



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00201

(22) Data de depozit: 13.03.2014

(41) Data publicării cererii:
30.09.2015 BOPI nr. 9/2015

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• POPESCU IONELA DANIELA,
STR. SFÂNTUL ELEFTERIE NR. 25,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• ALBULESCU RADU NICOLAE AUREL,
STR. ROȘIA MONTANĂ NR. 6, BL. O7,
SC.C, ET. 2, AP. 125, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TĂNASE CRISTIANA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34,
SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;

• CODRICI ELENA,
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR. 4,
BL. PM 51, SC. 3, ET. 7, AP. 117,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• ALBULESCU LUCIAN,
STR.ROȘIA MONTANĂ NR.6, BL.O 7, SC.C,
ET.2, AP.125, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• MIHAI SIMONA, BD. CAMIL RESSU
NR. 76, BL. S1B-S1C, SC. B, AP. 34,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• ENCIU ANA-MARIA, STR. PLUGARILOR
NR. 1, BL. 94, SC. A, AP. 15, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NEAGU TEODORA MONICA,
STR.ALECU MATEEVICI NR.5, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CONSTANTINESCU ȘTEFAN,
STR. PARIS NR. 7, ET. 1, AP. 2, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROFILUL PROTEOMIC REALIZAT PRIN SPECTROMETRIE
DE MASĂ PENTRU DETECTAREA TUMORILOR
CEREBRALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de analiză pentru identificarea unor biomarkeri prin analiza profilului proteic în probele de ser de la pacienți cu glioblastom. Metoda conform invenției constă în prepararea și achiziția cipurilor, după care se aplică protocolul de măsurare asupra probelor de proteine, și analiza datelor din care este identificat un grup de clustere serice relevante,

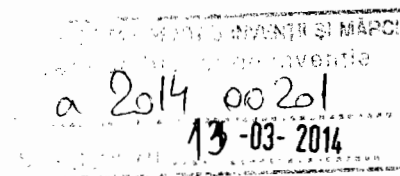
selectându-se un set de 4 biomarkeri S100A8, S100A9, CXCL4, CXCL7 care prezintă diferențe statistice semnificative între pacienții cu tumori cerebrale și subiecții sănătoși.

Revendicări: 3
Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



DESCRIEREA INVENȚIEI



60

Prezenta invenție realizează o analiză complexă, combinând tehnologii moderne de proteomică pentru a descoperi potențiali biomarkeri-candidați utili în diagnosticul tumorilor cerebrale.

Glioblastomul este cea mai frecventă tumoră cerebrală primară asociată cu o supraviețuire relativ scurtă; intervalul mediu de supraviețuire pentru pacienții cu glioblastom multiform este de doar 9-12 luni [1]. Deși metodele de diagnostic imagistic sunt principala metodă de depistare a tumorilor cerebrale asimptomatice, este necesară dezvoltarea unei strategii de diagnostic bazate pe tehnologii proteomice cu sensibilitate crescută și raport cost-eficiență convenabil [2].

Identificarea de biomarkeri în vederea diagnosticării tumorilor, stabilirii recurenței și monitorizării răspunsului terapeutic constituie un deziderat major în oncologie. În prezent eforturi considerabile se concentrează pe metode de diagnostic timpuriu al tumorii, inclusiv cele care implică detecția de proteine specifice sau profiluri proteomice realizate din biopsii cât și din ser/plasmă [3,4].

În acest sens identificarea unor noi biomarkeri proteici sau a unor seturi de proteine reprezintă o provocare la nivel științific național cât și internațional.

Modificările la nivelul expresiei, structurii sau funcției proteinelor pot constitui biomarkeri utili în diagnosticul precoce, precum și în evaluarea prognosticului. În acest context, detectarea unor seturi de biomarkeri cu sensibilitate și specificitate crescute poate avea o rată de succes mai mare în diagnostic, față de identificarea unui biomarker unic [5].

În literatură, există studii ce prezintă identificarea biomarkerilor serici în glioblastom prin metoda SELDI-TOF, demonstrându-se încă o dată că aceasta reprezintă o metodă promițătoare prin capacitatea de a identifica mai mulți markeri serici cu sensibilitate și specificitate mare [6].

Liu J. et al, utilizând tehnologia SELDI-ToF MS au realizat screeningul și evaluarea biomarkerilor pentru detectarea glioblastoamelor față de control și față de pacienții cu alte tumori cerebrale benigne [7]. Prin compararea probelor provenite de la pacienți cu astrocitoame cu un lot martor, din 15 picuri identificate (m/z 8214.77; 8926.76; 4815.11; 8612.23; 2082.19; 4299.87; 2103.55; 7764.82; 2368.19; 3226.97:

2389,55; 2021,78; 4469,09; 6457,054; 8702,416) au fost selectați doar 2 biomarkeri cu raportul m/z 8214,8 și 2368,2 ce pot servi ca biomarkeri finali discriminatori. În acest studiu a fost comparat și lotul pacienților cu astrocitoame maligne cu un lot de pacienți cu tumori cerebrale benigne. Deși inițial au fost identificate 22 de picuri, în final doar 2 picuri (m/z 4155,3 și 14047,8) au fost selectate ca posibili biomarkeri. Concluzia studiului a fost că analiza SELDI-ToF MS combinată cu un algoritm de rețea neuronală artificială (ANN), ar putea facilita descoperirea de noi biomarkeri.

