

Proteomics in de Oncologie

De potentiële waarde van massa spectrometrie voor kankerdiagnose en het ontdekken van nieuwe biomarkers

*Connie R. Jimenez, coordinator biomedical & clinical proteomics
Center for Medical Systems Biology, Proteomics Center VU(mc), Vrije Universiteit Amsterdam*

Inleiding

Ondanks de vooruitgang in de kennis van de genetische componenten verantwoordelijk voor het ontstaan en in standhouden van kanker, zijn er nog grote hiaten in ons begrip van de pathogenese en zijn er nog steeds geen effectieve strategieën beschikbaar voor vroege detectie en behandeling. In de afgelopen paar jaar is de hoop gevestigd op het in kaart brengen van eiwitexpressie profielen (proteomics) om een beter begrip te krijgen van kanker, om nieuwe biomarkers te ontdekken voor diagnose en vroege detectie van de ziekte, en om nieuwe aangrijpingspunten voor medische therapieën te ontwikkelen. Zowel de medische kansen als de technische uitdagingen zijn groot. Het proteoom, het eiwitcomplement van het genoom, is namelijk vele malen complexer dan het genoom en bovendien verandert het tijdens verschillende momenten van de ziekte voortdurend. Voor de analyse van het dynamische en chemisch diverse proteoom is recentelijk een diversiteit aan scheidingstechnieken voorhanden gekomen. Voor de globale detectie en identificatie van de eiwitten spelen massa spectrometrische technieken een cruciale rol. Dit artikel bespreekt het snel ontwikkelende onderzoeksterrein van proteomics aan de hand van voorbeelden uit oncologisch onderzoek, en bespreekt de mogelijkheden, huidige beperkingen en de te verwachten trends.

Waarom proteomics?

De ontrafeling van het menselijk genoom, ofwel het in kaart brengen van alle ca. 24.000 menselijke genen, heeft een enorme hoeveelheid informatie beschikbaar gemaakt over ons erfelijk materiaal - het DNA en het ervan afgeschreven RNA. Genoom-breed screenen van cellulaire genexpressieprofielen middels 'DNA-microarrays' (zgn. transcriptomics) is recentelijk nuttig gebleken voor het karakteriseren van kanker. Met deze arrays kunnen transcripten van alle verschillende genen tegelijk gekwantificeerd worden. Het idee achter deze benadering is dat transcript expressiepatronen, wanneer in voldoende aantallen vergeleken, klinisch voorspellende waarde hebben. Deze hypothese is nu in een aantal kankersoorten bevestigd.

Ondanks de vooruitgang die de genoom data en transcriptomics gebracht hebben in ons begrip van de moleculaire veranderingen ten grondslag aan kanker, zijn er belangrijke beperkingen: het verband tussen een bepaalde hoeveelheid boodschapper RNA molekulen en de hoeveelheid van het overeenkomstige eiwit kan niet voorspeld worden, noch kan de uiteindelijke vorm van het eiwit inclusief modificaties worden afgeleid van de primaire sequentie en evenmin kunnen de interacties die het eiwit aangaat worden voorspeld. Door te kijken naar eiwitten, de belangrijkste functionele bouwstenen van cellen, kunnen we veranderingen in de cel beter begrijpen. Daarom is het belangrijk om een globaal kwantitatief inzicht te verkrijgen in de structuur en functie van de verschillende betrokken eiwitten onder verschillende omstandigheden (proteomics).

Veelbelovende terreinen van proteomics onderzoek zijn: het in kaart brengen van (veranderde) eiwitexpressie profielen, niet alleen op het nivo van cellen en weefsels, maar ook in subcellulaire structuren, en in lichaamsvloeistoffen; de ontwikkeling van nieuwe biomarkers voor diagnose en de vroege detectie van kanker; de identificatie van nieuwe aangrijpingspunten ('targets') voor behandeling en het potentieel om therapieontwikkeling te versnellen via snelle evaluatie van het therapeutisch effect en toxiciteit.

Wat is nieuw?

Eiwitten worden al sinds jaar en dag bestudeerd. Maar het bijzondere van proteomics is dat het veel eiwitten tegelijk in kaart kan brengen. Dat maakt proteomics tot een 'holistische' technologie waarmee nieuwe verbanden tussen eiwitten en de ziekte ontdekt kunnen worden. In de afgelopen jaren zijn een breed scala aan geavanceerde technieken ontwikkeld om grote aantallen eiwitten tegelijk efficiënt te kunnen scheiden, analyseren en identificeren met hoge

gevoeligheid. Hierin speelt de snelle ontwikkeling van massa spectrometrie, samen met het beschikbaar komen van de sequentie van het menselijk genoom en ontwikkelingen in de bioinformatica, een centrale rol.

Proteomics strategieën voor het onderzoek van biomarkers

Kankercellen scheiden andere eiwitten uit dan gewone cellen hetgeen leidt tot cascades van interacties die uiteindelijk resulteren in een veranderde bloedsamenstelling. Vanwege de complexiteit van de interacties wordt het steeds duidelijker dat het meten van een enkele parameter niet voldoende informatie kan geven. Binnen de kankerdiagnostiek vindt derhalve momenteel een verschuiving plaats naar het gebruik van panels van markers, een heeft het concept van de 'moleculaire streepjes-code' zijn intrede gedaan. Massa spectrometrische metingen, die simultaan honderden bloedeiwitten of fragmenten kunnen visualiseren (in de vorm van een massa spectrum), geven een nauwkeuriger afspiegeling van de biologische (en pathologische) processen in het hele organisme dan technieken die focussen op een enkele component. Bovendien heeft proteomics, vanwege het open-screenings karakter, groot potentieel voor het vinden van nieuwe biomarkers.

