

Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometrie

14.6.2013

MSc. Miguel Ángel Merlos Rodrigo

*Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova Univerzita v
Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, CZ*

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

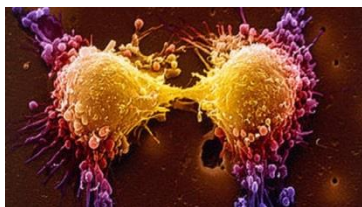
Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti „in vivo“ zobrazovacích technik



1



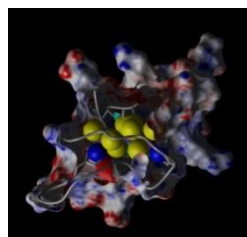
Studium nádorových
biomarkerů pomocí
MALDI-TOF



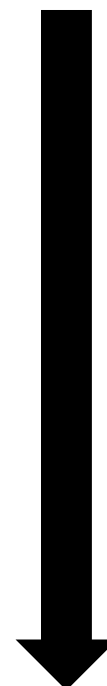
2



Metalothioneiny a patologie
nemoci



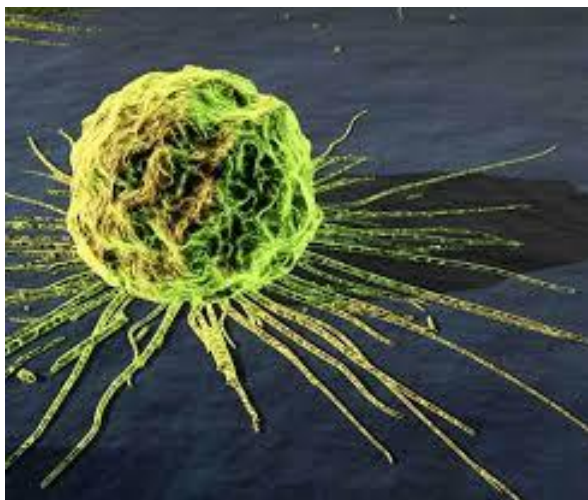
3

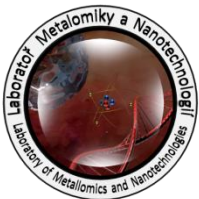


Identifikace metalothioneinu v
nádorových buňkách pomocí
MALDI-TOF hmotnostní
spektrometrie

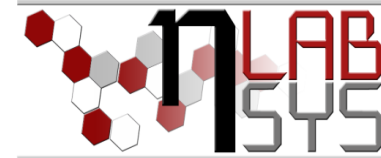


1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF





Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

MALDI-TOF

Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight

Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice - průletový hmotnostní analyzátor



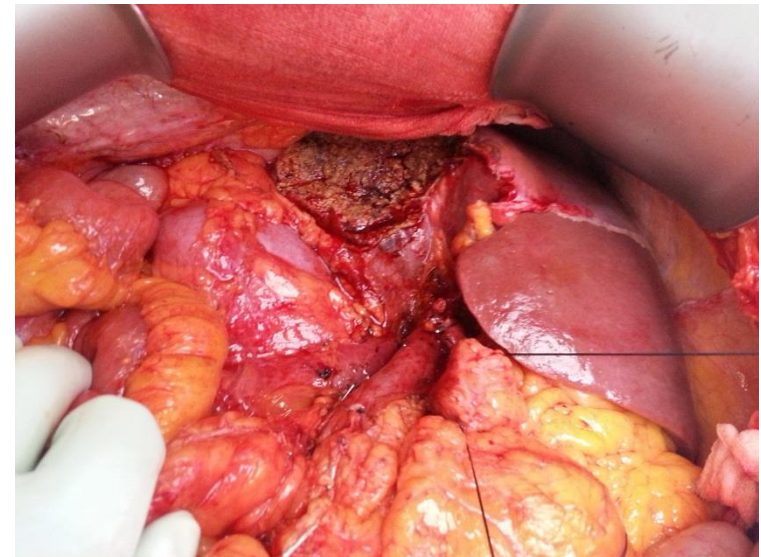
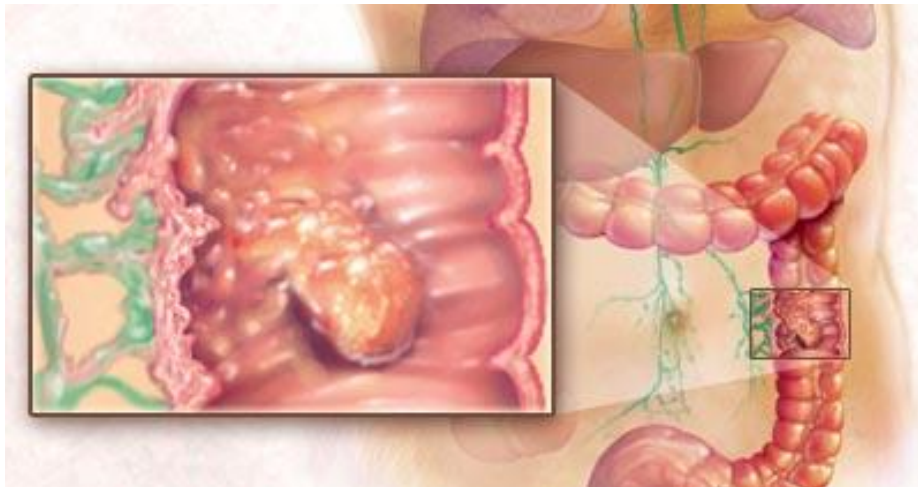
Měkká ionizační technika v
hmotnostní spektrometrii.

MALDI-TOF/TOF byla použita v různých studiích pro určení rozdílných markerů a mechanismů rozvoje rakoviny.

1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

Rakovina gastrointestinálního traktu

MALDI-TOF může usnadnit objevení nového a kvantitativního prognostického biomarkeru pro rakovinu trávicího traktu zahrnující i lymfatické uzliny.

