

MRM alapú módszerek alkalmazása testfolyadékokból történő biomarker vizsgálatokhoz

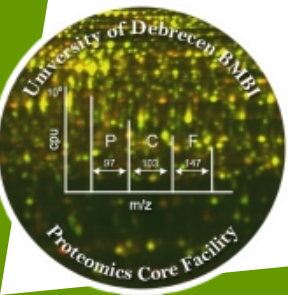
Dr. Csősz Éva

Proteomika és Lipidomika Szolgáltató Laboratórium

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

Általános Orvostudományi Kar

Debreceni Egyetem



Biomarkerek – miért, hogyan, honnan?

Olyan molekulák, amelyek a betegségek diagnosztikájában, a betegség lefolyásának nyomonkövetésében és terápiájában, a toxikus hatások kimutatásában használhatók

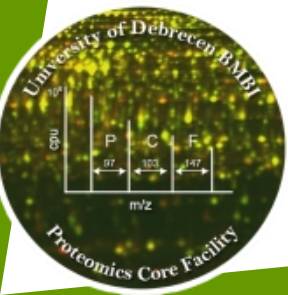
Biomarker fehérjék – jelenlétük/mennyiségük bír jelző szereppel

Enzimek – jelenlét vagy aktivitás a fontos?

Legjobb prediktorok, amelyek a hiba/kóros állapot helyéről származnak

= biopszia

- Invazív
- Sokszor speciálisan képzett szakember szükséges
- Nem lehet szűrésre használni



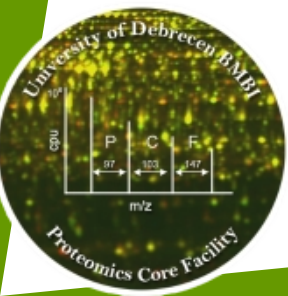
Folyékony biopszia –liquid biopsy



Szájüregi laphámrák – OSCC

Helyettesítheti-e a nyál a biopsziát?

- Nem invazív
- Folyamatosan termelődik
- Nincs szükség speciálisan képzett szakemberre a gyűjtéshez
- Felhasználható lenne szűrésre, a magas kockázatú csoportok azonosítására



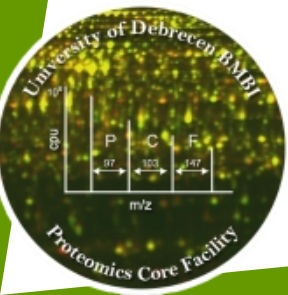
Folyékony biopszia –liquid biopsy

- Szérum/plazma
- Vizelet
- Nyál
- Könny
- Verejték
- Hüvelyváladék
- Intersticiális váladék
- Agy-gerincvelői folyadék
-

Óriási az igény a nem invazív módon gyűjthető biológiai minták iránt

Point-of care típusú tesztek kifejlesztése

- Mintamennyiség
- Mintagyűjtés módja

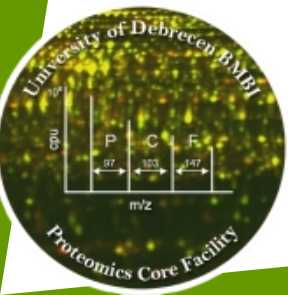


Tömegspektrometria

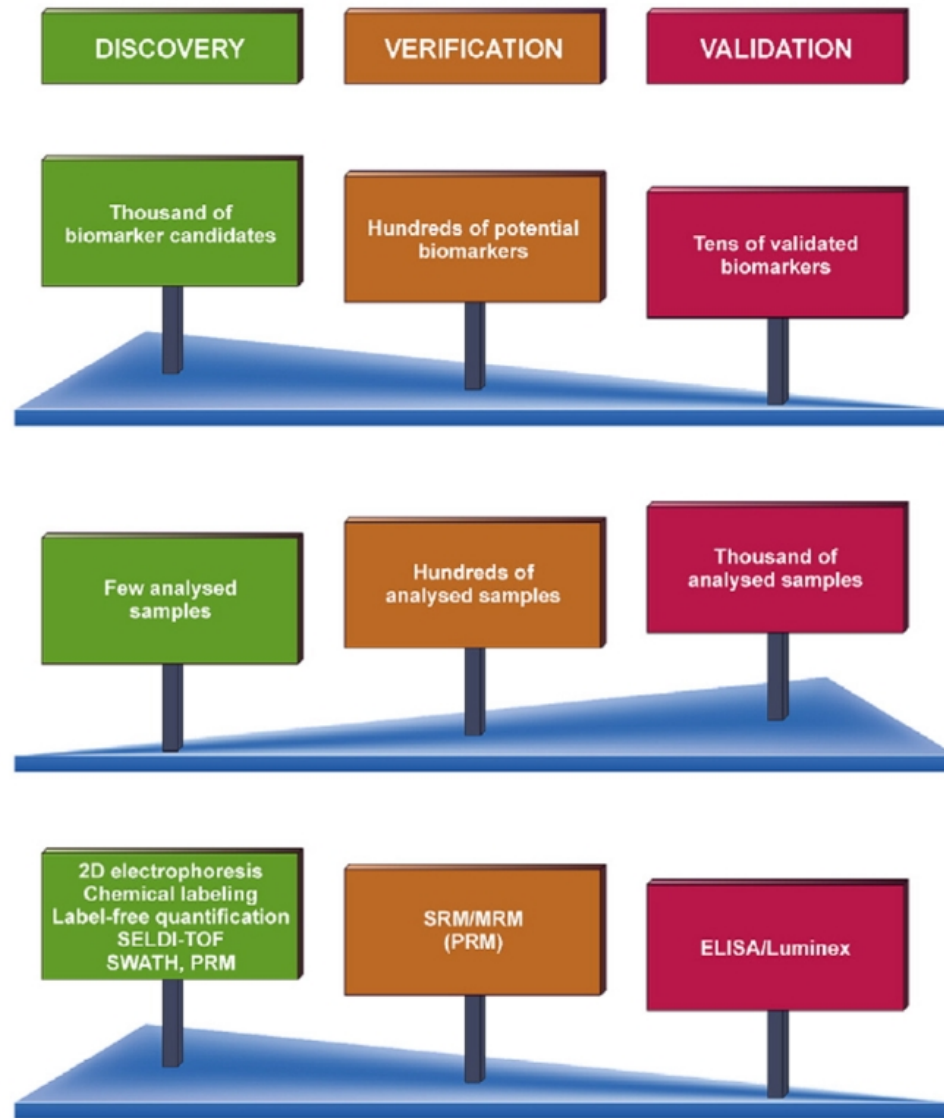
- Több ezer fehérje kimutatása és kvantitálása biológiai mintákból
- Elegendő a viszonylag kis mintamennyiség

Tömegspektrometria
Proteomika

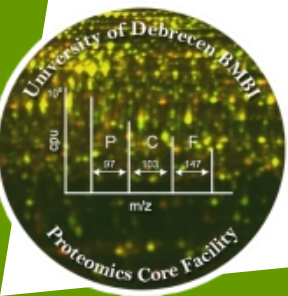
Nem invazív
módon gyűjthető
testfolyadékok
vizsgálata



Biomarker felfedezés folyamata



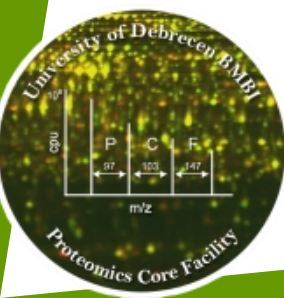
Csősz és mtsai. *J Proteomics* 2017



Célzott proteomikai megközelítés alkalmazása potenciális biomarkerek vizsgálatára

Leggyakrabban használt módszer az SRM/MRM – (Selected/Multiple Reaction Monitoring) szelektált/többszörös reakció monitorozáson alapuló tömegspektrometriás módszer

- Specifikus
- Szelektív
- Szenzitív
- Multiplex



METHOD OF THE YEAR

NEWS FEATURE | SPECIAL FEATURE

Targeted proteomics

Analysis of a preselected group of proteins delivers more precise, quantitative, sensitive data to more biologists. Vivien Marx reports.

