



Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

AgroClustEr: FoCus – Food Chain Plus – Gesundheitliche Bewertung und
Konsumentenverhalten

TP 4.9 HealthMetabol

Förderkennzeichen 0315540A

Zuwendungsempfänger: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 24098 Kiel

Ausführende Stelle: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel – Agrar- und
Ernährungswissenschaftliche Fakultät , Olshausenstr. 40, 24118 Kiel

Verbundprojektleitung: Herr Prof. Dr. Döring

Teilprojektleitung: Frau Prof. Dr. Karin Schwarz

Teilprojektlaufzeit: 1.10.2010-31.03.2016

Das diesem Bericht zugrundeliegende BMBF-Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315540A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

I Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Der Metabolomikansatz mit der vergleichenden Analyse von Biomarkern und Stoffwechselmetaboliten soll zur Generierung neuer Hypothesen dienen und die funktionelle Analytik, die gezielt Metaboliten von biofunktionellen Inhaltsstoffen erfasst, komplementär ergänzen. Mit der Identifizierung von relevanten Metaboliten und ihres Levels soll die Phänotypisierung der Probanden in den humanen Interventionsstudien präzisiert werden. Ziele dieses Teilprojektes sind

- die Entwicklung von Methoden zur Erfassung des Metabolitenspektrum in biologischen Proben
- die Untersuchung von Effekten der Zufuhr von funktionellen Lebensmittelinhaltsstoffen auf das Metabolitenspektrum
- die fachliche Ausgestaltung einer Netzwerkplattform für Funktionelle Analytik und Metabolomik

2. Voraussetzungen

Bei Antragsstellung des Projektes gab es an der CAU Kiel keine Metabolomics-Plattform bzw. Gruppe, welche sich mit dem Metabolomics-Ansatz von Humanproben und anderen biologischen Proben beschäftigt hat.

Für die Umsetzung dieses Teilprojektes wurde ein neues Quadrupole Time-of-Flight Massenspektrometer der Firma Bruker (Bremen) beschafft. Die Etablierung dieses Systems war Teil des Projektes und der Meilensteine. Darüber hinaus musste eine Analyseplattform für polare und sehr polare Verbindungen etabliert werden, um potentielle Biomarker zu identifizieren.

Die nötigen Proben für die Entwicklung sowie die Studien wurden von TP 4.1 sowie dem Bundeswehr Krankenhaus in Kronshagen zur Verfügung gestellt. Die nötigen Ethikvoten wurden sowohl von TP 4.1 als auch von TP 4.9 gestellt.

3.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Metabolomik (AP 1)

Die LC-MS ist die effektivste Methode für den Bereich der geplanten Interventionsstudien (TP 4.1 und der geplanten Bioverfügbarkeitsstudien (TP 2.1, 2.2, 3.4 und 3.9) mit sekundären Pflanzenstoffen. Die gleichzeitige Darstellung einer Vielzahl von Komponenten und Stoffwechselmetaboliten in Tier- und Humanstudien vermag die Zielkomponenten auszumachen („metabolite profiling“), die für eine anschließende Daten-Darstellung und Interpretation möglicher metabolischer Effekte in den Studien notwendig sind. Es wird eine Methode zur Erfassung der sekundären Metaboliten etabliert, indem eine chromatographische Methode, basierend auf der Ultrahochdruck-Flüssigkeits-

Chromatographie (UHPLC), weiter entwickelt wird. Zurzeit stehen HPLC-Anlagen mit konventioneller Trennleistung zur Verfügung. Um die Trennleistung zu erhöhen, ist es notwendig, im Rahmen des Projektes die vorhandenen HPLC Anlagen durch eine UHPLC (z.B. Agilent Infinity-LC) zu ergänzen. Durch die Erhöhung des Druckbereiches sollen Trennleistungen erreicht werden, wie sie im Bereich der Gaschromatographie üblich sind. Der hohe Druck ermöglicht es, längere Säulen und kleinere Partikel für die chromatographische Trennung einzusetzen. Die Metaboliten-Identifizierung soll durch eine Kopplung mit dem vorhandenen Massenspektrometer (Ion-Trap) zu Beginn des Projektes stattfinden. Ein Abgleich der identifizierten Massen findet mit einer Metabolomik-Datenbanken statt. Zur Empfindlichkeitssteigerung und Möglichkeit der Derivatisierung von Metaboliten bei der Detektion wird ein automatisiertes Split-Modul (LEO) benötigt. Im weiteren Verlauf des Projektes ist die Kopplung an ein neu zu beschaffendes Q-TOF-Massenspektrometer vorgesehen. Die Auswertung der Daten soll im Sinne der Systembiologie mit computergestützten und statistischen Programmen erfolgen (z. B. Clusteranalyse, Hauptkomponentenanalyse, Anwendung von Algorithmen). Hierfür werden Software-Lösungen seitens der Geräte-Hersteller angeboten. Diese computergestützte Auswerte- und Statistik-Software wird im Zusammenhang mit dem neu anzuschaffenden Massenspektrometer für die vorgesehenen Untersuchungen benötigt. In der ersten Phase wird eine Methodenentwicklung durchgeführt. Hierfür benötigtes Probenmaterial (Plasma und Urinproben) werden aus den in-trans-Studien in Teilprojekt 4.1 zur Verfügung gestellt. Des Weiteren steht Probenmaterial aus Routineuntersuchungen an Hochleistungssportlern zur Verfügung (Kontrolluntersuchen an Berufstauchern, die im Schiffschiffsmedizinischen Institut der Bundeswehr durchgeführt werden). Diese Probanden unterliegen aufgrund ihrer hohen körperlichen Belastung einem Stress, der nachgewiesenermaßen zu einem Anstieg an hydroxylierten Hippuraten, die oxidativen Stress indizieren, führt.

Funktionelle Analytik (AP 2)

Im Bereich der funktionellen Analytik soll im Rahmen dieses Projektes eine ergänzende Methode zur Bestimmung von Metaboliten phenolischer Verbindungen (Quercetin, Catechin, Tannine) etabliert werden und die Analytik im Teilprojekt 2.1 ergänzen. Im TP 2.1 wird nach enzymatischer Aufspaltung die Summe der Metaboliten über das jeweilige Aglycon bestimmt. Die ergänzende Bestimmung soll wie unter AP1 mittels Flüssigchromatographie und Kopplung an ein Massenspektrometer erfolgen. Parallel zur eigenen Methodenentwicklung soll weiterhin ein Abgleich mit anderen Laboren erfolgen. Es ist vorgesehen, in diesem Rahmen einen Unterauftrag an ein Labor zu vergeben, das über Massenspektrometer (wie z.B. Triple-Quadrupol) verfügt, die spezielle für die Quantifizierung geeignet sind, zu vergeben.

Plattform für Funktionelle Analytik und Metabolomik (AP 3)

Es ist die Aufgabe dieses Teilprojektes, die fachliche Ausgestaltung der Plattform für Funktionelle Analytik und Metabolomik federführend zu übernehmen. Das Projektmanagement wird durch organisatorische Arbeiten den Aufbau dieser Plattform unterstützen. Ziel ist es, im Netzwerk entwickelte und bestehende Methoden für die funktionelle Analytik systematisch zu erfassen, die Methoden untereinander abzugleichen und die Potentiale für sich ergänzende Analysen auszuloten. Des Weiteren sollen die Ressourcen zur massenspektrometrischen Analyse gebündelt werden und die Potentiale für komplementäre Untersuchungen ermittelt werden. Vorgesehen war, dass für ausgewählte

Referenzmaterialien möglichst alle im Netzwerk zur Verfügung stehenden Methoden durchgeführt werden und ein umfassender Vergleich der Methoden dokumentiert wird.

Metabolomik (AP 4)

Es ist die Aufgabe dieses Teilprojektes durch die Analyse von Probenmaterial aus den Interventionsstudien eine Präzisierung der Typisierung der Probanden vorzunehmen und die Effekte der Interventionen durch funktionelle Milchbestandteile auf der Ebene des Metabolitenprofils zu erfassen. Für die Durchführung dieses Arbeitspaketes wird auf die in Arbeitspaket 1 entwickelte Methode zur Erfassung des Metabolitenprofils zurückgegriffen.

3.2 Meilensteine

Arbeitspaket 1

M 4.9.1 Entwicklung der Probenaufbereitung, Vorversuche in Kombination mit chromatographischer Trennung ist erfolgt (Projektmonat 6).

M 4.9.2 Entwicklung einer chromatographischen Trennmethode mit gekoppelter MS (QToF) zum Screening biologischer Proben (Projektmonat 12) in Kombination mit Datenbankrecherche ist erfolgt.

M 4.9.3 Identifizierung und Quantifizierung von relevanten Stoffwechselmetaboliten in biologischen Proben ist mittels MS (Q-TOF) erfolgt (Projektmonat 24).

M 4.9.4 Versuchs- und Datenauswertung der Hauptversuche sowie Anwendung von Datenbanken und statistischer Verfahren zur Datenaufbereitung ist abgeschlossen (Projektmonat 30).

Arbeitspaket 2

M 4.9.5 Entwicklung der Probenaufbereitung für Stoffwechselmetaboliten von Polyphenolen ist abgeschlossen (30 Monate).

M 4.9.6 Entwicklung einer LC-MS Methode zur Erfassung der Stoffwechselmetaboliten der Polyphenole ist abgeschlossen (36 Monate).

Arbeitspaket 3

M 4.9.7 Erfassung von MS-Ressourcen ist abgeschlossen (6 Monate).

M 4.9.8 Erfassung von Methoden für die funktionelle Analytik abgeschlossen (12 Monate).

M 4.9.9 Referenzmaterialien für vergleichenden Untersuchungen wurden bestimmt (18 Monate).

Arbeitspaket 4

M 4.9.10 Analyse von Probenmaterial aus der Interventionsstudie 2 ist erfolgt (Projektmonat 48).

M 4.9.11 Analyse von Probenmaterial aus der Interventionsstudie 3 ist erfolgt (Projektmonat 60).

