



Doctoral Thesis

Analysis of protein expression and post-translational modifications in the brain using mass spectrometry

Author(s):

Tweedie-Cullen, Ry Yves

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005830666> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 18323

**ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION AND POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS
IN THE BRAIN USING MASS SPECTROMETRY**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of Dr. sc. ETH Zurich

presented by
RY YVES TWEEDIE-CULLEN
BSc, MSc - University of Auckland, New Zealand

accepted on the recommendation of
Isabelle Mansuy, examiner
Bernd Wollscheid, co-examiner

2009

Summary

The work presented in this thesis can be broadly divided into two main areas: the qualitative analyses of protein post-translational modifications (PTMs), and the quantitative analyses of protein expression and phosphorylation in transgenic mice. The qualitative analyses described provide workflows for the analysis of neural protein post-translational modifications including phosphorylation, methylation, acetylation and ubiquitination. The findings from this provide an extensive mapping of PTMs on histone proteins in the brain, and on other major synaptic, nuclear, vesicle-associated and cytoplasmic proteins. The data demonstrate that histones PTMs are much more prevalent than previously anticipated, and further strengthen their importance for regulatory mechanisms in the brain. These methods resulted in the identification of approximately 3000 unique phosphorylation sites on 1200 synaptic proteins, of which approximately half were undescribed and occur on many key synaptic and nuclear proteins. The quantitative isobaric labelling technique ,iTRAQ, was used to profile and then compare changes in the proteome after over-expression of the immediate early gene *Zif268*, or inhibition of either the protein phosphatase calcineurin or PP1. This demonstrated that CaN inhibition and *Zif268* overexpression modulate similar targets in the amygdala and the comprehensive approach allowed us to see that the profile of regulated functional groups was comparable between the two transgenic lines. Analyses of *Zif268* over-expressing mice elucidated the specific functional groups that are regulated by *Zif268* activation. The application of bioinformatic screens of promotor regions of identified proteins allowed us to both determine and validate direct targets of *Zif268*, in addition, gene ontology analyses suggested a role of the proteasome in *Zif268*-mediated improvements in cognition. The combination of iTRAQ with phosphorylation analyses also allowed the development of a single workflow to analyse both changes in phosphorylation but also changes in protein expression in specific sub-cellular fractions from unique brain regions. This workflow allowed the identification of changes resulting from the inhibition of the protein phosphatase PP1. The proteomic workflows developed here, and the results, represent the possibilities arising from the development and application of neuroproteomic techniques and the use of appropriate bioinformatic tools for their analysis.

Zusammenfassung

Die hier präsentierte Arbeit kann grob in zwei Hauptbereiche unterteilt werden: Auf der einen Seite steht die qualitative Analyse post-translationaler Modifikationen (PTM), und auf der anderen Seite die quantitative Analyse von Proteinausdrücken und der Phosphorylierung in transgenen Mäusen. Die beschriebenen qualitativen Analysen liefern Arbeitsabläufe zur Analyse von post-translationalen Modifikationen neuraler Proteine, wie zum Beispiel Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung. Die Forschungsergebnisse gewährleisteten die umfassende Zuordnung von PTMs auf Histonproteine im Gehirn, sowie auf andere bedeutensame synaptische, nukleare, vesikelverbundene und zytoplasmische Proteine. Die Messwerte zeigen, dass Histon-PTMs sehr viel weiter verbreitet sind als zuvor angenommen, was deren Bedeutung für regulatorische Mechanismen im Gehirn unterstreicht. Durch die Entwicklung und Anwendung dieser Methoden wurden weiterhin fast 3000 einzelne Phosphorylierungsstellen auf 1200 synaptischen Proteinen identifiziert. Ungefähr die Hälfte dieser Phosphorylierungsstellen waren zuvor noch nicht beschrieben, obwohl viele in bedeutenden synaptischen und nuklearen Proteinen auftreten. Die quantitative Technik iTRAQ (Englisch für - Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) wurde angewandt, um Proteinveränderungen in Mäusen mit einer *Zif268*- und *CaN*-überexpression vergleichen zu können. Hiermit wurden Änderungen in Proteomen durch Überexpression von *Zif268* und nach Hemmung von PP1 untersucht. Dies zeigte, dass *CaN*-Hemmung und *Zif268*-überexpression ähnliche Ziele in der Amygdala modulieren. Durch den umfangreichen Ansatz konnte aufgedeckt werden, dass das Profil regulierender funktionaler Gruppen zwischen den beiden transgenen Mäusen vergleichbar ist. In einer weiteren Untersuchung wurde iTRAQ zur Identifizierung von Proteomänderungen eingesetzt, die durch *Zif268*-Überexpression in neuronalen Zellen auftreten. Das Ergebnis waren spezifisch funktionelle Gruppen, von denen angenommen wird, dass sie teilweise die physiologischen Veränderungen während des Gedächtnisaufbaus herbeiführen. Die Anwendung von Bioinformatikmethoden erlaubte zusätzlich die Identifizierung und Validierung von Zielen des Transkriptionsfaktors *Zif268*. Schliesslich zeigte die Genontologie-Analyse auf, dass Veränderungen des Proteoms eine Rolle in der durch *Zif268* herbeigeführten Verbesserungen der Wahrnehmung spielen. Die Kombination von iTRAQ und Analysen der Phosphorylierung ermöglichte zusätzlich die Entwicklung eines Arbeitsablaufes, mit dessen Hilfe die Analyse von Änderungen sowohl in der

Phosphorylierung, als auch in Proteinausdrücken in spezifischen subzellularen Bereichen einzelner Gehirnregionen möglich ist. Die hier entwickelten proteomischen Arbeitsabläufe und deren Resultate zeigen die Möglichkeiten auf, die sich durch die Entwicklung und Anwendung von neuroproteomischen Techniken und der Benutzung angemessenerer Bioinformatikmethoden für ihre Analyse ergeben.