

Metabolomets ioniske komponenter bestemt ved kromatografi og massespektrometri

Bestemmelse af pool-størrelser af fosforylerede intracellulære energi- og redoxkomponenter, samt cellens byggesten er vigtig for at afgøre, om metabolismen i cellefabrikker er påvirket af høj produktionsbelastning. Det er afgørende, at kunne evaluere, hvordan forskellige genetiske modifikationer påvirker det intracellulære maskineri.

Af Olivera Magdenoska¹, Daniel Killerup Svenssen¹, Peter Boldsen Knudsen¹, Andrea Thorhallsdottir², Mhairi Workman¹ og Kristian Fog Nielsen¹

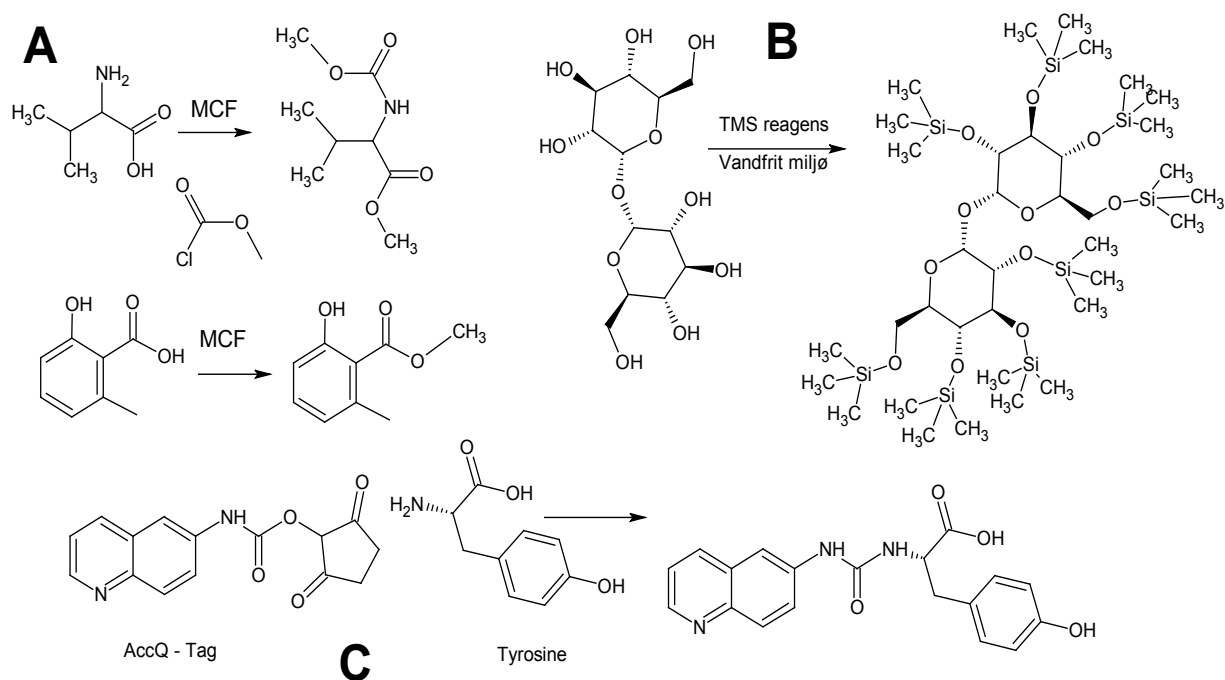
¹Institut for Systembiologi, DTU

²Actavis, Island

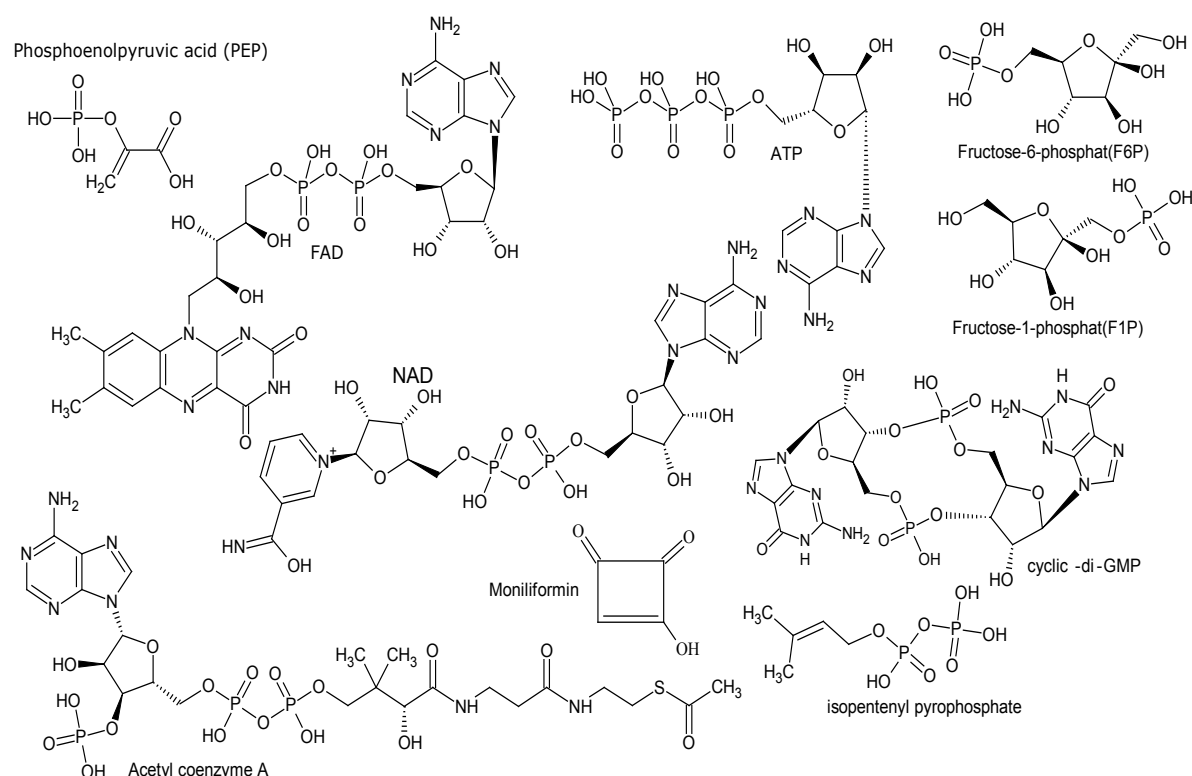
Analyse af de mange intracellulære metabolitter er en udfordrende opgave. Den kan udføres ved en kombination af kromatografi og massespektrometri (MS), mens bestemmelse af hele

det intracellulære metabolom, kræver en kombination af flere analysemetoder.

Aminosyrer og andre organiske syrer kan med fordel analyseres med gaskromatografi-massespektrometri (GC-MS), som derivater med f.eks. chloroformat eller trimethylsilyl (TMS), som figur 