

Identifizierung von Peptidmarkern zur Erkennung periprothetischer Gelenkinfektionen mittels Kapillarelektrophorese gekoppelt mit Massenspektrometrie (CE-MS)

Methoden

Probenvorbereitung und CE-MS-Analyse

Die Probenvorbereitung und die Kapillarelektrophorese gekoppelt mit Massenspektrometrie (CE-MS) wurden wie beschrieben durchgeführt. Urinaliquots wurden aufgetaut und 700 µl davon mit 700 µl einer Lösung aus 2 M Harnstoff, 10 mM NH₄OH und 0,02 % SDS gemischt. Die Proben wurden mittels eines Centrisart-Zentrifugalfilters mit einer Molekulargewichtsgrenze von 20 kDa (Sartorius, Göttingen, Deutschland) ultrafiltriert, um Proteine mit hohem Molekulargewicht zu entfernen. Das Filtrat wurde mit einer PD-10-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare Bio Sciences, Uppsala, Schweden) entsalzt, um Harnstoff, Elektrolyte und Salze zu entfernen und Polypeptide anzureichern. Die Proben wurden lyophilisiert und bei 4 °C gelagert. Kurz vor der CE-MS-Analyse wurden die Proben in 10 µl HPLC-Grad-Wasser aufgelöst. Proben wurden bei 2 psi für 99 Sekunden in das CE-MS-System injiziert, was zu einem Injektionsvolumen von etwa 280 nl führte. Ein P/ACE MDQ CE-System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) wurde mit einem MicroTOF II MS (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) kombiniert. Eine Lösung aus 20 % Acetonitril (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in HPLC-Grad-Wasser (Roth, Karlsruhe, Deutschland), ergänzt mit 0,94 % Ameisensäure (Sigma-Aldrich), wurde als Laufpuffer verwendet. Für die CE-MS-Analyse wurde die Elektrospray-Ionisationsschnittstelle von Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) auf eine Spannung von -4,0 bis -4,5 kV eingestellt. Spektren wurden über einen m/z-Bereich von 350–3000 aufgenommen und alle 3 Sekunden kumuliert.

CE-MS-Datenverarbeitung

Nach der CE-MS-Analyse wurden massenspektrometrische Ionenpeaks, die identische Moleküle in verschiedenen Ladungszuständen darstellten, mittels MosaFinder-Software in Einzelmassen dekonstruiert. Es wurden nur Signale mit $z > 1$, die in mindestens 3 aufeinanderfolgenden Spektren mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 4 beobachtet wurden, berücksichtigt. Die Daten wurden unter Verwendung von 3151 internen Standards als Referenzdatenpunkte für Masse und Migrationszeit kalibriert, wobei eine globale und lokale lineare Regression angewendet wurde. Für die Kalibrierung der Signalintensität wurden Referenzsignale von 29 häufig vorkommenden Peptiden verwendet. Diese Methode ist sehr reproduzierbar und berücksichtigt analytische und Verdünnungsvariationen in einem einzigen Kalibrierungsschritt. Die erhaltene Peptidliste charakterisiert jedes Polypeptid durch seine kalibrierte Molekülmasse [Da], kalibrierte CE-Migrationszeit [min] und normalisierte Signalintensität. Alle detektierten Peptide wurden in einer Microsoft-SQL-Datenbank gespeichert, abgeglichen und annotiert, was eine weitere statistische Analyse ermöglichte.

Peptidsequenzierung

Peptide wurden mittels CE-MS/MS oder LC-MS/MS analysiert, wie an anderer Stelle

ausführlich beschrieben. Die MS/MS-Experimente verwendeten ein Ultimate 3000 Nano-Flow-System (Dionex/LC Packings, USA) oder ein P/ACE MDQ CE-System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), die beide mit einem Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verbunden waren. Vollständige MS-Scan-Spektren (von m/z 300–2000) wurden im Orbitrap aufgezeichnet. Ionen wurden sequenziell zur Fragmentierung isoliert. Die Datendateien wurden mit Proteome Discoverer 2.4 und der SEQUEST-Suchmaschine gegen die UniProt-Menschendatenbank durchsucht. Relevante Einstellungen beinhalteten die Oxidation von Methionin und Prolin als variable Modifikationen. Die Fehlerrate wurde auf 1 % festgelegt, die Toleranz für die Vorläufermasse betrug 5 ppm und die Toleranz für Fragmentmassen 0,05 Da. Zur weiteren Validierung der ermittelten Peptidsequenzen wurde die berechnete CE-Migrationszeit der Sequenzkandidaten basierend auf der Anzahl basischer Aminosäuren mit der experimentellen Migrationszeit verglichen.