Echter, zelfs met de meest recent ontwikkelde analytische technieken is het ontdekken van biomarkers in biologische monsters nog steeds een enorme uitdaging. In een cel komen meer dan honderd duizend verschillende, chemisch diverse eiwitten voor, waarvan vele in zeer lage concentraties. Daarom is de globale analyse van eiwitten gecompliceerd en zijn er meerdere strategieën nodig, geoptimaliseerd voor de categorie van eiwitten die mogelijk als biomarker gebruikt kunnen worden. Verder is de keuze van het 'start-materiaal' voor biomarkeronderzoek belangrijk: bloed is makkelijk verkrijgbaar, maar de biomarker concentraties zijn hierin het laagst; het gebruik van proximale vloeistoffen zoals cerebrospinale vloeistof voor hersentumoren, heeft de voorkeur omdat daarin hogere marker concentraties te vinden zullen zijn; het gebruik van tumorweefsel is misschien de meest directe manier, maar klinisch gezien minder nuttig. Hieronder volgt een overzicht van de meest gebruikte strategieën en hun toepassingen in oncologisch/medisch onderzoek samen met een bespreking van de huidige 'bottle-necks'.

Eiwitexpressie profielen in kaart brengen middels 2D gel electrophorese

Een methode voor eiwitscheiding die al decennia bestaat, en in proteomics experimenten veel wordt gebruikt, is twee-dimensionele gelelectrophorese (2DGE). In een buisvormige gel of gel strip (de eerste dimensie) wordt een eiwitmonster gescheiden op lading. Vervolgens wordt de gel strip op een vierkante gel gelegd die de eiwitten scheidt op grootte (de tweede dimensie). Na specifieke kleuring is een constellatie van eiwit spots zichtbaar in de vorm van een vlekkenpatroon van 1000-2000 verschillende eiwitten (Fig. 1A). Deze techniek is ook zeer geschikt voor het scheiden van verschillende isovormen van een eiwit. Verschillende soorten biologische monsters (bv. plasma, hersen- en tumorweefsel) vertonen specifieke eiwitexpressie profielen (Fig. 1A). In een experiment waarbij verschillende groepen monsters vergeleken worden (bv normaal en ziek) is speciale beeldanalyse software nodig om de eiwitten te detecteren, de profielen te vergelijken ('matchen') en om uiteindelijk de kwantitatieve verschillen op te sporen. Een voorbeeld van een gereguleerde eiwitspot na bestraling van tumorweefsel *in vitro* is getoond in figuur 1B. Differentiele eiwitspots kunnen vervolgens worden uitgesneden en de eiwitten geïdentificeerd middels massa spectrometrie (zie onder). Via deze strategie hebben veel studies op- en neer- gereguleerde eiwitten geïdentificeerd in kankercellen^{1,2} waarvan een aantal kandidaat biomarkers.

Eiwitidentificatie middels massa spectrometrie

Voor de identificatie van de eiwitten – na hydrolyse tot peptiden - spelen massaspectrometrische technieken in combinatie met bioinformatica algoritmes een cruciale rol^{3,4} (Fig. 2). Hiertoe worden de eiwitten in stukjes, genaamd peptiden, geknipt met een enzym (in-gel of in oplossing). Het voordeel van digestie is dat peptiden in de massaspectrometer efficiënt kunnen worden gedetecteerd en hun molekulgewicht (massa) met een hoge nauwkeurigheid bepaald. Dankzij de genetische informatie kunnen we nu snel de eiwitten identificeren doordat de gemeten peptiden, en fragmenten daarvan gegenereerd in botsingskamers, via geavanceerde software

gematched kunnen worden aan het genoom. Het werkt als een vingerafdruk aan de hand waarvan de eiwitten geïdentificeerd worden.

Eiwit-profilering middels gel-vrije massa spectrometrie strategieën

Inmiddels is duidelijk geworden dat bepaalde klassen eiwitten (met name grote en hydrofobe eiwitten maar ook hele basische of zure eiwitten) slecht gevisualiseerd kunnen worden middels 2D gelen. Verder is de hoeveelheid benodigde eiwit vrij hoog (~ 200- 800 µg). Deze hoeveelheid is in geval van klinische monsters niet altijd beschikbaar, met name wanneer het om kankercellen gaat die zijn geïsoleerd uit tumorweefsel mbv laser-capture microdissectie. Daarom zijn er alternatieve proteomics strategieën ontwikkeld die grofweg in 2 categorieën vallen: 1. directe massa spectrometrie na geen/minimale fractionatie van bloed eiwitten met als doel diagnostiek en 2. massa spectrometrie van peptiden na een 1 of multi-dimensionele chromatografische scheiding met als doel het ontdekken en identificeren van biomarkers. Een bijkomend voordeel van beide benaderingen is dat ze geautomatiseerd kunnen worden, hetgeen belangrijk is voor de benodigde doorvoersnelheid ofwel 'through-put' voor klinische proteomics studies.

