

# Τυποποίηση του αμυλοειδούς με φασματομετρία μάζας



**Μάκης Ζωιδάκης, PhD**  
**Εργαστήριο Πρωτεομικής**  
**IIBEAA**

# ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

- Μεθοδολογία πρωτεομικής-ιόντων πτησεις
- Προσεγγίσεις μελέτης πρωτεϊνών του αμυλοειδούς με φασματομετρία μάζας:
  1. Ταυτοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση
  2. Απόλυτη ποσοτικοποίηση
  3. Απεικόνιση ιστού
- Μελλοντικές εξελίξεις

# Η έννοια του «παραδείγματος» (paradigm)

**Το «παραδείγμα» είναι το σύνολο των δεδομένων, θεωριών και τεχνικών που αποτελούν τα εργαλεία ενός επιστημονικού πεδίου**

**Περιοδικά τα παραδείγματα αλλάζουν ριζικά, συνήθως όταν εφευρίσκεται μια νέα πειραματική μέθοδος (π.χ. μικροσκόπιο) ή όταν προκύπτουν νέα δεδομένα (π.χ. δομή και αλληλουχία DNA, RNA, πρωτεϊνών)**

# Πρωτεομική

Μελέτη ενός συνόλου πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα κυρίως με φασματομετρία μάζας

1994 Marc Wilkins



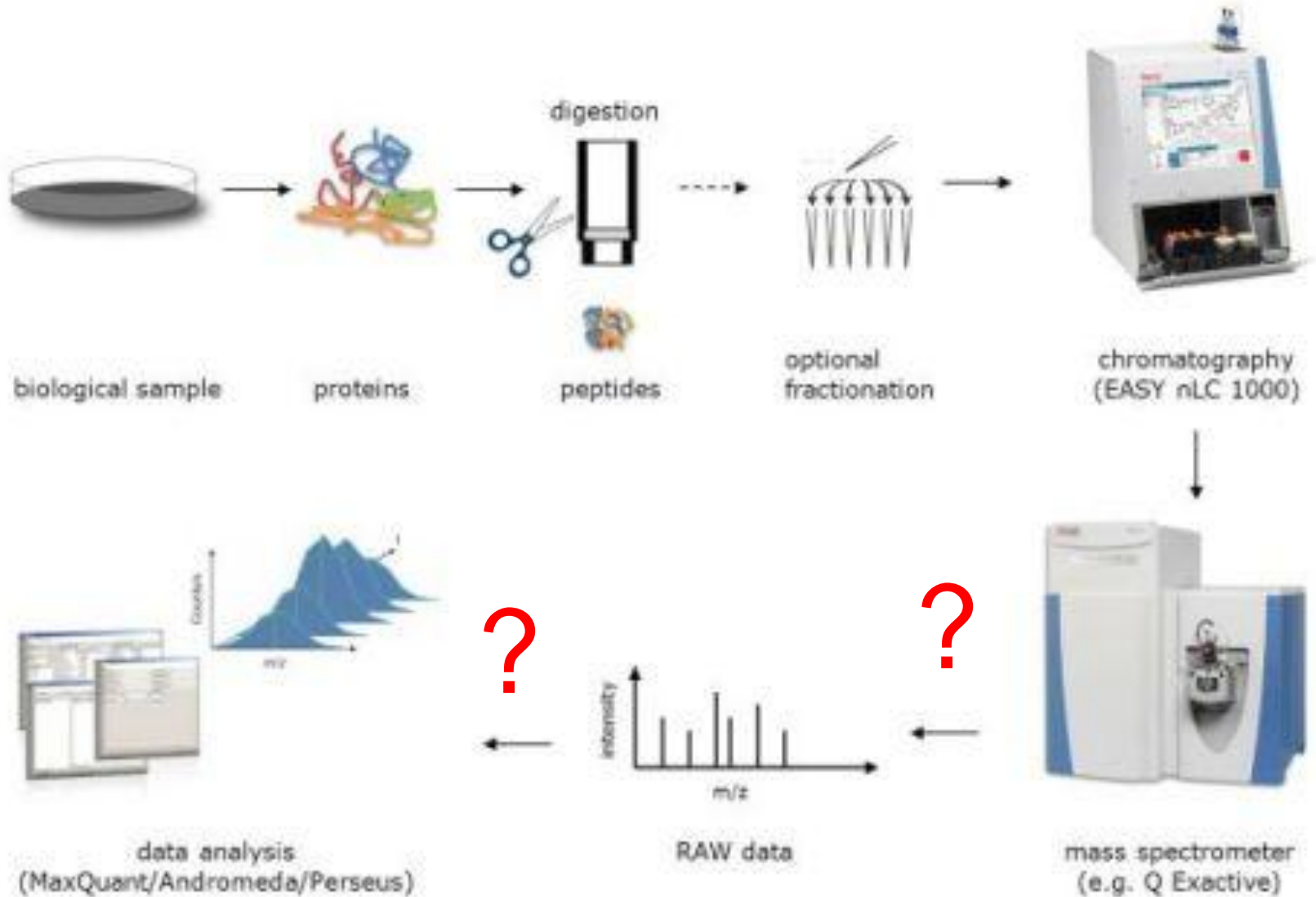
Γενομική και Πρωτεομική είναι αλληλένδετες  
2001 Αλληλούχιση του γονιδιώματος μας: 20500 γονίδια

Το πρωτέομα μας αποτελείται από εκατοντάδες χιλιάδες πρωτεΐνες κυρίως λόγω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση, οξειδωση, κλπ).