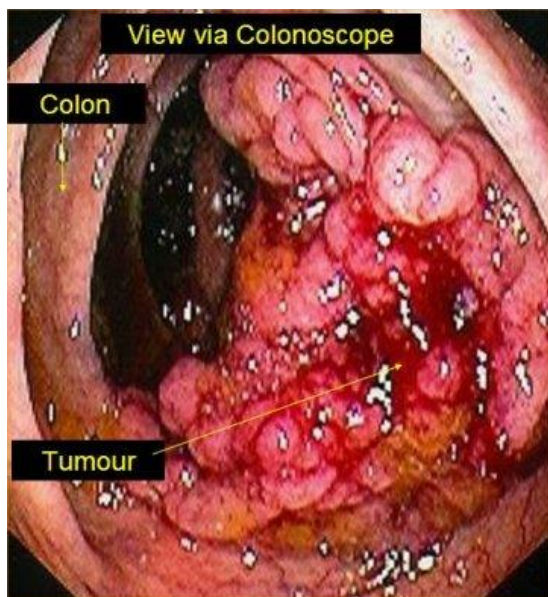


1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

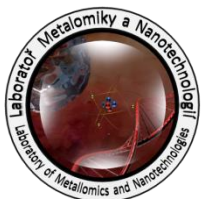
Rakovina gastrointestinálního traktu

Vysoká citlivost a specifita, která byla dosažena na úrovni sérového degAla-FPA (fibrinopeptid-A), ukazuje, že MALDI-TOF může usnadnit objevení nového a kvantitativního prognostického biomarkeru pro rakovinu trávicího traktu i s lymfatickými uzlinami.

(Zhang et al., 2013)



V dalších studiích bylo popsáno určení biomarkerů metastáz rakoviny trávicího traktu použitím kvantitativní proteomiky a následné identifikace pomocí MALDI-TOF.



Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

Rakovina gastrointestinálního traktu

Journal of
proteome
●research

Article

pubs.acs.org/jpr

Are Gastric Cancer Resection Margin Proteomic Profiles More Similar to Those from Controls or Tumors?

Priscila F. Aquino,^{†,#} Juliana S. G. Fischer,^{‡,#} Ana G. C. Neves-Ferreira,[§] Jonas Perales,[§]
Gilberto B. Domont,^{||} Gabriel D. T. Araujo,^{||} Valmir C. Barbosa,[⊥] Jucilana Viana,^{||} Sidney R. S. Chalub,[○]
Antonia Q. Lima de Souza,^{||} Maria G. C. Carvalho,[⊗] Afonso D. Leão de Souza,[†] and Paulo C. Carvalho^{*,‡}

Journal of
proteome
●research

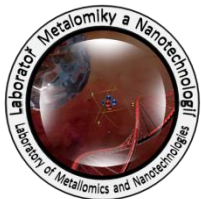
Article

pubs.acs.org/jpr

Identification and Functional Validation of Caldesmon as a Potential Gastric Cancer Metastasis-associated Protein

Qian Hou,[†] Hwee Tong Tan,[†] Kiat Hon Lim,[‡] Teck Kwang Lim,[§] Avery Khoo,[‡] Iain B.H. Tan,^{||}
Khay Guan Yeoh,[⊥] and Maxey C. M. Chung^{†,§,*}

(2013)



Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

Rakovina gastrointestinálního traktu

Table 1. Differentially Expressed Proteins Identified in the Metastatic Gastric Cancer Cell Lines^a

IPI accessions	gene symbols	protein name	% coverage	MKN7:AGS	AZ521:FU97
IPI00396485.3	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	47.8	1.49	1.69
IPI00789435.2	EEF1D	Elongation factor 1-delta isoform 3	23.7	2.53	1.95
IPI00738381.2	EEF1G	Elongation factor 1-gamma	32.3	1.60	1.63
IPI00946642.1	EIF5A2	Eukaryotic translation initiation factor 5A2	33	1.46	1.84
IPI00299573.12	RPL7A	60S ribosomal protein L7a	16.9	1.79	2.93
IPI00027270.1	RPL26	60S ribosomal protein L26	29.7	1.89	3.76
IPI00927658.1	RPL32	Ribosomal protein L32	34	1.72	3.16
IPI00794894.1	RPL23A	RPL23A Protein	12.7	2.02	3.91
IPI00414676.6	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	47.4	1.66	1.87
IPI00026663.2	ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3	11.7	7.71	4.92
IPI00218414.5	CA2	Carbonic anhydrase 2	10.4	1.83	8.86
IPI00947127.1	LDHA	Lactate dehydrogenase A chain isoform 3	29.6	1.69	1.89
IPI00218918.5	ANXA1	Annexin A1	42.5	1.47	12.25
IPI00872379.1	ANXA5	Annexin A5	18.8	2.28	2.25
IPI00747810.2	FSCN1	Fascin	26	5.21	3.91
IPI00790503.3	MYH10	Isoform 3 of Myosin-10	18.5	3.18	1.74
IPI00007402.3	IPO7	Importin-7	12.6	1.80	3.40
IPI00018352.1	UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	30.9	5.01	3.40
IPI00023860.1	NAP1L1	Nucleosome assembly protein 1-like 1	25.3	1.40	1.75

06

(Qian Hou et al., 2013)



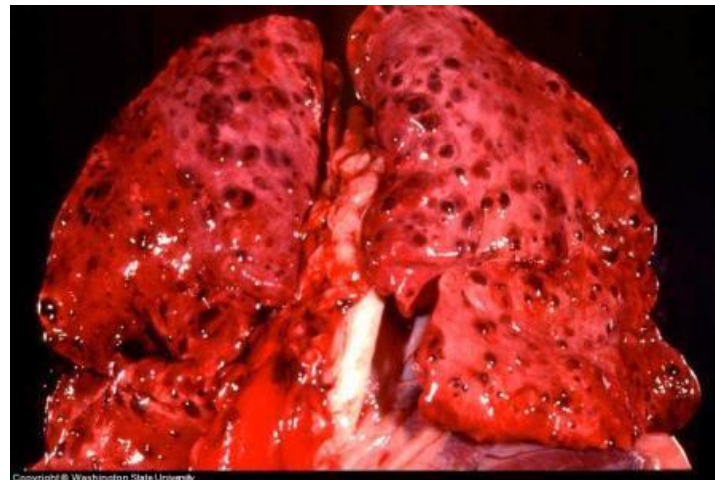
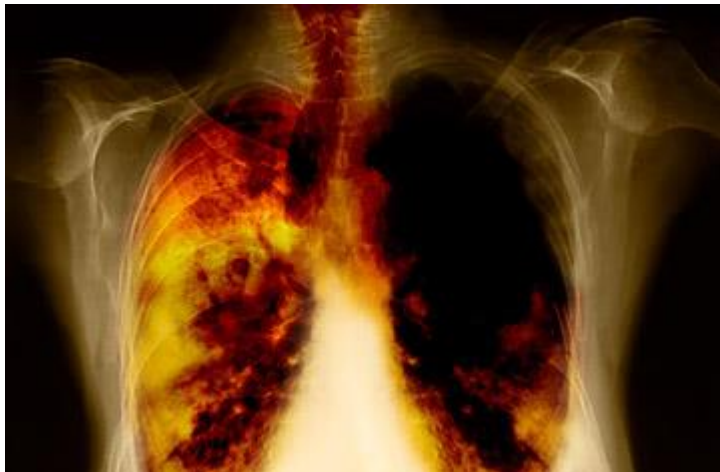
Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

Rakovina dýchacího systému

V nedávných studiích byl MALDI-TOF hmotnostní spektrometr ověřen jako inovativní nástroj pro stanovení a identifikaci biomolekul, které se vyskytují v různých typech a fázích rakoviny plic.



