

Massenspektrometrische Untersuchungen von modifizierten Nucleosiden und ihre Evaluierung als Tumormarker bei Brustkrebs

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von

Antje Frickenschmidt

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 01.01.2003 bis 30.06.2006 unter der Anleitung von Prof. Dr. Hartmut Liebich, Prof. Dr. Stefan Laufer und Dr. Bernd Kammerer am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2006

Dekan: Prof. Dr. Stefan Laufer

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Laufer

2. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Liebich

Ich danke...

... Herrn Dr. Bernd Kammerer für die Betreuung der Arbeit, die Stellung des Themas, seine Unterstützung und das stete Interesse an meiner Arbeit sowie für zahlreiche Diskussionen

... Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer für die Übernahme des Erstgutachtens und die Ermöglichung der Finanzierung des dritten Jahres

... Herrn Prof. Dr. Hartmut Liebich für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Zweitgutachtens

... dem DFG Graduiertenkolleg Analytik der Universität Tübingen für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit

... Herrn Prof. Dr. Christoph Gleiter von der Abteilung für Klinische Pharmakologie für die Abschlussfinanzierung

... Frau Prof. Dr. Christa E. Müller und Herrn Dr. J. Burbiel vom Pharmazeutischen Institut der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für die Synthese von Standardsubstanzen

... Frau Ute Hilcher und Herrn Dr. Hans Neubauer von der Abteilung Tumorprogression in der Frauenklinik Tübingen für die Kooperation und Durchführung der Zellkulturinkubationen

... Frau Dr. Ursula Delabar für ihre Hilfe und ihren Optimismus bei den anfänglichen Problemen mit der Sykam-HPLC

... Frau Dr. Gabriela Zurek von der Firma Bruker für die LC-ESI-MS-Messungen

... allen derzeitigen und ehemaligen Doktoranden und Mitarbeitern des AK Prof. Laufer am Institut für Pharmazeutische Chemie für die gute Arbeitsatmosphäre

... meinem Mitdoktoranden und Laborkollegen Herrn Dr. Rainer Kahlich für seine Hilfe in fachlichen Dingen und eine schöne Zeit im und außerhalb des Labors (und natürlich für den Apfelsaft)

... Frau Alexandra Stoffel für ihre Freundschaft und die schöne gemeinsame Zeit in Tübingen

... Frau Sabine Linsenmaier für fast 3 ½ Jahre gemeinsamer Promotion mit viel Spaß und für ihre Unterstützung auch in weniger schönen Zeiten

... meinen Mitdoktoranden Herrn Holger Scheible und Herrn Dino Bullinger für die nette Arbeitsatmosphäre, fachlich kompetente Unterstützung mit viel Geduld und alle gemeinsamen Unternehmungen

... Frau Katrin Kinkel für die bereitwillige Aufnahme im Büro während des Schreibens, die Motivation in Zeiten des Zweifels und das Korrekturlesen

... Frau Gabriele Ahrens für die Verbreitung ihrer fast immer guten Laune, die äußerst kompetenten Haarschnitte und das Korrekturlesen

... schließlich danke ich meinen Eltern für ihre stete Unterstützung, ihr Vertrauen und viel Geduld während der vergangenen 3 ½ Jahre

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit und darüber hinausgehende Arbeiten wurden in folgender Form veröffentlicht:

Publikationen:

- 1 **Mass spectrometric identification of modified urinary nucleosides used as potential biomedical markers by LC-ITMS coupling**
Kammerer, B.; Frickenschmidt, A.; Müller, C.E.; Laufer, S.; Gleiter, C.H.; Liebich, H.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382(4), 2005, 1017-1026
- 2 **MALDI-TOF MS Analysis of Urinary Nucleosides**
Kammerer, B.; Frickenschmidt, A.; Gleiter, C.H.; Laufer, S.; Liebich, H.
Journal of the American Society of Mass Spectrometry, 16(6), 2005, 940-947
- 3 **Age-dependence of urinary normal and modified nucleosides in childhood as determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography**
Liebich, H.M.; Mueller-Hagedorn, S.; Bacher, M.; Scheel-Walter, H.G.; Lu, X.; Frickenschmidt, A.; Kammerer, B.; Kim, K.R.; Gerard, H.
Journal of Chromatography, B, 814(2), 2005, 275-283
- 4 **Chromatographic, capillary electrophoretic and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of urinary modified nucleosides as tumor markers**
Liebich, H.M.; Mueller-Hagedorn, S.; Klaus, F.; Meziane, K.; Kim, K.R.; Frickenschmidt, A.; Kammerer, B.
Journal of Chromatography, A, 1071(1-2), 2005, 271-275

Posterpräsentationen:

- 1 **MALDI-TOF Analysis: Urinary nucleosides from cancer patients as potential tumor markers**
Antje Frickenschmidt, Stefan Laufer, Christoph H. Gleiter, Hartmut Liebich, Bernd Kammerer, DPhG-Jahrestagung Würzburg, 2003
- 2 **Chromatographic separation of nucleosides from biological fluids and identification by off-line mass spectrometric techniques: MALDI-TOF-MS/MALDI-PSD and nano-ESI-MS³**
Antje Frickenschmidt, Iris Gräber, Thomas Böttinger, Stefan Laufer, Christoph H. Gleiter, Hartmut Liebich and Bernd Kammerer
ISC Paris, 2004
- 3 **Modified nucleosides as potential tumor markers: analysis by MALDI-TOF-MS and Ion Trap MS**
Frickenschmidt, A., Bullinger, D., Gleiter, C.H., Liebich, H., Laufer, S. and Kammerer, B.
DPhG-Jahrestagung Mainz, 2005

INHALTSVERZEICHNIS

1	VORWORT UND FRAGESTELLUNG	1
2	EINLEITUNG.....	3
2.1	BRUSTKREBS UND TUMORMARKER.....	3
2.1.1	Auftreten von Brustkrebs	3
2.1.2	Risikofaktoren	4
2.1.3	Behandlungsmethoden und Vorsorge.....	4
2.1.4	Tumormarker für Brustkrebs.....	5
2.2	NUCLEOSIDE UND RNA-METABOLISMUS.....	9
2.2.1	Modifizierte Nucleoside.....	9
2.2.2	tRNA- und Nucleosidmetabolismus.....	13
2.3	ANALYTISCHE METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON NUCLEOSIDEN.....	24
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	27
3.1	ENTWICKLUNG EINER MS-KOMPATIBLEN HPLC-METHODE ZUR TRENNUNG VON NUCLEOSIDEN	27
3.1.1	Überblick über bisher publizierte HPLC-Methoden zur Trennung von Nucleosiden	27
3.1.2	Methodenoptimierung	29
3.2	MALDI-TOF-ANALYTIK VON NUCLEOSIDEN AUS URIN.....	33
3.2.1	Überblick über publizierte Methoden zur Messung von Nucleosiden und kleinen Molekülen mittels MALDI-TOF-MS.....	33
3.2.2	Messung von Standardnucleosiden.....	34
3.2.3	Anwendung der optimierten Methode auf Nucleoside aus Urinproben	48
3.3	UNTERSUCHUNG VON NUCLEOSIDEN MITTELS IONENFALLEN-MS	59
3.3.1	Überblick über bisher veröffentlichte Methoden zur massenspektrometrischen Detektion von Nucleosiden	59
3.3.2	Spritzenpumpeninjektionen von Standard-Nucleosiden zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens durch MS ⁿ -Experimente mit der Ionenfalle.....	61
3.3.3	Urinproben	86
3.3.4	Untersuchung von Zellkulturüberständen.....	107
3.4	MIKROSOMENINKUBATIONEN VON MTA UND PSEUDOURIDIN.....	126
3.4.1	Einleitung	126
3.4.2	Ergebnisse und Diskussion	127
3.5	NANO-ESI-MESSUNGEN VON NUCLEOSIDEN AUS URIN AM TRIPLE-QUADRUPOLE.....	130
3.5.1	Einleitung	130
3.5.2	Untersuchung von Nucleosiden aus Urin	131
3.5.3	Zusammenfassung	136

