

VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V DIAGNOSTICE A VE VÝZKUMU AMYLOIDÓZY

A. Potáčová, R. Hájek

Mikulov 13. 4. 2012



Babak Myeloma Group
Dept. of Pathological Physiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

Diagnostika amyloidózy

- ❖ Amyloidóza = heterogenní skupina onemocnění
 - Charakterizovaná extracelulární akumulací nerozpustných nízkomolekulárních proteinů se sekundární strukturou β -skládaný list \rightarrow poškození tkání, orgánů \rightarrow progresivní onemocnění, končící smrtí
 - Způsobená různými proteiny (>25 + různé varianty)
 - Systémová nebo orgánově specifická
 - Získaná nebo vrozená
- ⇓
- Přesná typizace a časná diagnóza je klíčová pro léčbu, protože různé formy vyžadují různé léčebné postupy
 - Rozlišení jednotlivých typů nemoci pouze na základě klinických projevů je obtížné

Loo D. J Biomed Biotechnol. 2011; Bhat A Clin Rev Allerg Immunol. 2010;38:97.



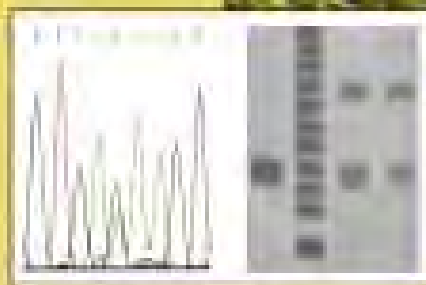
Babak Myeloma Group
Dept. of Pathological Physiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

Diagnostika

Immunohistochemistry Immuno-electron microscopy



Amyloidomics



Genomics



Proteomics

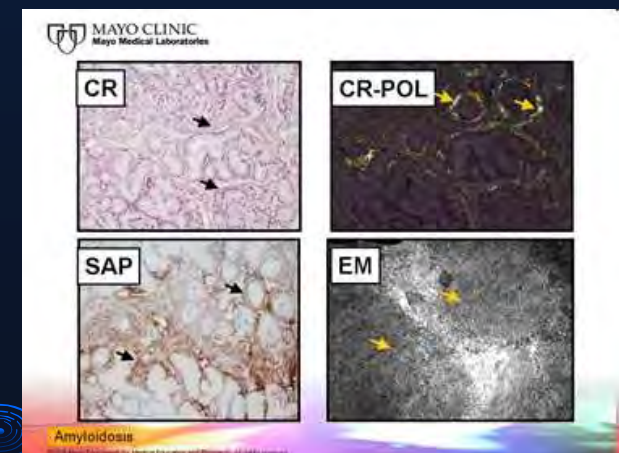
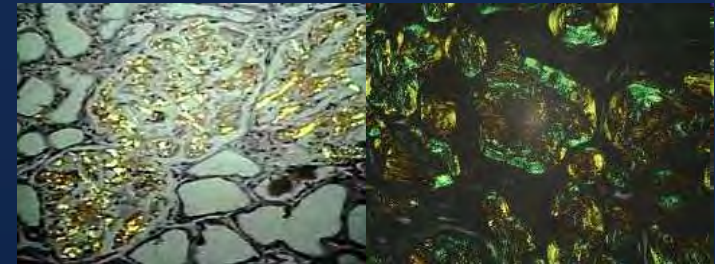
Diagnostika

1) Detekce přítomnosti amyloidu

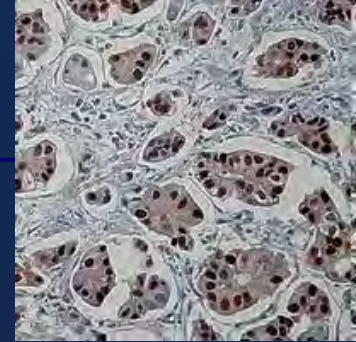
- **Barvení konžskou červení: červeno-zelený dichroismus a dvojlom v polarizovaném světle**

- Kostní dřeň
- Podkožní tuk (záchyt cca 90%) – je-li negativní → labiální slinné žlázy (záchyt cca 50%) – je-li negativní → orgánová biopsie
 - Doporučení: řez 10 mikronů, silný zdroj světla (použít polarizační nebo fluorescenční filtry)

- Nebo méně specifické metody barvení: thioflavin T, S nebo elektronová mikroskopie
- Immunoelektronová mikroskopie



2) Immunohistochemie



- Standardně používaná metoda – rychlá, levná, u některých typů amyloidu spolehlivá
 - ✓ Pro detekci serum amyloid P component (SAP)

Limitace:

- Nižší senzitivita a specificita – nemusí zachytit časně fáze nemoci
- Vysoké nespecifické pozadí u formalinem-fixovaných parafinových řezů
- Neúčinné Ab při detekci aberantních amyloidogenních proteinů
 - Genetické mutace mohou způsobit ztrátu epitopu
 - Ab jsou převážně produkovány proti konstantní části řetězce ⇒ nebudou detekovat AL proteiny exprimující jen variabilní části
 - Pouze omezený panel Ab pro detekci hereditárních typů amyloidóz

Loo D. *J Biomed Biotechnol.* 2011. Chee Ch. E. *Clin Lymph Myeloma & Leukemia* 2010; 10(3):177. Picken M.M. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134:545.