Într-un alt studiu care a inclus 140 de probe de ser ce proveneau de la pacienți cu astrocitoame maligne, seruri de control și seruri de la pacienți cu alte tumori cerebrale, cu ajutorul tehnologiei SELDI-ToF MS, o combinație de șapte biomarkeri serici cu identitate necunoscută a fost sugerată drept un clasificator semnificativ cu sensibilitate 84,6% și specificitate 86,4 %, pentru a diferenția corect cazurile de astrocitom de lotul control. Printre acești biomarkeri, la pacienții cu astrocitom 4 au fost supraexprimați (m/z 2018, 6633, 7567, 15115) și 3 au fost subexprimați (m/z 4286, 8140, 8926). În plus, expresia semnificativ crescută a două dintre aceste proteine (m/z 7567 și 15115) a fost detectată în astrocitomul de grad scăzut comparativ cu astrocitomul de grad înalt [8]. Și în acest studiu concluzia a fost că, tehnologia SELDI-ToF MS ar putea facilita în mare măsură descoperirea biomarkerilor serici în astrocitoame.

Petrik V. et al, au identificat biomarkeri serici care să îmbunătățească predicția de supraviețuire la pacienții cu tumori cerebrale folosind SELDI-ToF MS. Un pic, identificat ca lanțul-B al glicoproteinei alfa 2-Heremans-Schmid (AHSG), a fost mai puțin exprimat în tumori de grad înalt. Mai mult decât atât, s-a realizat și validarea nivelurilor serice de AHSG la setul de pacienți, precum și într-un set independent de probe de ser de la 72 de pacienți cu gliom folosind o metodă turbidimetrică; rezultatele au sugerat AHSG ca un predictor independent de supraviețuire al pacienților cu această patologie. În timp ce nivelurile serice scăzute ale AHSG au fost corelate cu o rată scăzută a timpului de supraviețuire (<3 luni), s-a constatat că valorile normale în ser pot fi asociate cu prelungirea ratei de supraviețuire (> 2 ani) [9].

Gautam P. et al., au analizat nivelurile de proteine prezente în plasma de la pacienții cu GBM folosind o abordare bazată pe LC-MS/MS iTRAQ. S-au identificat 296 de proteine, din care 61 au prezentat o modificare de 1,5 ori în grupul de pacienți. Niveluri modificate a feritinei (FTL), S100A9, și carnozina 1 (CNDP1), au fost verificate

prin ELISA într-un test set de zece probe de plasmă. FTL este un marker de inflamație, de asemenea, implicat în cancer, S100A9 este un membru important al cascadei de semnalizare Ca^{2+} raportat ca fiind modificat în țesutul GBM. CNDP1 a fost raportat pentru rolul său în reglementarea nivelului de carnozina, implicat ca un potențial medicament pentru GBM. Acestea și alte proteine din setul de date pot forma puncte de plecare utile pentru alte investigații clinice pentru dezvoltarea de panouri de biomarkeri din plasma pentru GBM [10].

Literatura de brevete evidențiază utilizarea unor seturi de biomarkeri, de ex. brevetul US 20110027797 [11] definește un set de biomarkeri constând din gene selectate AP2A2, AP0C3, BDNF, CALU, CXCL14, CXCL9, FII, GNRHI, LADI, LAMP2, LII, PSG9, SERPIN1, GPX3, SPAN1CLI pentru screeningul, detectarea, prognosticul terapiei în compararea astrocitomului de grad mic cu astrocitomul de grad înalt. Abordări asemănătoare sunt descrise în brevetele WO 2012170711 [12] și EP2260303 [13].

Toate aceste argumente au constituit motive pentru aprofundarea studiului proteomic prin tehnologii de ultima generație, cu scopul final de identificare a unor biomarkeri care pot fi cuantificați în mod obiectiv și care sunt orientativi pentru un anumit status patologic. Odată cu identificarea caracteristicilor discriminatorii - caracterizate și validate, aceste molecule pot reprezenta biomarkeri, care pot fi folosiți prospectiv, pentru a diferenția între loturile incluse în studiu.

Deoarece există o nevoie tot mai mare de dezvoltare a biomarkerilor de diagnostic, prognostic, sau de predicție, am investigat proteine exprimate în probele de ser de la pacienții cu glioblastom folosind spectrometria de masă de tip SELDI - TOF MS.

Problemele rezolvate de invenție constau în:

- identificarea unui set de biomarkeri, care nu sunt abordați încă în practica medicală curentă, lucru esențial cu atât mai mult cu cât există puține date în literatura de specialitate privind rolul acestora în patologia tumorală în general, cu atât mai mult în patologia gliomelor de grad înalt.

- identificarea unor biomarkeri prin analiza profilului proteic în glioblastoame prin spectrometrie de masă SELDI-ToF MS.

Detalii privind realizarea prezenței invenției sunt prezentate în exemplele următoare.

Descrierea figurilor

Figura 1. Prezintă un exemplu de spectre de masă reprezentative SELDI-TOF obținute pentru cipurile CM10 la pH 4,5 și pH 6,0 (control/glioblastom).

Figura 2. Prezintă spectre cu intensități relative diferite - picurile cu raporturile m/z de 2948,04 și 6440,01 sunt semnificativ scăzute în serul pacienților cu glioblastom în comparație cu lotul control.

Figura 3. Prezintă spectre cu intensități relative diferite - picurile cu raporturile m/z de 9192,84, 10836,09, 13153,66 și 23466,27 sunt semnificativ crescute în serul pacienților cu glioblastom în comparație cu lotul control.

Figura 4. Prezintă valorile concentrațiilor serice ale proteinei S100A9 la pacienții cu glioblastom și control, determinate prin metodele ELISA ($p < 0,001$, ANOVA).

