

OCENA WŁAŚCIWEGO BUFORU DO HOMOGENIZACJI TKANKI MÓZGOWEJ DO ANALIZY PROTEOMICZNEJ

ADAM KARPIŃSKI^{1,2}, ANNA KONOPKA^{1,3}, DOMINIC WINTER⁴, WITOLD KONOPKA³, LESZEK KACZMAREK², EWA BULSKA¹

¹Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, Pasteura 1, 02-093 Warszawa, Polska

²Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, Polska

³Polski Ośrodek Rozwoju Technologii, Sieć Badawcza Łukasiewicz, Stabłowicka 147, 54-066 Wrocław, Polska

⁴Medical Faculty, Institute for Biochemistry and Molecular Biology (IBMB), University of Bonn, Nußallee 11, 53115 Bonn, Germany



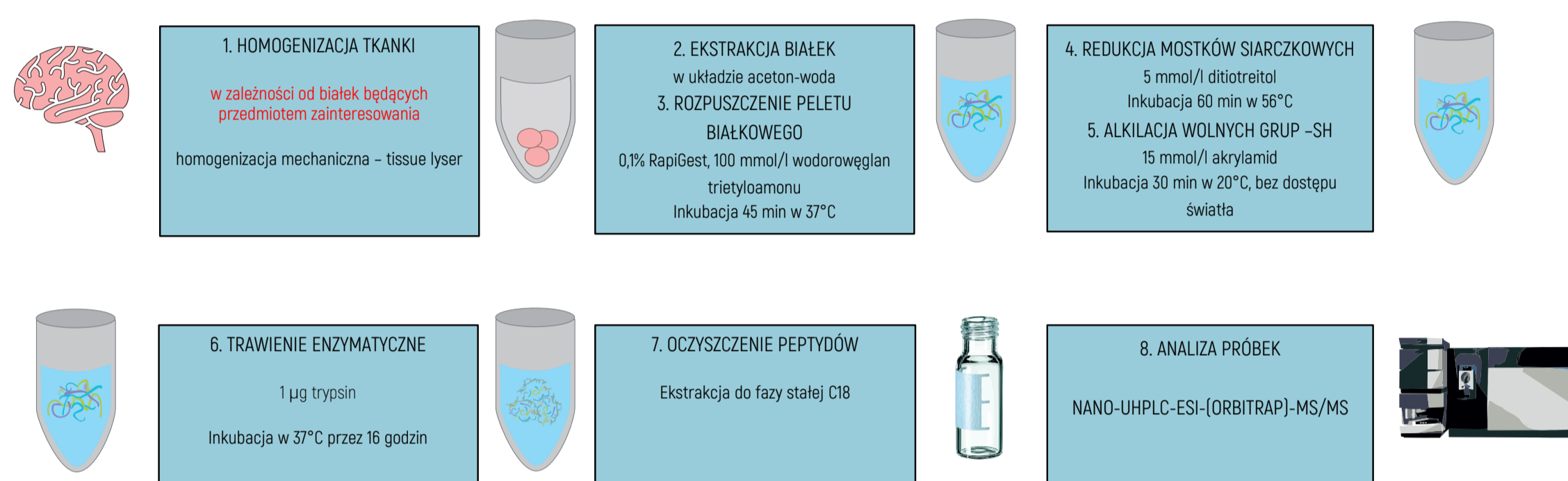
Projekt nr POWR.03.02.00-00-1007/16-00 realizowany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego

Streszczenie

Analiza proteomiczna, w której wykorzystuje się spektrometrię mas, jest stosowana do prowadzenia globalnej analizy jakościowej oraz ilościowej białek w próbkach biologicznych m.in. w mózgu. Kluczowym etapem analizy proteomicznej jest odpowiednie przygotowanie próbki, szczególnie etap ekstrakcji białek z tkanki mózgowej. Celem prezentowanej pracy jest analiza jakościowa oraz ilościowa białek wyekstrahowanych z tkanki mózgowej przy zastosowaniu 3 różnych rodzajów buforów do homogenizacji. Zastosowano proteomiczną strategię bottom-up w trybie bez znakowania trwałymi izotopami (analiza label-free), która polega na analizie peptydów, powstałych po trawieniu enzymatycznym białek.

