

Hmotnostní spektrometrie v klinické laboratoři

B.Friedecký

Brno Pracovní den
10.11.2010

Minulost MS

- Referenční metody měření nízkomolekulárních látek biologických materiálů
- GC-MS LC-MS
- Základ metrologické návaznosti
- Pracovní nástroj referenčních laboratoří

Rozvoj MS a MS/MS v posledních letech

- Úspěšný v oblasti analýz nízkomolekulárních látek
- Toxikologie
- Léky
- Vrozené vady
- Vitamin D
- Albumin v moči
- HbA1c
- *MS/MS je zlatý standard vyšetřování při novorozeneckém skríninku vrozených vývojových vad*
- *MS/MS v oblastech toxikologie a TDM může být nástrojem metabolomiky*

Co očekávají lékaři v US od MS(2009)

- Endokrinologové a onkologové zvýšenou analytickou sensitivitu a lepší **analytickou specifickou** ve srovnání s imunochemickými metodami
- Hodnota m/z je specifická pro analyt
- Dosažení meze detekce v řádu pmol/l
- Možnost **multiplexních** měření

Nejčastější pojmy MS

- Separace - GC, LC, CE
- Ionizace
 - EI, APCI (malé molekuly)
 - ESI, MALDI, SELDI (velké mol.)
- Generování m/z
 - TOF
 - Trojice kvadrupolů při MS/MS

