

Dott.ssa **Damiana Pieragostino**

*Dipartimento di Scienze Mediche Orali e Biotecnologiche*

**SSD: Biochimica Clinica (BIO12)**

**Lab Regionale di Screening Neonatale Esteso**

*Unità Di Biochimica Analitica e Proteomica*

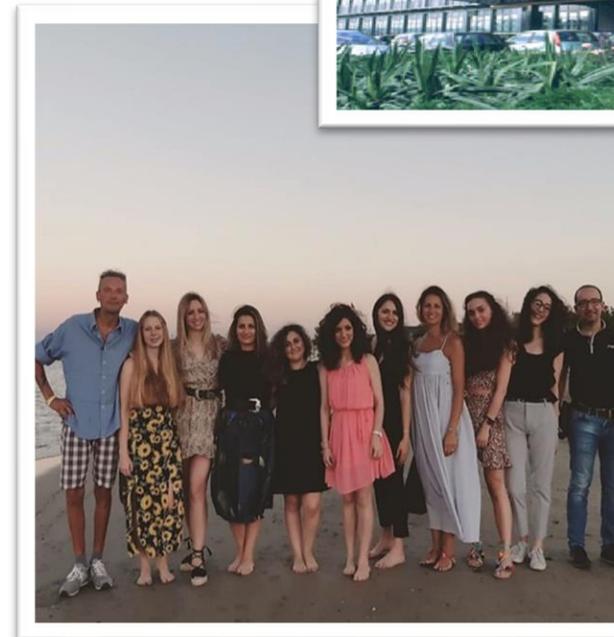
*“G. d’Annunzio” Centro Studi Ee Tecnologie avanzate (CAST)*

**Ricevimento Venerdì dalle 9:00-11:00 su appuntamento**

*Tel. 0871 541593793/96*

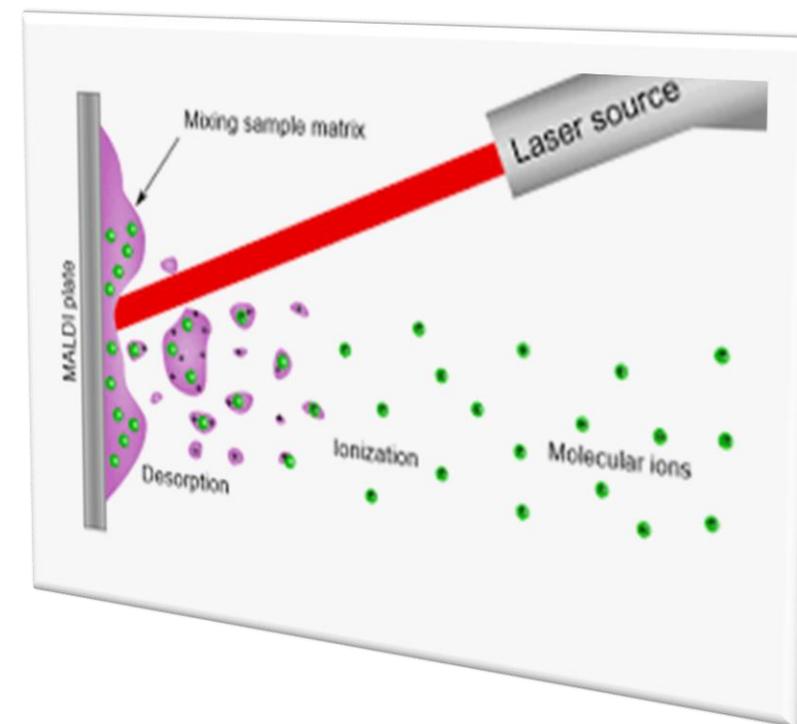
*Fax. 0871 541598*

**[damiana.pieragostino@unich.it](mailto:damiana.pieragostino@unich.it)**



# La Spettrometria di Massa nella Ricerca Biomedica

- *Quantificazione di farmaci,  
Es. immunosoppressori*
- *Medicina legale*
- *Quantificazioni di metaboliti per attività  
enzimatica: Es. DPYD*
- *Screening neonatale Esteso*
- *Proteomica per l'Identificazione di specie  
batteriche: MALDI BIOTYPER*
- *Medicina personalizzata: Approcci OMICI*



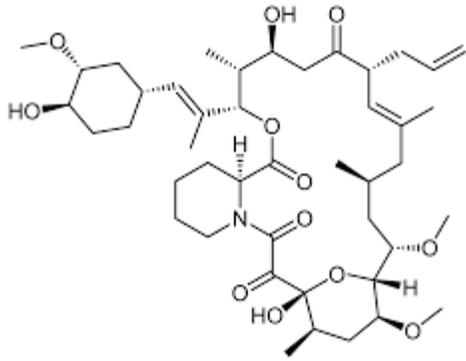
*Quantificazione di farmaci, Es.  
immunosoppressori: Tacrolimus (FK-506),  
Everolimus (EVE) e Sirolimus (SIR )*

---

- Gli immunosoppressori sono farmaci usati per il controllo di gravi manifestazioni allergiche, malattie autoimmuni e malattie correlate ai trapianti
- Vengono impiegati per controllare la reazione di rigetto e sono i principali responsabili del buon esito del trapianto
- sono caratterizzati da un elevato potenziale tossico correlato con il livelli ematici del farmaco, da significative variazioni intra- e inter-paziente
- Monitoraggio necessario



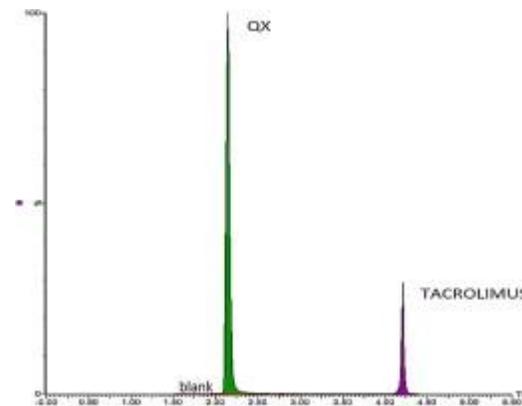
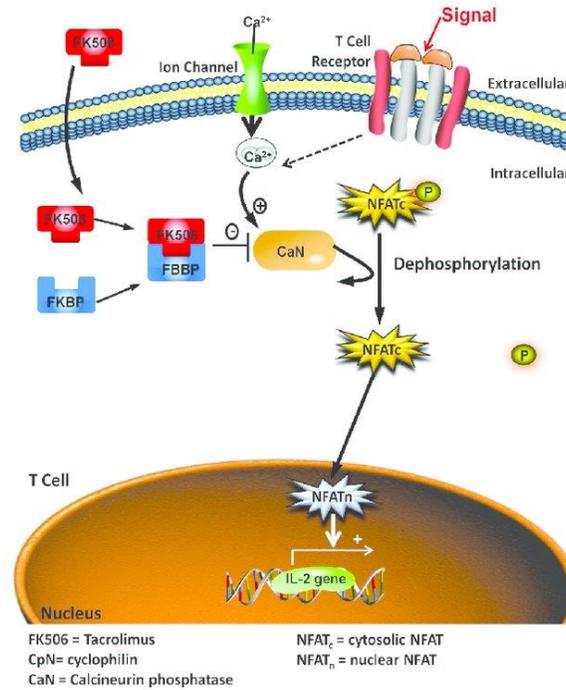
- **Quantificazione di farmaci, Es. immunosoppressori**



**Tacrolimus**

An UPLC–MS/MS method coupled with automated on-line SPE for quantification of tacrolimus in peripheral blood mononuclear cells

Debora Pensi <sup>a, 1</sup>, Amedeo De Nicolò <sup>a, 1</sup>, Michele Pinon <sup>b</sup>, Pier Luigi Calvo <sup>b</sup>, Antonello Nonnato <sup>c</sup>, Andrea Brunati <sup>b</sup>, Giovanni Di Perri <sup>a</sup>, Antonio D'Avolio <sup>a</sup>

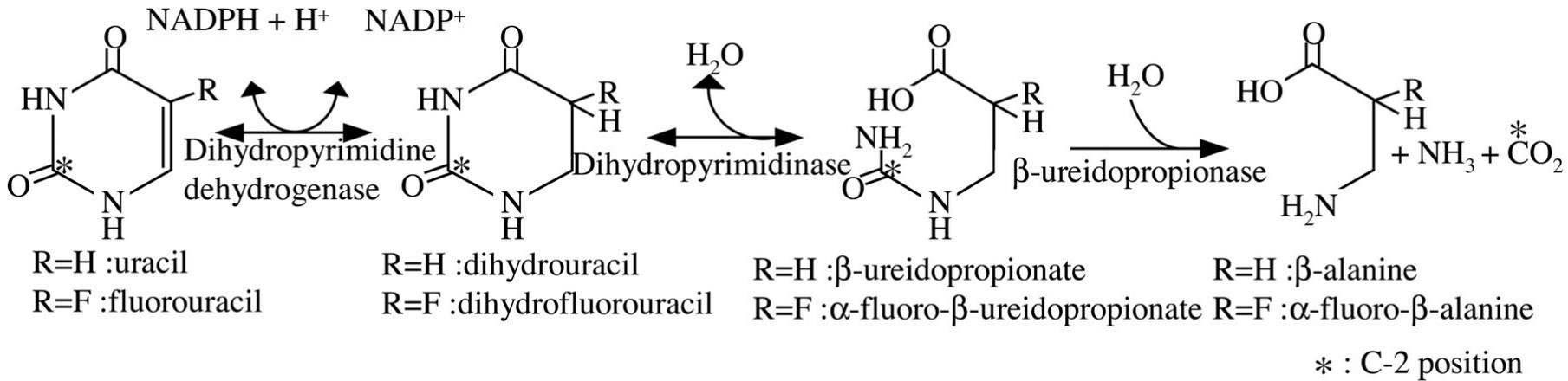
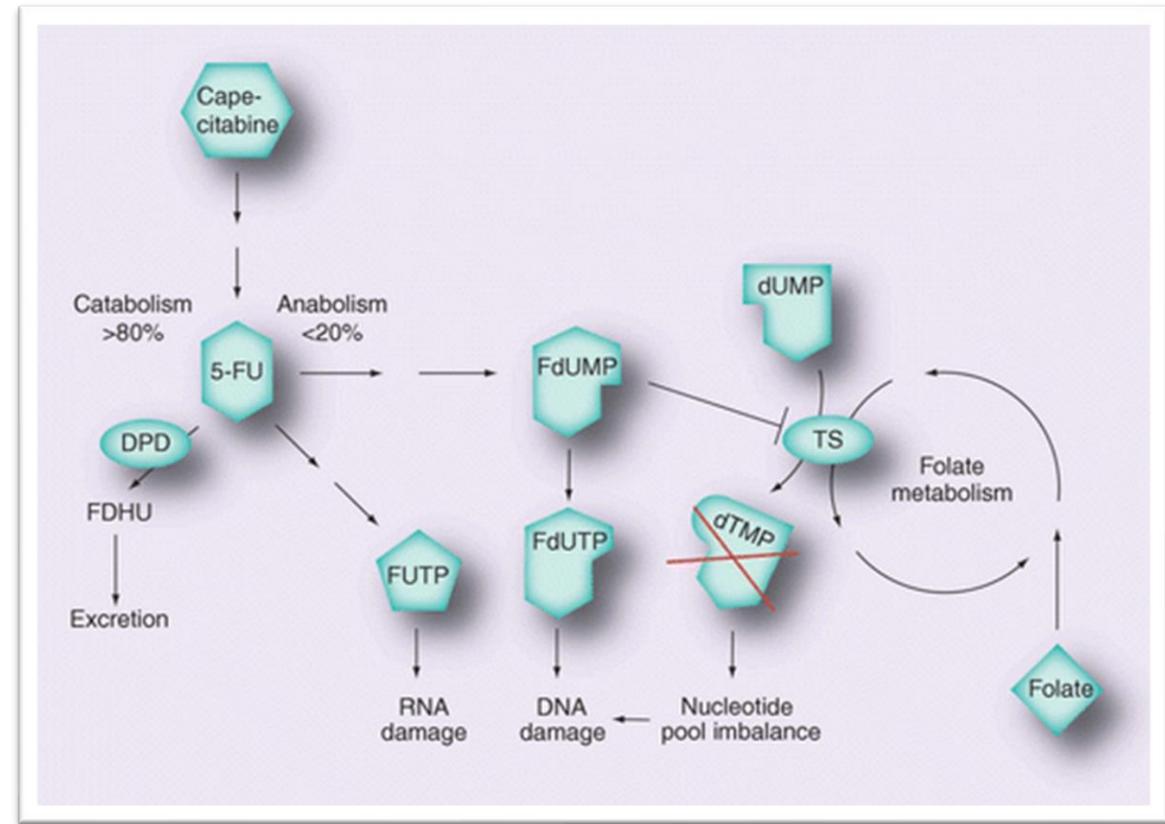


Mechanism of action of tacrolimus (FK506). In the cytoplasm tacrolimus (FK506) binds to the immunophilin FK506-binding protein (FKBP). The resulting complex then binds to the enzyme calcineurin (CaN), preventing the dephosphorylation of the cytoplasmic component of the nuclear factor of activated T-cells (NF-ATc). This blocks the transport of NF-ATc into the nucleus, preventing the binding of NF-ATn to the nuclear promoter of the interleukin-2 (IL-2) gene. Consequently, T cells do not produce IL-2, which is necessary for full T-cell activation.

