

# Lebensmittelchemie 2015

Viele Lebensmittelinhaltsstoffe wirken auf die menschliche Gesundheit. Um den molekularen Mechanismus dieser Wirkung zu untersuchen, werden in der Lebensmittelchemie zunehmend Metabolomics-Techniken eingesetzt. Targeted Metabolomics erfasst dabei quantitativ die Stoffflüsse innerhalb eines biologischen Systems, während Non-targeted Metabolomics Stoffwechselintermediate zu detektieren versucht, etwa Lipide (Lipodomics).

◆ Unter den Makronährstoffen stehen die Lipide spätestens seit den 1950er Jahren in der Diskussion, sich direkt auf die menschliche Gesundheit auszuwirken. Aussagen wie „ein hoher Anteil von Fett in der Ernährung macht krank und dick“ oder „Lebensmittel mit einem hohen Gehalt an gesättigten Fettsäuren erhöhen das Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen“ sind jedem bekannt. Die neue Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Ernährung zum Thema Fett – „Fettzufuhr und Prävention ausgewählter ernährungsmitbedingter Krankheiten“ – zeigt aber, dass diese tief im Ernährungsbewusstsein der deutschen Bevölkerung verankerten Überzeugungen mehr Mythos als evidenzbasierte Fakten sind. Die protektive Wirkung von omega-3-ungesättigten Fettsäuren (n3 polyunsaturated fatty acids, n3-PUFA) für Herz-Kreislauferkrankungen hingegen erscheint hinreichend belegt; dies bestätigen Metaanalysen epidemiologischer Studien.<sup>1)</sup> Unstrittig ist ebenso, dass n3-PUFA Blutfette senken, und viele Studien legen eine kardioprotektive und anti-inflammatorische Wirkung nahe.

## Bildung von Eicosanoiden und anderen Oxylipinen

◆ Der molekulare Wirkmechanismus der essenziellen Nährstoffe n3-PUFA ist nur unzureichend ver-

standen (Abbildung 1). Zum einen beeinflusst der Einbau der n3-PUFA in (Phospho)Lipide Membraneigenschaften wie die Fluidität. Zum anderen geht man davon aus, dass ein Großteil ihrer Wirkungen über oxidierte Fettsäuren – Eicosanoide und andere Oxylipine – vermittelt werden.<sup>2)</sup> Zahlreiche dieser Oxylipine wirken als endogene Mediatoren mit physiologischen Funktionen

(Abbildung 2, S. 344). Im menschlichen Körper entstehen sie in der Arachidonsäure (ARA, 20:4n6)-Kaskade auf vier Wegen:

- Umsetzung durch Cyclooxygenasen (COX) führt unter anderem zum instabilen Prostaglandin (PG) H<sub>2</sub>, einer Vorstufe anderer PGs – etwa PGE<sub>2</sub> –, die Fieber, Schmerz und Entzündungen regulieren. →

