

Fluxomics

Fluxomics er en dynamisk tilgang til at undersøge biokemiske reaktioner inden for en organisme eller et biologisk system.

Af Johnny Östman,
Sveriges Landbrugsuniversitet
og Hanne Christine Bertram

Metabolomics, der beror på at måle et så stort antal metabolitter som muligt i et biologisk system, er blevet et udbredt redskab inden for mange områder af biovidenskab. Der er således et hav af anvendelser af metabolomics, der ofte bruges til at forstå, hvordan ydre påvirkninger påvirker et biologisk system. Som få eksempler bruges metabolomics blandt andet til at undersøge, hvordan planter reagerer på det omgivende klima og miljø [1]; hvordan kosten påvirker vores krop [2]; hvordan virus, infektioner og sygdom sætter ind [3,4], men også hvordan fermenteringsprocesser forløber [5] og hvordan bakterier udøver symbiotiske interaktioner [6]. For alle eksempler gælder det dog, at metabolomics har den begrænsning, at teknikken kun giver information om et øjebliksbillede.

Statisk versus dynamisk

Måling af koncentrationer er grundlaget for mange analysemetoder, og kan også betragtes som det basale formål i metabolomics. Mængden af en metabolit i et biologisk system fortæller dog ikke nødvendigvis hele historien. I biologiske systemer er der mange metabolitter, som er under homeostatisk kontrol og deres koncentration varierer således kun inden for et begrænset interval. Man kan forestille sig et biologisk system, hvor der er et kontinuerligt forbrug af en metabolit under homeostatisk kontrol. I dette biologiske system vil en produktion af metabolitten eller en optagelse af metabolitten være nødvendig for at opretholde en homeostatisk tilstand. Hvis forbruget stiger eller falder, så vil en samtidig stigning eller fald i produktionen eller optagelsen være afgørende.

I nogle af disse tilfælde vil koncentrationen af den pågældende metabolit forblive den samme, og ændringen kan ikke detekteres ved traditionelle koncentrationsmålinger, skønt der kan være klare biologiske forskelle. Sådanne ændringer i produktionen eller forbrug kaldes metaboliske fluxændringer, og analysen af sådanne ændringer går



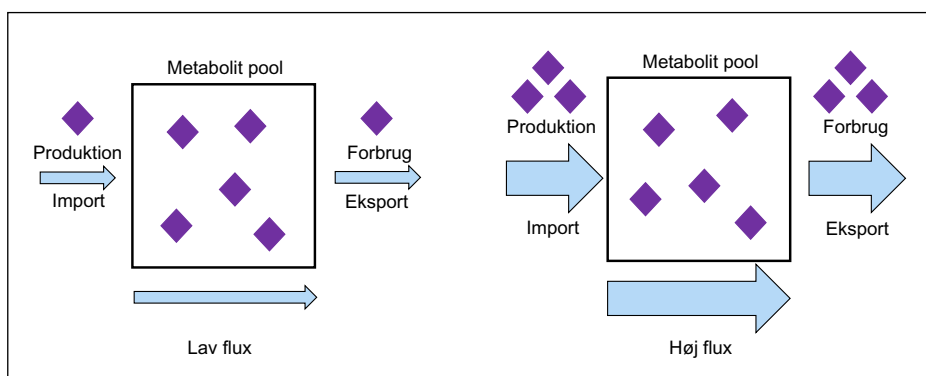
Flux-konceptet kan sammenlignes med en trafiksituation: Et øjebliksbillede af tilstedeværende biler fortæller os ikke nødvendigvis, hvor mange biler der reelt passerer igennem systemet over en periode, der rækker ud over det nærværende øjeblik.

under begrebet flux-analyse. Begrebet metabolisk flux er præsenteret i figur 1. Situationen med, at et statisk øjebliksbillede ikke siger noget om fluxen, er også velkendt for bilister i trafikken; en stor mængde biler på vejen siger ikke nødvendigvis noget om fluxen.

Fluxændringer på matematisk form

Den metaboliske flux af en enkelt reaktion kan udtrykkes som i ligning 1, side 29, der betragter en ændring i

koncentration over tid, hvor Φ betegner flux, n angiver mængden af stof, V betegner volumen af metabolitpoolen og Δt angiver tidsintervallet. Fluxen kan være enten positiv eller negativ, og i en homeostatisk situation vil den være nul. Dette betyder for eksempel, at et øget forbrug kan kompenseres med en stigning i import, produktion eller en kombination af begge, uden at der sker en koncentrationsændring. Fluxanalyse kan også udvides til at inkludere mange reaktioner og deres reaktionshastighe-



Figur 1. Illustration af, hvordan metabolit-koncentrationen kan være identisk under lav og høj flux.