3.6	HPLC-MS-METHODE ZUR MESSUNG VON NUCLEOSIDEN IN URINPROBEN UND AUSWERTUNG MIT METHODEN DER BIOINFORMATIK	137
3.6.1	Einleitung	137
3.6.2	MS-Methode	141
3.6.3	Proben	147
3.6.4	Auswertung.....	147
4	ZUSAMMENFASSUNG	151
5	MATERIAL UND METHODEN.....	155
5.1	PROBENVORBEREITUNG.....	155
5.1.1	Chemikalien und Geräte	155
5.1.2	Urin (Affinitätschromatographie).....	156
5.1.3	Zellkulturüberstände	156
5.1.4	Mikrosomeninkubationen.....	157
5.2	MS-KOMPATIBLE HPLC-UV-METHODE ZUR TRENNUNG VON NUCLEOSIDEN AUS URIN ..	160
5.2.1	Chemikalien	160
5.2.2	Gerät	160
5.2.3	Säulen.....	160
5.2.4	Methodenparameter	160
5.3	MALDI-TOF-MESSUNGEN VON NUCLEOSIDEN	161
5.3.1	Chemikalien	161
5.3.2	Gerät.....	162
5.3.3	Verwendete Targets	162
5.3.4	Präparationstechniken	162
5.3.5	Interne und externe Kalibrierung	163
5.3.6	MALDI-TOF-Methode	164
5.3.7	PSD-Methode	164
5.3.8	Messung von Standardnucleosiden.....	165
5.3.9	Messung von Nucleosiden aus Urinproben.....	165
5.4	SPRITZENPUMPENINJEKTIONEN VON NUCLEINBASEN UND NUCLEOSIDEN AN DER IONENFALLE	166
5.4.1	Chemikalien	166
5.4.2	Gerät	166
5.4.3	MS-Parameter.....	166
5.4.4	Messung	169
5.5	AUTO-LC-MS3-METHODE ZUR IDENTIFIZIERUNG VON NUCLEOSIDEN AUS URIN.....	170
5.5.1	Chemikalien	170
5.5.2	Geräte	170
5.5.3	Säule.....	170
5.5.4	HPLC-Methode	170
5.5.5	MS-Parameter.....	171

5.6	NANO-ESI-MESSUNGEN VON NUCLEOSIDEN AUS URIN AM TRIPLE-QUADRUPOLE.....	172
5.6.1	Geräte und Materialien	172
5.6.2	Methodenparameter	172
5.7	HPLC-MS-METHODE ZUR MESSUNG VON NUCLEOSIDEN IN URINPROBEN UND BIOINFORMATISCHE AUSWERTUNG	173
5.7.1	Chemikalien	173
5.7.2	Geräte	173
5.7.3	Säule	174
5.7.4	HPLC-Methode	174
5.7.5	MS-Methode	174
6	LITERATUR	177

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ASCO	American Society of Clinical Oncology
BRCA	Brustkrebsgen (Breast Cancer Gene)
CA	Carbohydrate Antigen
CEA	Carcinoembryonales Antigen
c-erbB-2	Complementary DNA Erythroblastoma
CHCA	α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
CI	Chemische Ionisation
CID	Collision Induced Dissociation
CMP	Cytidinmonophosphat
CNL	Constant Neutral Loss
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EI	Elektronenstoßionisation
EIC	Extracted Ion Chromatogram
ER	Estrogen Rezeptor
ESI	Elektrosprayionisation
FA	Ameisensäure (formic acid)
FAB	Fast Atom Bombardment
GMP	Guanosinmonophosphat
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC	Interne Kalibrierung
IMP	Inosinmonophosphat
IS	Interner Standard
ITMS	Ionenfallen-MS
oa-TOF	orthogonal accelerating TOF
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight
MG	Massengenauigkeit
MS	Massenspektrometrie
NAD	Nicotinamiddinucleotid
NMN	Nicotinamidmononucleotid
PSD	Post Source Decay
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	transfer RNA
siRNA	small interfering RNA
snRNA	small nuclear RNA
RP	Reversed Phase
S/N	Signal to Noise
SVM	Support Vector Machine
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TFA	Trifluoressigsäure
TQMS	Triplequadrupol-MS
UMP	Uridinmonophosphat

Nucleoside

A	Adenosin
m1A	1-Methyladenosin
m6A	N6-Methyladenosin
m ⁶ ₆ A	N6,N6-Dimethyladenosin
m ² ₆ A	2,N6-Dimethyladenosin
MTA	5`-Deoxy-5`-thioadenosin
t6A	N6-Threonylcarbamoyladenosin
C	Cytidin
m5C	5-Methylcytidin
m3C	3-Methylcytidin
ac4C	N4-Acetylcytidin
G	Guanosin
m1G	1-Methylguanosin
m2G	N2-Methylguanosin
m7G	7-Methylguanosin
m ² ₂ G	N2,N2-Dimethylguanosin
m ² ₂ 7G	N2,N2,7-Trimethylguanosin
I	Inosin
m1I	1-Methylinosin
m7I	7-Methylinosin
U	Uridin
m3U	3-Methyluridin
m5U	5-Methyluridin
DHU	5,6-Dihydrouridin
Ψ	Pseudouridin
X	Xanthosin
PCNR	Ribosylpyridinoncarboxamid

1 Vorwort und Fragestellung

Die Identifizierung von Substanzen als Tumormarker bei Krebserkrankungen steht seit langem im Fokus der Forschung. Viele der etablierten Tumormarker in der klinischen Praxis sind dennoch nicht spezifisch und/oder sensitiv genug und korrelieren nur bei einem Bruchteil der untersuchten Fälle mit der Erkrankung. Andere Marker sind zur Überwachung einer Therapie geeignet, nicht aber für die Diagnose.

Modifizierte Nucleoside sind Endprodukte des RNA-Metabolismus und werden aufgrund des gesteigerten Stoffwechsels bei Tumorerkrankungen in erhöhten Konzentrationen im Urin ausgeschieden. Dieses Phänomen wurde in vielen Studien und bei verschiedenen Krebserkrankungen beobachtet und die modifizierten Nucleoside daher als Tumormarker vorgeschlagen. Die quantitative Messung im Urin wäre eine einfache, nicht-invasive Methode zur Diagnose, während die meisten anderen Marker im Biopsiegewebe oder Plasma gemessen werden müssen. Insbesondere bei Brustkrebs ist die Diagnose in frühen Stadien schwierig. Modifizierte Nucleoside könnten hier eine Alternative zu den etablierten Tumormarkern bieten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene massenspektrometrische Techniken angewendet werden, um modifizierte und unmodifizierte Nucleoside aus Proben biogenen Ursprungs zu charakterisieren und zu identifizieren. Dabei stand die Analytik von Nucleosiden aus Urinproben von Mammakarzinompatientinnen und aus Zellkulturüberständen von verschiedenen Brustkrebszelllinien im Vordergrund. Die Untersuchung der Zellkulturüberstände sollte Aufschluß über die von den Tumorzellen direkt ausgeschiedenen Nucleoside und deren Muster geben, während die

Ergebnisse der Urinanalytik sämtliche weitere Umwandlungen im Körper zwischen Bildung und Ausscheidung widerspiegeln.

