

Quantifizierung von Chitotriosidase in Humanplasma mittels MRM

LC/MS^E- und LC/MRM-MS/MS-Methoden zur Bestimmung von Plasmaproteinen

Die chronische und progressiv verlaufende Gaucher-Krankheit ist das häufigste Mitglied einer Gruppe von Erbkrankheiten, die als lysosomale Speicherkrankheiten bezeichnet werden. Schätzungen besagen, dass etwa 1 von 40.000–60.000 Menschen von der Krankheit betroffen ist, die auf einem Mangel an Glucocerebrosidase beruht, dem Enzym, das die Umwandlung von Glycosylceramid in Ceramid und Glucose katalysiert.

Zur Diagnostik der Krankheit wird oft die Chitotriosidase verwendet, eine von aktivierten Makrophagen produzierte Chitinase, deren Aktivität bei Patienten mit Gaucher-Krankheit deutlich erhöht ist. Die Enzymaktivität ist darüber hinaus nützlich zur Überwachung des Fortschreitens der Krankheit und des Behandlungsverlaufs, da der Chitotriosidase-Plasmaspiegel der Patienten nach Einleiten einer Therapie mit Enzymsupplementierung sehr schnell abfällt.

Die Chitotriosidaseaktivität im Plasma wird normalerweise mit dem fluorogenen Substrat 4-MU-Chitotriosid bestimmt, wobei der Fluoreszenzfarbstoff an das katalytische Zentrum der Chitotriosidase bindet. Eine genaue Quantifizierung der Chitotriosidase mit diesem Enzymassay kann jedoch durch eine offensichtliche Substrathemmung kompliziert werden.

Um die Krankheit bei verschiedenen Patienten zu untersuchen, wurden alternative Quantifizierungsmethoden auf LC/MS-Basis zur Messung der Menge, der Konzentration und der Aktivität von Chitotriosidase im Plasma angewandt. Außerdem wurden LC/MS^E- und LC/MRM-MS/MS-Methoden angewandt, um die Konzentration der Plasmaproteine auf ungezielte und gezielte Weise zu bestimmen. Die qualitativen Ergebnisse wurden dann zur Identifizierung eindeutiger, interferenzfreier MRM-Übergänge für die Chitotriosidase genutzt.

Überblick über den Aufbau des Experiments

Serumproben von Patienten vor und nach Behandlung sowie Proben von Kontrollpersonen wurden mit 0,1% Ameisensäure verdünnt und dann über eine Affinitätssäule gegeben, die die 6 oder 12 häufigsten Serumproteine abreicherte. Die so behandelten Proben wurden denaturiert, reduziert, alkyliert und mit Trypsin enzymatisch

Es wurden alternative Quantifizierungsmethoden auf LC/MS-Basis zur

Messung der Menge, der Konzentration und der Aktivität von Chitotriosidase

im Plasma mehrerer Patienten mit Gaucher-Krankheit angewandt. LC/MS^E- und

LC/MRM-MS/MS-Methoden wurden zur ungezielten beziehungsweise gezielten

Bestimmung der Konzentration der Plasmaproteine verwendet. Die qualitati-

ven Ergebnisse der LC/MS^E-Experimente wurden zur Identifizierung eindeuti-

ger, interferenzfreier MRM-Übergänge für die Chitotriosidase genutzt.

verdaut. RapiGest SF wurde entfernt durch Zugabe von 2 µl konzentrierter Salzsäure und anschließendes Abzentrifugieren. Der Überstand wurde weiter verwendet.

Die Enzymaktivität der Chitotriosidase wurde biochemisch bestimmt mit dem Substrat 4-Methylumbelliferyl-β-D-N,N',N''-triacetylchitotriose.

Die Experimente zur Quantifizierung mit LC/MS^E wurden als Dreifachbestimmungen angesetzt. Es wurde eine Umkehrphasenchromatographie mit einem 1,5-stündigen Gradienten bei 300° n/min auf einem Identity High Definition Proteomics-System (Waters) durchgeführt, mit einem nanoAcquity UPLC-System (Waters) mit einer LC-Säule für Trennungen im Nanobereich des Typs NanoEase Atlantis C₁₈ 3 µm, 75 µm x 15 cm. Teil des Identity^E-Systems war außerdem ein Massenspektrometer Synapt MS (Waters), das so programmiert war, dass es zwischen normalen und höheren Kollisionsenergien in der Gaszelle wechselte.

Die MRM-Analyse wurde mit einem Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer durchgeführt, das an ein wie oben beschrieben konfiguriertes UPLC-System gekoppelt war. Der Gradient verlief in diesem Fall von 1%–50% Acetonitril über 30 min. Die Breite der Analysefenster MS1 und MS2 betrug 1 Da, die Kollisionsenergie etwa 15–20° eV und die Verweilzeit etwa 25° ms.