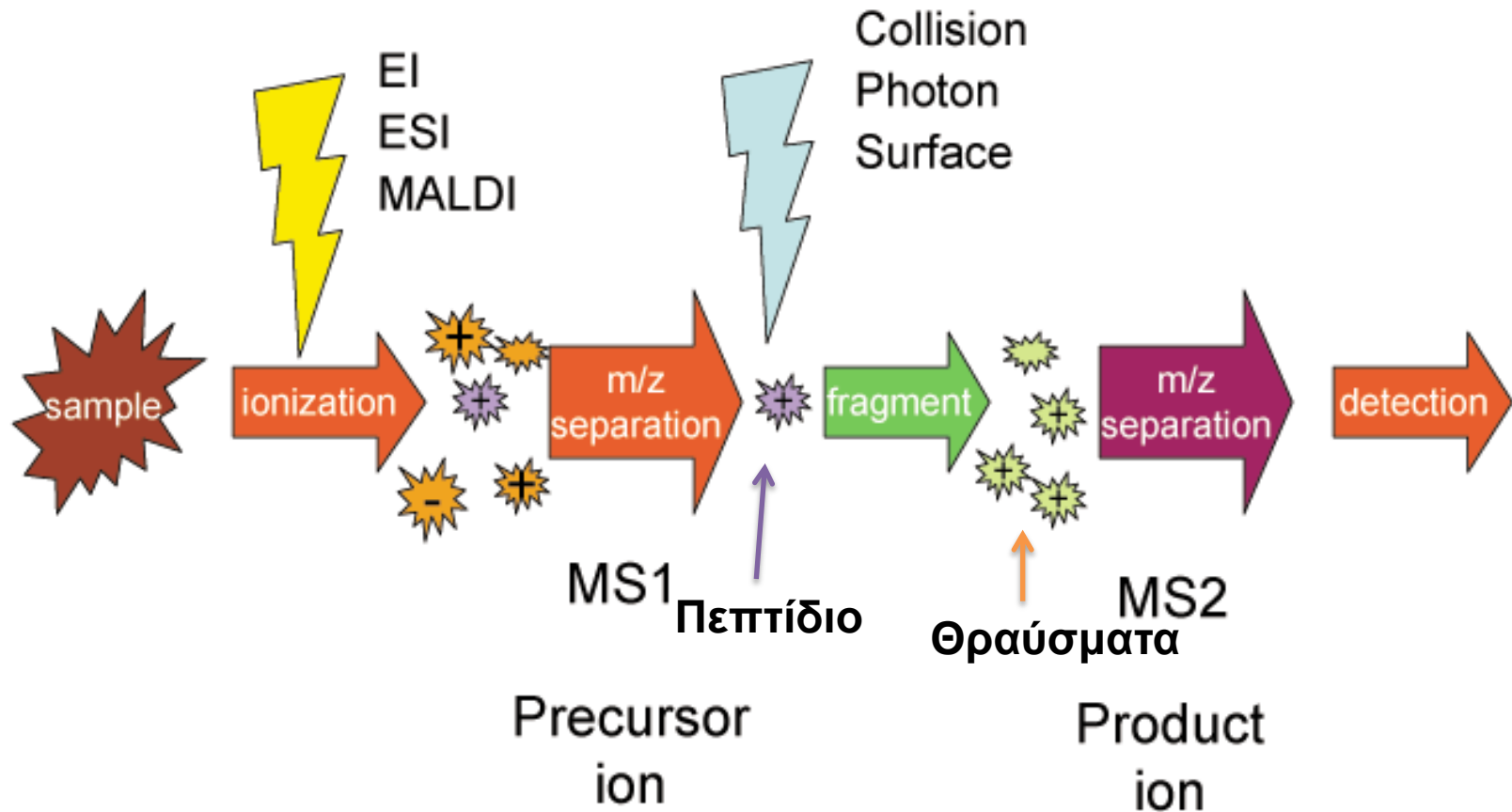
**Στάδια της πρωτεομικής ανάλυσης:**

- 1. Διαχωρισμός**
- 2. Ταυτοποίηση**
- 3. Ποσοτικοποίηση**

