Industrielle Gemeinschaftsforschung

Schlussbericht (zur Veröffentlichung)

zu IGF-Vorhaben Nr. 19456 BG

Thema

Zentrifugalmikrofluidische Automatisierung der Probenvorbereitung für die proteomische Analyse von infektionsbiologisch relevantem Kohortenmaterial durch Massenspektrometrie

Berichtszeitraum

01.04.2017 – 31.3.2020

Forschungsvereinigung

Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung e.V.

Forschungseinrichtung(en)

Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung e.V.

Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald

Freiburg, 30.9.2020

Ort, Datum

Tobias Hutzenlaub

Name und Unterschrift aller Projektleiterinnen und Projektleiter der Forschungseinrichtung(en)

Gefördert durch:

Bundesministerium für Wirtschaft und Energie

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Forschungsnetzwerk Mittelstand

1. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Übersicht über das Projekt

Zielsetzung

Das Forschungsziel des IGF-Vorhabens 19456 BG („NanoPrep“) war es, eine zentrifugalmikrofluidische Automatisierung der bisher manuell durchgeführten Probenvorbereitung für die proteomische Analyse von biologischem Kohortenmaterial durch nano-LC-MS/MS (Flüssigchromatographie mit Tandem Massenspektrometrie-Kopplung) bereitzustellen. Eine solche Automatisierung ermöglicht eine reproduzierbare, quantitative Analyse von Proteinen. Dies ist insbesondere von Relevanz bei großen Probensammlungen/Kohorten für Diagnostik und Prognostik wo bereits die Menge an Proben eine manuelle Probenvorbereitung stark erschwert. Angestrebt wurde ein voll automatisierter enzymatischer Verdau von Proteinen mittels Trypsin zu einem Peptidgemisch sowie die Aufreinigung (Entsalzung) dieses Peptidgemisches.

Zeitplan

Das Projekt war für eine Laufzeit vom 01.04.2017 bis zum 30.09.2019 ausgelegt. Durch Verzögerungen in der Projektbearbeitung musste das Projekt einmalig bis zum 31.03.2020 verlängert werden.

Darstellung der erzielten Ergebnisse

Im Zentrum dieses Vorhabens stand die Machbarkeit einer zentrifugalmikrofluidisch automatisierten Probenvorbereitung von biologischem Kohortenmaterial für die proteomische Massenspektrometrie nachzuweisen. Die prinzipielle Vorgehensweise war den hierfür gängigsten Probenvorbereitungsassay auszuwählen, diesen an die Rahmenbedingungen der zentrifugalen Mikrofluidik anzupassen und dann zu automatisieren. Dieser Probenvorbereitungsassay besteht aus folgenden zwei Schritten:

1) **Verdau:** Die Proteine einer Probe (z.B. Serum) werden mittels des Enzyms Trypsin zu Peptiden verdaut. Der Verdau wird durch eine Ansäuerung mittels Essigsäure nach einem definierten Zeitraum abgestoppt.
2) **Entsalzen:** Anschließend wird der Peptidmix aufgereinigt d.h. Elemente (wie z.B. Salze), die die massenspektrometrische Analyse stören würden, werden entfernt. Dies geschieht mittels Festphase d.h. die Peptide binden z.B. an einer Säule an, anschließend werden die störenden Bestandteile weggewaschen und schließlich die Peptide eluiert.

Frühzeit im Projekt wurde entschieden für die Automatisierung von Verdau und Entsalzung 2 getrennte zentrifugalmikrofluidische Chips zu entwickeln und keine Gesamtintegration durchzuführen. Grund hierfür ist, dass sich dadurch das Spektrum an möglichen Anwendungen erhöht, weil sich nun die Chips leichter mit Systemen kombinieren lassen, für die nur entweder die zentrifugalmikrofluidische Entsalzung oder der zentrifugalmikrofluidische Verdau von Interesse ist (z.B. ist in manchen LC-MS/MS Systemen die Aufreinigung als weitere Vorsäule integriert. Hier ist nur ein Chip für den Verdau sinnvoll.). Entsprechend sind die auf den folgenden Seiten dargestellten Ergebnisse nach Verdau und Entsalzung aufgeteilt.