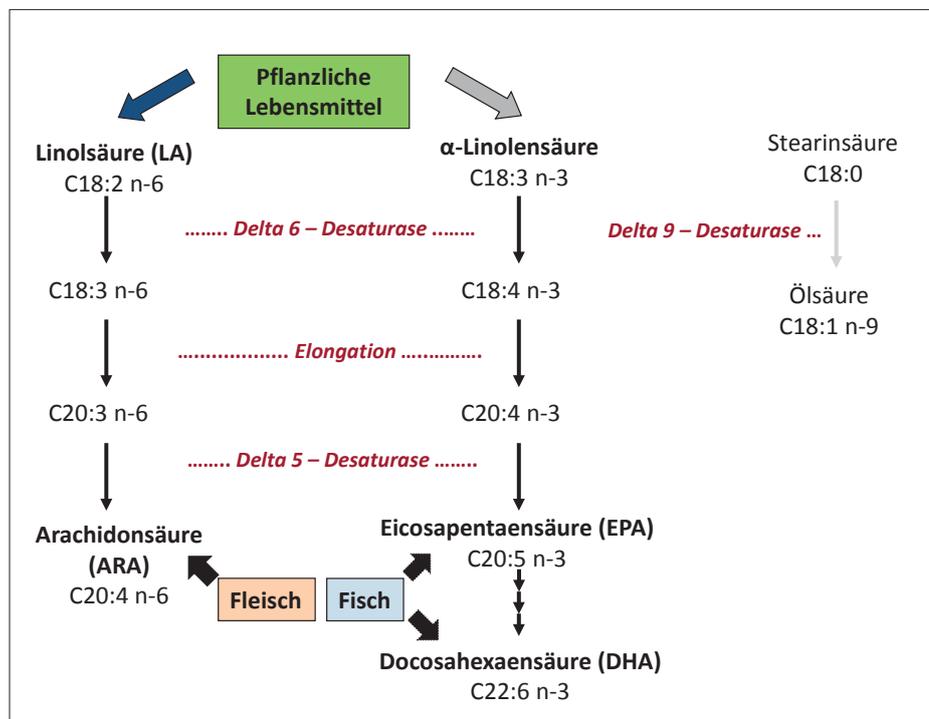


Abb. 1. Essenzielle Nährstoffe: Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA). Da Menschen nur über delta-5-, delta-6- und delta-9-Desaturasen verfügen, müssen sie sowohl n3-PUFA als auch n6-PUFA mit der Nahrung aufnehmen. Durch Desaturierung und Elongation können jeweils nur die n3-PUFA, darunter ALA, EPA, DHA, ineinander und nur die n6-PUFA wie LA und ARA ineinander überführt werden. Da n6-PUFA nicht in n3-PUFA umzuwandeln sind, bestimmt die Ernährung das endogene n3-PUFA/n6-PUFA-Verhältnis.

- Durch Lipoxygenasen (LOX) entstehen regio- und stereoselektiv Hydroperoxy-PUFA als reaktive Zwischenprodukte; sie sind Vorstufen zum Beispiel für Leukotriene oder werden zu Hydroxyfettsäuren reduziert.
- Im dritten Zweig der ARA-Kaskade oxidieren Cytochrom-P450(CYP)-Enzyme PUFA, wobei Hydroxy- und Epoxyfettsäuren entstehen. Die lösliche Epoxidhydrrolase (sEH) wandelt Epoxy- schnell in vic-Dihydroxyfettsäuren um. Epoxyfettsäuren regulieren vaskuläre sowie kardiale Funktionen und wirken in Tiermodellen entzündungshemmend und schmerzstillend.<sup>3,4)</sup>
- Viertens bilden sich Oxylipine ohne enzymatische Katalyse im Rahmen der Lipidautooxidation, wobei über Hydroperoxyintermediate sowohl cyclische, PG ähnliche Produkte wie Isoprostane als auch Hydroxy- und Epoxyfettsäuren entstehen.

Viele Medikamente beeinflussen direkt einen der ersten beiden Bildungswege, was ihre hohe Relevanz in der (Patho-)Physiologie unterstreicht. Aufgrund der vielfältigen Reaktionen resultiert in der ARA-Kaskade ein komplexes Muster an PUFA-Oxidationsprodukten (Abbildung 2).

### Targeted Metabolomics der Arachidonsäure-Kaskade

◆ Physiologische Wirkungen von Oxylipinen resultieren weniger aus der Modulation eines einzelnen Mediators, als vielmehr aus Veränderungen im komplexen Oxylipinmuster. Um zu verstehen, wie Oxylipine wirken, ist es daher erforderlich, die Produkte aller Bildungswege der ARA-Kaskade parallel zu quantifizieren und so die Stoffflüsse innerhalb dieses metabolischen Wegs zu erfassen. Man spricht dabei von Targeted Metabolomics. Hierfür wird vor allem Flüssigkeitschromatographie (LC) gekoppelt an Massenspektrometrie (MS) mit Elektrospray-Ionisation (ESI) eingesetzt. Trotz moderner Gerätetechnik ist die Oxylipinanalytik in biologischen Proben nach wie vor eine Herausforderung.<sup>5)</sup>

