

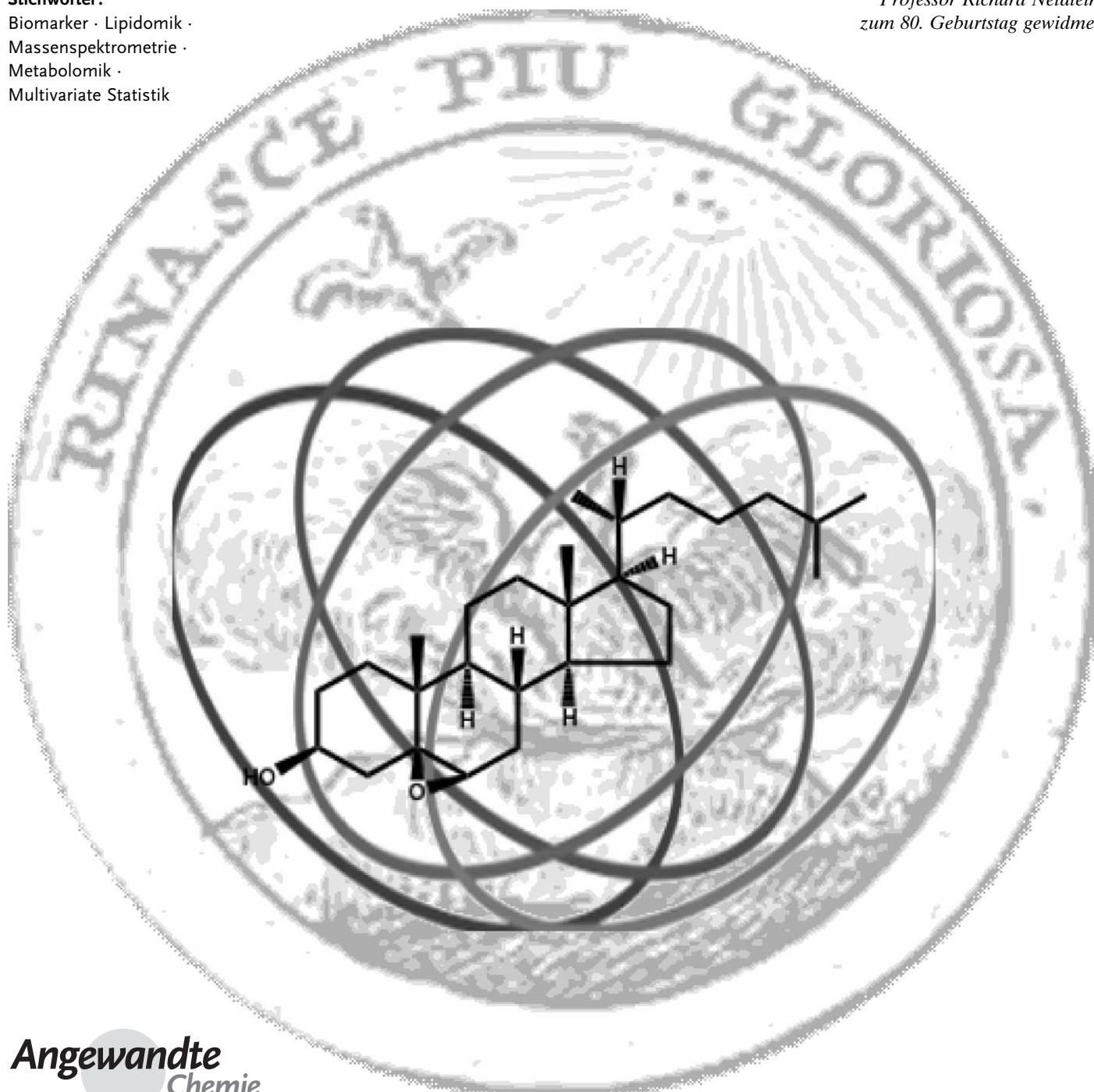
# „Targeted Metabolomics“ in der Biomarkerforschung

William J. Griffiths, Therese Koal, Yuqin Wang, Matthias Kohl, David P. Enot und Hans-Peter Deigner\*

**Stichwörter:**

Biomarker · Lipidomik ·  
Massenspektrometrie ·  
Metabolomik ·  
Multivariate Statistik

Professor Richard Neidlein  
zum 80. Geburtstag gewidmet



**D**er Begriff „Metabolomics“ bezeichnet ein wissenschaftliches Be-tätigungs-feld, das im ureigenen Sinn interdisziplinär ist und in dem analytische Chemie, Plattformtechnologie, Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie sowie Datenanalyse kombiniert zum Einsatz kommen. Angewendet in der Biomarkerforschung schließt das Gebiet die Pathobiochemie, Systembiologie, Medizin und molekulare Diagnos-tik mit ein, ebenso wie Bioinformatik und multivariate Statistik. Nachdem Metabolomics-Ansätze im Screening angeborener Stoffwechselstörungen bei Neugeborenen mittlerweile fest etabliert sind, weitet sich die Anwendung in der diagnostischen Forschung gegen-wärtig auf eine zunehmende Zahl an Erkrankungen aus. Hier werden die wichtigsten technischen Voraussetzungen sowie neuere Entwick-lungen auf den Gebieten Metabolomics und Datenanalyse herausge-stellt. Das Hauptaugenmerk liegt auf der Biomarker-Identifizierung und -Qualifizierung sowie auf „Targeted Metabolomics“ mithilfe von Hochdurchsatz-Massenspektrometrie.

## 1. Einleitung

Auf dem Gebiet der Bioanalytik werden in jüngster Zeit ehrgeizige „Metabolomics“-Konzepte vorangetrieben, deren Ziel es ist, möglichst alle niedermolekularen Verbindungen (mit Molekulargewichten unter 1500 Dalton) zu quantifizieren, die in einem biologischen System oder unter bestimmten physiologischen Bedingungen vorhanden sind. „Metabolomics“ als Reinkarnation einer wissenschaftlichen Disziplin zu bezeichnen mag überzogen sein, tatsächlich hat sich dieses Feld in den letzten zehn Jahren von der Anwendung etablierter Plattformen bis hin zur Entstehung gänzlich neuer Technologien rasant weiterentwickelt.<sup>[1–9]</sup> Neben der erfolg-reichen Entwicklung von „omics“-Technologien, die man überwiegend mit dem Proteom oder dem Genom in Verbin-dung bringt, liefert nun eine umfängliche Bestimmung von Metaboliten aus Körperflüssigkeiten oder Gewebe eine Si-gnatur des metabolischen Phänotyps, die unser Verständnis von Krankheiten und von toxikologischen Mechanismen am Ende der biologischen Reaktionskette vertieft und ergänzt.

Die Suche nach dem Ursprung von Metabolomics führt uns weit in die Historie der analytischen Chemie, in eine Zeit, bevor die Begriffe „Metabolom“,<sup>[10]</sup> „Metabonomics“<sup>[11]</sup> und „Metabolomics“ etabliert waren. Die wissenschaftliche Me-tabolom-Forschung begann zwar schon in den späten sechziger Jahren, das Feld erfreut sich aber erst seit fünf Jahren unter der Bezeichnung Metabolomics einer großen Aufmerksam-keit. Der Beginn dieser Entwicklung ist im Jahr 1966 anzusiedeln, als Dalgliesh et al. Gaschromatographie (GC) mit Flammenionisationsdetektion (FID) für Metabolismus-Un-tersuchungen kombinierten.<sup>[12]</sup> Im Jahr 1971 formulierten Robinson und Pauling das grundlegende Konzept, dass Daten, welche den funktionellen Zustand eines komplexen biologischen Systems wiedergeben, aus den qualitativen und quantitativen Metabolitenmuster von Körperflüssigkeiten erhoben werden können.<sup>[13]</sup> Gleichzeitig beschrieben Horning und Horning Ergebnisse der Gaschromatographie einer Pa-

## Aus dem Inhalt

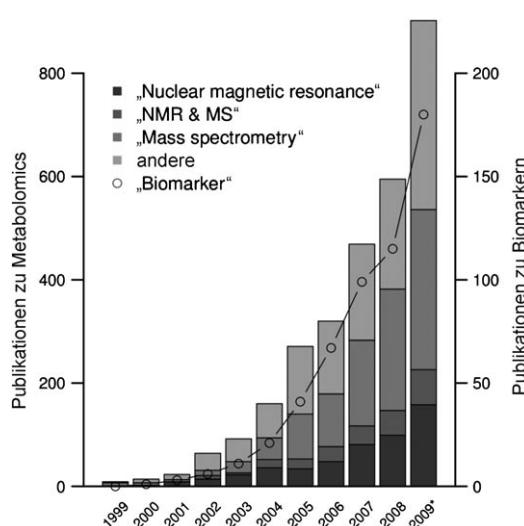
1. Einleitung	5555
2. Warum „Targeted Metabolomics“?	5556
3. Massenspektrometrische Analyse für „Targeted Metabolomics“	5556
4. Probenvorbereitung für FIA-MS/MS und HPLC-MS/MS	5557
5. HPLC-MS/MS-Analyse von Lipiden in Körperflüssigkeiten	5558
6. Probenvorbereitung für die GC-MS-Analyse	5560
7. GC-MS-Analyse von Cholesterolmetaboliten in Körperflüssigkeiten	5560
8. Datenanalyse	5561
9. Anwendungen bei Erkrankungen: Biomarker und Metabolomics	5564
10. Jenseits der Datenintegration	5568
11. Herausforderungen bei der Biomarkeranalyse	5570
12. Schlussfolgerungen und Ausblick	5571

tientenprobe als „Metabolic Profiling“,<sup>[14]</sup> und Mamer et al. untersuchten Säuren aus Urin mit GC-MS.<sup>[15]</sup>

Innerhalb der letzten zehn Jahre hat sich die Zahl wis-senschaftlicher Veröffentlichungen, die sich mit dem simul-anen Messen endogener Verbindungen mit Kernresonanz-

[\*] Dr. T. Koal, Dr. D. P. Enot, Priv.-Doz. Dr. H.-P. Deigner  
BIOCERATES Life Sciences AG  
Innrain 66A, 6020 Innsbruck (Österreich)  
Fax: (+43) 512-579-823-4270  
E-Mail: hans-peter.deigner@biocrates.com  
Homepage: <http://www.biocrates.com>  
Dr. W. J. Griffiths, Dr. Y. Wang  
Swansea University, School of Medicine  
Institute of Mass Spectrometry  
Singleton Park, Swansea SA2 8PP (Großbritannien)  
Dr. M. Kohl  
Universität Bayreuth, Mathematisches Institut  
95440 Bayreuth (Deutschland)

spektroskopie (NMR) und Massenspektrometrie (MS)<sup>[16–26]</sup> befassen, explosionsartig entwickelt. Wie anhand der Zahl an Publikationen in PubMed nachweisbar ist (Abbildung 1), wird MS hier seit 2005 deutlich gegenüber NMR bevorzugt



**Abbildung 1.** Zahl an Publikationen in PubMed zu folgenden Suchbegriffen: metabolomic\*, metabonomic\*, „metaboli\* profiling“, „metaboli\* fingerprinting“ und/oder lipidomics (linke senkrechte Achse), aufgeschlüsselt nach dem Auftreten der Begriffe „Nuclear Magnetic Resonance/NMR“, „Mass Spectrometry/MS“ und „Biological Marker/ Biomarker“ in Titel und/oder Kurzzusammenfassung und MeSH-Stichwörtern (rechte senkrechte Achse).

(Verhältnis etwa 2:1). Während die leichte Verfügbarkeit von Messinstrumenten, die etablierte Datenprozessierung und eine zerstörungsfreie Analyse für die Verwendung von NMR-Spektroskopie sprechen, lässt sich der Trend zur Massenspektrometrie durch Vorteile wie größere Empfindlichkeit, Unterscheidung der Metabolite, bessere Abdeckung des Gesamtmetaboloms und Modularität mit einer an unterschiedliche Verbindungsklassen anpassbare Analytik erklären. Unter 2169 Publikationen, die sich mit Metabolomics befassen und mit Medical Subject Headings (MeSH) bei MEDLINE erfasst sind, beschäftigen sich mehr als 90 % mit

lebenden Organismen, insbesondere mit Körperflüssigkeiten von Wirbeltieren und mit Pflanzen.

Die Biomarkerforschung mithilfe von „Metabolomics“, insbesondere „Targeted Metabolomics“ (Abbildung 1), hat ein großes Potenzial sowohl zur Auffindung von Markern als auch zur Markervalidierung.<sup>[27–40]</sup> Hier behandeln wir neuere Entwicklungen der quantitativen Hochdurchsatz-Massenspektrometrie und in Metabolomics, wobei wir auch unsere persönliche Sicht einfließen lassen wollen. Den Schwerpunkt haben wir auf Aspekte mit Relevanz zur Identifizierung von Biomarkern gelegt, was technologische Trends, analytische Methoden, biomedizinische Anwendungen und Datenanalyse mit einschließt.

## 2. Warum „Targeted Metabolomics“?

Es gibt bisher kein analytisches Einzelverfahren, das in der Lage ist, gleichzeitig alle Zielmetaboliten zu identifizieren und reproduzierbar mit hoher Genauigkeit zu quantifizieren. Diesbezüglich haben sich zwei verschiedene Metabolomics-Ansätze etabliert: „Targeted Metabolomics“ und „Non-Targeted Metabolomics“. Das zuletzt genannte Verfahren, Non-Targeted Metabolomics, wird in der Regel für eine globale Metabolomanalyse verwendet, wobei alle detektierbaren Analyte im Probenextrakt mit hochauflösender Massenspektrometrie oder NMR-Spektroskopie erfasst und analysiert werden. Ziel dabei ist es, möglichst alle detektierten Signale auch zu identifizieren. Dazu ist es notwendig, die Rohdaten mit chemometrischen Methoden zu komprimieren und diese reduzierten Datensätze durch Abgleich mit Bibliotheken und Datenbanken oder mit weiteren analytischen Verfahren auszuwerten, um die zuvor unbekannten Metaboliten zu identifizieren. Im zuerst genannten Ansatz, Targeted Metabolomics, werden dagegen zuvor ausgewählte, spezifische Metabolitsignale detektiert (durch „selected reaction monitoring“ (SRM) in der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) oder „selected ion monitoring“ (SIM) bei einfacher MS), um für eine begrenzte Zahl an bekannten endogenen Metaboliten die relativen Intensitäten und absoluten Konzentrationen genau zu ermitteln.

## 3. Massenspektrometrische Analyse für „Targeted Metabolomics“

Non-Targeted Metabolomics bietet die Möglichkeit einer De-novo-Analyse. Dabei werden die potenziell detektierbaren Metaboliten/Metabolitgruppen allerdings durch die Art der Probenvorbereitung und durch die verwendete analytische Plattform eingeschränkt (Empfindlichkeit, Nachweisbarkeit, Umfang der Metabolitenanzahl). Die Hauptnachteile bestehen in der beschränkten Zahl etablierter Protokolle zur Prozessierung von Rohdaten, Plattform-Abhängigkeiten und der Schwierigkeit, die chemische Identität potenzieller Zielauflyte eindeutig aufzuklären. Dagegen setzt Targeted Metabolomics zwangsläufig Vorwissen über das Metabolom und den chemischen Inhalt der Probe voraus. In der Biomarkerforschung macht es sich bezahlt, in die Optimierung



Hans-Peter Deigner promovierte in pharmazeutischer Chemie in Heidelberg und setzte nach einem Aufenthalt als Research Associate an der Harvard Medical School seine Forschung in Heidelberg als Gruppenleiter und Privatdozent fort. Er hat umfangreiche Erfahrungen aus der Entwicklung von Biomarkern Diagnostika in Biotechnologiefirmen. 2004–2006 hatte er eine Professur für biomedizinische Chemie an der School of Chemical Sciences and Pharmacy der University of East Anglia in Norwich inne. Seit 2007 leitet er die Biomarkerforschung und Molekulardiagnostik. Seine Forschungsinteressen umfassen Bioanalytik, Aspekte der Systembiologie und der Integration von „omics“-Daten sowie deren kombinierte Verwendung als Biomarker.

der Probenvorbereitung für niedrig-konzentrierte Zielanalyte zu investieren, Artefakte bei aufeinanderfolgenden Probenanalysen zu vermeiden, Änderungen in den Metabolitkonzentrationen direkt mit dem biologischen und biochemischen Wissen zu korrelieren und diese Ergebnisse mit anderen „omics“-Daten abzulegen. Prinzipiell ist es schwierig, gerade für Biomarker-Langzeitvalidierungsstudien, beide Strategien direkt miteinander zu vergleichen, da die Datenerhebung einerseits auf verschiedenen Plattformen und andererseits auf unterschiedlichen Messverfahren beruht. Dieses Vergleichbarkeitsproblem kann aber umgangen werden, indem eine Kalibrierung mit internen Standards, welche der Probe vor der Extraktion hinzugegeben werden, oder mit externen Standards durchgeführt wird. Dadurch lassen sich sowohl Variabilität in der Probenvorbereitung als auch, und das ist viel wichtiger, Matrixeffekte und andere Störeffekte auf den Analyt in der Probe minimieren. Diese einzelnen Schritte sind für Hochdurchsatzanalysen zwar aufwendig, aber für die Quantifizierung von Metaboliten sind sie zwingend notwendig. Im Wesentlichen werden bei Targeted-Metabolomics-Untersuchungen mit Massenspektrometrie drei verschiedene Analysentechniken mit unterschiedlichsten Probenvorbereitungsverfahren eingesetzt: Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), Fließinjektionsanalyse-Tandemmassenspektrometrie (FIA-MS/MS) und HPLC-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS).<sup>[1-4, 6, 16-21, 23, 41-44]</sup>

Als massenspektrometrische Detektoren kommen Verfahren mit einer Auflösung im Bereich von Einheitsmassen zur Anwendung (z.B. Quadrupol-Instrumente), aber auch hochauflösende Techniken wie Fourier-Transformations-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) und Orbitrap-Instrumente. Das MS-System kann dabei als reiner Einzelmassenanalysator verwendet werden, in diesem Fall wird die Intensität des Ionensignals am Detektor gegen das Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) aufgezeichnet, oder als Tandemmassenanalysator. Bei der Tandem-MS-Analyse können z.B. so genannte Produktionsspektren aufgenommen werden. Dabei dient der erste Massenanalysator ( $MS_1$ ) zur Selektion von Ionen mit bestimmten  $m/z$ -Werten, die in der nachgeschalteten Stoßzelle durch Kollision mit einem Inertgas fragmentiert werden („collision-induced dissociation“, CID). Anschließend werden im zweiten Massenanalysator ( $MS_2$ ) die resultierenden Fragmentionen in MS/MS- oder  $MS^2$ -Spektren detektiert. Bei Fortführung dieses Prozesses mit einem dritten Massenanalysator ( $MS_3$ ), wobei Fragmentionen mit dem  $MS_2$  selektiert werden, spricht man von MS/MS/MS oder  $MS^3$ . Für serielle Kombinationen von Massenanalysatoren, realisiert in Hybridinstrumenten, werden am häufigsten Quadrupole, TOF oder Ionenfallen eingesetzt, z.B. als Tandemquadrupol-, Quadrupol-TOF- bzw. Quadrupol-Ionenfallen-MS-Instrumente. Ionenfallen eignen sich besonders für  $MS^3$ - und weitere  $MS^n$ -Analysen. „Triple-Quadrupol“-Instrumente bieten den Vorteil der SRM-Detection. Dabei selektieren der  $MS_1$  einen ausgewählten  $m/z$ -Wert und der  $MS_2$  eines oder mehrere Fragmentionen mit bekannten  $m/z$ -Werten. Da dies kein Scan-Modus ist, wird die Ionentransmission in den Detektor maximiert. Jeder Analyt, der von der Säule eluiert und in der Ionenquelle ionisiert wird, wird durch ein selektiertes Ion im  $MS_1$  und Fragment-

ionen im  $MS_2$  charakterisiert und durch einen Peak beschrieben. In einer Messmethode können simultan mehrere SRMs als eine Art „Scan“ gemessen werden, wobei der Analysator von SRM zu SRM springt („multiple reaction monitoring“, MRM). In einer chromatographischen Analyse können außerdem, um die Empfindlichkeit zu maximieren, diese SRMs nur entsprechend der Analyt-Retentionszeit in Zeitfenstern und nicht, wie üblich, über die gesamte Analysezeit detektiert werden („scheduled MRM“). Einfache Massenspektrometer ermöglichen den SIM-Modus als selektivsten und empfindlichsten Detektionsmodus, wobei der einzige Massenanalysator ( $MS_1$ ) das Zielion mit einem bestimmten  $m/z$ -Wert selektiert und für dieses ein SIM-Chromatogramm aufzeichnet.

