

Targeted Metabolomics: schnelle und standardisierte massenspektrometrische Analyse aus Blutplasma im Kitformat

*Ralf Bogumil, Therese Koal, Klaus M. Weinberger, Sascha Dammeier
BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Österreich*

Die Entdeckung von metabolischen Biomarkern und die routinemäßige Analytik von Stoffwechselprodukten gewinnt zunehmende Bedeutung in den modernen biowissenschaftlichen Disziplinen. Sowohl die klinische, pharmazeutische und toxikologische Forschung als auch die biologische Grundlagenforschung profitieren von der Ergänzung etablierter Genomics- und Proteomics-technologien durch *Targeted Metabolomics*. In einem validierten und standardisierten Verfahren ermöglicht der neu entwickelte *AbsoluteIDQ™* Kit erstmals in einem einzigen Assay über 150 verschiedene Metaboliten aus vier verschiedenen Stoffklassen (Acylcarnitine, Aminosäuren, Glycerophospho- und Sphingolipide und Hexosen) bei einem geringem Probeneinsatz von 10µL Blutplasma zu bestimmen.

Targeted Metabolomics

Die heutzutage viel zitierte Systembiologie versucht, die Gesamtheit und Dynamik aller regulatorischen und biochemischen Prozesse in einem Organismus auf molekularer Ebene zu verstehen. Während sich diese Untersuchungen bislang vor allem auf die Ebenen des Genoms, des Transkriptoms und des Proteoms beschränkten, ist es durch die Weiterentwicklung der massenspektrometrischen Analysetechniken in den letzten Jahren nun auch möglich, das Metabolom umfassender zu untersuchen [1-3]. Dies ist von besonderer Bedeutung, da das Metabolom am Ende der Kette vom Gen/Genom zur Funktion steht und daher direkt aussagekräftig ist. Das Abbild der Konzentrationen verschiedenster endogener Metabolite stellt den funktionellen Endpunkt der physiologischen und pathophysiologischen Stoffwechselprozesse des Organismus dar. Dabei werden gleichermaßen die individuelle genetische Prädisposition sowie Umwelteinflüsse wie Ernährung, Sport oder Medikation abgebildet.

Der *AbsoluteIDQ* Kit basiert auf einem sogenannten *Targeted Metabolomics* Ansatz. Darunter versteht man die zielgerichtete Identifizierung und Quantifizierung einer Vielzahl von bekannten Metaboliten [4-6]. Dieser Ansatz hat im Gegensatz zu den Non-Targeted Methoden, zum Beispiel dem weit verbreiteten Metabolic Profiling, unter anderem den Vorteil, dass man generell quantitative oder semi-quantitative Informationen erhält. Konzentrations-Änderungen von Metaboliten lassen sich einfacher im physiologischen Kontext interpretieren, da häufig die Funktionen der Metaboliten in verschiedenen Stoffwechselwegen gut beschrieben sind. Kürzlich wurde die erste "genome-wide association" Studie publiziert, in der genomische Daten mit Targeted Metabolomics Daten korreliert werden konnten [6]. Des Weiteren eignet sich die *Targeted Metabolomics* Methode besser für Hochdurchsatz- und Routineanwendungen und ist in

Zukunft für Bereiche wie die klinische Diagnostik von hohem Interesse. So hat sich beim neonatalen Screening auf angeborene Stoffwechselerkrankungen gezeigt, dass eine multiparametrische massenspektrometrische Analyse erfolgreich in der diagnostischen Routine eingesetzt werden kann [7].

Die BIOCRATES Life Sciences AG hat in den letzten Jahren eine Metabolomics-Technologie entwickelt und etabliert, die es ermöglicht, viele Klassen von biologisch relevanten Metaboliten in Zellen, Zell-Kompartimenten oder verschiedensten klinischen Probenmaterialien systematisch zu quantifizieren. Diese Technologie beinhaltet eine automatische Probenaufarbeitung, integriert mit modernsten und sensitiven massenspektrometrischen Analysemethoden, sowie eine maßgeschneiderte Softwarelösung (Met/IQ™), die Probenmanagement, Datenerfassung, -validierung und -auswertung steuert. Mit Hilfe dieser Plattform können bis zu 1000 Metaboliten bestimmt werden.