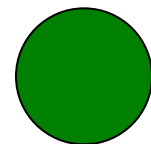
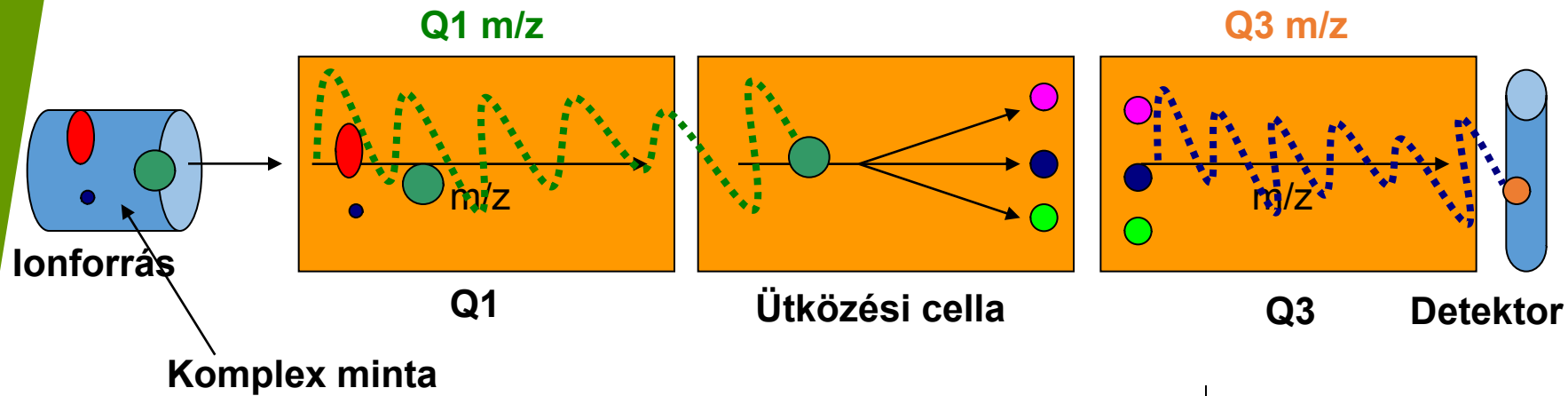
Although the number and identity of protein-coding genes in humans and many other organisms are known to a certain level of approximation, the numbers of proteins produced by each of these genes remains a mystery. Further complicating matters, given the many possible splice forms and post-translational modifications, the potential number of proteins is "staggering," says Arizona State University researcher Josh LaBaer, who is also president-elect of the US Human Proteome Organization. A protein is also dynamic. "It's phosphorylated this minute; it's not phosphorylated the next

"I personally can't wait until we stop hearing about someone describing how big of a list of proteins, peptides or phosphopeptides they detected," says one researcher critical of discovery proteomics who did not wish to be identified. Proteomics has been doing "my list is bigger than your list" for far too long. "It is way more important to measure the one right protein than 10,000 wrong ones."

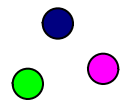
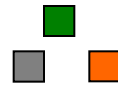
Scientists wanting to follow well-founded hunches about dozens or hundreds of proteins seek a focused, reproducible, quantitative view of a small subset of the whole



Célzott MRM-alapú tömegspektrometriás analízis



Q1 m/z

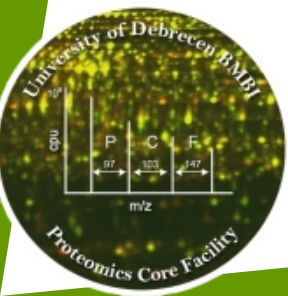
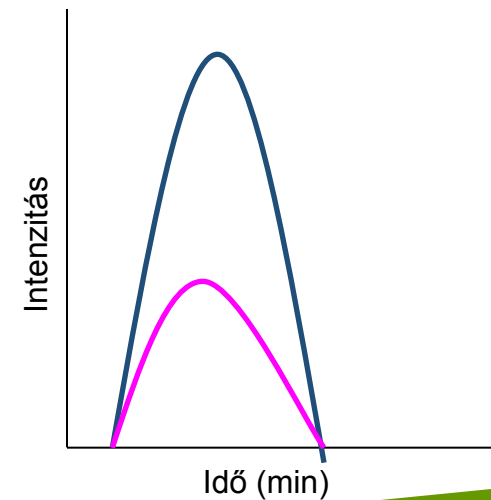


Q3 m/z

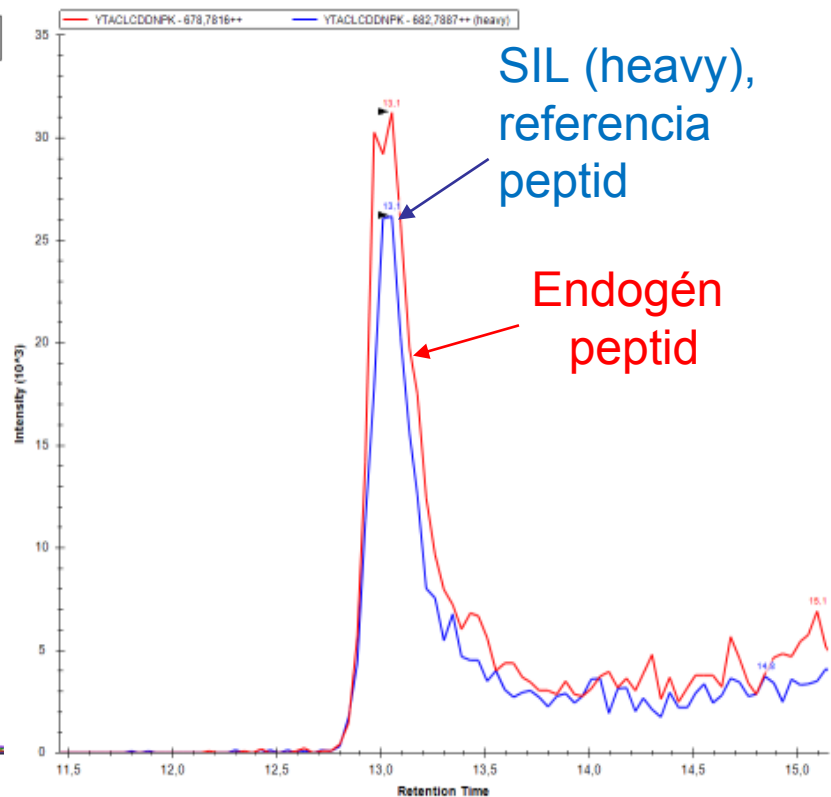
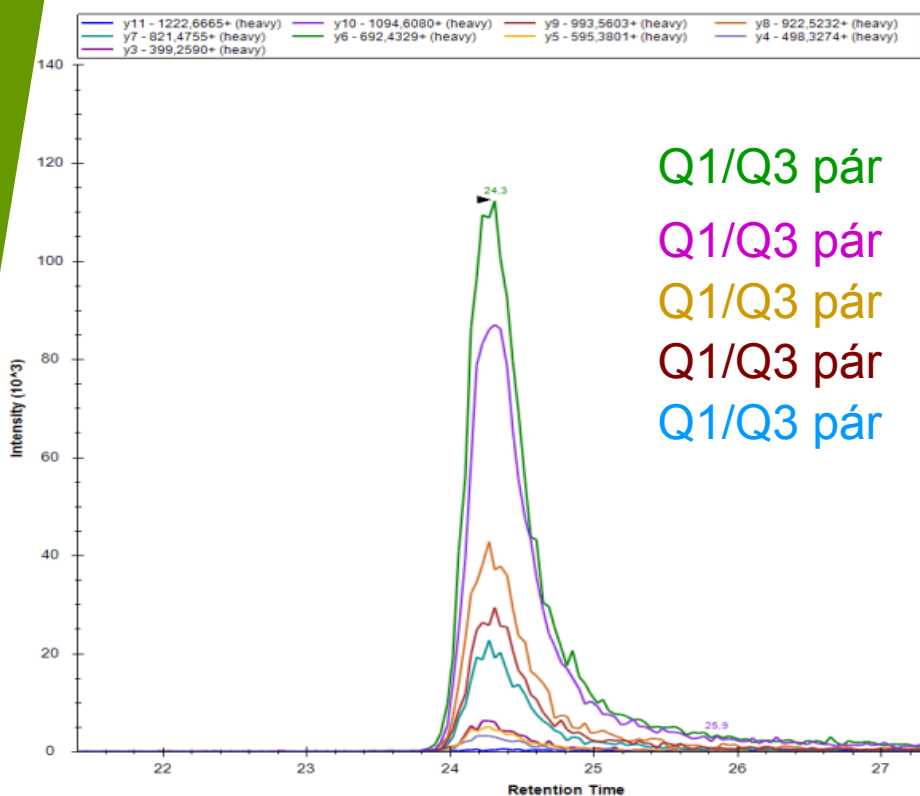
MRM átmenetek

Q1 m/z – Q3 m/z pár

Q1 m/z – Q3 m/z pár



Célzott MRM-alapú tömegspektrometriás analízis



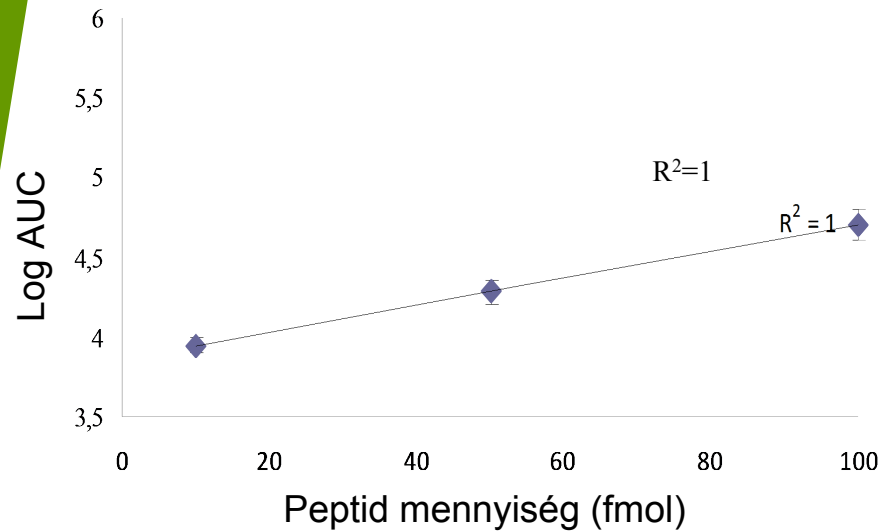
Stabil izotóppal jelzett (SIL) szintetikus referencia peptidek használata
belső standardként

