



CEITEC



Central European Institute of Technology

BRNO | CZECH REPUBLIC

Cesta hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF z vědeckých laboratoří do klinické diagnostiky

Mgr. Ondrej Šedo, Ph.D.

CORE122
19. 4. 2024



EUROPEAN UNION
EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND
INVESTING IN YOUR FUTURE



**OP Research and
Development for Innovation**



1. Základní pojmy

2. Historie a princip MALDI-TOF MS

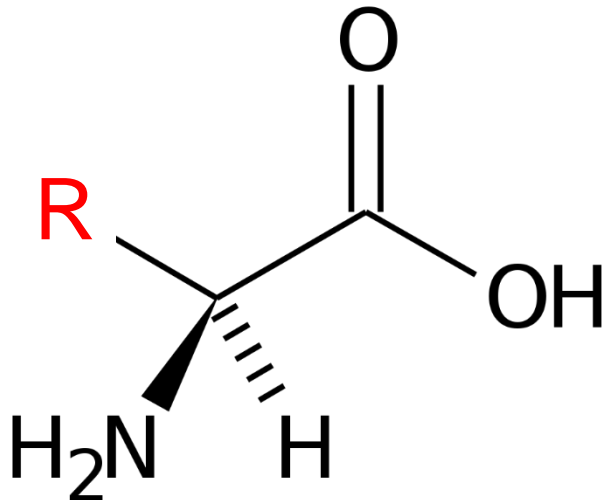
3. Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

4. MALDI-TOF MS profilování v klinické diagnostice

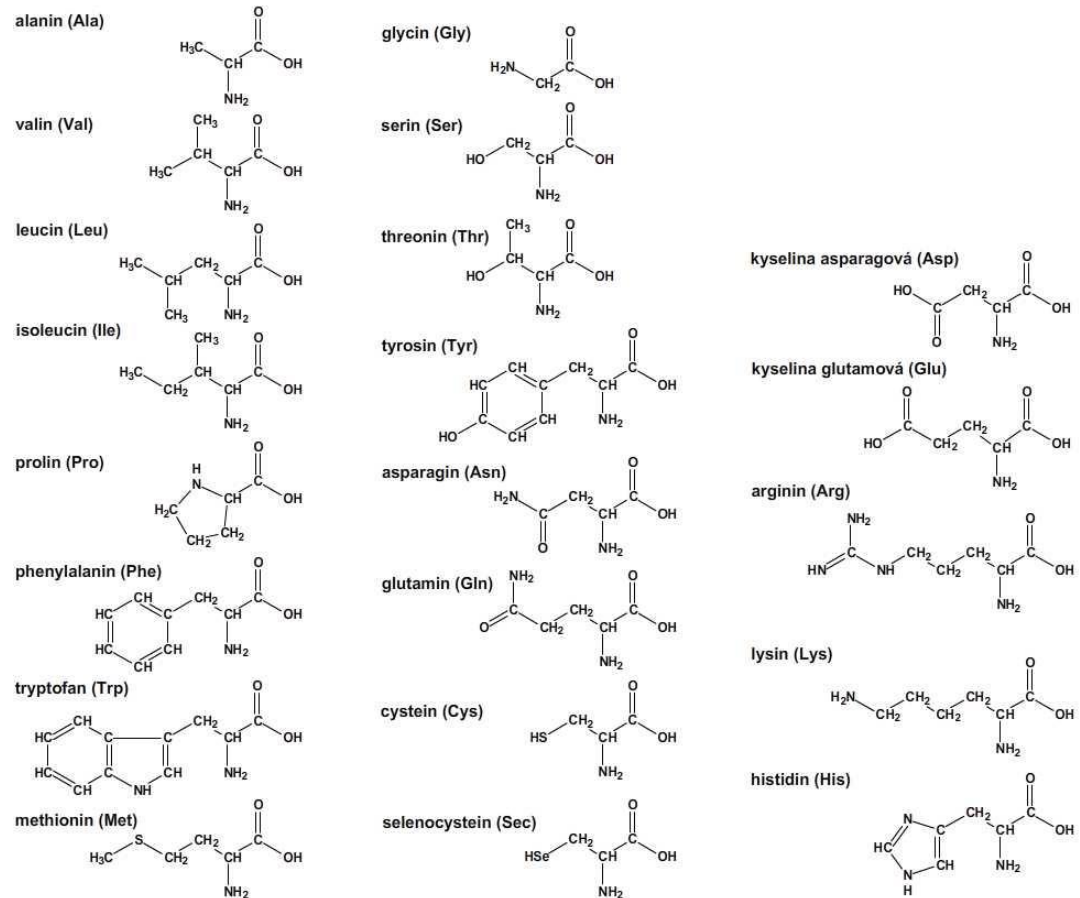
5. Vývoj nové aplikace MALDI-TOF MS profilování

Bílkoviny = Proteiny

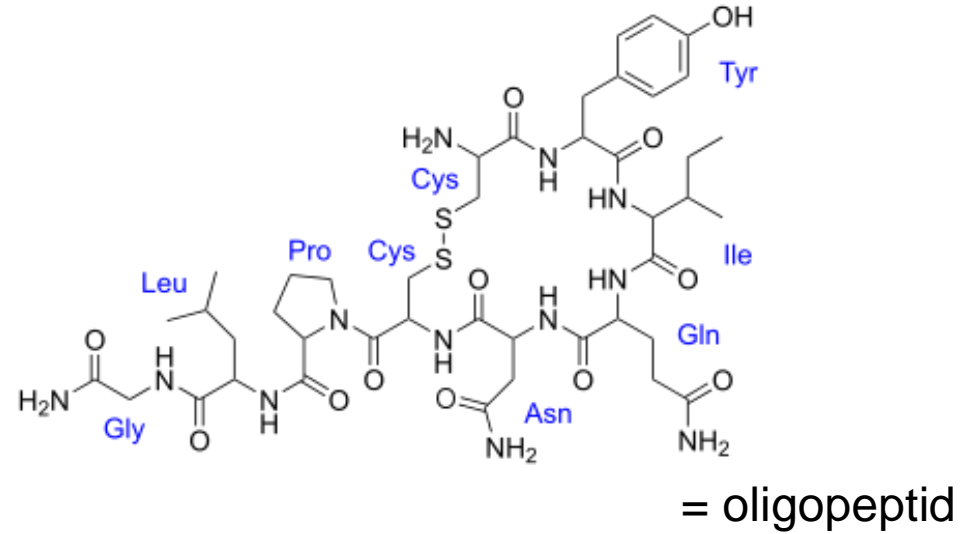
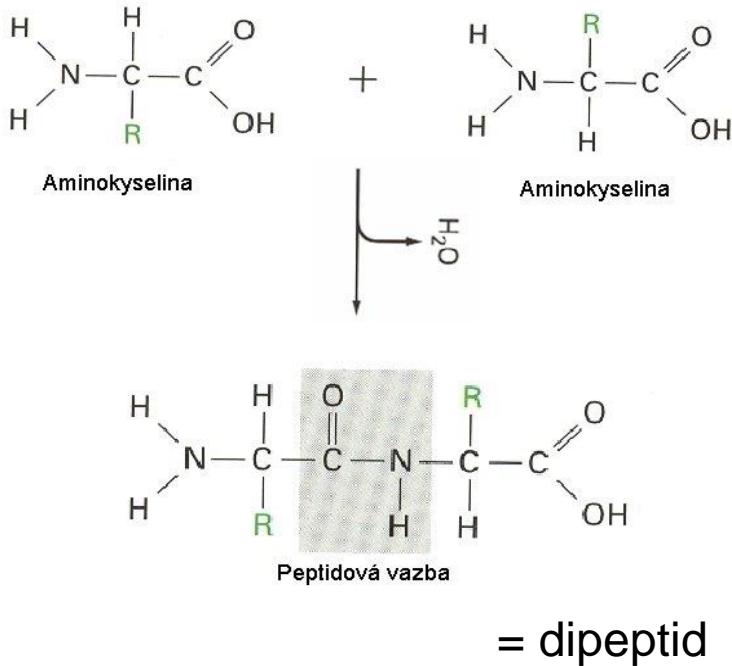
Aminokyselina:

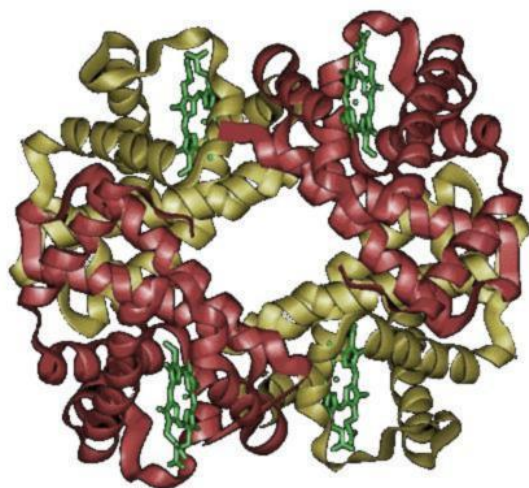


Přehled základních aminokyselin



Peptidová vazba:





= bílkovina/protein

Funkce proteinů:

Stavební (kolagen, keratin)

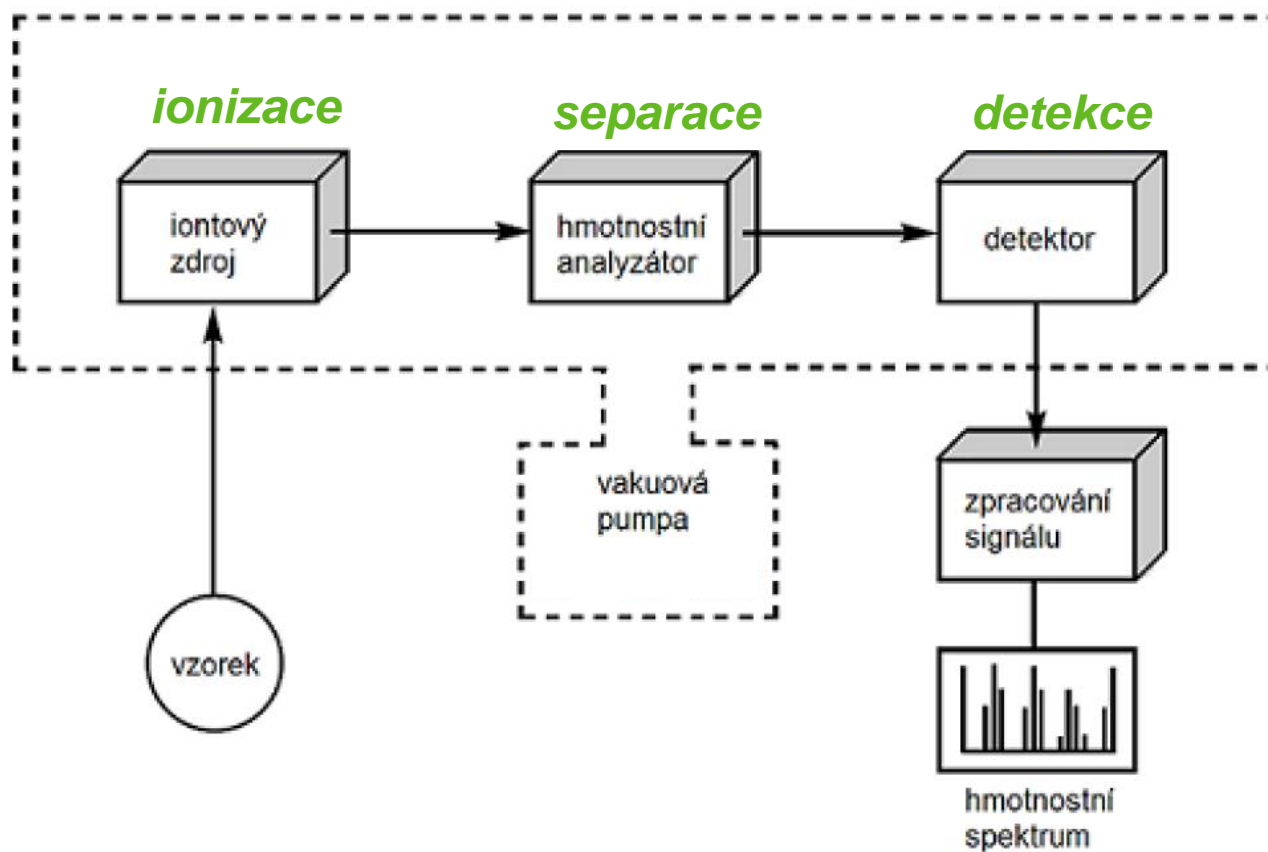
Transportní (hemoglobin)

Katalytické, řídicí a regulační (enzymy)

Ochranné a obranné (imunoglobuliny)

Zajišťující pohyb (aktin, myosin)

Hmotnostní spektrometrie (MS – Mass Spectrometry):



1. Základní pojmy

2. Historie a princip MALDI-TOF MS

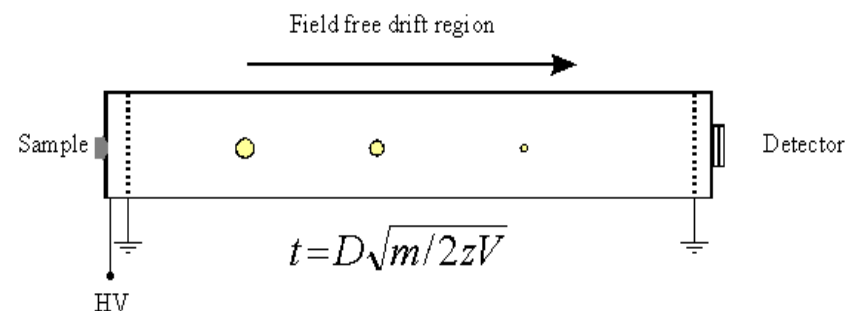
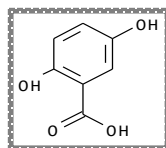
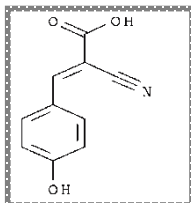
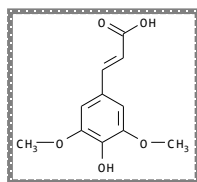
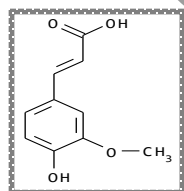
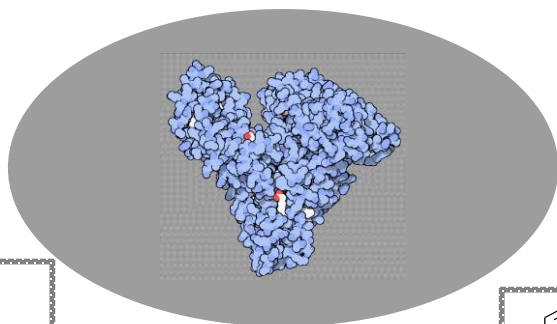
3. Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

4. MALDI-TOF MS profilování v klinické diagnostice

5. Vývoj nové aplikace MALDI-TOF MS profilování

- MALDI-TOF MS = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - - Time of Flight Mass Spectrometry