1 A og B. Aminosyrer og aminer kan derivatiseres med OPA eller AQC, figur 1 C, og efterfølgende analyseres med HPLC-UV eller mere følsomme metoder så som HPLC-fluorescens eller HPLC-MS.



Figur 1. Derivativering af aminosyre og phenolisk syre med chloroformat (A), silylering af sukker (B), AccQ-Tag derivativering af aminosyre (C).



Figur 2. Eksempler på forskellige nøglemetabolitter i celledrift samt mykotoxinet, moniliformin.

Hovedparten af energimetabolitter (ATP, ADP, GTP etc.), redox co-faktorerne (FAD, NADH, NADP etc.), sukkerfosfater, byggesten til polyketider (acetyl-CoA, malonyl-CoA, etc.), og terpen (isopentenyl og dimethylallyl fosfater), samt byggestene til DNA og RNA, er alle fosforylerede, figur 2. Da GC-MS-analyse ikke er anvendelig til fosforylerede metabolitter (enkelte mono-fosforylerede stoffer kan bestemmes som TMS-derivater), efterlades et kæmpe hul i metabolomanalysen.

Til separation af fosforylerede forbindelser anvendes kapillarelektroforese eller væskkekromatografi før MS-detektion. Vi vælger at satse på en selektion af HPLC/UHPLC-teknikker, da vi har erfaring inden for dette område.