Der neu entwickelte Absolute/DQ Kit ermöglicht die Quantifizierung von derzeit 163 Metaboliten in Blutplasma durch den Anwender. Zusätzliche spezielle Kits bzw. Erweiterung auf andere biologische Matrices befinden sich bereits in Entwicklung, um dem zunehmenden Bedarf an standardisierten und validierten Analysetechniken für die Metabolomicsforschung bzw. spätere Diagnostik gerecht zu werden. Das umfassende Metabolitenspektrum wird im Rahmen von Kundenprojekten bei BIOCRATES angeboten.

Absolute/DQ™ Kit

Der Kit basiert auf einer standardisierten Fließinjektions-Tandem Massenspektrometrie Analyse-methode (Flow Injection Analysis, FIA-MS-MS), wobei die Ionisierung über eine Elektrospray-Ionenquelle (ESI) erfolgt. Für die Quantifizierung werden isotope markierte interne Standards eingesetzt. Die MS/MS Signalintensitäten jedes Analyten relativ zu seinem isotope markierten internen Standard ist in einem definierten Bereich proportional zur Konzentration. Um eine möglichst hohe Selektivität und Sensitivität der Analyse-methode sicherzustellen, erfolgt die MS/MS Quantifizierung im sogenannten *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) Detektionsmodus, bei dem metabolitspezifische Precursor-/Produkt-Übergänge gemessen werden. Der Kit wurde in der jetzigen Version für die beiden Triple Quadrupole Massenspektrometer API 4000™ sowie 4000 QTRAP® der Firma Applied Biosystems/MDS Sciex entwickelt und optimiert, kann aber auch mit dem 3200 QTRAP® Gerät verwendet werden.

In Abbildung 1 ist der detaillierte Arbeitsablauf des Kits inklusive des Zeitbedarfes für die einzelnen Schritte dargestellt. Der Kit wurde in einem Standard 96-well Platten-Format entwickelt, welches sowohl eine manuelle als auch eine vollautomatisierte Probenvorbereitung mittels eines Pipettier-roboters (Hamilton MICROLAB STAR System) erlaubt. Zur Durchführung sind sechs aufeinanderfolgende Schritte nötig, die durch die Met/IQ Software, die integraler Bestandteil des Kits ist, miteinander verknüpft sind. Die Met/IQ Software enthält verschiedene Module, die wie un-

ten beschrieben, den Arbeitsablauf standardisieren und eine schnelle Auswertung des Assays ermöglichen.

