



Doctoral Thesis

Differential analysis of biological samples by mass spectrometry

Author(s):

McCombie, Gregor

Publication Date:

2006

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005273719> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 16749

DIFFERENTIAL ANALYSIS OF BIOLOGICAL SAMPLES BY MASS SPECTROMETRY

A dissertation submitted to the

ETH Zurich

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

Gregor McCombie

Master of Science ETH

Born September 26th, 1976

Citizen of the UK and Gipf-Oberfrick

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner

Dr. Richard Knochenmuss, co-examiner

Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, co-examiner

2006

1 Summary

In differential analysis, the molecular compositions of groups or classes of biological samples are compared. The groups are delineated according to the biological effect under study, such as diseased vs. normal or treated vs. untreated groups. Compounds exhibiting significant differential abundance – so called biomarkers – can be used in diagnosis, drug efficacy testing or phenotyping.

There are three major steps involved in differential analysis: 1) Sample preparation, 2) measurement and 3) data analysis. The bulk of the work presented here is devoted to describing advances made in each of these steps. This is rounded off by reporting on work incorporating all three steps for the differential analysis of lipids.

Two new sample pretreatment methods were developed to facilitate the discovery of differential molecular compositions. One approach was to make use of phage display derived antibodies in order to develop a modular depletion strategy to eliminate the most abundant proteins in blood serum. These proteins are present at such high concentrations that they mask the detection of less abundant proteins that are more likely to be linked to subtle physiological changes.

The second pretreatment advance was related to sample preparation for matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). Electrospray deposition has been shown to provide extraordinarily homogenous samples. However, in this thesis it is demonstrated that thin samples on some metals can also result in a signal enhancement in comparison to thick samples. A clear correlation between sample thickness and ion signal could be proven, for at least one MALDI matrix. The signal enhancement is due to a reduction in the ionization potential of the matrix.

1. Summary

The second major step in differential analysis is the actual measurement, which was performed by MALDI-MS here. At low mass to charge ratio (m/z) in MALDI-MS, spectra usually contain many signals derived from the matrix used to assist analyte ionization. Here it was possible to show that a detailed understanding of ionization mechanisms allows some control of ion suppression effects. The demonstrated characteristics and generality of the suppression of matrix signals greatly facilitates the measurement of small molecular weight compounds by MALDI-MS.

The third key step in differential analysis is the automated processing of the data. Enormous datasets are collected, making manual inspection of the data impractical, if not impossible. Multivariate methods and clustering were applied to MALDI-MS images. Regions on tissue sections could be identified and compared in a multivariate fashion. The resulting images were based on the changes of many signals, rather than just one single peak as is common in MALDI-MS imaging.

Finally, the individually developed steps were combined and electrospray MALDI-MS with multivariate data analysis was applied to yeast lipid extracts. Spiked lipid extract samples could be separated from non-spiked samples. The multivariate methods successfully identified the spiked substance as the differentiating compound.

2 Zusammenfassung

In der differentiellen Analyse werden Gruppen von biologischen Proben in Bezug auf ihre molekulare Zusammensetzung verglichen. Die Gruppen werden aufgrund der untersuchten biologischen Effekte wie krank/gesund oder behandelt/unbehandelt definiert. Moleküle mit signifikant unterschiedlichen Konzentrationen – so genannte Biomarker – können für Diagnosen, Wirksamkeitsprüfungen von Medikamenten oder Phänotyp Bestimmungen benutzt werden.

Differenzielle Analyse besteht aus drei Hauptschritten: 1) Probenvorbereitung 2) Messung und 3) Datenanalyse. Der Hauptteil dieser Dissertation befasst sich mit Arbeiten in den einzelnen Schritten, während zum Schluss noch ein Beispiel von differentieller Fettstoffanalyse behandelt wird, welche alle Schritte beinhaltet.

Um die Entdeckung sich unterscheidender molekularer Zusammensetzungen zu erleichtern wurden zwei neue Probenvorbereitungsmethoden entwickelt. Einer der Ansätze war die Entwicklung einer flexiblen Methode zur Entfernung der häufigsten Serumproteine durch Antikörper aus Phagen Display. Diese häufigsten Proteine sind in so hohen Konzentrationen vorhanden, dass sie das Erfassen der weniger häufigen Proteine, die mit grösserer Wahrscheinlichkeit mit feinen physiologischen Änderungen verknüpft sind, verhindern können.

Die zweite Vorbehandlungsmethode hat mit der Probenvorbereitung in „matrix assisted laser desorption/ionization“ Massenspektrometrie (MALDI-MS) zu tun. Es war bekannt, dass durch Elektrospray aufgetragene Proben enorm gleichmässig werden. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass dünne Proben auf einigen Metallen, im Vergleich zu dicken Proben, auch eine Signalverstärkung zur Folge haben. Eine klare Korrelation zwischen Probendicke und Signalstärke konnte für

2. Zusammenfassung

mindestens eine Matrix bewiesen werden. Die Signalverstärkung ist auf ein erniedrigtes Ionisationspotential der Matrix zurückzuführen.

Der zweite Hauptschritt in der differentiellen Analyse ist die eigentliche Messung und wurde hier mittels MALDI-MS durchgeführt. Normalerweise ist in MALDI-MS der tiefe m/z Bereich voller Matrixsignale. Hier war es möglich zu zeigen, dass ein gründliches Verständnis der Ionisierungsprozesse eine beschränkte Kontrolle über Ionenunterdrückungseffekte ermöglicht. Eigenschaften und Allgemeingültigkeit von Matrixunterdrückungseffekten wurden beschrieben, was die Messung von kleinen Molekülen durch MALDI-MS erheblich vereinfacht.

Der dritte Hauptschritt in der differentiellen Analyse ist die automatisierte Datenauswertung. Da riesige Mengen an Daten gesammelt werden, ist ihre Analyse von Hand praktisch unmöglich. Multivariate Methoden und Clustering wurden auf MALDI-MS Bildern angewandt. Interessante Flächen auf Gewebeschnitten konnten identifiziert und in einer multivariaten Art verglichen werden. Die resultierenden Bilder basierten auf den Änderungen vieler Signale anstatt wie mit MALDI-MS Bildern üblich, nur einem einzigen.

Schlussendlich wurden die separat entwickelten Schritte kombiniert, und Electrospray-MALDI-MS mit multivariater Datenanalyse wurde auf Fettstoff-Extrakte von Hefezellen angewendet. Reine Extrakte konnten zuverlässig von solchen getrennt werden, bei denen wenig eines zusätzlichen Stoffes beigemischt wurde. Die Analysemethoden konnten erfolgreich den beigemischten Stoff identifizieren.