Descrierea tabelor

Tabelul 1. Prezintă cluster de proteine exprimate diferențiat în glioblastom, comparativ cu controlul (m/z: masă/sarcină; ↑: Nivelul expresiei de proteine a fost crescută în glioblastom, comparativ cu controlul; ↓: Nivelul expresiei de proteine a fost scăzută în glioblastom, comparativ cu controlul).

Tabelul 2. Prezintă proteinele identificate în urma procesării datelor utilizând software-ul MASCOT (benzile 1D corespunzătoare greutateilor moleculare ale proteinelor exprimate diferențiat în glioblastom față de controale, stabilite prin analiza SELDI-TOF MS).

Exemplul 1 – Definirea parametrilor optimi de preparare a probelor și selecția condițiilor optime de selectare a clusterelor de biomarkeri candidați în vederea analizei prin metoda SELDI-ToF MS.

Au fost colectate probe de ser de la 35 pacienți cu glioblastom - 21 bărbați și 14 femei cu vârsta medie de 60,25 ani (interval 40-80 ani). Au fost colectate probe pentru lot martor de la 30 de subiecți sănătoși - 9 bărbați și 21 femei cu vârsta medie de 39,3 de ani (interval 24-74 ani).

Probele de ser au fost alicotate și păstrate la -80°C până la determinare.

În vederea analizei SELDI-ToF MS probele au fost pregătite prin denaturare cu tampon conținând 9,5M uree, 2% CHAPS (w/v) 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] - 1-propanesulfonate și 1% (w/v) DTT Ditiotreititol.

În cadrul acestui model experimental s-a realizat optimizarea protocolului de lucru. astfel un eșantion de probe reprezentative a fost diluat în tampon de legare cu pH diferit și s-au aplicat pe chip-uri Q10 (suprafață anionică) și CM10 (suprafață cationică). Pentru CM10 intervalul de pH a fost între 3,5-7,0 (acetat de amoniu 50 mM la pH 3,5-5,5; fosfat de sodiu 50mM la pH 6,0-7,0) iar pentru Q10 a fost între 4,5-8,0 (acetat de amoniu 50 mM pentru pH 5,0-5,5; fosfat de sodiu 50 mM pentru pH 6,0-7,5; tampon Tris HCl 50 mM pentru pH 8,0-8,5). Soluția de matrice ProteinChip SPA (acid sinapinic) conține acetonitril 100% și acid trifluoroacetic 1%.

Protocol de preparare chipuri CM10 si Q10

1. S-au diluat probele denaturate 1/10 în soluție tampon;
2. S-au montat chipurile în bioprosesor;
3. S-au hidratat chipurile cu 200 μ L soluție tampon;
4. S-au incubat chipurile pentru 10 minute, la temperatura camerei, pe shaker (250 rpm). S-a repetat spălarea până la un total de 2 spălări.
5. S-a îndepărtat soluția tampon din godeuri și s-a adăugat 100 μ L probă în fiecare godeu.
6. S-au incubat chipurile pe un shaker pentru 1 oră la temperatura camerei.
7. S-au îndepărtat probele din godeuri și s-a realizat spălarea lor cu 200 μ L soluție tampon pentru 5 minute, cu agitare. S-a repetat acest pas de încă 2 ori până la un total de 3 spălări.
8. S-a îndepărtat soluția tampon din godeuri și s-a realizat spălarea fiecărui godeu cu 200 μ L de apa deionizată, 5 minute, cu agitare.
9. S-au scos chipurile din bioprosesor și s-au uscat la temperatura camerei, 10 minute.
10. S-a aplicat 0,5 μ L soluție SPA/spot de 2 ori.
11. S-au citit chipurilor și s-au analizat spectrele utilizând ProteinChip Reader.

Citirea si analiza chipurilor

Chipurile au fost citite cu sistemul "Protein Chip DATA Manager". Urmatoarele setări au fost folosite pentru platforme SELDI-ToF-MS: Target m/z 5 kDa, atenuarea matricei la 2,5 kDa și domeniul de masă între 0-50...100kDa. Calibrarea externă a fost realizată utilizând standardul de proteine ce cuprinde: recombinant hirudin (6,96 kDa), equine cytochrome c (12,23 kDa), equine myoglobin (16,95 kDa) și carbonic anhidrase

(29,00 kDa). Acuratețea de masă ($m/\Delta m$) a fost calculată la $< 0.02\%$ de-a lungul întregului experiment. Zgomotul a fost ajustat pentru a elimina zgomotul chimic la intervale de masă scăzute. Pentru clusterare au fost considerate doar picurile cu un raport semnal-la-zgomot (S/N) ≥ 5 și cu aria de sub pic ≥ 3 . Au fost folosite pentru a se genera picurile clusterelor doar picurile calificate care au fost prezente în $> 10\%$ din spectre. Masa pentru fiecare cluster a fost setată la $0,3\%$ din masa picului pentru spectrele optimizate la masă scăzută (0- 30 kDa) și la 2% din masa picului pentru spectrele optimizate la masă crescută (30-100 kDa). Au fost autodetectate picuri cu $S/N > 5$ în intervalul m/z 2,5-100 kDa. Clusterarele au fost completate utilizând o a doua selecție a picurilor cu $S/N > 2$ și $0,3\%$ masă, picurile estimate fiind adăugate.

În urma analizei spectrelor s-a decis că cele mai bune rezultate au fost obținute pe chipul CM10 la pH 4.5 (tampon acetat de amoniu) și la pH 6.0 (tampon fosfat de sodiu) (Figura 1).