Analiza proteomiczna

Przygotowanie próbki do analizy proteomicznej składa się z 8 etapów. W niniejszym wystąpieniu przedstawiono optymalizację procesu homogenizacji tkanki mózgowej oraz wybór odpowiedniego buforu do analizy proteomicznej. Porównano 3 rodzaje buforów – bufor zawierający detergent (**DB**), bufor zawierający czynniki chaotropowe (**CAB**) oraz bufor nie zawierający detergentu (**DFB**). Skład stosowanych buforów przedstawiono w poniższej tabeli.

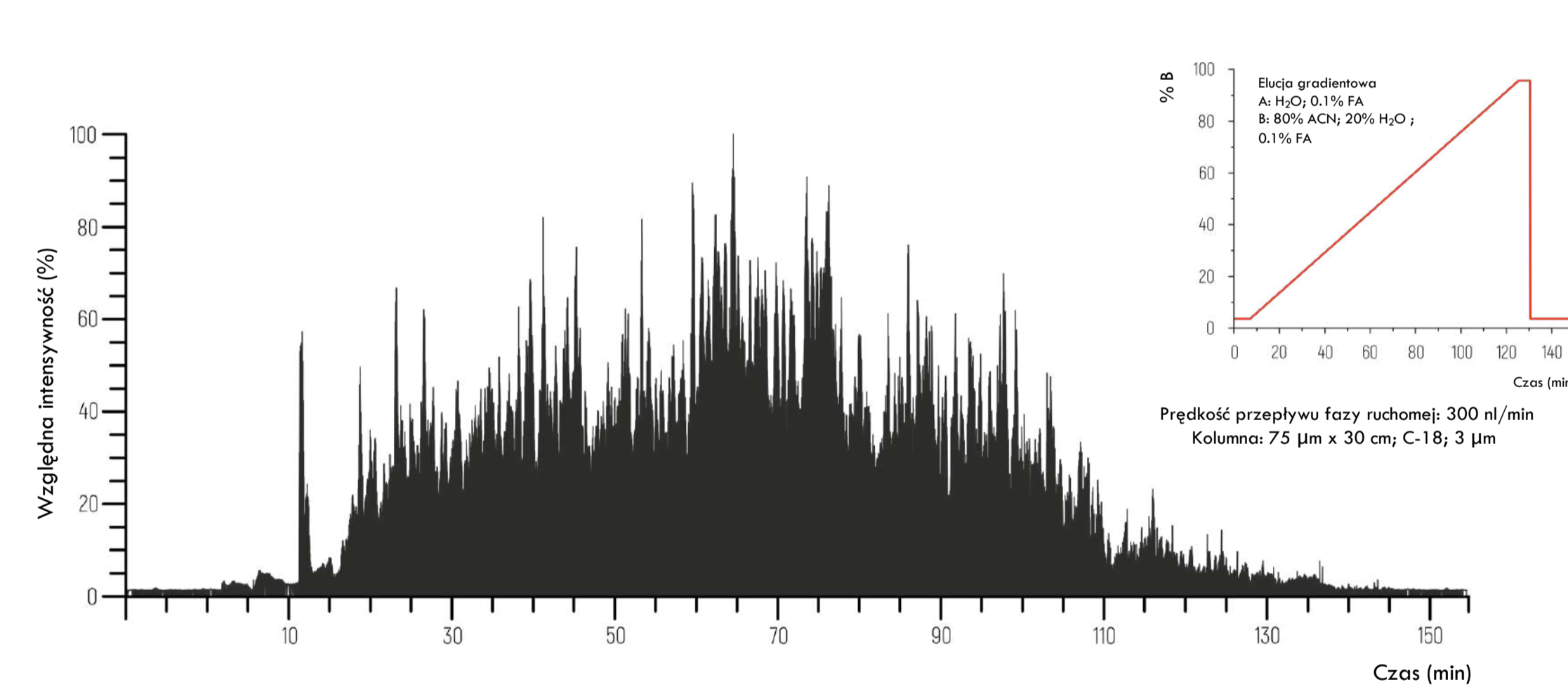


Bufor zawierający detergent (DB)	Bufor zawierający czynniki chaotropowe (CAB)	Bufor nie zawierający detergentu (DFB)
1% SDS 100 mmol/L TEAB, pH 8.5 inhibitory proteaz i fosfataz	8 mol/L mocznik, 2 mol/L lisococznik, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5 inhibitory proteaz i fosfataz	250 mmol/L sacharozę 150 mmol/L NaCl 1 mmol/L EDTA 50 mmol/L HEPES, pH 7.0 inhibitory proteaz i fosfataz