Quantificazioni di metaboliti per attività enzimatica: Es. DPYD

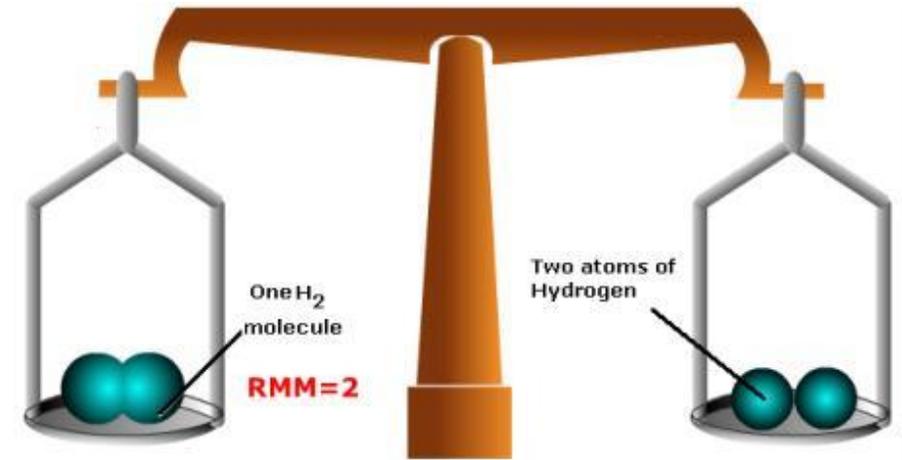
Fluoropyrimidine-based chemotherapy toxicity

UH2/U ratio



# LO SPETTROMETRO DI MASSA: uno strumento democratico

---

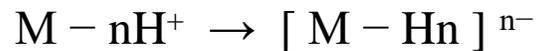
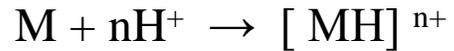
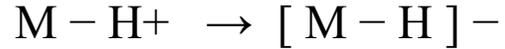
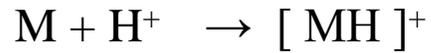


Two atoms of Hydrogen balance one molecule of H<sub>2</sub>  
Relative molecular mass of an element or compound X =  
Mass of one molecule of X / One mass of one atom of Hydrogen

**Metodica che consente la identificazione e l'analisi quantitativa di una molecola dalla determinazione della sua massa...con una piccola precisazione!**



# LO SPETTROMETRO DI MASSA ANALIZZA SOLO IONI



➤ Misura il rapporto **MASSA/CARICA** ( $m/z$ ) delle molecole dopo che queste sono state ionizzate, cioè **dopo che gli è stata impartita una carica elettrica**

➤ Separa gli ioni in base al rapporto  $m/z$

## Unità di misura è il Th

**Massa** = Dalton (Da) : 1 Da è 1/12 della massa di un atomo di carbonio-12 ( $^{12}\text{C}$ )

**Carica** = intesa come carica elementare di un elettrone (negativa)

o di un protone (positiva)  $\rightarrow z$

$m/z$

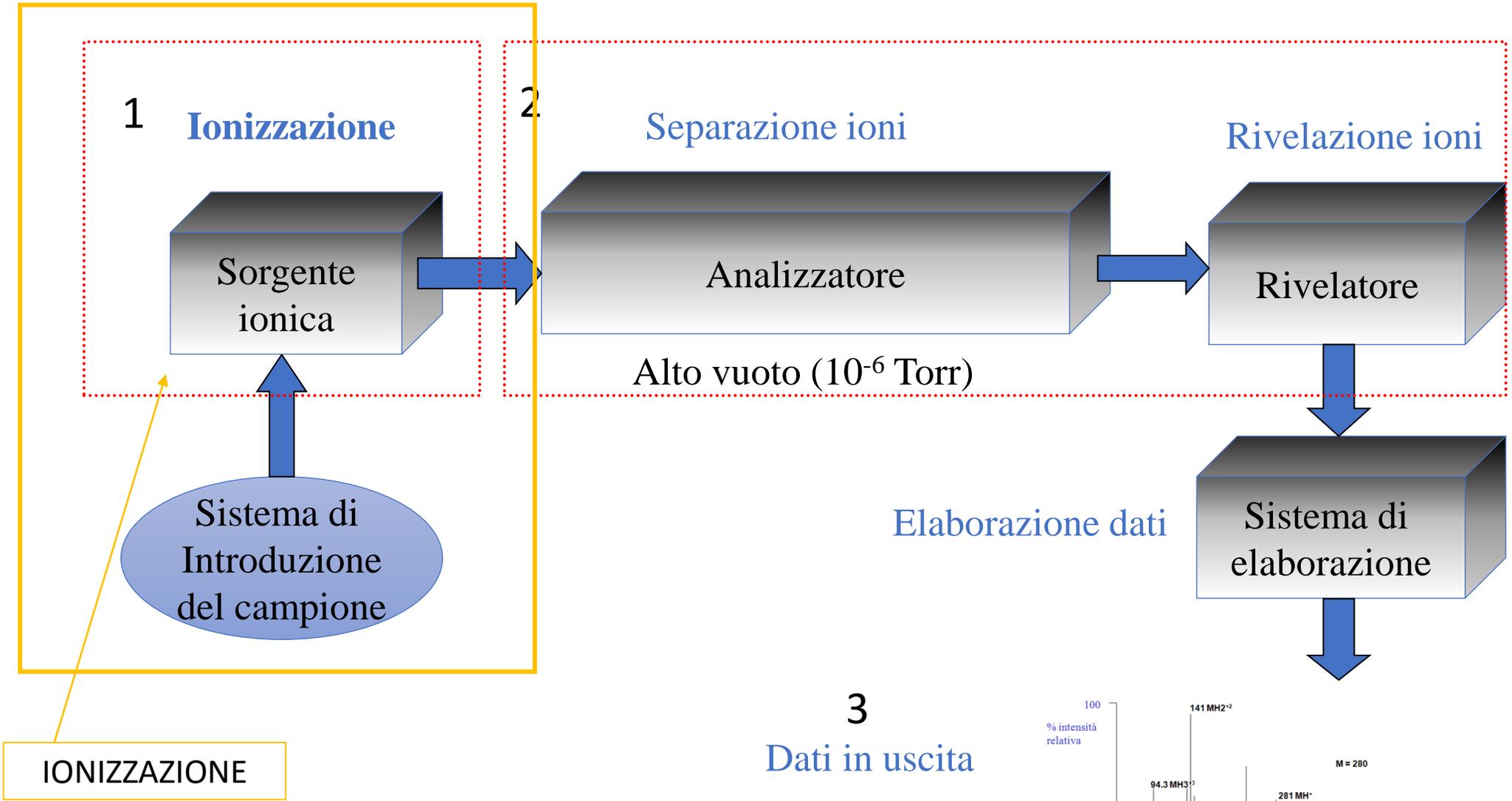
ESISTONO DIVERSI MODI PER IONIZZARE.

