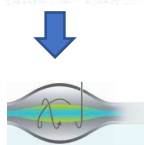
Rozdělení gelu na části



Štěpení v gelu



separace -
RP C18 kyselý pH



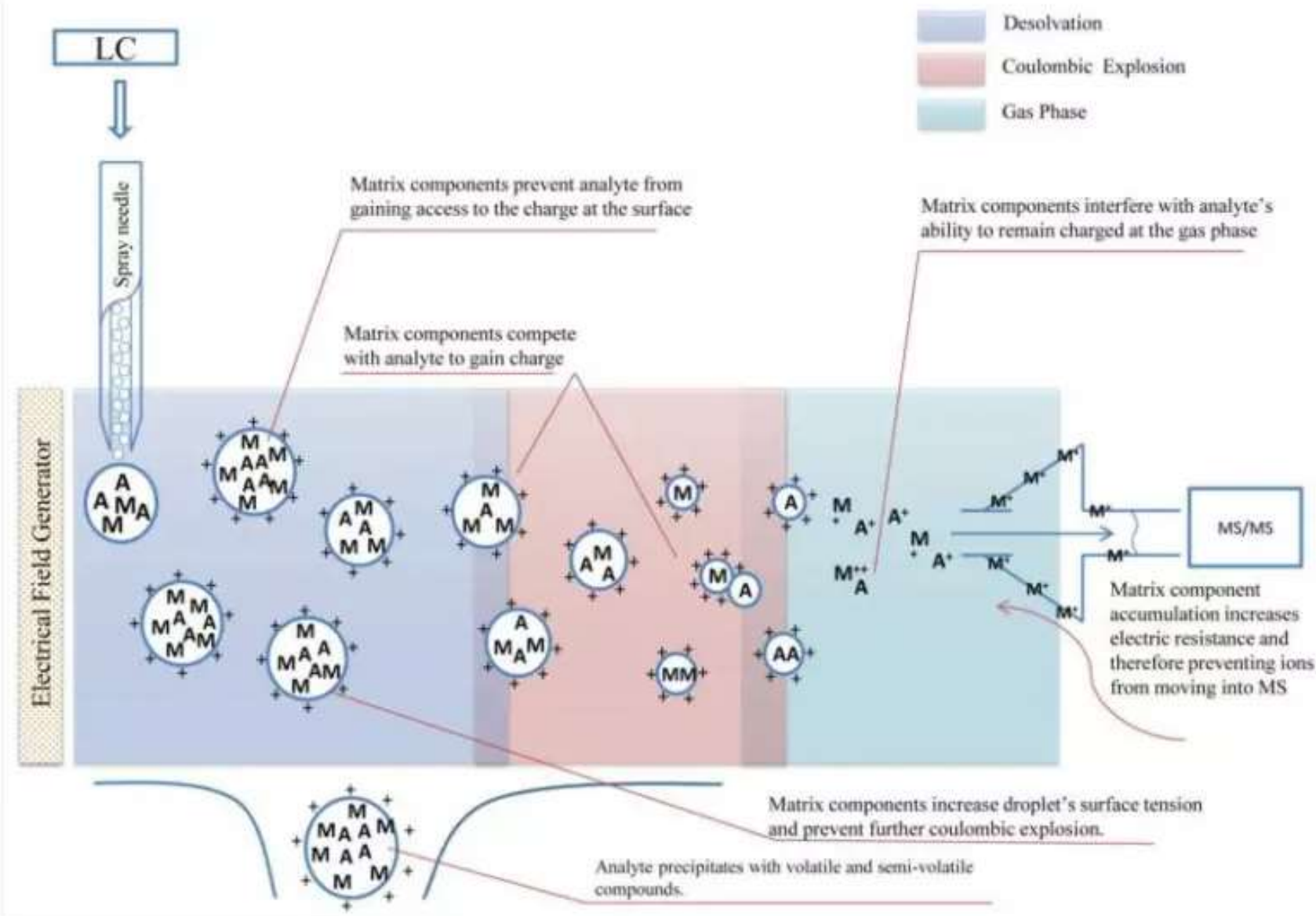
MS detekce

MS měření není kvantitativní

Stejná intenzita v různých vzorcích nemusí
znamenat stejnou koncentraci

Stejná koncentrace v různých vzorcích nemusí
dát stejnou intenzitu signálu

Matriční efekt



Možné zeslabení signálu

Možné zesílení signálu

Vzorky shodného složení



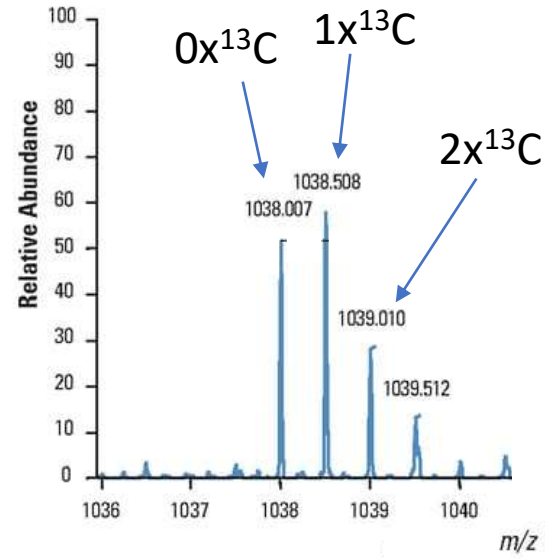
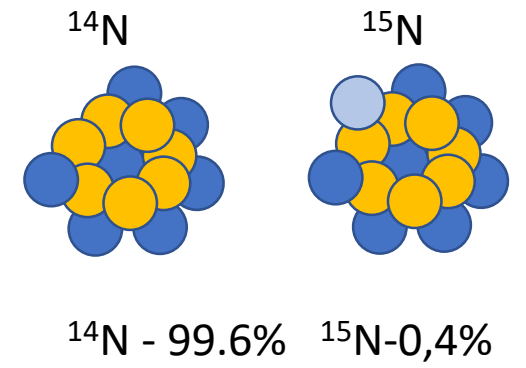
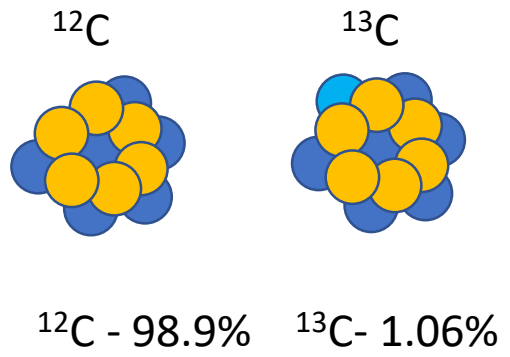
předpoklad shodného matričního efektu

Provádíme relativní kvantifikaci LFI, DIA

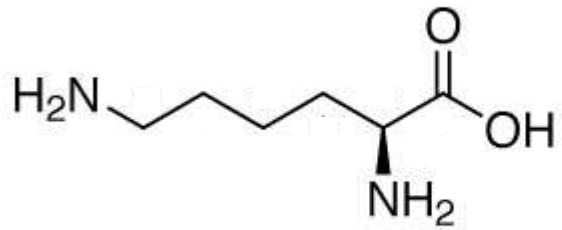
Založeno na předpokladu Nikoliv jistotě

Relativní kvantifikace může být provedena u dvou chemicky identických látek v jednom spektru.

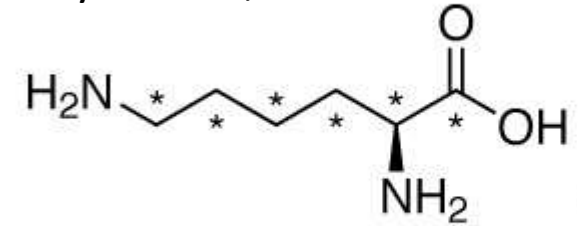
Tyto látky se mohou lišit v izotopickém složení



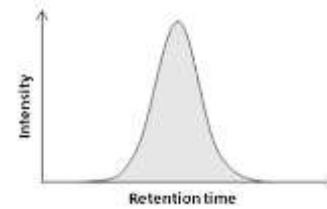
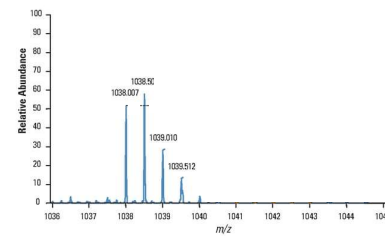
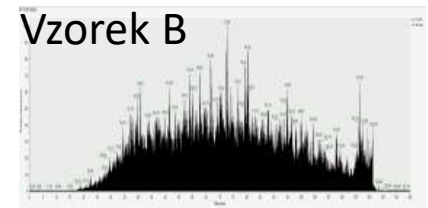
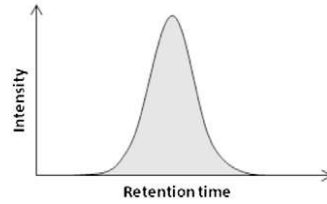
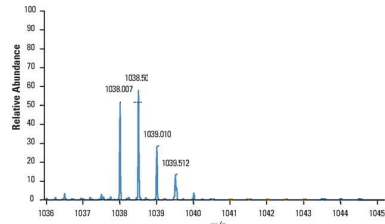
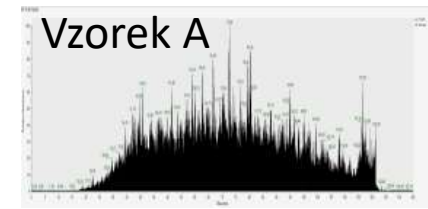
Lysin 146,19 Da 0x ^{13}C



Lysin 152,19 Da 6x ^{13}C



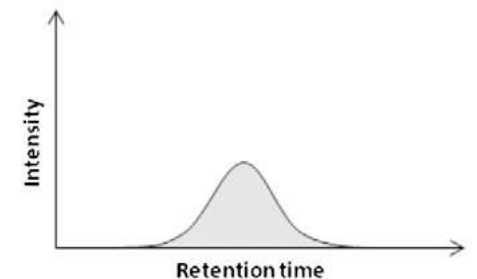
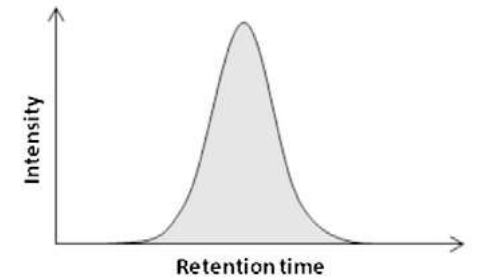
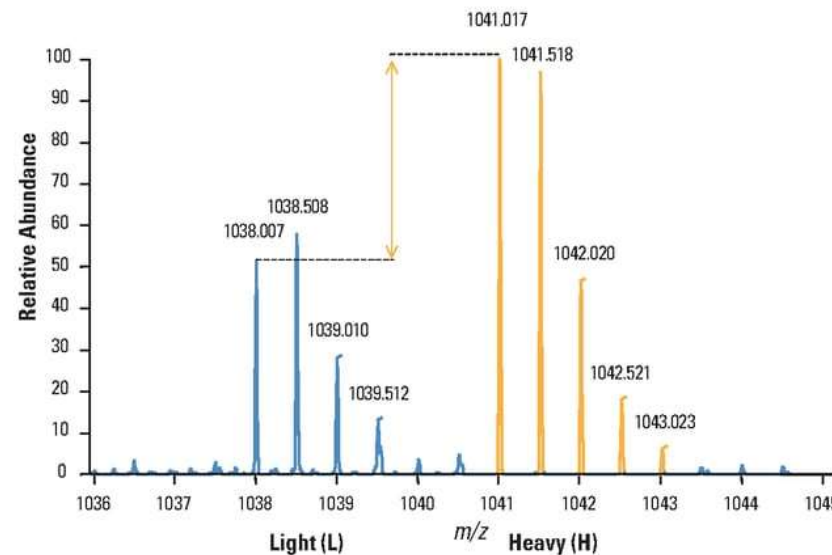
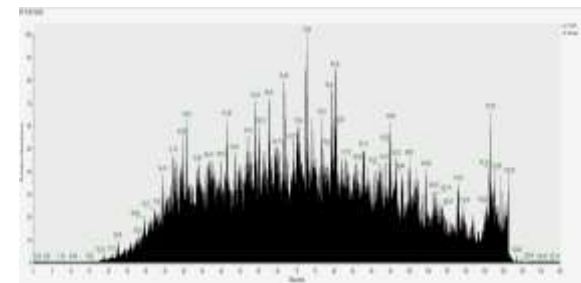
Kvantifikace proteinů bez značení - LFQ



Náchylné k artefaktům,
Nutné měřit všechny vzorky v
jeden čas, na jednom stroji, jedné
chromatografii

Kvantifikace proteinů pomocí značení

Vzorek A a B - směs



Kvantifikace pomocí MS – stabilní izotopy

METABOLICKÉ

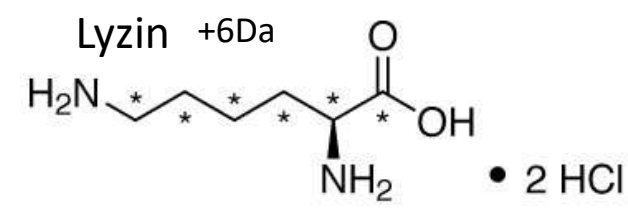
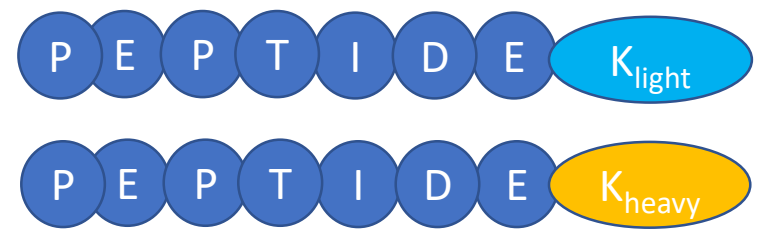
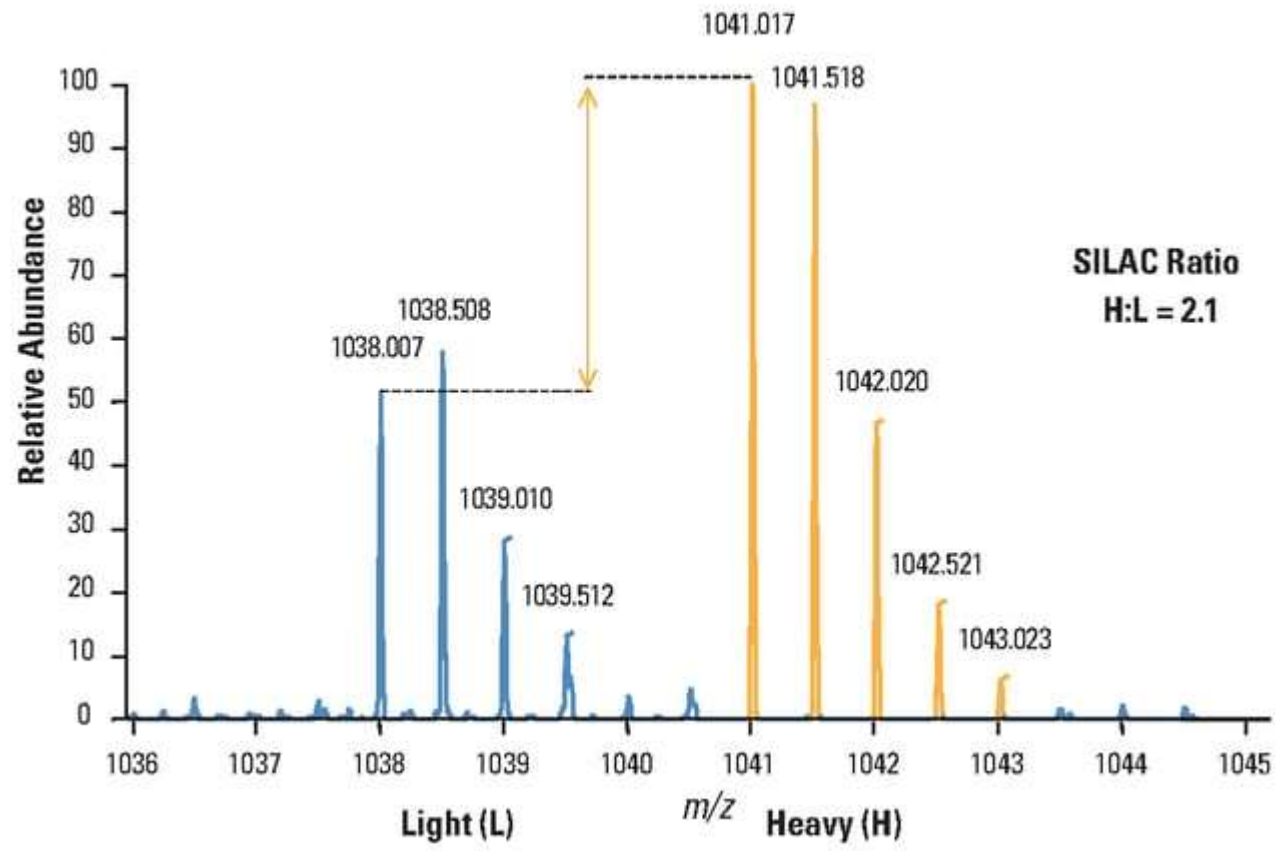
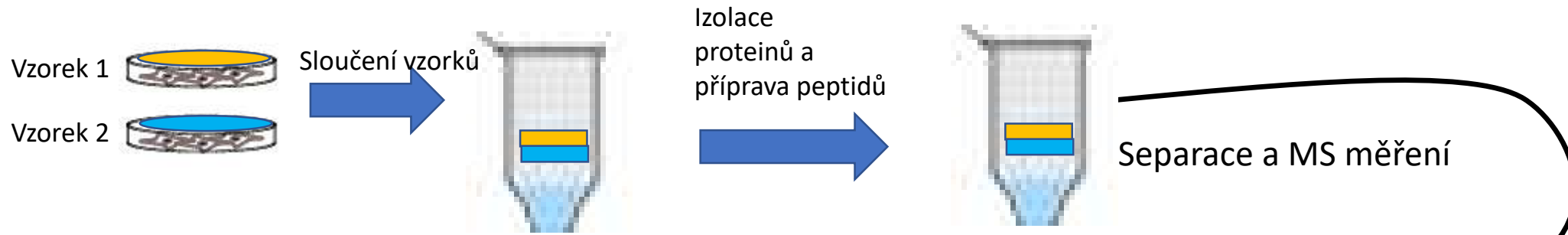
- **SILAC** – Stable Isotope Labeling with Aminoacids in Culture

CHEMICKÉ

- **Dimethylation isotope labeling**
- **iTRAQ** - Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation
- **TMT** – Tandem Mass Tags

METABOLICKÉ

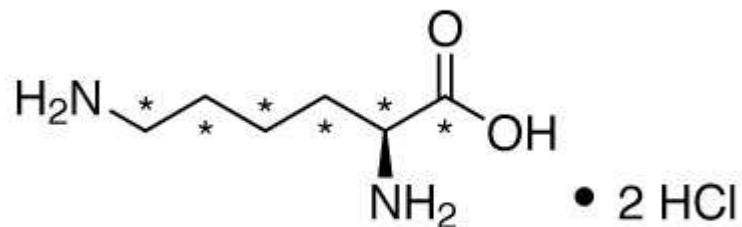
- **SILAC** – Stable Isotope Labeling with Aminoacids in Culture



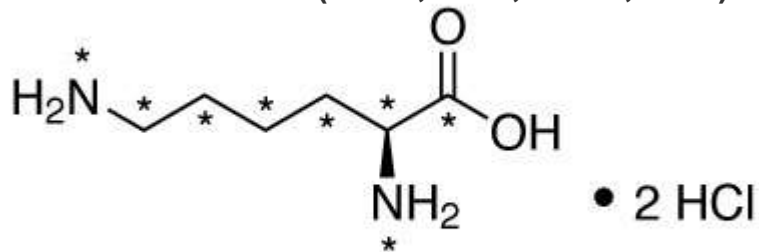
“Těžké” aminokyseliny využívané pro SILAC

- Uměle je možné vyrobit aminokyseliny se zvýšeným výskytem těžkých izotopů

L-LYSINE:2HCL ($^{13}\text{C}_6$, 99%) +6Da

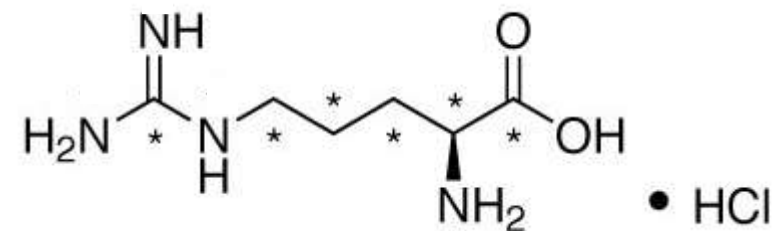


L-LYSINE:2HCL ($^{13}\text{C}_6$, 99%; $^{15}\text{N}_2$, 99%) +8Da

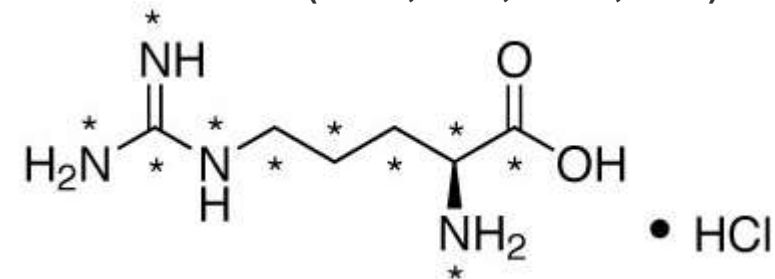


mass shift	+4	+6	+8	+10
Arginine		X		X
Leucine		X		
Lysine	X	X	X	

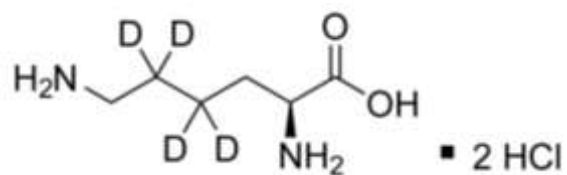
L-ARGININE:HCL ($^{13}\text{C}_6$, 99%) +6 Da