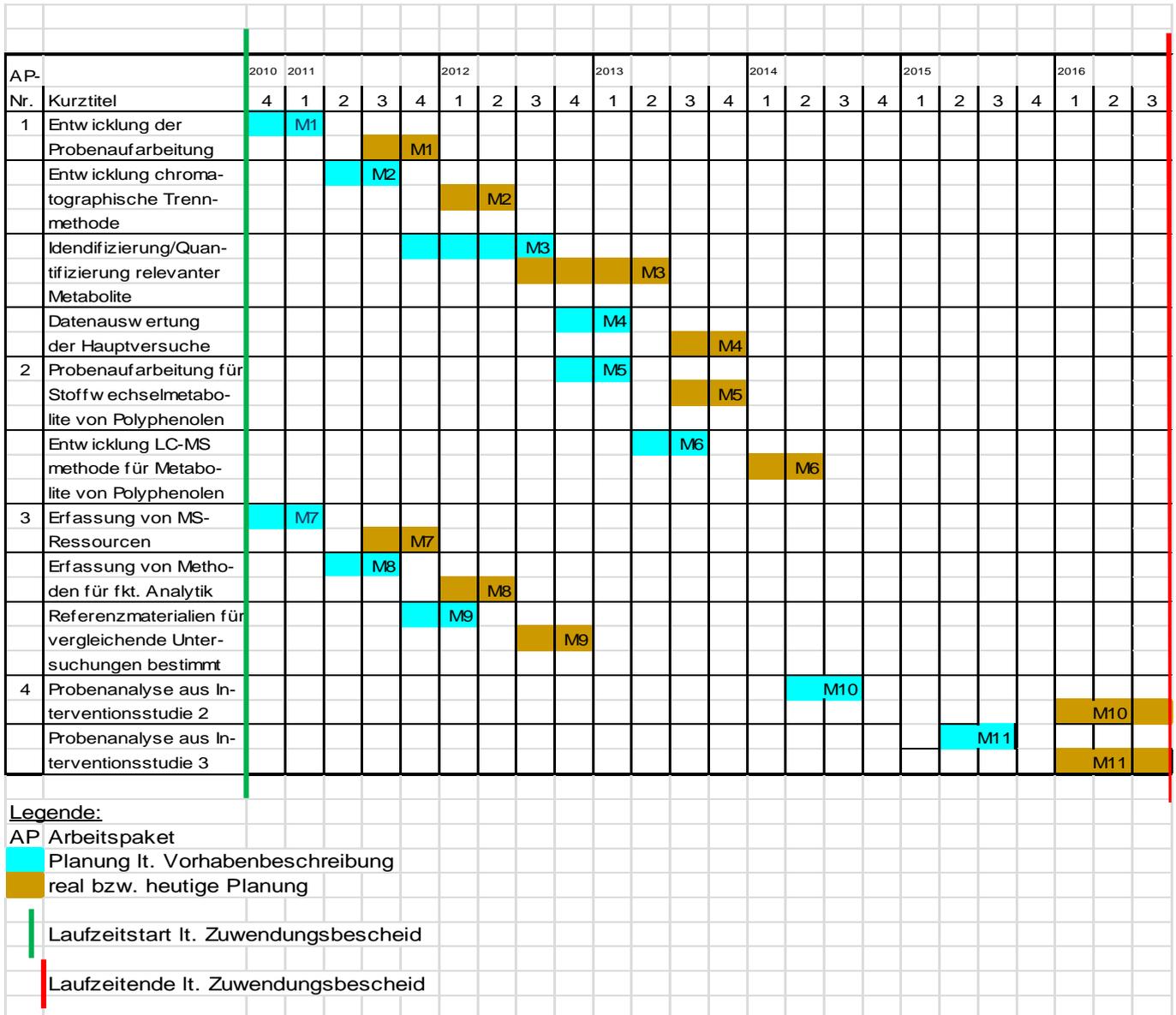


Abbildung 1 Vergleich Planung und Realisierung des Vorhabens

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die wichtigsten ernährungsbedingten chronischen Erkrankungen wie Atherosklerose, bestimmte Krebserkrankungen oder Diabetes mellitus Typ 2 sind verbunden mit Inflammationsprozessen und oxidativem Stress. Oxidativer Stress zeigt sich in der Modifizierung von stoffwechselphysiologischen Biomarkern im Organismus. Das Interesse liegt hierbei zunehmend bei den ernährungsbedingten Einflüssen auf das Profil von Metaboliten und Stressmarkern und stellt immer häufiger die Komplexität der Wechselwirkungen von Lebensmittelinhaltsstoffen und ihren Stoffwechselmetaboliten mit nicht-ernährungsbedingten Stoffwechselmetaboliten dar (1). Insbesondere am Beispiel der Polyphenole hat sich in den vergangenen Jahren herausgestellt, dass die Funktionalität in vivo weitaus komplexer ist als die bei in vitro-Testungen nachgewiesenen anti-oxidativen Wirkungen. Mittlerweile wurde dieser Erkenntnis Rechnung getragen, indem zum einen eine

Vielzahl von Biomarkern analysiert werden, die Expression von einer Vielzahl von Genen untersucht bzw. auf der Ebene der Proteine und Peptide (Proteomik) gemessen wird (2). In Ansätzen der Metabolomik, die bisher insbesondere in der Pharmakologie und Toxikologie Anwendung findet, wird angestrebt, die Gesamtheit der Stoffwechselprodukte qualitativ und quantitativ zu erfassen, um regulatorische Prozesse und Effekte auszumachen, die z.B. von antioxidansreichen Lebensmitteln, PUFA-reichen Ölen oder von kalorischer Restriktion (CR) herrühren. Die nicht-zielgerichtete und umfassenden Analyse von Metaboliten („metabolite profiling“) führt zu Erkenntnissen über das Netzwerk der Metabolitenverteilungen und -änderungen und kann so Einblicke in die zugrundeliegenden biochemischen Prozesse liefern auch hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen Genen und deren Funktionen im Stoffwechsel des Organismus. In der sogenannten „genome wide association study“ wurden genomische Daten mit Metabolomik-Daten das erste Mal korreliert (3). In der niedermolekularen Metabolomik wurden in den vergangenen Jahren insbesondere zwei Analysetechniken verfolgt, wie die NMR und MS (Kernresonanz Spektroskopie und Massenspektrometrie) (4). Bei den NMR Techniken kann die nicht-destruktive Analyse mit einem sehr geringen Umfang der Probenaufarbeitung erfolgen, während bei der destruktiven MS-Analyse i.d.R. eine chromatographische Trennung vorgeschaltet ist. Für die Erfassung von sekundären Stoffwechselprodukten wird häufig die LC/MS angewendet. Ein wesentlicher Vorteil der MS-Analytik gegenüber der NMR liegt in der wesentlich höheren Empfindlichkeit, sodass es hier auch noch möglich ist, im mikro- bis femtomolaren Bereich quantifizieren zu können. Die gleichzeitige Identifizierung von mehr als 1000 Metaboliten mit niedriger Molekularmasse (ca. 50-1500amu) wird in der Massenspektrometrie über die Molekularmassen sowie in Abhängigkeit des Massenspektrometers anhand eines Fragmentierungsmusters, z.B. ESI-MSn-Iontrap, oder der Höhe der Auflösung und Massengenauigkeit durchgeführt, wie sie z.B. bei Time-of-Flight Massenspektrometern (TOF) erreicht werden kann (5). Bei der sogenannten Q-TOF Anlage ist eine hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit mit hoher Massengenauigkeit für das Erkennen, Quantifizieren und Darstellen von Metaboliten-Profilen und Unterschieden in Konzentrationen eine optimale Lösung. Weiterhin kommt hierbei der Entwicklung geeigneter Verfahren in der Probenvorbereitung und -aufbereitung zur umfangreichen Erfassung der Metaboliten im Sinne des „Profiling“ eine hohe Bedeutung zu (6). Die große Bedeutung der umfassenden Identifizierung von Stoffwechselmetaboliten, um Effekte im Stoffwechsel eines Organismus aufzeigen zu können, zeigt sich weiterhin in einer Ergänzung zur Genom- und Proteom-Analyse. So können unterschiedlichste Proteinmodifikationen aufgrund von oxidativem Stress auftreten (7) und in der Bildung von Metaboliten mit geringerer Molekularmasse resultieren, wie es z.B. für Nitro-Tyrosin beschrieben ist. Nitro-Tyrosin entsteht bei der Regulierung biologischer Prozesse durch Stickstoffoxid im Organismus (8). Andere Proteinmodifikationen wie z.B. die Bildung von Disulfidbrücken, Glycosilierungen oder Phosphorylierungen (9) stellen weitere mögliche Zielkomponenten dar, die im Sinne eines Screenings/Profiling ausgegremt werden können. Bei den oxidativen Modifikationen durch Glykosilierungen reduzierender Zucker (Maillard Reaktion) handelt es sich z.B. um Carboxymethyllysine oder Pentosidine (10). Weitere Marker oxidativen Stresses mit geringer Molekularmasse sind nach Ogino und Wang (10), Wood et al. (12) oder Winnik und Kitchin (11) Biomarker der Lipidoxidation wie Malondialdehyd, Isoprostane, 4-Hydroxy-2-nonenal und einfache Alkan-Verbindungen (Ethane und Pentane) oder Biomarker der DNA wie 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine und 8-Nitroguanine (12). Bis zu 34 weitere niedermolekulare Stoffwechselmetaboliten im Urin sind bei Saude et al. (13) beschrieben. In der Arbeitsgruppe des Antragsstellers am Schiffahrtsmedizinischen Institut werden insbesondere die in der Niere unter oxidativem Stress aus dem Hippurat gebildeten hydroxylierten Derivate des

ursprünglichen Moleküls Benzoat (hauptsächlich Dihydroxybenzoate) analysiert. Unter experimentellen Bedingungen korreliert die Bildungs- und Ausscheidungsrate der Dihydroxybenzoate mit dem oxidativen Stress. Dieser Stoffwechselweg ist offensichtlich geeignet, freie OH-Radikale zu binden (14). In einer kürzlich von Fardet et al. (15) veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass ca. 1000 Metaboliten im Urin bei Ratten durch den Fettgehalt der Diät verändert und 76 Metaboliten durch den Zusatz von Catechin vollständig reversiert wurden. Vier Variablen, die durch eine Hochfett-diät in erhöhtem Maße ausgeschieden wurden, konnten als Deoxycytidin, Nicotinsäure, Dihydroxychionlin und Pipecolinsäure identifiziert werden. Nach Supplementierung mit Catechin wurde der Level dieser Metaboliten deutlich auf den Level reduziert, der bei Ratten mit einer Niedrigfett-diät erzielt werden konnte. Bei diesen Ergebnissen handelt es sich den Autoren zu Folge um neue Erkenntnisse zur Stoffwechselfunktion, die nur durch einen breitgewählten Ansatz der Analyse von Metaboliten (Metabolomik) möglich ist.

Da in der überwiegenden Zahl zur Identifizierung und Quantifizierung niedermolekularer Metaboliten keine Referenzsubstanzen kommerziell zur Verfügung stehen, spielen frei zugängliche Datenbanken eine wichtige Rolle wie z.B. die HMDB (Human Metabolome Database; www.hmdb.ca).

Literatur

1. Gilney MJ, Walsh M, Brennan L, Broche HM, German B, Ommen Bv. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;82:497-503.
2. Horgan RP, Clancy OH, Myers JE, Baker PN. An overview of proteomic and metabolomic technologies and their application to pregnancy research. *BJOG* 2009;116:173-181.
3. Gieger C, Geistlinger L, Altmaier E, Hrabce de Angelis M, Kronenberg F, Meitinger T, Mewes HW, Wichmann HE, Weinberger KM, Adamski J, Illig T, Suhre K. (2008) Genetics meets metabolomics: a genome-wide association study of metabolite profiles in human serum. *PLoS Genet.* 4: e1000282.
4. Gibney MJ, Walsh M, Brennan L, Broche HM, German B, Ommen Bv. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;82:497-503.
5. Dettmer K, Aranov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Rev.* 2007;26:51-78.
6. Want EJ, O'Maille G, Smith CA, et al. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2006;78:743-752.
7. Daggett V. Protein degradation: The role of mixed-function oxidases. *Pharmaceutical research* 1987;4:278-284.
8. Du M, Wu W, Ercal N, Ma Y. Simultaneous determination of 3-nitro tyrosine, o-, m-, p-tyrosine in urine samples by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection with pre-column cloud point extraction. *Journal of chromatography B* 2004;803:321-329.