- APPROCCI HARD
- APPROCCI SOFT

Ioni monocarica  $z = 1$

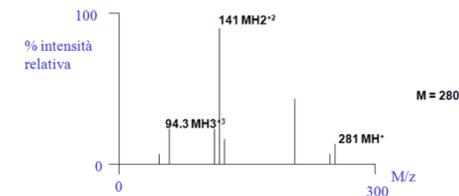
Ioni multicarica  $z > 1$

# SPETTROMETRI DI MASSA

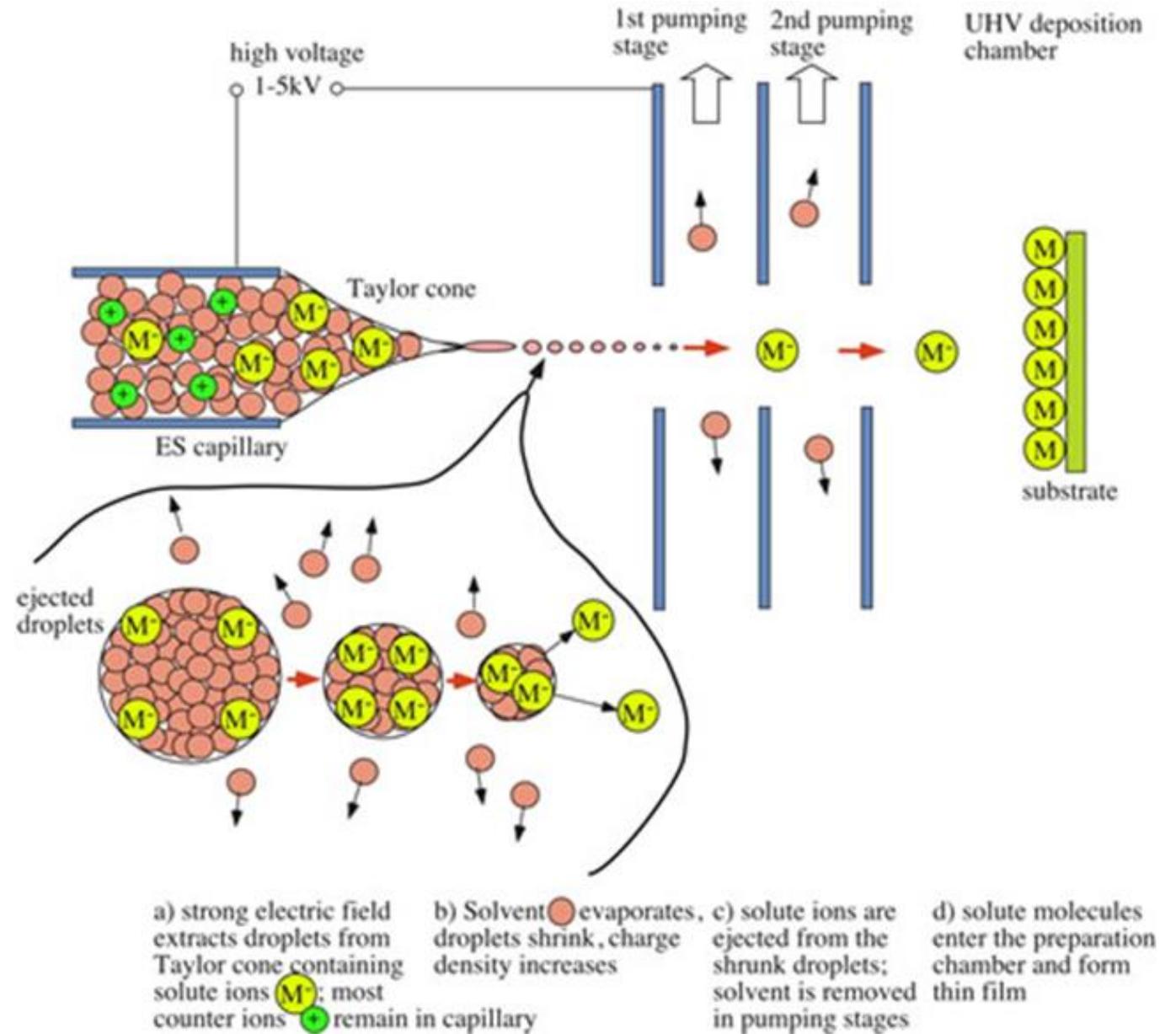


IONIZZAZIONE

3  
Dati in uscita



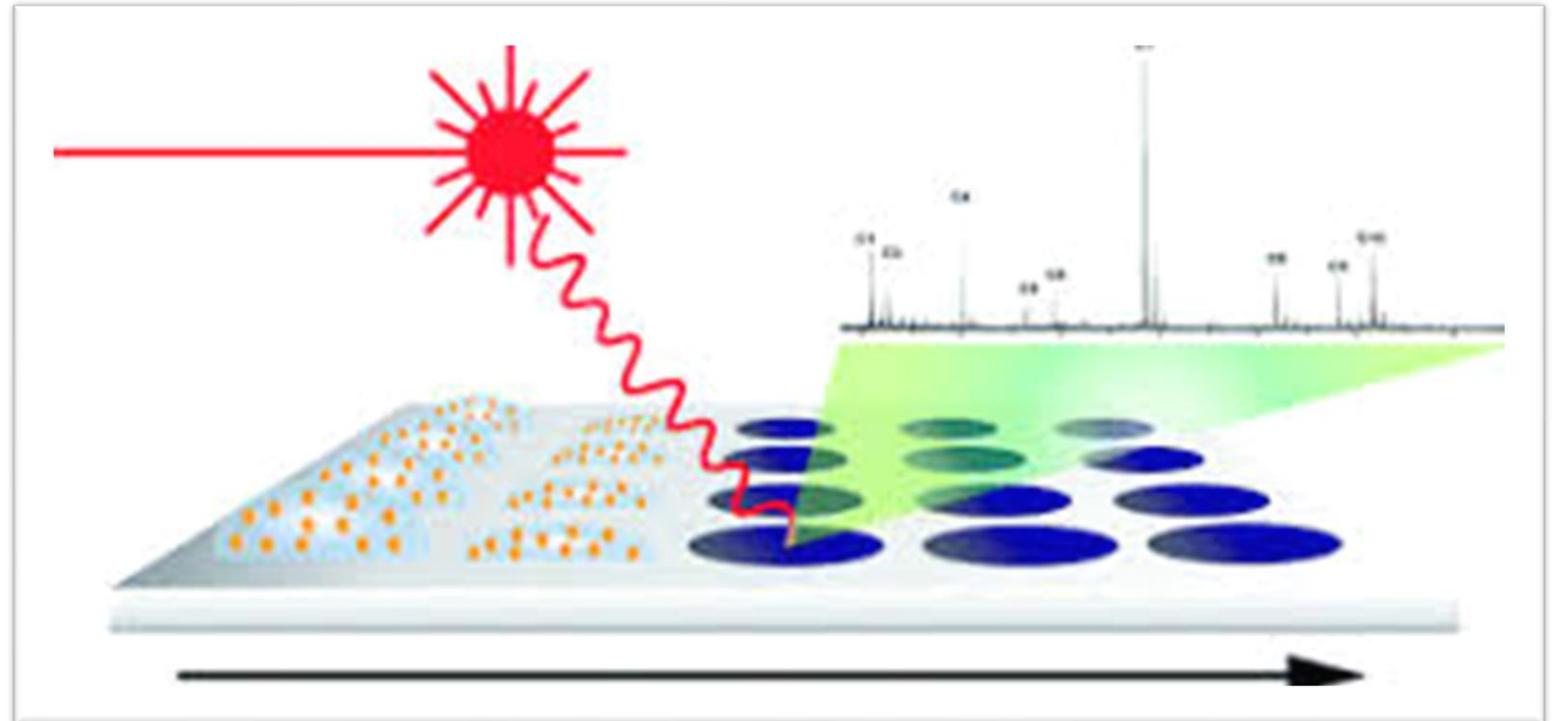
# 1. ESI : Electrospray Ionization



## 2. IONIZZAZIONE SOFT IN FASE SOLIDA

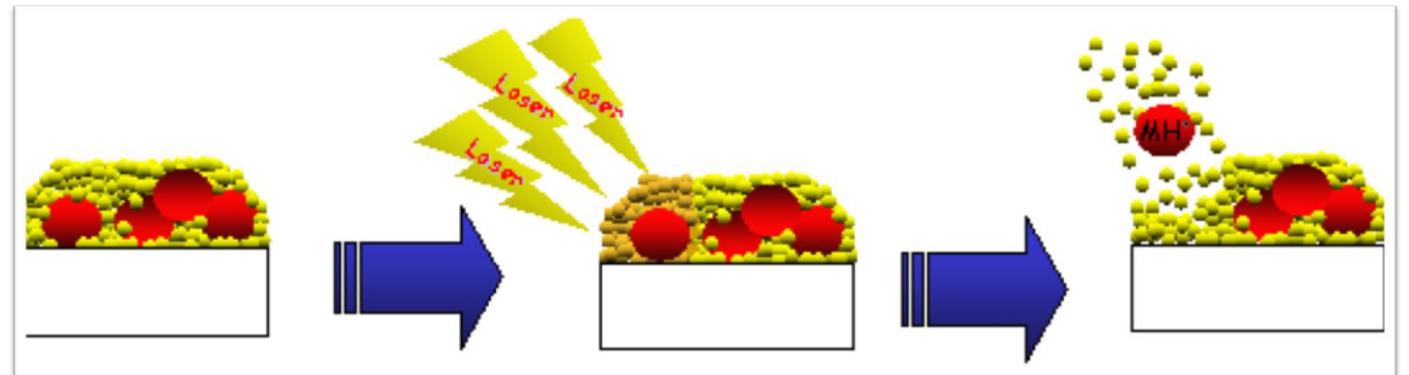
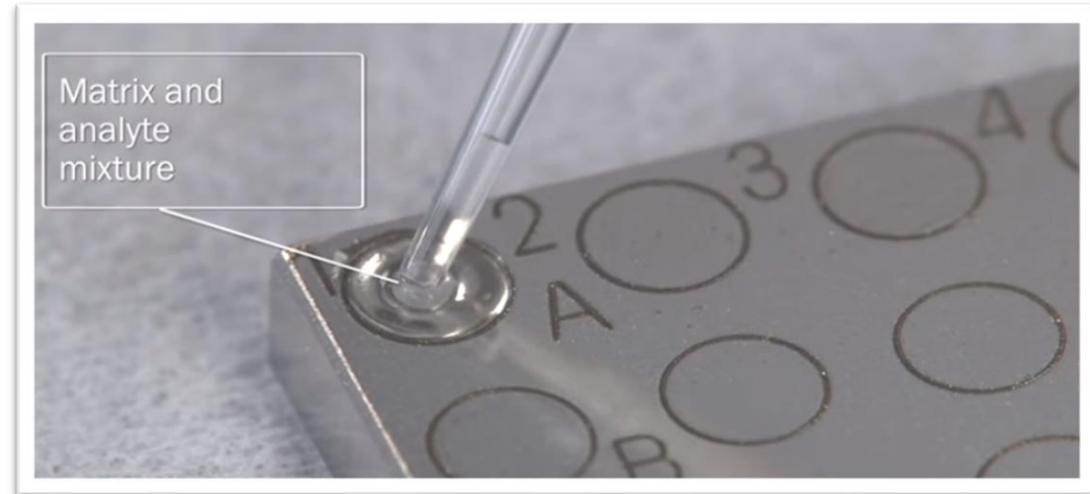
Genera Ioni Gassosi senza decomposizione né Frammentazione delle molecole:

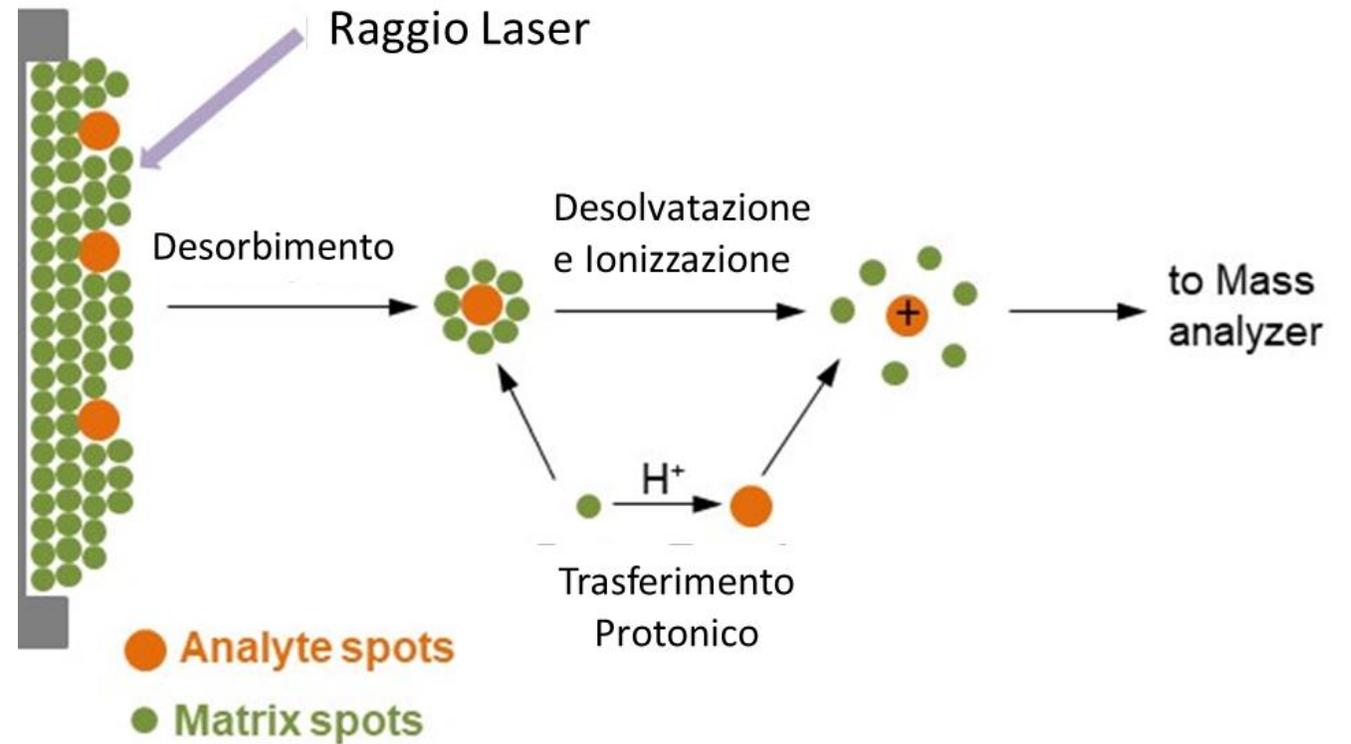
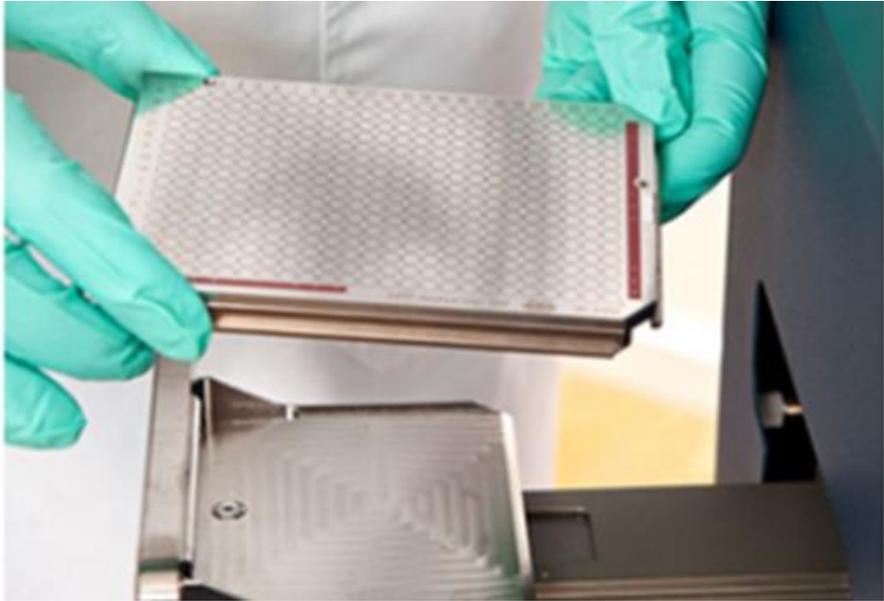
**M**atrix  
**A**ssisted  
**L**aser  
**D**esorption  
**I**onization



## 2. Ionizzazione MALDI

- Step 1: Si miscela il campione con una matrice e si spotta su di una piastra di metallo
- Step 2: Il campione viene irraggiato con un raggio laser attivando il desorbimento
- Step 3: Le molecole sono ionizzate prendendo/cedendo un protone dalla matrice

