

Immunaffinitetschromatografi-massespektrometri (IA-LC-MS) giver nye dimensioner i analytisk kemi

Immunassays, dvs. analytiske metoder der baserer sig på antigen-antistofreaktioner, omfatter mere end kvantitative fastfase-assays (ELISA). Her omtales metoder, der ved at kombinere immunkemisk selektivitet med massespektrometri løser problemer, som ikke kan løses med ELISA

Af Jette W. Sen¹, Morten Z. Hansen, Niels H. H. Heegaard, Autoimmunafdelingen, Statens Serum Institut

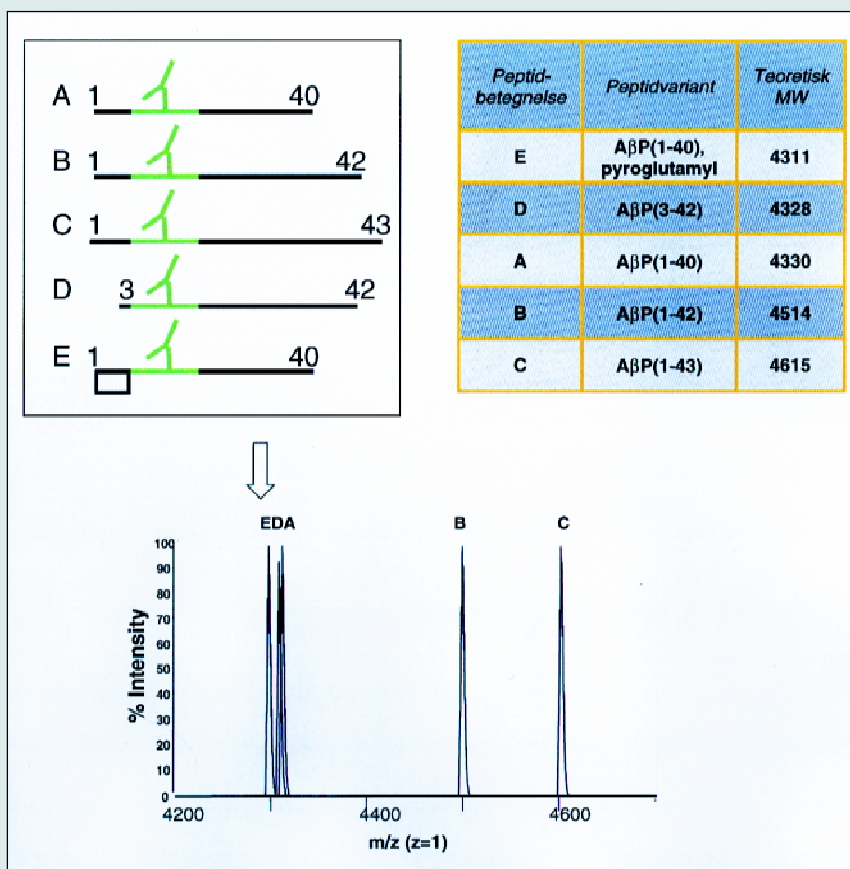
¹ nuværende adresse: Klinisk Biokemisk Afdeling, Rigshospitalet

Antistoffer er proteiner, der specifikt genkender og binder andre molekyler (antigener) i non-kovalente interaktioner. Polyklonale antistoffer induceres ved immuniseringer (vaccinationer), mens monoklonale antistoffer produceres af udødeliggjorte, klonede antistofproducerende enkeltceller fra immuniserede dyr eller individer. Et monoklonalt antistof binder normalt et bestemt område (en epitop) på antigenet, mens et polyklonalt antistof er en samling af forskellige antistofmolekyler, der binder flere forskellige epitoper med flere forskellige bindingsstyrker på antigenet. Antigener, der er delvist forandrede, kan således fortsat binde polyklonale antistoffer, hvis sådanne antigener har genkendelige epitoper (figur 1).

Metoder, der udnytter antigen-antistofreaktioner, er vidt udbredte i analytisk kemi, specielt i form af fastfase enzym-immunosorbent assays (ELISA).

