

Molekularno slikanje z masno spektrometrijo in uporaba metode v histologiji

Ana Dolinar, Tjaša Goričan, Veronika Jarc

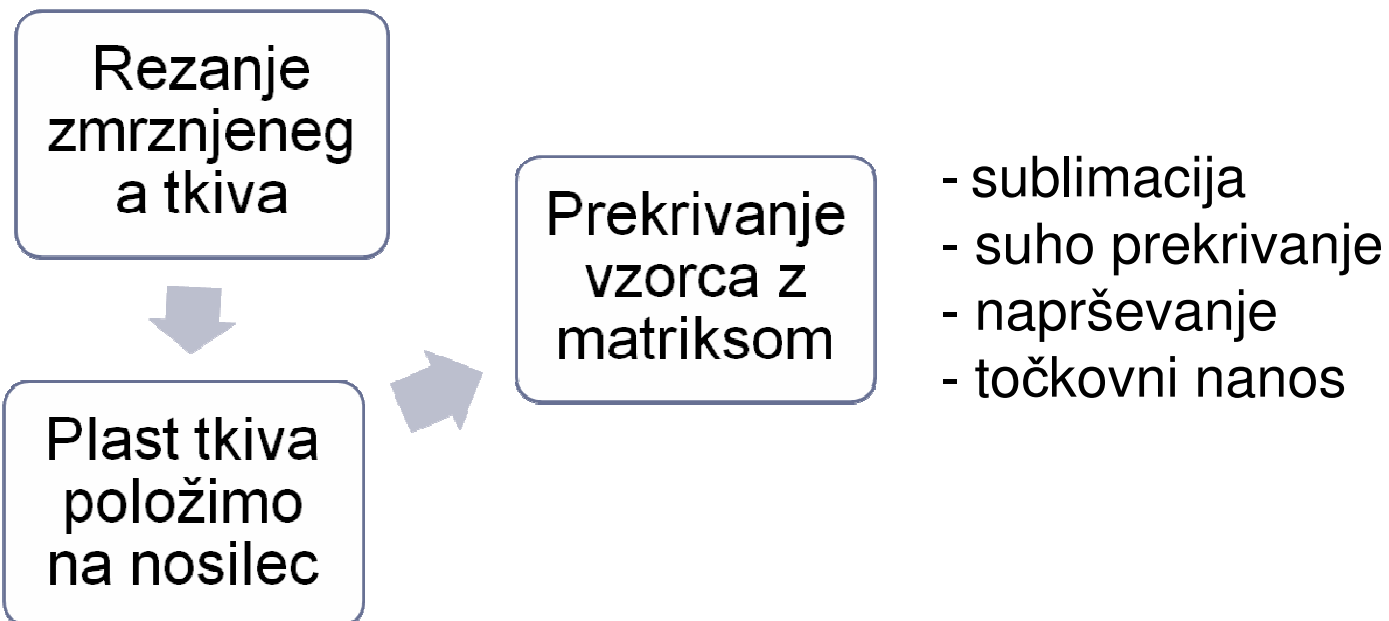
MALDI-IMS

- ▶ MALDI: Matrix-assisted laser desorption ionization
- ▶ IMS: Imaging mass spectrometry
- ▶ Študije histoloških preparatov
- ▶ Analiza lipidov, segmentov DNA, peptidov in proteinov
- ▶ Masa analiziranih molekul: med 1 in 100 kDa



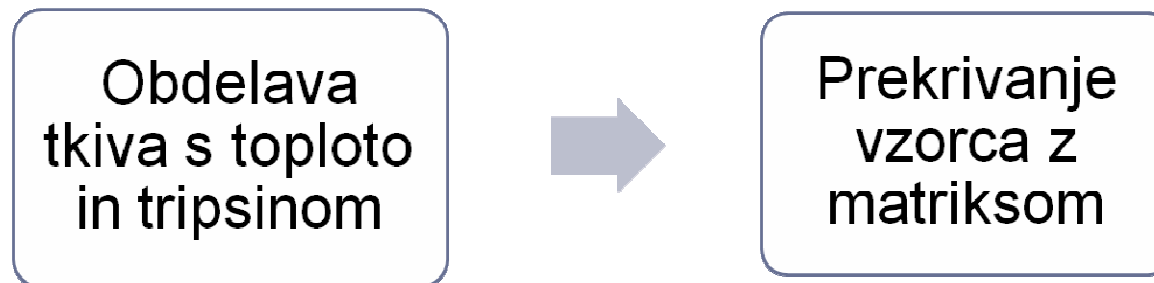
Priprava vzorca

- ▶ Ključni korak za pridobitev dobrih rezultatov
- ▶ Priprava neobdelanega tkiva:



Priprava vzorca

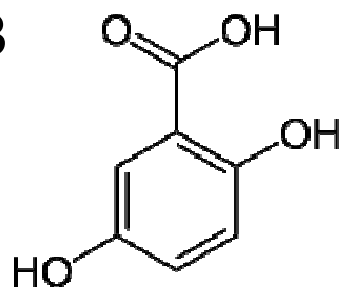
- ▶ Priprava obdelanega tkiva:
 - à obdelano tkivo: fiksacija s formalinom, vključitev v parafin



Priprava vzorca

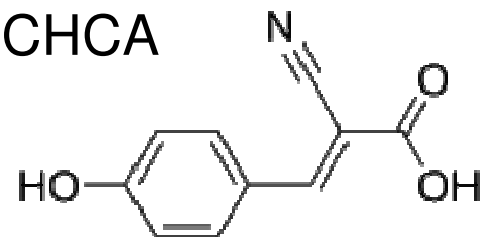
► Pogosto uporabljeni matriksi:

