

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/28970> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Raterink, Robert-Jan

Title: High-throughput profiling of small molecules using mass spectrometry

Issue Date: 2014-10-01

SAMENVATTING

In de gezondheidszorg wordt continu gestreefd naar verbetering en speelt kostenbesparing een steeds belangrijkere rol. Om de zorgkosten te beperken, is er een sterke behoefte aan zorginnovaties. Hierin zijn snellere en goedkopere analytische meetmethoden cruciaal. Het ultieme doel van deze nieuwe meetmethoden is het mogelijk maken van therapie op maat: 'personalized medicine'. Voor dit doel zijn er doorbraken nodig in biomedisch en farmacologisch onderzoek. Het snelle fenotyperen van een biologisch systeem door middel van het globale profileren van kleine moleculen is hierin belangrijk.

Er is vaak een omgekeerd evenredig verband tussen de gevoeligheid (het aantal te detecteren moleculen en molecuulklassen) en de snelheid en kosten van de meetmethode. Klassieke meetmethoden voor kleine moleculen, zoals bijvoorbeeld microscopie of immunoassays, analyseren voornamelijk een enkel molecuul met hoge meetsnelheid. Er is echter behoefte aan meer diepgaande meetmethoden waarbij vele kleine moleculen tegelijkertijd gemeten kunnen worden, met een acceptabele meetsnelheid. Tot dusver is het globale en tegelijkertijd snelle profileren van een breed scala aan kleine moleculen een uitdaging, vooral in het metabolomics veld.

In dit proefschrift wordt de ontwikkeling van nieuwe methoden voor het snelle profileren van kleine moleculen in complexe biologische monsters, door middel van massaspectrometrie (MS) beschreven. Hiervoor is directe infusie (DI)-MS een aangewezen, snelle techniek, omdat er voorafgaand aan MS detectie geen scheidingsmethode wordt gebruikt. Voor een succesvolle DI-MS meetmethode is het pre-analytische gedeelte een zeer belangrijke, maar tot dusver onderbelichte factor. De focus van dit proefschrift lag daarom op het ontwikkelen van nieuwe monstervoorbewerkingstechnieken waarbij, met betrekking tot de meetsnelheid, miniaturisatie en automatisering de rode draad waren.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de huidige monstervoorbewerkingstechnieken voor metabolomics uitgevoerd met een MS. Hoewel er op dit moment geen enkele universele monstervoorbewerkingstechniek beschikbaar is voor de globale analyse van het gehele metaboloom, lijkt de combinatie van onteiwitten en het verwijderen van lipiden een goede strategie om een groter aantal metabolieten te meten en hun reproduceerbaarheid te verbeteren. Door recente ontwikkelingen op het gebied van geautomatiseerde off-line well-plate extractietechnieken (onteiwitting, vloeistof-vloeistof extractie en vaste-stof extractie) is een snelle monstervoorbewerking al goed mogelijk. In de toekomst moeten monstervoorbewerkingstechnieken niet alleen geautomatiseerd en snel zijn, maar ook kwantitatief en gestandaardiseerd, zodat metabolomics data van verschillende studies uit verschillende labs vergeleken kunnen worden. Dit is vooral belangrijk voor metabolieten die deels gebonden kunnen zijn aan eiwitten of andere factoren in bloed.

In **Hoofdstuk 3** wordt de snelle fenotypering van zebrafish embryogenese beschreven door middel van nano-electrospray en hoge resolutie (HR) DI-MS. Met behulp van beperkte, maar efficiënte monstervoorbewerking werd gedemonstreerd dat gedetailleerde metabolietprofielen konden worden verkregen. Hierin konden vijf vroege ontwikkelingsstadia met een tijds-resolutie van slechts 1 uur worden onderscheiden. Met behulp van gedegen dataverwerking werden 102 relevante moleculaire variabelen aangetoond. Deze variabelen weerspiegelen de

start van bepaalde genexpressie zoals bekend uit de literatuur en de toenemende energiebehoefte. In de toekomst zijn effectievere en bij voorkeur snelle monstervoorbewerkingstechnieken wenselijk om nog meer (reproduceerbare) informatie te verkrijgen over metabolieten met een lage concentratie.