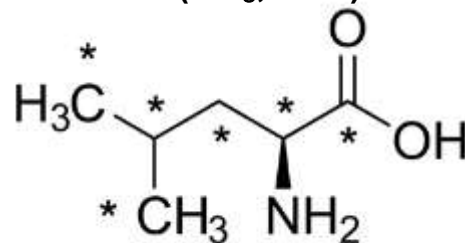
L-ARGININE:HCL ($^{13}\text{C}_6$, 99%; $^{15}\text{N}_4$, 99%) +10 Da



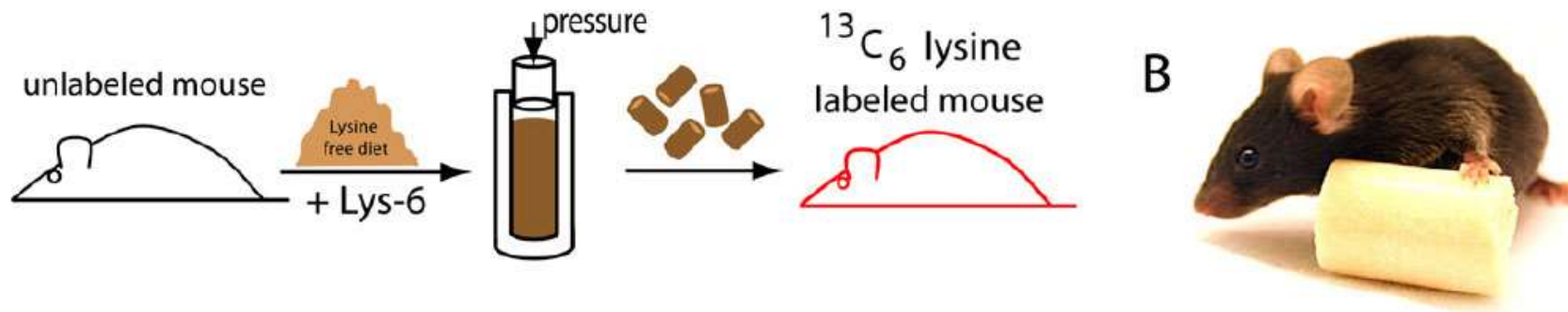
L-LYSINE:2HCL (4,4,5,5- D_4 , 96-98%) +4Da



L-Leucine ($^{13}\text{C}_6$, 99%) +6Da



SILAC MYŠ



F1 93% $^{13}\text{C}_6$ lysine

F2 97% $^{13}\text{C}_6$ lysine

F3-F4 téměř 100 % $^{13}\text{C}_6$ lysine

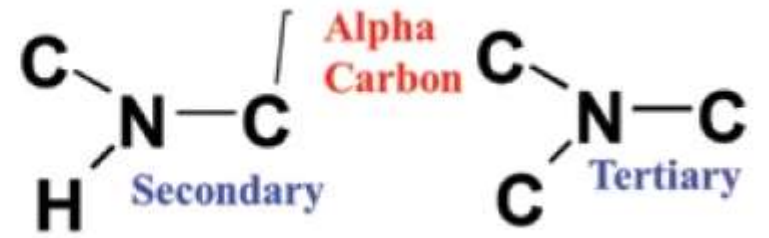
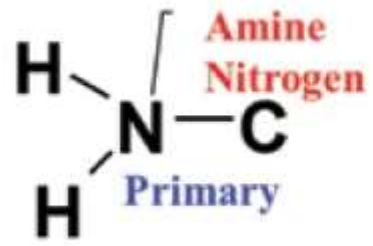
- Aminokyseliny jsou poskytnuty jako živina
- Musí se jednat o esenciální aminokyselinu
- Využití proteosyntetického aparátu k naznačení proteinů
 - Kultivace buněk v médiu s “těžkou” aminokyselinou
 - Po několika generacích (šesti) je kultura kompletně proznačena
 - Krmení zvířete krmivem s “těžkou” aminokyselinou
- Omezeno na bezsérové, nekomplexní médium/krmivo
- Při multiplexingu větším než 2 by odstup hmot by měl být alespoň 4Da
- Velmi přesný
 - Z uváděných metod nejpřesnější
 - Artefakty potlačeny i v průběhu lyze buněk a přípravy peptidů
 - Velmi drahý

Kvantifikace pomocí MS – stabilní izotopy

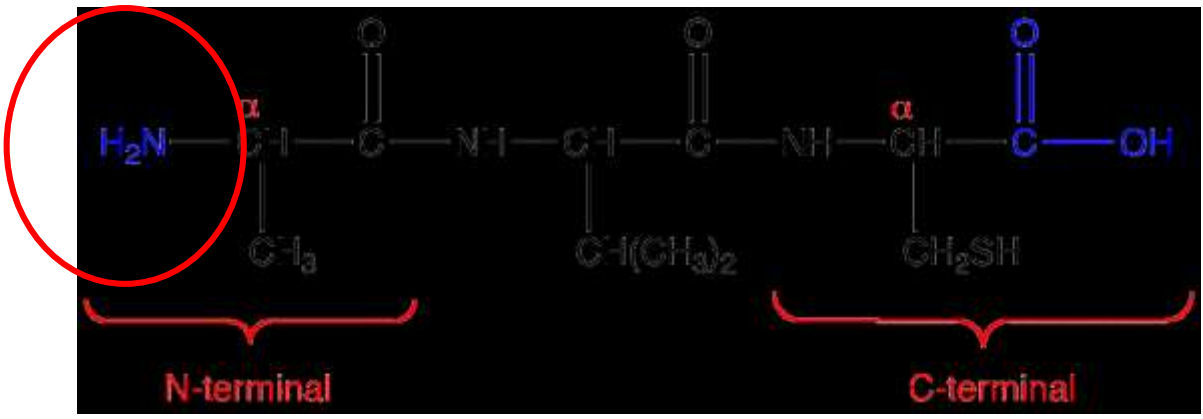
CHEMICKÉ

- **Dimethylation isotope labeling**

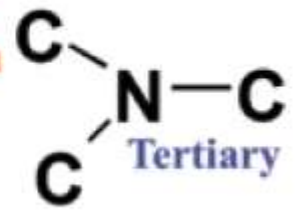
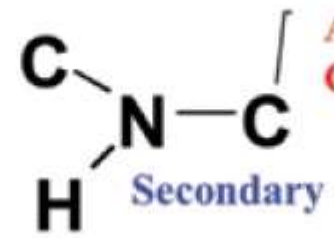
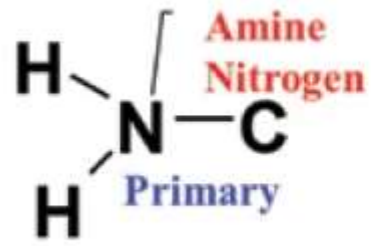
Primární amin



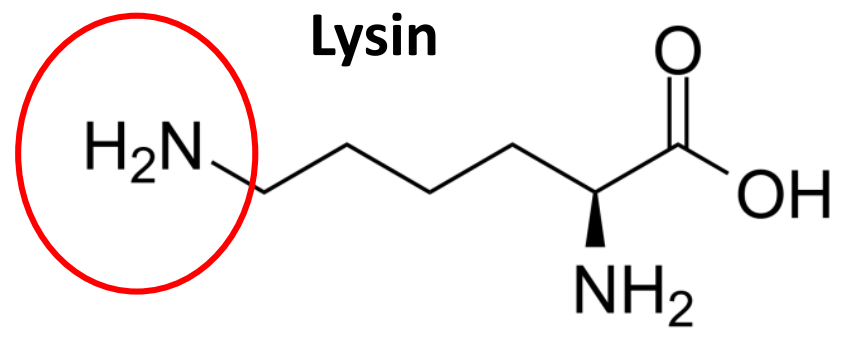
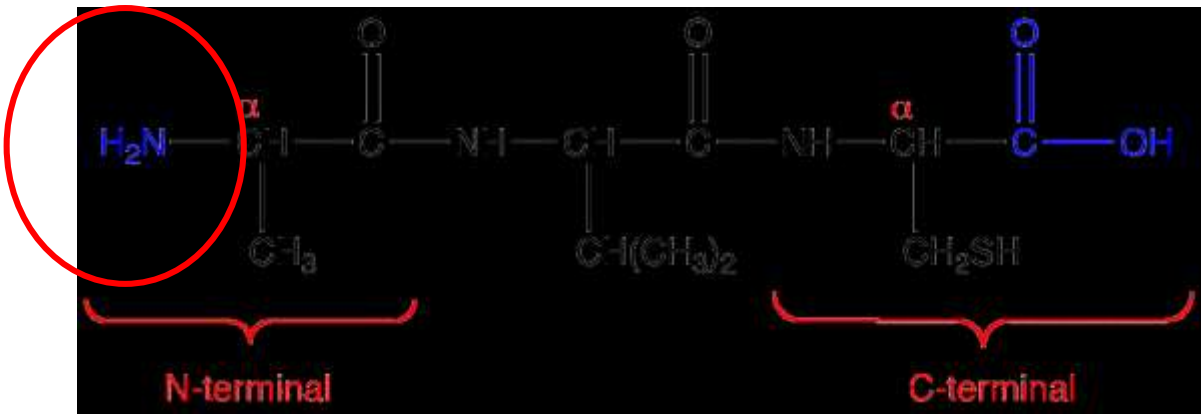
N Konec

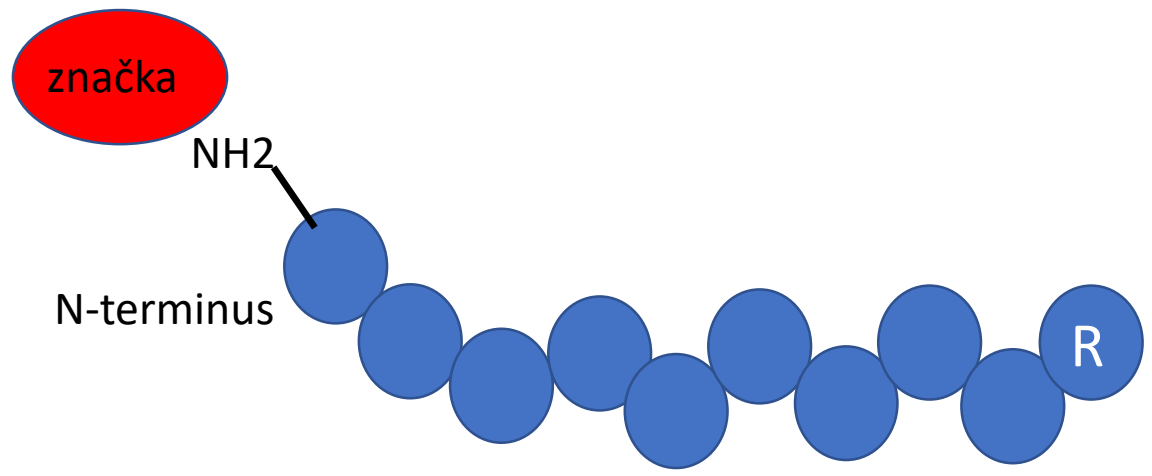
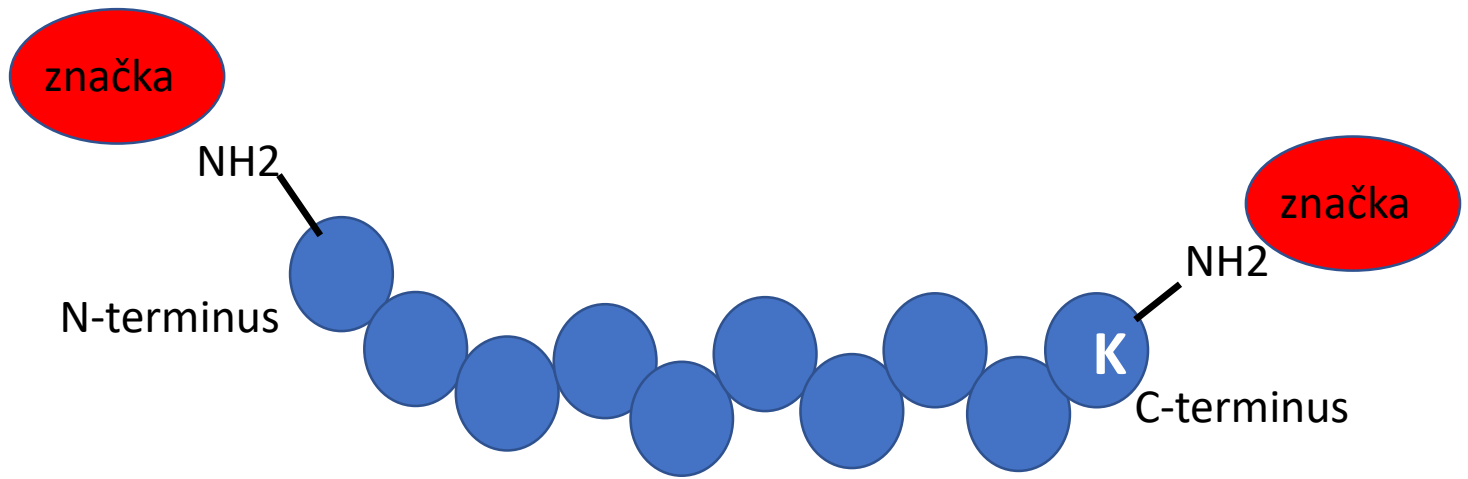


Primární amin

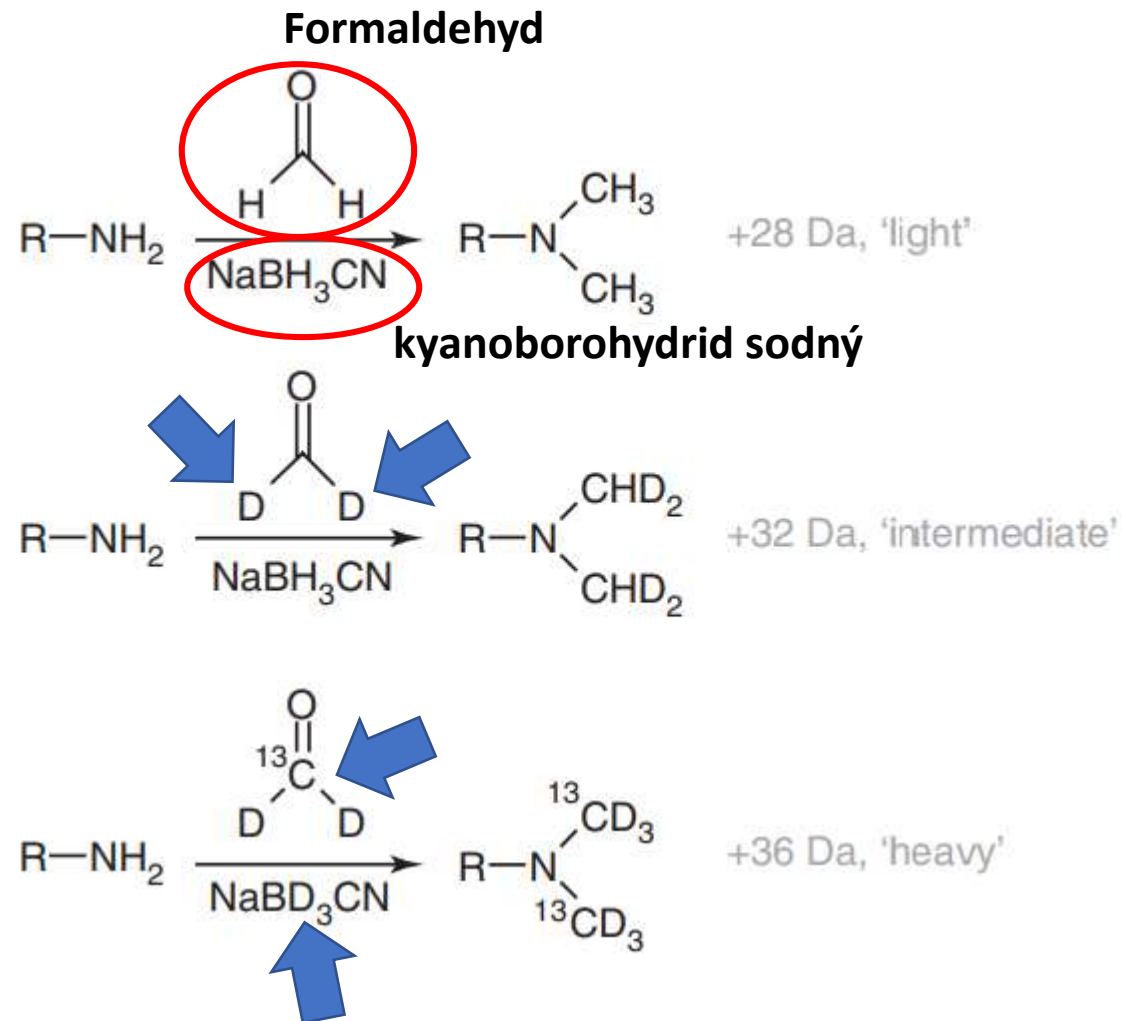


N Konec





Di-methylace



Kultivace



Izolace proteinů

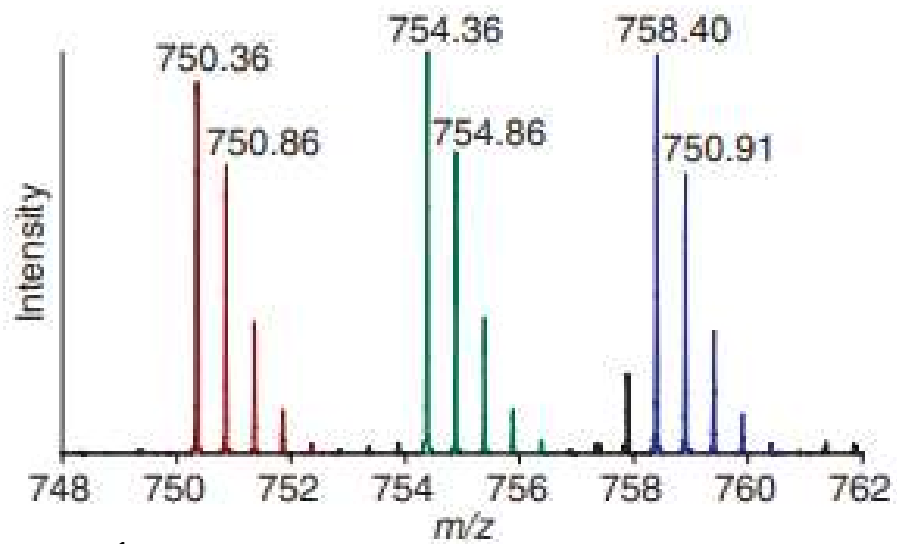
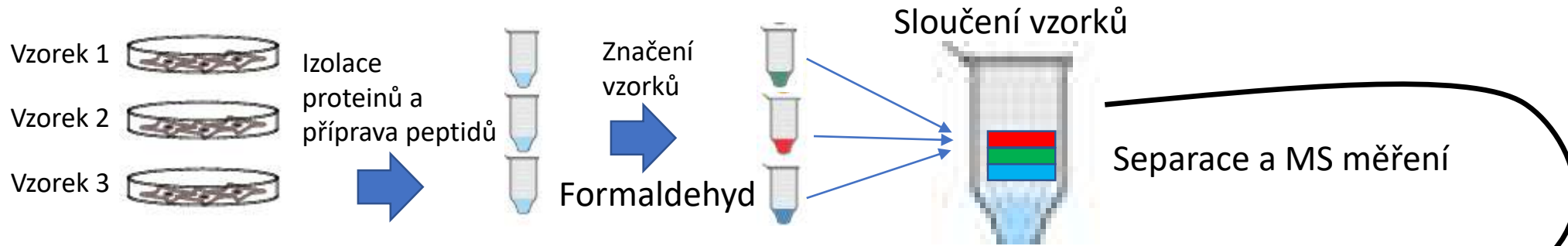


