



Typizace amyloidóz pomocí laserové mikrodisekce a hmotnostní spektrometrie

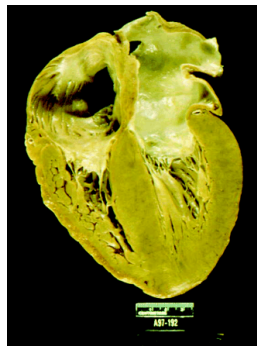
Dušan Holub

Laboratoř experimentální medicíny,
Ústav molekulární a translační medicíny
Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci,
Hněvotínská 5, 775 15 Olomouc

XIII. workshop mnohočetný myelom a Roční setkání České myelomové skupiny
10. - 11. 4.2015
Mikulov

Amyloidóza

Amyloidóza zahrnuje skupinu vzácných onemocnění, pro kterou je typické ukládání amyloidu - amyloidogenních proteinů do tkání



Srdce



Ledviny
renální amyloidóza



Jazyk

Nahromaděný amyloid poškozuje tkáňové mikroprostředí, což může vést až k orgánovému selhání

Správné určení amyloidogenního proteinu je velmi důležité pro klinický management, aby se zabránilo chybné diagnóze a nevhodné léčbě

Amyloidóza

- známo 31 amyloidogenních proteinů, které mohou způsobit amyloidózu

Amyloidóza	Amyloidogenní protein	Systémová/lokalizovaná	Získaná (A), nebo vrozená (H)	Cílený orgán/onemocnění
AL	Immunoglobulin light chain	S, L	A	Všechny orgány mimo CNS
AH	Immunoglobulin heavy chain	S, L	A	Všechny orgány mimo CNS
A β 2M	β 2-microglobulin, wild type	L	A	Muskuloskeletální systém
	β 2-microglobulin, variant	S	H	
ATTR	Transthyretin, wild type	S, L	A	Srdce
	Transthyretin, variants	S	H	Srdce
AA	(Apo) serum amyloid A	S	A	Všechny orgány mimo CNS
AApoAI	Apolipoprotein A I, variants	S	H	Srdce, játra, ledviny, kůže
AApoAII	Apolipoprotein A II, variants	S	H	Ledviny
AApoAIV	Apolipoprotein A IV, wild type	S	A	Ledviny
...
A β	A β protein precursor, wild type	L	A	CNS
	A β protein precursor, variant	L	H	CNS
...
APrP	Prion protein, wild type	L	A	CJD
	Prion protein variants	L	H	CJD, GSS syndrom
...



Diagnostika

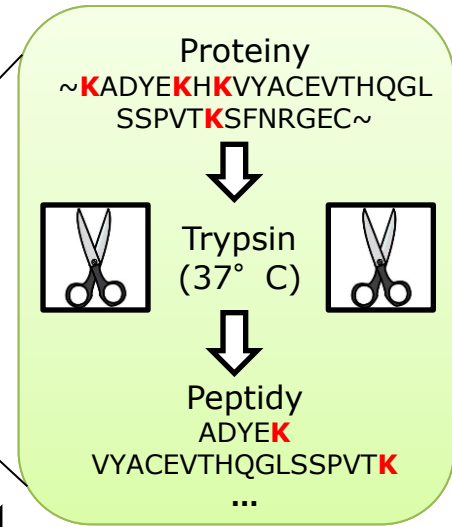
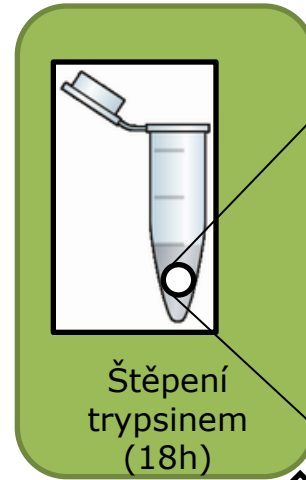
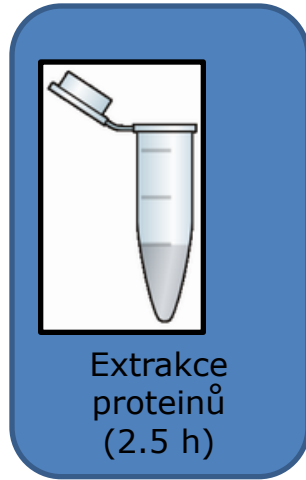
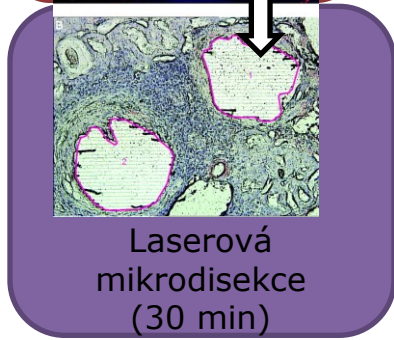
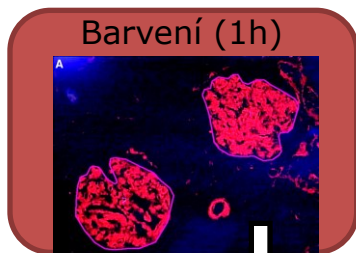
Nepřímé metody: IHC, IFC

