ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΗΜΙ-ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ

Αντώνης Μυριδάκης, Julien Chilloux, Isabel Garcia Perez και Marc-Emmanuel Dumas
Division of Integrative Systems Medicine and Digestive Disease, Department of Surgery and Cancer, Faculty of Medicine, Imperial College London, Exhibition Road, South Kensington, London SW7 2AZ, UK
e-mail: a.myridakis@imperial.ac.uk

Περίληψη

Η μεταβολομική ανάλυση (metabolomics) αποτελεί ένα από τα ραγδαίως αναπτυσσόμενα πεδία της συστημικής βιολογίας. Οι προσεγγίσεις με χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS) συνδυάζουν την ευρεία κάλυψη των μη-στοχευμένων τεχνικών με τη γρήγορη και απλή ταυτοποίηση των μεταβολιτών με τη χρήση βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας-χρόνων κατακράτησης.

Αναπτύχθηκε μια ολιστική μέθοδος, καλύπτοντας όλα τα στάδια από την αρχική προετοιμασία των δειγμάτων μέχρι και την επεξεργασία /αξιολόγηση των δεδομένων. Βελτιστοποιήθηκαν μια σειρά σταδίων-κλειδιών της μεθόδου. Για την επεξεργασία/καθαρισμό των βιολογικών δειγμάτων, συγκρίθηκαν τεχνικές υγρής-υγρής εκχύλισης και κατακρήμνισης πρωτεϊνών/ λιπιδίων. Βελτιστοποιήθηκε η εισαγωγή του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο όπως και η λειτουργία του αυτόματου δειγματολήπτη για τον περιορισμό της επιμόλυνσης από δείγμα σε δείγμα (carryover). Συγκρίθηκαν μια σειρά πακέτων λογισμικού για την αποτελεσματικότητά τους στην η ανίχνευση, ταυτοποίηση και ολοκλήρωση των χρωματογραφικών κορυφών. Ιδιαίτερο βάρος δόθηκε στη στρατηγική ελέγχου ποιότητας της ανάλυσης όσον αφορά στη γραμμικότητα, ανιχνευσιμότητα και επαναληψιμότητα των αναλυτών, το φιλτράρισμα αυτών με κορεσμένο σήμα και των προερχόμενων από επιμολύνσεις, τον έλεγχο και διόρθωση των φαινομένων παρτίδας (batch effect), σειράς ανάλυσης (run order effect) και μεταβολής της ευαισθησίας του οργάνου (instrument drift).

Τέλος, η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία σε μια σειρά από μήτρες δειγμάτων (ούρα/πλάσμα/ορός/κόπρανα/περικαρδιακό υγρό/καρδιακός ιστός από ανθρώπους και πειραματόζωα, κυτταροκαλλιέργειες κτλ.) και καταδείχθηκε η καταλληλόλητα της μεθόδου για μοριακές επιδημιολογικές μελέτες μεγάλης κλίμακας με την ανάλυση πάνω από τριών χιλιάδων (3000) δειγμάτων.

Λέξεις-Κλειδιά: μεταβολομική ανάλυση, αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας, συστημική βιολογία, ανάπτυξη μεθόδου.

Abstract

Metabolomics is one of the most fast-growing fields in systems biology. Gas chromatography−mass spectrometry (GC-MS) approaches combine the coverage of the untargeted pipelines, with the library-facilitated, rapid metabolite identification, based on both mass spectra and retention times.

A new holistic and high-throughput GC-MS profiling protocol was developed, covering from sample aliquoting to the generation of the final assigned metabolite/intensity table. A series of key-steps of the method were optimized. Regarding sample preparation/clean-up, liquid-liquid extraction and protein precipitation techniques were compared. Sample injection and autosampler settings were optimized as well, in order to maximize the signal without compromising robustness and to eliminate carry-over, respectively. Several software packages were tested as well for the detection, identification and integration of the chromatographic peaks.