Bekæmp fødevareforfalskning med MISA fra Metrohm



Få lynhurtigt svar!

Se om din fødevareprøve indeholder:

- ✓ Pesticider
- ✓ Antibiotika
- ✓ Væksthormon
- ✓ Kunstige farvestoffer
- ✓ Ulovlige tilsætningsstoffer

Med **MISA** fra **Metrohm** finder du nemt uønskede, ulovlige stoffer!

Kontakt os på tlf. +45 70200561 eller mail@metrohm.dk

Tag din sukkeranalyse til det næste niveau!

Med ionkromatografi (IC) kan du bestemme forskellige sukkerarter og sukkeralkoholer, som fx: **laktose, præbiotika (GOS og FOS)** eller **tilsætningsstoffer som iod eller sulfit**, på samme tid.



- ✓ **Effektiv:** Fuldt automatiseret prøvefiltrering, -dialyse eller -fortynding er integreret
- ✓ **Robust:** 3 års instrumentgaranti
- ✓ **Pålidelig:** Global service og applikationssupport

 **Metrohm**

der i et system samtidigt. Denne tilgang kaldes ofte fluxomics, analogt med andre systembiologiske tilgange som genomics, transcriptomics, proteomics og metabolomics.

$$\phi = \frac{\Delta n \text{ metabolit}}{V \cdot \Delta t} = \frac{(n_{\text{import}} + n_{\text{produceret}}) - (n_{\text{export}} + n_{\text{forbrugt}})}{V \cdot \Delta t} \quad (1)$$

Der findes primært to overordnede måder at lave fluxomics-analyser på: Fluxomics baseret på stabile isotoper og flux balanceanalyse. Isotopfluxomics til blive diskuteret detaljeret nedenfor.

Isotoper og deres opdagelse

Isotoper er varianter af samme grundstof, der kun adskiller sig ved antallet af neutroner i deres kerner. Isotoper kan være enten stabile eller ustabile, dvs. radioaktive isotoper. Historien om, hvordan isotoper blev opdaget, fandt sted i den første del af det 20. århundrede. To foreslåede elementer med tydelige forskelle i radioaktiv opførsel, viste sig at være fuldstændig uadskillelige af kemikalier og beviste dermed indirekte eksistensen af radioaktive isotoper i 1907 [7]. Hypotesen om, at kemiske grundstoffer består af blandinger af enheder med forskellige atomvægte, kom nogle år senere og er ofte krediteret Frederick Soddy [8], selvom den svenske nobelpristager Theodor Svedberg havde fremført hypotesen forinden [9].

Det første eksperimentelle bevis for eksistensen af stabile isotoper blev gjort af Joseph John Thomson i 1912 med et apparat, han kaldte et spektrograf [10], og i 1913 rapporterede han, at prøver af neon altid indeholder molekyler med atomvægte på både 20 og 22 [11]. Der blev sået tvivl om arten af Thomsons ukendte gas med atomvægt 22 i nogen tid. Det ultimative bevis for eksistensen af stabile isotoper blev leveret af Francis William Aston efter studier af neon med et forbedret spektrograf, hvor han også opdagede den tredje stabile isotop af neon, dvs. ^{21}Ne [12]. Efter opdagelsen af neutronen [13], blev isotopernes natur fuldt ud forstået.

Sporing med isotoper

Forskellige isotoper af et grundstof deler kemiske egenskaber. Den vigtigste undtagelse er en forskel i kinetik, da isotoper med højere masse reagerer langsommere end lettere isotoper [14]. Jo højere atomnummeret er for et grundstof, des mindre påvirkning har massen af en yderligere neutron på kinetikken, da indvirkningen på den samlede masse af atomet er relativt mindre. På grund af deres identiske egenskaber, er isotoper velegnede til at følge kemiske reaktioner ved at spore mærkede atomer.