Skład badanych buforów do homogenizacji:

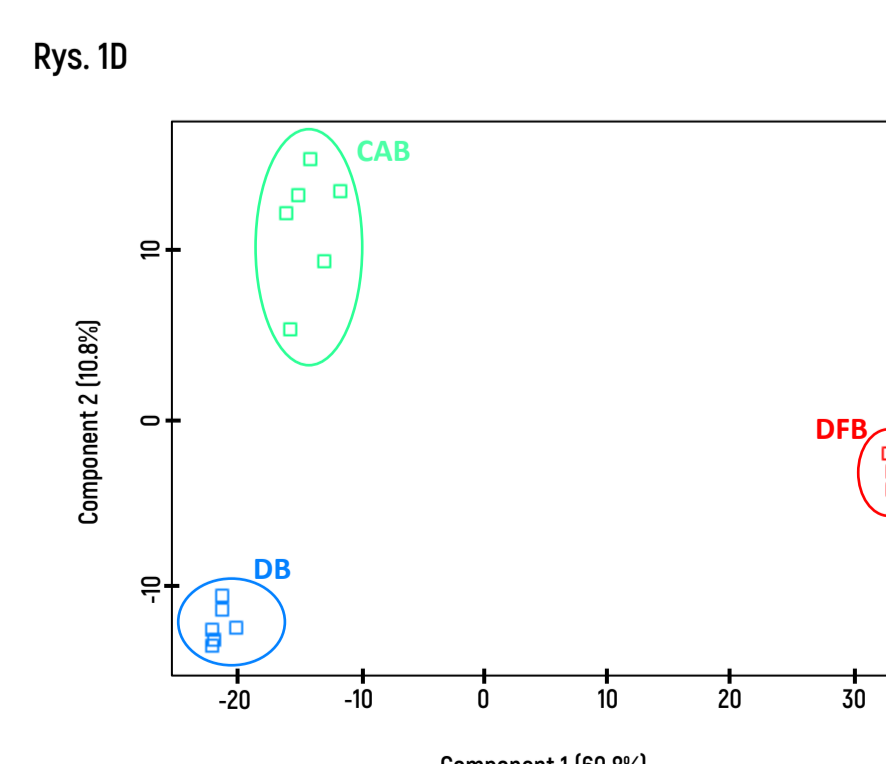
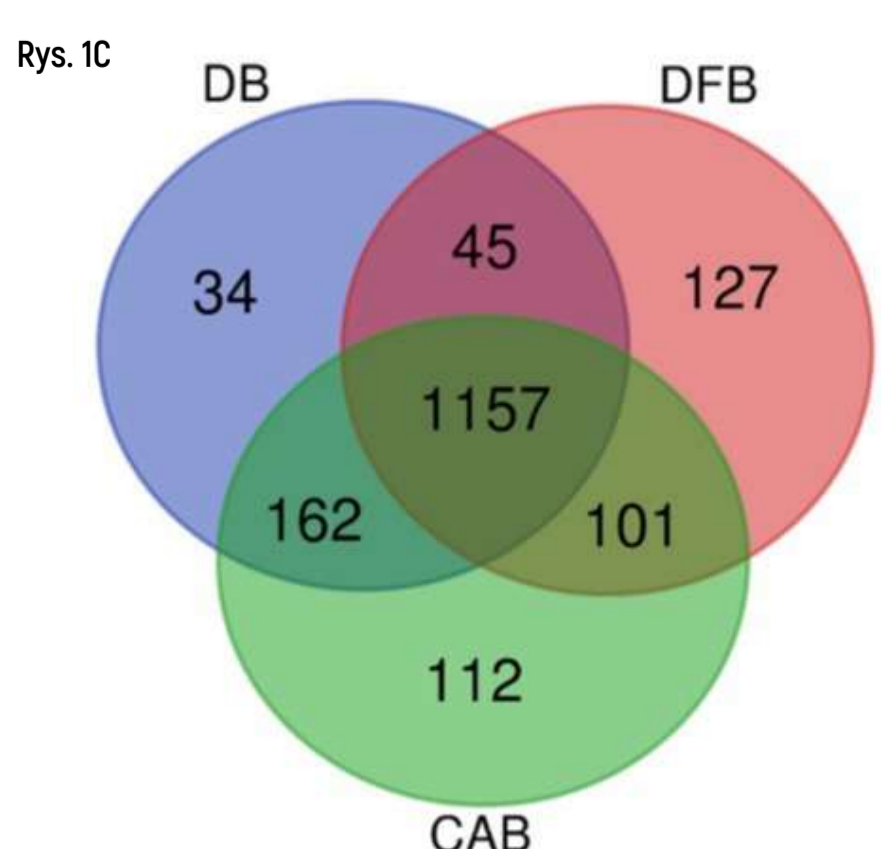
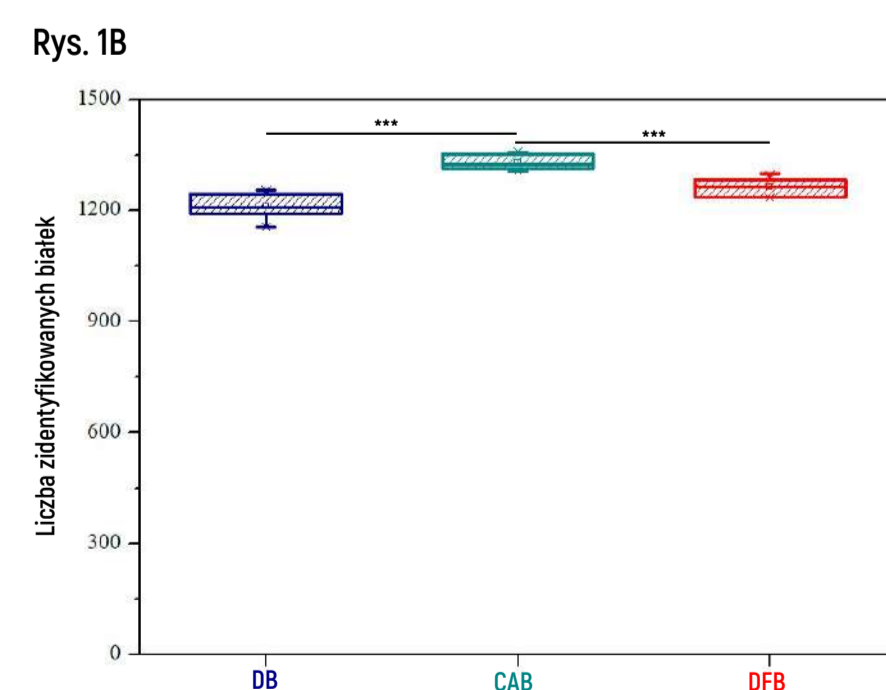
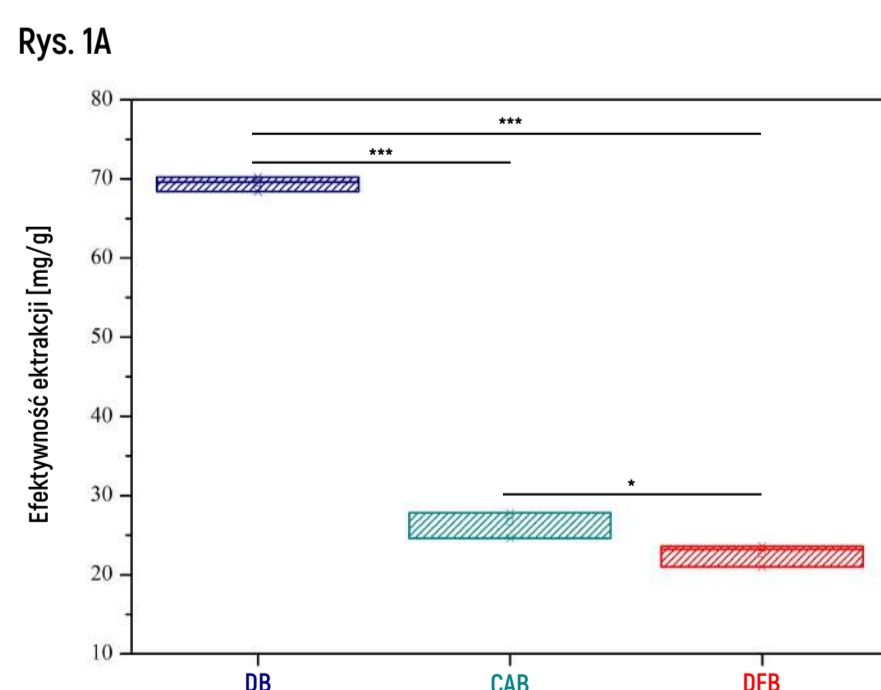
Analiza nano-UHPLC-nESI-(Orbitrap)-MS/MS

- Spektrometr mas Orbitrap Velos™ (Thermo Fisher Scientific, USA) połączony z chromatografem ciekowym EASY nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).
- Widma fragmentacyjne (MS/MS) oraz proteomiczna baza UniProt: określenie sekwencji aminokwasowej peptydów – analiza jakościowa białek.
- Pole powierzchni pod pikami na chromatogramie zarejestrowanym w trybie całkowitego prądu jonowego (ang. Total Ion Current, TIC) – analiza ilościowa białek.



