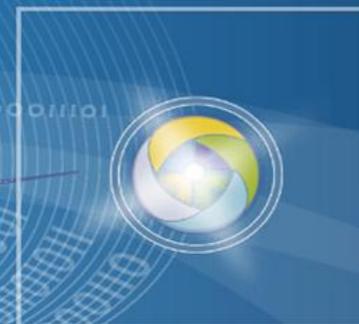


Introducción a las Herramientas utilizadas en Metabolómica.

Integrated
BIOLOGY



Seminario BIOLOGIA INTEGRADA:

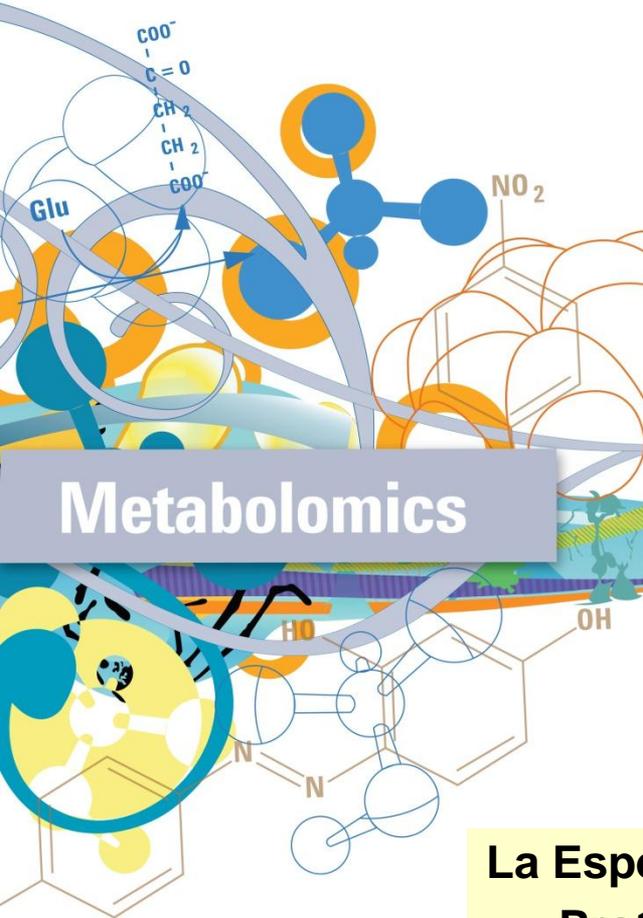
Integración de Resultados Multi-ómicos: La Clave en la Investigación Biomédica del siglo XXI

CEK/CIBEK (Centre d'Investigació Biomèdica Esther Koplowitz – Fundació Clínic)

Barcelona, 13 de Marzo del 2013

Isidre Masana
Especialista Productos LC/MS
Agilent Technologies
División de Biociencia y Análisis Químico

Introducción a las Herramientas utilizadas en Metabolómica.



- Herramientas **Instrumentales** : Fundamentos y Terminología de la Espectrometría de Masas.
- **Flujos de Trabajo** y Herramientas **Bioinformáticas**.

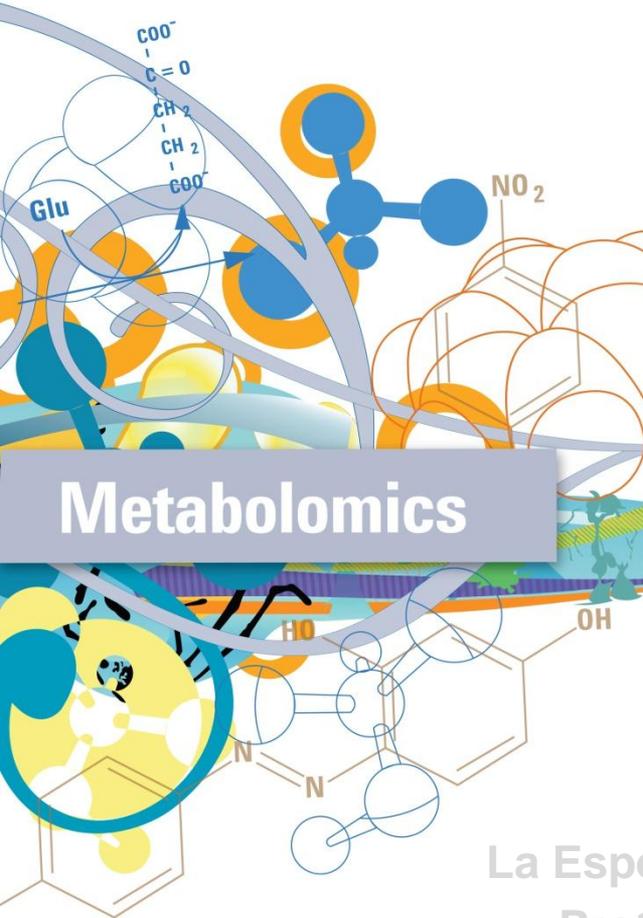
Objetivos:

- **Facilitar la intercomunicación** entre grupos **genómicos/transcriptómicos** ↔ metabolómicos/proteómicos en proyectos de Biología Integrada.
- Dar a conocer las enormes **posibilidades** de la Espectrometría de Masas en investigación biomédica.

La Espectrometría de Masas es **LA tecnología analítica clave** en:

- **Proteómica, Metabolómica, Lipidómica,...**
- **Desarrollo y Monitorización Terapéutica de Fármacos (TDM)** y muchas otras aplicaciones clínicas.

Introducción a las Herramientas utilizadas en Metabolómica.



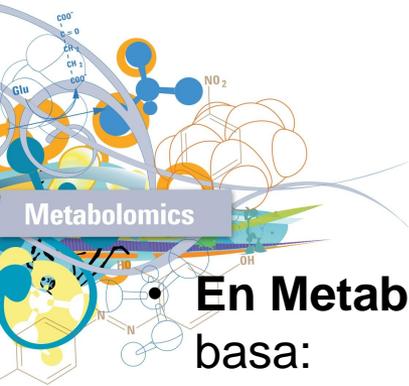
- Herramientas **Instrumentales** : Fundamentos y Terminología de la Espectrometría de Masas.
- Flujos de Trabajo y Herramientas Bioinformáticas.