Den primære udfordring med de fosforylerede stoffer er, at de ikke tilbageholdes ved omvendt fase-kromatografi, der ellers er den mest effektive metode mht. peak-kapaciteten og separation af isomerer. Det gælder også, hvis man bruger de mere polære omvendte fase-materialer som phenyl, pentafluorophenyl og biphenyl.

Ionbytning og hydrofil interaktionskromatografi (HILIC) udgør de eneste reelle alternativer til omvendt fase-kromatografi. Begge findes i mange varianter.

I første omgang satte vi på HILIC, da denne teknik udnyttes til svampetoksinet, moniliformin [1] (pKa 0.5, figur 2). HILIC, vandig normalfase kromatografi udnytter det vandlag, der dannes over en polær stationær fase, samt dipol-dipol og ioniske interaktioner med den stationære fase. HILIC-faser fås i mange varianter, fra relativt svage interaktioner som:

- diol- og amid-faser
- til intermediat interaktionskolonner som silica og silica hydrid [2]
- ioniske HILIC-faser som amino-silica og den zwitter-ioniske Zic-Hilic [3].

Specielt amino-silica er attraktivt, da det er muligt at manipulere forholdet mellem NH_2 - og NH_3^+ -grupper på overfladen ved at ændre pH.

Ingen af disse kolonner resulterede i stabile retentionstider, og for en række vigtige analytter var toppene for brede (op til seks min.). Behovet for 50 mM acetat til eluering af de trifosforylerede nucleotider var desuden problematisk, da det krævede hyppig rensning af elektrospaykilderne på vores daværende Waters LC-MS-instrumenter.

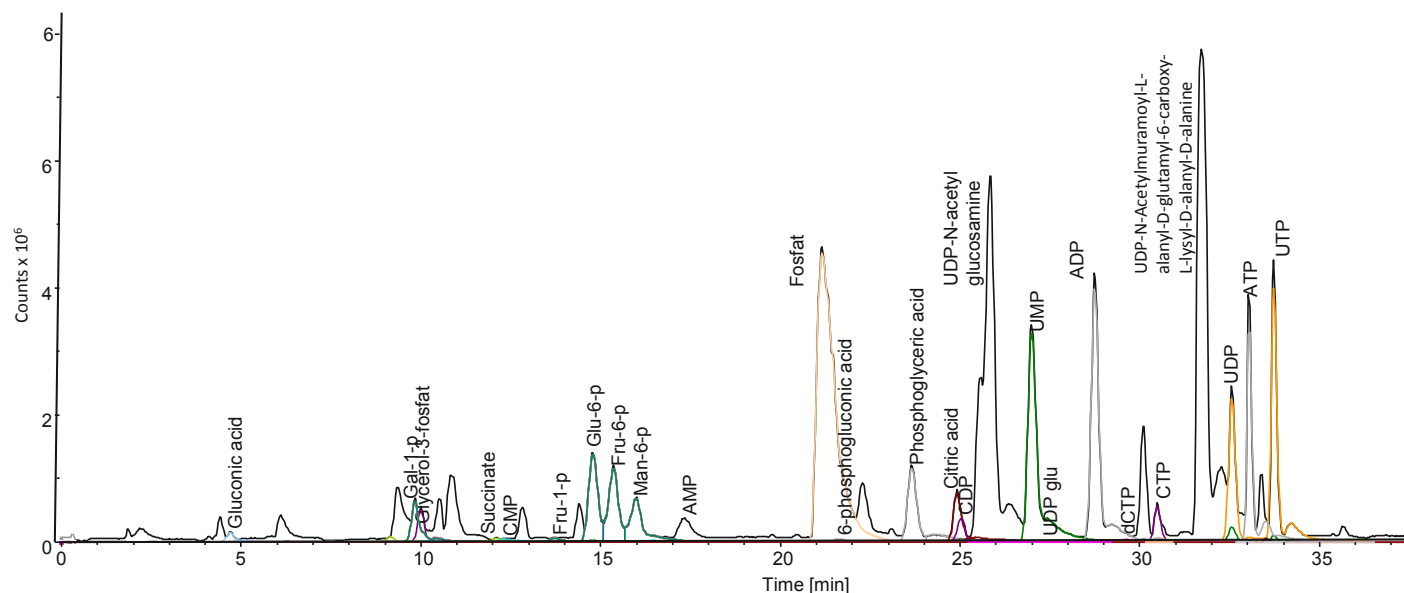
Dertil har HILIC-kolonnerne et begrænset dynamisk område, og det var nødvendigt at anvende ca. 90% acetonitril for at opnå god retention for organiske syrer samt polære ikke-ioniske stoffer. Desværre blev top-bredderne under disse betingelser endnu værre for de di- og tri-fosforylerede stoffer, muligvis pga. udfældning i injektionssystemet.

