

Vissen naar biomarkers met LC-MS

Biomarkers zijn karakteristieke biomoleculen in lichaamsvloeistoffen die een ziekte snel en eenvoudig kunnen aantonen. Vloeistofchromatografie speelt in de zoektocht naar deze biomarkers een steeds grotere rol.

Door Els van den Brink, gepubliceerd in chromatografiespecial van C2W, 3 september 2005.

Een ziekte zoals kanker beïnvloedt altijd de fysiologie van een aantal cellen in het menselijke lichaam. Als gevolg daarvan veranderen de concentraties van karakteristieke eiwitten in lichaamsvloeistoffen zoals bloed of urine. Op basis van de concentraties van deze 'biomarkers' is het dus in principe mogelijk om een diagnose te stellen of het effect van een behandeling te meten. Dat zou voor patiënten een stuk minder belastend zijn dan onderzoeken met bijvoorbeeld MRI-scans die nu vaak nodig zijn. Theo Luider, hoofd van het laboratorium Neuro-Oncologie en Proteomics coördinator van het Center for Biomics, Erasmus MC in Rotterdam, werkt er samen met zijn collega's hard aan om het aantal betrouwbare biomarkers uit te breiden, met name voor patiënten met hersentumoren. Daarvoor maakt hij gebruik van een combinatie van vloeistofchromatografie en massaspectrometrie (LC-MS).

Orde van grootte

Het idee klinkt redelijk eenvoudig. Vergelijk de eiwitpatronen van gezonde mensen met die van een bepaalde patiëntengroep en zoek de belangrijkste verschillen. De eiwitten met de grootste concentratieverschillen zijn de kandidaat-biomarkers. Technisch gezien is dat echter een enorme uitdaging, met name op het gebied van eiwitscheiding. "Als je niet weet waar je naar zoekt, is het lastig om te zuiveren", zegt Luider. Om van te voren niks uit te sluiten, is het belangrijk om zo veel mogelijk van de voorkomende eiwitten in de analyse mee te nemen. En dat zijn er nogal wat. Een mens heeft ongeveer dertigduizend genen, maar het aantal verschillende eiwitten kan wel het honderdvoudige daarvan zijn. Bijkomend probleem is de enorme dynamiek in de eiwitconcentraties. Vooral in bloed en urine kunnen deze concentraties zeer ver uit elkaar liggen. "Het concentratieverschil kan wel twaalf ordes van grootte zijn", vertelt Luider. "Het gevaar is dus dat je vooral eiwitten ziet met een hoge expressie en andere eiwitten mist."

De bekendste methode voor zo'n proteomics-aanpak is tweedimensionale gel electroforese. Deze techniek is echter minder geschikt voor toepassing bij lichaamsvloeistoffen vanwege de grote concentratieverschillen. Bovendien is deze techniek vrij arbeidsintensief. "Als je met patiëntenmateriaal werkt, wil je graag een heel simpele en snelle technologie, anders kom je nooit aan grote aantallen", legt Luider uit. Vloeistofchromatografie (LC) werkt hiervoor beter. Het Center for Biomics in Rotterdam heeft een aantal speciale nano-LC kolommen die ook gekoppeld kunnen worden om tweedimensionale vloeistofchromatografie te doen. Door automatisering kunnen verschillende monsters achter elkaar gefractioneerd worden en daarna gemeten worden in de massaspectrometer.

Patiëntenmateriaal

Voor zijn onderzoek naar hersentumoren gebruikt Luider verschillende soorten patiëntenmateriaal. De meest geschikte lichaamsvloeistof is ruggenmergvloeistof. Hersentumoren worden namelijk volledig omringd door deze vloeistof. Vandaar dat hierin de grootste effecten zijn te verwachten. Probleem is alleen dat deze vloeistof niet zomaar wordt afgenomen bij patiënten. Dat gebeurt alleen bij een duidelijke medische aanleiding, bijvoorbeeld om te controleren op uitzaaiingen bij borstkankerpatiënten. Vandaar dat Luider ook regelmatig bloedmonsters gebruikt. Soms kan het efficiënter zijn om de zoektocht naar biomarkers te beginnen bij het tumorweefsel zelf. Luider gebruikt daarvoor laser-microdissectie, waarmee hij heel precies een aantal tumorcellen kan uitsnijden. Hiervoor worden plakjes weefsel op een membraan onder de microscoop gelegd, waar vervolgens

met een laser op geschoten kan worden. Een groepje van 125 tot 1000 cellen is al voldoende om een goede analyse op te doen. Voordeel van deze techniek is dat de resultaten niet worden verstoord door andere cellen die ook in de tumor aanwezig zijn zoals endotheelcellen of macrofagen. De concentratieverschillen binnen een cel zijn veel kleiner dan in lichaamsvloeistof, waardoor de kans groter is om een biomarker ertussenuit te vissen. Is een kandidaat-biomarker eenmaal geïdentificeerd in tumorweefsel, dan kan vervolgens onderzocht worden of dit biomolecuul ook te vinden is in lichaamsvloeistoffen, waar uiteindelijk de beoogde diagnostische testen voor opgezet moeten worden.