DHB



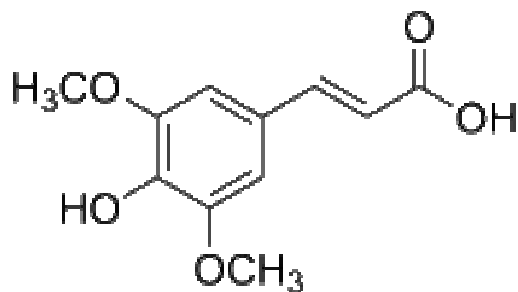
http://en.wikipedia.org/wiki/Gentisic_acid

CHCA



http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic_acid

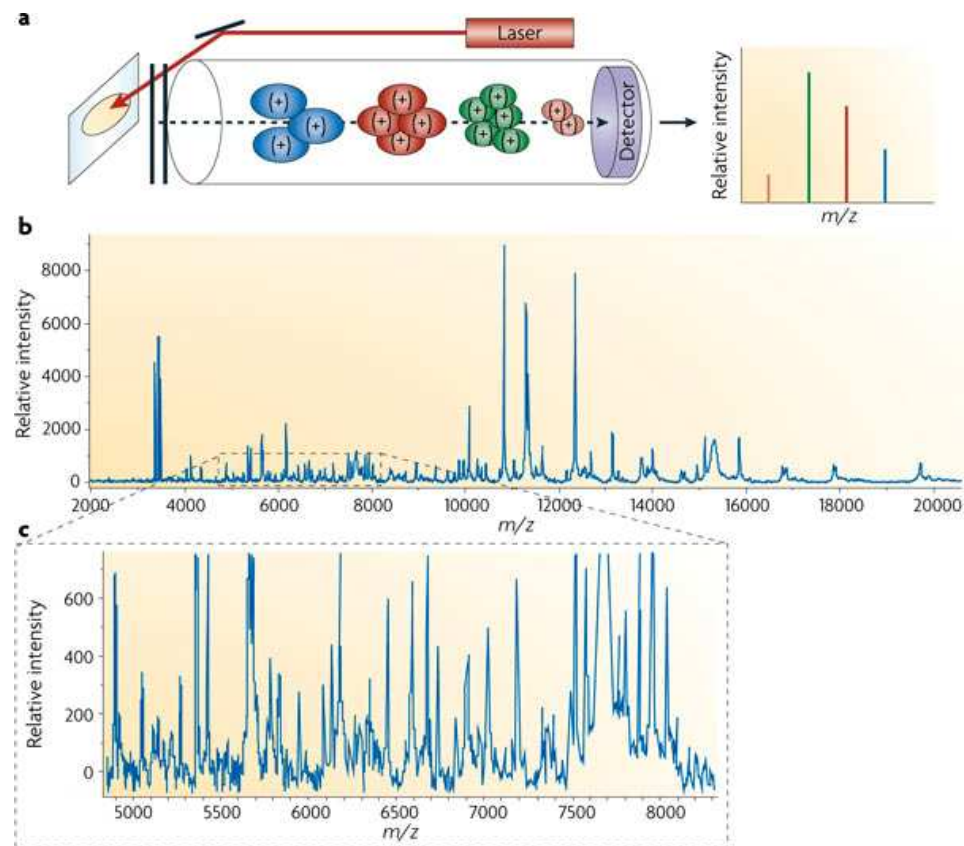
SA



http://en.wikipedia.org/wiki/Sinapinic_acid

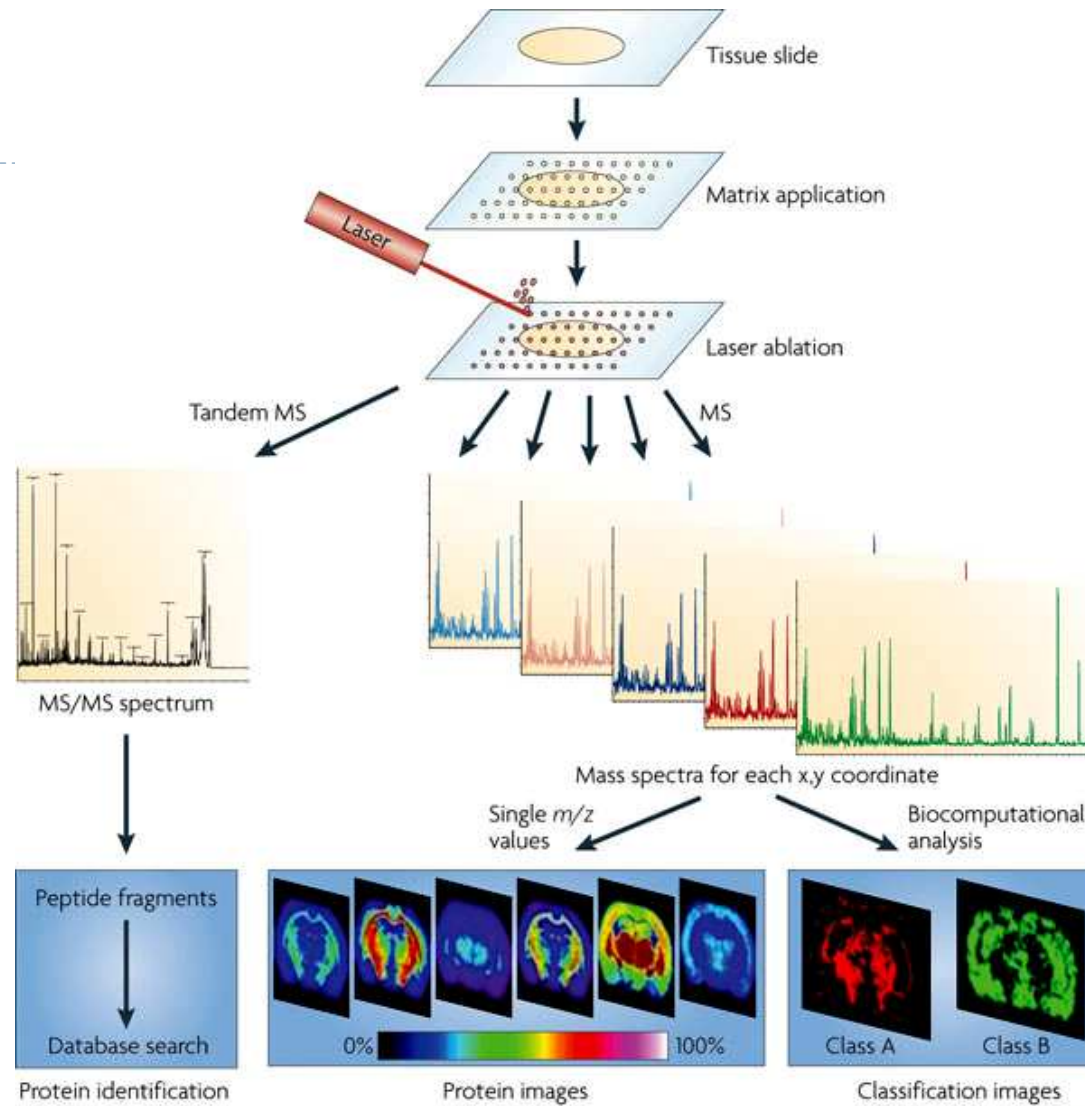


Potek analize

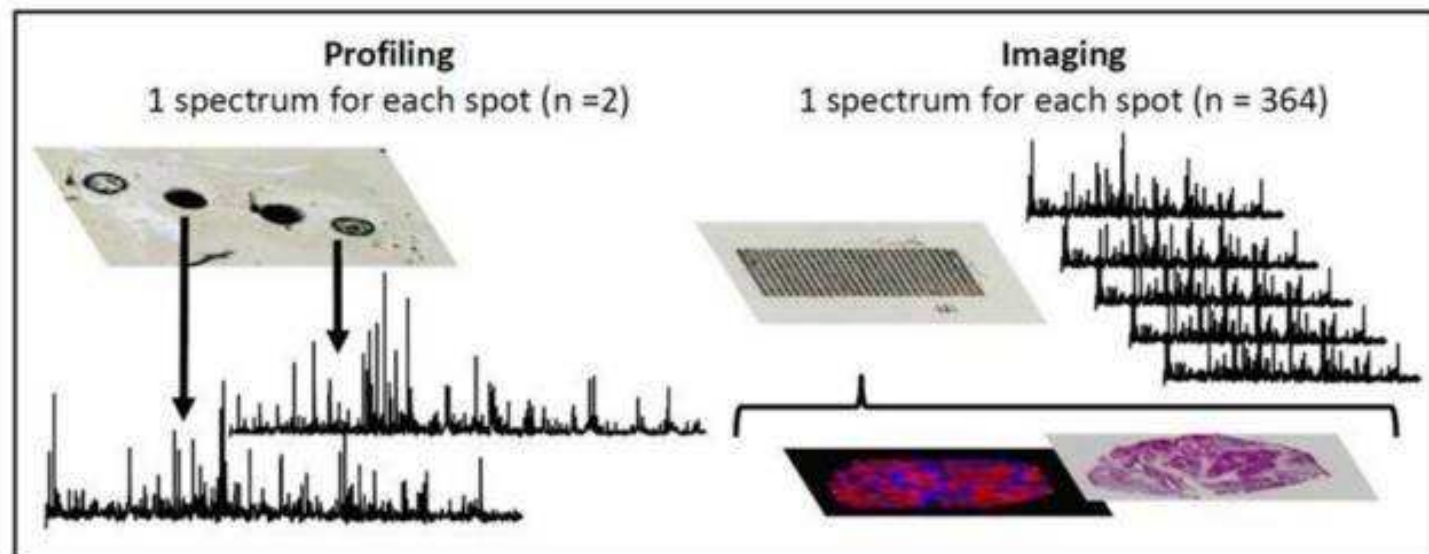


Nature Reviews | Cancer

Schwamborn, K. in Caprioli, R. M., 2010.



Schwamborn, K. in Caprioli, R. M., 2010. [Nature Reviews | Cancer](#)



Gustafsson, J. O. R. *et al.*, 2011.

Prednosti metode

- ▶ Rekonstrukcija podatkov v 3D sliko
- ▶ Neposredna povezava med spektri in anatomskimi ali patološkimi značilnostmi
- ▶ Ne potrebujemo tarčno specifičnih reagentov in predhodnega označevanja analitov
- ▶ Analiza večih vzorcev hkrati



Diagnostične in prognostične študije

- ▶ Zadnja leta: Uporaba MALDI IMS za identifikacijo bioloških molekul (proteinov), ki sodelujejo pri razvoju in napredovanju bolezni (raka)
 - ▶ Biomarkerji
- ▶ Diagnostične študije: Primerjava tkiv:
 - ▶ Tumornih (rakavih) z normalnimi (zdravimi)
 - ▶ Podtipov tumorjev med seboj
- ▶ Prognostične študije: Kategoriziranje pacientov z dolgo in kratko dobo preživetja
- ▶ Identifikacijo proteinov po metodi MALDI IMS potrdimo z metodama IHC in western blot



Zakaj?