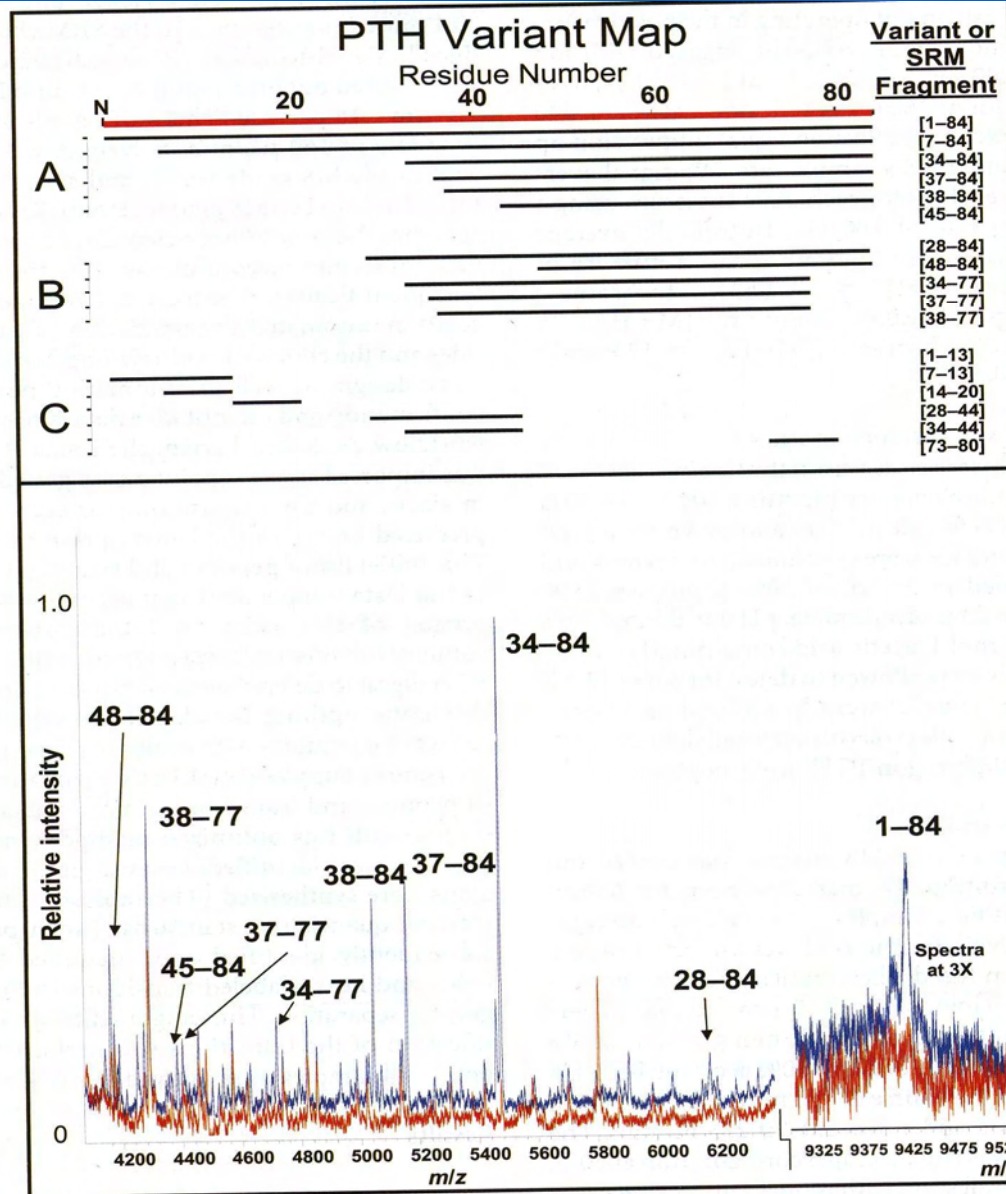
LC-MS/MS- módy SRM a MRM

System tři kvadrupolů
(separace, fragmentace, selektivní detekce)

Klasická LC-MS/MS – analýza jednoho nízkomolekulárního analytu

- Módy SRM a MRM jsou způsoby MS/MS, upravené pro multiplexní provedení
- Múd SRM (selected reaction monitoring) - profil jednoho analytu a jeho variant -isoforem
- Múd MRM (multiple reaction monitoring) - multiplexní analýza

Varianty PTH



MRM- výkonnost a přesnost

- 10-50 analytů při jednom měření
- Přesnost $CV\% < 20$
- Potřebná doba několika málo minut

Standardizace MS/MS

- Vnitřní standardy eliminují supresi ionizace, která se vyskytuje u vzorků některých pacientů a adjustují nastavení měřícího systému.
- Kvantifikace pomocí externího kalibrátoru se stejnými nároky jako u klasických biochemických stanovení
- *Materiál NIST-SRM 972 zajistil pravdivost měření 25-OH-vitaminu D*

Proteomika, proteom

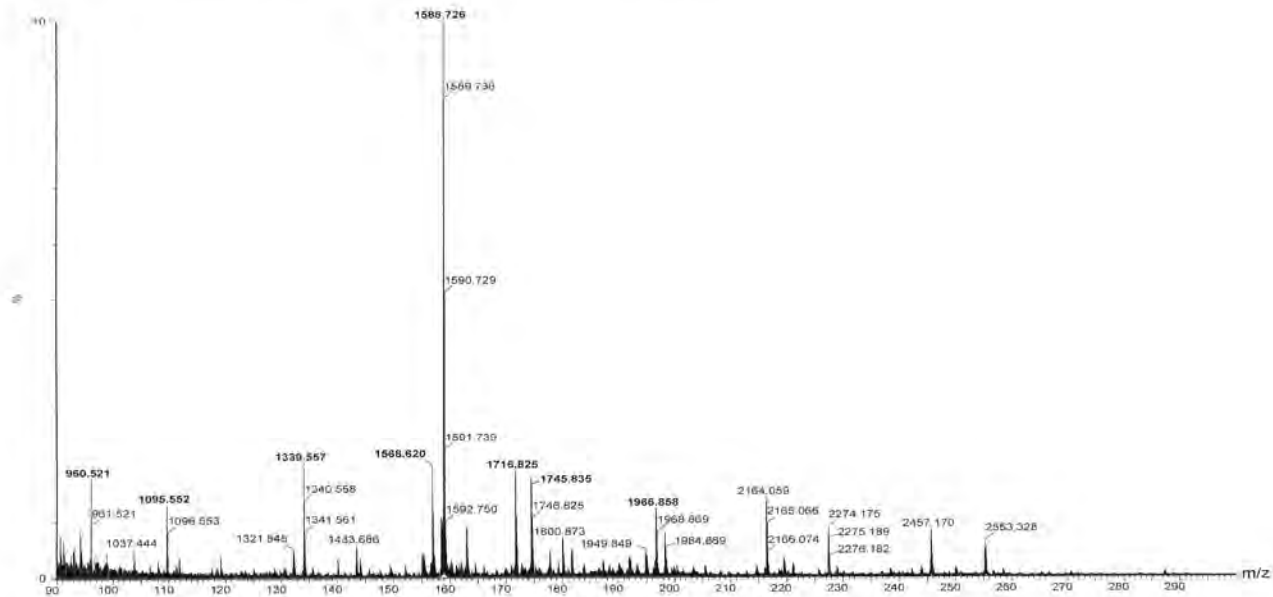
- Proteom se skládá z cca 20.000 genomem exprimovaných proteinů a z dalších několika milionů posttranslačně změněných proteinů
- Stanovuje se běžně jen cca 150 proteinů o koncentracích $\geq 0,06$ mg/l
- Proteomika je analýza proteomu
- Souvislost s genomikou: genotyp/fenotyp
- MS má potenci stanovovat až femtomolové (10^{-15}) koncentrace proteinů (low abundant proteins)

