

# Abstract

**Motivation:** LC-HRMS is the most commonly used analytical technique for the simultaneous detection of as many metabolites as possible in untargeted metabolomics approaches. Despite its many advantages, it also has several drawbacks including unspecific, non-biological related signals and matrix effects that distort relative metabolite abundances and complicate subsequent statistical analysis. In this respect, stable isotopic labelling, which relies on the artificial creation of metabolite molecules enriched with certain stable isotopes (e.g.  $^{13}\text{C}$  or  $^{15}\text{N}$ ), can be used to overcome these limitations.

**Aim:** The aim of the presented thesis was the development of novel software for the processing of LC-HRMS data derived from native and isotopically labelled biological samples.

**Results:** The developed software MetExtract facilitates a) the automated detection of all metabolites of a biological system and b) the automated detection of all biotransformation products derived from a studied tracer substance in stable isotopic labelling assisted and LC-HRMS based untargeted metabolomics applications. The software utilises the distinct isotope patterns introduced by native and labelled isotopologs of the same metabolites for the detection of all truly metabolite-derived signals and thus efficiently removes any information of non-biological origin. Each detected feature pair that represents a certain ion species of a metabolite is verified with i) the distinct molecular mass gain introduced by the labelling, ii) the unique isotope patterns, and iii) a check for congruent coelution of the native and the labelled metabolite forms. Additionally, the software reports the exact number of incorporated labelling-isotope atoms for each found feature pair, which greatly enhances metabolite annotation. Moreover, MetExtract convolutes feature pairs derived from the same metabolite into feature groups and determines a fold quantification value, which, provided a proper labelling and sample pooling protocol ahead of LC-HRMS analysis, accounts for different ion suppression and enhancement effects as well as mass detector drifts across different measurement batches and improves relative metabolite quantification and thus comparison of experimental conditions.

**Applications:** With the aid of MetExtract the advantages of SIL in untargeted metabolomics approaches, which include the detection of only biological metabolites (e.g. 135 *Fusarium graminearum*- and 362 wheat-derived metabolites), improved relative metabolite quantification, and multivariate statistical analysis, were demonstrated.

In tracer-fate experiments MetExtract was used to automatically detect 9 detoxification products of the *F. graminearum* mycotoxin deoxynivalenol in wheat. Moreover, it was utilised for studying the metabolic fate of the aromatic amino acid phenylalanine in grape-berries (63 metabolites) and wheat cell suspension cultures (139 metabolites). All these metabolites were unambiguously assigned descendants of the respective tracer under investigation.

**Keywords:** MetExtract, Metabolite detection, Metabolite characterisation, Fast polarity switching

# Kurzfassung

**Motivation:** Flüssigkeitschromatographie in Kombination mit hochauflösender Massenspektrometrie und Electrospray-Ionisierung (LC-ESI-HRMS) ist die derzeit wichtigste und am häufigsten eingesetzte analytische Methode um das Metabolome einer biologischen Probe zu erfassen. Trotz vieler Vorteile hat diese Technik die Nachteile, dass nicht zwischen biologisch relevanten Metaboliten und Kontaminationen unterschieden wird und dass Matrix-Effekte die relative Quantifizierung der erfassten Metabolite verzerren. Isotopenmarkierung mit stabilen Isotopen gleicht diese Nachteile aus und verbessert dadurch die Interpretation des Versuchs.

**Ziele:** Zur effizienten Nutzung der Isotopenmarkierung sollte im Zuge dieser Dissertation eine Software zur automatischen Auswertung von LC-HRMS Daten natürlicher und isotopenmarkierter biologischer Proben entwickelt werden.

**Ergebnisse:** Die Dissertation beschreibt die Software MetExtract, die mittels LC-HRMS Analyse generierte Metabolomics Daten analysiert. MetExtract detektiert a) alle Metabolite eines biologischen Systems und b) nur jene Metabolite, die von einer bestimmten Vorläufersubstanz abstammen. Hierfür bedient sich MetExtract komplexer Isotopenmuster, die durch das Markieren mittels stabiler Isotope in den jeweiligen biologischen Experimenten entstehen. Die Software filtert Störsignale und Substanzen nicht biologischen Ursprungs aus und erkennt daher nur biologisch relevanten Metabolite. Jeder gefundenen Metabolite wird mit 3 Kriterien verifiziert: i) existiert einen isotopenmarkierter Partner mit der entsprechenden Masse, ii) ist das Isotopenmuster gültig und iii) sind die natürliche und markierte Metabolitformen identisch chromatografiert. Anhand dieser Merkmale wird für jeden gefundenen Metabolit auch die Anzahl an ausgetauschten Atomen mit dem verwendeten stabilen Isotop ermittelt. Unterschiedliche Ionen, die vom selben Metabolit abstammen, werden in Metabolitgruppen zusammengefasst. Des Weiteren errechnet MetExtract einen Fold-quantification Wert, der, sofern das Experiment entsprechend durchgeführt wurde, unterschiedliche Matrix-effekte und Detektorabweichungen ausgleicht, wodurch die relativen Konzentrationen der Metabolite korrigiert und die statistische Auswertung des Experiments verbessert wird.

**Anwendungen:** MetExtract wurde angewendet, um die Vorteile von Isotopenmarkierung mittels stabiler Isotope in ungerichteten Metabolomicsexperimenten zu demonstrieren.

Des Weiteren wurde das entwickelte Tool eingesetzt, um den Metabolismus des Mycotoxins Deoxynivalenol in Weizenpflanzen zu untersuchen. Dieser Ansatz fand 9 Detoxifizierungsprodukte von Deoxynivalenol. Auf ähnliche Weise wurde auch nach sekundären Metaboliten, die von der Aminosäure Phenylalanine abstammen, in Weinbeeren (63 Metabolite) und Weizenzellkulturen (139 Metabolite) gesucht. Neben bereits bekannten wurden auch neue, unbekannte Metabolite in den Proben gefunden und annotiert.

**Suchbegriffe:** MetExtract, Metabolit Detektion, Metabolit Charakterisierung, Fast polarity switching