Für die Analytik ergaben sich zwei Schwerpunkte:

- die Identifizierung von bisher unbekanntem Nucleosid-Modifikationen und deren Überprüfung auf ihr Potenzial als Tumormarker
- die Untersuchung des veränderten Nucleosid-Musters, d. h. des relativen Konzentrationsverhältnisses der einzelnen Nucleoside zueinander, als Folge der Erkrankung.

Bei den Experimenten sollten insbesondere Minorkomponenten untersucht und identifiziert werden. Diese sollten anschließend neben bekannten Nucleosiden und sonstigen unbekanntem Ribosylderivaten auf ihr Potenzial als Tumormarker untersucht werden. Dazu sollte eine Klassifizierungsstudie unter Einsatz von Methoden der Bioinformatik zur Unterscheidung von Brustkrebspatientinnen und gesunden Probandinnen auf Basis der Konzentrationsverhältnisse der Ribosylderivate im Urin durchgeführt werden.

2 Einleitung

2.1 Brustkrebs und Tumormarker

2.1.1 Auftreten von Brustkrebs

Etwa jede neunte Frau in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Im vergangenen Jahr betrug die Zahl der Erkrankungen rund 50000, während 18000 Patientinnen verstarben. Brustkrebs ist mit 25 % aller malignen Tumore die häufigste Krebserkrankung der Frau. In der Altersklasse zwischen 35 und 55 Jahren ist er die häufigste Todesursache.¹

Nur 5 % der Mammakarzinom-Erkrankungen sind auf Vererbung zurückzuführen. In diesen Fällen treten Mutationen verschiedener Gene auf, insbesondere der Breast Cancer Gene 1 und 2 (BRCA-1 und BRCA-2). Bei weiteren 10 % sind Häufungen in Familien zu beobachten, ohne dass eine Vererbung nachgewiesen werden kann.¹

Die Stadien bei Mammakarzinomen werden durch die so genannten TNM-Marker beschrieben. Die T-Klassifizierung gibt den Durchmesser des Primärtumors an. Der Befund T0 bedeutet: kein Tumornachweis. Die Tumorgöße wird in den Stadien T1 (Tumor kleiner als 2 cm), T2 (Tumor mit Durchmesser zwischen 2 und 5 cm), T3 (Tumor größer als 5 cm) und T4 (Tumor mit Ausdehnung auf benachbarte Organe) angegeben. Die N-Klassifizierung beschreibt den Befall der Lymphknoten und die M-Klassifizierung gibt an, ob bereits Metastasen im Körper diagnostiziert wurden.²

Obwohl Brustkrebs eine weit verbreitete Krankheit ist und die Diagnose- und Behandlungsmöglichkeiten im Fokus der Forschung liegen, gelten selbst bei optimaler Therapie nur ca. 36 % der Mammakarzinomfälle als geheilt, d.h. frei

von Metastasen.³ Es gibt nach wie vor keine verlässlichen Tumormarker für die Diagnose im frühen Stadium.⁴ Wird der Tumor frühzeitig erkannt, liegt die Heilungsrate bei über 90 %.¹

Auffällig ist die geographische Verteilung der Erkrankungszahlen. Während in Nordamerika und Westeuropa die höchsten Zahlen zu verzeichnen sind, erkranken in Afrika und Ostasien deutlich weniger Frauen. Dass in asiatischen Regionen sehr viel weniger Mammakarzinomfälle auftreten und auch die Sterblichkeit bei Erkrankungen niedriger liegt, könnte auf die unterschiedliche Ernährung und Umwelteinflüsse zurückgeführt werden.⁵

2.1.2 Risikofaktoren

Das Auftreten von Mammakarzinomen wird mit Faktoren wie körperlicher Aktivität, Ernährung, exogener Östrogenzufuhr, gutartigen Brusterkrankungen und Vererbung in Verbindung gebracht.⁶ Der größte Risikofaktor für ein Mammakarzinom ist das Alter. In Deutschland treten 80 % der Fälle nach dem 50. Lebensjahr auf, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren. Daneben wird bei früher erster Regelblutung, spät einsetzender Menopause (>54 Jahre), später Schwangerschaft oder Kinderlosigkeit ein erhöhtes Risiko für eine Erkrankung festgestellt.¹

2.1.3 Behandlungsmethoden und Vorsorge

Zu den etablierten Behandlungsmethoden des Mammakarzinoms und etwaiger Metastasen gehören die Operation, die Chemotherapie, die Hormontherapie, die Immuntherapie und die Strahlentherapie.⁷ Außerdem gibt es neue Ansätze, wie z.B. die stammzellgestützte Hochdosischemotherapie oder neoadjuvante Methoden.^{3;8}

Frauen mit vererbtem Brustkrebsrisiko wird ab dem 35. Lebensjahr eine Mammographie pro Jahr empfohlen. Weiterhin wird die monatliche Selbstuntersuchung der Brust, eine halbjährliche Tastuntersuchung beim Gynäkologen und eine jährliche Mammographie angeraten.¹

Da bei Mammakarzinomkrankungen sehr heterogene Krankheitsbilder auftreten, ist es schwierig, für jede Patientin die optimale Therapie zu wählen. Insbesondere bei Diagnose im fortgeschrittenen Stadium sind die Möglichkeiten zur erfolgreichen Therapie bisher begrenzt. Daraus folgt die Notwendigkeit der Entwicklung von Methoden zur Prävention und Früherkennung.

2.1.4 Tumormarker für Brustkrebs

Tumormarker sind Substanzen, die aufgrund einer Krebserkrankung in biologischen Medien in veränderten Konzentrationen auftreten und so auf die Erkrankung hinweisen. Die Bestimmung von Tumormarkern bei Brustkrebs bzw. Krebs allgemein hat mehrere Ziele:

- Abschätzung des Risikos für eine Erkrankung bei Vererbung
- Diagnose eines Tumors und Einteilung in benigne und maligne Erkrankungen sowie Ermittlung des Stadiums
- Prognose bei diagnostiziertem Tumor (Vorhersage von Rückfallwahrscheinlichkeit, Fortschreiten der Krankheit und Überlebenswahrscheinlichkeit)
- Überwachung der Therapie

Beim Mammakarzinom existieren diverse Tumormarker, die in verschiedene Kategorien eingeteilt werden können. Auf die modifizierten Nucleoside wird in diesem Zusammenhang in 2.2.2.4 eingegangen, daher wird im Folgenden kurz auf die übrigen Marker eingegangen.

2.1.4.1 Keimlinienmarker

Es gibt genetische Anzeichen für das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, die als Keimlinienmarker bezeichnet werden. Die wichtigsten Keimlinienmarker sind BRCA1 und BRCA2 (Breast Cancer Gene 1 und 2), deren Status – normal, mutiert oder deletiert – Patientinnen aus Hochrisikofamilien Aufschluss über das individuelle Risiko gibt. Bei diesen genetischen Anzeichen können spezielle Vorsorgemaßnahmen getroffen werden.⁹

2.1.4.2 Marker im Tumorgewebe

Daneben treten Marker wie HER-2, Estrogen- und Progesteronrezeptoren und Cathepsin D auf, die im Tumorgewebe selbst nachgewiesen werden können und das Vorhandensein desselben anzeigen.⁹

Bei 20 % bis 40 % aller Mammakarzinome wird eine Amplifikation von HER-2/neu bzw. die Überexpression des codierten Proteins beobachtet.¹⁰⁻¹² Diese Phänomene weisen teilweise auf Resistenzen gegen Therapien wie z.B. Chemotherapie, Radiotherapie oder endokrine Therapie hin oder deuten auf schlechtere Heilungschancen.¹³

Die Überexpression von ER α (Estrogenrezeptor α) wird bei Brustkrebs-erkrankungen zur Prognose herangezogen. Die Aussagekraft von ER β in diesem Zusammenhang ist noch nicht hinreichend geklärt.

