

# 2D-Differential Gel Electrophoresis & Applications en neurosciences

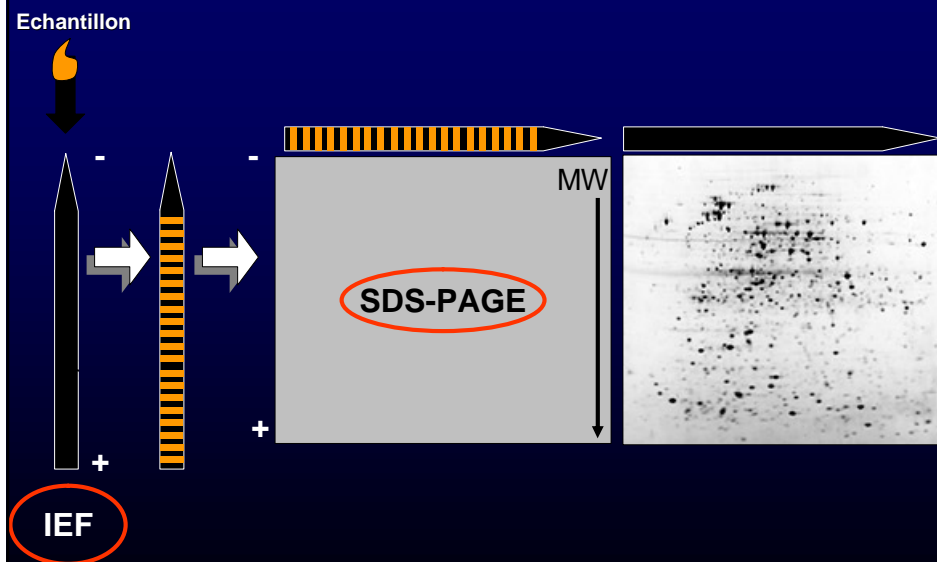
Jean-Etienne Poirrier

Centre de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire  
Centre de Recherches du Cyclotron  
Université de Liège

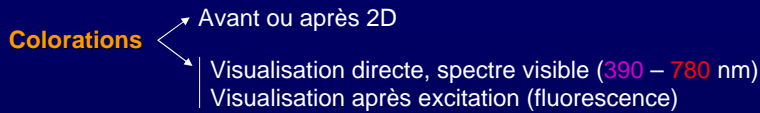
Rencontre CJSFEAP – 1ère édition  
21 janvier 2005  
ESPI, Paris (F)



## Electrophorèse 2D classique

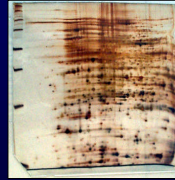


# Détection des protéines sur gels 2D



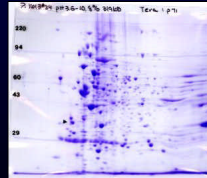
## Coloration à l'argent :

- visualisation dans le visible
- rapide, peu chère
- limite de détection : 0,02 ng
- **linéarité : 1,5 ordre de magnitude**
- **faible homogénéité**
- **interférences** avec techniques en aval



## Coloration au bleu de coomassie :

- visualisation dans le visible
- rapide, peu chère
- **limite de détection : 38 ng**
- **linéarité : 2 – 3 ordres de magnitude**
- meilleure homogénéité
- moins d'interférences



Réf : Merril & Washart, 1998 ; Rabilloud et al., 2001



# Détection des protéines sur gels 2D

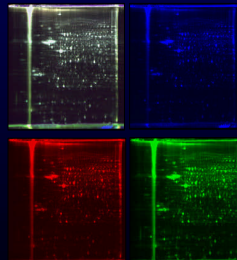
## Coloration au Sypro Ruby (ruthénium) :

- fluorescence
- temps correct, chère (sauf RuBPS)
- limite de détection : 1 ng
- linéarité : 4 ordres de magnitude
- bonne homogénéité
- ok pour MS (si lavages adéquats)



## Coloration à la cyanine :

- fluorescence
- temps correct, chère
- limite de détection : 125 pg
- linéarité : 5 ordres de magnitude
- excellente homogénéité (std int)
- ok pour MS



Réf : Rabilloud et al., 2000 ; Lilley et al., 2001 ; Rabilloud et al., 2001 ; Lopez et al., 2003



# Problèmes des gels 2D

- Reproductibilité (*gel-to-gel variation*)
- Résolution
- Analyse quantitative
- Protéines de pI extrêmes
- Récupération des protéines hydrophobes et de membrane  
➔ ASB14, Triton-X100, ...
- Récupération des protéines de haut poids moléculaire
- Faible représentation des protéines en faible quantité ➔  
IPG, ...
- Compatibilité avec la spectrométrie de masse ➔ lavage  
après Sypro, ...