Directe profilering van lichaamsvloeistoffen middels massa spectrometrie voor diagnostiek

De techniek die 3 jaar geleden bekendheid kreeg vanwege de veelbelovende mogelijke diagnostische toepassing in de context van het eierstok carcinoom^{5,6}, heet SELDI-TOF-MS, oftewel Surface-Enhanced Laser Desorption Ionisation - Time of Flight - Mass Spectrometry (Fig. 3A). Het principe is als volgt: peptiden en eiwitten uit een druppel bloed worden gebonden op een plaatje, een proteïnechip. Na een wasstap blijft een aantal eiwitten selectief aan de chip vastzitten. Die worden in de massa spectrometer gebracht en beschoten met een laser. De eiwitten raken "geïoniseerd" en worden versneld richting "detector". De Time of Flight is proportioneel aan de massa. De meting resulteert in een laag-resolutie piekenprofiel van peptiden en kleine eiwitten, ~50-100 per spectrum. Geavanceerde bioinformatica algoritmes zijn nodig om patronen te vinden die uniek zijn voor het ziektebeeld en vervolgens gebruikt kunnen worden om nieuwe monsters te classificeren. Een aantal studies hebben sensationele data laten zien met betrekking tot de gevoeligheid van de techniek en de waarde voor de (vroeg) detectie kanker en classificatie van kanker subtypen.

Echter, na de initiële veelbelovende resultaten is het enthousiasme de afgelopen 3 jaar enigszins getemperd vanwege het ontbreken aan reproduceerbaarheid van de resultaten en ontbreken van geïdentificeerde biomarkers⁷. Bovendien bleken de differentiele peptiden in 'disease-signatures', die inmiddels geïdentificeerd zijn, fragmenten van veel voorkomende bloed- en ontstekings-eiwitten te zijn. Het is momenteel nog de vraag of in de toekomst op deze manier diagnostiek bedreven kan worden en of relevante biomarkers gevonden gaan worden.

Inmiddels zijn er verbeterde varianten op de SELDI strategie ontwikkeld die peptiden uit bloed invangen via magnetische bollen⁸ of kolommetjes in een 96-wells plaat (Jimenez, ongepubliceerde data). Voor de uitlezing van het eiwitprofiel wordt gebruik gemaakt van geavanceerde massa spectrometrie, namelijk Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight massa spectrometrie oftewel MALDI-TOF-MS (Fig. 3A). In deze MALDI-profielen kunnen 300-400 peptiden met hoge nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid worden gemeten (Fig. 3B) en indien gewenst ook geïdentificeerd (middels fragmentatie in de botsingskamer). Echter ook hier is de gevoeligheid van de methode beperkt. Toch is de MALDI-massa spectrometrische profilering van peptiden in bloed (dat via gestandaardiseerde protocollen is afgenomen!) de moeite van het onderzoeken waard vanwege de eenvoud van de strategie (dus goedkoop) en de hoge-doorvoer mogelijkheid. Deze laatste aspecten zijn cruciaal voor het potentiële gebruik als diagnostische proteomics test.

Eiwit-profilering na chromatografische scheiding en massa spectrometrie voor ontdekken van nieuwe biomarkers

Biologische monsters, en bloedserum in het bijzonder, hebben een zeer complexe samenstelling met een groot verschil in expressie nivo's van de aanwezige eiwitten (10^9 in weefsels en 10^{12} in bloed). Zo maakt het eiwit albumine (35-55 mg/ ml) 60%-80% van de totale hoeveelheid eiwit in bloed uit terwijl bv. cytokines voorkomen op het nivo van pg/ml. Geen enkele massa spectrometer heeft een zo groot dynamisch meetbereik. Eiwitprofileringstrategieën die

eiwitscheiding bewerkstelligen hebben meer potentieel voor het ontdekken van relevante biomarkers omdat het dynamisch bereik groter wordt en daarmee de methode gevoeliger. Deze gevoeligheid gaat echter wel ten koste van de 'through-put'.

Een scheidingsmethode die in de afgelopen jaren populair is geworden omdat die direct gekoppeld kan worden aan de massa spectrometer is de nano-vloeistof-chromatografie (nanoLC) (Fig. 4). Na digestie van alle eiwitten of na selectieve isolatie van native peptiden en kleine eiwitten uit bloed, kunnen deze worden gescheiden op hydrofobiciteit gevolgd door detectie in de massa spectrometer. Om de methode kwantitatief te maken wordt meestal een label (vaak een stabiele isotoop) geïncorporeerd in de peptiden, maar recentelijk zijn ook label-vrije methoden beschreven die praktischer zijn voor klinische studies met grote monster-aantallen. Een samenvatting van de label-vrije strategie is beschreven door Shrader en Schulz-Knappe¹¹. De toegevoegde dimensie van scheiding zorgt ervoor dat enkele duizenden peptiden gemeten kunnen worden (Fig. 4), in tegenstelling tot de ~100-400 peptiden die zichtbaar zijn in een SELDI-TOF of MALDI-TOF benadering. De detectiegrens van deze methode hangt af van de mate van scheiding en van het peptide, maar ligt in de orde van ng/ ml. Van deze benadering verwachten wij dan ook de meeste resultaten met betrekking tot het ontdekken van (panels van) biomarkers. Momenteel investeert de VUmc-Cancer Center Amsterdam in nieuwe apparatuur die nanoLC analyses mogelijk maakt op een Fourier-Transform massa spectrometer.