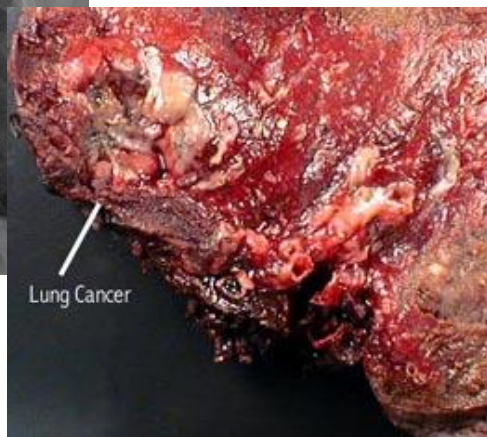
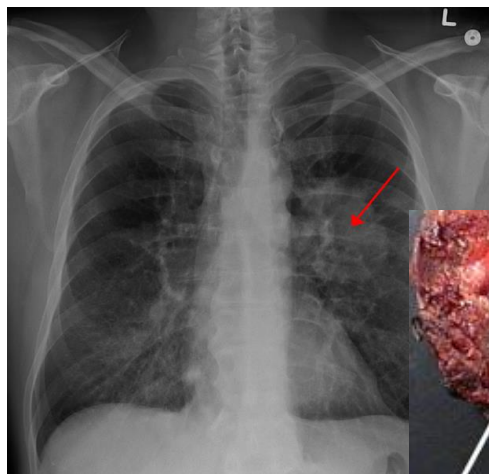
1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

Rakovina dýchacího systému

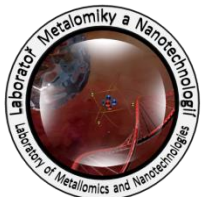


Pastor et al., 2013 (Seville, Andalucía, Španělsko) popsal celkem 16 regulačních proteinů oxidačního stresu které byly rozdílně exprimovány u pacientů s rakovinou plic a/nebo s chronickou obstrukční plicní nemocí ve srovnání s kontrolní skupinou.

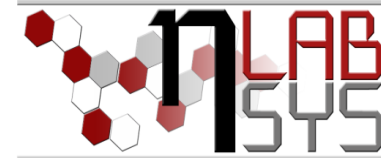
(International Journal of Molecular Sciences)



Tato zjištění zdůrazňují roli proteinů reagujících na oxidační stres v patogenních dráhách obou nemocí a poskytují nové kandidáty na biomarkery a predikční nástroje pro diagnózu rakoviny plic. Například **prohibitin** je důležitým biomarkerem pro sledování vývoje a pro prognózu karcinomu nosohltanu.



Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

Rakovina dýchacího systému

Cancer
Science

The official journal of the Japanese Cancer Association



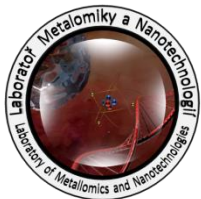
Association of *CASP3* polymorphism with
hematologic toxicity in patients with advanced
non-small-cell lung carcinoma treated with
platinum-based chemotherapy

Shaohua Gu,¹ Qihan Wu,² Xueying Zhao,¹ Wenting Wu,¹ Zhiqiang Gao,³ Xiaoming Tan,⁴ Ji Qian,¹ Hongyan Chen,¹
Yi Xie,¹ Li Jin,¹ Baohui Han^{3,5} and Daru Lu^{1,5}

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The role of cytochrome c oxidase subunit Va in
non-small cell lung carcinoma cells: association
with migration, invasion and prediction of distant
metastasis



Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



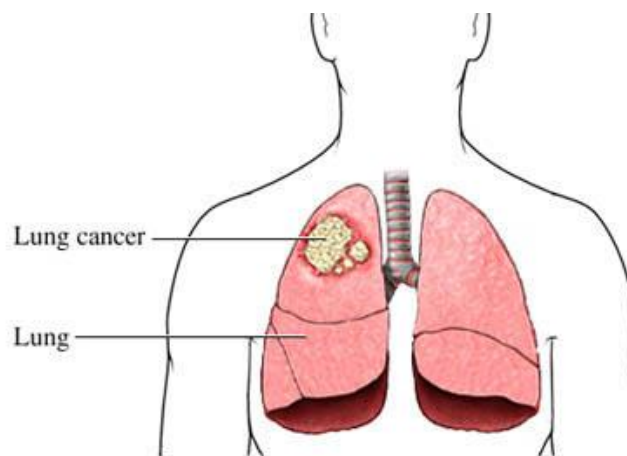
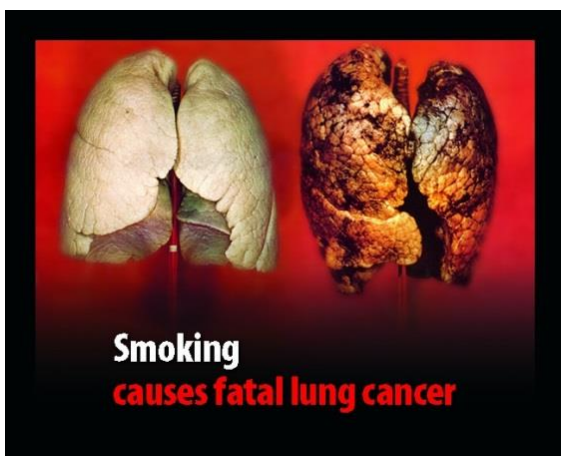
1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

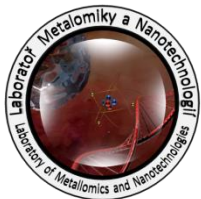
Rakovina dýchacího systému

Odborné články

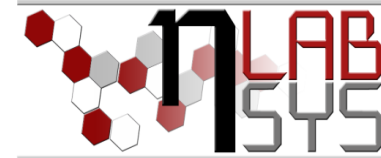
(Musharraf, S.G., et al., 2012)

Porovnání vzorků plasmy od zdravých nekuřáků, kuřáků a od pacientů s rakovinou plic: Model založený na odlišení nízkomolekulárních proteinů a peptidů pomocí technologie magnetických „kuliček“ a MALDI-TOF MS.





Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

Rakovina ledvin a močového měchýře

V moči je možné identifikovat pomocí MALDI-TOF nové biomarkery pro rakovinu močového měchýře.



Identification of urinary Gc-globulin as a novel biomarker for bladder cancer by two-dimensional fluorescent differential gel electrophoresis (2D-DIGE)

Fei Li^a, Ding-nan Chen^a, Cheng-wu He^a, You Zhou^b, Vesa M. Olkkonen^b, Nan He^c, Wei Chen^a, Pei Wan^a, San-san Chen^a, Yong-tong Zhu^a, Kai-jian Lan^a, Wan-long Tan^{a,c}

Bladder Cancer

Serum Proteomic Profiling in Patients with Bladder Cancer

Kristina Schwamborn^{a,*}, René C. Krieg^a, Joachim Grosse^b, Nadine Reulen^a, Ralf Weiskirchen^c, Ruth Knuechel^a, Gerhard Jakse^b, Corinna Henkel^a

Bryan et al., 2013

Gianazza et al., 2012

Rakovina prostaty

Existuje mnoho studií popisujících použití MALDI-TOF pro determinaci markerů rakoviny prostaty a pokroky v této oblasti.

Separation and Study of the Range of Plasminogen Isoforms in Patients with Prostate Cancer

E. F. Shin^{1*}, D. I. Vodolazhsky¹, A. Yu. Golikov¹, T. N. Belova¹, N. V. Boyko¹, D. V. Zimakov¹, E. N. Cherkasova¹, M. I. Kogan², M. B. Chibichian², S. A. Moshkovskii³, V. A. Tarasov¹, and D. G. Matishov¹

Somatostatin Derivative (smsDX) Targets Cellular Metabolism in Prostate Cancer Cells after Androgen Deprivation Therapy

Lei Yan^{1,3}, Zhaoquan Xing^{1,3}, Zhaoxin Guo¹, Zhiqing Fang¹, Wei Jiao¹, Xiaoyu Guo², Zhonghua Xu^{1*}, Zhenghui Fang³, Anders Holmberg⁴, Sten Nilsson⁴, Zhaoxu Liu^{1,2,4*}

¹Department of Urology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan, China, ²Aging and Health Center, School of Nursing, Shandong University, Jinan, China, ³Department of Obstetrics and Gynecology, Jinan Central Hospital, Shandong University, Jinan, China, ⁴Department of Oncology and Pathology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden



Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

Rakovina prsu

Methylace vimentinu predikuje špatné celkové přežití nezávislé na rase, podtypu, fázi, stavu uzlin, nebo metastatické onemocnění a je příslibem jako nový prognostický biomarker pro pacienty s rakovinou prsu. (Ulirsch et al., 2013)

Vimentin DNA methylation predicts survival in breast cancer

Jacob Ulirsch · Cheng Fan · George Knaff ·
Ming Jing Wu · Brett Coleman · Charles M. Perou ·
Theresa Swift-Scanlan



Rakovina vaječníků

Hlavní část výzkumu věnujícího se profilování proteomu ve vaječnicích je soustředěna na podmínky nemocí jako jsou syndrom polycystických ovarií, rakovina vaječníků, apod.



Transforming growth factor-beta-induced protein secreted by peritoneal cells increases the metastatic potential of ovarian cancer cells

Miranda P. Ween¹, Noor A. Lokman¹, Peter Hoffmann², Raymond J. Rodgers¹, Carmela Ricciardelli¹ and Martin K. Oehler^{1,3}

¹Discipline of Obstetrics and Gynaecology, Research Centre for Reproductive Health, Robinson Institute, University of Adelaide, Adelaide, SA, Australia

²Adelaide Proteomics Centre, School of Molecular and Biomedical Science, University of Adelaide, Adelaide, SA, Australia

³Department of Gynaecological Oncology, Royal Adelaide Hospital, Adelaide, SA, Australia

Screening and Identification of Biomarkers in Ascites Related to Intrinsic Chemoresistance of Serous Epithelial Ovarian Cancers

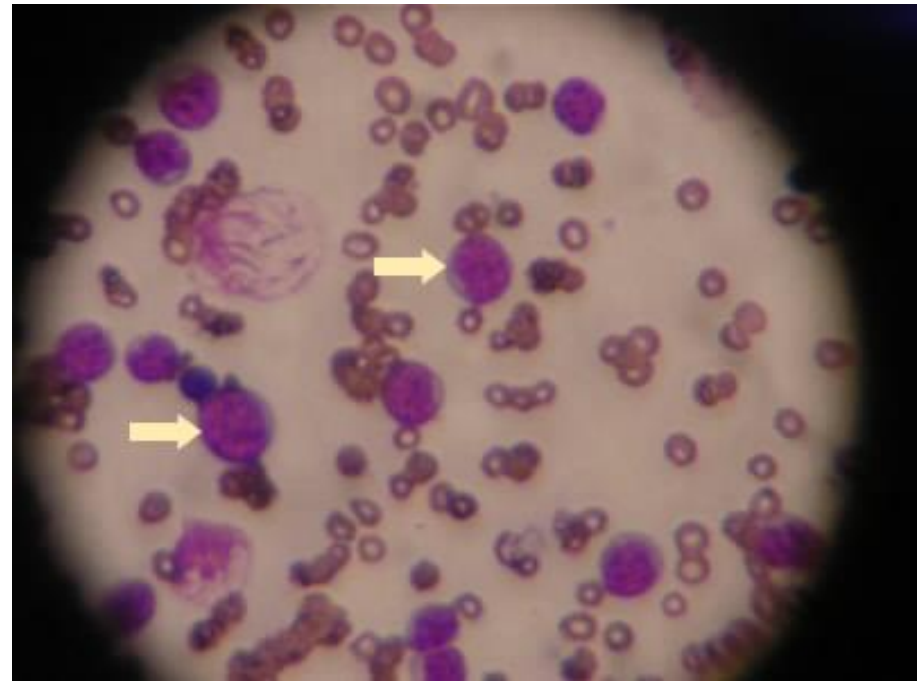
He Huang^{1,2}, Yujie Li^{1,2}, Jihong Liu^{1,2}, Minghui Zheng², Yanling Feng¹, Kunhua Hu³, Yongwen Huang¹, Qidan Huang¹

¹Department of Gynecology Oncology, Sun Yat-Sen University Cancer Center, State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou, P. R. China, ²Department of Clinical Laboratory, The Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, P. R. China, ³Proteomics Center, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, P. R. China

1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

Leukémie

Dao Wang et al., popsal patnáct různých exprimovaných proteinů u dětské akutní lymfoblastické leukémie, které byly získány pomocí štěpení *in situ*, a poté byly analyzovány pomocí MALDI-TOF MS.