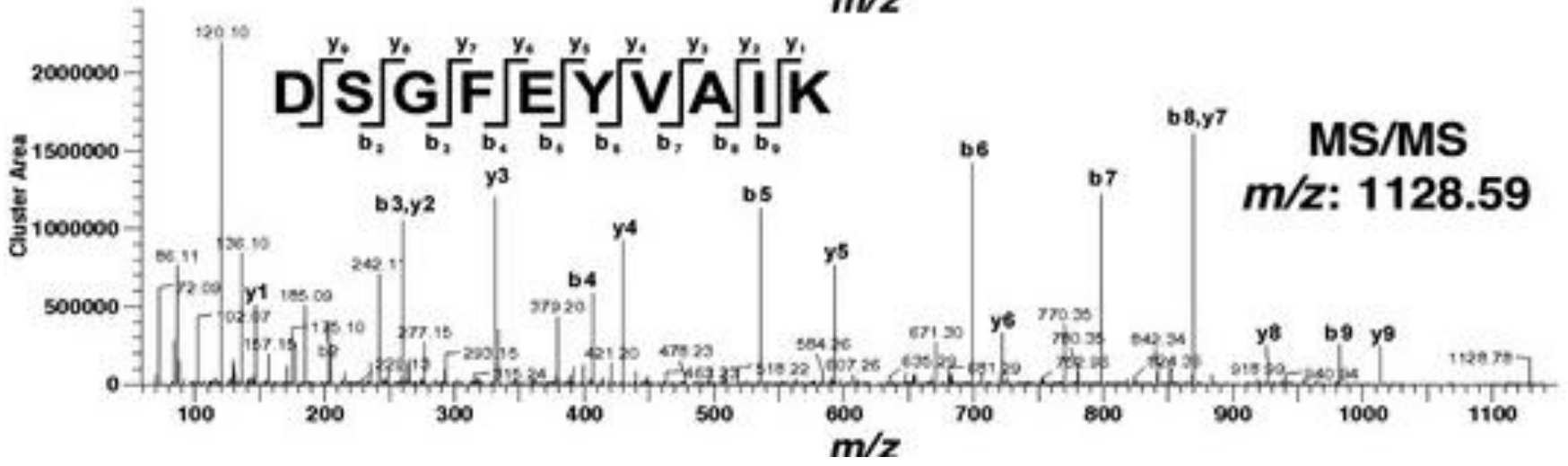
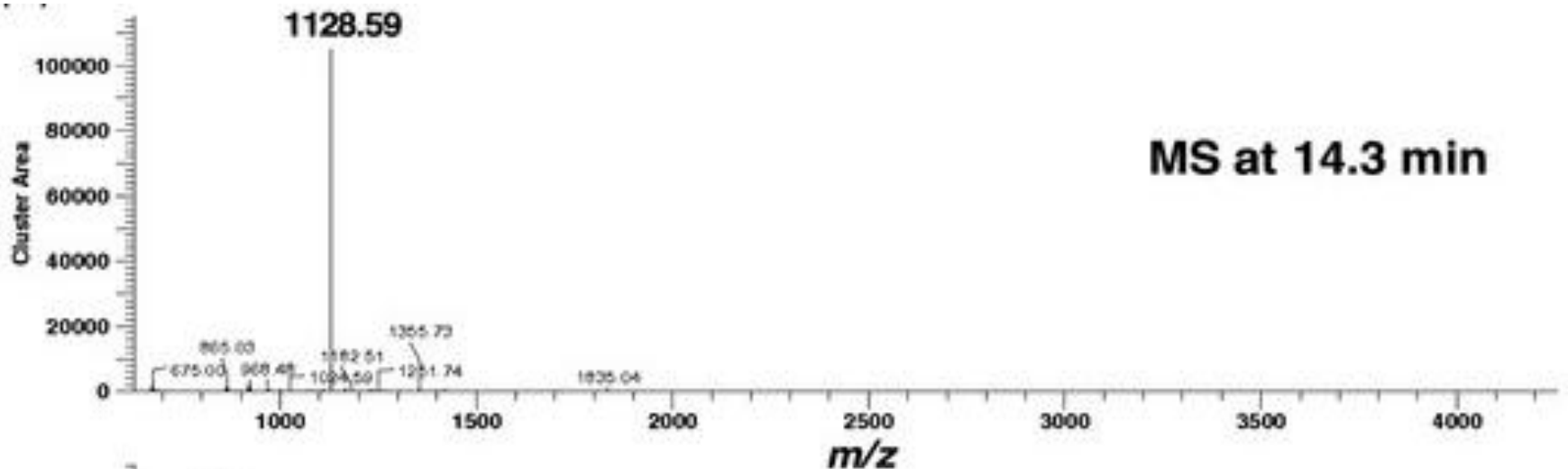
# Επισκόπηση πρωτεομικής ανάλυσης