Insbesondere bei Erkrankungen ohne Lymphknotenbefall konnte eine Korrelation zwischen erhöhten Cathepsin-D-Werten und der Entwicklung von Metastasen festgestellt werden.^{14;15} Cathepsin-D wurde aufgrund dieser Ergebnisse für den Einsatz als Prognosefaktor für Rückfall oder Tod vorgeschlagen.¹⁶

2.1.4.3 Zirkulierende Marker

Weiterhin gibt es die zirkulierenden Marker, die im Serum oder Plasma nachgewiesen werden können. Diese werden wiederum in verschiedene Untergruppen eingeteilt:

1. Tumor-assoziierte Antigene (TAAs), z.B. CEA, CA 15-3
2. Stimulierung oder Inhibition von Proliferation oder Angiogenese (wird durch biologische Essays nachgewiesen)
3. Antikörper als Antwort auf TAAs, z.B. Anti-p53
4. freie Tumorzellen oder DNA-Bruchstücke, die im Blut detektiert werden können

CEA

Das karzinoembryonale Antigen CEA (carcinoembronal antigen) ist ein membran-assoziiertes Glykoprotein, das zu 45-60 % aus Kohlenhydraten besteht. Adenokarzinome fast aller Organe exprimieren CEA.¹⁷ Das Expressionsmuster kann sowohl von Tumor zu Tumor als auch innerhalb eines Tumors sehr stark variieren. Verschiedene Typen von Mammakarzinomen weisen bezüglich CEA verschiedene Expressionsmuster auf. Etwa ein Drittel der lobulären und fast 90 % der duktaalen Karzinome exprimieren CEA.¹⁸

CA 15-3

CA 15-3 ist ein hochmolekulares Kohlenhydrat-Antigen der Milchfettkügelchen-Muzin-Familie, das mit Hilfe monoklonaler Antikörper detektiert werden kann. CA 15-3 findet sich vorwiegend in Mammakarzinomen, aber auch bei benignen Brustveränderungen und zu ca. 10-20 % in normalem Milchgangsepithel.¹⁹ Beim Mammakarzinom steigt die Inzidenz erhöhter Serumkonzentrationen in

Abhängigkeit vom klinischen Stadium von 20-40 % (Stadium I) auf 60-85 % (Stadium IV).

Eine Verwendung von CA 15-3 für Screening, Diagnose, Einstufung des Stadiums oder Beobachtung des Therapieverlaufs wird von der ASCO nicht empfohlen. Obwohl CA 15-3 mit fortschreitendem Stadium ansteigt, ist ausgehend vom Einzelwert keine Einstufung möglich. Insbesondere bei niedrigen Konzentrationen ist eine Beurteilung schwierig, da hier Metastasen nicht ausgeschlossen werden können.²⁰

2.1.4.4 Methoden zur Bestimmung der Zellproliferation

Die Zellteilungsrate eines Tumors (Proliferationsrate) ist ein wichtiger Parameter für die Erstellung von Prognosen bei Krebserkrankungen. Zu den Methoden für die Bestimmung der Zellproliferation zählen die DNA-Durchflußzytometrie, das Antigen Ki-67 und das Phosphoprotein Mitosin.

2.1.4.5 Modifizierte Nucleoside

Die modifizierten Nucleoside sind Endprodukte des RNA-Metabolismus. In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass ihre Konzentration im Urin bei Krebserkrankungen allgemein und Brustkrebspatientinnen im Speziellen gegenüber gesunden Personen erhöht ist. Auf die modifizierten Nucleoside, den RNA-Metabolismus und ihre Verwendung als Tumormarker wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

2.2 Nucleoside und RNA-Metabolismus

2.2.1 Modifizierte Nucleoside

Nucleoside sind die Bausteine der Nucleinsäuren (Ribonucleinsäure, RNA und Desoxyribonucleinsäure, DNA). Sie bestehen aus einer Purin- oder Pyrimidinbase, die über eine N-glycosidische Bindung an Ribose bzw. Desoxyribose geknüpft ist. Die Hauptnucleoside sind die vom Purin abgeleiteten Nucleoside Adenosin und Guanosin und die auf Pyrimidin basierenden Nucleoside Cytidin, Uridin (bei RNA) und Thymidin (bei DNA). Von diesen Nucleosiden leiten sich alle weiteren, teilweise stark modifizierten Nucleoside ab.

Bis zum heutigen Tag sind etwa 100 modifizierte Nucleoside bekannt, wobei das Ausmaß der Modifizierung in den verschiedenen RNA-Arten, wie z.B. transfer RNA (tRNA), messenger RNA (mRNA), ribosomale RNA (rRNA) und small nuclear RNA (snRNA), stark variiert.²¹ Unter den RNA-Arten ist die tRNA die am stärksten modifizierte. In ihr wurden 79 verschiedene Nucleoside nachgewiesen.²² In einigen Eukaryoten weisen bis zu 25 % der in der tRNA enthaltenen Nucleoside Modifikationen auf. Die Modifizierungen reichen von ein- oder mehrfacher Methylierung an Base oder Zucker über Isomerisierung, Reduktion, Thiolierung und Deaminierung bis hin zur Hypermodifikation mit komplexen Seitenketten. Eine Auswahl von Nucleosiden ist in Abbildung 1 gezeigt.