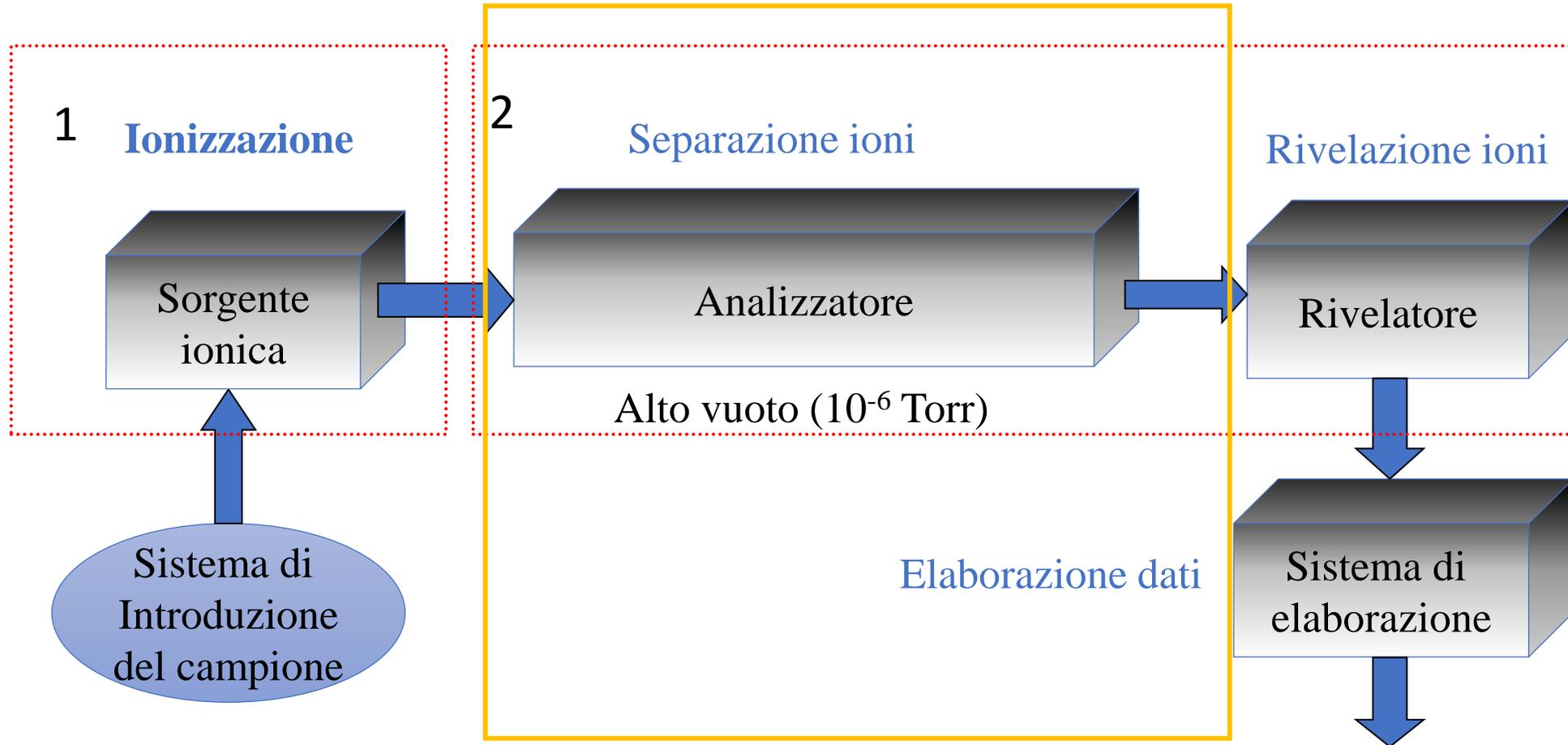




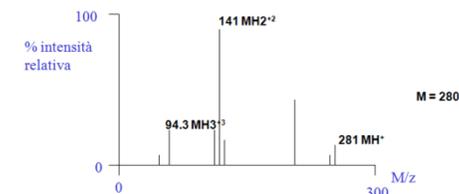
IL PROCESSO DI  
IONIZZAZIONE AVVIENE IN  
UNA CAMERA AD ALTO  
VUOTO

Le macromolecole sono co-precipitate insieme ad una matrice e lasciate cristallizzare. La matrice assorbe l'energia del laser e la trasferisce alle macromolecole preservandone la struttura. Questo processo, che avviene in una camera ad alto vuoto, permette la ionizzazione del campione e il suo ingresso nell'analizzatore.

# SPETTROMETRI DI MASSA: Analizzatori



3  
Dati in uscita



# Tipi di Analizzatori:

Analizzatore

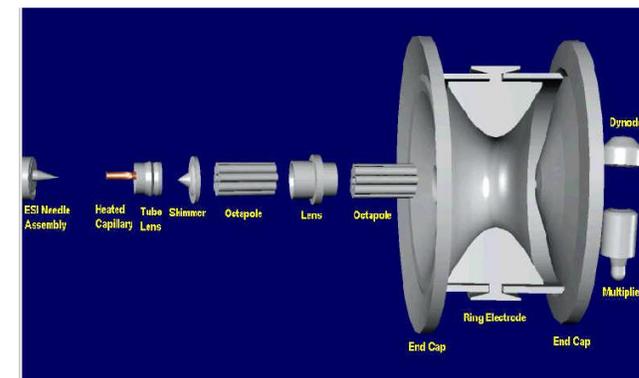
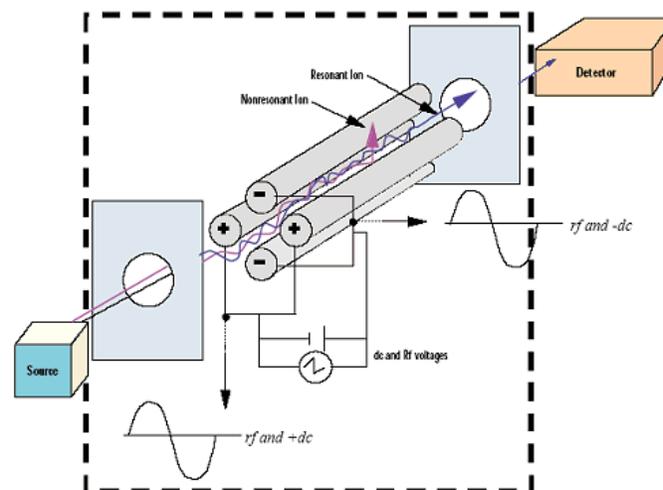
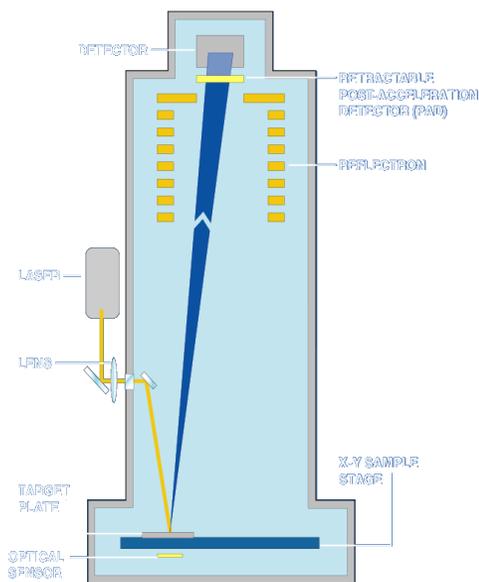
TOF (Time of Flight/Tempo di Volo)

2 PRINCIPIO

QUADRUPOLO

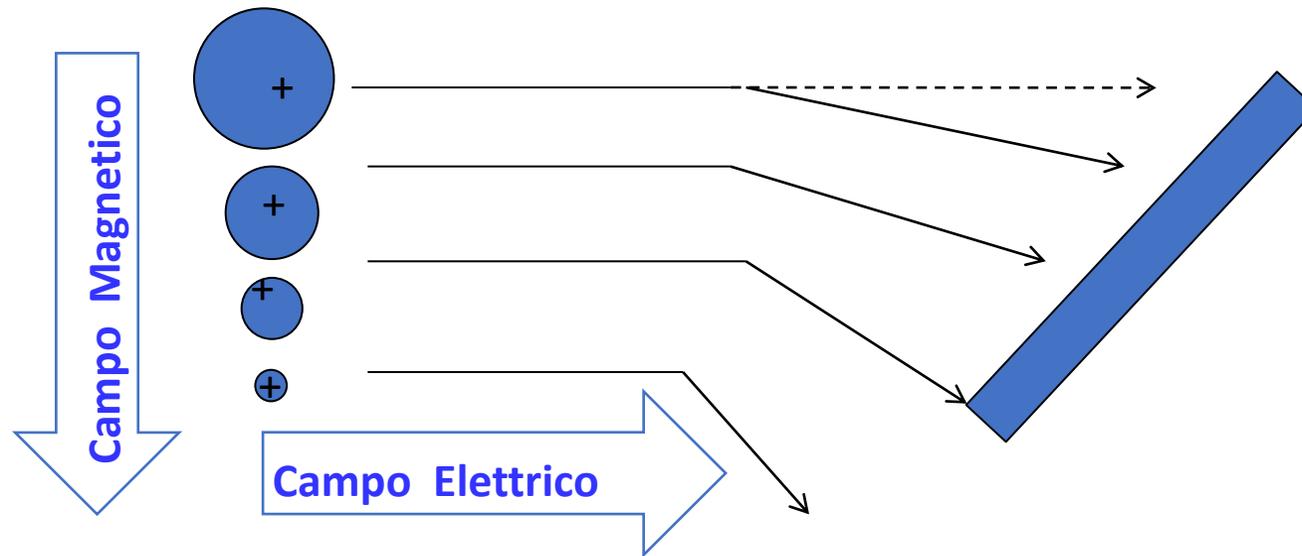
1 PRINCIPIO

TRAPPOLE IONICHE: LINEARI, C-TRAP-ORBITRAP...



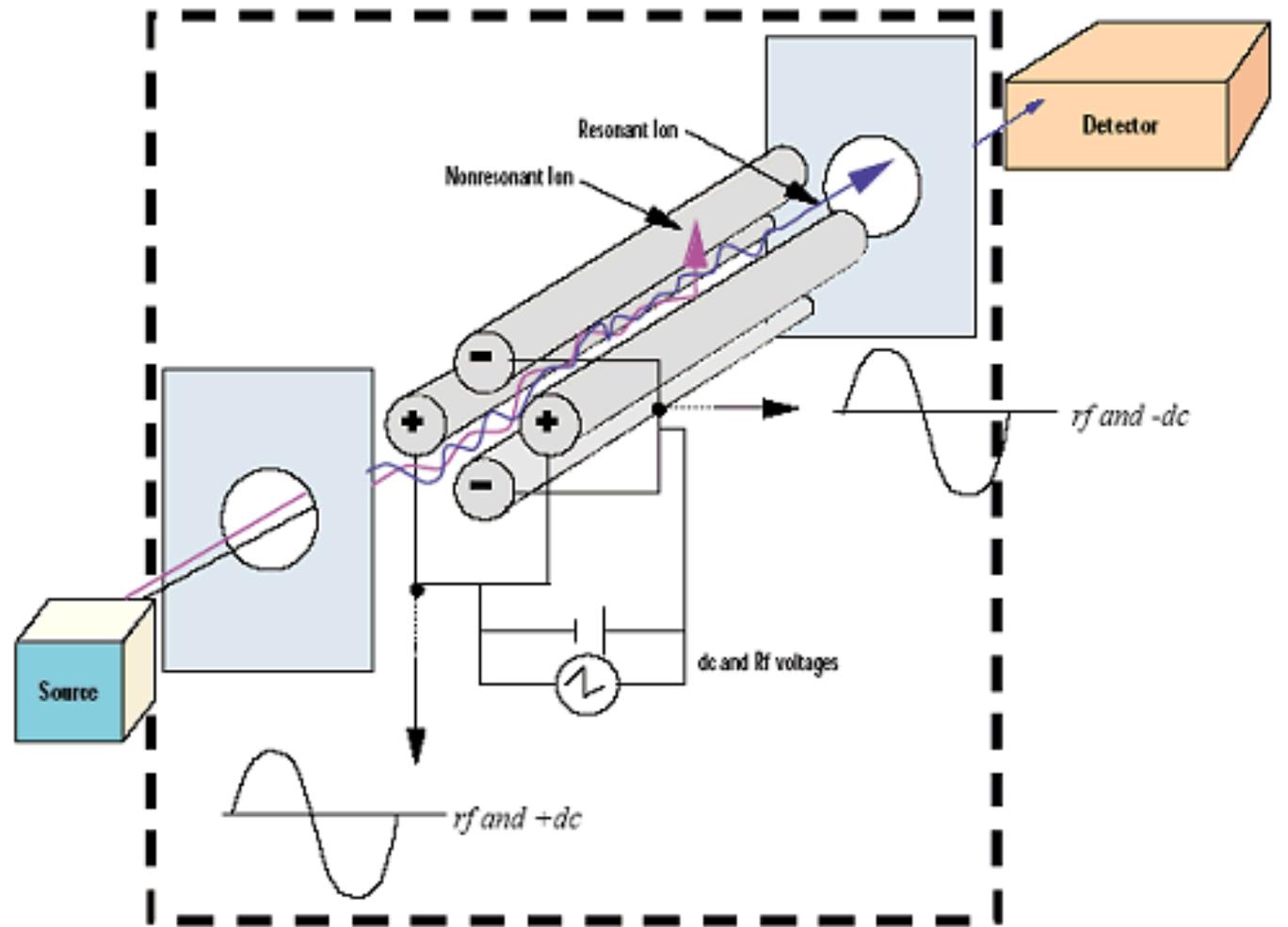
## PRIMO principio di funzionamento:

- La traiettoria di uno ione o di una particella carica in movimento può essere modificata per azione di un campo magnetico elettrico, e l'entità della deviazione è funzione del rapporto massa/carica della particella: a parità di carica, particelle di massa minore subiranno deviazione maggiore.