# Ανάλυση ιόντων στο φασματογράφο μάζας

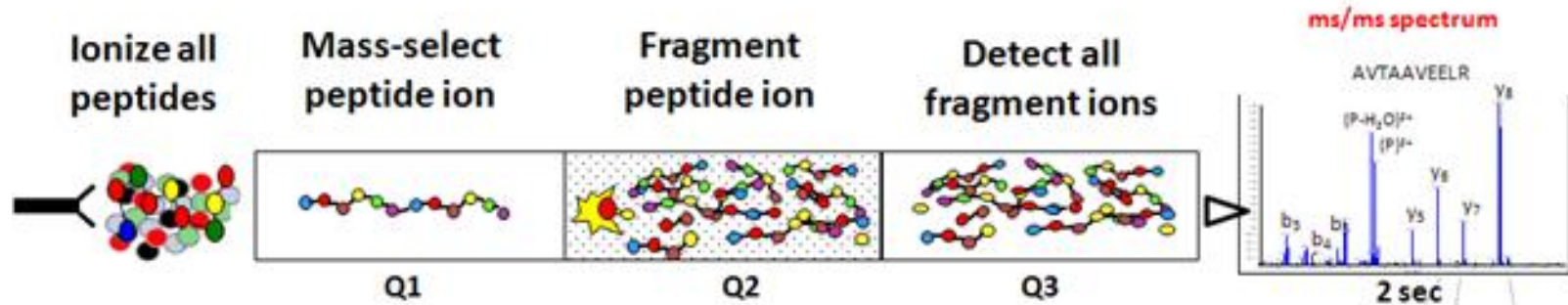


# Δεδομένα αναγνώρισης πεπτιδίων με θραυσματοποίηση

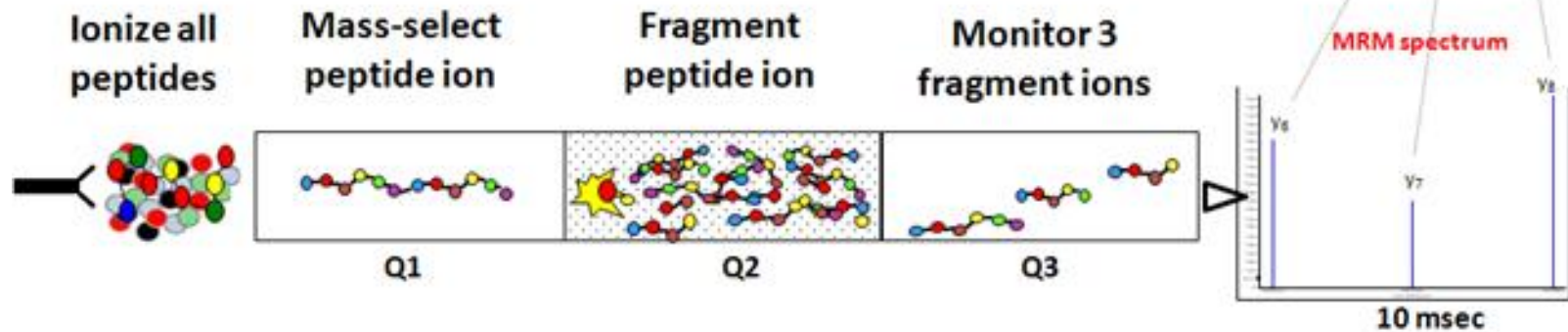


# Στοχευμένη πρωτεομική ανάλυση για απόλυτη ποσοτικοποίηση MRM (Multiple Reaction Monitoring)

## MS/MS Operating Mode



## MRM-MS

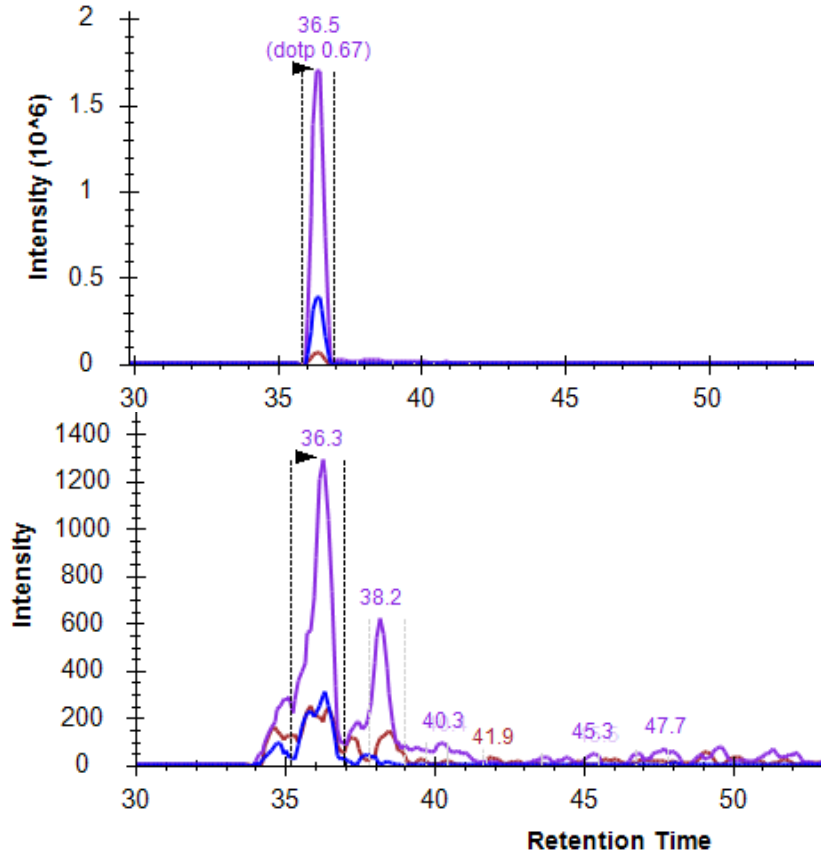


Πιο ειδική μέθοδος από την ELISA



# Τυπικά δεδομένα μεθόδου MRM

Η ανάλυση πεπτιδίου αναφοράς σεσημασμένου με  $^{15}\text{N}$  εγγυάται την ποιότητα της ταυτοποίησης