Objetivos:

- Facilitar la intercomunicación entre grupos genómicos/transcriptómicos ↔ metabolómicos/proteómicos en proyectos de Biología Integrada.
- Dar a conocer las **posibilidades** de la Espectrometría de Masas en investigación biomédica.

La Espectrometría de Masas es LA tecnología analítica clave en:

- Proteómica, Metabolómica, Lipidómica,...
- Desarrollo y Monitorización Terapéutica de Fármacos (TDM) y muchas otras aplicaciones clínicas.



Las Herramientas Instrumentales Básicas en Metabolómica

En Metabolómica la obtención de **perfiles masivos de metabolitos** se basa:

- **Cromatografía/Espectrometría de Masas (LC/MS, GC/MS, CE/MS):** para **toda clase de metabolitos** (minoritarios y mayoritarios). LC/MS se usa también para proteómica.
- **Resonancia Magnética Nuclear (RMN):** sólo para metabolitos **mayoritarios.**



• LC/MS, GC/MS “versus” NMR

- **Sensibilidad: LC/MS, GC/MS** permiten **detectar metabolitos a mucha más baja concentración que RMN**

- **MS** requiere típico $> 1-100\text{pg}$ (10^{-12}g) metabolite **RMN** $>200\mu\text{g}$ - 5mg
- **Sensibilidad MS** $> 10^6$ veces mejor que la de **RMN.**



• Estado Muestra:

- **LC/MS** requiere muestras líquidas (o sólidos disueltos en agua o solventes orgánicos). GC/MS también acepta muestras gaseosas.
- **RMN** acepta muestras sólidas y líquidas.



• Número de Espectros/muestra:

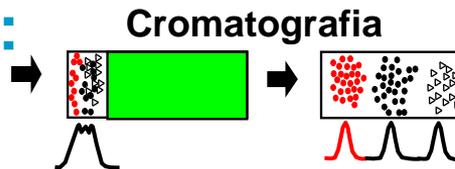
- **LC-GC/MS:** **miles** de espectros MS/muestra **RMN:** **1 espectro** RMN/muestra

Fundamentos LC/MS – GC/MS :

Ejemplo LC/MS-QTOF

 Video LC/MS-QqQ

Para detectarse por MS los **metabolitos necesitan ionizarse**



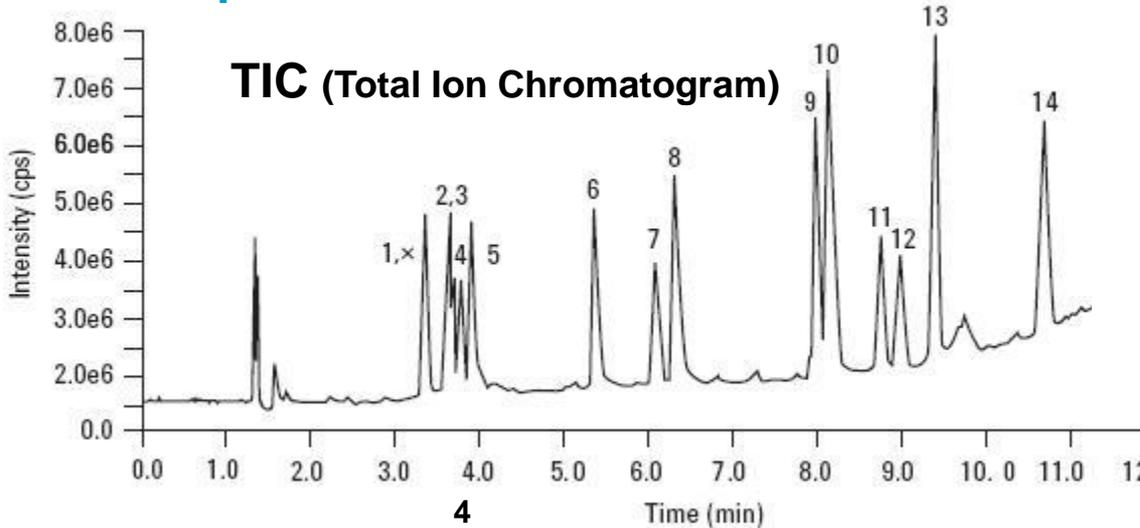
HPLC: **todo tipo** metabolitos →
← GC: metabolites **volátiles**
CE: metabolitos ionicos



Información Proporcionada por LC-GC-CE /MS. ^{Int.} m/z

Ejemplo Drogas de Abuso mediante LCMS-TOF

Nota aplicación 5989-0667EN



Información cuantitativa:

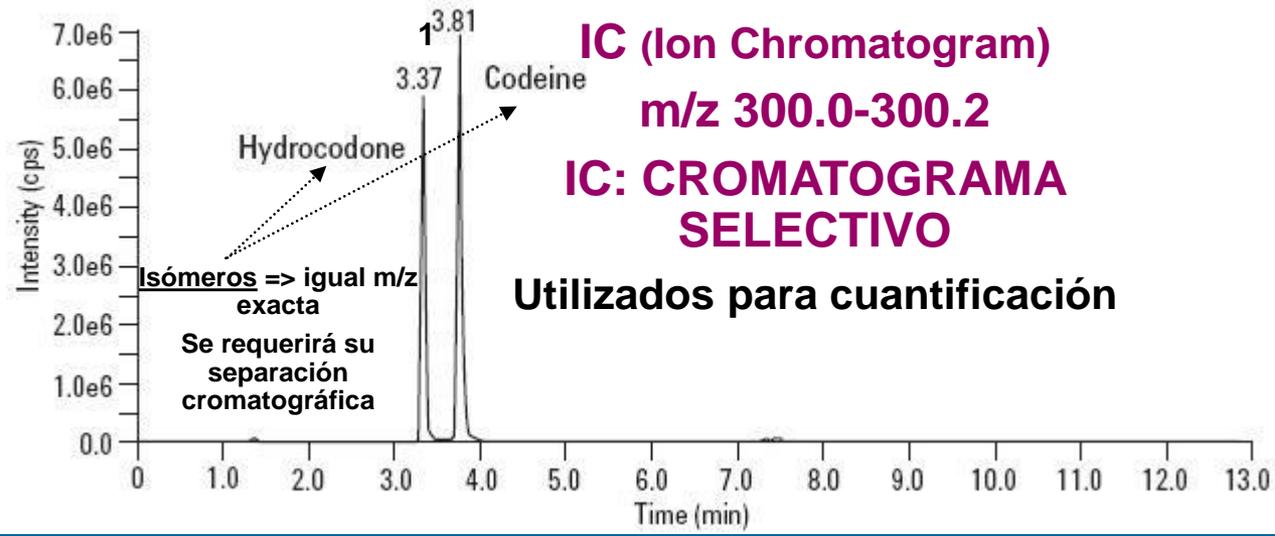
- Área pico (TIC: no selectiva - IC: selectiva)

Información cualitativa (ID):

- Tiempo Retención
- Espectro de Masas

Table 1. Compounds* and RT as Found in Figure 1.