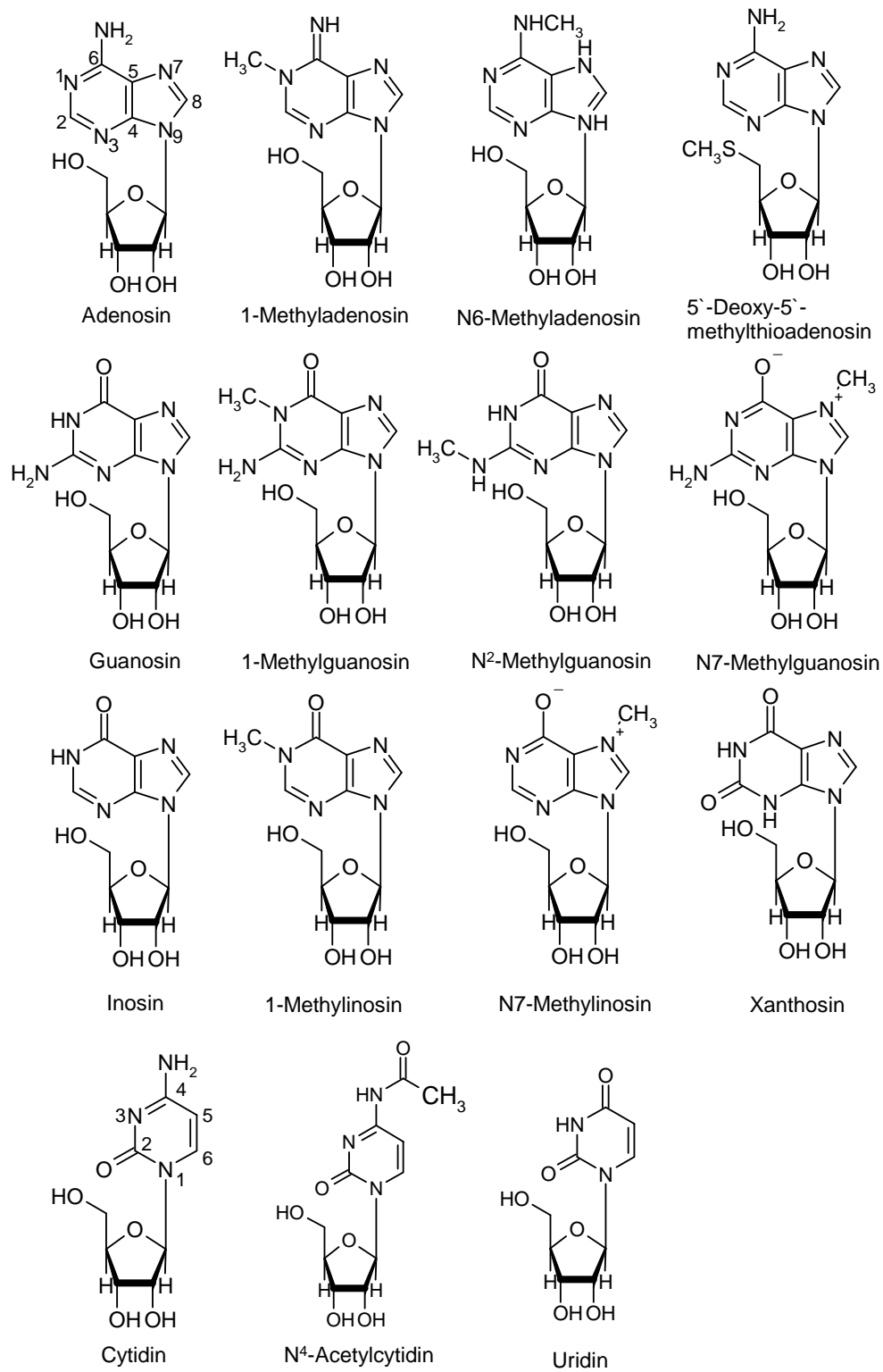


Abbildung 1: Strukturen einiger modifizierter und unmodifizierter Nucleoside

Die meisten der Modifikationen, insbesondere die Methylierungen, erfolgen posttranskriptional im Zellkern in der prä-RNA an den normalen Nucleosiden Adenosin, Guanosin, Uridin und Cytidin.²³ Dabei kommen hochspezifische Enzyme zum Einsatz, die häufig eine Ortsspezifität aufweisen. So wird Uridin an unterschiedlichen Positionen in der tRNA durch verschiedene Enzyme in Pseudouridin überführt.^{24;25}

Bereits 1987 wurde das Ausmaß der Aktivität der modifizierenden Enzyme mit verschiedenen Faktoren wie der dreidimensionalen Struktur der tRNA oder der Nucleotidsequenz in der Umgebung des zu modifizierenden Nucleotids in Verbindung gebracht.²⁶

Bisher wurde nur eine geringe Anzahl von RNA-modifizierenden Enzymen isoliert und charakterisiert, allerdings nur selten aus humanen Zellen, häufiger aus Ratten, Mäusen, *Saccharomyces Cerevisiae* oder *E. Coli*. Bei den meisten der identifizierten Enzyme handelt es sich um hochspezifische RNA-Nucleosid-Methyltransferasen. Als Beispiel sei die in humanen Zellen identifizierte tRNA-(Cytosin-5)-methyltransferase genannt, die die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf das C5-Atom des an Position 48 oder 49 in der tRNA lokalisierten Cytosins katalysiert. Hier zeigt sich eine hohe Ortsspezifität.²⁷ Die tRNA-(Cytosin-5)-methyltransferase war bis 1998 das einzige aus humanen Zellen isolierte und charakterisierte modifizierende Enzym der tRNA. Es wurde gezeigt, dass es nicht nur humane tRNA, sondern auch verschiedene andere RNAs, u.a. von *E. Coli* und Hefe, methylieren kann. Ein Bruchstück eines dieser Substrate, das die entsprechende Methylierungsposition enthielt, wurde nicht methyliert. Daraus wurde geschlossen, dass die dreidimensionale Struktur der gesamten tRNA eine Rolle bei der Erkennung des Substrates spielt.²⁸

Bei Desaminierungen, Isomerisierungen oder Alkylierungen handelt es sich um weitere einfache Modifikationen, die durch die Beteiligung von höchstens zwei Enzymen entstehen. Bei komplexeren Modifikationen werden Multi-Enzym-Reaktionen beobachtet, oder es werden andere biosynthetische Vorstufen

einbezogen. Zu diesen modifizierten Nucleosiden zählen Queosin und Archaeosin.²⁷

Die bis 1998 in humanen Zellen identifizierten und charakterisierten RNA-modifizierenden Enzyme sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: In humanen Zellen identifizierte RNA-modifizierende Enzyme²⁷

Enzym	Substrat
tRNA (Cytosin-5-)-methyltransferase	tRNA-48/49
mRNA (Guanin-7-)-methyltransferase	mRNA
mRNA (2'-O-)-methyltransferase	mRNA
mRNA (adenosin-N ⁶ -)-methyltransferase	mRNA
Doppelstrang-RNA Adenosin Desaminase	RNA

2002 identifizierten Ching et al. in humanen Zellen das Gen einer potentiellen RNA Methyltransferase, das starke Homologien mit einer in E. Coli identifizierten Uridin-2'-O-Methyltransferase aufweist.²⁹ Wie hier beschäftigen sich die meisten Arbeitsgruppen in diesem Forschungsbereich mit der Identifizierung der Gene für modifizierende Enzyme, nicht aber mit der Struktur der Enzyme selbst.

Modifizierte Nucleoside spielen eine wichtige Rolle für die RNA-Aktivität. Je nach Position in der RNA beeinflussen sie die Translation. Modifikationen in Nachbarschaft zur 3'-Region des Anticodons wirken sich auf die Effizienz und Präzision des Translationsprozesses aus und sorgen für die Erhaltung des Leserasters. An Position 34, dem Nucleotid an der 5'-Seite des Anticodons, treten häufig Modifikationen auf, die einen Einfluss auf die Bindung der tRNA an das Codon der mRNA und die Präzision des Translationsprozesses haben.

Modifikationen außerhalb des Anticodonbereichs tragen zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur der tRNA bei.²⁶

In einer jüngeren Publikation wurde die Isolierung und Charakterisierung von MTU1 (Mitochondriale tRNA-spezifische 2-Thiouridylase 1) in humanen HeLa-Zellen beschrieben.³⁰ Dieses Enzym katalysiert die 2-Thiolierung des 5-Taurinomethyl-2-uridins innerhalb der mitochondrialen tRNA^{Lys}. Wird das MTU1-Gen inaktiviert, nimmt die mitochondriale Aktivität ab.³⁰ Dieses Ergebnis zeigt, wie wichtig einige RNA-Modifikationen für die Funktion von Zellen sind.