Přímá metoda: LMD-LCMS

Cíl projektu

Zavést proteomickou metodu pro typizaci amyloidóz z parafínových tkání pomocí LMD-LCMS

Typizace amyloidóz pomocí LMD-LCMS



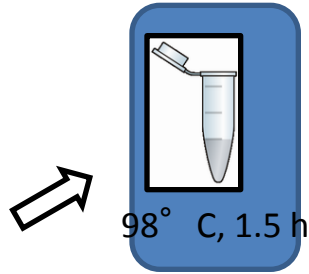
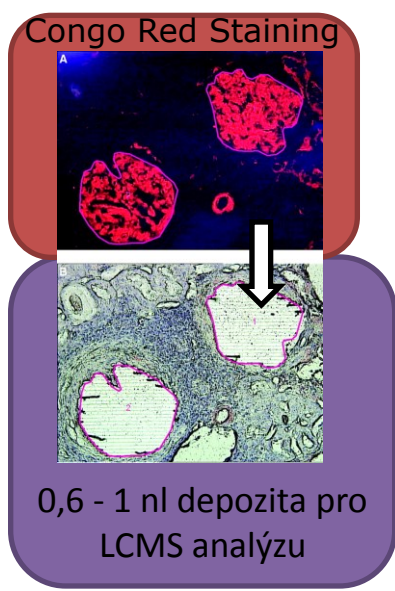
Seznam identifikovaných proteinů

Protein	Score	Protein Name	Accession	Length	Score	Protein Name	Accession	Length	Score
1	100.0	Human Aβ1-42	P05067	42	100.0	Human Aβ1-42	P05067	42	100.0
2	95.0	Human Aβ1-40	P05068	40	95.0	Human Aβ1-40	P05068	40	95.0
3	90.0	Human Aβ1-42	P05067	42	90.0	Human Aβ1-42	P05067	42	90.0
4	85.0	Human Aβ1-40	P05068	40	85.0	Human Aβ1-40	P05068	40	85.0
5	80.0	Human Aβ1-42	P05067	42	80.0	Human Aβ1-42	P05067	42	80.0



Proces začíná barvením parafínového řezu Kongo červení = zviditelnění amyloidových depozit

Obarvená plocha je vyříznuta pomocí laserového mikrodisektoru (LMD)

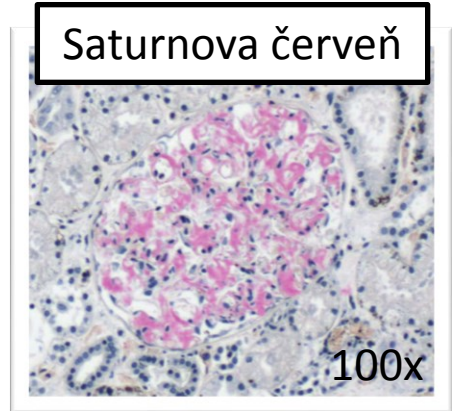
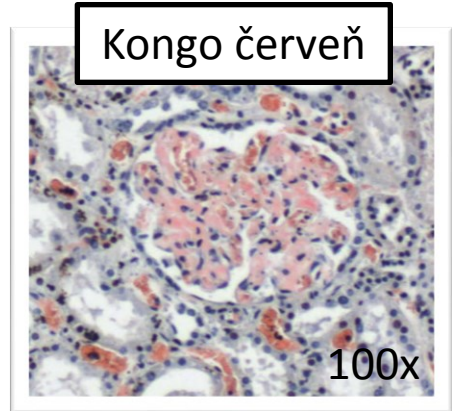