- Als potente Botenstoffe kommen viele Oxylipine in biologischen Proben nur in subnanomolarer Konzentration vor und erfordern so eine hochempfindliche Analytik. Gleichzeitig muss die Methode einen linearen Bereich von mindestens vier Größenordnungen aufweisen, da andere Oxylipine in derselben Probe mehr als hundertfach höher konzentriert vorliegen.
- Die vielfältigen Bildungswege von Oxylipinen führen zu einer großen Zahl regio- und stereoisomerer Verbindungen und stellen somit hohe Anforderungen an die Selektivität der Messmethode. Wie in Abbildung 3 am Beispiel von regioisomeren Hydroxy-ARA dargestellt, gelingt dies nur durch die Kombination effizienter chromatographischer Trennung mit massenspektrometrischer Detektion nach Fragmentierung im selected/multiple reaction monitoring (SRM, MRM) selektiv detektieren.

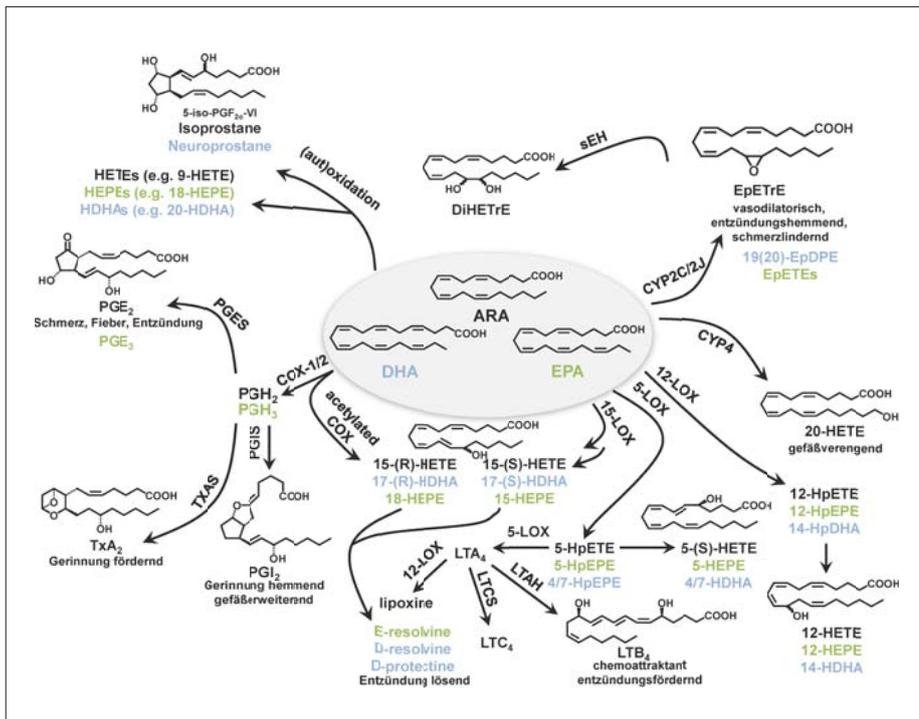


Abb. 2. Vereinfachtes Schema der Arachidonsäure-Kaskade. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) werden durch Cyclooxygenasen (COX), Lipoxygenasen (LOX), Cytochrom-P450-Monooxygenase (CYP) und Autoxidation zu Eicosanoiden und anderen Oxylipinen umgesetzt. Die physiologische Wirkung einiger ausgewählter Produkte ist angegeben.