Analiza jakościowa białek

Najwyższą efektywność ekstrakcji białek z tkanki mózgowej (**Rys. 1A**) uzyskano dla buforu **DB**. Analiza proteomiczna z wykorzystaniem spektrometrii mas pozwoliła na identyfikację 1930 białek na przekroju 3 homogenatów (**Rys. 1B**). Największą liczbę białek zidentyfikowano w przypadku buforu **CAB** (1330). 112 białek zostało zidentyfikowanych tylko w przypadku buforu **CAB**, 127 białek zostało zidentyfikowanych tylko w przypadku buforu **DFB**, a 34 białka zostały zidentyfikowane tylko w przypadku buforu **DB** (**Rys. 1C**). Na podstawie przeprowadzonej analizy proteomicznej możliwe było zgrupowanie próbek [3 powtórzenia biologiczne, 2 powtórzenia techniczne dla każdego powtórzenia biologicznego] pochodzących od każdego z homogenatów (**Rys. 1D**).

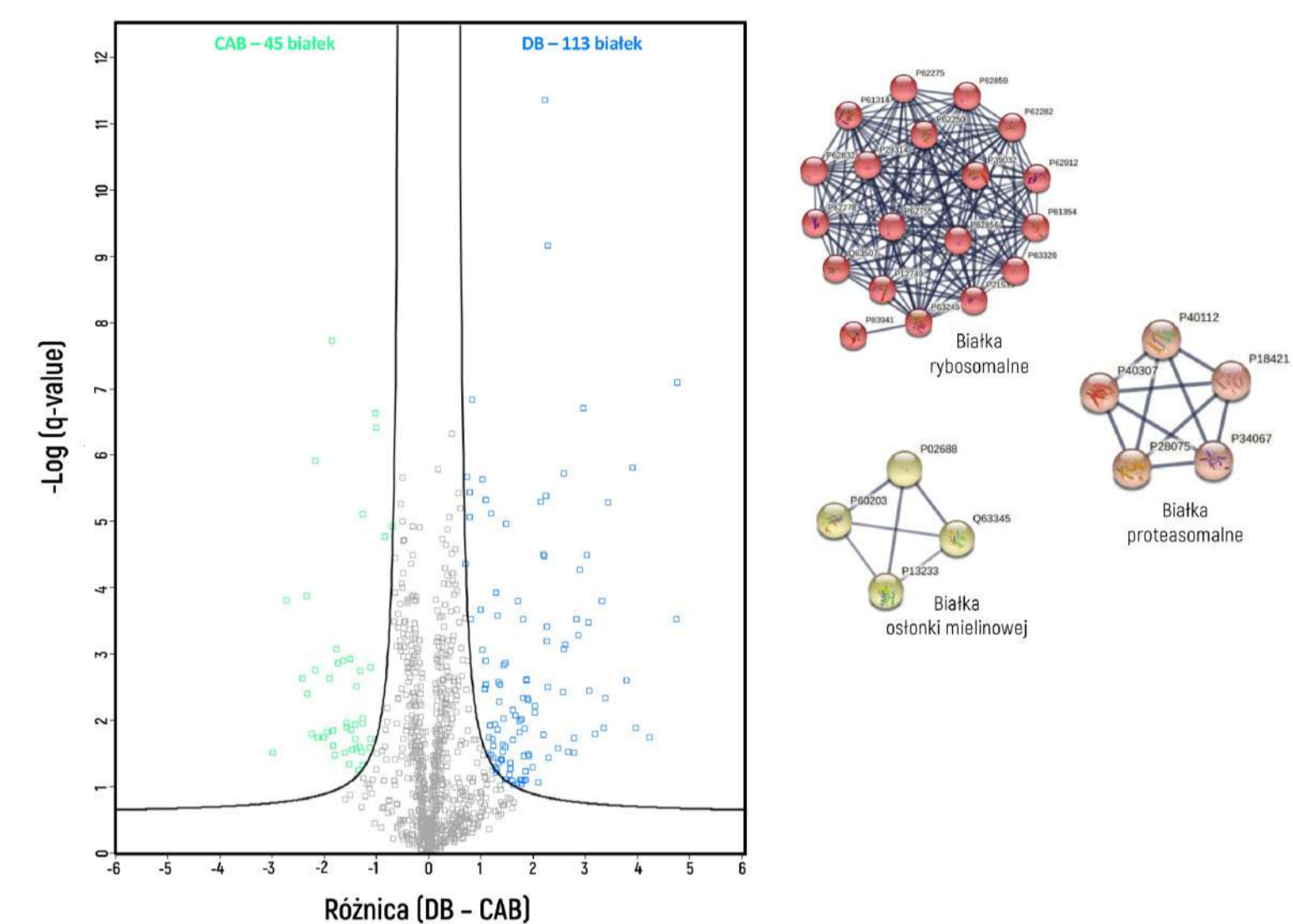