Zwei andere wichtige Scan-Modi von „Triple-Quadrupol“-Instrumenten sind der Vorläuferionen-Scan und der Neutralverlust-Scan. Beim Vorläuferionen-Scan lässt  $MS_2$  nur Fragmente mit einem bestimmten  $m/z$ -Wert durch, während durch Scans an  $MS_1$  die Vorläuferionen ermittelt werden, aus denen diese spezifischen Fragmente entstehen. Beim Neutralverlust-Scan werden beide Massenanalysatoren,  $MS_1$  und  $MS_2$ , parallel so betrieben, dass nur Ionen detektiert werden, die durch die Abspaltung eines definierten neutralen Fragments in Beziehung stehen.

#### 4. Probenvorbereitung für FIA-MS/MS und HPLC-MS/MS

Die Probenvorbereitung vor der massenspektrometrischen Analyse ist ein äußerst wichtiger Schritt bei Studien mit Non-Targeted Metabolomics wie auch mit Targeted Metabolomics. Dabei ist man allgemein der Auffassung, dass der Aufwand minimal gehalten werden sollte, weil jeder einzelne Probenvorbereitungsschritt zu unkontrollierbaren Analytverlusten führen kann und dadurch eine umfassende Analyse von Metaboliten(klassen) nachteilig beeinflussen kann. Solche Analytverluste können aber durch entsprechende interne Standards korrigiert werden. Die Komplexität einer umfassenden Metabolomanalyse und der damit verbundene extrem große dynamische Bereich (z.B.  $\text{mg mL}^{-1}$  bis  $\text{pg mL}^{-1}$  in Plasma) macht in den meisten Fällen Probenvorbereitungsschritte vor der eigentlichen Analyse unverzichtbar. Es gibt Metabolomics-Anwendungen, wo die Probenvorbereitung auf ein Minimum reduziert werden kann. Dies ist z.B. bei der Analyse humaner Gallenflüssigkeit der Fall, bei der es ausreicht, die Probe vor der FIA-MS/MS-Analyse zu verdünnen,<sup>[45]</sup> oder bei der Urinanalytik von Patienten mit cholestatischen Lebererkrankungen,<sup>[46]</sup> bei der man mit einer einfachen  $C_{18}$ -Festphasenextraktion (SPE) vor der FIA-MS/MS-Analyse auskommt. Bei der Analytik des Metaboloms in Gewebeproben ist eine Probenvorbereitung mit mehreren Teilschritten für die Analytextraktion allerdings unumgehbar, außer in den Fällen, wo direkt das Gewebe z.B. mit MALDI-Bildgebung<sup>[47-49]</sup> („matrix-assisted laser desorption ionisation“) oder mit DESI<sup>[50]</sup> („desorption electrospray ionisation“) analysiert werden soll.

Die Kombination von einerseits enormer Heterogenität der physikalischen und chemischen Eigenschaften und an-

dererseits breiten Konzentrationsbereichen endogener Metabolite in einem biologischen System macht es in der Realität unmöglich, das gesamte Metabolom mit einer einzelnen oder auch einigen wenigen analytischen Methoden zu analysieren.<sup>[1,2]</sup> Zusätzliche Probenvorbereitungsschritte, z.B. Derivatisierung oder SPE, sind für die Analyse von Metaboliten in geringeren Konzentrationen notwendig, um die Nachweisgrenzen zu verbessern. Dabei ist die Art der Probenvorbereitung von der zu untersuchenden Matrix, von der analytischen Methode und vom jeweiligen Metabolomics-Ansatz abhängig (Targeted Metabolomics für zuvor ausgewählte Zielanalyte/-analytgruppen oder Non-Targeted Metabolomics für das gesamte Metabolom). In diesem Aufsatz konzentrieren wir uns auf Targeted Metabolomics. Daher werden hier auch relevante Beispiele verschiedener Probenvorbereitungsmethoden für diese Anwendung beschrieben.

Die meisten HPLC-MS-Metabolomics-Studien nutzen die Elektrospray-Ionisierung (ESI).<sup>[51,52]</sup> Die bevorzugte Anwendung dieser Ionisierungsmethode ist auf den großen dynamischen Bereich des ESI-Prozesses zurückzuführen, der vor allem eine relativ umfassende Ionisierung fast aller Metabolitklassen ermöglicht. Einige Metabolite/Metabolitklassen mit höheren endogenen Konzentrationen zeigen auch in realen Probenextrakten sehr gute ESI-Ionisierungsausbeuten. Beispielsweise können Phospholipide in Plasma nach einfacher Methanol-Proteinfällung<sup>[53]</sup> oder Blight/Dyer-Extraktion (Chloroform/Methanol),<sup>[54]</sup> aber ohne vorherige chromatographische Trennung, ausreichend empfindlich mit FIA-ESI-MS/MS analysiert werden. Es gibt aber auch Metaboliten, die weniger gut mit ESI zu ionisieren sind. Sie benötigen mehr Aufwand in der Probenvorbereitung oder bedürfen einer anderen Ionisierungsart.

Bevor wir näher auf die Probenvorbereitung für Targeted-Metabolomics-Studien eingehen, sollen kurz entsprechende Verfahren für die globale Metabolomanalyse durch Non-Targeted Metabolomics betrachtet werden. Siuzdak und Kollegen haben eine umfassende Extraktionsmethode für Serum und CSF entwickelt und optimiert. Dabei werden 50- $\mu$ L-Proben mit eiskaltem Methanol extrahiert und zentrifugiert. Der Extraktionsüberstand wird anschließend im Vakuum eingedampft und im LC-Laufmittel rekonstituiert.<sup>[53,55-56]</sup> Mit dieser Extraktion gefolgt von einer HPLC-ESI-MS/MS-Methode (ESI mit Positivionen-Detektion; Dauer 60 min) haben Crews et al. mehr als 4000 Signale reproduzierbar in Plasma und CSF detektieren können. Als Signale wurde jene angesehen, die ein Signal-zu-Rausch (S/N)-Verhältnis über 10 aufwiesen.<sup>[53]</sup> Mit einem ähnlichen Extraktionsprotokoll und einer UPLC-ESI-MS/MS-Methode konnte Zelena et al. in Plasma 1600 Signale im Positivionen-Modus und 1110 Signale im Negativionen-Modus mit ESI detektieren.<sup>[57]</sup> Dagegen detektierten Wishart et al. nur ca. 200 eindeutige Signale, wenn CFS direkt ohne jegliche Probenvorbereitung mit HPLC-ESI-MS/MS analysiert wurde (kombinierte Positivionen- und Negativionen-Detektion mit ESI).<sup>[42]</sup> Mithilfe von MS/MS konnten nur einige wenige der Signale in den Spektren von CSF auch bestimmten Verbindungen zugeordnet werden: Crews et al. gelang dies für 12 Verbindungen, Wishart et al. für 17.

## 5. HPLC-MS/MS-Analyse von Lipiden in Körperflüssigkeiten

Lipide spielen eine wesentliche Rolle im Metabolom, daher ist deren Analyse von besonderem Interesse. Allerdings sind analytische Methoden, die eine Rekonstitution des Probenextrakts in wässrigen HPLC-Lösungsmitteln wie 5% Acetonitril in Wasser<sup>[53,56]</sup> oder 100% Wasser<sup>[57]</sup> vorsehen, nicht für die Analytik von Lipiden geeignet, da viele Lipide nicht in diesen Lösungsmitteln löslich sind. Lipide bedürfen folglich einer speziellen Methodik sowohl für die Probenvorbereitung als auch für die Analyse.<sup>[58]</sup>

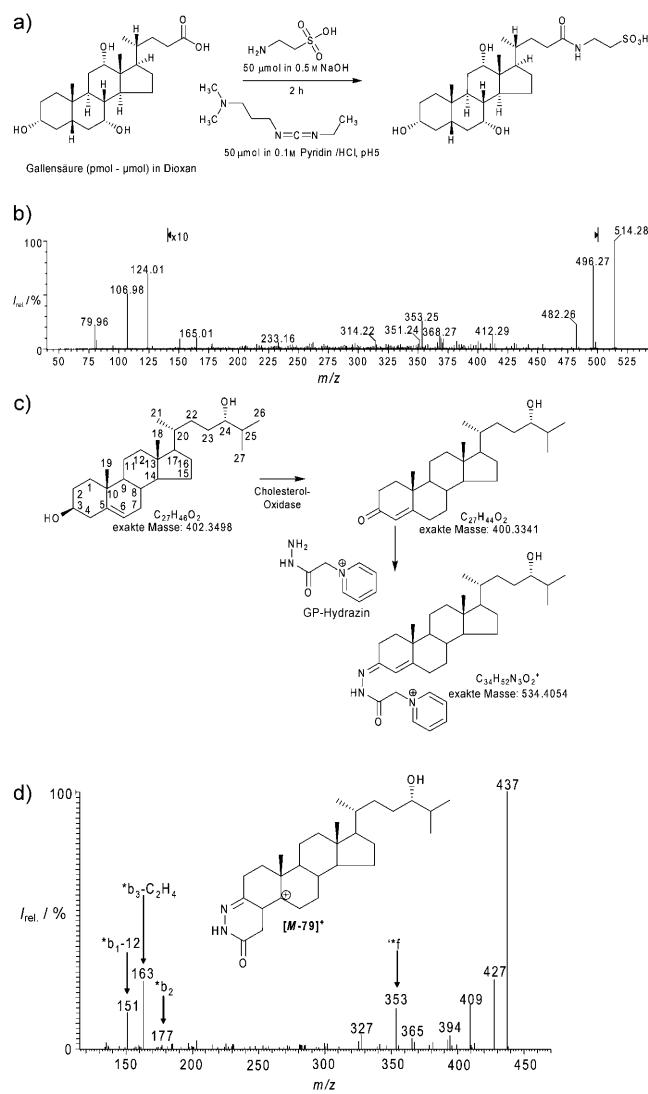
Lipidmodifizierende Enzyme, z.B. Phospholipase, 5-Lipoxygenase, Phosphoinositid-3-kinase, Sphingosinkinase, kontrollieren Signallipide und schaffen somit ein komplexes Netzwerk, das für lebenswichtige Prozesse wie Apoptose und Proliferation relevant ist. Sie spielen somit auch bei Krebs, Diabetes, Entzündungen und Stoffwechselerkrankungen eine wichtige Rolle.<sup>[59]</sup> Zahlreiche Lipide mit Schlüsselfunktionen und deren Wechselwirkungen konnten bisher identifiziert und Informationen über ihre Rolle in der Pathobiochemie gesammelt werden. Allerdings sind weitere quantitative Lipidomics-Hochdurchsatzmethoden notwendig, um das Potenzial von Lipiden als neue Biomarker zu nutzen.

Eine sehr gut geeignete Möglichkeit, Lipide in Plasma und CSF zu extrahieren, ist die Extraktion mit 99.9 % Ethanol in einem Volumenverhältnis von mindestens 1:10 für Plasma und 1:4 für CSF. Dabei wird die Probe unter Ultraschallbehandlung tropfenweise in Ethanol gegeben.<sup>[60]</sup> Unter diesen Bedingungen befinden sich die Lipide frei in Lösung, da die Lipid-Protein-Verbindungen aufgespalten werden. Im nächsten Schritt werden die Lipide hinsichtlich ihrer Lipophilie auf einer C<sub>18</sub>-SPE-Kartusche fraktioniert. Dafür wird die Lipidlösung in Ethanol auf 70 % Ethanol verdünnt und auf die C<sub>18</sub>-Kartusche gegeben. Die hydrophoberen Lipide, wie Triglyceride, Cholesterin und seine Ester, werden dabei zurückgehalten, und die weniger hydrophoben Lipide, wie Oxysterole, Gallensäuren, Steroide und Phospholipide, eluieren nach weiterer Zugabe von 70 % Ethanol aus der SPE-Kartusche. Die hydrophobere Lipidfraktion kann anschließend mit 99.9 % Ethanol oder Chloroform/Methanol (1:1, v/v) eluiert werden. Dieser Trennschritt kann z.B. für eine anschließende Analyse von Oxysterolen oder Steroiden wichtig sein, die endogen oder auch als Artefakt durch Cholesterol-Autoxidation gebildet werden können.<sup>[61,62]</sup> Wenn Phospholipide die Zielanalyte sind, ist 70 % Ethanol als Lösungsmittel für HPLC-ESI-MS/MS oder FIA-ESI-MS/MS geeignet. Wenn aber z.B. Oxysterole oder Gallensäuren analysiert werden sollen, sind alternative Protokolle vorzuziehen. Zum Beispiel kann eine Extraktion mithilfe von Anionenaustauschersäulen wie Lupidex-DEAP durchgeführt werden, wobei die Fraktionierung nach der Säurestärke erfolgt. Die anschließende Analyse erfolgt bevorzugt durch HPLC-ESI-MS/MS mit ESI im Negativionen-Modus.<sup>[63]</sup> ESI im Positivionen-Modus wird normalerweise für die Analyse von Neutralverbindungen verwendet; allerdings ist der Ionenstrom gering, wenn die Zielmoleküle keine basischen funktionellen Gruppen enthalten. Dies trifft auf Oxysterole und freie Steroide zu.

Eine Möglichkeit, um die ESI für Neutralverbindungen zu verbessern, bietet die Derivatisierung mit sauren oder basischen Gruppen. Die Derivatisierung kann auch genutzt werden, um die Ionisierungsfähigkeit von Molekülen zu steigern, die schwach saure oder basische Gruppen tragen.<sup>[55,64-67]</sup> Um die Ionisierung von schwachen Säuren wie Carbonsäuren ( $pK_S \approx 6$ ) zu erleichtern, bietet sich eine Derivatisierung mit einer Aminosulfonsäure (z.B. 2-Aminoethansulfonsäure) oder mit 4-Aminobenzoësäure in Gegenwart eines Carbodiimids wie 1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl)carbodiimid (EDC) an. Dabei wird die stark saure Sulfonatgruppe ( $pK_S \approx 1.5$ ) am Zielmolekül eingeführt, was zu einer besseren Detektion bei ESI im Negativionen-Modus führt.<sup>[64]</sup> Die deuterierte Form  $\text{NH}_2\text{CD}_2\text{CD}_2\text{SO}_3\text{H}$  von 2-Aminoethansulfonsäure kann für quantitative Studien unter Stabilisotopenmarkierung verwendet werden (ähnlich wie ICAT in Proteomics).<sup>[55]</sup>

Die Derivatisierung mit einer Aminosulfonsäure verbessert nicht nur das Ionisierungsverhalten, sondern sie beeinflusst auch das Fragmentierungsmuster im MS/MS. Dadurch wird einerseits die Zahl an Fragmentionen erhöht, die Strukturinformationen liefern können, und andererseits können charakteristische Fragmentionen mit geringen Massen erhalten werden (Abbildung 2). Die Einführung von Ladung zur besseren Ionisierung ist auch für andere funktionelle Gruppen möglich. Zum Beispiel können Oxogruppen (in Aldehyden und Ketonen) mit Hydrazinen (z.B. 2,4-Dinitrophenylhydrazin) derivatisiert werden. Dadurch werden sowohl die Ionisierung und das MS/MS-Fragmentierungsverhalten als auch die Löslichkeit des Zielanalyten in der mobilen Phase für die Umkehrphasenchromatographie verbessert.<sup>[60,67-69]</sup> Ein Nachteil ist allerdings der erforderliche zusätzliche Probenvorbereitungsschritt. Oxogruppen treten z.B. bei den in Plasma geläufigen Steroiden, Sterolen und Gallensäuren auf.<sup>[45,70-71]</sup> Es ist dabei vorteilhaft, Lipide mit Oxogruppen nach Extraktion und Isolierung unter schwach sauren Bedingungen mit Hydrazinreagentien zu derivatisieren und anschließend mit HPLC-MS/MS (oder MS<sup>n</sup>) zu analysieren, um mehr dieser Lipide mit Oxogruppen z.B. im Plasma erfassen zu können. Wir haben beispielsweise beobachtet, dass die Löslichkeit sowie das Ionisierungs- und Fragmentierungsverhalten von Steroiden und Gallensäuren mit Oxogruppen durch Derivatisierung mit Girard-P(GP)-Hydrazinreagens verbessert werden können. Mithilfe dieses Derivatisierungsverfahrens konnten folgende Steroide und Gallensäuren im Plasma von Erwachsenen und/oder Säuglingen identifiziert werden: DHEA-3-Sulfat, Epiandrosteron-3-sulfat, Androsteron-3-sulfat, Etiocholanolon-3-glucuronid, 3 $\beta$ ,5 $\beta$ -Dihydroxy-B-norcholestan-6 $\beta$ -carboxyaldehyd, 7 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxocholest-4-en-27-säure, 3-Oxocholest-4-en-27-säure und 7 $\alpha$ -27-Dihydroxycholest-4-en-3-on.<sup>[60]</sup>

Ein größerer Teil des Lipidoms kann durch Vorschalten eines Oxidationsschritts, der Alkoholgruppen in Oxogruppen umwandelt, vor der Derivatisierung mit Girard-P-Hydrazin extrahiert werden (Abbildung 2). Dafür werden chemische Oxidationsmittel oder auch Enzyme wie Cholesteroloxydase verwendet, die Sterole und Steroide mit 3 $\beta$ -Hydroxy-5-en- und 3 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -wasserstoff-Gruppen in die entsprechende 3-Oxo-4-en- bzw. 5-Oxo-5 $\alpha$ -wasserstoff-Analoga



**Abbildung 2.** a) Derivatisierung von Gallensäure mit 2-Aminoethansulfonsäure, b) Negativionen-ESI-MS/MS-Spektrum des Derivats ( $[\text{M}-\text{H}]^-$  bei  $m/z$  514). c) Oxidation und Derivatisierung von 24S-Hydroxycholesterol. d) ESI-MS<sup>3</sup> der Derivate aus dem Plasma von Neugeborenen ( $[\text{M}]^+$  bei  $m/z$  534).