Klassisk ionbytning med saltgradienter er udelukket, da saltene inden for få minutter blokerer. Derimod er høj-pH ionbytning, også kaldet ionkromatografi (IC) en mulighed, når en suppressor anvendes til fjernelse af K^+ eller Na^+ fra den gradient (typisk 10-100 mM) af NaOH eller KOH, der benyttes til separationen. Metoden er anvendelig til analyse af sukkerfosfater og mange di- og trifosforylerede nucleotider, figur 3, side 10, og med en anden kolonne også sukre og oligosakkarider.

Metoden har den ulempe, at høj-pH labile stoffer, som de vigtige redox co-faktorer, acetyl-, malonyl-CoA'er hydrolyseres, så de ikke kan differentieres. En række andre metabolitter er ikke høj pH-stabile, og vi vælger derfor at satse på ion-par kromatografi til intracellulære metabolitter. IC-MS anvendes dog til sukre samt enkelte fosforylerede og sulfonerede stoffer.

Ion-par kromatografi

Det sidste alternativ er ion-par kromatografi, figur 4, side 10, ►



Figur 3. IC-MS-analyse af *Streptomyces lividans* ekstrakt med (Dionex IC2100 med IonPac®AS11-HC), 1-100 mM NaOH gradient, kombineret med en Bruker maXis G3 Time of Flight MS med ESI- kilde.

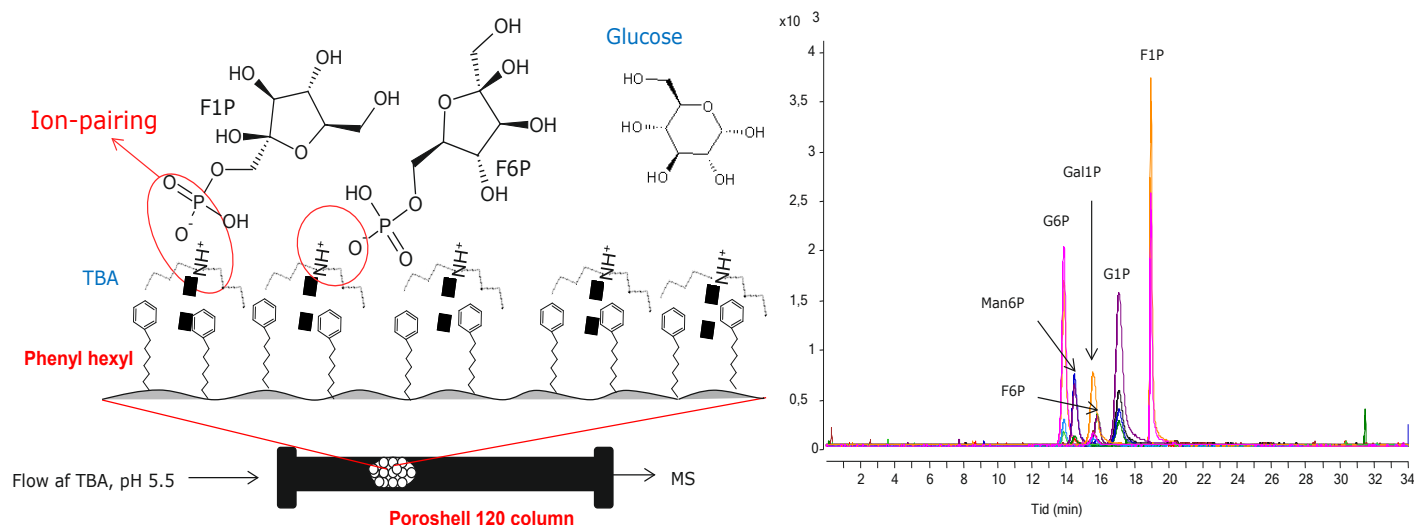
en slags mobil ionbytter, der opbygges af ion-par modifieren, som er et ionisk og hydrofobt stof, der absorberes på overfladen af en omvendt-fase kolonne, typisk ved at blande 5-20 mM af modifieren i eluenten. Herved ændres mængden af ionbytter-grupper på kolonnen under kromatografien. Det er ikke tilrådeligt at ændre den mere end 10-30%, da dette resulterer i ikke reproducerbare retentionsstider. Ved analyse af negativt ladede stoffer bruges en positivt ladet ion-par-danner og tilsvarende til positivt ladede stoffer, figur 4.