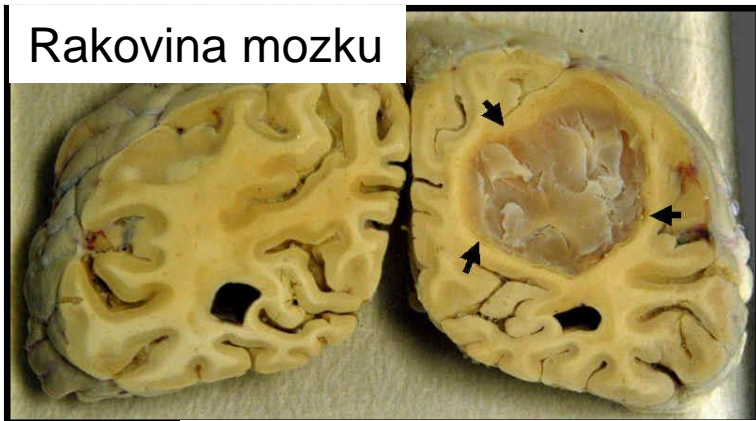


Abnormální zvýšení nezralých bílých krvinek.

1. Studium nádorových biomarkerů pomocí MALDI-TOF

Další typy rakoviny

Rakovina mozku



Rakovina varlat



Nitrooční melanom

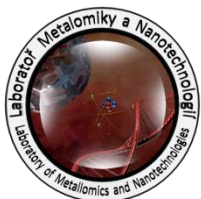


Rakovina (melanom) kůže



Rakovina slinivky břišní





Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



1



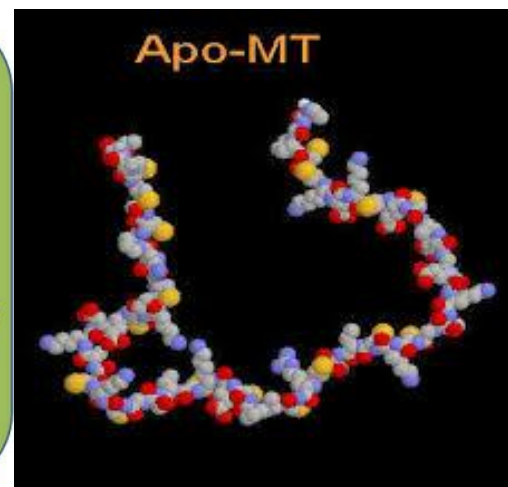
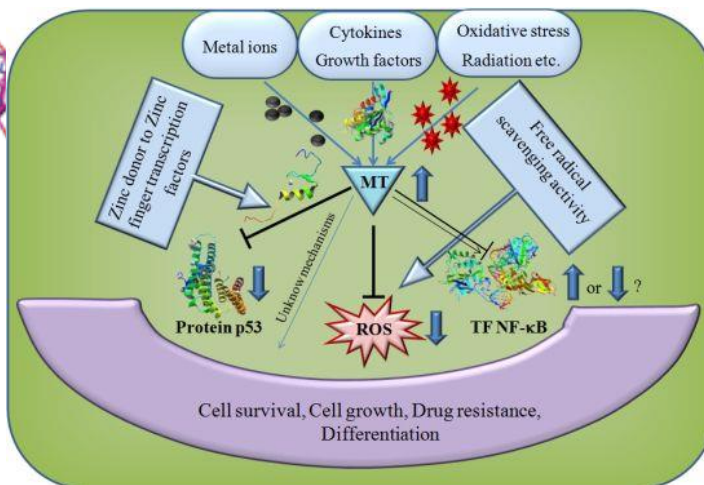
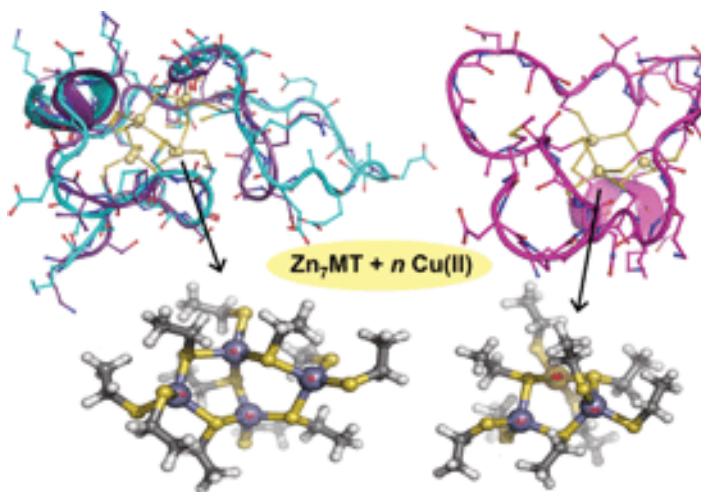
**Studium nádorových
biomarkerů pomocí
MALDI-TOF**