überführt.<sup>[72]</sup> Mit diesem Verfahren konnten zusätzlich Desmosterol, 7-Dehydrocholesterol, Cholesterin, 24S-, 27- und 7 $\alpha$ -Hydroxycholesterol, 7 $\alpha$ ,27-Dihydroxycholesterol, 3 $\beta$ -Hydroxycholest-5-en-27-säure und 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxycholest-5-en-27-säure in Plasma identifiziert werden.<sup>[60]</sup> Während in den bereits erwähnten Studien von Wishart et al. und Crews et al. zu CSF mit globaler HPLC-MS-Metabolomics 17 bzw. 12 Verbindungen identifiziert werden konnten,<sup>[42,56]</sup> gelang es Ogundare et al. mit der GP-Derivatisierung (mit und ohne Verwendung von Cholesteroloxydase) und durch Vergleich der HPLC-MS<sup>3</sup>-Resultate mit Daten von authentischen Standards, neun Sterole und Gallensäuren zu identifizieren. Sie postulierten anhand der HPLC-MS<sup>3</sup>-Spektren und Retentionszeiten die Strukturen für acht weitere Cholesterolmetabolite, sodass insgesamt 17 Metabolite bestimmt wurden.<sup>[73]</sup> Folglich entspricht die Zahl der im CSF-Lipidom nach GP-Derivatisierung identifizierten 3 $\beta$ -Hydroxy- und

Oxosterole/steroide und Gallensäuren der Gesamtzahl der mit HPLC-MS (ohne Derivatisierung) erfaßbaren Verbindungen im gesamten Metabolom. Der Vorteil von Targeted Metabolomics ist hier offensichtlich.

## 6. Probenvorbereitung für die GC-MS-Analyse

GC und GC-MS werden bereits seit Mitte der 60er Jahre für Metabolom-Analysen eingesetzt.<sup>[13,74,75]</sup> Allerdings ist die GC nur für flüchtige Verbindungen geeignet (und für solche, die durch Derivatisierung in flüchtige Verbindungen umgewandelt werden können). Nichtflüchtige und thermisch labile Verbindungen werden besser mit HPLC-MS und Ionisierung bei Atmosphärendruck („atmospheric pressure ionisation“, API) oder mit MALDI-MS-Verfahren analysiert. Trotzdem kann bei Auswahl geeigneter Derivatisierungsmethoden ein Großteil der Komponenten des Metaboloms mithilfe von GC-MS erfasst werden. Trotz der Notwendigkeit einer Derivatisierung bietet die GC-MS-Analyse auch einige Vorteile gegenüber HPLC-MS. GC-Säulen bieten einerseits eine höhere Auflösung als HPLC-Säulen, andererseits enthalten die Massenspektren nach Ionisation durch Elektronenstoß (EI-Modus) eine Fülle von hilfreichen Strukturinformationen. Im Vergleich zur HPLC-MS bieten die für EI-Massenpektren verfügbaren umfassenden Spektrenbibliotheken (z.B. <http://www.nist.gov/srd/nist1a.htm>) und Retentionsindizes eine wesentlich leichtere Möglichkeit, Verbindungen mit GC-MS zu identifizieren. Ein Nachteil von GC-MS ist es, dass die Signale für die Molekülionen in den entsprechenden EI-Spektren äußerst schwach sind oder nicht detektiert werden können, sodass jegliche Information zum Molekulgewicht fehlt. Dies kann aber durch Aufnahme von Spektren nach chemischer Ionisation (CI) ergänzt werden, die Signale für z.B.  $[M+H]^+$  oder  $[M+NH_4]^+$  liefern. Durch Verwendung perfluorierter Derivate konnten in CI-Spektren mit Negativionen-Detektion für einige Steroide in CSF Nachweissgrenzen bis  $50 \text{ pg mL}^{-1}$  erzielt werden.<sup>[76]</sup> Die GC-MS bietet allein kein Analysenverfahren für das gesamte Metabolom, aber gezielte Derivatisierungen verschiedener funktionellen Gruppen zusammen mit entsprechenden Probenvorbereitungsverfahren können den erfassbaren Anteil des Metaboloms deutlich erhöhen. Für globale Non-Targeted-Metabolomics-Studien (z.B. an Körperflüssigkeiten) werden im einzigen Probenvorbereitungsschritt die Proteine durch Zugabe von Methanol gefällt und durch Zentrifugieren abgetrennt.<sup>[42,77]</sup>

Als nächstes muss geklärt werden, welche funktionelle Gruppe auf welche Weise derivatisiert werden soll. Oxo-gruppen sind häufige funktionelle Gruppen und können leicht mit Methoxyamin zu Methyloximen derivatisiert werden, während Alkoholgruppen mit verschiedenen Reagentien in Trimethylsilyl(TMS)-Ether umgewandelt werden können.<sup>[78,79]</sup> Mithilfe dieser Extraktions- und Derivatisierungsverfahren konnten Jiye et al. bei einer GC-MS-Analyse von Humanplasma 500 separate Peaks detektieren und auf dieser Grundlage 32 endogene Metaboliten quantifizieren. Die Konzentrationen reichten dabei von  $2 \text{ mM}$  ( $800 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) für nicht verestertes Cholesterin bis  $24 \mu\text{M}$  ( $4.32 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) für

Inositol.<sup>[77]</sup> Wishart et al. verwendeten einen ähnlichen Ansatz und bestätigten, dass CSF eine wesentlich weniger komplexe Matrix als Plasma ist. Sie konnten 41 von ca. 50 detektierten GC-Peaks zuordnen und die entsprechenden Substanzen in Konzentrationen von  $3.8 \text{ mM}$  ( $230 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) für Harnstoff bis  $< 1 \mu\text{M}$  ( $75 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) für Glycin quantifizieren.<sup>[42]</sup>

## 7. GC-MS-Analyse von Cholesterolmetaboliten in Körperflüssigkeiten

Der erste Schritt im Cholesterolmetabolismus ist die Oxidation zu einem Oxysterol. Die Oxysterole werden dann über Pregnolon weiter zu Steroidhormonen oder über  $7\alpha$ - oder 27-Hydroxylierung zu Gallensäuren verstoffwechselt. Oxysterole sind biologisch aktiv, wobei die Aktivität von der individuellen chemischen Struktur abhängt.<sup>[80,81]</sup> In ähnlicher Weise sind auch die Gallensäuren oder andere Intermediate ihrer Biosynthese biologisch aktiv, wobei spezifische Verbindungen als Liganden von Kernrezeptoren wirken.<sup>[82,83]</sup> Störungen in der Steroid- und Gallensäuren-Biosynthese können verschiedene Erkrankungen nach sich ziehen. Daher können bei der Untersuchung von Krankheitsverläufen und für die damit verbundene Suche nach Biomarkern Unterschiede in den Plasmakonzentrationen dieser Intermediate/Metaboliten außerst interessant sein.<sup>[84]</sup>

Björkhem und Kollegen haben in Zusammenhang mit der Untersuchung von Atherosklerose und neurodegenerativen Erkrankungen umfangreiche Studien an Cholesterolmetaboliten in Blut und besonders in CSF durchgeführt.<sup>[85,86]</sup> Als Analysenverfahren wurde GC-MS im SIR-Detektionsmodus eingesetzt, um eine maximale GC-MS-Empfindlichkeit zu erzielen. Die Probenvorbereitung umfasste eine alkalische Hydrolyse der (Oxy)sterolester, gefolgt von einer Variante der Folch-Extraktion (KOH in Ethanol, Chloroform, NaCl-Lösung) und anschließendem Trocknen der organischen Phase. Das getrocknete Probenextrakt wurde dann in Toluol wieder in Lösung gebracht, und der große Cholesterolüberschuss wurde mithilfe einer Normalphasen-SPE abgetrennt. Die Oxysterole, die dabei nach dem Cholesterol eluierten, wurden vor der GC-MS-Analyse zu den Trimethylsilylern derivatisiert.<sup>[87]</sup> Mit diesem Analyseverfahren konnten folgende Oxysterole in Plasma identifiziert und unter Zuhilfenahme entsprechender isotopenmarkierten Standards quantifiziert werden:  $7\alpha$ -Hydroxycholesterol ( $43 \pm 48 \text{ ng mL}^{-1}$ ),  $7\beta$ -Hydroxycholesterol ( $3 \pm 5 \text{ ng mL}^{-1}$ ),  $7$ -Oxocholesterol ( $22 \pm 14 \text{ ng mL}^{-1}$ ),  $5\alpha,6\alpha$ -Epoxycholesterol ( $6 \pm 8 \text{ ng mL}^{-1}$ ),  $5\beta,6\beta$ -Epoxycholesterol ( $26 \pm 18 \text{ ng mL}^{-1}$ ), Cholestan- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol ( $27 \pm 39 \text{ ng mL}^{-1}$ ),  $24$ -Hydroxycholesterol ( $64 \pm 24 \text{ ng mL}^{-1}$ ),  $25$ -Hydroxycholesterol ( $2 \pm 3 \text{ ng mL}^{-1}$ ) und  $27$ -Hydroxycholesterol ( $154 \pm 43 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Die Summe dieser Werte stimmte überdies mit der Summe an freien Oxysterolen und deren Fettsäureestern überein.<sup>[87]</sup>

Die Gruppen von Björkhem und Lütjohann haben die Methode auch für die Analyse von CSF angewendet, wobei die Oxysterol-Konzentrationen in Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen und entsprechenden Kontrollgruppen im Fokus standen.<sup>[88-91]</sup> In den CSF-Kontrollproben wurden folgende Oxysterol-Konzentrationen ermittelt:  $7\alpha$ -

Hydroxycholesterol ( $1.50 \text{ ng mL}^{-1}$ ),  $7\beta$ -Hydroxycholesterol ( $1.11 \text{ ng mL}^{-1}$ ), 7-Oxocholesterol ( $0.86 \text{ ng mL}^{-1}$ ) 24-Hydroxycholesterol ( $1.54 \text{ ng mL}^{-1}$ ) und 27-Hydroxycholesterol ( $0.8 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Wiederum entsprach die Summe dieser Werte der Summe an freien Oxysterolen und deren Fettsäureestern.<sup>[88]</sup> Dabei ist es wenig überraschend, dass keine dieser Verbindungen in globalen GC-MS-Metabolomics-Studien nachgewiesen werden konnte,<sup>[42,77]</sup> denn in solchen Studien wurde gewöhnlicherweise keine alkalische Hydrolyse durchgeführt, und die freien Oxysterole wiesen in CSF Konzentrationen von nur  $20 \text{ pg mL}^{-1}$  oder  $0.05 \text{ nm}$  auf.<sup>[73]</sup>

## 8. Datenanalyse

Die Datenanalyse spielt eine zentrale Rolle in einem Biomarkerprojekt. Sie hat das Ziel, die wichtigsten Metabolite im Hinblick auf anschließende Validierungsstudien oder klinische Anwendungen zu ermitteln. Bei der Vielzahl möglicher Experimente, den verschiedenen MS-Datencharakteristiken und der großen Spanne von statistischen Verfahren besteht die Datenanalyse aus festgelegten Schritten, von denen manche optional sind. Im einzelnen sind dies: Signalverarbeitung, Normalisierung, Transformation und Bewertung der Daten sowie die Anwendung statistischer Verfahren zum Vergleich von Gruppen und zur Konstruktion von Vorphersagmodellen.<sup>[92,93]</sup> In diesem Aufsatz werden wir besonderes Augenmerk auf diejenigen Aspekte legen, die wir im Rahmen der Biomarkeridentifizierung und -validierung unter Verwendung von Metabolomics-Daten für entscheidend halten.

Das Ziel der Datenvorverarbeitung, die auch Analyse auf niedriger Stufe („low level analysis“) genannt wird, ist es, das Rohsignal – die Antwort des Detektors – in eine diskrete und leichter für die Datenanalyse verwendbare Größe umzuwandeln, welche den Metaboliten charakterisiert.<sup>[94,95]</sup>

Neben der unverwechselbaren Charakterisierung der spektralen und chromatographischen Merkmale der Analyte sollte bei einem zielorientierten metabolischen Ansatz die Bedeutung einer optimalen Signalverarbeitung nicht unterschätzt werden, um biologisch sinnvolle und reproduzierbare Resultate zu erhalten. Dies wird noch offenkundiger, wenn die Datenextraktion automatisch durchgeführt wird und die Messungen sich über längere Zeiträume erstrecken. Unerwünschte Störsignale werden von verschiedenen Quellen erzeugt, die bei der massenspektrometrischen Analyse immament vorhanden sind (Verlust der Empfindlichkeit, Verschiebung des analytischen Systems), oder aber von Faktoren, die mit der Heterogenität der Proben sowie mit unterschiedlichen Reagentienchargen oder Laborbedingungen zusammenhängen. Die Vorverarbeitung von massenspektrometrischen Daten besteht typischerweise aus der Grundlinienkorrektur, Filterung oder Zerlegung der Signals, der Signalextraktion (d.h. Detektion und Quantifizierung der Peaks) sowie der Integration.<sup>[94,95]</sup> Das Grundlinien- oder Hintergrundmassenspektrum ist das Massenspektrum, das man beobachtet, wenn keine Probe wissentlich in das Massenspektrometer eingebracht wird.<sup>[96]</sup> Es kann flach oder kurvig sein, mit einem positiven oder negativen (z.B. linea-

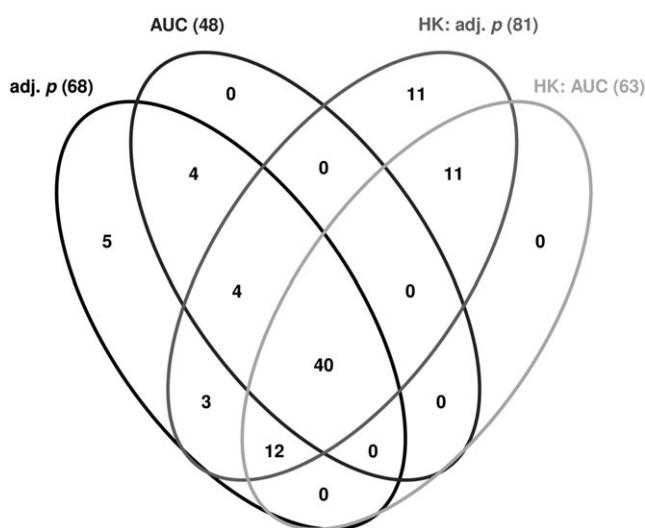
ren) Trend.<sup>[97]</sup> Es gibt ziemlich viele Ansätze, die entweder aus nichtparametrischen Methoden oder aus parametrischen Schätzerverfahren, die auf physikalischen Modellen für die Vorgänge im Massenspektrometer beruhen, bestehen. Einen Überblick hierzu geben Shin und Markey.<sup>[98]</sup> Neben dem Hintergrundsignal enthalten Massenspektren auch ein hochfrequentes Rauschen, das mithilfe von Glättungsfilttern wie Gauß-Filttern oder Filtern mit gleitendem Mittelwert, Deconvolutionsfiltern oder Zerlegungsmethoden wie der Wavelet-Transformation reduziert werden kann.<sup>[97,98]</sup> Nach der Reduktion von Hintergrund- und Hochfrequenzrauschen werden die Peaks im rauschreduzierten Massenspektrum mit automatisierten Methoden detektiert und quantifiziert. Wie-derum gibt es eine ziemlich große Auswahl an verschiedenen Algorithmen, die zum Beispiel auf dem Signal-Rausch-Verhältnis beruhen.<sup>[94–98]</sup>

Nach der Extraktion der Analytmessung folgt üblicherweise ein Anpassungsschritt, der als Normalisierung bekannt ist und der darauf abzielt, Metabolitdaten, die an verschiedenen Tagen, mit verschiedenen Instrumenten, in unterschiedlichen Verdünnungen usw. erhoben wurden, vergleichbar zu machen. In der Praxis beruhen Normalisierungsverfahren auf gewissen Annahmen über die Daten und den Aufbau des Experiments und müssen daher entsprechend angepasst werden. Die gebräuchlichsten Methoden versuchen, direkt aus den Daten einen Verdünnungs- oder Skalierungsfaktor für jede Probe abzuleiten.<sup>[99]</sup> Dieser Skalierungsfaktor kann aus der Summe (oder einer verwandten Größe) aller Messungen für eine Probe abgeleitet werden oder auch mit komplizierteren Verfahren berechnet werden.<sup>[92,100,101]</sup> Ein alternativer Ansatz besteht darin, die Probenkonzentrationen unter Verwendung von biologischen Informationen wie Kreatininkonzentration, Urinvolumen oder Osmolalität zum Zeitpunkt der Probenabnahme zu adjustieren.<sup>[102]</sup> Diese Art der Normalisierung ist aber ungeeignet, wenn biochemische Prozesse studiert werden, die einen großen Einfluss auf den Skalierungsparameter haben können (zum Beispiel im Fall einer Nierenschädigung).

Der einleuchtendste Ansatz, um unerwünschte Unterschiede zwischen den Probenmessungen zu umgehen, ist die Bestimmung von absoluten Metabolitkonzentrationen mit einem oder mehreren internen Standards. Als ein Ergebnis hiervon wird die interindividuelle Varianz minimiert, und Datensätze, die an mehreren Orten und in mehreren Experimenten erzeugt wurden, werden direkt vergleichbar.<sup>[103]</sup> Jedoch kann die Umsetzung dieses Ansatzes bei der Erstellung von Metabolitdaten in Hochdurchsatzverfahren recht schwierig sein. Infolge der chemischen Diversität ist es unwahrscheinlich, dass ein einzelner interner Standard für alle Metabolite ausreicht; statt dessen wird ein Satz von internen Standards individuell für den jeweiligen Metabolit benötigt.

Wir haben vor kurzem ein neues Konzept zur Normalisierung von Metabolomics-Daten eingeführt, das auf endogenen „Housekeeping“-/Referenzmetaboliten beruht. Dieser Ansatz wurde von der quantitativen Echtzeit-PCR übernommen, bei der die Verwendung von „Housekeeping“-/Referenzgenen der Goldstandard ist.<sup>[104]</sup> Unsere Daten zeigen, dass die Verwendung endogener „Housekeeping“-/Referenzmetaboliten die Macht statistischer Analysen ver-

größern kann, d. h. technische Fehler reduziert werden.<sup>[105]</sup> Dies illustriert das Venn-Diagramm in Abbildung 3, in dem die adjustierten *p*-Werte und die Fläche unter der Kurve (AUC) mit und ohne „Housekeeper“(HK)-Normalisierung verglichen werden.



**Abbildung 3.** Ein Venn-Diagramm, welches die Zahl an Metaboliten mit adjustierten *p*-Werten (*adj. p*) < 0.01 und AUC > 0.8 für die Unterscheidung zwischen den Proben von Kontrollprobanden und Pneumoniepatienten zeigt. Die Ergebnisse wurden mit und ohne HK-Normalisierung gewonnen. Die Summe der Zahlen in jeder Ellipse repräsentiert die Zahl der Metabolite, die mit dem entsprechenden Kriterium ausgewählt wurden, während die Summe der Zahlen außerhalb die Zahl der Metabolite repräsentiert, die mit dem Kriterium nicht ausgewählt wurden. Zahlen in sich überlappenden Flächen stehen für Metabolite, die mehr als ein Kriterium gemeinsam haben. Weitere Einzelheiten finden sich im Text.