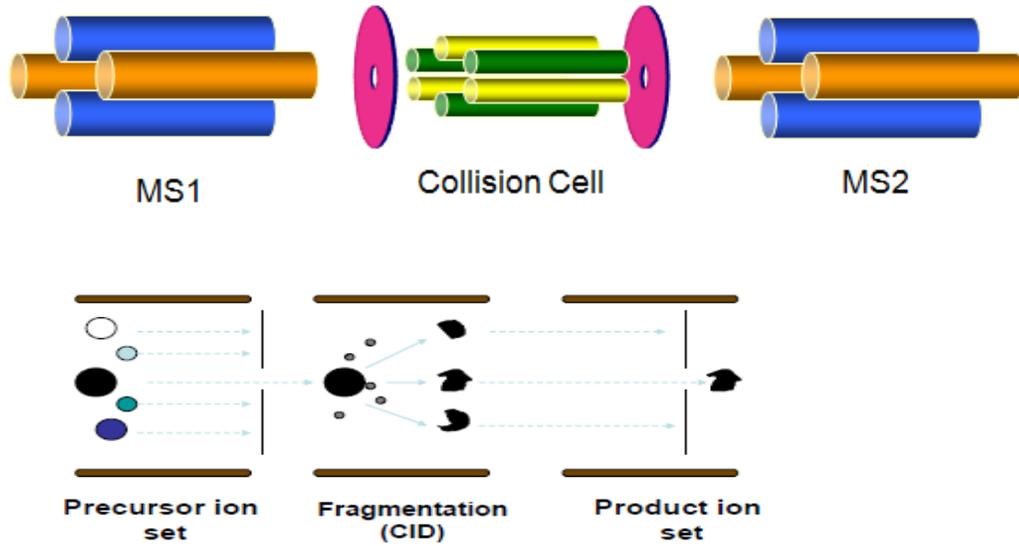


Principio di Funzionamento dei QUADRUPOLI/TRAPPOLE IONICHE

# 1. Quadrupolo



# Essentials of Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry



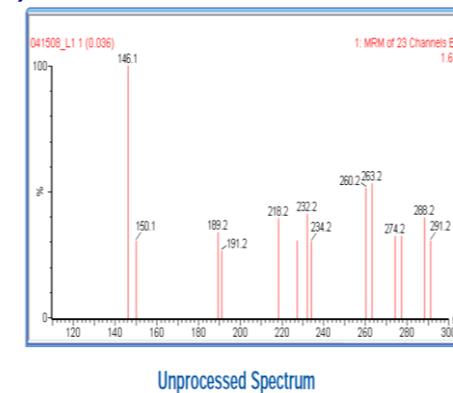
How it works:

- Select one parent ion mass for MS1 and select one daughter ion mass for MS2, both MS1 and MS2 are fixed
- Observed "spectrum" shows the parent ion from each MRM parent/daughter transition in a centroid format
- Can cycle through many MRM transitions during course of one acquisition
  - Measure only what you set up to see
  - Time is spent measuring only desired signals

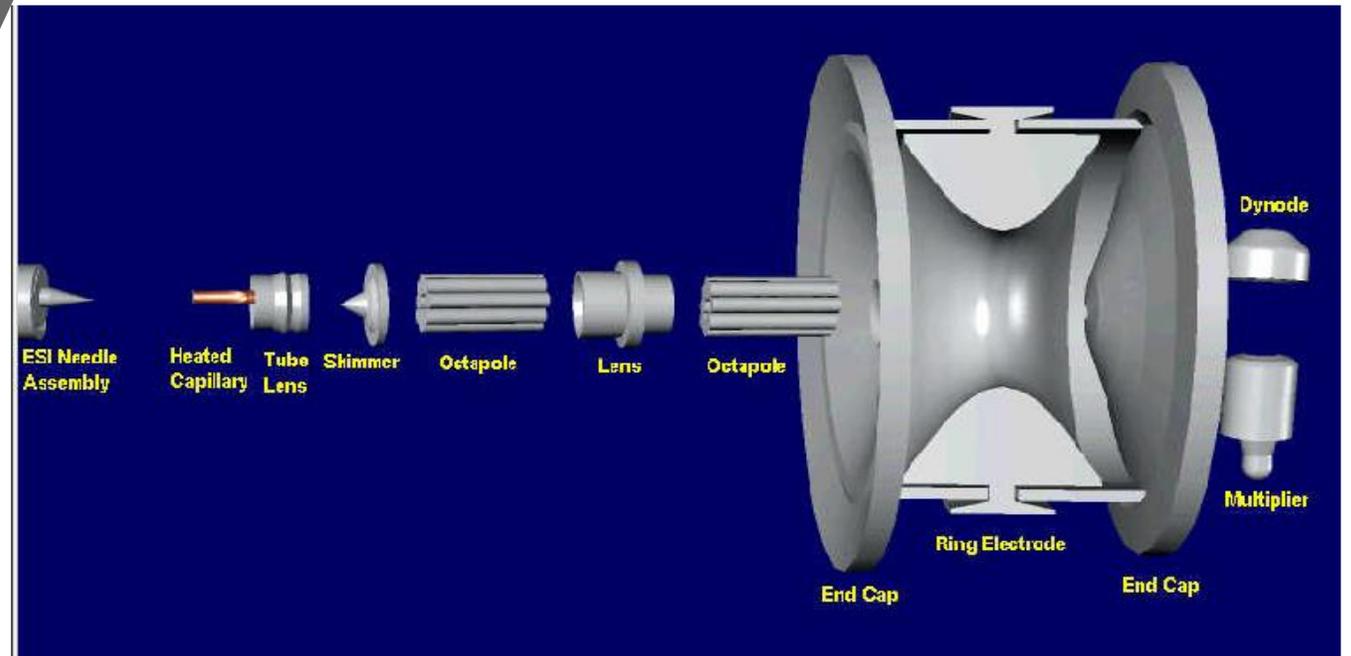
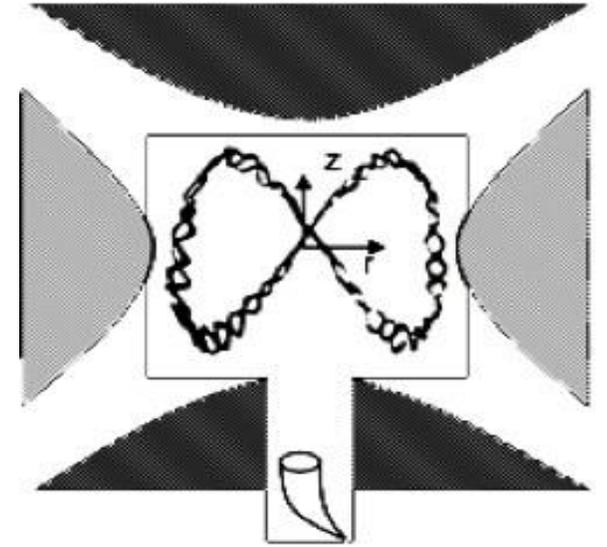
## Multiple Reaction Monitoring (MRM)

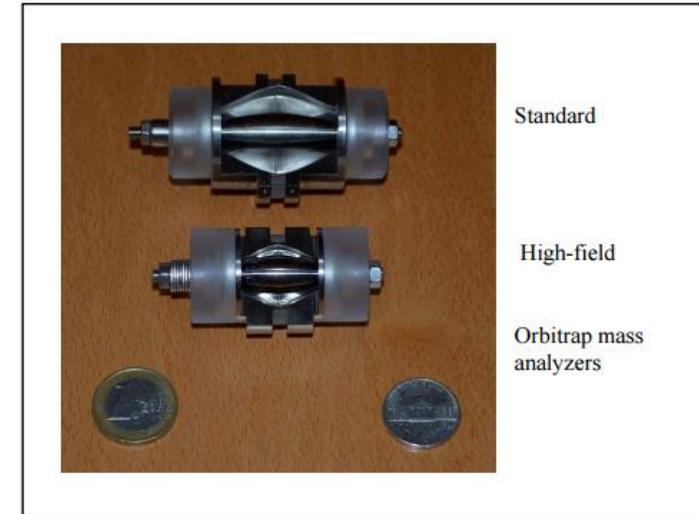
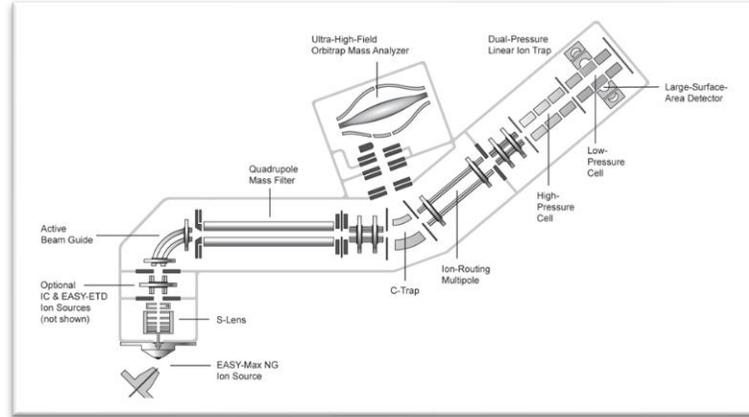
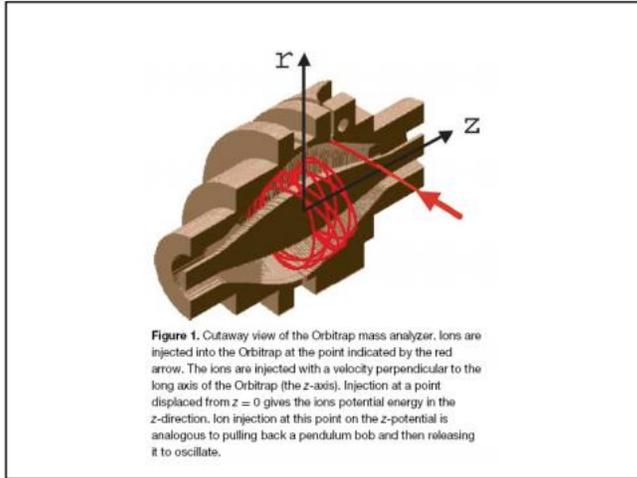


Analysis of amino acids by MS/MS – (MRM)



# 2. Trappola Ionica

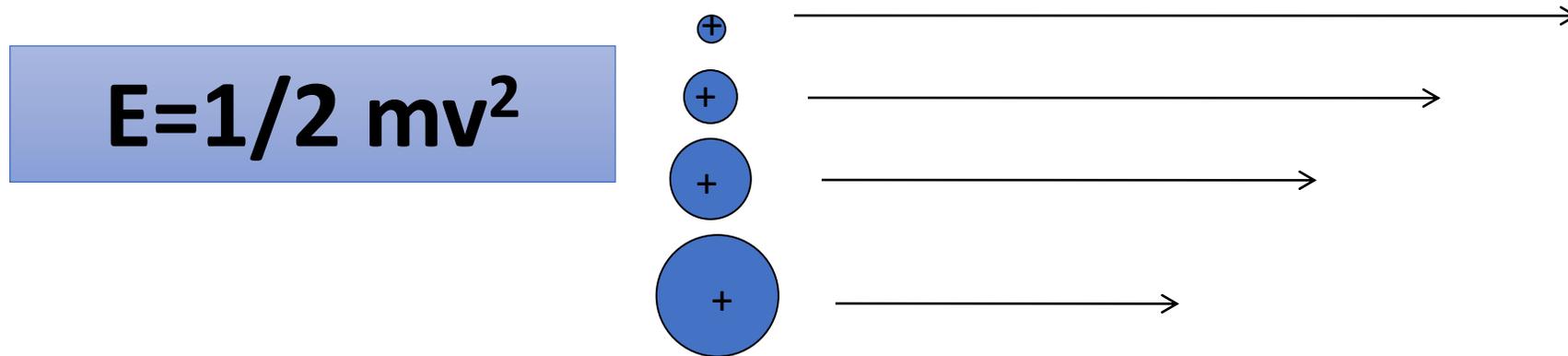




## 2.b ORBITRAP

## SECONDO principi di funzionamento:

- Ioni o particelle cariche, accelerati da un campo elettrico, assumono velocità diverse in dipendenza della loro massa: a parità di carica, particelle a massa maggiore assumono velocità minore.