MALDI IMS	IHC
=novejša metoda	=starejša metoda
Niso potrebni tarčno specifični reagenti => ni sprememb (modifikacij) površja tkiv => lokalizirajo se lahko tudi proteini z ne znano strukturo (+)	Primarna protitelesa niso na voljo za vse proteine => lokalizirajo se lahko le znani proteini (-)
Resolucijsko omejena- slabša občutljivost (-)	Resolucija do subceličnega nivoja (omejena z resolucijo mikroskopa) (+)
Slabša lokalizacija proteinov Uporaba <u>beber</u> : Se boljše resolucija in občutljivost => več m. za identifikacijo proteinov (-)	Boljša lokalizacija proteinov (+)



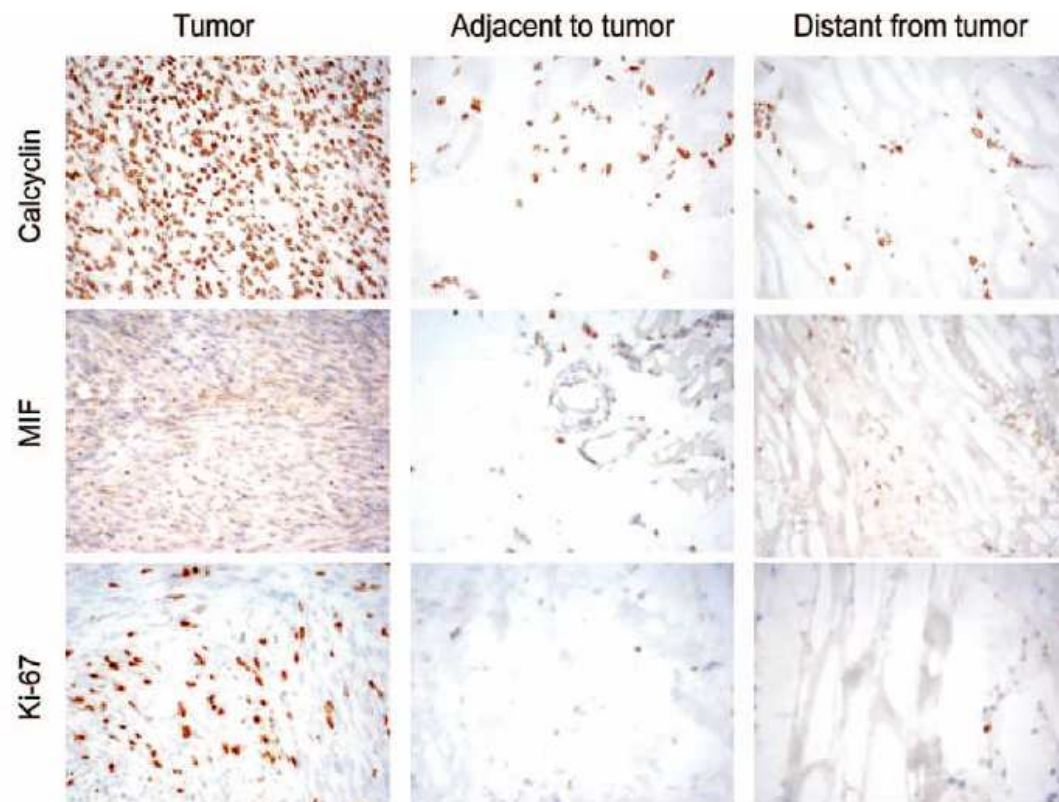
Diagnostične študije

- ▶ Razlike v ekspresiji proteinov med tumorskim (rakavim) in normalnim (zdravim) tkivom
 - ▶ Vidne tudi v normalnem tkivu, ki obdaja tumor



Primer 1: Rak ledvic

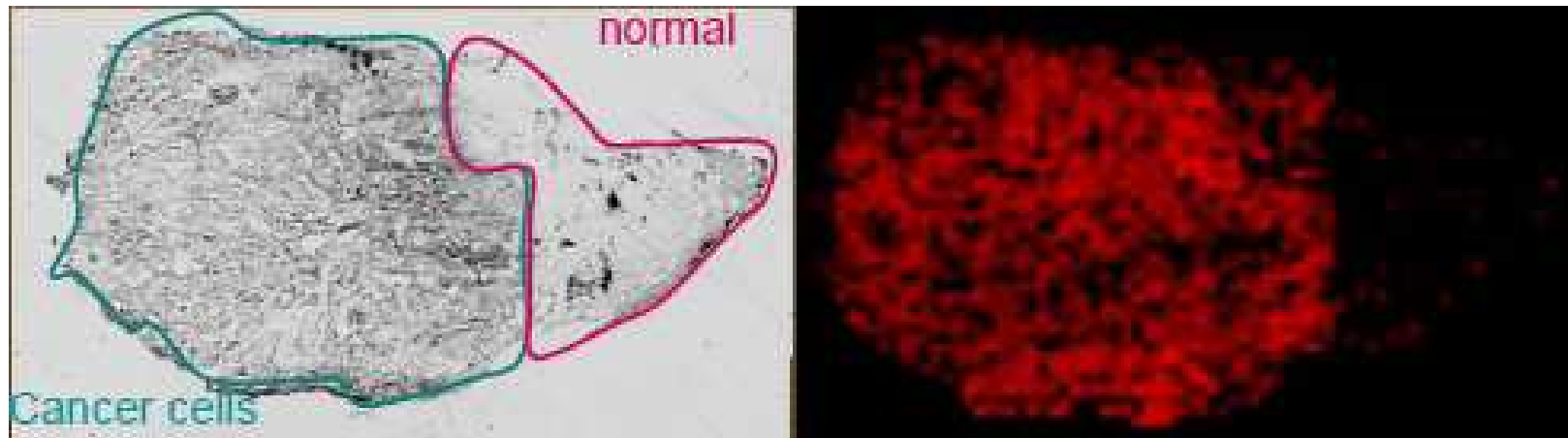
- ▶ Znižanje ekspresije proteinov, ki sodelujejo pri mitohondrijski dihalni verigi v tumorju in v normalnem tkivu, ki meji na tumor