Exemplul 2 - identificarea clusterelor relevante în vederea confirmării potențialilor biomarkeri

Dupa ce s-au stabilit condițiile optime de preparare și achiziție a chipurilor s-a continuat experimentul, utilizând exemplul 1 pentru toate probele luate în studiu.

Prin aplicarea protocolului de măsurare asupra probelor de proteine și analiza datelor, pe chipuri CM 10 la pH 4,5, s-a identificat un grup total de 73 de clusterare (proteine) serice identificabile în probele provenite de la pacienți cu Glioame/Control. pe intervalul de greutate moleculară 2000-55.000 Da. Analiza avansată a distribuției și modificărilor de expresie ale celor 73 de clusterare a condus la selecția unui grup de 6 clusterare (**8143,147; 2948,037; 23466,27; 6440,011; 3094,012; 9192,839**) ce prezintă cea mai bună putere de clasificare între cele două grupuri. Condiția de selecție a clusterelor relevante a fost ca $p < 0.05$, prezența picului în cât mai multe probe.

Prin aplicarea protocolului de măsurare asupra probelor de proteine și analiza datelor, pe chipuri CM10 la pH 6,0, s-a identificat un grup total de 79 de clusterare (proteine) serice identificabile în probele provenite de la pacienți cu glioame/controale. pe intervalul de greutate moleculară 2000-55.000 Da.

Analiza avansată a distribuției și modificărilor de expresie ale celor 79 de clusterare a condus la selecția unui grup de 5 clusterare (**3892,553; 10836,09; 13153,61; 15868,12;**

28114,621) ce prezintă cea mai bună putere de clasificare între cele două grupuri ($p < 0.05$, picul selectat să fie prezent în cât mai multe probe).

Clusterelor de proteine relevante sunt prezentate în tabelul 1.

Exemplul 3 – Fraționarea probelor și alegerea fracțiilor relevante

În urma citirii și analizei datelor s-a decis fracționarea probelor de ser ce conțin clusterelor relevante alese în exemplul 2, în vederea confirmării potențialilor biomarkeri în fracțiile corespunzătoare.

Kitul de fracționare a serului este conceput pentru a facilita analiza probelor de ser prin fracționarea proteinelor. Fraționarea se bazează pe proprietățile lor biofizice. Setul permite fracționarea *high-throughput* prin utilizarea schimbătorului anionic într-o placă cu 96 godeuri. Pentru realizarea schimbului anionic este necesară rehidratarea plăcii înainte de utilizare. Probele sunt adăugate în placă și apoi eluate treptat, prin modificarea pH-ului cu tamponul de spălare până când sunt colectate șase fracțiuni. Fracțiunile pot fi apoi analizate utilizând ProteinChip folosind protocolul corespunzător.

Au fost analizate serurile provenite de la pacienții cu glioblastoame.

Tampon ProteinChip U9 (9 M uree, 2% CHAPS, 50 mM Tris-HCl, pH 9)

Tampon de rehidratare (50 mM Tris-HCl, pH 9)

Tampon de spalare 1 (50 mM Tris-HCl, pH 9)

Tampon de spalare 2 (50 mM Hepes, pH 7)

Tampon de spalare 3 (100 mM acetat de Na, pH 5)

Tampon de spalare 4 (100 mM acetat de Na, pH 4)

Tampon de spalare 5 (50 mM citrat de Na, pH 3)

Tampon de spalare 6 (33.3% izopropanol, 16,7% acetonitril, Acid 0,1% trifluoroacetic)

După preluarea fracțiilor s-a decis analiza următoarelor fracții 1, 3, 4, 5+6 pe chipuri CM10, la pH 4,5 (tampon acetat) și 6,0 (tampon fosfat) folosindu-se protocoalele de preparare și citire descrise în **exemplul 1**.

În urma analizei spectrelor pe fiecare fracție s-a evidențiat existența clusterelor luate în analiză. În urma analizei statistice a fracțiilor pentru fiecare cluster în parte (p, ROC, etc), s-a decis analiza anumitor fracții pentru anumite cluster.

În figurile 2 și 3 sunt redate spectre reprezentând cluster pentru seturile de probe normale și patologice din cadrul studiului.

Exemplul 4 - identificarea biomarkerilor

Electroforeza 1D

Probele fracționate au fost concentrate cu filtre Amicon® Ultra 0.5mL Filters (3kDa), folosind tamponul 50mM Tris pH 8,0, până la un volum final de 50μL. Probele au fost mai departe concentrate prin reducerea volumului la ~20μL într-un sistem vacuum; 10μL din probă a fost diluată până la 20μL cu 8μL de tampon concentrat 4x (Invitrogen) și 2μL DTT (Ditiotreitol) 500mM.

Probele au fost fierte 10 minute. Probele au fost rulate cu sistemul Novex gel electrophoresis (Invitrogen), gelurile folosite au fost pre-cast 12% BisTris. Standardul de greutate moleculară folosit -- See Blue plus2 pre-stained (Invitrogen) a fost rulat pentru fiecare gel.

Gelurile au fost fixate și colorate cu Coomassie blue coloidal. Probele concentrate au fost încărcate în gel fără echilibrarea proteinelor totale între fracții. Acest lucru s-a datorat faptului că fiecare fracție conține o cantitate diferită de proteine totale. În unele cazuri cantitatea de proteine totale a fost insuficientă și nu au fost vizibile benzi la colorarea cu Coomassie blue.