Massa spectrometrie van weefsel *in situ*: moleculaire imaging

Een andere veelbelovende toepassing van directe MALDI-massa spectrometrie, die relevant is voor diagnostiek en het ontdekken van biomarkers, is de analyse van weefsel *in situ*⁹. Deze benadering maakt 'imaging' van eiwitexpressie in normale en kanker weefsels mogelijk. Het werkt als volgt (Fig. 5): bevroren weefsel wordt gesneden in dunne plakjes (vriescoupes) die worden gelegd op een metalen plaatje. Het weefsel op de plaat, na het opbrengen van een soort coating, wordt vervolgens in de MALDI-massa spectrometer op regelmatige spatiele intervallen gemeten. De grootte van het interval bepaald de spatiele resolutie, hetgeen leidt tot lage-resolutie eiwitprofielen of spatiele eiwitbeelden (Fig. 5). De eiwitprofielen die verkregen worden op de verschillende intervallen worden vergeleken mbv de computer, hetgeen leidt tot een spatiele distributie van individuele massa's (eiwitten) over de weefselcoupe. Analyses van longtumoren met deze benadering¹⁰ hebben verschillen in eiwitexpressie aan het licht gebracht tussen normaal longweefsel en tumorweefsel en met specificiteit voor verschillende tumor typen. Bovendien hadden de 'proteomic patterns' voorspellende waarde voor de aanwezigheid van lymfkliermetastasen en de overleving van de patient.

Proteomics van organellen, eiwitcomplexen en post-translationele modificaties: naar minder kijken om meer te zien

Eiwitten doen hun werk meestal niet alleen, maar in complexen waarvan de compositie en plaats in de cel vaak dynamisch gereguleerd is. Het selectief oogsten van celcompartimenten gevolgd door proteomics analyse is een krachtige manier om bepaalde klassen van therapeutisch relevante eiwitten, bv plasmamembraaneiwitten, in beeld te brengen. Een mooi voorbeeld hiervan is de recente studie gepubliceerd in Nature¹² waarin subcellulaire fractionatie werd gebruikt om specifiek het deel te isoleren van het plasmamembraan van endotheelcellen dat blootstaat aan het bloed. Differentiele analyse van weefsel-specifieke eiwitprofielen in gezonde ratten en dieren met longtumoren leidde tot de ontdekking van nieuwe endotheleiwitten die specifiek waren voor normaal longweefsel en longtumoren en die gebruikt konden worden voor imaging en als mogelijk therapeutisch aangrijpingspunt.

Om eiwitcomplexen te karakteriseren zijn gefocuseerde benaderingen nodig. Het bedrijf Cellzome gebruikt een slimme affiniteitszuivering in kankercellen om eiwitten in de signaaltransductie cascade van Tumor Necrosis Factor te bestuderen. Met behulp van antilichamen tegen bekende eiwitten is daarmee het hele eiwit-interactie netwerk in kaart gebracht¹³. Van de 221 gevonden interacties waren er 80 nieuw. Deze nieuwe interacterende eiwitten kunnen weer aangrijpingspunten vormen voor therapie.

Tenslotte onderkent men steeds vaker in de biologie dat de functie van een eiwit niet alleen wordt bepaald door de aminozuurvolgorde of de structuur van een eiwit, maar ook door veranderingen aan het molecuul die later optreden. Een bekend voorbeeld daarvan is fosforylatie, waarbij er aan

het eiwit een fosfaatgroep wordt gekoppeld. Verkeerde fosforylering speelt o.a. een rol bij het ontstaan van kanker. Ondanks de hoge moeilijkheidsgraad van fosfo-proteomics (de expressienivo's zijn vaak laag en meestal is maar een klein deel van het cellulaire eiwit gefosforyleerd) zijn er recentelijk doorbraken geboekt. Met behulp van phospho-tyrosine specifieke antilichamen in combinatie met een speciale labelingsstrategie ('stable-isotope labeling') werd de dynamiek in kaart gebracht van de subset van eiwitten die gefosforyleerd raken na behandeling van cellen met Epidermal Growth Factor¹⁴. In deze baanbrekende studie werden 81 signaal eiwitten geïdentificeerd waarvan 31 nieuwe effectors die ingedeeld konden worden in 5 verschillende activiteitsprofielen.

Toekomstige uitdagingen

Proteomics heeft groot potentieel waar het gaat om het begrijpen van biologische en pathologische processen, maar het is een utopie om alle eiwitten tegelijk kwantitatief in kaart te willen brengen. Vanwege de chemische diversiteit van eiwitten en grote verschillen in expressienivo's zijn meerdere strategieën in parallel nodig om een goed beeld te krijgen van het proteoom tijdens gezondheid en ziekte. Integratie van diverse proteomics datasets is hiertoe cruciaal.