▶ Caldwell, R. L. *et al.*, 2006

Primer 2: Rak na jajčniku

- ▶ Večja ekspresija proteina REG-alfa v rakavem tkivu v primerjavi z normalnim vzorcem

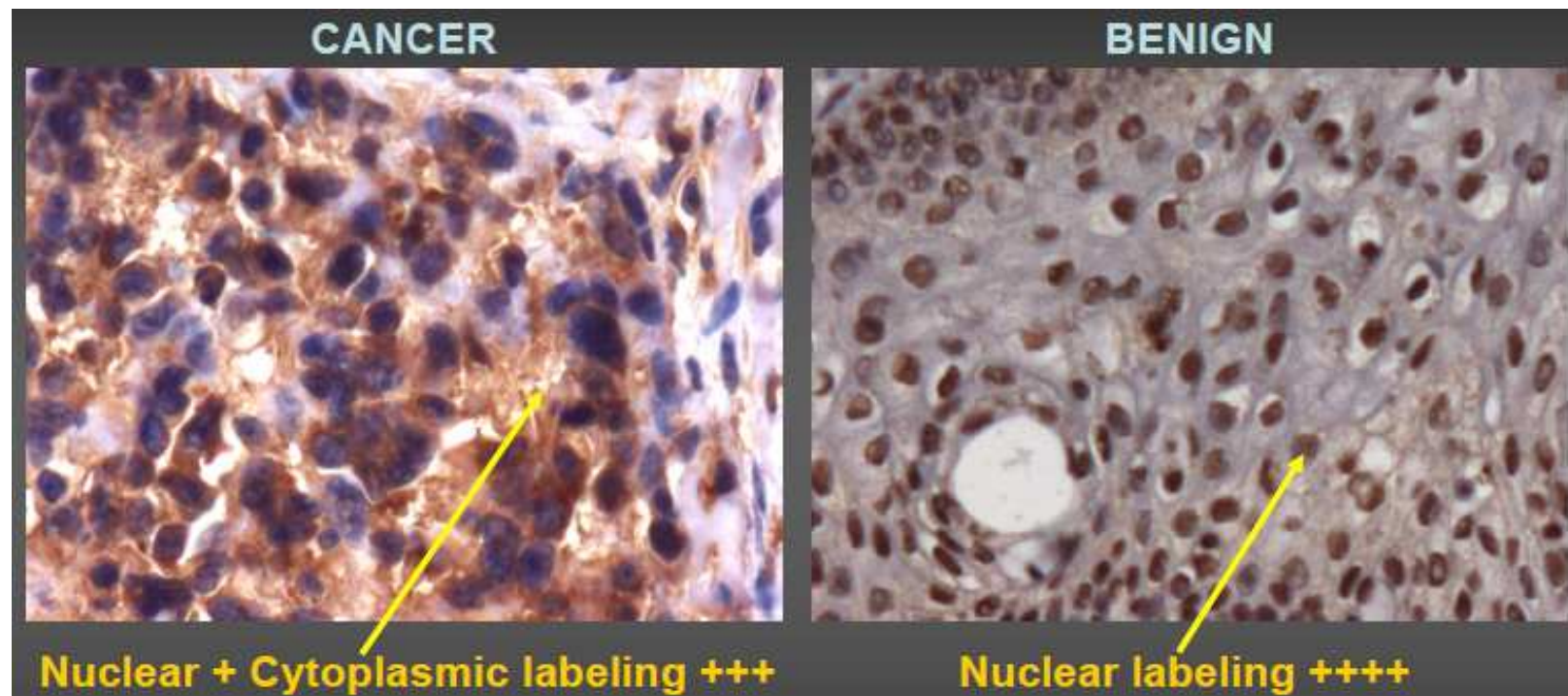


<http://www.proteomics.necker.fr/pdfs/fourniercoursnecker.pdf>



▶ IHC: Lokalizacija REG-alfa:

- ▶ V rakavem tkivu: Citoplazma (nekaj v jedru)
- ▶ V 76,9% benignih tumorjev: NI v citoplazmi