2.2.2 tRNA- und Nucleosidmetabolismus

2.2.2.1 De-novo-Synthese von Nucleotiden

Die Synthese der Purinnucleotide beginnt mit der de-novo-Synthese von Inosin-5`-monophosphat (IMP), ausgehend von Glutamin. Aus IMP werden die anderen Purinnucleosidphosphate Xanthosin-5`-monophosphat (XMP), Adenosin-5`-monophosphat (AMP) und Guanosin-5`-monophosphat (GMP) gebildet.³¹ Anschließend erfolgt die weitere Phosphorylierung der Nucleotide bis zu den entsprechenden Triphosphaten. Diese werden zur RNA-Synthese eingesetzt.

Bei den Pyrimidinen ist die de-novo-Synthese von UMP, ebenfalls ausgehend von Glutamin, der erste Schritt. Diesem folgt die Bildung von Cytidin-5`-monophosphat (CMP). Kinasen setzen die Nucleosid-Monophosphate zu den Triphosphaten um, die in die RNA-Synthese eingehen.

2.2.2.2 tRNA und Proteinbiosynthese

Die tRNA ist eine Ribonucleinsäure, die aus etwa 80 Nucleotiden besteht. Sie vermittelt bei der Proteinsynthese die richtige Aminosäure zum entsprechenden Codon auf der mRNA. Im tRNA-Molekül treten einige Paarungen von

konjugierten Basen auf, wobei Adenin und Uracil bzw. Cytosin und Guanin durch Wasserstoffbrücken-Bindungen verbunden werden. Durch diese Paarungen entsteht die charakteristische Kleeblattstruktur der tRNA, wie schematisch in Abbildung 2 gezeigt. Die tatsächliche dreidimensionale Struktur ist eher einem L ähnlich, wie in Abbildung 3 zu sehen.

Die Proteinbiosynthese besteht im Wesentlichen aus zwei Schritten: der Transkription und der Translation.

Im ersten Schritt wird die Information der DNA über den Aufbau eines Proteins im Zellkern auf die mRNA übertragen. Die tRNA hat die Aufgabe, die entsprechenden Aminosäuren aus dem Cytosol zur mRNA an den Ribosomen zu transportieren, wo das codierte Protein gebildet wird. Die Sequenz einer tRNA gibt vor, mit welcher Aminosäure sie beladen wird, um anschließend an den Ribosomen bei der Proteinbiosynthese die entsprechende Aminosäure zu liefern. Das Anticodon am unteren Ende der Anticodonschleife lagert sich an die messenger RNA (mRNA) an. Die Zuordnung der Basenfolge des Codons zu den codierten Aminosäuren nennt man den genetischen Code. Er wird in 5`-3`-Richtung der mRNA-Sequenz gelesen. Eine Darstellung zur Entschlüsselung des genetischen Codes ist in Abbildung 4 gezeigt.

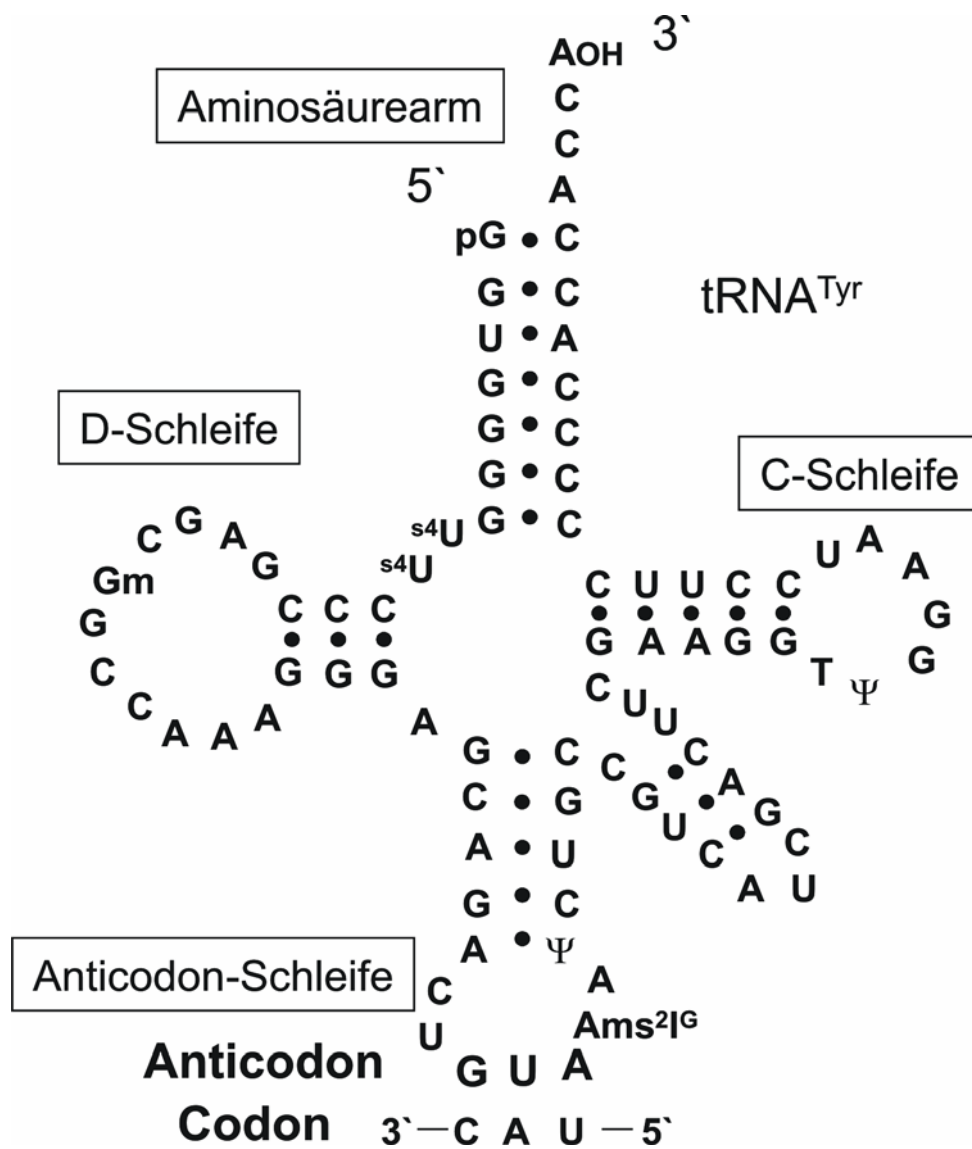


Abbildung 2: Tyrosin-tRNA schematisch mit Codon einer mRNA

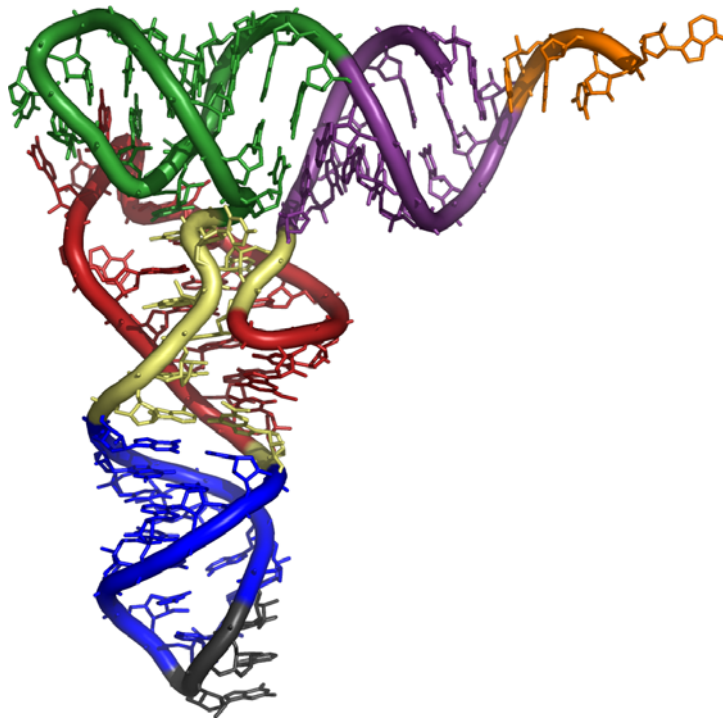


Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der tRNA (violett: Aminosäurearm, grün: C-Schleife, rot: D-Schleife, blau: Anticodonschleife, grau: Anticodon)Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/tRNA>