Görbe alatti terület – AUC – relatív vagy abszolút kvantitálás

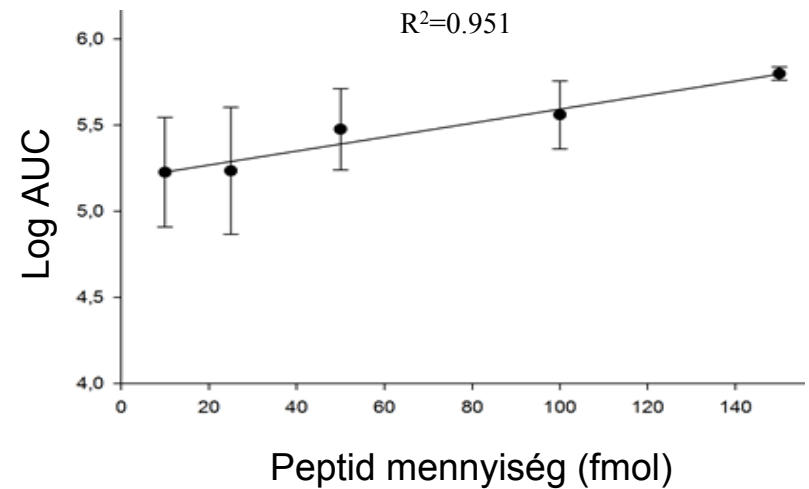


Beta defenzin 2 lineáris dinamikus tartománya

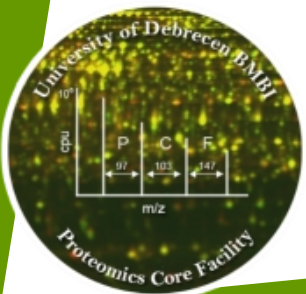
Könny



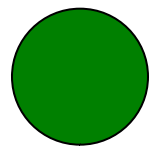
Sejtkultúra felülűszó



Kalló és mtsai. RCMM 2015.



Hogyan tervezzük MRM átmeneteket?



Q1 m/z



Q3 m/z

SRM atlas (<http://www.srmatlas.org/>)

CPTAC Assay Portal (https://assays.cancer.gov/available_assays)

In silico emésztés

Blastp keresés

MMSFVQKGSWLLLALLHPTIILAQQEAVE
GGCSHLGQSYADRDVWKPEPCQICVCD
SGSVLCDDIICDDQELDCPNPEIPFGECC
AVCPQPPTAPTRPPNGQGPQGPKGDPG
PPGIPGRNGDPGIPGQPGSPGSPGPPGI
CESCPTGPQNYSPQYDSYDVKSGVAVG
GLAGYPGPAGPPG

Uniprot szekvencia

GEDGK
GAAGIK
GFDGR
GAPGEK
LDAIK
LLSSR

Peptidek

GAPGEK

Fehérjére jellemző
szekvencia

MRM
átmenetek
tervezése

Q1 (m/z) Q3 (m/z)
293.646 304.157

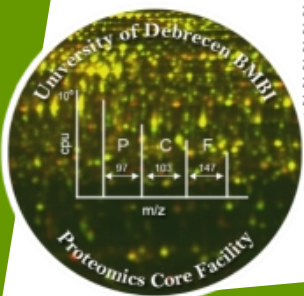
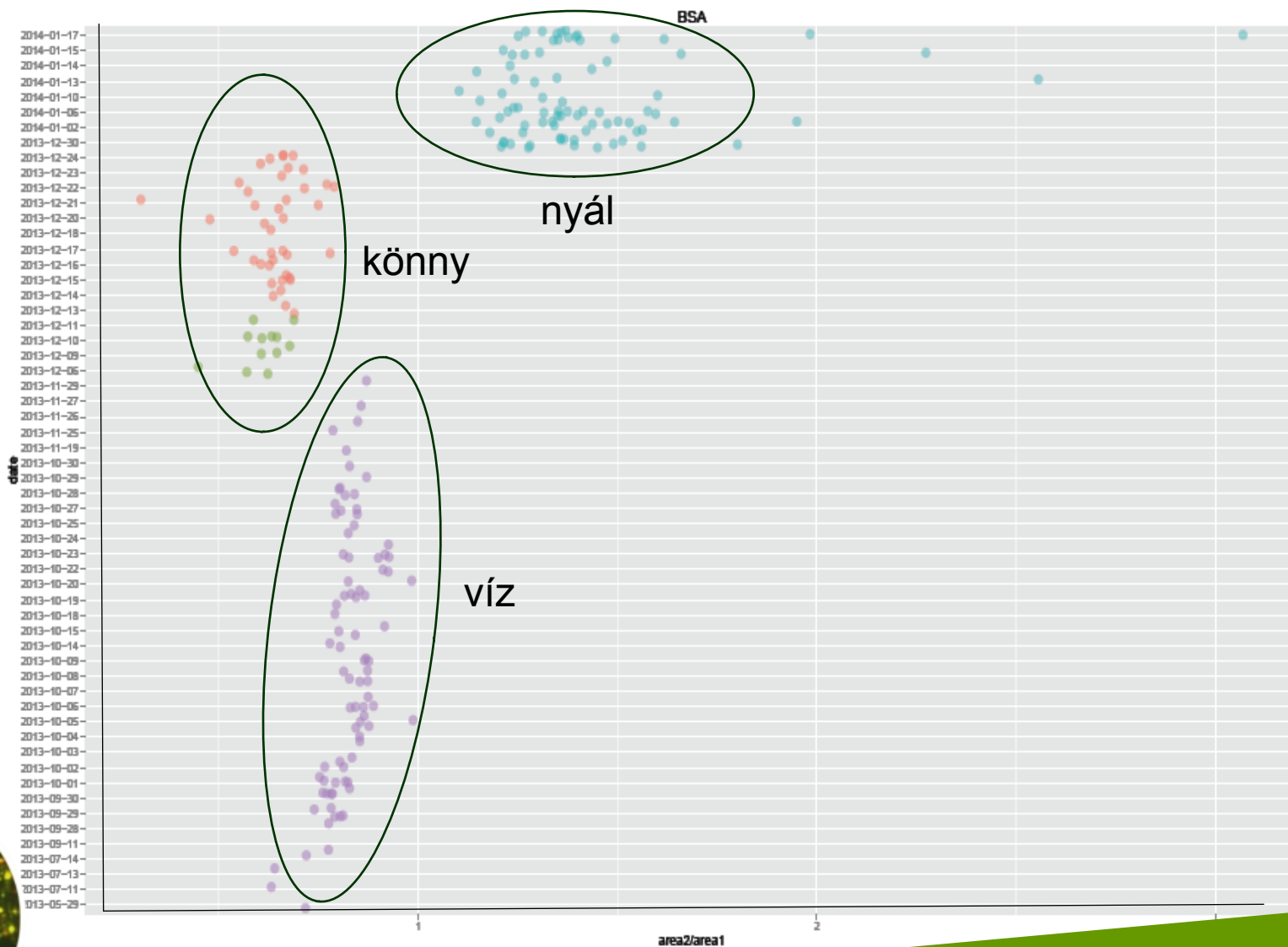
MRM átmenetek



Nézőpont kérdése: előny vagy hátrány?

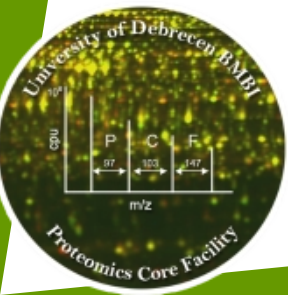


A mátrix hatása az MRM alapú kvantitálásra



A magyar lakosságra jellemző OSCC-specifikus nyálbiomarkerek proteomikai vizsgálata

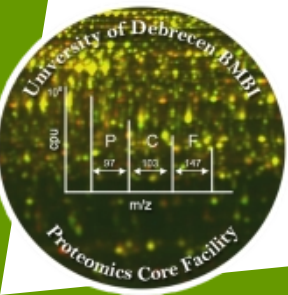
Csősz és mtsai. *PLOS One*, 2017.