2

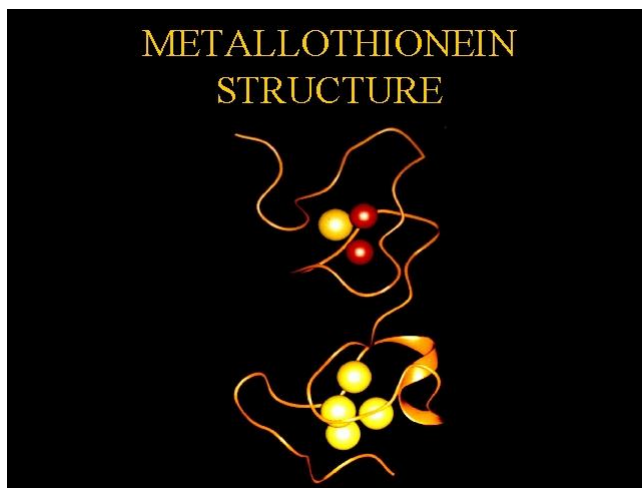


**Metalothioneiny a patologie
nemoci**

2. Metalothioneiny a patologie nemoci



2. Metalothioneiny a patologie nemoci



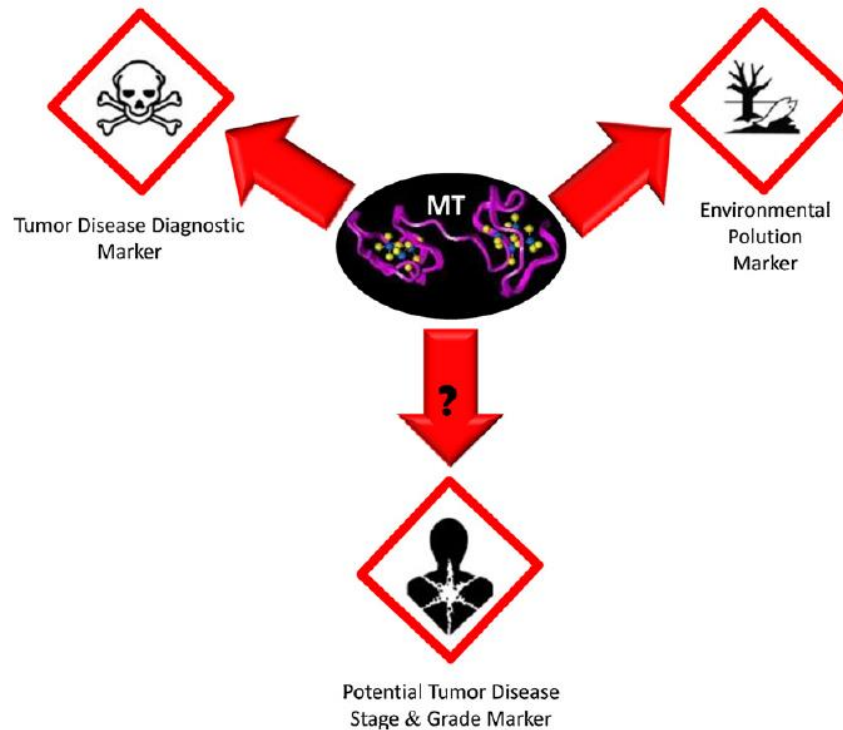
Metalothioneiny patří ke skupině vnitrobuněčných a nízkomolekulárních proteinů (Mr 6000-7000 Da).

Tyto proteiny jsou lokalizovány v cytoplazmě a některých organelách, převážně v mitochondriích.

Metalothioneiny určené MT1 až MT4 se liší malými rozdíly v sekvenci a náboji.

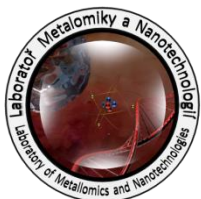
(Andrews 2000; Skutkova, Babula et al. 2012)

2. Metalothioneiny a patologie nemoci

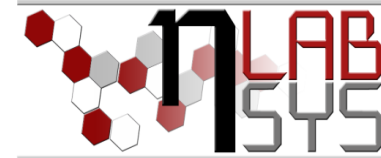


Metalothioneiny mohou být použity jako markery znečištění životního prostředí a jako nádorovými diagnostickými markery. Potenciálně mohou být použity taky jako markery vývoje rakoviny.

(Ryvolova M. et al., 2011)



Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



2. Metalothioneiny a patologie nemoci

- Řada studií demonstrovala přítomnost nebo zvýšenou syntézu metalothioneinů v rychle se množících normálních buňkách, regeneračních buňkách a rakovinových buňkách. Bylo dokázáno, že metalothioneiny chrání buňky před cytotoxickými efekty elektrofilních protinádorových léčiv.
- Metalothioneiny se účastní i vývoje resistance k protinádorovému léčivu **cisplatině**, jednomu z nejvíce používaných chemoterapeutik na bázi kovu (Pt).
- Bylo zamýšleno, že zvýšení buněčného obsahu metalothioneinů může sloužit jako možný biomarker resistance k léčbě cisplatinou.

REVIEW Open Access

Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies

Shinichiro Takahashi^{1*}



(Markus Knipp, 2009)



A comparative study on interactions of cisplatin and ruthenium arene anticancer complexes with metallothionein using MALDI-TOF-MS

Guangxue Zhang^{a,b,c}, Wenbing Hu^{a,b}, Zhifeng Du^{a,b}, Shuang Lv^{a,b}, Wei Zheng^{a,b}, Qun Luo^{a,b}, Xianchan Li^{a,b}, Kui Wu^{a,b}, Yumiao Han^{a,b}, Fuyi Wang^{a,b,*}

Metallothionein in bladder cancer: correlation of overexpression with poor outcome after chemotherapy

Christian Wülfing · Hermann van Ahlen · Elke Eltze · Hansjürgen Piechota · Lothar Hertle · Kurt-Werner Schmid



Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



2. Metalothioneiny a patologie nemoci

- MT-I A, E, X a MT-2A isoformy byly přítomny v rakovině prostaty. Bylo napsáno, že MT-1 a MT-2 isoformy se můžou týkat proliferační aktivity prsu, rakoviny tlustého střeva a rakoviny prostaty (a dalších).

Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis

M. George Cherian^{a,*}, A. Jayasurya^b, Boon-Huat Bay^b



Metallothionein 1F and 2A overexpression predicts poor outcome of non-small cell lung cancer patients

Bożena Weryńska^a, Bartosz Pula^b, Beata Muszczynska-Bernhard^c, Agnieszka Gomulkiewicz^b, Aleksandra Piotrowska^b, Robert Prus^b, Marzena Podhorska-Okolow^b, Renata Jankowska^a, Piotr Dziegielel^{b,d,e,*}

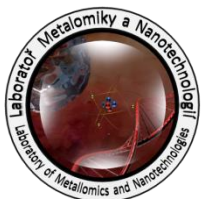
Clinicopathological Significance of Metallothioneins in Breast Cancer

Rongxian JIN¹, Jingxiang HUANG¹, Puay-Hoon TAN², Boon-Huat BAY²

¹Department of Anatomy, National University of Singapore, ²Department of Pathology, Singapore General Hospital, Singapore

Increased Metallothionein I/II Expression in Patients with Temporal Lobe Epilepsy