We compared several sample clean-up techniques and conditions, optimized the chromatography and tested several commercial and in-house software packages for the data extraction and preprocessing. Special focus was given on the quality control strategy, and more specifically, on linearity, detectability, reproducibility, tracing saturated signals and contaminations, batch effects, run order effects and instrument drifts.
Finally, the method was validated and applied in urine, plasma, serum, fecal, pericardial fluid and cardiac tissue samples from human and mice and for cell and cell culture media. Over three thousand (3000) samples have been analyzed, showing the applicability of the method for large scale-molecular epidemiological studies.

Key-words: metabolomics, GC-MS, systems biology, method development.

Αντώνης Μυριδάκης, Julien Chilloux, Isabel Garcia Perez και Marc-Emmanuel Dumas, Imperial College London

Ανάπτυξη και εφαρμογή ημι-στοχευμένης μεθόδου μεταβολομικής ανάλυσης με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας για μοριακές επιδημιολογικές μελέτες μεγάλης κλίμακας
7ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας
Αθήνα, 11-12 Μαΐου 2018

1. Εισαγωγή

Η σχέση μεταξύ μεταβολισμού και παθογένεσης διάφορων ασθενειών είναι καλά τεμηριωμένη (Holmes et al. 2012, Le Chatelier et al. 2013, Pedersen et al. 2016) όπως και η μεταβολομική ανάλυση, η συστηματική μελέτη ενός μοναδικού μεταβολικού προφίλ ενός κυττάρου, ιστού, οργάνου ή οργανισμού είναι επίσης πολύ καλά χαρακτηρισμένη Johnson et al. (2016). Οι πιο ευρέως διαδεδομένες τεχνικές αποτύπωσης ενός μεταβολικού προφίλ είναι η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) (Garcia et al. 2011, Zhou et al. 2012) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού Larive at al. (2015). Γενικά, η NMR δίνει πιο επαναλήψιμα και σταθερά αποτελέσματα ενώ απαιτεί και ελάχιστη επεξεργασία των δειγμάτων. Η MS είναι πολύ πιο ευαίσθητη σαν τεχνική και δίνει πολύ χαμηλότερα όρια ανίχνευσης. Επίσης, η διακριτική ικανότητας της MS αυξάνεται ιδιαίτερα με τη διασύνδεση της είτε με υγρή (Liquid Chromatography, LC) ή αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) Dumas et al. (2014). Οι LC-MS προσεγγίσεις δεν απαιτούν παραγωγοποίηση των πολικών μεταβολιτών και ανιχνεύουν πολύ μεγάλους αριθμούς αναλυτών, αλλά, η δομική ταυτοποίηση είναι πού χρονοβόρα, δύσκολη και πολλές φορές αδύνατη. Αντιθέτως, οι GC-MS προσεγγίσεις πρσφέρουν το μεγαλο πλεονέκτημα της δυνατότητας χρήσης βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας-χρόνων κατακράτησης, ανοίγοντας προοπτικές ημι-στοχευμένων μεθόδων Fiehn (2016). Η χρήση αυτών των βιβλιοθηκών επιτρέπει την ταχύτατη και σχεδόν αυτοματοποιημένη δομική ταυτοποίηση των μεταβολιτών. Παρότι, έχουν δημοσιευθεί πολλά άρθρα στην παγκόσμια βιβλιογραφία όσον αφορά μελέτες και πρωτόκολλα βασισμένα σε GC-MS μεταβολομικές αναλύσεις Mastrangelo et al. (2015), δεν υπάρχει μια πλήρης, αναλυτική, υψηλής διεκπεραιωτικής ικανότητας (high throughput) μεθοδολογία από την προεπεξεργασία των δειγμάτων στην ανάλυση-επεξεργασία των αποτελεσμάτων για μεταβολομικές μελέτες μεγάλης κλίμακας.