Uit de studie in **Hoofdstuk 3** valt te concluderen dat met beperkte monstervoorbewerking en nanoelectrospray-DI-MS in combinatie met goede dataverwerking, gedetailleerde metabolietprofielen van complexe monsters verkregen kunnen worden. Om de volledige potentie van DI-MS te benutten zouden er andere effectievere monstervoorbewerkingstechnieken moeten worden ontwikkeld (zoals bijvoorbeeld voorgesteld in **Hoofdstuk 4** en **5**) die bij voorkeur kleine polaire moleculen kunnen extraheren en scheiden van interfererende (endogene) zouten, zoals gesuggereerd in **Hoofdstuk 2**.

In **Hoofdstuk 4** wordt drie-fase elektroextractie (3-fase EE) naar een twee microliter druppel hangende aan een geleidende pipetpunt beschreven. Door middel van de elektromigratie van analieten in een waterige monsterfase met groter volume, door een niet-mengbare organische filter fase, naar een waterige acceptorfase met een klein volume, werd een snelle verrijking van carnitines gerealiseerd. De samenstelling van de organische filterfase bepaalde de selectiviteit van 3-fase EE. Deze eigenschap is niet alleen nuttig voor het afstemmen van de extractie van het aantal verschillende metabolieten naar keuze, maar ook om migratie van eiwitten naar de acceptordruppel te voorkomen. Hierdoor is 3-fase EE veelzijdig, omdat selectieve verrijking en tegelijkertijd purificatie van analieten in een enkele methode geïntegreerd worden. Tenslotte werd de potentie van 3-fase EE voor high-throughput screening gedemonstreerd, door een *proof of principle* van de online integratie van 3-fase EE in een commercieel en geautomatiseerde nanoelectrospray-DI-MS platform.

Het aantal verschillende metabolieten dat met 3-fase EE gemeten kan worden, kan in vervolgonderzoek worden uitgebreid door de samenstelling van de organische filterfase te optimaliseren. Op deze manier zou 3-fase EE ook geschikt kunnen worden voor globale profilering. Bovendien valt het te voorzien dat 3-fase EE ontzoutings eigenschappen kan hebben vanwege de organische filter fase, hoewel dit niet is aangetoond in dit proefschrift. Verder zou de verrijkingfactor verbeterd kunnen worden door de dimensies van 3-fase EE te optimaliseren. Ook zouden er in de toekomst microfluidische chiptechnologieën ingezet kunnen worden om 3-fase EE verder te miniaturiseren. Hierbij kan de potentie van massief-parallelisatie (in het kader van high-throughput screening) verder verkend worden.

In **Hoofdstuk 5** wordt een geminiaturiseerde vloeistof-vloeistof extractie beschreven, door middel van gasdruk-geassisteerd mengen, gevolgd door passieve fasescheiding. Deze methode zorgde ervoor dat de gehele extractieprocedure uitgevoerd kon worden in een 384-well plaat, geïntegreerd in een commerciële en geautomatiseerde nanoESI-DI-MS robot. Door de gasdruk en tijdsduur te variëren kon de effectiviteit van het mengproces geoptimaliseerd worden. Voor de extractie van geneesmiddelen uit menselijk plasma toonde dit platform, in vergelijking met een conventionele, manuele vloeistof-vloeistof extractie procedure, goede analytische eigenschappen met betrekking tot precisie en lineariteit. De resultaten demonstreerden de potentie van dit nieuwe volledig geautomatiseerde platform voor de analyse van geneesmiddelen in complexe (klein-volume) monsters zoals plasma en gedroogde bloedspots. De dichloormethaan fase is na vloeistof-vloeistof extractie succesvol geanalyseerd met nanoelectrospray-DI-MS. Hierdoor is onze methode zeer geschikt voor de analyse van relatief apolaire verbindingen zoals geneesmiddelen, maar bijvoorbeeld ook lipiden. In principe kunnen

beide fases geïnfuseerd worden na extractie. Dit kan interessant zijn voor de analyse van polaire verbindingen in de (opgeschoonde) waterige fase. Wel moet dan rekening gehouden worden met een mogelijk hoge concentratie van (endogene) zouten in de waterige fase en zou een additionele verdunningsstap nodig kunnen zijn.