I disse assays udnyttes antistoffer til at måle specifikke analytter i komplicerede biologiske matricer som f.eks. humant serum. Mange forskellige udformninger af metoderne er mulige, men de baserer sig alle på reaktioner mellem antigener og antistoffer (immunaffinitetsreaktioner) og på immobilisering af et af reagenserne på en fast fase [1]. Fastfase-immunassays er automatiserbare, tillader parallel processing af mange prøver, giver et kvantitativt resultat og er relativt lette at udvikle – hvis man har passende antistoffer – og derfor har de stor udbredelse inden for klinisk biokemi.

Problemet med fastfase-immunassays er, at signalet er et udtryk for den samlede reaktion af et antistof med molekyler, der ud over en fællesmængde af epitoper meget vel kan være heterogene. Netop sammensætningen af de reagerende antigener kan ikke vurderes, da den eneste separation, der indgår i fastfase-immunassays, er adskillelsen af kompleksbundne fra frie reagenser. Det kan for proteiner og peptider betyde, at eksempelvis posttranslationelle modifikationer (fosforyleringer, glycosyleringer, deletioner) eller punktmutationer i aminosyresekvensen forbliver uerkendte. Da sådanne molekyllære varianter er interessante ud fra et medicinsk, biologisk og



Figur 1. Forskellige antigener med den samme antistofbindende epitop. Her illustreret skematisk ved fem peptider (amyloid β -peptidvarianter) af varierende længde N- eller C-terminalt eller med N-terminal modifikation. Alle varianter bibeholder en epitop, der genkendes af antistoffet (grønt Y). Poolen af peptider kan isoleres ved brug af antistoffet, hvorefter de enkelte varianter, der adskiller sig mht. masse (tabel) vha. massespektrometri (teoretisk spektrum vist) detekteres og karakteriseres semikvantitativt.

diagnostisk synspunkt, er det ønskværdigt at kunne måle dem specifikt. Fastfase-immunassays kan kun benyttes, hvis der udvikles specifikke (ofte monoklonale) antistoffer for de molekyllære varianter, dvs. hvis man i forvejen har en idé om, hvad man skal lede efter.

Ved at kombinere moderne højopløsnings-separationsmeto-

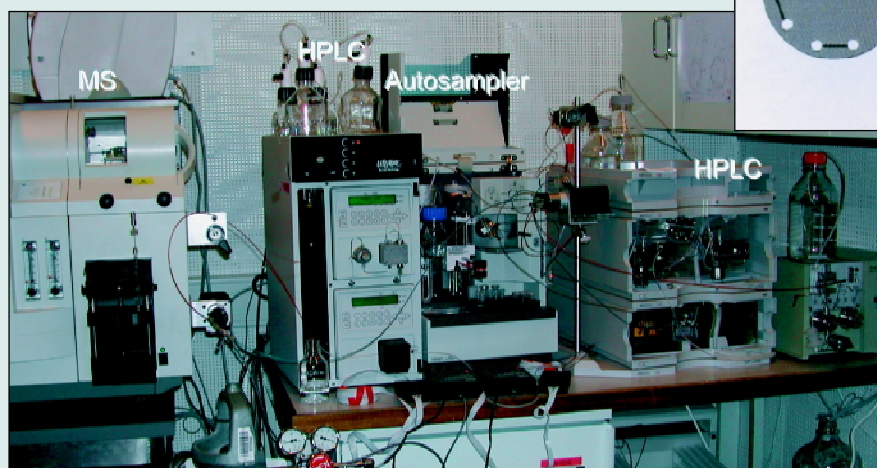
der med immunaffinitetsteknikker i en todimensionel analysestrategi kan man opnå en meget præcis diskrimination af molekulære varianter i en gruppe af molekyler, der alle reagerer med et antistof.