Štěpení a značení

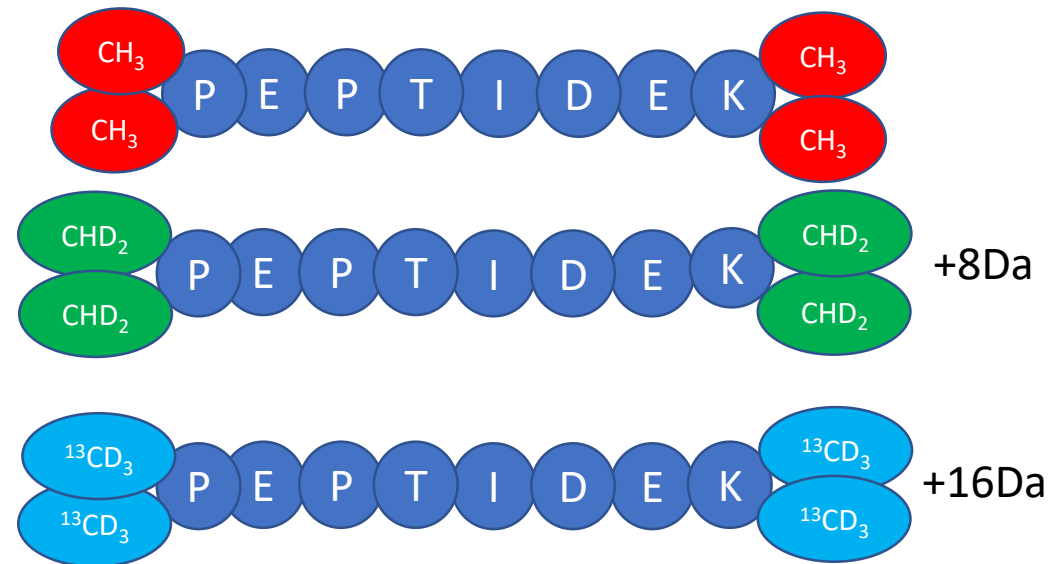


LC separace a MS





MS¹ precursor scan

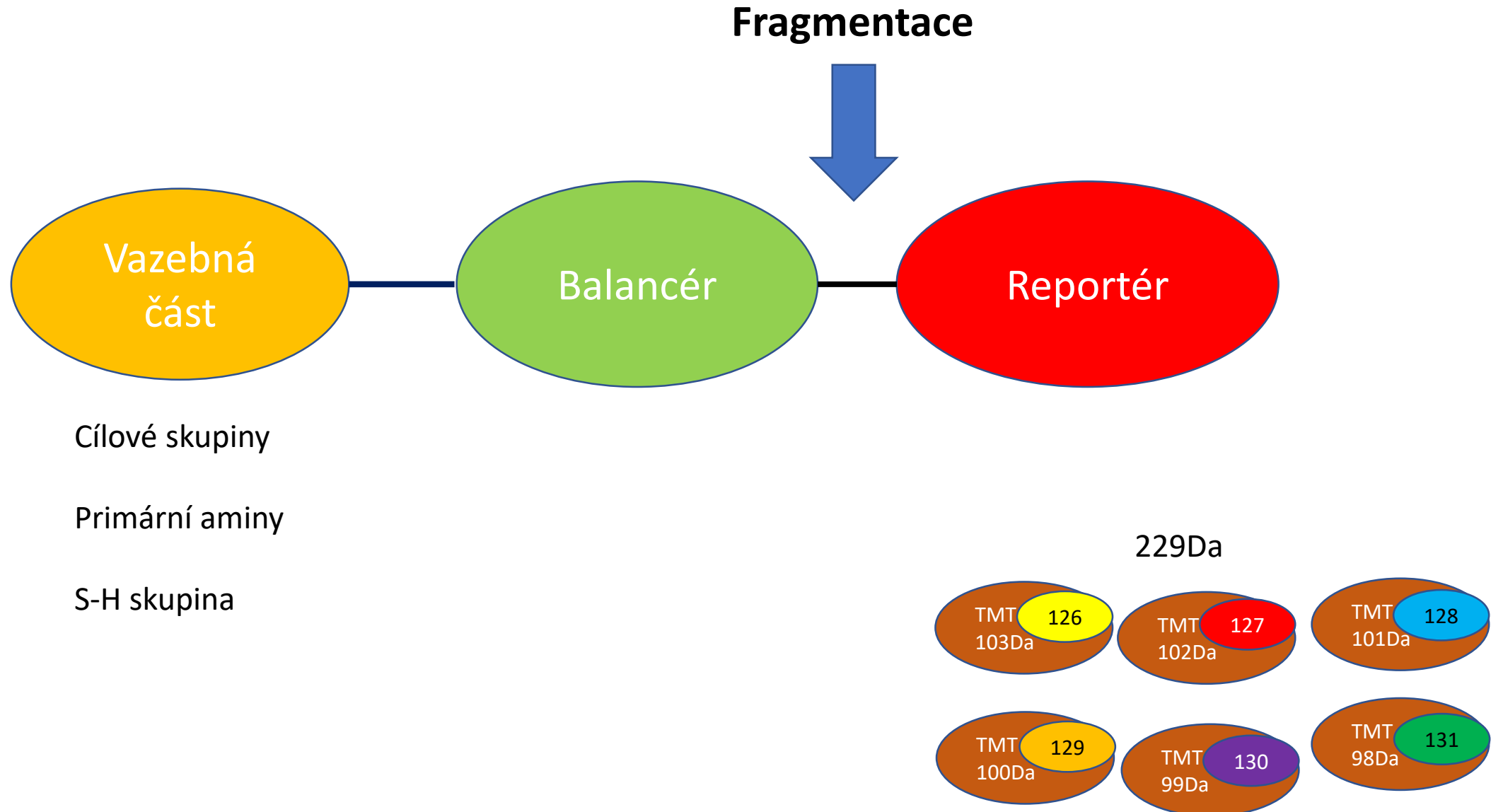


Kvantifikace pomocí MS – stabilní izotopy

CHEMICKÉ

- **TMT** – Tandem Mass Tags
- **iTRAQ** - Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation

Obecná struktura izobarických značek



- Vzorek 1
- Vzorek 2
- Vzorek 3
- Vzorek 4
- Vzorek 5
- Vzorek 6



Izolace
proteinů a
příprava peptidů



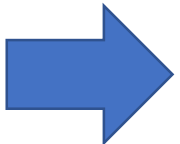
Značení
vzorků
TMT 6



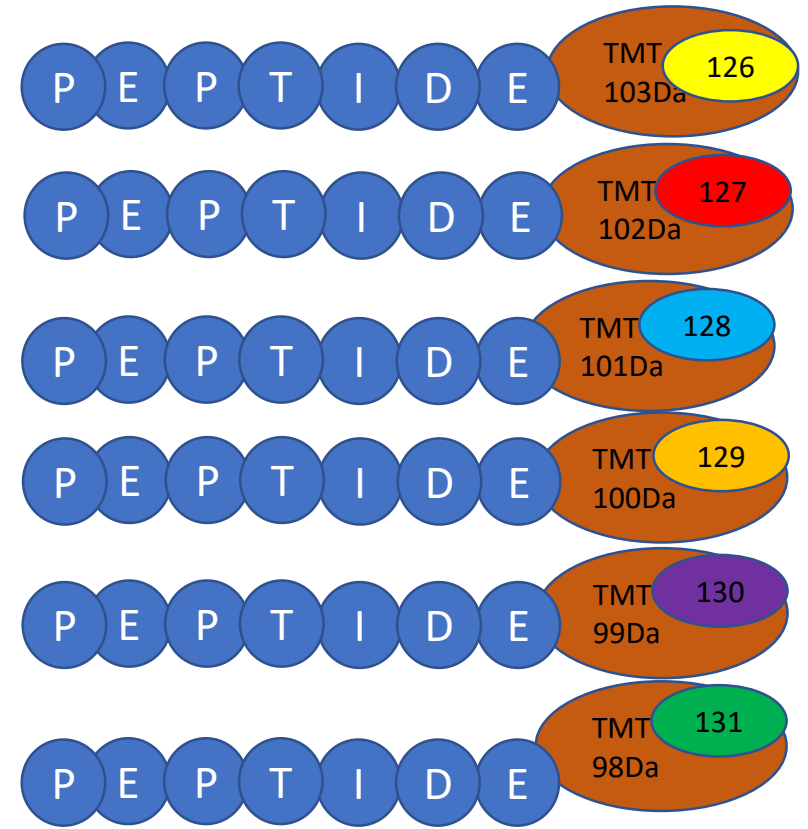
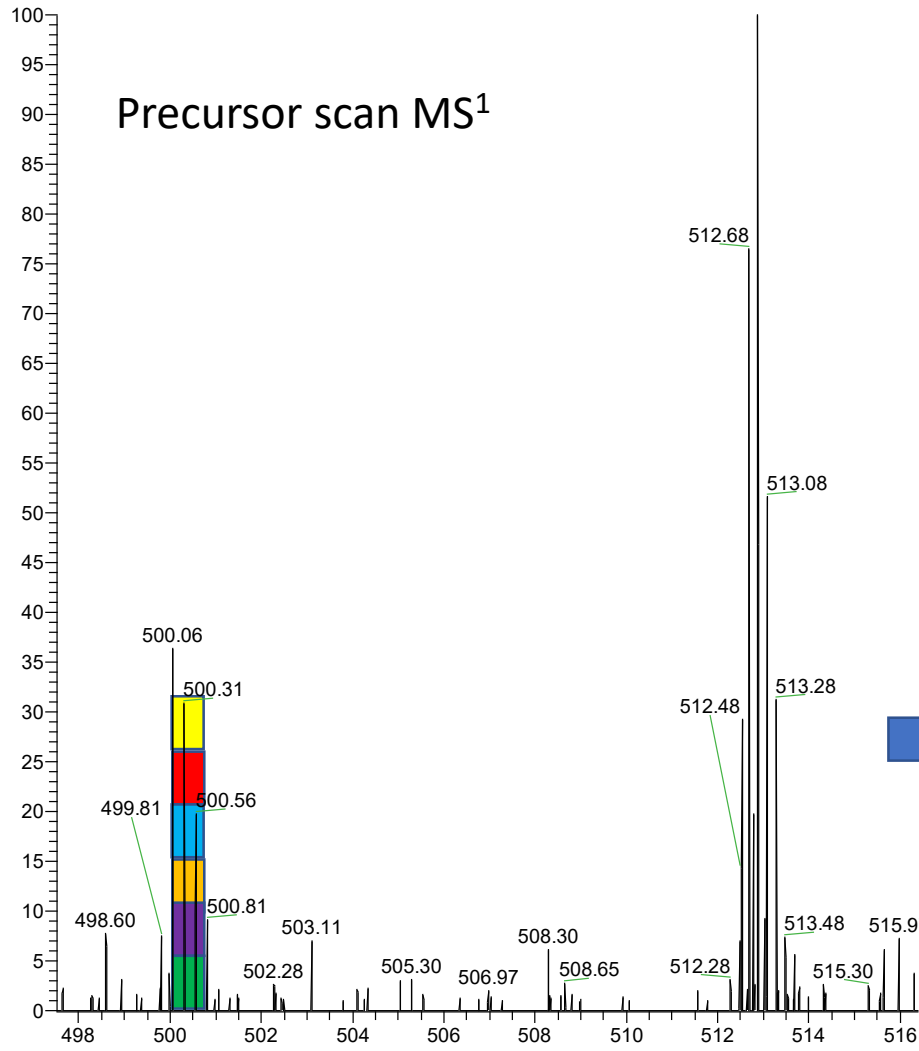
Sloučení vzorků

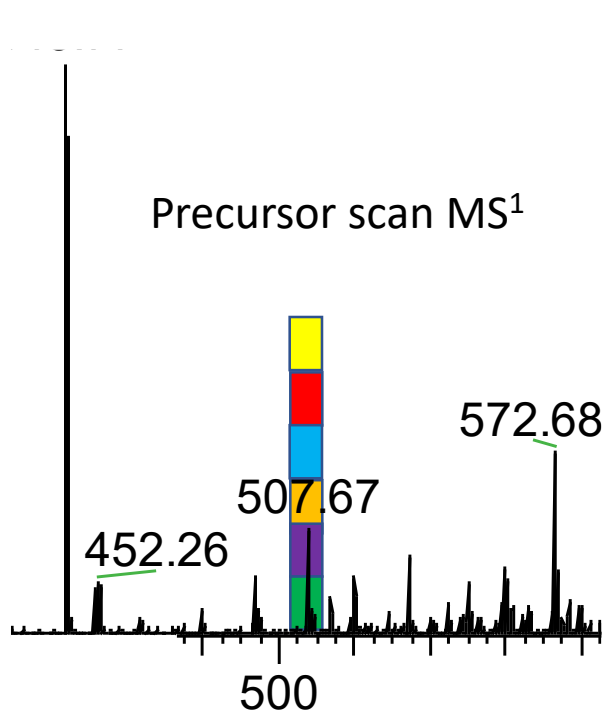


Separace a MS měření

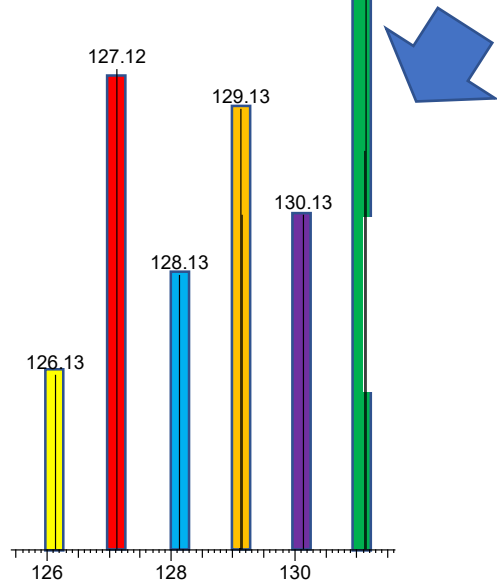
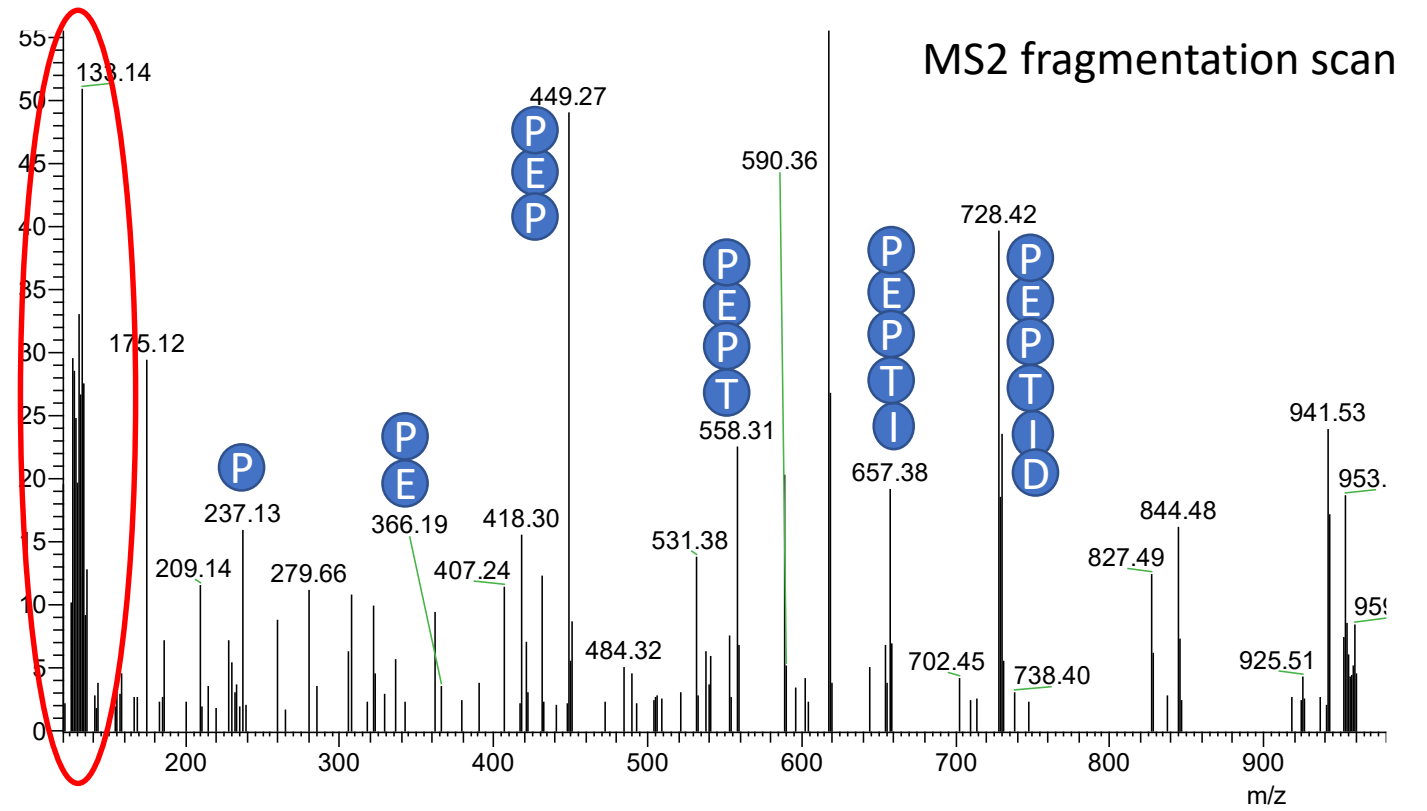
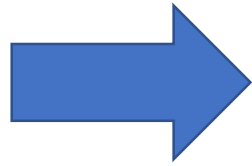


test-TMT_20231025121743 #35621 RT: 57.45 AV: 1 NL: 2.33E7
T: FTMS + p NSI Full ms [400.0000-1600.0000]

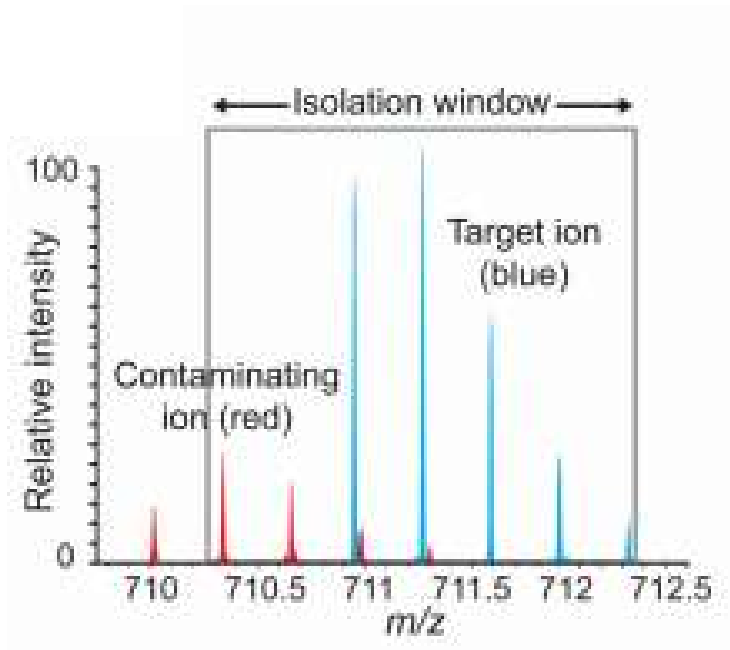




Fragmentace



Koizolace– zplošťování poměrů

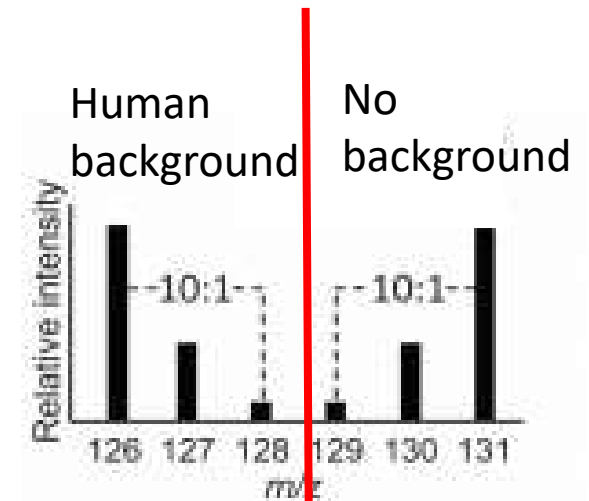


Přesnost měření je v milidaltonech
ale

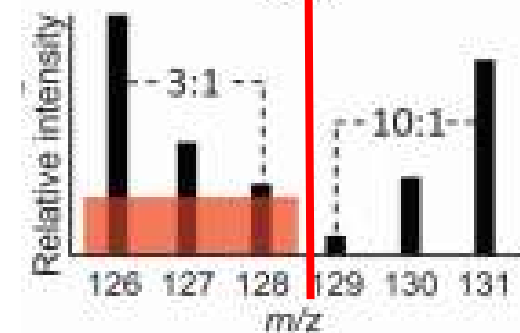
Izolace prekursoru v Daltonech

Vždy máme nějakou formu koizolace

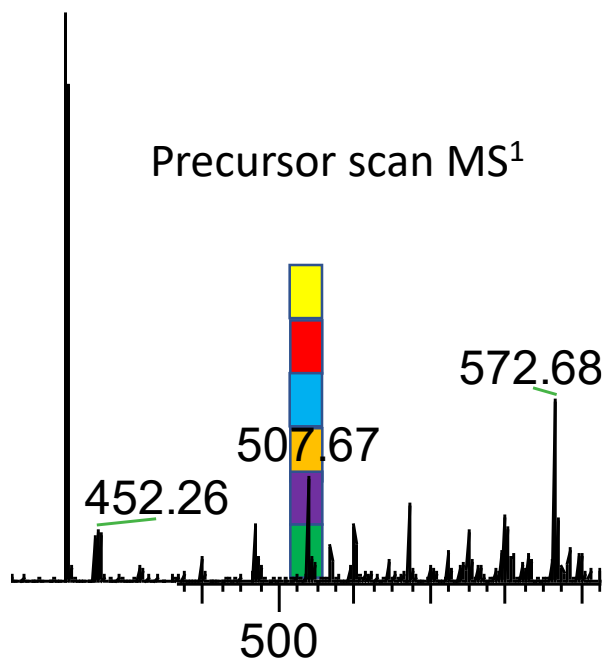
No interference



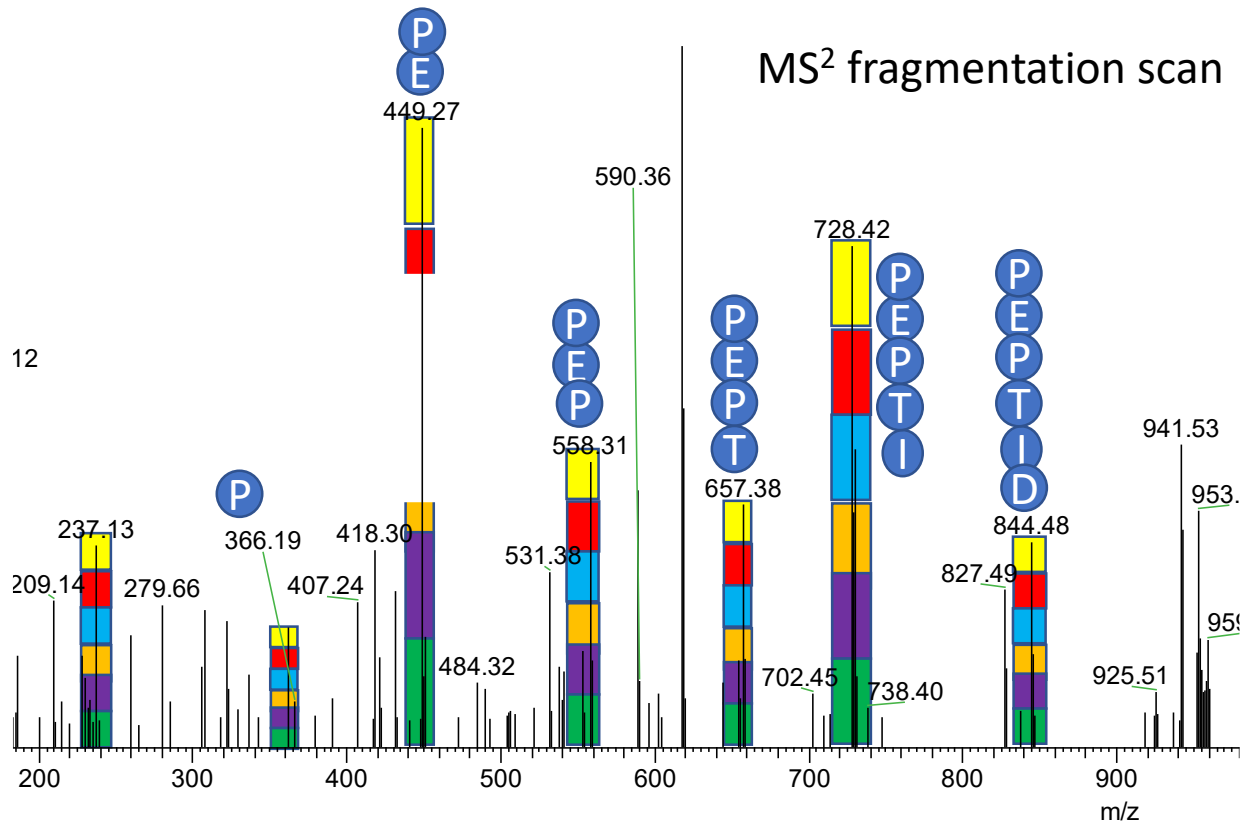
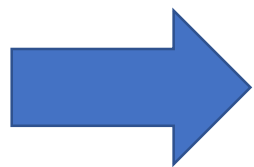
Typical interference