Principio di Funzionamento dei TUBI DI VOLO (ToF)

ESEMPIO:

  
 $E_1 = m_1 \times v_1^2$  Dove  $M_1 = 2$

  
 $E_2 = m_2 \times v_2^2$  Dove  $M_2 = 8$

La ionizzazione MALDI impartisce solitamente 1 sola carica e uguale E cinetica ad entrambe le molecole quindi:  $E_1 = E_2$

Segue che:

$$m_1 \times v_1^2 = m_2 \times v_2^2$$

$$\cancel{2} \times v_1^2 = \cancel{8}^4 \times v_2^2$$

$$v_1^2 = 4v_2^2$$

$$v_1 = \sqrt{4v_2^2}$$

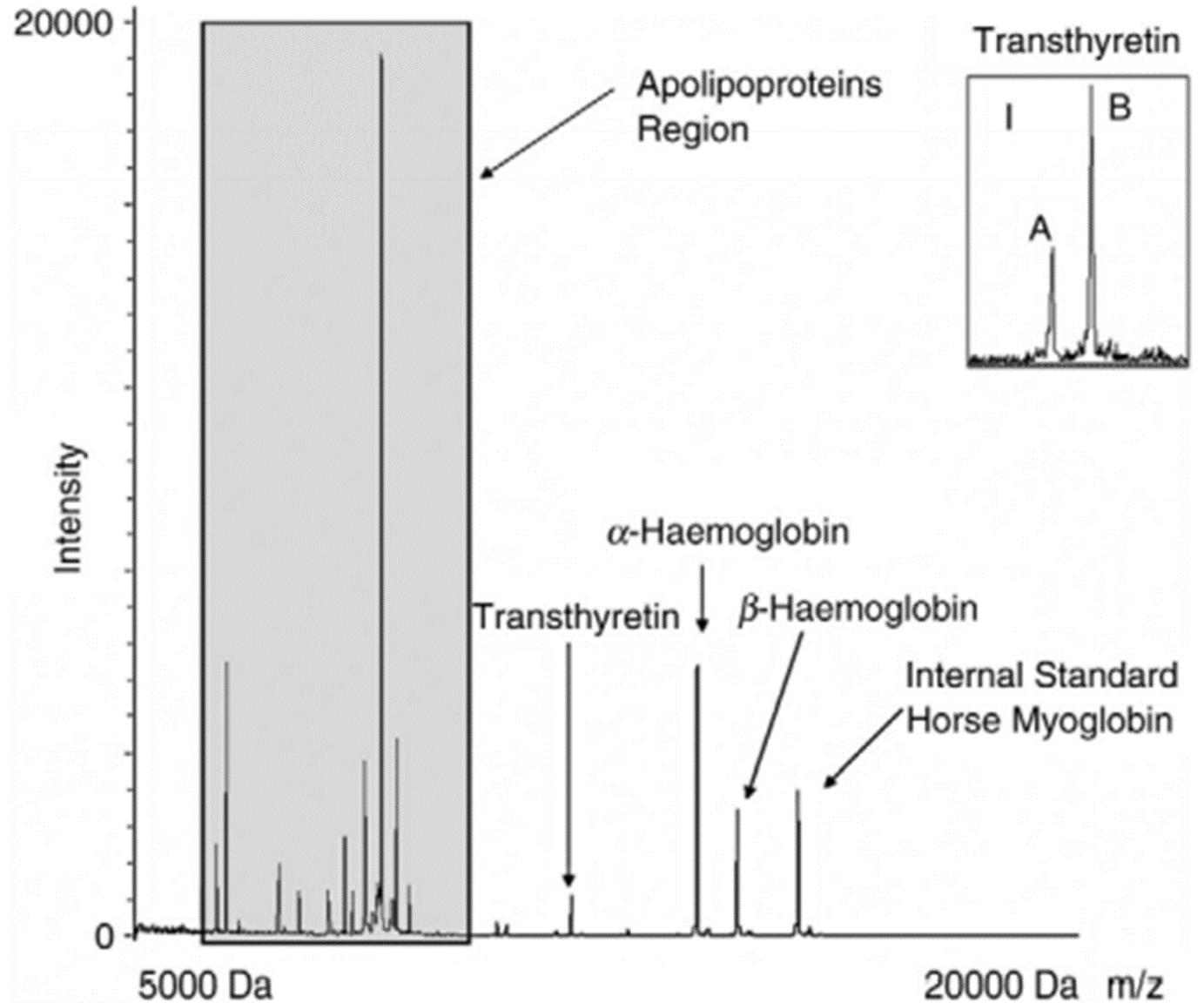
$$v_1 = 2v_2$$

Se uno io ha una massa 4 volte più piccola di un altro ione  
La sua velocità sarà 2 volte maggiore



VERO SOLO IN ASSENZA DI ATTRITO  
E A PARITA' DI CARICA

# SPETTRO DI MASSA MALDI LINEARE DI UN SIERO



# APPROCCIO PROTEOMICA PER RICERCA DI BIOMARCATORI IDENTIFICAZIONE SPECIE BATTERICHE

STESSO GENOMA

DIVERSO PROTEOMA

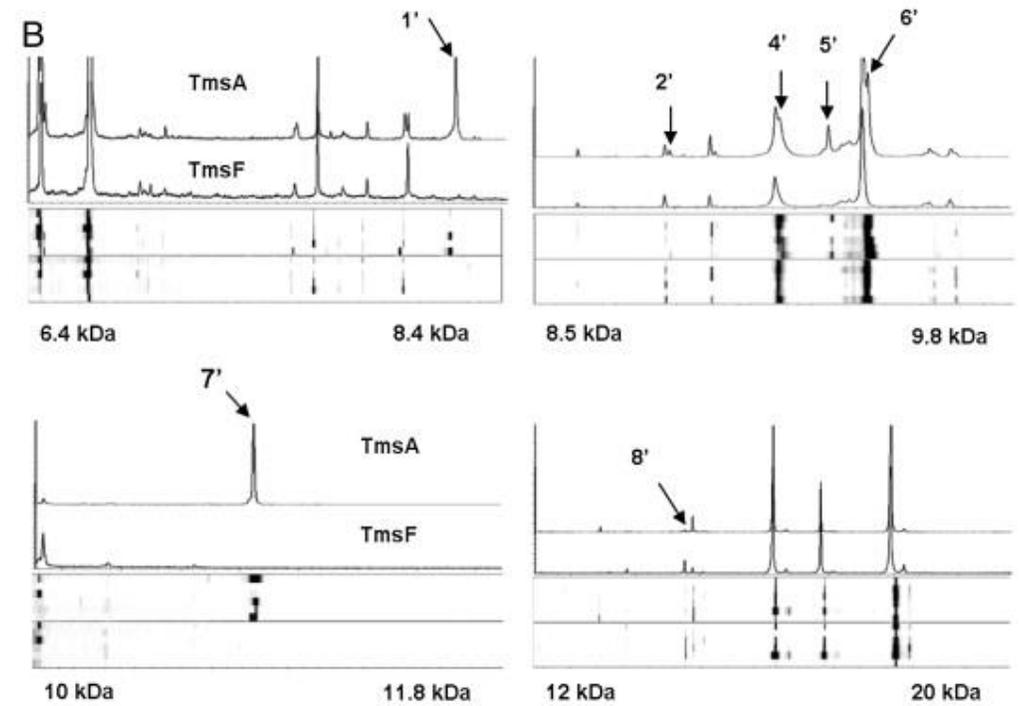
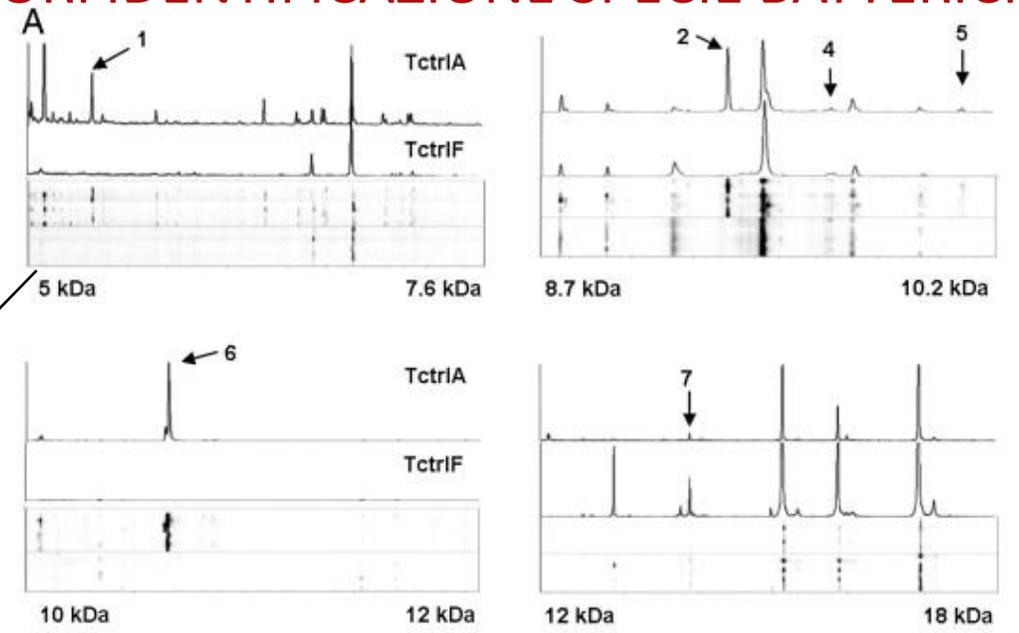
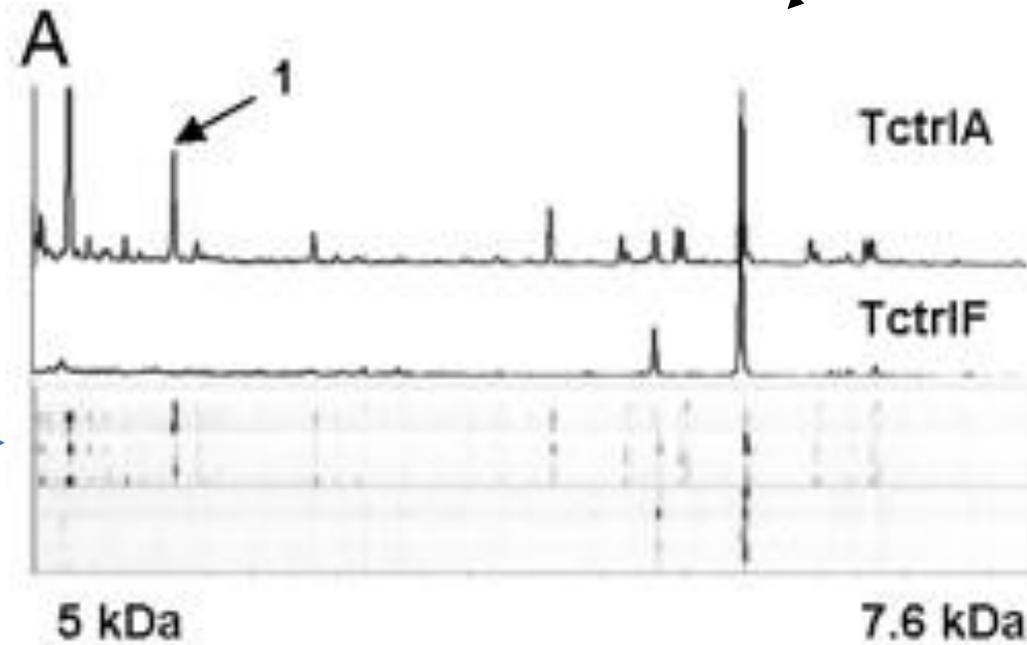