Hvis ion-par kromatografi skal bruges sammen med MS detektion, skal to krav opfyldes:

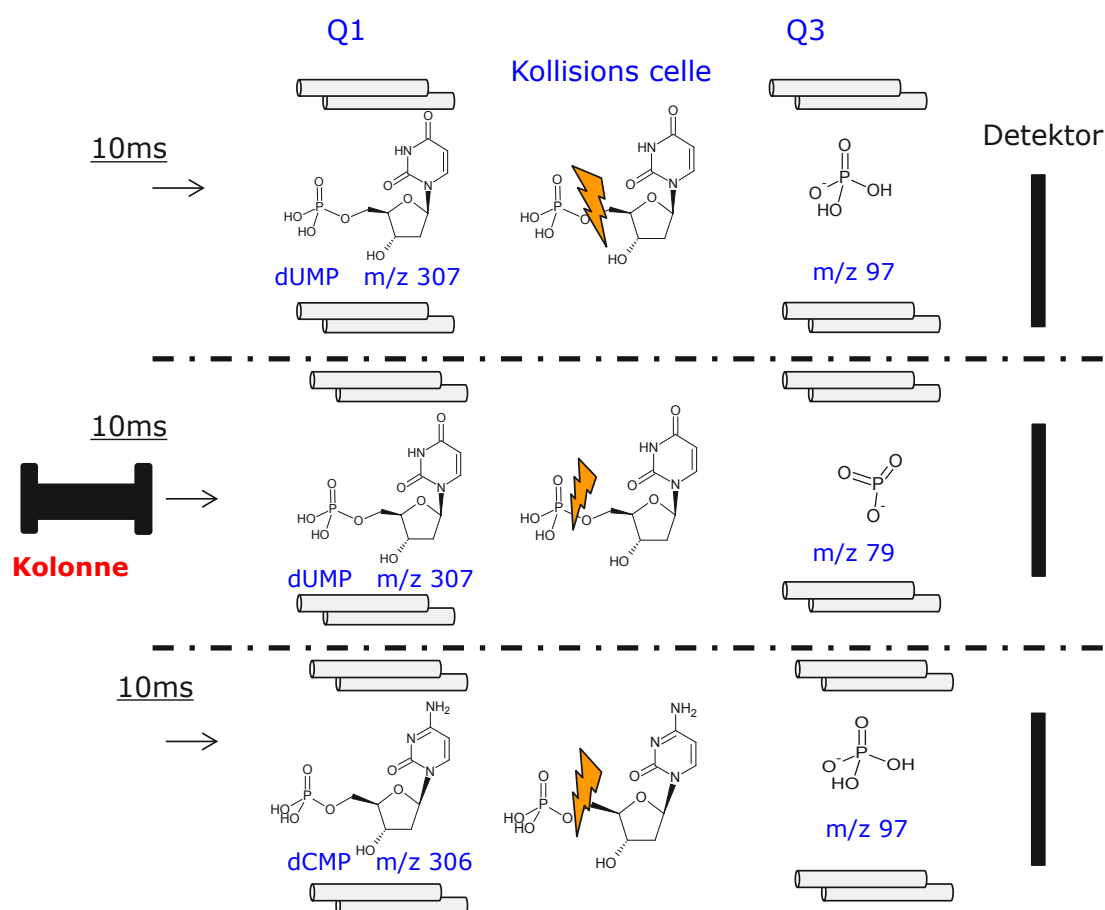
- Ion-par-reagenset skal være flygtigt, så ion-kilden ikke blokeres, og
- MS'en skal opereres i den modsatte polaritet af reagensets ladning. Da alle de intracellulære metabolitter har en negativ ladning ved neutralt pH, anvendes tributylamin, figur 4, der kun tillader brug af MS-instrumentet i negativ polaritet. De positivt ladede ion-par reagenter er næsten umulige at fjerne fra HPLC-systemet igen, og et dedikeret system er nødvendigt til disse analyser.