Et skematisk eksempel er vist i figur 1, hvor et anti-peptid-antistof med specificitet for den markerede (grønne) epitop i et peptid binder alle de fem peptider på trods af, at der er forskelle i N- og C-terminaler. Uafhængigt af det faktiske mængdeforhold mellem varianterne vil antistofbindingen resultere i ét signal i en ELISA, nemlig summen af reaktiviteten med alle antistofbindende molekyler. Peptiderne kan til gengæld differentieres med metoder, der separerer på grundlag af masseforskelle (figur 1). Massespektrometri (MS) har i de senere år vist sig at være vigtig for biologisk forskning. Her adskilles molekyler i gasfasen efter deres masser (eller mere præcist efter deres masse/ladningsforhold (m/z)). I forhold til mange andre analytiske metoder (f.eks. gel-elektroforese, størrelseschromatografi og ultracentrifugering) der kan benyttes til at størrelsesadskille molekyler, men ikke magter f.eks. at adskille de fem peptidformer illustreret i figur 1, er MS overlegen mht. præcisionen i massebestemmelsen. MS-målinger gør det muligt, f.eks. i et proteinmolekyle med en masse på omkring 10-15.000, at afgøre, om en enkelt aminosyre er oxideret eller ej, dvs. at adskille molekulmasseforskelle på 16. Ofte er opløsningsevnen endnu højere.

I klinisk biokemiske undersøgelser er man ofte interesseret i at undersøge netop varianter i peptider og proteiner hos patienter i diagnostisk øjemed, og her er den todimensionelle immunaffinitets-MS strategi af stor værdi.

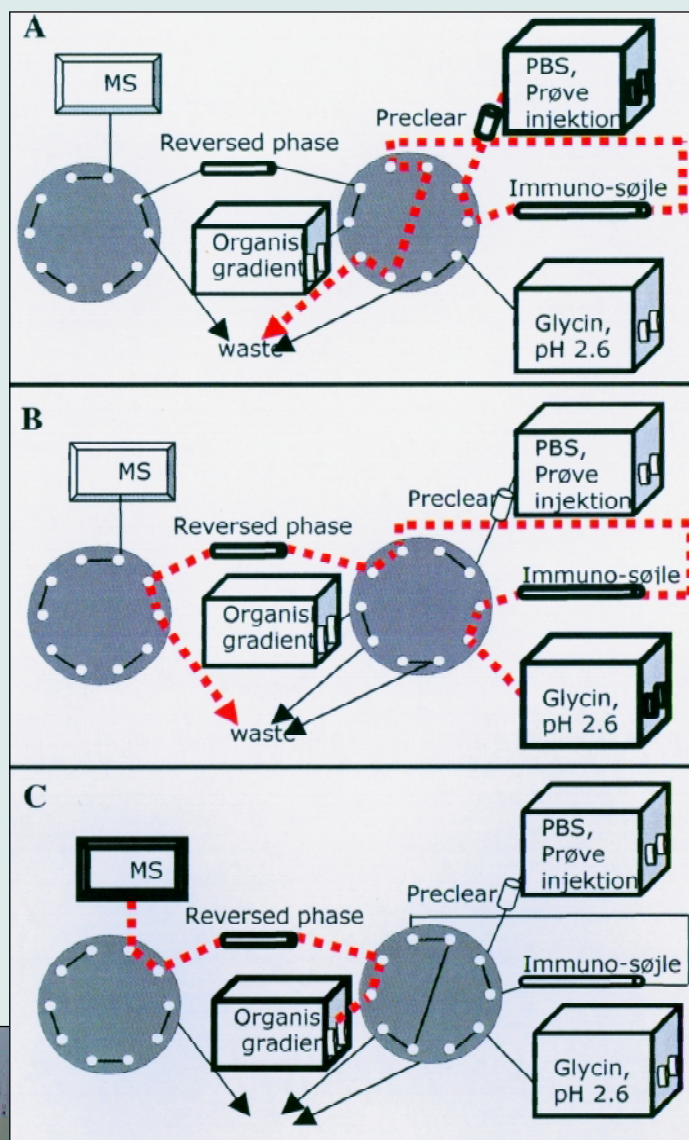
Det todimensionelle immunaffinitetssystem

Det todimensionelle immunaffinitets-MS-system (figur 2 og 3) udnytter flere væskechromatografiske matricers egenskaber til at isolere specifikke analytter fra biologiske væsker såsom



Figur 2. Foto af en IA-LC-MS-opsætning. Prøven injiceres vha. en autosampler ind i systemet. Her møder den først en pre-clear-søjle, dernæst en antistofsøjle og til slut en afsaltningssøjle. To HPLC-anlæg sørger for vækestrømmene af de forskellige buffere og organiske solventer. En principskitse er vist i figur 3.

