

University of Groningen

Antibody-free LC-MS/MS protein analysis of TRAIL

Wilffert, Daniel

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Wilffert, D. (2016). *Antibody-free LC-MS/MS protein analysis of TRAIL*. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

**Nederlandse samenvatting en
toekomstperspectieven**

Het centrale thema van dit proefschrift is de ontwikkeling van uiterst gevoelige vloeistof chromatografie – massa spectrometrie (LC-MS/MS) methodieken voor de kwantificatie van eiwitten in biologische matrices zonder het gebruik van antilichamen. Generieke monstervoorbewerkingstechnieken hebben het voordeel dat ze de beperkingen omzeilen die gepaard gaan met het gebruik van antilichamen (zie **Tabel 2** in **Hoofdstuk 2** voor een SWOT analyse van de voor- en nadelen van antilichaamvrije methodiek). Het verkrijgen van antilichamen kan namelijk tijdrovend zijn en hoge productiekosten hebben en het kan lastig zijn om een constante kwaliteit te garanderen van batch tot batch. Dit heeft geleid tot problemen met de reproduceerbaarheid van een aantal commercieel geproduceerde immunoassays met als gevolg een slechte vergelijkbaarheid van de immunoassays tussen verschillende laboratoria. Om tot een optimale solid-phase extractie (SPE) monstervoorbewerkingstrategie te komen is het nodig dat men een gedetailleerd inzicht heeft in de fysisch-chemische eigenschappen van de te bepalen eiwitten alsmede in die van de meest voorkomende interfererende eiwitten uit de biologische monsters.

Het aantal eiwit-gebaseerde biofarmaceutica dat op de markt wordt gebracht is de laatste jaren aanzienlijk toegenomen.¹ Dit zorgt ervoor dat er steeds minder tijd is voor methodeontwikkeling waardoor de vraag naar meer generieke methoden toeneemt, zoals antilichaam-vrije LC-MS/MS methoden. Hoewel bepaling van eiwitten in complexe biologische monsters op het pM niveau lange tijd het domein was van immunoassays, laten we in dit proefschrift zien dat ook antilichaam-vrije LC-MS/MS methoden deze mogelijkheid beginnen te krijgen.

Een literatuurstudie in **hoofdstuk 2** bespreekt het brede spectrum aan mogelijkheden van antilichaam-vrije methoden die toegepast kunnen worden bij eiwitkwantificatie met LC-MS/MS. Vanwege de grootte van de meeste eiwitten, bevatten deze methoden meestal een enzymatische digestiestap om zo de grote eiwitten in kleinere signatuur peptiden te knippen. Dit wordt gedaan omdat peptiden geschikter zijn voor massaspectrometrie door de betere ionisatie- en fragmentatie-eigenschappen. Het artikel laat ook zien dat LC-MS bepaling van eiwitten op gemiddeld tot hoog concentratieniveau in sommige gevallen niet eens een verrijgingsstap nodig heeft. Als er meer gevoeligheid nodig is, kan een

monstervoorbewerking toepast worden op eiwitniveau, voorafgaand aan de digestie, of op het niveau van het signatuurpeptide na de eiwitdigestie. Verder wordt ook in gegaan op de mogelijkheid van antilichaam-vrije affiniteitsverrijkingstechnieken, zoals technieken gebaseerd op lectinen die affiniteit hebben voor post-translationele modificaties (PTMs) of metaal ionen voor bepaalde aminozuren die aanwezig zijn in het eiwit.