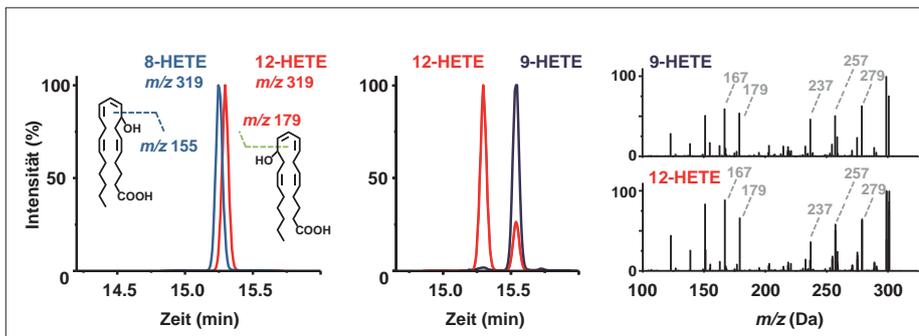


Abb. 3. Selektive Detektion von Regioisomeren durch Kombination von Chromatographie und Massenspektrometrie. Wie am Beispiel hydroxylierter Arachidonsäuren (HETE) gezeigt, lässt sich die große Zahl isomarer Oxylipine nur durch Kombination effizienter chromatographischer Trennung mit massenspektrometrischer Detektion nach Fragmentierung im selected/multiple reaction monitoring (SRM, MRM) selektiv detektieren.

phischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion spezifischer Fragmentierungen im Selected/multiple-reaction-monitoring-Modus (SRM/MRM).

- Zur Quantifizierung sind Standardsubstanzen nötig. Die Verfügbarkeit, Reinheit und Stabilität von (internen) Standards begrenzen die Leistungsfähigkeit der Methoden.
- Weitere in der Probe enthaltene Moleküle beeinflussen das ESI-MS-Signal.<sup>6)</sup> Dies stellt hohe Anforderungen an Probenvorbereitung und Chromatographie.
- Nach Entnahme einer biologischen Probe wie Blut oder Gewebe können sich ex vivo Oxylipine enzymatisch und nicht enzymatisch abbauen oder bilden. Diese Reaktionen hält eine optimierte Probennahme, -stabilisierung, -lagerung und -aufarbeitung so gering wie möglich.

Um diesen Herausforderungen zu begegnen, wird kontinuierlich an neuen und verbesserten Probenvorbereitungsstrategien, leistungsfähigeren chromatographischen Trennungen und Ionisationstechniken sowie an der Synthese von (internen) Standards gearbeitet. Derzeitige Analysemethoden ermöglichen eine parallele Detektion und Quantifizierung von zirka 150 Oxylipinen mit Sensitivität im picomolaren Bereich.<sup>6,7)</sup> Der Einsatz dieser Techniken in Zellkulturen und Tiermodellen sowie Humaninterventionsstudien ermöglicht es, die Wirkung von Lebensmittel(-inhaltsstoffen) auf die ARA-Kaskade umfassend zu untersuchen.

### Beeinflussung der Oxylipinbildung durch n3-PUFA

◆ Als Substrate in der ARA-Kaskade (Abbildung 2) beeinflussen n3-PUFA die Bildung von Oxylipinen auf mehreren Ebenen. Der am längsten beschriebene Mechanismus zur Erklärung der gesundheitlichen Wirkung der aus Fischölen stammenden n3-PUFA Docosahexensäure (DHA, 20:6n3) und Eico-

sapentaensäure (EPA, 20:5n3) ist die Konkurrenz mit ARA um die aktiven Zentren von COX- und LOX-Enzymen. Er beschreibt deren Konkurrenz mit ARA um die aktiven Zentren von COX- und LOX-Enzymen. In vielen Fällen werden DHA und EPA nicht nur langsamer als ARA umgesetzt; ihre Produkte – darunter Serie-3-Prostaglandine und Serie-5-Leukotriene aus EPA – sind auch weniger entzündungsfördernd als die aus ARA gebildeten Serie-2-Prostaglandine und Serie-4-Leukotriene. Derzeitiges Lehrbuchwissen begründet so die entzündungshemmende Wirkung von Fischölen. Spätestens aber die Entdeckung von spezifischen, entzündungslösenden Resolvinen aus DHA und EPA durch Serhan und Kollegen zeigt,<sup>8)</sup> dass n3-PUFA Lipidmediatoren weitaus komplexer beeinflussen, als bloß ARA aus COX und LOX zu verdrängen. In den vergangenen Jahren wurden mehr als zehn n3-PUFA-Oxylipine beschrieben, die Entzündungen beenden und so Gewebszerstörung und Funktionsverlust verhindern (specialized pro-resolving lipid mediators, SPM).