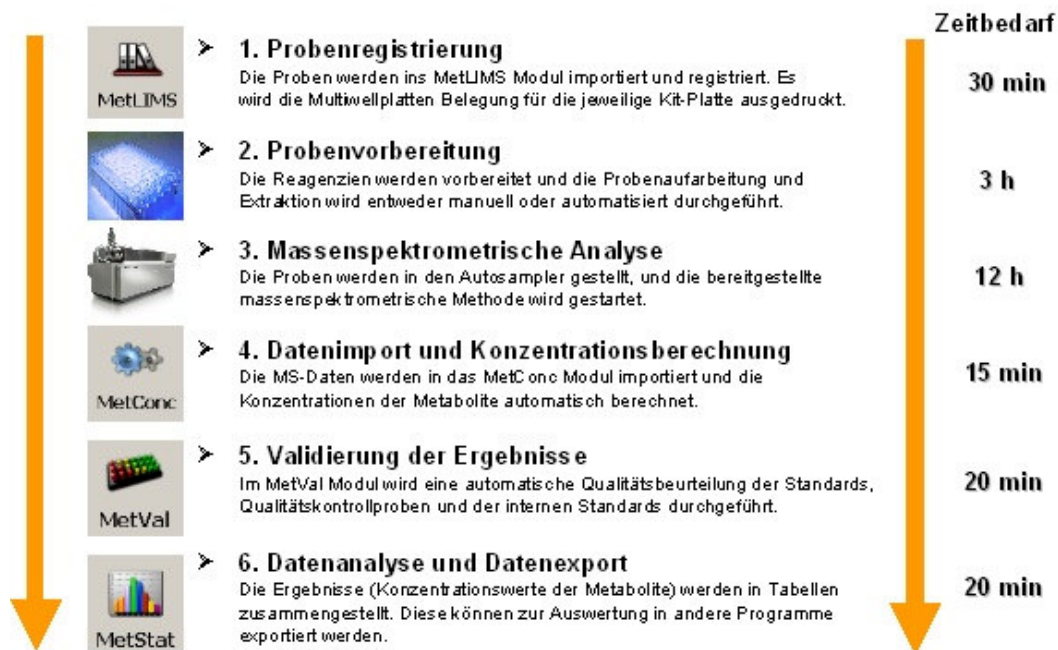


Abbildung 1: Darstellung des Arbeitslaufs des AbsoluteIDQ™ Kits

1. Probenregistrierung

Die MET/Q Software enthält ein flexibles LIMS (Laboratory Information Management System) Modul. In diesem werden die Projekte und Proben registriert oder externe Probenlisten (beispielsweise von bereits etablierten LIMS-Lösungen) importiert. Darüber hinaus werden hier die Standards, Qualitätskontrollen und die Methoden-SOP (*Standard Operating Procedure*) verwaltet sowie den Proben eindeutige Barcodes zugeordnet. Je nach Bedarf können detaillierte Informationen zu den Proben hinzugefügt werden, die für die spätere statistische Auswertung von Interesse sind. Die registrierten Proben werden im Folgenden gemeinsam mit Qualitätskontrollen und Standards auf die 96-Well Kitplatte verteilt, bevor die Plattenbelegung für die Arbeit im Labor ausgedruckt werden kann. Die Software generiert außerdem eine sog. csv-Datei mit dem Belegungsschema, die dann in die Software des Massenspektrometers, derzeit exklusiv in Analyst® der Firma Applied Biosystems, eingelesen wird, um ein schnelles Erstellen der Abarbeitungsliste der Proben zu ermöglichen.

2. Probenvorbereitung

Die reproduzierbare Probenvorbereitung und Extraktion der chemisch sehr unterschiedlichen Metaboliten aus einer komplexen Matrix wie Plasma ist ein wichtiger Schritt, der durch eine speziell entwickelte Kitplatte im Sandwichformat ermöglicht wird. In Abbildung 2 ist das spezielle Design der Kitplatte dargestellt.

Dieses Kitformat gewährleistet eine einfache und äußerst schnelle Probenvorbereitung. Die Plasmaprobe (10 µL) wird auf das obere Trägermaterial aufgetragen, in dem die internen Standards bereits enthalten sind. Da die internen Standards für jede Quantifizierung und Konzentrationsbestimmung essentiell sind, ist hier durch die Integration in die Kitplatte eine wichtige potentielle Fehlerquelle eliminiert. Anschließend erfolgt die Derivatisierung der Aminosäuren durch Phenylisothiocyanat, bevor nach Trocknung unter Stickstoffgas alle Metaboliten durch einen einzigen Schritt mit einem definierten Volumen an Extraktionsmittel extrahiert werden. Durch Zentrifugation wird die extrahierte Probe filtriert und in die untere Deep-Well Platte überführt. Nach einem abschließenden Verdünnungsschritt ist die 96-Well Platte analysenbereit und kann in den Autosampler des Massenspektrometers gestellt werden.

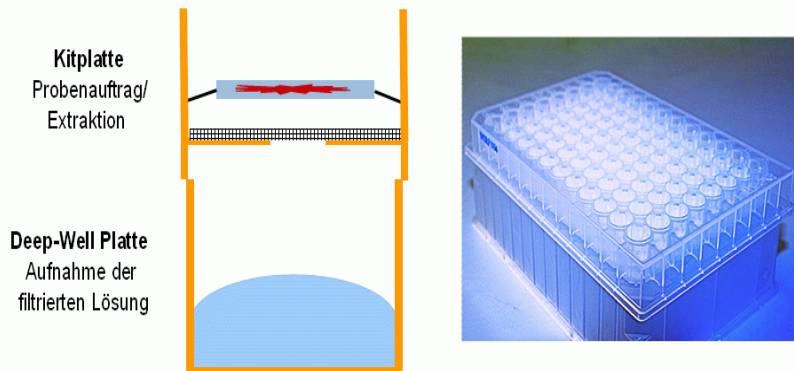


Abbildung 2: Schematische Darstellung der AbsoluteIDQ™ Kitplatte

3. Massenspektrometrische Analyse

Die Injektion der extrahierten Probe und der Proben transfer mittels der mobilen Phase zur FIA-ESI-MS/MS Analyse kann mit allen handelsüblichen Applied Biosystem/MDS Sciex Analyst-Software kompatiblen Autosampler- und HPLC-Systemen erfolgen.