Στην παρούσα μελέτη , παρουσιάζουμε ένα αναλυτικό πρωτόκολλο για την επεξεργασία των δειγμάτων, την ανάλυση τους με GC-MS και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, δίνοντας βάρος σε σημεία κλειδιά της μεθόδους τα οποία περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων, I) τον καθαρισμό των βιολογικών δειγμάτων II) την ολοκλήρωση των χρωματογραφικών κορυφών, III) την επέκταση των εμπορικά διαθέσιμων βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας-χρόνων κατακράτησης, IV) τον ποιοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων) και V) την εξάλειψη των φαινόμενων παρτίδας (batch effect), σειράς ανάλυσης (run order effect) και μεταβολής της ευαισθησίας του οργάνου (instrument drift). Τέλος, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε πάνω από 3000 βιολογικά δείγματα προερχόμενα από μια σειρά από μήτρες (ούρα/πλάσμα/ορός/κόπρανα/περικαρδιακό υγρό/καρδιακός ιστός από ανθρώπους και πειραματόζωα, κυτταροκαλλιέργειες κτλ.) και καταδείχθηκε η καταλληλόλητα της μεθόδου για μοριακές επιδημιολογικές μελέτες μεγάλης κλίμακας.

2. Μεθοδολογία

Τα βιολογικά δείγματα εμβολιάζονται με ισοτοπικά επισημασμένα εσωτερικά πρότυπα. Τα δείγματα ούρων επεξεργάζονται περεταίρω με ουρεάση (*Canavalia ensiformis*) για την απομάκρυνση της ουρίας. Δοκιμάστηκαν οκτώ (8) διαφορετικά πρωτόκολλα για τον καταρισμό των δειγμάτων: τέσσερα (4) βασισμένα σε τεχνικές υγρής-υγρής εκχύλισης και

τέσσερα (4) σε τεχνικές κατακρήμνισης πρωτεϊνών/λιπιδίων. Οι μεταβολίτες αρχικά παραγωγοποιήθηκαν με μεθοξυ-αμίνη (methoxy-amine, MOX) και στη συνέχεια με N-μέθυλο-τριμέθυλσίλυλο-τριφθοροακεταμίδιο (N-methyl-trimethylsilyl-trifluoroacetamide, MSTFA). Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν σε ένα Agilent 7890B-5977C single quadrupole GC-MS σύστημα. Εφαρμόστηκαν και συγκρίθηκαν σειρά λογισμικών, είτε εμπορικά διαθέσιμων είτε αναπετυγμένων από την ομάδα μας, για την εξαγωγή, επεξεργασία και ανάλυση των μεταβολομικών δεδομένων ενώ η δομική ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με τη βιβλιοθήκη Fiehn.

3. Αποτελέσματα

Η κατακρήμνιση πρωτεϊνών/λιπιδίων με κρύα μεθανόλη αποδείχθηκε η πιο αποτελεσματική τεχνική καθαρισμού και επέδειξε την ευρύτερη μεταβολική κάλυψη, προφέροντας παράλληλα ένα σχετικά σύντομο χρόνο συμπύκνωσης μέχρι ξηρού των δειγμάτων. Η ανίχνευση και ολοκλήρωση των χρωματογραφικών κορυφών με τη χρήση του λογισμικού Gavin, Behrends et al. (2011) επέδειξε σημαντικά ακριβέστερη ολοκλήρωση των κορυφών σε σχέση με τα πακέτα AMDIS/MPP, υπερτερώντας στα ακόλουθα σημεία, I)την ελαχιστοποίηση των ψευδώς θετικών (false positive) και ψευδώς αρνητικών (false negative) αποτελεσμάτων, II) την ολοκλήρωση του θορύβου σε περίπτωση μη ύπαρξης ανιχνεύσιμης κορυφής, γεγονός που βοηθάει ιδιαίτερα στην επακόλουθη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, III) τη δυνατότητα για οπτική αναπαράσταση και έλεγχο των ολοκληρώσεων, και τέλος, IV) τη δυνατότητα χρήσης εναλλακτικών λιγότερο ευαίσθητων/άφθονων ιόντων για την ολοκλήρωση κορεσμένων κορυφών. Επιπρόσθετα, βρίσκεται σε εξέλιξη η επέκταση της βιβλιοθήκης Fiehn (φάσματα μάζας και χρόνοι κατακράτησης για περισσότερους από οκτακόσιους (800) μεταβολίτες) με μια συλλογή προτύπων ενώσεων για περισσότερους από πεντακόσιους (500) ενδογενείς μεταβολίτες. Αξιολογήθηκαν μια σειρά αναλυτικών χαρακτηριστικών της μεθόδου, και πιο συγκεκριμένα, η επαναληψιμότητα, η γραμμικότητα, τα επίπεδα επιμολύνσεων, τα φαινόμενα παρτίδας (batch effects), σειράς ανάλυσης (run order effect) και μεταβολής της ευαισθησίας του οργάνου (instrument drift) και ανάλογα με την εκάστοτε μελέτη, εντοπίστηκαν και βελτιστοποιήθηκαν με τη χρήση ανάλογων αλγορίθμων, Muhammad et al. (2012). Τέλος, αναπτύχθηκε μια στρατηγική προσέγγισης και χειρισμού μεγάλων σε έκταση μελετών, όσον αφορά στην καθημερινή οργάνωση των αναλύσεων και στην συντήρηση των οργάνων, με σκοπό να μεγιστοποιηθεί η παραγωγικότητα της μεθόδου, διατηρώντας παράλληλα υψηλή ποιότητα αποτελέσματων. Η μέθοδος έχει ήδη εφαρμοστεί σε περισσότερα από τρεις χιλιάδες (3000) δείγματα και ανιχνεύοντας στις περισσότερες μήτρες, περισσότερους από εκατό (100) μεταβολίτες, που πληρούν τα αναλυτικά κριτήρια ποιότητας.

