



# ECHO MS: nový standard pro rychlý a robustní screening malých molekul

Martina Kintlová<sup>1</sup>, Petr Džubák<sup>1</sup> a Marián Hajdúch<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Hněvotínská 1333/5, 779 00 Olomouc, Česká republika

E-mail: martina.kintlova@upol.cz

Tato práce byla podpořena projektem Národní institut pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – financováno Evropskou unií – Next Generation EU; Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (CZOPENSREEN: LM2023052, EATRIS-CZ: LM2023053); interním grantem Univerzity Palackého v Olomouci (IGA\_LF\_2024\_038).

## Úvod

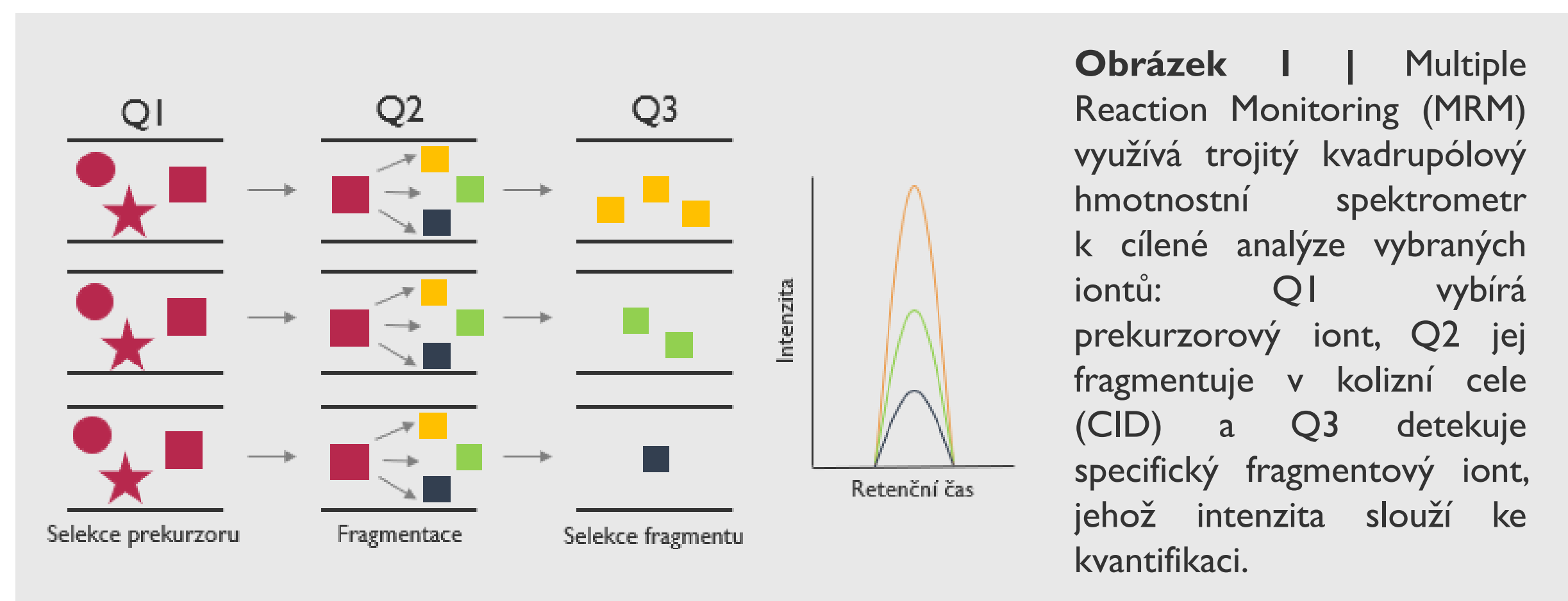
Kinázy jsou enzymy, které regulují klíčové biologické procesy, jako je buněčná signalizace, metabolismus a exprese genů. Svým významem pro řízení růstu, dělení i přežití buněk se staly hlavními cíli při vývoji léčiv pro onkologická, autoimunitní a neurodegenerativní onemocnění, včetně Alzheimerovy choroby. Identifikace účinných inhibitorů kináz je proto zásadní v raných fázích vývoje léčiv.

K jejich detekci a stanovení  $IC_{50}$  se tradičně používají enzymatické a imunochemické testy doplňované hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF.

Ta se na našem pracovišti uplatňovala při high-throughput (HTS) inhibitorů kináz. Ačkoli je MALDI-TOF pro tento účel užitečná, její možnosti z hlediska robustnosti, jednoduchosti manipulace a flexibility při rutinním nasazení jsou omezené. Proto jsme workflow rozšířili o platformu SCIEX Echo® MS, která kombinuje akustický přenos vzorku s rychlou hmotnostní spektrometrií bez chromatografické separace. Ve spojení s hmotnostním spektrometrem Triple Quad 6500+ tato technologie zkracuje dobu analýzy, zjednodušuje práci a zvyšuje reprodukovatelnost, čímž výrazně zefektivňuje HTS.