Extrakce a denaturace proteinů



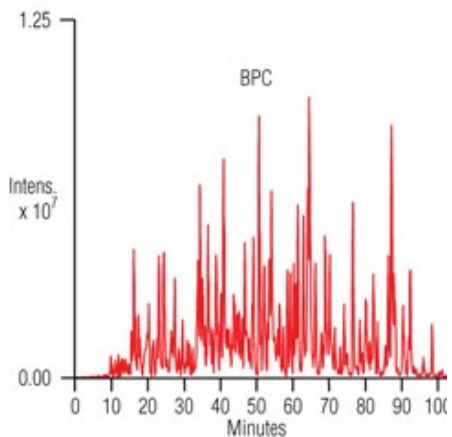
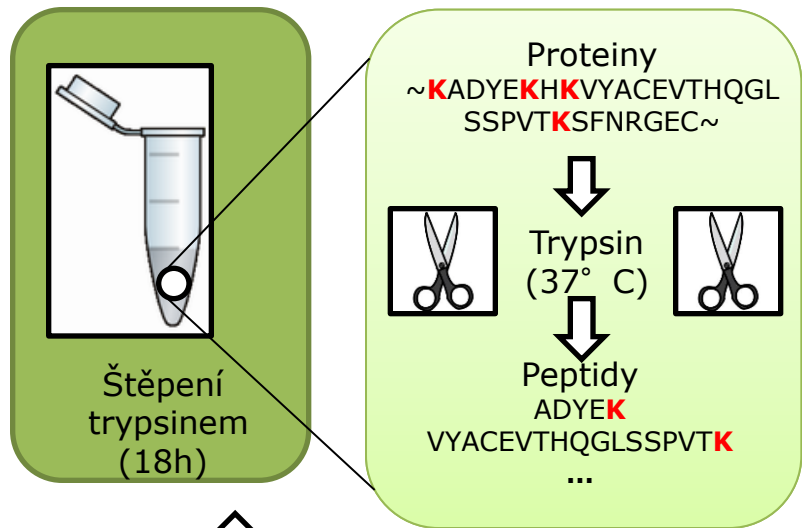
Laserový mikrodisektor (Olympus)