Ergebnisse Verdau

Um die durch die Mikrofluidik zu verdauenden Proben einem Benchmarking unterziehen zu können, wurde der in **Abb. 1** dargestellte manuelle Kontroll-Workflow auf der Grundlage von vorläufigen Experimente entwickelt und festgelegt. Der Gesamtproteingehalt im menschlichen Serum variiert je nach Probe zwischen 60 und 80 µg/µl. Der manuelle Arbeitsablauf wurde daher für eine mittlere Konzentration von 70 µg/µl ausgelegt, wobei 2,9 µg Protein verdaut werden und bei Bedarf mehrere Injektionen in das LC-MS/MS-System möglich sind. Zu diesem Zweck wurden 2 µl gepooltes Humanserum (Dunn Labortechnik GmbH, Deutschland) in 52 µl UT-Puffer (8 M Harnstoff (Sigma Aldrich, USA) und 2 M Thioharnstoff (Sigma Aldrich, USA)) verdünnt, was zu einer Konzentration des UT-Puffers von 96,4 Vol% führte, um die Probe 5 Minuten lang zu denaturieren. 1,1 µl der Verdünnung wurden weiterverwendet und mit 10,7 µl von 15,5 ng/µl modifiziertem Trypsin (Promega, USA) in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Sigma Aldrich, USA) gemischt. Der Verdau erfolgt bei einem Massenverhältnis von Protein zu Trypsin von 17:1 und wird bei 37°C für 17 Stunden durchgeführt. Der Verdau wurde durch Zugabe von Essigsäure (Carl Roth, Deutschland) gestoppt.

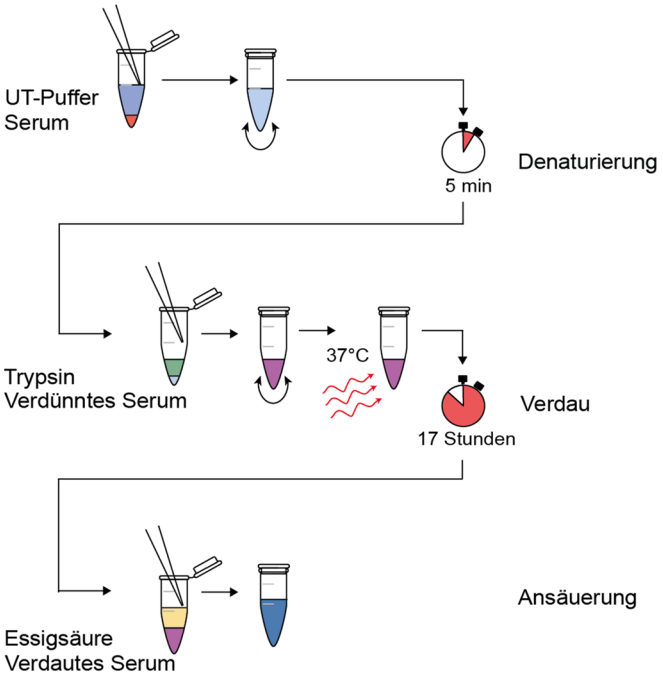

Abbildung 1: *Darstellung des entwickelten Verdau Workflows welcher einerseits automatisiert wird und andererseits als Kontrolle bei jedem zentrifugalmikrofluidisch durchgeführten Verdau eingesetzt wird.*

Das mikrofluidische Layout des zentrifugalmikrofluidischen Verdauchips wurde mit SolidWorks 2017 (Dassault Systèmes, Frankreich) entworfen und durch Netzwerksimulationen in MATLAB Simulink Simscape R2016a (MathWorks, USA) ausgelegt. Die Chips wurden von Hahn-Schickard in COC-Folientechnologie hergestellt (**Abb. 2**). Dieser Prozess umfasst die folgenden Schritte: Ein Masterwerkzeug wurde durch Fräsen (KERN Microtechnik, Deutschland) des Designs in PMMA (Evonik, Deutschland) mit 150 mm Durchmesser und 6 mm Dicke hergestellt. Anschließend wurde ein Negativwerkzeug gegossen, das aus Elastosil RT-607 PDMS (Wacker

Chemie, Deutschland) besteht. Strukturierte Folien wurden durch Mikro-Thermoformen einer 200 µm COC 6013/8007 coextrudierten Folie (TOPAS Advances Polymers, Deutschland) mit einer modifizierten Heißprägemaschine HEX01 (Jenoptik, Deutschland) hergestellt. Zur Versiegelung der mikrofluidischen Strukturen mit coextrudierter Folie COC 6013/8007 wurde thermisches Siegeln auf der modifizierten Heißprägemaschine eingesetzt.