So überzeugend die Ergebnisse zur Wirkung der SPM in experimentellen Studien sind, so unklar ist ihre Rolle in der Vermittlung der Wirkung von n3-PUFA aus der Nahrung. In vielen Laboren lassen sich SPM nach n3-PUFA-Gabe trotz empfindlichster Methoden nicht nachweisen. Betrachtet man die relativen Konzentrationsänderungen von Oxylipinen in humanem Plasma, so finden die größten Veränderungen im dritten, CYP-katalysierten Bildungsweg statt. Dabei wird insbesondere ein starker Anstieg von Epoxy-EPA und -DHA sowie ihrer Hydrolyseprodukte beobachtet.<sup>9,10)</sup> Dieser Befund scheint von hoher biologischer Relevanz zu sein, da Epoxy-EPA hochwirksam antiarrhythmisch und somit herzschützend sind.<sup>3)</sup> Auch wirken diese – wie viele andere Epoxy-PUFA – entzündungshemmend, schmerzlin- dernd und gefäßerweiternd.<sup>3,4)</sup> Die Aufnahme von n3-PUFA ändert

nicht nur die Epoxyfettsäurekonzentrationen, sondern erhöht auch die Spiegel an 17-HDHA (aus DHA) und 18-HEPE (aus EPA) in den Hydroxyfettsäuren besonders deutlich.<sup>10)</sup> Weder die physiologische Wirkung noch der Bildungsweg dieser Oxylipine ist bisher verstanden. Bemerkenswert ist, dass 18-HEPE auch dominierend in vitro, nach Inkubation mit EPA in verschiedenen Zelllinien entsteht.<sup>11)</sup>

Trotz intensiver Untersuchungen ist es derzeit noch unklar, welche Veränderungen im Oxylipinmuster die Wirkung von n3-PUFA vermitteln. Diese Frage ist Gegenstand der Forschung vieler Arbeitsgruppen der Lebensmittelchemie, Ernährungsforschung, Medizin und angrenzender Fachdisziplinen.

### In Lipiden gebundene Oxylipine

◆ In den letzten Jahren fanden Forschungsgruppen Veresterungsprodukte von Oxylipinen in verschiedenen Geweben.<sup>12)</sup> Die Bildung der veresterten Lipidmediatoren ist eng mit der freier Oxylipine verknüpft (Abbildung 2), da – mit Ausnahme einer Lipooxygenase (ALOX-15B) und Autoxidation – sich nur freie Fettsäuren zu Oxylipinen umsetzen lassen. Aufgrund



der geringen endogenen Konzentration freier Fettsäuren setzen im ersten Schritt Enzyme der Familie der (cytosolischen) Phospholipasen A2 (cPLA2) PUFA frei, und zwar aus Phospholipiden vor allem aus der sn2-Position (Abbildung 4). Veresterte Oxylipine resultieren durch Reveresterung des Lysophosphats mit dem Lipidmediator (Abbildung 4). Im Vergleich zu den freien, nicht veresterten Lipidmediatoren ist nur wenig über die physiologische Rolle dieser Lipide bekannt. Man geht davon aus, dass sie vor allem als Speicher für Lipidmediatoren dienen, die durch einen Reiz freigesetzt werden, um so eine schnellere Reaktion zu ermöglichen.<sup>13)</sup> Die Modifikation der Fettsäure beeinflusst auch die Eigenschaften des daraus entstehenden Phospholipids und damit die Fluidität der Membran. So ist es nicht überraschend, dass veresterte Oxylipine in den Blutplättchen an

der Regulation der Blutgerinnung beteiligt sind. In-vitro-Experimente zeigen, dass vor allem HETE-Phosphatidylcholine die Gewebefaktor-abhängige Blutgerinnung beeinflussen.<sup>14)</sup> Darüber hinaus besitzen sie entzündungshemmende Eigenschaften. So unterdrückt zum Beispiel 18:0/15-HETE-PE durch Interaktion mit Toll-ähnlichen Rezeptoren Entzündungsreaktionen der angeborenen Immunantwort.<sup>15)</sup>

### Non-targeted Lipidomics

◆ Die Modulation von Oxylipinen – frei oder verestert in polaren Lipiden – ist nur eine Art, wie n3-PUFA oder das n3/n6-PUFA-Verhältnis endogene Lipide beeinflusst. PUFA sind Teil von Phospholipiden, Sphingolipiden, Triglyceriden und Cholesterolestern. Diese haben sowohl als Strukturbildner (Membrane) als auch als Signalmoleküle

oder deren Vorläufer physiologische Funktionen.