9. Qin J, Chait BT. Identification and characterization of posttranslational modifications of proteins by MALDI ion trap mass spectrometry. *Analytical chemistry* 1997;69:4002-4009.
10. Ogino K, Wang D-H. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med. Okayama* 2007;61:181-189.
11. Winnik WM, Kitchin KT. Measurement of oxidative stress parameters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008;233:100-106.
12. Wood LG, Gibson PG, Garg ML. A review of the methodology for assessing in vivo antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006;86:2057-2066.
13. Saude EJ, Obiefuna IP, Somorjai RL, et al. Metabolomic biomarkers in a model of asthma exacerbation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008;179.
14. Malyusz M, Kähler W, Gronow G. (2001) Hippurate metabolism as a hydroxyl radical trapping mechanism in the rat kidney. *Kidney Blood Press. Res.* 24, 149-158
15. Fardet A, Llorach R, Martin J-F, et al. A liquid chromatography-quadrupole time-of-flight (LC-QTOF)-based metabolomic approach reveals new metabolic effects of catechin in rats fed high-fat diets. *Journal of Proteome Research* 2008;7:2388-2398.
16. Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research* 2007;35:521-526.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Aus dem TP 2.1 – 2.4, TP 3.4 und 3.8 sowie TP 4.1 wurden Proben zur Verfügung gestellt. Es wurden Messergebnisse von Probanden der humanen Interventionsstudien in TP 4.1 zur Phänotypisierung und systemischen Auswertung in Kombination mit Metabolomik-Daten bereitgestellt. In Zusammenarbeit mit dem Koordinationsprojekt wurde für das gesamte Netzwerk eine Plattform für Funktionelle Analytik und Metabolomik eingerichtet.

II. Eingehende Darstellung

1. Der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses

Arbeitspaket 1

M 4.9.1 Entwicklung der Probenaufbereitung, Vorversuche in Kombination mit chromatographischer Trennung ist erfolgt (Projektmonat 6).

Zu Beginn von Teilprojekt 4.9 ist ein umfassendes Screening von verschiedenen Festphasen-Extraktions-Kartuschen (SPE) durchgeführt worden. Es sind mehr als 23 verschiedene Festphasen Kartuschen mit den Proben getestet worden. Tabelle 1 zeigt alle 23 verschiedenen Festphasen-Kartuschen, welche für das Screening getestet worden sind. Ziel war es, Matrixeffekte zu vermindern und gleichzeitig störende Detergenzien abzutrennen. Zusätzlich sollte eine Aufkonzentrierung des Probenmaterialies mittels SPE erreicht werden. Als biologische Probenmaterialien wurden Urinproben von männlichen und weiblichen Probanden sowie Urin- und Plasmaproben nach Quercetinapplikation eingesetzt.

Tabelle 1 Übersicht über alle für das Screening eingesetzten Festphasen-Kartuschen (SPE) – Fortsetzung der Tabelle auf der nachfolgenden Seite

Hersteller	Säulenart	Packungsmaterial	Packungsmaterial (mg) / Säulenvolumen (ml)	geeignet (+) / ungeeignet (-)
Alltech	High Capacity	C18	50/1,5	+
Alltech	Extract Clean Columns	C18	50/1,5	+
Alltech	High Capacity	C18	100/1,5	+
Alltech	Extract Clean Columns	C18	1000/8	-
Alltech	Extract Clean Columns	C18	200/4	-
Alltech	Extract Clean Columns	C18	500/8	-
IST	Isolute	C18 EC		-
Kinesis	Telos	PPT		+
Macherey & Nagel	Chromabond	C18 EC		+
Macherey & Nagel	Chromabond	C18		
Macherey & Nagel	Chromabond Polystyrol Divinylbenzol	HR-P		-
Macherey & Nagel	Chromabond	Easy	3/200	-
Macherey & Nagel	Chromabond	C18 Hydra		+
Macherey & Nagel	Chromabond	HR-X		-
Supelco	Hybrid SPE - Percipitation		30/1	-
Waters	Oasis	HLB 3cc	60mg	-
Waters	Oasis	Wax 3cc		+
Macherey & Nagel	Chromabond	C2	100/1	-
Alltech	Extract Clean Columns	PR-C18	100/1.5	-

Hersteller	Säulenart	Packungsmaterial	Packungsmaterial (mg) / Säulenvolumen (ml)	geeignet (+) / ungeeignet (-)
Alltech	Extract Clean Columns	C8	100/1.5	-
Alltech	Extract Clean Columns	C18	50/1.5	-
SeQuant	Zic-HILIC SPE	Polypropylene	100/1	-

Im Anschluss an die Festphasenextraktion erfolgte die Analyse mittels QTOF/MS. Die Urinproben wurden mittels Direktinjektion aufgegeben. Die Plasmaproben wurden aufgrund der hohen Komplexität chromatographisch mittels Ultra Hochdruck Flüssigkeitschromatografie (UHPLC) aufgetrennt und anschließend in der QTOF/MS analysiert.

In Abbildung 2 ist eine Urinprobe (nach Applikation einer Quercetin-Kapsel), die mittels C18 Hydra Festphasen Säule (Macherey & Nagel, Düren) extrahiert wurde, dargestellt. Die Abbildung ist in drei Abschnitte unterteilt: Abschnitt 1 zeigt das Filtrat, das keine Metaboliten enthalten sollte. Abschnitt 2 zeigt die Waschphase, in welche störende Detergenzien abgewaschen wurden. Das Eluat, im letzten Abschnitt, sollte die höchsten Metabolitenkonzentrationen aufweisen. Die eingesetzten Methoden der Festphasen-Kartuschen waren für die Probenmaterialien nicht optimiert und zeigten dadurch bedingt auch in Abschnitt 1 & 2 erhöhte Metabolit-Konzentrationen. Eine Optimierung der Methode erfolgt nur für die später eingesetzten Säulen. Bei der Auswertung der verschiedenen Festphasen-Kartuschen wurde dies berücksichtigt. Die Bestimmung der Eignung erfolgte durch den Vergleich des Metabolitenspektrums in den einzelnen Abschnitten und der höchsten Intensität an Metaboliten in Abschnitt 3. Bei der Auswertung des Screenings erfüllte vor allem die Hydra Säule und die proteinabtrennende Telos Säule die Vorgaben.

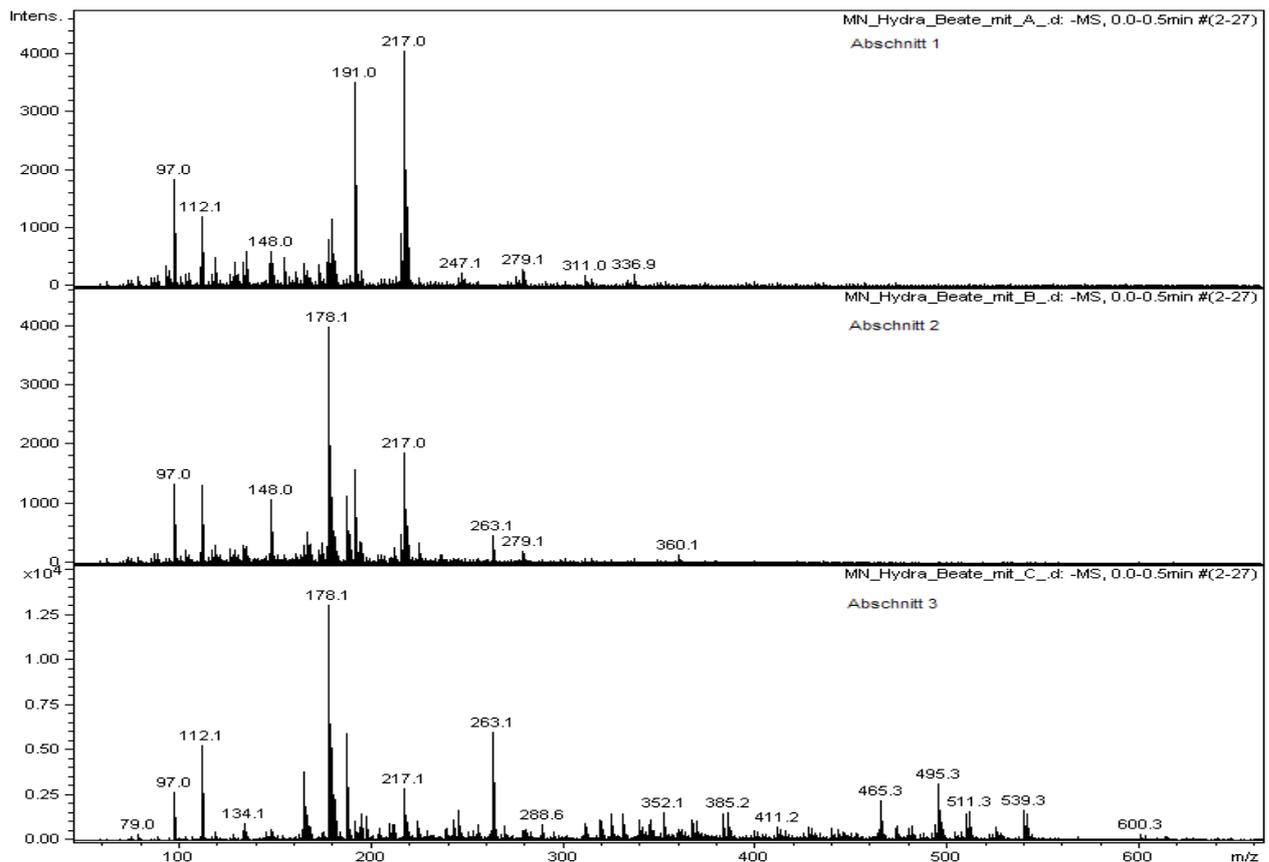


Abbildung 2 QTOF/MS - Massenspektrogramm einer Urinprobe nach Quercetinapplikation. Festphasen-extraktion der Urinproben mittels C18 Hydra SPE für die Abschnitten 1 – 3 (s. Text)

M 4.9.2 Entwicklung einer chromatographischen Trennmethode mit gekoppelter MS (QToF) zum Screening biologischer Proben (Projektmonat 12) in Kombination mit Datenbankrecherche ist erfolgt.

Für die chromatographische Analyse mittels UHPLC wurden verschiedene Säulenarten, Methoden sowie Probenaufarbeitungsschritte getestet und etabliert. Letzteres ist wichtig, damit störende Probenfraktionen von der Gesamtmatrix abgetrennt werden können.

Dafür wurden verschiedene Proteinpräzipitationssäulen (z.B. von Telos) sowie unterschiedliche nasschemische Verfahren getestet. Als am geeignetsten wurde das nasschemische Verfahren der Methanol-Proteinpräzipitation identifiziert. Dabei wird das Methanol auf -20°C gekühlt und zur Probe im Verhältnis 1:3 zugegeben. Die Inkubation erfolgt bei -20°C für 20 min. Anschließend wird die Probe zentrifugiert und der Überstand analysiert.