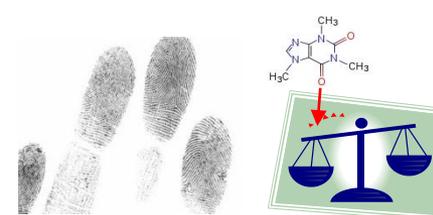
Peak Number	RT (min)	Compound
1	3.37	Hydrocodone
x	3.40	Unknown with M + H = 166, 1221
	3.64	Oxycodone
	3.70	Amphetamine
	3.81	Codeine
	3.94	Methamphetamine
	5.41	Cocaine
	6.12	CE
	6.36	PCP
	8.04	Propoxyphene
	8.18	Methadone
	8.81	Alprazolam
	9.00	Nordiazepam
	9.46	Methaqualone
	10.86	Diazepam





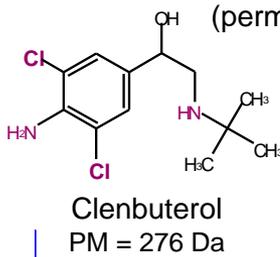
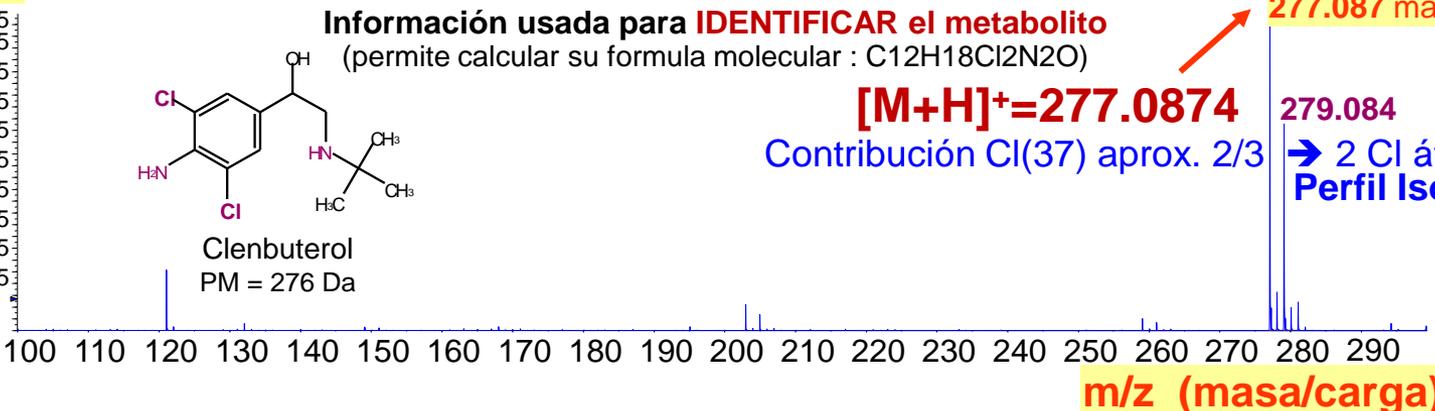
Espectro LC/MS (Ionización Electrospray)

Información Cualitativa



Espectro LC/MS pico 5.75min +TOF MS: 5.672 to 5.833 min

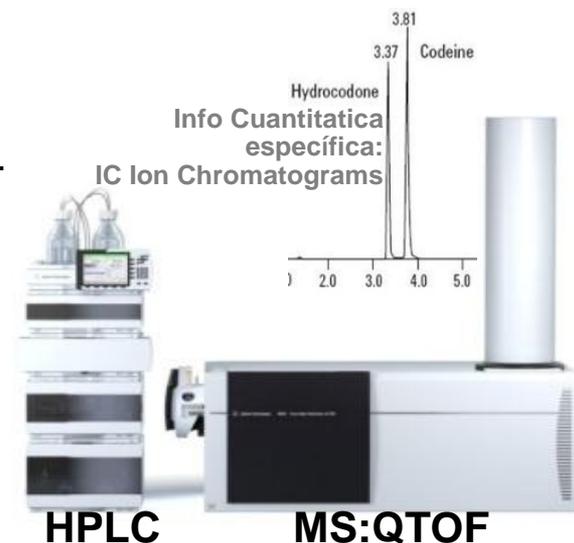
Intensidad



¿Qué información proporciona LC/MS de cada metabolito?:

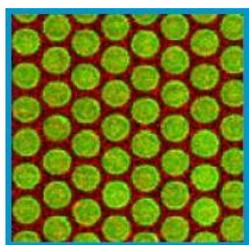
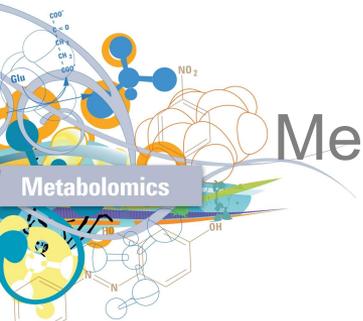
- para **IDENTIFICARLOS** :
 - Espectro MS masa exacta & perfil isotópico → fórmula molecular.
 - Espectro MS/MS → información estructura molecular del metabolito.
 - Tiempo Retención → confirmar con patrones analizados en idénticas condiciones
- para **CUANTIFICARLOS**:
 - Intensidad Señal IC (del MS): proporcional a la concentración de metabolito → Permite Cuantificarlo Absoluta o Relativamente.

LC/MS: una “herramienta clave” en laboratorios –ómicos y clínicos.

