

# Opravdu kompletní řešení pro metabolomiku a integrovanou biologii od Agilent Technologies

Metabolomika je jedna z „omik“ (podobně jako *proteomika* nebo *genomika*) věnující se identifikaci a kvantifikaci všech malých molekul (metabolitů) přítomných v buňkách nebo tkáních živých organismů, tvořících tzv. metabolom. Změny v metabolomu mohou korelovat například se studovanou nemocí a rozdílové metabolity potom představují tzv. biomarkery, které lze použít pro diagnostiku nemoci nebo pro vývoj nových farmak k efektivní léčbě těchto onemocnění. Kromě klinického výzkumu nachází metabolomika uplatnění i v mnoha dalších oblastech jako je farmaceutický průmysl, zemědělství, potravinářství, zkoumání vlivu životního prostředí na organismy (tzv. *environmental metabolomics*) nebo v toxikologii.

Metabolity jsou extrémně různorodá skupina látek od polárních aminokyselin, organických kyselin, sacharidů nebo alkoholů až po velmi nepolární látky, jako jsou některé pigmenty, steroidní hormony, nebo lipidy. Neexistuje žádná technika, která umožňuje stanovit všechny metabolity najednou, takže v metabolomice nachází uplatnění celá řada separačních technik ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Zde nabízí Agilent Technologies nejširší portfolio na trhu, od spojení hmotnostní spektrometrie s kapilární elektroforézou (CE/MS, viz článek *ChromAtoMol 3, str. 23*), přes kapalinovou chromatografii (HPLC), až po superkritickou fluidní chromatografii (SFC) a samozřejmě plynovou chromatografii (GC).

Kromě separace a detekce polárních i li-

pořilných metabolitů hraje v metabolomice důležitou roli softwarové zpracování dat a zasazení výsledků do biologického kontextu, tj. identifikace metabolických cest, které byly nějakým způsobem ovlivněné. V metabolomice existují dva hlavní přístupy, které se mohou vzájemně doplňovat: necílená metabolomika a cílená metabolomika.

## Necílená metabolomika (*discovery metabolomics*)

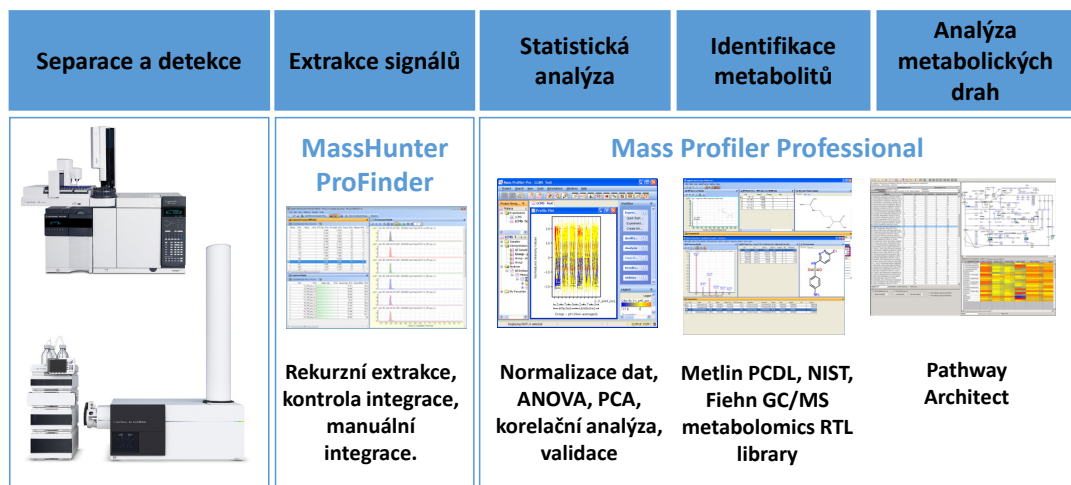
Necílená metabolomika se využívá pro hledání nových metabolitů/biomarkerů, které jsou u sledovaného organismu ovlivněny nemocí, novým léčivem apod. Z toho důvodu se zjišťují rozdíly v profilu všech metabolitů mezi testovanými a kontrolními vzorky. Celý postup od akvizice dat až po získání výsledků je znázorněn na **Obrázku 1**. Vzhledem k tomu, že není dopředu známo, jaké analyty jsou pro nás důležité, je nutno využívat instrumentaci vhodnou pro necílenou analýzu. Zde se uplatňují hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením a určením přesné hmoty (TOF, QTOF), které umožňují necílené hledání sloučenin ve vzorku a jejich kvalitní identifikaci.