OSCC specifikus biomarkerek vizsgálata

- OSCC a szájüregi daganatok leggyakoribb formája
- A hatodik leggyakoribb daganat
- 5 éves túlélési ráta alacsony

Nagyon fontos jól használható diagnosztikus biomarkerek azonosítása

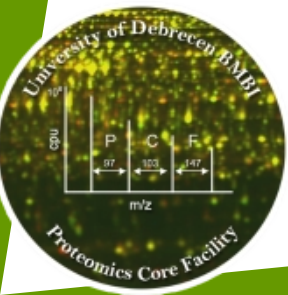


OSCC specifikus biomarkerek vizsgálata

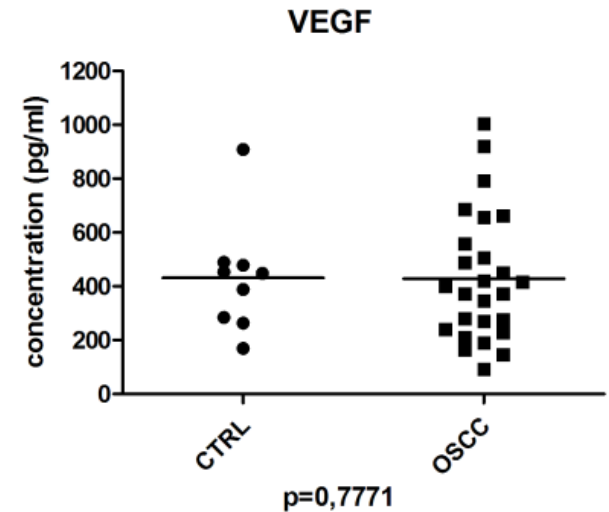
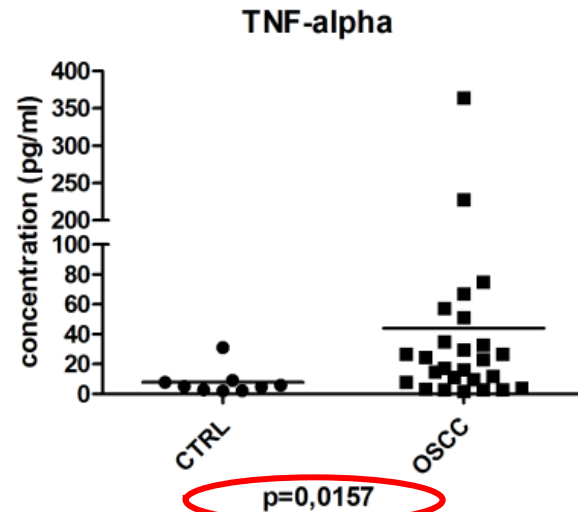
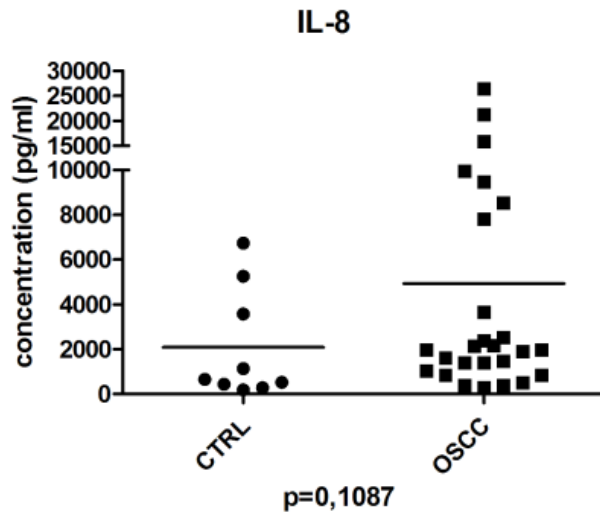
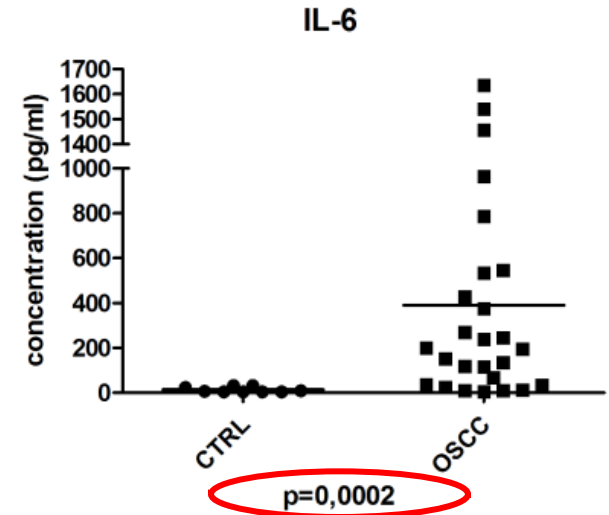
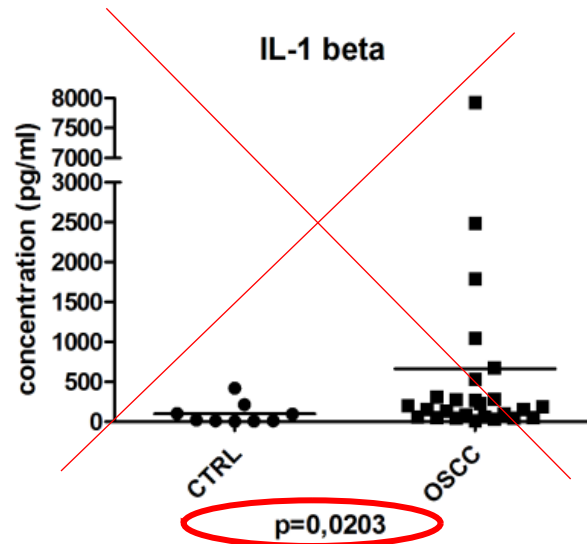
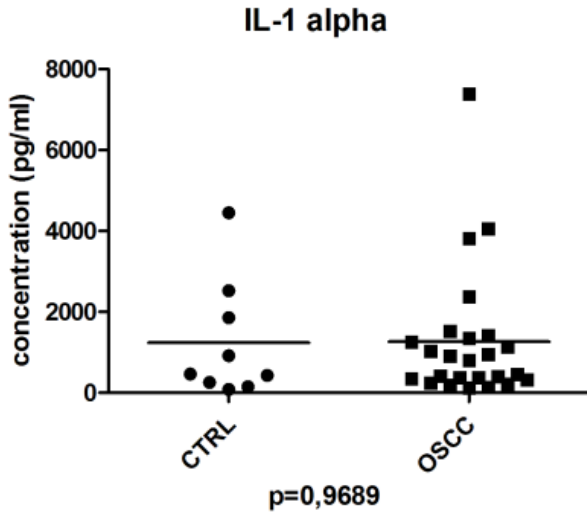
- Profilin
- Tioredoxin
- S100A9
- Kataláz
- CD44
- CD59
- Galektin 3 kötő fehérje
- Citokeratin Cyfra 21-1 fragmense
- IL-1 alfa
- IL-1 beta
- IL-6
- IL-8
- TNF-alfa
- VEGF

Célzott tömegspektrometriás
módszer tervezése

Luminex xMAP
technológián alapuló
multiplex kit



Citokin szintek változása



TNF alfa, IL6 potenciális biomarkerként használható a magyar lakosság szűrésére

Potenciális biomarker fehérjék szintjének vizsgálata OSCC-ben szenvedő betegek és illesztett kontrollok nyálmintáiban

- Profilin
- Tioredoxin
- S100A9
- Kataláz
- CD44
- CD59
- Galektin 3 kötő fehérje
- Citokeratin Cyfra 21-1 fragmens