Abbildung 2: *In NanoPrep entwickelter zentrifgualmikrofluidischer Chip zur Durchführung von automatisierten Verdauworkflows. Parallel können bis zu 6 Proben verdaut werden.*

Die fluidische Funktionalität des Verdauchips ist in **Abb. 3** dargestellt.

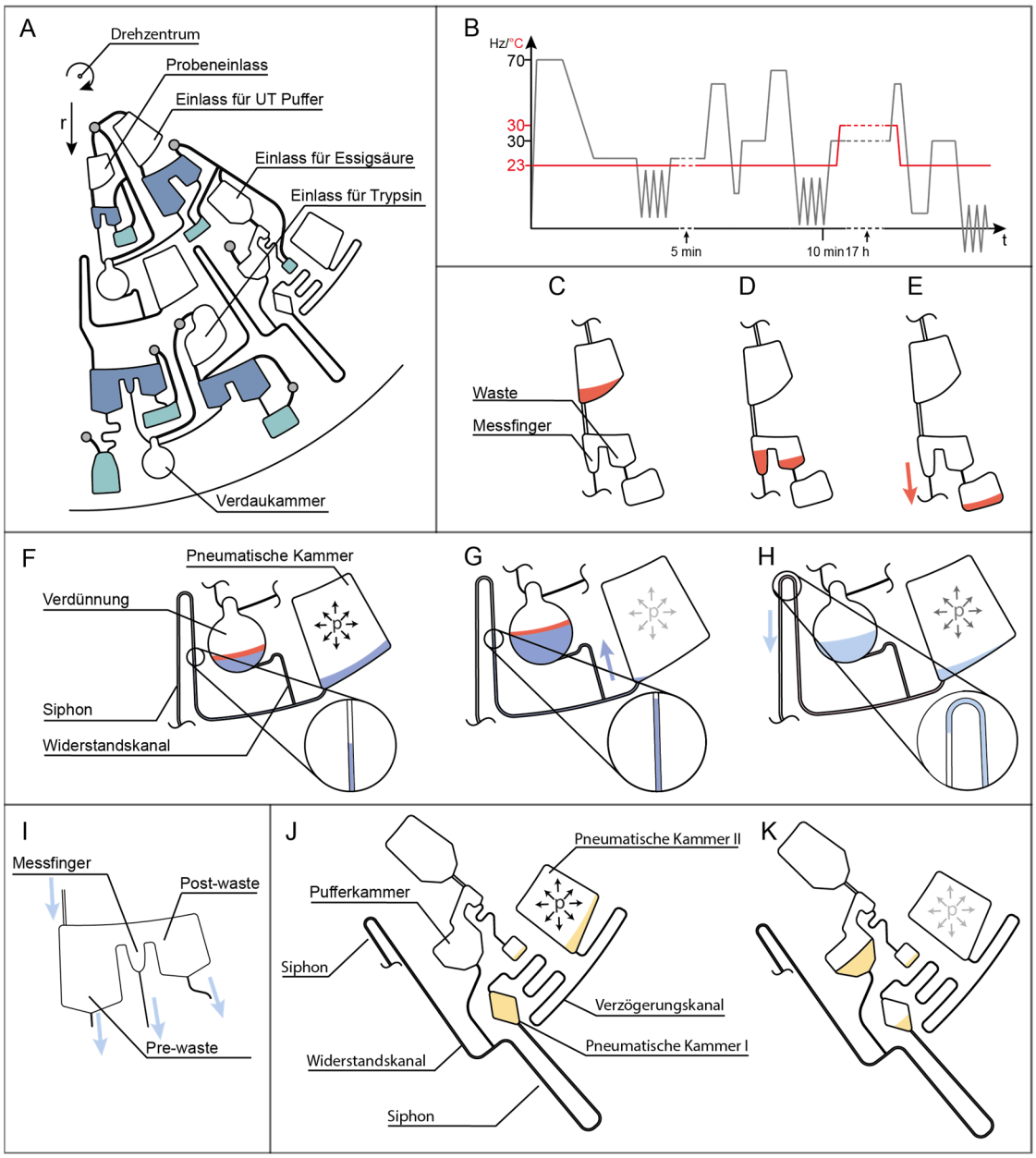

Abbildung 3: *Schematische Darstellung des mikrofluidischen Layouts für den Verdau von Humanserum (A) und Frequenzprotokoll (B). Zuerst werden alle Flüssigkeiten genau abgemessen um Pipettierungenauigkeiten und –fehler auszuschließen (Prinzip: C-E). Die Probe wird mit UT Puffer verdünnt (F) und weitergeschaltet (G-H). Ein kleiner Teil dieser Mischung wird abgemessen und in die Verdaukammer überführt (I) und mit Trypsin verdaut. Während des tryptischen Verdaus wird die Essigsäure zurückgehalten (J-K) und nach Abschluss zum Abstoppen in die Verdaukammer überführt.*

Für die Bestimmung der fluidischen Abmessgenauigkeit (Englisch: „Metering“) wurden zusätzlichen Strukturen zur Auswertung integriert. Nach dem Abmessen wird die Flüssigkeit in flache, geometrisch sehr definierte Auswertungskanäle zentrifugiert und die Höhe des Meniskus im Kanal mit einem Stroboskopaufbau bei 30 Hz ausgewertet. Bei dieser hohen Rotationsfrequenz werden die auf den Meniskus wirkenden Kapillarkräfte im Vergleich zu den Zentrifugalkräften vernachlässigbar. Dadurch ist der resultierende Meniskus der Flüssigkeitssäule in den mikrofluidischen Kanälen flach, was eine exakte Bestimmung des

Flüssigkeitsvolumens ermöglicht. Zur endgültigen Quantifizierung des dosierten Volumens wurden die Stroboskopbilder in Solidworks importiert und mit der CAD-Struktur der Auswertekanäle abgeglichen. Für jede Abmessstruktur wurde diese Auswertung dreimal wiederholt und der CV ermittelt. Es wurde ein hervorragendes Ergebnis des %CVs zwischen 0,31 (Serum) und 1,32 (Essigsäure) festgestellt (**Abb. 4**).

