

## Hochdurchsatzscreening

# Shotgun Lipidomics in der biomedizinischen und klinischen Forschung

CHRISTIAN KLOSE<sup>1</sup>, ÜNAL COSKUN<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup> LIPOTYPE GMBH, DRESDEN

<sup>2</sup> PAUL-LANGERHANS-INSTITUT DRESDEN DES HELMHOLTZ-ZENTRUMS MÜNCHEN AM UNIVERSITÄTSKLINIKUM DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DRESDEN

<sup>3</sup> DEUTSCHES ZENTRUM FÜR DIABETESFORSCHUNG E. V. (DZD), NEUHERBERG

Shotgun lipidomics is the comprehensive and quantitative analysis of the lipid composition of biological and clinical samples. Here we describe the application and performance of the Lipotype shotgun lipidomics technology in clinical high throughput screening projects for the identification of disease-specific lipid patterns as well as in organ-wide analysis aiming at the systemic understanding of lipid-related physiological processes.

DOI: 10.1007/s12268-016-0739-3  
© Springer-Verlag 2016

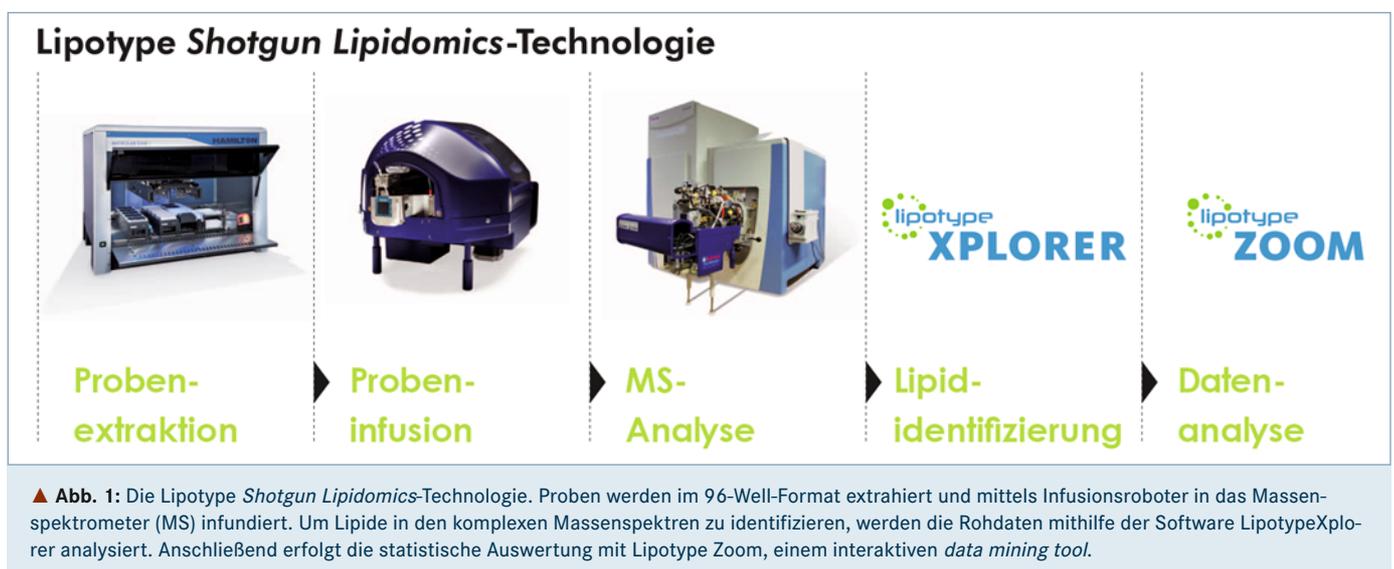
■ Lipide sind eine besondere Gruppe unter den biologischen Molekülen: Sie erfüllen sowohl strukturelle als auch metabolische Funktionen. In Form von Triglyceriden und Cholesterinestern dienen sie als Energiereserve der Zellen (intrazellulär als Lipidtröpfchen oder als Lipoproteine im Blut). Als Hauptbestandteile biologischer Membranen üben Glycerophospholipide, Sphingolipide und Cholesterin wiederum strukturelle