serum. Først isoleres analytten efter forbehandling af prøven ved passage igennem en såkaldt preclear-søjle (affinitetsmatrice koblet med irrelevant antistof) vha. immunaffinitetschromatografi. Derefter afsaltes prøven på en omvendt fase (reversed phase)-søjle, og til sidst karakteriseres det opfangne materiale ved brug af et massespektrometer forbundet (online) med det chromatografiske system. Det hele foregår i en flertrins, fuldt automatiseret operation [2]. Princippet er illustreret i figur 3. De molekyler, der bindes af antistof-fet immobiliseret på antistofsøjlen, elueres fra antistofsøjlen med lavt pH. Til sidst elueres materialet med en kort organisk



Figur 3. Princippet i det todimensionelle IA-LC-MS-system (som ses i praksis i figur 2) er baseret på tre trin:

- A: Injektion af prøve, f.eks. serum over en immunaffinitets-kolonne der isolerer analytten,
- B: Eluering af immunaffinitetskolonnen over en reversed fasekolonne for afsaltning,
- C: Afsaltning på en reversed fasekolonne med efterfølgende eluering ind i massespektrometret med en kort organisk gradient (3 min).

gradient af acetonitril/myresyre fra omvendt fase-matricsen direkte ind i massespektrometret.

Ved blot at skifte antistof på immunaffinitets-søjlen kan man bruge systemet til selv i meget komplicerede matricer at analysere stort set enhver analyt, mod hvilken der findes anvende-

Teknisk oversættelse – kemi og kemiteknik
 Forskrifter – Datablade – Vejledninger – Afhandlinger
 Engelsk – Fransk – Italiensk – Norsk
Tetralix
 Postboks 323 • 2830 Virum
 Tlf.: 4583 5438 • Fax: 4583 5448 • e-mail: mail@tetralix.dk

lige antistoffer. Man benytter typisk polyklonale antistoffer, idet varianter i et givent protein eller peptid herved kan analyseres, uden at risikere at én af varianterne mangler netop det antistofbindende område (epitop), som f.eks. et monoklonalt antistof kan være afhængigt af.

Hurtig og nem identifikation af transthyretinvarianter i blodprøver

Transthyretin (TTR) er et lille plasmaprotein med en molekylvægt på 13761,4, der bl.a. er ansvarlig for transport af thyroxin og A vitamin. Hos nogle familier ses varianter (punktmutationer i aminosyresekvensen) i dette protein, der fører til alvorlige og dødelige lidelser. Der kendes over 70 forskellige punktmutationer [3]. Normalt diagnosticeres transthyretinmutationer vha. en polymerase chain reaction (PCR), som dog kræver separate primers for hver mutation eller sekventering af PCR-produktet. Ved brug af det beskrevne todimensionelle massespektrometri system kan proteinet og alle varianter, der giver forskelle i molekylmasse, analyseres direkte fra serum som illustreret i figur 4 [2]. Først isoleres transthyretin fra serum vha. immunaффinitetssøjlen, hvorpå der er bundet kanin-antistoffer rettet mod transthyretin. Immunaффinitetssøjlen elures henover reversed phase-søjlen som afsalter proteinet før elueringen ind i massespektrometret. Da antistoffet på immunaффinitetssøjlen er polyklonalt, binder det flere epitoper og flere forskellige isoformer af transthyretin, også varianter.