De antilichaam-vrije LC-MS/MS methoden die beschreven zijn in de **hoofdstukken 3-5** van dit proefschrift richten zich op het kwantificeren van verschillende vormen van tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): de recombinante humane vorm, een recombinante “death receptor 4 (DR4-)” specifieke variant en de endogeen voorkomende vorm.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we een antilichaam-vrije LC-MS/MS methode die een nauw gerelateerde DR4-specifieke variant rhTRAIL^{4C7} onderscheidt van het wild type rhTRAIL. Beide worden gemeten met een kwantificeringslimiet (LLOQ) van 20 ng/mL (350 pM) in humaan en muizenserum. Als monstervoorbewerking wordt Ni²⁺-geïmmobiliseerd metaal-affiniteitschromatografie (IMAC) toegepast waarmee beide rhTRAIL varianten aanzienlijke affiniteit hebben vanwege de histidines die zich aan het oppervlak van de eiwitten bevinden. Na de verrijking worden de eiwitten gedigesteerd en worden er twee signatuurpeptiden gekozen die zorgen voor de hoogste gevoeligheid en die de rhTRAIL variant van het wild-type rhTRAIL kunnen onderscheiden. Om onbedoelde oxidatie te voorkomen van het in de peptiden aanwezige methionine tijdens de monsterbewerking en de daaropvolgende analyse, worden de peptiden volledig geoxideerd tot hun sulfoxiden. Absolute kwantificatie wordt bereikt door het gebruik van ¹⁵N-metabolisch gelabelde interne standaarden van beide varianten. Deze zorgen voor correctie van eventuele verliezen tijdens de verrijkingstap op eiwitniveau en de digestie tot signatuurpeptiden. De methode is volledig gevalideerd in overeenstemming met internationale richtlijnen en toegepast voor de bepaling van de farmacokinetische profielen van beide varianten, die tegelijkertijd zijn toegediend aan muizen. Deze gelijktijdige analyse van de nauw gerelateerde

rhTRAIL varianten met een verschil van slechts een paar aminozuren toont duidelijk de selectiviteit aan van de ontwikkelde antilichaam-vrije eiwit LC-MS/MS methode.

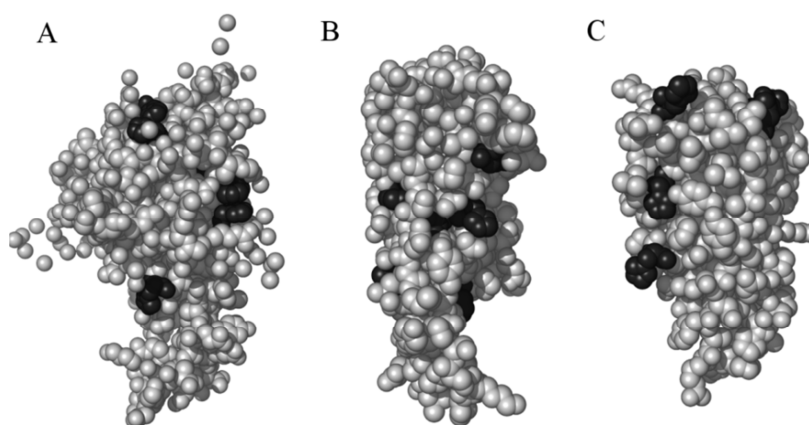
In **hoofdstuk 4** wordt een methode gepresenteerd waarin de monstervoorbewerking is uitgebreid met een initiële sterke kation-wisselings (SCX) SPE stap en waarin de LC scheiding is geminiaturiseerd door het gebruik van een LC-MS chip interface op microschaal. Er is hier gekozen voor SCX vanwege het hoge iso-elektrische punt van TRAIL (8.9) in vergelijking met dat van de matrix eiwitten die worden verrijkt met IMAC. Dit levert een verbeterde opzuivering op en daardoor een toename in gevoeligheid in humaan serum tot 0.5 ng/mL (8.8 pM) rhTRAIL^{WT}, hetgeen dicht bij de LLOQ van 0.2 ng/mL (3.5 pM) ligt van een gevalideerde ELISA die al eerder werd toegepast in klinische fase 1 studies. Daarnaast geeft het ons, als alternatief, ook de mogelijkheid om een kleiner monstervolume te gebruiken van 20 µL met nog steeds LLOQ's van 2 ng/mL (35 pM) voor rhTRAIL^{WT} en 10 ng/mL (175 pM) voor rhTRAIL^{4C7}. Dit biedt de mogelijkheid in een enkele muis de gehele farmacokinetische curve te bepalen in plaats van dat er voor ieder tijdspunt een muis opgeofferd moet worden.

In **hoofdstuk 5** wordt beschreven hoe de SCX verrijking op eiwitniveau wordt omgezet in een SCX verrijking op peptideniveau. Dit biedt voor het eerst de mogelijkheid tot het analyseren van endogene niveaus van sTRAIL met LC-MS/MS tot op een niveau van 3 pM in zowel sputum als speeksel. De ontwikkelde methode is gebruikt voor het vergelijken van de sputum- en speekselniveaus van sTRAIL van mensen uit een gezonde controlegroep en een groep astmapatiënten.