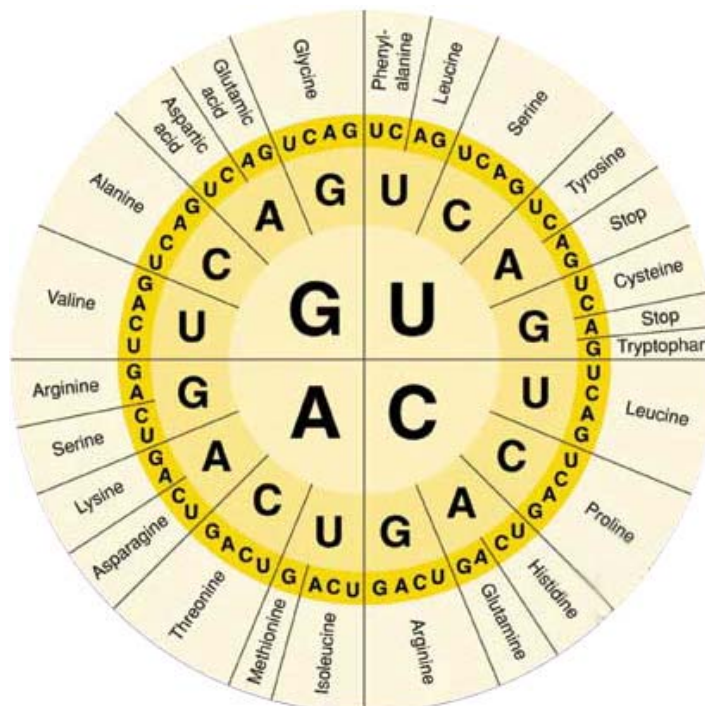


Abbildung 4: Der genetische Code, Quelle: <http://www.biology.lsu.edu>

2.2.2.3 Abbau der tRNA und Ausscheidung von Nucleosiden

Nach der Proteinsynthese an den Ribosomen werden die beteiligten RNA-Arten wieder abgebaut. Zunächst werden sie durch Endonucleasen zu Oligonucleotiden, dann durch Phosphodiesterasen zu Nucleosiden und schließlich unter Katalyse von Phosphorylasen und Abspaltung von Ribose-1-phosphat zu den Basen abgebaut. Diese können wieder zum Aufbau von neuer RNA recycelt werden.³² Dazu ist anzumerken, dass für die beim Abbau der RNA entstehenden modifizierten Nucleoside keine spezifischen Phosphorylasen existieren und diese daher quantitativ ausgeschieden werden. Die unmodifizierten Nucleoside werden zu den Basen abgebaut. Adenosin wird in Inosin überführt, Inosin und Guanosin in die Basen Hypoxanthin und Guanin. Aus beiden wird unter Abspaltung von Ammoniak bzw. Wasserstoffperoxid Xanthin gebildet, das im Weiteren zu Harnsäure umgesetzt wird. Diese wird in den Blutkreislauf eingeschleust und über die Nieren aus dem Körper ausgeschieden.³³

Bei den Pyrimidinen wird Cytidin zunächst in Uridin umgewandelt, welches unter Abspaltung von Ribose-1-phosphat zur Uracilbase abgebaut wird. Uracil wird über mehrere Stufen zu β -Alanin abgebaut, das schließlich in Ammonium und Kohlendioxid gespalten wird. Ammonium wird in Harnstoff umgewandelt, der aus den Zellen in den Blutkreislauf transportiert und schließlich über die Nieren aus dem Körper ausgeschieden wird.³³

Die modifizierten Nucleoside werden durch spezifische Transportproteine in der Plasmamembran aus den Zellen in den Blutkreislauf abgegeben.³⁴ Hydrophile Stoffe wie Nucleoside passieren die Leber weitgehend unverändert, da sie die lipophile Barriere der Leberzellmembran nicht bzw. nur sehr langsam überwinden können. Es folgt eine rasche renale Eliminierung.³⁵

Abbildung 5 zeigt einen Überblick über den tRNA-Metabolismus.

Da die modifizierten Nucleoside weitgehend quantitativ im Urin ausgeschieden werden, kann ihre Konzentration zur Abschätzung des RNA-Metabolismus im Körper herangezogen werden.³⁶⁻³⁸ Der RNA-Umsatz ist bei erwachsenen

Menschen konstant, wobei weder Unterschiede zwischen verschiedenen Altersklassen noch zwischen Männern und Frauen zu erkennen sind.³⁹⁻⁴² Dagegen fällt der RNA-Umsatz bei Kindern bis zum Alter von 16 Jahren wesentlich höher aus.^{42;43}