Für die Entwicklung der Trennmethode wurden verschiedene UHPLC Säulenmaterialien auf ihre Trenneigenschaften untersucht. Stark polare Komponenten der verwendeten biologischen Humanproben sind chromatographisch mit Standardsäulenmaterialien schwer aufzutrennen, da sie nur geringe Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen und kurz nach dem Injektionspeak eluieren.

In der Literatur wird für solche Problemstellungen vorrangig die Hydrophile-Interaktionschromatographie (HILIC) eingesetzt. Der Vorteil der HILIC Säulenarchitektur ist, dass die polaren Verbindungen eine stärkere Interaktion mit dem Säulenmaterial eingehen,

als sie dies bei Standardsäulen der Fall ist. Durch die verbesserte chromatographische Auftrennung wird die Ionisierung in der Quelle und dadurch die Detektion in der QTOF/MS positiv beeinflusst.

Weitere Faktoren für das Screening wären die Partikelstruktur und -größen und der Säuleninnendurchmesser. Da mit einer UHPLC Anlage gearbeitet wird, soll eine hohe Auftrennung erreicht werden. Dafür wurden zwei unterschiedliche Partikelstrukturen, die Nucleodur und Nucleoshell Partikel, untersucht.

Die Partikel einer Nucleoshell Säule besitzen einen festen Kern aus Siliciumdioxid und als Schale ein poröses Material. Dadurch kann die Probe durch die Schale „diffundieren“, jedoch nicht durch den Kern. Dies führt zu einer schnelleren Trennung und einer verbesserten Trennleistung. Die Partikel von Nucleodur Säulen sind aus porösem Material, die Probe diffundiert durch die kompletten Partikel.

Neben der Struktur der Partikel ist auch die Größe für die Trennleistung relevant. Grundsätzlich gilt: Je kleiner die Partikel, desto höher ist die Packdichte in der Säule. Daraus folgt, bei steigender Partikeldichte nimmt der Rückdruck zu.

Von der UHPLC Anlage wird ein maximaler Druck von 600 bar toleriert. Aus diesem Grund wurde bei der Nucleoshell Säule eine Partikelgröße von 2,7 µm gewählt, bei der Nucleodur Struktur hingegen eine Größe von 1,8 µm. Dies führt zu einem erhöhten Rückdruck, die chromatographische Trennleistung ist bei beiden Säulentypen vergleichbar. Zusätzlich wurde eine AMID-HILIC-Säule der Firma Waters getestet. Diese zeichnet sich durch kleine Partikel (1,7µm) bei einem Innendurchmesser von 2.1 mm aus.

Beim Vergleich aller drei Säulenarten konnte die beste Auftrennleistung bei der AMID-HILIC gezeigt werden. Dies liegt zum einen an dem Prinzip der HILIC-Trennung und wird andererseits durch die durch die AMID-Modifizierung der Partikel unterstützt, wodurch hochpolare Metaboliten noch besser mit der Säule interagieren können.

Während der Erarbeitung dieses Meilensteines wurde auch begonnen, Proben des Schifffahrtsmedizinischen Institutes der Bundeswehr zu analysieren. Dadurch konnte eine Datenbank mit humanen Metaboliten von gesunden Probanden aufgebaut und später als Bibliothek genutzt werden.

Einschlusskriterien für die Probanden der Bundeswehr waren: Geburtsjahrgänge 1987 bis 1990, männlich und gesund. Die Beurteilung des Gesundheitszustandes erfolgt im Zuge der (Eingangs-) Untersuchungen bei der Bundeswehr. Die Daten der Untersuchungen werden anonymisiert zur Verfügung gestellt.

M 4.9.3 Identifizierung und Quantifizierung von relevanten Stoffwechselmetaboliten in biologischen Proben ist mittels MS (Q-TOF) erfolgt (Projektmonat 24).

Für den dritten Meilenstein wurden Urinproben von verschiedenen Probanden mittels der entwickelten Metabolomik-Plattform analysiert. Die gewonnenen Daten wurden sowohl mittels des gezielten sowie des ungezielten Ansatzes ausgewertet.

Ein Beispiel für eine solche Untersuchung ist die Analyse von 557 Urinproben aus der FoCUS Kohorte. Die Urinproben wurden mittels eines „dilute and shoot“ Prinzip mit einer wässrigen Ameisensäurelösung verdünnt (1:3 v/v) und dann in 80 Batches über fünf Tage gemessen. Die Proben wurden alle mit Hilfe der entwickelten flüssigkeitschromatographischen Methode

(Analytik für hochpolare Verbindungen mit Hilfe einer Waters Amid Säule aufgetrennt) und dann in dem Quadrupole-Flugzeitmassenspektrometer (QTOF) gemessen (negative Ionisierung).

Ziel dieser Studie war es, die Stabilität der Proben und die Robustheit des Systems über einen Zeitraum von sieben Wochen zu messen und anschließend zu validieren.

Bisherige Studien aus der Literatur haben die Validierung lediglich für „day-to-day“ oder für fünf Tage gezeigt. Bei der Analyse von den FoCus Urinproben werden jedoch Probenzahlen von mehr als 3000 erwartet.

Aus diesem Grund wurden die 80iger Batches fünffach injiziert (an fünf aufeinander folgenden Tagen), sodass über den kompletten Messzeitraum (von sieben Wochen) eine komplexe Matrix und realistische Probenbelastung für das System erzeugt wurde. Zusätzlich wurden jeden Tag noch drei unterschiedliche Arten von gepoolten Proben injiziert, die für die Analyse der Stabilität herangezogen wurde.

Die gewonnenen Daten wurden mittels des gezielten Ansatzes und sechs Leitsubstanzen, welche natürlicherweise in den Urinproben enthalten sind, ausgewertet. Diese Leitsubstanzen sind alle hochpolar (Wasser zu Oktanol Verhältnis um 0), haben ein Molekulargewicht von 90-250 Dalton und retardieren aus der Säule (während der Chromatographie) über die komplette Laufzeit (zu verschiedenen Zeitpunkten). Aus den Daten wurden für alle QC Proben die Intensitäten der Leitsubstanzen sowie die Retentionszeit bestimmt. Die Daten wurden dann statistisch auf Ausreißer überprüft und die relative Standardabweichung (RSD) wurde berechnet. Mit Hilfe der RSD wurden die Daten bewertet. Dafür wurden die Werte mit der „FDA Guideline für Studien mit biologischen Proben“ verglichen (U.S. Department of Health and Human Services FDA September 2013). Diese Guideline definiert RSD Werte die für „large-scale“ Ansätze zu tolerieren sind.

Als Ergebnis kann gezeigt werden, dass die gewählten Methoden, die Systeme (Massenspektrometer und LC) sowie die Proben über den kompletten Zeitraum innerhalb des tolerablen Bereiches schwanken. Das heißt, dass die Tag-zu-Tag aber auch die Woche-zu-Woche Reproduzierbarkeit für Studien die sieben Wochen laufen bzw. 3360 Proben beinhalten, kann als gegeben betrachtet werden.

Alle Daten wurden zusätzlich noch mit dem ungezielten Ansatz ausgewertet. Dafür wurde eine Hauptkomponenten-Analyse durchgeführt. Zu erwarten war, dass die gepoolten Proben in der Nähe des Ursprunges einen zentralen Cluster ausbilden und alle anderen Proben in einem weiteren Cluster liegen.

Abbildung 3 zeigt das Ergebnis einer solchen Hauptkomponenten Analyse. Die gepoolten Proben liegen nicht ganz im Ursprungspunkt bilden allerdings einen engen Cluster aus (bis auf wenige Ausnahmen). Die restlichen Probandenproben bilden den erwarteten großen Hauptcluster aus. Innerhalb dieses Clusters sind die wiederholten Injektionen der Probandenproben gut sichtbar (d.h. die Wiederholbarkeit ist gegeben). Ansonsten lassen sich auch Subcluster aufzeigen, die sich nicht auf die jeweilige Woche beziehen (also die Zeit) sondern probandenspezifische Gründe haben müssen.

Als nächstes wurden diese Subcluster zu analysiert und mittels der gewonnenen Phänotypisierungsdaten auf eventuelle Auffälligkeiten des Metaboloms für erkrankte (bspw. Diabetiker) gegen gesunde Probanden zu ermittelt.

Für diesen Ansatz wurden die Proben in beiden Ionisierungsformen gemessen. Auch wurden alle Proben fragmentiert analysiert, um mögliche gefundene Substanzen mit Hilfe zusätzlicher Fragment-Informationen genauer zu bestimmen.

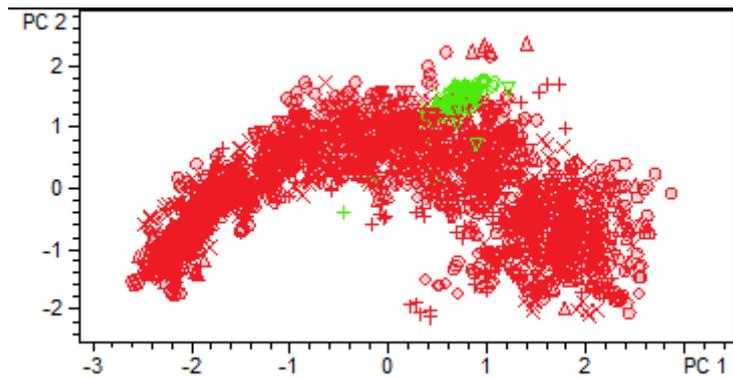


Abbildung 3 Plot einer Hauptkomponenten Analyse von 557 humanen Urinproben sowie gepoolter Kontrollen; die grünen Marker zeigen die Kontrollen und die roten Marker die jeweiligen Probandenproben

Zusätzlich zu dieser Studie wurden die Datenbanken für den gezielten Ansatz stetig weiter entwickelt (mittlerweile umfasst die Hauptdatenbank rund 750 Metaboliten, welche aus verschiedenen Studien abgeleitet wurden). Zusätzlich konnten eigene Marker identifiziert werden (bspw. Indoxylsulfate aus dem Thyrosinabbau). Die Entwicklung dieser Datenbank ist ein stetiger Prozess, sodass alle gefunden und interessanten Metaboliten dieser Datenbank hinzugefügt werden.

M 4.9.4 Versuchs- und Datenauswertung der Hauptversuche sowie Anwendung von Datenbanken und statistischer Verfahren zur Datenaufbereitung ist abgeschlossen (Projektmonat 30).