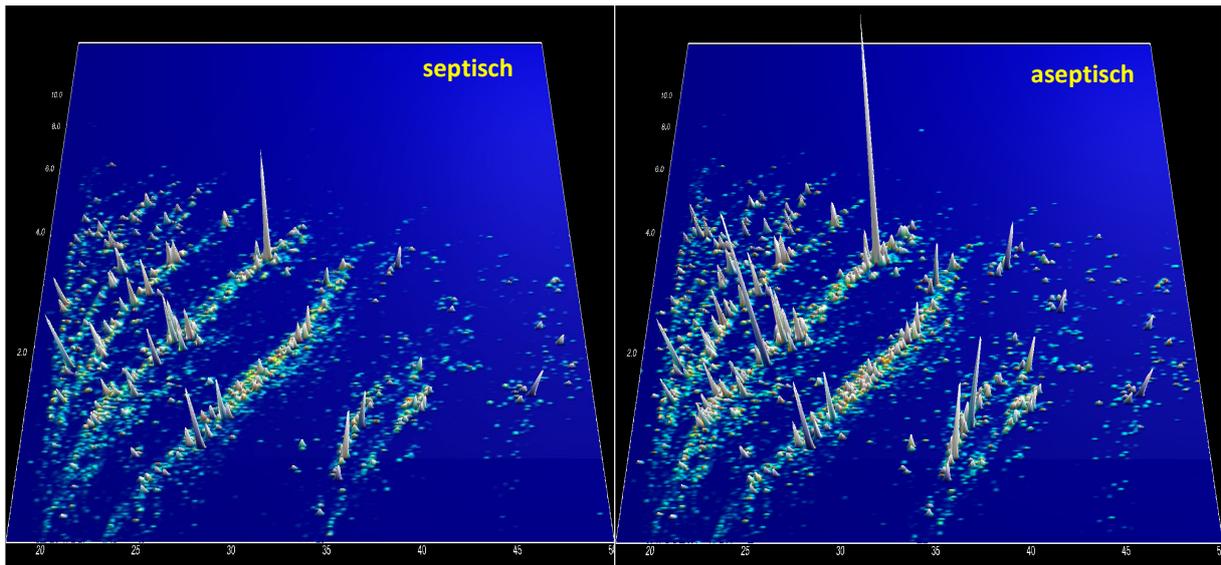
Statistische Analyse

Ein Vergleich der Peptidhäufigkeiten zwischen der septischen und der aseptischen Gruppe wurde in der Kohorte durchgeführt. Eine Analyse der unterschiedlichen Peptidabundanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests (mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für Mehrfachtests) durchgeführt. Ein Signifikanzschwellenwert von $p < 0,05$ wurde angewendet, sofern nicht anders angegeben. Um ein Klassifikationsmodell zu entwickeln, wurden alle sequenzierten Peptide ausgewählt, die eine signifikante nominelle Differenz ($p < 0,05$) aufwiesen. Das Datenset wurde zur Modellentwicklung mittels eines Support Vector Machine (SVM)-Algorithmus verwendet, der in die MosaCluster-Software integriert ist. Zur Bestimmung der Fläche unter der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve (AUC) des generierten Modells wurde die MedCalc-Software verwendet.

Ergebnisse

CE-MS-Probenanalyse

Insgesamt wurden 78 Urinproben für die CE-MS-Analyse erhalten. Die Studie umfasste 28 septische Patienten und 39 aseptische Probanden. Proteine und Peptide wurden in den Urinproben mittels CE-MS im Molekulargewichtsbereich von 800 bis 20.000 Dalton detektiert. Insgesamt wurden in der Studienkohorte 6911 verschiedene Peptide und Proteine identifiziert, wobei ein Häufigkeitsschwellenwert von 30 % in mindestens einer der beiden Studiengruppen erreicht wurde. Die Verteilung der Peptide in der septischen und nicht-septischen Gruppe ist in der untenstehenden Abbildung dargestellt.