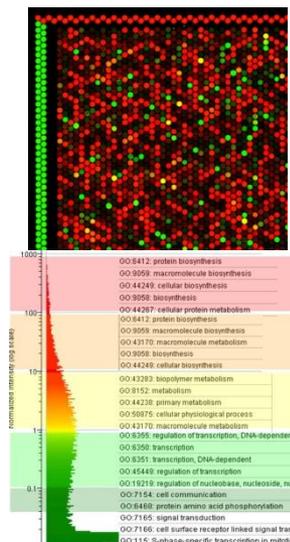


LC/MS “versus” μ -arrays

Metabolómica “vs” Genómica/Transcriptómica



- **Todos** los genes son conocidos (también con NGS).
- Los genes **se identifican por sus coordenadas x,y** en el μ -array.
- El **nivel de expresión del gen** se mide por la **intensidad del color**.



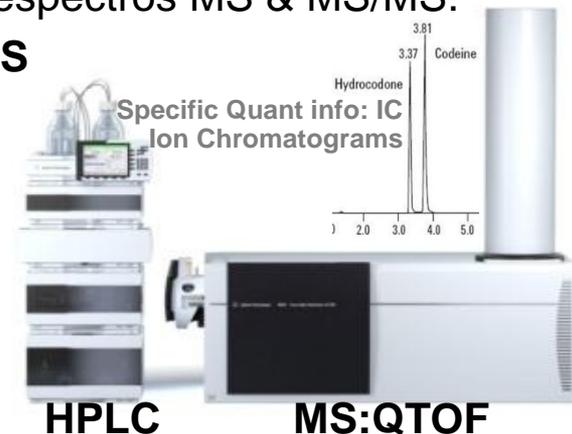
¿“Cuello de botella” de la **Metabolómica**?:

- **NO** se conocen todos los metabolitos.
- Para identificarlos se utilizan patrones para comparar su RT, espectros MS & MS/MS.
- Bases de Datos (fórmulas) & **Bibliotecas de Espectros MS/MS son de gran ayuda** en la identificación de metabolitos (pero son dependientes del instrumento y condiciones).

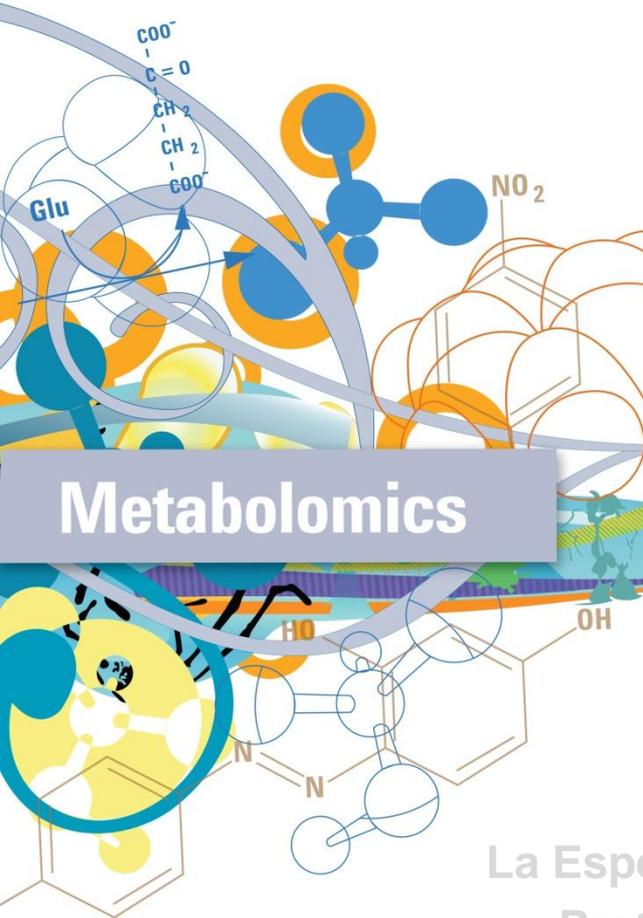
Para **muchas aplicaciones** (como clasificación pacientes) pueden utilizarse **metabolitos NO identificados** (caracterizados por su tiempo y masa exacta & perfil isotópico)

como biomarcadores; pero **deben**

IDENTIFICARSE para interpretarlos biológicamente.



Introducción a las Herramientas utilizadas en Metabolómica.



- Herramientas Instrumentales : Fundamentos y Terminología de la Espectrometría de Masas.
- **Flujos de Trabajo** y Herramientas **Bioinformáticas**.

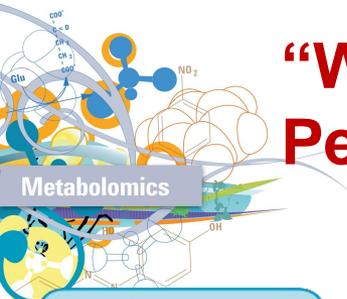
Objetivos:

- Facilitar la **intercomunicación** entre grupos genómicos/transcriptómicos ↔ metabolómicos/proteómicos en proyectos de Biología Integrada.
- Dar a conocer las **posibilidades** de la Espectrometría de Masas en investigación biomédica.

La Espectrometría de Masas es LA tecnología analítica clave en:

- Proteómica, Metabolómica, Lipidómica,...
- Desarrollo y **Monitorización Terapéutica de Fármacos (TDM)** y muchas otras aplicaciones clínicas.

“Workflow” Descubrimiento Biomarcadores Perfilado Genérico (perfilado Metabolómico masivo)



Separate and detect



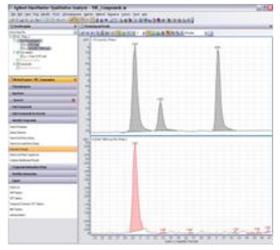
Accurate mass

LC-TOF/QTOF



GC/MSD

Find peaks and quantitate



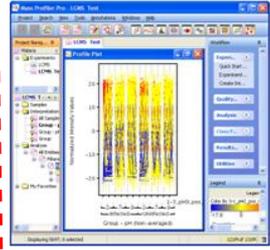
MassHunter Qual

Soft. Deconvolución: MFE

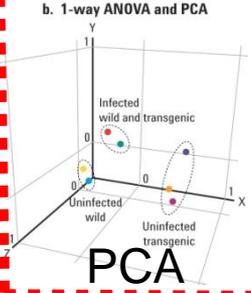
Extraer automáticamente la información para **cuantificar relativamente MILES** de **compuestos desconocidos**

Buscar Correlaciones entre Grupos de **Complejos Datos Espectrales**
Intensidad, T_r , Masa exacta

Multivariate analysis

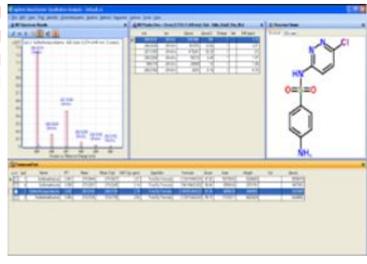


Mass Profiler Pro
Alinear, Normalizar, Filtrar, ANOVA,....