Controlli →

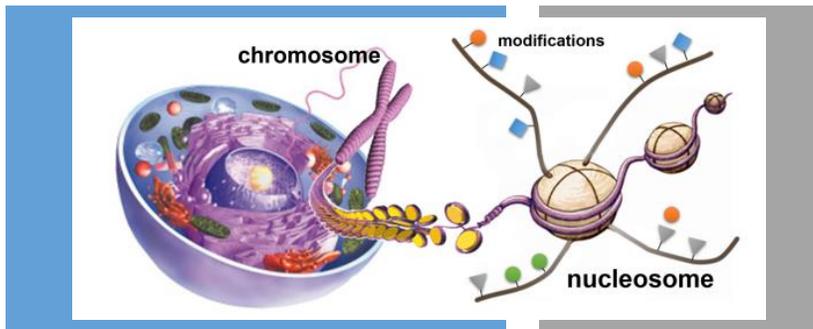
Malati →

Controlli →

Malati →



# STUDIO DELLE MODIFICHE POST TRADUZIONALI

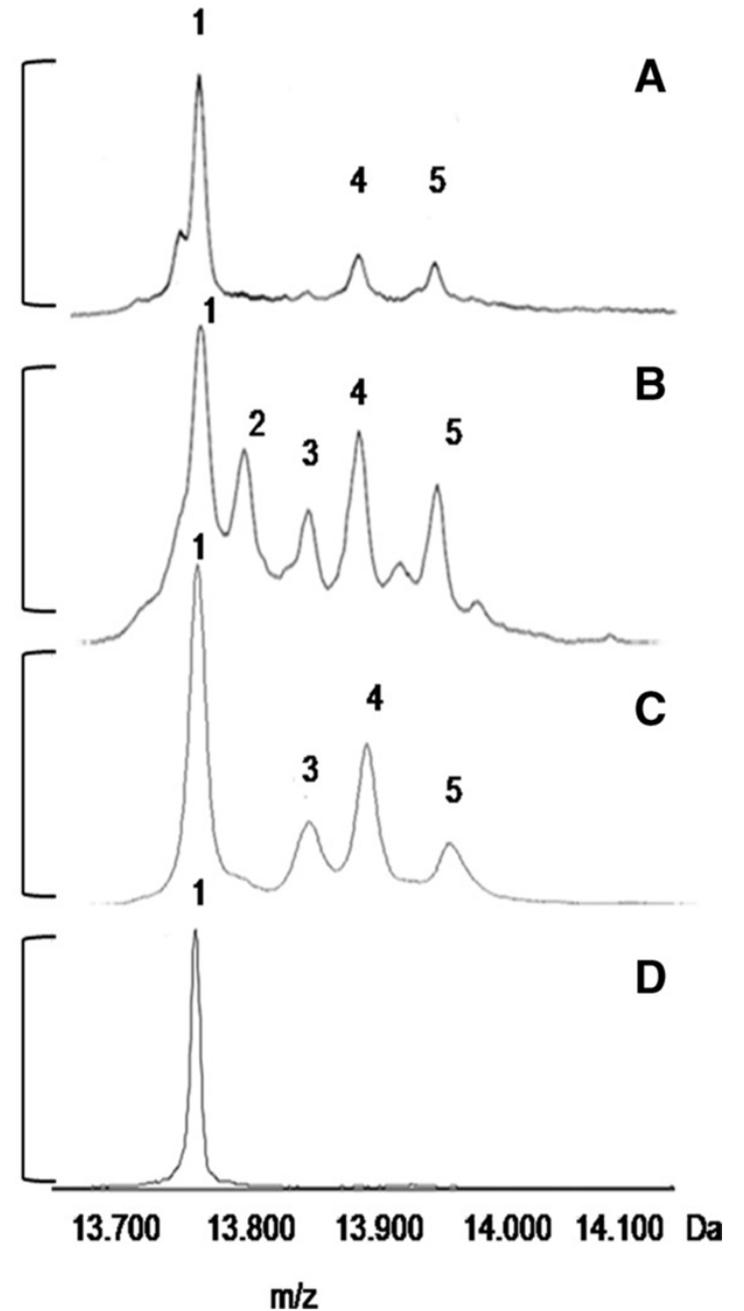


MALATTIA NEUROLOGICA  
NON INFIAMMATORIA

SCLEROSI MULTIPLA

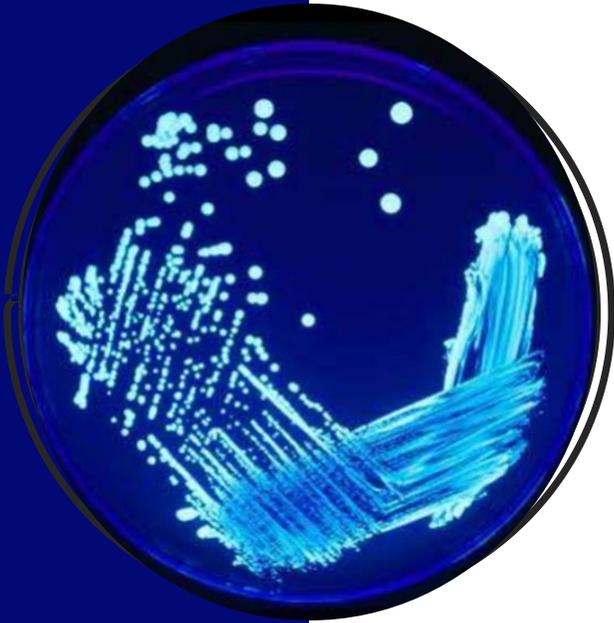
ENCEFALOMIELE  
ACUTA DISSEMINATA

CAMPIONE TRATTATO  
CON RIDUCENTE



APPROCCIO  
CLINICO

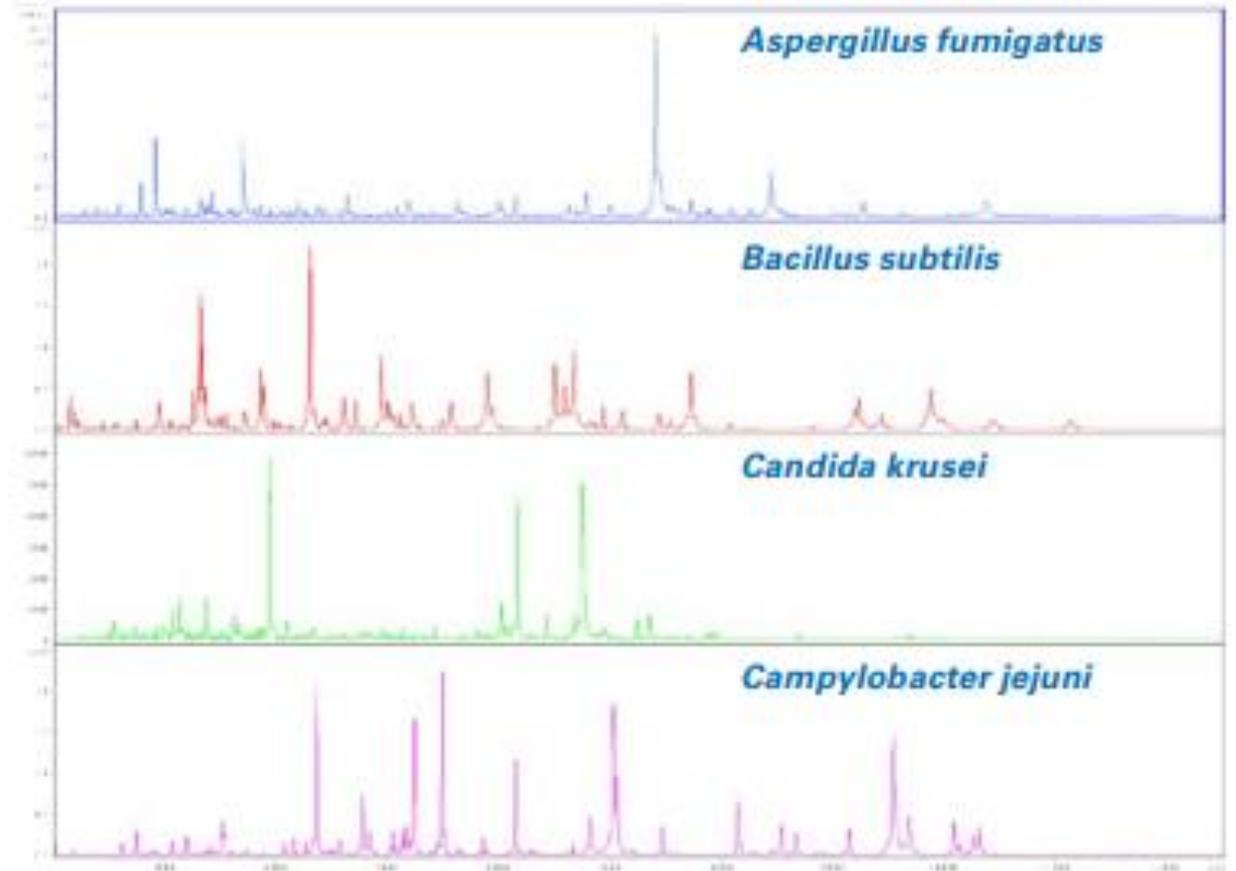
# MALDI PROFILING PER L'IDENTIFICAZIONE MICROBIOLOGICA



# MALDI PROFILING PER L'IDENTIFICAZIONE MICROBIOLOGICA

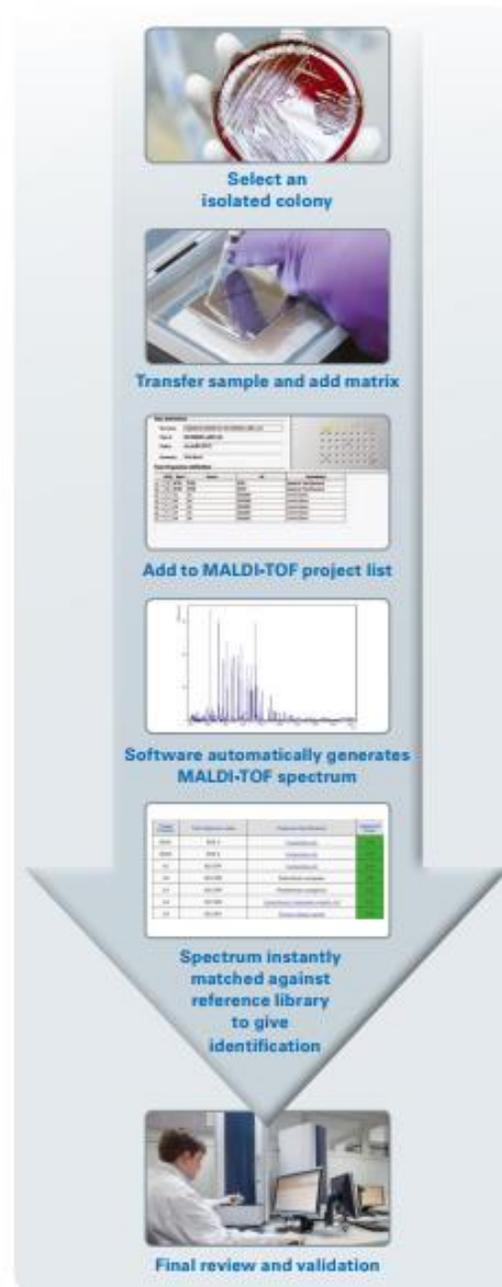
---

- PERMETTE DI IDENTIFICARE L'IMPRONTA DIGITALE DI UN MICROORGANISMO GENERANDO UNO SPETTRO DI MASSA CARATTERISTICO DEL SUO PROFILO PROTEOMICO.
- TALE SPETTRO VIENE POI CONFRONTATO CON MIGLIAIA DI SPETTRI DI RIFERIMENTO CARATTERISTICI DEI VARI MICROORGANISMI.

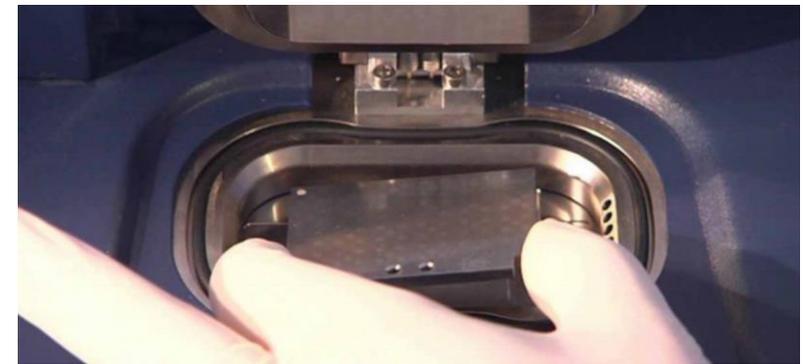
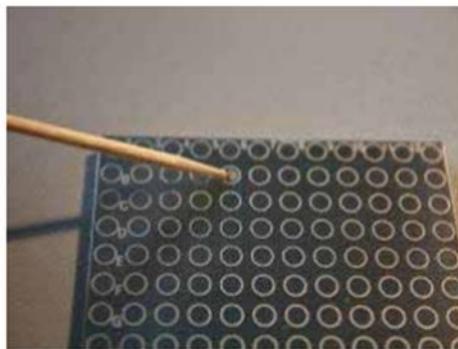
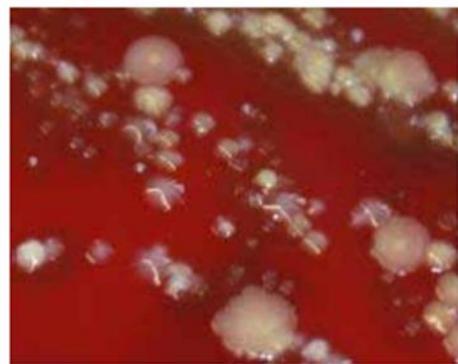


## VANTAGGI DELLA SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI NELL'IDENTIFICAZIONE MICROBIOLOGICA

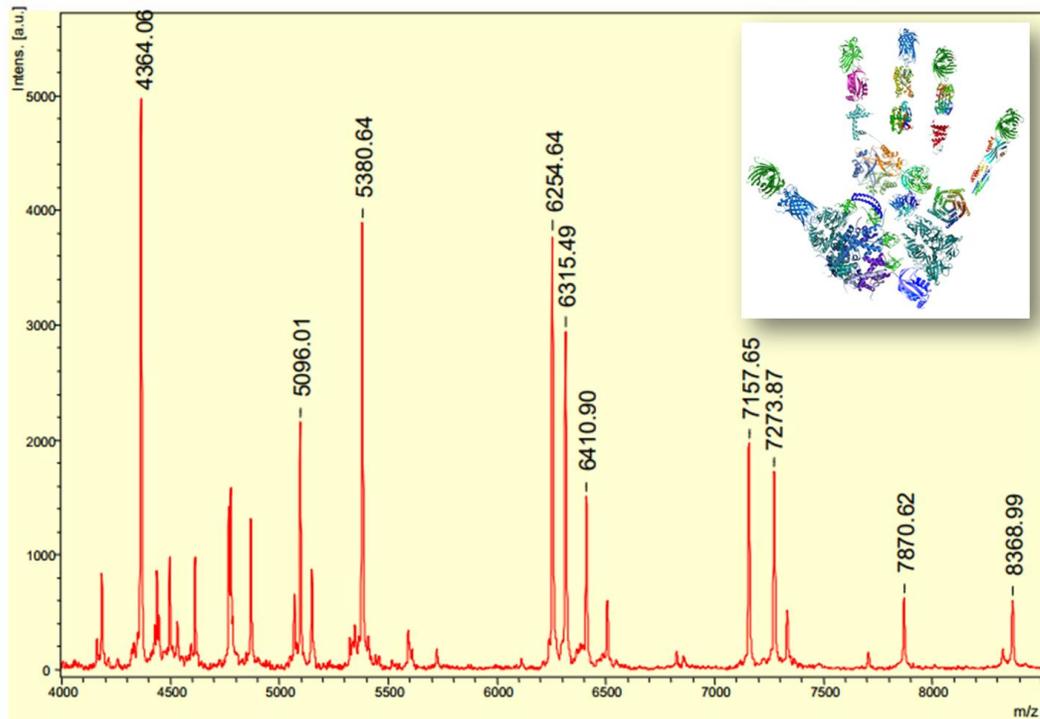
- E' RACCOMANDATA LA MESSA IN CULTURA PER 24 H
- NON SERVE LA COLORAZIONE GRAM
- È COMPATIBILE CON QUALSIASI TERRENO DI CULTURA
- 100000 CELLULE SONO SUFFICIENTI
- SI POSSONO ANALIZZARE CONTEMPORANEAMENTE 96 CAMPIONI
- RISULTATI OTTENUTI IN POCHI MINUTI
- METODO ROBUSTO E RIPRODUCIBILE
- METODO SICURO