Für den Meilenstein 4.9.4 wurde die lokale Datenbank für die gezielte metabolomische Analyse weiter aufgebaut und mit Fragmentinformationen sowie Retentionszeiten (soweit vorhanden bzw. bekannt) unterfüttert, um die Wahrscheinlichkeit von falsch-richtigen zu minimieren. Die Datenbank umfasst mittlerweile mehr als 750 Substanzen, welche alle bereits in humanen Proben detektiert und nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 2 Ausschnitt aus der Humandatenbank für die gezielte metabolomische Analyse – Fortsetzung der Tabelle auf den nachfolgenden Seiten

Datenbankbeispiel					
m/z	Formel	Name	Qual1	Qual2	Qual3
483.113317	C21H22O13	(-)-Epigallocatechin-3,3,9 -glucuronide			
157.158692	C10H20O	(-)-Neoisomenthol			
382.238813	C21H32FNO4	(+)-AS 115	109.101	183.1735	127.1117
265.052906	C13H12O4S	(1R 2R)-3-[(1 2-Dihydro-2-hydroxy-1-naphthalenyl)thio]-2-oxopropanoic acid			
149.080835	C6H12O4	(2-methoxyethoxy)propanoic acid			
223.148127	C17H18	(all-E)-1 7 9-Heptadecatriene-11 13 15-triyne			
203.179427	C15H22	(E)-Calamene			
121.049535	C4H8O4	(S)-3 4-Dihydroxybutyric acid			
105.054621	C4H8O3	(S)-3-Hydroxyisobutyric acid			
241.016521	C10H8O5S	1 2-Dihydroxynaphthalene-6-sulfonate			
275.094771	C12H18O5S	1 4-Benzenediol 2 6-bis(1-methylethyl)- 4-(hydrogen sulfate)			
244.155672	C13H17N5	1-((4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl)methyl)-2-methylpyridinium	150.1022	94.0653	122.0709
257.024295	C11H10Cl2N2O	1-(2 4-Dichlorophenyl)-2-(1-imidazolyl)ethanol	125.0147	153.0092	188.9856
189.127392	C13H16O	1-(2 3 6-trimethyl phenyl)-3-Buten-2-one			
207.174342	C14H22O	1-(2 6 6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-1-penten-3-one			
175.148127	C13H18	1 2 3 4 Tetrahydro-1 5 7-trimethylnaphthalene			
173.132477	C13H16	1 2-Dihydro-1 1 6-trimethylnaphthalene			
75.091675	C3H10N2	1 3-Diaminopropane			
197.066917	C7H8N4O3	1 3-Dimethyluric acid	169.0722	149.0603	112.0507
121.014019	C4H8S2	1 3-Dithiane			
171.116827	C13H14	1 6 7-Trimethylnaphthalene			
331.226771	C21H30O3	17-Hydroxyprogesterone	97.064	109.0627	313.2099
189.127392	C13H16O	1-H-Inden-1-one 2 3-dihydro-3 3 5 6-tetramethyl			
103.075356	C5H10O2	1-Hydroxy-2-pentanone			
520.339766	C26H50NO7P	1-Linoleoylglycerophosphocholine GPCho(18:2)			
761.967119	C11H15N5O34	1-Methyladenosine			

m/z	Formel	Name	Qual1	Qual2	Qual3
115.111742	C7H14O	1-Methylcyclohexanol			
170.092403	C7H11N3O2	1-Methylhistidine			
138.078764	C7H9N2O	1-Methylnicotinamide			
183.051267	C6H6N4O3	1-methyluric acid	97.9677	155.0551	126.0279
167.056352	C6H6N4O2	1-Methylxanthine	110.0306	136.0124	
399.310501	C23H42O5	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol	117.0543	339.2885	265.2529
522.355416	C26H52NO7P	1-Oleoylglycerophosphocholine LysoPC(18:1)			
471.029934	C11H20O16P2	1-Phosphatidyl-1D-myo-inositol 3-phosphate			
282.127726	C21H15N	2 3 3-Triphenylacrylonitrile			
258.896233	C6HCl3O5-2	2 3 5-Trichloromaleylacetic acid			
302.232585	C16H31NO4	2 6 dimethylheptanoyl carnitine			
338.087043	C15H15NO8	2 8-Dihydroxyquinoline-beta-D-glucuronide			
488.313551	C25H46NO6P	2-(8-[3]-ladderane-octanyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine			
121.049535	C4H8O4	2 4-Dihydroxybutanoic acid			
91.075356	C4H10O2	2-3 Butanediol	72.0822		
491.355343	C30H50O3S	26 27-diethyl-1alpha 25-dihydroxy-22-thia-20-epivitamin D3			
200.091734	C9H13NO4	2-Acetyl-1 5 6 7-tetrahydro-6-hydroxy-7-(hydroxymethyl)-4H-azepine-4-one			
258.080793	C12H11N5S	2-Amino-6-(benzylthio)purine			
216.123034	C10H17NO4	2-amino-8-oxo-9 10-epoxy-decanoic acid			
162.076084	C6H11NO4	2-aminoadipic acid	98.0602	116.0705	144.0649
232.922412	C5H2BrClN4	2-BROMO-6-CHLORO-PURINE			
118.986989	C2H2ClF3	2-Chloro-1 1 1-trifluoroethane			
135.065185	C5H10O4	2-Deoxy-D-Ribose	99.0426	81.0328	
118.122641	C6H15NO	2-Diethylaminoethanol			
119.070271	C5H10O3	2-Ethylhydracrylic acid			
203.127786	C10H18O4	2-ethylsuberic acid			
170.044784	C7H7NO4	2-Furoylglycine	95.0128		
258.169985	C13H23NO4	2-Hexenoylcarnitine			
119.070271	C5H10O3	2-Hydroxy-2-methylbutyric acid			

m/z	Formel	Name	Qual1	Qual2	Qual3
142.06004	C5H10O3Na	2-hydroxy-2-methylbutyric acid Sodium Adduct	83.0864	123.1051	99.9353
133.085921	C6H12O3	2-Hydroxy-3-methylpentanoic acid			
125.059706	C7H8O2	2-hydroxybenzyl alcohol			
105.054621	C4H8O3	2-Hydroxybutyric acid			
119.070271	C5H10O3	2-Hydroxyvaleric acid			
103.038971	C4H6O3	2-Ketobutyric acid			
215.139019	C10H18N2O3	2-methoxy-N-[3-oxo-3-(pyrrolidin-1-yl)propyl]acetamide			
119.070271	C5H10O3	2-Methyl-3-hydroxybutyric acid			
131.070271	C6H10O3	2-Methyl-3-ketovaleric acid			
300.014499	C6H11N3O7P2	2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine diphosphate			
103.075356	C5H10O2	2-Methylbutyric acid			
246.169985	C12H23NO4	2-methylbutyrylcarnitine	85.0295	187.0966	144.1016
160.09682	C7H13NO3	2-Methylbutyrylglycine			
137.080835	C5H12O4	2-Methylerythritol			
147.065185	C6H10O4	2-Methylglutaric acid			
298.114595	C11H15N5O5	2-methylguanosine	166.0735	149.0474	215.0862
194.08117	C10H11O3N	2-methylhippuric acid	119.0491	91.0547	
473.131958	C19H25N2O10P	2-O-[2-(BENZYL OXY)ETHYL] THYMIDINE-5-MONOPHOSPHATE			
286.201285	C15H27NO4	2-Octenoylcarnitine			
101.096091	C6H12O	2-Oxohexane			
87.080441	C5H10O	2-Pentanone			
152.070605	C8H9NO2	2-Phenylglycine	79.0548	107.049	135.0434
142.966111	C3H4Cl2O2	3 3-dichloro-propionic acid			
197.066917	C7H8N4O3	3 7-Dimethyluric acid	182.0426	126.0653	139.0368

Für die gemessenen Probandenproben aus der Rekrutierungsphase der FoCUS Kohorte (4.1) wurden ebenfalls statistisch Modelle mit der Hauptkomponenten-Analyse berechnet und ausgewertet.

Die Datenauswertung mittels der Clusteranalyse zeigte jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Es ließen sich zwar Muster erkennen, diese korrelierten jedoch nicht mit einzelnen Metaboliten bzw. den definierten Parameter (wie BMI, inflammatorischen Status o.ä.).

Allerdings konnten die Messdaten aus der Rekrutierungsphase eingesetzt werden, um ein neues, erweitertes Probenvalidierungsverfahren zu etablieren. Dieses Verfahren basiert auf einem zweigliedrigen System aus Qualitätskontrollproben (QC), welche als gepoolte Proben bereits in der Literatur bekannt war. Jedoch wurde in unserem Verfahren die gepoolten Proben einmal wie die Probandenproben aufgearbeitet und darüber hinaus einmal unaufgearbeitet gemessen. Zusätzlich wurden die QC Proben alle mittels dem gezielten Ansatz (dafür wurden sechs Leitsubstanzen innerhalb der Probenmatrix gewählt) und dem ungezielten, statistischen Ansatz ausgewertet.

Durch den Einsatz beider Auswertungstechniken können Messfehler, -ausreißer sowie Systemfehler effektiv und statistisch abgesichert identifiziert werden. Dies ist notwendig, da etwaige Fehler die statistischen Modelle negativ beeinflussen und somit das Gesamtergebnis verfälschen. Nach dem Ausreißer-Test werden alle übrigen QC Proben sowie die Probandenproben in einem gemeinsamen Hauptkomponenten-Modell integriert, um die zu erwartende Clusterbildung (ein kleiner Cluster für die QC Proben sowie ein weit gestreckter für die Probanden) zu bestätigen.

Das zweistufige System ist deutlich unempfindlicher gegen statistische Fehler und systemische Ungenauigkeiten als die bisher publizierten und angewendeten Methoden. Der dazugehörige Artikel wurde im Journal „Bioanalysis“ publiziert (Januar Ausgabe 2015).

Zusätzlich zu der Etablierung und Veröffentlichung des Validierungsansatzes wurde eine weitere Studie durchgeführt, welche das Ziel hatte, eine kombinierte Methode zur Erfassung, Identifizierung sowie Quantifizierung von verschiedenen oxidativen Stressmarkern aus verschiedenen chemischen Stoffklassen zu etablieren. Diese Studie wurde mit Probanden (Tauchern) des Schifffahrtsmedizinischen Institutes durchgeführt.

Als Stoffklassen wurden die Gruppe der Prostaglandine, Guanosine sowie dihydroxylierte Benzoate ausgewählt. Als Probenmatrices wurde Urin von Tauchern kurz vor dem Tauchgang, direkt danach sowie nach einer sechs stündigen Regenerationsphase genutzt. Die Besonderheit bei der Untersuchung von Taucherurin ist, dass aufgrund der Flaschenatmung mit einem höheren Sauerstoffanteil es vermehrt zu oxidativen Stress kommt.

Als Ergebnis konnte gezeigt werden, dass alle drei Stoffklassen im Urin mittels LC/QToF-MS detektiert werden können. Der dynamische Messbereich lässt dabei die Parallelisierung zu, da das Molekulargewicht aller untersuchten Substanzen innerhalb eines Bereiches von 100-400 Dalton liegen. Auch die Quantifizierung mittels der QToF-MS konnte etabliert werden, hier zeigten sich jedoch noch Verbesserungsansätze, da die Streuung der einzelnen Messergebnisse über den kompletten Messzeitraum stark schwanken.

M 4.9.5 Entwicklung der Probenaufbereitung für Stoffwechselmetaboliten von Polyphenolen ist abgeschlossen (30 Monate).

Für die Entwicklung einer gezielten Erfassung von Polyphenol-Metaboliten im Urin und Plasma nach der Durchführung von Bioverfügbarkeits- bzw. Interventionsstudien mit polyphenolreichen Testlebensmitteln wurde neben dem Bereich der Probenaufarbeitung die Methodenentwicklung mittels verschiedener Massenspektrometer vorangetrieben.