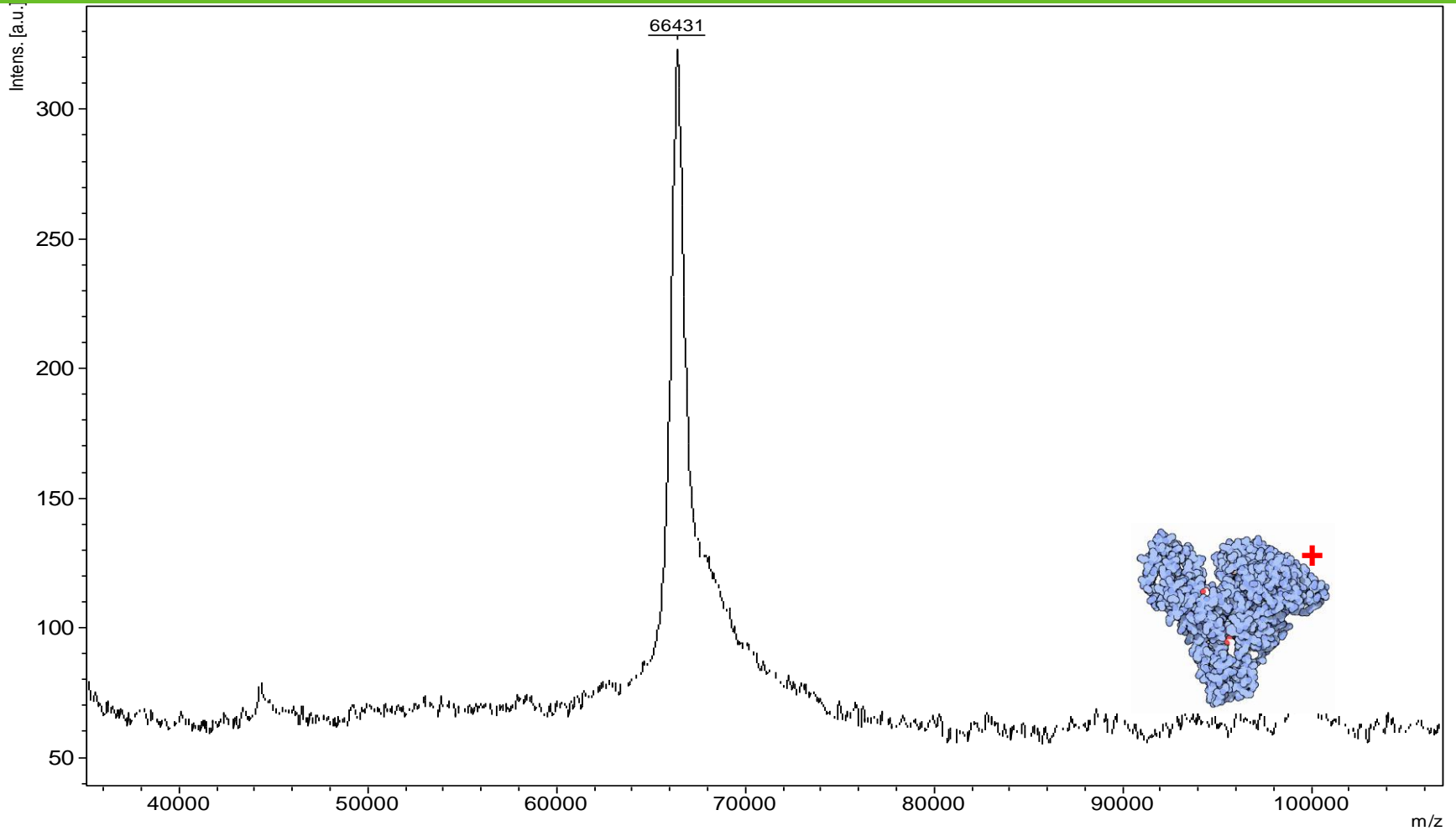
Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací
s průletovým analyzátozem



Princip MALDI-TOF MS

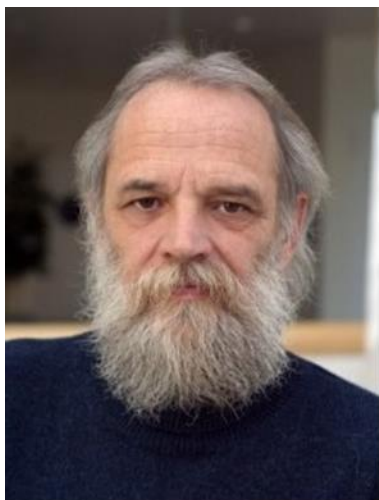
Analýza intaktních molekul

Hmotnostní spektrum

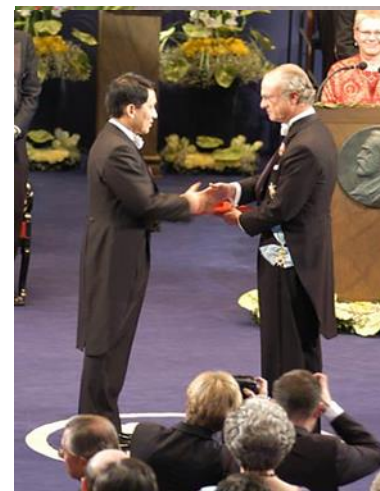


Princip MALDI-TOF MS

Objevitelé

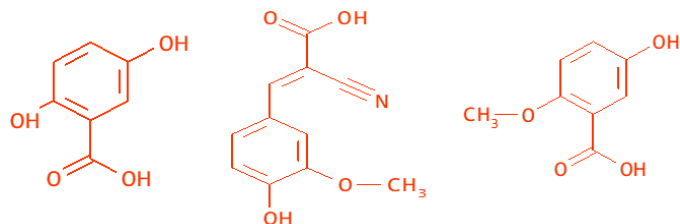


Michael Karas, Franz Hillenkamp



Koiči Tanaka

**MALDI
matrice:**



nano-kobalt, glycerol

Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F., *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Proc.* 78 (1987) 53.
Tanaka K., Waki H. Ido Y., Akita S. Yoshida Y. Yoshida T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2 (1988) 2.

1. Základní pojmy

2. Historie a princip MALDI-TOF MS

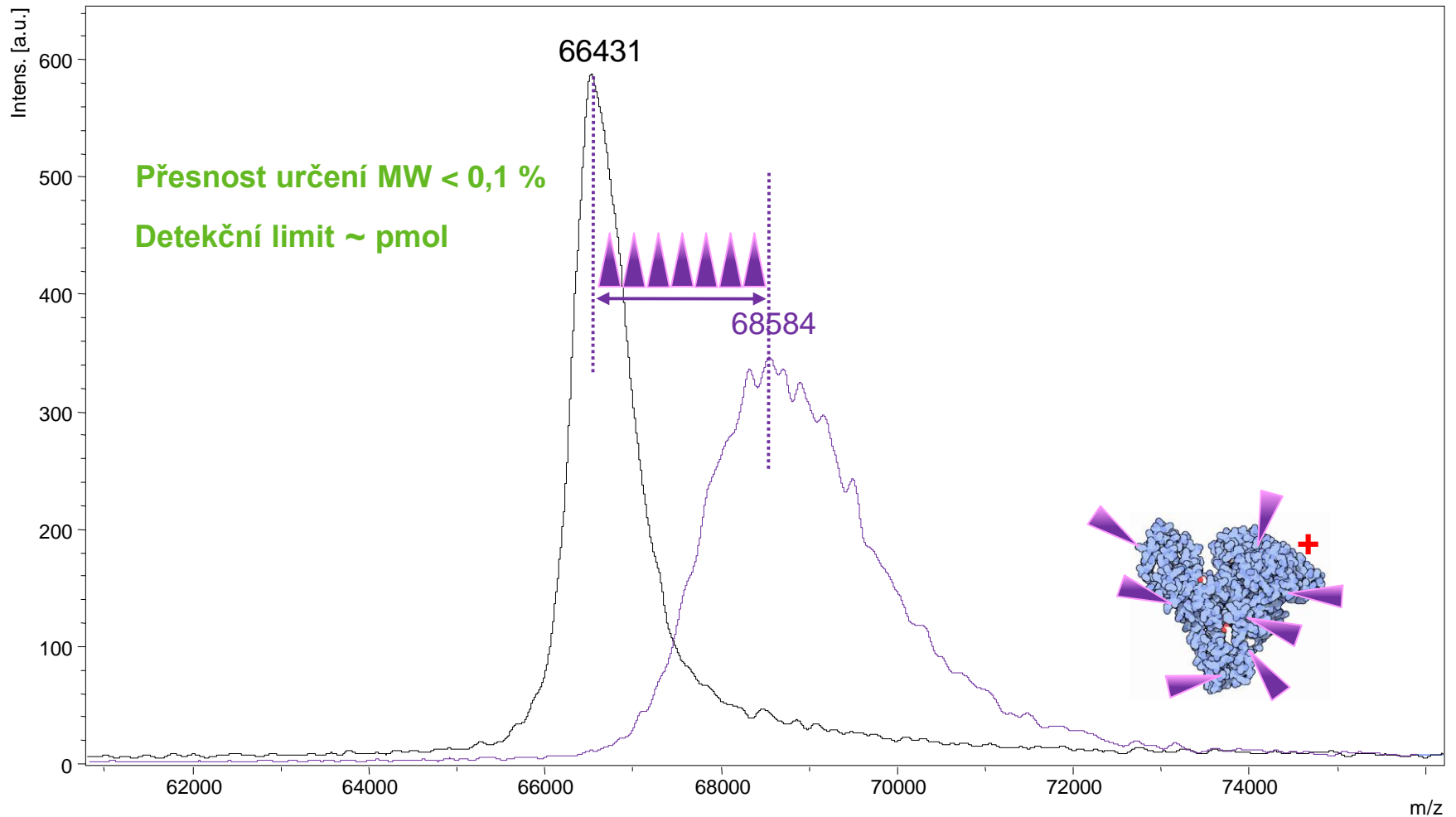
3. Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

4. MALDI-TOF MS profilování v klinické diagnostice

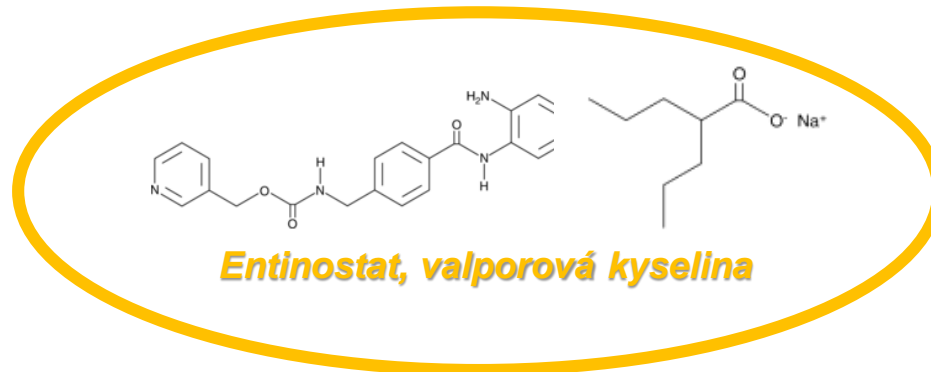
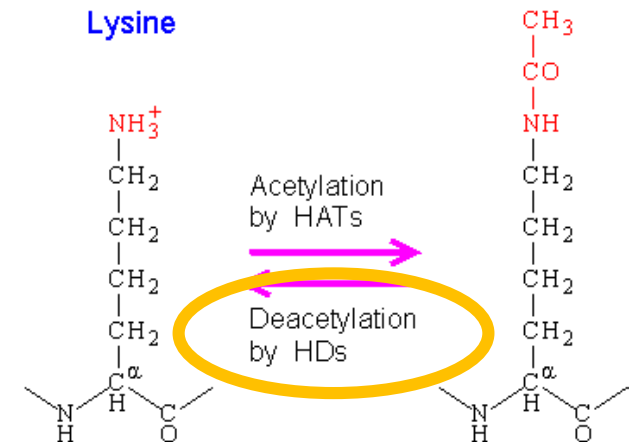
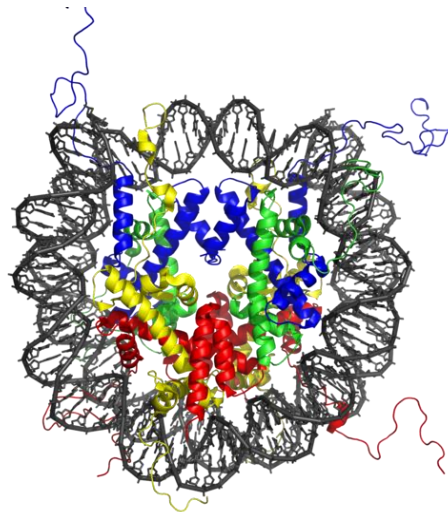
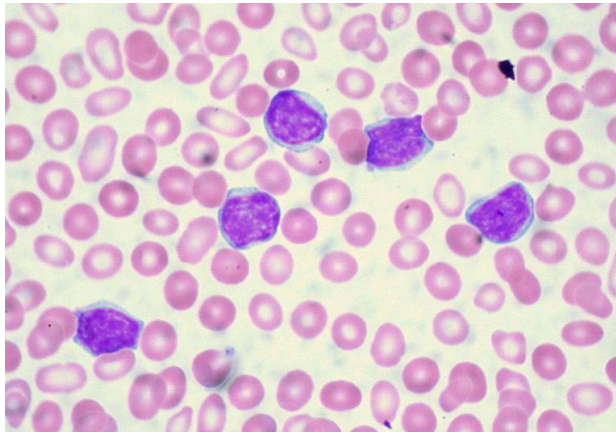
5. Vývoj nové aplikace MALDI-TOF MS profilování

Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení počtu modifikací proteinu: albumin



Chronická lymfatická leukémie

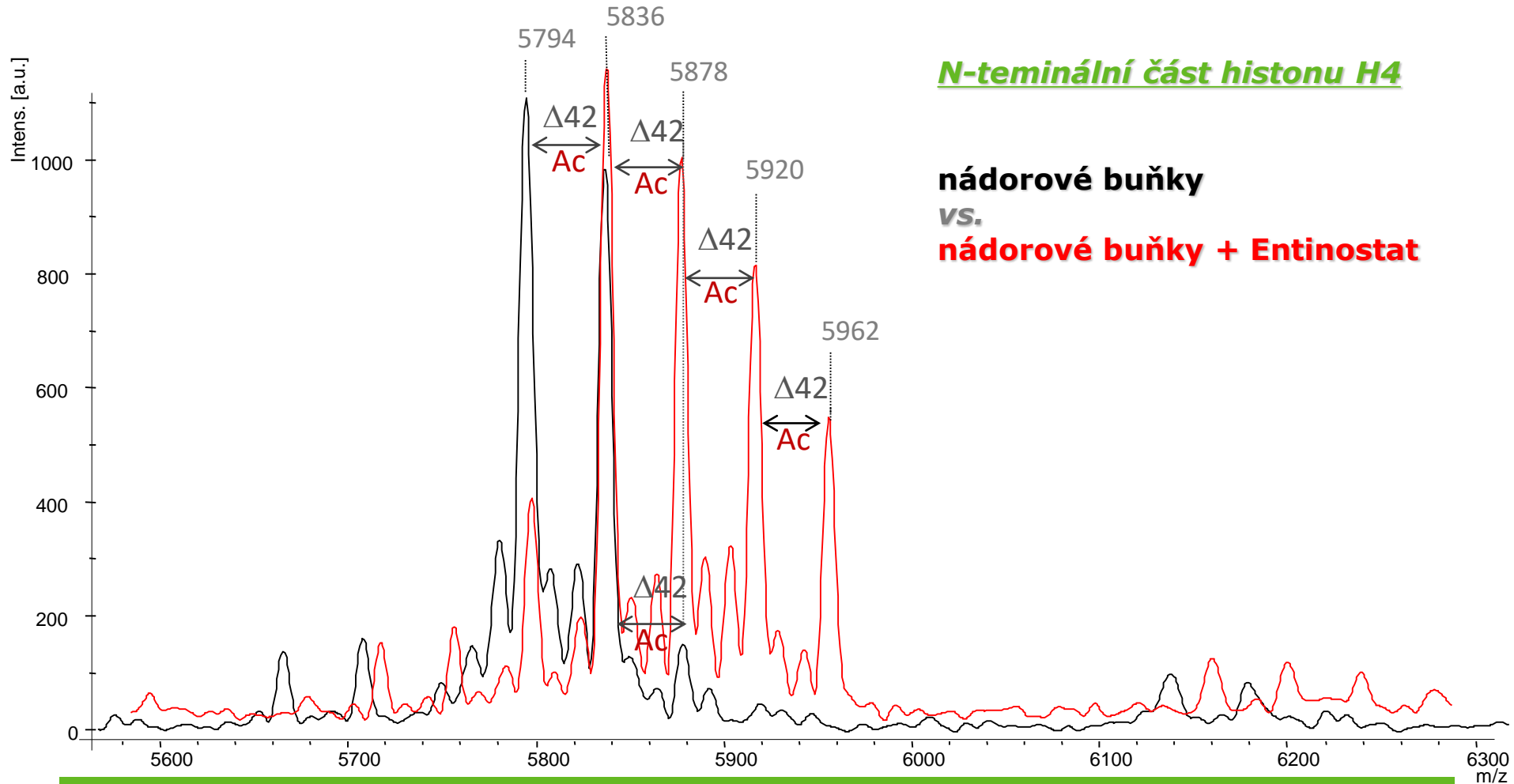


Převzato z:

veda.cz
 wikipedia.org
 healthpic.tk

Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení počtu modifikací proteinu: Působení inhibitorů deacetyláz na histony