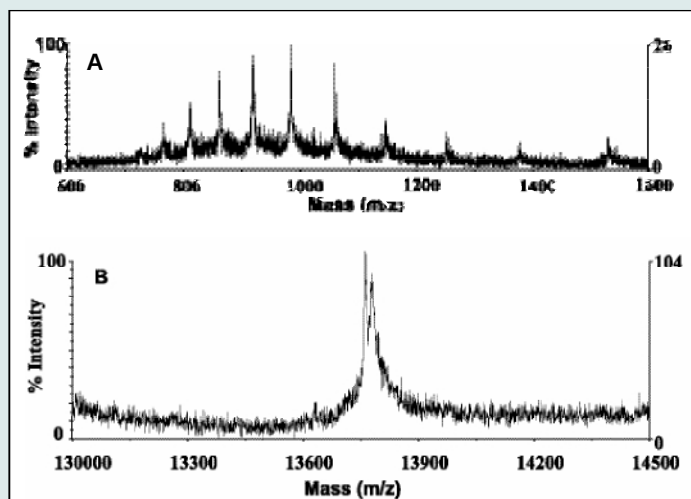
I figur 4 ses transthyretin analyseret direkte fra serum fra en patient og en normal person. Der analyseres 10 µl prøve indeholdende 2,5 µl serum. Som det ses i figur 4, kan mutationen (methionin i stedet for leucin i position 111) pga. masseforskellen på +18 let adskilles fra det normale molekyle. Det ses også, at patienten med variant transthyretin er heterozygot, da både normal (masse = 13761,5) og variant (masse = 13778,2) transthyretin er til stede i spektret i et 1:1 forhold. Et specifikt problem for analysen var, at transthyretin indeholder en fri

cysteinyll som ved oxidation giver anledning til sulfoxider med +16 (O₂) i molekylvægt. Disse former giver anledning til en masseheterogenitet ved den beskrevne analyse, som er vanskelig at differentiere fra mutationen med +18 i massetilvækst. Problemet blev løst ved at reducere serumprøverne inden analyse ved behandling med dithiothreitol.

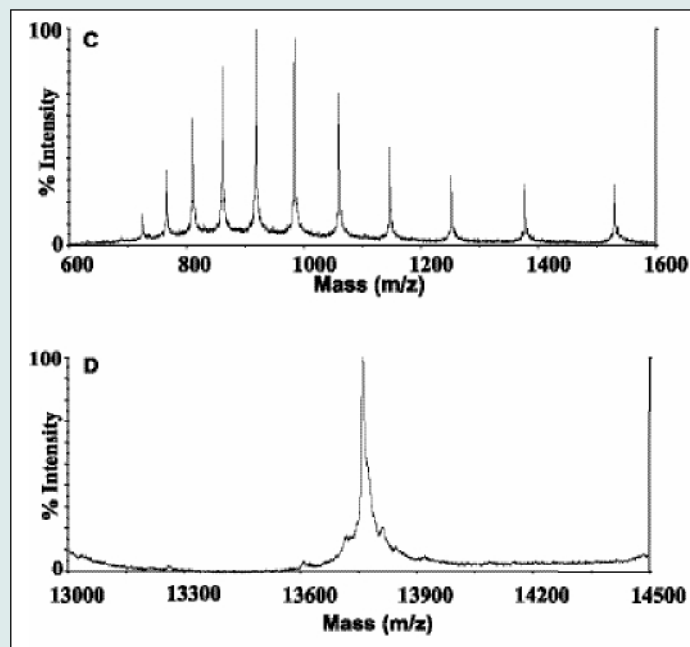
Identifikation af amyloid β-πεπτιδ

Hos patienter med Alzheimers sygdom fælder et specifikt peptid, amyloid β-peptid (AβP) (figur 1), ud i hjernen som uopløselige øjensynligt destruktive ansamlinger (plaques) (figur 5). Det er omdiskuteret, om disse plaques er en følge af eller en årsag til de neurodegenerative forandringer, der ses ved Alzheimers sygdom. Sygdommen kan ikke kureres, men der er nu udviklet medicin med nogen symptomatisk og sygdomsforhalende virkning, så det er vigtigt at kunne skelne disse patienter fra de ca. 100 andre mulige demenstyper. Det er desværre normalt ikke muligt at diagnosticere Alzheimers sygdom før relativt sent i sygdomsforløbet, og der findes endnu ingen specifikke diagnostiske tests baseret på blod- eller cerebrospinalvæskeprøver.