Dem Anwender wird mit dem Kit eine validierte gerätespezifische Analysenmethode zur Verfügung gestellt, so dass der Aufwand für das massenspektrometrische Setup sehr gering ist. Die isokratische Fließinjektionsmethode benötigt 3 min und jede Probe wird zweimal vermessen, einmal im Positiv- und einmal im Negativ-Messmodus. Die Mehrzahl der Analyten wird im Positiv-Modus analysiert, doch einige lassen sich besser im Negativ-Modus bestimmen. Hierdurch ergibt sich ein totaler Zeitbedarf von ca. 7 min pro Probe inklusive Injektion. Bei 96 Proben erfolgt die Datenaufnahme praktischerweise über Nacht.

4. Datenimport und Konzentrationsberechnung

In Analogie zu Genomics und Proteomics ist auch bei größeren Metabolomicsprojekten prinzipiell der zeitaufwendigste Schritt nicht die Datenaufnahme, sondern die Datenverarbeitung und -auswertung. Beim AbsoluteIDQ Kit werden von 163 Metaboliten bei 96 Proben über 15.000

Konzentrationen berechnet. Diese Funktion wird in automatisierter Form von der Met/Q Software durchgeführt. Das MetConc Modul interagiert mit der Applied Biosystems/MDS Sciex Software Analyst, indem die massenspektrometrischen Daten (wiff-Dateien) konvertiert und in die Met/Q Datenbank importiert werden. Bei diesem Datenimport laufen automatisierte Algorithmen ab, die letztendlich die einzelnen Konzentrationen berechnen. Der Absolute/DQ Kit ermöglicht gemeinsam mit der ausgefeilten Met/Q Software eine Hochdurchsatz-Analyse endogener Metabolite, welches sich besonders auch für große Probenzahlen anbietet.

5. Validierung der Ergebnisse

Im MetVal Modul der Software wird eine automatisierte Qualitätsbeurteilung der erhaltenen Daten vorgenommen und abgeglichen, ob die erhaltenen Werte für die internen Standards, die Blanks und die Qualitätskontrollen im Bereich der in der Methoden-SOP gesetzten Grenzen liegen. Die Ergebnisse können in diversen Grafiken dargestellt werden, die einen schnellen Überblick über die Qualität der Daten ermöglichen. Falls sich Werte außerhalb der Grenzen befinden, wird dies einerseits graphisch angezeigt, andererseits aber auch in den Ergebnistabellen vermerkt.

6. Datenanalyse und Datenexport

In dem letzten Schritt, ausgeführt im MetStat Modul, können die Assay-Ergebnisse in verschiedenen Tabellen (zum Beispiel nach Stoffklassen sortiert, dargestellt als Konzentrationen oder Intensitäten) zusammengefasst werden. Die Ergebnisse der zuvor erfolgten Datenvalidierung werden in die Tabellen ebenfalls integriert. Diese Tabellen können dann in verschiedenen Formaten (.csv oder .txt) exportiert werden. Dadurch wird dann eine weitergehende statistische und bioinformatische Auswertung in anderen Programmen ermöglicht.

Methodenvalidierung

Die hier beschriebene Kitmethode ist gemäß der *FDA Guidance for Industry „Bioanalytical Method Validation“* validiert worden. Darüber hinaus wurde die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit in verschiedenen externen Labors getestet. Abbildung 3 A zeigt die Variationskoeffizienten von einigen Analyten, die hier die unterschiedlichen chemischen Klassen von Metaboliten repräsentieren.