Der Datensatz besteht aus 66 Proben (21 Kontrollen, 45 Pneumonie) und 197 Metaboliten, wobei zwei „Housekeeper“-Metaboliten für die Normalisierung ausgewählt wurden. Basierend auf einem adjustierten *p*-Wert < 0.01 und AUC > 0.8 als Schwellenwerte sind die Merkmale, die mit den HK-normalisierten Daten identifiziert werden, in guter Übereinstimmung mit denen, die in den Originaldaten gefunden wurden. Zusätzlich beobachten wir einen Anstieg bei der Zahl der signifikanten Unterschiede sowie eine größere AUC. Von der verbesserten statistischen Macht abgesehen wurden mehrere Metabolite unter verschiedenen experimentellen Bedingungen als Referenzmetabolite identifiziert.<sup>[105]</sup>

Metabolite sind dadurch charakterisiert, dass ihre Konzentrationen einen großen dynamischen Bereich einnehmen, und typischerweise ist die Varianz bei höheren Konzentrationen entsprechend größer. Für die statistische Analyse muss eine varianzstabilisierende Transformation oder eine Transformation hin zur Normalverteilung, zum Beispiel der Logarithmus oder der verallgemeinerte Logarithmus oder Potenztransformationen, angewendet werden, um die Abhängigkeit der Varianz von der Metabolitkonzentration abzumildern.<sup>[106,107]</sup> Die Motivation hinter diesen Transformationen besteht darin, dass viele statistische Verfahren auf

Homoskedastizität oder Verteilungsannahmen angewiesen sind, die in der Regel für die nichttransformierten massenspektrometrischen Daten nicht erfüllt sind. Alternative Methoden wie etwa Zentrierung (z.B. am Mittelwert oder Median) und/oder Skalierung (z.B. mithilfe von Standardabweichung oder Median der absoluten Abweichungen) neigen dazu entweder ineffizient zu sein oder Messungen mit niedriger Intensität zu stark zu gewichten.<sup>[92,108]</sup>

Da die Erzeugung von qualitativ hochwertigen Daten von zahlreichen Faktoren abhängt, ist es notwendig, dass die oben beschriebenen Schritte von einer gründlichen Bewertung der Datenqualität begleitet werden. Dafür ist die Einführung von unabhängigen Proben zur Qualitätskontrolle, anstelle der eigentlichen Daten, notwendig, um mögliche Mängel während der Vorverarbeitung zu identifizieren. Typische Ansätze hierfür sind diagnostische statistische Verfahren und Darstellungen wie Histogramme, Ähnlichkeitsplots in der Form von „Heatmaps“ oder Baumdiagrammen oder auch multivariate Analysen wie die Hauptkomponentenanalyse.

In metabolomischen Biomarkerstudien ist es selten der Fall, dass Methoden des „Data Mining“ die zugrundeliegenden biologischen Mechanismen aufdecken können, ohne ein A-priori-Wissen über den pathophysiologischen Zustand des Patienten einzuführen. In diesem Zusammenhang ist die statistische Analyse im Wesentlichen ausgerichtet auf univariante Tests für Gruppenvergleiche (Klassenvergleich) und auf fortgeschrittene Algorithmen zur Klassifikation von Personen nach deren klinischem Ergebnis (Klassenvorhersage). Während klinische Studien auf wenige Parameter eingeschränkt sind, müssen Data-Mining-Strategien für metabolomische Daten so angepasst werden, dass diese mit einer großen Zahl von Messungen (bis zu Tausend) klarkommen.

Bei Klassenvergleichen ist es üblich, jeden Metabolit separat zu behandeln, wobei die entsprechende univariate statistische Analyse aus einem statistischen Test wie dem *t*- oder Mann-Whitney-Test besteht oder aus irgendeiner Art von Regressionsanalyse wie lineare oder generalisiert lineare Modelle. Dies führt in der Praxis dazu, dass man wenigstens einen (nicht adjustierten) *p*-Wert für jeden Metabolit erhält und man mehrere hundert Tests (zumindest so viele wie es Metabolite gibt) parallel durchführt. Beim klassischen statistischen Hypothesentest wird typischerweise der Fehler erster Art  $\alpha$  eines einzelnen Tests auf 1 % oder 5 % begrenzt. Nun jedoch, da man mehrere hundert Tests simultan betrachtet (d.h. multiples Testen), muss man davon ausgehen, dass die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Testergebnisses sehr viel größer als  $\alpha$  ist. Ausgehend von  $N$  unabhängigen statistischen Tests und einem Anteil  $p$  von wahren Nullhypotesen ist die Wahrscheinlichkeit, wenigstens einen falsch-positiven Test zu bekommen, gleich  $1 - (1 - \alpha)^p N$  was größer als  $\alpha$  ist, falls  $pN > 1$ ; z.B.  $\alpha = 5\%$ ,  $N = 100$ ,  $p = 20\%$  führt auf 64.1 % Wahrscheinlichkeit (auch familienweiter Fehler genannt) wenigstens ein falsch-positives Testergebnis zu erhalten. Daher ist es sehr empfehlenswert, die ursprünglichen *p*-Werte zu adjustieren, um Kontrolle über den Fehler erster Art für alle Tests zusammen zu haben und verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Hierfür existieren zwei Hauptsätze: die familienweite Fehlerrate (FWER) und die Fehlentdeckungsrate (FDR). Die FWER ist

die Wahrscheinlichkeit dafür, dass es wenigstens ein falsch-positives Testergebnis gibt, die FDR ist der erwartete Anteil an falsch-positiven Testergebnissen. Im allgemeinen ist die FWER konservativer als die FDR und sollte gewählt werden, wenn man hohe Sicherheit für alle positiven Testergebnisse wünscht, hingegen ist die FDR vorzuziehen, falls ein gewisser Anteil von falsch-positiven Tests akzeptabel ist. Einen detaillierten Überblick über die zur Verfügung stehenden Ansätze geben Dudoit und van der Laan.<sup>[109]</sup> Wie im Rahmen der MAQC-Studie („microarray quality control“) hervorgehoben wurde,<sup>[110]</sup> ist es am besten, die adjustierten *p*-Werte mit der Vielfachheit der Veränderungen zu kombinieren, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse weiter zu erhöhen.

Die Hauptaktivität im Rahmen der Biomarkerentwicklung ist es, ein Vorhersagemodell vorzulegen, das in der Lage ist, Personen in korrekter Weise mit größtmöglicher Genauigkeit ihrer pathologischen Gruppe zuzuordnen. Aufgrund der hohen Dimensionalität der metabolischen Information können die meisten Klassifikationsmethoden nicht direkt, oder zumindest nicht in effizienter Weise direkt, angewendet werden: Mit wachsender Zahl an Messungen werden die Abstände zwischen Subjekten ähnlicher, und folglich ist der Klassifikationsalgorithmus nicht in der Lage, Entscheidungsgrenzen festzulegen. Dieses Phänomen, das auch als „Fluch der Dimensionen“ bekannt ist, wird noch verstärkt, wenn verdeckte und irrelevante Merkmale eingebunden werden. Daher ist es ein Hauptaspekt der Biomarkerentdeckung, den Ausgangsdatensatz zu verkleinern, sodass die Rechnungen machbar werden, die Vorhersagekraft des Modells verbessert wird und die biochemische Interpretation sich auf eine kleinere Menge von relevanten Metaboliten richten kann. Ein Modell zu finden, das eine vernünftige Teilmenge von hervorstechenden Merkmalen kombiniert und eine optimale Genauigkeit hat, kann auf verschiedene Weise angestrebt werden: zum einen können die Merkmale mit einer Art Relevanzmaß gefiltert werden, bevor der Klassifikationsalgorithmus angewendet wird, zum anderen kann die Teilmengensuche mit dem Klassifikationsalgorithmus verbunden werden („Wrapper“). Da Metabolite mit einer geringen Variabilität oftmals als nicht informativ angesehen werden, können diese in einem ersten Schritt mithilfe eines unspezifischen Filters entfernt werden.<sup>[111,112]</sup> Spezifische Filteransätze verwenden bestimmte Kriterien, üblicherweise in der Form von Ergebnissen von Klassenvergleichen oder von korrelationsbasierten Metriken, um die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen einzelnen Merkmalen zu messen.<sup>[113]</sup> Diese Techniken sind sehr effizient, vernachlässigen es jedoch, mögliche Wechselwirkungen und Korrelationen zwischen den Merkmalen explizit einzubinden, weshalb sie sehr wahrscheinlich in Situationen versagen werden, in denen die einzelnen Merkmale nur in Kombination informativ sind. „Wrapper“ bauen auf eine iterative Suche von Teilmengen in Verbindung mit einer Bewertungsmetrik (üblicherweise gegeben in Form der Klassifikationsgenauigkeit), welche die Merkmalsteilmengen bewertet. Da eine vollständige Ausschöpfung des Merkmalsraums im Allgemeinen nicht praktisch umsetzbar ist (die Zahl möglicher Teilmengen liegt in der Größenordnung von  $2^d$ , wobei  $d$  die Zahl der Messungen ist), werden mathematische Optimierungsstrategien hinzu-

gezogen, um eine akzeptable Menge von Biomerkern zu finden. Aufgrund der Anwendung des Lernalgorithmus auf jede Teilmenge, der Effizienz der Suchstrategie und der zusätzlichen Schritte, die notwendig sind, das Relevanzmaß zu schätzen, sind „Wrapper“ die zeitaufwendigsten Methoden unter allen Strategien zur Merkmalsauswahl. Für das Aufspüren von Biomerkern zahlen sich die Rechenkosten jedoch oftmals aus, da Wechselwirkungen zwischen den Merkmalen im Prinzip erhalten bleiben und die endgültige prädiktive Signatur oftmals eine höhere Genauigkeit bei gleichzeitig geringerer Länge aufweist.<sup>[114]</sup>

Nach der Auswahl der Merkmale muss der Klassifikator berechnet werden; das ist typischerweise eine (deterministische) Funktion, welche den multidimensionalen Vektor auf eine binäre (oder  $n$ -äre) Ergebnisvariable abbildet. Für diesen Zweck steht eine große Zahl an Algorithmen des überwachten Lernens zur Verfügung wie etwa logistische Regression, (diagonale) lineare oder quadratische Diskriminanzanalyse, mit schrumpfenden Zentroiden regularisierte Diskriminanzanalyse, Zufallswälder („random forests“), neuronale Netze, Stützvektormaschinen („support vector machines“), verallgemeinerte partielle kleinste Quadrate, Partitionierung um Medoide herum, rekursive Teilungs- und Regressionsbäume, K-nächste-Nachbarn-Klassifikatoren, „Bagging“, „Boosting“, „naive Bayes“ und viele mehr.<sup>[115–117]</sup> Methoden zum Auffinden von Klassen (d.h. nichtüberwachte Lernmethoden) wie die Clusterbildung sind nicht dazu geeignet, neue Proben zu klassifizieren.<sup>[118]</sup>

Im nächsten Schritt muss die berechnete prädiktive Signatur unter Verwendung eines geeigneten Maßes zur Messung der Leistung validiert werden. Da es in der  $n$ -ären Klassifikation  $n$  richtige Entscheidungen gibt, betrachtet man typischerweise einen Satz von Metriken; z.B. werden im Fall der binären Klassifikation häufig Paare von Metriken verwendet wie etwa Empfindlichkeit (Sensitivität) und Spezifität oder positiver und negativer Vorhersagewert. Generell kann die Verwendung eines einzelnen, d.h. eindimensionalen, Maßes zur Messung der Leistung, z.B. das Quotenverhältnis („odds ratio“), ziemlich in die Irre führen, da es nur einen eindimensionalen Aspekt eines  $n$ -dimensionalen Problems ( $n$  richtige Entscheidungen) widerspiegelt. Falls ein Klassifikator zum Beispiel 50 von 100 (50 %) Proben einer ersten und 99 von 100 (99 %) Proben einer zweiten Gruppe richtig vorhersagt, so ist das Quotenverhältnis  $0.5/0.5 \times 0.99/0.01 = 99$ . Jedoch ist dieser konkrete Klassifikator nicht besser als der Zufall, wenn es um das Vorhersagen der Zugehörigkeit zur ersten Gruppe geht. Einen umfassenden Überblick über die Möglichkeiten für binäre Klassifikationsprobleme gibt das MAQC-Konsortium in Lit. [119]. Typischerweise sollten für Maße zur Messung der Leistung zusätzlich statistische Maße wie Varianz oder Konfidenzintervalle angegeben werden, um deren statistische Signifikanz abzuschätzen und um einen realistischeren Eindruck von der Leistung des Klassifikators in der Praxis zu bekommen. Solche statistischen Maße können mit einer oder mehreren Runden von Kreuzvalidierung, „Bootstrap“ oder einem Ansatz, in dem die Stichprobe im Training-Test-Schritt aufgeteilt wird, berechnet werden.<sup>[116]</sup> Dieser Teil der Klassifikatorenentwicklung wird auch interne Validierung genannt. Um eine Verzerrung bei der Schätzung

des Klassifikationsfehlers zu vermeiden, bestehen die Testdaten aus Beobachtungen, die an keiner Entscheidung innerhalb aller Modellierungsphasen beteiligt sind; dies schließt auch das Vorverarbeiten der Daten sowie die Merkmalsselektion ein.<sup>[120,121]</sup> Erste Ergebnisse von Mikroarray-Studien, in denen biologische Effekte von signifikanter Stärke vorhanden sind und Klassifikatoren von angemessener Genauigkeit verwendet wurden, zeigen, dass die Wahl des Algorithmus zur Vorverarbeitung der Daten nur einen geringen Einfluss hat.<sup>[122,123]</sup>

Zusätzlich zur Genauigkeit muss ein Klassifikator verschiedene Kriterien erfüllen: Es muss die Prävalenz berücksichtigt werden, die prädiktive Signatur sollte mit biochemischer Evidenz unterstützt werden, und klinischer und therapeutischer Nutzen müssen gezeigt werden. Unter dem klinischen Nutzen eines Klassifikators versteht man, dass dieser einen zusätzlichen Wert zu den bereits verwendeten klinischen Prädiktoren hinzufügt.<sup>[124]</sup> Dies ist der Fall, wenn er entweder existierenden klinischen Prädiktoren überlegen ist oder in Kombination mit existierenden klinischen Prädiktoren den klinischen Prädiktoren allein überlegen ist. Für diesen Zweck sollten „Likelihood-Ratio“-Tests verwendet werden.<sup>[125]</sup> Weiterhin muss eine prädiktive molekulare Signatur für den täglichen Einsatz über eine gute Reproduzierbarkeit verfügen, die durch das Prozessieren der Proben in anderen Laboratorien bestätigt wurde. Eine solche Reproduzierbarkeit, therapeutische Relevanz und klinischer Nutzen sollten in externen Validierungen angegangen werden. Dies bedeutet, dass die Vorhersagekraft des trainierten Klassifikators durch die Vorhersage der Klassenzugehörigkeit von neuen, nicht gekennzeichneten Fällen aus unabhängigen Datensätzen beurteilt wird. Diese unabhängigen Datensätze können vom selben klinischen Zentrum kommen, sollten aber idealerweise auch von anderen klinischen Zentren stammen. Die externe Validierung kann auch den Transfer des Klassifikators auf die Plattform, die für die klinische Anwendung verwendet wird, beinhalten.

Eine Zusammenfassung von Empfehlungen für die beste Herangehensweise an die Analyse von und das Berichten über Biomarkerentdeckung und -validierung auf der Basis von Metabolomics findet sich in Tabelle 1.<sup>[126,127]</sup>

## 9. Anwendungen bei Erkrankungen: Biomarker und Metabolomics

Da das Metabolom durch das Alter, die Zusammensetzung der Magen-Darm-Flora und den Lebensstil beeinflusst wird, eignet es sich ideal zur Charakterisierung von Ernährungs- und Therapiebedingten Veränderungen, zur Charakterisierung des Metabolismus und natürlich zur Beschreibung metabolischer Störungen (siehe auch eine aktuelle Übersicht von Oresic<sup>[128]</sup>). Das Anwendungsgebiet von Metabolomics umfasst somit einen weiten Bereich, einschließlich Ernährungs- und Umweltforschung, ebenso wie eine zunehmende Zahl an Biomarkerstudien in Diagnostik und Arzneimittelforschung (Abbildung 1). Hier sollen bevorzugt neue Anwendungen in der Frühdiagnostik und etablierte sowie entstehende Anwendungen in der Therapie vorgestellt werden.

**Tabelle 1:** Empfehlungen für Datenanalyse/Statistik in Metabolomics.

Nr.	Empfehlungen
1	Bereich der Gültigkeit der Biomarkers: eine detaillierte Beschreibung der Patientengruppe geben
2	Angemessenes Hypothesentesten: Berücksichtigung einer möglichen Verzerrung wie Stratifikation der Population, technische Chargen und Störfaktoren
3	Verwendung eines geeigneten Indikators für die Ungenauigkeit und die Messung des Fehlers (Konfidenzintervall) sowie für die Berechnung der Auswirkung der Stichprobengröße
4	Korrektur für die Vielfachheit der statistischen Tests
5	Sich nicht nur auf (adjustierte) <i>p</i> -Werte verlassen: Kombiniere diese mit der Vielfachheit der Veränderungen oder anderen Kriterien
6	Validiere prädiktive Signaturen intern und extern
7	Schätze die Vorhersagekraft des multivariaten Modells mit einem Testdatensatz, der unabhängig von dem ist, der für die Trainings-/Modellierungsphase verwendet wurde
8	Bewerte die Qualität der Vorhersagemodelle auf der Basis mehrerer Maße und vergleiche sie mit dem Goldstandard, der routinemäßig in der Praxis verwendet wird
9	Setze den Markersatz sowohl in den pathophysiologischen als auch in den klinischen Kontext

Obwohl im Umweltbereich bereits gute Fortschritte erzielt wurden, bleiben noch zahlreiche mögliche Anwendungen ungenutzt. Zu den interessanten Entwicklungen der jüngsten Zeit gehört hier die Identifizierung bestimmter Wirbeltiere oder Wirbelloser als Indikatorarten für den Umweltstatus (beispielsweise Fischarten zur Beurteilung der Effekte von Umweltgiften, Klimaveränderungen, Einflüssen auf die Biodiversität, ebenso wie veränderte Biomarkermuster zur Risikobeurteilung von Arzneistoffen und Umweltchemikalien). Zu diesem Zweck wurden Erdwürmer (*Eisenia veneta*) Umweltgiften wie Nitrophenol<sup>[129]</sup> und fluorinierten Anilinen<sup>[130]</sup> exponiert, und die Wirkungen von Trichloräthylen und des Pestizids Dinoseb auf die Entwicklung von Fischen und Fischembryos (*Oryzias latipes*) wurden untersucht.<sup>[131,132]</sup>

Die Gesamtzahl potenzieller Biomarker wurde auf ca. 1133 000 geschätzt, wobei das Genom etwa 25 000 bis 30 000,<sup>[133]</sup> das Transkriptom ca. 100 000,<sup>[134]</sup> das Proteom etwa 1 000 000<sup>[135]</sup> und das Metabolom etwa 2500 bis 3000<sup>[134,136]</sup> Kandidaten beitragen können. Obwohl technologiebedingt die Verwendung von Metaboliten in diesem Zusammenhang erst später begann, thematisiert eine zunehmende Zahl an Publikationen inzwischen Metabolite zur Erklärung von Pathomechanismen komplexer Erkrankungen, zur Charakterisierung von Phänotypen, bei der Entwicklung diagnostischer Biomarker, als Marker zur Patientenstratifizierung und als „companion diagnostics“.<sup>[137]</sup> Vielversprechende Anwendungen in der Toxikologie und bei der Charakterisierung von Arzneistoffkandidaten lassen erwarten, dass Metabolomics

sich als unverzichtbar für Wirkstoffidentifizierung und -entwicklung erweisen wird.<sup>[138]</sup>

Metabolite werden bereits seit vielen Jahren in Körperflüssigkeiten gemessen, um Erkrankungen wie Diabetes über Glukose- oder mögliche Gefäßerkrankungen über Cholesterolkonzentrationen anzudeuten. Da Metabolomics inzwischen eine beeindruckende Zahl an Verbindungen erfassst und sich für Hochdurchsatzverfahren eignet, ist mittlerweile damit eine viel umfassendere Beurteilung des Patientenzustands wie auch eine Verwendung in der Identifizierung, Qualifizierung und Weiterentwicklung von Biomarkern möglich.