José Eduardo Peixoto-Santos¹, Orfa Yineth Galvis-Alonso⁴, Tonicarlo Rodrigues Velasco¹, Ludmyla Kandratavicius¹, João Alberto Assirati², Carlos Gilberto Carlotti², Renata Caldo Scandiuzzi¹, Luciano Neder Serafini³, João Pereira Leite^{1*}



Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie



1



Studium nádorových
biomarkerů pomocí
MALDI-TOF

2



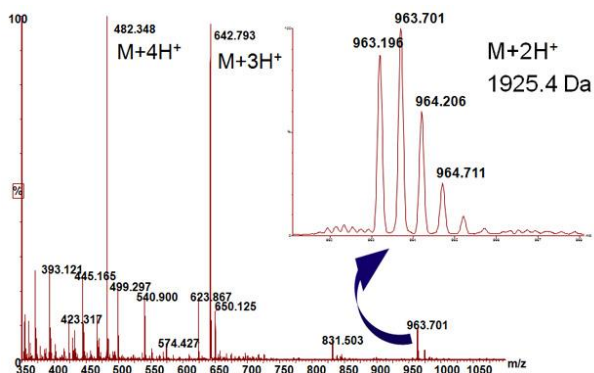
Metalothioneiny a patologie
nemoci

3



Identifikace metalothioneinu v
nádorových buňkách pomocí
MALDI-TOF MS

3. Identifikace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF MS



Materiál a metody:

Matrice:

α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA)

2,5-dihydroxybenzoová kyselina (2,5-DHB)

Vzorky metalothioneinů byly připraveny v 30% ACN s 0.1% TFA (TA30).

Bruker ultrafleXtreme (Bruker Daltonik GmbH, Germany) vybavený laserem operujícím na vlnové délce 355 nm při akceleračním napětí 25 kV, chlazený dusíkem a s maximální energií 43.2 μ J v reflektorovém pozitivním módu.

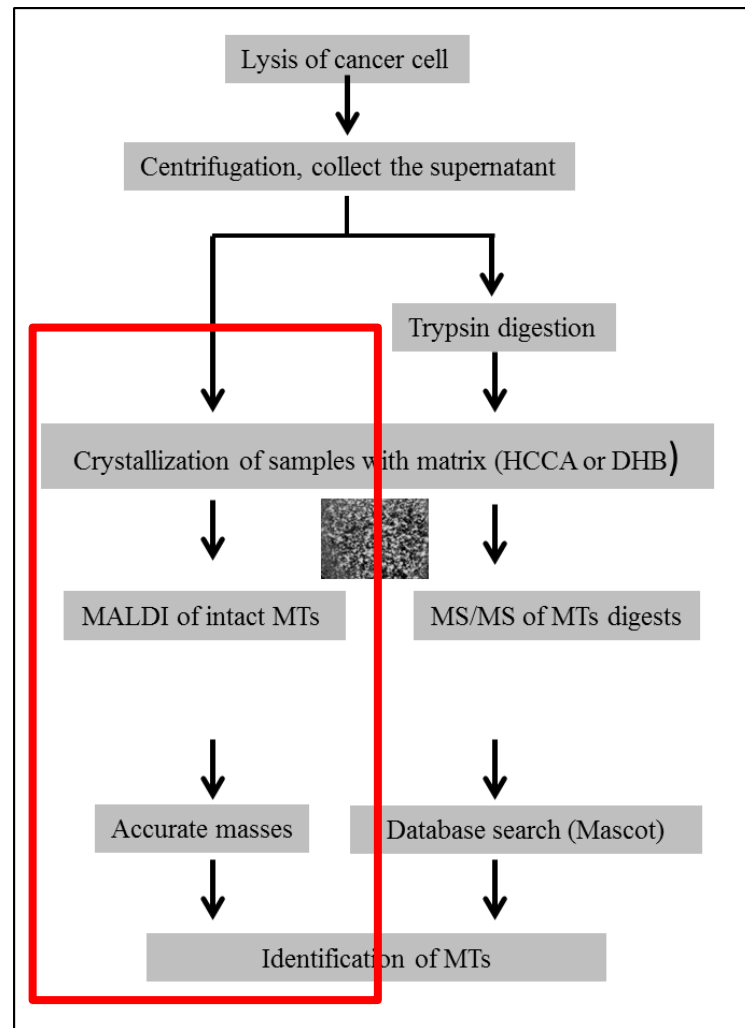
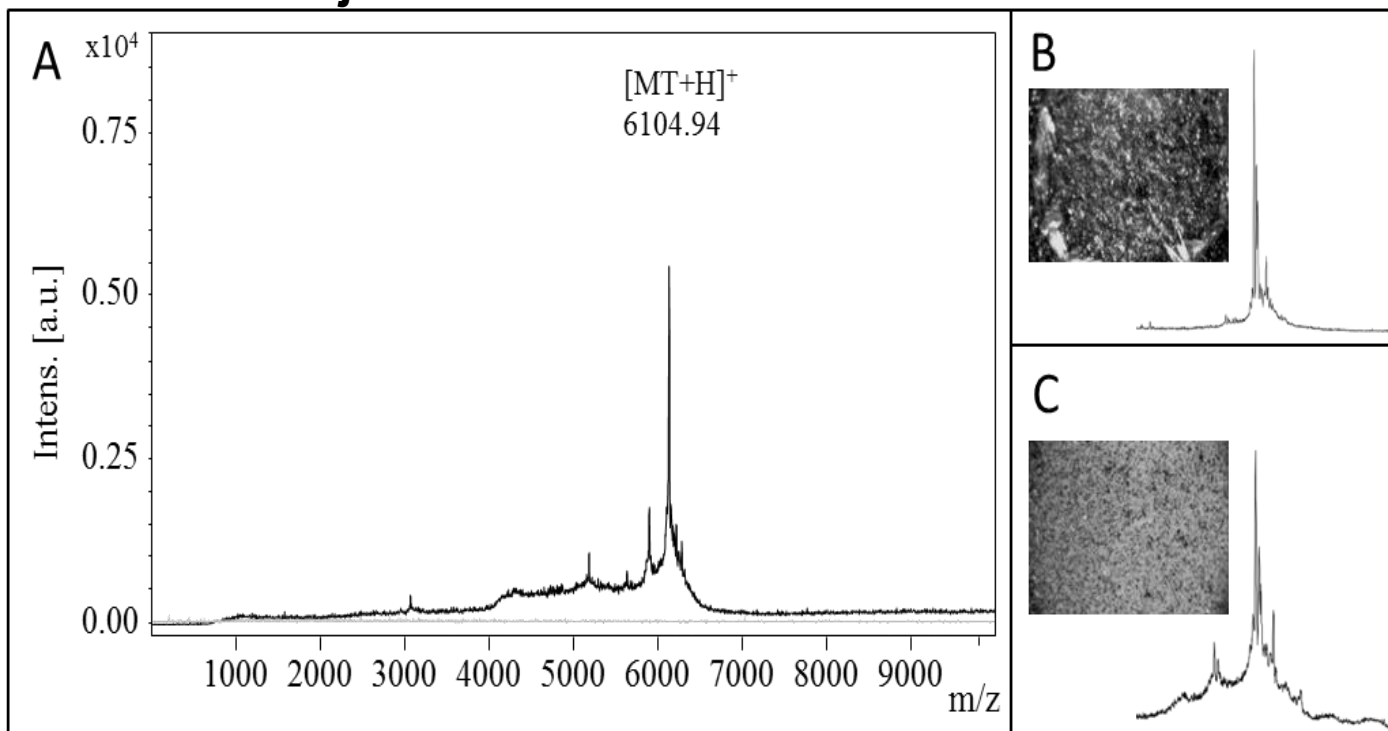