Réf : Ünlü et al., 1997 ; Lilley et al., 2002



- Résolution
- Reproductibilité
- Analyse quantitative

## 2D-DIGE

Marquage minimal  
(*minimal labelling*)

Marquage de saturation  
(*saturation labelling*)

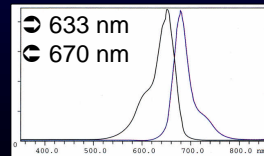
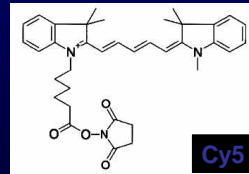
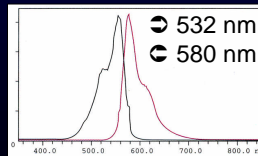
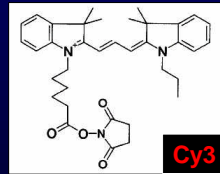
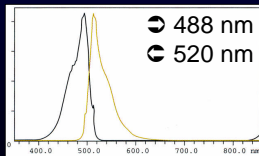
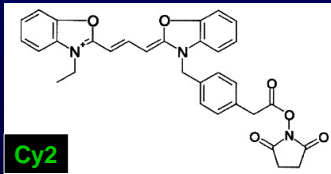
1. Utilisation de **cyanines** comme marqueurs
2. Migration de **3 échantillons**<sup>1</sup> dans le même gel
3. Utilisation d'un **standard interne, normalisation**

Réf : Ünlü et al., 1997



# Cyanines

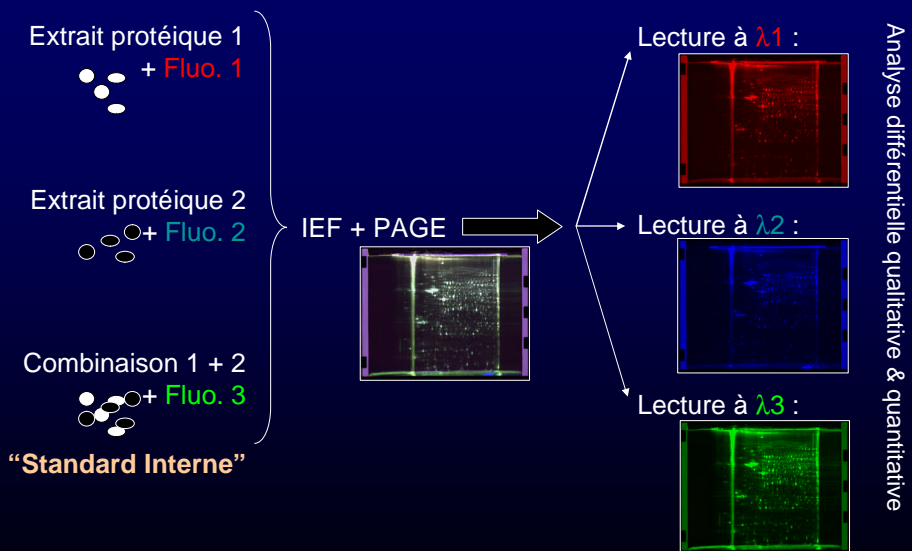
1. Charge doit correspondre à la charge des résidus protéiques modifiés
2. Mr et charge similaires entre eux
3. Spectres de fluorescence différents