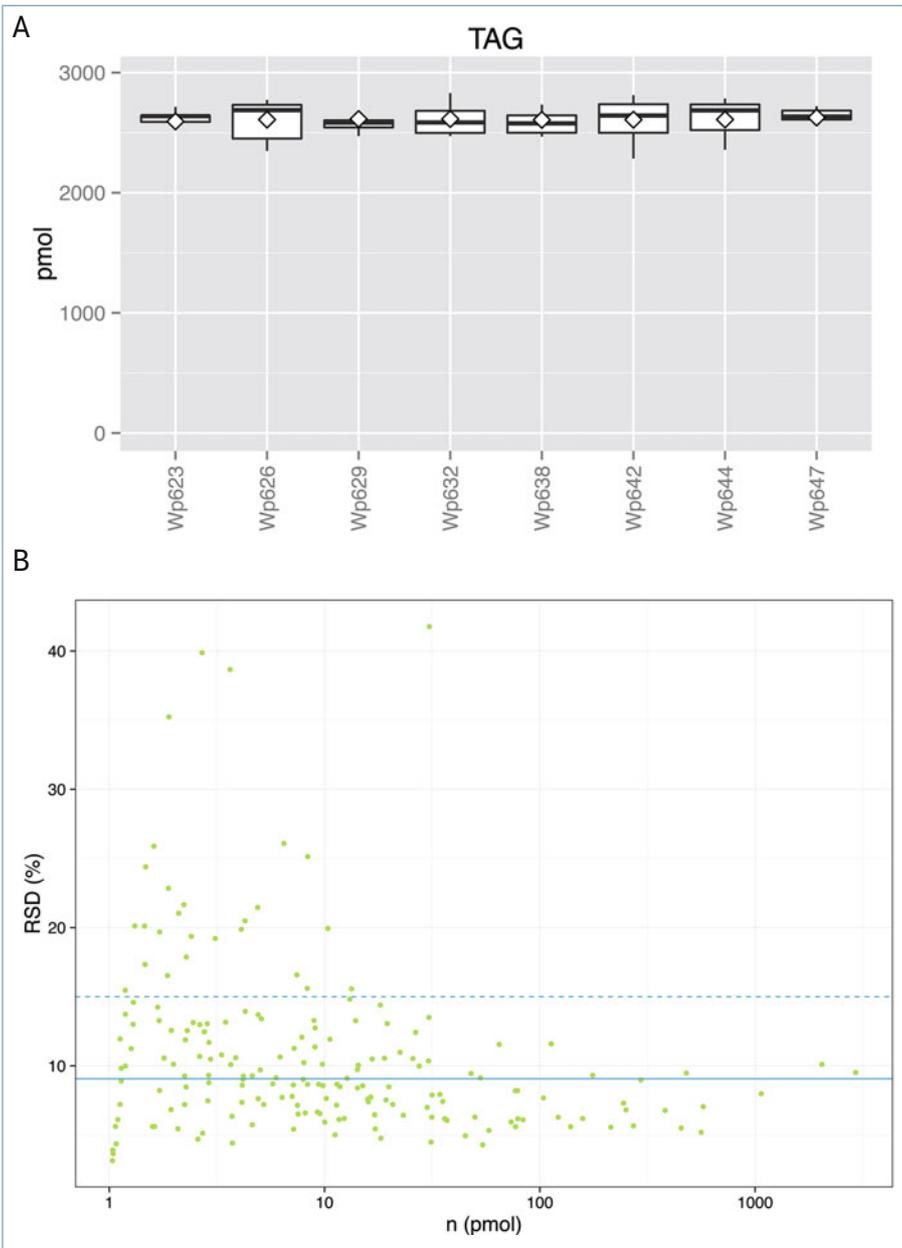
Aufgaben aus. Ihr Zusammenwirken mit Membranproteinen und dem Zytoskelett erlaubt es Zellen, sich von ihrer Umwelt abzugrenzen und intrazelluläre Organellen (z. B. Mitochondrien und den Golgi-Apparat) überhaupt erst zu ermöglichen. Lipide fungieren auch als spezifische Marker auf Zelloberflächen oder sind direkt in Signaltransduktionsprozesse, z. B. als *second messenger*, involviert.