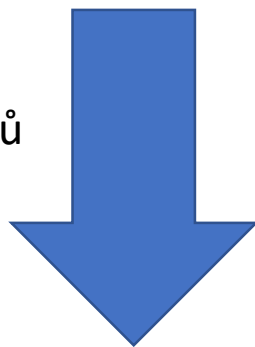
Jak by se šlo tohoto pozadí zbavit?



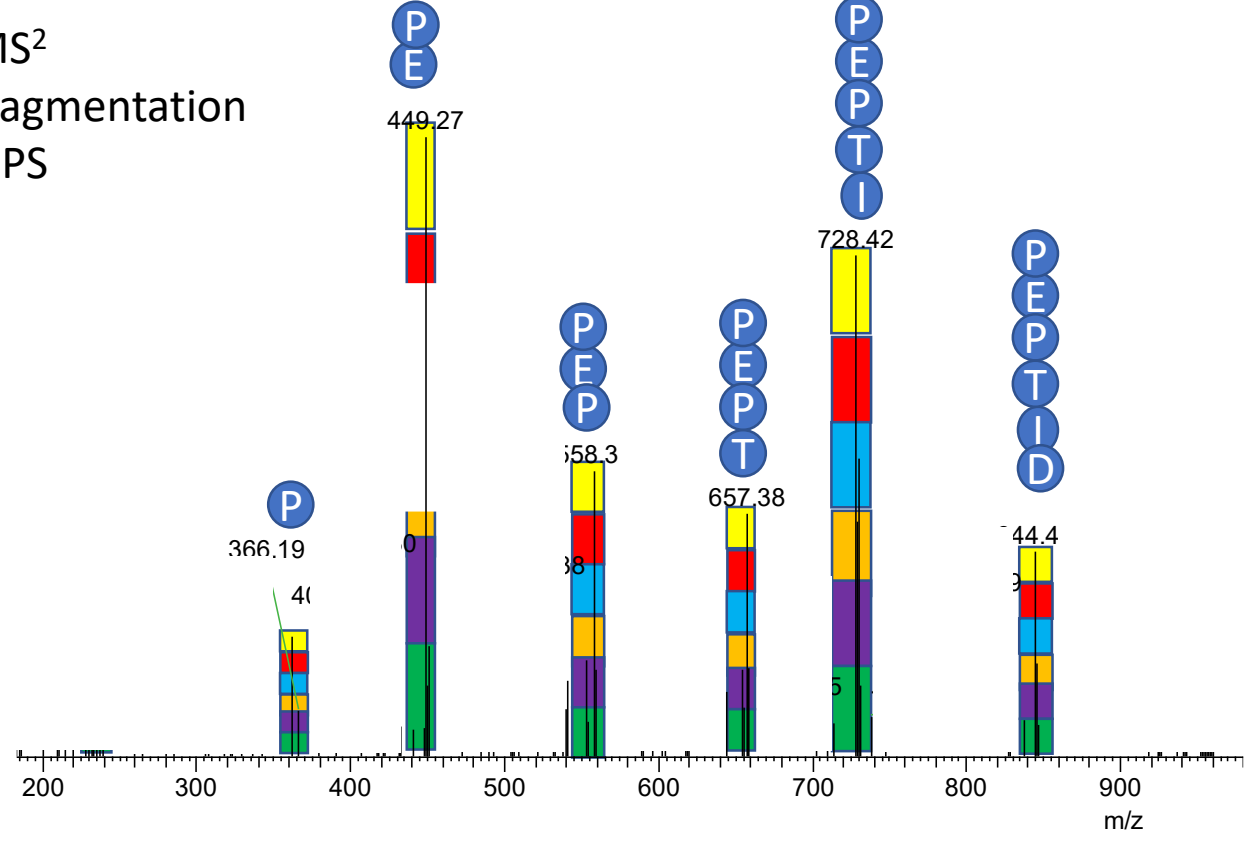
Fragmentace



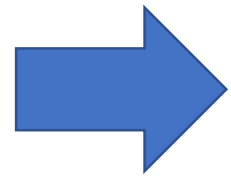
Synchronní izolace fragmentů



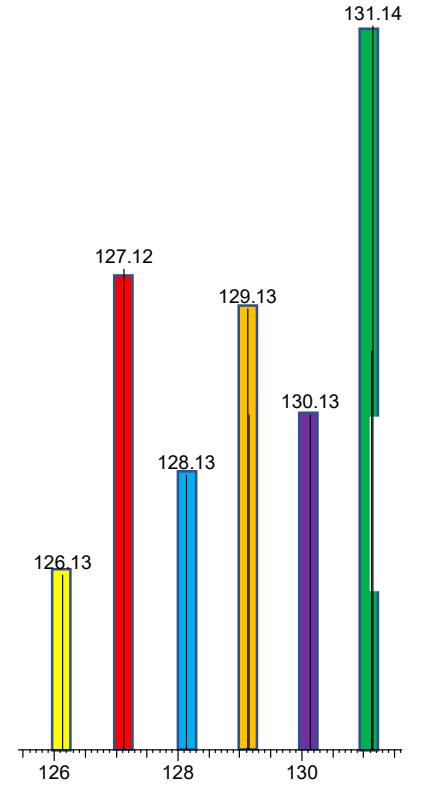
MS²
fragmentation
SPS



Fragmentace



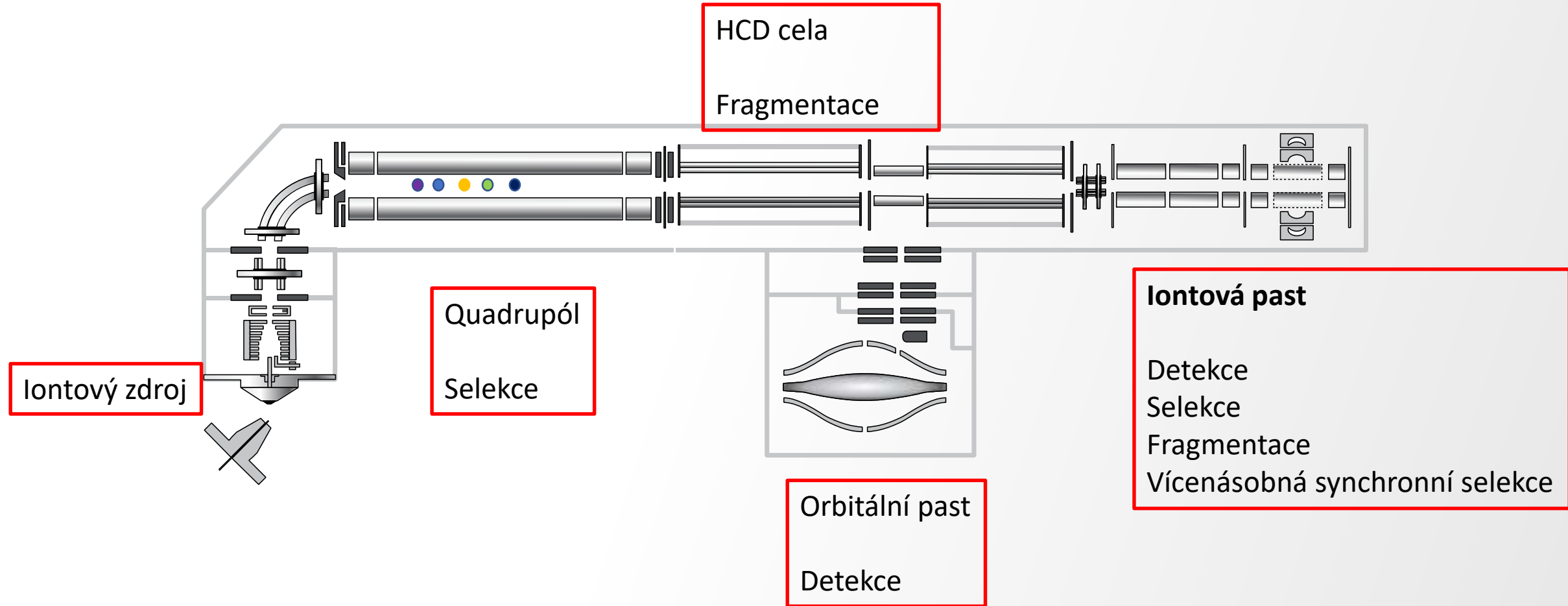
MS³ scan



SPS – synchronous selection precursor
Možnost vybrat více hmot najednou

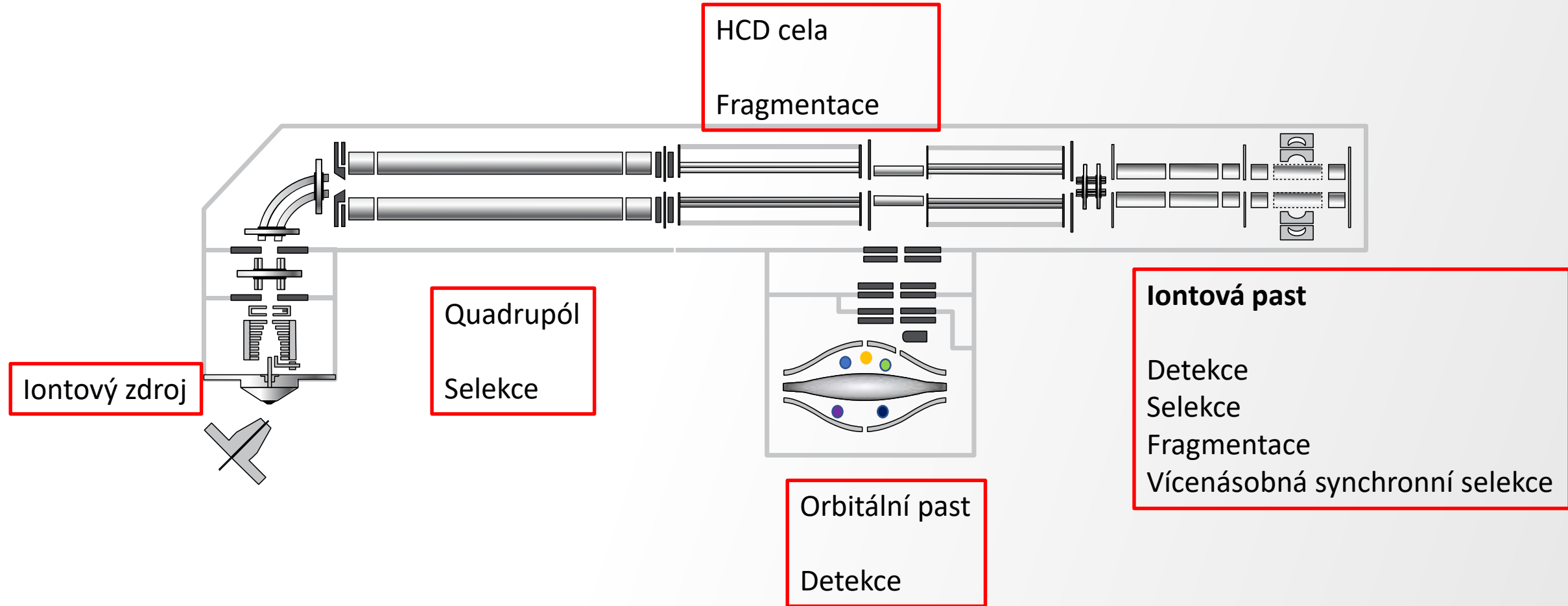
Tribridní Orbitrapy

● ● ● ● ● Prekurzory MS¹ scan



Tribridní Orbitrapy

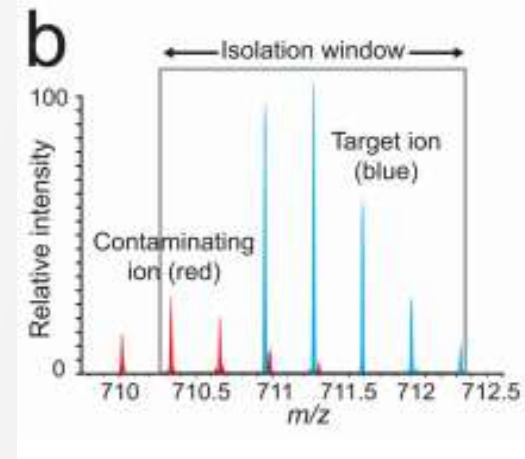
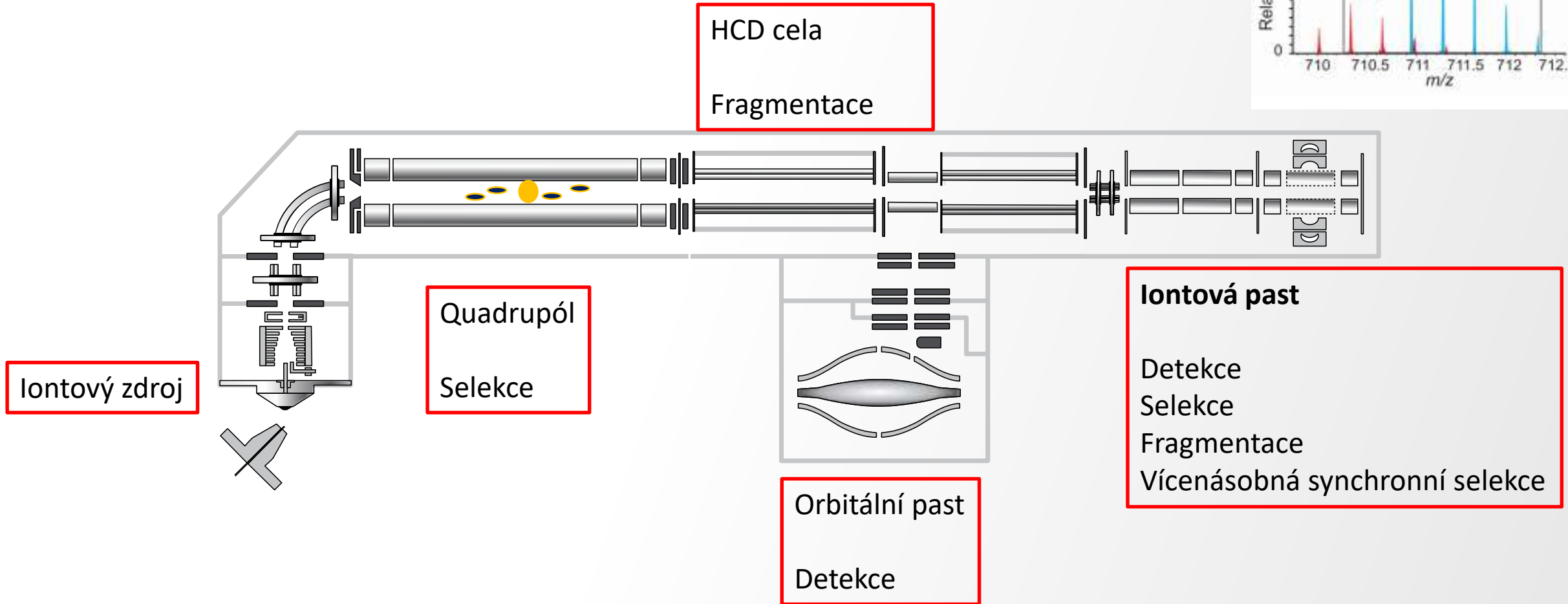
● ● ● ● ● Prekurzory MS¹ scan