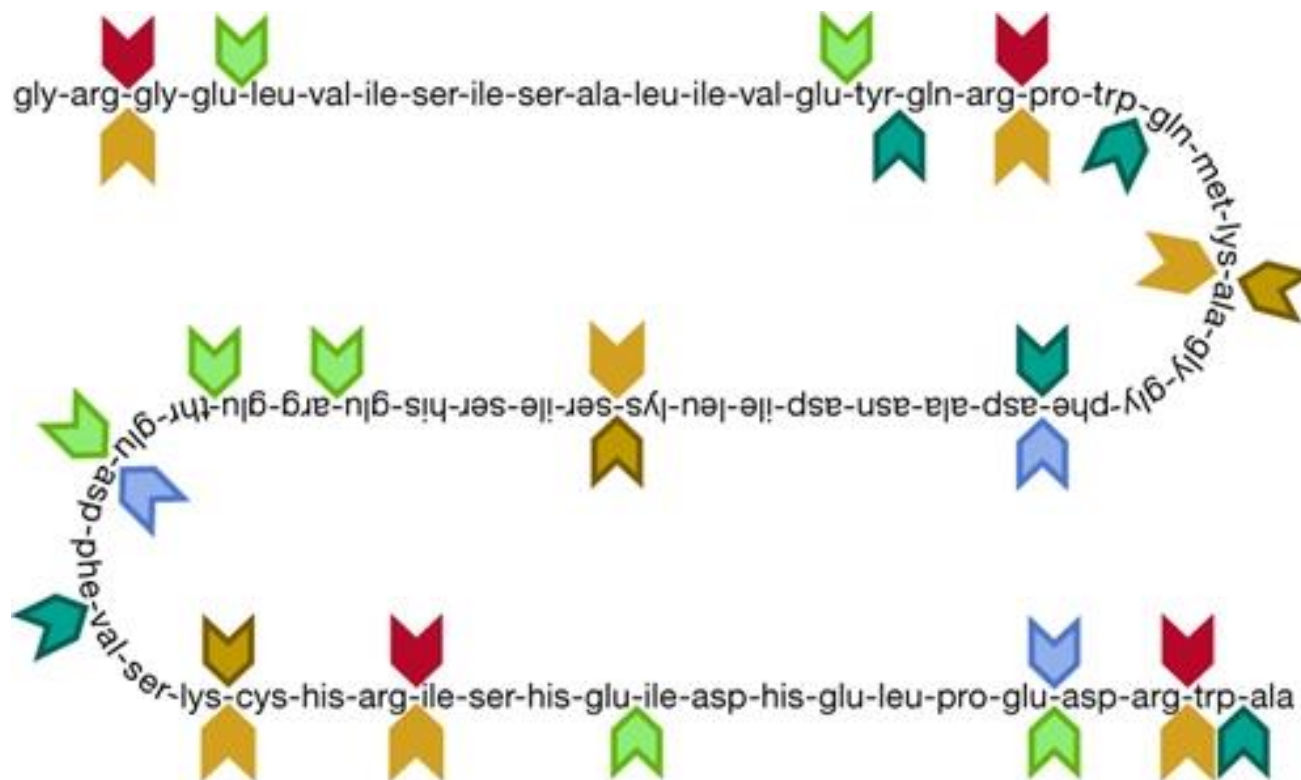


Činčárová L., Lochmanová G., Nováková K., Šultésová P., Konečná H., Fajkusová L., Fajkus J.
Zdráhal Z., *Mol BioSys* 8 (2012) 2937.

Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

Peptidové mapování

Proteolýza pomocí enzymů



■ Arg-C, Sequencing Grade
■ Glu-C, Sequencing Grade
■ Asp-N, Sequencing Grade

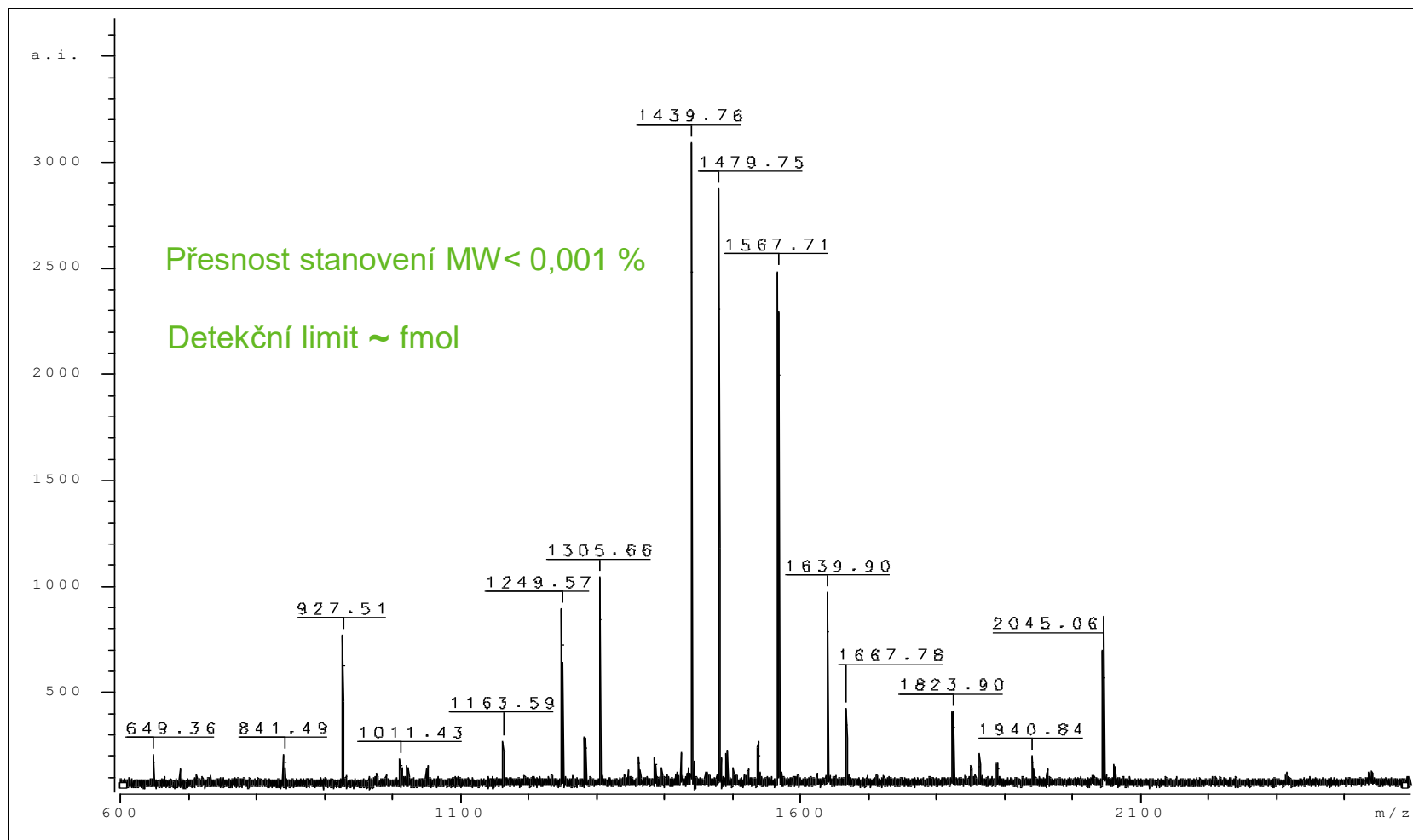
■ Trypsin Gold, Sequencing Grade Modified Trypsin, Immobilized Trypsin
■ Chymotrypsin, Sequencing Grade
■ Endoproteinase Lys-C, Sequencing Grade/rLys-C, Mass Spec Grade

803216E

Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

Peptidové mapování

Detekce peptidů pomocí MALDI-TOF MS



Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

Peptidové mapování

Databázové vyhledávání



Peptide Mass Fingerprint

URL:
[Matrix Science home page](http://www.matrixscience.com/cgi/nph-mascot.exe?1)

User Name: Email:

Search Title:

Taxonomy:

Database: Enzyme:

Global Modifications:

Variable Modifications:

Protein MW >=: kDa Missed Cleavages <=:

Mass Tol. MS: ppm

Mass values: MH⁺ M_r Monoisotopic Average

Data file:

Query Data:

Search unmatched peaks only

Instrument:

Results: Overview Report top hits
 On Import check matching MSMS only

databáze

proteáza

modifikace

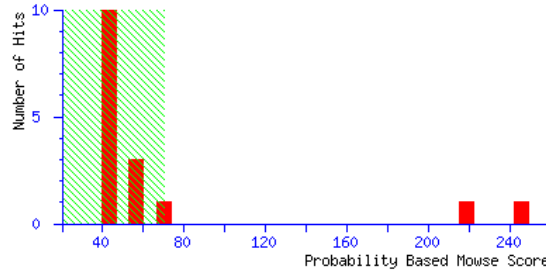
**molekulová
hmotnost
peptidů**

{MATRIX} Mascot Search Results

User : ondra
Email : sedo@post.cz
Search title :
Database : NCBI nr 20070326 (4761919 sequences; 1643098755 residues)
Taxonomy : Mammalia (mammals) (572832 sequences)
Timestamp : 6 Apr 2007 at 14:54:43 GMT
Top Score : 246 for [gi|30794280](#), albumin [Bos taurus]

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 70 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)

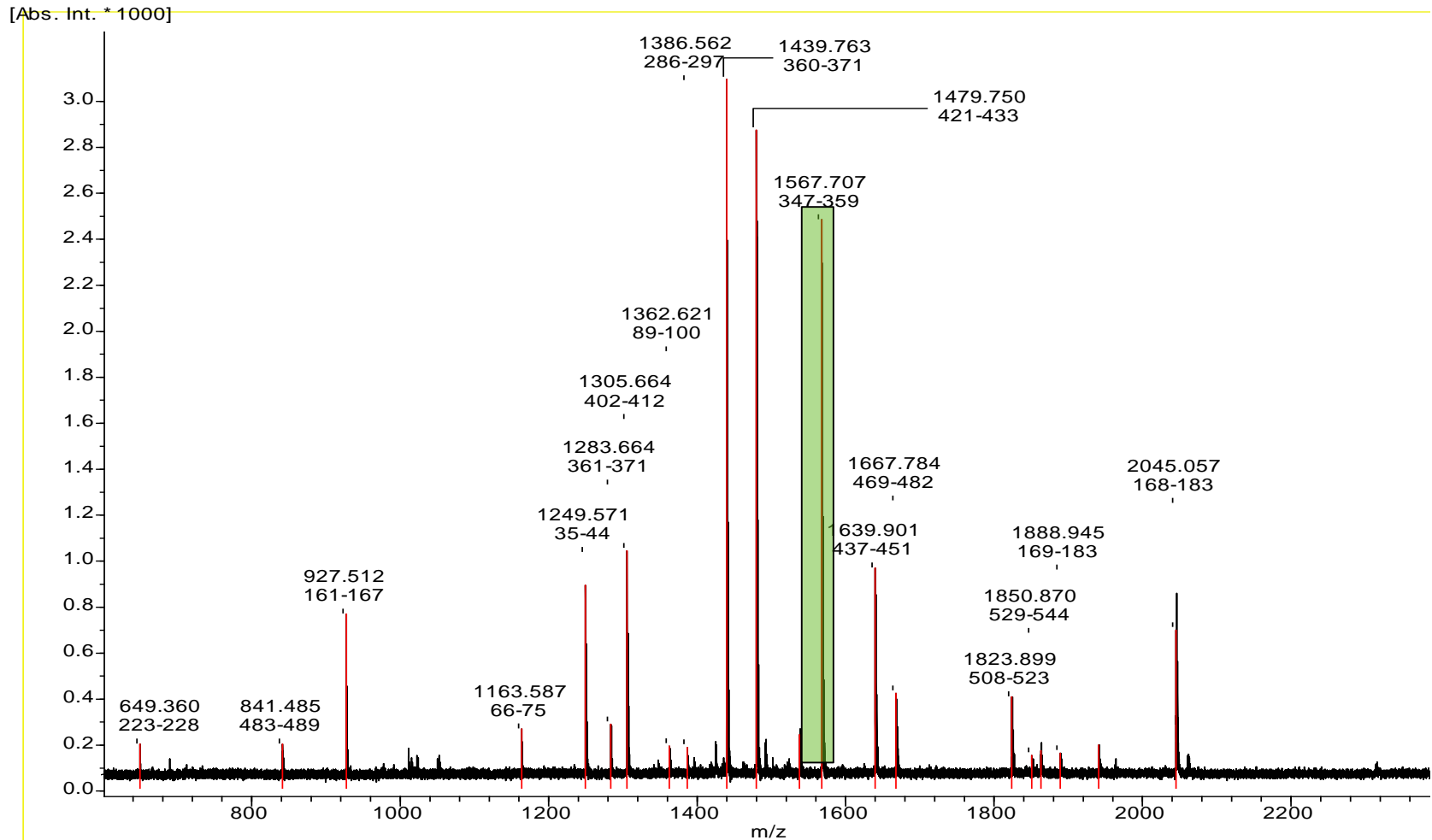
Significance threshold $p <$ Max. number of hits

- [gi|30794280](#) Mass: 69278 Score: **246** Expect: 1.4e-19 Queries matched: 19
albumin [Bos taurus]
- [gi|1351907](#) Mass: 69240 Score: **246** Expect: 1.4e-19 Queries matched: 19
Serum albumin precursor (Allergen Bos d 6) (BSA)
- [gi|229552](#) Mass: 66088 Score: **190** Expect: 5.7e-14 Queries matched: 16
albumin

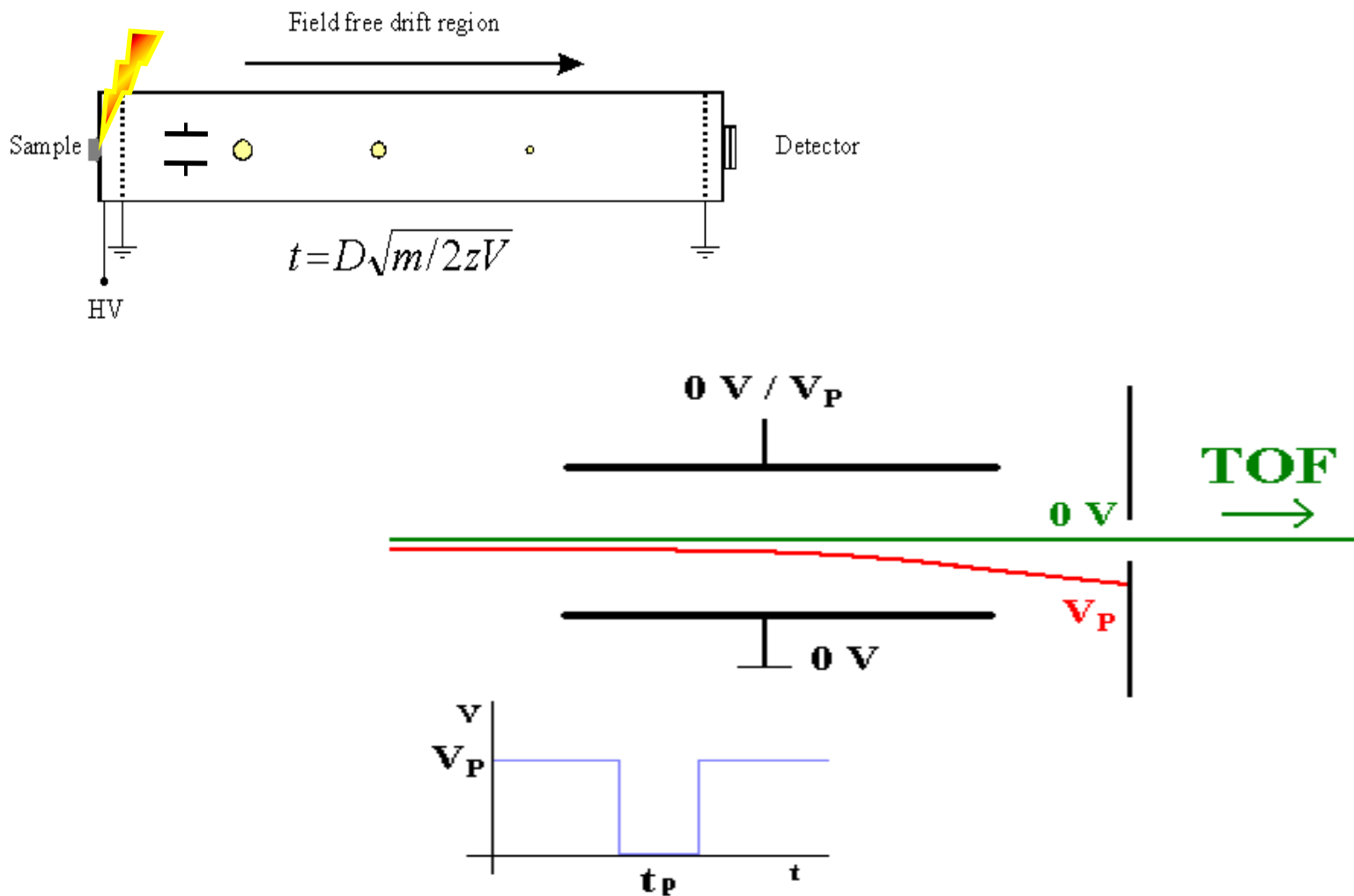
Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