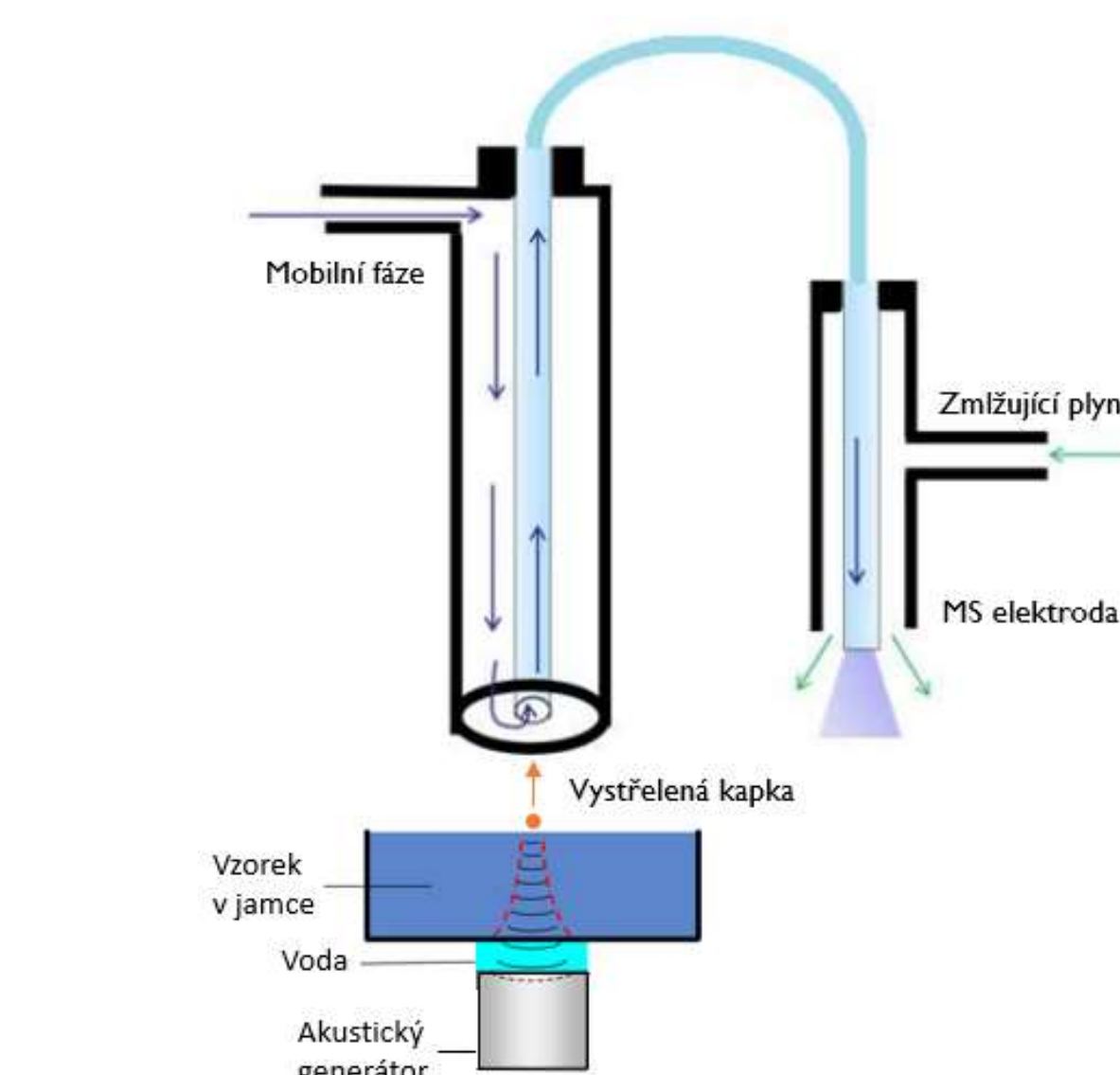