Tribridní Orbitrapy

● Koizolované pozadi

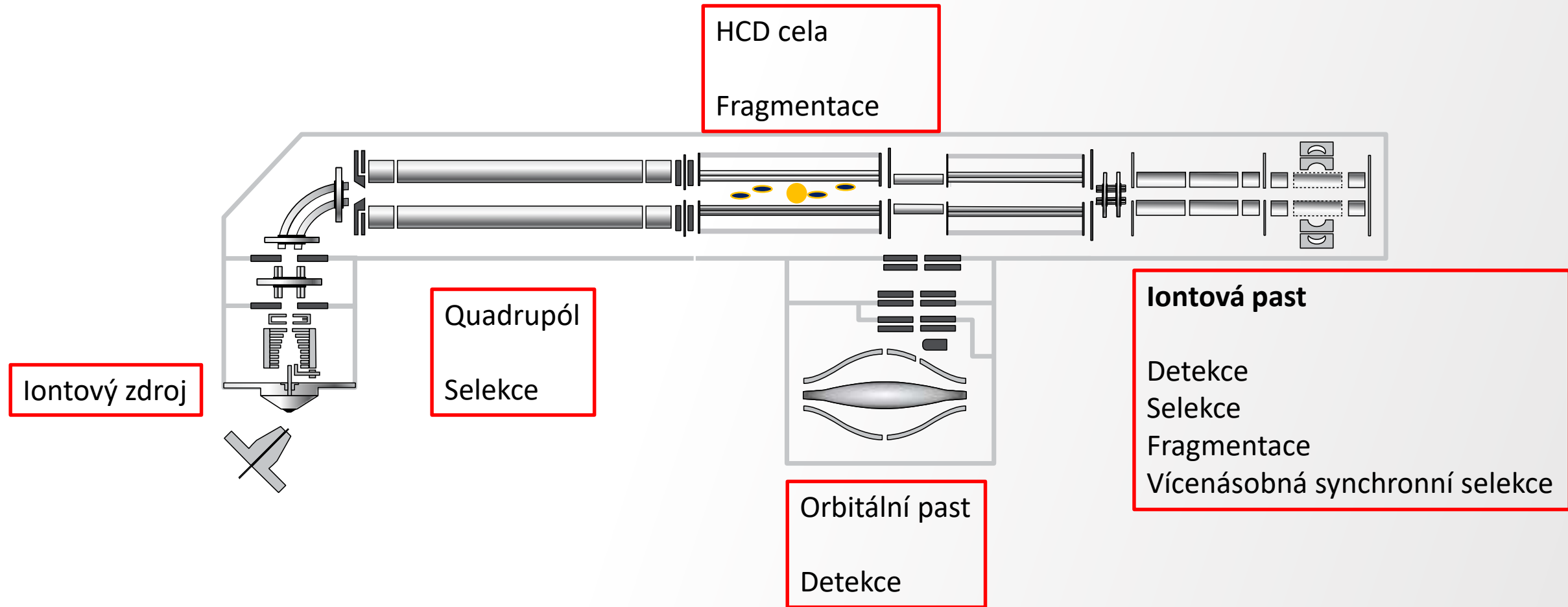
● Prekurzor



Tribridní Orbitrapy

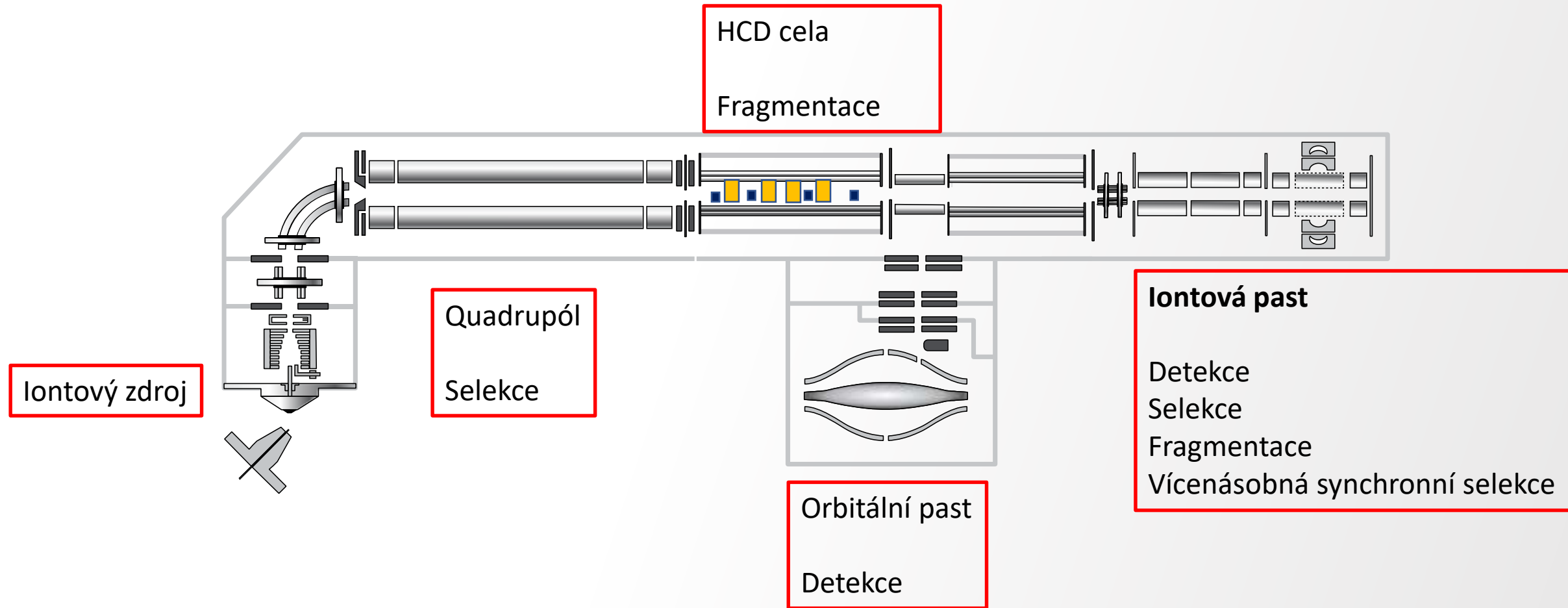
● Koizolované pozadi

● Prekurzor



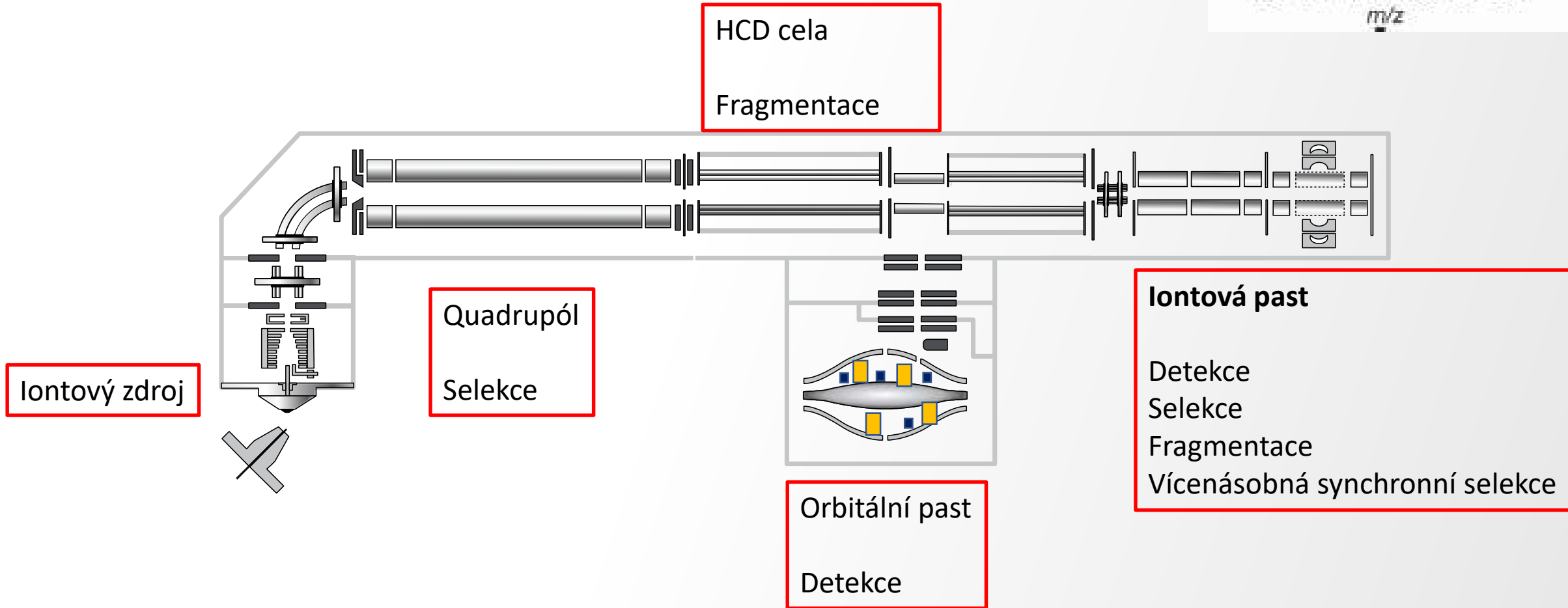
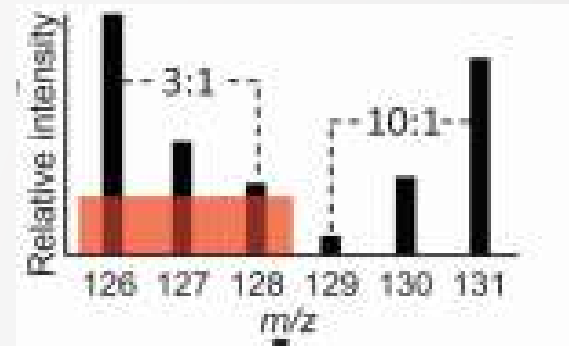
Tribridní Orbitrapy

- Fragменты прекурсора
- Fragменты позади



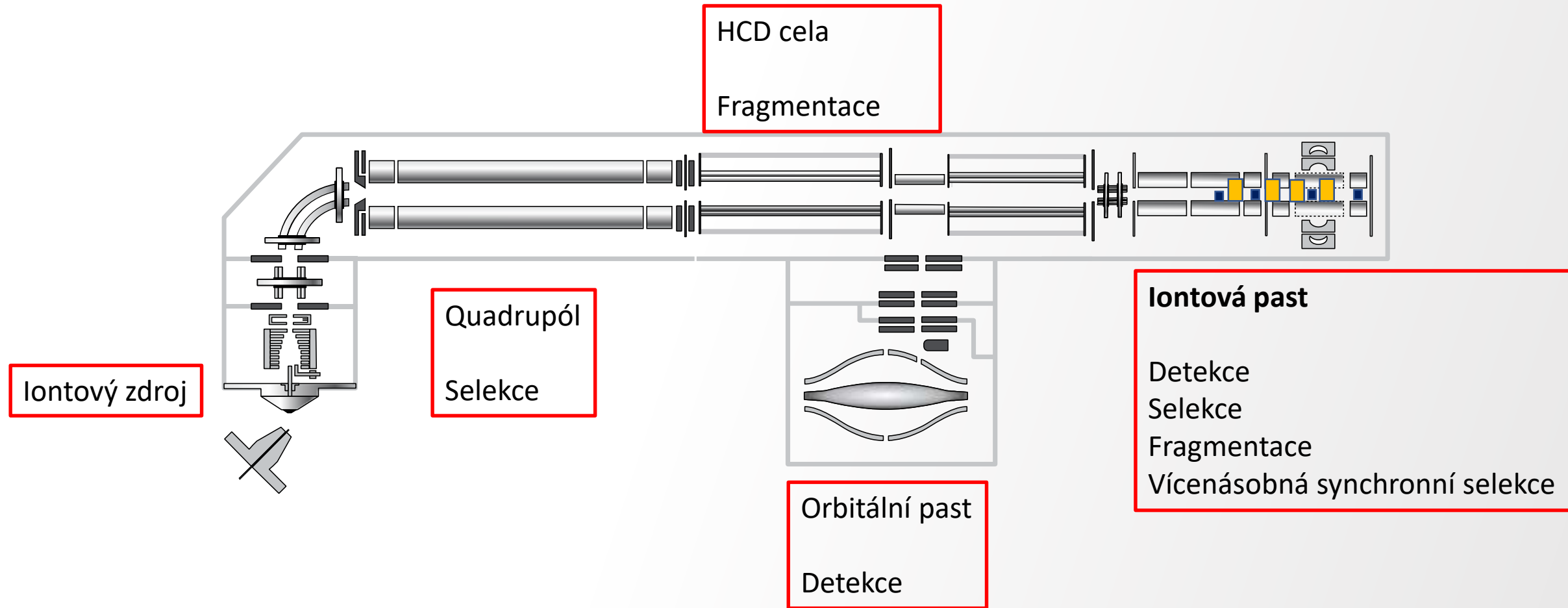
Tribridní Orbitrapy

- Fragmenty prekurzoru
- Fragmenty pozadi



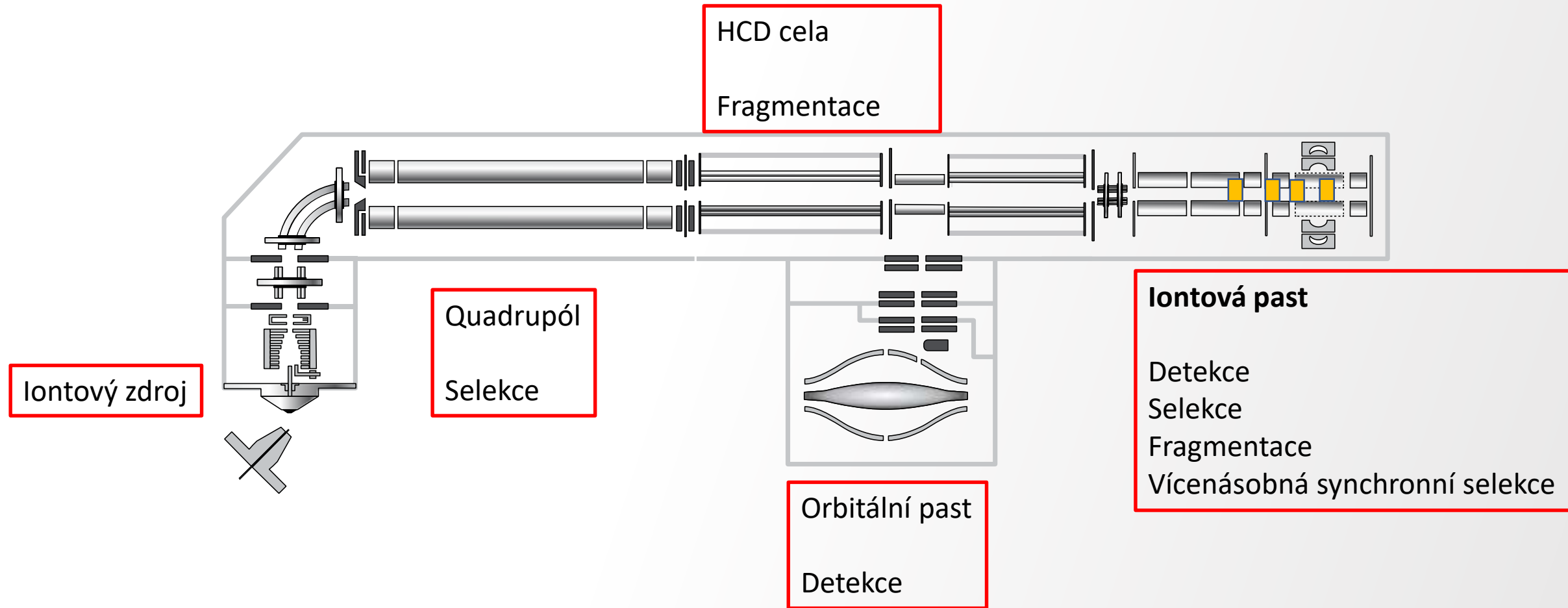
Tribridní Orbitrapy

- Fragmenty prekurzoru
- Fragmenty pozadi



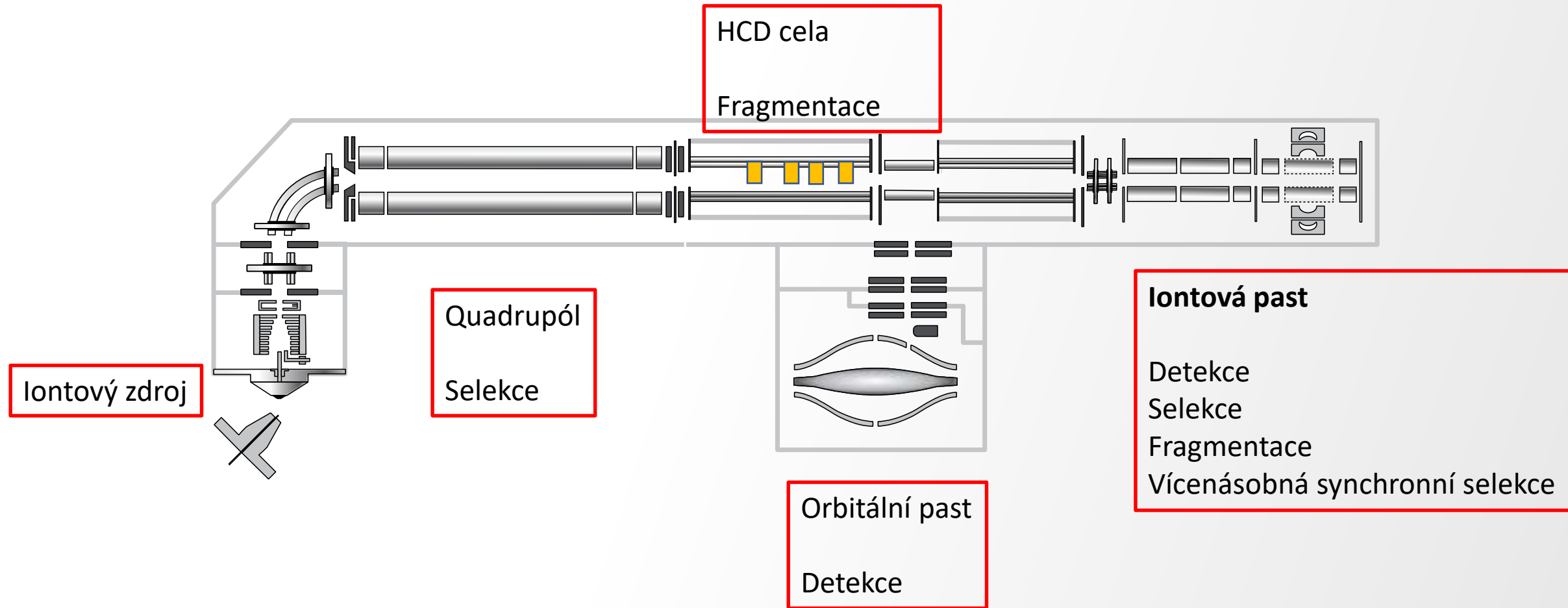
Tribridní Orbitrapy

■ Fragmenty prekurzoru

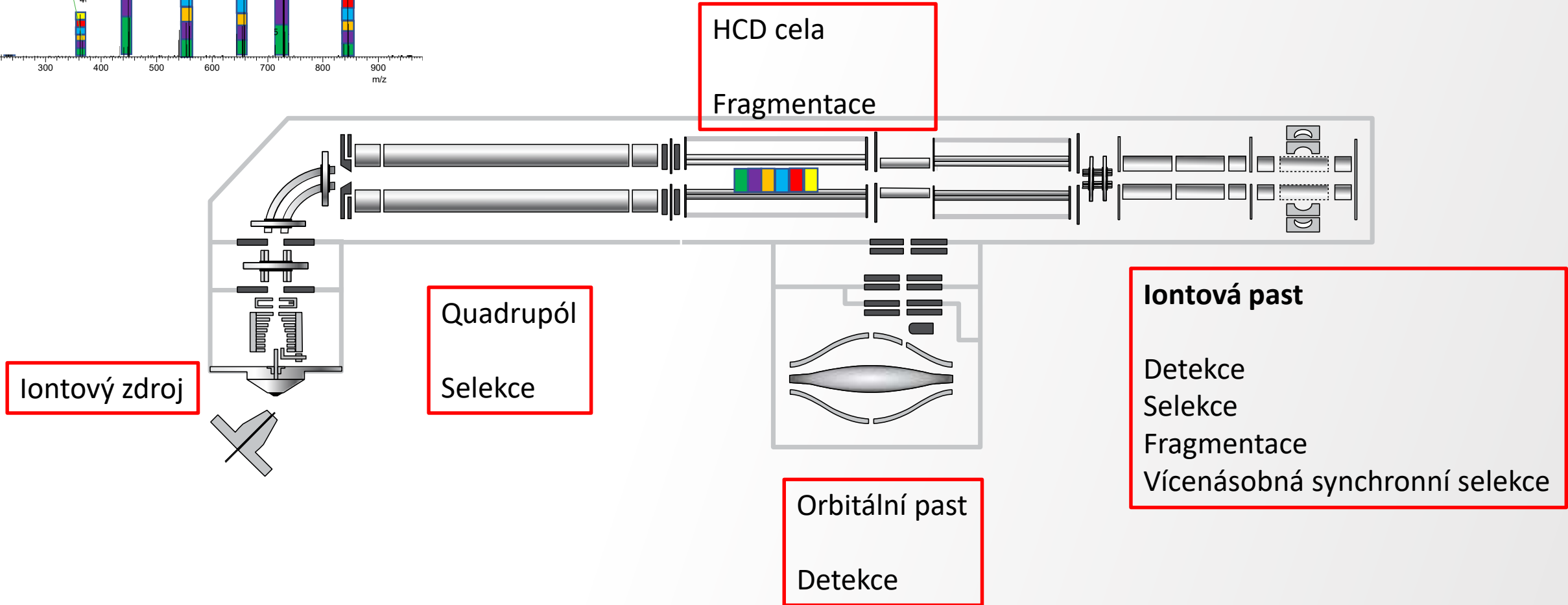
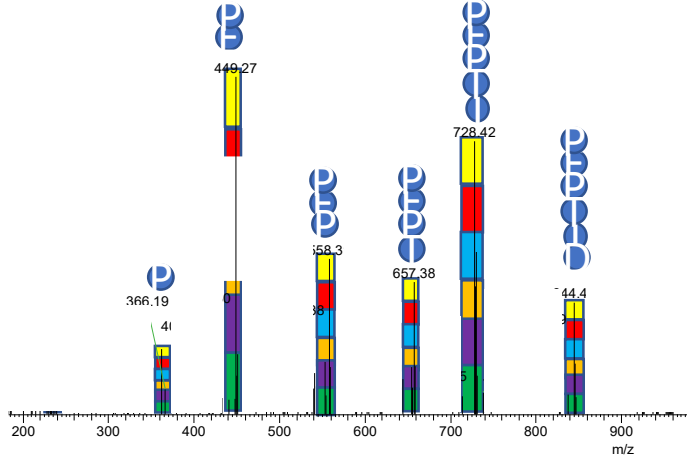