Generell liegen die Variationskoeffizienten deutlich unterhalb von 15 % und sind über die beteiligten Labore hinweg vergleichbar. Hierbei treten analyten- und stoffklassenspezifische Unterschiede auf, welche in den stark unterschiedlichen endogenen Konzentrationen begründet liegen. Die Varianzen von Kitmessungen an verschiedenen Tagen in einem Labor sind ebenfalls dargestellt und zeigen sehr robuste Werte. Darüber hinaus wurde die Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebniswerte untersucht, was in der Darstellung der Absolutwerte pro Testort zum Ausdruck kommt (siehe Abbildung 3 B). Die Konzentrationen weichen nur geringfügig voneinander ab, was zum Beispiel eine gute Voraussetzung dafür ist, multizentrische Studien durchzuführen.

Durch die standardisierte Aufarbeitung und den Einsatz von internen Standards, die für die Konzentrationsberechnung eingesetzt werden, wird der Einfluss vieler Faktoren auf das Ergebnis stark minimiert.

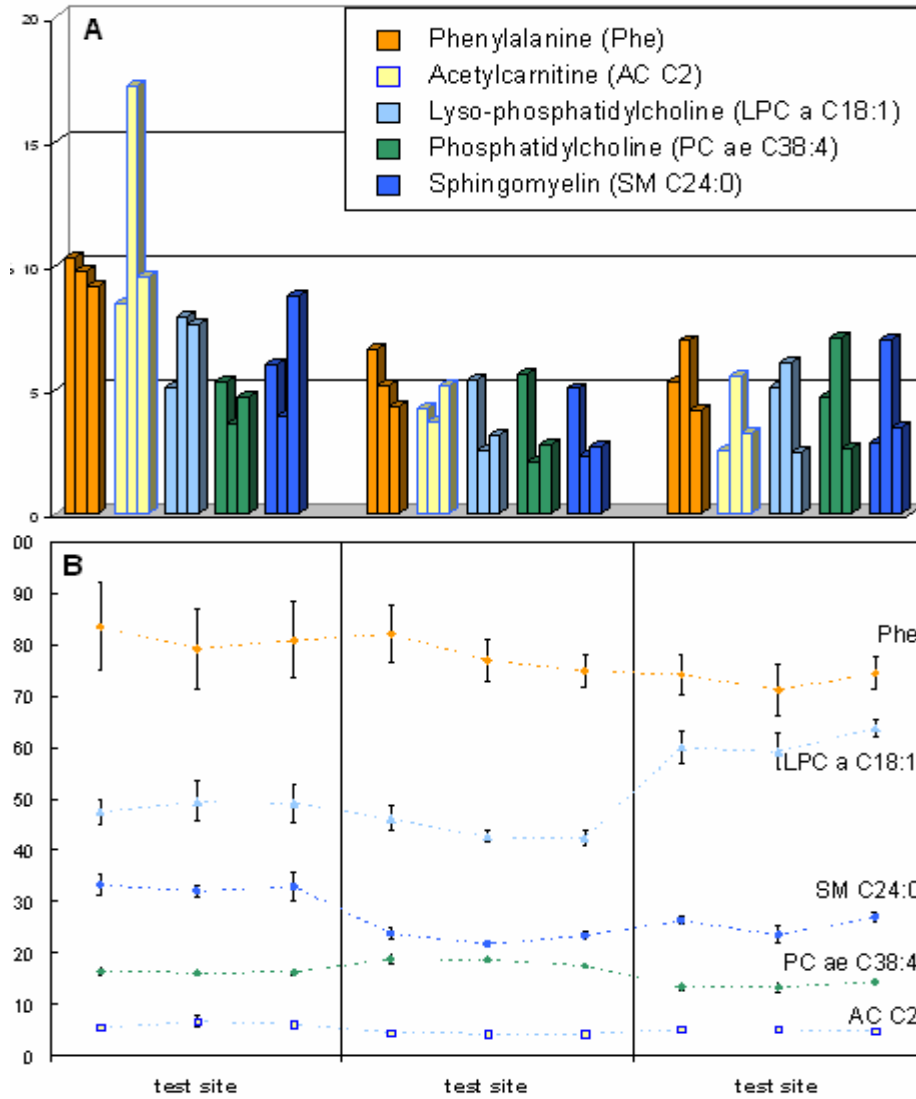


Abbildung 3: Repräsentative Ergebnisse eines Feldtestes in 3 unabhängigen Laboratorien (test site I, II, III).