Metabolomics wurde bereits früh zum Screening von Neugeborenen auf Erbkrankheiten eingesetzt, beispielsweise zur Detektion von ca. 30 Fehlfunktionen in Enzymen, die Reaktionen von Kohlenhydraten, Aminosäuren,<sup>[139]</sup> Fettsäuren, Nukleinsäuren und des Harnstoffzyklus katalysieren.<sup>[140]</sup> Das Neugeborenen-Screening mithilfe von Massenspektrometrie ist mittlerweile weithin etabliert.<sup>[141–146]</sup> Ein Grund für diesen Erfolg liegt darin, dass der Zusammenhang zwischen (insbesondere monogenetischer) Krankheit, metabolischem Biomarker und Genetik bei vielen Erbkrankheiten<sup>[139,147]</sup> offensichtlich ist, so wie bei Cytochrom-P450-abhängigen Enzymen, welche die Synthese von Cholesterin,<sup>[148]</sup> Gallensäuren,<sup>[149]</sup> Steroidhormonen<sup>[150–153]</sup> und Vitamin D<sub>3</sub><sup>[154]</sup> katalysieren. Weitere unverzichtbare Anwendungen umfassen metabolische Störungen in lysosomalen Speicherkrankheiten, die eine Akkumulation der enzymspezifischen Sphingolipidsubstrate<sup>[139,147]</sup> in GM<sub>1</sub>- und GM<sub>2</sub>-Gangliosidose, Gaucher-Syndrom, Niemann-Pick-Krankheit, Fabry-Krankheit und vielen anderen bedingen. Entsprechend finden sich erste Versuche, Biomarker für Erkrankungen aus dem Metabolitenprofil abzuleiten, in der pädiatrischen Forschung.<sup>[155]</sup> Andere erfolgversprechende Anwendungen finden sich naturgemäß bei Störungen die mit Konzentrationsveränderungen endogener Metabolite wie Lipide, Zucker, Nukleotide, organische Säuren und Aminosäuren verbunden sind, z. B. bei vaskulären oder kardiovaskulären Erkrankungen.

Folglich stellen Metabolismus-, Alters- und Gewichtsbedingte Erkrankungen wie Diabetes Mellitus, Metabolisches Syndrom und Atherosklerose die natürlichen Felder von Metabolomics-Anwendungen dar. Die vier Gebiete, die durch das „Metabolic Disorders Steering Committee“ des „Biomarkers Consortium“ (<http://www.biomarkersconsortium.org/>), eine große öffentlich-private biomedizinische Forschungsinitiative, als solche mit höchster Priorität ausgewählt wurden, umfassen Atherosklerose, Beta-Zell-Funktion, Diabetes-bedingte Mikroangiopathie und altersbedingte Funktionsveränderungen.<sup>[156]</sup>

Metabolomics ist aber keineswegs auf Erkrankungen mit bekannten metabolischen Störungen begrenzt, sondern konnte auch anderweitig erfolgreich erprobt werden. In einer Aufstellung der Verteilung von Metabolomics-Publikationen über zahlreiche Erkrankungen haben wir im Oktober 2009 gezeigt (unveröffentlichte Ergebnisse), dass neben metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen auch Tumorerkrankungen und zahlreiche Störungen des Nervensystems, des endokrinen und des Verdauungssystems untersucht wurden. Obwohl diese Verteilung sicher durch die Fallzahl und durch den medizinischen Bedarf beeinflusst ist, ist sie

auch durch Erwartungen auf neue Informationen zur Krankheits-Ätiologie und zur Pathophysiologie gesteuert. Ein ständig wachsendes Spektrum unterschiedlicher Erkrankungen wird inzwischen mithilfe von Metabolomics untersucht, um die Diagnostik zu verbessern, Krankheitsverläufe abschätzen zu können, Behandlungen zu steuern und die Arzneistoffentwicklung zu beschleunigen. Um das Potenzial von Metaboliten als Biomarker bei unterschiedlichsten Erkrankungen aufzuzeigen, werden wir im Folgenden einige repräsentative Beispiele vorstellen.

Metabolomics wurde beispielsweise eingesetzt, um das Verhalten von achtzehn Patienten mit induzierbarer Ischämie und einer gleichgroßen Kontrollgruppe ohne Ischämie unter sportlicher Belastung zu überwachen. Dazu wurden vor und nach dem Test Plasmaproben entnommen und mit einem ERI-Tandemmassenspektrometer analysiert. Während die Laktatkonzentrationen erwartungsgemäß bei beiden Gruppen anstieg, konnte die Ischämie-Gruppe anhand von sechs Metaboliten von der Kontrollgruppe unterschieden werden.<sup>[157,158]</sup> Ein Bedarf an verbesserter Diagnostik besteht beispielsweise bei Morbus Crohn, einer entzündlichen Darmerkrankung mit unklarer Ätiologie, die durch chronische Entzündung des Magen-Darm-Trakts gekennzeichnet ist. Um die exakten Massen tausender Metabolite in den Faeces von Zwillingen unterscheiden zu können, wurde Zyklotronresonanz-Fourier-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) eingesetzt.<sup>[159]</sup> Differentiell regulierte Metabolitenkonzentrationen wurden hier unter Aminosäuren, Fettsäuren, Gallensäuren und Arachidonsäure-Metaboliten gefunden, signifikante Unterschiede konnten beim Tyrosin- und Phenylalanin-Metabolismus sowie bei der Biosynthese von Gallen- und Fettsäuren nachgewiesen werden. Daraus abgeleitete Signalübertragungswege können zum Verständnis der Pathobiochemie von Morbus Crohn beitragen und auch zu neuen Ansätzen für Arzneistoffe führen.

Erkrankungen der Leber stellen hohe Anforderungen an die Diagnostik, da eine Reihe dieser Erkrankungen eine ähnliche klinische Symptomatik sowie ähnliche Laborparameter zeigt. Whitfield und Mitarbeiter konnten anhand eines Hundemodells das diagnostische Potenzial von Metabolomics nachweisen.<sup>[160]</sup> Auch bei Hirnerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen kommt Metabolomics inzwischen zum Einsatz. In Anbetracht der Unsicherheit klinischer Parameter bei der Parkinson-Krankheit wären diagnostische Marker ebenso wie Marker zur Beobachtung des Krankheitsverlaufs von großer Bedeutung. Bogdanov und Kollegen<sup>[161]</sup> identifizierten Änderungen in 8-Hydroxy-2-deoxyguanosin-, Harnsäure- und Glutathion-Konzentrationen als Marker zur Unterscheidung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Sie bewerten Metabolomics hier in Bezug auf eine Biomarkeridentifizierung für Diagnostik und Verlaufskontrolle als sehr aussichtsreich.

Präeklampsie beschreibt eine komplexe Störung in der Schwangerschaft mit weitreichenden Auswirkungen sowohl auf die Mutter als auch auf das Neugeborene. Um Präeklampsie-Proben von Proben normaler Schwangerer anhand von metabolischen GC-TOF-MS-Daten zu unterscheiden, kamen unter anderem genetische Algorithmen zum Einsatz.<sup>[162]</sup> Metabolomics Profiling erwies sich ferner in der

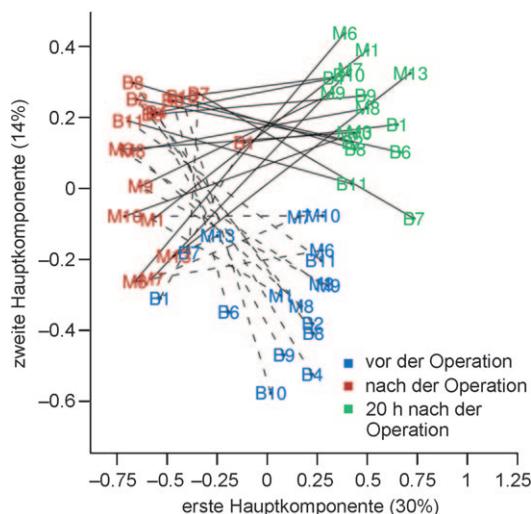
Diagnostik von Abstoßungsreaktionen nach Nieren-, Leber- und Herztransplantationen<sup>[163,164]</sup> sowie beim Nachweis von Nierentoxizität<sup>[165]</sup> gegenüber klinischen Standardparametern als überlegen.

Da bekannt ist, dass Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe unterschiedliche Konzentrationen bestimmter Metabolite (z.B. solcher des Energiestoffwechsels) aufweist und dass Krebszellen einen eigenen metabolischen Phänotyp haben, kam Metabolomics auch in der Onkologie zum Einsatz.<sup>[7,166]</sup> Die meisten Studien beziehen sich hier allerdings auf <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischen oder PET-Untersuchungen sowie auf Gewebeuntersuchungen und Biopsien. Bisher wurde noch kein überzeugender Ansatz veröffentlicht, der Unterschiede anhand der Untersuchung peripherer Proben wie Plasma oder Serum in Verbindung mit einem Tumornachweis oder mit der Größe von Tumoren zeigt. Wir sind jedoch der Meinung, dass in der näheren Zukunft auch Metaboliten in peripheren Kompartimenten wie Plasma oder Serum, die mit empfindlichen massenspektrometrischen Methoden quantifiziert werden können, zur Erkennung von Krebskrankungen herangezogen werden, mit der Hoffnung auf Früherkennung wenigstens einiger Erkrankungen. Zusätzlich kann Metabolomics hier möglicherweise Marker zur dringend erforderlichen Kontrolle therapeutischer Interventionen liefern.

Longitudinale Studien an Patienten liefern für die Entwicklung diagnostischer Biomarker sehr wichtige Daten. Dennoch sind immer noch Fehler durch die Aufnahme unterschiedlicher Nahrung und die Veränderung physiologischer Bedingungen möglich. Physiologische Belastungen und Stress beeinflussen bekanntermaßen das Metabolom, weshalb der Einschluss hospitalisierter Individuen, die nicht an der ausgewählten Krankheit leiden, sehr empfehlenswert ist. In diesem Zusammenhang haben wir den Teil des Plasmametaboloms von Patienten nach Beipassoperation untersucht. Über 200 Metabolite wurden bei 17 Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der Beipassoperation untersucht.<sup>[193]</sup> Die Daten zeigen klar, dass zahlreiche signifikante Änderungen von Metabolitenkonzentrationen detektiert werden können und Zeitpunkte anhand quantitativer Metabolitendaten unterschieden werden können (Abbildung 4).

Die „Heatmap“ in Abbildung 5 zeigt, dass Metabolitenkonzentrationen Cluster bei unterschiedlichen Zeiten (vor und nach Behandlung) bilden und zahlreiche Metabolitenkonzentrationen durch die Operation differenziell reguliert werden. Dies ist auch in der Hauptkomponentenanalyse sichtbar, die zeigt, dass die Metabolitenvariabilität hauptsächlich den Entnahmzeitpunkt und den mit der Operation verbundenen Stress (unter anderem durch die Narkose) reflektiert. Entsprechend müssen die empfindlichen Veränderungen von Metabolitenkonzentrationen in Körperflüssigkeiten, die unter veränderten Bedingungen oder infolge verschiedenster Behandlungen bei Patienten auftreten, durch passende Kontrollen berücksichtigt werden, damit nicht Biomarkerkandidaten ohne direkten Bezug zur Erkrankung selektiert werden.

Im Bereich der Diagnostik erwarten wir von Targeted Metabolomics den größten Nutzen. Dies lässt auch die eta-

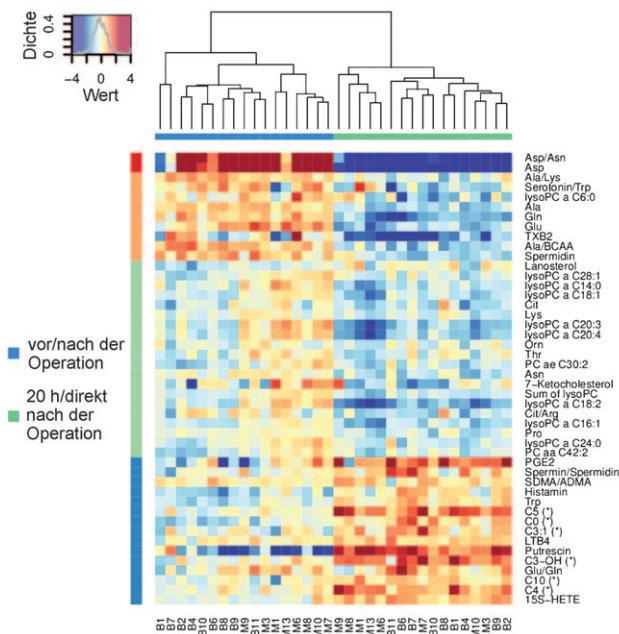


**Abbildung 4.** Projektion von zielgerichteten metabolomischen Profilen für 17 Patienten auf die ersten beiden Hauptkomponenten (PC). Jedem Patienten wurden Plasmaproben zum Zeitpunkt der Operation sowie nach deren Ende und 20 h nach der Operation entnommen. Durch Transformation der hochdimensionalen Daten in ein Koordinatensystem, das durch die ersten beiden PCs, die zusammen 44% der Variabilität innerhalb der Daten widerspiegeln, aufgespannt wird, kann man den Zeitverlauf für jeden Patienten folgen, wobei jeder Zeitpunkt einen eigenen Cluster bildet.

blierte Anwendung der Massenspektrometrie<sup>[167,168]</sup> im Bereich des klinischen Neugeborenen-Screenings erwarten. Am anderen Ende des Altersspektrums könnte Lipidomics eine größere Rolle in der Frühdiagnostik neurodegenerativer Erkrankungen spielen.

Beinahe ein Viertel des Cholesterols im Körper befindet sich im Hirn.<sup>[169]</sup> Im Menschen verläuft die Hauptroute des Cholesteroltransports aus dem Hirn, wie bereits zuvor erwähnt, über metabolische Umwandlung in 24S-Hydroxycholesterol, das, anders als Cholesterol, die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann.<sup>[170,171]</sup> 24S-Hydroxycholesterol wird aus Cholesterol durch eine Cytochrom-CYP46A1<sup>[172]</sup>-katalysierte Reaktion in Neuronen gebildet und aus dem Hirn mit einer Geschwindigkeit von 6–7 mg pro Tag ausgeschleust.<sup>[170,171]</sup> Anders als 24S-Hydroxycholesterol wird 27-Hydroxycholesterol mit einer Geschwindigkeit von 5 mg pro Tag in das Hirn transportiert,<sup>[173]</sup> wo es zu 7a-Hydroxy-3-oxocholest-4-en-27-carbonsäure umgesetzt und über die Blut-Hirn-Schranke mit einer Geschwindigkeit von 2 mg pro Tag<sup>[174]</sup> wieder zurück transportiert wird.

Da das Hirn von CSF umgeben ist, das die Metaboliten von Hirnzellen aufzunehmen vermag, wurde vorgeschlagen, dass der Oxysterolgehalt von CSF als Marker der Cholesterolhomöostase des Hirns dienen könnte.<sup>[175]</sup> Die Konzentration an 24S-Hydroxycholesterol sollte entsprechend die Zahl metabolisch aktiver Neuronen widerspiegeln, ebenso wie die Verfügbarkeit von Cholesterol für eine Umsetzung durch CYP46A1. Im Verlauf der Neurodegeneration sinkt die Zahl metabolisch aktiver Neuronen, während die Konzentration an Cholesterol, das für die 24S-Hydroxylierung verfügbar ist, durch Verlust der Membranen ansteigt. Eine Bestimmung der Oxysterolkonzentrationen (freies Oxysterol plus Fettsäure-



**Abbildung 5.** „Data Mining“ deckte 46 Merkmale auf, die signifikant (adjustierter  $p$ -Wert  $< 0.01$ ) um die Operation herum und danach veränderten. Die Visualisierung der relevantesten Metabolitveränderungen (jede Zeile steht für einen Metaboliten) erfolgt durch die Darstellung der Konzentrationsverhältnisse zwischen nach und vor der Operation sowie zwischen 20 Stunden nach und sofort nach der Operation für jeden Patienten (jede Spalte repräsentiert einen Patienten). Das Baumdiagramm über dem Bild zeigt das Ergebnis einer hierarchischen Clusteranalyse (basierend auf den ausgewählten Merkmalen, die auch für die Sortierung der Patienten verwendet wurde), die zu einer perfekten Trennung der beiden Gruppen führt. Rote und blaue Zellen zeigen höhere bzw. niedrigere Konzentration in der Probe bezogen auf den zweiten Zeitpunkt an (siehe das Diagramm in der linken oberen Ecke).

ester) in CSF mit GC-MS scheint eher das Maß der Neurodegeneration als die Zahl metabolisch aktiver Neuronen wiederzugeben,<sup>[86]</sup> da signifikant erhöhte Konzentrationen an 24S-Hydroxycholesterol bei Alzheimer-Erkrankung (AD), vaskulärer Demenz (VD) und kognitiv beeinträchtigten Patienten (MCI) gefunden wurden (ca.  $2 \text{ ng mL}^{-1}$ , im Vergleich zu  $< 1.5 \text{ ng mL}^{-1}$  bei den Kontrollproben).<sup>[89,90,176]</sup> Ebenso ist die Konzentration an 27-Hydroxycholesterol in CSF von AD- und MCI-Patienten erhöht ( $1.8 \text{ ng mL}^{-1}$ , im Vergleich zu  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  in den Kontrollen),<sup>[90]</sup> was allerdings einer schlecht funktionierenden Blut-Hirn-Schranke zugeschrieben wurde.<sup>[86]</sup> Diese Diskussion zeigt das Potenzial von Metabolomics. Allerdings waren die Zielsetzungen durch die verwendete GC-MS-Technik eher begrenzt. Der Einsatz von weniger selektiven analytischen Methoden ist eine Möglichkeit, um das erfassbare Metabolom zu erweitern.