Ledvina
glomerulus





Proteiny jsou enzymaticky štěpeny na peptidy



Peptidy jsou separovány na koloně

Peptidy jsou analyzovány

Peptides are selected based on abundance and

selected peptides are fragmented by collision

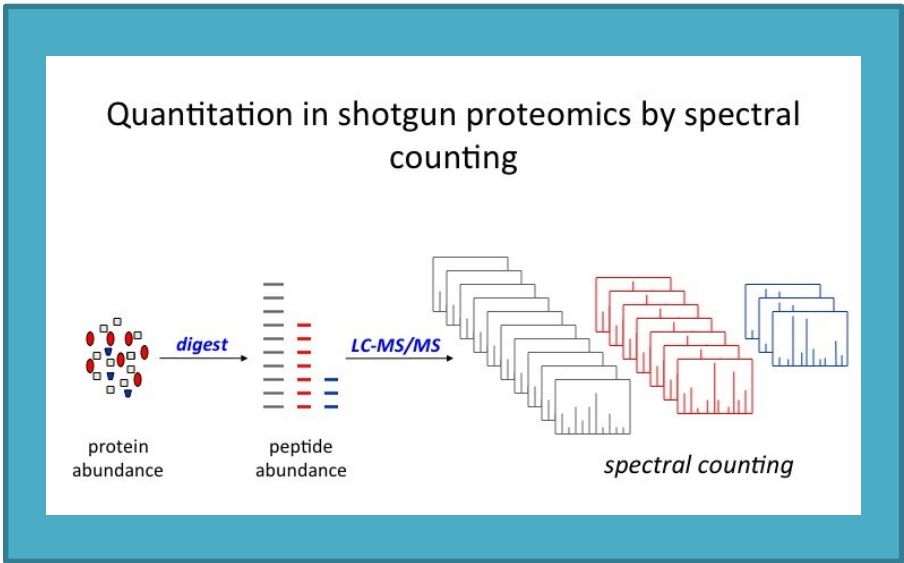
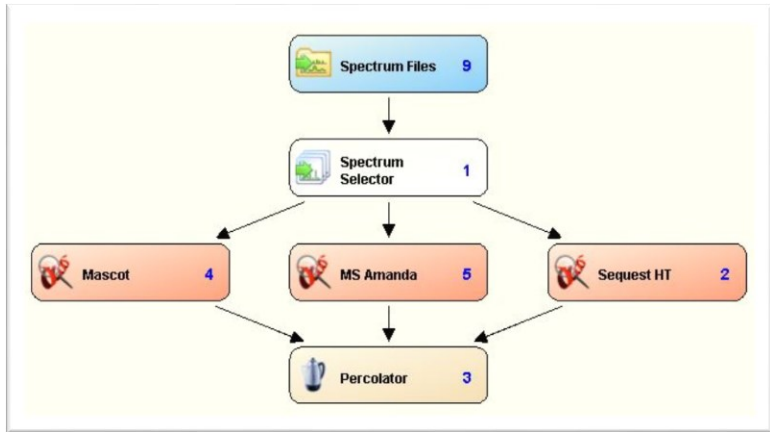
G S P A I N K

Mass/charge of daughter ions are measured

Relative intensity vs. m/z



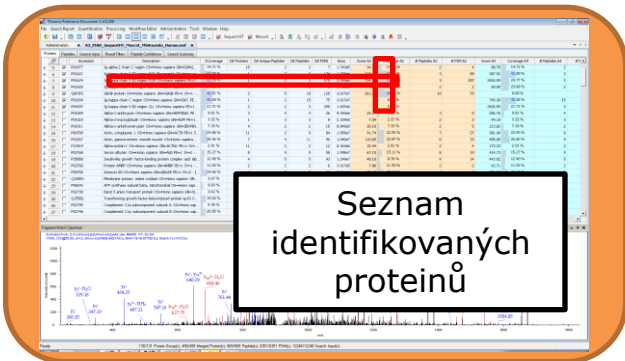
Naměřená spektra jsou porovnávána proti proteinové sekvenční databázi pomocí třech různých vyhledávacích nástrojů



Měření počtu MS/MS spekter pro daný protein lze považovat za semikvantitativní stanovení jeho abundance



7.



Seznam identifikovaných proteinů

Interpretace naměřených výsledků

Identifikovaný protein	Amyloidogenní protein	Případ č. 7					
		MS/MS Count					
		Myokard			Játra		
		Vzorek_01	Vzorek_02	Vzorek_03	Vzorek_01	Vzorek_02	Vzorek_03
Igkappa chain C region	*	53	49	47	72	67	50
Apolipoprotein E	*	29	37	37	55	55	54
Serum Amyloid P-component	*	16	20	21	33	30	29
Apolipoprotein A-IV	*	11	9	8	13	9	6
Apolipoprotein A-I	*	5	5	4	8	8	6
Transthyretin	*	5	1	3	4	4	3
Ig lambda-3 chain C regions	*	3	4	3	6	6	4
Ig alpha-1 chain C region	*	3	4	5	4	5	3
Ig gamma-2 chain C region	*	3	1	1	1	0	0
Ig gamma-3 chain C region	*	3	0	0	0	0	0
Gelsolin	*	2	5	3	3	1	1
Ig mu chain C region	*	2	5	2	8	8	6
Lactadherin	*	1	0	0	0	0	0
Beta-2-microglobulin	*	1	1	1	1	1	1
Fibrinogen Alpha chain	*	1	3	3	4	3	2
...	*