Proteomics onderzoek leidt vaak tot een flink aantal kandidaat biomarkers. Slechts een klein aantal hiervan zal een klinisch bruikbare marker opleveren. Met de recent ontwikkelde strategieën kan nu het initiele ontdekkingproces systematisch worden uitgevoerd samen met de initiele validatie. Het is echter belangrijk dat er ook een systematisch klinisch vervolg komt aan de proteomics ontdekkingsreis, anders is proteomics gedoemd om slechts een technologie te zijn die grote datasets genereert. Voor een totaal begrip van kanker is multidisciplinair onderzoek belangrijk. Deze zal geïntegreerd moeten worden in een 'systeem-biologische' benadering, waarin een geïndividualiseerde diagnose en behandeling mogelijk wordt.

Samenvatting

Sinds de structuur van het menselijk genoom in kaart is gebracht, is proteomics hét vakgebied waar in de toekomst nieuwe doorbraken te verwachten zijn. Dankzij de razendsnelle ontwikkelingen (vergelijkbaar met die van computer hardware) op het gebied van met name massa spectrometrie en bioinformatica, kunnen nu complexe eiwitmengsels in biologische preparaten nauwkeurig, kwantitatief en gevoelig in kaart worden gebracht. De verwachting is dat deze ontwikkeling al spoedig zijn eerste vruchten zal afwerpen in de vorm van nieuwe biomarkers, diagnostische assays en 'drugable targets'.

Literatuur

1. Hanash, S. (2003) Disease proteomics. *Nature* 422, p226.
2. Mocellin, S., Rossi, CR., Traldi, P., Nitti, D., and Lise M. (2004) Molecular oncology in the post-genomic era: the challenge of proteomics. *Trends in Mol. Med.* 10, p24.
3. Pandey, A. and Mann, M. (2000), Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, p837.
4. Aebersold, R. and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, p198.
5. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC & Liotta LA (2002) Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359, p572.
6. Veenstra TD, Prieto DA, Conrads TP. (2004) Proteomic patterns for early cancer detection. *Drug Discov Today.* 9, p889.
7. Diamandis EP, van der Merwe DE. (2005) Plasma protein profiling by mass spectrometry for cancer diagnosis: opportunities and limitations. *Clin Cancer Res.* 11, p963.
8. Villanueva J, Philip J, Entenberg D, Chaparro CA, Tanwar MK, Holland EC, Tempst P. (2004) Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem.* 76, p1560.
9. Chaurand P, Sanders ME, Jensen RA, Caprioli RM.(2004) Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *Am J Pathol.* 165, p1057.

10. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, Massion PP, Larsen PH, White BC, Roberts JR, Edgerton M, Gonzalez A, Nadaf S, Moore JH, Caprioli RM, Carbone DP. (2003) Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 9, p433.
11. Schrader M, Schulz-Knappe P. (2001) Peptidomics technologies for human body fluids. *Trends Biotechnol.* 10 Suppl: S55-60.
12. Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, Testa JE, Schnitzer JE. (2004) Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature*. 429, p629.
13. Bouwmeester, T. et al. (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol.* 6, p97.
14. Blagoev B, Ong SE, Kratchmarova I, Mann M. (2004) Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nat Biotechnol.* 22, p1139.

