

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138666> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Laan, T. van der

Title: High-throughput quantification and unambiguous identification for metabolomics

Issue Date: 2020-12-14

Addendum

Nederlandse Samenvatting

Curriculum Vitae

Acknowledgements

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Metabolomics is het onderzoeksveld dat zich richt op de analyse van kleine moleculen in een biologisch systeem. Deze kleine moleculen worden metabolieten genoemd en omvatten bijvoorbeeld aminozuren, vetzuren, suikers, hormonen en vitamines. Het metaboloom is de verzameling van alle metabolieten in een biologisch systeem en het zo goed mogelijk meten van het metaboloom is het hoofddoel van metabolomics.

Metabolietenconcentraties worden beïnvloed door een groot aantal chemische processen die zijn onder te verdelen in genetische factoren en omgevingsfactoren. Deze combinatie van factoren zorgt ervoor dat het metaboloom een goede weerspiegeling geeft van het fenotype van een biologisch systeem. Dit fenotype is specifiek voor elk persoon en kan daarom van grote toegevoegde waarde zijn voor gepersonaliseerde gezondheidszorg. Buiten de medische hoek worden metabolieten metingen ook toegepast in de voedselindustrie. Metabolietenprofielen kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt voor het begrijpen van eigenschappen van voedselproducten, zoals voedingswaarde en smaak.

Metabolietenprofielen worden voornamelijk verkregen door massa spectrometrie (MS) en nucleaire magnetische resonantiespectroscopie (NMR). Deze technieken worden gebruikt voor het beantwoorden van de twee belangrijkste vragen in metabolomics: wat is de hoeveelheid van een metaboliet en wat is de identiteit van een metaboliet in een biologisch monster. Ondanks de ontwikkeling van hoog-geavanceerde analytische apparatuur, is de analyse van metabolieten onderhevig aan een aantal analytische uitdagingen. De grootste uitdaging bij MS-analyses is het optreden van matrix effect in complexe monsters. Matrix effect treedt op wanneer meerdere moleculen tegelijkertijd worden geïntroduceerd in de MS, waardoor ze met elkaar in competitie gaan voor het verkrijgen van een lading. Het verkrijgen van een lading wordt ook wel ionisatie genoemd en is nodig om gemeten te kunnen worden in de MS. Sommige metabolieten verliezen deze competitie, waardoor het signaal van deze metabolieten onderdrukt kan worden en onder de detectiegrens kan vallen. Daarnaast is de samenstelling van monsters niet altijd gelijk, waardoor de ladingcompetitie verandert en dus ook de herhaalbaarheid van de analyses verminderd wordt. Bij NMR-analyses vormen voornamelijk het gebrek aan gevoeligheid van de metingen en signaaloverlap de grootste problematiek.

In dit proefschrift tackelen wij de grootste uitdagingen van MS en NMR door middel van een fractioneringsaanpak. Het verdelen van een monster over fracties zorgt ervoor dat de complexiteit wordt verminderd voordat de analyse plaatsvindt. Dit zorgt aan de ene kant voor minder matrix effect tijdens de MS-analyse. Hierdoor kan er sneller gemeten worden omdat tijdrovende chromatografische scheidingen niet meer nodig zijn. Daarnaast kan de kwaliteit van NMR spectra drastisch worden verhoogd door het fractioneren van een complex monster omdat er minder

signaaloverlap optreed en de fracties kunnen worden geconcentreerd. Het onderzoek van dit proefschrift is uitgevoerd in het MI3 consortium en gefinancierd door COAST/NWO.

In **hoofdstuk 2** hebben wij een methode ontwikkeld waarmee matrix effect snel kan worden verminderd door middel van een onconventioneel gebruik van vloeistofchromatografie (LC). Het doel was in dit geval niet om analieten te scheiden maar om beruchte matrix componenten te binden. Tijdens de analyse van vijf potentiële biomarkers voor hart- en vaatziekten, zagen wij dat fosfolipiden de voornaamste bron waren voor signaalonderdrukking. Daarom maakten wij gebruik van een reversed phase kolom voor het binden van de (fosfo)lipiden, waardoor de polaire potentiële biomarkers in een schone flow-through konden worden gemeten. De analysetijd kon drastisch worden verlaagd omdat de analieten geen retentie ondervonden op de LC-kolom en de (fosfo)lipiden vervolgens snel van de LC-kolom konden worden geëluëerd door snelle gradiëntwisselingen. De vloeistofstroom van de eluerende (fosfo)lipiden werd naar een afvalvat gestuurd zodat de ionisatiebron van de MS minder vervuild werd. De snelle LC-MS methode verwijderde de signaalsuppressie die was veroorzaakt door de fosfolipiden in een analyse tijd van slechts drie minuten.

Hoofdstuk 2 toonde aan dat, naast fosfolipiden, ook zouten een belangrijke bron van signaalsuppressie zijn. Daarom hebben wij de fractioneringsaanpak van **hoofdstuk 2** uitgebreid met twee extra kolommen in **hoofdstuk 3**. De extra kolommen waren samengesteld uit een kationen- en anionenwisselaar. De combinatie van een reversed phase kolom en de ionwisselaars zorgde voor een fractionering die was gebaseerd op polariteit en lading. Hierdoor was het mogelijk om het aantal analieten uit te breiden naar vijftig bekende prognostische en diagnostische biomarker metabolieten. In deze methode konden wij geen fracties verwijderen omdat de analieten een veel breder chemisch bereik omvatten. Hierdoor was het doel van de fractionering om de bekende signaalonderdrukkers te verspreiden over verschillende fracties zodat hun negatieve effect tijdens de ionisatie kon worden geminimaliseerd. Het gebruik van drie in serie geschakelde kolommen zorgde hiervoor door fosfolipiden, positieve en negatieve zouten te verspreiden over verschillende fracties. De korte analysetijd van het fractioneringsplatform van **hoofdstuk 3** werd bereikt door het snel schakelen van mobiele fasen en het gebruik van korte kolommen (≤ 1 cm). Dit resulteerde in een analysetijd van drie minuten per MS polariteit. Bovenop de scheiding tussen fracties zorgde het gebruik van hoogwaardige vastefase-extractie kolommen (deeltjesgrootte ≤ 5 μm) voor een scheiding binnen de fracties. Hierdoor werden fosfolipiden van acylcarnitines en vetzuren gescheiden in dezelfde fractie. Het voordeel van fractioneren werd benadrukt door het vergelijk met een directe injectie in de MS en met LC-MS. In vergelijking met een directe injectie in de MS werd de signaalonderdrukking verminderd van 89% naar 25%. Daarnaast was de gevoeligheid van het fractioneringsplatform vergelijkbaar aan conventionele