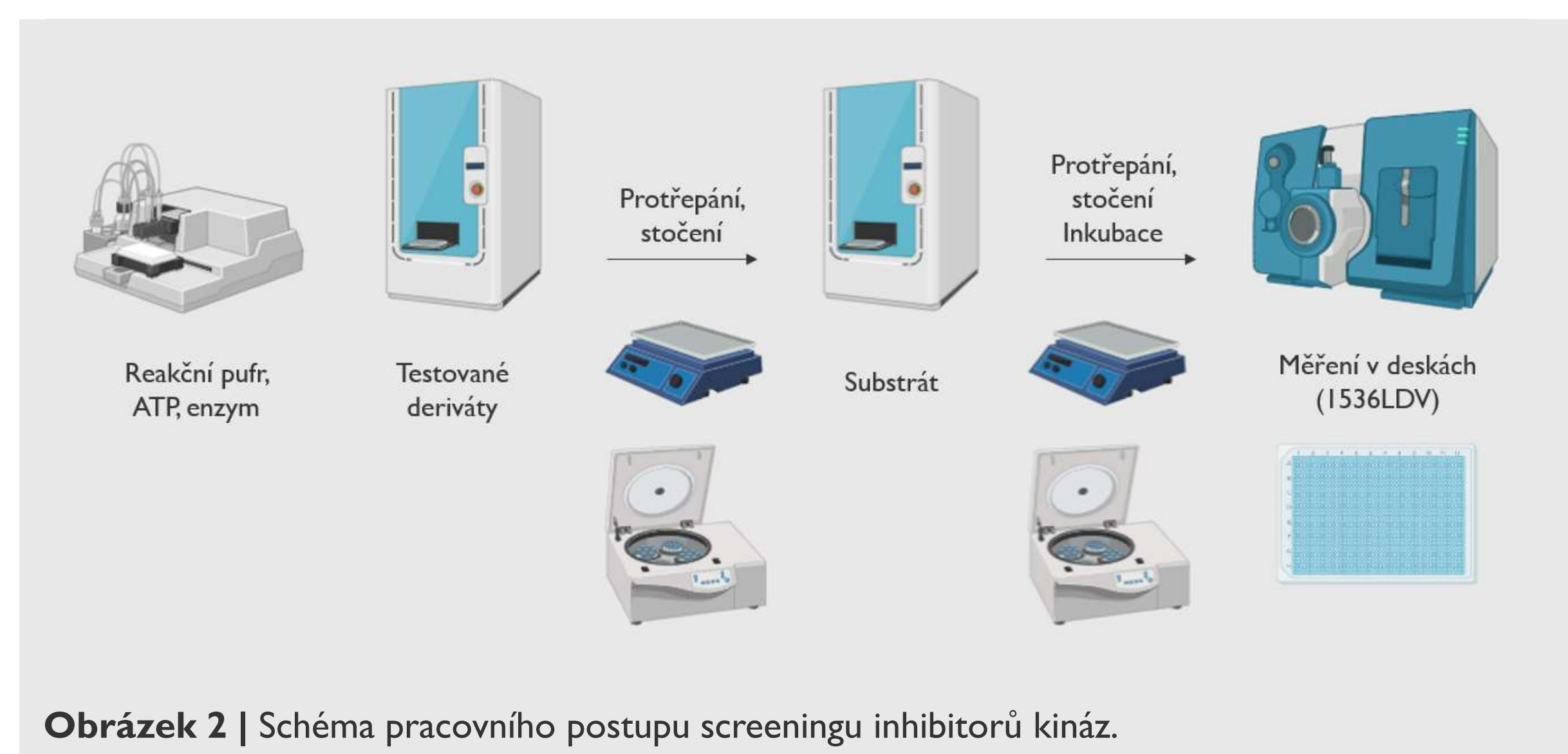
## Metodika