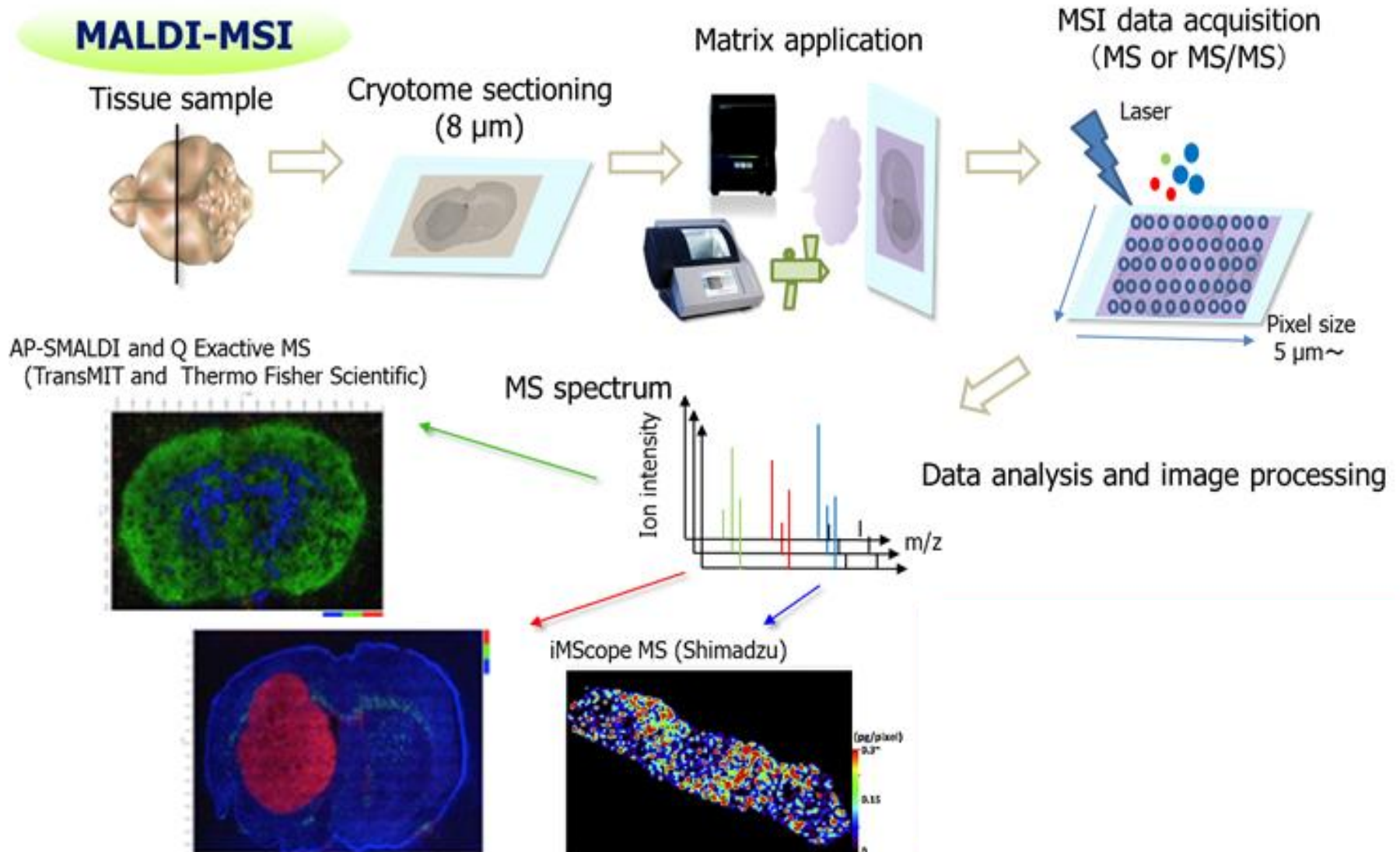


*Πεπτίδιο αναφοράς (heavy)*

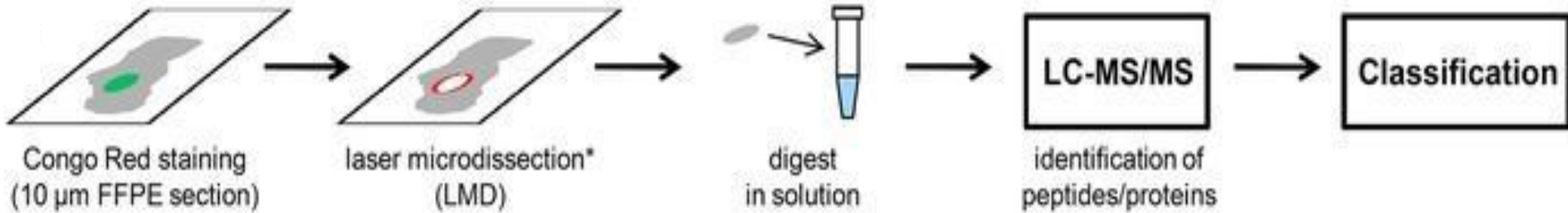
*Πεπτίδιο δείγματος (light)*

Η μέθοδος έχει εξαιρετική αναπαραγωγικότητα και ειδικότητα

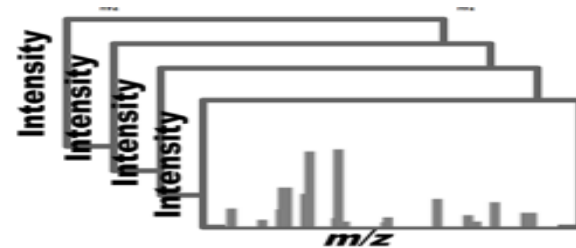
# Απεικόνιση ιστού με φασματομετρία μάζας