Unter Verwendung von Umkehrphasen-SPE anstelle von Normalphasen-SPE für die Vorbereitung von CSF-Proben können zusätzlich saure und neutrale Lipide erfasst werden. Des Weiteren können mit der GP-Derivatisierung (mit und ohne Cholesteroloxidase-Schritt, Abbildung 2) auch Steroide, Sterole und Gallensäuren mit sowohl Oxo- als auch  $3\beta$ -Hydroxy-5-en- und  $3\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -wasserstoff-Einheiten mit

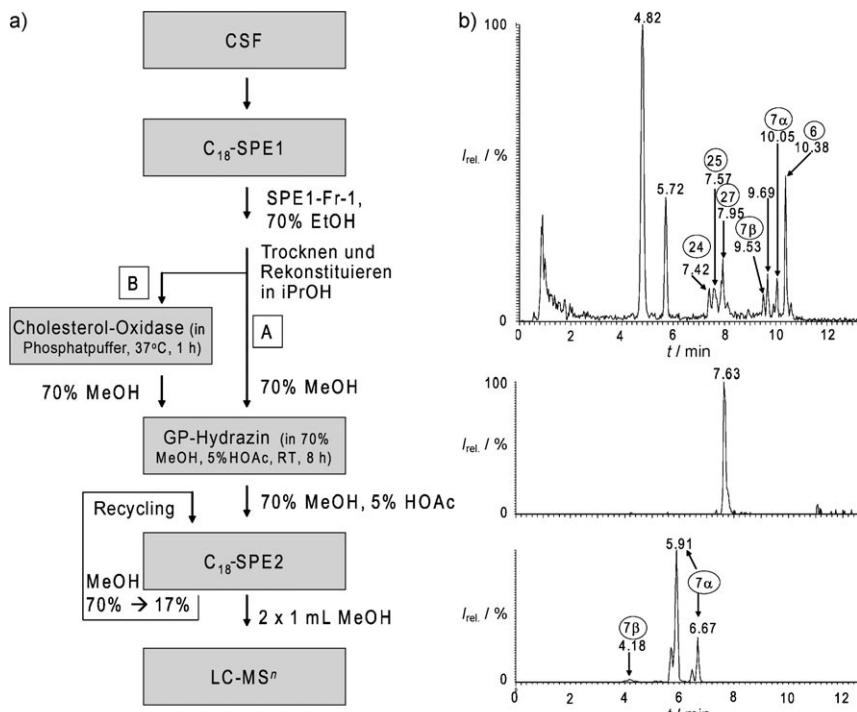
HPLC-ESI-MS analysiert werden. Damit konnten folgende Oxysterole und Gallensäuren im humanen CSF identifiziert werden: 24S-Hydroxycholesterol ( $0.018 \pm 0.009 \text{ ng mL}^{-1}$ ), 25-Hydroxycholesterol ( $0.030 \pm 0.010 \text{ ng mL}^{-1}$ ), 27-Hydroxycholesterol ( $0.029 \pm 0.012 \text{ ng mL}^{-1}$ ),  $7\beta$ -Hydroxycholesterol ( $0.009 \pm 0.005 \text{ ng mL}^{-1}$ ),  $7\alpha$ -Oxcholesterol ( $0.034 \pm 0.017 \text{ ng mL}^{-1}$ ),  $3\beta$ -Hydroxycholest-5-en-27-säure ( $0.416 \pm 0.193 \text{ ng mL}^{-1}$ ),  $3\beta,7\beta$ -Dihydroxycholest-5-en-27-säure ( $0.165 \pm 0.155 \text{ ng mL}^{-1}$ ) und  $7\alpha$ -Hydroxy-3-oxocholest-4-en-27-säure ( $7.17 \pm 2.826 \text{ ng mL}^{-1}$ ; Abbildung 6).<sup>[73]</sup> Diese Werte entsprechen den freien Konzentrationen ohne vorherige Hydrolyse.

Metabolomics kann in der Arzneistoff-Forschung zur Identifizierung von makromolekularen Zielstrukturen, zur Reihung von Leitstrukturen und zur Ermittlung von Toxizität und damit zur Entwicklung neuer und sicherer Arzneistoffe beitragen. Bedingt durch einen verstärkten Bedarf, Wirksamkeit und Verträglichkeit nachzuweisen, werden erhöhte Anforderungen an die Pharmaentwicklung gestellt, die Toxizität zu minimieren und frühestmöglich im Entwicklungsprozess nachzuweisen. Die Verwendung von Metabolomics kann in der molekularen Toxikologie von Arzneistoffkandidaten zum Verständnis der Mechanismen beitragen und damit Fehlschläge sowohl im frühen wie späteren Entwicklungsstadium reduzieren. Es ist daher gut verständlich, dass die Identifizierung von Toxizitätsmarkern zur Verwendung in präklinischen und klinischen Studien<sup>[177–181]</sup> einen der Schwerpunkte aktueller Pharmaforschung darstellt.

Metabolomics hat somit das Potenzial, sowohl die Kosten als auch den Zeitaufwand für die Entwicklung neuer Arzneistoffe zu reduzieren, zumal bis heute etwa die Hälfte in der klinischen Phase III scheitert. Toxizität und Nebenwirkungen sind aber auch Probleme für zugelassene Arzneimittel. Schätzungsweise 2–20% aller Klinikeinweisungen gehen auf unerwünschte Nebenwirkungen zurück, diese treten bei etwa 10% aller hospitalisierten Patienten auf.<sup>[182]</sup> Darunter sind in Deutschland 10.2% unerwünschte Wirkungen bei der Arzneimitteltherapie kardiovaskulärer Erkrankungen<sup>[183]</sup> und ca. 12% in kardiologischen Stationen in Frankreich.<sup>[184]</sup> Nach Angabe der Firma Stemina (<http://www.stemina.com/>), eignen sich humane embryonale Stammzellen, die zu unterschiedlichen Zelltypen wie Kardiomyozyten-Vorläuferzellen differenzieren können, als interessante Alternative in Toxizitätsscreenings und prädiktiver Toxikologie.

Noch ist es zu früh, die Rolle metabolischer Biomarker im Vergleich zu anderen diagnostisch eingesetzten Biomolekülen zu bewerten. Wir haben uns aber bemüht, relevante Charakteristika, Vorteile und Nachteile einschlägiger (und hauptsächlich verwendeter) „omics“-Daten und Marker hinsichtlich Biomarkerentdeckung, -entwicklung und diagnostischer Anwendungen gegenüberzustellen (Tabelle 2). Dies bezieht sich ausschließlich auf erwähnte Anwendungen und nicht auf den wissenschaftlichen Stellenwert dieser „omics“-Technologien. Obwohl so eine Bewertung immer unvollständig bleiben muss und die Meinung der Autoren wieder gibt, denken wir dennoch, dass einige Vorteile von Metaboliten als Marker offensichtlich sind.

Metabolite (und ihre unterschiedlichen Konzentrationen) stellen funktionelle Endpunkte dar und sollten deshalb den



**Abbildung 6.** a) Probenvorbereitung für die LC-ESI-MS-Analyse von Gallensäuren und Oxyestrolen durch GP-Derivatisierung. b) Extrahierte Ionenchromatogramme für die  $[M]^+$ -Ionen von GP-derivatisierten Monohydroxycholestenolen ( $m/z$  534.4; oben), Hydroxycholestensäuren ( $m/z$  548.3847; Mitte) und/oder Hydroxy-3-oxocholest-4-ensäuren ( $m/z$  564.3796; unten).

gegenwärtigen Zustand eines Organismus ohne große Verzögerung durch Signalweiterleitung wiedergeben. Dies bedeutet nicht zwangsläufig, dass metabolische Marker beispielsweise wertvoller als prognostische Marker sind, sie könnten aber sehr wohl die am besten geeigneten Biomarker für sehr schnell fortschreitende Erkrankungen darstellen. Andere Faktoren betreffen das ausgesprochen kleine Probenvolumen – eine Tatsache, die beispielsweise in der Pädiatrie sehr wichtig ist – ebenso wie die kurze Zeit, die für die Beschaffung der diagnostischen Information notwendig ist. Andererseits ist die Abdeckung des Metaboloms mit gezielten quantitativen Methoden nach wie vor relativ gering, was die Chancen einschränkt, Marker durch Screening zu entdecken. Diese Situation verbessert sich allerdings schnell.

Während sich die biochemische Interpretation von Gebedaten relativ einfach gestaltet, werden Plasma- oder Serumkonzentrationen durch zahlreiche Parameter vielfältiger Kompartimente beeinflusst. Allerdings sind wir der Meinung, dass eine biologische Plausibilität, die sicher sowohl wissenschaftlich von Interesse ist als auch bei weiteren Entdeckungen sehr hilfreich sein kann, keine unabdingbare Voraussetzung für einen Biomarker darstellt und auch, ebenso wenig wie mangelnde biologische Interpretierbarkeit, kein Hindernis für eine Weiterentwicklung darstellt. Ein solches Akzeptanzkriterium würde sonst ein vollständiges Verständnis biologischer Vorgänge sowie die vollständige Kenntnis der Kinetik und Wechselwirkungen eines biologischen Systems voraussetzen – eine Situation von der wir noch weit entfernt sind. Hinweise auf die Beteiligung bestimmter Stoffwechselwege können allerdings wertvolle zusätzliche

Bestätigungen liefern, insbesondere bei unzureichender statistischer Signifikanz der Daten.

Im Zuge ihrer „Critical-Path“-Initiative, die auf eine effizientere Arzneimittelentwicklung abzielt, arbeitet die FDA an Richtlinien für die Qualifizierung und den Einsatz von Biomarkern. Metabolomics wird als Teil der „Critical-Path“-Initiative anerkannt und kann in Bezug auf viele Aspekte eine entscheidende Rolle spielen: bei der Entdeckung besserer Biomarker, bei Biomarkern zur Erkennung von Nieren-, Leber-, Herz- und Gefäßschäden, bei Krankheitsmodellen zur Optimierung von Leitstrukturen und zur Beurteilung der Toxizität, bei der Identifizierung von Biomarkern für die Beurteilung der Unbedenklichkeit, Wirksamkeit und Toxizität, um die Planung klinischer Studien zu vereinfachen, beim Einschluss geeigneter Patienten, beim Verfolgen der Reaktion der Probanden auf die Arzneimitteltherapie und bei vielem anderen mehr.<sup>[185–187]</sup>

Während Plattform-Kompatibilitäten, Datenprozessierung und weitere für klinische Studien relevante Punkte z.B. in der Mikroarray-Technologie in mehreren Projekten und in vielen Publikationen behandelt worden sind, um Mittel zur Qualitätskontrolle zur Verfügung zu stellen, um Richtlinien für Mikroarray-Datenanalyse zu entwickeln, um Vor- und Nachteile verschiedener Datenanalysemethoden beurteilen zu können, um Übereinstimmung über die beste Vorgehensweise zu erreichen, um Qualitätskontroll-Kriterien und Grenzwerte zur Beurteilung der Leistung verschiedener Mikroarray-Plattformen zu erhalten, ist in Bezug auf Metabolomics hier noch ein langer Weg zurückzulegen. Auf dem Gebiet der funktionellen Genomik und der Mikroarray-Technologie sind Methoden der Qualitätskontrolle, Vorgaben zur Datenhinterlegung und Richtlinien weiter entwickelt als bei Metabolomics. Hier wurden beispielsweise Definitionen für genomics Biomarker, Pharmakogenomik, Pharmakogenetik gegeben und Kategorien zur Kodierung von genomics Daten und von Proben etabliert.<sup>[188, 189]</sup>

## 10. Jenseits der Datenintegration

„Metabolic Profiling“ wird seit langem zur Bestimmung von Biomarkern verwendet, um den pathophysiologischen Zustand von Patienten beurteilen zu können. Das Aufkommen genomics und proteomics Technologien lieferte plausible Zusammenhänge, die diagnostischen und prognostischen Biomarkern im Gesund-krank-Kontinuum entsprechen.<sup>[190, 191]</sup> Metabolic Profiling wird als Metabolomics<sup>[9]</sup> oder als Metabonomics<sup>[11]</sup> bezeichnet, obwohl beide Begriffe metabolische Veränderungen unter verschiedenen Bedingungen

**Tabelle 2:** Einige Charakteristika bei der Identifizierung und Anwendung von RNA-, Protein- und metabolischen Biomarkern mit vergleichender Bewertung.

Charakteristikum	Funktionelle Genomik, Transkriptomik	Proteomik	Metabolomics			
Speziesunabhängigkeit in Bezug auf (Tier)Mo- delle und Menschen	speziesabhängig	–	speziesabhängig	–	Metabolische Stoffwechselwe- ge sind hoch konserviert bei Spezies; Vorteile beim Scree- ning im Tiermodell	++
Grad der Abdeckung des Gesamt-„oms“ im Screening	pangenomisch, >10 <sup>6</sup> Gene, Spleißvarianten; Vormarsch der Hochdurchsatz-Sequen- zierung	+++	eingeschränkt mit 2D-Elekto- phorese, bei >10 <sup>6</sup> möglichen Veränderungen (einschließlich posttranslationaler Modifika- tionen) relativ geringer Pro- zentsatz, allerdings zuneh- mend durch technische Ent- wicklungen in der MS	+	Noch weit von einer „voll- ständigen“ Abdeckung ent- fernt (ca. 10 <sup>3</sup> ); erfordert die Anwendung verschiedener analytischer Plattformen/Me- thoden	--
Zeit bis zum Ergebnis/ Umschlagzeit/Proben- vorbereitung	>2.5 h, PCR oder Mikroar- rays; mehrere Aufarbeitungs- schritte	–	z. B. Antikörper-Test, ELISA, Array >3 h; mehrere Aufarbei- tungsschritte für MS	+ / –	<2 h möglich für kleinere Probenanzahl; direkte Analyse von Plasma, Serum, Blut- tröpfchen	++
Erforderliche Proben- größe/Nachweisgren- ze	>2 mL Blut ohne Amplifikati- on, ca. 100 ng Total-RNA mit Amplifikation	–	im pg-Bereich für Antikörper- Test (ELISA), im ng-Bereich für Arrays	+	z. B. 20 µL Plasma/Serum oder 50 mg Gewebe für meh- rere Methoden; Langzeitsta- bilität ungeklärt	++
Aussagen über gegen- wärtigen Zustand (eines Organismus, einer Zelle usw.)	mehr eine Vorschau; die meisten transkriptionellen Än- derungen benötigen >1 h; Nützlichkeit hängt davon ab, wie schnell sich der betreffen- de Krankheitszustand verän- dert	+ / –	die meisten Veränderungen auf dem Niveau der Proteinsyn- these (ohne Sekundärmodifi- kationen) benötigen mindestens 1 h.	–	Metabolitenkonzentrationen reagieren rasch bei physiolo- gisch relevanten Veränderun- gen (teilweise binnen Minuten und weniger).	++
Antwort auf Stimulus/ dynamischer Bereich	Veränderungen der Transkript- konzentrationen bis zu 100- fach oder mehr	++	Konzentrationsveränderungen bis ca. 10-fach; viel Information in Sekundär- modifikationen verborgen	+ / –	Metabolitenkonzentrationen über Veränderungen auf En- zymebene möglich (Amplifi- kationseffekt); beeinflussbar durch Nahrung, Umgebung usw.	++ <sup>[a]</sup>
Nichtinvasive Biomar- kerbestimmung mög- lich	erfordert Zellextraktion.	--	erfordert üblicherweise Extrakti- on (Zellen, Körperflüssigkei- ten); direkte Bestimmung aus Serum/Plasma möglich mit Antikörpern	–	möglich aus Urin, Speichel, Kot usw.	++
Nachweis von Erb- krankheiten und ange- borenen Störungen	Gute Chancen zur Detektion auch Multigen-bedingter Stö- rungen.	++	Funktionalität schlecht über Konzentrationsveränderungen beschreibbar (gegebenenfalls bei Enzymen), erfordert Se- quenzierung	–	gängig in der Pädiatrie, weni- ger geeignet bei Multigen-be- dingten Störungen	++
Anwendung in der Toxikologie	sinnvoll, aber funktionelle Auswirkungen schwer ab- schätzbar	+	funktionelle Auswirkungen schwer abschätzbar	+ / –	liefert Funktionsänderungen; Relevanz muss bestätigt werden	+
Dateninterpretation in der Systembiologie, über Modelle, Wege usw.	zahlreiche Möglichkeiten, aber vielfach indirekte Wechselwir- kungen; auch Hinweise durch Daten primär auf indirekte Wechselwirkungen	++	begrenzt durch Teil der Erfas- sung des Gesamtproteoms	+	begrenzt durch Teil der Erfas- sung und durch Datenbank- einträge; abhängig von Er- krankung; gute Kenntnis der Stoffwechselwege	+ / –

[a] Bewertung abhängig vom Studienziel.

bezeichnen. Wir haben die statistische Kombination von Biomarkersätzen bestehend aus unterschiedlichen Biomolekülen und kombiniert zu diagnostischen Signaturen, die eben diese unterschiedlichen Biomolekülen umfasst, unabhängig von einer Datenintegration und von einer biochemischen Interpretation untersucht. Dies wurde auf der Grundlage rein statistischer Methoden mit unterschiedlichen Klassifikationsverfahren durchgeführt und hat bisher vielversprechende Ergebnisse geliefert. Hier ist anzumerken, dass sich dieser Ansatz grundsätzlich von integrativen multidimensionalen Analysen unterscheidet, bei denen beispielsweise Genom, Epigenom und Transkriptom inhaltlich kombiniert werden.<sup>[192]</sup> Solche Analysen zielen darauf ab, biologische Beziehungen, die bei der Gewinnung unterschiedlicher „omics“-Daten feststellbar sind, mit unterschiedlichen Ansätzen auszuwerten.

Wir haben beispielsweise Support-Vektormaschinen mit einem linearen Kern verwendet, um Ischämie und Hypoxie bei Ratten vorherzusagen (7 Tiere mit Ischämie und 9 Kontrolltiere). Durch Kombination der beiden (auf Basis eines t-Tests und aufgrund von „fold changes“ bestgereihten (ausgewählt aus 275 unterschiedlichen) Metabolitendaten mit mRNA-Daten (SDF1 und VEGF) konnte die Genauigkeit des Klassifikators von 50% bzw. 68.75% auf 75% gesteigert werden. Die entsprechenden ROC-Kurven sind in Abbildung 7 dargestellt.

Unsere Methode kombiniert damit auf rein statistischer Basis die Messung von mindestens zwei unterschiedlichen Typen von Biomolekülen (RNA, nichtkodierende RNA/mikroRNA, Proteine, Metaboliten), ungeachtet der biologischen Plausibilität und unabhängig von bekannten oder noch unbekannten biologischen Zusammenhängen irgendwelcher Art, um damit einen aus unterschiedlichen Biomolekülen zusammengesetzten Biomarker zu erhalten.

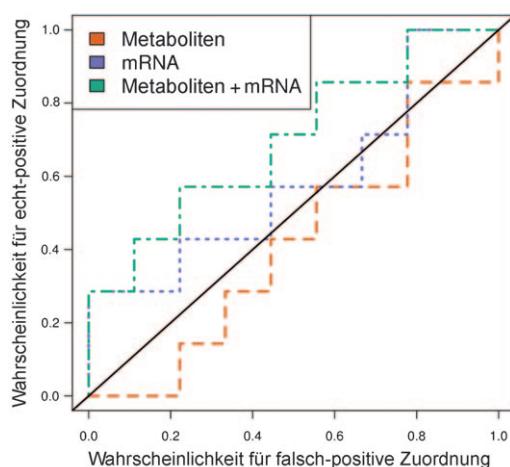
Die obigen Beispiele zeigen, dass eine diagnostische Methode oder ein krankheitsspezifischer Klassifikator, der aus wenigstens zwei Biomolekülen unterschiedlichen Typs besteht, den Status von Zellen, eines Gewebes, Organs oder

Organismus möglicherweise am besten beschreiben kann. Diese zusammengesetzten Biomarker oder aus solchen Biomolekülen abgeleitete Signaturen und Klassifikatoren können Molekülkombinationen des gleichen Typs überlegen sein und hoch empfindliche und spezifische Biomarker ergeben, insbesondere bei komplexen Erkrankungen wie Krebs. Dies allgemein zu belegen steht allerdings noch aus, ebenso wie die biologische Erklärung für ein solches Resultat.

