

22. Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. AACC Press. ISBN 1-890883-49-2; pp 72-73.
23. Harris EK. Statistical principles underlying goal-setting in clinical chemistry. *Am J Clin Pathol* 1979; 72: 374-382.
24. Cotlove E, Harris EK, Williams GZ. Biological and analytical components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects III. Physiological and medical implications. *Clin Chem* 1970; 16: 1028-1032.
25. Gowans EMS, Hyltoft Petersen P, Blaabjerg O, et al. Analytical goals for the acceptance of common reference intervals for laboratories throughout a geographical area. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 757-764.
26. Fraser CG. General strategies to set quality specifications for reliability performance characteristics. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 487-490.
27. Cobbaert C, Weykamp C, Baadenhuijsen H, Kuypers A, Lindemans J, Jansen R. Selection, preparation and validation of commutable frozen human serum pools as secondary reference materials for lipid and apolipoprotein measurement procedures - Study within the framework of the Dutch project "Calibration 2000". *Clin Chem* 2002; 48: 1526-1538.
28. Borg S, Helander A, Carlsson AV, Högström-Brandt AM. Detection of relapses in alcohol-dependent patients using carbohydrate-deficient transferrin: improvement with indi-

vidualized reference levels during long-term monitoring. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 961-963.

29. Myrick H, Henderson S, Anton RF. Utility of a new assay for carbohydrate-deficient transferrin to monitor abstinence during a treatment outcome study. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 1330-1334.

Summary

On the significance of the %CDT result in the assessment of possible alcohol abuse. Punt JMHM, Masseur WMM, Janssens PMW, Pelt J van. Ned Tijdschr Klin Chem 2002; 27: 271-278.

While interpreting a %CDT result in relation to possible alcohol abuse, the reviewer must not be guided mainly by the estimated a priori chances, as a number of other factors do play a role: the correctness of the cut-off value, the biological variation and the interlaboratory comparability of results. In assessment of laboratory results in general, and especially those having important consequences for the person concerned, both the clinical biochemist and the physician must appreciate these factors.

Key-words: %CDT, cut-off value, alcohol abuse, between-laboratory variation, biological variation.

Ned Tijdschr Klin Chem 2002; 27: 278-280

Proteomics: een veelbelovende ontwikkeling met kansen voor de klinische chemie

J.M.G. BONFRER*

In februari 2002 publiceerde de *Lancet* een artikel van Petricoin et al. (1) met als titel "Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer". De aandacht die dit artikel kreeg, was vooral te danken aan de koppeling van een zuiveringsstap op een eiwitchip, gevolgd door massaspectrometrische analyse van de eiwitten, waardoor complexe biologische materialen zonder bewerkelijke zuiveringsstap snel en eenvoudig kunnen worden geanalyseerd. De resultaten die door de groep van Petricoin en Liotta werden gepresenteerd, lijken veelbelovend. Petricoin vond in eerste instantie een 100%-gevoeligheid bij een specificiteit van 92% toen hij de profielen van een groep van 50 vrouwen met ovariumkanker vergeleek met die van 50 gezonde proefpersonen en vrouwen met benigne gynaecologische afwijkingen (1). Ook studies naar andere tumoren (2, 3) of met lichaamsvloeistoffen anders dan serum zijn in een vergevorderd

stadium (4). Behalve in de oncologie worden deze detectietechnieken ook in andere aandachtsgebieden gebruikt. De introductie van de chiptechniek heeft dan ook een breed toepassingsgebied (5). Het toenemende belang van de kennis omtrent proteomics en de daarbij behorende diagnostische mogelijkheden hebben ertoe geleid, dat enkele leden van de NVKC het initiatief hebben genomen tot oprichting van een werkgroep Proteomics.

Proteomics

Proteomics behelst het bestuderen van eiwitprofielen, waarbij expressie, identificatie en opheldering van de relatie tussen de functie en structuur in normale (gezonde) omstandigheden en tijdens afwijkingen daarvan, centraal staan. De eiwitten worden niet alleen individueel, maar ook in hun onderlinge expressie geanalyseerd. Vooral de combinatie van de studie van het genoom (DNA-niveau) en transcriptie (mRNA) met de daadwerkelijke expressie van eiwitten in het lichaam zal een beter inzicht geven in de onderliggende ziekteprocessen. Functionele veranderingen in eiwitten die post- en translationeel plaatshebben, kunnen met proteomics zichtbaar worden gemaakt. Analyse vindt dus plaats op het uitvoerende niveau van de reeks DNA-mRNA-eiwit. Het is te verwachten, dat proteomics de kennis van de pathogenese aanzienlijk zal vergroten.