Flüssigkeit	Durchschnittsvolumen [µl]	%CV
Serum	0,86	0,31
UT-Puffer	22,62	1,17
Verdünntes Serum	1,15	0,15
Trypsin	10,01	0,87
Essigsäure	9,96	1,32

Abbildung 4: *Mittleres Volumen und Variationskoeffizient der Messstrukturen (n=3).*

An drei aufeinander folgenden Tagen wurde pro Tag ein Triplikat Humanserum auf dem zentrifugalmikrofluidischen Chip („Disk Set“) und ein Triplikat mittels des manuellen Kontroll-Workflows („manuelles Set“) verdaut. Die biologische Bewertung erfolgte durch den Vergleich der beiden Probensätze mittels massenspektrometrischen Analyse.

Die Probensätze wurden manuell mit Millipore ZipTip C18 Spitzen (Merck KGaA, Deutschland) aufgereinigt, durch Lyophilisierung getrocknet und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -80°C gelagert. Ein Ultimate 3000 RSLC (Thermo Scientific), gekoppelt an einen Q-Exactive HF (ThermoFisher), wurde für massenspektrometrische Analysen verwendet. Lyophilisierte tryptische Peptide wurden in 2% ACN / 0,1% Essigsäure in Wasser (MS-Puffer A) resolubilisiert, und in das LC-System injiziert. Die Proben wurden in randomisierter Reihenfolge gemessen. Die Rohdaten wurden mit der Software Genedata Refiner (v13.0.1, Genedata, Basel, Schweiz) verarbeitet. Die Datenbanksuche wurde mit dem MASCOT-Suchalgorithmus v2.6 (Linux) gegen eine UniProt/Swissprot-Datenbank durchgeführt. Ein spezifisches Protein wurde in einer Probe identifiziert, wenn mindestens ein für dieses Protein einzigartiges Peptid gefunden wurde. Die Datensätze wurden auf Proteinebene hinsichtlich der Anzahl der identifizierten Proteine sowie der Reproduzierbarkeit der Quantifizierung ausgewertet (**Abb. 4**).