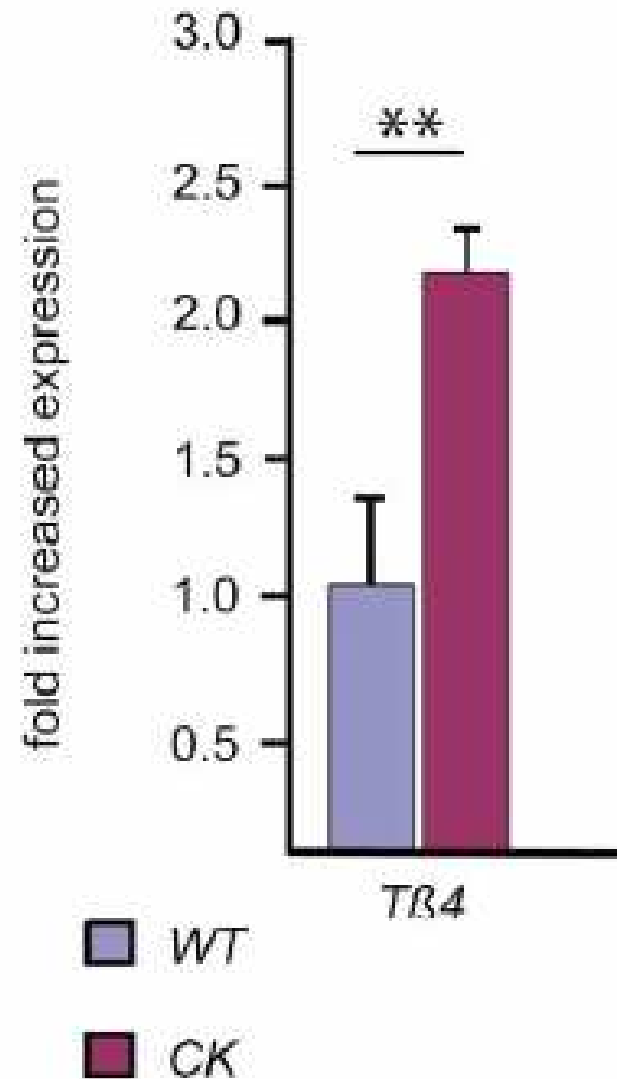


<http://www.proteomics.necker.fr/pdfs/fourniercoursnecker.pdf>



Primer 3: Pljučni rak

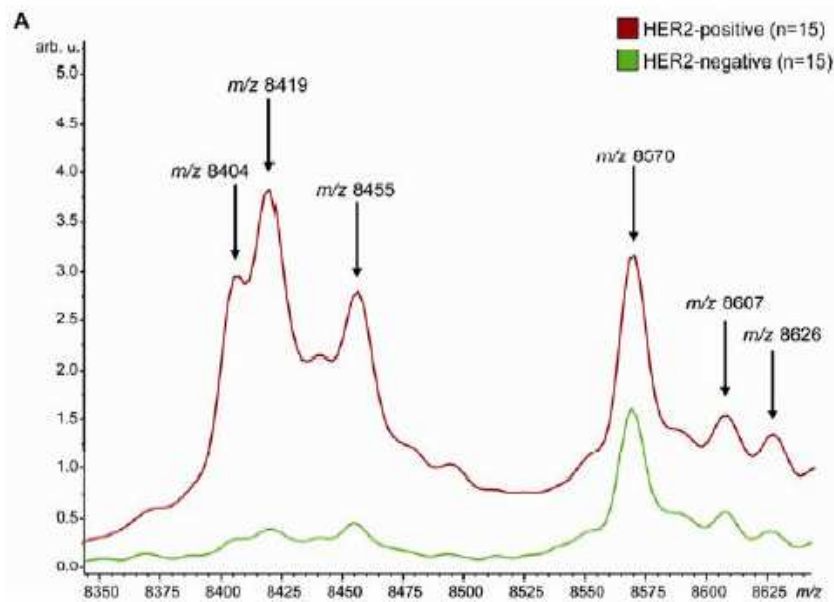
- ▶ Visoka ekspresija proteinov SUMO2 in TMSB4X



