



Metabolomics

Analytische Massenbewegung

Sollen im Zuge epidemiologischer Studien große Sätze an Blut-, Plasma- oder Urinproben in einem akzeptablen Zeitraum, unter konstanten Bedingungen und mit zuverlässig reproduzierbaren Resultaten analysiert werden, macht Handarbeit aus Sicht von Experten wenig Sinn. Metabolomics-Studien erfordern eine vollständig automatisierte Vorgehensweise.

Von Guido Deußing

Die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Adipositas, Diabetes (Typ II) und einigen Krebserkrankungen wird von Experten unter anderem mit mangelnder Bewegung und Fehlernährung in Verbindung gebracht. Vor allem fettreiche Lebensmittel können die Gesundheit und das Wohlbefinden nachhaltig beeinträchtigen. Allerdings reagieren die Menschen unterschiedlich auf vergleichbare Lebensweisen. Anders lässt es sich nicht erklären, dass zum Beispiel eine Fast-Food-dominierte Ernährung den einen an Gewicht und Körperumfang zunehmen und erkranken lässt, einen anderen jedoch nicht.

Ursächlich hierfür sind möglicherweise nuancierte Unterschiede im genetischen Bauplan, was die Verarbeitung und Verwertung von Nahrung im Organismus betrifft.

Um den Einfluss der Ernährung auf die Gesundheit sowie die Rolle und den Einfluss des Genpools untersuchen und bewerten zu können, werden groß angelegte epidemiologische Studien durchgeführt, die den Stoffwechsel sowie die resultierenden Stoffwechselprodukte (Metaboliten) in den Blick nehmen. Deren Gesamtheit wird als Metabolom bezeichnet, ihre Erfassung und Quantifizierung als Metabolomics.

Profilierung Tausender Einzelkomponenten

Auf der Suche nach Erkenntnisgewinn und Erklärung möglicher genetischer und ernährungsbedingter Zusammenhänge arbeiten Forscher mithilfe der Metabolit-Profilierung daran, insbesondere in Blut, Urin oder in anderen Körperflüssigkeiten Biomarker zu identifizieren, die Aufschluss geben können über die im Körper ablaufenden Stoffwechselprozesse. Eingesetzt werden hierbei in aller Regel anspruchsvolle, hinreichend aussagekräftige Analysetechniken wie die Massenspektrometrie, oft in Verbindung mit der Gaschromatographie oder der Hochleistungsflüssigchromatographie (GC/MS, LC/MS).

Metabolomics nur automatisiert sinnvoll

Um einen wissenschaftlichen Beleg (Evidenz) für eventuell ausgeprägte krankheitsmodifizierende Effekte zu erhalten, braucht es umfangreiche, verlässliche Datenmengen: Metabolomics-Studien gehen nicht selten mit der Bestimmung Hunderter bis Tausender Einzelkomponenten in

Zur Qualitätskontrolle wurden in jeder Sequenz auch QC-Proben mit definiertem Gehalt an Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) analysiert. Der Tabelle zu entnehmen sind die Mittelwerte der Gehalte in Prozent, wobei n die Zahl der Sequenzen angibt, SD die Standardabweichung und % CV den prozentualen Variationskoeffizient. Die Auswertung zeigt die sehr gute Langzeitstabilität und -reproduzierbarkeit der Systeme. [1]

Monat	DHA			EPA		
	Mittelwert	SD	% CV	Mittelwert	SD	% CV
1 (n = 36)	2,14	0,06	2,60	0,46	0,02	4,22
2 (n = 36)	2,14	0,06	2,66	0,46	0,01	2,22
3 (n = 38)	2,13	0,06	3,02	0,47	0,03	7,28
4 (n = 38)	2,15	0,08	3,58	0,47	0,04	9,16
5 (n = 37)	2,16	0,06	2,66	0,47	0,03	7,13
6 (n = 38)	2,15	0,05	2,47	0,48	0,04	8,46
7 (n = 38)	2,16	0,04	1,78	0,47	0,03	6,54
8 (n = 38)	2,15	0,07	3,23	0,47	0,02	5,30
9 (n = 38)	2,15	0,06	2,71	0,46	0,03	6,90
10 (n = 38)	2,17	0,05	2,55	0,46	0,03	6,31
Vergleich der Mittelwerte	P = 0,062			P = 0,064		

sehr großen Probensätzen einher. Allein die große Zahl an Proben und Analyten in einem überschaubaren Zeitraum zu untersuchen, stellt eine Herausforderung dar. Obendrein gilt es, Rahmenbedingungen zu schaffen, die zuverlässig reproduzierbar richtige Resultate gewährleisten. Diesem Anspruch gerecht werde man nur schwer durch Handarbeit, sei sie auch noch so solide, sind Experten überzeugt und setzen bei der Metabolomics-Forschung auf ein Maximum an Automatisierung. Etwa Laura Yun Wang und Kollegen vom Elsie Widdowson Laboratory sowie dem Institute of Metabolic Science im englischen Cambridge.