# PROTOCOLLO DI ANALISI



## RESULT: Bacterial Protein "Fingerprint"



## Pattern matching result – report output

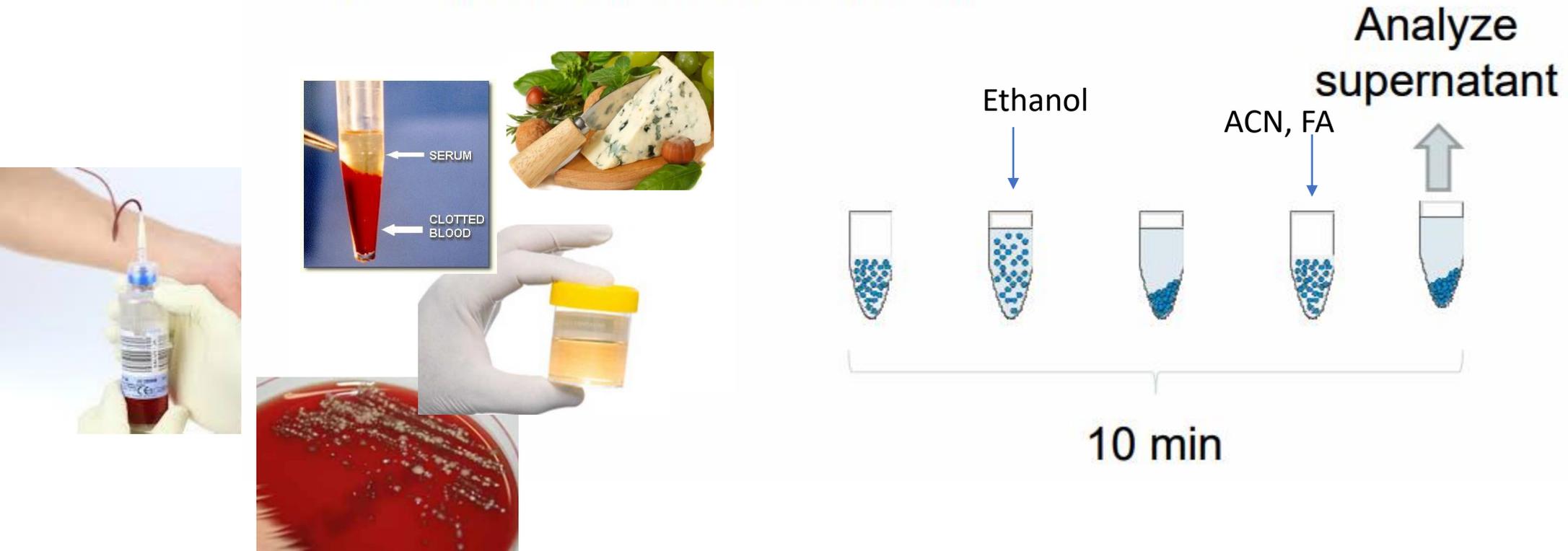
Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Streptococcus agalactiae 03_198 CTL	2.357	<a href="#">1311</a>
2 (+++)	Streptococcus agalactiae 04_158 CTL	2.352	<a href="#">1311</a>
3 (+++)	Streptococcus agalactiae 03_145 CTL	2.347	<a href="#">1311</a>
4 (+++)	Streptococcus agalactiae V29 CTL	2.346	<a href="#">1311</a>
5 (+++)	Streptococcus agalactiae 03_102 CTL	2.321	<a href="#">1311</a>
6 (++)	Streptococcus agalactiae DSM 6784 DSM	2.244	<a href="#">1311</a>
7 (++)	Streptococcus agalactiae CNR 10 CTL	2.237	<a href="#">1311</a>
8 (++)	Streptococcus agalactiae DSM 2134T DSM	2.075	<a href="#">1311</a>
9 (+)	Streptococcus agalactiae DSM 16828 DSM	1.986	<a href="#">1311</a>
10 (-)	Streptococcus equi ssp zooepidemicus ATCC 43079T THL	1.542	<a href="#">40041</a>

Protocollo 2

# Performing a MALDI Biotyper run



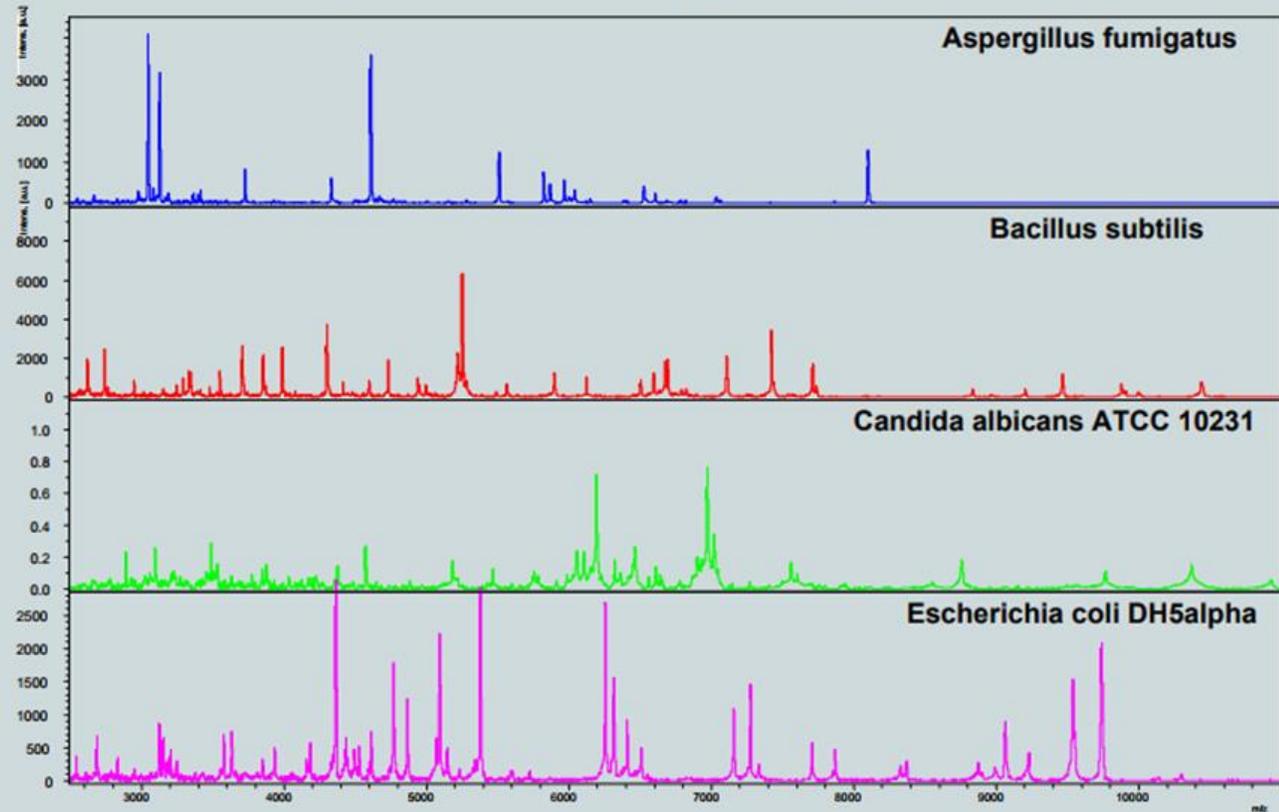
## b. Ethanol-FA extraction



# MALDI Biotyper

Broad applicability of MALDI-TOF profiling

gram+ and gram- bacteria, yeasts, filamentous fungi

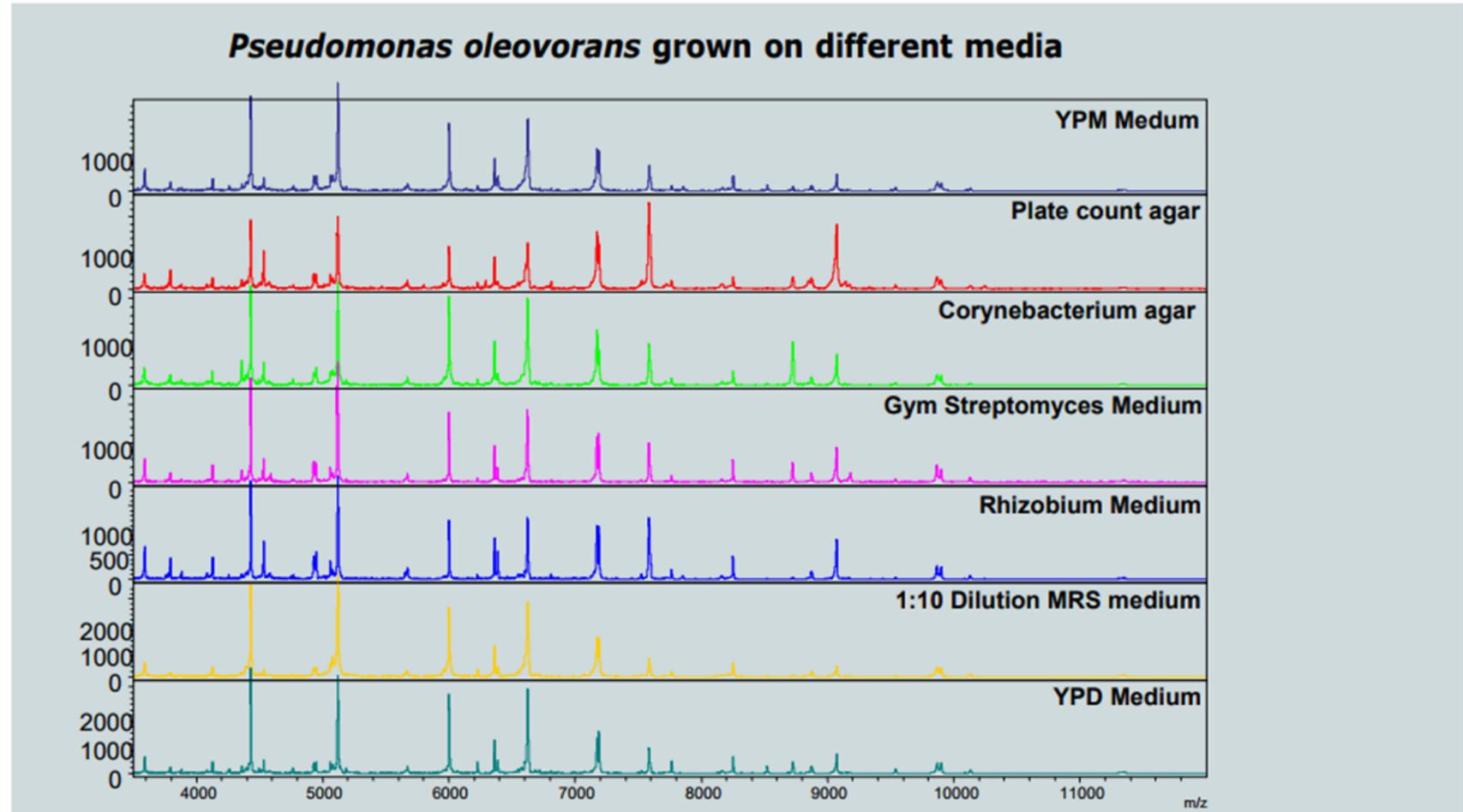


RISULTATI  
DELL'ANALISI  
MALDI DEI  
BATTERI

# MALDI Biotyper

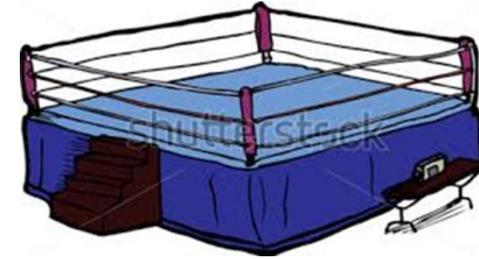
## Low influence of culture conditions

RISULTATI  
INDIPENDENTI  
DALLE  
CONDIZIONI DI  
COLTURA



# MALDI BioTyper

## Industrial quality control



**Objective:** Find source of bacterial contamination in production process of facial creme

	Water pipes	Facial creme	Price/sample	Time to result
<b>MALDI BioTyper</b>	Herbaspirillum huttiense	Burkholderia cenocepacia	Approx. 0.5 USD	Minutes
<b>RiboPrinter</b>	Herbaspirillum huttiense	Burkholderia cenocepacia	30-50 USD	Hours
<b>API</b>	-	-		
<b>Vitek 2</b>	-	Burkholderia cenocepacia		



VS