Jeden z hlavních a nejdůležitějších kroků v necílové metabolomice představuje extrakce chemických signálů – látek (tzv. *peak picking* nebo *feature finding*, o kterém jsme psali v minulém čísle *ChromAtoMol* u necílené analýzy (viz článek *ChromAtoMol 3, str. 29*).

- **Metabolom:** souhrn všech metabolitů, které jsou v živém organismu přítomny za daných podmínek.
- **Rekurzní extrakce:** Při necílené extrakci píků/látek z MS dat je vždy potřeba nastavit nejnižší signál, který nás zajímá (threshold). Často však dojde k tomu, že z některých vzorků nelze signál molekuly získat, protože je slabý a je pod nastavenou úrovní. Chybějící signály pak způsobují problémy v následné statistické analýze. Rekurzní extrakce spočívá v tom, že ze všech látek nalezených napříč všemi vzorky se vytvoří seznam, který je cíleně prohledáván, ale v tomto případě už s nulovým thresholdem. Tímto způsobem se eliminují falešně negativní nálezy a také je dosaženo lepšího statistického vyhodnocení díky absenci nulových signálů.
- **Metlin PCDL pro metabolomiku:** Offline verze internetové metabolomické knihovny, kterou jako jediná firma nabízí Agilent Technologies. Obě verze, webová i offline obsahují produktová spektra 9400 metabolitů získaná za standardizovaných podmínek na LC/QTOF MS Agilent Technologies.

**Obrázek 1**

Postup pro necílenou metabolomiku pomocí nástrojů Agilent Technologies: Po akvizici dat (LC/MS nebo GC/MS) následuje necílová extrakce signálů v software MassHunter ProFinder, statistická analýza, identifikace metabolitů pomocí knihoven a interpretace dat v biologických procesech. LC/MS a GC/MS data mohou být analyzována dohromady ve stejném software a stejném projektu.



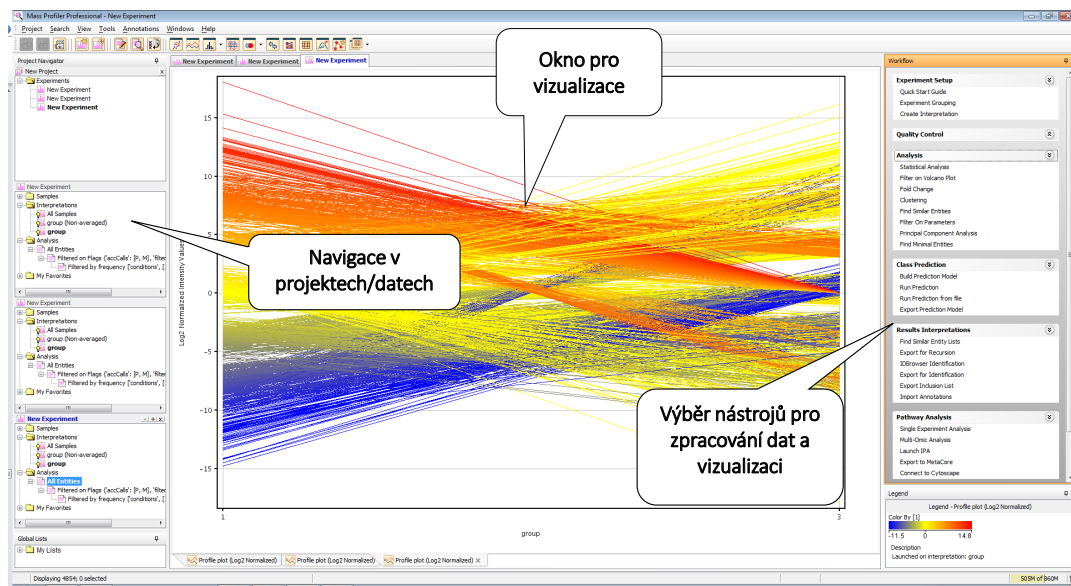
V tomto kroku je nezbytné získat z naměřených dat co nejvíce reálných metabolitů a naopak minimalizovat extrakci náhodného šumu. Protože metabolomické studie obvykle pracují se spoustou vzorků z několika skupin, aby bylo možné pokrýt biologickou variabilitu (často studie zahrnují stovky vzorků), vyvinul Agilent Technologies pro extrakci chemických signálů specializovaný program **Mass Hunter ProFinder**, který umožňuje zpracování LC (CE, SFC)/MS i GC/MS dat, včetně rekurzní extrakce, manuální kontroly/úpravy integrace píků a zarovnání dat podle m/z a retenčního času. Díky tomu je dosaženo maximální kvality vstupních dat pro statistickou analýzu.