In ihrer online auf *Genome Medicine* frei zugänglich (Open Access) publizierten Arbeit, berichten Laura Yun Wang et al. über ihre Entwicklung und Validierung einer robusten, vollständig automatisierten Methode zur Bestimmung von Phospholipid-gebundenen Fettsäuren aus menschlichem Blutplasma zwecks metabolischer Phänotypisierung im Rahmen einer groß angelegten epidemiologischen Studie mit einem Probensatz von $n > 25.000$ [1,2]. Deutlich legen die Wissenschaftler dar, wo sie die Schwierigkeiten der klassischen, in weiten Teilen manuellen beziehungsweise lediglich teilautomatisierten Analytik sehen und wie sie die für die Methode re-

levanten Arbeitsschritte vollständig automatisiert und auf Tauglichkeit überprüft haben.

Herausforderung Probenvorbereitung

Im großen Stil ließen sich ernährungsrelatierte Biomarker im Rahmen epidemiologischer Studien jedoch nur dann nutzen, wenn man sie hinreichend schnell, kostengünstig, auf robuste Weise und genau bestimmen könne, schreiben Laura Yun Wang et al. Für die Profilierung der Fettsäuren der Phospholipid-Fraktion im Humanplasma bedarf es einer Vielzahl unterschiedlicher Arbeitsschritte. Die Lipide sind in Gänze aus dem Plasma vermittels einer Festphasenextraktion (SPE) zu extrahieren, daraus wiederum die Phospholipide, die ihrerseits in freie Fettsäuren und flüchtige Fettsäuremethylester (FAME) umzuwandeln und mittels GC/FID zu analysieren sind. Mit dieser Methode lassen sich unterschiedliche geometrische Isomere spezieller Fettsäuren, namentlich unter anderem *cis*- und *trans*-Ölsäuren, in einem GC-Lauf in akzeptabler Zeit bestimmen, schreiben die Wissenschaftler.

Von Hand ausgeführt würden diese doch sehr komplexen Arbeitsschritte viel Zeit in Anspruch nehmen und überdies anfällig sein für Fehler, bringen es Laura Yun Wang et al. auf den Punkt. Wie der Literatur zu entnehmen gewesen sei, hätten mehrere Arbeitsgruppen bereits Methoden zur automatisierten Profilierung von Fettsäuren aus menschlichem Plasma entwickelt. Zwar sei in den von ihnen gesichteten Arbeiten von einem hohen Probendurchsatz die Rede gewesen, nie aber von einer vollständigen Automatisierung der gesamten Analytik, einschließlich der Extraktion der Phospholipid-Fraktion oder der Hydrolyse und Derivatisierung der freien Fettsäuren, sowie von großen Probensätzen für epidemiologische Studien. Dieses Ziel wurde nun von Laura Yun Wang und Kollegen nach eigenen Angaben erreicht.

Alle Arbeitsschritte vollständig automatisiert

Unter Einsatz dreier kombinierter Automatisierungssysteme sei es ihnen gelungen, schreiben die Wissenschaftler, mit hohem Probendurchsatz die Fettsäuren aus der im Humanplasma enthaltenen Phospholipid-Fraktion im Rahmen epidemiologischer Studien zwecks Aufklärung genetischer und ernährungsspezifischer Zusammenhänge bei der Entwicklung von Diabetes (Typ II) hinreichend reproduzierbar zu bestimmen, und zwar mit über einen langen Zeitraum stabilen Resultaten.