MS/MS = tandemová hmotnostní spektrometrie

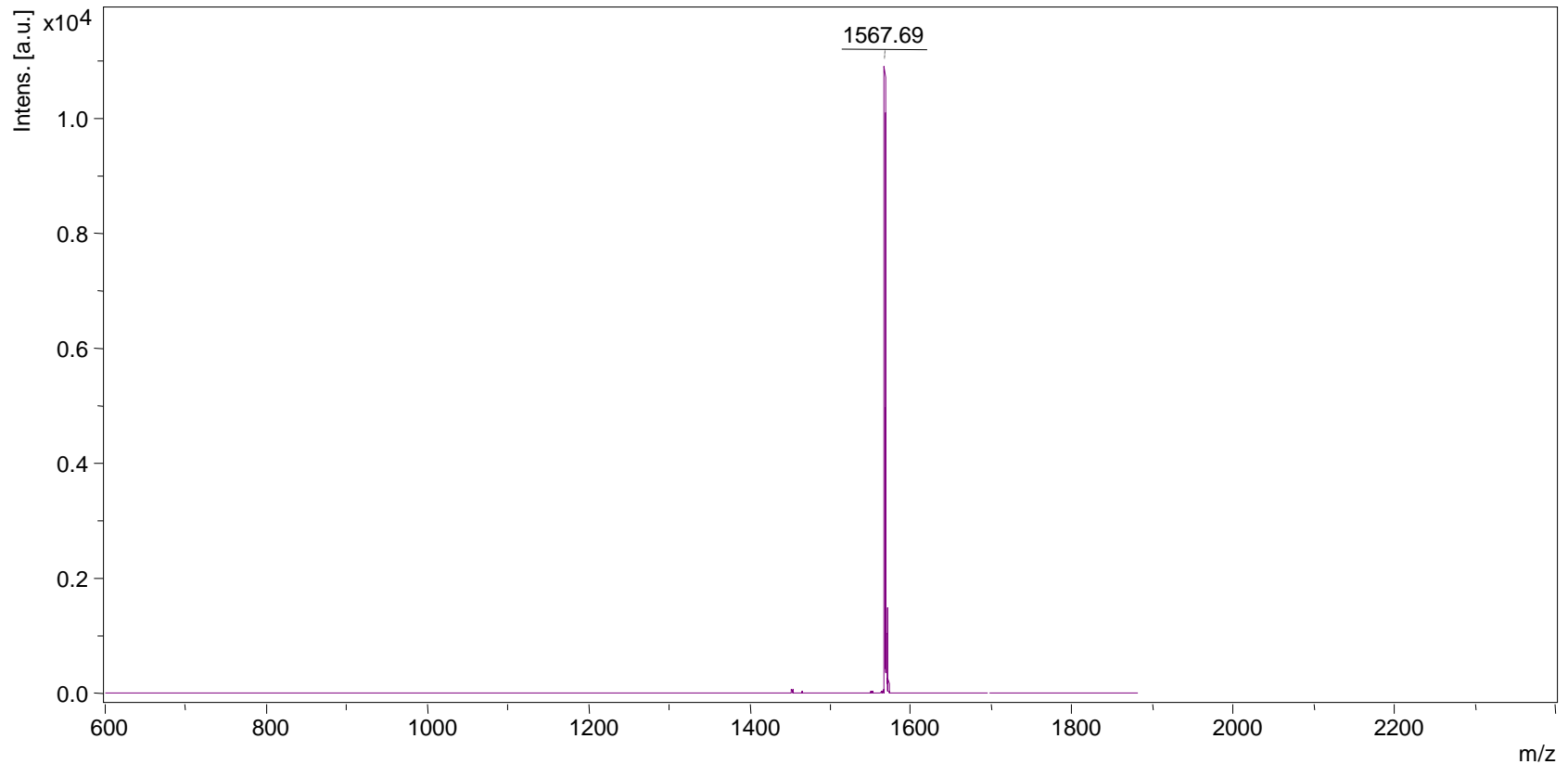
Výběr prekurzorového iontu



Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS MS/MS Izolace prekurzorového iontu

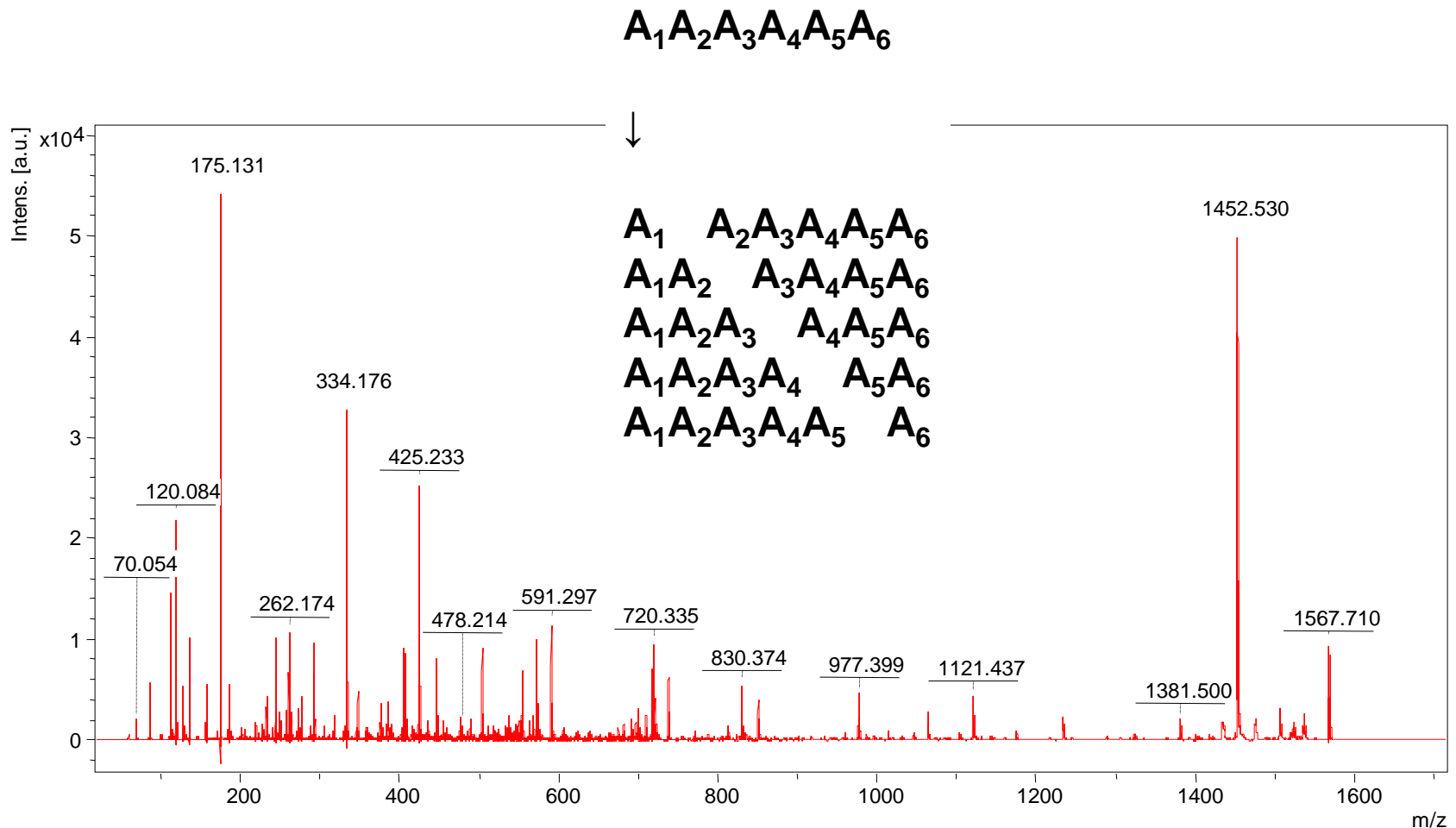


Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS MS/MS Izolace prekurzorového iontu



Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS MS/MS

Analýza MS/MS, hmotnostní spektrum fragmentů



Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS MS/MS Databázové vyhledávání



databáze

proteáza

modifikace

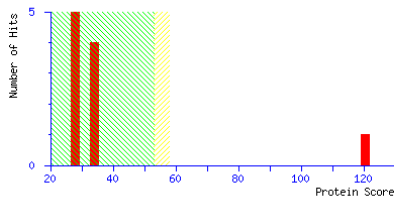
**molekulová
hmotnost
peptidů
a jejich
MS/MS
fragmentů**

Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS MS/MS Databázové vyhledávání



Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 53 indicate peptides with significant homology.
 Individual ions scores > 58 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

| | | |
|---------------------------|---|------------------------------|
| Format As | Peptide Summary | Help |
| Significance threshold p< | 0.05 | Max. number of hits |
| Standard scoring | <input checked="" type="radio"/> MudPIT scoring <input type="radio"/> | Ions score or expect cut-off |
| Show pop-ups | <input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups <input type="radio"/> | Sort unassigned |
| Preferred taxonomy | All entries | Require bold red |

Select All Select None Search Selected Error tolerant

- [gi|229552](#) Mass: 66088 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
albumin

Check to include this hit in error tolerant search

| Query | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | ppm | Miss | Score | Expect | Rank | Unique | Peptide |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------|------|-------|---------|------|--------|------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> 1 | 1567.7100 | 1566.7027 | 1566.7354 | -20.88 | 0 | 120 | 3.2e-08 | 1 | U | K.DAFLGSLYEYSR.R |

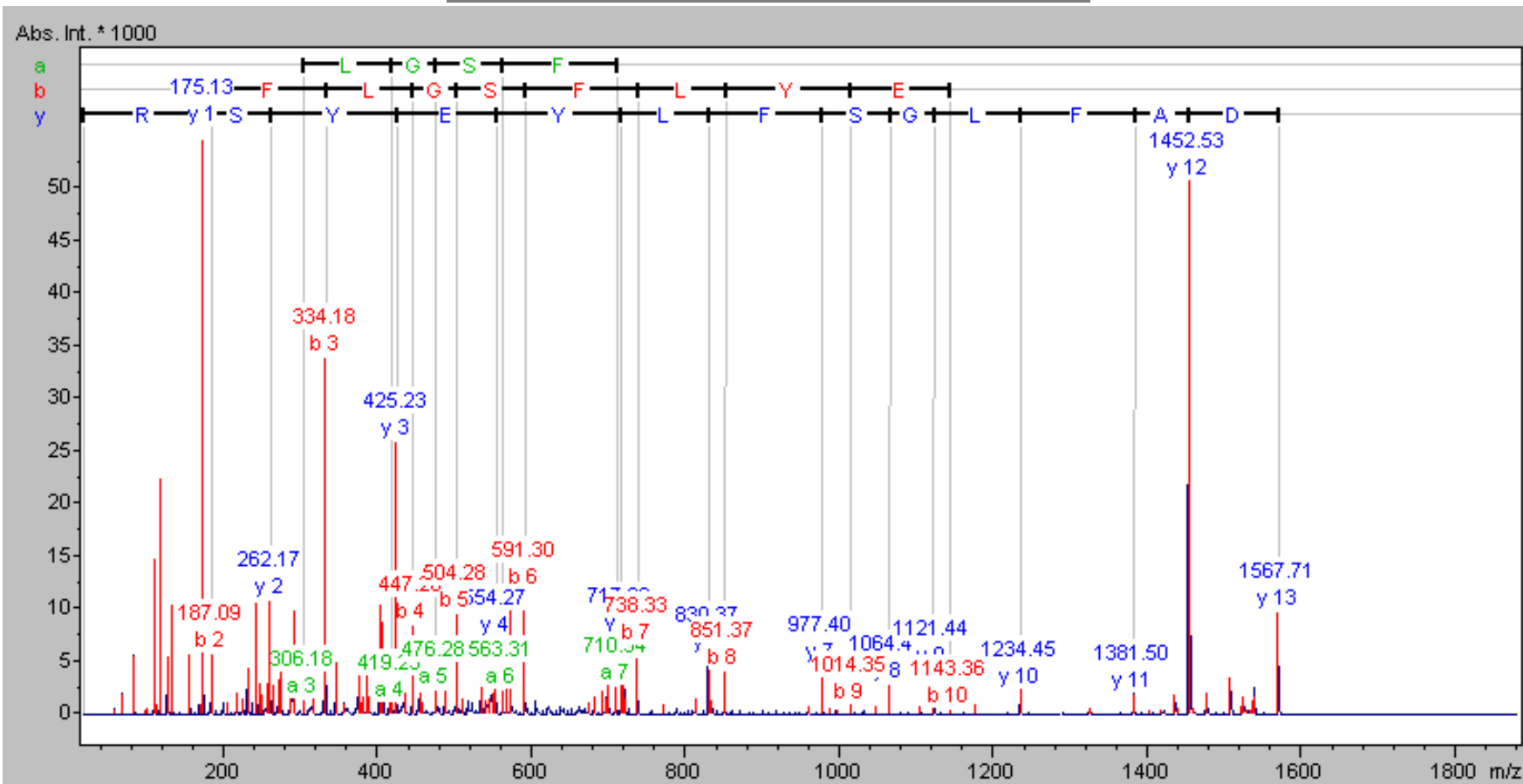
Proteins matching the same set of peptides:

[gi|1351907](#) Mass: 69248 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor
[gi|30794280](#) Mass: 69278 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 serum albumin precursor [Bos taurus]
[gi|174267962](#) Mass: 69190 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 ALB protein [Bos taurus]
[gi|76445989](#) Mass: 53890 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 serum albumin [Bos indicus]
[gi|154425704](#) Mass: 69248 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 ALB protein [Bos taurus]
[gi|367460260](#) Mass: 66420 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Chain A, Crystal Structure Of Bovine Serum Albumin
[gi|440909714](#) Mass: 69292 Score: 120 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Serum albumin [Bos grunniens mutus]