Både stabile og ustabile (radioaktive) isotoper kan bruges til sporing af en kemisk forbindelse. Et epokegørende eksperiment med isotoper blev udført ved mærkning med radioaktivt bly [15,16]. Og brugen af blandt andet ^3H og ^{14}C har spillet stor betydning i forhold til at kortlægge biokemiske reaktioner og reaktionsmekanismer [17]. Brugen af stabile isotoper kom dog på banen allerede i 1930'erne, og studier med brug af ^2H , ^{13}C og ^{15}N blev rapporteret [18-20]. I dag er brugen af stabile isotoper i metaboliske sporingseksperimenter langt mere almindelig end radioaktive isotoper, hvilket blandt andet hænger sammen med et ønske om at begrænse forskernes udsættelse for radioaktivitet og bedre målingsteknikker til stabile isotoper.

Flux-målinger

Man skelner mellem to typer af flux-målinger: steady-state og

ikke-steady-state teknikker. For steady-state-teknikken fungerer en stabil isotop som et sporstof, der leveres kontinuerligt med en given hastighed, for eksempel ved infusion. Forholdet mellem det stabile isotop-sporstof og den endogene metabolit, der er af interesse (dvs. som beriges med isotop-sporstoffet), vil nå en stabil tilstand efter nogen tid, når forbrug og produktion har opnået ligevægt. Fluxen kan derefter beregnes ud fra infusionshastigheden og den berigelse, der måles i en prøve, der er taget under steady state [21].

Beregning af kinetik under ikke-steady-state forhold er mere krævende. Men det er en vigtig teknik for at få viden om de mekanismer, der er involveret, når et biologisk system påvirkes/stimuleres, for eksempel under fysisk aktivitet eller under indtagelse af mad. Prøverne tages til forskellige tidspunkter før og efter påvirkningen/stimuleringen, og kinetiske parametre kan beregnes ud fra forskelle i koncentration og berigelse på de forskellige tidspunkter ved hjælp af de såkaldte Steele-ligninger [22].

Når de isotop-berigede prøver er blevet samlet, analyseres disse typisk ved hjælp af analytiske teknikker baseret på massespektrometri (MS) eller kernemagnetisk resonans (NMR), der kan måle berigelsen. Ved at måle omfang og arten af inkorporeringen af den stabile isotop, er det både muligt at beregne fluxen; at kortlægge metaboliske reaktioner, og at estimere de relative bidrag af specifikke reaktioner til dannelsen af metabolitter [23]. Forskelle i flux kan også måles indirekte ved at sammenligne berigelsesgraderne efter forskellige behandlinger [24]. Antallet af atomer i et molekyle, der er mærket med isotopen, kan variere fra ingen til alle atomer. Disse varianter kaldes isotopologer og betegnes almindeligvis med $M + X$, hvor X er antallet af mærkede atomer. Molekyler med det samme antal inkorporerede mærkede atomer kan have de mærkede atomer i forskellige positionerne. Disse varianter af isotopmærkede molekyler kaldes isotopomerer og kan identificeres ved NMR og ved at studere MS fragmenter. Isotopologer analyseres almindeligvis ved MS, da de kan skelnes selv med MS-udstyr med lav opløsning.

Eksempel på anvendelse i ernæringsforskningen

Vi gennemførte et studie, hvor forsøgspersoner fik infuseret ^2H -mærket glukose ($[\text{6,6-}^2\text{H}_2]\text{glukose}$) under indtagelse af to forskellige måltider: hvidt, raffineret hvedemelsbrød eller fuldkornsrugbrød [25]. Efter måltiderne var indtaget, blev der løbende taget blodprøver ud, hvor isotop-berigelsen blev målt ved MS, hvilket gav mulighed for at måle optagelsen af glukose fra blodbanen og ind i cellerne ("clearance"). Ved hjælp af denne flux-analyse viste studiet, at optagelsen af glukose skete langsommere efter indtag af fuldkornsrugbrød sammenlignet med efter indtag af hvidt hvedebrød. Når man på samme forsøgspersoner målte glukose i blodet på traditionel vis, kunne man ikke detektere nogen forskelle mellem de to typer af brød, som formentlig skyldes en homeostatisk kontrol af blodets glukose-koncentration. Dermed demonstrerer studiet, at flux-målinger giver os et indblik i, hvor hurtigt og hvor meget glukose, der optages af cellerne, som vi ikke kan få ved "statiske" målinger af blodets glukose-indhold.

Epilog

Vesentlige dele af artiklen er modificeret fra ph.d.-afhandlingen "Metabolomics and flux analysis by mass spectrometry" af Johnny Östman fra Sveriges Landbrugsuniversitet i Uppsala.