Tribridní Orbitrapy

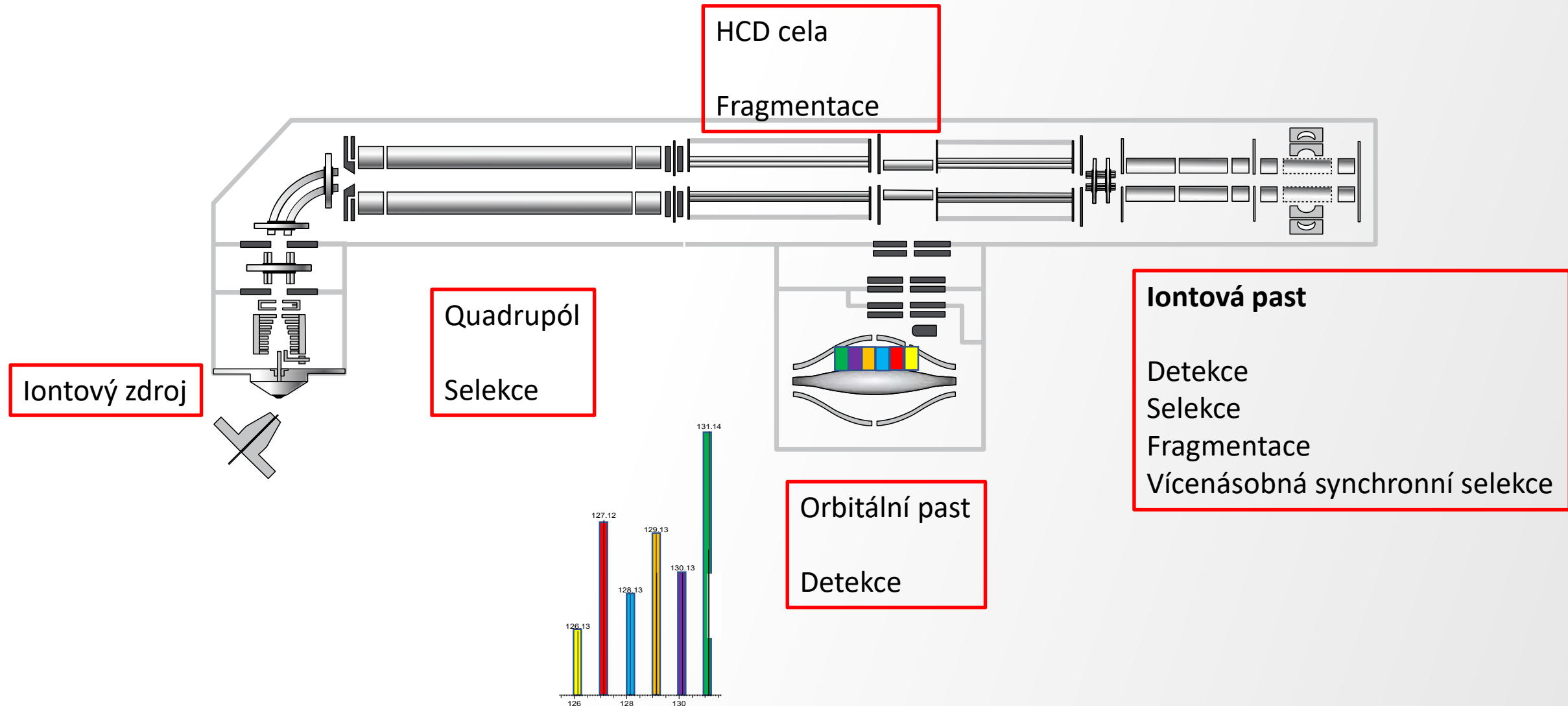
■ Fragменты прекурсора

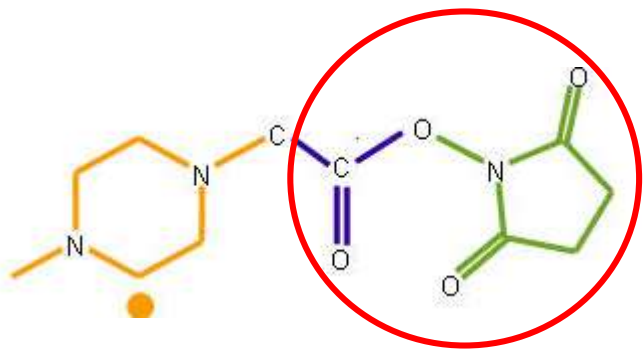


Tribridní Orbitrapy

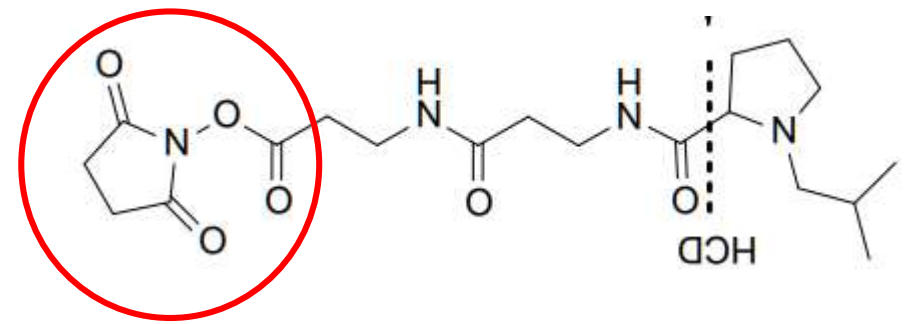


Tribridní Orbitrapy



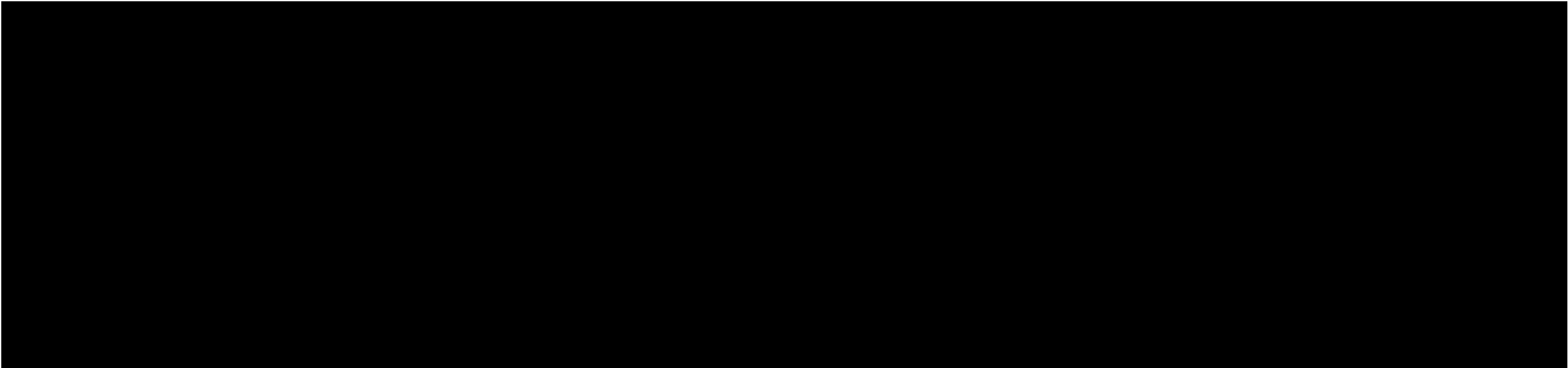


iTraq



TMT

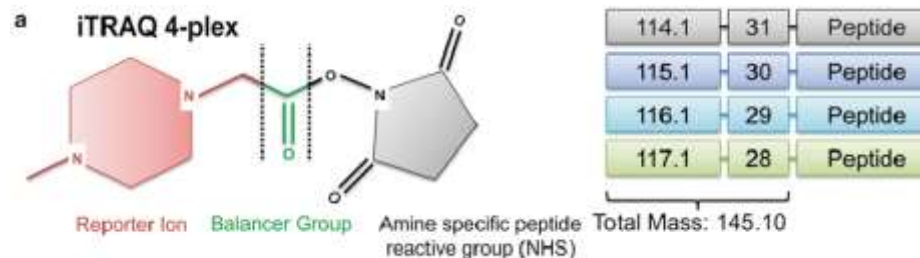
N-Hydroxysuccinimide (NHS) ester
Reakce s primárními aminy



iTRAQ a TMT

- iTRAQ

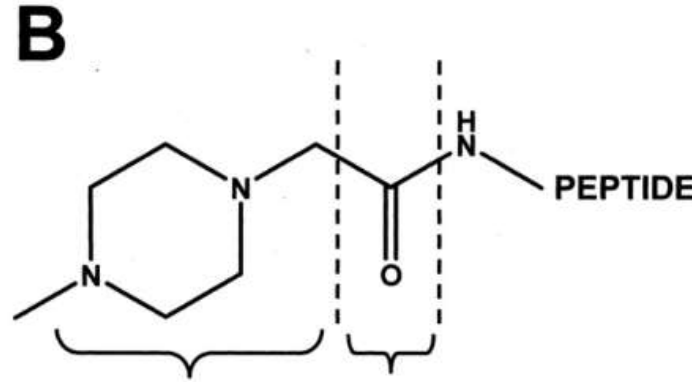
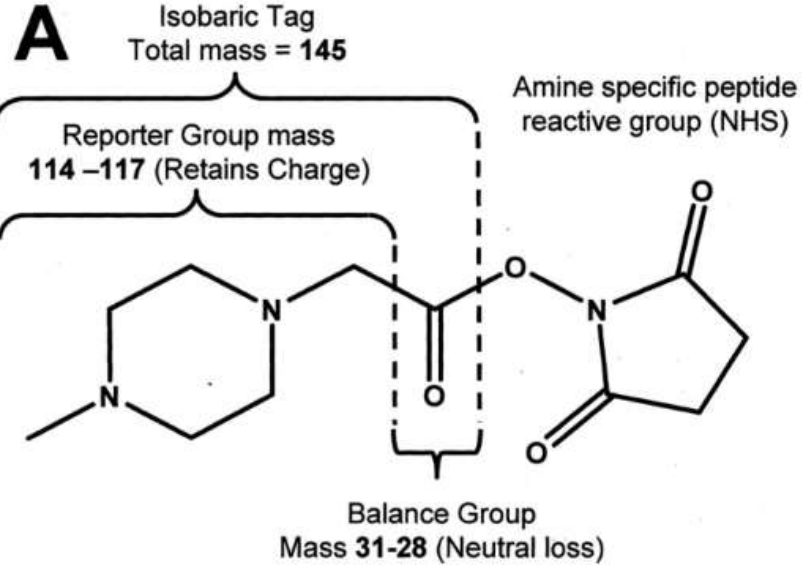
- Varianta pro 4 značky
- Varianta pro 8 značek
- Odstup značek 1Da
- Kompatibilní se všemi MS instrumenty



- TMT

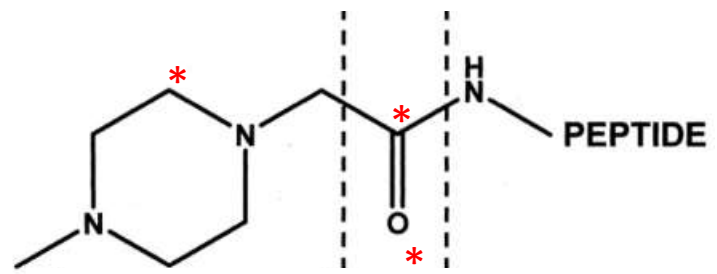
- Varianta pro 10 značek (odvozeno od dimethylpiperidine)
- Varianta pro 18 kanálů (odvozeno od prolinu)
- V plném počtu značek požaduje vysoké rozlišení
 - Není kompatibilní se všemi MS stroji



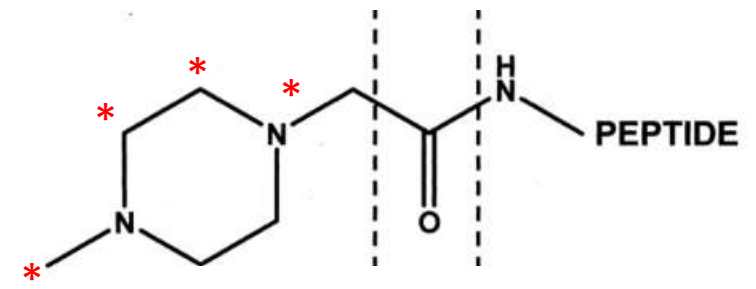


m/z 114 (+1)	¹³ C	¹³ C ¹⁸ O	(+3)
m/z 115 (+2)	¹³ C ₂	¹⁸ O	(+2)
m/z 116 (+3)	¹³ C ₂ ¹⁵ N	¹³ C	(+1)
m/z 117 (+4)	¹³ C ₃ ¹⁵ N		(+0)

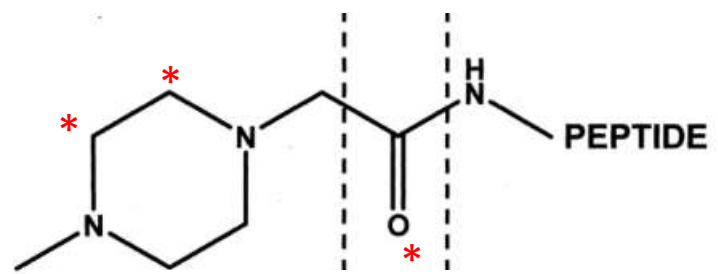
iTRAQ 4plex



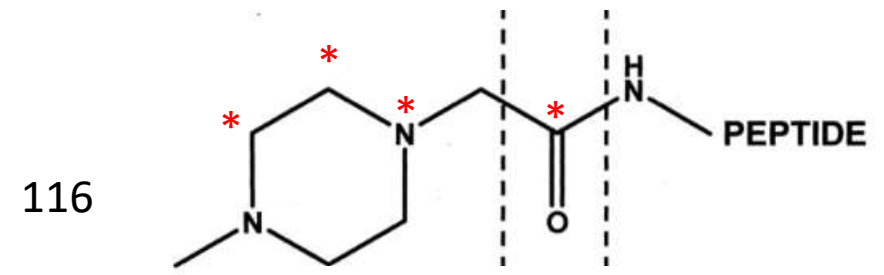
114



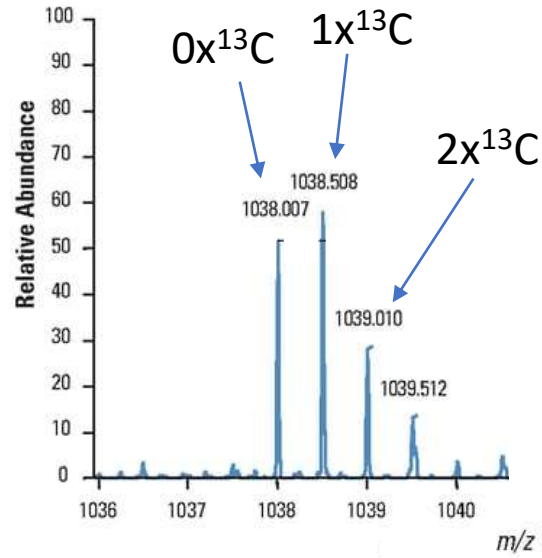
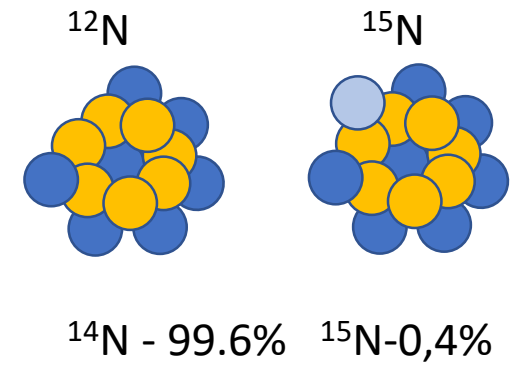
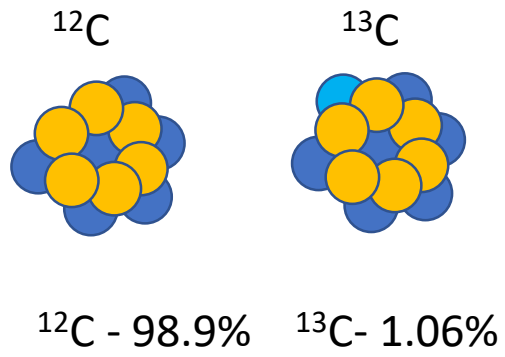
117



115



116



Není neutron jako neutron
Neutron v ^{13}C je nepatrně těžší než ten v ^{15}N

●
1.003355Da

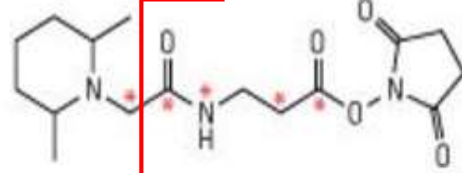
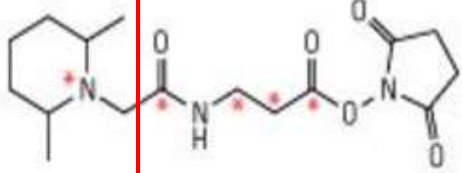
●
0.997035Da

Rozdíl hmot 0.00632 Da

Izobarické značky TMT
(ThermoScientific)
10 plex

1N

127N

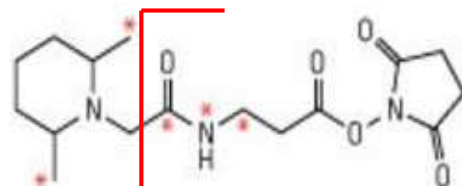
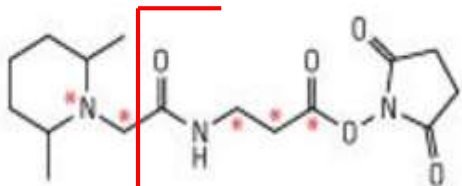


127C

1C

1N1C

128N

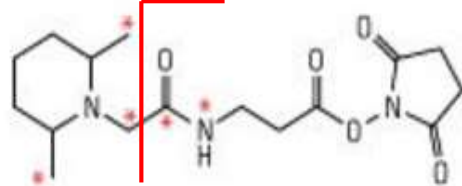
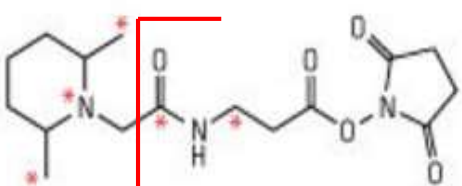


128C

2C

1N2C

129N

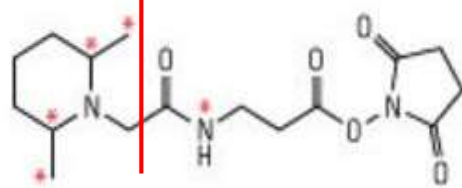
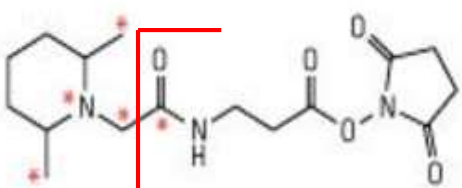


129C

3C

1N3C

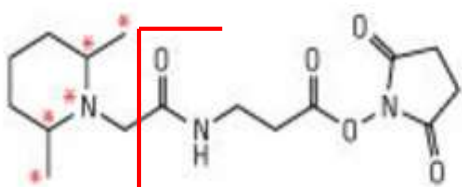
130N



130C

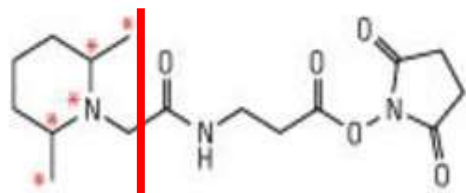
4C

131

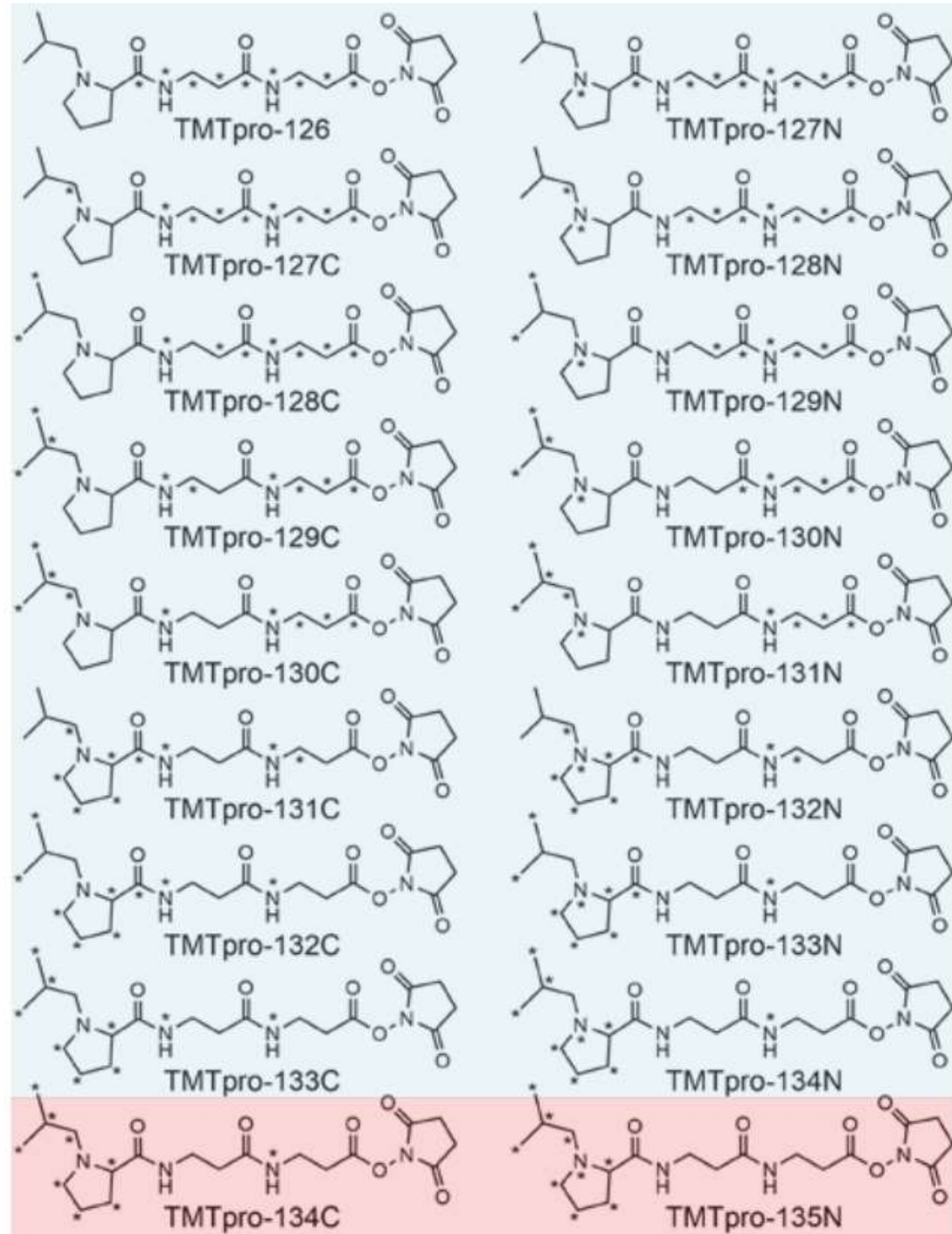
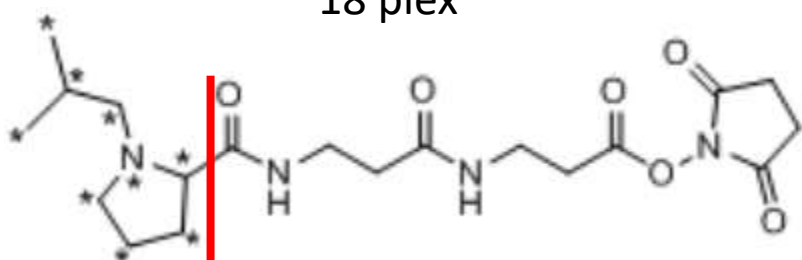