Lipide zeichnen sich durch eine sehr hohe strukturelle Diversität aus; aktuelle Datenbanken, wie lipidmaps.org enthalten derzeit etwa 40 000 unterschiedliche Lipide, wobei davon ausgegangen werden darf, dass die Zahl an biologisch vorkommenden Verbindungen noch deutlich höher ist. Um ernährungsbedingte und krankheitsbedingte Veränderungen dieser Klasse an Molekülen zu untersuchen, kommen auf Standardsubstanzen basierte Targeted Metabolomics nicht mehr infrage. Stattdessen werden verschiedene Non-targeted-Lipidomics-Methoden eingesetzt.<sup>16,17)</sup> Dabei kommen häufig hochauflösende Massenspektrometer, wie time-of-flight (TOF) und Orbitrap-Analysatoren zum Einsatz.

Die massenspektrometrischen Untersuchungsmethoden lassen

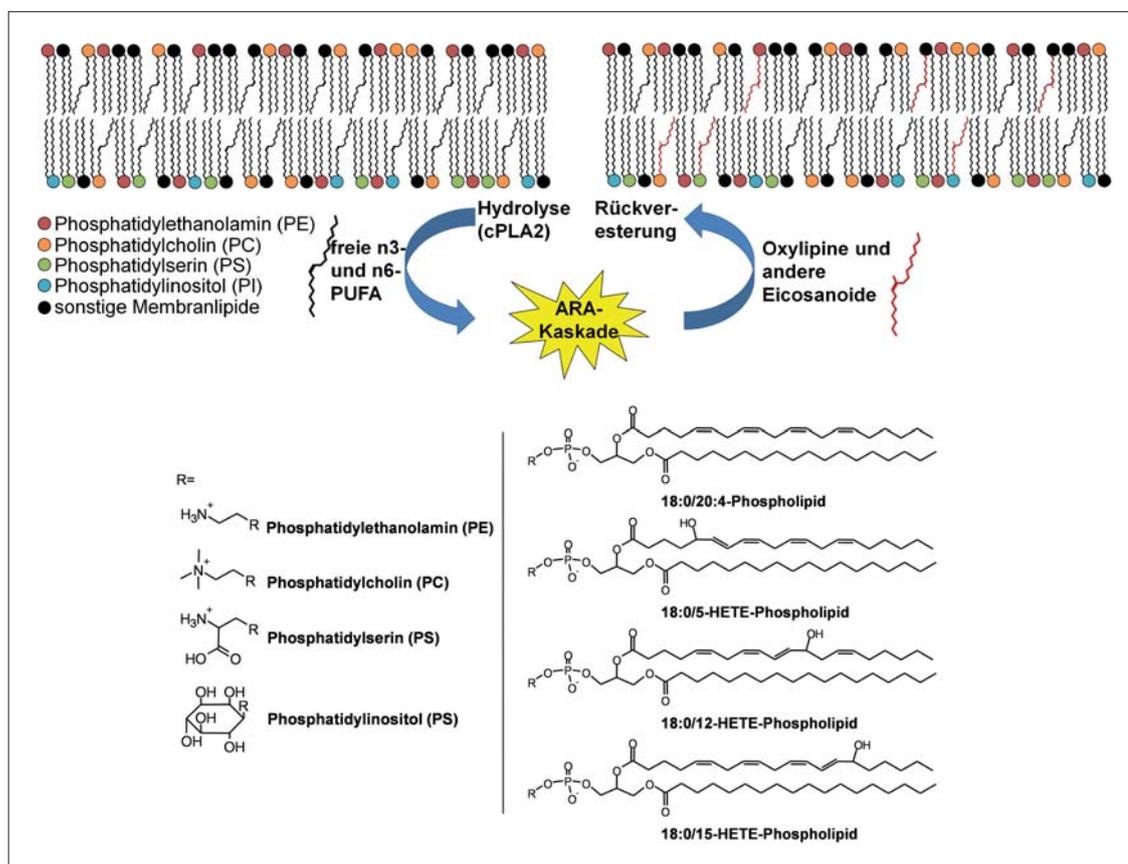


Abb. 4. Bildung von veresterten Oxylipinen. Aus einer Zellmembran setzen Phospholipasen wie die cytosolische Phospholipase A2 ungesättigten Fettsäuren (PUFA) frei. Diese werden in der ARA-Kaskade (Abbildung 2) oxidativ umgesetzt und dann mit dem Lysophospholipid wieder verestert. Die Oxylipin enthaltenden polaren Lipide modulieren die Membraneigenschaften und dienen als Pool zur direkten Freisetzung der Lipidmediatoren. Die Struktur mengenmäßig bedeutender veresteter Lipidmediatoren ist exemplarisch dargestellt.

sich in zwei Gruppen einteilen: Die erste Gruppe basiert auf dem Shotgun-Prinzip, wobei der zu untersuchende Lipidextrakt direkt mit MS analysiert wird.<sup>18)</sup> Aufgrund der Vielzahl von isomeren Verbindungen, wie sie beispielsweise in der ARA-Kaskade gebildet werden – die zudem auch ein ähnliches Fragmentspektrum aufweisen –, ist die Leistungsfähigkeit dieses Ansatzes allerdings begrenzt. Daher liefert zunehmend die zweite Gruppe, LC-MS-Methoden, ein detailliertes Bild des Lipidoms einer biologischen Probe. Die so bestimmte hochaufgelöste exakte Masse liefert die vorläufige Identifizierung und Klassifizierung der Lipide. Die LC trennt hierbei nicht nur einzelne Lipidklassen und Isomere, sondern verbessert auch die Empfindlichkeit, indem sie unter anderem die Ionensuppression reduziert.