Es wurde eine fast gleiche Anzahl von 604 Proteinen im Datensatz welcher zentrifugalmikrofluidisch verdaut wurde und 602 Proteinen in den Kontrollproben identifiziert. Die Verteilung der berechneten Intensitäts-CVs für alle Proteine ist in **Abb. 4A** zusammengefasst. Der Median des automatisierten Datensatzes betrug 31,7 %, während der Median für die händische durchgeführte Kontrolle 39,3 % betrug. Um zu analysieren, wie der Intensitäts-CV mit der Proteinhäufigkeit in jedem Satz zusammenhängt, wurde der Intensitäts-CV gegenüber dem Proteinhäufigkeitsrang (Sortierung der Proteine von der höchsten Intensität zur niedrigsten)

aufgetragen (siehe **Abb. 4B & C**). Intensitäts-CVs unter 30% sind grau dargestellt. Im Disk Set wiesen 46,4 % der Proteine einen Intensitäts-CV von weniger als 30 % auf, während dies im manuellen Set nur bei 29,7 % aller identifizierten Proteine der Fall war. Um die beiden Sätze vergleichen zu können, wurde in **Abb. 4B** eine Fitfunktion für die CV-Werte hinzugefügt. Die Analyse für alle identifizierten Proteine zeigte eine höhere Reproduzierbarkeit im Disk Set im Vergleich zum manuellen Set, was durch den niedrigeren Median der CV-Intensität und den Vergleich der CV-Profile angezeigt wird.

Die Gesamtreproduzierbarkeit in beiden Sets scheint durch den Arbeitsablauf selbst begrenzt zu sein, da dieser keine Reduktion und Alkylierung der Proben vor dem Aufschluss beinhaltet. Die Einbeziehung dieser Schritte würde höchstwahrscheinlich zu einem vollständigeren Aufschluss führen und damit die Variabilität in der Quantifizierung weiter reduzieren. Die Reproduzierbarkeit des Arbeitsablaufs kann jedoch in jedem Fall deutlich verbessert werden, wenn der entwickelte zentrifugalmikrofluidsche Chip verwendet wird. Zusätzlich werden durch die Automatisierung Arbeitsschritte gespart und somit Benutzerfehler potentiell reduziert.

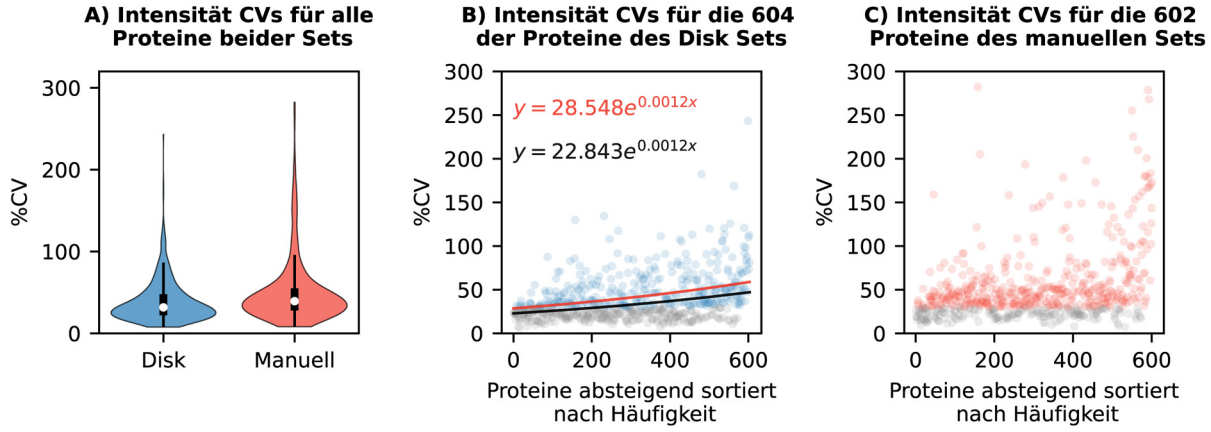

Abbildung 5: *Proteomische Ergebnisse:* ***A)*** *Verglichen werden die CV-Werte für die Intensität aller Proteine, die auf dem zentrifugalmikrofluidischen Chip („Disk Set“) und in den manuellen Kontrollversuchen („manuelles Set“) ermittelt wurden.* ***B)*** *Intensitäts-CV aufgetragen nach dem Rang der Häufigkeit des Proteins für das Disk Set. CV-Profile für das Disk Set und das manuelle Set. Zu Visualisierungszwecken wurden die Trendlinien für das Disk-Set (schwarz) und das manuelle Set (rot) im gleichen Diagramm eingezeichnet.* ***C)*** *Intensitäts-CV aufgetragen nach dem Rang der Häufigkeit des Proteins für das manuelle Set.*