Réf : Ünlü et al., 1997 ; Tonge et al., 2001

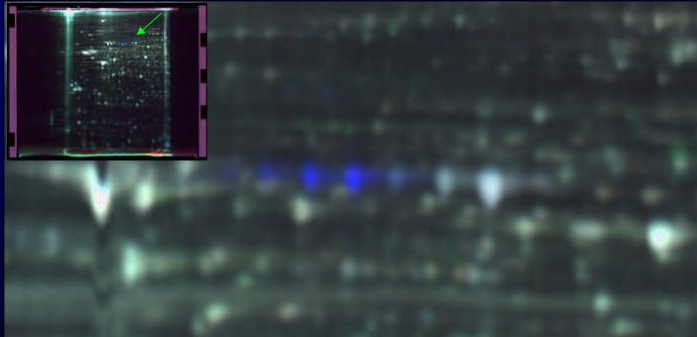


# Principe



Réf : Ünlü et al., 1997





## Standard Interne

Regroupement de quantités égales des échantillons étant comparés

Gel	Cy2	Cy3	Cy5	Gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	POOL	ConA	T1D	7	POOL	T2A	ConE
2	POOL	ConB	T2D	8	POOL	T2B	T1E
3	POOL	ConC	T3D	9	POOL	T2C	T3F
4	POOL	T1A	ConD	10	POOL	T3A	ConF
5	POOL	T1B	T2E	11	POOL	T3B	T1F
6	POOL	T1C	T3E	12	POOL	T3C	T2F

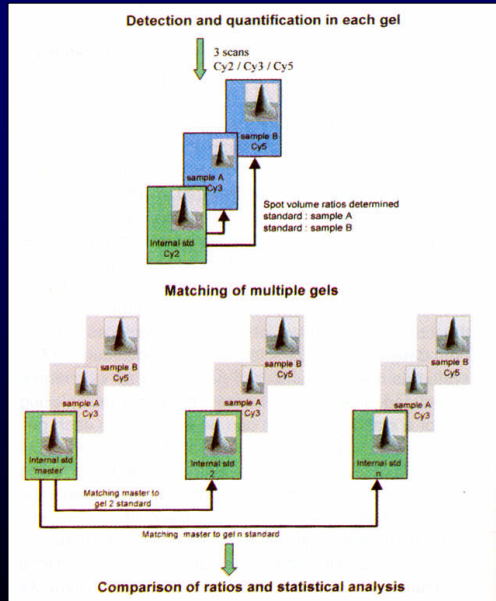
Control group	= Con (A-F)
Treated group 1	= T1 (A-F)
Treated group 2	= T2 (A-F)
Treated group 3	= T3 (A-F)

- représente la moyenne de tous les échantillons analysés
- assure que toutes les protéines des échantillons soient présentes

- ➡ comparaison et *matching* des gels
- ➡ normaliser les mesures d'abondances sur plusieurs gels



# Standard Interne

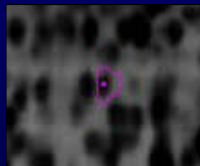


Réf : Alban et al., 2003



# Normalisation

Notion de volume d'un spot



Volume = surface (pixels) x intensité (échelle de gris)



# Normalisation

Calcul des **quotients d'abondance**  
pour des paires de spots co-détectés dans le même gel

**Différences inhérentes au système :**  
intensité du laser, de la fluorescence,  
variation des filtres, quantités d'échantillons, ...