Izobarické značky TMT
(ThermoScientific)
18 plex, 2021

10 plex



18 plex



Kvantifikace pomocí MS – stabilní izotopy

METABOLICKÉ

SILAC

jen živé buňky, metabolické značení, kvantifikace MS,

CHEMICKÉ

dimetylace

značí aminoskupiny, značení na úrovni peptidů, kvantifikace MS, možno i v DIA , maximálně 3 kanály

**iTRAQ
TMT**

značí aminoskupiny, značení na úrovni peptidů, multiplex, kvantifikace až při MS/MS, případně při MS³, nízké množství missing values

Kvantifikace v proteomice

Metabolické značení

Chemické značení

LFQ/DIA

Kultivace



Izolace proteinů



Štěpení



Značení



Frakcionace



LC separace a MS



shot-gun metody (pros and cons)

- **až 10 000 proteinů v jednom experimentu**
 - **Není jistota, že protein zájmu bude detekován**
- 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 většiny informace o proteoformách**

Cílená analýza

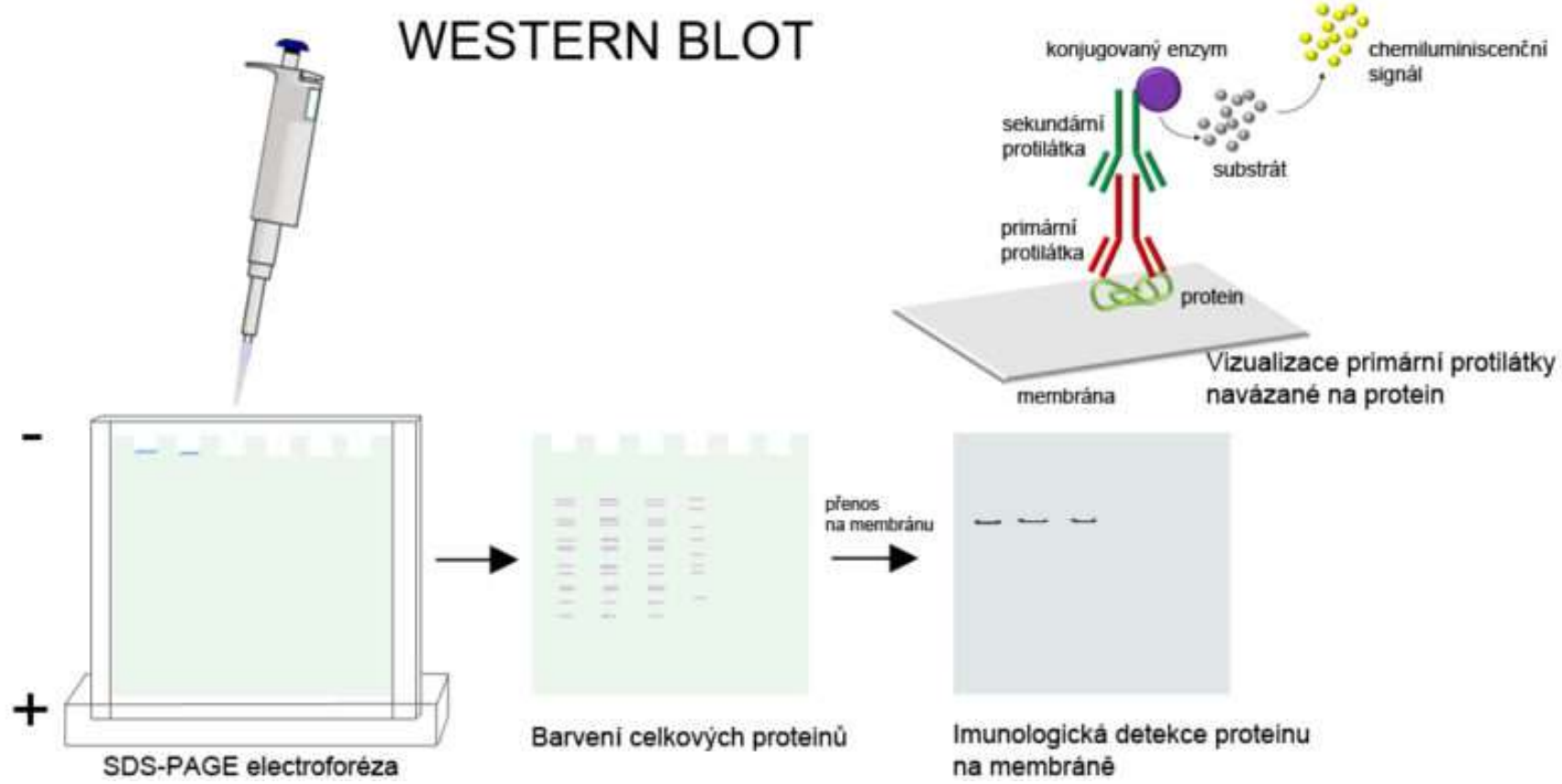
Víme co hledáme

- Necílená proteomika – 2 podmínky a hledáme co se mění

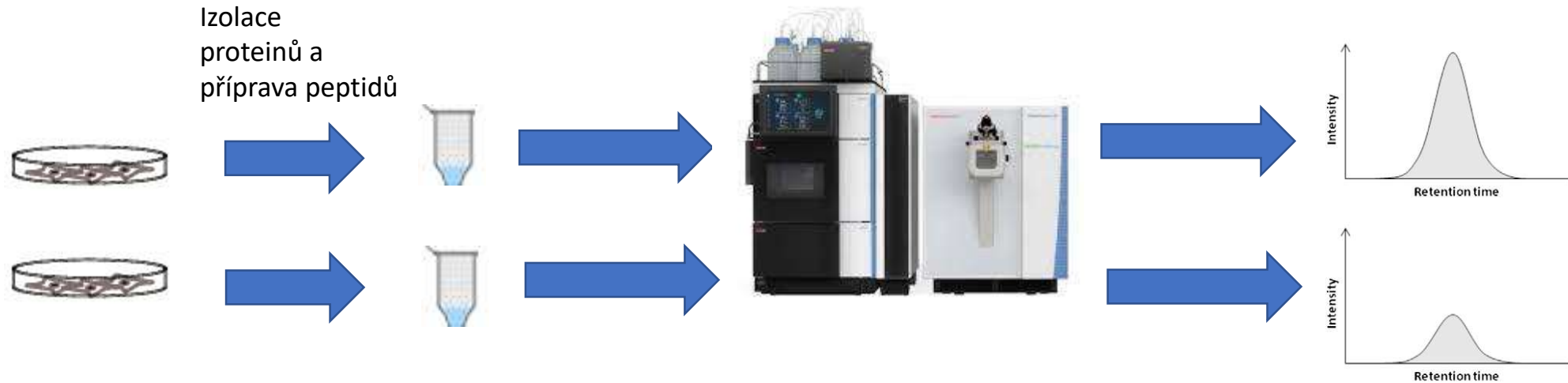
X

- Cílená proteomika – víme co hledáme
 - Sledujeme přítomnost/nepřítomnost konkrétního proteinu
 - Sledujeme míru změny

WESTERN BLOT



Izolace proteinů a příprava peptidů



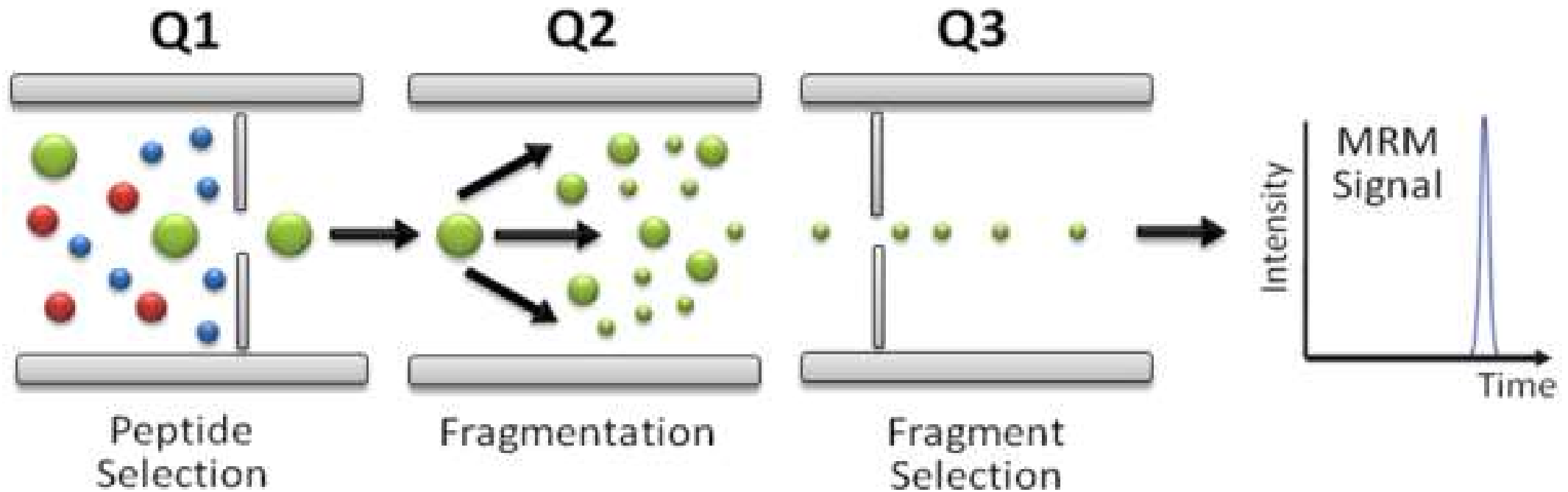
Cílená kvantifikace **x** necílená kvantifikace

- Vyšší přesnost
 - Sledujete plochu po peakem, dostatečný počet bodů přes peak
- Vyšší reproducibilita
 - Vždy v daný čas sledujete určený prekurzor, metoda není stochastická
- Vyšší citlivost
 - Sledujete omezený počet prekurzorů - lze na nich strávit více času
- Vyšší selektivita
 - Ladíte MS instrument na jeden konkrétní prekurzor
- Instrumentální univerzálnost
 - Lze měřit na mnoha typech MS instrumentů dle varianty metody
 - Použití i s klasickým HPLC

Selected reaction monitoring - SRM

Když to opakují pro několik fragmentů

Multiple reaction monitoring - MRM



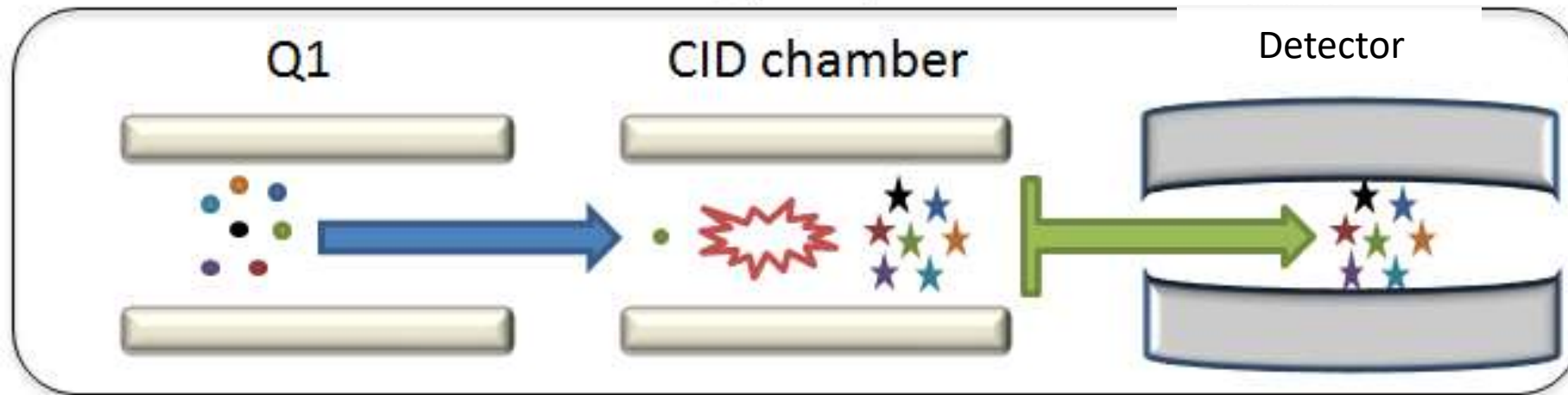
Metoda je proveditelná na trojitých quadrupólech

SRM selected reaction monitoring

- Původní varianta metody
- Určeno pro trojité quadrupóly
 - Relativně levný instrument
- Sledujeme fragment vzniklý z prekurzoru
 - Dvojitě filtrování – prekurzor na Q1 a fragment na Q3
 - Velmi specifické
 - Velmi citlivé

PRM

Parallel reaction monitoring (PRM)



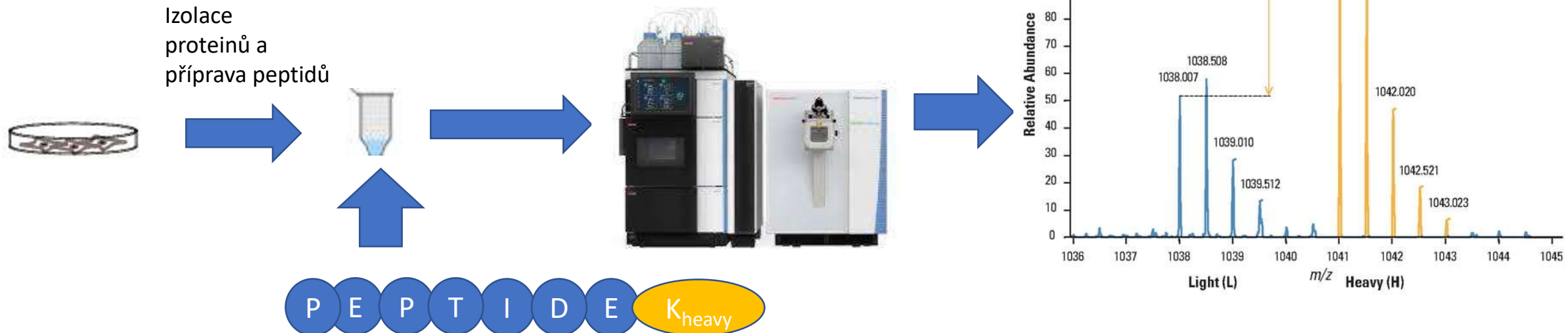
PRM- paralel reaction monitoring

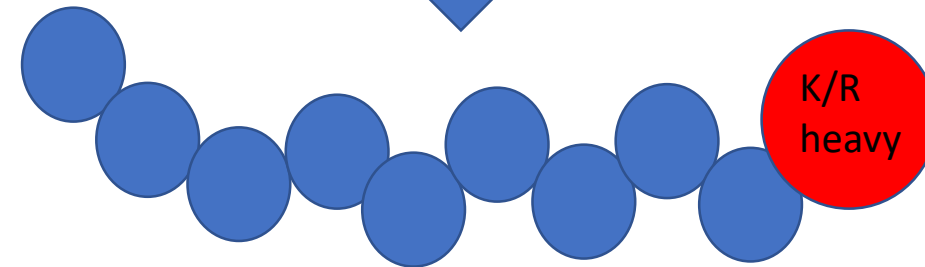
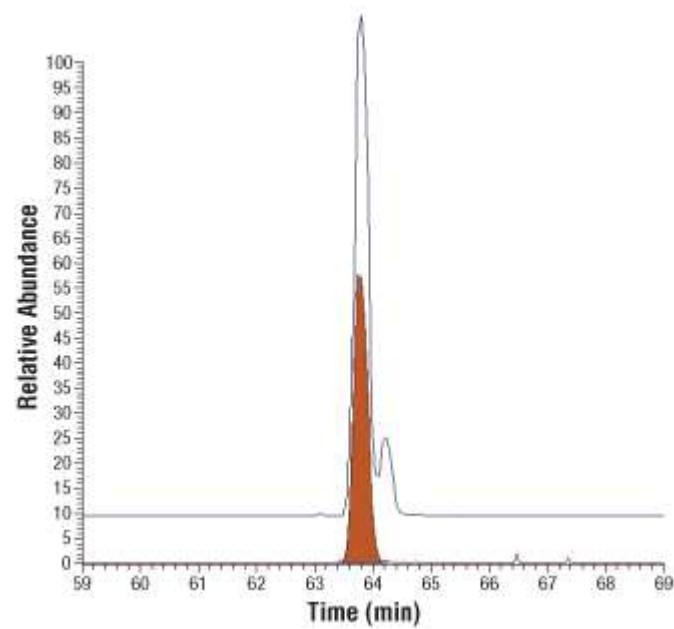
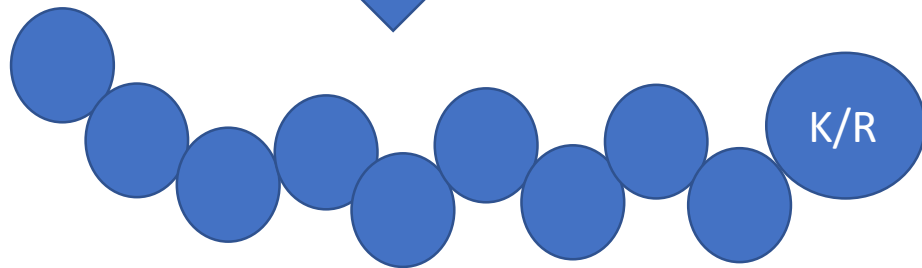
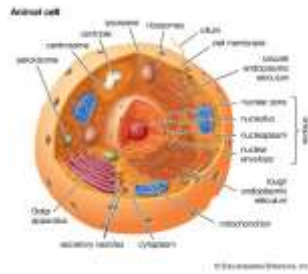
- Varianta SRM pro instrumenty zaznamenávající celé spektrum
 - TOF
 - Orbitrap
- Ty zároveň nemají třetí quadrupól
- Místo izolace fragmentu tedy zaznamenáme všechny vzniklé fragmenty
- Výhoda vysokého rozlišení
- Nevýhodou je ztráta citlivosti
 - Dáno principem detekce iontů

Využití těžkých peptidů

- Podobně jako SILAC
 - Nevyužívá se přirozené syntézy ale umělé výroby
- Cena kolem do 1000kč za peptid
 - Hrubý nečištěný výsledek syntézy
- Vnitřní standard
 - Potvrzení identifikace
 - Potvrzení retenčního času

Výsledek opakovatelný v čase
Přenositelnost mezi instrumenty
Přenositelnost mezi laboratořemi

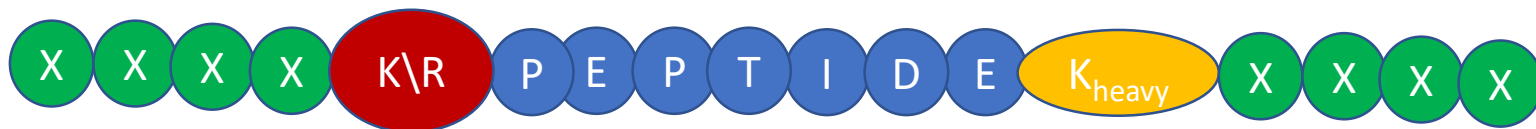
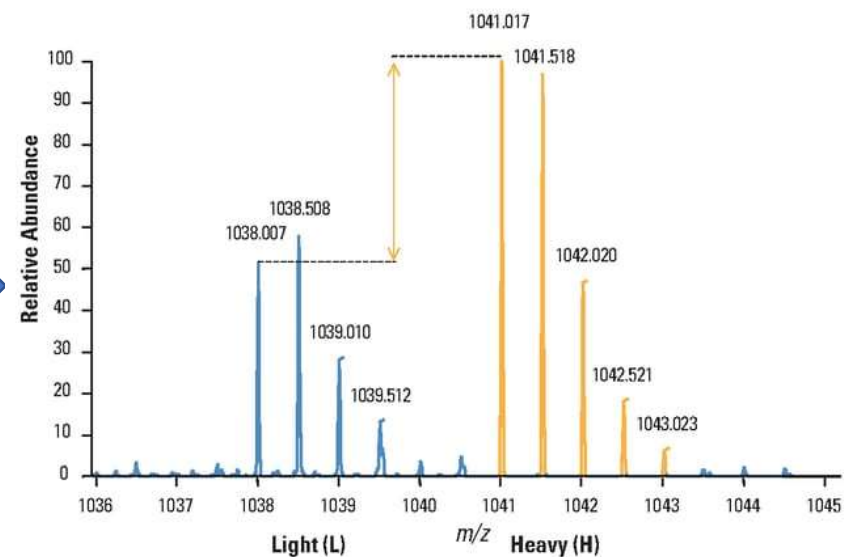
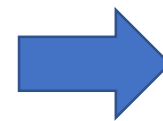