Dalším krokem je samotná statistická analýza,

jejímž cílem je výběr signálů/látek, které jsou mezi sledovanými skupinami významně odlišné. I když statistická analýza spousty analytických chemiků upřímně děsí, základní diferenční analýza je poměrně jednoduchá a software **Mass Profiler Professional (MPP)**, obsahuje i průvodce, který nováčky celým postupem provede krok za krokem. MPP je primárně určený pro chemiky, kteří ke své práci potřebují statistickou analýzu hmotnostně-spektrometrických dat, nabízí ale i řadu pokročilých testů z multivariační analýzy, vizualizace dat, tvorby a validace statistických modelů. **Obrázek 2** znázorňuje uživatelské rozhraní software Mass Profiler Professional (MPP).

**Obrázek 2**

Ukázka obrazovky software Mass Profiler Professional, který je zaměřen na statistickou analýzu hmotnostně-spektrometrických dat.



### Věděli jste, že?

- Knihovna Metlin pro metabolomiku je v systémech Agilent dostupná jako místní kopie bez nutnosti vyhledávání na webu
- Obsahuje produktová spektra pro 9400 látek
- Produktová spektra v internetové knihovně Metlin jsou naměřena na Agilent LC/MS QTOF

Získané rozdílové metabolity je potom nezbytné identifikovat, aby mohly být namapovány na biologické dráhy. **MPP** umožňuje pro všechny metabolity, nebo pro ty vybrané na základě statistické analýzy, vypočítat sumární vzorec a také využívá k identifikaci všechny knihovny spekter, dostupné pro hmotnostní spektrometry Agilent. Pro účely metabolomiky je to především LC/MS knihovna **Metlin**<sup>1</sup>, **NIST** a **GC/MS metabolická knihovna** vyvinutá Oliverem Fiehnem. Vše je velmi jednoduché, protože celý proces probíhá v jednom software, data se nemusí nikam přesouvat a je možné celý postup automatizovat.

Posledním krokem je zasazení výsledků do biologického kontextu, tedy zjištění, které metabolické dráhy jsou ve sledovaném organismu ovlivněny. Pro tento účel obsahuje MPP modul označovaný jako **Pathway Architect**, který komunikuje s databázemi metabolických drah (např. WikiPathway, BioCyc nebo KEGG).

Celý princip spočívá v tom, že jsou identifikovány metabolické dráhy, ve kterých se vyskytují zjištěné regulované metabolity. I když se proces mapování metabolitů na biologické dráhy může zdát jako poměrně jednoduchý, ve skutečnosti je pro funkční řešení nutné

překonat jeden nečekaný problém: různé databáze – ať už biologických drah nebo spektrální knihovny – mohou označovat stejnou chemickou látku různými jmény, případně obsahují několik různých záznamů, které se týkají stejného metabolitu. Například *Human Metabolite Database* (HMDB) obsahuje 23 různých označení pro D-glukózu. Řešením tohoto problému je „překladač“, který umí propojit záznamy týkající se stejné látky mezi jednotlivými databázemi. Tento překladač se jmenuje **Agilent-BridgeDB** a i když pracuje na pozadí **Pathway Architect** a není vidět, je srdcem celého systému.