MALDI-SELDI TOF MS

- Nakoncentrování vzorku na čipu, Často na bázi afinitní chromatografie (čip IMAC-immobilized metal affinity chromatography)
- Tryptická digesce
- Ionizace
- TOF (m/z na bázi času průletů z ionizační komory na detektor)
- Srovnání s knihovnou spekter
- SELDI – navázání studovaných proteinů na čip a ionizace laserem přímo z jeho povrchu

MALDI TOF MS – vyhodnocení profilu programem Mascott

702 Gast et al.: SELDI-TOF MS serum protein profiles and storage duration



MASCOT peptide mapping results: m/z 8939 C3a_{desArg} anaphylatoxin

Start-End	Mr (obs)	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Sequence
672-679	960.52	959.51	959.54	-0.03	R.SVQLTEKR.M
713-722	1095.55	1094.54	1094.58	-0.04	R.FISLGEACK.V
699-709	1339.59	1338.58	1338.58	-0.00	K.ELRKCCEDGMR.E
692-704	1568.64	1567.63	1567.64	-0.00	R.KCCEDGMRENPMR.F
723-735	1588.74	1587.73	1587.74	-0.01	K.VFLDCCNYITELR.R
722-735	1716.84	1715.83	1715.84	-0.00	K.KVFLDCCNYITELR.R

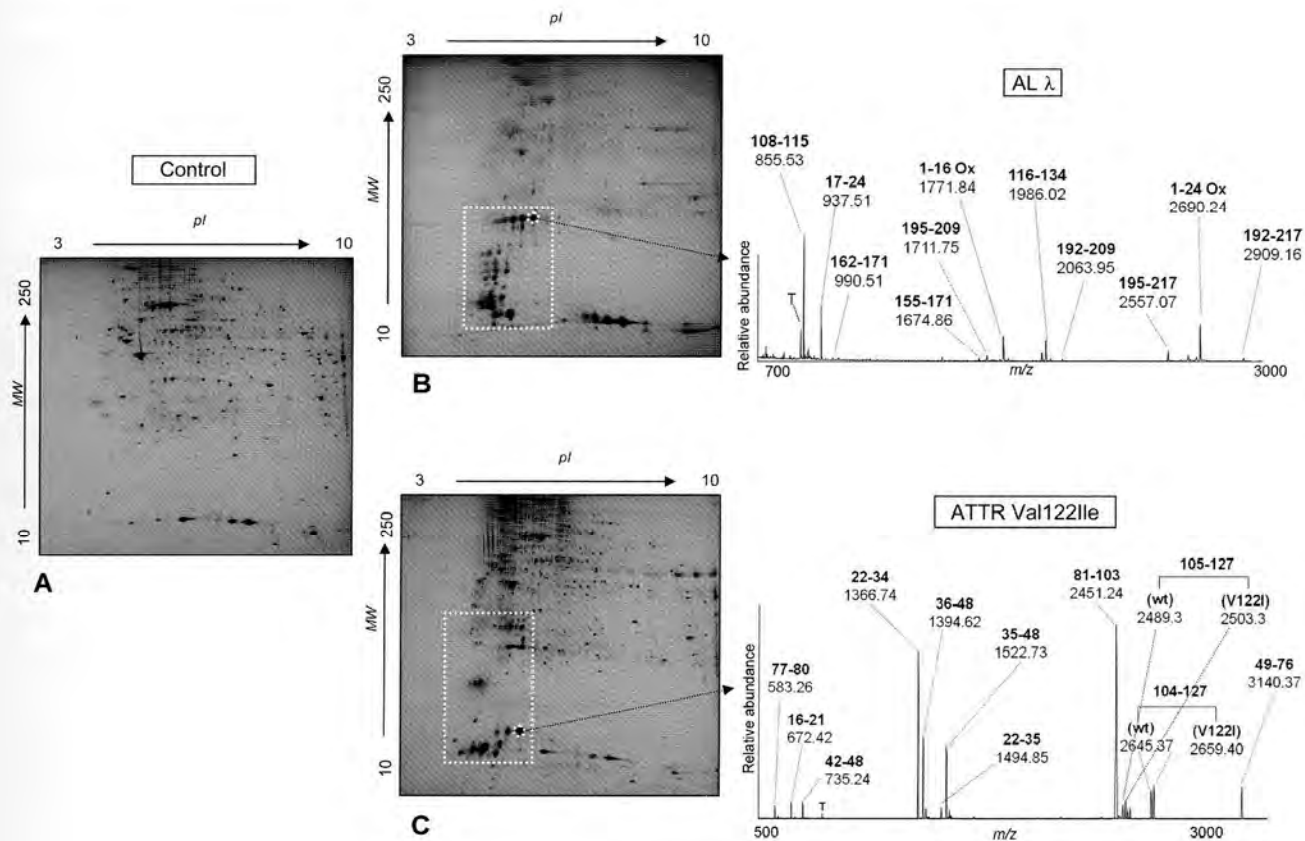
Amino acid sequence of m/z 8939 C3a_{desArg} anaphylatoxin (start: 672 - end: 747, 61% sequence coverage):