E-mail:

Johnny Östman: johnny.ostman@slu.se

Referencer

1. R. Nakabayashi & K. Saito. (2015). Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 24, 10-16.
2. H.C. Bertram & L.M.A. Jakobsen (2018). Nutrimetabolomics - integrating metabolomics in nutrition to disentangle intake of animal-based foods. *Metabolomics*, 14,34.
3. R. Madsen et al. (2010). Chemometrics in metabolomics-A review in human disease diagnosis. *Anal. Chim. Acta*, 659, 23-33.
4. D.J. Beale et al. (2019) Untargeted metabolomics analysis of the upper respiratory tract of ferrets following influenza A virus infection and oseltamivir treatment.
5. A. Trimigno et al. (2020). An NMR Metabolomics Approach to Investigate Factors Affecting the Yoghurt Fermentation Process and Quality. *Metabolites*, 10, 293.
6. L.M.A. Jakobsen et al. (2019). Lactose and Bovine Milk Oligosaccharides Synergistically Stimulate *B. longum* subsp. *longum* Growth in a Simplified Model of the Infant Gut Microbiome. *J. Proteome Res.* 18, 3086-3098.
7. H.N. McCoy & W.H. Ross, W.H. (1907). The Specific Radioactivity of Thorium and the Variation of the Activity with Chemical Treatment and with Time. *J. Am. Chem. Soc.* 29, 1709-1718.
8. F. Soddy (1910). Radioactivity. *Ann. Rep. Progr. Chem.* 7, 256-286.
9. D. Strömholm & T. Svedberg, T. (1909). Untersuchungen über die Chemie der radioaktiven Grundstoffe. II. *Zeitschrift für anorganische Chemie*, 63, 197-206.
10. J.J. Thomson (1912). XIX. Further experiments on positive rays. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 24, 209-253.
11. J.J. Thomson (1913). Bakerian Lecture: - Rays of positive electricity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 89, 1-20.
12. F.W. Aston. (1920). XLIV. The constitution of atmospheric neon. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 39, 449-455.
13. J. Chadwick (1932). The existence of a neutron. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 136, 692-708.
14. E.W. Washburn & H.C. Urey (1932). Concentration of the H₂ Isotope of Hydrogen by the Fractional Electrolysis of Water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 18, 496-498.
15. G.V. Hevesy & F. Paneth (1913). Die Löslichkeit des Bleisulfids und Bleichromats. *Zeitschrift für anorganische Chemie*, 82, 323-328.
16. G. Hevesy (1923). The Absorption and Translocation of Lead by Plants: A Contribution to the Application of the Method of Radioactive Indicators in the Investigation of the Change of Substance in Plants. *Biochem. J.* 17, 439-445.
17. G. Lappin (2015). A historical perspective on radioisotopic tracers in metabolism and biochemistry. *Bioanalysis*, 7, 531-540.
18. R. Schoenheimer et al. (1939). Studies in protein metabolism. The metabolic activity of body proteins investigated with l (-)-leucine containing two isotopes. *J. Biol. Chem.* 130, 703-732.
19. R. Schoenheimer & D. Rittenberg (1935). Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. *Science*, 82, 156-157.
20. H.G. Wood et al. (1940). Heavy carbon as a tracer in bacterial fixation of carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 135, 789-790.
21. I.-Y. Kim et al. (2016). Applications of stable, nonradioactive isotope tracers in in vivo human metabolic research. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(1), e203.
22. R. Steele (1959). Influences of Glucose Loading and of Injected Insulin on Hepatic Glucose Output. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 82, 420-430.
23. C. Jang et al. (2018). Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell*, 173, 822-837.
24. M. El-Azzouny et al. (2014). Increased glucose metabolism and glycerolipid formation by fatty acids and GPR40 receptor signaling underlies the fatty acid potentiation of insulin secretion. *J. Biol. Chem* 289, 13575-13588.
25. J. Östman et al. (2019). Glucose Appearance Rate Rather than the Blood Glucose Concentrations Explains Differences in Postprandial Insulin Responses between Wholemeal Rye and Refined Wheat Breads - Results from A Cross-Over Meal Study. *Mol. Nutr. Food Res.* 63, 1800959.

AARHUS
15. - 16. september

LabDays 2021

Fagmesse for laboratorieteknik



Laboratorieteknik for alle

Netværk ■ Seminarer ■ Nyheder ■ Alt under ét tag

labdays.dk