# Ταυτοποίηση πρωτεϊνών αμυλοειδούς και σχετική ποσοτικοποίηση



## (LC-MS/MS)

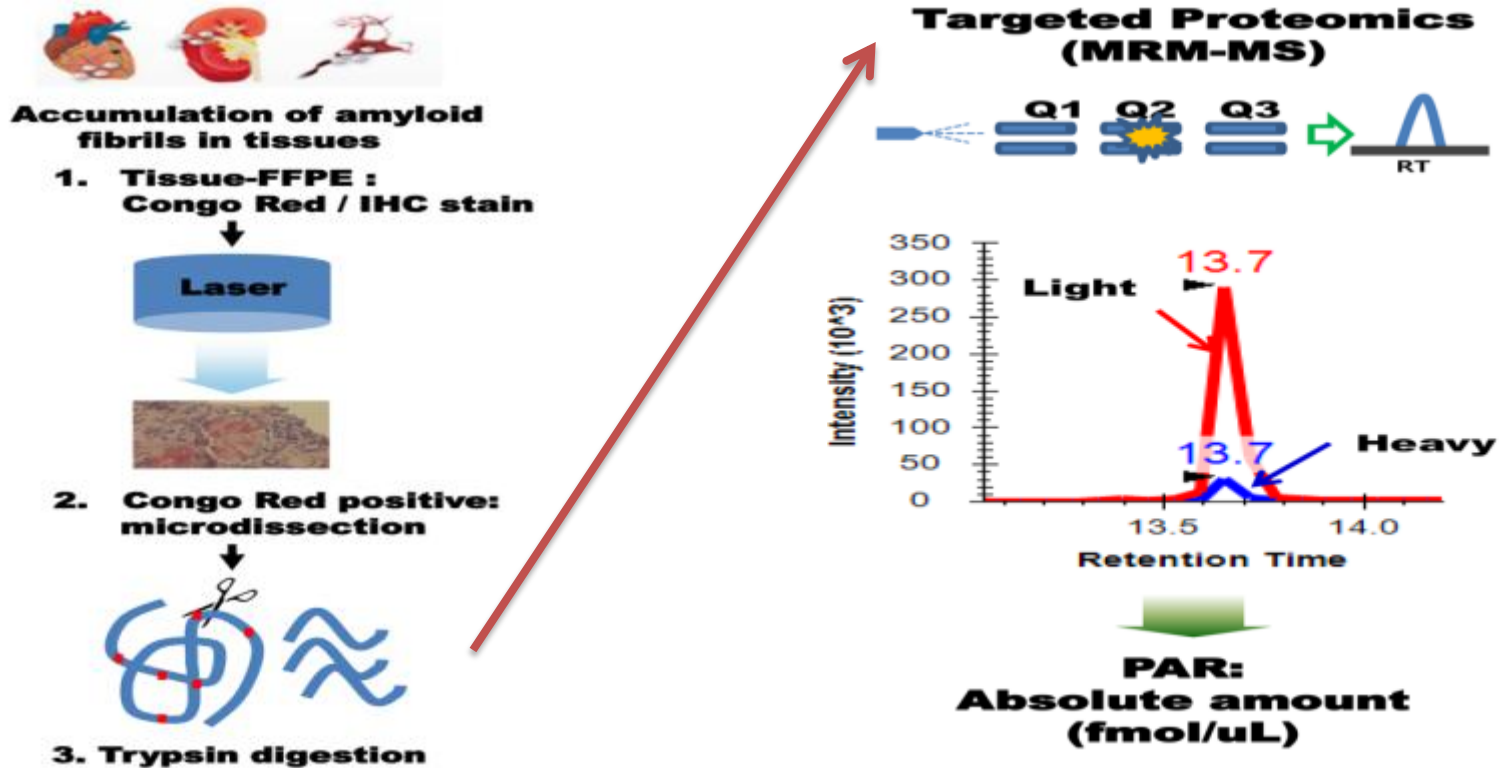


**Spectral counts:  
Relative amount**

# Αποτελέσματα πρωτεομικής ανάλυσης αμυλοειδούς

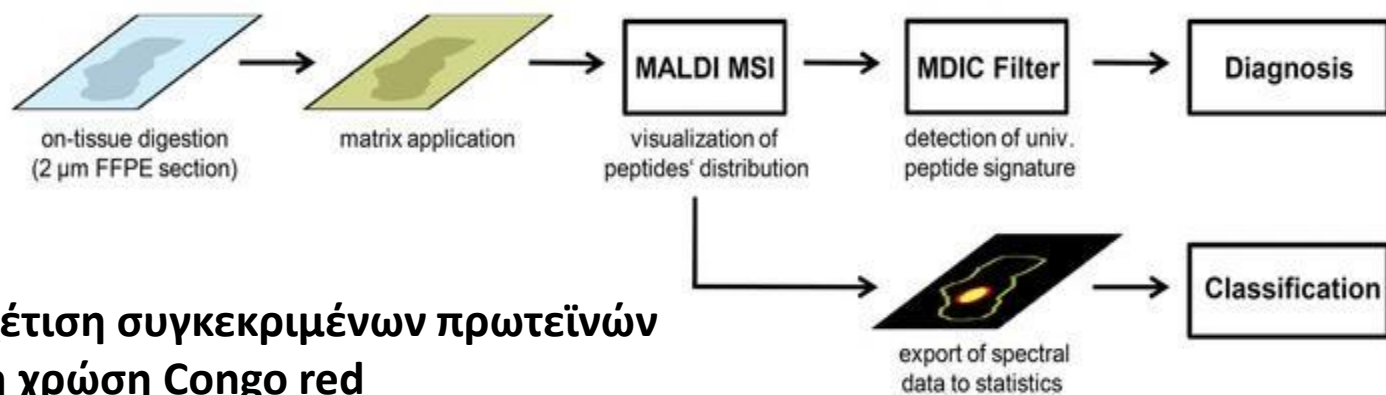
#	Identified proteins (545)	ATTR	AA	AL-L	AL-K	ALns	ALys	AGel
1	Apolipoprotein E	21	76	61	53	136	31	3
2	Apolipoprotein A-4	21	7	36	55	69	33	22
3	Transthyretin	<b>174</b>						
4	Serum amyloid A-1 protein		<b>143</b>					
5	Ig lambda-2 chain C regions			<b>140</b>				
6	Ig kappa chain C region				<b>139</b>			
7	Serum amyloid P-component	11	47	27	11	23	2	4
8	Insulin					<b>107</b>		
9	Ig lambda chain V-IV region			<b>74</b>				
10	Lysozyme C						<b>46</b>	
11	Gelsolin							<b>41</b>
12	Ig kappa chain V-I region				<b>3</b>			
13	Collagen alpha-3(VI) chain	175	161	252	208	278	154	165
14	Basement membrane-specific heparan sulfate	87	117	101	91	53	135	122
15	Collagen alpha-1(VI) chain	81	49	95	104	124	55	61
16	Vimentin	54	76	47	31	64	120	60
17	Collagen alpha-2(VI) chain	45	35	75	64	90	45	54
18	Hemoglobin subunit beta	56	77	51	42	26	33	29
19	Membrane primary amine oxidase	45	58	32	28	27	63	56
20	Perilipin-1	48	46		9	24	90	62
21	Annexin A2	39	47	35	21	43	63	33
22	Actin, alpha skeletal muscle	20	44	25	60	36	55	17
23	Hemoglobin subunit alpha	55	44	43	42	17	26	23
24	Myosin-9	39	21	56	20	45	38	36