Současná doporučení pro diagnostiku:

1. **Barvení konžskou červení** – nezbytný zlatý standard pro časnou detekci amyloidu. Musí být prováděno pod polarizovaným světlem.
2. **Určení amyloidózy musí být založeno na typizaci amyloidu v** depositech, nelze spoléhat pouze na klinické příznaky či určení pouze z analýzy DNA.
3. Immunohistochemie musí být prováděna a interpretována s opatrností. Nejednoznačné výsledky musí být dále potvrzeny pomocí sofistikovanější metody.

⇒ odběr dostatečného množství biol. materiálu



Picken M.M. Arch Pathol Lab Med 2010;134:545.



Babak Myeloma Group
Dept. of Pathological Physiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

Využití proteomických metod v diagnostiku amyloidózy

Proteomika = analytický nástroj pro detekci kompletního proteomu.

Nástup moderních technologií proteomiky společně s dokončením genomových databází \Rightarrow proteomika by mohla sloužit jako nástroj pro jednoznačnou identifikaci amyloidu.

Před analýzou je třeba:

1. Zvolit druh odběru vzorku a jeho příprava pro MS analýzu
2. Zvolit typ MS analýzy a způsob vyhodnocení
3. Referenční metodu, pomocí níž si ověříme správnost metodiky

Výběr druhu vzorku a jeho příprava

Záleží na typu nemoci, zda je systémová či pouze lokalizovaná

- Preference: mikrodisekce ložiska pozitivního na Congo Red barvení
 - komplikace – nutné odstranit parafín a „odfixovat“ vzorek
 - existují protokoly pro tento způsob přípravy vzorků
- 2. Podkožní tuková tkáň – dostupná, nekomplikovaný odběr
 - vhodné jen pokud předpokládáme systémové onemocnění
 - mikrodisekce ložiska pozitivního na Congo Red barvení nebo je třeba vyextrahovat protein z tukové tkáně
- 3. Sérum – bylo by velice atraktivní, ale zatím neexistuje metoda pouze pro separaci amyloidních fibril ze séra (jak je odlišit od běžných plazmatických proteinů)
 - připadalo by v úvahu u AL amyloidózy – imunoprecipitační extrakce FLC

Příprava vzorku tukové tkáně před analýzou

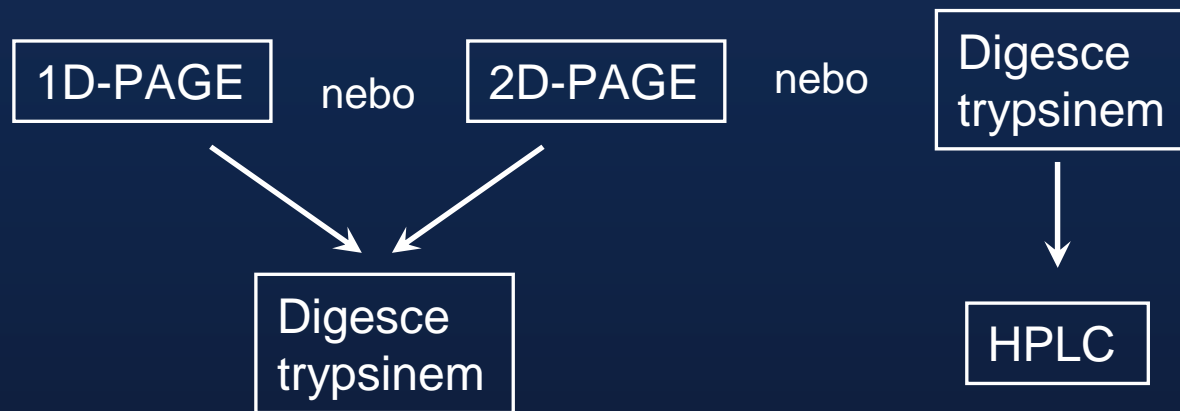
Odběr: Aspirát tukové tkáně + zdravá kontrola – pro správné počáteční nastavení metodiky

2x promýt izotonickým fyz. \odot → mechanická homogenizace v lyzačním \odot (7M urea, 2M thiourea, 4%CHAPS, 65mM DTT) → 4x sonikace → 18 h dialýza proti 50nM NH_4HCO_3

Změřit proteiny → digesce trypsinem → tandemová chromatografie (1. kation výměnná, 2. RP kapilární LC)

Schéma uspořádání proteomické analýzy

1. krok = separace:



2. krok = hmotnostní spektrometrie:



3. krok = vyhodnocení v databázi:

G. Merlini:
„MudPIT“



Časový harmonogram

1. Duben 2012 – nastavit odběry s klinikou a patologií – nejlépe již diagnostikovaných pacientů (kvůli ověření správnosti metody) + nastavit referenční metodu
2. Duben/květen – **zoptimalizovat metody přípravy vzorku** – ESI MS/MS analýza je rutinně používaná, tam nepředpokládáme problém

Perspektiva navazujícího výzkumu

V současné době se výzkum v oblasti amyloidózy ubírá několika směry:

- Nové diagnostické techniky – časná a přesná diagnostika
- Výzkum mechanismu tvorby amyloidogenních fibril – pochopení molekulárních mechanismů a následný vývoj cílené léčby
- Sledování mutací, které mají za následek agregaci proteinů - genomika
- Léčba, cílená léčby, genová terapie

Pomocí proteomiky lze např.:

- Sledovat strukturální modifikace izolovaných amyloidogenních proteinů: sekvence AK v izolovaných amyloidech, lokalizace –S-S – můstků, postranlační modifikace

Děkuji za pozornost



Babak Myeloma Group
Dept. of Pathological Physiology
Faculty of Medicine, Masaryk University