Im Bereich der Probenaufarbeitung lag der Fokus neben der Matrixminimierung von biologischen Probenmaterialien auf der gezielten Anreicherung der Zielkomponenten mittels spezifischen Lösemittel-Fällungsreaktionen und Festphasenextraktionsmethoden. Um den Anforderungen der massenspektrometrischen Analytik gerecht zu werden, gilt es neben Proteinen, Phospholipide und weitere Matrixbestandteile zu minimieren, um die Sensitivität der Messung zu verbessern. Gleichwohl wurde hierbei darauf hingearbeitet perspektivisch ein hohes Probenaufkommen mit einer schnellen Routinemethode bearbeiten zu können. Die hierfür gewählten Festphasenkartuschen wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur Flavonoid Rückhaltung und Aufkonzentrierung mittels Gefriertrocknung in der Speedvac getestet. Für die Methodenentwicklung wurden zunächst Urinproben verwendet, welche entsprechend mit Quercetin-Dihydrat in Aceton als Standard versetzt wurden, um die Wiederfindung und Reproduzierbarkeit zu erfassen. Des Weiteren wurde der Einsatz von Apfelschalenextrakt als Standard genutzt, um neben der Form des Aglykons auch glycosidische Verbindungen detektieren zu können. Nach einem ersten Festphasenscreening wurde im Folgenden mit den Säulen Chromabond Easy, Chromabond C18 Hydra, Biotage Isololute und Oasis HLB weitergearbeitet.

Die besten Wiederfindungsergebnisse konnten mit der Oasis HLB erreicht werden. Trotz Methodenoptimierungen im Bereich der Säulenconditionierung, der Eluentenwahl, der Elutionsgeschwindigkeit und Gefriertrocknungsanpassungen lag die Reproduzierbarkeit der Analysen jedoch auch hier deutlich über den FDA Guidelines von maximal 20% für Minorkomponenten aus physiologischen Proben.

M 4.9.6 Entwicklung einer LC-MS Methode zur Erfassung der Stoffwechselmetaboliten der Polyphenole ist abgeschlossen (36 Monate)

Unter den UHPLC Säulen für Flavonoide eignete sich die Sphinx's Säule mit ihrer Phenol-C18-Silica Struktur sowie die HILIC UHPLC Säule, welche für den non-targeted Ansatz verwendet wurde. Zur Sensitivitätserhöhung der Massensignale der QTOF-MS wurden die Standardsubstanzen Quercetin-3-glucosid, das Aglikon Quercetin-Dihydrat als auch ein Ziel-Humanmetabolit Quercetin-3-sulfat in nicht physiologischen Konzentrationen mittels Direktinjektion vermessen und eine gezielte MS-Methode für die Zielmassen generiert. Hierbei wurden die spezifischen Geräteeinstellungen sowohl für den Quellenbereich als auch für den Ionentransfer modifiziert, um neben einer verbesserten Ionenausbeute ein stabiles Messsignal generieren zu können.

Die anschließende Analyse der Urinproben mittels UHPLC Sphinx's Säule und Kopplung an die QTOF-MS zeigt zwar deutliche Signale für die Standards, d.h. in gespickten Proben, jedoch konnten im physiologisch Bereich (ohne Standardaddition) nur Spuren einzelner Metaboliten mit dem Programm „Target Analysis“ zugeordnet werden. Die detektierten Signale im Massenspektrum liegen deutlich im Noise Bereich (Intensität <100) und liefern

trotz der hohen Empfindlichkeit und hohen Massengenauigkeit der Q-TOF Anlage keine Möglichkeit der zuverlässigen Quantifizierung und Darstellung von physiologischen Metaboliten-Profilen und physiologischen Konzentrationen bzw. Konzentrationsunterschieden des Probenmaterials.

Da es bedingt durch die Sensitivitätsgrenzen nicht möglich war, eine erfolgreiche Methodenetablierung für den Konzentrationsbereich der zu erwartenden physiologischen Metabolitenkonzentrationen zu etablieren, wurden keine Kooperationsmessungen mittels Triple Quad bei der Technischen Lebensmittel und Umweltanalytik GmbH Bremerhaven in Auftrag gegeben. Ein Vergleich der Methoden zur Messung von Polyphenol-Metaboliten aus Humanproben zwischen den beiden MS Systemen QTOF und Triple Quad wurde somit ausgeschlossen, da es nicht zielführend gewesen wäre.

Mittels UHPLC QTOF wurden Messungen durchgeführt zu Metaboliten in Proben, die aus einer Humanstudie mit Allicin sowie deren Derivaten von S-Allylcystein (Teilprojekt 3.4) stammen. Im Gegensatz zu Polyphenolen konnte Allicin im Teilprojekt 3.4 als sekundärer Pflanzenstoff stabil zum Transport an beta-Lactoglobulin gebunden werden. Hierbei entsteht S-Allylcystein. Hierfür wurde eine entsprechende Methodenentwicklung von der Aufarbeitung bis zur Detektion durchgeführt.

Die Humanstudie untersuchte die Bioverfügbarkeit von den Allicin Derivaten aus drei unterschiedlichen Formulierungen. Aus der Literatur ist bekannt, dass SAC und S-Allylmercaptogluthation die Hauptmetaboliten von Allicin im Plasma sind und auch nach der Aufnahme von fermentiertem Knoblauchextrakt, der SAC und SAMC enthält, im Plasma nachzuweisen sind. In der Humanstudie wurde sowohl Knoblauchpulver als auch fermentierter Knoblauchextrakt verabreicht. Über die SAC- und S-Allylmercaptogluthation-Konzentration im Plasma soll die Bioverfügbarkeit der oben genannten Schwefelverbindungen bestimmt werden.

Für die Entwicklung einer Quantifizierungsmethode wurden beide Marker als Reinsubstanz synthetisiert. Die Marker sind in dem relevanten Konzentrationsbereich (10-200 nM) nicht spektroskopisch erfassbar. Daher wurden verschiedene Derivatisierungsreagenzien getestet, mit denen die spektroskopische Detektierbarkeit der Metaboliten erhöht werden kann. Zu den getesteten Reagenzien zählen Dansylchlorid, Phenylisothiocyanat und o-Phthaldialdehyd. Letzteres erwies sich als geeignet und ermöglichte die Erfassung von Konzentrationen ≥ 10 nM mittels HPLC und Fluoreszenz-Detektion. Die Derivatisierungsmethode wurde durch Veränderung verschiedener Parameter (Konzentration und pH-Wert des Boratpuffers, verschiedene schwefelhaltige Co-Reagenzien, Mengenverhältnis von Derivatisierungsmittel und Zielsubstanzen) optimiert. Für die HPLC-Analyse ist eine Aufarbeitung der Plasmaproben notwendig. Verschiedene Lösungsmittel und Inkubationsbedingungen wurden getestet, um eine umfangreiche Proteinfällung mit gleichzeitig möglichst geringen Verlusten der Zielsubstanzen zu erreichen. Für eine ausreichende chromatographische Auftrennung der derivatisierten Plasmaproben wurden verschiedene HPLC-Säulen und Laufmittel getestet. Für die abschließende Auswertung konnte noch kein interner Standard als geeignete Verbindung ermittelt werden, sodass die Analyse der Plasmaproben aus der Humanstudie noch nicht abgeschlossen ist. Eine Auswertung dieser Humanstudie ist bisher nur in TP 3.4 über die Analyse der Atemgasproben erfolgt.

Arbeitspaket 3

M 4.9.7 Erfassung von MS-Ressourcen ist abgeschlossen (6 Monate).

Es wurde eine Abfrage aller Massenspektrometer an der CAU Kiel sowie den angrenzenden Forschungsbehörden durchgeführt und ausgewertet.

Bei dieser Abfrage zeigte sich, dass es sehr verschiedene Systeme mit einer Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten in Kiel gibt. Um diese technischen Ressourcen optimal zu nutzen, wurde eine Datenbank aller verschiedener Systeme, vorhandener Methoden sowie Ansprechpartner erstellt und im internen Bereich der FoCus-Homepage (www.focus.uni-kiel.de) den registrierten Nutzern zur Verfügung gestellt.

Diese Datenbank wurde darüber hinaus „offen“ gestaltet, sodass bisher nicht identifizierte Geräte im Nachhinein noch integriert werden konnten. Somit ist die Datenbank im Verlauf der Zeit stetig gewachsen und hat sich „selbst“ aktualisiert.

M 4.9.8 Erfassung von Methoden für die funktionelle Analytik abgeschlossen (12 Monate).

Neben der Datenbank für die instrumentelle massenspektrometrische Analytik wurde eine weitere Datenbank etabliert, welche die funktionelle Analytik umfasst. Dazu wurde im FoCus-Netzwerk eine Abfrage nach den verschiedensten analytischen Techniken getätigt. Zusätzlich wurden die jeweiligen Ansprechpartner, bisher etablierte Applikationen sowie (soweit vorhandene) Literaturstellen mit erfasst.

Diese Datenbank wurde ebenfalls im internen Bereich der FoCus-Homepage den Mitgliedern des FoCus Projektes zur Verfügung gestellt, damit die vorhandenen analytischen Kenntnisse und Methoden optimal genutzt werden können.

M 9.4.9 Referenzmaterialien für vergleichende Untersuchungen wurden bestimmt (18 Monate)

Als Referenzmaterialien für vergleichende Analysen sowohl innerhalb des TP 4.9 als auch an analytischen System in anderen TP / Forschungsstellen wurden gepoolte Proben (sogenannte QC Proben) vorbereitet und etabliert.

Der Vorteil von gepoolten Proben ist, dass sie eine analytische Komplexmatrix wie die eigentlichen Messproben besitzen, da der „Pool“ aus den vorhandenen Probandenproben generiert wird. Dadurch beinhaltet eine solche Probe alle analytischen Merkmale / Eigenschaften, die auch in den Probandenproben enthalten sind.

Solche QC Proben werden sowohl von den Probandenrekrutierungsproben als auch von den Probenmaterialien der Interventionsstudie I / II (als auch später von III) gebildet und bei -80 °C gelagert.

Als Referenz innerhalb der Proben werden Markersubstanzen gewählt, welche natürlicherweise in den Proben enthalten sind. Dadurch müssen keine Standards (= Internen Standards) zugespielt werden. Ein Zufügen von externen Substanzen bedeutet immer ein

verschieben der vorhandenen Matrix der QC Proben gegenüber den Probandenproben und wirkt sich somit negativ auf die Detektion aus.

Als Markersubstanzen werden 6-8 Substanzen gewählt, welche alle verschiedene Intensitätslevels sowie Retentionszeiten besitzen, sodass der komplette Lauf gut abgebildet wird. Die QC Proben werden dann jeweils alle ca. 20-30 Läufe innerhalb einer Studie gemessen, und die Markersubstanzen werden in ihrem analytischen Verhalten verfolgt. Darüber hinaus kann dieses Verhalten auch an anderen analytischen Systemen bestimmt und verfolgt werden, was die Vergleichbarkeit der analytischen Methode signifikant verbessert und erleichtert.