În urma analizei cu softul Quantity One, versiunea **versiunea 4.6.1**, (BioRad) a gelurilor s-a decis alegerea anumitor benzi corespunzătoare clusterelor identificate prin SELDI-TOF MS. Ulterior s-a realizat decuparea benzilor relevante, continuând cu digestia cu tripsină a acestora, în vederea analizei ulterioare LC/MS/MS.

LC/MS/MS

Digestia proteinelor

Benzile de proteine au fost digerate cu tripsina. Benzile specifice din gel au fost spălate cu 50.....100 mM bicarbonat de amoniu, urmat de acetonitril (ACN).

Benzile proteice au fost ulterior reduse și alchilate cu 10 mM DTT, respectiv 55 mM iodoacetamida (IAA), ambele dizolvate în 100 mM bicarbonat de amoniu. Benzile au fost decolorate cu 50% 100 mM bicarbonat de amoniu/50% ACN înainte de ciclul de spălarea finală cu 50 ... 100mM bicarbonat de amoniu și ACN.

Probele au fost liofilizate și rehidratate în soluție de tripsină (Promega sequencing grade: 20μg a fost resuspendată în 100ng/μl cu 0,1% TFA, imediat înainte de folosire a fost diluat la 13ng/μl cu 50mM bicarbonat de amoniu). Probele au fost incubate la 4°C pentru

20 minute, soluția de tripsină neabsorbită a fost îndepărtată și bucățile de gel au fost imersate în 50mM bicarbonat de amoniu.

Probele au fost lăsate la digerat la 37°C pentru 2 ore, apoi probele au fost păstrate la temperatura camerei peste noapte. Supernatantul ce conține peptide a fost decantat într-un tub nou și bucățile de gel spălate de 2 ori cu 50...100mM bicarbonat de amoniu și ACN, de fiecare dată adunând soluția de extracție cu supernatantul inițial. Amestecul de supernatant a fost liofilizat și resuspendat în 25μl de 5% ACN/0,1% acid formic pentru analiza MS.

Analiza LC/MS/MS

Biomarkerii identificați prin tehnologia **SELDI-ToF-MS** au fost analizați ulterior prin **LC-MS/MS** utilizând sistemul Surveyor LC și LCQ Deca XP Plus (ThermoScientific).

Peptidele au fost analizate cu LC/MS/MS utilizând sistemul Surveyor LC și LCQ Deca XP Plus (ThermoScientific) și prin cromatografia de fază inversă (Biobasic column, ThermoScientific: 180μM x 15mm) mai mult de 30 minute în gradient ACN la o rată de curgere de 3 μl/minut.

Peptidele au fost ionizate cu Electrospray Ionisation și MS/MS au fost achiziționate cu ioni dependenți de statusul lor de încărcare și de intensitate. Verificările de control al calității pentru funcționarea optimă a instrumentelor erau în vigoare. Acuratețea masei și sensibilitatea pentru MS a fost confirmată cu infuzie directă de glufibrioptide (2,5 pmoli/μl) și performanța LC/MS/MS a fost evaluată cu BSA digerat. Sensibilitatea, timpul de retenție, peptidele identificate și secvența de proteine acoperită au fost toate în intervalele specificate. Controlul de calitate cu BSA a fost efectuat înainte și după analiza probei.

Procesarea datelor în urma analizei LC/MS/MS

Fișierele de date (.raw) au fost convertite în fișiere generice Mascot folosind MassMatrix File Conversion Tool (Version 2.0; <http://www.massmatrix.net>) pentru input-ul în Mascot searching algorithm (Matrix Science). Fișierele de date au fost comparate cu SwissProt v. (2010_06) cu taxonomie umană folosind următoarele criterii de căutare: peptide triptice cu cel mult un situs de clivaj tripsinic, metilarea carbamid cisteinei și oxidarea metioninelor, care au fost setate ca modificări variabile.

Rezultatele căutării în baza de date utilizând software-ul MASCOT au generat un număr de 63 de peptide, dintre care s-au selectat 4 peptide triptice obținute în funcție de condițiile stabilite - S100A8, S100A9, CXCL4 (PF4) și CXCL7 - Tabel 2.

Exemplul 5 - validarea proteinelor identificate prin LC/MS/MS utilizând tehnica ELISA.

Determinarea *in vitro* cantitativă a proteinei umane S100A9/**calgranulin B** în serul pacienților cu glioblastoam, folosește metoda enzimatică *sandwich* ELISA (kit Eiaab, Wuhan Eiaab Science, China).

Principiul metodei

Plăcile prevăzute în acest kit au fost pre-acoperite cu un anticorp specific față de proteina S100A9. Standardele sau probele s-au adăugat în godeurile corespunzătoare plăcii de microtitrare împreună cu un anticorp policlonal conjugat cu biotină. S-a adăugat streptavidină conjugată cu peroxidază HRP în fiecare godeu al microplăcii și a urmat incubarea o perioadă de timp. Apoi s-a adăugat o soluție de substrat TMB (soluție de amplificare a culorii) în fiecare godeu și culoarea dezvoltată este proporțională cu cantitatea de S100A9.

Reacția enzimă-substrat este terminată prin adăugarea de soluție de acid sulfuric și schimbarea culorii este măsurată spectrofotometric la o lungime de undă de 450 nm ± 2 nm. Concentrația de S100A9 în probe este apoi determinată cu ajutorul unei curbe standard în domeniul de concentrație 0-5000 pg/mL.

Preparare reactivi

Tampon de spălare - Dacă s-au format cristale în concentrat, se lasă la temperatura camerei și se amestecă ușor până când cristalele s-au dizolvat complet. Se diluează 30 mL de tampon de spălare concentrat în apa deionizată sau distilată pentru a pregăti 750 mL de tampon de spălare.