Jedes der drei Automatisierungssysteme bestand aus jeweils zwei unabhängig voneinander arbeitenden Multi-PurposeSamplern (GERSTEL-MPS). Einer der beiden Autosampler war mit der Möglichkeit zur automatisierten Festphasenextraktion (GERSTEL-SPE) und einer integrierten Zentrifuge ausgestattet und diente als allein stehende Workstation für die automatisierte Extraktion und Aufreinigung der Lipidfraktion. Der zweite MPS saß dem GC/MS-System auf und führte die Probenvorbereitung,



GERSTEL-MultiPurposeSampler (MPS), in unterschiedlichen Ausführungen als Single-Rail und Dual-Head-Version (vergleichbar dem Dual-Rail-Sampler) verfügbar, wie er von Laura Yun Wang et al. zur automatisierten Bestimmung von Phospholipid-Fettsäuren aus menschlichem Blutplasma eingesetzt wurde.

Foto: GERSTEL / Wolfram Schroll

also die Schritte der Hydrolyse und Derivatisierung der FAME zu Fettsäuremethylestern, sowie die Injektion der Probe in den online gekoppelten GC 7890 N von Agilent Technologies aus.

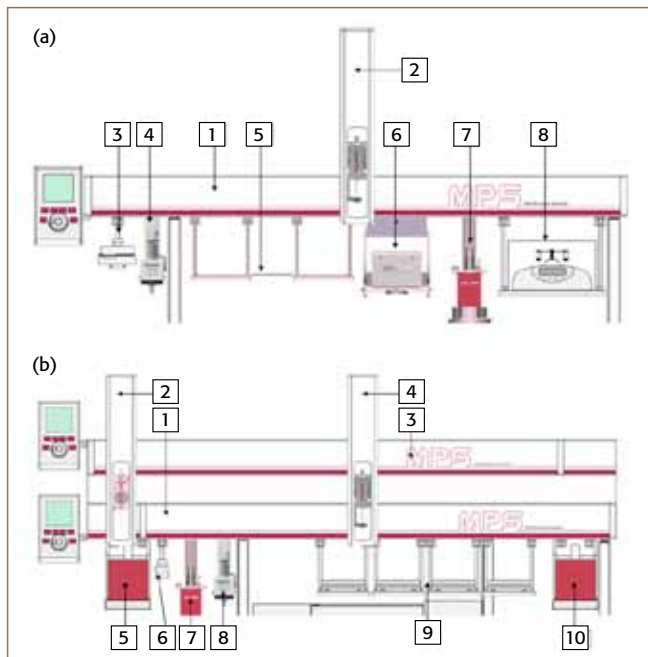
Bei der Wahl des zweiten Autosamplers legten Laura Yun Wang et al. Wert auf Funktionalität: Der MPS in der Ausführung als Dual-Rail- beziehungsweise Dual-Head-Variante verfügt über zwei unabhängig voneinander und in alle drei Raumrichtungen agierende Arme, die zeitgleich unterschiedliche Werkzeuge beziehungsweise unterschiedlich dimensionierte Spritzen einsetzen können, wie sie im Zuge weitreichender Probenvorbereitungsschritte einschließlich der Dosierung großvolumiger Flüssigkeitsmengen sowie zur Injektion der Probe im μL -Maßstab in ein angeschlossenes GC-System vonnöten sind. Wichtig für die hohe Güte und Reproduzierbarkeit der Resultate ist die sequenzielle Abarbeitung der Proben: Jede Probe wird erst unmittelbar vor der Analyse bearbeitet; alle Proben erfahren die exakt gleiche Behandlung in exakt der gleichen Zeit. Diese Tatsache und die Möglichkeit einer umfangreichen benutzerfreundlichen Softwaresteuerung erlauben eine reibungslose Probenvorbereitung und Analyse ohne Eingreifen des Laborpersonals.

Was am Ende zu sagen übrig bleibt

Die Bestimmung eines großen Probensatzes, wie ihn Laura Yun Wang und Kollegen im Rahmen des EPIC-InterAct-Projekts (siehe Kasten u. l.) bezüglich der Bestimmung von Phospholipid-Fettsäuren aus menschlichem Blutplasma zwecks metabolischer Phänotypisierung zu bearbeiten hatten, dauert auch unter günstigsten Bedingungen, wie sie eine intelligente Automatisierung schafft, mehrere Monate. Die drei von den Wissenschaftlern eingesetzten Probenvorbereitungs- und Analysensysteme liefern selbst über solch große Zeiträume geräteunabhängig gut reproduzierbare, verlässliche und stabile Ergebnisse.