Irodalmi adatok alapján biomarkerként

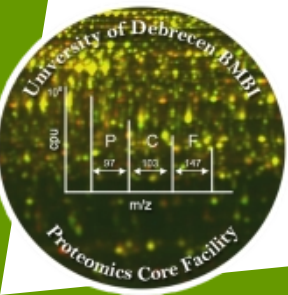
azonosították OSCC esetében



Tömegspektrometriás
módszertervezés és
optimalizálás

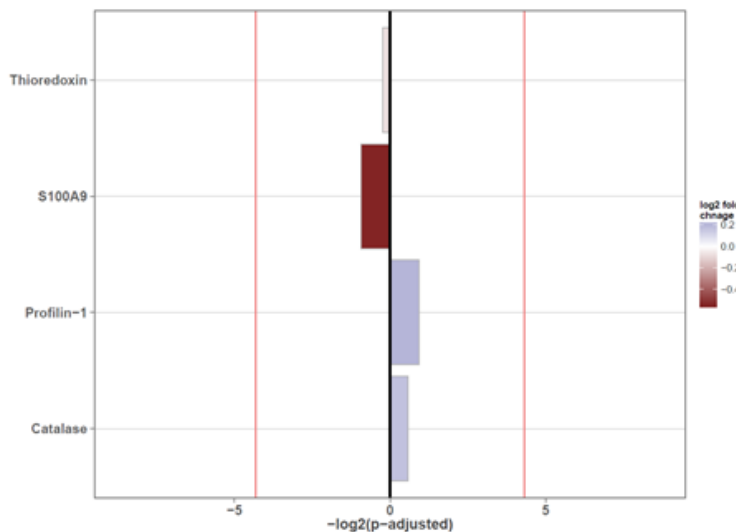


15 beteg, 15 korban illesztett és
15 fiatal kontroll nyálminta

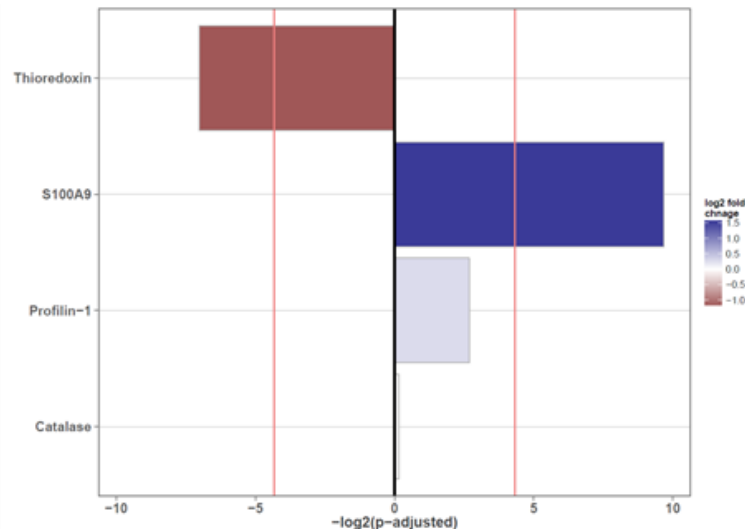


Potenciális OSCC specifikus nyálfehérjék vizsgálata

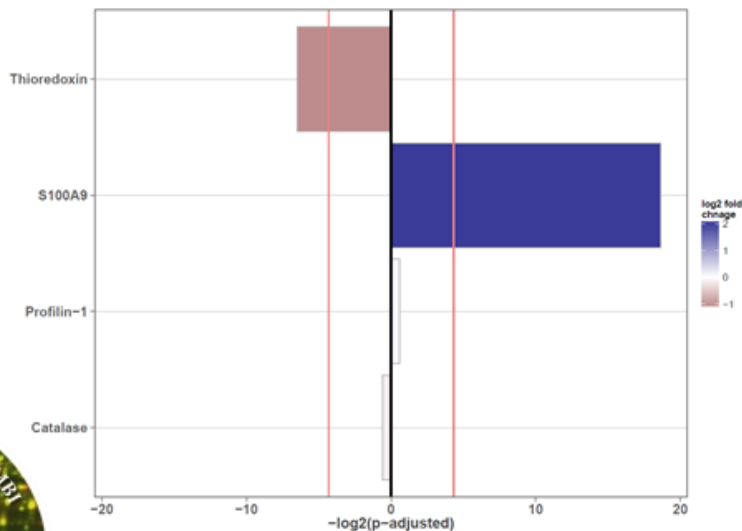
Illesztett kontroll – Fiatal kontroll



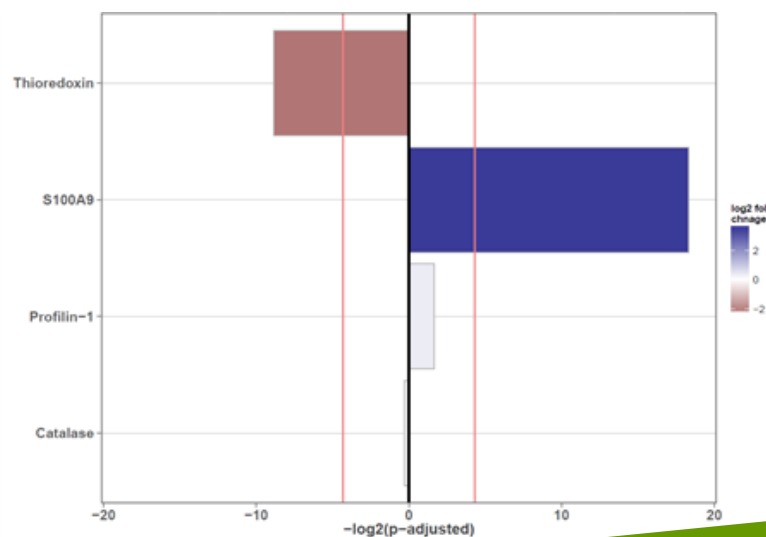
OSCC – Fiatal kontroll



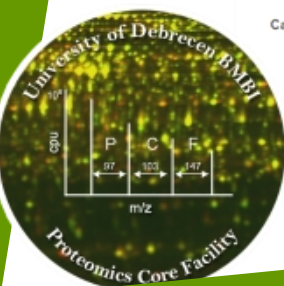
OSCC – Illesztett kontroll



OSCC – Kontroll



Tioredoxin és S100A9 használható potenciális biomarkerként



Melyik a jobb potenciális biomarker vagy biomarker kombináció?

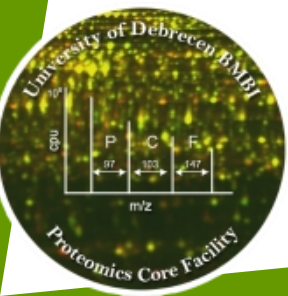
Tömegspektrometriás analízis

Tioredoxin és S100A9 potenciális biomarkerként használható

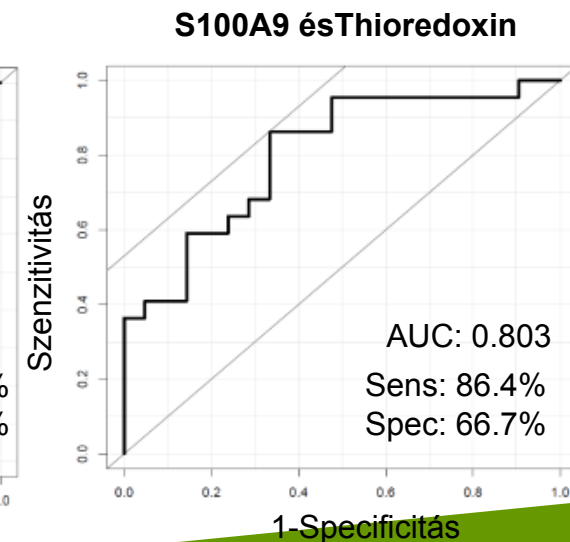
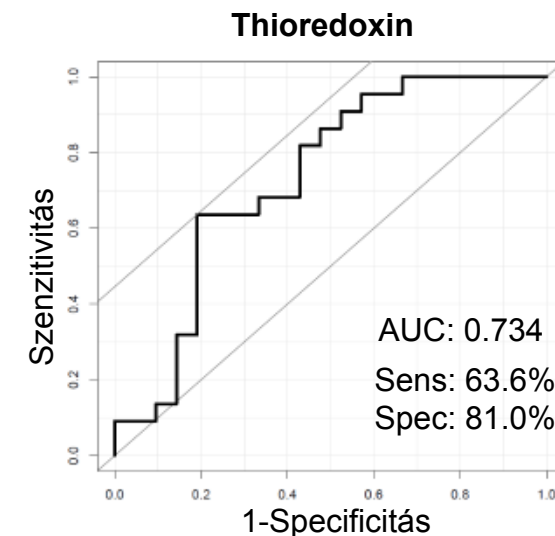
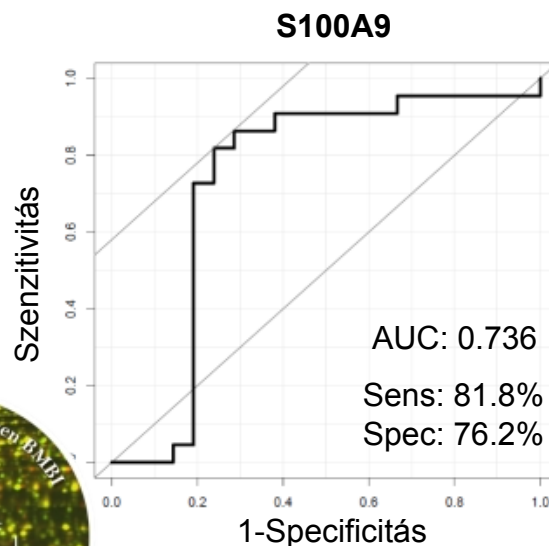
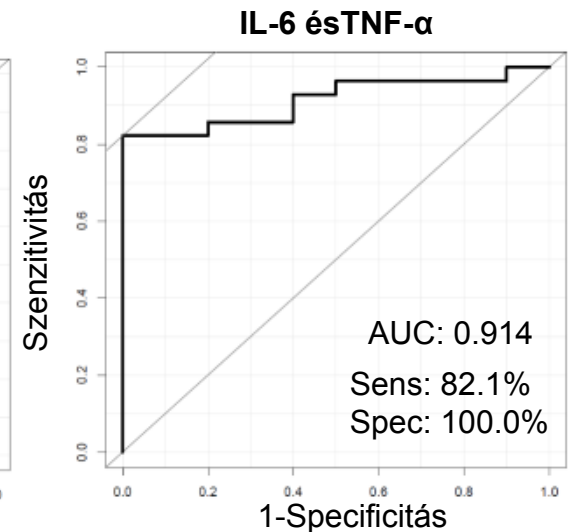
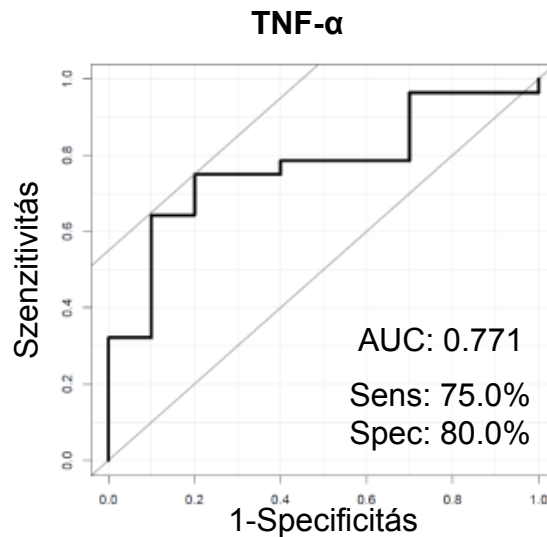
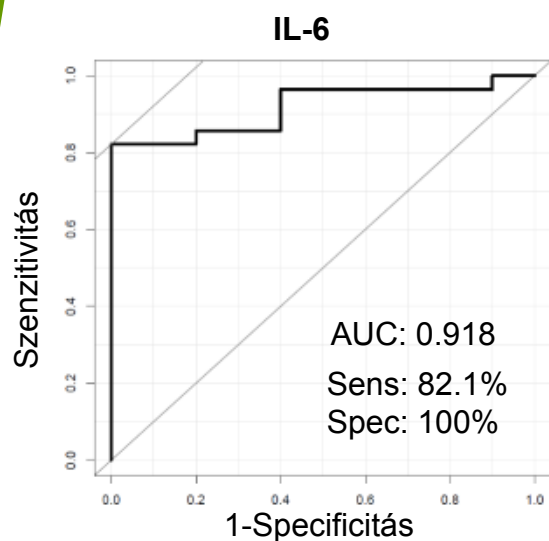
Citokin szintek vizsgálata (Luminex analízis)