#	Případ č. 8					
	MS/MS Count					
	Myokard			Játra		
	Vzorek_01	Vzorek_02	Vzorek_03	Vzorek_01	Vzorek_02	Vzorek_03
	9	1	3	2	3	3
	30	24	17	40	44	37
	13	9	11	24	29	26
	14	8	10	6	15	14
	9	9	10	10	14	11
	4	2	3	4	4	4
	33	27	26	29	30	31
	2	2	1	3	3	2
	1	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	9	1	4	0	0	0
	1	0	0	1	0	0
	3	1	2	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	11	2	2	12	4	5

Typing of amyloidosis from FFPE tissue samples

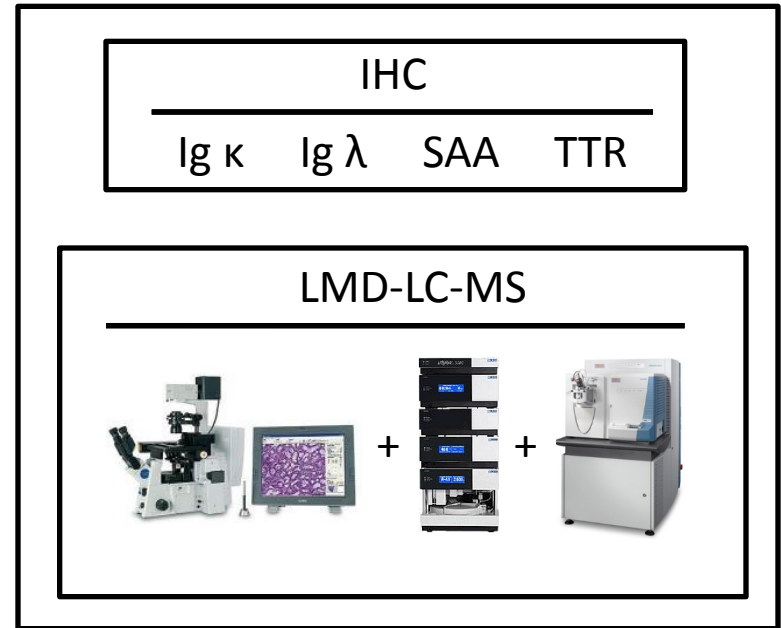
~ 100 cases (CR+)

~ 150 FFPE tissue
samples



FFPE tissue

CR+
→



-> 11 cases subtyped by IHC and LMD-LC-MS (2014) ✓

-> 41 cases are currently being processed by LMD-LC-MS (March-June 2015)

-> 48 cases will be processed by LMD-LC-MS (July-September 2015)

=> 100 cases x 3 replicates x LC-MS run (105 min) = 29 days

-> 3 cases have amyloid mutation form

-> 5 cases were subtyped by LMD-LC-MS (2014, Ostrava)

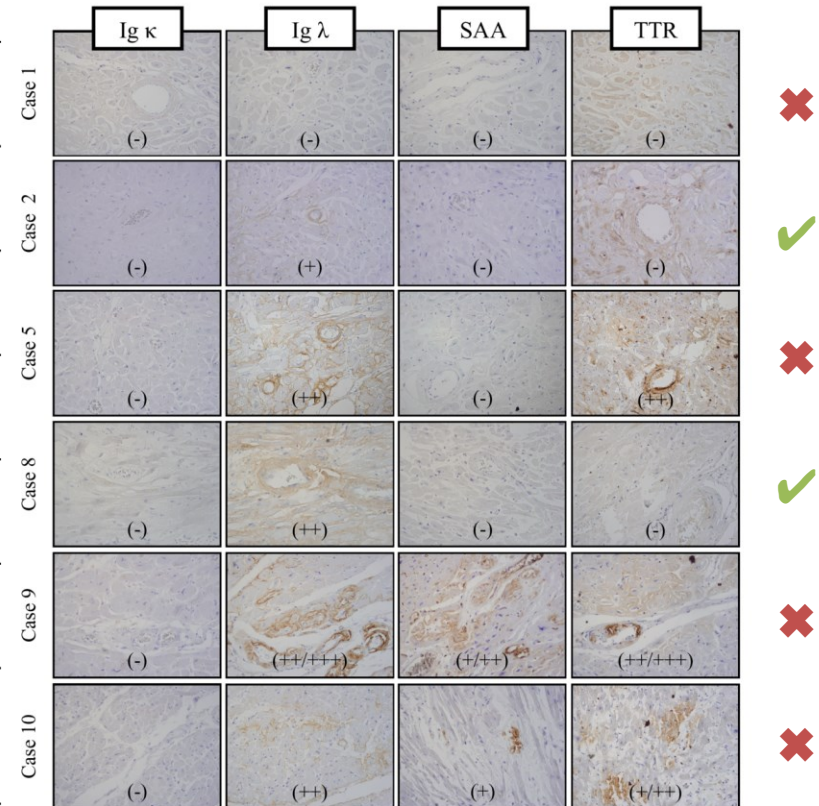
The clinical diagnosis and characteristics of the patients