Vi har derfor arbejdet med at udvikle immunaффinitets-MS-metoder, der kan benyttes til at påvise og karakterisere de AβP-varianter, der måtte frigives fra det syge hjernevæv til blod eller cerebrospinalvæske. AβP eksisterer i flere varianter (figur 1), og man ved at nogle få af disse varianter, der typisk er forlænget med 2-3 aminosyrer C-terminalt, er patologiske og tilstrækkeligt uopløselige til at de danner de omtalte hjerneplaques. Da hjernen er badet i cerebrospinalvæske, reflekterer væskens indhold af peptider og proteiner til en vis grad hjernevævet tilstand. Aβ-peptid varianternes nedsatte tilstedeværelse i cerebrospinalvæsken (formentlig som følge af udfældning i



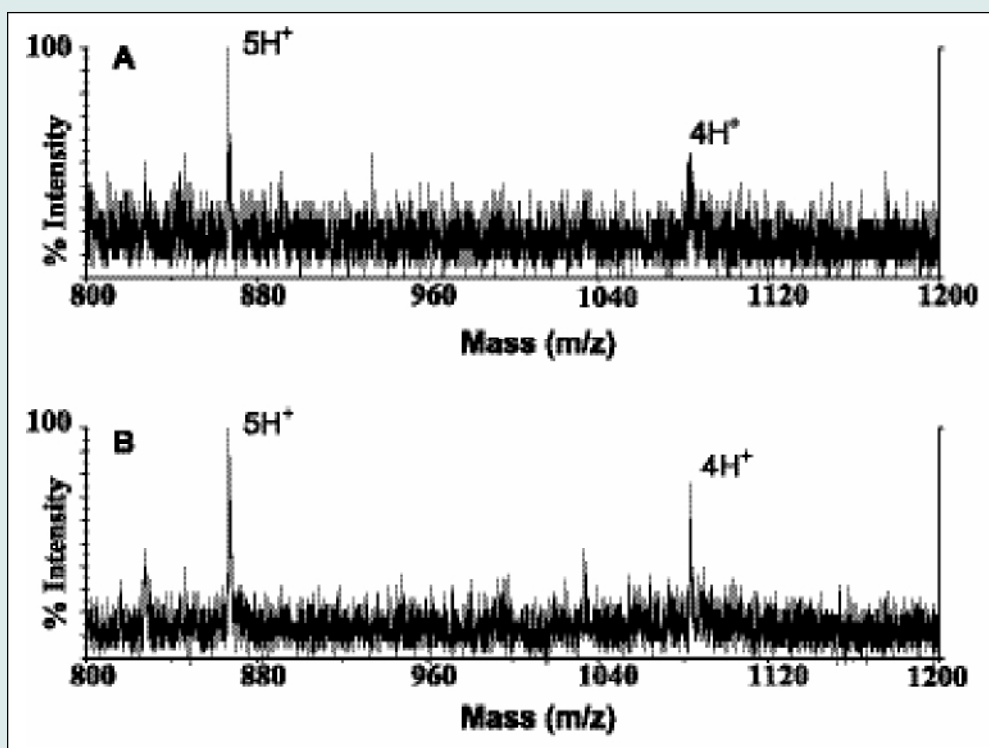
TTR isoform	Teoretisk MW	Observeret MW
Normal	13761,4	13761,5
Leu111Met	13779,4	13778,2



TTR isoform	Teoretisk MW	Observeret MW
Normal	13761,4	13761,3

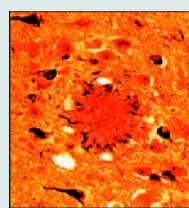
Figur 4. Massespektre af transthyretin (TTR) efter analyse direkte fra serum vha. immunaффinitets-massespektrometri (kanin-antitranssthyretinantistof fra DAKO A/S). Begge prøver er fortyndet 4 x i fosfat-bufret saltvand, pH 7.4 indeholdende 10 mM dithiothreitol. A og B: 10 µl prøve fra patient heterozygot for en transthyretinmutation. A, rådata (intensitet som funktion af masse/ladnings (m/z)-værdier). B, afledte masser fra forsøget i A.

C og D: 10 µl serumprøve fra normalt individ forbehandlet på samme måde som beskrevet for patientprøven. C, rådata. D: afledte masser fra forsøget i C.