## Cílená metabolomika

Cílená metabolomika, jak už vyplývá z názvu, se zaměřuje na sledování vybraných metabolických drah. Cílem je obvykle přesná kvantifikace prekurzorů a produktů, takže se vedle hmotnostních spektrometrů typu QTOF využívají i trojitě kvadrupóly (QQQ). Cílená metabolomika se často používá pro validaci výsledků získaných necílenou metabolomikou, tedy k potvrzení relevance nalezených biomarkerů na větším počtu vzorků.

## Multi-omická analýza – integrovaná biologie

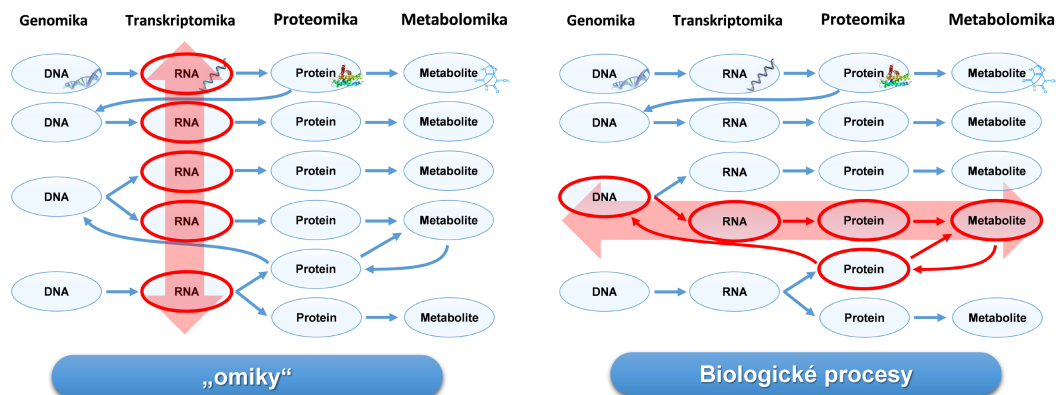
Omics přístupy využívají data z analýzy malých molekul (**metabolomika**), proteinů (**proteomika**) a genomu (**genomika**, **transkriptomika**) pro studium živých systémů. Výsledky těchto dílčích studií se často realizují samostatně a postrádají celkový pohled na biologický proces, který zdaleka není přímý od DNA, přes RNA k proteinu, případně metabolitu (**Obrázek 3**).

Kombinací dvou, nebo i více typů omických přístupů lze dosáhnout lepšího oddělení skutečně biologicky relevantních markerů – signálů – od těch, které sice mají dostatečnou statistickou významnost (liší se mezi skupinami vzorků), ale ve skutečnosti nesouvisí se sledovaným dějem. Například analýza kompletního genomu často vede k detekci milionů „single-nukleotide variant“ (SNV), a zjistit, která změna je klíčová pro rozvoj onemocnění, je nesmírně obtížné. V případě, že se na stejných vzorcích provedou také proteomické nebo metabolické experimenty, lze získaná data navázat na metabolické dráhy a zjistit „průnik“ všech těchto experimentů. Tím lze do značné míry odfiltrout náhodné vlivy v každém experimentu a potažmo tak zvýšit odstup signálu (relevantní informace) od šumu (náhodné signály) pro omické experimenty<sup>2</sup>.