Die größte Herausforderung in der Non-targeted-Metabolomics-Methodik liegt allerdings in der Datenauswertung. Softwaretools wandeln die aus den Analysen gewonnene Datenmenge erst zu interpretierbaren Ergebnissen. Bei LC-MS-basierten Methoden gleicht zunächst ein Peak-Alignment Schwankungen in der Retentionszeit aus. Anschließend detektiert und integriert die Software die Peaks und normiert sie. Der letzte Schritt ist in der Regel eine datenbankbasierte Identifikation des einzelnen Peaks (Features). Hierzu dienen Datenbanken wie Lipidmaps oder die Human Metabolome Database (HMDB), die auf identifizierten Lipiden beziehungsweise Metaboliten basieren. Diese Datenbanken liefern neben den exakten Massen auch Fragmentspektren zur Charakterisierung. Aufgrund der Regelmäßigkeit komplexerer Lipide (Variation der verschiedenen Fettsäuren an den unterschiedlichen sn-Positionen oder deren C-Zahl) lassen sich In-silico-Datenbanken erzeugen. Lipidblast aus dem Fiehn Lab (UC Davis, Kalifornien, USA) ist ein Beispiel für eine solche computergenerierte Datenbank und enthält neben den exak-

ten Massen auch mehr als 200 000 Spektren.

Aufgrund der Größe der Datensätze werden diese mit chemometrischen und bioinformatischen Methoden analysiert, um anschließend Veränderungen im Lipidom zu identifizieren. Erste Untersuchungen dazu, wie n3-PUFA auf das Serum-Lipidom wirkt, zeigten Änderungen in den Triglyceriden, Phospholipiden und insbesondere Sphingomyelinen. Letztere sind insofern von besonderem Interesse, da sie wichtig für den Aufbau von very low density lipoprotein (VLDL) sind und somit am Transport von anderen Lipiden beteiligt sind.<sup>16)</sup> In anderen Lipidklassen, wie Ceramiden oder lyso-Phosphatidylethanolaminen, kam es nicht zu Veränderungen. Dies zeigt deutlich, dass n3-PUFA selektiv in bestimmte komplexere Lipide eingebaut werden. Ein mechanistisches Verständnis dieser Befunde zum Metabolismus von n3-PUFA ist Gegenstand aktueller Forschung.