Arbeitspaket 4

M 4.9.10 Analyse von Probenmaterialien aus Interventionsstudie mit Milchproteinhydrolysat ist erfolgt (Projektmonat 48)

Im Berichtszeitraum 2015 wurde im Teilprojekt 4.9 ein Interventionsstudie wie im Meilensteinplan veranschaulicht analysiert. Dafür wurden die Methoden und Techniken angewandt, welche in den vorigen Meilensteinen erfolgreich entwickelt, adaptiert und implementiert wurden.

Für die Interventionsstudie (durchgeführt von TP 4.1) wurden 40 Probanden ausgewählt und über den Zeitraum von 20 Wochen (mit jeweils zwei Wash-out-Phase) interveniert.

Dafür wurde ein Milchproteinhydrolysat (TP 3.2) entwickelt, welches sich durch eine hohe Dichte an bioaktiven Peptiden auszeichnet. Für dieses Hydrolysat wurde ein Testlebensmittel entwickelt und in die erste Interventionsstudie verwendet. Die Studienprobanden nahmen täglich eine definierte Menge des Interventionslebensmittels zu sich. Um den Verlauf bzw. die Veränderungen der Blutparameter zu verfolgen, wurde in regelmäßigen Zeitintervallen den Probanden Proben (Blut und Urin) entnommen. Daraus resultierend ergaben sich für jeden Probanden sechs Probensätze: Eine direkt vor dem Studienstart (T0, nach der Wash-out-Phase), sowie während der Interventionsphase jeweils eine nach vier und acht Wochen. Anschließend erfolgte eine erneute Wash-Out-Phase und eine erneute Probenentnahme zu T12, T16 sowie T20.

Für die Analyse dieser Interventionsstudie mittels Flüssigkeitschromatografie gekoppelt an ein hochauflösendes Massenspektrometer (LC-QToF-MS) wurden die Urinproben der Probanden heran gezogen.

Die Probenaufarbeitung erfolgte mittels des Dilute & Shoot Ansatzes. Um eine vergleichbare Konzentration der Urinproben zu erreichen, wurden in alle Proben die Kreatininkonzentration mittels der Jaffe-Methode bestimmt. Kreatinin wird relativ stabil vom Körper ausgeschieden, sodass über die Konzentration des Kreatinin der Verdünnungsgrades des Urins bestimmt werden kann.

Damit eine statistische Evaluation der Messergebnisse erreicht werden kann, ist es wichtig, die Urinproben auf eine Konzentration (bezogen auf Kreatinin) einzustellen. Dafür wurde jeweils die Urinkonzentrationen der Probanden pro Zeitraum (bspw. W0-W12) bestimmt. Die Urinproben wurden anschließend auf den der niedrigsten Wert pro Proband verdünnt, sodass am Ende alle drei Urinproben pro Messreihe eine vergleichbare Konzentration

besaßen. Dadurch konnten alle Proben pro Interventionsphase in einem PCA-Modell ausgewertet werden.

Die Proben wurden nach der Einstellung bezogen auf den Kreatininwert mit angesäuertem Wasser (0.1 % Ameisensäure in ultra-pure Wasser) versetzt (1:3) und dann bis zum Zeitpunkt der Analyse bei -80 °C gelagert.

Die Chromatographie wurde mittels des HILIC Verfahrens durchgeführt, um vor allem die hoch-polaren Verbindungen (organische Säuren und andere polare Verbindungen) gut aufzutrennen. Die Proben wurden im Massenspektrometer sowohl im positiven als auch negativen Modus analysiert, da z.T. einige Metaboliten sich nur in einer Ionisationsform analysieren lassen. Da darüber hinaus eine breite Molekülgröße abgedeckt werden sollte, wurden alle Proben sowohl mit einer „Small-Molecules“-Methode (Molekulargewichtsbreite zwischen 90-300 Dalton) sowie einer „Middle-Small-Molecules“-Methode (Molekulargewichtsbreite zwischen 200-1000 Dalton) analysiert.

Um statistisch valide Daten zu erhalten und den Zufallsfehler zu minimieren, wurden alle Proben dreifach aufgearbeitet und analysiert. Daraus ergaben sich pro Proband 24 Datenfiles bzw. 72 für die dreifache Bestimmung.

Die Datenauswertung erfolgte vor allem mit der Hauptkomponentenanalyse. Einzelne Signale wurden anschließend mit diversen Algorithmen prozessiert, um sowohl die Molekülmasse zu bestimmen als auch mögliche Summenformeln bzw. Verbindungen abzuleiten. Zur Identifizierung wurden auch Fragmentinformationen für die jeweiligen Proben herangezogen.

Bei der Probenprozessierung ergab sich jedoch, dass nicht alle 40 Probanden auch zu jedem Probenstag (n=6) Urin abgegeben haben. Da sich das Metabolom zwischen Männern und Frauen signifikant unterscheidet, wurde der einzige männliche Proband aus der Ergebnisevaluation genommen ebenso wie Probanden, die nicht alle Proben geben konnten.

Daraus resultiert eine Fallgröße von n=23 Probanden. Die Verteilung dieser Probanden auf die verschiedenen BMI Klassen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 Das Probandenkollektiv der Interventionsstudie, eingeteilt in den BMI-Index

Class	BMI (kg/m ²)	all 38 test persons and percentage	positive ionization: remaining 23 test persons	negative ionization: remaining 25 test persons
underweight	< 18.5	0	0	0
normal	18.5 – 24.9	3 (8 %)	3 (13 %)	3 (12 %)
overweight	25 – 29.9	6 (16 %)	5 (22 %)	5 (20 %)
obese class I	30 – 34.9	6 (16 %)	3 (13 %)	3 (12 %)
obese class II	35 – 39.9	7 (18 %)	3 (13 %)	3 (12 %)
obese class III	≥ 40	16 (42 %)	9 (39 %)	11 (44 %)

Abbildung 4 zeigt ein Hauptkomponentenmodell der Probanden (n=23, positiver Ionisation und „Small-Molecule“-Methode). Die grüne Farbe symbolisiert Probandenproben, welche in der Interventionsphase waren, die roten Proben sind die jeweiligen Kontrollen. Die Symbole stehen jeweils einen Probanden.

Auf der Abbildung ist ersichtlich, dass die jeweiligen Probandenproben (Interventions- und Kontrollphase) innerhalb eines Clusterbereiches liegen. Es lässt sich jedoch kein Zusammenhang zwischen Intervention und Kontrolle abbilden. Generell lässt sich noch ein „engerer“ Cluster (= Mitte rechts bis Mitte oben) ablesen, dieser lässt jedoch keine Aussage über die Zusammensetzung zu. Dieser Cluster steht in keinem Zusammenhang zu den Proben (weder zum Messzeitraum noch zur Probenentnahme), er bleibt somit unbekannt.

Auch konnte kein Zusammenhang zwischen den BMI-Eingruppierung und den Interventionspunkten festgestellt werden. Es zeigt sich zwar, dass die meisten normalgewichtigen Probanden im oberen Zentrum clustern und die stark Adipösen (Stufe 3) eher im unteren Bereich des Diagrammes, jedoch gibt es in beiden Clusterbereichen auch starke Ausreißer, sodass der Zusammenhang schwach ist, jedoch bei höheren Probandenzahlen ggf. deutlicher hervor tritt.

Generell lässt sich jedoch aufgrund der Wiederholungen (n=3) zeigen, dass die Messungen eine gute Wiederholbarkeit aufweisen und enge Cluster gebildet haben. Somit kann ausgeschlossen werden, dass Messfehler oder Ungenauigkeiten innerhalb der Messungen zu den Verschiebungen der Cluster bzw. zu falschen Ergebnissen geführt haben.

Die Ergebnisse für den negativen Ionisationsbereich sowie für den größeren Daltonbereich sind äquivalent zu den gezeigten. Somit lassen sich keine Effekte der Intervention auf das gesamte Urinmetabolom der Probanden ableiten. Es konnten auch keine spezifischen Biomarker für das Proteinhydrolysat gemessen bzw. identifiziert werden.

Neben den Urinproben sind auch Zellversuche mit dem Interventionsmaterial Milchproteinhydrolysat durchgeführt wurden. Dabei wurden Zelllinien mit dem Hydrolysat mit unbehandelten Zellen verglichen. Um einen möglichen falsch-positiven Effekt auszuschließen, wurde eine dritte Zelllinie mit einem weiteren Hydrolysat behandelt, welches nicht mit positiven anti-inflammatorischen Eigenschaften beschrieben bzw. nachgewiesen werden konnte.

Bei diesen Zellversuchen, welche auf einer ultra-hochauflösenden FT-ICR-Plattform (TP 5.4) durchgeführt worden sind, konnte ein metabolomischer Effekt vom Hydrolysat nachgewiesen werden (s. Abb. 4).

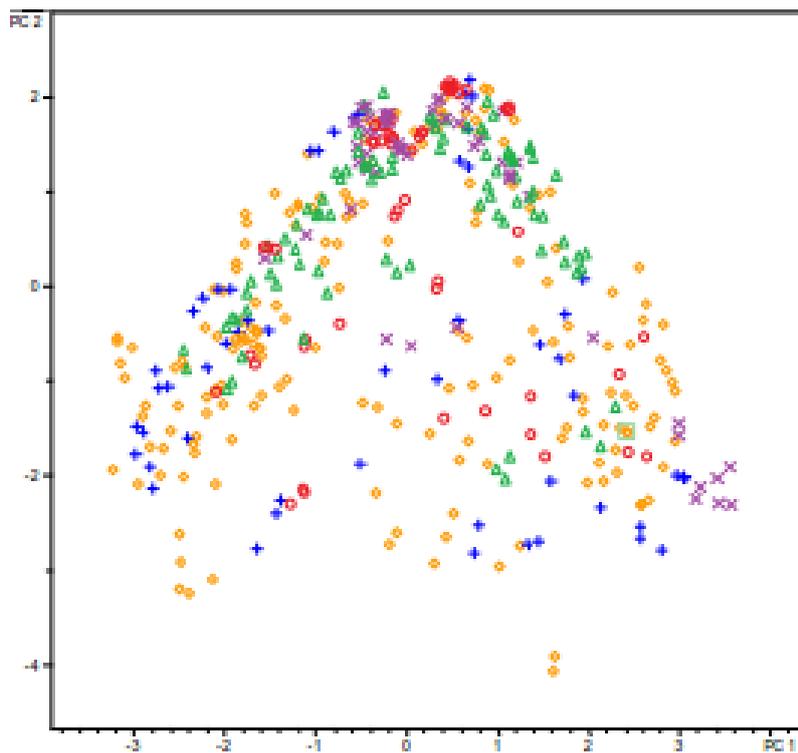
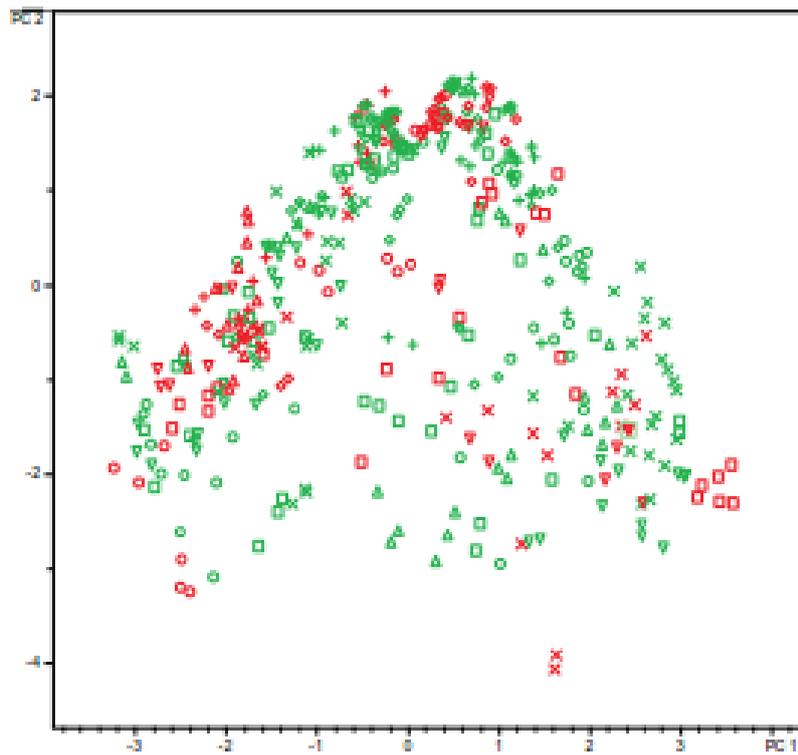