In Teil A sind die Variationskoeffizienten (in %) von 5 verschiedenen Analyten dargestellt, wodurch die Reproduzierbarkeit sowohl an 3 unterschiedlichen Tagen (je 3 Balken pro Analyt) als auch zwischen den Laboren beschrieben wird. In Teil B sind die medianen Konzentrationen (in µM) inklusive Standardabweichung aller Kittests dargestellt. Pro Kitplatte wurden jeweils 9 Proben einer Poolplasmaprobe (je 10 µL) analysiert.

Die große Anzahl an gemessenen Metaboliten erfordert allerdings auch, bei einigen Klassen Kompromisse einzugehen. So werden zum Beispiel für die große Menge an Phospho- und Sphingolipiden semiquantitative Werte erzeugt, was sich dadurch begründet, dass korrespondierende Standards nicht verfügbar sind. Für andere Metaboliten wiederum liegt die Konzentration im Normalplasma außerhalb des validen Quantifizierungsbereiches, sodass diese

Parameter nur bei ausgelenkten Metabolitenspiegeln, zum Beispiel bei Stoffwechsellanomalien, Krankheitszuständen oder als Folge von Behandlungen, sicher bestimmt werden können.

Metabolitenspektrum und Anwendungsgebiete

In Tabelle 1 findet sich eine Übersicht über die Metabolitenklassen, die mit dem Kit gemessen werden, die Anzahl der Metaboliten sowie einige Beispiele für die biologische Relevanz der verschiedenen Metabolitenklassen. Natürlich lässt sich die (patho)physiologische Funktion dieser Substanzen hier nicht umfassend beschreiben, aber die genannten Annotationen sollen einen Eindruck davon vermitteln, wie vielseitig Metabolomics in der Beurteilung des Stoffwechselgeschehens verwendet werden können.

Tabelle 1: Übersicht über gemessene Metabolitenklassen

Metabolitenklasse	Gemessene Analyten	Biologische Relevanz (Ausgewählte Beispiele)
Acylcarnitine	41	Energiestoffwechsel, Fettsäuretransport und mitochondriale Fettsäure-Oxidation (zum Beispiel angeborene Störungen wie MCAD), Ketose, oxidativer Stress, Schädigung der Mitochondrien-Membran (Apoptose)
Aminosäuren	13 proteinogene Aminosäuren + Ornithin	Aminosäure-Metabolismus (zum Beispiel angeborene Störungen wie PKU, MSUD), Harnstoff-Zyklus, Aktivität von Glukoneogenese und Glykolyse, Insulinsensitivität / -resistenz, Immunmodulation, Neurotransmitter-Stoffwechsel, oxidativer Stress
Hexosen	Summe an Hexosen (90-95 % Glucose)	Kohlenhydratstoffwechsel
Lyso-Phosphatidylcholine	15	Phospholipidabbau (Aktivität von Phospholipasen), Membranschädigung, Signalkaskaden, Fettsäureprofil
Phosphatidylcholine	77	Dyslipidämien, Membranzusammensetzung und -schädigung, Fettsäureprofil und Aktivität von Desaturasen
Sphingomyeline	15	Signalkaskaden, Membranschädigung (zum Beispiel Neurodegeneration)

Während für einige dieser Metabolitenklassen wie zum Beispiel die Aminosäuren andere Kits oder etablierte Bestimmungsverfahren auf dem Markt sind, ist das Besondere dieses Kits die simultane Quantifizierung von Analyten von 4 verschiedenen Stoffklassen aus einer Probenmenge von nur 10 µL und die hohe Anzahl an Phospho- und Sphingolipiden, die bestimmt werden können.