Analiza ilościowa białek

Analiza ilościowa białek w przypadku buforu **DB** i **CAB** pozwoliła na identyfikację 158 białek o zmienionej ekspresji (stężeniu). 113 białek charakteryzowało się wyższym stężeniem w przypadku buforu **DB** w porównaniu z **CAB**; 45 białek charakteryzowało się wyższym stężeniem w przypadku buforu **CAB** w porównaniu z **DB**.

- Białka membranowe: 64 w **DB**, 19 w **CAB** (różnica 237%)
- Białka synaptyczne: 34 w **DB**, 9 w **CAB** (różnica 278%)
- Białka cytoplazmatyczne: 42 w **DB**, 13 w **CAB** (różnica 223%)

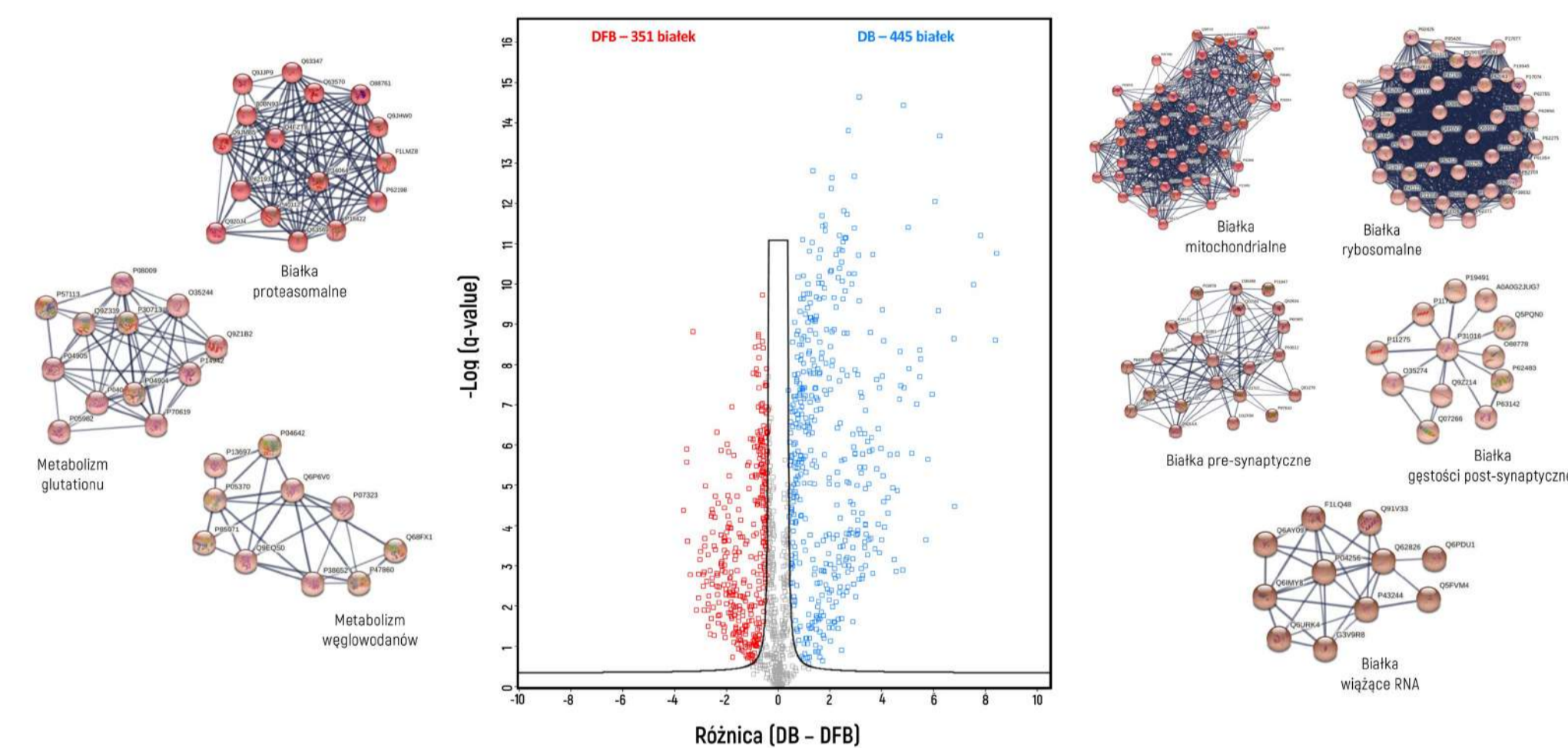
Na podstawie analizy skupień metodą MCL, w przypadku buforu **DB**, zidentyfikowano 3 klastry, które na podstawie analizy ontologii genów (GO) były wzbogacone w (1) białka rybosomalne, (2) białka proteasomalne oraz (3) białka osłonki mielinowej.