# Απόλυτη ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών αμυλοειδούς



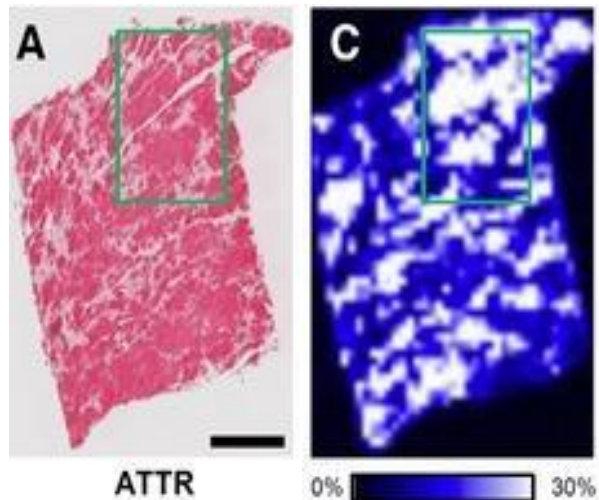
Προκαταρκτικά αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η στοχευμένη πρωτεομική ανάλυση είναι πιο ειδική και ευαίσθητη από την ανοσοϊστοχημεία και την γενική πρωτεομική ανάλυση που καταλήγει σε σχετική ποσοτικοποίηση

# Απεικόνιση αμυλοειδούς με φασματομετρία μάζας



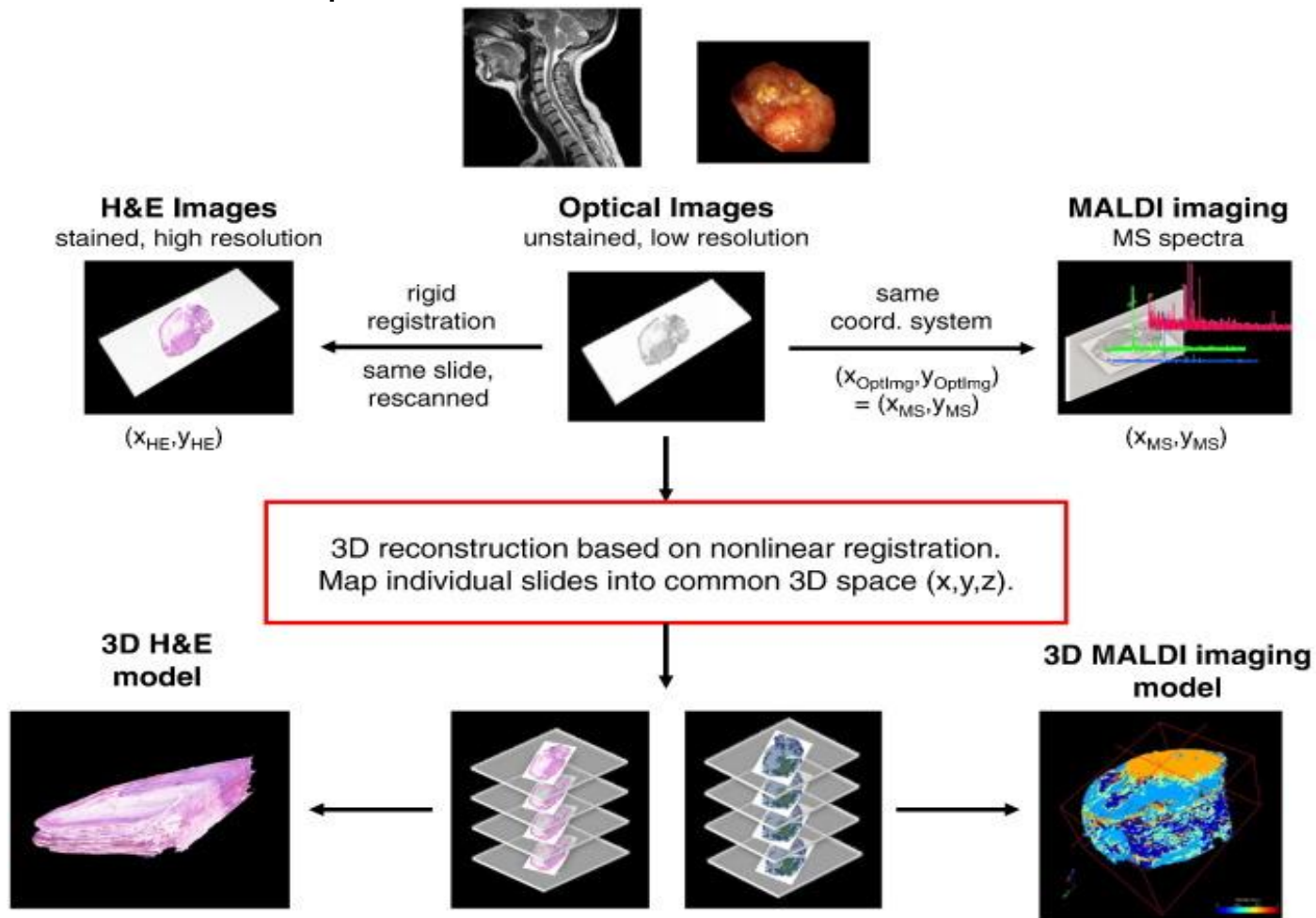
Συσχέτιση συγκεκριμένων πρωτεϊνών με τη χρώση Congo red