Die möglichen Anwendungsgebiete sind durch das breite Metaboliten-Spektrum vielfältig. In Tabelle 2 sind die Hauptanwendungsgebiete aufgeführt. Neben der Grundlagenforschung sind hier als wichtige Einsatzorte vor allem die pharmazeutische und klinische Forschung zu sehen. Prinzipiell sind Metabolomics-Methoden für den Bereich *“Translational Research“* besonders gut geeignet, da die Metaboliten als chemische Entitäten in den verschiedenen Spezies identisch und auch die zentralen Stoffwechselwege in der Evolution stark konserviert sind. Deshalb sind hier Untersuchungen von der Zellkultur über präklinische Tiermodelle bis hin zu klinischen Studien mit den gleichen analytischen Methoden durchführbar. Dies ist gerade im Bereich Genomics aufgrund der genetischen Unterschiede nur schwer möglich. In diesem Kontext bietet der Kit durch den geringen Probenbedarf von 10 µL ideale Voraussetzungen, zum Beispiel auch Mausmodelle exzellent zu untersuchen. Der Kit wurde für humanes Plasma validiert, aber ist inzwischen für verschiedene Tierplasmen getestet worden, die ebenfalls problemlos analysiert werden können [8]. Weitere Anwendungsvorschriften, wie zum Beispiel Erweiterung auf Gewebehomogenatproben oder andere Körperflüssigkeiten, die den Einsatzbereich des Kits erweitern, befinden sich in der Entwicklung.

Tabelle 2 : Anwendungsgebiete für den Absolute/DQ™ Kit

Anwendungsgebiete	Bereich
Grundlagenforschung	Funktionelle Genomik und Systembiologie
Pharmazeutische Forschung und Entwicklung	Charakterisierung von Krankheitsmodellen, Validierung von <i>Drug Targets</i> , präklinische und klinische Studien zu Toxikologie / Verträglichkeit und Pharmakodynamik / Wirksamkeit, Aufklärung von Wirkmechanismen (<i>mode of action</i>)
Klinische Forschung Diagnostik /Theranostik	Entdeckung und Validierung von metabolischen Biomarkern, Verfolgung von therapeutischen Effekten, frühe Diagnose von latenten Krankheiten, Umwelteinflüsse
Nahrungsmittelindustrie/ Ernährungswissenschaften	Gesundheitseffekte von Designer-Nahrung, Ernährungsbedingte Änderungen im Metabolismus

Literatur:

- [1] Dettmer, K., Aronov, P. A., Hammock, B. D., *Mass Spectrometry-based Metabolomics*, Mass Spectrometry Reviews, 26, 51-78 (2007)
- [2] Hollywood, K., Brison, D.R. Goodacre, R., *Metabolomics: Current Technologies and Future Trends*, Proteomics, 6, 4716-4723 (2006)
- [3] Weinberger, K., Graber, A., *Using Comprehensive Metabolomics to Identify Novel Biomarkers*, Screening Trends in Drug Discovery, Vol. 6, 42-45 (2005)
- [4] Wang-Sattler R., Yu Y., Mittelstrass K., Lattka E., Altmaier E., Gieger C., Ladwig K.H., Dahmen N., Weinberger K.M., Hao P., Liu L., Li Y., Wichmann H.E., Adamski J., Suhre K., Illig T. *Metabolic profiling reveals distinct variations linked to nicotine consumption in humans--first results from the KORA study*. PLoS ONE;3(12):e3863. Epub Dec 5.(2008)
- [5] Unterwurzacher I, Koal T, Bonn G.K., Weinberger K.M., and Ramsey S.L., *Rapid sample preparation and simultaneous quantitation of free prostaglandins and lipoxygenase derived fatty acid metabolites by LC-MS/MS from small sample volumes*, Clin Chem Lab Med., 46(11):1589-1597 (2008)
- [6] Gieger C, Geistlinger L, Altmaier E, Hrabé de Angelis, Kronenberg F, Meitinger T, Mewes H-W, Wichmann H-E, Weinberger KM, Adamski J, Illig T, and Suhre K *Genetics Meets Metabolomics: A Genome-Wide Association Study of Metabolite Profiles in Human Serum*, PLoS Genetics, Volume 4, Issue 11, e1000282 (2008)
- [7] Roschinger, W, Olgemoller, B., Fingerhut, Liebl, B, Roscher, A.A., *Advances in Analytical Mass Spectrometry to Improve Screening for Inherited Metabolic Diseases*, Eur. J. Pediatr., Suppl , 67-76, (2003)
- [8] Bogumil, R., Röhring, C. and Dammeier, S., *Detection of Metabolites in Different Animal Plasma Using the AbsoluteIDQ p150 Kit*, Application Note 1001-1, www.biocrates.com