TNF alfa, IL6 potenciális biomarkerként használható a magyar lakosság szűrésére

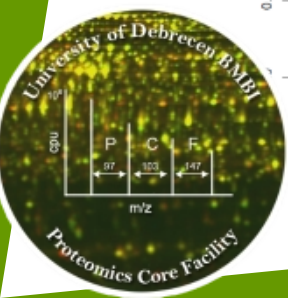
ROC (Receiver Operator Characteristic) statisztika



A potenciális biomarkerek elemzése ROC statisztika segítségével

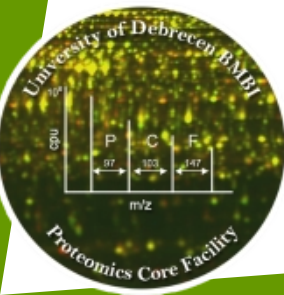


Csősz és mtsai. PLOS One, 2017.



Az egyes országokban vizsgált potenciális OSCC-specifikus nyál biomarkerek

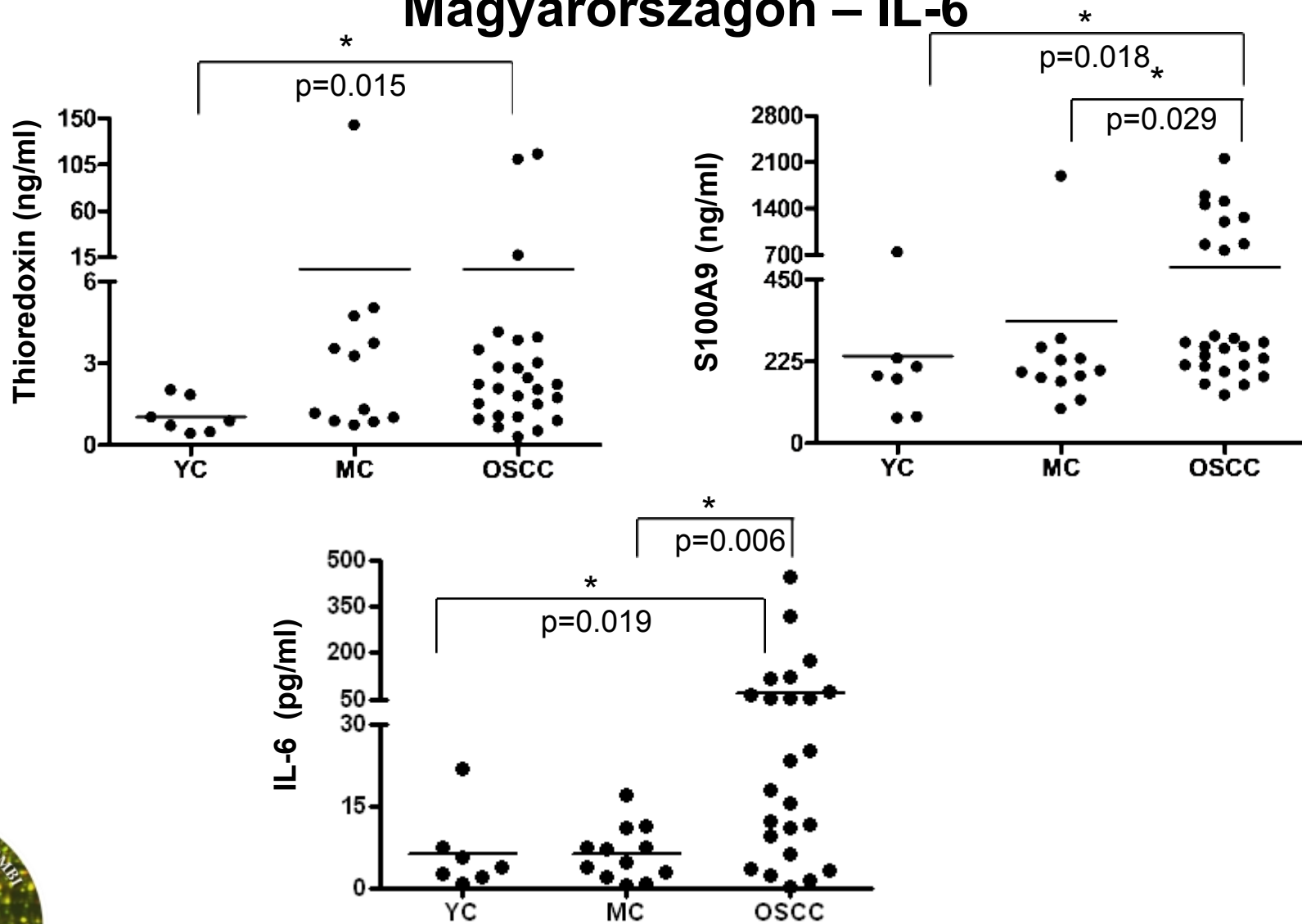
Ország	Vizsgált fehérjék
Kína	CA-50, CEA, S100A7, S100A8, S100A9
Horvátország	bFGF, IL-6
Magyarország	CATA, CD44, CD59, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, K1C19, M2BP, PROF, S100A9, TNF- α , TXN, VEGF
India	CA125, LDH
Irán	IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α
Izrael	ALB, CA125, CA19.9, CEA, CYD1, Cyfra 21.1, EGF, IgG, IGF1, Ki-67, LDH, MMP-2, MMP-9, MSP, OGG1, p-Src, sIgA, SCCA, TPA
Olaszország	STAT, SUR
Japán	HNP-1, IL-6, IL-1 β , IL-8, OSTP
Szerbia	IL-1 β , IL-8, M2BP
Taiwan	ALB, AMY, ANXA2, APOA, APOA2, APOA-IV, B3AT, C4BPA, CBG, CD109, CHIT1, CO6, CO9, DHB4, EGF, FSCN, FABP, GSTM1, HEXA, HPRT, HEP2, H2A1A, HYEP, ICAM3, IGHA2, IGHV, ITIH2, ITIH4, KBRS1, KNG1, KV119, KV403, LV102, PCP, RETN, RL7, S100A8, TRFE, T132A, TBA1C, VTNC, ZN497, ZN501
Egyesült Királyság	P53ab
Amerikai Egyesült Államok	ACT, bFGF, CATA*, CD44, CD59, END1, H1, IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, INVO, K1C19, M2BP, MOES, MYO, PROF, RAB7, S100A12, S100A7, S100A9, S100P, TNF- α , VEGF



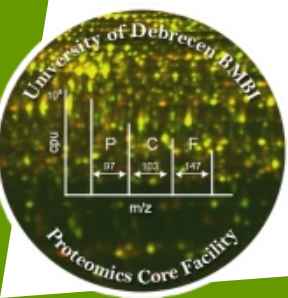
Csősz és mtsai. PLOS One, 2017.

Potenciális biomarker az OSCC szűrésére

Magyarországon – IL-6



Csősz és mtsai. PLOS One, 2017.

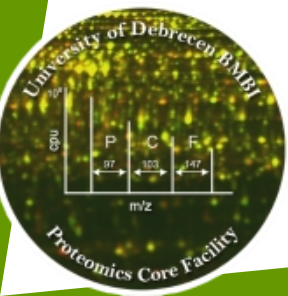




Könnybiomarkerek vizsgálata

Alzheimer kórban

Kalló és mtsai. PLOS One, 2017.