Schéma pro rychlou identifikaci metalothioneinů v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF MS

Výsledky

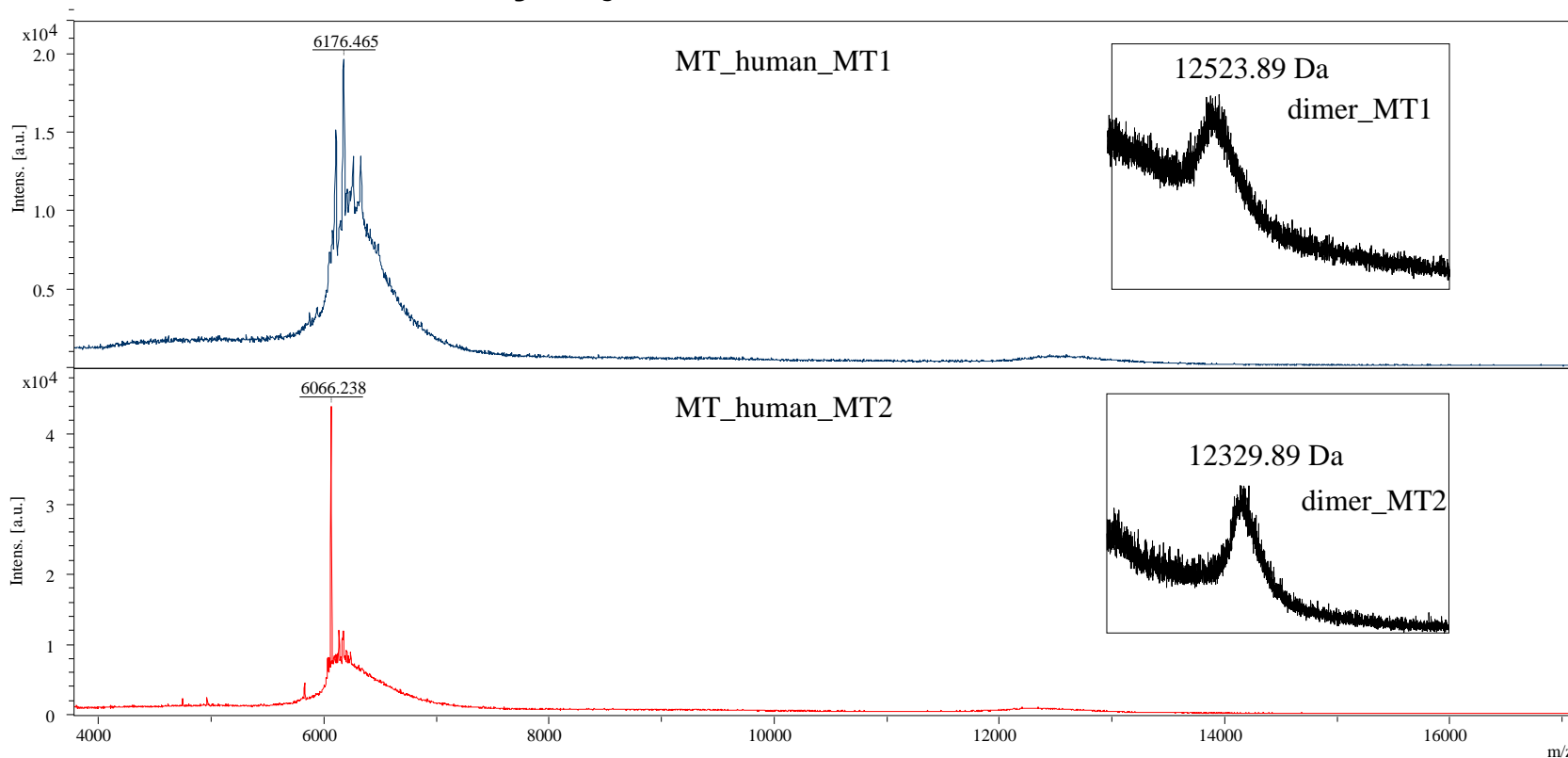
MT z králičích jater



MALDI-TOF MS spektra MT2-B z králičích jater s použitím HCCA matrice (A). Fotka ko-krytalů matrice s metalothioneinem na MALDI destičce s použitím 2,5-DHB (B) a HCCA matrice (C).

Výsledky

Metalothionein z lidských jater



Spektra metalothioneinu z lidských jater. Modrá: spektra MT1
a červená: spektra MT2.

Poland girls et al., 2013





Identifikace a charakterizace metalothioneinu v nádorových buňkách pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

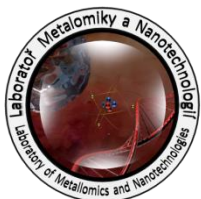


Závěr:

MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometrie se prokázala jako efektivní nástroj nejen pro determinaci metalothioneinů v biologických vzorcích, ale i pro identifikaci jejich isoformů v různých typech vzorků.

Budoucí práce

- Provedení trypsinového štěpení
- Fragmentace metalothioneinů pomocí MALDI-TOF a identifikace pomocí MASCOTu (software).



Poděkování



Laboratoř metalomiky a nanotechnologií



Podpořeno projektem:

NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Děkuji za vaši pozornost