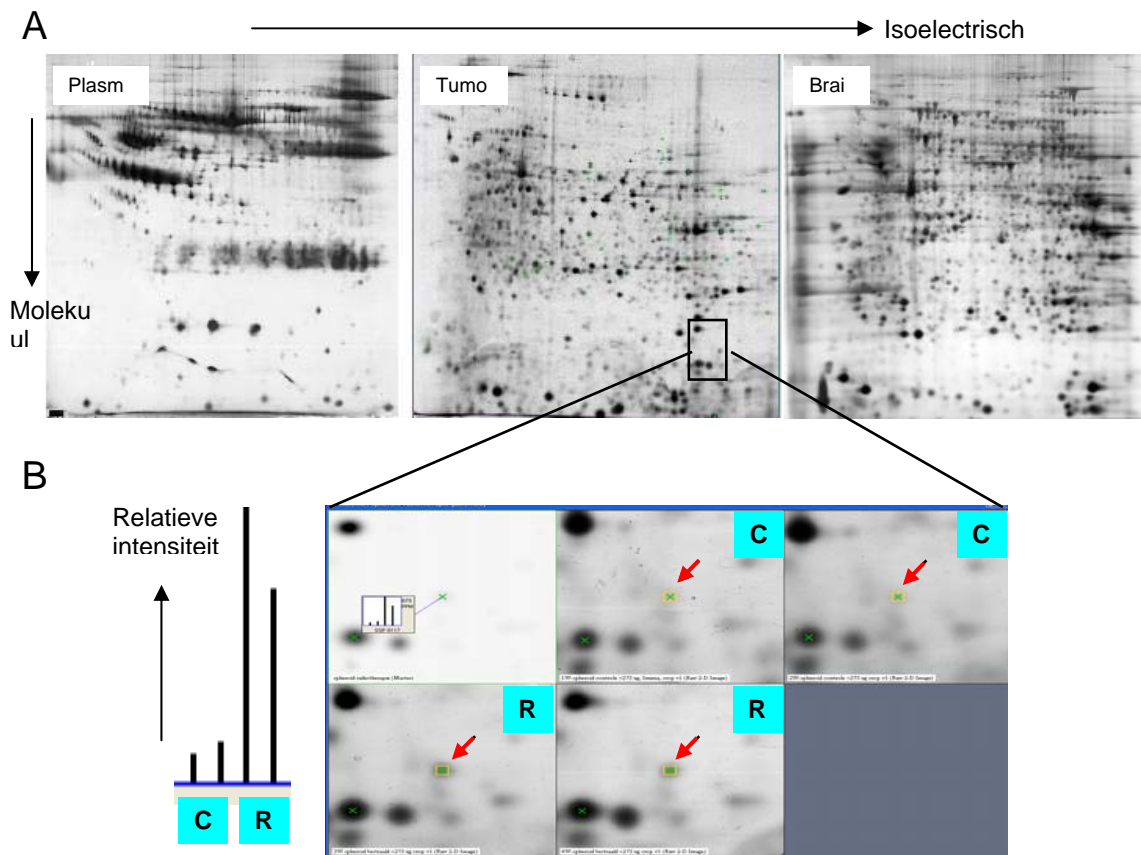


Fig. 1.

Fig. 1 Eiwitexpressie profielen in kaart brengen middels 2DGE. A. Voorbeelden van weefsel-specifieke 2D gel expressieprofielen. B. Vergroting. Voorbeeld van een geregleerde eiwit spot in een tumor-sferoid na bestraling (Jimenez en Sminia, ongepubliceerde data). C, controle; R, bestraald.

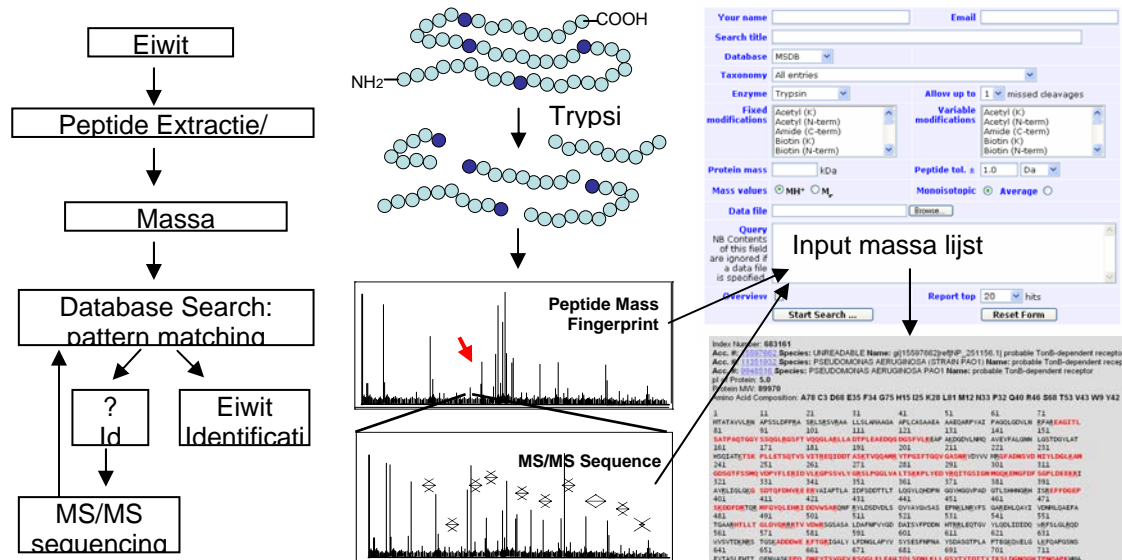


Fig 2.

Fig. 2. Eiwitidentificatie strategie middels massa spectrometrie en database searching. Een eiwit in een stukje gel of in oplossing wordt geknipt met een enzym hetgeen leidt tot de vorming van fragmenten (peptiden). De molekulgewichten (massa's) van de peptiden worden gemeten in de massa spectrometer en gebruikt om sequentie-databases te doorzoeken. Wanneer dit niet leidt tot een betrouwbare identificatie kan een peptide geselecteerd worden voor fragmentatie in een botsingskamer. Deze fragmenten kunnen worden gemeten in een tandem massa spectrometer (zoals de MALDI-TOF/TOF in het Proteomics Center VU(mc)) en ook gebruikt voor een 'database-search'. Deze 'MS/MS'-toepassing kan leiden tot de opheldering van de primaire structuur van het peptide, en van eventuele modificaties.