Case	Sex	Age	Clinical Diagnosis	Serum Protein	FLC κ [mg/l]	FLC λ [mg/l]	FLC κ/λ ratio	Cardiomyopathy	Nephropathy
1	M	68	MGUS	IgG κ	449.49	91.01	4.939	Mayo 3	NS + RI
2	M	63	MGUS	λ	18.21	593.41	0.031	Mayo 3	NS + RI
3	M	58	MM	IgD κ	241.45	1	241.4	Mayo 3	NS + RI
4	M	49	MGUS	κ	2114.3	36.7	57.61	Mayo 3	NS + RI
5	F	75	MGUS	IgA λ	18.72	284.75	0.066	Mayo 3	NS + RI
6	M	84	MGUS	IgA λ	47.19	84.14	0.561	Mayo 3	NS + RI
7	M	70	MM	κ	906.33	16.51	54.90	Mayo 3	NS + RI
8	F	67	MGUS	λ	21.14	70.12	0.302	Mayo 3	NS + RI
9	M	77	-	ND	ND	ND	ND	Mayo 3	-
10	M	49	MGUS	λ	22.55	495.17	0.046	Mayo 3	NS
11	F	78	MM	κ	1588.16	24.4	65.09	Mayo 3	NS

Comparison of IHC and LMD-LC-MS/MS methods

Case	Tissue	Immunohistochemical analysis ^a				LMD-LC-MS/MS analysis
		Size	Ig κ	Ig λ	SAA	
1	Heart	-	-	-	-	AL κ
	Liver	-	+-	-	-	AL κ
2	Heart	-	+	-	-	AL λ
	Liver	-	+	-	-	AL λ
3	Heart	+	-	+ / ++	+	AL κ
	Tongue	+	-	++	++	AL κ
4	Heart	-	-	-	+ / ++	AL κ
	Liver	-	-	-	+	AL κ
5	Heart	-	++	-	++	AL λ
	Liver	-	++	-	++	AL λ
6	Heart	-	++	-	+	AL λ
	Kidney	-	++	-	+-	AL λ
7	Heart	+	-	-	+	AL κ
	Liver	+	-	-	+	AL κ
8	Heart	-	+	-	-	AL λ
	Liver	-	++	-	-	AL λ
9	Heart	-	++ / +++	+ / ++	++ / +++	AL λ
	Kidney	-	+ / ++	+ / ++	++	AL λ
10	Heart	-	++	+	+	AL λ
	Liver	-	++	-	+ / ++	AL λ
11	Heart	++	-	-	-	AL κ
	Small intestine	+	-	+	-	AL κ

The typing of amyloidosis by IHC





Výhody a nevýhody LMD-LCMS

- LMD-LCMS

- + vysoce citlivá (22 z 22)

- + vysoce specifická (22 z 22)

- + levná

- Vyžaduje vysokou vstupní investici do přístrojů (LMD, LC, MS)

- vyškolený personál

Nabízíme možnost spolupráce 😊

Požadujeme zaslání parafinované tkáně (FFPE)

Kontakt:

Mgr. Dušan Holub

holub.dusan@gmail.com

ÚMTM, Olomouc



Děkuji za pozornost.