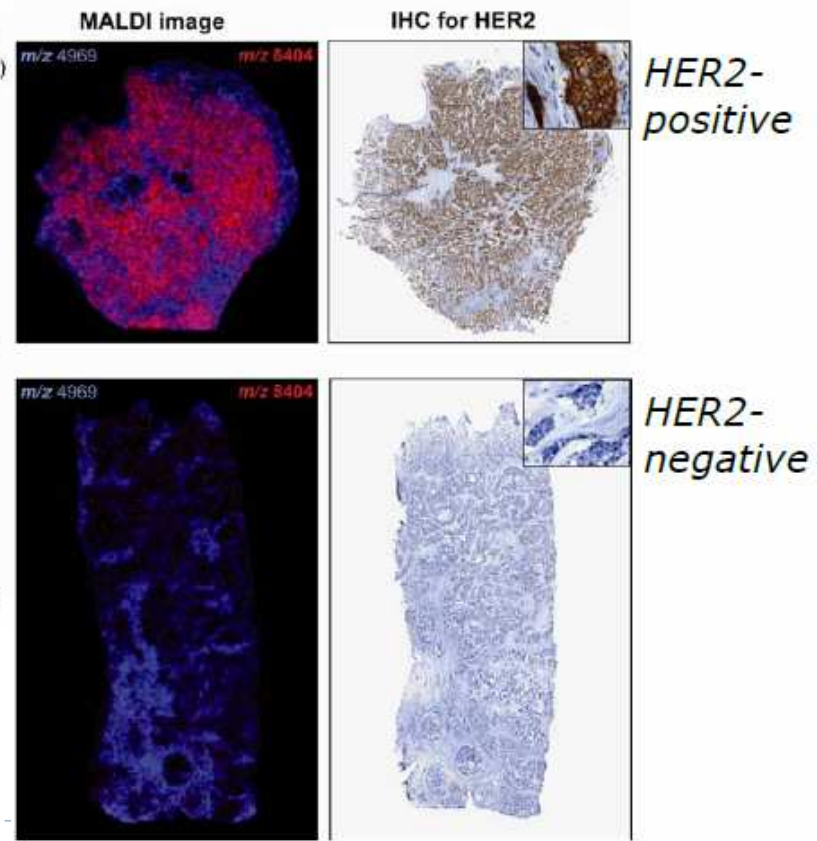
Gruner, B. M. *et al.*, 2012

Primer 4: Rak dojke

- Ocenimo izražanje proteina ERBB2, da predvidemo odziv pacienta na terapijo



Rauser, S. *et al.*, 2010



Rauser, S. *et al.*, 2010

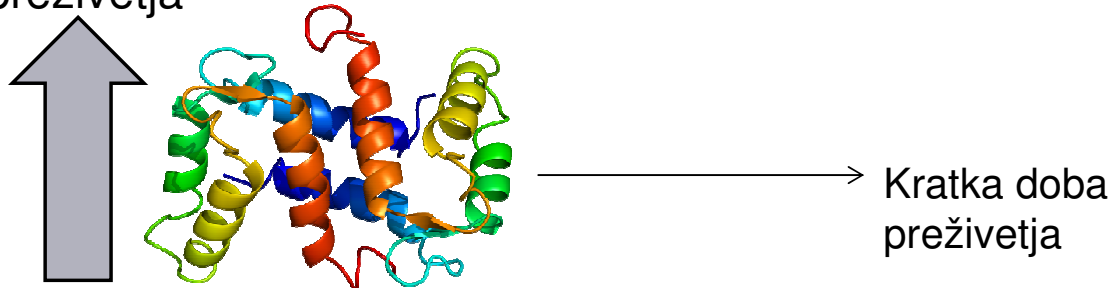
Prognostične študije

- ▶ Glede na to, kateri protein je bolj izražen v tkivu => ugotavljamo čas preživetja pacienta
 - ▶ Razlika v ekspresiji proteinov NE kaže časa preživetja pacienta

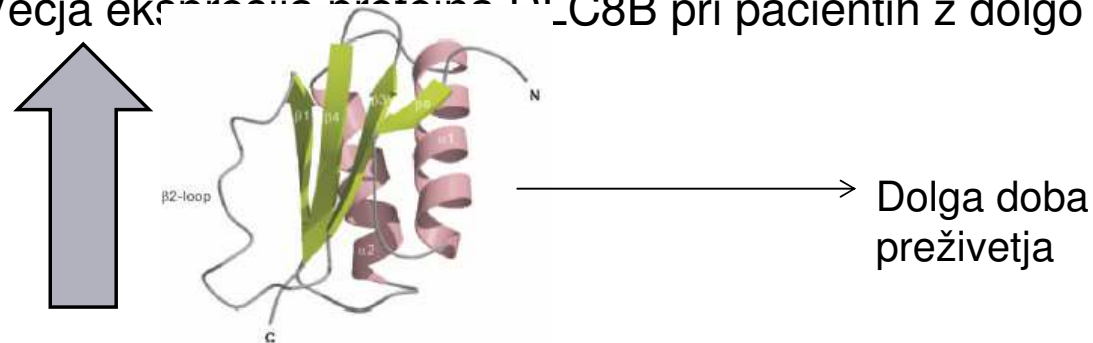


Primer: Možganski tumor

- ▶ Večja ekspresija proteina S100A6 pri pacientih s kratko dobo preživetja



- ▶ Večja ekspresija proteina P1-C8B pri pacientih z dolgo dobo



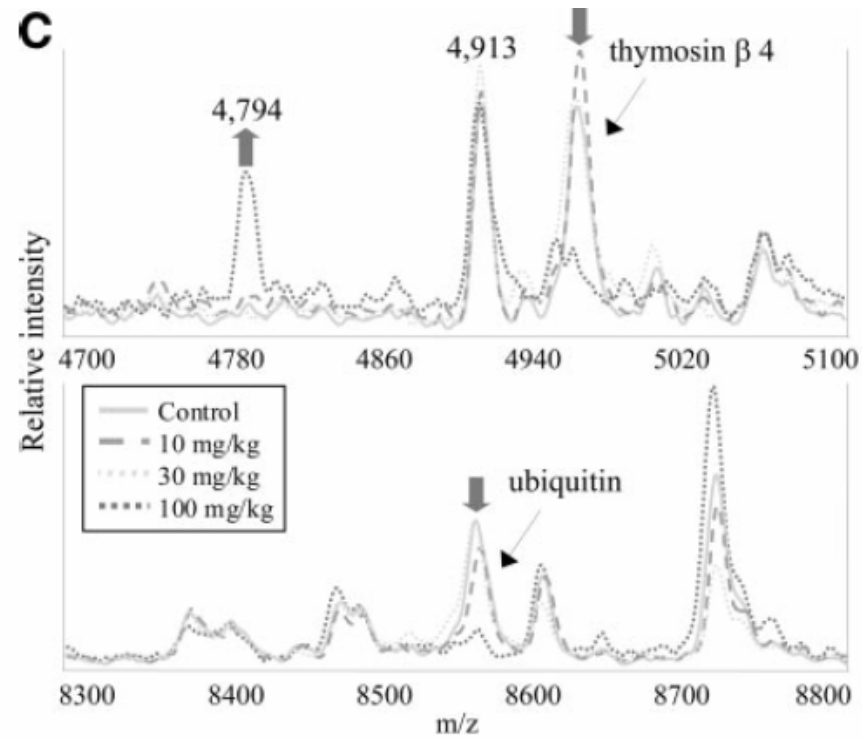
Študije odgovorov zdravil na peptidni in proteinski analizi

- ▶ Identifikacija molekulskega markerja pred kliničnim zdravljenjem => uspešno zdravljenje
- ▶ Poleg gensko ekspresivnega mapiranja uporabljamo tudi MALDI IMS.
- ▶ Pacienti z rakom dojke so prejeli zdravljenje z PACLITAXELOm vključno z obsevanjem.
 - ▶ Rezultati: 3 preveč izražene proteine in 4 premalo izražene
 - ▶ α - defensini(DEF α 1, DEF α 2, DEF α 3) se izražajo v veliki količini v tumorskih celicah.