Inhibici kináz jsme stanovovali pomocí systému SCIEX Echo® MS v režimu Multiple Reaction Monitoring (viz Obr. 1), který umožňuje cílenou a vysoce selektivní detekci zvolených iontů. Pro každý enzymatický substrát a produkt byly předem zvoleny specifické MRM přechody a jejich parametry byly ověřeny v reakčním pufru, aby se minimalizoval vliv případných interferencí. Množství reakčního produktu ve vzorku s testovaným derivátem bylo následně kvantitativně porovnáno s pozitivní kontrolou, což umožnilo přesné vyhodnocení míry inhibice.

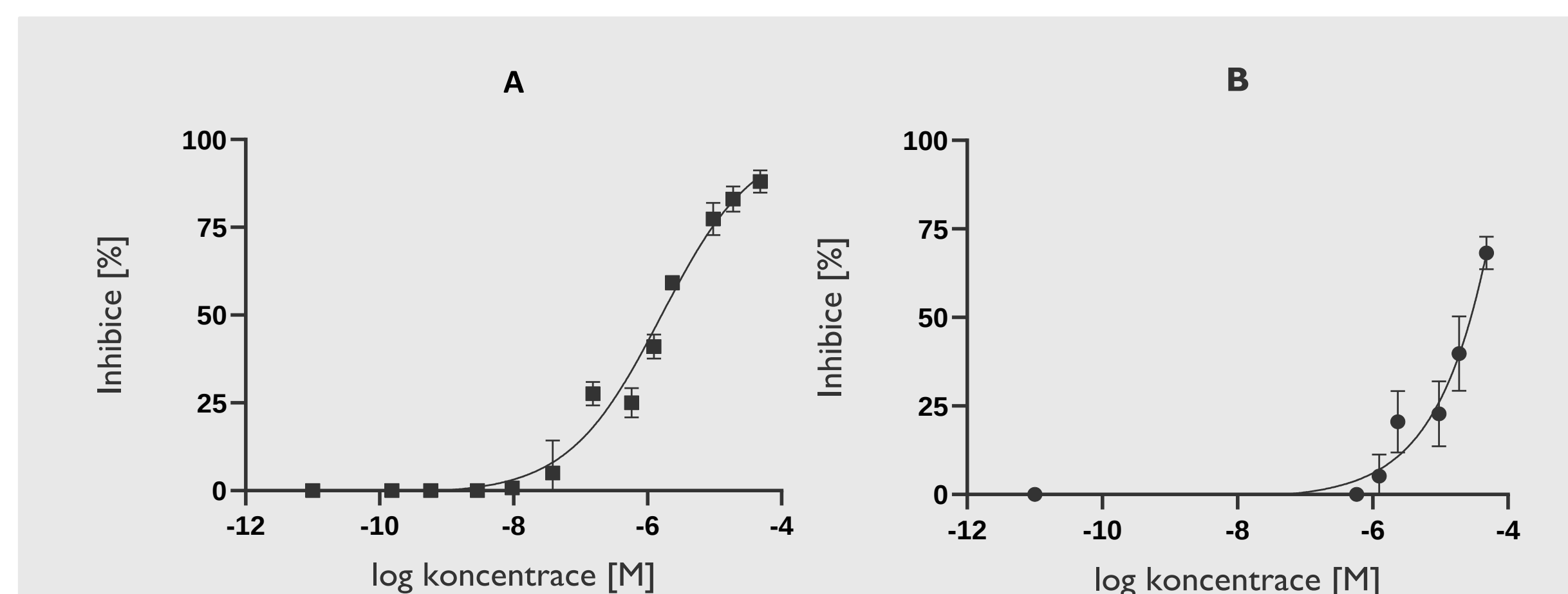


Reakční směs obsahovala 1,0  $\mu$ l pufru (1 mM HEPES, 1 mM  $MgCl_2$ , 2 mM DTT, pH 7,5), 1,5  $\mu$ l ATP (0,1 mg/ml), peptidový substrát a enzym. Všechny komponenty byly dávkovány pomocí přístrojů Certus Flex a Labcyte Echo 550 (viz Obr. 2), což zajišťovalo konzistentní přípravu reakcí. Použité enzymy byly skladovány při  $-80^\circ C$  a před každým měřením čerstvě ředěny. Peptidový substrát byl připraven v koncentraci 5 mg/ml v deionizované vodě a uchováván při  $-20^\circ C$ .

Po inkubaci reakcí byly vzorky akusticky přenášeny pomocí jednotky Echo (využívající OPI rozhraní, viz Obr. 3) přímo do hmotnostního spektrometru systému Echo MS a data byla zpracována v softwaru Sciex OS. Deriváty vykazující více než 50 % inhibici v primárním screeningu byly dále analyzovány ve 12bodové ředící řadě, což umožnilo výpočet hodnoty  $IC_{50}$  v softwaru GraphPad Prism a vytvoření křivky závislosti účinku na dávce (viz Obr. 4). Tento přístup poskytl detailní inhibiční profil každého testovaného derivátu a usnadnil jejich porovnání.



Obrázek 3 | Schéma akustického přenosu vzorku: Akustický generátor vytváří ultrazvukovou vlnu, která prostupuje jamkou se vzorkem a způsobí ejekci kapky. Ta vstupuje do rozhraní OPI (Open Port Interface), kde se mísí s mobilní fází a je následně vedena přes MS elektrodu do ESI zdroje hmotnostního spektrometru.



## Závěr

Začlenění platformy SCIEX Echo® MS do high-throughput screeningu významně urychlilo a zefektivnilo identifikaci účinných inhibitorů kináz. Díky spojení akustického přenosu vzorku a rychlé hmotnostní spektrometrie bez chromatografie umožňuje tato technologie provádět analýzy z velmi malých objemů (od 2,5  $\mu$ l v 1536jamkových LDV destičkách), čímž výrazně snižuje

spotřebu činidel i celkové náklady – zásadní benefit u rozsáhlých screeningových studií. Metoda byla optimalizována pro klíčové kinázové cíle spojené s léčbou nádorových a neurodegenerativních onemocnění a představuje robustní, reprodukovatelnou a ekonomicky efektivní platformu pro vývoj nových terapeutik v onkologii i neurovědách.