Metoden resulterer i god kromatografisk selektivitet og tillader bl.a. separation af de fleste sukkerfosfater, der kemisk set er meget ens, figur 4. Detektionsmæssigt bruger vi primært tandem massespektrometri (MS/MS) på en tripel quadrupol MS, figur 5, med negativ electrospray (ESI) ionisering. Instrumentet er så hurtigt, at flere stoffer i praksis kan måles på én gang. Dette skyldes den korte fragmenteringstid (ca. 5-50 ms), der typisk udføres to gange pr. stof. Med 20 sekunders kromatografisk topbredde kan man således måle 50 stoffer, hvis der foretages 20 målinger hen over toppen. Da isotopmærkede interne standarder anvendes, er der i praksis brug for tre fragmenteringer (overgange) pr. stof, hvorfor vi af følsomhedshensyn bruger 30 ms pr. fragmentering.

MS/MS er pt. den mest følsomme metode, men den lider af den skavank, at kun kendte stoffer med kendte fragmenteringsmønstre kan detekteres. Derfor sammenkobles ion-par UHPLC-systemet til en quadrupol-Time-of-Flight MS med jævne mellemrum. Denne tilbyder mere følsomhed i full-scan mode og tillader akkurat masse MS. Det betyder, at ATP kan måles med høj nøjagtighed, m/z 505.98859874 $\pm$ 0.001 [M-H],



Figur 4. Ion-par kromatografi med tributylamin som ion-par-modifier, non-anioniske hydrofile analytter som glucose tilbageholdes ikke. Til højre ses separationen af en række sukkerfosfater (G glukose, F fruktose, Gal galaktose, Man mannose).



Figur 5. Tandem MS-detektion af to stoffer på en triple quadrupol MS, pga. af den lave måletid pr. stof kan mange stoffer måles på én gang.

hvilket betyder, at elementarsammensætningen for kendte stoffer kan verificeres, selv uden en referencestandard. Instrumentet kan også anvendes til MS/MS, hvorved en identifikation af et kendt stof uden referencestandard, kan underbygges.

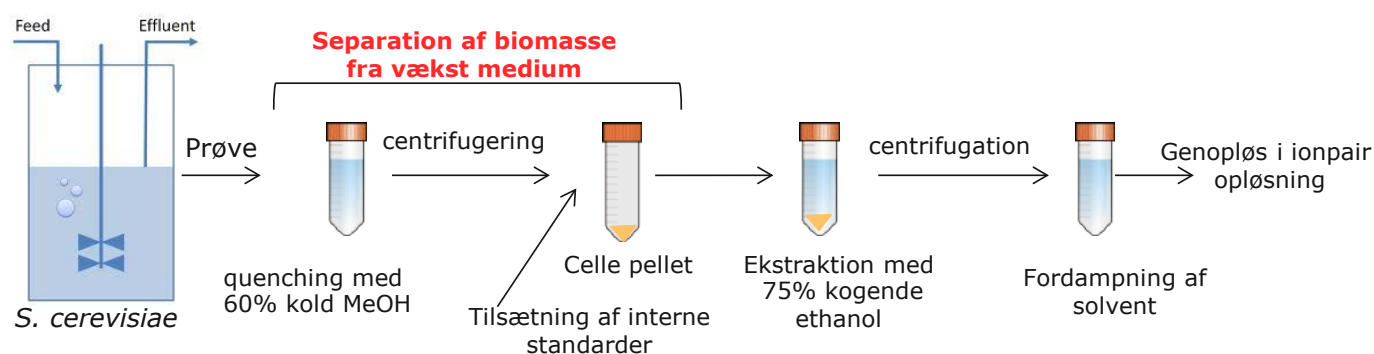
Quenching og prøveforberedelse

Som beskrevet er separation og detektion af de intracellulære metabolitter en yderst vanskelig analyseopgave, der kompliceres yderligere af en tidskrævende og besværlig prøveforberedelse. Grundet en meget høj turn-over rate af intracellulære metabolitter