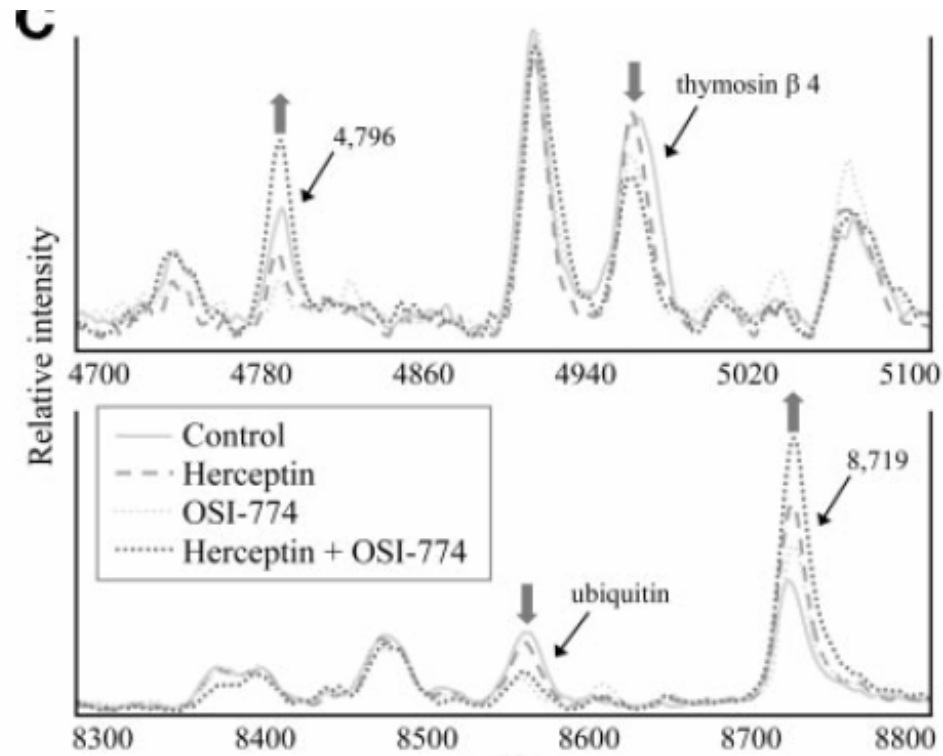


-
- ▶ Študija transgenih miši okuženih z sesalskim tumorskim virusom(MMTV)
 - ▶ zdravljenje je potekalo z tirozin kinazami, ERLOTINIB(OSI-774) in TRASTUZUMAB.
 - ▶ Odvzem tkiva v različnih časovnih intervalih





(L.Reyzer *et al*)



(L.Reyzer *et al*)

4,796 E-kadherin vezavni protein

8,719 calmodulin

Lipidna analiza

- ▶ Pomembna vloga pri signalni transdukciji in shranjevanju energije
 - ▶ Majhno maso (>1000 Da) $\Rightarrow$ z MALDI IMS opazujemo regije značilne za lipide
 - ▶ Študija Hay-Yana je opazovala razporeditev cardiolipinov v mišjih organih
 - ▶ Cardiolipini se nahajajo na notranji membrani mitohondrija. Vloga: pomembni za ATP sintezo pri oksidativni fosforilaciji.
 - ▶ Rezultati: v tumorskih regijah je bila v večini prisotna linolejska kislina, v normalnih regijah pa sfingolipidi.
-

-
- ▶ Z MALDI IMS lahko opazujemo tudi lipide v celicah, ki niso rakaste
 - ▶ Burnum in sodelavci so opazovali razporeditev fosfolipidov v mišjem embriu med implantacijo.
 - ▶ Rezultati: 4-8 dnevom nosečnosti se je razporeditev zelo spremenila.



Aplikacija MALDI IMS za razvoj zdravil

- ▶ Popolno razumevanje odziva zdravil čez cel metabolizem.
- ▶ Za analizo se uporablja MS/MS
- ▶ Tehnika opazovanja ene reakcije(SRM) in tehnika opazovanja več reakcij(MRM).
- ▶ Za opazovanje s strukturo povezane kompozicije zdravila



-
- ▶ Bouslimani in sodelavci so skušali zdravili raka ledvic s pomočjo terapije HIPEC(heated intraoperative chemotherapy) in MALDI IMS.
 - ▶ Alkilirano molekulo OXALIPLATIN in njenih derivatov.
 - ▶ Rezultati: delovanje le znotraj korteksa ledvice.



Viri

- ▶ Schwamborn, K. in Caprioli, R. M. Molecular imaging by mass spectrometry — looking beyond classical histology. *Nature Reviews Cancer*, 2010, letnik 10, str. 639-646.
- ▶ Gustafsson, J. O. R. *et al.* MALDI Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS)—Application of Spatial Proteomics for Ovarian Cancer Classification and Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, letnik 12, str. 773-794.
- ▶ http://en.wikipedia.org/wiki/Gentisic_acid, 17. 11. 2012.
- ▶ http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic_acid, 17. 11. 2012.
- ▶ http://en.wikipedia.org/wiki/Sinapinic_acid, 17. 11. 2012.