Des Weiteren regulieren Membranlipide und spezifische Lipid-Protein-Interaktionen die Funktion von Rezeptoren, wie z. B. den EGF-Rezeptor [1, 2], aber auch Prozesse der Immunantwort [3, 4]. In der klinischen Thematik finden sich Störungen im Lipidmetabolismus wieder, so z. B. im Diabetes Typ 2, bei Alzheimer und Adipositas [5–7]. Aus diesen vielfältigen Funktionen ergibt sich die Notwendigkeit zur strengen Regulation des Lipidmetabolismus und somit der Lipidzusammensetzung zellulärer Membranen.

### Shotgun Lipidomics

Zur verständlichen Analyse der Lipidzusammensetzung verschiedener Zellen, Gewebe, Organe und Körperflüssigkeiten sowie von deren vielfältigen Lipid-assoziierten Prozessen sind drei Bedingungen unabdingbar: die absolute Quantifizierung zum Zwecke der Standardisierung, ein großer dynamischer Bereich und die damit einhergehende Sensitivität sowie ein hoher Probendurchsatz. Diese Kriterien werden durch das massenspektrometriebasierte *Shotgun Lipidomics*-Verfahren erfüllt [8]. Die Lipotype GmbH hat ein Hochdurchsatzverfahren entwickelt, mit dem aktuell bis zu 200 Proben pro Tag analysiert werden können (**Abb. 1**). Dazu werden die





▲ **Abb. 2:** Technische Reproduzierbarkeit der *Shotgun Lipidomics*-Technologie. **A,** Die analytische Qualität der Messungen wird im Hochdurchsatz mithilfe von Referenzproben bestimmt. Im hier gezeigten Beispiel wurde der Triglyceridgehalt (TAG) in Pikomol für acht Referenzproben je Lauf (Well-Platte, insgesamt acht Läufe bzw. Well-Platten) bestimmt. Mit einer technischen Varianz (relative Standardabweichung, RSD) von unter 15 Prozent sind die Messungen über acht Läufe hinweg sehr reproduzierbar. **B,** Gezeigt wird die technische Varianz (relative Standardabweichung, RSD) in Abhängigkeit von der Lipidmenge. Im Median beträgt die technische Varianz neun Prozent (volle Linie). 86 Prozent aller Lipide weisen eine technische Varianz von unter 15 Prozent auf (gestrichelte Linie;  $n = 64$ ).

Proben im 96-Well-Format mithilfe eines Pipettierroboters (Hamilton Robotics) extrahiert und anschließend per Nano-Elektrospray-Ionisierung (TriVersa Nanomate, Advion) in das Massenspektrometer (Q-Exactive, Thermo Scientific) infundiert. Die Zugabe lipidklassenspezifischer interner Standards ermöglicht die quantitative Analyse. Die so generierten Massenspektren werden

mithilfe einer proprietären Softwarelösung (LipotypeXplorer) analysiert und die Lipide identifiziert. Anschließend erfolgt die statistische Auswertung der Daten durch Signifikanztests und multivariate Analysemethoden mit einem interaktiven *data mining tool* (LipotypeZoom). Mit der *Shotgun Lipidomics*-Technologie können Hunderte Lipide verschiedenster Klassen quantitativ, mit hoher

Sensitivität (im submikromolaren Bereich) und geringer technischer Varianz (unter zehn Prozent) aus geringen Probenmengen (z. B. ein Mikroliter Blutplasma oder 60.000 HeLa-Zellen) im Hochdurchsatz erfasst werden.

### **Shotgun Lipidomics in der biomedizinischen und klinischen Forschung**

Das Forschungsfeld der Membranbiologie und Biochemie ist seit mehreren Jahren im besonderen Fokus der Lebenswissenschaften und der biomedizinischen Forschung. Warum synthetisieren Zellen mehrere 1.000 Lipidspezies, wenn nur eine genügt, um eine Membran zu bilden? Was ist die Konsequenz dieser physikochemischen Vielfalt, insbesondere in Bezug auf zelluläre Eigenschaften und Lipid-Protein-Interaktionen? Beeinflusst die Fettquelle unserer Nahrung die Lipidzusammensetzung unserer Zellen und Organe? Gibt es spezifische Lipidsignaturen im gesunden wie auch im kranken Zustand? Dies sind nur einige der vielen Fragen, die sich in den letzten Jahren herauskristallisiert haben.