**Normalisation**  
basée sur 1 hypothèse :  
*la majorité des spots n'ont pas changé d'une image à l'autre*

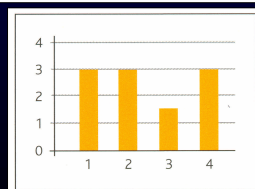
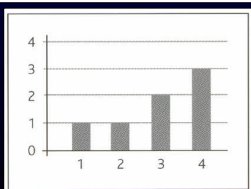
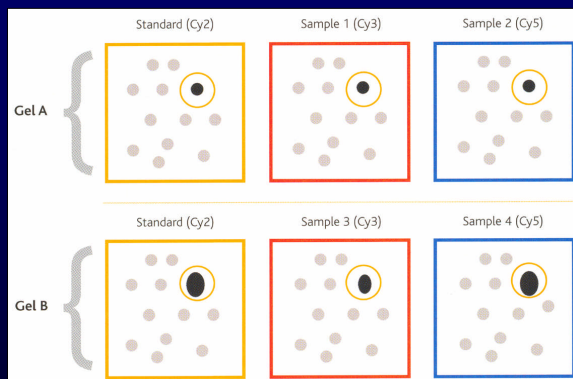
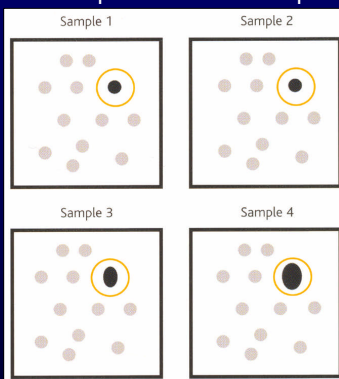
Réf : Alban et al., 2003



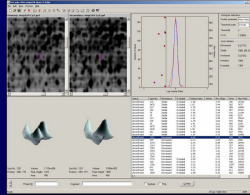
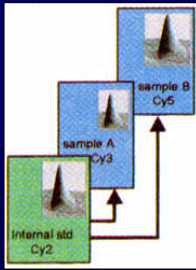
# Normalisation

Electrophorèse 2D classique

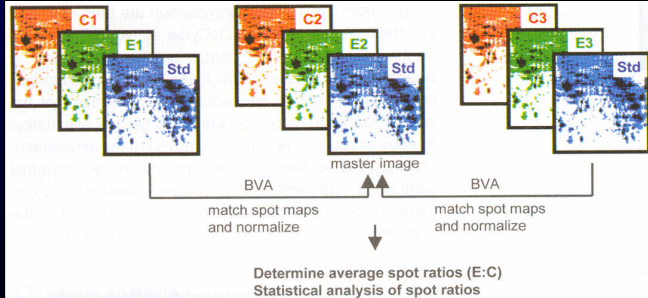
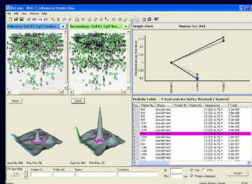
2D-DIGE



# Analyse statistique



**D.I.A.** : Differential In-gel Analysis  
**B.V.A.** : Biological Variance Analysis

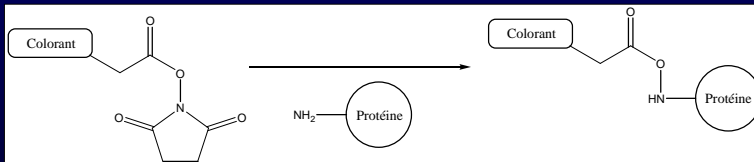
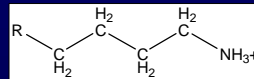


Réf : Alban et al., 2003 ; Knowles et al., 2003



# Marquage minimal

Marquage **avant** électrophorèses  
 de 1 – 2 % résidus lysine (6 - 10%)  
 (protéine:colorant = 50 µg:200 pmol)



Masse ajoutée aux protéines	Cy3	Cy5	Cy2
	+ 434 Da	+ 466 Da	+ 464 Da

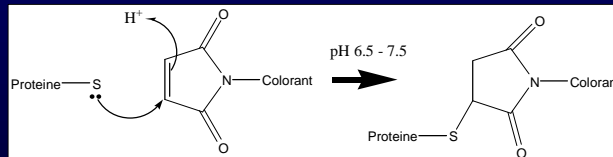
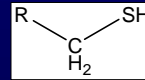
Comment améliorer encore la sensibilité ?  
 Comment passer en MS sans décalage entre protéines marquées et non-marquées ?