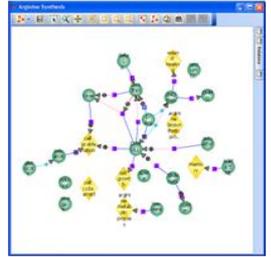
Metabolitos Relevantes

Identify peaks



ID Browser

Analyze pathways



Pathway Architect

Software & “Workflow” común con **Genómica/ Transcriptómica**

- “Workflow” e instrumentos pueden utilizarse en **Proteómica..**
- Los mismos instrumentos pueden utilizarse en **Monitorización Terapéutica de Fármacos (TDM)** y muchas otras aplicaciones clínicas..

“Workflow” Descubrimiento Biomarcadores Dirigido por Rutas Metabólicas (“Targeted Metabolomics”)

Metabolomics

Separate and detect



LC-TOF/QTOF

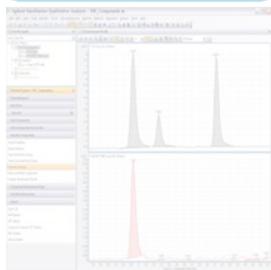


LC-QqQ



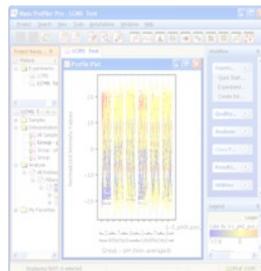
GC-QqQ

Find peaks and
quantitate



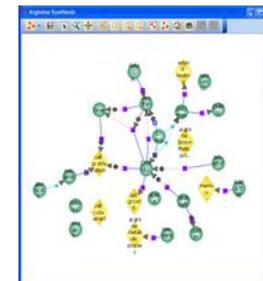
MassHunter Qual

Multivariate
analysis



Mass Profiler Pro

Analyze
pathways



Pathway Architect

Utilice la **información de rutas metabólicas** o experimentos anteriores, para **definir la lista de los metabolitos a seguir** para el análisis estadístico multivariante

Especialmente para metabolitos **minoritarios** la **extracción dirigida** de datos es **más eficaz** que la **no dirigida**

Plataforma Multi-ómica: GeneSpring IB / MPP 12.5

Cambios de expresión reflejados directamente en las rutas

Proyectos

Ensayos Expresión Génica/ Transcriptómica basados en: Microarrays, NGS, q-PCR

Ensayos de Metabolómica/ Proteómica/ X-ómicas basados en LC/MS, GC/MS, CE/MS

Nexo unión experimentos multi-ómicos (p.e.transcriptomics/ metabolomics): Rutas Metabolicas

Enrichment Analysis on curated pathways and computationally – derived networks

Interpretation2: Tissue

- LMX1B
- NIK2-2
- ASCL1
- GATA2

MS Experiment Creation Wizard (Step 1 of 11)

Select Data Source

Choose the data sources that will be used for the experiment

- MassHunter Quant
- MassHunter Qual
- MassHunter Qual (GC scan data)
- MassHunter ICP-MS
- Chemstation
- AMDIS
- Generic