Die Lipotype GmbH und das Paul-Langerhans-Institut Dresden des Deutschen Zentrums für Diabetesforschung, einem Satelliten-Institut des Helmholtz Zentrums München an der Universitätsklinik Carl Gustav Carus Dresden, konnten konkrete Fragestellungen in der Hochdurchsatzanalyse von klinischen Proben validieren und neue probenspezifische Protokolle zur organweiten Lipidanalytik entwickeln. Diese enge und offene Zusammenarbeit ermöglicht die direkte Translation innovativer Lipidanalytik in die biomedizinische und klinische Forschung.

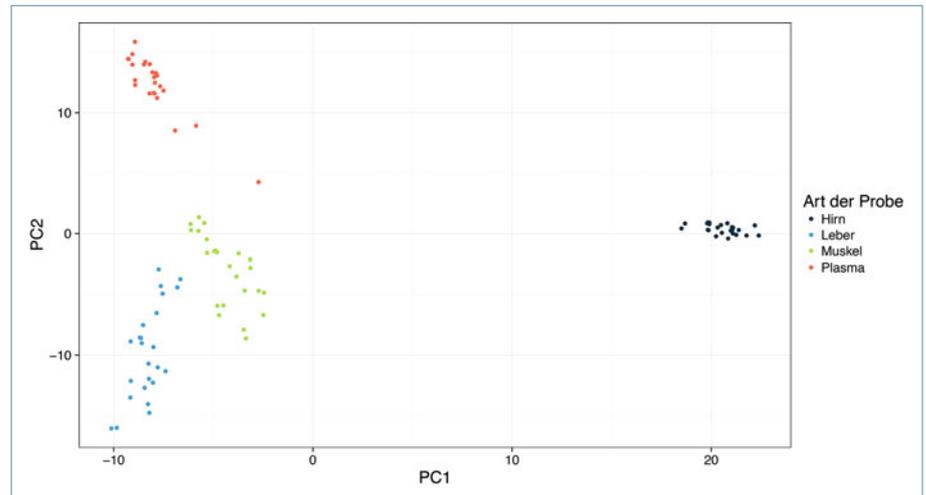
### **Hochdurchsatzscreening klinischer Proben zur Biomarker-Identifizierung**

Humane Serum- oder Plasmaproben sind die gängigsten Matrices bei Biomarker-Screenings für Indikationen wie z. B. Diabetes Typ 2 oder kardiovaskuläre Erkrankungen, aber auch bei ernährungswissenschaftlichen Interventionsstudien. Das Screening bei Lipotype erfolgt im 96-Well-Format und verläuft bei einem Umfang von mehreren 100 bis über 1.000 Proben mit hoher Reproduzierbarkeit über einen Zeitraum von mehreren Tagen bis Wochen. Die einflussreichsten Faktoren hierbei sind Batch-Effekte und analytischer Drift. Batch-Effekte sind geringe aber systematische Unterschiede in den Ergebnissen zwischen analytischen Läufen, die an verschiedenen Tagen und/oder Geräten durchgeführt wur-

den. Das Ausmaß beider Effekte kann mithilfe von Referenzproben bestimmt und, falls nötig, korrigiert werden [9, 10]. Im hier gezeigten Beispiel (**Abb. 2**) wurden 570 Serumproben in acht Läufen an acht aufeinanderfolgenden Tagen analysiert. Zusätzlich wurden 64 Referenzproben vermessen, mit deren Hilfe die technische Varianz bestimmt werden konnte. Nach Batch- und Drift-Korrektur lag die technische Varianz bei neun Prozent für mehr als 50 Prozent der analysierten Lipide. Dieser Wert liegt deutlich unter den üblicherweise angestrebten 15 Prozent und verdeutlicht die Robustheit der *Shotgun Lipidomics*-Technologie – eine wesentliche Voraussetzung für die Identifizierung von Biomarkern.