Ergebnisse Entsalzung

Analog zu Verdau wurde auch bei der Entsalzung ein manueller Workflow etabliert, mit welchem die Automatisierung verglichen werden kann (**Abb. 6**). Neben einer Probe kam hier ein Waschpuffer (8 % ACN, 0.05% TFA) und ein Elutionspuffer (68%ACN, 0.05%TFA) zum Einsatz. Als Festphase wurden Thermo Scientific HyperSep Tips verwendet.

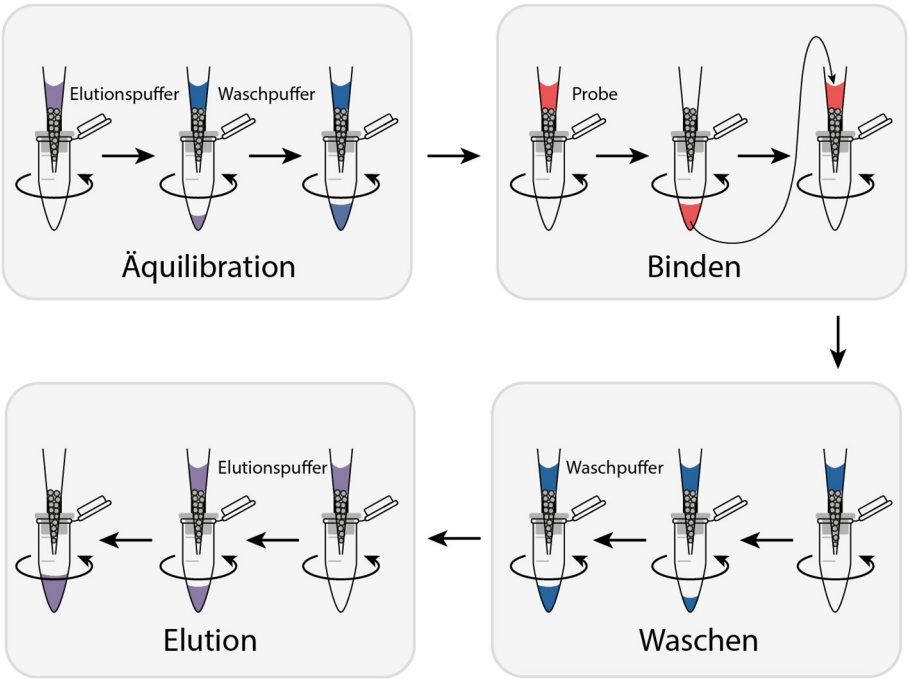

Abbildung 6: *Darstellung des entwickelten Entsalzungs Workflows auf Basis von HyperSep welcher einerseits automatisiert wird und andererseits als Kontrolle bei jeder zentrifugalmikrofluidisch durchgeführten Entsalzung eingesetzt wird. Elutionspuffer und Waschpuffer werden neben Eluieren und Waschen auch zum Äquilibrieren der Festphase eingesetzt.*

Der zentrifugalmikrofluidische Chip wurde im gleichen Herstellungsverfahren, wie schon im Abschnitt „Ergebnisse Verdau“ hergestellt.

Evaluiert wurde die Funktionalität durch den Verdau und die Aufreinigung von gepooltem Humanserum. Hierbei wurden sowohl händisch als auch mit dem entwickelten Verdauchip verdaut. Beide Ansätze wurden dann sowohl zentrifugalmikrofluidisch als auch mittels HyperSep entsalzt. Alle 4 Kombination (jeweils ein Triplikat) wurden anschließend mit einem Thermo Scientific Orbitrap Velos LC-MS Gerät vermessen und mit MaxQuant ausgewertet. Alle Kombinationen zeigen vergleichbare Proteinidentifzierungen d.h. die zentrifugalmikrofluidische Entsalzung ist der manuellen ebenbürtig bei signifikant weniger Schritte durch den Benutzer.