er det nødvendigt at stoppe metabolismen på under 1 sekund, således at de intracellulære pools ikke ændres signifikant; en proces der betegnes quenching. For at kunne evaluere effektiviteten af quenchingen anvendes energy charge ratio,

$$E = (C_{ATP} + 0.5 \times C_{ADP}) / (C_{ATP} + C_{ADP} + C_{AMP}),$$

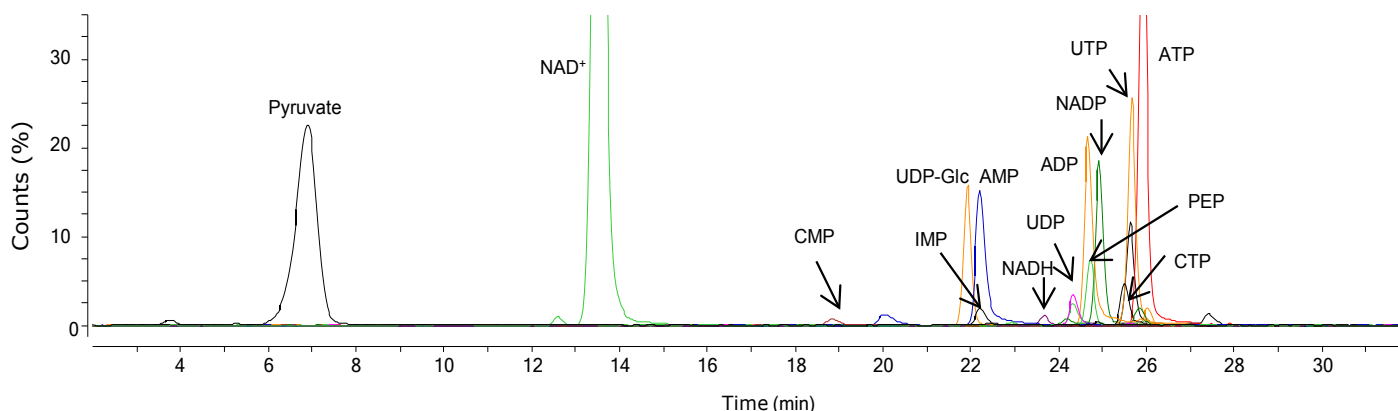
hvor C er koncentrationen. Rationen bør typisk ligge på 0,9-0,95, da normale celler indeholder væsentligt mere ATP end ADP og AMP. Der er tale om en særdeles sensitiv balance, som kræver høj præcision under prøveforberedelsen. Selv små unøjagtigheder kan forskubbe den ned til 0.5. Typisk kræves der en øvelse, før nye folk har succes med proceduren.



Figur 6. Quenching af bagegær og klargøring af prøve til UHPLC-MS/MS-analyse.

Da der ikke kendes en universel quenching-metode, der dækker samtlige organismetyper, er det yderst vigtigt at optimere metoden til den valgte organisme, bl.a. for at sikre lav lækage og en høj energy charge ratio.

Skimmelsvampe kan dog producere en lang række uønskede stoffer, der besværliggør oprensningen af det ønskede produkt. Samtidig har denne type mikroorganismer ofte en kompleks morfologi, der besværliggør dyrkning i bioreaktorer samt en



Figur 7. Ion-par UHPLC-MS/MS-analyse af et ekstrakt fra bagegær. Alle analytterne kan differentieres via deres forskellige MS/MS-fragmenteringer.

Den nemmeste metode er den som anvendes til gær, der kan quenches i 60% methanol ved -40°C , uden at cellemembranen ødelægges. Så centrifugeres cellerne ned, og medie og methanol fjernes, hvorefter biomassen ekstraheres i kogende ethanol eller methanol-chloroform. Metoden sikrer, at lipider og en række interfererende stoffer fjernes via chloroformfasen. Den resterende vand-methanol-fase frysetørres, genopløses og analyseres, figur 7.

Andre celler såsom mammale er for sensitive til, at denne metode kan anvendes, da cellemembranen nedbrydes af methanol. Den bedste metode til denne type celler er quenching i iskoldt saltvand efterfulgt af forsigtig centrifugering, således cellerne ikke lyseres. Denne metode er til gengæld ikke anvendelig til gær og andre mikroorganismer, da disse indeholder enzymer, der er aktive selv ved lavere temperaturer.