SVQLTEKRMD KVGKYPKELR KCCEDGMREN PMRFSCQRRF FISLGEACK KVFLDCCNYI TELRRQHARA SHLGLA

Aplikace MALDI/SELDI TOF MS

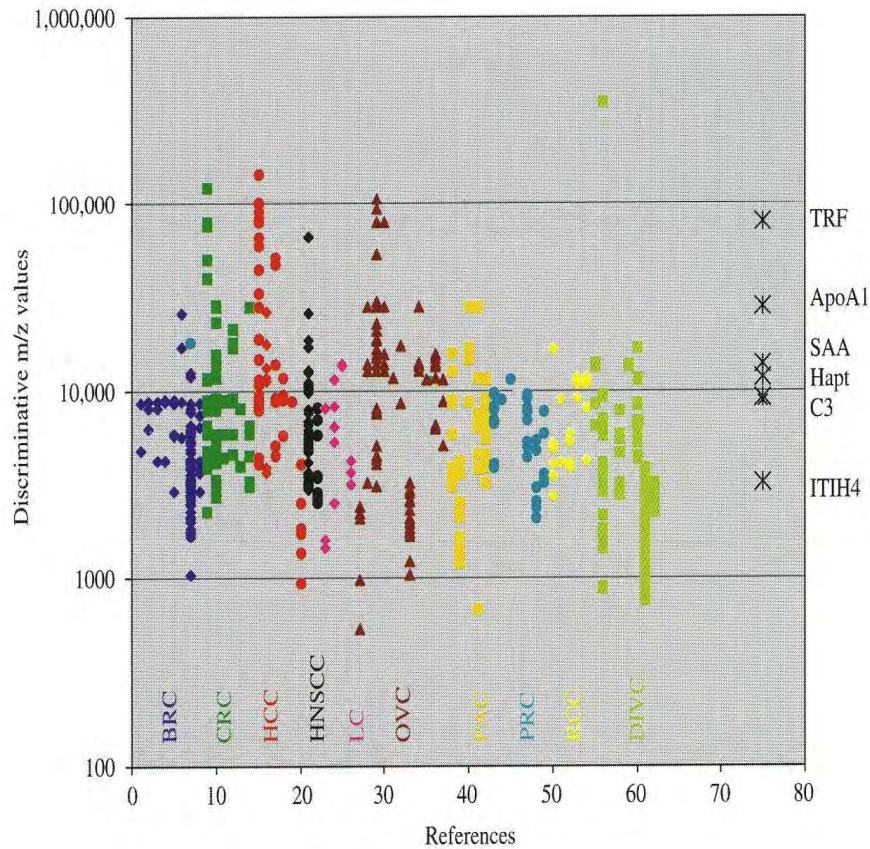
- Proteinové profily
- Systematický výzkum proteomu HUPO
- Pokusy o nalezení diagnostických biomarkerů v podobě proteinových profilů (zejména v onkologické diagnostice)
- Rychlá diagnostická vyšetření v mikrobiologii