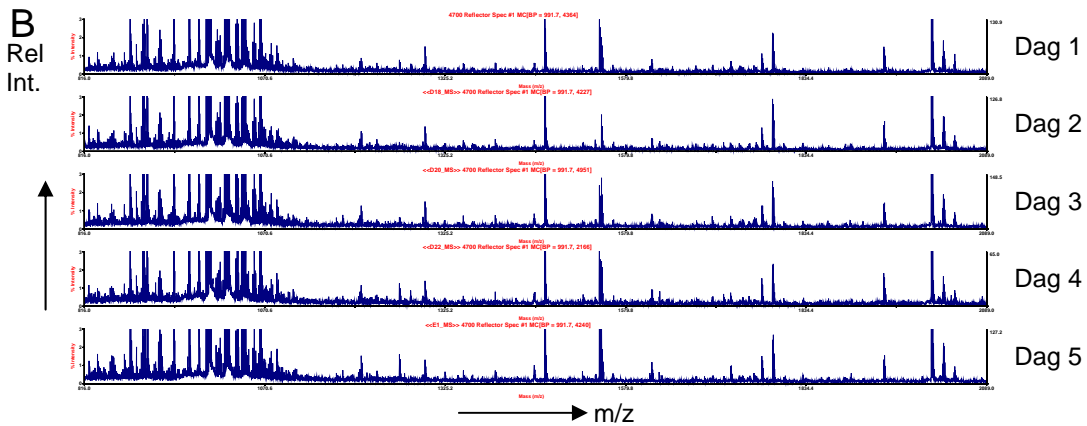
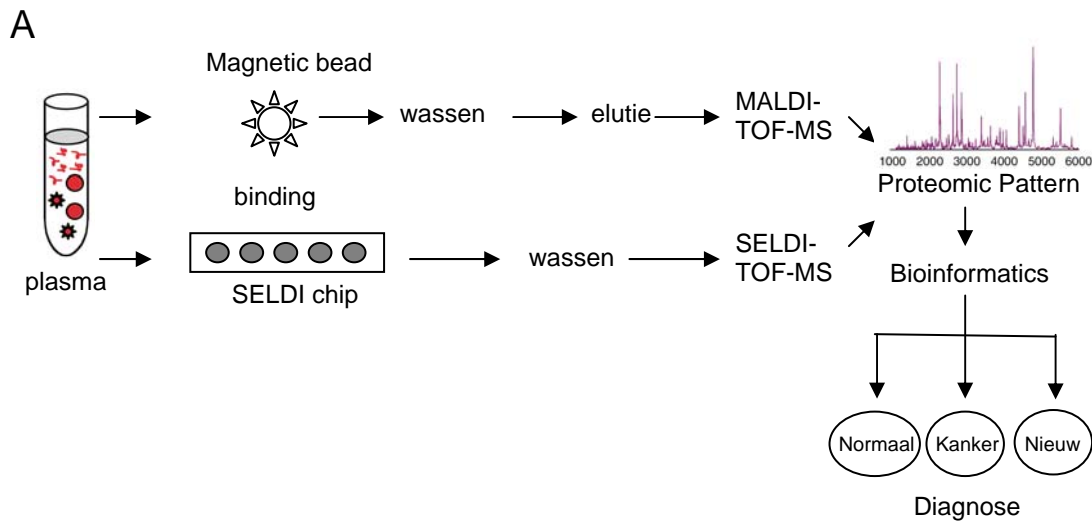


Fig. 3.

Fig. 3. Diagnostische proteomics. A. Peptidenprofielen uit bloed in kaart brengen middels SELDI-TOF en MALDI-TOF massa spectrometrie. Schematisch overzicht van alle stappen. Slechts een druppel serum of plasma is nodig. Bioinformatica algoritmes worden gebruikt voor ontdekking van discriminerende sets van pieken en voor clustering en classificatie van bloedmonsters. B. Peptidenprofielen uit serum kunnen nauwkeurig en met hoge reproduceerbaarheid gemeten worden middels MALDI-TOF-MS (Jimenez et al., ongepubliceerde data).