### Zusammenfassung

◆ Bioanalytische Methoden beschreiben die gesundheitliche Wirkung von Lebensmittelinhaltsstoffen auf molekularer Ebene. Um die protektive Wirkung von n3-PUFA zu untersuchen, finden dabei sowohl Targeted-Metabolomics-Methoden von Lipidmediatoren als auch Non-targeted-Lipidomics-Techniken Anwendung. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Wirkung von mehreren oxidativen Fettsäuremetaboliten (Oxylipinen) orchestriert wird, wobei insbesondere Epoxy-FA und (mehrfach) hydroxylierte n3-PUFA eine wichtige Rolle spielen. Die Analyse des umfassenden Lipidoms offenbart darüber hinaus, dass n3-PUFA das Muster vieler Lipidklassen spezifisch beeinflusst. Die Aufgabe für die nächsten Jahre besteht nicht nur darin, diese Veränderungen mechanistisch zu verstehen, sondern viel mehr in der Korrelation der immer umfassender werdenden analytischen Datensätze mit der biologischen Wirkung.

### Literatur

- 1) R. Chowdhury, S. Warnakula, S. Kunutsor et al., *Ann. Intern. Med.* 2014, 160, 398–406.
- 2) M. W. Buczynski, D. S. Dumlao, E. A. Dennis, *J. Lipid Res.* 2009, 50, 1015–38.
- 3) C. Westphal, A. Konkel, W. H. Schunck, *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015, 851, 151–87.
- 4) G. Zhang, S. Kodani, B. D. Hammock, *Prog. Lipid Res.* 2014, 53, 108–23.
- 5) I. Willenberg, A. I. Ostermann, N. H. Schebb, *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 2675–83.
- 6) A. I. Ostermann, I. Willenberg, N. H. Schebb, *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 1403–14.
- 7) D. S. Dumlao, M. W. Buczynski, P. C. Norris, R. Harkewicz, E. A. Dennis, *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1811, 724–36.
- 8) C. N. Serhan, *Nature* 2014, 510, 92–101.
- 9) J. P. Schuchardt, S. Schmidt, G. Kressel et al., *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 2014, 90, 27–37.
- 10) R. Fischer, A. Konkel, H. Mehling et al., *J. Lipid Res.* 2014, 55, 1150–1164.
- 11) A. I. Ostermann, I. Willenberg, K. H. Weylandt, N. H. Schebb, *Chromatographia* 2015, 78, 415–428.
- 12) V. J. Hammond, V. B. O'Donnell, *Bba-Biomembranes* 2012, 1818, 2403–2412.
- 13) N. H. Schebb, A. I. Ostermann, J. Yang et al., *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 2014, 113–115, 21–9.
- 14) C. P. Thomas, L. T. Morgan, B. H. Maskrey et al., *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 6891–903.
- 15) A. H. Morgan, V. Dioszeghy, B. H. Maskrey et al., *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 21185–91.
- 16) I. Ottestad, S. Hassani, G. I. Borge, *Plos One* 2012, 7, e42550.
- 17) A. D. Watson, *J. Lipid Res.* 2006, 47, 2101–11.
- 18) X. Han, S. Rozen, S. H. Boyle et al., *Plos One* 2011, 6, e21643.

**Nils Helge Schebb** leitet seit dem Jahr 2014 als Vertretungsprofessor den Lehrstuhl für Lebensmittelchemie an der Bergischen Universität Wuppertal. Seine Arbeitsgruppe erforscht die Wirkung von Lebensmittelinhaltsstoffen, insbesondere Polyphenolen und ungesättigten Fettsäuren, auf die Arachidonsäurekaskade.



**Sven Meckelmann** promovierte im Jahr 2014 an der Bergischen Universität Wuppertal. Als Postdoc in der Gruppe von Valerie O'Donnell an der Cardiff University, Wales, setzt er non-targeted Lipidomics zum molekularen Verständnis von genetisch bedingten Veränderungen des Lipidoms ein.