Standard - se reconstituie standardul cu 1,0 mL diluent rezultând soluția stoc de 5000 pg/mL. Această operațiune se face cu minim 15 minute înainte de prepararea diluțiilor seriale. Standardul nediluat servește ca standard ridicat (5000 pg/mL). Diluantul servește ca standard de la zero (0 ng/mL).

Mod de lucru

S-au pregătit toți reactivii, standardele de lucru și probele indicate în secțiunile anterioare.

1. S-au adăugat 100 microlitri de standard, blanc sau probă. S-a incubat timp de 2 ore la 37°C.
2. S-a îndepărtat lichidul din fiecare godeu și s-au adăugat 100 microlitri de reactiv de detecție A în fiecare godeu. S-a acoperit placa cu o folie și s-a incubat timp de 1 oră la 37°C.
3. Cu 5 minute înainte de terminarea incubării s-a preparat tamponul de spălare. S-a îndepărtat energic lichidul din godeuri și s-a spălat fiecare godeu cu câte 400 microlitri de tampon de spălare preparat anterior. S-a repetat spălarea de trei ori. La ultima spălare s-a scurs bine placa pe o hârtie de filtru.
4. S-au adăugat 100 microlitri de soluție de detecție B a reactivului de lucru în fiecare godeu. Plăcuța s-a acoperit cu o folie nouă și s-a incubat timp de 1 oră la 37°C.
5. S-au repetat operațiunile de spălare de 5 ori.
6. S-au adăugat 90 microlitri de soluție de substrat în fiecare godeu. Plăcuța s-a acoperit cu o folie nouă și s-a incubat timp de 15-30 de minute la 37°C. la întuneric.
7. S-au adăugat 50 microlitri de reactiv de stopare/godeu.

În cazul în care culoare nu este uniformă, se face omogenizare pentru a asigura reacția completă.

8. S-a determinat densitatea optică, folosind un cititor de microplăci setat la 450 nm.

Analiza prin ELISA a proteinei S100A9 a serului provenit de la pacienții cu glioblastoame a relevat diferențe semnificative între lotul martor și cel al pacienților, astfel: nivelul seric de la pacienții cu **glioblastom** a variat între 190.72 pg/mL și 459.68 pg/mL, cu o medie de **277,72 pg/mL** în comparație cu nivelul seric de la lotul **control** care a variat între 96,413 pg/mL și 158,67 pg/mL, cu o medie de **124,25 pg/mL**.

Aplicarea testului One-Way Anova a arătat diferențe semnificative statistice ($p < 0,01$).

REVENDICARI

Revendicare 1:

Un set de biomarkeri proteici - **S100A8, S100A9, CXCL4 și CXCL7** - ce constituie un instrument de diagnostic pentru pacienții cu tumori cerebrale **caracterizat prin aceea că** cei 4 biomarkeri prezintă diferențe statistice semnificative între pacienții cu tumori cerebrale și subiecții sănătoși.

Revendicare 2:

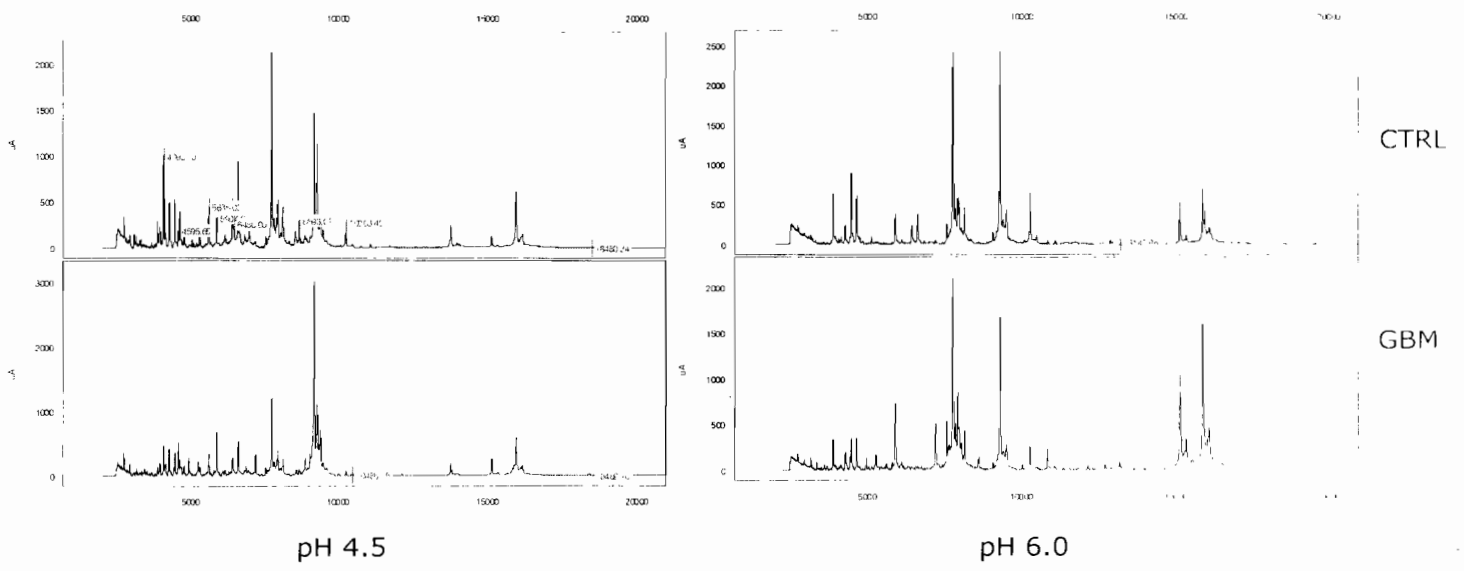
Utilizarea setului de biomarkeri de la revendicarea 1. pentru diagnosticul tumorilor cerebrale, unde numiții biomarkeri au valori serice crescute simultan la pacienții cu tumori cerebrale în raport cu media valorilor serice a lotului control de subiecți sănătoși.