Congo Red Πεπτίδιο ATTR

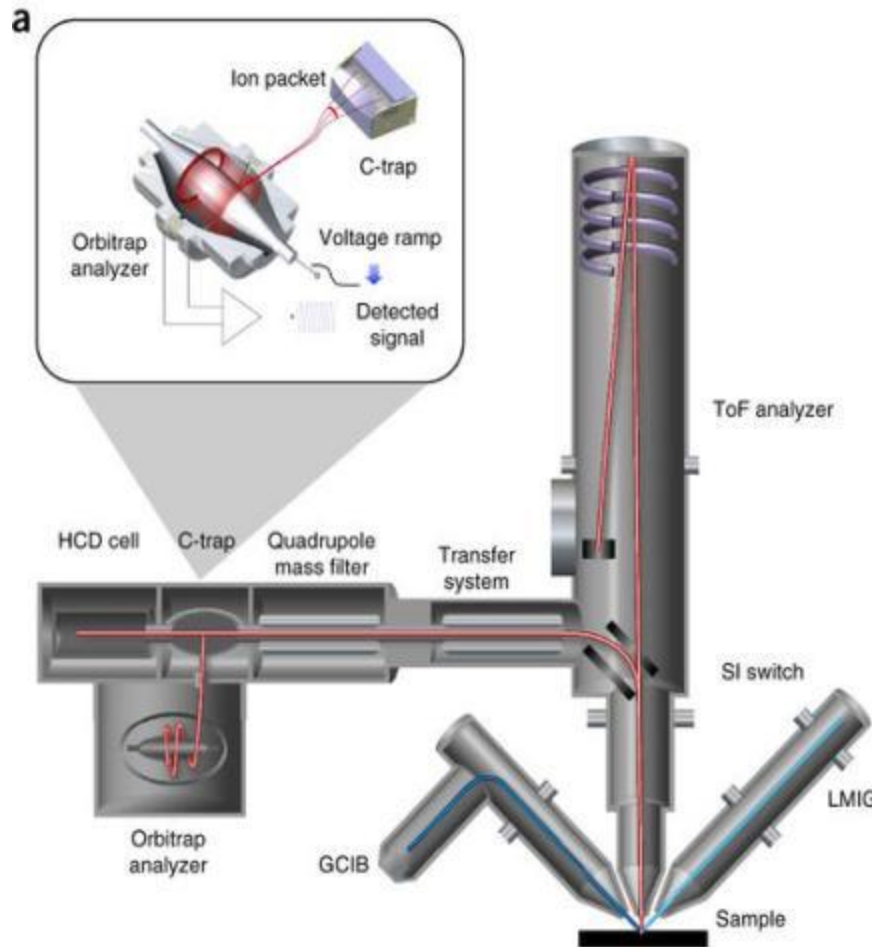


# Μελλοντικές εξελίξεις

1. Εφαρμογή στοχευμένων πρωτεομικών μεθόδων στην τυποποίηση αμυλοειδούς θα διευκολύνει την διάγνωση
2. Τρισδιάστατη ανάλυση αμυλοειδούς με φασματομετρία μάζας μέσω συνδυασμού δισδιάστατων τομών

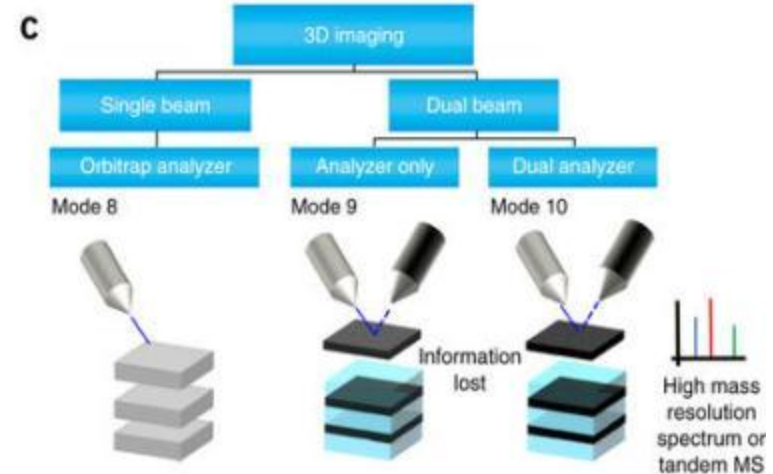


# Άμεση τρισδιάστατη ανάλυση αμυλοειδούς με φασματομετρία μάζας



**b**

	Method	Beam modality	Mass analyzer	Mode
	Surface spectra (1D)	Single beam ( $Bi_n$ or $Ar_n$ )	ToF	1
			Orbitrap analyzer	2
	Depth profiling	Dual beam ( $Ar_n$ and $Bi_n$ )	ToF	3
			Orbitrap analyzer	4
			Dual analyzer	5
	Imaging (2D)	Single beam ( $Bi_n$ or $Ar_n$ )	ToF	6
			Orbitrap analyzer	7
	3D Imaging	Dual beam ( $Ar_n$ and $Bi_n$ )	Orbitrap analyzer	8
			ToF	9
			Dual analyzer	10



The 3D OrbiSIMS—label-free metabolic imaging with subcellular lateral resolution and high mass-resolving power [Melissa K Passarelli](#). *Nature Methods* volume 14, pages 1175–1183 (2017)



**Κωνσταντίνος Καβάφης**  
**«Σοφοί δε Προσιόντων»**

Οι άνθρωποι γνωρίζουν τα γινόμενα.  
Τα μέλλοντα γνωρίζουν οι θεοί,  
πλήρεις και μόνοι κάτοχοι πάντων των φώτων.  
**Εκ των μελλόντων οι σοφοί τα προσερχόμενα  
αντιλαμβάνονται.**

Η ακοή αυτών κάποτε εν ώραις σοβαρών σπουδών ταραττεται.  
**Η μυστική βοή τούς έρχεται των πλησιαζόντων γεγονότων.**  
**Και την προσέχουν ευλαβείς.**  
Ενώ εις την οδόν έξω, ουδέν ακούουν οι λαοί.