LC-MS analyses. LC-MS analyses zijn doorgaans specifiek ontwikkeld voor een bepaalde stofklasse en de scheiding duurt aanzienlijk langer (3-22 minuten per monster). Wij laten zien dat fractionering het mogelijk maakt om meerdere stofklassen snel en in één platform te meten met een vergelijkbare gevoeligheid als LC-MS.

In **hoofdstuk 4** hebben wij een platform ontwikkeld dat zowel de kwantificatie als de identificatie van metabolieten mogelijk maakt. Om dit te bewerkstelligen hebben wij een MS techniek gebruikt die fragmentatiedata verkrijgt van alle stoffen in een meting. Deze techniek heet sequential window acquisition of all theoretical mass spectra (SWATH). Informatie over de fragmentatie van stoffen is van groot belang bij het bepalen van de structuurformule van onbekende stoffen. Daarnaast kan fragmentatie data gebruikt worden om stoffen met dezelfde massa, isomeren, van elkaar te onderscheiden. SWATH maakt het mogelijk om fragmentatie data van alle stoffen in een monster te verkrijgen op een selectieve manier. De massa's van de analieten worden in de massa spectrometer verdeeld in verschillende pakketten en vervolgens gefragmenteerd. De indeling van deze pakketten kan worden bepaald door een vast massabereik per pakket (vaste SWATH) of een variabel massabereik dat zorg voor een evenredige verdeling van de analieten per pakket (variabele SWATH). Wij hebben laten zien dat variabele SWATH in combinatie met een conventionele chromatografische scheiding leidde tot correcte identificaties en accurate kwantificaties. Unieke fragmentatiepatronen konden worden bepaald voor de onderzochte isomeren, wat resulteerde in de accurate kwantificatie van vijf isomerenparen. Daarnaast hebben wij 20 vooraf bekende metabolieten kunnen identificeren met behulp van de vaste en variabele SWATH data. De fragmentatie data konden worden gebruikt om de 20 metabolieten terug te vinden in een MS spectra bibliotheek.

De betrouwbaarheid van de identificatie van onbekende metabolieten neemt aanzienlijk toe wanneer deze wordt uitgevoerd door twee complementaire technieken. Daarom hebben wij in **hoofdstuk 5** een identificatiemethode ontwikkeld met behulp van MS en NMR. Hiervoor hebben wij het probleem van signaaloverlap in NMR spectra en de lage gevoeligheid van NMR metingen aangepakt door middel van een fractioneringsmethode. Eendimensionale chromatografie wordt vaak gebruikt om onbekende stoffen te zuiveren voordat de NMR analyse plaatsvindt. Onze resultaten laten echter zien dat er nog veel vervuilingen aanwezig zijn in de fracties van een eendimensionale scheiding. Deze vervuilingen kunnen signaaloverlap veroorzaken met de onbekende stoffen en zo een juiste identificatie voorkomen. In onze identificatiemethode hebben wij gebruik gemaakt van een tweedimensionale scheiding om de fracties schoner te krijgen. Ten eerste werd achterhaald welke vervuilingen er nog aanwezig waren in de fracties. Daarna werd bekeken welke tweede dimensie chromatografie het meest geschikt was om deze vervuilingen te scheiden van de onbekende stof. Vervolgens werd deze scheiding gebruikt voor het verder

zuiveren van de onbekende stoffen. Dit resulteerde in fracties die geconcentreerd en puur genoeg waren voor het verkrijgen van zuivere NMR spectra.

Metabolomics wordt steeds vaker toegepast in de gezondheidszorg, voedselindustrie en vele andere sectoren. Het succes van metabolomics is voor een groot deel te danken aan goede analytische methodes die zorgen voor de identificatie en kwantificering van metabolieten in biologische monsters. MS en NMR hebben in het verleden bewezen erg krachtig te zijn in het verkrijgen van kwalitatieve en kwantitatieve data van metabolieten. Er zijn, echter, een aantal uitdagingen waardoor het potentieel van deze technieken niet volledig benut kan worden. Wij hebben deze uitdagingen aangepakt door middel van fractionering. Het fractioneren van biologische monsters stelde ons in staat om snelle MS metingen uit te voeren en zuivere NMR spectra te verkrijgen. Deze methodes lieten zien dat voor de ontwikkeling van een goede analytische methode, kennis over de matrix componenten net zo belangrijk is als kennis over de analieten. Wij verwachten dat fractionering in combinatie met MS en/of NMR zal zorgen voor een snel analysesysteem, dat kan worden gebruikt voor zowel de selectieve identificatie als de accurate kwantificatie van het metabool. Zo'n algemeen meetsysteem zal de analyse van grootschalige metabolomics onderzoeken faciliteren en de impact van metabolomics op levenswetenschappen versterken.