Die abgereicherten Plasmaproben wurden mit zwei synthetischen Peptiden dotiert, die ein

13C-markiertes Arginin enthielten und den Fragmenten T26 (SFTLASSSDTR) und T38 (YPLIQTLR) entsprachen (New England Peptide, Garner, USA).

Die Daten der LC/MS^E-Analyse wurden zunächst verarbeitet. Nach der Peakdetektion wurden sie zeitlich angeglichen und mit speziellen Algorithmen durchsucht, darunter ein Suchalgorithmus für Protein- und Peptidionen. Anhand dieser experimentell erhaltenen Suchergebnisse wurden MRM-Übergänge ausgewählt, die eindeutig für das Protein (proteotypisch) waren.

Es ist erwähnenswert, dass während des Durchsuchens der datenunabhängigen LC/MS^E-Daten eine Methode zur Berechnung der molaren und absoluten Proteinmenge angewendet werden kann. Sie basiert auf der linearen Beziehung der Stärke des ESI-Signals und der molaren Konzentration eines Proteins. Durch Verwenden eines internen Standards mit bekannter Konzentration kann daher ein Signal-Faktor berechnet werden, mit dem die Konzentration aller identifizierten Proteine der Probe abgeschätzt werden kann.

Quantitative LC/MS^E-Experimente

Die absolute Konzentration und die Enzymaktivität der Chitotriosidase wurde zunächst bei Plasmaproben von vier Patienten anhand der LC/MS-Experimente bestimmt und mit den Ergebnissen des 4-MU-Assays verglichen, siehe Abbildung 1. Bei zwei der Patientenproben C

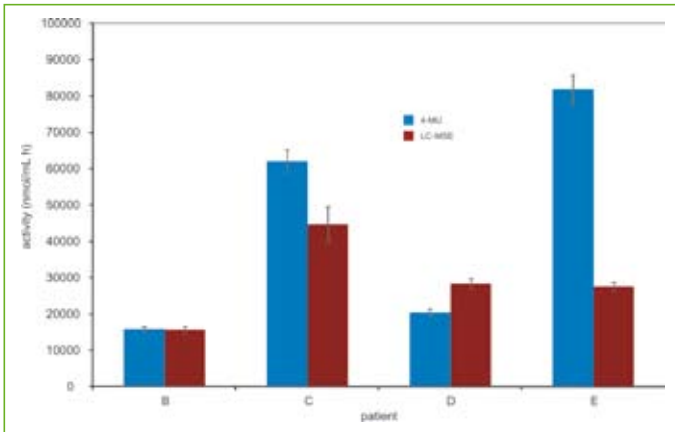


Abb. 1: Messung der Plasmachitotriosidaseaktivität mit dem 4-MU-Assay (blau) und absolute Quantifizierung mittels LC/MS^E (rot)

und E) stimmten die Ergebnisse der beiden Methoden nicht überein. Man könnte daraus schließen, dass die LC/MS^E-basierten Methode die Enzymkonzentration unterbestimmt. Interessanterweise handelte es sich bei diesen beiden Proben allerdings gerade um solche, bei denen der 4-MU-Assay eine relativ hohe Aktivität anzeigte.

Die Identifizierungsdaten und quantitativen Ergebnisse der LC/MS-Experimente wurden weiter validiert durch quantitative MRM-basierte Tandem-Quadrupol-LC/MS/MS-Experimente. Anhand der qualitativen LC/MS^E-Ergebnisse wurden die am besten geeigneten proteotypischen Peptide der Chitotriosidase und assoziierte MRM-Parameter bestimmt. Kurz gesagt wurden Peptide mit Cystein-, Methionin- und N-terminalen Glutathion aus-

mehrfach geladene Vorläuferionen und einfach geladene Produktionen betrachtet, und nur Peptide einer gewissen Kettenlänge und Produktionen aus einem gewissen Massebereich.

Die beiden besten MRM-Kandidaten waren die Peptide SFTLASSDTR und YPLIQLTLR. Mit ¹³C-Arginin markierte Varianten dieser Peptide wurden synthetisiert und als interne Standards für die absolute Quantifizierung verwendet.

Die interessierenden Bereiche der erhaltenen LC/MRM-MS/MS-Chromatogramme sind in Abbildung 2 gezeigt. Wie erwartet koeluiieren die ¹³C-markierten internen Standards mit den interessierenden Peptiden und erlauben eine absolute Quantifizierung auf Basis des ¹³C/¹²C-Verhältnisses.