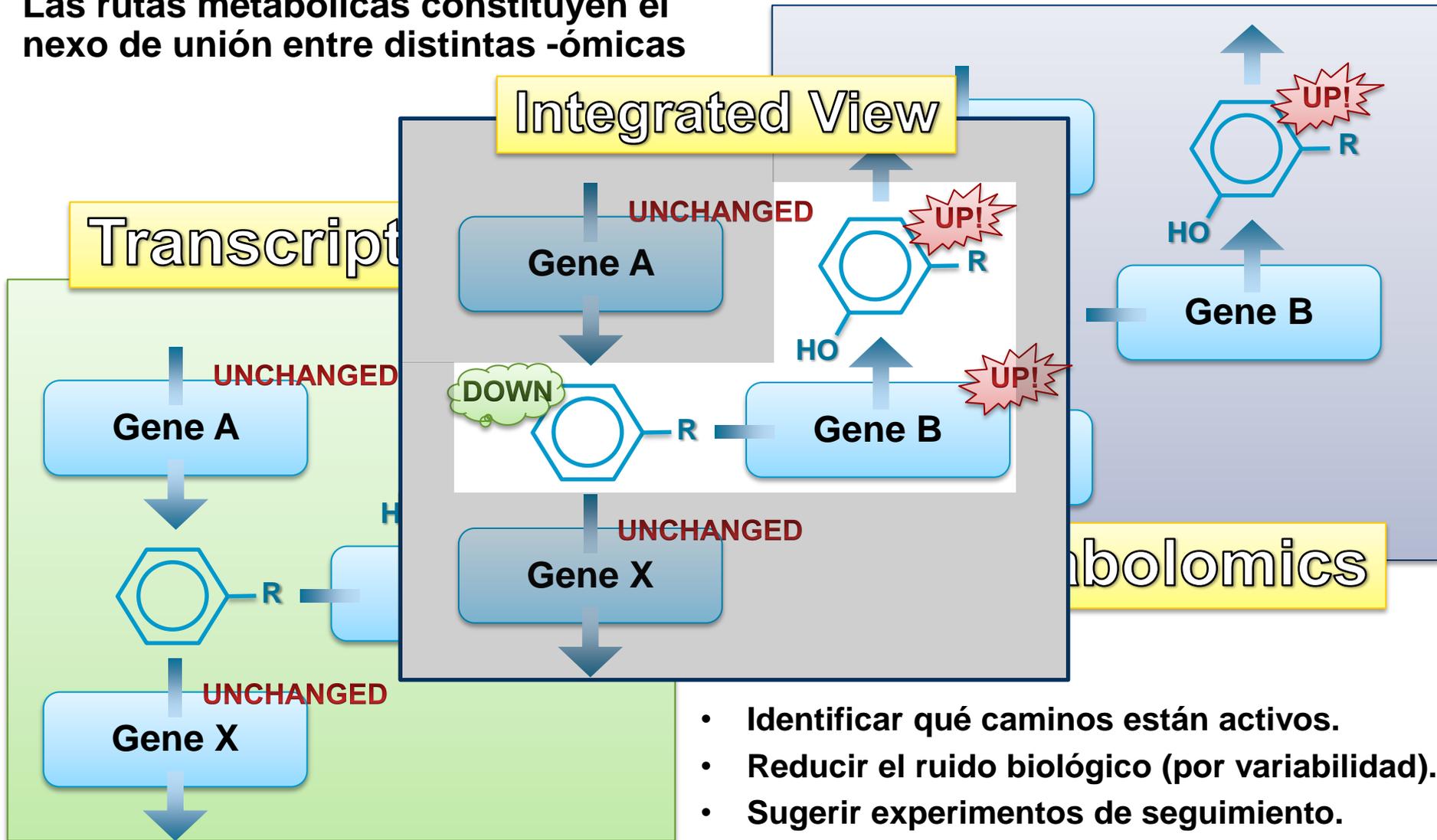
Organism

Plataforma Abierta. Permite la Importación Genérica para equipos NO Agilent: *.xls, *.xlsx, *.TXT or *.CSV files

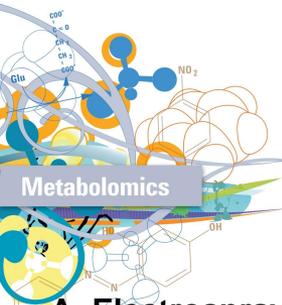
Name	DB	DB ID	[Brain]	[Reference]
Entrez Gene		4790	-0.5701773	0.2805512
Entrez Gene		5978	-1.1788701	1.1719047

El Concepto de Biología Integrada

Las rutas metabólicas constituyen el nexo de unión entre distintas -ómicas



- Identificar qué caminos están activos.
- Reducir el ruido biológico (por variabilidad).
- Sugerir experimentos de seguimiento.



Ejemplo Clasificación Pacientes Cáncer de Prostata:

Análisis de Componentes Principales (PCA) de **metabolitos** significativamente alterados entre las 3 clases $p < 0.005$ Fold Change > 2.0

A.- Electropray Polaridad Positiva:

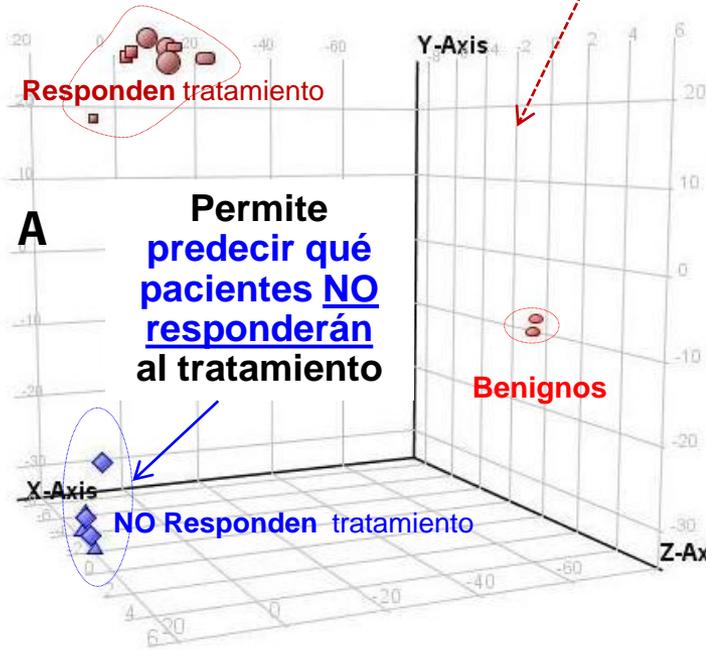
- **Total** metabolitos: 6747
- Filtrados (25% líneas celulares): **3632**
- **Filtrados** ($p < 0.005$ FC > 2.0): **311**

Color by Diagnosis

- Benign
- Non-responsive
- Responsive

Shape by Cell lines

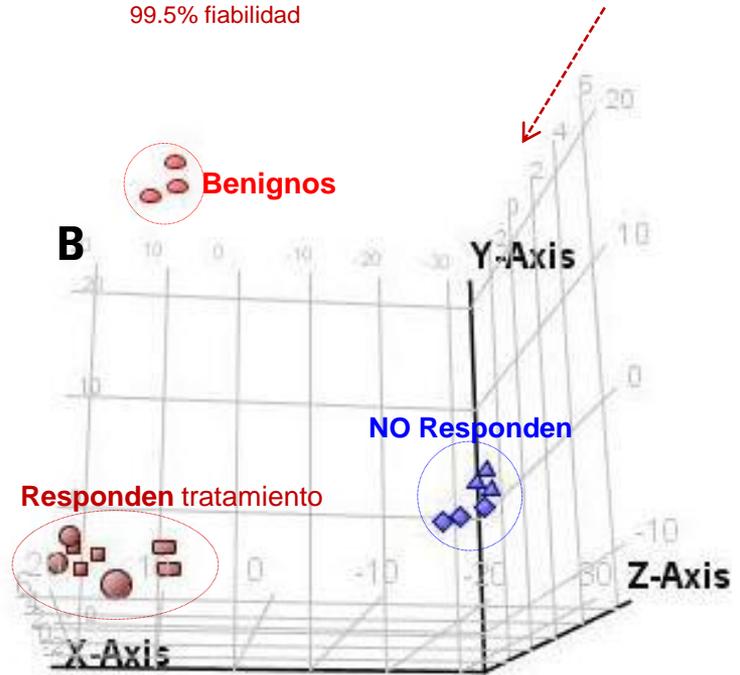
- 22RV1
- ▲ DU145
- LnCap
- ◆ PC3
- RWPE
- VCAP



Permite predecir qué pacientes **NO responderán** al tratamiento

B.- Electropray Polaridad Negativa:

- **Total** metabolitos: 2288
- Filtrados (25% líneas celulares): **863**
- **Filtrados** ($p < 0.005$ FC > 2.0): **171**
99.5% fiabilidad