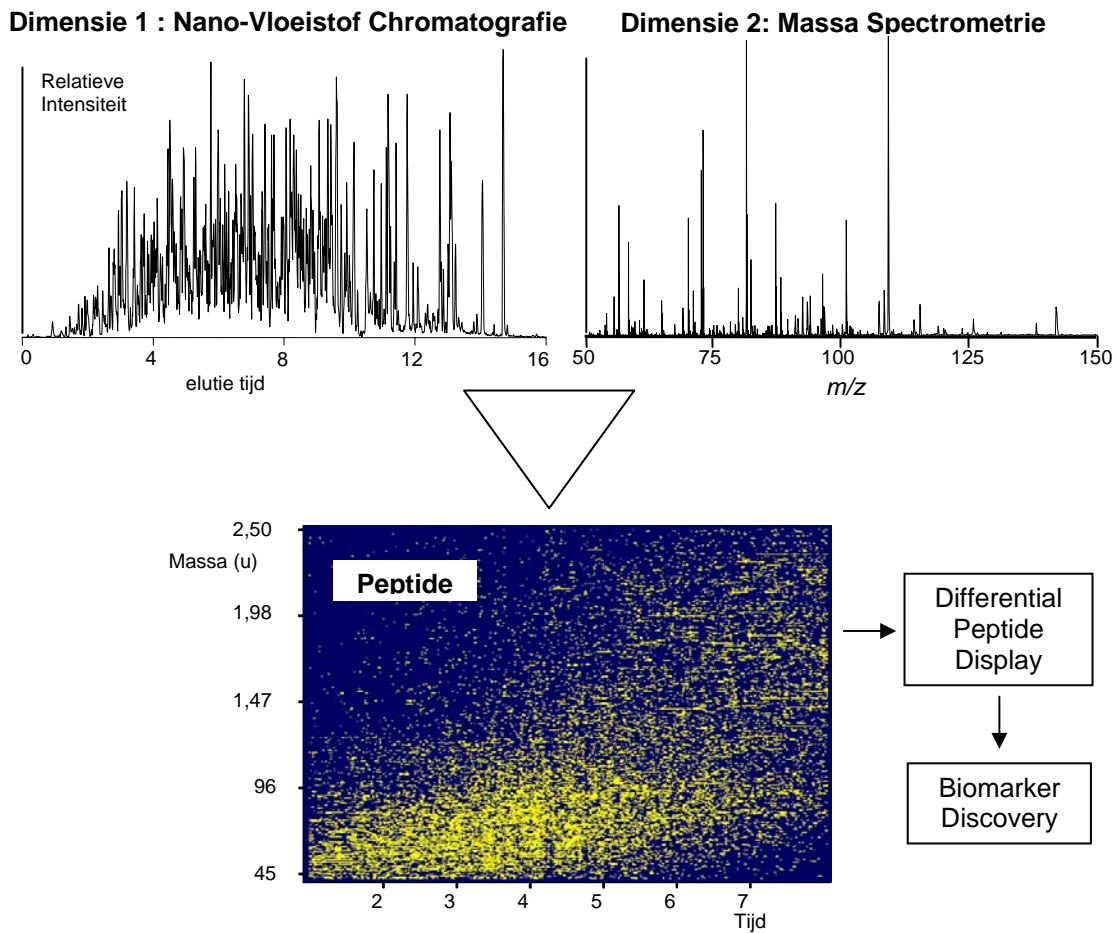


Fig. 4.

Fig. 4. Twee-dimensionele peptiden-display na chromatografische scheiding voor het ontdekken van nieuwe biomarkers. Voor het ontdekken van biomarkers is de focus op het identificeren van peptiden en eiwitten die uniek zijn of zeer veel voorkomen in het weefsel of bloed van kankerpatienten, vergeleken met gezonde donoren. Om ook peptiden en eiwitten te meten die lager tot expressie komen is scheiding middels (nano-)vloeistofchromatografie cruciaal, gevolgd door massa spectrometrie. Fourier-transform massa spectrometers die een zeer hoge resolutie, gevoeligheid en dynamisch bereik hebben zijn het meest geschikt voor de analyse van complexe lichaamsvloeistoffen zoals plasma.

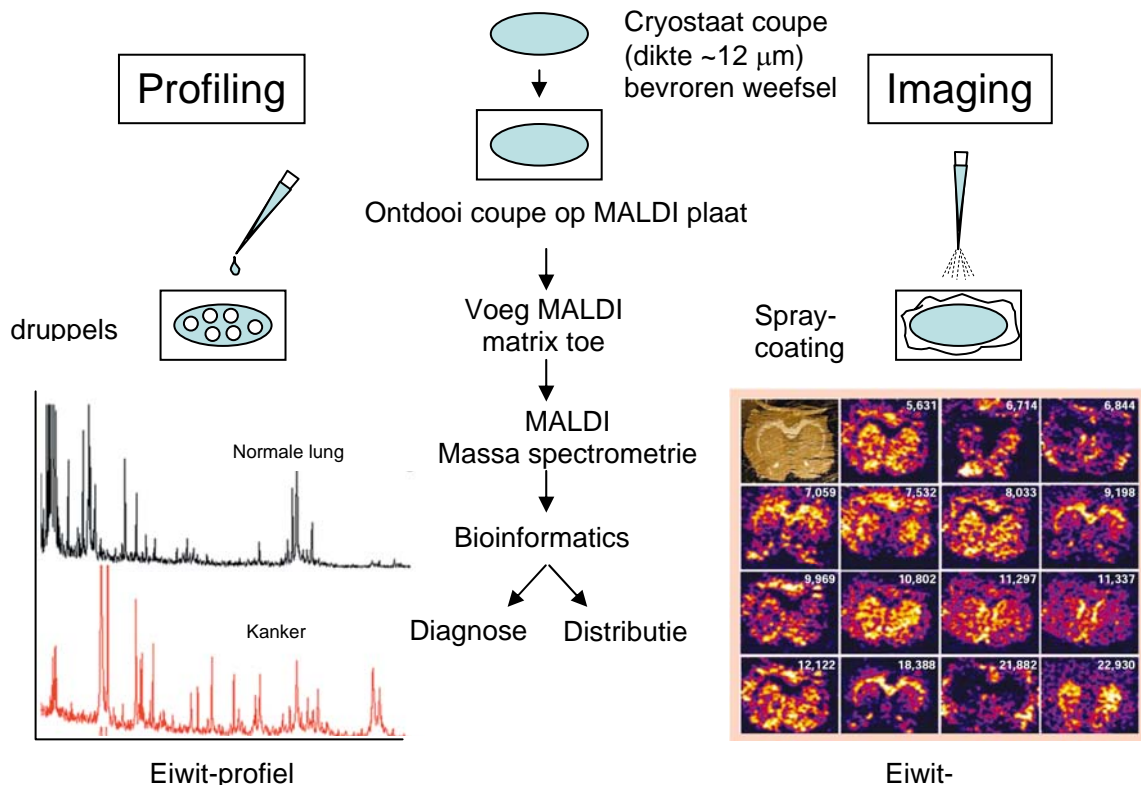


Fig. 5.

Fig. 5. Eiwitprofielen meten middels directe MALDI-TOF-MS op weefsel *in situ*. Schematisch overzicht van de benodigde stappen voor analyse met lage en hoge spatiele resolutie, leidend tot een eiwitprofiel of eiwit-distributie over het weefsel (beeld). Een voorbeeld van de eerste toepassing is de classificatie van stadia van longtumoren¹⁰. Een voorbeeld van de tweede toepassing is de spatiele analyse van hersenweefsel van de rat (zie referenties in 9).