2D ELFO a návaznost s MALDI TOF MS



Intensita hledání onkologických biomarkerů

672 Findeisen and Neumaier: Mass spectrometry based proteomics profiling as diagnostic tool



Proč je hledání proteomických biomarkerů málo úspěšné

- Obrovský počet posttranslačních proteinů
- Jejich závislost na genetických a environmentálních faktorech
- Problémy s preanalytikou a databázemi biologických materiálů
- Problémy s kvantifikací-rozsah koncentrací přes 10 řádů

Problémy preanalytiky v proteomice

- Obecné preanalytické problémy
- Odběrové nádoby, proteolýza, antiproteolytika
- Špatný stav materiálů v biobankách
- *Řada nadějných profilů a biomarkerů nemohla být verifikována na jiných pracovištích z důvodů preanalytických chyb*

Pokus o proteinový profil k diagnostice PCa

- V roce 2008 ztroskotala na preanalytických problémech validace tohoto profilu, prováděná šesti špičkovými ústavami USA (John Hopkins, San Antonio, Pittsburg...)
- Používaly vzorků ze čtyř různých bank biologického materiálu

FDA clearance

- Provedena modelově ve spolupráci proteomiků, pracovníků FDA a výrobců na dvou hypotetických systémech. Edukační pokus.
- 1. Systém MS/MS MRM, pracující s 10 peptidy, obohacenými pomocí příslušných antipeptidových protilátek
- 2. Proteinový čip se 120 jamkami a 10 analyty
- **Skutečnou clearanci FDA zatím žádný systém tandemové MS ani proteinových čipů nemá udělenou**

Dva metodické přístupy MS v proteomice

- První metodický přístup-profil části proteomu .Typickým nástrojem je MALDI-TOF MS
- Druhý metodický přístup-kvantifikace cílových proteinů (targeted proteins).Typickým přístupem je SID MRM (SID= Stable Isotope Dilution ke kalibraci)

Kvantifikace cílových(targeted) proteinů

- **Cílový protein stanoven vhodnými peptidy po jeho proteolytické digesci. Peptidy musí odpovídat cílovému proteinu. Obsah peptidů se obohací pomocí antipeptidových protilátek (immunoaffinity enrichment)**
- Možnost výběru různých (surrogate) peptidů=možnost multiplexních stanovení variant nebo isoforem cílového proteinu
(pepsin/pepsinogen cTnI/IL 33)
- Kvantifikace obohacených peptidů kalibrací MS/MS MRM stabilní isotopovou dilucí (SID)
- SISCAPA-stable isotope standard capture with antipeptide antibodies

Zjednodušení proteinových vzorků u metod MS/MS.