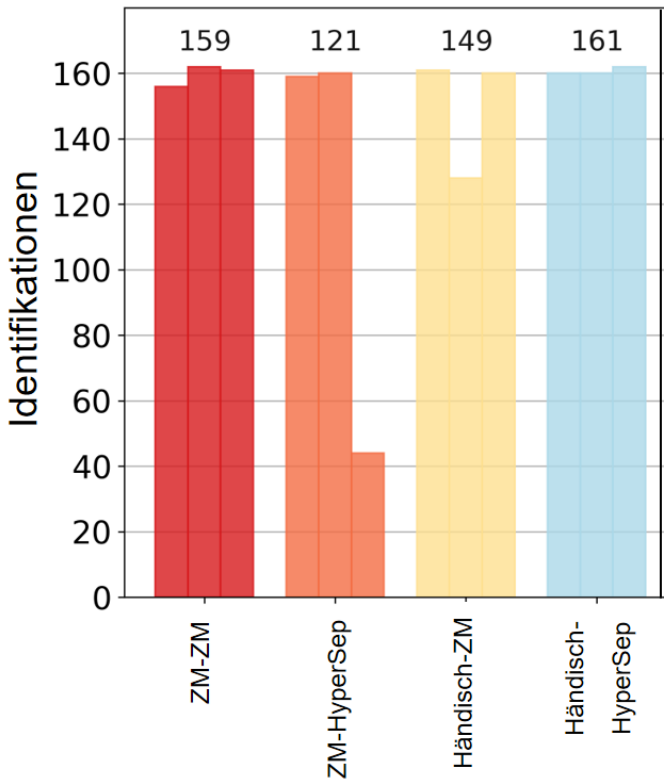

Abbildung 7: *Proteinidentifikation als Maß für die Funktionalität der Entsalzung. Verglichen wurden folgende Experimente: Verdau auf dem zentrifugalmikrofluidischen Verdauchip & Entsalzung auf dem zentrifugalmikrofluidischen Entsalzungschip (ZM-ZM); Verdau auf dem zentrifugalmikrofluidischen Verdauchip & händische Entsalzung mit HyperSep Tips (ZM-HyperSep); Händisch durchgeführter Verdau & Entsalzung auf dem zentrifugalmikrofluidischen Entsalzungschip (Händisch-ZM); Händisch durchgeführter Verdau & händische Entsalzung mit HyperSep Tips (Händisch-HyperSep). Alle Triplikate der 4 Kombinationen zeigen ähnliche Proteinidentifikationen außer bei einem der ZM-HyperSep Triplikate. Dies wurde auf einen Benutzerfehler beim Verwenden der HyperSep Tips zurückgeführt.*

Ergebnisse Schnittstellen

Im Rahmen von NanoPrep sollte zudem das Interfacing zum LC-MS/MS evaluiert werden. Hierzu wurden Experimente mit einem Agilent Autosampler durchgeführt mit dem Ergebnis, dass der Autosampler prinzipiell die entwickelten zentrifugalmikrofluidischen Chips nach erfolgtem Verdau und/oder Entsalzung anstechen kann und so die vorbereitete Probe überführen könnte.