Analiza ilościowa białek w przypadku buforu **DB** i **DFB** pozwoliła na identyfikację 796 białek o zmienionej ekspresji (stężeniu). 445 białek charakteryzowało się wyższym stężeniem w przypadku buforu **DB** w porównaniu z **DFB**; 351 białek charakteryzowało się wyższym stężeniem w przypadku buforu **DFB** w porównaniu z **DB**.

- Białka membranowe: 337 w **DB**, 114 w **DFB** (różnica 196%)
- Białka synaptyczne: 204 w **DB**, 63 w **DFB** (różnica 224%)
- Białka membranowe synaptyczne: 56 w **DB**, 9 w **DFB** (różnica 522%)
- Białka cytoplazmatyczne: 140 w **DB**, 180 w **DFB** (różnica 22%)

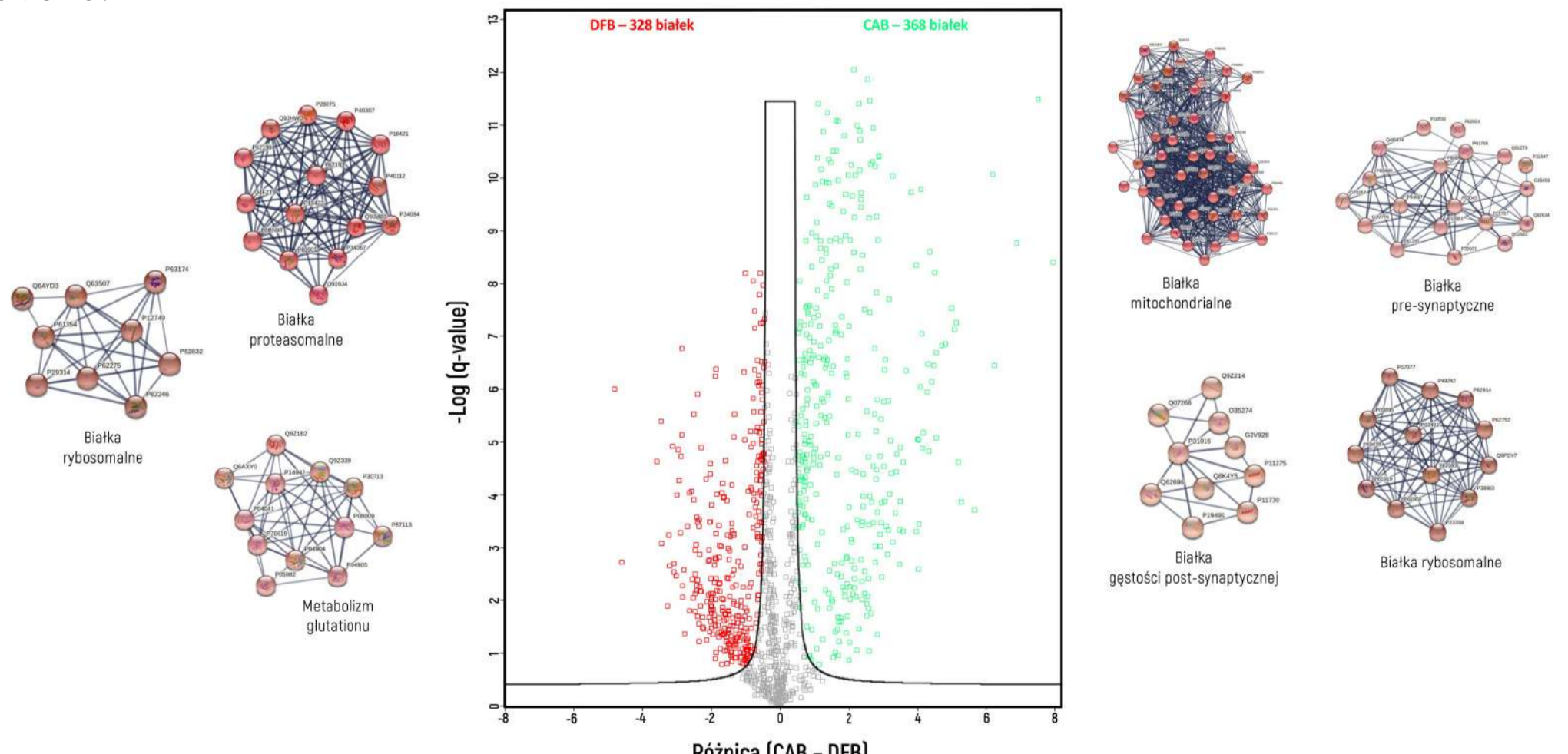
Na podstawie analizy skupień metodą MCL, w przypadku buforu **DB**, zidentyfikowano 5 klastrów, które na podstawie analizy ontologii genów (GO) były wzbogacone w (1) białka mitochondrialne, (2) białka rybosomalne, (3) białka pre-synaptyczne, (4) białka gęstości post-synaptycznej oraz (5) białka wiążące RNA. W przypadku buforu **DFB**, zidentyfikowano 3 klastry, które na podstawie analizy ontologii genów (GO) były wzbogacone w (1) białka proteasomalne, (2) metabolizm glutationu oraz (3) metabolizm węglowodanów.



Analiza ilościowa białek w przypadku buforu **CAB** i **DFB** pozwoliła na identyfikację 696 białek o zmienionej ekspresji (stężeniu). 368 białek charakteryzowało się wyższym stężeniem w przypadku buforu **CAB** w porównaniu z **DFB**; 328 białek charakteryzowało się wyższym stężeniem w przypadku buforu **DFB** w porównaniu z **CAB**.