Im direkten Vergleich mit der manuellen Vorgehensweise habe die automatisierte Bestimmung unter Einsatz der MultiPurposeSampler (MPS) überzeugt, berichten Wang et al. Etwa durch die Reduktion der sonst üblichen Bearbeitungs- und Analysenzeit: Manuell ließen sich maximal 350 Proben pro Monat analysieren, umgerechnet 4.200 Proben pro Jahr. Die Automatisierung der Analytik unter Einsatz des MPS, wie er in ihrer Arbeit beschrieben sei, habe hingegen zu einem Durchsatz von 90 Proben pro Tag geführt. Pro Monat habe man 1.200 Proben analysiert, in zwei Jahren 860 Sequenzen mit einer Probenzahl von > 25.000 . [1]

Die von ihnen beschriebene Methode [1] besitze eine gute Reproduzierbarkeit, schreiben Laura Yun Wang et al., und Langzeitstabilität für die Bestimmung von Fettsäuren in Plasmaphospholipiden sowohl im Rahmen epidemiologischer Forschungsstudien als auch in der Routineanalytik. Obendrein ließe sich ihre Methode leicht adaptieren für die Untersuchung anderer Matrices wie Zellextrakte, Gewebehomogenate und Nahrungsmittelproben.



MultiPurposeSampler (MPS)-Systeme zur automatisierten Probenvorbereitung und Derivatisierung von Fettsäuren der Phospholipidfraktion aus Humanplasma. (a) MPS-Single-Rail für die Extraktion der Phospholipidfraktion, ausgestattet mit: 1) Festphasenextraktion [SPE-Option]; 2) Spritzenhalter; 3) Salzlösungsreservoir; 4) Lösungsmittelreservoirs; 5) Drei-Positionen-Tray-Halter; 6) SPE-Kartuschen-Fach; 7) SPE / Eindampfen; 8) Vortex / Zentrifuge. (b) MPS-Dual-Rail-Dual-Head für die Hydrolyse, Derivatisierung und Injektion von Phospholipiden. 1) Derivatisierungseinheit; 2) Derivatisierungsspritzenhalter; 3) Injektionseinheit; 4) Injektionsspritzenhalter; 5) beheizte Zone; 6) Waschflaschen; 7) SPE / Eindampfen; 8) Lösungsmittelreservoirs; 9) Vier-Positionen-Tray-Halter; 10) Rührwerk. [1]

Quellen

- [1] Laura Yun Wang, Keith Summerhill, Carmen Rodriguez-Canas, Ian Mather, Pinal Patel, Michael Eiden, Stephen Young, Nita G. Forouhi, and Albert Koulman, Development and validation of a robust automated analysis of plasma phospholipid fatty acids for metabolic phenotyping of large epidemiological studies, *Genome Medicine* 5 (2013) 39, doi: 10.1186/gm443
- [2] N. G. Forouhi, F. Imamura S. J. Sharp, A. Koulman, M. B. Schulze, J. Zheng, Z. Ye, I. Sluijs, M. Guevara, J. M. Huerta, J. Kröger, L. Y. Wang, K. Summerhill, J. L. Griffin, E. J. Feskens, A. Affret, P. Amiano, H. Boeing, C. Dow, G. Fagherazzi, P. W. Franks, C. Gonzalez, R. Kaaks, T. J. Key, K. T. Khaw, T. Kühn, L. M. Mortensen, P. M. Nilsson, K. Overvad, V. Pala, D. Palli, S. Panico, J. R. Quirós, M. Rodriguez-Barranco, O. Rolandsson, C. Sacerdote, A. Scalbert, N. Slimani, A. M. Spijkerman, A. Tjonneland, M. J. Tormo, R. Tumino, D. L. van der A, Y. T. van der Schouw, C. Langenberg, E. Riboli, N. J. Wareham, Association of Plasma Phospholipid n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids with Type 2 Diabetes: The EPIC-InterAct Case-Cohort Study, *Genome Medicine* 13 (2016) e1002094; doi: 10.1371/journal.pmed.1002094

InterAct

InterAct ist ein 2006 gestartetes EU-Projekt. Es zielt darauf ab, die Zusammenhänge genetischer Veranlagung und der Lebensumstände, vor allem der Ernährungsgewohnheiten, zu untersuchen. InterAct will aufklären, welche Faktoren Diabetes (Typ II) begünstigen. Das Projekt umfasst eine epidemiologische Untersuchung (EPIC-Study) mit insgesamt 350.000 Studienteilnehmern aus zehn Ländern. Weitere Infos: www.inter-act.eu