Revendicare 3:

O semnătură proteică determinată prin SELDI-ToF ($m/z = 10836,09, 13153,66$), corespunzând proteinelor S100A8, CXCL4, S100A9 și CXCL7, aplicată ca metodă de diagnostic al glioblastomului, diagnosticul de glioblastom stabilindu-se în cazul în care cei 4 biomarkeri sunt supraexpresiți în serul pacienților de 1.4-2.5 ori.

FIGURI

Figura 1



07

Figura 2.

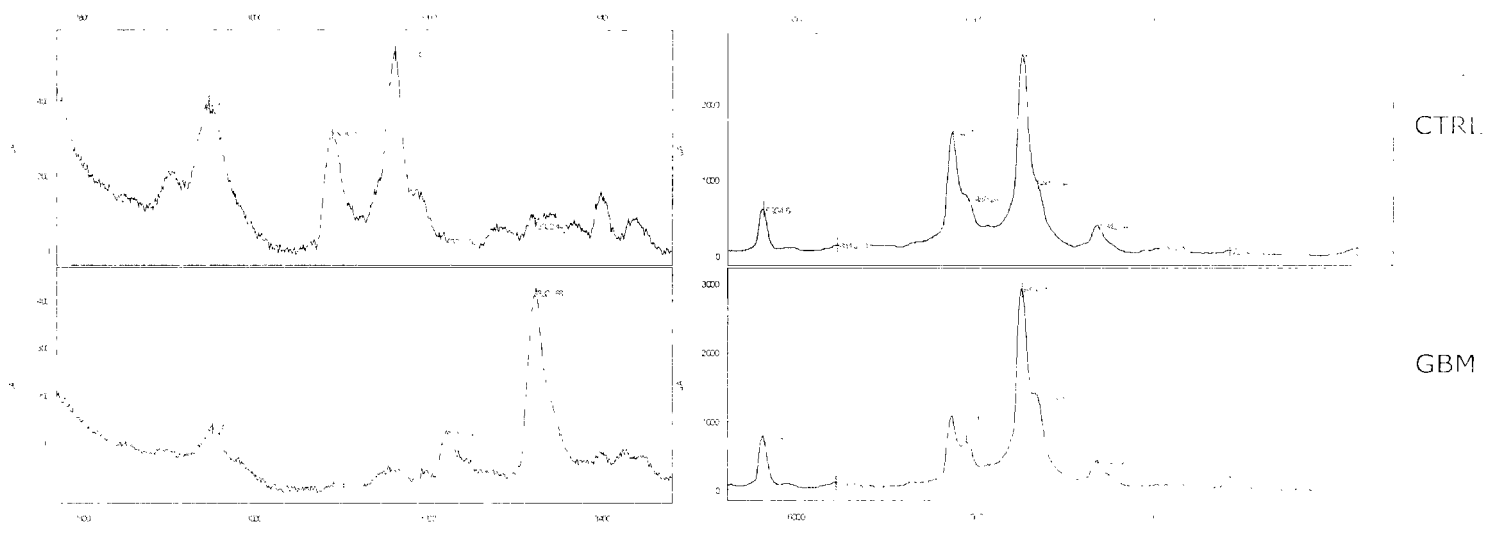


Figura 3.