- Białka membranowe: 276 w **CAB**, 100 w **DFB** (różnica 176%)
- Białka synaptyczne: 160 w **CAB**, 57 w **DFB** (różnica 181%)
- Białka membranowe synaptyczne: 53 w **CAB**, 5 w **DFB** (różnica 960%)
- Białka cytoplazmatyczne: 108 w **CAB**, 155 w **DFB** (różnica 39%)

Na podstawie analizy skupień metodą MCL, w przypadku buforu **CAB**, zidentyfikowano 4 klastry, które na podstawie analizy ontologii genów (GO) były wzbogacone w (1) białka mitochondrialne, (2) białka pre-synaptyczne, (3) białka gęstości post-synaptycznej, (4) białka rybosomalne. W przypadku buforu **DFB**, zidentyfikowano 3 klastry, które na podstawie analizy ontologii genów (GO) były wzbogacone w (1) białka proteasomalne, (2) białka rybosomalne oraz (3) metabolizm glutationu.



Wnioski

- Bufor zawierający detergent (**DB**) jest najlepszym spośród badanych buforów do homogenizacji tkanki mózgowej, gdy celem jest przeprowadzenie globalnej analizy proteomicznej. Umożliwia on efektywną ekstrakcję białek mających znaczenie w przypadku badania chorób neurodegeneracyjnych m.in. białek mitochondrialnych, białek rybosomalnych, białek synaptycznych, białek membranowych oraz białek osłonki mielinowej.
- Bufor nie zawierający detergentu (**DFB**) jest najlepszym spośród badanych buforów do homogenizacji tkanki mózgowej, gdy celem analizy jest przeprowadzenie analizy jakościowej oraz ilościowej białek cytoplazmatycznych oraz białek proteasomalnych.