Agilent Technologies má unikátní pozici v tom, že ve svém portfoliu zahrnuje nástroje pro genomiku, transkriptomiku, proteomiku i metabolomiku. Nabízí zároveň řešení, jak jejich výstupy kombinovat a interpretovat v kontextu biologických systémů. Tímto řešením je propojení software **GeneSpring** (transkriptomika) a **Mass Profiler Professional** pomocí modulu **Pathway Architect**. Ten umožňuje, podobně jako v případě metabolomiky, mapovat na biologické dráhy i proteiny, které danou dráhu katalyzují, případně geny, které nesou informaci o daném enzymu. GeneSpring a Mass Profiler Professional ve spojení s Pathway Architect tedy představují platformu, kde se setkávají molekulární biologové s (bio)chemiky.

Multi-omická analýza s využitím bioinformatického software Agilent Technologies byla využita v řadě studií. Příkladem může být studium vlivu radioaktivního záření na semena rýže ve Fukushimašské prefektuře<sup>3</sup>, výzkum retinoblastomu (zhoubný nádor oka)<sup>4</sup> nebo glioblastomu (GBM), nejčastějšího primárního nádoru mozku<sup>5</sup>.

**Obrázek 3**  
Znázornění principu „omics“ studií vs. biologických procesů



V tomto případě je důležitá možnost importovat nově změřená data do dříve vytvořeného statistického modelu a využít je pro potvrzení biomarkeru. Do MPP lze importovat nejen kvalitativní data z přístrojů QTOF, ale i kvantitativní data získaná ať již na QTOF nebo na QQQ systémech. Pro cílenou metabolomiku však existuje i softwarový nástroj **Pathway-to-PCDL**, který pro vybrané metabolické cesty (například navržené při experimentu necílené metabolomiky), sestaví databázi všech látek, které se v těchto dráhách vyskytují. Taková databáze je potom využitelná pro cílenou, a tedy mnohem citlivější extrakci píků těchto látek, které by jinak necíleným přístupem nebyly detekovány.

### Závěr

Metabolomika je populární a rychle se rozvíjející disciplína, která má potenciál přinést unikátní objevy v biologii, klinickém výzkumu, vývoji léčiv apod. Principy, postupy a softwarové nástroje využívané pro metabolické studie jsou navíc použitelné i ve spoustě dalších oborů jako je analýza potravin, analýza životního prostředí a zemědělství. Klíčem k úspěchu necílené metabolomiky je získání maximálního množství kvalitních informací ze vzorku. Vzhledem k širokému spektru polarit metabolitů je nezbytné použít paralelně několik separačních technik, čímž se však vzorek frakcionuje a ztrácíme komplexní pohled. Metabolické řešení firmy Agilent založené na platformě **Mass Profiler Professional** je unikátní tím, že umožňuje v rámci jedné studie integrovat data z různých separačních technik (LC, CE, GC) ve spojení s různými typy hmotnostních analyzátorů (QQQ, TOF, QTOF), ale i data získaná z dalších přístupů (genomika, proteomika). Lze tak získat kompletní obrázek o celém vzorku, nikoli o pouhé frakci metabolitů, které daná technika umožňuje separovat a detekovat.

**Ondřej Lacina**

[ondrej.lacina@hpst.cz](mailto:ondrej.lacina@hpst.cz)

**Jitka Zrostlíková**

[jitka.zrostlikova@hpst.cz](mailto:jitka.zrostlikova@hpst.cz)

### Literatura:

1. Scripps Center for Metabolomics. . [online]. [cit. 2016-12-13]. Dostupné z: <https://metlin.scripps.edu/index.php>
2. Pathways to Insight. 2015(5991-0222EN).
3. HAYASHI, G. et al., A Multi-omic Approach to Reveal the Effect of Low-level Gamma Radiation on Rice Seeds. *Agilent Application Note*. 2016, (5991-6416EN).
4. NILANJAN, G. et al., Integrated Transcriptomics and Metabolomics Study of Retinoblastoma Using Agilent Microarrays and LC/MS/GC/MS Platforms. *Agilent Application Note*. 2015, (5991-6215EN).
5. DURAIRAJ, R. et al., Molecular Subtypes in Glioblastoma Multiforme: Integrated Analysis Using Agilent GeneSpring and Mass Profiler Professional Multi-Omics Software. *Agilent Application Note*. 2016, (5991-5505EN).