Abbildung 4 Oberes Modell: Hauptkomponentenmodell der Interventionsstudie, gemessen mit der positiven "Small-Molecule"- Methode; grün = mit Intervention-Lebensmittel, rot = jeweilige Kontrolle; Symbole = jeweiligen Probanden; Unteres Modell: Eingruppierung der Proben nach den BMI-Werten (normaler BMI= rote Kreise; übergewichtig = grüne Dreiecke; Adipositas Stufe 1 = lila Kreuze; Adipositas Stufe II = blaue Plusse und Adipositas Stufe 3 = gelbe Rauten

M 4.9.11 Analyse von Probenmaterialien aus der Interventionsstudie mit Milchligosaccharide ist erfolgt (Projektmonat 60)

Die Auswertung einer humanen Interventionsstudie mit Milchligosacchariden konnte aufgrund von technischer Problemen bei der Progenerierung und -lagerung nicht bis zum Abschluss des Berichtes erfolgen.

Um sich einen Überblick über mögliche Effekte von den Milchligosacchariden schon zum jetzigen Zeitpunkt zu verschaffen, wurden in Kooperation mit dem Max-Rubner-Institut Kiel (TP 5.2, Herr Klempt) Analysen an Zellkulturen durchgeführt.

Dafür wurden CaCo-Zellen mit der 1. Entwicklungsstufe (Dünndarm) verwendet. Die Zellen wurden daraufhin geteilt und z.T. mit dem Interventionsmaterial, mit anderen Oligosacchariden sowie einer reinen Kontrolle behandelt.

Die gewonnenen Zellproben wurden mittels eines Säureaufschlusses mit Hilfe von Ultraschall aufgespalten und extrahiert. Die Zellflüssigkeit wurde anschließend mittels dem SIMPLEX Ansatzes extrahiert, um eine polare Phase, eine unpolare sowie eine Protein Phase zu gewinnen. Jede einzelne Probe wurde anschließend sowohl mittels der FT-ICR-MS (TP 5.4) also auf mittels der LC-QToF-MS gemessen.

Die Ergebnisse der beiden Massenspektrometer werden im Folgenden miteinander verglichen, damit ein möglichst umfassendes Bild des Zellzustandes abgebildet werden kann.

2. Wichtigste Position des zahlenmäßigen Nachweises

Die zur Verfügung gestellten Gelder wurden in den fünf Jahre Projektlaufzeit effektiv eingesetzt, um eine hocheffektive und funktionierende Metabolomics-Plattform an der CAU Kiel zu etablieren.

Für die Etablierung des Projektes wurde der beantragte und bewilligte Finanzrahmen eingehalten. Bewilligt wurden:

- Personal Pos 0812: 214.300 €
- Verbrauchsmaterial Pos 0843: 43.500 €
- Vergabe von Aufträgen Pos 0835: 15470 €
- Dienstreisen Pos 0846: 3500 €

Für die Wahrnehmung dieser Plattform wurden verschiedene Poster und Vorträge auf nationalen und internationalen Tagungen bzw. Konferenzen gehalten. Durch den Einsatz der Webseite konnte darüber hinaus auch die Plattform für andere Gruppen an der CAU bzw. den angrenzenden Forschungseinrichtungen (UKSH, FZ Borstel usw.) geöffnet und bekannt gemacht werden, sodass eine weitaufgefächerte Nutzung der geförderten Ressourcen gewährleistet wird.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Innerhalb des Förderzeitraumes konnte an der CAU Kiel eine hochwertige Plattform etabliert werden. Da es zu Beginn der Förderzeitraumes noch keine Metabolomics Plattform in Kiel

gab, mussten alle analytischen Schritte (von der Probengewinnung, -aufarbeitung, -messung sowie -auswertung) adaptiert, optimiert und etabliert werden.

Dies ist innerhalb des zur Verfügung gestellten Zeitraumes gelungen und wurde auch durch gut platzierte Publikationen in der wissenschaftlichen Community bekannt gemacht.

4. Verwertungsplan

Die Plattform ist bereits in verschiedene Folgeprojekte mit eingeplant bzw. integriert. So konnte, basierend auf den Ergebnissen von TP4.9, ein Zusatzförderantrag erfolgreich gestellt werden, durch den ein weiteres „omics“-Teilprojekt für die Unterdisziplin der Metabolomics, die Lipidomics, eingeworben und etabliert werden. Darüber hinaus gibt es verschiedene Kooperationen innerhalb der Universität und des UKSH in Kiel, welche sich auf die entwickelten Methoden aus dem FoCUS-Projekt beziehen.

Darüber hinaus wurde die Plattform für verschiedene Anträge im nationalen und internationalen Umfeld eingesetzt (z.B. ERA-HDHL Call for Joint Transnational Research Proposals: “Biomarkers for Nutrition and Health” 2016). Die Entscheidung über diese Projekte steht noch aus.

Ausgehend von diesem Projekt wurde das Netzwerk „spectromics“ (www.spectromics.uni-kiel.de) zusammen mit anderen Einrichtungen der Universität gegründet, um dem Bedarf an massenspektroskopischen und metabolomics-Analysen besser begegnen zu können.

5. Bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet

Während des Förderzeitraumes wurden kontinuierlich neu publizierte Studien in die eigene Arbeit integriert, sodass neue Erkenntnisse die eigene Arbeit beschleunigen.

Ein generelles Problem bei Humanproben ist jedoch, dass analytische Methoden zur Probenaufarbeitung und -messung nicht direkt in die eigene Probenpipeline integriert werden können. Nichts desto trotz wurden Erkenntnisse z.B. im Hinblick auf die Probenstabilität, der Ergebnisvalidierung (Quality-Kontroll-Samples) sowie der bioinformatischen Datenauswertung genutzt, um exakte und reproduzierbare Ergebnisse zu erzeugen.

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Aus dem TP 4.9 sind eine Reihe von Postern und Vorträgen in verschiedenen Tagungen und Konferenzen entstanden. Darüber hinaus konnte im Januar 2015 eine Publikation im Journal „Bioanalysis“ sowie eine Publikation im Jahre 2014 in der nationalen (sowie auch der internationalen) Ernährungsumschau platziert werden.

Ausgewählte Tagungsbeiträge:

Demetrowitsch T. J., Petersen B., Koch A., Schwarz K. Methodvalidierung für die Analyse von humanen Urinproben mittels LC/QToF-MS. Bruker Anwendertreffen 2014 (Vortrag 17.02.2014, Berlin)

Demetrowitsch T. J., Kaehler W., Koch A., Schwarz K. Measurement of urine parameters of oxidative stress with time-of-flight mass spectrometry. "EUBS - European Underwater and Baromedical Society" (Poster, 24.-27.09.2014, Wiesbaden).

Demetrowitsch T. J., Schwarz K. Metabolomische Studien in der Gesundheitsforschung. Food-Nutrition-Health Tagung in Kiel (Vortrag, 12.-13.05.2015)

Wesseling A., Demetrowitsch T. J., Schwarz K. and Ober D. Pyrrolizidine alkaloids in the Lolium-Festuca species complex Botanikertagung in München. (Poster, 30.08.-03.09.2015)

Wesseling A., Demetrowitsch T. J., Schwarz K. and Ober D. Pyrrolizidine alkaloids in the Lolium-Festuca species complex. DGMS-Tagung Hamburg (Poster, 28.02.-02.03.2016)

Demetrowitsch T.J., Jensen-Kroll J., Placzek M., Schwarz K. Metabolomics and Lipidomics-platform at the CAU Kiel Applications of an ultra-high resolution mass spectrometer. Summerschool des Exzellenzcluster "Inflammatory at Interfaces" (Poster, 11.-13.07.2016)

Publikationsliste

Demetrowitsch T.J. Method development and validation for human metabolomic experiments by LC/QTOF-MS. (Dissertation, ISBN: 978-3-86247-493-6)

Demetrowitsch T. J., Petersen B., Keppler J. K., Koch A., Schreiber S., Laudes M., and Schwarz K. (2015) Validation of a 2-step-QC-approach for a large-scale human urine metabolomic study conducted in 7 experimental batches with LC/QTOF-MS. In: Bioanalysis: Volume 7, Nr.1 (DOI: [10.4155/BIO.14.270](https://doi.org/10.4155/BIO.14.270))

Demetrowitsch T. J., Schwarz, K. (2014). Metabolomics: new analytical methods for metabolome research. Ernährungsumschau International (DOI: 10.4455/eu.2014.019)

Demetrowitsch T. J., Schwarz, K. (2013). Neue Analysetechniken - mehr Daten, mehr Informationen. Schriftenreihe der öffentlichen Hochschultagung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. (Volume 120, Site 155-162, ISSN: 1612-6300)

Wesseling A., Demetrowitsch T. J., Schwarz K. and Ober D. (submitted in Phytochemistry) Characterization of pyrrolizidine alkaloid occurrence the subfamily Pooideae (Poaceae).

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel AgroClustEr: FoCus – Food Chain Plus Verbund „Gesundheitliche Bewertung und Konsumentenverhalten“ TP4.9 HealthMetabol	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Schwarz, Karin Demetrowitsch, Tobias	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.3.2016
	6. Veröffentlichungsdatum September 2016
	7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Christian-Albrechts-Universität Kiel Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde Abt. Lebensmitteltechnologie Prof. Dr. Karin Schwarz Olshausenstr. 40 24118 Kiel	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen FKZ0315540A
	11. Seitenzahl 28
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 21
	14. Tabellen 3
	15. Abbildungen 4
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung Ziele dieses Teilprojektes waren <ul style="list-style-type: none"> • die Entwicklung von Methoden zur Erfassung des Metabolitenspektrum in biologischen Proben • die Untersuchung von Effekten der Zufuhr von funktionellen Lebensmittelinhaltsstoffen auf das Metabolitenspektrum • die fachliche Ausgestaltung einer Netzwerkplattform für Funktionelle Analytik und Metabolomik 	
19. Schlagwörter Metabolomics, funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe	
20. Verlag	21. Preis