Als Nächstes wurden die berechneten Peptidkonzentrationen

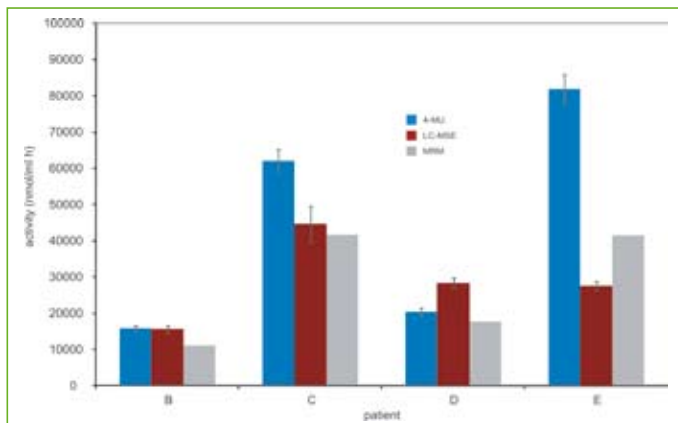


Abb. 3: Messung der Plasmachitotriosidaseaktivität mit dem 4-MU-Assay (blau), absolute Quantifizierung mittels LC/MS^E(rot) und absolute Quantifizierung mittels Triple-Quadrupol-MRM-LC/MS/MS (grau)

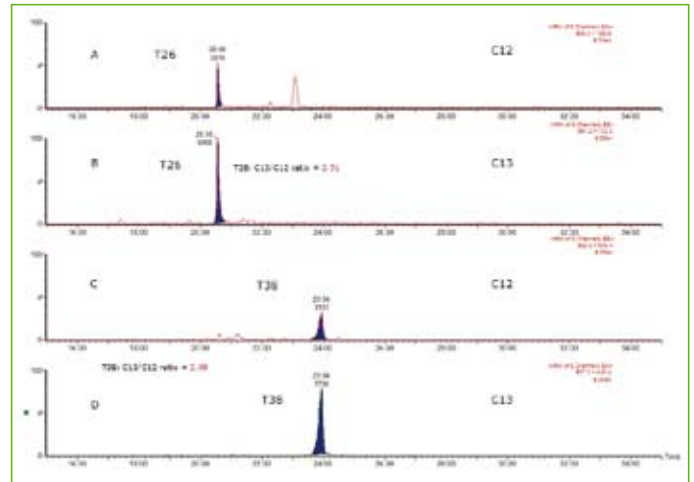


Abb. 2: MRM-Chromatogramme der Peptide SFTLASSDTR (T26), YPLIQLTLR (T38) und der ¹³C-markierten internen Standards

gemittelt und in eine Chitotriosidase-Enzymaktivität umgerechnet, siehe Abbildung 3.

Alle drei Methoden zur Messung der Enzymaktivität zeigten bei den Seren der Patienten B und D eine gute Übereinstimmung. Die Ergebnisse scheinen aber eher darauf hinzudeuten, dass der 4-MU-Assay die Chitotriosidaseaktivität überbestimmt als dass die LC/MS^E-Methode die Aktivität unterbestimmt. Es ist bedeutsam, dass bei verschiedenen Gaucher-Patienten die spezifische Aktivität unterschiedlich ist, die hydrolytische Aktivität gegenüber dem Substrat pro Mol Enzym also voneinander abweicht.

Diese Experimente haben zur Entwicklung eines neuen biochemischen Assays geführt, der im Mittel um 10–20 % niedrigere Werte für die Enzymaktivitäten der Chitotriosidase liefert. Allerdings sind diese Werte patientenabhängig sehr nahe den Konzentrationen, die mit den LC-MS basierten Methoden ermittelt werden.

Literatur

- [1] Aerts JMFG. *et al.*: Biomarkers for lysosomal storage disorders: identification and application as exemplified by chitotriosidase in Gaucher disease, *Acta Paediatrica* 97 7–14 (2008)
- [2] Hollak CEM. *et al.*: Marked elevation of plasma chitotriosidase activi-

ty, a novel hallmark of Gaucher disease, *J. Clin. Invest.* 93, 1288–1292 (1994)

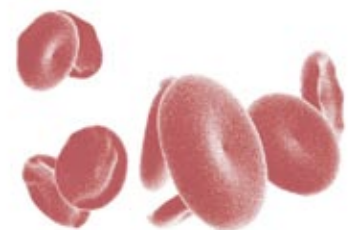
- [3] Vissers JPC. *et al.*: Analysis and quantification of diagnostic serum markers and protein signatures for Gaucher disease, *Mol. Cell. Proteomics* 6, 755–766 (2007)
- [4] Silva JC. *et al.*: Absolute quantification of proteins by LCMSE, a virtue of parallel MS acquisition, *Mol. Cell. Proteomics* 5, 144–156 (2006)

Autoren

Richard Sprenger, Hans Aerts, Department of Medical Biochemistry, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Niederlande

Catalin Doneanu, Waters Corporation, Milford, USA

Jim Langridge, Hans Visser, Waters Corporation, Manchester, UK



KONTAKT

Jim Langridge
Waters Corporation
Manchester, UK
James.Langridge@waters.com