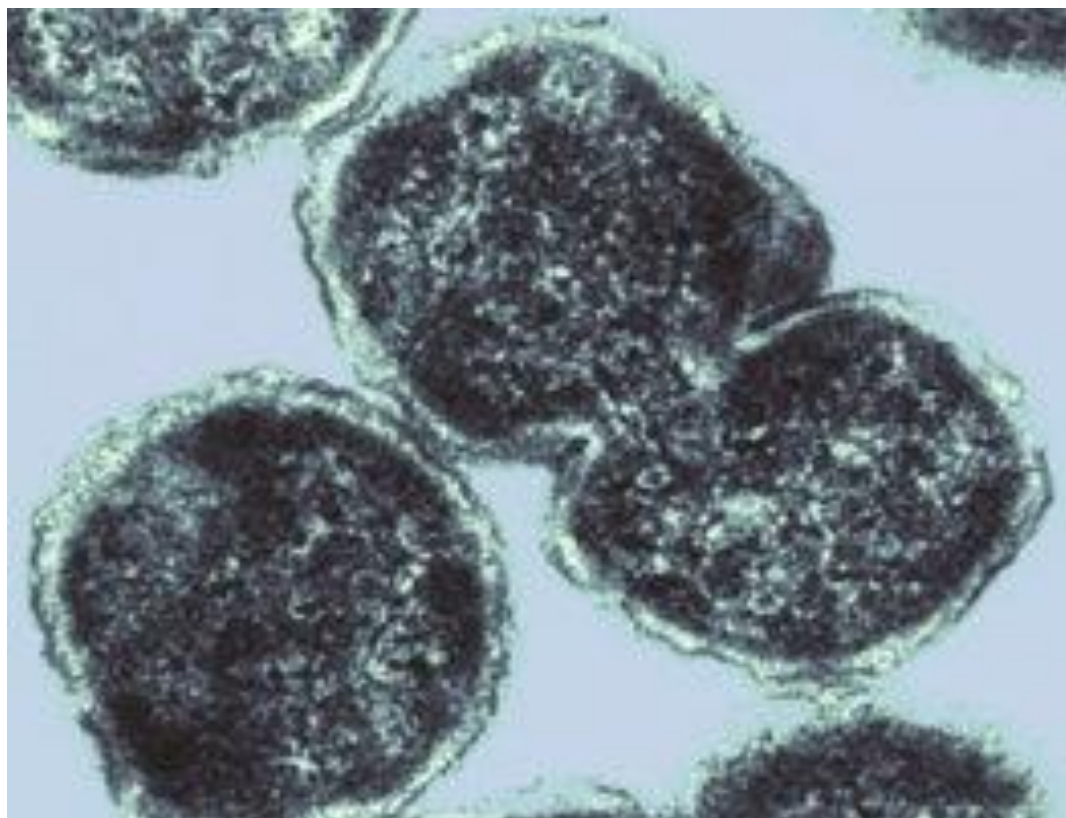
Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS MS/MS Databázové vyhledávání



peptid DAFLGSFLYEYSR



Paracoccus denitrificans

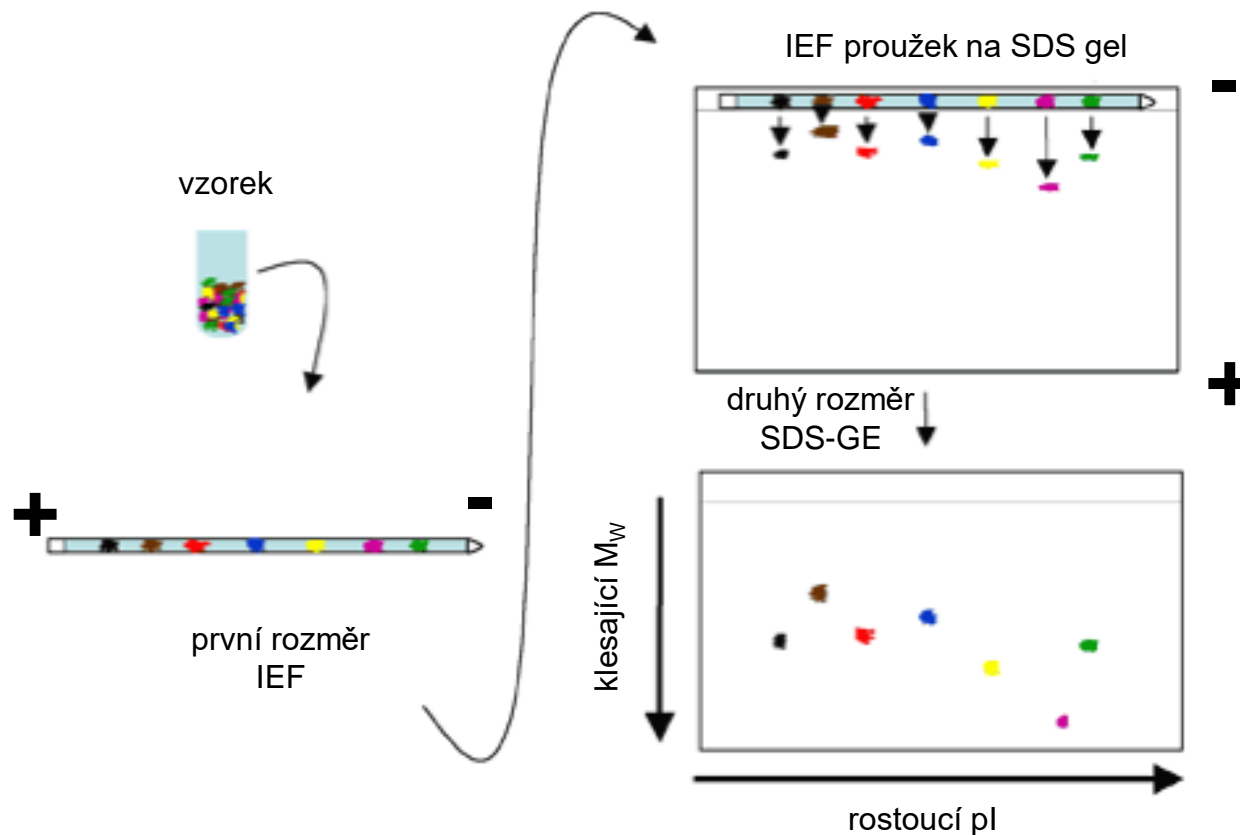


Převzato z:
microbewiki.kenyon.edu

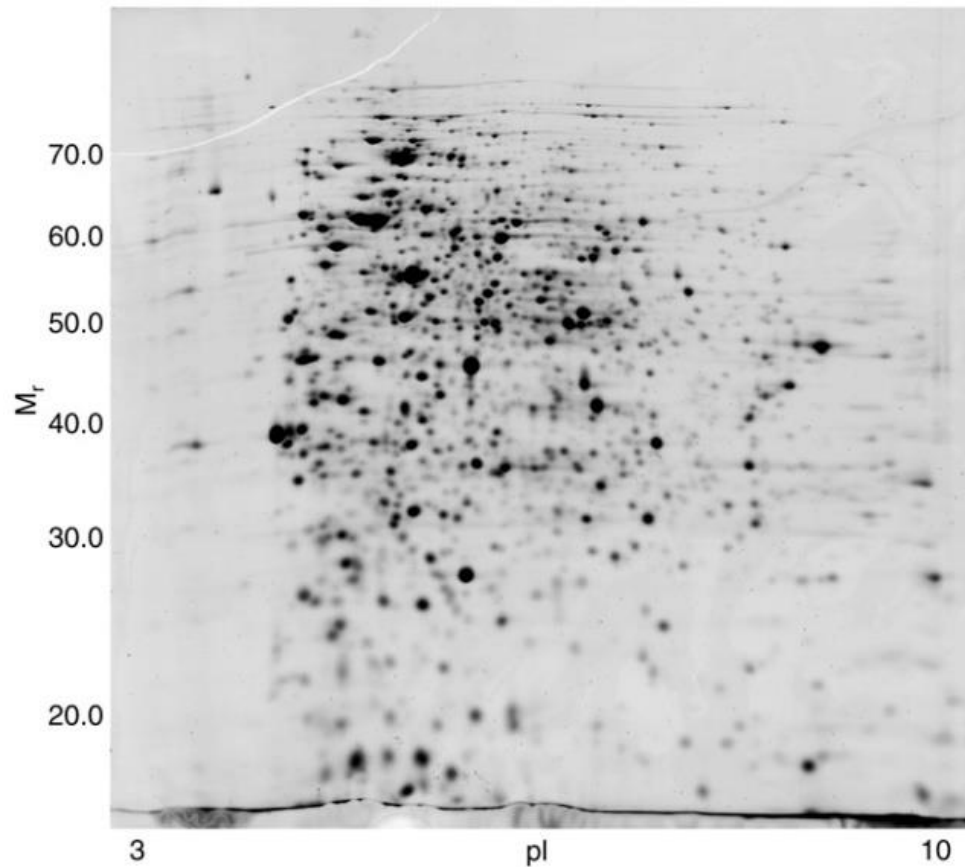
2D GE – dvoudimenzionální gelová elektroforéza

1) IEF – izoelektrická fokuzace

2) SDS-PAGE – denaturující elektroforéza v polyakrylamidovém gelu



Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS
Spojení se separačními technikami
Kvantifikace na základě změny denzity spotů



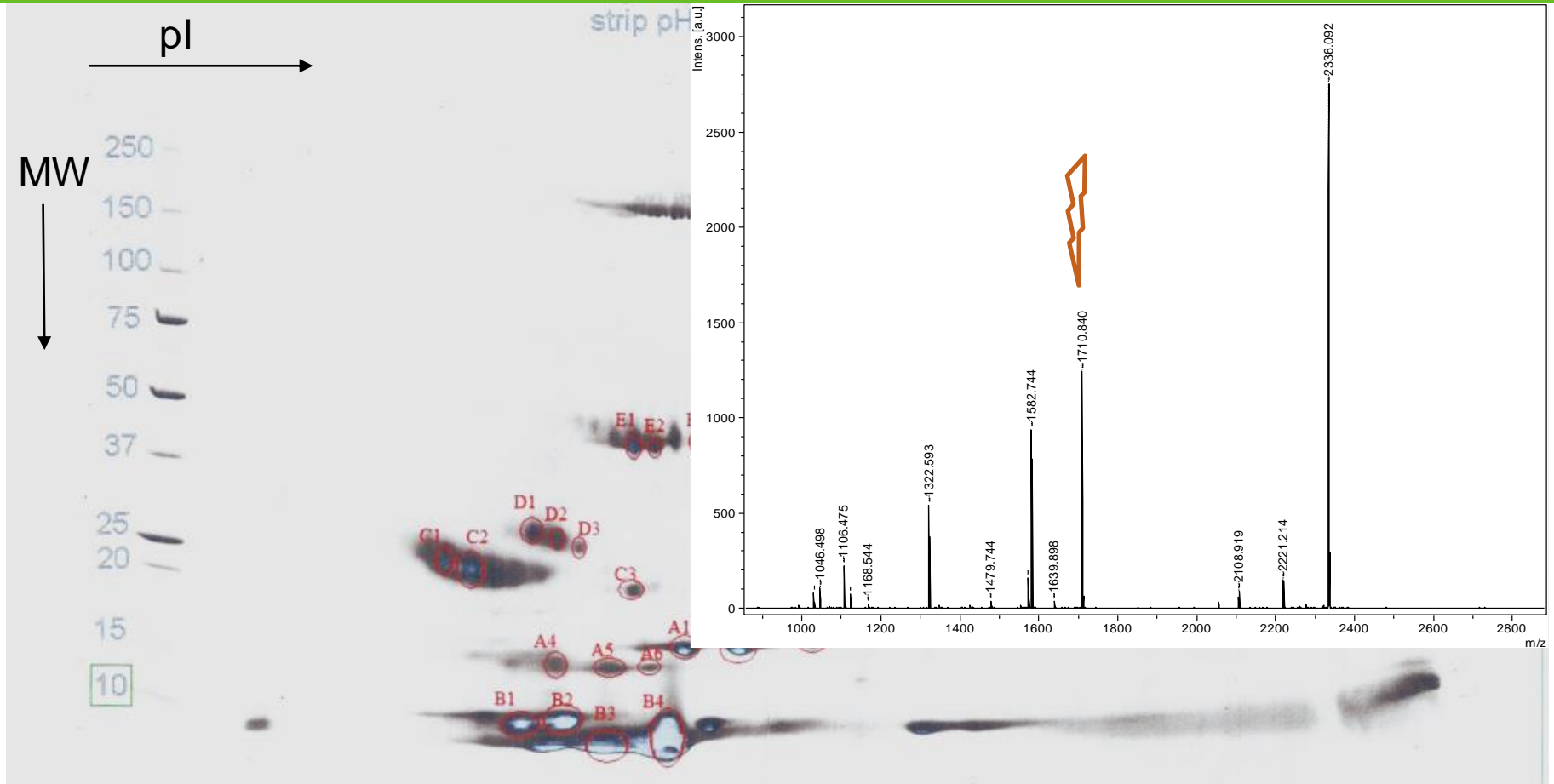
Bouchal P., Struhárová I., Budinská E., Vyhliđalová T., Zdráhal Z., van Spanning R., Kučera I.
Biochim Biophys. Acta 6 (2010) 1350.