Tot slot wordt in **Hoofdstuk 6** een geminiaturiseerde samplingmethode beschreven waarbij met behulp van een micronaald de opname van geneesmiddelen in de (klein-volume) dooier van zebravislarven gemonitord wordt met massaspectrometrie. Eerst werd aangetoond dat de huidige methoden door middel van gehele embryo lyse geen rekening houden met mogelijk adsorptie van geneesmiddelen aan de huid. Dit kan resulteren in vals-positieve opnameuitkomsten. Onze micronaaldmethode biedt wel de mogelijkheid om de opname van in principe elke nieuwe verbinding in de zebravis correct te monitoren. Dit is erg belangrijk omdat geen enkele fysisch-chemische eigenschap gebruikt kan worden om de opname van de verbinding in de zebravis accuraat genoeg te voorspellen. Met onze methode werd de opname van 15 pre-klinische verbindingen en twee veel gebruikte anti-tuberculosis geneesmiddelen gemonitord en gecorreleerd aan high-throughput screening data van *M. Marinum* geïnfekteerde zebravislarven en aan andere conventionele *in vivo* en *in vitro* modellen. Met ons verbeterde zebravis geneesmiddel-screening platform kunnen nieuwe inzichten verkregen worden in de interpretatie en voorspelling van de effectiviteit van een geneesmiddel.

Het ligt in de lijn der verwachting dat deze methode een deur opent voor het gebruik van zebravislarven in gedetailleerde farmacologische bepaling van activiteit (zoals PK modellering) en dat het een bredere acceptatie van de zebravis in het ontdekken en ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen teweegbrengt. Ook zou er naast de gerichte analyse van geneesmiddelen uit het microsample een globale profilering van kleine moleculen uitgevoerd kunnen worden, waarbij men extra informatie over het fenotype krijgt met betrekking tot metabolomics en systeemfarmacologie.

De profilering van kleine moleculen vereist nieuwe monstervoorbewerkingstechnieken om snelle DI-MS analyses mogelijk te maken. Samenvattend werden in dit proefschrift de eerste stappen gezet voor nieuwe methoden die veelbelovend zijn in de analyses van kleine moleculen met DI-MS. In **Hoofdstuk 4** en **5** werden nieuwe concepten met betrekking tot monstervoorbewerking gepresenteerd. In het algemeen zou de potentie van zowel 3-fase EE, als de micro vloeistof-vloeistof-extractie methode beter benut kunnen worden wanneer alvorens extractie een derivatiseringsmethode geïntegreerd wordt. Door de fysisch-chemische eigenschappen van relatief polaire verbindingen gunstig te veranderen zijn effectieve ontzouting en verbeterde ionisatie efficiëncies mogelijk.

De meeste methoden in dit proefschrift werden geïntegreerd met DI-MS, omdat deze MS-techniek in potentie erg geschikt is voor het globale en snelle profileren van een groot aantal kleine moleculen. In **Hoofdstuk 6** werden de (klein-volume) dooiermonsters echter geanalyseerd met vloeistof-chromatografie-MS. In vervolgonderzoek zou de koppeling met DI-MS onderzocht kunnen worden, waarbij 3-fase EE wellicht een goede monstervoorbewerkingstechniek is, omdat analieten hierbij verrijkt en gepurificeerd kunnen worden, zoals beschreven in **Hoofdstuk 4**.

Wanneer de gepresenteerde high-throughput concepten verder uitgewerkt en geoptimaliseerd worden, zouden deze methoden gebruikt kunnen worden in biomedische en farmacologische screeningstoepassingen. Dit kan uiteindelijk bijdragen aan de ontwikkeling van 'personalized medicine'.