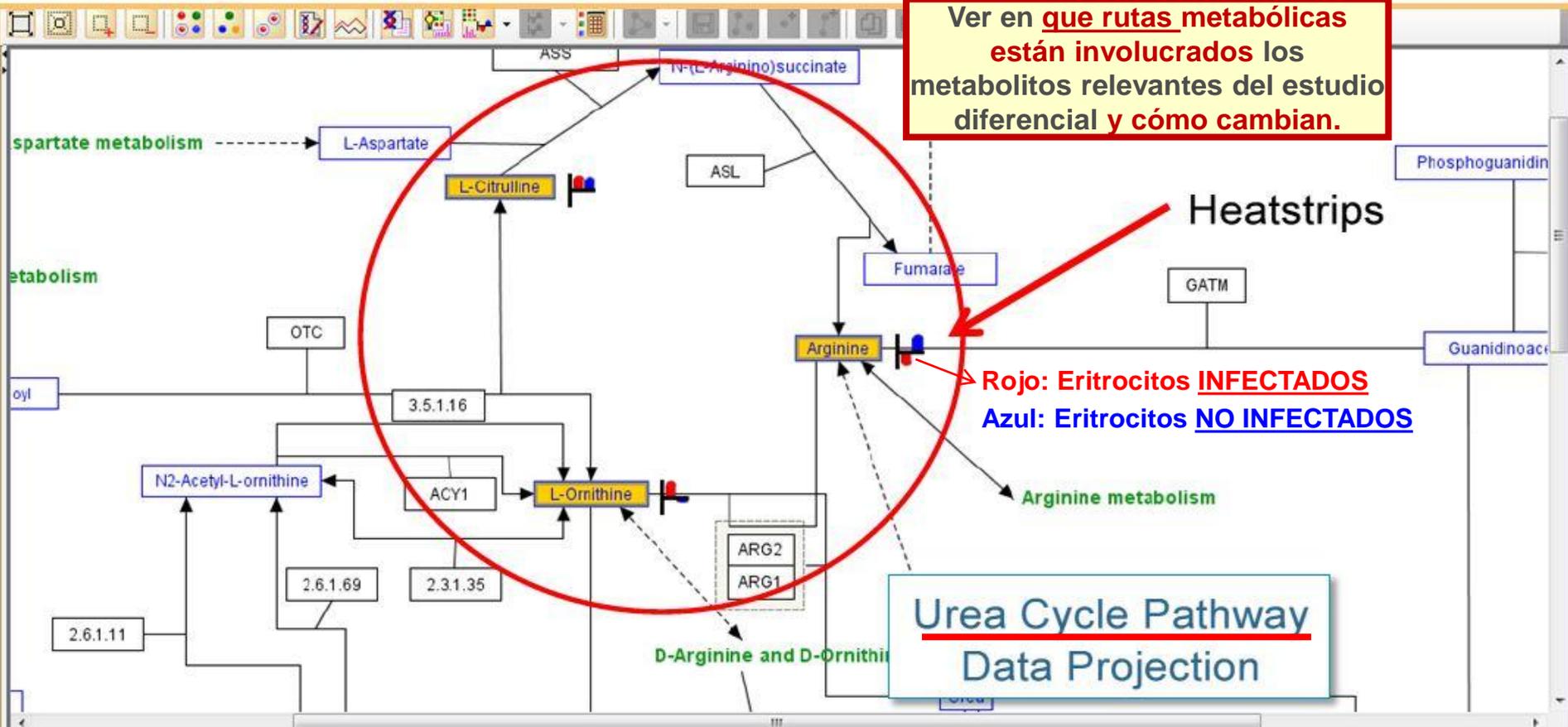


- 22Rv1, LNCaP and VCaP: androgen responsive (prostate cancer),
- DU145 and PC3: androgen non-responsive (prostate cancer)
- RWPE (benign).

¹Cancer Center, Medical College of Georgia, Augusta, GA; ²Metabolomics Laboratory Agilent Technologies, Santa Clara, CA,....

Abundancias Diferenciales de 3 Metabolitos de la Ruta de la Arginasa (Ciclo Urea) en Eritrocitos infectados por Malaria.

Ver en que rutas metabólicas están involucrados los metabolitos relevantes del estudio diferencial y cómo cambian.

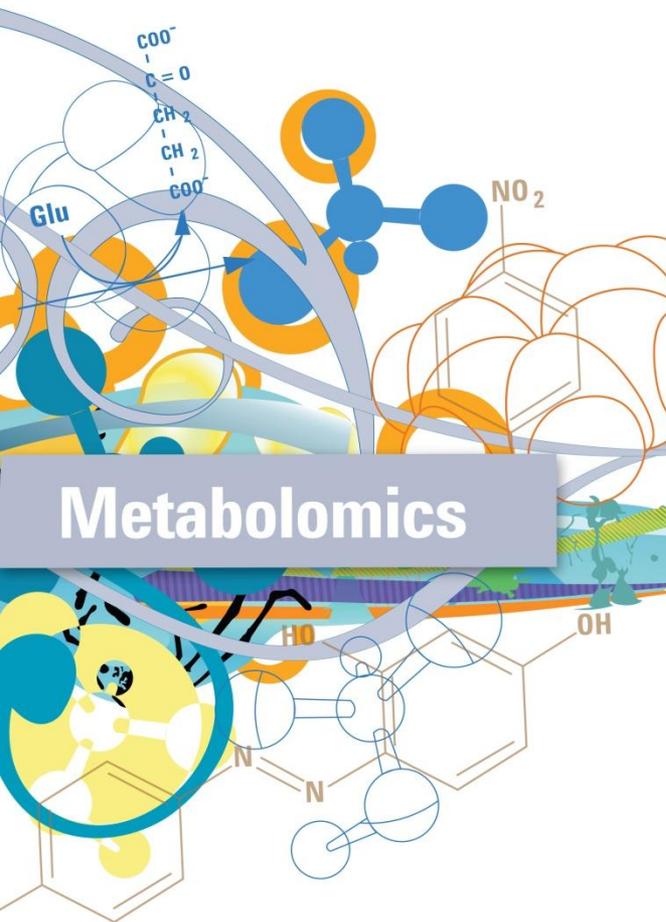


Urea Cycle Pathway
Data Projection

Malaria QQQ (normalized) - Conflicts : 0

Entity Name	Compound Name	[IRBC]	[NRBC]	DB	DB ID	Compound	Retention Time
Arginine	Arginine	-3.938	4.824	CAS Number	74-79-3	Arginine	2.2
L-Citrulline	Citrulline	6.103	5.458	CAS Number	372-75-8	Citrulline	2.026004
L-Ornithine	Ornithine	4.632	-1.48	CAS Number	70-26-8	Ornithine	1.2880372