4. Συμπεράσματα – Πρόταση

ΟΙ στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη και διακρίβωση ενός αναλυτικού πρωτόκολλου και στη συνέχεια ενός πρωτόκολλου εξαγωγης και επεξεργασίας των ληφθέντων δεδομένων, για μεταβολομική ανάλυση υψηλής παραγωγικότητας με χρήση GC-MS και εφαρμογή του σε μοριακές επιδημιολογικές μελέτες μεγάλης κλίμακας. Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε, καλύπτει στο έπακρο όλους τους παραπάνω στόχους και περιλαμβάνει από την αρχική προεπεξεργασία των βιολογικών δειγμάτων, στην δημιουργία

του τελικού πίνακα ταυτοποιημένων μεταβολιτών.

5. Βιβλιογραφία

Behrends V, Tredwell GD and Bundy JG., "A software complement to AMDIS for processing GC-MS metabolomic data", Anal Biochem, 415, p.p. 206-208, 2011.

Dumas, M. E., Kinross, J. and Nicholson, J. K., "Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease", Gastroenterology, 146(1), p.p. 46-62, 2014.

Fiehn, O., "Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling", Curr Protoc Mol Biol, 114, p.p. 30 34 31-30 34 32, 2016.

Garcia, A. and Barbas, C., "Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics", Methods Mol Biol. 708, p.p. 191-204, 2011.

Holmes, E., Li, J. V., Marchesi, J. R. and Nicholson, J. K., "Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk", Cell Metab, 16(5), p.p. 559-564, 2012.

Johnson, C. H., Ivanisevic, J. and Siuzdak, G., "Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms", Nat Rev Mol Cell Biol, 17(7), p.p. 451-459, 2016.

Larive, C. K., Barding, G. A., Jr., and Dinges, M. M. "NMR spectroscopy for metabolomics and metabolic profiling", Anal Chem, 87(1), p.p. 133-146, 2015.

Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., . . . Pedersen, O, "Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers", Nature, 500(7464), p.p. 541-546, 2013.

Mastrangelo, A., Ferrarini, A., Rey-Stolle, F., Garcia, A. and Barbas, C., "From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS", Anal Chim Acta, 900, p.p. 21-35, 2015.

Muhammad, A. K., Ebbels, T. M. D., Spagou, K., Masson, P. and Want, E. J., "Optimizing the Use of Quality Control Samples for Signal Drift Correction in Large-Scale Urine Metabolic Profiling Studies", Anal Chem, 84(6), p.p. 2670–2677, 2012.

Pedersen, H. K., Gudmundsdottir, V., Nielsen, H. B., Hyotylainen, T., Nielsen, T., Jensen, B. A., . . . Pedersen, O., "Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity", Nature, 535(7612), p.p. 376-381, 2016.

Zhou, B., Xiao, J. F. and Tuli, L., Ressom, H. W., "LC-MS-based metabolomics", Mol Biosyst, 8 (2), p.p. 470-481, 2012.