### Shotgun Lipidomics von Organproben

Auch für Organproben kann das *Shotgun Lipidomics*-Verfahren wertvolle Daten liefern. Dafür werden lediglich wenige 100 Mikrogramm Probenmaterial benötigt. Von großer Bedeutung sind eigens auf die jeweilige Probenart entwickelte Probenbearbeitungs- und Extraktionsprotokolle. Verschiedene Probenarten weisen hochspezifische Lipidmuster auf. Zum Beispiel hat die Analyse von mehr als 100 Proben verschiedener Mausorgane (Hirn, Leber, Muskel) und Mausplasma ergeben, dass ca. 300 von insgesamt 500 Lipiden signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ , ANOVA) zwischen den Organen aufweisen. Das bedeutet, dass jedes Organ eine spezifische Lipidsignatur aufweist (**Abb. 3**). Dies wird noch dadurch verdeutlicht, dass mithilfe statistischer Klassifizierungsmethoden (*support vector machine*) Organproben mit einer Genauigkeit von mehr als 95 Prozent aller Fälle allein anhand des Lipidoms richtig zugeordnet werden können. Dieses Ergebnis bestätigt, dass verschiedene Organe über einen spezifischen Lipidmetabolismus verfügen. Daher wird es in Zukunft wichtig sein, Interventionen pharmakologischer oder genetischer Art, die auf den Lipidstoffwechsel abzielen, im organspezifischen Kontext zu beurteilen, um entsprechende Lipidsignaturen aus



▲ **Abb. 3:** Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) verschiedener Mausproben. Basierend auf der quantitativen Analyse Hunderter Lipidmoleküle mittels *Shotgun Lipidomics* können die aus verschiedenen Organen oder Plasma gewonnenen Proben eindeutig voneinander unterschieden werden. Basierend auf ihrer Lipidzusammensetzung konnten die Proben mit einer Genauigkeit von über 95 Prozent der jeweiligen Probenquelle zugeordnet werden (*support vector machine*, SVM).

Serum oder Plasma spezifisch zuordnen zu können.

### Literatur

- [1] Coskun U, Grzybek M, Drechsel D et al. (2011) Regulation of human EGF receptor by lipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:9044–9048
- [2] Beutel O, Roder F, Birkholz O et al. (2015) Two-dimensional trap for ultrasensitive quantification of transient protein interactions. *ACS Nano* 9:9783–9791
- [3] Köberlin MS, Snijder B, Heinz LX et al. (2015) A conserved circular network of coregulated lipids modulates innate immune responses. *Cell* 162:170–183
- [4] Wang F, Beck-García K, Zorzin C et al. (2016) Inhibition of T cell receptor signaling by cholesterol sulfate, a naturally occurring derivative of membrane cholesterol. *Nat Immunol* 17:844–850
- [5] Rhee EP, Cheng S, Larson MG et al. (2011) Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans. *J Clin Invest* 121:1402–1411
- [6] Mapstone M, Cheema AK, Fiandaca MS et al. (2014) Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat Med* 20:415–418
- [7] Rauschert S, Uhl O, Koletzko B et al. (2016) Lipidomics reveals associations of phospholipids with obesity and insulin resistance in young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 101:871–879
- [8] Surma MA, Herzog R, Vasilj A et al. (2015) An automated shotgun lipidomics platform for high throughput, comprehensive, and quantitative analysis of blood plasma intact lipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 117:1540–1549
- [9] Klose C (2016) Sample Handling and Automation: Drift. In: Wenk RM (Hrsg) *Encyclopedia of Lipidomics*. Springer Netherlands, S 1–2, doi: 10.1007/978-94-007-7864-1\_55-1

- [10] Surma MA, Klose C (2015) Sample Handling and Automation: Quality Control. In: Wenk RM (Hrsg) *Encyclopedia of Lipidomics*. Springer Netherlands, S 1–2, doi: 10.1007/978-94-007-7864-1\_53-1

### Korrespondenzadressen:

Dr. Christian Klose  
Lipotype GmbH  
Tatzberg 47  
D-01307 Dresden  
Tel.: 0351-796-5345  
Fax: 0351-796-5349  
klose@lipotype.com

Dr. Ünal Coskun  
Paul-Langerhans-Institut Dresden des Helmholtz-Zentrums München am Universitätsklinikum der Technischen Universität Dresden  
Fetscherstraße 74  
D-01307 Dresden  
Tel.: 0351-796-5340  
Fax: 0351-796-36699  
coskun@plid.de