Generieke LC-MS/MS methodes bieden meer flexibiliteit dan antilichaam-gebaseerde methoden. Zo zou de analyse van de TRAIL varianten uitgebreid kunnen worden met andere rhTRAIL varianten, zolang er signatuurpeptiden beschikbaar zijn die genoeg gevoeligheid bieden en de varianten van elkaar kunnen onderscheiden. Er zouden b.v. analysemethoden ontwikkeld kunnen

worden die meerdere DR4- of DR5-specifieke varianten tegelijkertijd in één analyse kunnen kwantificeren.

Daarnaast zou het erg interessant zijn om de antilichaam-vrije LC-MS/MS methodiek ook toe te passen op andere leden van de TNF superfamilie, aangezien de fysisch-chemische eigenschappen van sTRAIL overlap vertonen met die van sommige andere leden, zoals Lymphotoxin α (TNF β) en het a-proliferation inducing ligand (APRIL). Alle drie bevatten meerdere histidines aan het oppervlak van de eiwitstructuur (Figuur 1) en hebben een hoog iso-electrisch punt rhTRAIL 8.9, TNF β 9.0 en APRIL 9.4.



Figuur 1 De moleculaire eiwitstructuren van de monomeren van de leden van de TNF superfamilie: (A) sTRAIL, (B) lymphotoxin α (TNF β) en (C) a-proliferation-inducing ligand (APRIL).²⁻⁴ De histidines die zijn afgebeeld in het zwart op het oppervlak van de eiwitstructuren vertonen affiniteit met de geïmmobiliseerde Ni²⁺ metaalionen.

In het geval van APRIL zou het interessant zijn om de analyse te combineren met die van TRAIL, omdat beide cytokines een verhoging in concentratie hebben laten zien in het serum van patiënten met de auto-immuunziekte systemische lupus erythematosus (SLE).^{5,6} Het combineren van deze biomarker eiwitten in een panel zou kunnen bijdragen aan een verbetering van de gevoeligheid en specificiteit van de diagnose van SLE.⁷ Dezelfde benadering kan toegepast worden voor het onderscheiden van de verschillende iso-vormen

van een eiwit, veroorzaakt door alternatieve splicing van het DNA.^{8,9} Hiervoor geldt eveneens dat de eiwitverrijking gebaseerd moet zijn op een gezamenlijke fysisch-chemische eigenschap en dat de signatuurpeptiden de specifieke aminozuren moeten bevatten. Er zouden ook post-translationele modificaties voor kunnen komen, zoals glycosylering en phosphorylering van het eiwit. Dit biedt zelfs nieuwe mogelijkheden voor de monstervoorbewerking, zoals lectin of IMAC verrijking.

Dit proefschrift laat zien dat er vele voordelen verbonden zijn aan de ontwikkeling van LC-MS/MS methoden voor eiwitten, gebaseerd op hun fysisch-chemische eigenschappen. Eiwitten met een hoog iso-elektrisch punt in vergelijking met veel voorkomende matrix eiwitten, zoals albumine (pI 5.3) in serum zijn bijvoorbeeld zeer geschikt voor SCX verrijking. Eiwitstructuren met histidines op het oppervlak zijn geschikt voor IMAC. Tijdens deze monstervoorbewerking op het eiwitniveau is het van belang om inzicht te hebben in de grootte van het eiwit, het feit dat het minder diffusie vertoont en van de beperking in beschikbaarheid van analoge of isotoop-gelabelde eiwit interne standaarden.¹⁰ Deze beperkingen zijn in mindere mate van belang voor peptiden, maar de proteolytische digestie van het eiwit resulteert naast het signatuur peptide ook in een groot aantal matrix peptiden, die aanwezig zijn in eiwit rijke matrices, zoals plasma of serum en die vaak zeer vergelijkbare eigenschappen hebben.