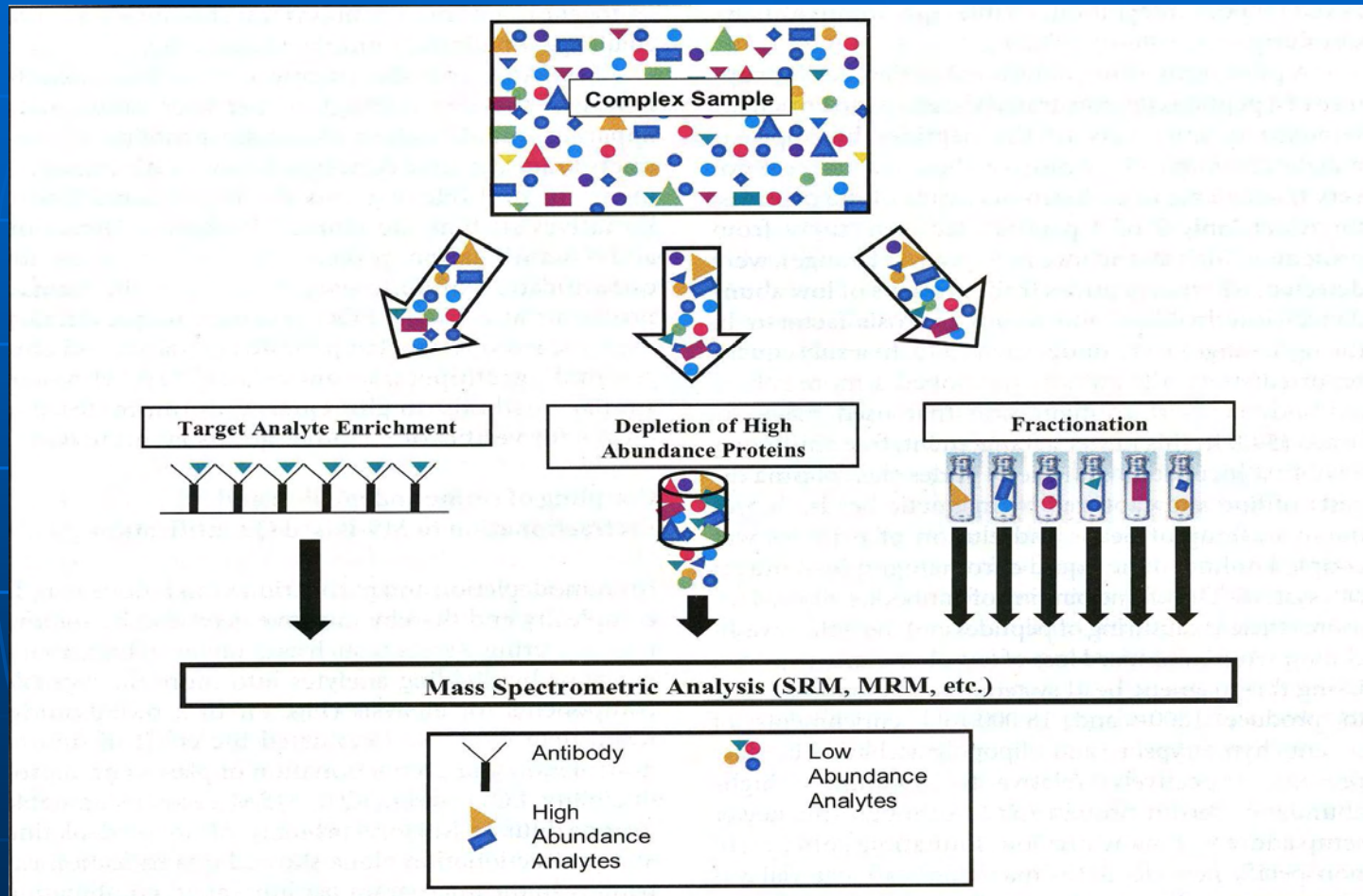


Fig. 2. Strategies to minimize sample complexity and improve detection.

Three primary approaches prior to MRM or MS-based analysis—target analyte enrichment, depletion of high abundance proteins, and fractionation—decrease sample complexity and purify analytes. SRM, selected reaction monitoring.

Kvantitativní proteomika cílových (targeted) proteinů

- Analýza malých molekul metodou MS/MS je dobře zvládnutá včetně multiplexních postupů (MRM).
- **Ke kvantifikaci cílových proteinů se nadějně jeví SID MRM s imunoafinitním obohacením peptidů(SISCAPA).**
- Možnost validovat dostatečně rychle, zda cílový protein lze považovat za biomarker
- Možnost rychlých **multiplexních analýz**
- **Možná náhrada imunochemických metod**

SID MRM kvantifikace(PSA)