*namens de werkgroep Proteomics i.o.: M. van Dieijen-Visser, R. van Schaik, R. de Jonge, D. Swinkels en J. Bonfrer.

Correspondentie: Dr. J.M.G. Bonfrer, Algemeen Klinisch Laboratorium, Het Nederlands Kanker Instituut / Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis, Plesmanlaan 121, 1066 CX Amsterdam.
e-mail: j.bonfrer@nki.nl

Methodieken

De belangrijkste analysetechnieken die momenteel worden toegepast bij proteomics zijn tweedimensionale gelelektroforese en massaspectrometrie (6, 7).

Tweedimensionale gelelektroforese

De eiwitsamples worden in twee dimensies gescheiden, één op basis van lading, isoelectrisch punt, en de ander op basis van massa. De eiwitspots worden vervolgens uit de gel gesneden en gedigesteerd met trypsine. De massa's van de gedigesteerde fragmenten worden daarna geanalyseerd met behulp van een massaspectrometer. De verkregen massaprofielen worden vervolgens gematched met bestaande referentiespectra in speciale databanken.

Eiwitidentificatie met behulp van massaspectrometrie

Massaspectrometrie is een zeer goede manier om peptiden te identificeren. Een mengsel van eiwitten zal een specifiek patroon te zien geven: een fingerprint. Afhankelijk van de methodiek dienen de eiwitten tevoren gezuiverd te worden of kunnen deze direct in complexe materialen worden bepaald. De massaspectrometer bestaat uit een ionisatiebron, een analyser, waarbij scheiding op basis van massa-ladingratio's plaatsvindt, gevolgd door detectie van de gevormde ionen. De verbetering van de ionisatietechnieken die momenteel worden gebruikt bij massaspectrometrie hebben er toe bijgedragen, dat karakterisering van eiwitten is vergemakkelijkt. De drie belangrijkste toepassingen die op dit moment worden aangewend voor de analyse en karakterisering van eiwitten zijn: MALDI-TOF, tandem MS en SELDI-TOF. De genoemde technieken zullen achtereenvolgens kort worden toegelicht.

MALDI-TOF-MS

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) is gebaseerd op de ionisatie van eiwitten die eerst zijn neergeslagen in een matrix van speciale verbindingen, zoals dihydroxybenzoëzuur of α -cyano-4-hydroxykaneelzuur. Samen vormen zij een vaste stof die wordt bestraald met een laser. Het matrixmateriaal, met absorptie in de golflengte van het gebruikte laserlicht, is in staat de geabsorbeerde energie door te geven aan de geïncorporeerde (bio)moleculen. Deze worden nu gefragmenteerd, geïoniseerd en uit de matrix de ruimte in geschoten. Hierna worden zij in het apparaat versneld. De tijd die deze fragmenten nodig hebben om de afstand tot de detector te overbruggen, is omgekeerd evenredig met de massa-lading, m/z -waarde. De m/z -profielen van de gedigesteerde fragmenten worden vergeleken met profielen in een database om zo te komen tot eiwitidentificatie. Er wordt gebruik gemaakt van een statistisch scoringssysteem (6, 8). MALDI-TOF-MS is niet geschikt voor directe analyse van complexe biologische materialen en een voorbewerking of zuivering met behulp van bijvoorbeeld tweedimensionale gelelektroforese is altijd vereist.

Tandem MS

Bij tandem MS zijn er twee massaspectrometers in serie gekoppeld. Reeds gescheiden componenten (HPLC, GC, capillaire elektroforese) worden geïoniseerd met de eerste massaspectrometer. Hier wordt een selectie gemaakt van bepaalde massafragmenten, die vervolgens verder worden gefragmenteerd en met een tweede massaspectrometer worden geanalyseerd. De monsters moeten redelijk zuiver zijn, aangezien selectieve analyse van complexe monsters niet mogelijk is zonder voorbewerking. Karakterisering van massa/ladings- (m/z) -profielen wordt gebruikt voor identificatie van de eiwitten.