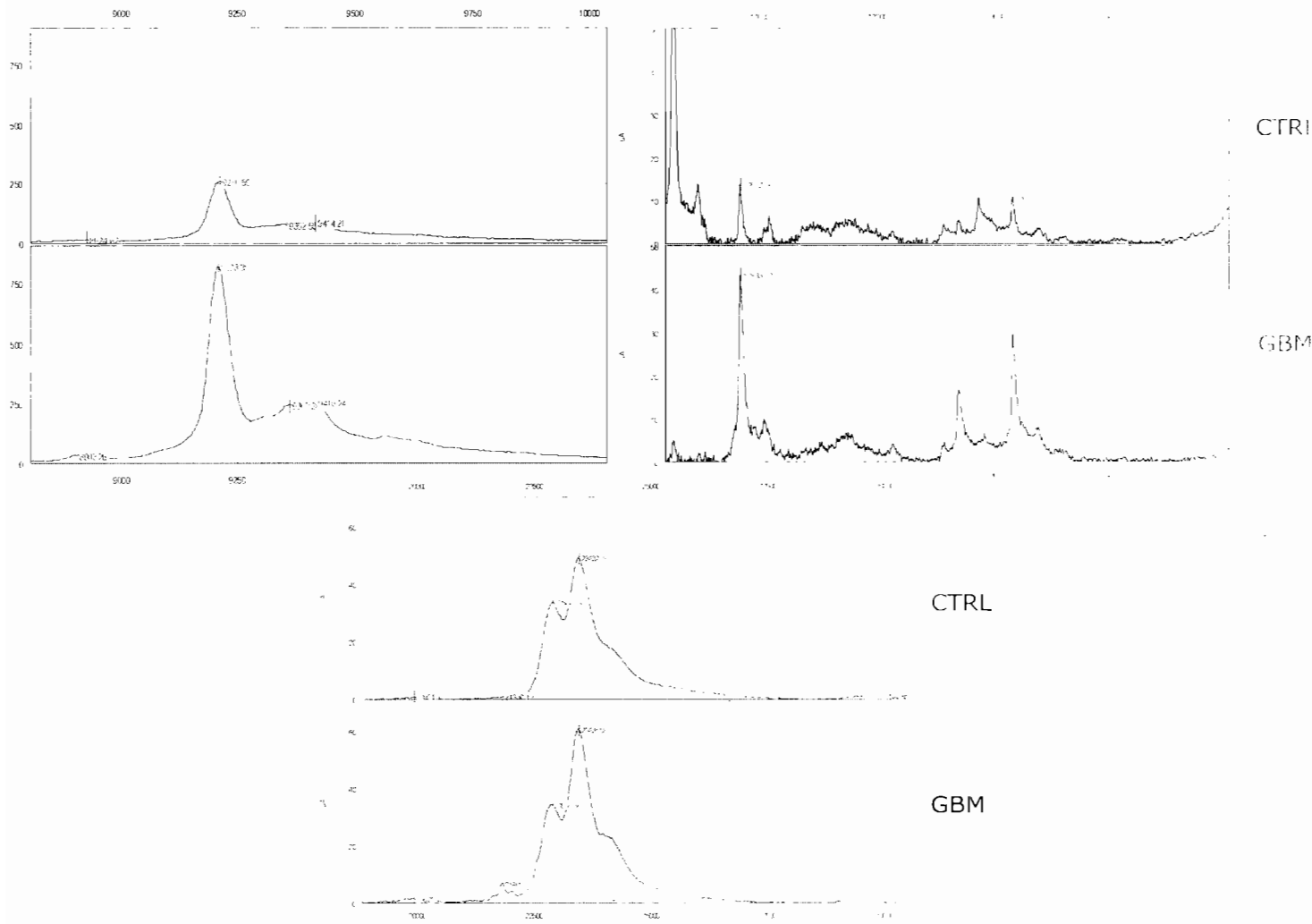
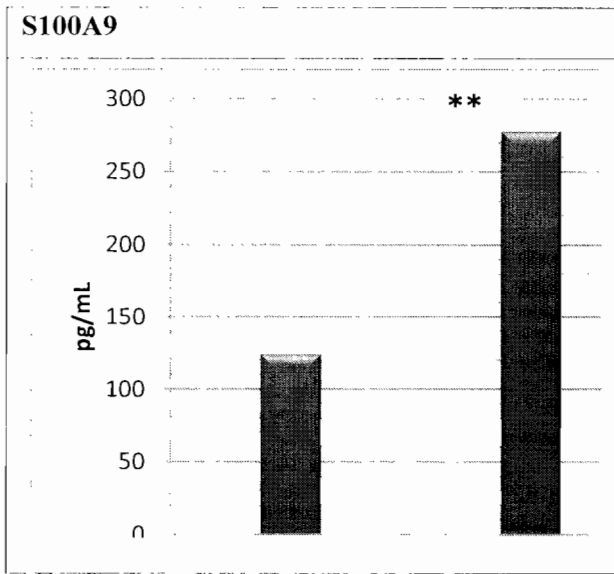


Figura 4.



Tabel 1.

Nr.	Masa (m/z)	Valoare p	ROC	Expresia diferențiată în glioblastom
1	8143,15	<0,001	0,747619	↓
2	2948,04	<0,005	0,673333	↓
3	23466,27	<0,05	0,648571	↑
4	6440,01	<0,05	0,648571	↓
5	9192,84	<0,001	0,859048	↑
6	3092,01	<0,001	0,859048	↓
7	3892,55	<0,001	0,908571	↓
8	10836,09	<0,001	0,811619	↑
9	13153,66	<0,001	0,911429	↑
10	15868,12	0,001	0,829524	↑
11	28114,62	<0,001	0,809524	↑

Tabel 2.

Proteină (Acronim)	Proteine - Descriere	Scor	Masă Proteină	m/z peptidă exprimată	Secvență peptide
S100A8_HUMAN	Protein S100-A8	164	10828	637.6	ALNSIIDVYHK
	OS=Homo	164	10828	711.64	LLETTECPQYIR
	sapiens	164	10828	1196.38	ELDINTDGAVNFQEF
	GN=S100A8 PE=1 SV=1				LILVIK
S100A9_HUMAN	Protein S100-A9	287	13234	486.45	LTWASIIHK
	OS=Homo	287	13234	728.82	LGHPDTLNQGFEK
	sapiens	287	13234	808.63	QLSFEEFIMLMAR
	GN=S100A9	287	13234	872.03	VIEIIMEDLDTNADK
	PE=1 SV=1	287	13234	904.41	NIEIINTFIHQYSVK
PLF4_HUMAN	Platelet factor 4	170	10838	667.44	ICLDLQAPLYK
	OS=Homo	170	10838	731.77	KICLDLQAPLYK
	sapiens GN=PF4 PE=1 SV=2	170	10838	789.7	AGPHICPTAQLIATLK
CXCL7_HUMAN	Platelet basic	105	13885	863.03	GKEESLDSDIYAEIR
	protein	254	13885	529.22	ICLDPDAPR
	OS=Homo	254	13885	551.13	NIQSLVIGK
	sapiens	254	13885	592.95	KICLDPDAPR
	GN=PPBP PE=1	254	13885	785.48	GTICNQVEVIATLK
	SV=3	254	13885	863.27	GKEESLDSDIYAEIR