A könny, mint védelmi vonal



Folyamatosan termelődik

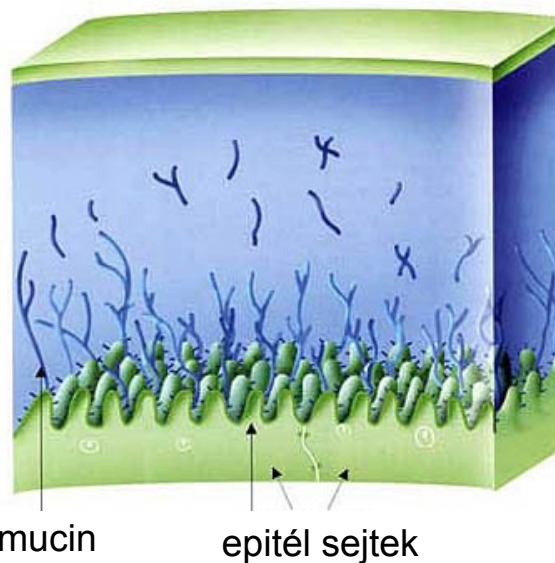
Fő szerepe a nedvesítés

Véd a patogénekkal

szemben

Non-invazív módon

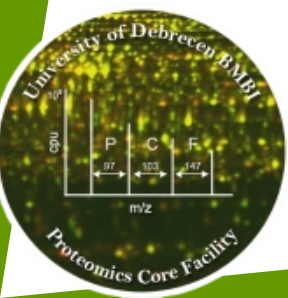
gyűjthető



Lipid réteg
0,1 μm

Vizes réteg
8 μm

Mucin réteg
0,8 μm



Alzheimer kór

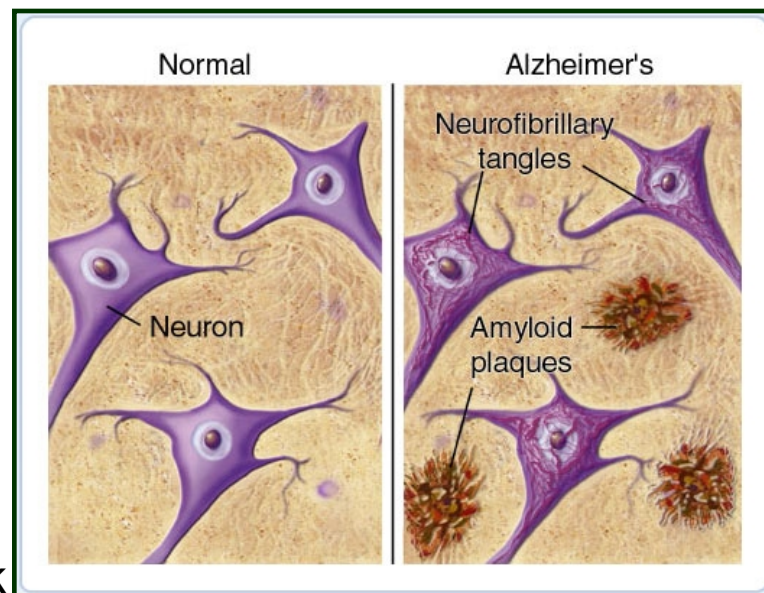


- ❖ Primer neurodegeneratív betegség
- ❖ Legfőbb kockázati tényezője az életkor
- ❖ Etiopatogenezise ismeretlen

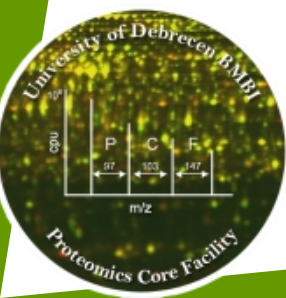
hipotézisek: 3-as típusú diabetes
(lokális agyi inzulinrezisztencia)
gyulladásos betegség

- ❖ Jellegzetes neuropatológiai elváltozások az agyban:

- amyloid plakkok
- neurofibrillaris kötegek
- neuronpusztulás



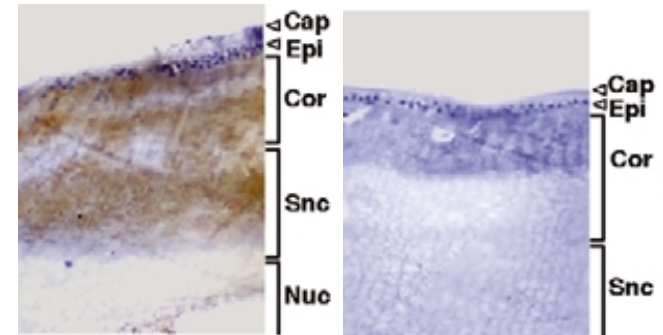
<http://www.successandyouth.com/news/alzheimers-risk-may-be-reduced-by-steady-diet-of-mental-stimulation.html>



Alzheimer kór – szemet érintő komplikációk



- Amiloid plakkok lerakódása a szemben
- Retina morfológiájának változása
- Retina érhálózatának megváltozása
- Csökkent vizuális teljesítmény



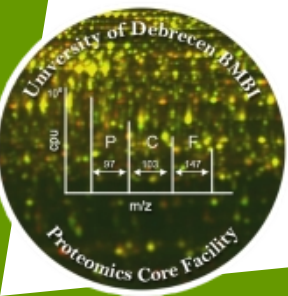
Alzheimer-kóros

Kontroll

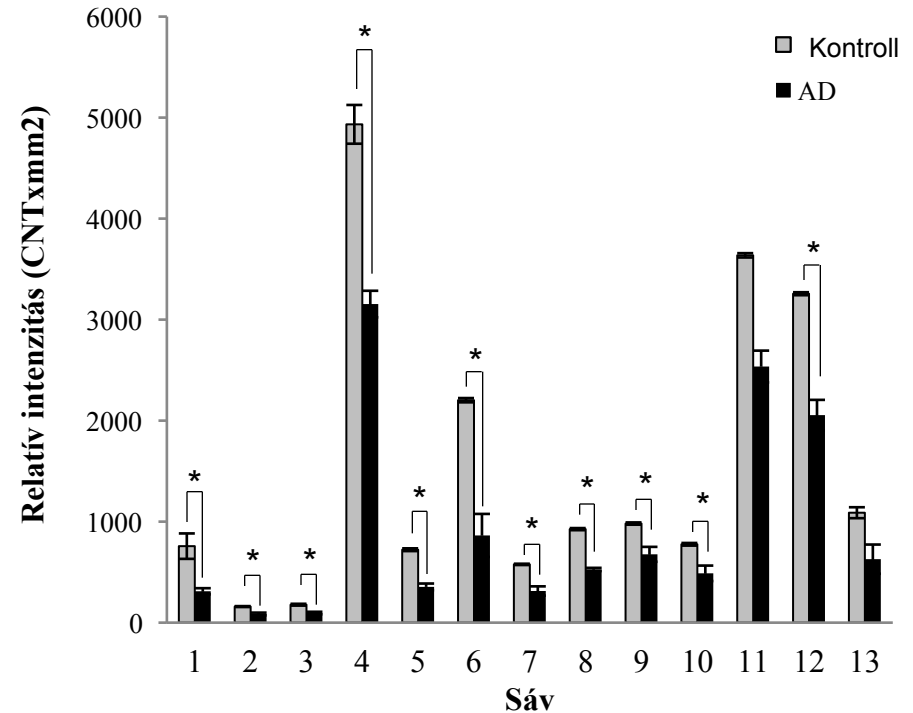
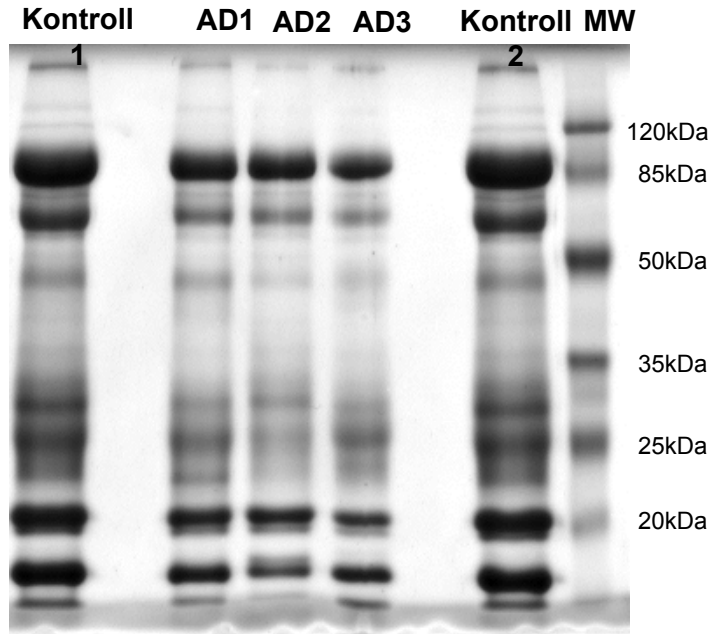
(Goldstein et. al.
2003)

Hipotézis:

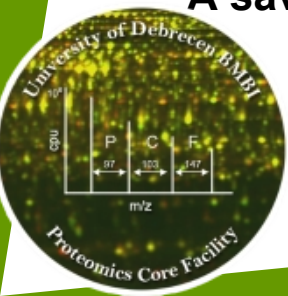
A szem mikrokörnyezet megváltozása hatással lehet a szekretált könnyfehérjékre is



Könnyfehérjék SDS-PAGE analízise



A sávok intenzitása szignifikánsan lecsökkent az Alzheimer kóros betegektől származó mintákban a kontroll csoporthoz képest