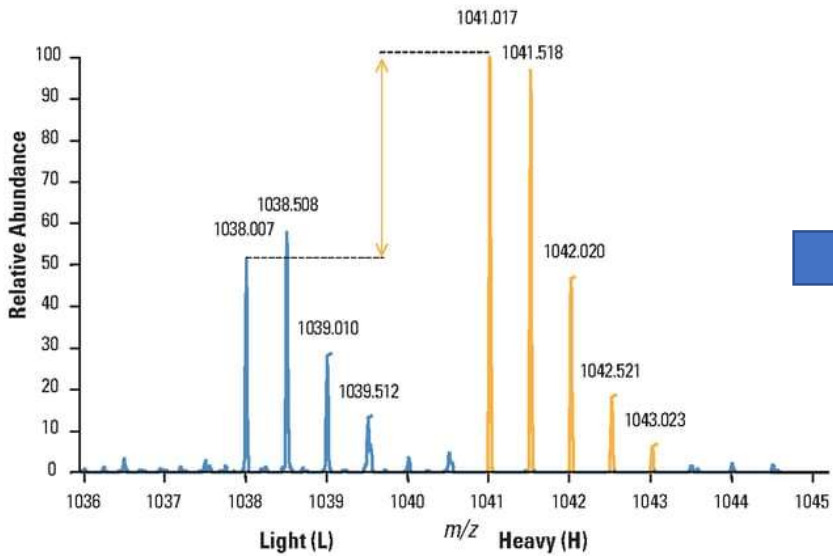


Absolutní kvantifikace

- Použití peptidu o známé koncentraci
 - Výrazně nákladnější – 10 000,- Kč za kus
- Možné přidat i místa pro tryptické štěpení
 - Peptid přidává před štěpením - pokrytí artefaktů vzniklých při štěpení

Izolace proteinů a příprava peptidů





Z poměru odečíst absolutní koncentrace

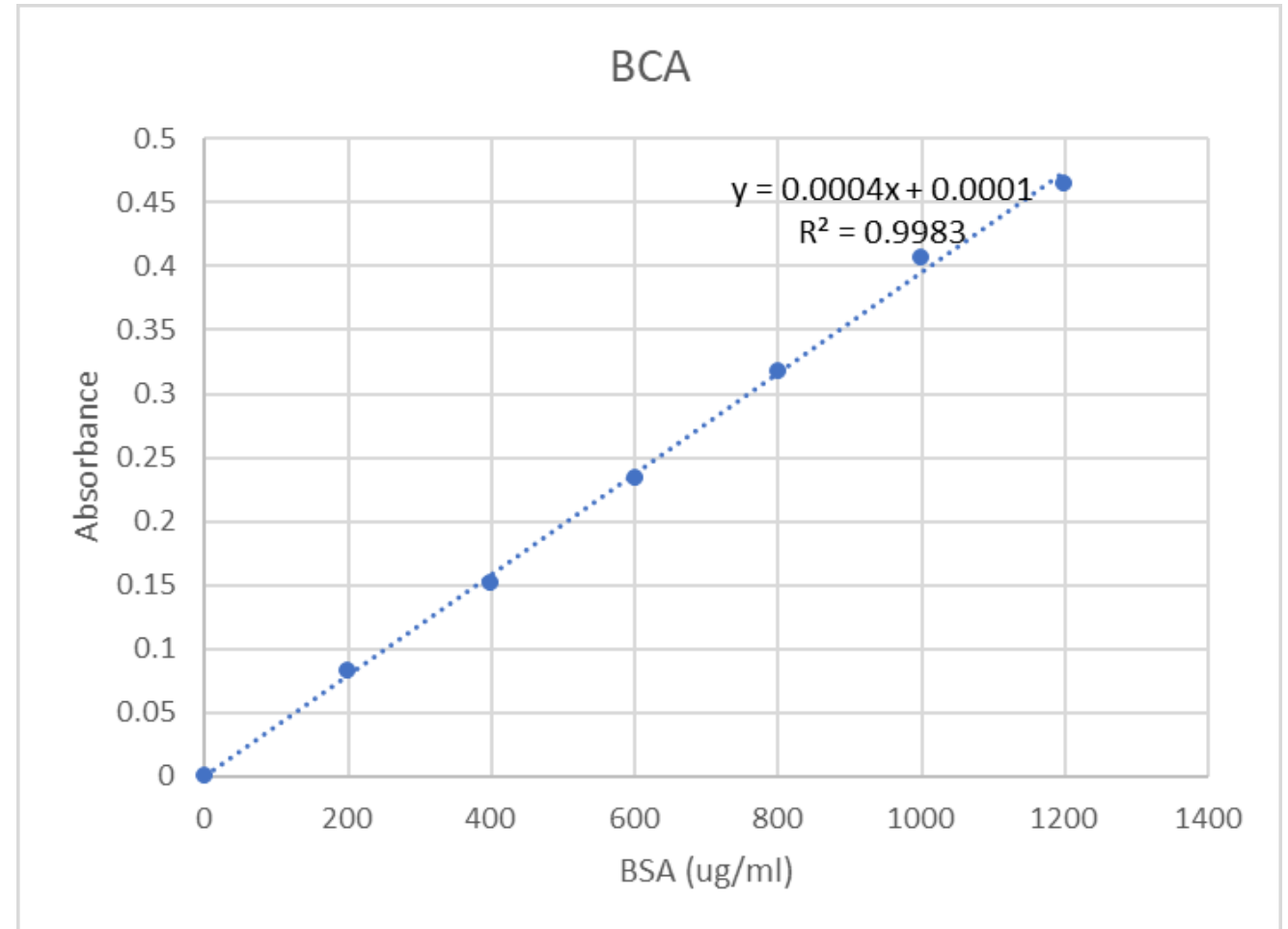
- Příklad známé koncentrace těžkého peptidu
- Koncentrace maximálně 10x odlišná od koncentrace sledovaného peptidu
- Kvalitativně hodnotnější informace než relativní porovnání

Množství proteinu se mění více než 10x

Co s tím?

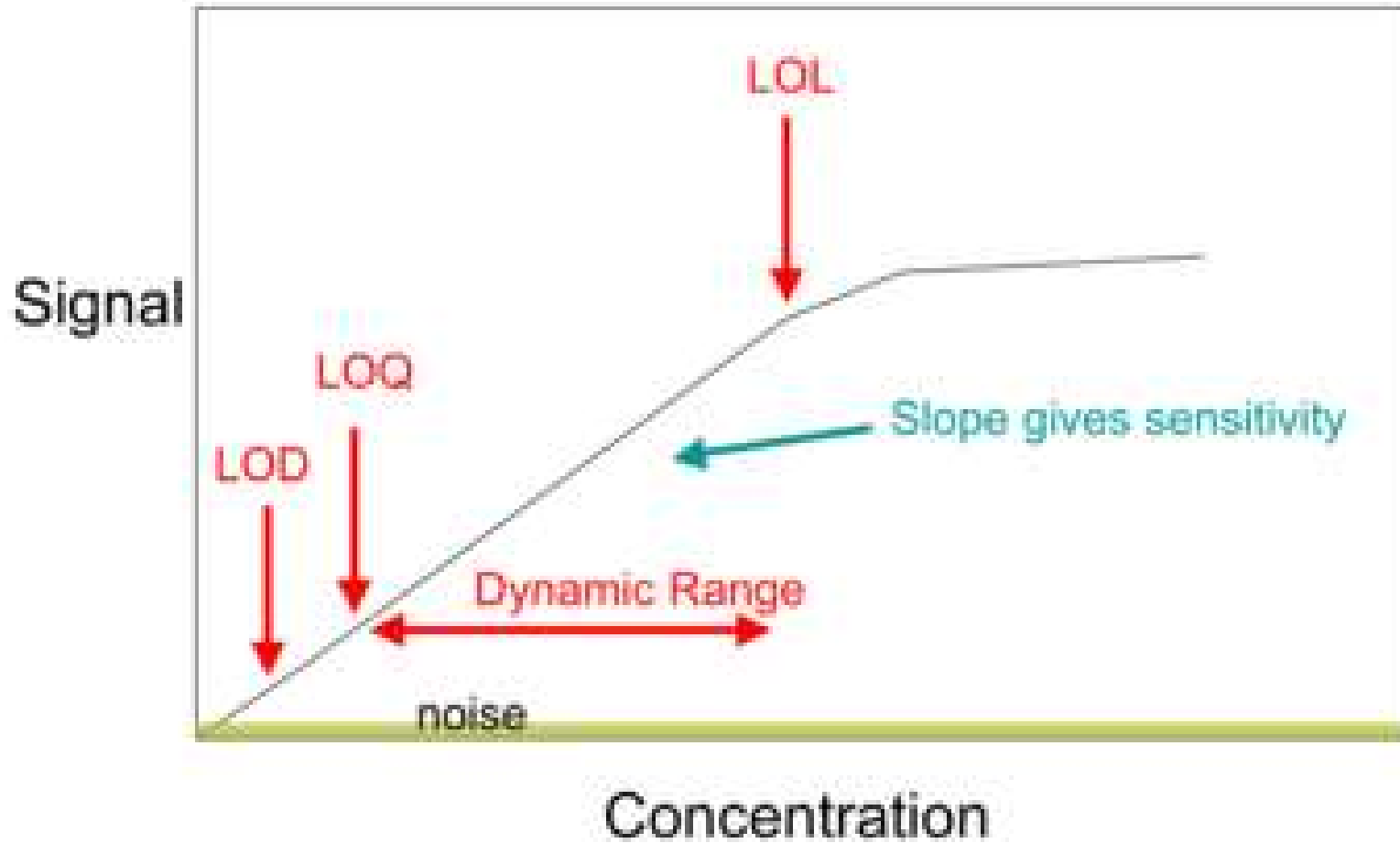
Externí kalibrace – kalibrační křivka

- Metoda jak určit absolutní množství látky ve vzorku
- Univerzální, není omezena na konkrétní metodu získávání dat
 - UV/VIS detekce
 - Fluorescence
 - MS signál



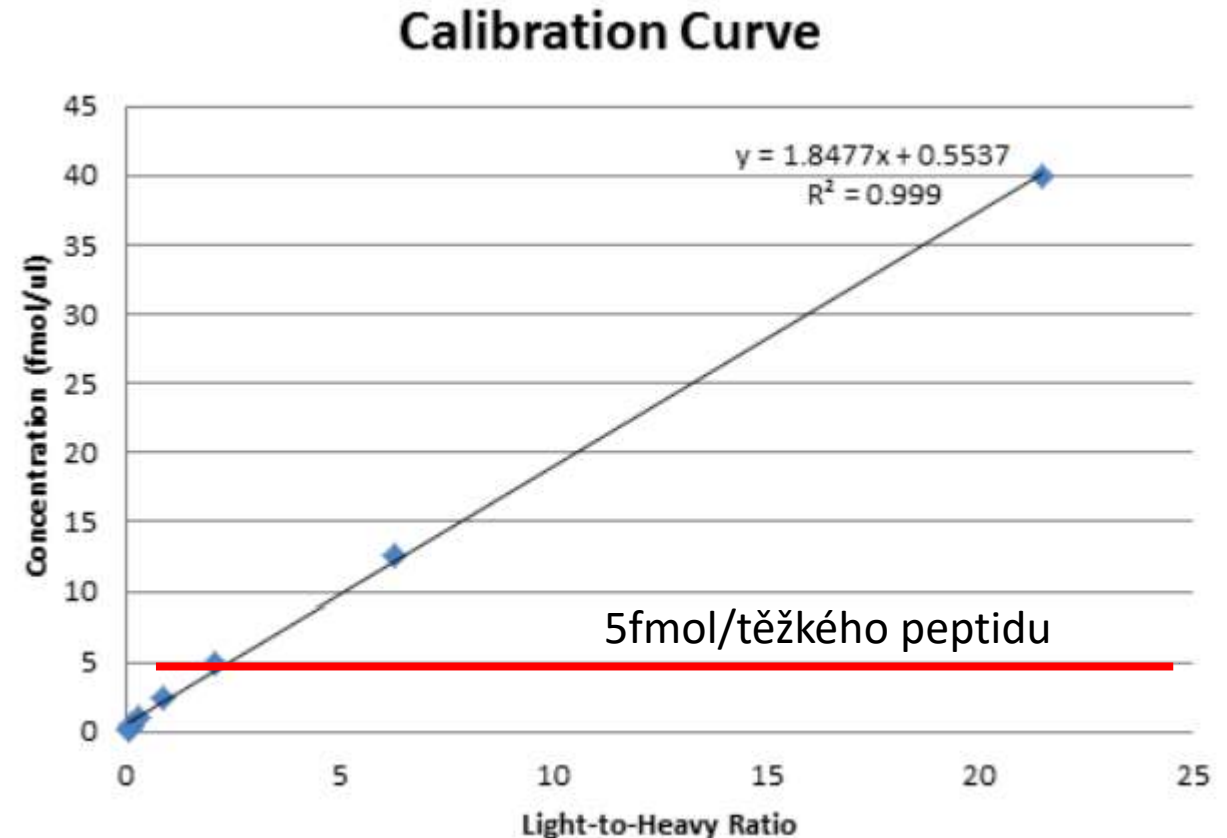
Linearita měření, LOD, LOQ

- LOD – limit of detection
 - Nejnižší množství látky poskytující odstup signálu od šumu 2:1
 - Pracujeme s chromatografickým peakem
 - Nejedná se o identifikaci spektra
- LOQ – limit of quantification
 - Nejnižší množství látky poskytující odstup signálu od šumu 10:1
- LOL- Limit of linearity



Kombinace vnitřního standardu a externí kalibrace

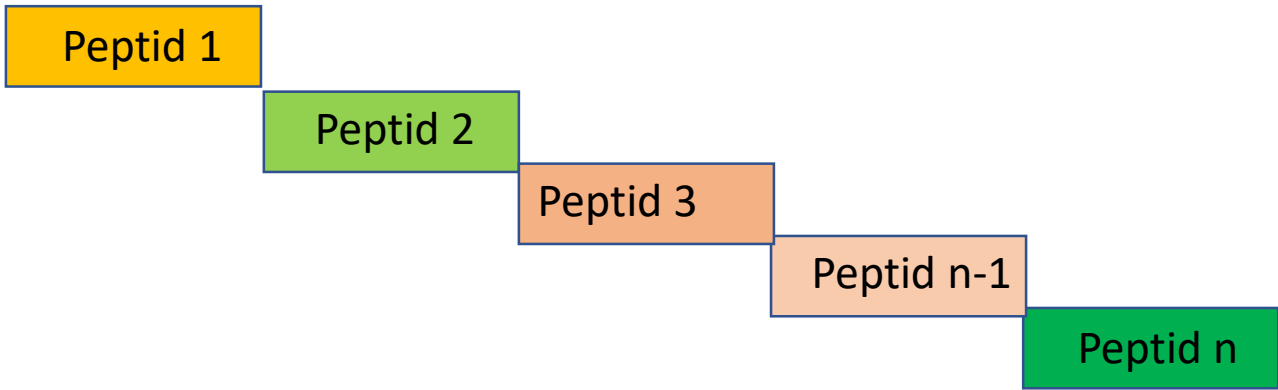
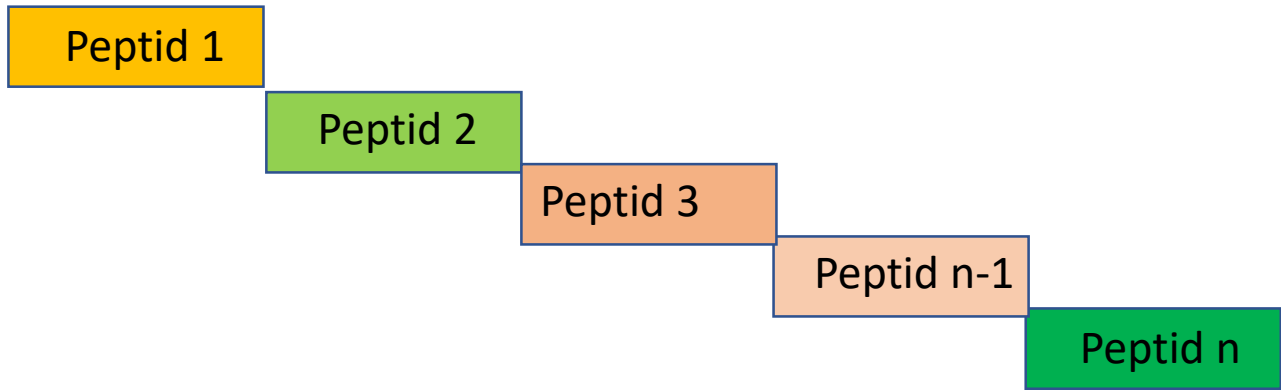
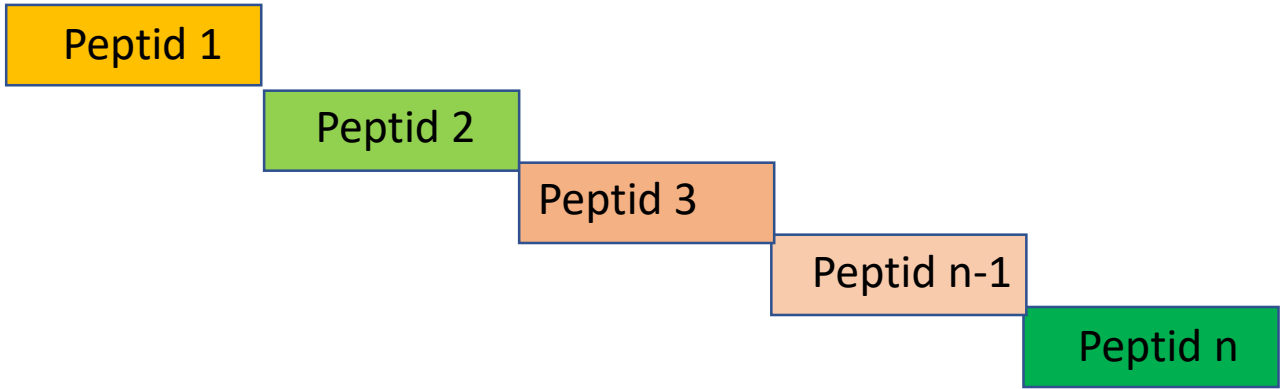
- Kalibrační křivka měřena takto:
 - Konstantní množství těžkého peptidu
 - Stoupající množství lehkého
- Použijeme externí kalibrační křivku
 - Na ní jsou vyneseny poměry pro jednotlivá porovnání
 - Z reálných vzorků pak odečítáme poměr light/heavy

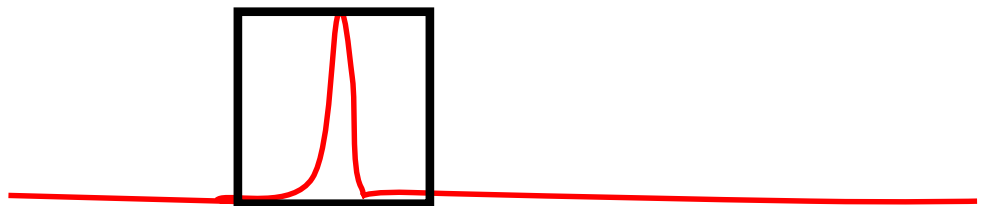




Software Skyline

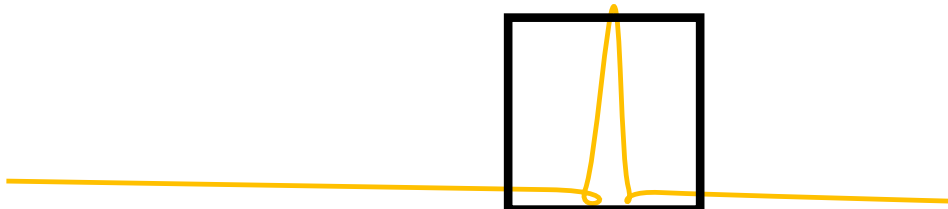
- <https://skyline.ms/project/home/software/Skyline/begin.view>
- Zdarma
- Aktivně vyvíjený od roku 2009
- Pokrývá vše co se týče cílené proteomiky
- Kvalitní soubor tutoriálů





Peptid 1

Nesledujeme peptid celou analýzu



Peptid 2

Detekce pouze v čase kdy se eluuje



Peptid 3

Tato strategie umožní sledovat desítky až stovky peptidů v jedné analýze

Strategie tvorby metody - okna

- Dobrá kvantifikace vyžaduje
 - Dobrý odstup signálu od šumu, viz LOQ
 - Dostatečná doba na akumulaci prekurzoru
 - Dobře prokreslený peak – dostatek bodů
 - Vhodný cycle time
- Tyto dva požadavky jdou proti sobě
- Často je potřeba kvantifikovat více peptidů v jenom nástřiku
 - Desítky až stovky
 - Pokud budeme všechna detekovat celou metodu
 - Budeme mít velmi dlouhý cycle time
 - Nebo velmi krátkou akumulaci/sumaci
- Zjistíme retenční čas peptidů a detekujeme je jen v úzkém okně
 - Úspora času
 - Vysoké nároky na reproduibilitu chromatografie

Jak vybrat vhodný peptid do analýzy?

Proteotypický peptid – peptid unikátní pro daný protein

- dobře ionizovatelný, pozorovatený MS
 - Lze vybrat z předchozího shotgun měření
 - On line knihovny
 - On line nástroj – ESP predictor
<https://www.genepattern.org/esppredictor#gsc.tab=0>
- nesmí být náchylný k PTM
 - Aminokyseliny náchylné k tvorbě artefaktů
 - Methionin, tryptofan - Oxidace
 - Glutamin, asparagin – konverze na Kys Glutamovou a Kys Asparagovou

Fragment

- hojný, dobře ionizovatelný, pozorovatený MS