Van veel van de beschikbare kennis over eiwitzuivering op preparatieve schaal is nog niet volledig geprofiteerd voor de monstervoorbewerking van eiwitten op analytische schaal. Voor de eiwitzuivering van recombinante eiwitten op preparatieve schaal worden vaak affiniteit tags ontworpen en toegepast. De tags geven vaak een hoge opbrengst in zuiverheid, creëren veel mogelijkheden in verrijking en kunnen gemakkelijk verwijderd worden na de opzuivering door een eiwitdigestie.¹¹ Een veelgebruikte affiniteitstag is een polyhistidine-tag met meerdere histidines, die zeer geschikt is voor IMAC verrijking. De reeds beschikbare kennis op preparatieve schaal kan ook gebruikt worden voor verrijking op analytische schaal, gebaseerd op de affiniteit van histidines die zich al van nature bevinden op het oppervlak van het eiwit, met IMAC. Het is

zelfs niet altijd nodig om een his-tag te verwijderen voor toediening in een preklinische studie en nadat het recombinante eiwit is opgezuiverd. Hierdoor is de his-tag zelfs ook nog beschikbaar voor verrijking op analytische schaal.¹²

Ook op peptide niveau kan de verrijkingsmethode geselecteerd worden op basis van de fysisch-chemische eigenschappen. In dit geval zal de methode gebaseerd moeten worden op de aminozuren waaruit het signatuur peptide is opgebouwd. Peptiden met veel positief geladen aminozuren (arginine, lysine of histidine) zijn geschikt voor een kationenwisselaar en peptiden met veel negatief geladen aminozuren (asparaginezuur of glutaminezuur) zijn geschikt voor een anionenwisselaar.¹³ Met het toenemen van onze kennis van deze technieken, groeien ook de mogelijkheden voor het toepassen van meer generieke methoden. Hierdoor wordt de weg vrijgemaakt om deze toe te passen voor steeds meer eiwit-gebaseerde biomarkers en biofarmaceutica.

Referenties

- (1) Walsh, G. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 992–1000.
- (2) Mongkolsapaya, J.; Grimes, J. M.; Chen, N.; Xu, X. N.; Stuart, D. I.; Jones, E. Y.; Screaton, G. R. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 1048–1053.
- (3) Banner, D. W.; Darcy, A.; Janes, W.; Gentz, R.; Schoenfeld, H. J.; Broger, C.; Loetscher, H.; Lesslauer, W. *Cell* **1993**, *73*, 431–445.
- (4) Schuepbach-Mallepell, S.; Das, D.; Willen, L.; Vigolo, M.; Tardivel, A.; Lebon, L.; Kowalczyk-Quintas, C.; Nys, J.; Smulski, C.; Zheng, T. S.; Maskos, K.; Lammens, A.; Jiang, X.; Hess, H.; Tan, S.-L.; Schneider, P. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, jbc.M115.661405.
- (5) Lub-de Hooge, M. N.; de Vries, E. G. E.; de Jong, S.; Bijl, M. *Ann. Rheum. Dis.* **2005**, *64*, 854–858.
- (6) Boghdadi, G.; Elewa, E. A. *Rheumatol. Int.* **2014**, 1217–1223.
- (7) Boichenko, A. P.; Govorukhina, N.; Klip, H. G.; van der Zee, A. G. J.; Güzel, C.; Luider, T. M.; Bischoff, R. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 4995–5007.
- (8) Torsetnes, S. B.; Levernæs, M. S.; Broughton, M. N.; Paus, E.; Halvorsen, T. G.; Reubsæet, L. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 6983–6992.
- (9) Foster, M. W.; Thompson, J. W.; Ledford, J. G.; Dubois, L. G.; Hollingsworth, J. W.; Francisco, D.; Tanyaratsrisakul, S.; Voelker, D. R.; Kraft, M.; Moseley, M. A.; Foster, W. M. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 3722–3732.
- (10) Bronsema, K. J.; Bischoff, R.; van de Merbel, N. C. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, *893-894*, 1–14.
- (11) Wood, D. W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, *26*, 54–61.
- (12) Li, Y. C.; Liang, Y.; Tang, Z. Y.; Xiao, Y. N.; Hao, H. P.; Wang, G. J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *70*, 505–511.
- (13) Bronsema, K. J.; Bischoff, R.; Bouche, M.-P.; Mortier, K.; van de Merbel, N. C. *Bioanalysis* **2015**, *7*, 53–64.