Bodlín bezocasý – Tenrec ecaudatus



Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

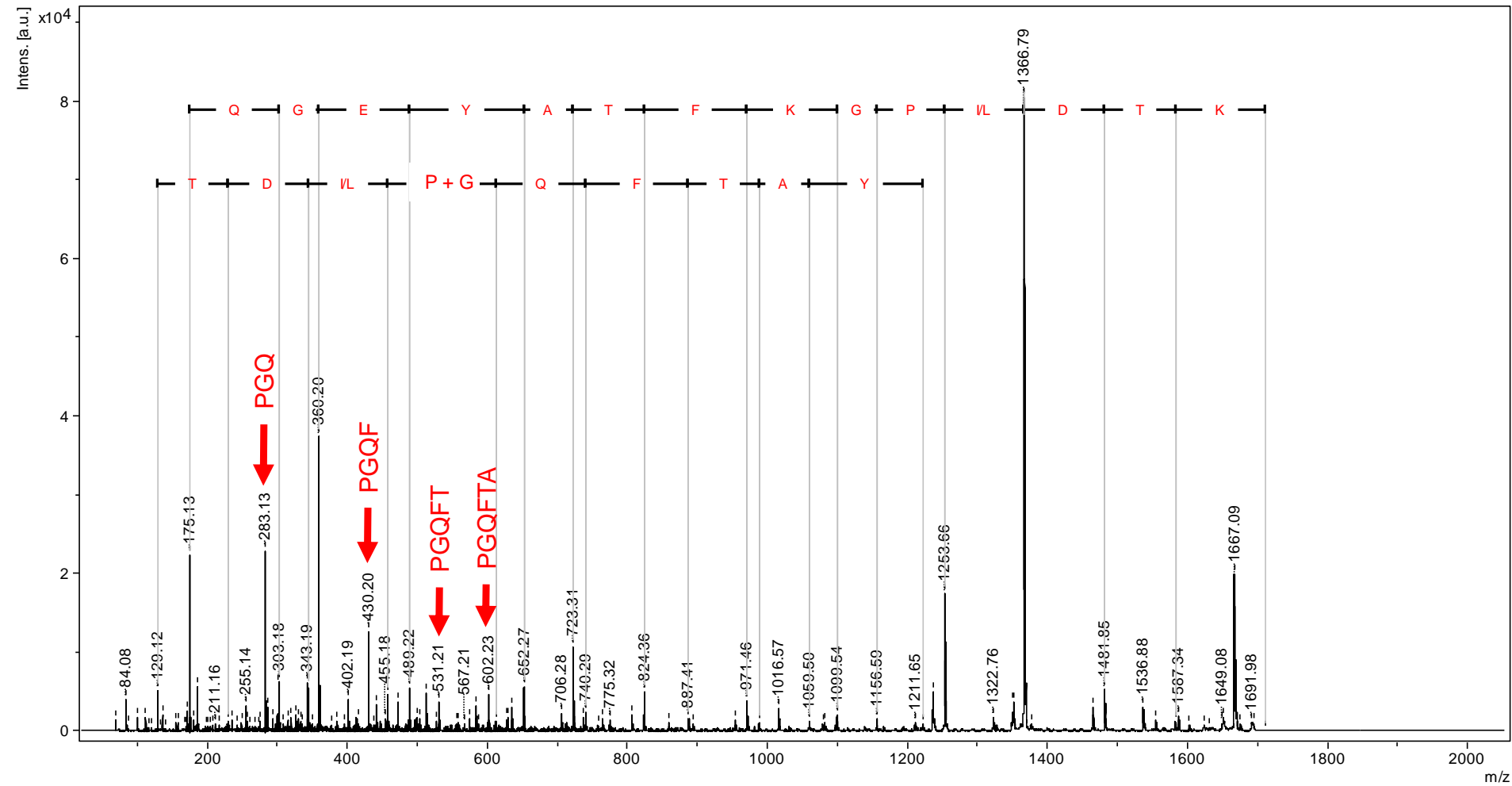
Aplikace



Dvoudimenzionální gelová elektroforéza

Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

Sekvenace *de novo*



Sekvenace *de novo*

Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

Protein BLAST

Basic Local Alignment Search Tool



homolog: tear lipocalin *Sus scrofa*
nalezené sekvence

MMRALLLAIGLGLVAALQAQEFPAVGQPLQDLLGRWYLKAMTSDPEIPGKKPESVTPLIL
QEDLSGTWYLK

KALEGGDLEAQITFLIDGQCQDVTLVLKKTNQPFTFTAYDGKRVVYILPSKVKDHYILYC
KTDLPGQFTAYEGKR VKDHYILYC

EGELDGQEVMAKLVGRDPENNPEALEEFKEVARAKGLNPDIVRPQQSETCSPGGN
EGELEGQQVRMAGLVD DTGSHPEALEDFK

1. Základní pojmy

2. Historie a princip MALDI-TOF MS

3. Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

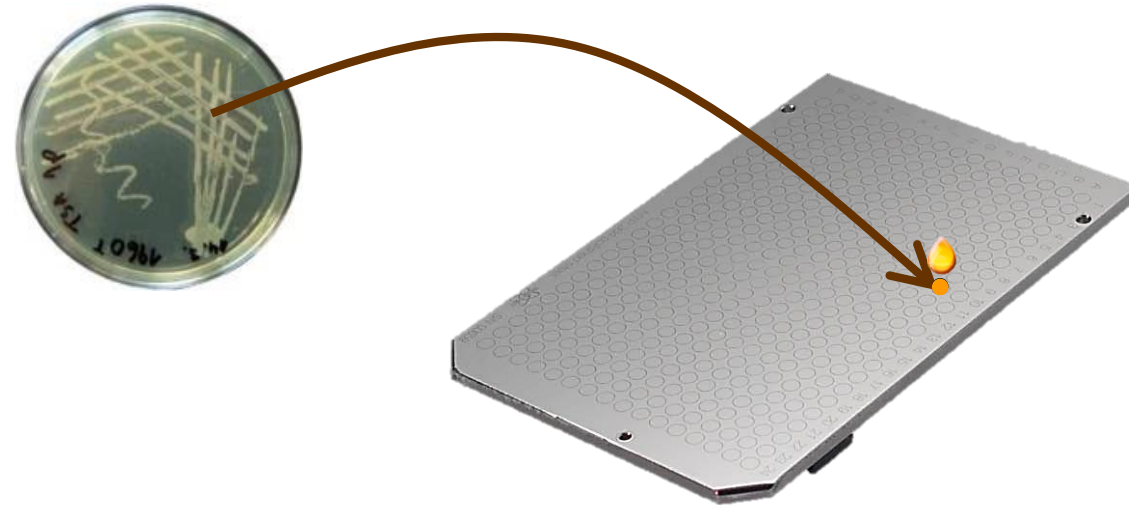
4. MALDI-TOF MS profilování v klinické diagnostice

5. Vývoj nové aplikace MALDI-TOF MS profilování

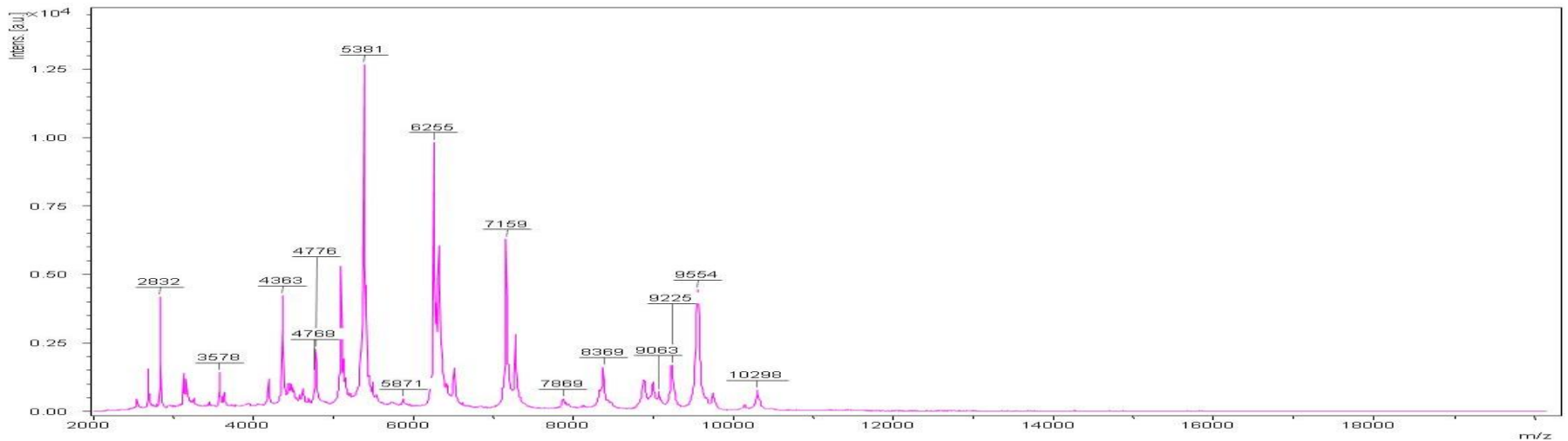
Proteomické markery onemocnění

- **preanalytická fáze (vliv věku, rasy, pohlaví, stravy, režimu, léků...)**
- **stabilizace vzorků po odběru (inhibice proteáz, rozpad krvinek)**
- **vhodnost metody analýzy a interpretace výsledků**
- **nižší produkce markerů u asymptomatických malých nádorů**
- **stejné proteiny produkují i zdravé tkáně (detekce modifikací)**
- **ovlivnění hladiny markeru jinými onemocněními**
- **ekonomická/diagnostická výhodnost oproti současným postupům**

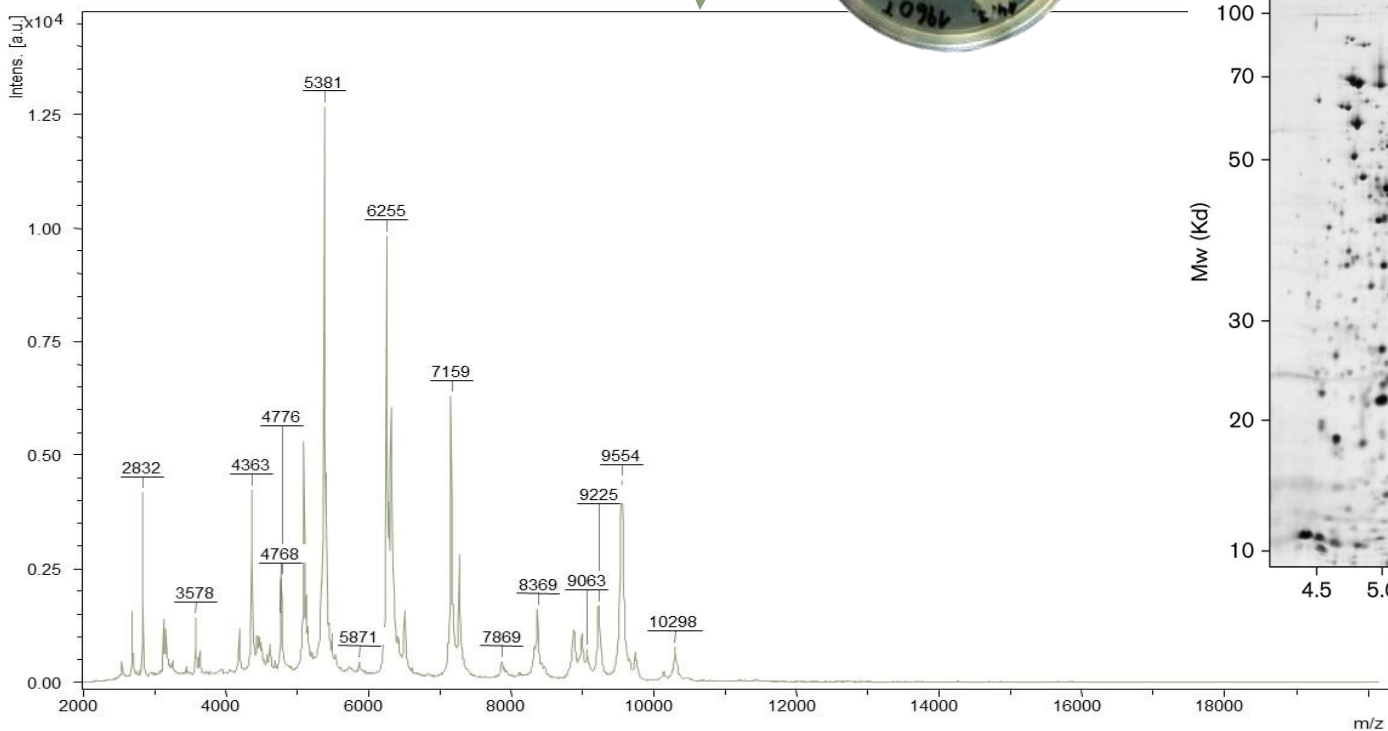
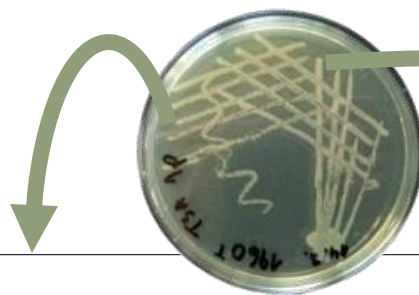
MALDI-TOF MS v klinické diagnostice



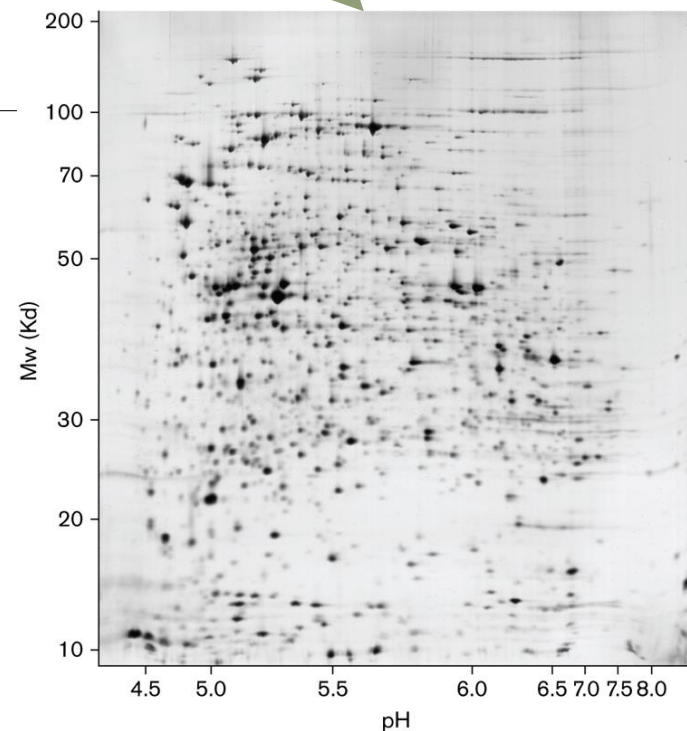
**převrstvení
bakteriálních buněk
na vzorkovací desce
MALDI matricí**



MALDI-TOF MS v klinické diagnostice: Detekce části bakteriálního proteomu

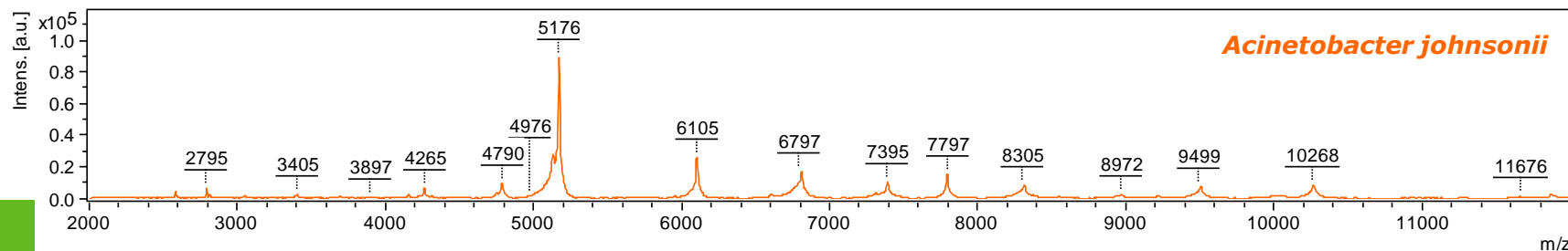
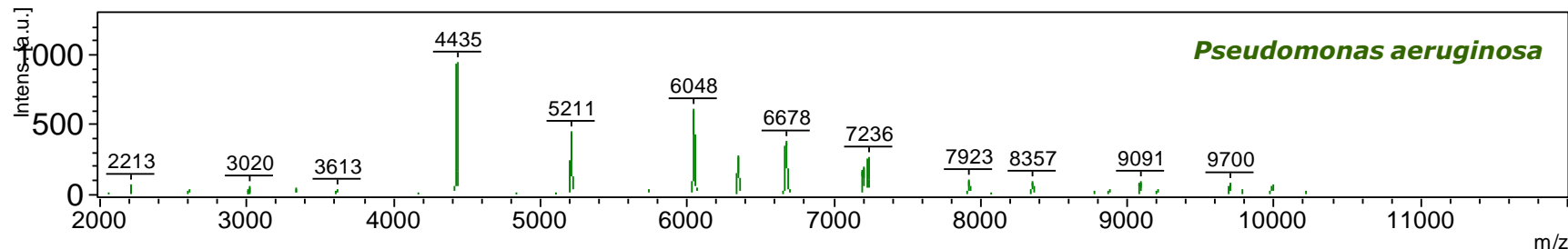
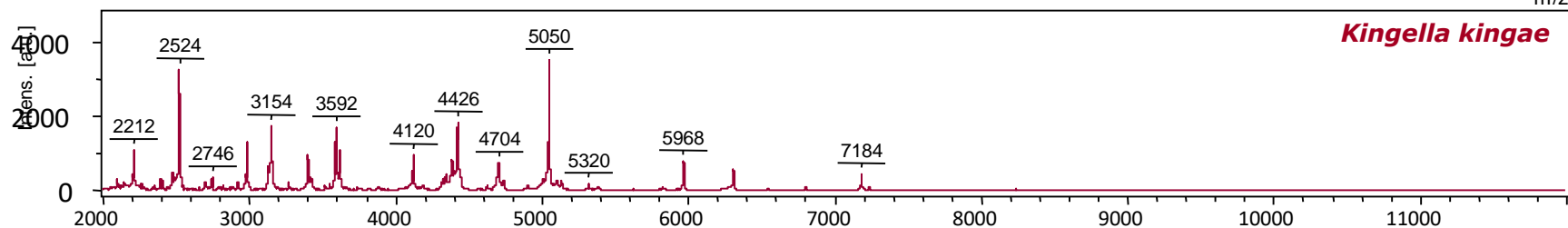
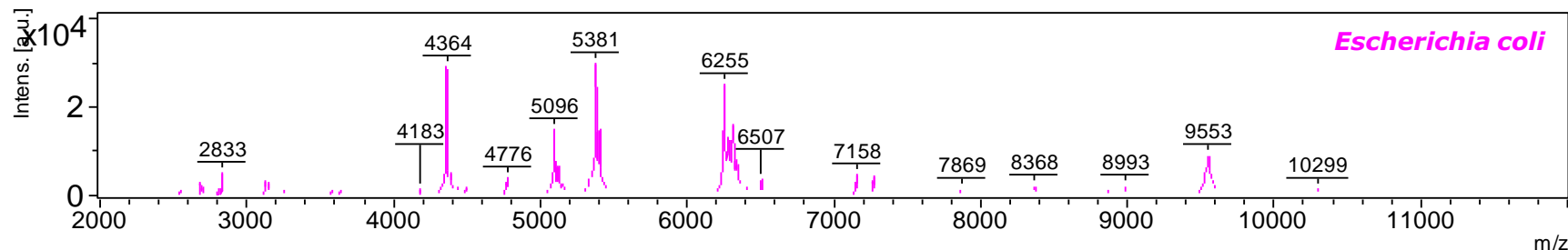