Mælkesyrebakterier udgør en særlig svær gruppe at quenche, da der ikke findes en pålidelig metode, der sikrer membran-stabiliteten. Det betyder, at de intracellulære metabolitter må analyseres sammen med interfererende materiale fra vækstmediet, resulterende i en kompleks blanding med store mængder sukker og andre medielementer, i essens en sirup. Vi vælger derfor at oprense prøver på aktivt kul [4] for at kunne måle nucleotiderne, hvilket betyder tab af non-aromatiske stoffer som f.eks. co-enzym og sukkerfosfater.

Den sidste større gruppering af organismer inkluderer de filamentøse bakterier og skimmelsvampe, der grundet den filamentøse natur er særlig sensitive og let nedbrydes. Til denne type mikroorganismer anvendes 60% methanol ved -40°C efterfulgt af enten centrifugering eller filtrering. Centrifugering er den foretrukne metode, da den er mere skånsom end filtrering, der kun anvendes i de tilfælde, hvor det ikke er muligt at bundfælde cellerne. Biomassen ekstraheres herefter med methanol-chloroform, hvorpå metabolitterne ekstraheres i en vandig buffer, der frysetørres. Som standard accepteres en lækageprocent på 20-30%.

Perspektiver

I øjeblikket arbejder vi med forskellige *proof of concept*-projekter, hvor molekylærbiologer har udviklet forskellige højproducerende skimmelsvampestammer til f.eks. produktion af 6-methylsalicylsyre, vanillin, orsellinsyrer og mycophenolsyre med en produktion på op til 2 g/L og udbytter op til 10% på C-mol basis.

kompleks regulering, der ofte gør, at de ønskede stoffer kun produceres på faste medier. Det er derfor attraktivt at producere de ønskede stoffer i en mere simpel cellefabrik.

For at løse disse problemer og gøre processerne nemmere arbejder molekylærbiologer på at overføre de kodende gener til gær, som er generelt anerkendt som sikker og ikke producerer uønskede toksiner. Samtidig er gær langt nemmere at dyrke i bioreaktorer, og har ofte højere væksthastigheder, hvorfor disse anses som ideelle til cellefabrikker.

Det har desværre vist sig at være svært at opnå samme udbytte i gær som i skimmelsvampe. En mulig forklaring er, at gær, som ikke naturligt producerer sekundære metabolitter, har en strømlinet metabolisme, der sikrer maksimal væksthastighed, hvorfor den ikke kan akkommodere højere produktion af ikke essentielle metabolitter.

Dette kommer til udtryk ved fermentering af en række gensplejsede gærstammer, hvor oscillerende vækst er observeret som funktion af højere kopiantal af det kodende gen. Vi arbejder med hypotesen, at denne oscillerende adfærd skyldes en redox ubalance, der kompenseres ved vekslen mellem to vækstformer.

Det er interessant at undersøge, hvordan *Aspergillus* til forskel fra gær adapterer sig, og hvordan de intracellulære pools ændres i forhold til produktion af det ønskede produkt. Sådanne informationer kan udpege flaskehalse i den centrale kulstofmetabolisme og derved guide molekylærbiologerne til yderligere optimering af cellefabrikken.

E-mail:

Kristian Fog Nielsen: kfn@bio.dtu.dk

Referencer

1. Sørensen JL, Nielsen KF, Thrane U. Analysis of moniliformin in maize plants using hydrophilic interaction chromatography. *J Agric Food Chem* 2007; 55:9764-9768.
2. Matyska MT, Pesek JJ, Duley J, Zamzami M, Fischer SM. Aqueous normal phase retention of nucleotides on silica hydride-based columns: Method development strategies for analytes relevant in clinical analysis. *J Sep Science* 2010; 33:930-938.
3. Lu W, Bennett BD, Rabinowitz JD. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *J Chromatogr B* 2008; 871:236-242.
4. Magdenoska O, Martinussen J, Thykaer J, Nielsen KF. Dispersive solid phase extraction combined with ion-pair ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for quantification of nucleotides in *Lactococcus lactis*. *Analytical Biochemistry* 2013; 440:166-177.