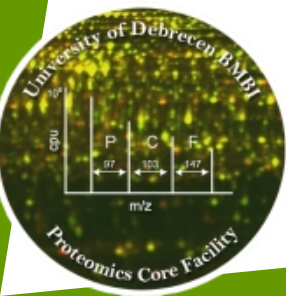
LC-MS/MS alapú fehérje azonosítás



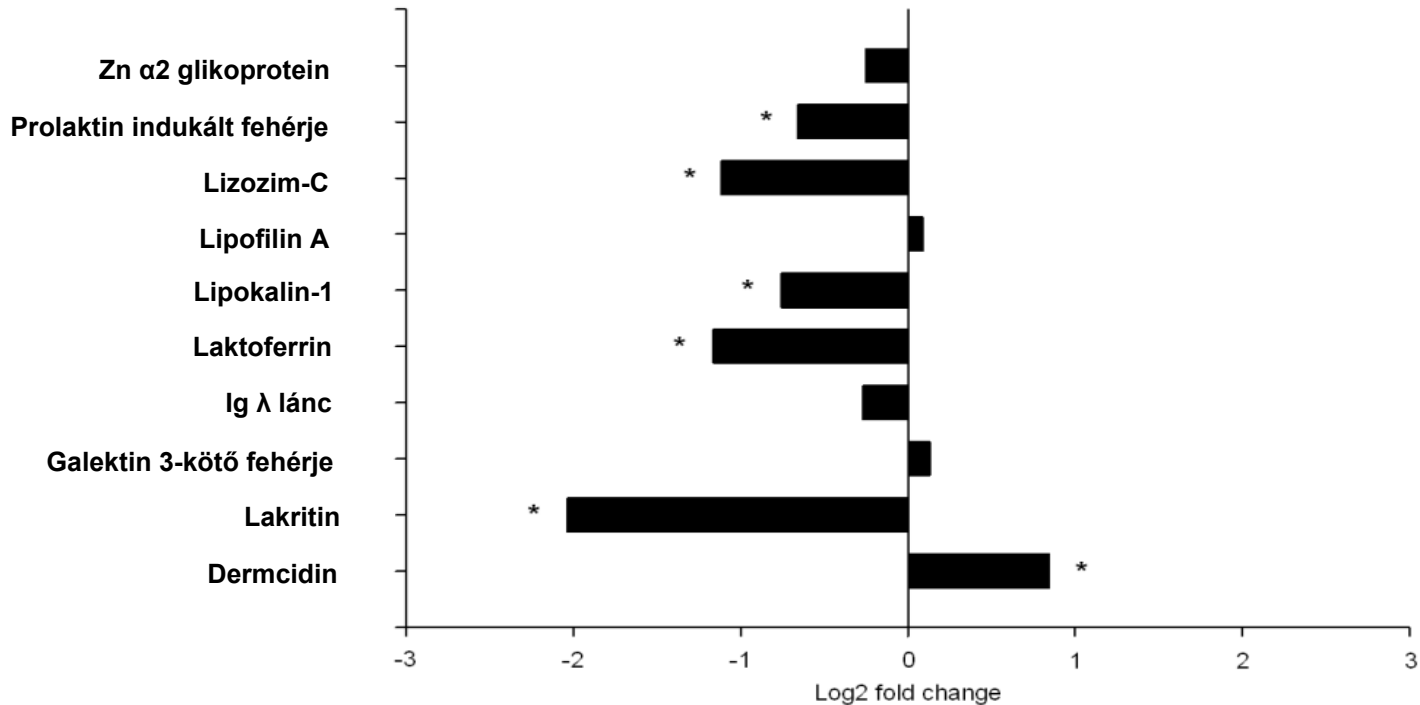
Sáv	Azonosított fehérje	UniProt ID
1	-	-
2	Laktoferrin	P02788
3	Laktoferrin	P02788
4	Laktoferrin	P02788
5	Laktoferrin Szérum albumin Ig α-lánc C régió	P02788 P02768 P01876
6	Laktoferrin Ig α-lánc C régió	P02788 P01876
7	Zn α2 glikoprotein Keratin 1 Lakritin	P25311 P04264 Q9GZZ8
8	Keratin 1 Keratin 10	P04264 P13645
9	Ig λ-lánc C régiók	P0CG05/P0CG06
10	Ig λ-lánc C régiók Ig κ-lánc C régió Zimogén granulom fehérje 16 homológ B Prolin gazdag fehérje 4	P0CG05/P0CG06 P01834 Q96DA0 Q16378
11	Lipokalin-1 Prolaktin indukált fehérje	P31025 P12273
12	Lizozim-C Lipofilin A Prolaktin indukált fehérje Lipofilin C Cisztatin-S	P61626 O75556 P12273 O95968 P01036
13	Lizozim-C	P61626

A csökkent mennyiségű
fehérjék a kémiai barrier
részei, ezáltal szerepet
játszanak a szervezet
védelmében

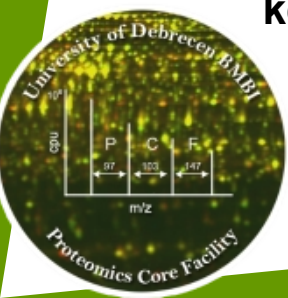
Az Alzheimer kór
patomechanizmusában szerepet
játszhat a szem kémiai
barrierének megváltozása



A kémiai barriert alkotó fehérjék MRM alapú vizsgálata



Az Alzheimer kór összefüggésben állhat a könnymirigyek csökkent működésével, a kémiai barrier megváltozik, az epitélsejtek által termelt dermcidin szintje megemelkedik

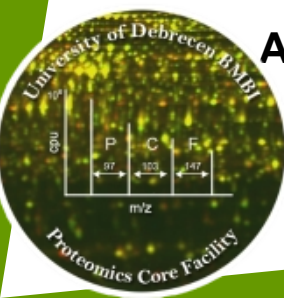


Alzheimer kórra specifikus potenciális biomarkerek azonosítása



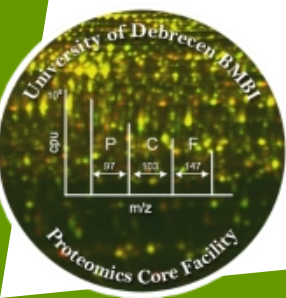
Fehérjék	Szenzitivitás (%)	Specifitás(%)	PV+ (%)	PV- (%)	AUC	Pontosság	95% CI
LCN1	53.1	79.7	22.7	43.3	0.68	0.72	0.56-0.80
LTF	78.1	51.6	17.5	55.4	0.67	0.73	0.55-0.78
LYZ	90.6	50.0	8.6	52.5	0.68	0.67	0.57-0.79
PIP	71.9	56.2	20.0	54.9	0.60	0.67	0.48-0.72
LACRT	90.6	57.8	7.5	48.2	0.71	0.65	0.59-0.82
DCD	62.5	76.6	19.7	42.9	0.70	0.70	0.59-0.82
LCN1+DCD	53.1	89.1	20.8	29.2	0.74	0.76	0.63-0.85
LYZ+LACRT	90.6	59.4	7.3	47.3	0.72	0.64	0.61-0.83
LCN1+DCD+ LACRT	90.6	65.6	6.7	43.1	0.80	0.69	0.71-0.89
LCN1+DCD+LTF	53.1	89.1	20.8	29.2	0.74	0.76	0.62-0.84
LCN1+DCD+LYZ	59.4	82.8	19.7	36.7	0.75	0.76	0.64-0.86
LCN1+LTF+LYZ	87.5	50.0	11.1	53.3	0.72	0.71	0.61-0.83
LYZ+LACRT+ DCD	90.6	65.6	6.7	43.1	0.79	0.71	0.69-0.89
LYZ+LACRT+ LCN1	87.5	59.4	9.5	48.1	0.72	0.67	0.62-0.83
PIP+LACRT+DCD	93.8	60.9	4.9	45.5	0.79	0.68	0.69-0.97
DCD+LCN1+LTF+PIP	62.5	76.6	19.7	42.9	0.74	0.72	0.64-0.84
LCN1+DCD+LYZ+LACRT	81.2	76.6	10.9	36.6	0.80	0.72	0.71-0.89

A lipokalin-1, dermcidin, lizozim-C és laktirin kombinációja jól használható biomarkernek tűnik



Összefoglalás

- Sikeresen kifejlesztettünk és alkalmaztunk MRM alapú tömegspektrometriás módszereket nyál- és könny fehérjék célzott vizsgálatára
- Az MRM alapú módszerek szenzitivitása és multiplex jellege jól használható a testfolyadékokból történő biomarker kutatásokban
- Eredményesen azonosítottunk potenciális biomarkereket szájüregi laphámrák és Alzheimer kór esetén
- Megfelelően kivitelezve az MRM-alapú vizsgálatok elengedhetetlen részét képezik a biomarker kutatásoknak





Köszönetnyilvánítás

Biomarker kutatócsoport

Proteomika és Lipidomika Szolgáltató Laboratórium



Prof. Tózsér
József



Dr. Csósz
Éva



Dr. Kalló
Gergő



Darainé
Julika



Dr. Matúz
Krisztina



Székely
Tímea



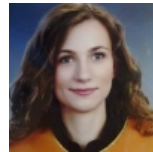
Dr. Csutak
Adrienne



Hartman
Zsolt



Sólyom
Kamilla



Szabó
Emese



Márkus
Bernadett



Kovács
Fruzsina



Deák
Eszter

Prof. Márton Ildikó

Prof. Kiss Csongor

Dr. Tar Ildikó

Dr. Szabó Adrienn

Dr. Tóth Noémi



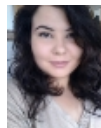
Dr. Emri
Miklós



Bába
Orsolya



Bertók
Nikolett



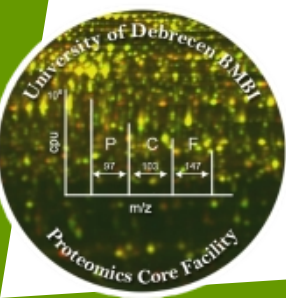
Varga
Anita



Tarsoly
Zsófia



Sinka
László



Bolyai János Kutatási Ösztöndíj



PD 116817



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

NKFIH PD121075