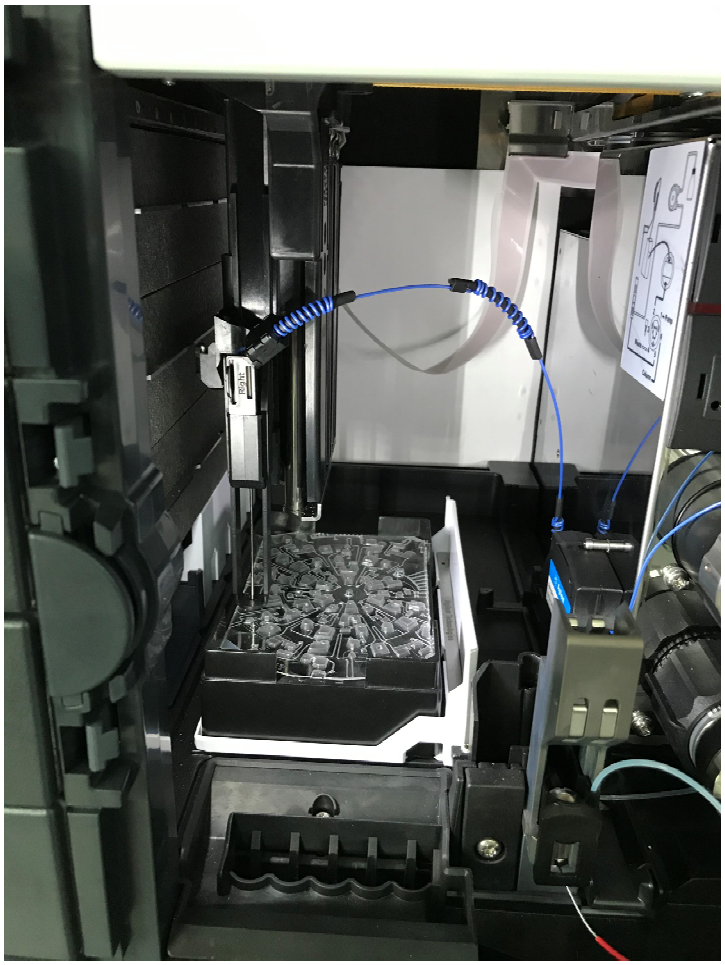

Abbildung 8: *Interfacing: Mittels Autosampler kann eine verarbeitete Probe aus dem zentrifugalmikrofluidischen Chip entnommen werden.*

Fazit

Im Vorhaben NanoPrep wurde die prinzipielle Machbarkeit einer zentrifugalmikrofluidischen Probenvorbereitung (Verdau und Entsalzung) nachgewiesen und somit das grundsätzliche Projektziel erreicht. Eine Abweichung zu den ursprünglich formulierten Zielen ist, dass aus dargelegten Gründen keine Komplettintegration von Verdau und Entsalzung durchgeführt wurde. Zudem wurde das Applikationsbeispiel „Multimarker für die Sepsis Diagnose“ nur modellhaft anhand von gepooltem Serumsproben durchgeführt d.h. es konnten keine realen Patientenproben im Rahmen von NanoPrep analysiert werden. Grund hierfür ist ein Ressourcenmangel, der durch die in vergangenen Berichten dargestellte höhere Aufwand bei der Materialwahl (Kontamination des MS durch COP/Klebefolie sowie Adsorptionsprobleme). Die Lösung dieser Herausforderungen und ein erfolgreiches Proof of Concept wurde als wichtiger eingeschätzt gegenüber der Demonstration in einem spezifischen Anwendungsfeld.

2. Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der Ergebnisse sowie Innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten der Ergebnisse

Der wissenschaftlich-technische Nutzen der erzielten Ergebnisse ist als hoch einzustufen. Es wurden eine Vielzahl von technischen Innovationen im Bereich der zentrifugalen Mikrofluidik entwickelt, die das Forschungsfeld bereichern können. Hierzu zählen insbesondere Materialwahl der zentrifugalmikrofluidischen Chips für die Probenvorbereitung für proteomische Massenspektrometrie, Umgang mit Protein- und Peptidadsorption in zentrifugalmikrofluidischen Chips und Entwicklung geeigneter Probenvorbereitungsprotokolle für die zentrifugalmikrofluidische Automatisierung.

Ein wirtschaftlicher Nutzen insbesondere für KMU liegt darin, dass die Machbarkeit einer automatisierten Probenvorbereitungsmethodik für die proteomische Massenspektrometrie demonstriert wurde. Zusammenhang hier ist, dass das Fehlen einer standardisierten Probenvorbereitungsmethodik als einer der wesentlichen Hindernisse angesehen wird, aufgrund dessen sich die Technologie bis jetzt noch nicht in der Klinik etabliert hat. NanoPrep zeigt hier einen Lösungsweg auf und wird somit bei einer Weiterentwicklung zum Produkt das Geschäftsfeld von KMUs in diesem Themengebiet (insbesondere Massenspektrometrie Dienstleister und Bioinformatik Firmen) signifikant vergrößern.