MALDI-TOF MS



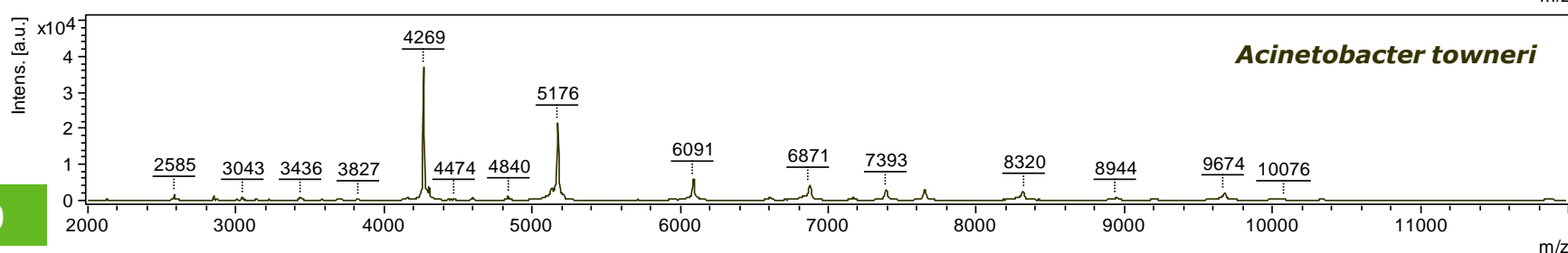
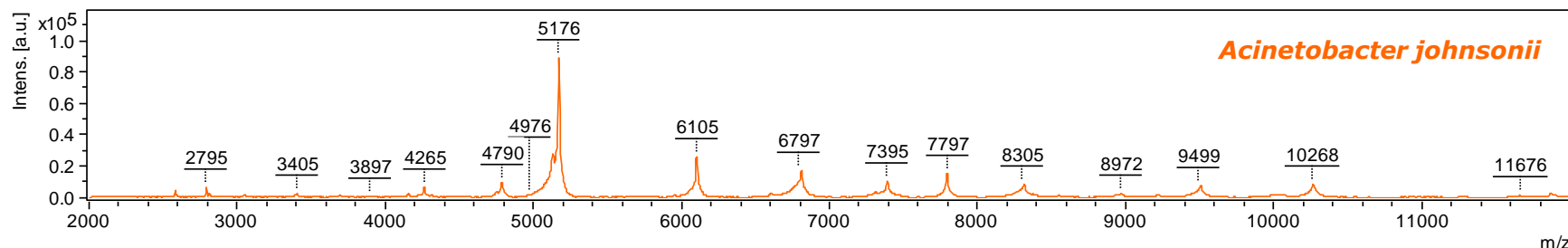
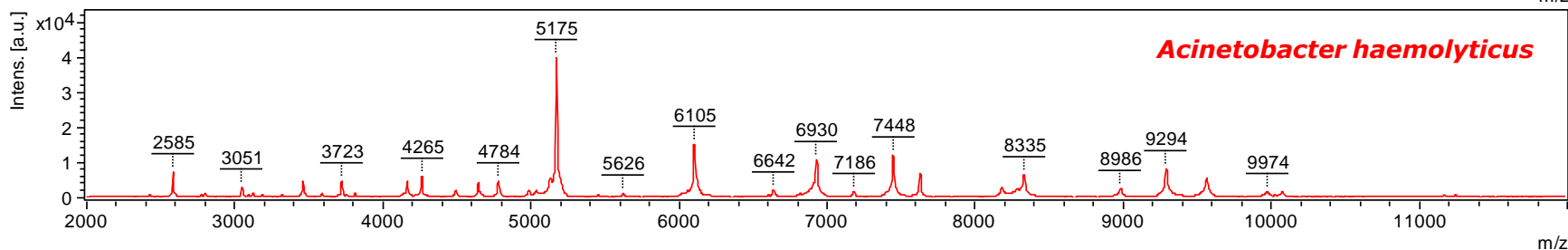
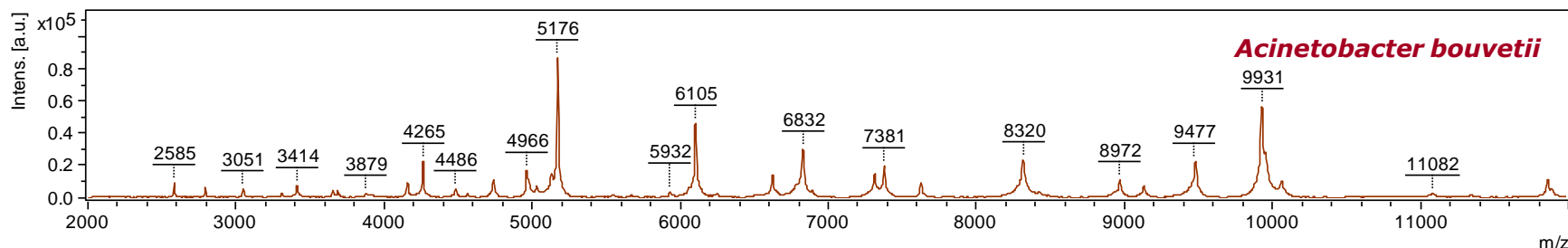
2D GE

MALDI-TOF MS v klinické diagnostice: Rozlišení rodů



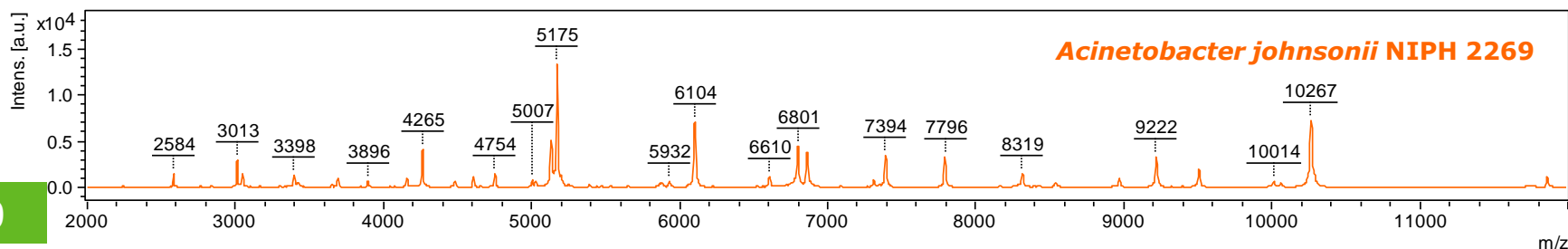
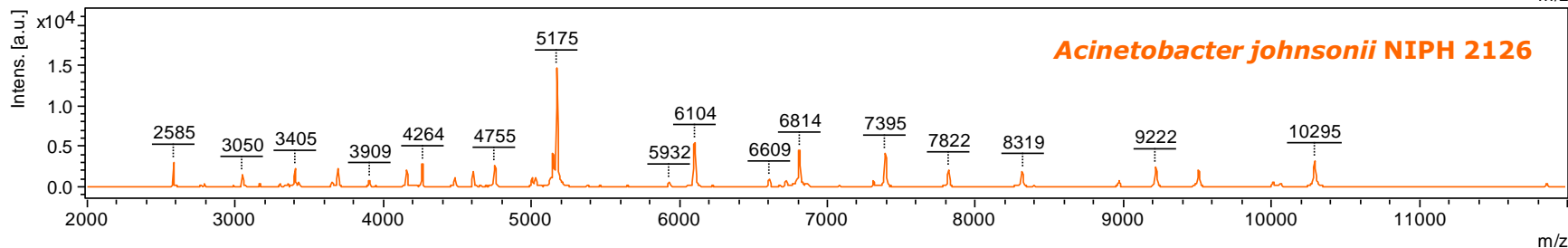
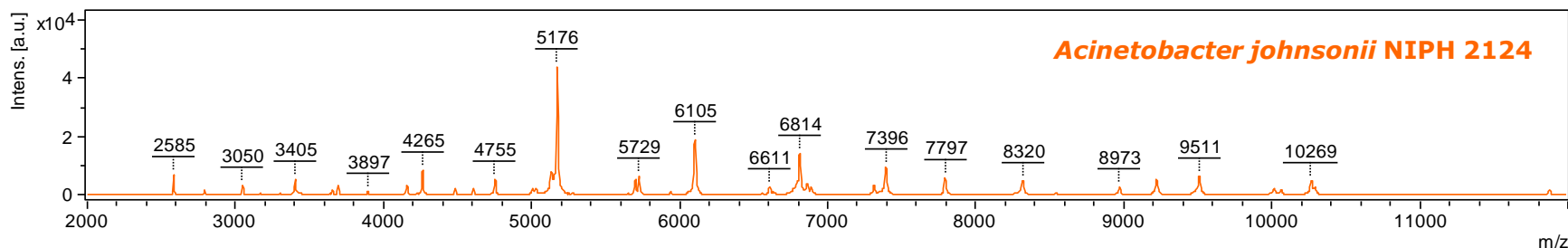
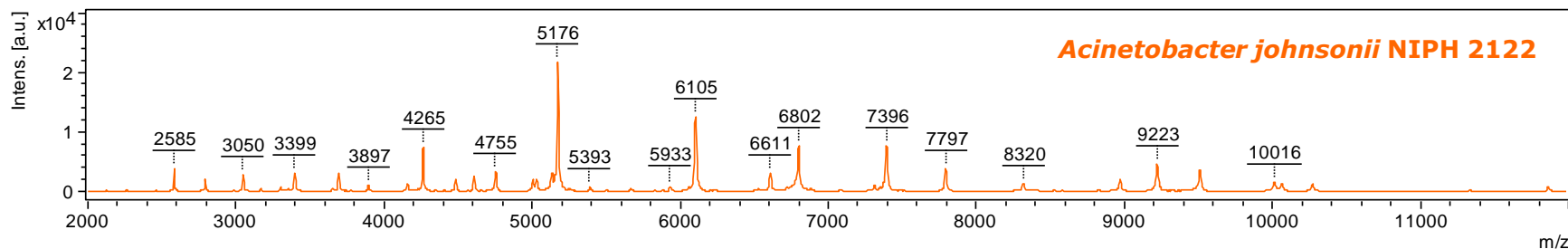
MALDI-TOF MS v klinické diagnostice

Rozlišení druhů



MALDI-TOF MS v klinické diagnostice

Rozlišení kmenů?

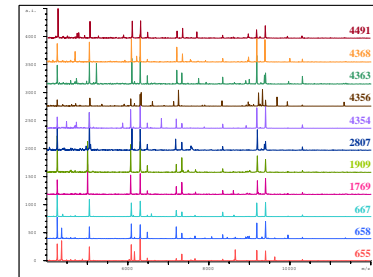


MALDI-TOF MS v klinické diagnostice

Identifikace bakterií



I. MALDI-TOF hmotnostní spektrometr



II. Databáze referenčních spekter

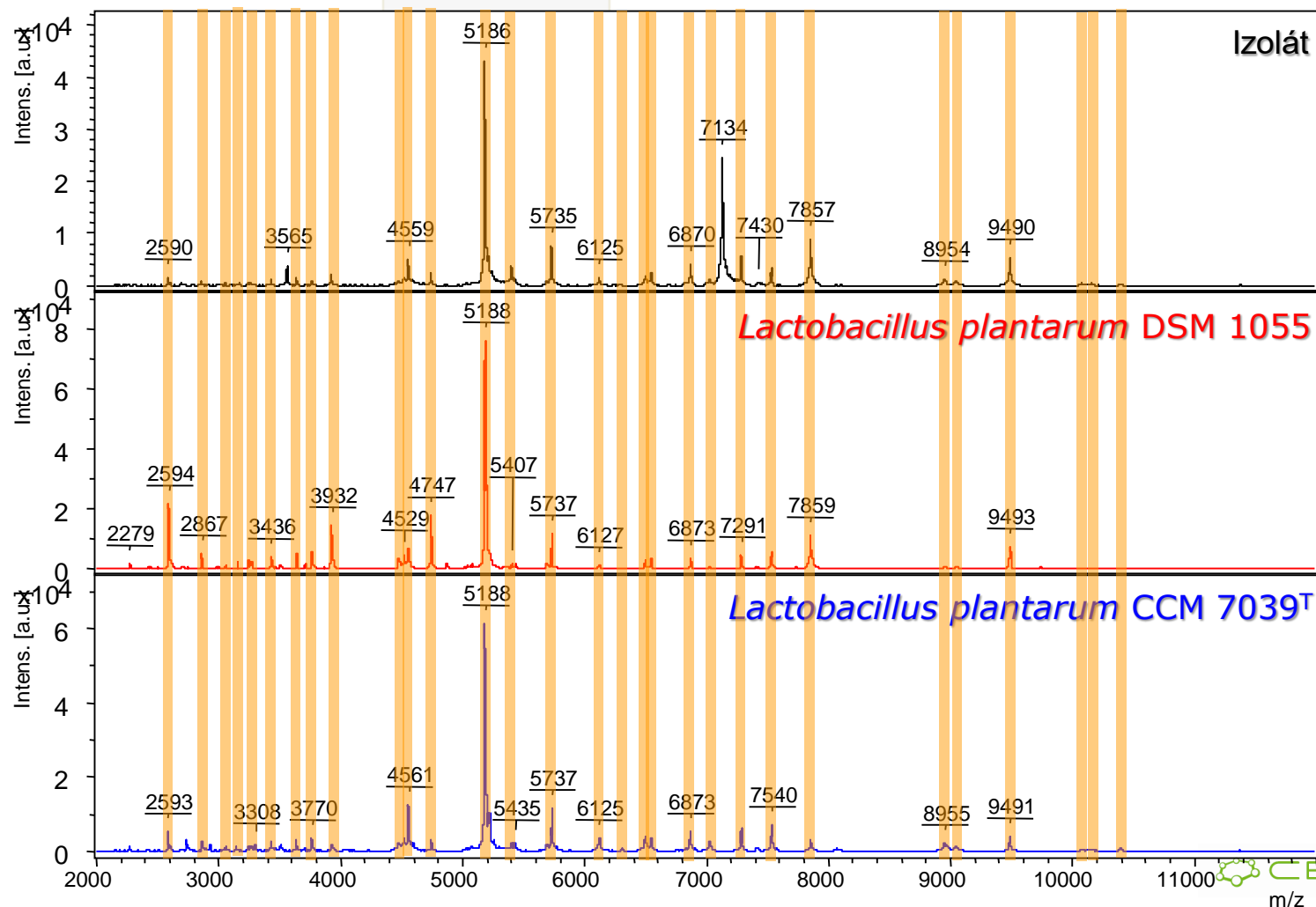
III. Software pro vyhodnocení dat

Result Overview

| Analyte Name | Analyte ID | Organism (best match) | Score Value | Organism (second best match) | Score Value |
|--------------|------------|--|-------------|--|-------------|
| infirmitas | infirmitas | Escherichia coli:H5494a:HEL | 99.9 | Escherichia coli:ATCC 25922:HEL | 99.9 |
| Probe 5 | Probe 5 | Streptococcus lypicus:DPQ 2108089:JMD | 99.9 | Streptococcus sp:marisorensis:DSM 98121:DSM | 99.9 |
| Probe 5 | Probe 5 | Streptococcus sp:marisorensis:DSM 98121:DSM | 99.9 | Streptococcus lypicus:DPQ 2108089:JMD | 99.9 |
| Probe 6 | Probe 6 | Mycoplasma sp:sp:causalis:1C98_1:CEB | 99.9 | Mycoplasma sp:sp:causalis:1C98_1:CEB | 99.9 |
| Probe 6 | Probe 6 | Mycoplasma sp:sp:causalis:1C98_1:CEB | 99.9 | Mycoplasma sp:sp:causalis:1C98_1:CEB | 99.9 |
| Probe 7 | Probe 7 | Actinobacter sp:Genospecies 3:Serovar 7:DSM 5908 | 99.9 | Actinobacter sp:Genospecies 3:Serovar 133:DSM 5912 | 99.9 |
| Probe 7 | Probe 7 | Actinobacter sp:Genospecies 3:Serovar 7:DSM 5908 | 99.9 | Actinobacter sp:Genospecies 3:Serovar 133:DSM 5912 | 99.9 |
| Probe 8 | Probe 8 | Pseudomonas aeruginosa:ATCC 27053:DEL | 99.9 | Pseudomonas aeruginosa:DSM 21817:DSM | 99.9 |

| Detected Species | Log(Score) |
|---|-------------|
| Lactobacillus plantarum DSM 1055_DSM | 2.449 |
| Lactobacillus plantarum DSM 2601_DSM | 2.440 |
| Lactobacillus plantarum DSM 20246_DSM | 2.381 |
| Lactobacillus plantarum DSM 2648_DSM | 2.285 |
| Lactobacillus plantarum DSM 13273_DSM | 2.279 |
| Lactobacillus plantarum DSM 12028_DSM | 2.215 |
| Lactobacillus plantarum ssp argenteratensis DSM 16365_DSM | 2.206 |
| Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T_DSM | 2.025 |
| Lactobacillus paraplantarum DSM 10641_DSM | 1.992 |
| Lactobacillus pentosus DSM 16366_DSM | 1.950 |

- srovnání získaných dat s databází referenčních MALDI-TOF hmotnostních spekter známých mikroorganismů



MALDI Biotyper References

Global MBT Sites – **March 2016**



| | |
|----------------------|-------------|
| Globally: | 2004 |
| Europe: | 1091 |
| Americas: | 437 |
| US: | 334 |
| Canada: | 40 |
| Mexico: | 16 |
| Argentina: | 10 |
| Brazil: | 20 |
| Chile: | 5 |
| Colombia: | 5 |
| Ecuador: | 1 |
| Peru: | 2 |
| Puerto Rico: | 3 |
| Asia/Pacific: | 396 |
| Australia: | 26 |
| China/HongKong: | 146 |
| Japan: | 122 |
| New Zealand: | 8 |
| Singapore: | 9 |
| Philippines: | 1 |
| Vietnam: | 2 |
| South Korea: | 45 |
| Taiwan: | 15 |
| Thailand: | 17 |
| Malaysia: | 5 |
| IMEA: | 51 |
| India: | 10 |
| Israel: | 7 |
| Middle East: | 18 |
| Egypt: | 7 |
| Algeria: | 1 |
| Africa: | 8 |



> 50 Million MALDI Biotyper Identifications p.a.