## 11. Herausforderungen bei der Biomarkeranalyse

Vorausgesetzt die Experimente werden vernünftig geplant, können mittlerweile die meisten Metabolomics-Techniken Biomarkerkandidaten liefern. Schon im Stadium der Entdeckung kann die Auswahl ungeeigneter Kandidaten, die später in der Validierungsphase scheitern würden, vermieden werden. Hierzu muss eine Reihe unterschiedlicher Aspekte berücksichtigt werden. Die Gewinnung reproduzierbarer Daten setzt das Vorliegen geeigneter Proben voraus sowie, aufgrund unterschiedlicher Stabilitäten der Verbindungen, deren geeignete Lagerung, eine optimierte Aufarbeitung (in Bezug auf Extraktionsausbeute und Aufreinigung), eine passende Lagerung (zur Vermeidung der Alterung von Proben) und den Einsatz validierter Analysemethoden mit ausreichender Genauigkeit, Empfindlichkeit und Selektivitäten sowie minimierte Matrix- und Verschleppungseffekte. Zusammen mit einer passenden Signalverarbeitung zahlt sich der Aufwand, der in die Validierung investiert wurde, in Bezug auf dadurch verminderte technische Variabilität und in Hinblick auf die Auswahl der dann für die weitere Entwicklung „richtigen“ Analyte sehr wohl aus.

Während sorgfältiges Design, Randomisierung, gezielte Patienten- und Probandenauswahl und adäquate statistische Verarbeitung absolute Voraussetzungen sind, um fehlerhafte Schlussfolgerungen zu vermeiden, wird die Bedeutung der Probenqualität sowohl bei der Datensammlung als auch in Bezug auf die Weiterverarbeitung bei Metabolomics-Experimenten oftmals unterschätzt. Inzwischen gibt es einige Veröffentlichungen, welche die Auswirkungen von Einlagerungsbedingungen, Transportbedingungen, den Einfluss von Einfrier-Auftau-Zyklen, Glaskontaminationen sowie Lagerungstemperaturen und -dauern (bis hin zu 6 Monaten) auf <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch oder massenspektrometrisch bestimmte Metabolitenkonzentrationen beschreiben. Durch den Mangel an Information zu der Empfindlichkeit einzelner Plattformen und zur Reproduzierbarkeit der Experimente, auch hinsichtlich des Einflusses physikochemischer Eigenschaften, kann ein metabolisches Profil deutlich beeinträchtigt werden, bis hin zu dem Punkt, an dem die mit der Handhabung verbundenen Variabilitäten deutlich verfälschend wirken. Es wird empfohlen, festgelegte experimentelle Bedingungen strikt einzuhalten, einheitliche Verfahren in der Präanalytik zu etablieren, enzymatische und chemische Veränderungen durch Lagerung bei tiefer Temperatur zu vermeiden und die Manipulation von Proben auf ein Minimum zu beschränken. Gegenwärtig ist wenig über den Effekt einer langfristigen Lagerung auf die (bio)chemischen Transformationen niedermolekularer Verbindungen in komplexen



**Abbildung 7.** Die ROC-Kurven („receiver operating characteristic“) für LOO-kreuzvalidierte Klassifikatoren („leave one out“) zeigen eine höhere Genauigkeit für solche prädiktiven Signaturen an, die verschiedene Biomoleküle kombinieren.

Matrices bekannt, was Fragen bezüglich reproduzierbarer Bestimmungen eingelagerter Proben und prospektiver epidemiologischer Studien aufwirft.

## 12. Schlussfolgerungen und Ausblick

Zurzeit steckt Metabolomics noch in den Kinderschuhen, da einige Probleme noch unzureichend behandelt worden sind, um mit anderen genomischen Technologien Schritt halten zu können. Für unterschiedliche Anforderungen und Experimente sowie aufgrund der Geräteterverfügbarkeit wird man noch längere Zeit auf NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Metabolom-Fingerabdrücke zurückgreifen, doch der Trend geht hin zu einer umfassenderen, gezielten und quantitativen Analyse des Metaboloms. Wahrscheinlich ist die Massenspektrometrie das Mittel der Wahl, um das komplexe Metabolom von Wirbeltieren, das auf jeden Fall mehr als 3000 Verbindungen umfasst, zu entschlüsseln.

FT-ICR-MS- und Orbitrap-Analysatoren entwickeln sich in Verbindung mit effizienter Chromatographie und Ad-hoc-Datenanalyse aufgrund ihrer Genauigkeit, ihres hohen Durchsatzes und ihres Umfangs ( $> 1000$  Metaboliten) zu den vorherrschenden analytischen Methoden in Metabolomstudien. Während sie Massewerte mit hoher Genauigkeit liefern, was die Zahl infrage kommender Moleküle auf einige wenige reduziert, ist damit allein keine komplette Strukturinformation erhältlich. Spezielle Datenbanken, welche die Spezies und die biologischen Zusammenhänge berücksichtigen (und damit die Zahl möglicher Kandidaten reduzieren), ermöglichen einem Experten zusammen mit spektroskopischen Datenbanken für Referenzverbindungen die Identifizierung. Für eine Weiterentwicklung von Metabolomics ist somit der Austausch chemischer und analytischer Informationen essenziell.

Immer noch – und trotz leistungsfähiger Chromatographie und Spektroskopie – bleibt der chemische Entstehungsweg vieler Analyte in zahlreichen Metabolomanalysen ungeklärt. Neuartige endogene oder exogene Metabolite werden oft nicht charakterisiert, und es besteht wenig Zweifel daran, dass eine Strukturaufklärung das Hindernis ist, das zur Vergrößerung der Zahl quantifizierbarer Zielstrukturen überwunden werden muss. Es ist zu erwarten, dass der quantitative Metabolomics-Ansatz zunehmend die Oberhand über die gegenwärtig vorherrschenden chemometrischen Methoden, die auf Rohintensitäten und Peakfläche beruhen, gewinnen wird, da er den geeigneten Ansatz liefert, um Artefakte aus Matrixeffekten zu vermeiden. Ebenfalls ermöglicht er die vergleichende Bestimmung über Datensätze hinweg. Zu den Nachteilen gehören die Kosten sowie die Verfügbarkeit markierter Verbindungen und die zeitintensive Validierung quantitativer Methoden. Des Weiteren ermöglichen die erhältlichen Probenvolumina (bei kleineren Tiermodellen oder bei Neugeborenen) nicht immer die erforderliche Zahl an Assays, um einen Großteil des Metaboloms abzudecken.

Die Verwendung von Surrogat-Matrizes oder indirekter Bestimmung über repräsentative markierte Verbindungen ist zur Erfassung eines größeren Anteils messbarer Verbindun-

gen von zunehmendem Interesse. Diese Praktiken sollten allerdings der frühesten Entdeckungsphase vorbehalten bleiben, und Maßnahmen zur Verifizierung sollten verstärkt zum Einsatz kommen, bevor man ein MS-Signal einem potentiellen Biomarker zuschreibt, der klinischen Anforderungen entsprechen könnte. Allerdings gibt es überzeugende Hinweise darauf, dass Metabolomics zum Screening oder in einer diagnostischen Methode eingesetzt werden könnte, oder dass Metabolite als Teil eines diagnostischen Musters in naher Zukunft einen festen Platz in der Diagnostik einnehmen werden. Der Nachweis der prinzipiellen Eignung von Metaboliten als Krankheitsindikatoren ist hier mit der erfolgreichen Verwendung einzelner Marker, die Störungen des Stoffwechsels anzeigen können, bereits vor Jahrzehnten erbracht worden. In der Zukunft wird man von weiteren Anwendungen bei Erkrankungen, bei denen es keine offensichtlichen Zusammenhänge mit veränderten Metabolitenkonzentrationen gibt, ausgehen können. Abgesehen von Metabolomics liegt der Schwerpunkt hier klar auf der Verwendung von Markerkombinationen (auch von Molekülen unterschiedlichen Typs), da nicht zu erwarten ist, dass einzelne molekulare Verbindungen hinreichende Informationen zu komplexen Erkrankungen liefern können. Wir sind davon überzeugt, dass sich die Empfindlichkeit (Sensitivität) und Spezifität diagnostischer Verfahren in Zukunft deutlich steigern lassen werden.

## Abkürzungen

AD	Alzheimer-Krankheit
ADR	Negative Effekte eines Wirkstoffs
API	Ionisation bei Atmosphärendruck
AUC	Fläche unter der ROC-Kurve
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CI	Chemische Ionisation
CID	Stoßinduzierte Dissoziation
CYP46A1	Cytochrom P450, Familie 46, Unterfamilie A, Polypeptid 1
DESI	Elektrospraydesorptions-Ionisation
DHEA	Dihydroepiandrosterone
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Elektronenstoß
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
FIA-MS	Fließinjektionsanalyse-Massenspektrometrie
FID	Flammenionisationsdetektion
FT-MS	Fourier-Transformations-Massenspektrometrie
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GP	Girard-P-Hydrazin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICAT	Isotopenmarkierter Affinitäts-Tag
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation

MCI	Leichte kognitive Störung
MS	Massenspektrometrie
MS/MS oder MS <sup>2</sup>	Tandemmassenspektrometrie
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PET	Positronenemissionstomographie
SPE	Festphasenextraktion
TMS	Trimethylsilyl
TOF-MS	Flugzeit-Massenspektrometrie
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
VD	Gefäßerkrankungen

Eingegangen am 6. Oktober 2009  
Online veröffentlicht am 13. Juli 2010

- [1] N. Blow, *Nature* **2008**, *455*, 697–700.
- [2] C. Curtin, *Genome Technol.* **2008**, *31*–35.
- [3] R. P. Horgan, O. H. Clancy, J. E. Myers, P. N. Baker, *BJOG* **2009**, *116*, 173–181.
- [4] D. Ryan, K. Robards, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7954–7958.
- [5] J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *Nature* **2008**, *455*, 1054–1056.
- [6] J. C. Lindon, E. Holmes, J. K. Nicholson, *FEBS J.* **2007**, *274*, 1140–1151.
- [7] J. L. Spratlin, N. J. Serkova, S. G. Eckhardt, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 431–440.
- [8] D. B. Kell, *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 296–307.
- [9] O. Fiehn, *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 155–171.
- [10] H. Tweeddale, L. Notley-McRobb, T. Ferenci, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 5109–5116.
- [11] J. K. Nicholson, J. C. Lindon, E. Holmes, *Xenobiotica* **1999**, *29*, 1181–1189.
- [12] C. E. Dalgleish, E. C. Horning, M. G. Horning, K. L. Knox, K. Yarger, *Biochem. J.* **1966**, *101*, 792–810.
- [13] L. Pauling, A. B. Robinson, R. Teranishi, P. Cary, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 2374–2376.
- [14] E. C. Horning, M. G. Horning, *Clin. Chem.* **1971**, *17*, 802–809.
- [15] O. A. Mamer, J. C. Crawhall, S. S. Tjoa, *Clin. Chim. Acta* **1971**, *32*, 171–184.
- [16] K. Hollywood, D. R. Brison, R. Goodacre, *Proteomics* **2006**, *6*, 4716–4723.
- [17] E. J. Want, A. Nordström, H. Morita, G. Siuzdak, *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 459–468.
- [18] W. Lu, B. D. Bennett, J. D. Rabinowitz, *J. Chromatogr. B* **2008**, *871*, 236–242.
- [19] W. B. Dunn, N. J. C. Bailey, H. E. Johnson, *Analyst* **2005**, *130*, 606–625.
- [20] X. Feng, X. Liu, Q. Luo, B. F. Liu, *Mass Spectrom. Rev.* **2008**, *27*, 635–660.
- [21] K. Dettmer, P. A. Aronov, B. D. Hammock, *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 51–78.
- [22] J. Nielsen, S. Oliver, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 544–546.
- [23] E. Werner, J. F. Heilier, C. Ducruix, E. Ezan, C. Junot, *J. Chromatogr. B* **2008**, *871*, 143–163.
- [24] O. N. Van, T. D. Veenstra, *Genome Med.* **2009**, *1*, 5.
- [25] H. J. Issaq, Q. N. Van, T. J. Waybright, G. M. Muschik, T. D. Veenstra, *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 2183–2199.
- [26] W. J. Griffiths, Y. Wang, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1882–1896.
- [27] C. Hu, R. van der Heijden, M. Wang, J. van der Greef, T. Hankemeier, G. Xu, *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 2836–2846.
- [28] R. G. Lowe, M. Lord, K. Rybak, R. D. Trengove, R. P. Oliver, P. S. Solomon, *Fungal Genet. Biol.* **2009**, *46*, 381–389.
- [29] Y. Sawada, K. Akiyama, A. Sakata, A. Kuwahara, H. Otsuki, T. Sakurai, K. Saito, M. Y. Hirai, *Plant Cell Physiol.* **2009**, *50*, 37–47.
- [30] R. G. Lowe, M. Lord, K. Rybak, R. D. Trengove, R. P. Oliver, P. S. Solomon, *Fungal Genet. Biol.* **2008**, *45*, 1479–1486.
- [31] K. Hanhineva, I. Rogachev, H. Kokko, S. Mintz-Oron, I. Venger, S. Karenlampi, A. Aharoni, *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2463–2481.
- [32] S. J. Rochfort, V. C. Trenerry, M. Imsic, J. Panozzo, R. Jones, *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1671–1679.
- [33] E. Altmaier, S. L. Ramsay, A. Graber, H. W. Mewes, K. M. Weinberger, K. Suhre, *Endocrinology* **2008**, *149*, 3478–3489.
- [34] A. U. Jackson, S. R. Werner, N. Talaty, Y. Song, K. Campbell, R. G. Cooks, J. A. Morgan, *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 272–281.
- [35] T. R. Koves, J. R. Ussher, R. C. Noland, D. Slentz, M. Mosedale, O. Ilkayeva, J. Bain, R. Stevens, J. R. Dyck, C. B. Newgard, G. D. Lopaschuk, D. M. Muoio, *Cell Metab.* **2008**, *7*, 45–56.
- [36] W. J. Griffiths, K. Karu, M. Hornshaw, G. Woffendin, Y. Wang, *Eur. J. Mass Spectrom.* **2007**, *13*, 45–50.
- [37] C. E. Wheelock, S. Goto, B. D. Hammock, J. W. Newman, *Metabolomics* **2007**, *3*, 137–145.
- [38] D. J. McNally, A. J. Aubry, J. P. Hui, N. H. Khieu, D. Whitfield, C. P. Ewing, P. Guerry, J. R. Brisson, S. M. Logan, E. Soo, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14463–14475.
- [39] S. P. Devaiah, M. R. Roth, E. Baughman, M. Li, P. Tamura, R. Jeannotte, R. Welti, X. Wang, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1907–1924.
- [40] J. C. Verdonk, V. de Ric, H. A. Verhoeven, M. A. Haring, A. J. van Tunen, R. C. Schuurink, *Phytochemistry* **2003**, *62*, 997–1008.
- [41] U. Ceglarek, A. Leichtler, M. Brügel, L. Kortz, R. Brauer, K. Bresler, J. Thiery, G. M. Fiedler, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *301*, 266–271.
- [42] D. S. Wishart, M. J. Lewis, J. A. Morrissey, M. D. Flegel, K. Jeronic, Y. Xiong, D. Cheng, R. Eisner, B. Gautam, D. Tzur, S. Sawhney, F. Bamforth, R. Greiner, L. Li, *J. Chromatogr. B* **2008**, *871*, 164–173.
- [43] J. L. Griffin, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2006**, *361*, 147–161.
- [44] C. Gieger, L. Geistlinger, E. Altmaier, M. Hrabé de Angelis, F. Kronenberg, T. Meitinger, H.-W. Mewes, H.-E. Wichmann, K. M. Weinberger, J. Adamski, T. Illig, K. Suhre, *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e1000282; de Angelis, F. Kronenberg, T. Meitinger, H.-W. Mewes, H.-E. Wichmann, K. M. Weinberger, J. Adamski, T. Illig, K. Suhre, *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e1000282; de Angelis, F. Kronenberg, T. Meitinger, H.-W. Mewes, H.-E. Wichmann, K. M. Weinberger, J. Adamski, T. Illig, K. Suhre, *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e1000282.
- [45] W. J. Griffiths, J. Sjövall, *J. Lipid Res.* **2009**, im Druck.
- [46] K. D. Setchell, J. E. Heubi, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2006**, *43* Suppl 1, 17–22.
- [47] P. J. Trim, S. J. Atkinson, A. P. Princivalle, P. S. Marshall, A. West, M. R. Clench, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 1503–1509.
- [48] K. E. Burnum, D. S. Cornett, S. M. Puolitaival, S. B. Milne, D. S. Myers, S. Tranguch, H. A. Brown, S. K. Dey, R. M. Caprioli, *J. Lipid Res.* **2009**, im Druck.
- [49] R. C. Murphy, J. A. Hankin, R. M. Barkley, *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S317–322.
- [50] C. Wu, D. R. Ifa, N. E. Manicke, R. G. Cooks, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7618–7624.
- [51] J. B. Fenn, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3999–4024; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3871–3894.
- [52] N. B. Cech, C. G. Enke, *Mass Spectrom.* **2001**, *20*, 362–387.