Peptidenniveau

Is het patiëntenmateriaal eenmaal voorhanden, dan kan het echte werk beginnen. De eerste experimentele stap is het verwijderen van overheersende eiwitten zoals albumine. Dat kan bijvoorbeeld met een Agilent kolom met antilichamen tegen albumine en enkele andere veel voorkomende eiwitten. Luider plaatst daarbij direct wel een kanttekening: "Albumine is een transporteiwit. Daar kan dus ook van alles in zitten. Weghalen heeft dus wel het risico dat je het kind met het badwater weggooit."

De volgende stap is een trypsinebehandeling om alle eiwitten in kleine stukjes te knippen. Bij de traditionele aanpak gebeurt dit pas na de eiwitscheiding door tweedimensionale elektroforese. Dat is in dit geval echter niet mogelijk, omdat grotere eiwitten op de kolom kunnen ontvouwen door de lage pH en het organische oplosmiddel dat aanwezig is bij LC-MS.

Ondanks de geautomatiseerde uitvoering van de LC-MS analyses is het nog steeds te veel werk om dit voor een honderdtal patiëntenmonsters te gebruiken. Daarom doet Luider in eerste instantie een grove analyse voor alle monsters door de peptidenmengsels direct te meten met massaspectrometrie, zonder voorafgaande fractionering. Op basis van deze eerste metingen kiest hij dan een beperkt aantal monsters die hij in meer detail wil onderzoeken met LC-MS. Een monolytische LC-kolom is het meest geschikt voor een dergelijke peptidenscheiding vanwege de korte scheidingstijd.

Luider heeft daarnaast een alternatieve scheidingsmethode in huis, die nog meer dan vloeistofchromatografie geschikt is voor grote aantallen monsters. Deze ClinProt Robot technologie (Bruker Daltonics) maakt gebruik van magnetische bolletjes met een functioneel oppervlak om eiwitzuiveringen uit te voeren. Net als bij chromatografische kolommen zijn er verschillende varianten beschikbaar, zoals magnetische bolletjes met een C18-, koper-, ijzer- of een specifiek antilichaamoppervlak. Nadat eiwitten aan deze magneet bolletjes gebonden zijn, zorgt de robot ervoor dat ze worden gewassen en overgebracht op een targetplaat voor massaspectrometrie. Luider gebruikt deze techniek nu vooral als voorzuivering, maar in principe is deze techniek ook geschikt voor het fractioneren van peptidenmengsels.

Massa's spectra

Voor de identificatie van de verschillende peptiden gebruikt Luider vooral een MALDI-TOF/TOF massaspectrometer. Hij legt uit: "Dit apparaat heeft als voordeel dat het volledig geautomatiseerd werkt, waardoor je in één nacht wel vierhonderd monsters kan meten. Alleen is de intensiteit van de pieken meer variabel. Daarom is het nodig om meerdere keren dezelfde meting te doen."

Uiteindelijk leveren al deze metingen een enorme hoeveelheid data op. Een onderzoek aan honderd verschillende patiëntenmonsters kan uiteindelijk wel enkele duizenden massaspectra opleveren. Met speciale software analyseert Luider deze spectra om de peptiden te vinden die verschillende signalen geven voor verschillende patiëntengroepen. Dat hoeven nog lang niet allemaal biomarkers te zijn. Door natuurlijke variatie kan de concentratie van eiwitten en peptiden tussen individuen soms wel met veertig procent verschillen. Sommige verschillen hebben ook te maken met de herkomst van de monsters. Een andere manier van opslag, het ziekenhuis waar het is afgenomen, de datum en het tijdstip van de afname, het kan allemaal effect hebben op het uiteindelijke peptidenpatroon. "Zolang je het maar weet, zijn zulke verschillen niet erg", zegt Luider. "Dan kun je het als parameter meenemen in de analyse." Maar het is wel heel belangrijk om alle kandidaat-

biomarkers vervolgens te valideren, door terug te gaan naar het ziekenhuis en monsters te testen van een nieuwe patiëntengroep met dezelfde ziekte.

Kandidaat

Onlangs ontdekte Luider met behulp van deze technologie een nieuwe kandidaat-biomarker voor hersentumoren. Samen met zijn collega's isoleerde hij een aantal cellen uit de bloedvatwanden in hersentumoren. Het bleek dat het eiwit *l*-caldesmon hier voorkwam in een paar afwijkende isovormen. Vervolgens onderzochten ze bloedserum van deze patiënten. Ook daar konden ze deze *l*-caldesmon-varianten vinden. Luider hoopt deze kandidaat-biomarker nu op korte termijn te valideren bij een grote groep patiënten. Het is nog de vraag waarom *l*-caldesmon, een eiwit dat bindt aan het cytoskelet van een cel, in deze afwijkende vorm voorkomt in hersentumoren. "Die kennis is wel van belang om een ziekteproces te begrijpen, maar niet noodzakelijk voor de betrouwbaarheid van een biomarker", stelt Luider. Vanwege de enorme hoeveelheid complexe data die LC-MS oplevert wordt deze techniek nog niet heel breed toegepast in het onderzoek naar biomarkers. Maar Luider verwacht dat dat in de toekomst gaat veranderen. "De software staat nu nog in de kinderschoenen, maar wordt steeds verder ontwikkeld. Nu wordt deze LC-MS nog niet grootschalig gebruikt, maar dat zal zeker komen."

© Copyright: Els van den Brink, Life & Science Producties