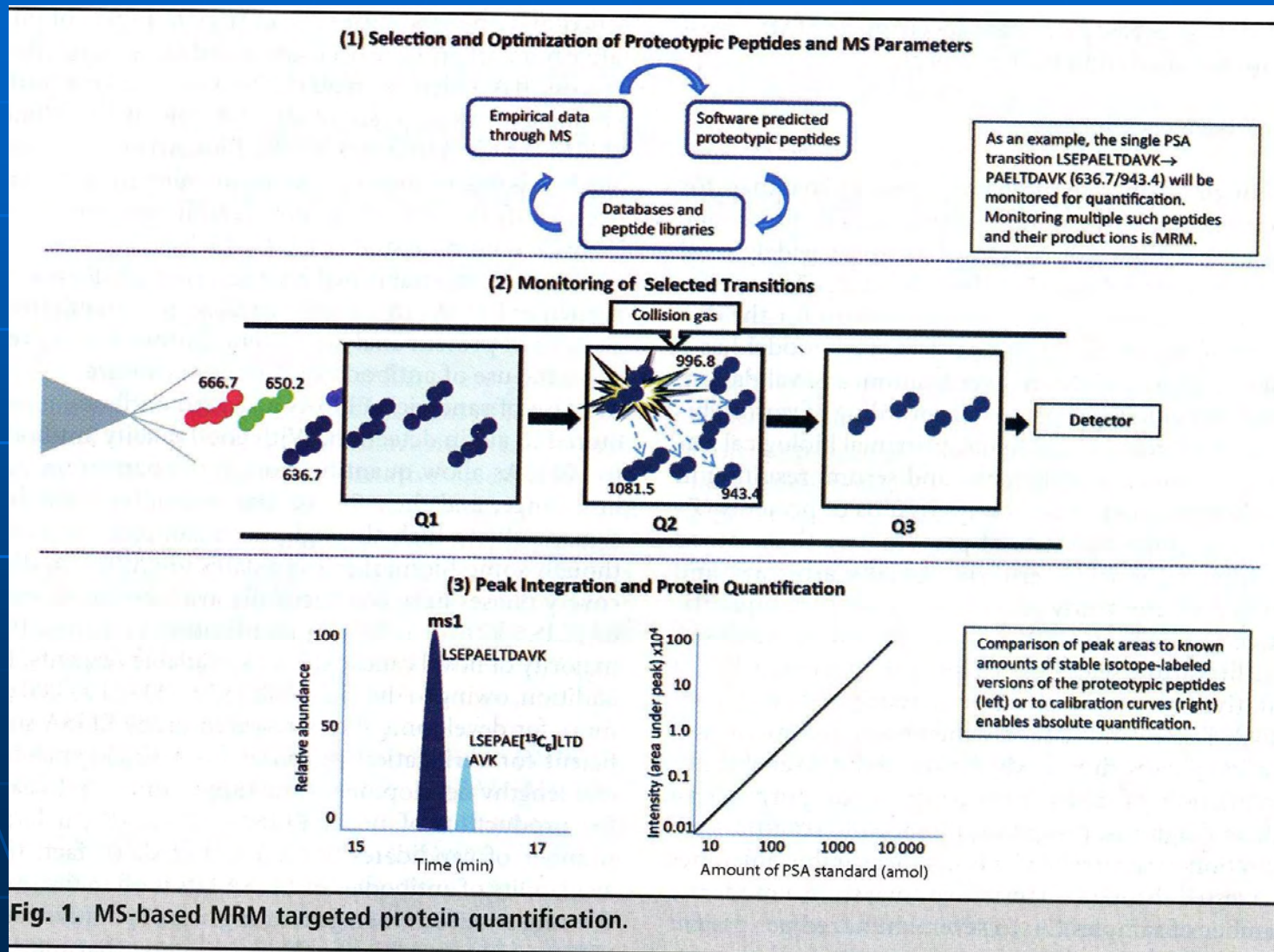


Fig. 1. MS-based MRM targeted protein quantification.

Validace potenciálních biomarkerů

Metoda LC-MS/MS v módu SID-MRM s imunoafinitním obohacením peptidů (SISCAPA), ekvivalentních hledanému proteinovému biomarkeru je velkou nadějí proteomiky

- ***CV% (mezilehlá preciznost) 6-14%***
- ***Recovery -15 až 5,9%***

Výhody MS

- Analytická sensitivita (LOD v pmol a fmol/l)
- MULTIPLEXNÍ ANALYTIKA
- Analytická specifičnost (m/z charakterizuje analyt jednoznačně)
- Malé provozní náklady

MS a investice do zdravotní péče

- D.Callahan:Taming the Beloved Beast, Princeton University Press 2010(krocení drahé bestie)
- Finanční náročnost nových technologií může zničit zdravotnictví
- Velmi často je pozitivní efekt pro pacienty malý,ale pozitivní efekt pro firmy obrovský
- I z tohoto hlediska je nutné omické metody posuzovat a určit regulovaně počet zařízení a pracovišť podle potřeb péče o pacienty