- [53] E. J. Want, G. O'Maille, C. A. Smith, T. R. Brandon, W. Uritboonthai, C. Qin, S. A. Trauger, G. Siuzdak, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 743–752.
- [54] X. Jiang, H. Cheng, K. Yang, R. W. Gross, X. Han, *Anal. Biochem.* **2007**, *371*, 135–145.
- [55] G. O'Maille, E. P. Go, L. Hoang, E. J. Want, C. Smith, P. O'Maille, A. Nordstrom, H. Morita, C. Qin, W. Uritboonthai, J. Apon, R. Moore, J. Garrett, G. Siuzdak, *Spectrosc. Int. J.* **2008**, *22*, 327–343.
- [56] B. Crews, W. R. Wikoff, G. J. Patti, H. K. Woo, E. Kalisiak, J. Heideker, G. Siuzdak, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 538–544.
- [57] E. Zelena, W. B. Dunn, D. Broadhurst, S. Francis-McIntyre, K. M. Carroll, P. Begley, S. O'Hagan, J. D. Knowles, A. Halsall, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1357–1364.
- [58] K. Schmelzer, E. Fahy, S. Subramaniam, E. A. Dennis, *Methods Enzymol.* **2007**, *432*, 171–183.
- [59] M. P. Wymann, R. Schneiter, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 162–176.
- [60] W. J. Griffiths, M. Hornshaw, G. Woffendin, S. F. Baker, A. Lockhart, S. Heidelberger, M. Gustafsson, J. Sjövall, Y. Wang, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3602–3612.
- [61] P. Liere, A. Pianos, B. Eychenne, A. Cambour, K. Bodin, W. Griffiths, M. Schumacher, E. E. Baulieu, J. Sjövall, *J. Lipid Res.* **2009**, im Druck.
- [62] G. J. Schroepfer, Jr., *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 361–554.
- [63] S. Liu, W. J. Griffiths, J. Sjövall, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 791–797.
- [64] Y. Yang, W. J. Griffiths, H. Nazer, J. Sjövall, *Biomed. Chromatogr.* **1997**, *11*, 240–255.
- [65] G. J. Van Berkel, J. M. Quirke, R. A. Tigani, A. S. Dilley, T. R. Covey, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1544–1554.
- [66] D. W. Johnson, H. J. ten Brink, R. C. Schuit, C. Jakobs, *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 9–16.
- [67] T. Higashi, K. Shimada, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 875–882.
- [68] T. Higashi, A. Yamauchi, K. Shimada, *J. Chromatogr. B* **2005**, *825*, 214–222.
- [69] W. J. Griffiths, S. Liu, G. Alvelius, J. Sjövall, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 924–935.
- [70] H. L. Makin, J. W. Honour, C. H. Shackleton, W. J. Griffiths in *Chromatography and Mass Spectrometry in Steroid Analysis*, 2. Aufl. (Hrsg.: H. L. J. Makin, D. B. Gower), Springer, Berlin, **2009**, S. 163–282.
- [71] M. Axelson, B. Mörk, J. Sjövall, *J. Lipid Res.* **1988**, *29*, 629–641.
- [72] J. MacLachlan, A. T. Wotherspoon, R. O. Ansell, C. J. Brooks, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *72*, 169–195.
- [73] M. Ogundare, S. Theofilopoulos, A. Lockhart, L. J. Hall, E. Arenas, J. Sjövall, A. G. Brenton, Y. Wang, W. J. Griffiths, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 4666–4679.
- [74] P. Enerothe, K. Hellstroem, R. Ryhage, *J. Lipid Res.* **1964**, *5*, 245–262.
- [75] E. C. Horning, C. J. Brooks, W. J. Vanden Heuvel, *Adv. Lipid Res.* **1968**, *6*, 273–392.
- [76] Y. S. Kim, H. Zhang, H. Y. Kim, *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 187–195.
- [77] A. Jiye, J. Trygg, J. Gullberg, A. I. Johansson, P. Jonsson, H. Antti, S. L. Marklund, T. Moritz, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 8086–8094.
- [78] R. P. Evershed in *Handbook of Derivatives for Chromatography* (Hrsg.: K. Blau, J. M. Halket), Wiley, Chichester, **1993**, S. 52–108.
- [79] „Mass spectrometry for metabolite identification“: Y. Wang, W. J. Griffiths in *Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling* (Hrsg.: W. J. Griffiths), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2008**, S. 1–43.
- [80] J. M. Lehmann, S. A. Kliewer, L. B. Moore, T. A. Smith-Oliver, B. B. Oliver, J. L. Su, S. S. Sundseth, D. A. Winegar, D. E. Blanchard, T. A. Spencer, T. M. Willson, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3137–3140.
- [81] A. Radhakrishnan, Y. Ikeda, H. J. Kwon, M. S. Brown, J. L. Goldstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 6511–6518.
- [82] C. Song, S. Liao, *Endocrinology* **2000**, *141*, 4180–4184.
- [83] P. B. Hylemon, H. Zhou, W. M. Pandak, S. Ren, G. Gil, P. Dent, *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 1509–1520.
- [84] K. D. Setchell, M. Schwarz, N. C. O'Connell, E. G. Lund, D. L. Davis, R. Lathe, H. R. Thompson, R. Leslie Tyson, R. J. Sokol, D. W. Russell, *J. Clin. Invest.* **1998**, *102*, 1690–1703.
- [85] A. Babiker, S. Dzeletovic, B. Wiklund, N. Pettersson, J. Salonen, K. Nyssönen, M. Eriksson, U. Diczfalusi, I. Björkhem, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **2005**, *65*, 365–375.
- [86] I. Björkhem, A. Cedazo-Minguez, V. Leoni, S. Meaney, *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 171–179.
- [87] S. Dzeletovic, O. Breuer, E. Lund, U. Diczfalusi, *Anal. Biochem.* **1995**, *225*, 73–80.
- [88] V. Leoni, D. Lütjohann, T. Masterman, *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 191–195.
- [89] A. Papassotiropoulos, D. Lütjohann, M. Bagli, S. Locatelli, F. Jessen, R. Buschfort, U. Ptak, I. Björkhem, K. von Bergmann, R. Heun, *J. Psychiatr. Res.* **2002**, *36*, 27–32.
- [90] V. Leoni, M. Shafaati, A. Salomon, M. Kivipelto, I. Björkhem, L. O. Wahlund, *Neurosci. Lett.* **2006**, *397*, 83–87.
- [91] M. Shafaati, A. Solomon, M. Kivipelto, I. Björkhem, V. Leoni, *Neurosci. Lett.* **2007**, *425*, 78–82.
- [92] D. P. Enot, W. Lin, M. Beckmann, D. Parker, D. P. Overy, J. Draper, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 446–470.
- [93] L. W. Sumner, E. Urbanczyk-Wochniak, C. D. Broeckling, *Methods Mol. Biol.* **2008**, *406*, 409–436.
- [94] K. R. Coombes, K. A. Baggerly, J. S. Morris in *Fundamentals of Data Mining in Genomics and Proteomics* (Hrsg.: M. Dubitzky, M. Granzow, D. Berrar), Kluwer, Dordrecht, **2007**, S. 79–99.
- [95] M. Katajamaa, M. Orešić, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1158*, 318–328.
- [96] A. D. McNaught, A. Wilkinson, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology (the „Gold Book“)*, 2. Aufl., Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1997**; korrigierte XML-Version online: <http://goldbook.iupac.org> (2006–); erzeugt von M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; Aktualisierungen von A. Jenkins.
- [97] S. G. Villas-Boas, U. Roessner, M. A. E. Hansen, J. Smetsgaard, J. Nielsen, *Metabolome Analysis: An Introduction*, Wiley, Hoboken, **2007**, S. 157.
- [98] H. Shin, M. K. Markey, *J. Biomed. Inf.* **2006**, *39*, 227–248.
- [99] G. Vivo-Truyols, J. Torres-Lapasio, A. van Nederkassel, Y. Vander Heyden, D. L. Massart, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1096*, 133–145.
- [100] R. J. O. Torgrip, K. M. Åberg, E. Alm, I. Schuppe-Koistinen, J. Lindberg, *Metabolomics* **2008**, *4*, 114–121.
- [101] F. Dieterle, A. Ross, G. Schlotterbeck, H. Senn, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4281–4290.
- [102] B. M. Warrack, S. Hnatyshyn, K.-H. Ott, M. D. Reily, M. Sanders, H. Zhang, D. M. Drexler, *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 547–552.
- [103] M. Sysi-Aho, M. Katajamaa, L. Yetukuri, M. Orešić, *BMC Bioinf.* **2007**, *8*, 93.
- [104] „Reference Gene Validation Software for Improved Normalization“: J. Vandesompele, M. Kubista, M. W. Pfaffl in *Real-Time PCR: Current Technology and Applications* (Hrsg.: J. Logan, K. Edwards, N. Saunders), Caister Academic Press, London, **2009**, S. 47–64.
- [105] M. Kohl, D. Enot, M. Keller, T. Koal, K. Weinberger, H. P. Deigner, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [106] W. Huber, A. von Heydebreck, H. Sueltmann, A. Poustka, M. Vingron, *Bioinformatics* **2002**, *18*(Suppl.1), 96–104.
- [107] G. E. P. Box, D. R. Cox, *J. R. Stat. Soc. B* **1964**, *26*, 211–252.

- [108] R. A. van den Berg, C. J. Hoefsloot Huub, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, M. J. van der Werf, *BMC Genomics* **2006**, *7*, 142.
- [109] S. Dudoit, M. J. van der Laan, *Multiple Testing Procedures with Applications to Genomics*, Springer, Berlin, **2008**.
- [110] MAQC Consortium, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1151–1161.
- [111] R. Simon, *J. Stat. Planning Inference* **2008**, *138*, 308–320.
- [112] F. Hahne, W. Huber in *Bioconductor Case Studies* (Hrsg.: F. Hahne, W. Huber, R. Gentleman, S. Falcon), Springer, Berlin, **2008**, S. 83–88.
- [113] M. A. Hall, G. Holmes, *IEEE Trans. Knowl. Data Eng.* **2003**, *15*, 1437–1447.
- [114] N. Pochet, F. De Smet, J. A. Suykens, B. L. De Moor, *Bioinformatics* **2004**, *20*, 3185–3195.
- [115] T. M. Mitchell, *Machine Learning*, McGraw-Hill, New York, **1997**.
- [116] R. Tibshirani, T. Hastie, J. H. Friedman, *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction*, 2. Aufl., Springer, Berlin, **2009** (Springer Series in Statistics).
- [117] A. J. Izenman, *Modern Multivariate Statistical Techniques: Regression, Classification, and Manifold Learning*, Springer, Berlin, **2008** (Springer Texts in Statistics).
- [118] A. Dupuy, R. Simon, *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99*, 147–157.
- [119] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8038641>.
- [120] S. Varma, R. Simon, *BMC Bioinf.* **2006**, *7*, 91.
- [121] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17392326>.
- [122] R. G. W. Verhaar, F. J. T. Staal, P. J. M. Valk, B. Lowenberg, M. J. T. Reinders, D. de Ridder, *BMC Bioinf.* **2006**, *7*, 105–120.
- [123] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19941644>.
- [124] R. Simon, *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98*, 1169–1171.
- [125] B. J. Biggerstaff, *Stat. Med.* **2000**, *19*, 649–663.
- [126] D. I. Broadhurst, D. B. Kell, *Metabolomics* **2006**, *2*, 171–196.
- [127] R. Goodacre, D. Broadhurst, A. Smilde, B. S. Kristal, J. D. Baker, R. Beger, C. Bessant, S. Connor, G. Capuani, A. Craig, T. Ebbels, D. B. Kell, C. Manetti, J. Newton, G. Paternostro, R. Somorjai, M. Sjöström, J. Trygg, F. Wulfert, *Metabolomics* **2007**, *3*, 231–241.
- [128] M. Oresic, *Nutr. Metab. Cardiovasc Dis.* **2009**, im Druck.
- [129] J. G. Bundy, D. Osborn, J. M. Weeks, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *FEBS Lett.* **2001**, *500*, 31–35.
- [130] J. G. Bundy et al., *Environme. Toxicol. Chem.* **2002**, *21*, 1966–1972.
- [131] M. R. Viant, J. G. Bundy, C. A. Pincetich, J. S. de Ropp, R. S. Tjeerdema, *Metabolomics* **2005**, *1*, 149–158.
- [132] M. R. Viant, C. A. Pincetich, D. E. Hinton, R. S. Tjeerdema, *Aquat. Toxicol.* **2006**, *76*, 329–342.
- [133] National Human Genome Research Institute, An overview of the Human Genome Project. <http://www.genome.gov/12011238>. Geprüft am 1. Juni 2010.
- [134] S. Vangala, A. Tonelli, *The AAPS J.* **2007**, *9*, E284.
- [135] P. M. Harrison, A. Kumar, N. Lang, M. Snyder, M. Gerst, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1083–1090.
- [136] K. Dettmer, B. D. Hammock, *Environ. Health Perspect.* **2004**, *112*, 396–397.
- [137] M. Oresic, A. Vidal-Puig, V. Hänninen, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2006**, *6*, 575–585.
- [138] W. H. Heijne, A. S. Kienhuis, B. van Ommen, R. H. Stierum, J. P. Grotens, *Expert Rev. Proteomics* **2005**, *2*, 767–780.
- [139] A. Velázquez, M. Vela-Amieva, I. Cicerón-Arellano, I. Ibarra-González, M. E. Pérez-Andrade, Z. Olivares-Sandoval, G. Jiménez-Sánchez, *Arch. Med. Res.* **2000**, *31*, 145–150.
- [140] W. Lehnert, D. Hunkler, *Eur. J. Pediatr.* **1986**, *145*, 260–266.
- [141] C. Baumgartner, D. Baumgartner, *J. Biomol. Screening* **2006**, *11*, 90–99.
- [142] C. L. Yu, X. F. Gu, *J. Peking Univ. Health Sci.* **2006**, *38*, 103–106.
- [143] C. D. Campbell, J. Ganesh, C. Ficicioglu, *Haematologica* **2005**, *90*, ECR45.
- [144] E. J. Want, B. F. Cravatt, G. Siuzdak, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1941–1951.
- [145] M. Piraud, C. Vianey-Saban, C. Bourdin et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 3287–3297.
- [146] M. Dott, D. Chance, M. Fierro, et al., *Am. J. Med. Genet. Part A* **2006**, *140*, 837–842.
- [147] B. K. Burton, *Pediatrics* **1998**, *102*, e69.
- [148] F. D. Porter, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 715–724.
- [149] P. Subramaniam, P. T. Clayton, B. C. Portmann, G. Mieli-Vergani, N. Hadzic, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2010**, *50*, 61–66.
- [150] M. I. New, R. C. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12790–12797.
- [151] K. Fujieda, T. Tajima, *Pediatr. Res.* **2005**, *57*, 62R.
- [152] N. Krone, F. G. Riepe, J. Grotzinger, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 445–454.
- [153] N. Krone, F. G. Riepe, D. Gotze, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 3724–3730.
- [154] N. Sawada, T. Sakaki, S. Kato, K. Inouye, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6607–6615.
- [155] M. A. Constantinou, et al., *Anal. Chim. Acta* **2005**, *542*, 169–177.
- [156] J. Chen, X. Zhao, J. Fritzsche, P. Yin, P. Schmitt-Kopplin, et al., *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1280–1289.
- [157] G. D. Lewis, A. Asnani, R. E. Gerszten, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *52*, 117–123.
- [158] R. Wiegand, G. F. Berriz, F. P. Roth, R. E. Gerszten, et al., *Circulation* **2005**, *112*, 3868–3875.
- [159] J. Jansson, B. Willing, M. Lucio, A. Fekete, J. Dickson, et al., *PLoS One* **2009**, *4*, e6386.
- [160] P. D. Whitfield, P. J. M. Noble, H. Major, R. J. Beynon, R. Burrow, A. I. Freeman, A. James, *German Metabolomics* **2005**, *1*, 215–225.
- [161] M. Bogdanov, W. R. Matson, L. Wang, T. Matson, R. Saunders-Pullman, S. S. Bressman, M. Flint, *Brain* **2008**, *131*, 389–396.
- [162] L. C. Kenny, W. B. Dunn, D. I. Ellis, J. Myers, P. N. Baker, the GOPEC Consortium, D. B. Kell, *German Metabolomics* **2005**, *1*, 227–234.
- [163] M. A. Silva, et al., *Liver Transplant.* **2006**, *12*, 146–151.
- [164] D. S. Wishart, *Am. J. Transplant.* **2005**, *5*, 2814–2820.
- [165] J. D. Bell, J. A. Lee, H. A. Lee, P. J. Sadler, D. R. Wilkie, R. H. Woodham, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1991**, *1096*, 101–107.
- [166] A. Sreekumar, L. M. Poisson, T. K. Rajendiran, A. P. Khan, Q. Cao, J. Yu, B. Laxman, R. Mehra, R. J. Lonigro, Y. Li, M. K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Cao, J. Byun, G. S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D. C. Alexander, A. Berger, J. R. Shuster, J. T. Wei, S. Varambally, C. Beecher, A. M. Chinnaiyan, *Nature* **2009**, *457*, 910–914.
- [167] D. H. Chace, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 445–477.
- [168] J. W. Honour, *Ann. Clin. Biochem.* **2003**, *40*, 628–638.
- [169] J. M. Dietschy, S. D. Turley, *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 1375–1397.
- [170] D. Lütjohann, O. Breuer, G. Ahlborg, I. Nennesmo, A. Sidén, U. Diczfalusi, I. Björkhem, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9799–9804.
- [171] I. Björkhem, D. Lütjohann, U. Diczfalusi, L. Ståhle, G. Ahlborg, J. Wahren, *J. Lipid Res.* **1998**, *39*, 1594–1600.
- [172] E. G. Lund, J. M. Guileyardo, D. W. Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7238–7243.
- [173] M. Heverin, S. Meaney, D. Lütjohann, U. Diczfalusi, J. Wahren, I. Björkhem, *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 1047–1052.
- [174] S. Meaney, M. Heverin, U. Panzenboeck, L. Ekström, M. Axelsson, U. Andersson, U. Diczfalusi, I. Pikuleva, J. Wahren, W. Sattler, I. Björkhem, *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 944–951.
- [175] W. J. Griffiths, Y. Wang, *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 2778–2805.

- [176] P. Schöcknecht, D. Lütjohann, J. Pantel, H. Bardenheuer, T. Hartmann, K. von Bergmann, K. Beyreuther, J. Schröder, *Neurosci. Lett.* **2002**, *324*, 83–85.
- [177] J. K. Nicholson, J. Connelly, J. C. Lindon, E. Holmes, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 153–161.
- [178] D. G. Robertson, *Toxicol. Sci.* **2005**, *85*, 809–822.
- [179] D. Portilla, S. Li, K. K. Nagothu, J. Megyesi, B. Kaissling, L. Schnackenberg, R. L. Safirstein, R. D. Beger, *Kidney Int.* **2006**, *69*, 2194–2204.
- [180] L. K. Schnackenberg, R. C. Jones, S. Thyparambil, J. T. Taylor, T. Han, W. Tong, D. K. Hansen, J. C. Fuscoe, R. D. Edmondson, R. D. Beger, Y. P. Dragan, *OMICS* **2006**, *10*, 1–14.
- [181] P. Espandiari, J. Zhang, B. A. Rosenzweig, V. S. Vaidya, J. Sun, L. Schnackenberg, E. H. Herman, A. Knapton, J. V. Bonventre, R. D. Beger, K. L. Thompson, J. Hanig, *Toxicol. Sci.* **2007**, *99*, 637–648.
- [182] P. A. Thürmann, *Pathologie* **2006**, *27*, 6–12.
- [183] S. Teweileit, U. Kuschel, M. Hippius, M. Goettler, M. Bornschein, *Med. Klin.* **2001**, *96*, 442–450.
- [184] R. Bordet, S. Gautier, H. Le Louet, B. Dupuis, J. Caron, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2001**, *56*, 935–941.
- [185] FDA Critical Path Opportunities Report. <http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath>.
- [186] L. K. Schnackenberg, R. D. Beger, <http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/ArticleSandPresentations/ucm077544.htm>.
- [187] L. K. Schnackenberg, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2007**, *7*, 247–259.
- [188] International Conference on Harmonization (ICH)—Guidance for Industry: E15 Definitions for Genomic Biomarkers, Pharmacogenomics, Pharmacogenetics, Genomic Data and Sample Coding Categories. <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm129286.htm>.
- [189] International Conference on Harmonization (ICH)—Guidance for Industry: E16: Genomic Biomarkers Related to Drug Response: Context, Structure, and Format of Qualification Submissions. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM174433.pdf>.
- [190] O. Fiehn, *Comp. Funct. Genomics* **2001**, *2*, 155–168.
- [191] J. B. German, D. E. Bauman, D. G. Burrin, M. L. Failla, H. C. Freake, J. C. King, S. Klein, J. A. Milner, G. H. Pelto, K. M. Rasmussen, S. H. Zeisel, *J. Nutr.* **2004**, *134*, 2729–2732.
- [192] R. Chari, B. P. Coe, C. Wedseltoft, M. Benetti, I. M. Wilson, E. A. Vucic, C. MacAulay, R. T. Ng, W. L. Lam, *BMC Bioinf.* **2008**, *9*, 422.
- [193] H. P. Deigner, D. Enot, M. Bauer, unveröffentlichte Ergebnisse.