SELDI-TOF-MS

Bij de Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS) is eiwitanalyse mogelijk in complexe biologische materialen, zoals bijvoorbeeld serum of liquor. Deze nieuwe methodiek, die ook werd gebruikt in het eerder genoemde artikel van Petricoin et al. (1), maakt gebruik van speciale ProteinChips. Door de interactie van het te analyseren materiaal met de chip vindt in feite een zuivering/chromatografie plaats. De oppervlakte van de chip is voorbewerkt met bijvoorbeeld antilichamen of receptoren, maar ook meer breedspectrumchips zijn beschikbaar. Na wassen is de chip met de daaraan gebonden eiwitten direct klaar, om met laserpulsen bewerkt te worden. Vervolgens vindt detectie van eiwitprofielen plaats met behulp van TOF-MS. In het genoemde artikel (1), maar ook in een aantal studies naar de detectie van andere tumoren (2, 3, 9) wordt het resulterende massaspectrogram in eerste instantie niet gebruikt om eiwitten te identificeren, maar wordt het verkregen profiel beoordeeld als een fingerprint van het serummonster. Door nu serum van een groot aantal gezonde personen te vergelijken met een te onderzoeken groep patiënten moet het volgens de verwachtingen mogelijk zijn deze groepen op basis van bepaalde piekarakteristieken/eiwitprofielen van elkaar te onderscheiden. Hierbij wordt gebruik gemaakt van geavanceerde zelflerende statistische modellen vergelijkbaar met die bij de beoordeling van genclustering d.m.v. micro arrays worden gebruikt. Er bestaan eiwitdatabanken en referentiespectra die afkomstig zijn uit verschillende celtypes van zowel gezond weefsel als van weefsel uit ziekteprocessen. Er is momenteel een groot aantal studies gaande die betrekking hebben op tumorweefsel of serum en die gebruikmaken van deze methodiek. Het gevonden eiwitprofiel wordt gebruikt om een unieke combinatie te zoeken waardoor een monster afkomstig van een patiënt met een bepaalde ziekte te onderscheiden is van een monster van een gezonde persoon.

Toepassing in het klinisch-chemisch laboratorium

Deze methodiek heeft een veel breder toepassingsgebied dan alleen bij de diagnostiek van tumoren, bijvoorbeeld ook bij de analyse van veranderde eiwitprofielen bij Alzheimer, longaandoeningen, analyse

van lichaamsvloeistoffen als liquor, bronchoalveolaire lavagevloeistof etc. Met name voor klinisch-chemische laboratoria lijkt analyse van sera met behulp van SELDI-TOF-MS een veelbelovende techniek.

Momenteel wordt er binnen de oncologie veel basaal onderzoek gedaan met behulp van proteomics. Identificatie van eiwitprofielen in serum als indicator van ziekte met behulp van SELDI-TOF-MS-technieken leidt tot nieuwe mogelijkheden. Wanneer het klinisch-chemisch laboratorium de rol van diagnostisch centrum voor onderzoek in lichaamsvloeistoffen ter opsporing en identificatie van ziekte wil behouden, lijkt het onafwendbaar dat ook de klinisch-chemicus zich deze expertise eigen zal moeten maken.

Uitgangspunten

De werkgroep in oprichting meent daarom, dat gebruik van lichaamsvloeistoffen in het onderzoek naar de samenhang van de eiwitten (proteomics) met de nieuwe massaspectrometrische methoden, een aandachtspunt moet worden voor de klinisch-chemicus. De werkgroep nodigt anderen die beroepsmatig een aandeel kunnen leveren in de werkzaamheden van de werkgroep uit zich te melden bij een van de leden van de werkgroep. De werkgroep Proteomics i.o. zal op 22 mei 2003 een symposium organiseren dat aandacht zal schenken aan zowel de technische aspecten als aan de klinische mogelijkheden in relatie tot het klinisch-chemisch laboratorium.

Literatuur

1. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577.
2. Adam BL, Vlahou A, Semmes OJ, Wright GL Jr. Proteomic approaches to biomarker discovery in prostate and bladder cancers. *Proteomics* 2001; 1: 1264-1270.
3. Wulfkuhle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, Petricoin EF. New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* 2001; 1: 1205-1215.
4. Noel-Georis I, Bernard A, Falmagne P, Wattiez R. Proteomics as the tool to search for lung disease markers in bronchoalveolar lavage. *Dis Markers* 2001; 17: 271-284.
5. Lewis S, Kuo Korsmeyer K, Almira Correia M. Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometry of Cytochromes P450. *Rapid Comm Mass Spectrometry* 1993; 7: 16-19.
6. Lawrie LC, Fothergill JE, Murray GI. Spot the differences: proteomics in cancer research. *Lancet Oncol* 2001; 2: 270-277.
7. Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, Wright GL Jr. Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem* 2001; 47: 1901-1911.
8. Oh JM, Brichory F, Puravs E, Kuick R, Wood C, Rouillard JM, et al. A database of protein expression in lung cancer. *Proteomics* 2001; 1: 1303-1319.
9. Daly MB, Ozols RF. The search for predictive patterns in ovarian cancer: Proteomics meets bioinformatics. *Cancer Cell* 2002; 1: 111-112.