Eritrocitos INFECTADOS // NO INFECTADOS



Metabolomics

- Los Estudios Metabolómicos basados en **Espectrometría de Masas y PCA** son una herramienta muy poderosa para el **Descubrimiento de Nuevos Biomarcadores**.
- La **Espectrometría de Masas** es una herramienta **clave** en laboratorios -ómicos y clínicos para Investigación Biomédica y Monitorización Terapéutica de Drogas (TDM).
- La **Metabolómica guiada por Rutas metabólicas** es una herramienta muy poderosa para estudios de Nuevos Biomarcadores y de Toxicidad de nuevos fármacos.
- Los **enfoques multi -ómicos reducen el "ruido de muestras biológicas"** (debida a su gran diversidad).
- La Metabolómica **puede ayudar mucho** en la evolución hacia una medicina **Predictiva, Preventiva, Personalizada y Participativa**.

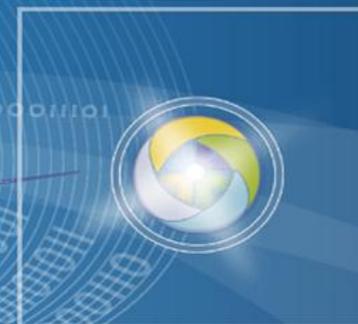
Para colaboraciones científicas o servicios de análisis -ómicos, Agilent le puede poner en contacto con grupos de investigación / laboratorios que disponen de todas estas herramientas.

isidre_masana@agilent.com

¿Preguntas?



Integrated BIOLOGY

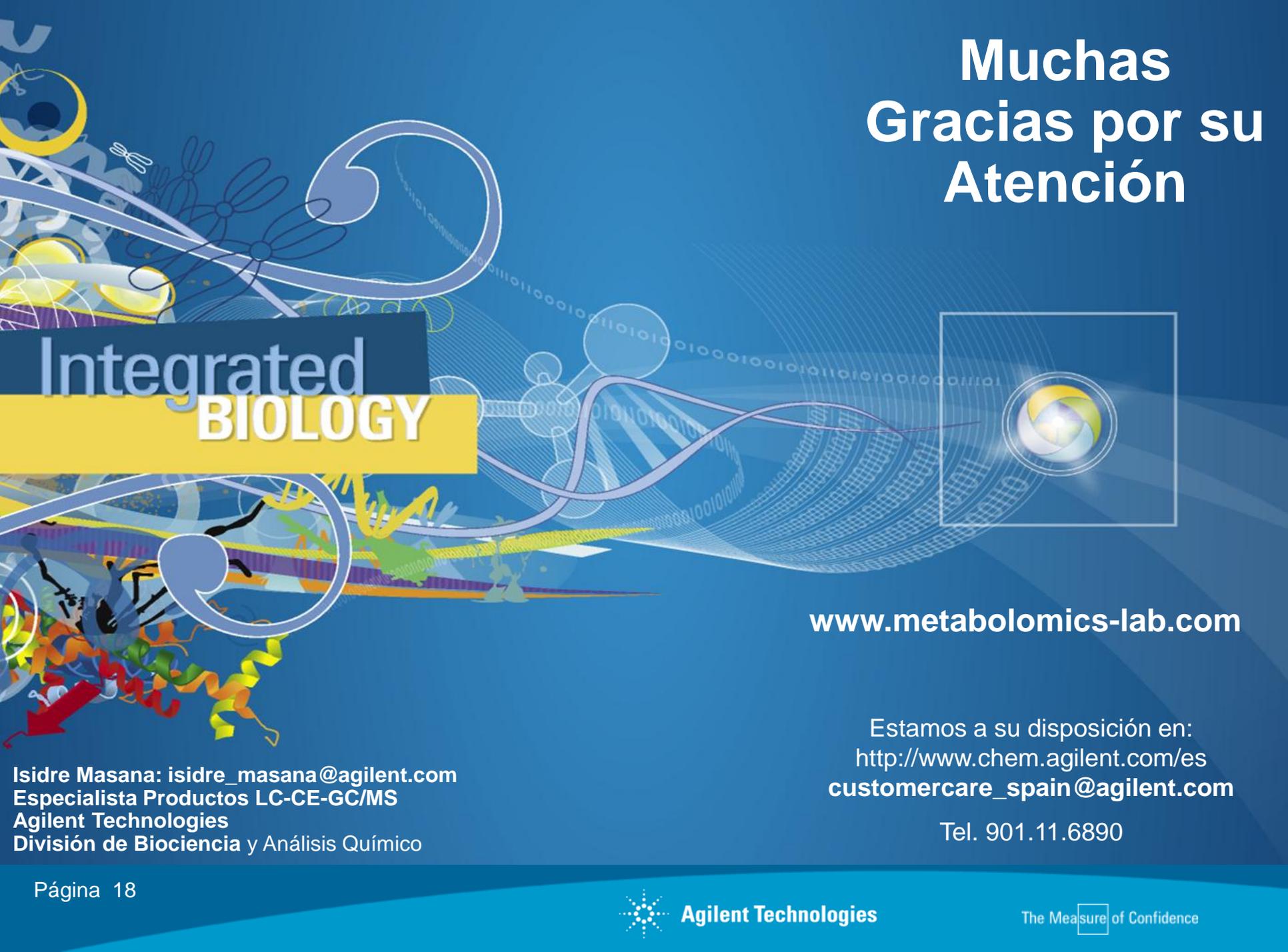


www.metabolomics-lab.com

Para colaboraciones científicas o servicios de análisis -ómicos, Agilent le puede **poner en contacto con grupos de investigación / laboratorios que disponen de todas estas herramientas.**

Isidre Masana: isidre_masana@agilent.com
Especialista Productos LC-CE-GC/MS
Agilent Technologies
División de Biociencia y Análisis Químico

Muchas Gracias por su Atención



Integrated
BIOLOGY

www.metabolomics-lab.com

Estamos a su disposición en:
<http://www.chem.agilent.com/es>
customercare_spain@agilent.com

Tel. 901.11.6890

Isidre Masana: isidre_masana@agilent.com
Especialista Productos LC-CE-GC/MS
Agilent Technologies
División de Biociencia y Análisis Químico