Figur 5. Massespektre af AβP(1-40) analyseret fra cerebrospinalvæske fra ikke-demente individer. Antistoffer var monoclonale antistoffer (Hyb 310 serie fra Statens Serum Institut (AntibodyShop A/S)). Hhv. 600 µl og 900 µl cerebrospinalvæske blev injiceret i A og B. Der ses 4H⁺- og 5H⁺-toppe fra endogen AβP i begge prøver (figur modificeret fra [2]).
Indsat er et billede af et mikroskopipræparat af et sølvfarvet hjernesnit, der viser et plaque omgivet af et antal (sorte) døde nerveceller (Selkoe DJ, Nature 1999, suppl., A23-A31).

Ladning	Teoretisk MW	Observeret MW (A)	Observeret MW (B)
5H ⁺	867,0	866,9	867,1
4H ⁺	1083,5	10883,6	1083,5



plaques) kan da også støtte diagnosen, men ikke specifikt nok til at niveauerne af de 42 og 43 aminosyrer lange Aβ-peptider kan bruges til sikkert at adskille Alzheimer-patienter fra andre former for demens.

Det er kun et begrænset antal af de kendte AβP-varianter, der er undersøgt, idet de traditionelle metoder såsom ELISA kræver variantspecifikke monoclonale antistoffer. Med det beskrevne immunaffinitets-MS-system er det i princippet muligt at isolere hele poolen af Aβ-peptidvarianter fra serum eller cerebrospinalvæske med bredt reagerende antistoffer. Efterfølgende karakteriseres alle peptidvarianterne samtidig med massespektrometri. En sådan immunaffinitets-MS måling af Aβ-peptider er vist i figur 5, hvor cerebrospinalvæske fra to ikke-demente neurologiske patienter, dvs. patienter, hvor Alzheimers sygdom ikke mistænkes, er undersøgt for massevarianter af AβP. Isoleret på denne måde ses i figur 5A og 5B massespektre fra AβP med en længde på 40 aminosyrer. Arbejdet fortsætter nu med analyse af prøver fra demenspatienter. Det er dog stadig en udfordring at gøre systemet sensitivt nok til at kunne analysere de øvrige varianter, der findes i meget lave koncentrationer (pM-nM) i både cerebrospinalvæske og serum.

Konklusioner

Udnyttelse af antistoffers selektivitet i kombination med den moderne massespektrometris høje opløsningsevne og præcision gør det muligt at forenkle, forbedre og forfine vævsvæske-baserede diagnostiske metoder. De to (eller tre) dimensioner udgøres af immunreagenser (antistoffer) til selektion, reversed phase chromatografi til afsaltning og massespektrometri til detektion. Molekylære varianter af et specifikt protein eller peptid (også i meget lave koncentrationer), i komplicerede

biologiske prøvematrixer med hundredvis af andre proteiner og peptider, kan på denne måde karakteriseres i et modulært system, hvor antistofferne let kan udskiftes. Systemet har ud over de diagnostiske formål også store muligheder for at give informationer af mere basal betydning for forståelse af normale og patologiske biologiske mekanismer.

Taksigelser

Det her beskrevne arbejde har modtaget økonomisk støtte fra M.L. Jørgensen og Gunnar Hansens Fond, Apotekerfonden af 1991, Lundbeckfonden og Fonden til Lægevidenskabens Fremme. JWS har modtaget støtte fra Forskerakademiet. Samarbejdet med Peter Roepstorff, Syddansk Universitet, Odense, Gunhild Waldemar, Rigshospitalet og Mogens Holst Nissen, Panuminstituttet er højt skattet og har været uvurderligt for projekternes gennemførelse.

E-mail-adresser:

Jette W. Sen: jwsen@rh.dk
Morten Z. Hansen: mzh@ssi.dk
Niels H.H. Heegaard: nhe@ssi.dk

Referencer

- Wild D (Ed.) *The Immunoassay Handbook*. 2 ed. London: Nature Publishing Group, 2001.
- Sen JW, Bergen HR, III, Heegaard NHH. On-line immunoaffinity-liquid chromatography-mass spectrometry for identification of amyloid disease markers in biological fluids. *Anal Chem* 2003; 75(5):1196-1202.
- Connors LH, Richardson AM, Théberge R, Costello CE. Tabulation of transthyretin (TTR) variants as of 1/1/2000. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 2000; 7:54-69.