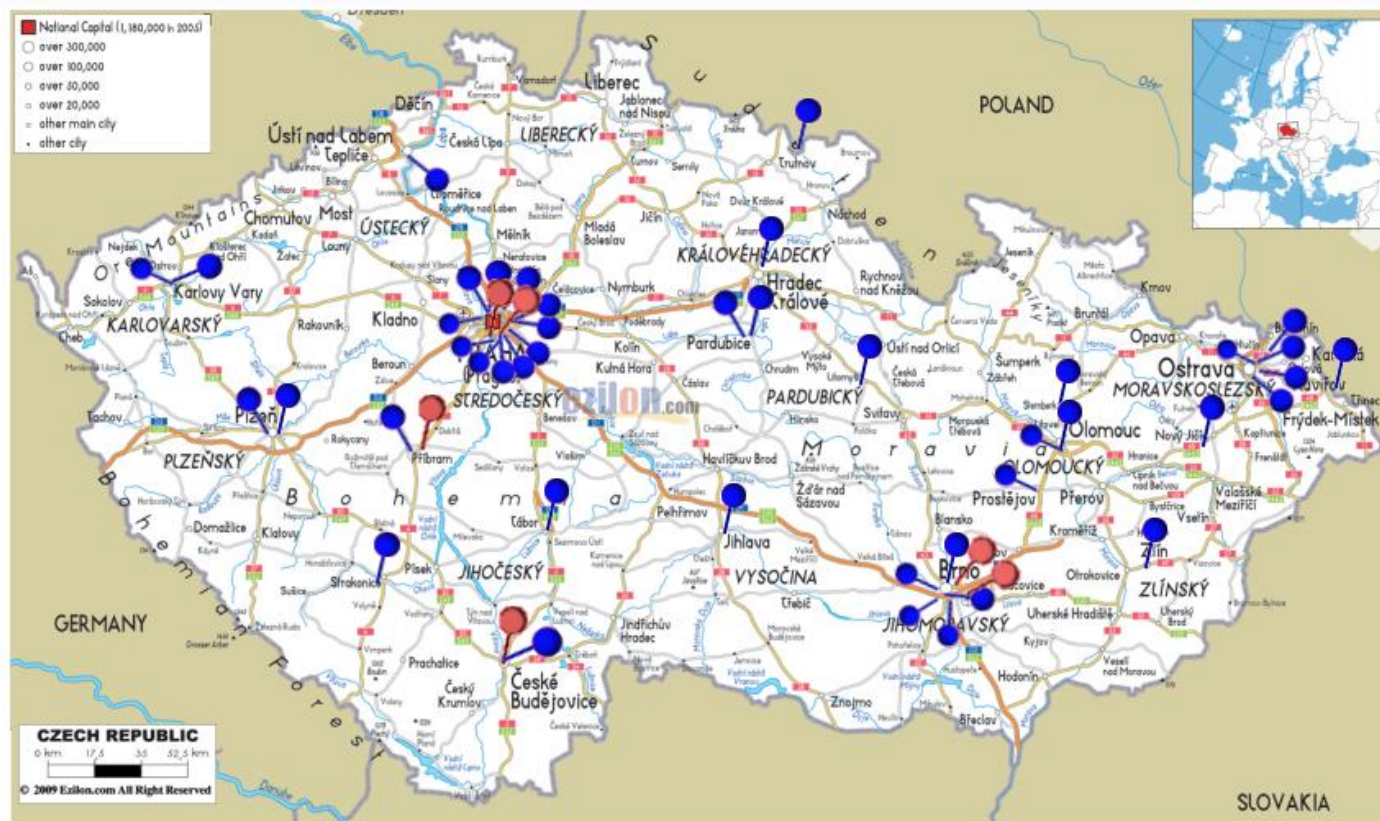
+490-500 MBT/year

MALDI-TOF MS v klinické diagnostice

Identifikace bakterií



Česká republika – celkem 49 MBT systémů (Červen 2016)
37x clinical, 2x public health, 3x veterinary, 1x university (+6x on big MALDI)



Chybí
Liberec, Klatovy, Kolín a okresní nemocnice



MBT systems



big MALDI systems

Výhody:

- doba analýzy ~ minuty
- identifikace na úrovni druhu (90 % klinických vzorků), případně i detailnější
- minimální náklady na analýzu
- identifikace vzorků s abnormálním fenotypem
- identifikace kvasinek, plísní a dalších mikroorganismů

Nevýhody:

- vysoká pořizovací cena
- problémy s rozlišením blízce příbuzných druhů
- identifikace ze směsných vzorků

- **pokud ve vzorku převažuje jeden kmen, i přímá analýza (bez kultivace) může vést k úspěšné identifikaci**
- **hemokultury** - diferenciální centrifugace
- krevní buňky jsou odstraněny při 500 rpm, bakterie získány při 14000 rpm a poté přímo analyzovány
- **bioterrorismus** – přímá MALDI-TOF MS analýza „podezřelého prášku“

MALDI-TOF MS v klinické diagnostice

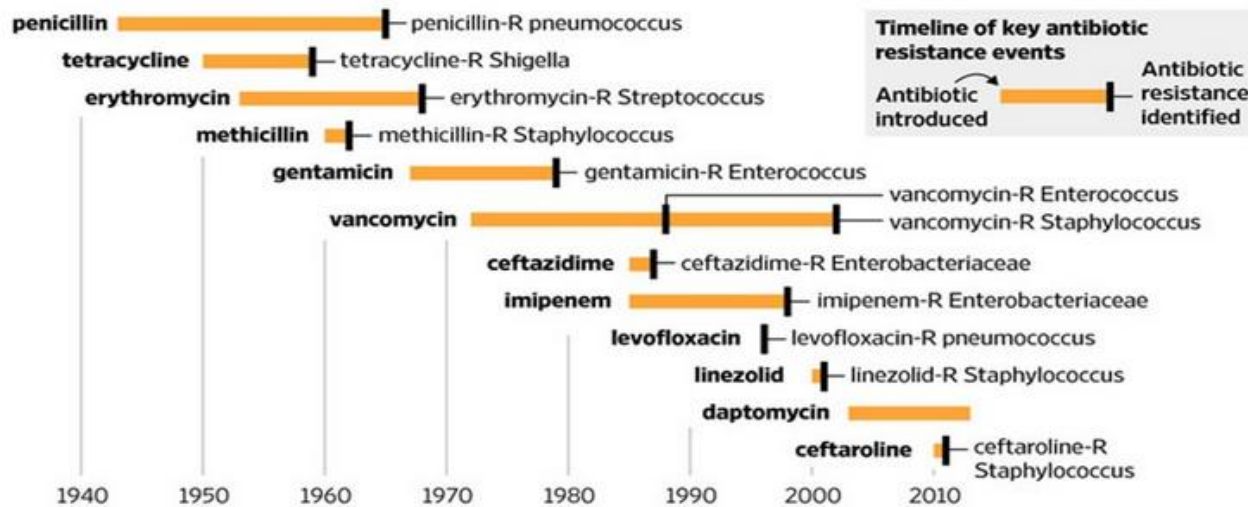
Identifikace bakterií

Antibiotická rezistence



The Rise of Resistance

Overuse of antibiotics in people and animals is leading to drug-resistant infections that help cause an estimated 2 million illnesses and 23,000 deaths a year in the U.S. alone, public health officials say.

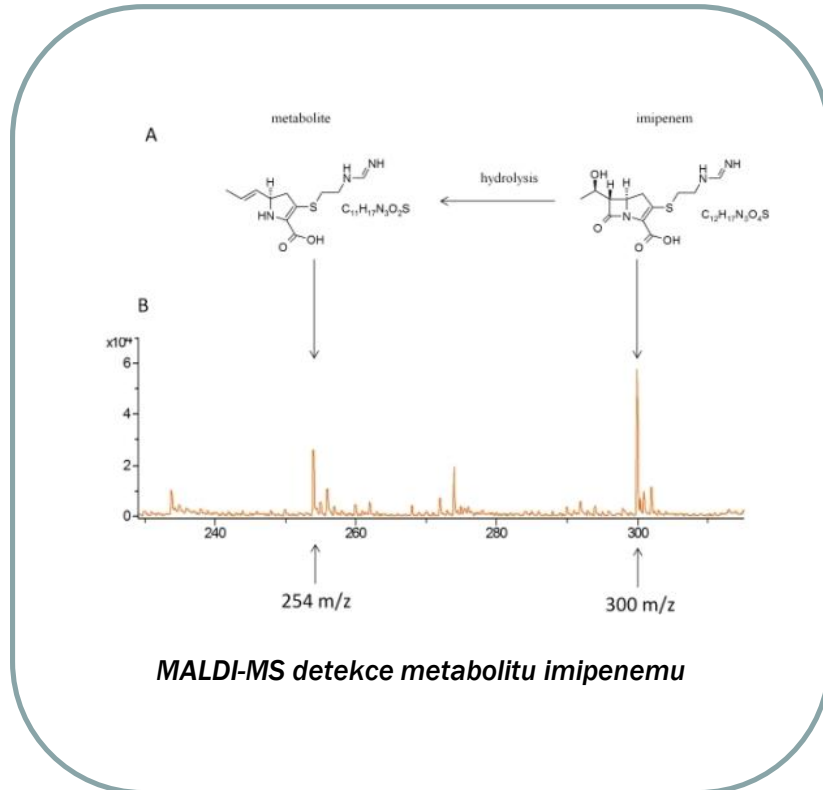


Notes: Data is as of 2013; penicillin was in limited use prior to widespread population usage in 1943.
Source: Centers for Disease Control and Prevention

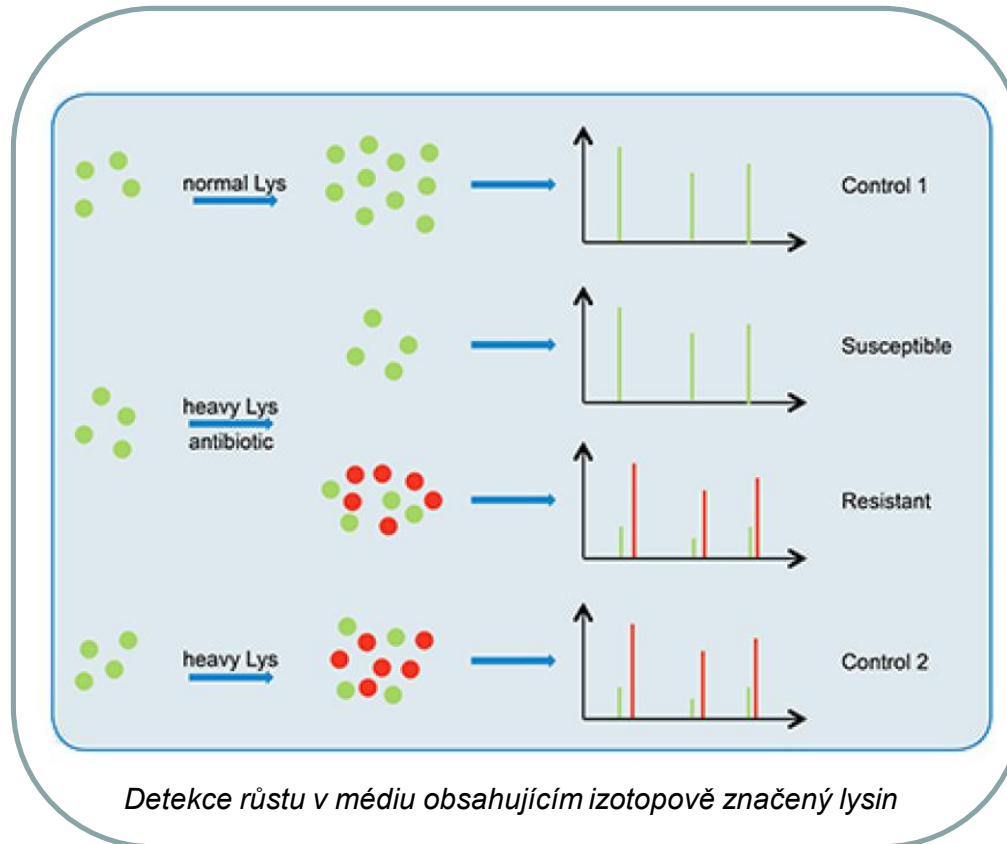
THE WALL STREET JOURNAL.



- **rezistence proti některým antibiotikům je spojena s přítomností specifických signálů v MALDI MS profilech** (přímou detekcí příslušných enzymů, proteinů exprimovaných z příslušných genů, nebo nepřímo na základě vyhodnocení celého spektra)
- **detekce MRSA na základě signálu peptidu PSM-mec** (Josten et al., Int J Med Microbiol 304 (2014) 1018-1023)



- rezistenci spojenou se změnou MW antibiotika lze rovněž sledovat pomocí MALDI MS
- inkubaci s antibiotikem lze provádět i přímo v kapce na vzorkovací desce spektrometru
- detekce v oblasti odpovídajících m/z , jiné MALDI matrice (Hrabák et al., J Clin Microbiol 49 (2011) 3222-3227)



- inhibici růstu je možné detekovat v proteinových profilech po kultivaci na izotopově obohacených médiích (Sparbier et al., J Clin Microbiol 51 (2013) 3741-3748).

1. Základní pojmy

2. Historie a princip MALDI-TOF MS

3. Identifikace proteinů pomocí MALDI-TOF MS

4. MALDI-TOF MS profilování v klinické diagnostice

5. Vývoj nové aplikace MALDI-TOF MS profilování

- **materiál podobný/shodný s analyzovaným systémem**
- **materiál levný a stabilní**
- **materiál dostupný kdykoli a v neomezeném množství**

- **volba extrakčního postupu**
- **volba MALDI matrice, včetně rozpouštědla a nanášecí metody na vzorkovací desku**
- **volba režimu detekce: pozitivní/negativní mód; lineární/reflektronový mód**

- **metoda umožňující detekci většího počtu relevantních signálů**
- **metoda poskytující opakovatelné/reprodukovatelné výsledky**
- **metoda rychlá, levná, jednoduchá, snadno dostupná**

- **kombinace separačních technik s MS analýzou peptidů (po proteolýze proteinů) umožňuje identifikovat a kvantifikovat v biologických materiálech tisíce proteinů**
- **na základě přímé MALDI-TOF MS analýzy proteinů jsou v klinické diagnostice rutinně identifikovány bakterie a další typy patogenů**
- **během vývoje analytické metody je nutné od začátku zvažovat praktické aspekty jejího využití**