Réf : Ünlü et al., 1997 ; Tonge et al., 2001



# Marquage de saturation

Marquage **avant** électrophorèses  
par **saturation** des résidus cystéine (3%)  
(protéine:colorant = 50 µg:20nmol)



	Maleimide Cy3	Maleimide Cy5
Masse ajoutée aux protéines	+ 673 Da	+ 684 Da

Meilleure sensibilité  
Passage direct en MS  
Moins de *photo bleaching*

Réf : Shaw et al, 2003



## 2D-DIGE

- Reproductibilité ✓
- Résolution ✓
- Analyse quantitative ✓
- Passage direct à la MS
- + Meilleure confiance
- + Automatisation + technique
- + Statistiques avancées
- + Réduction du nombre d'échantillons
- matériel coûteux et sous brevet ✗

Réf : Freeman et Hemby, 2004 ; USA patents 5,268,486 (12/1993) et 6,043,025 (03/2000)



# Protéomique en neurosciences

## Difficultés particulières :

- quantité d'échantillons limitée
- composition cellulaire hétérogène
- protéines d'intérêt souvent hydrophobes

## Exemples :

- dégradation spécifique de protéines dans le cerveau humain post-mortem,
- abondance de lipides et des acides nucléiques (purification par acétone, TCA, ...),
- abondance d'IGGs, de l'albumine,
- ...

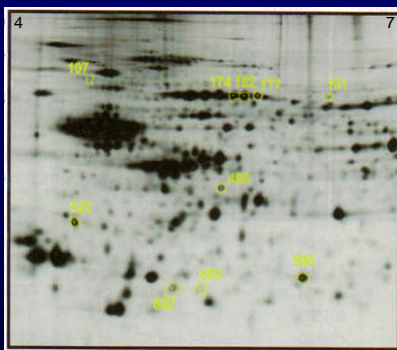
## Applications potentielles :

- détermination du neuroprotéome
- profils comparatifs d'expression
- ...

Réf : Freeman et Hemby, 2004

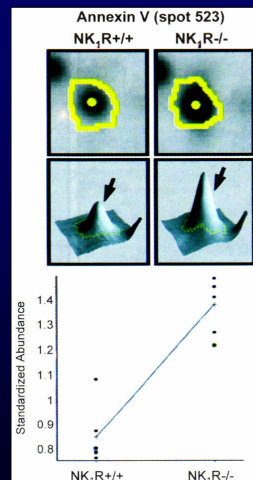
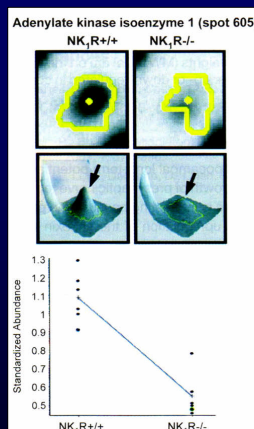


# Souris $NK_1R^{-/-}$



Profils d'expression protéique de souris KO pour le gène du récepteur à la neurokinine 1

- ↳ 8 protéines surexprimées, 2 sous-exprimées dans  $NK_1R^{-/-}$
- ↳ rôle physiologique du récepteur  $NK_1$  dans le cerveau de souris



Réf : Knowles et al., 2003



# Bibliographie

- Alban et al., 2003. *A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard*. Proteomics, 3:36-44
- Freeman et Hemby, 2004. *Proteomics for protein expression profiling in neuroscience*. Neurochemical Research, 29:1065-1081
- Issaq et al., 2002. *Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides*. Electrophoresis, 23:3048-3061
- Knowles et al., 2003. *Multiplex proteomic analysis by two-dimensional differential in-gel electrophoresis*. Proteomics, 3:1162-1171
- Lilley et al., 2001. *Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation*. Current Opinion in Chemical Biology, 6:46-50
- Lopez et al., 2003. *High-content proteomics: fluorescence multiplexing using an integrated, high-sensitivity, multi-wavelength charge-coupled device imaging system*. Proteomics, 3:1109-1116
- Merrill et Washart, 1998. *Protein detection methods*. In *Gel electrophoresis of proteins*, ed. Hames, Oxford University Press, 1998; pp. 53-91
- Rabilloud et al., 2000. *Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate), a powerful fluorescent stain for detection of proteins in gel with minimal interference in subsequent mass spectrometry analysis*. Proteome, 2000 (online)
- Rabilloud et al., 2001. *A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels*. Proteomics, 1:699-704
- Shaw et al., 2003. *Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes*. Proteomics, 3:1181-1195
- Tonge et al., 2001. *Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology*. Proteomics, 1:377-396
- Ünlü et al., 1997. *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. Electrophoresis, 18:2071-2077