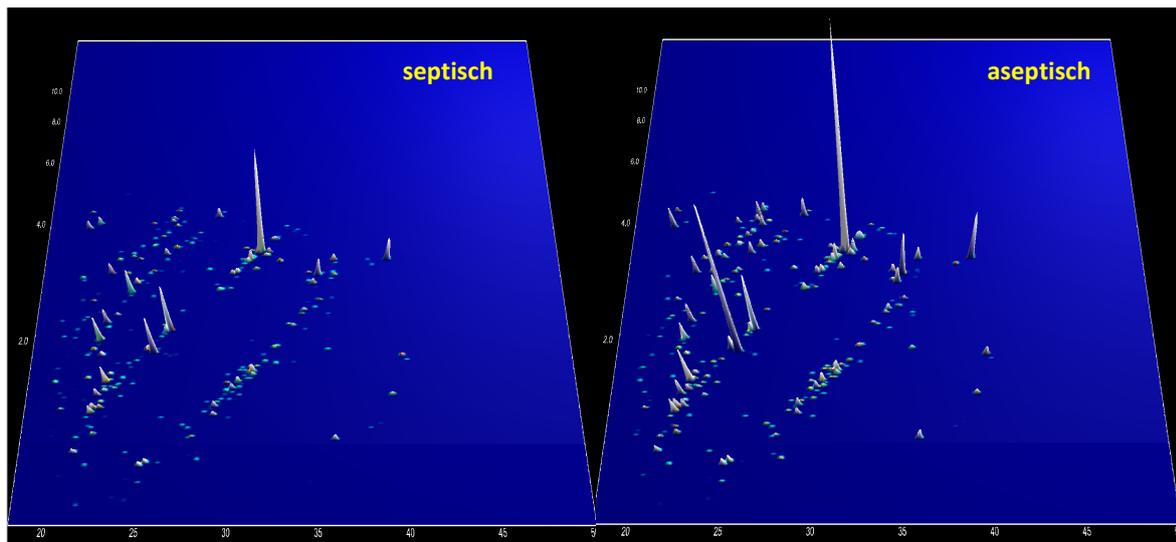


Statistische Peptidmarkersuche und Peptidmarkermodell-Konstruktion

Der statistische Gruppenvergleich führte zur Identifizierung von 1091 Peptiden, die signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigten (p -Wert $< 0,05$ im Wilcoxon-Rangsummentest mit Benjamini-Hochberg-Korrektur). Von diesen 1091 Peptiden konnten 324 anhand ihrer Aminosäuresequenz mittels MS/MS-Sequenzierung identifiziert werden. Diese 324 Peptidmarker-Kandidaten sind mit ihren Eigenschaften in der statistischen Gruppenanalyse in der Supplementärtabelle 1 dargestellt und grafisch unten aufgeführt. Ein auf diesen 324 Peptiden basierendes Peptidmarkermodell trennte die beiden Gruppen mit einer Genauigkeit von 100 %. Bei der vollständigen Leave-One-Out-Crossvalidierung betrug Sensitivität und Spezifität jeweils 89 %.

CE-MS- und Peptidsequenzcharakteristika der Peptidmarkerkandidaten

Wie aus der Appendix 1 hervorgeht, betreffen die auffälligsten Veränderungen Peptide, die aus strukturellen extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen-Alpha-Ketten stammen. Auch mehrere Blutplasmaproteine wie Beta-2-Mikroglobulin, Apolipoprotein A4, Fibrinogen-Alpha-Kette, Albumin oder Alpha-1-Säureglykoprotein, Proteine aus Erythrozyten wie Hämoglobin und Proteine aus Zellen wie CD99 sind betroffen. Weitere Veränderungen wurden bei Nieren- und möglicherweise immunmodulatorischen Proteinen wie Uromodulin, polymerem Immunglobulin-Rezeptor oder Natrium/Kalium-transportierender ATPase-Gamma-Untereinheit beobachtet. Die Mehrheit der beobachteten Veränderungen zeigte eine Abnahme der Peptidabundanz, was eine Abschwächung der physiologischen Kontrolle der Proteinhomeostase infolge der Infektion widerspiegeln könnte.



Eine detailliertere Auswertung der individuellen Peptidveränderungen im spezifischen Kontext (z.B. Sepsisdauer, Schweregrad, Infektionstyp) könnte die Beobachtungen weiter verfeinern, jedoch wird die Studiengröße möglicherweise nicht ausreichen, um alle Ansätze zu adressieren.

Schlussfolgerung

Die Suche nach Peptidmarkern im Urin von Patienten zur Diagnose von Implantatinfektionen, selbst bei geringgradiger Sepsis, erscheint vielversprechend. Es wurden ausreichend viele Proteinmarkerkandidaten identifiziert, und es konnten Peptidmarkermodelle mit hohem Diskriminierungs- und Stagingpotenzial entwickelt werden. Allerdings müssen sowohl in der Trainings- als auch in der Validierungsphase mehr Proben analysiert werden, um genügend Peptidmarker mit signifikanten p-Werten nach Korrektur für falsche Entdeckungen auszuwählen und die etablierten Peptidmarkermuster in unabhängigen Patientengruppen in einer klinischen Fall-Kontroll-Studie der Phase I und II zu validieren.

Appendix

Supplementary_Table_1.xls