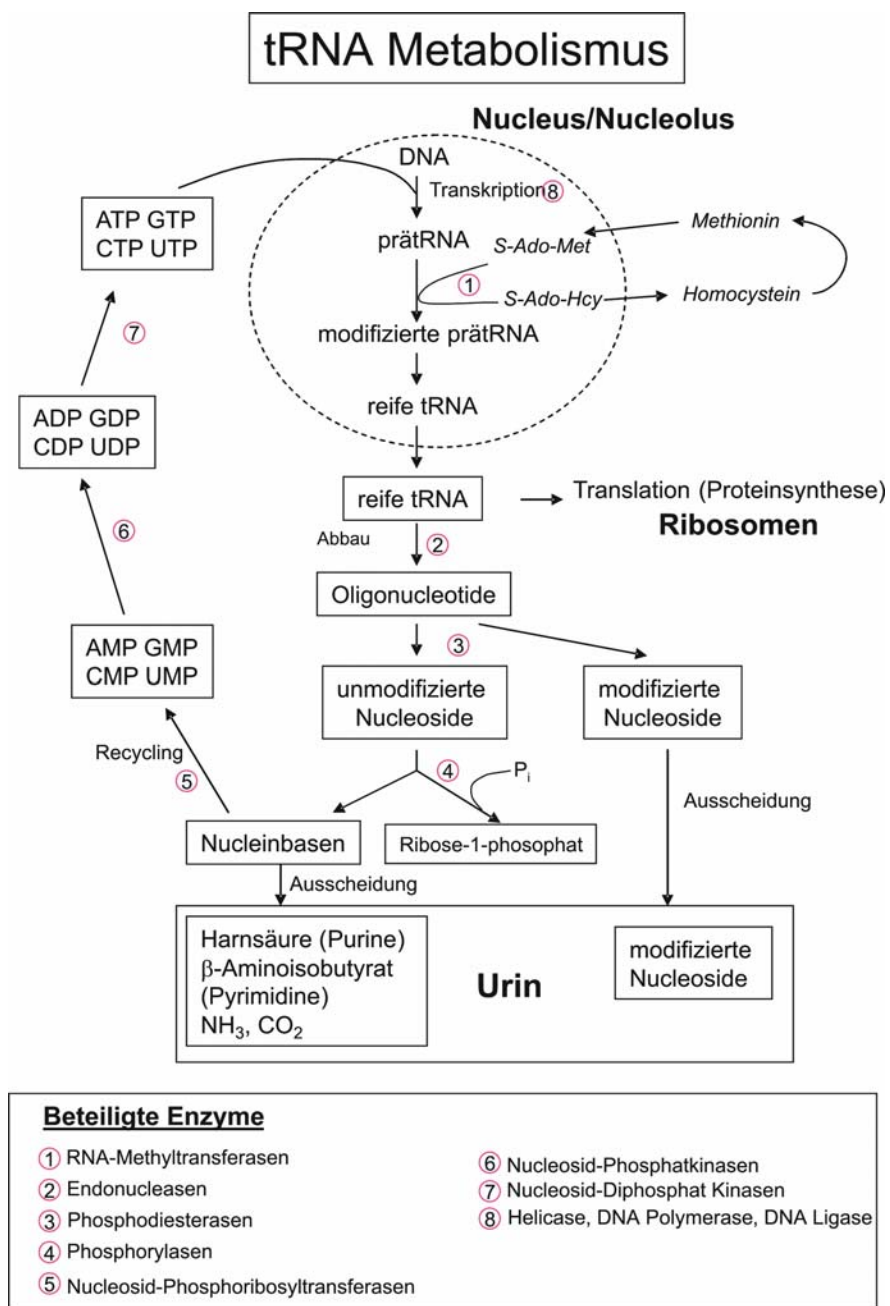


Abbildung 5: Überblick über den tRNA-Metabolismus

2.2.2.4 Nucleoside aus Urin als Tumormarker

In humanem Urin sind bis jetzt mehr als 50 verschiedene modifizierte Nucleoside nachgewiesen worden.⁴⁴ Bei Krebspatienten wurden einige von ihnen in höheren Konzentrationen nachgewiesen als bei gesunden Probanden. Diese Veränderungen sind auf den erhöhten Stoffwechsel in Tumorgewebe und damit höheren RNA-Metabolismus zurückzuführen.⁴⁵ Insbesondere die tRNA spielt hier eine große Rolle, da sie den höchsten Anteil an Modifikationen unter den RNA-Arten aufweist. Darüber hinaus ist ihr Umsatz bei der Proteinsynthese sehr hoch, da hier für ein Codon innerhalb der mRNA-Sequenz ein ganzes tRNA-Molekül steht, das aus ca. 80 Nucleotiden besteht.

Die erhöhte Ausscheidung von verschiedenen modifizierten Nucleosiden im Urin wurde in verschiedenen Studien insbesondere bei Brustkrebs⁴⁶⁻⁵⁰, Lungenkazinomen⁵¹⁻⁵³ und Leukämie⁵⁴⁻⁵⁶ nachgewiesen. Diese Beobachtungen lassen auf das Potenzial modifizierter Nucleoside als Tumormarker schließen.⁵⁷

Eignung von Methoden für eine Klassifizierung

Die Eignung von Substanzen als Tumormarker kann durch Angabe der Sensitivität und die Spezifität der Methode abgeschätzt und verglichen werden. Die Sensitivität ist definiert als Anteil der richtig positiven Untersuchungsergebnisse geteilt durch die Gesamtzahl der Probanden mit der Erkrankung. Die Spezifität ist der Anteil der richtig negativen Untersuchungsergebnisse geteilt durch die Gesamtzahl der Probanden ohne die Erkrankung.

Im Idealfall liegen die Verteilungen der jeweiligen Werte in getrennten Bereichen, wie in Abbildung 6 zu sehen. Es wird ein „Cut-Off-Wert“ definiert, der die Grenze zwischen den zu klassifizierenden Gruppen, hier gesund und krank, darstellt. Alle Proben, deren Werte unterhalb des Cut-Offs liegen, werden richtig als gesund eingestuft, die Spezifität liegt bei 100 %. Die Proben mit Werten

oberhalb des Cut-Offs sind die als krank eingestuft, die Sensitivität beträgt 100 %.

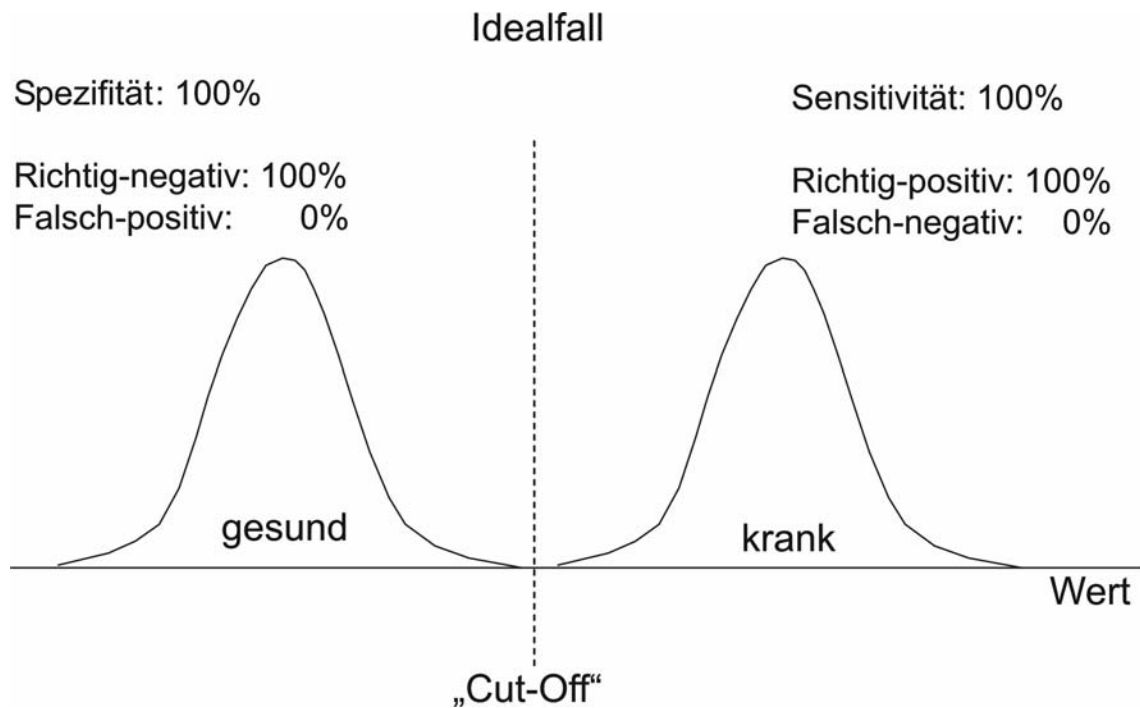


Abbildung 6: Idealfall bei Tumormarkern (Abbildung nach Fateh-Moghadam und Stieber⁵⁸⁾)

In der Realität ist gewöhnlich jedoch keine solche Trennung möglich. Der Realfall stellt sich eher wie in Abbildung 7 zu sehen dar. Die Verteilungsbereiche der gesunden und kranken Proben überschneiden sich. Wird nun dennoch ein Cut-Off-Wert gewählt, kommt es zu falsch-positiven und/oder falsch-negativen Zuordnungen. Wird eine Spezifität von 100 % gewählt, damit alle Kontrollproben als solche erkannt werden, ergibt sich daraus eine geringere Sensitivität. Umgekehrt sinkt die Spezifität, wenn alle kranken Proben richtig erkannt werden, d.h. es wird ein großer Teil der gesunden Patienten als krank eingestuft.

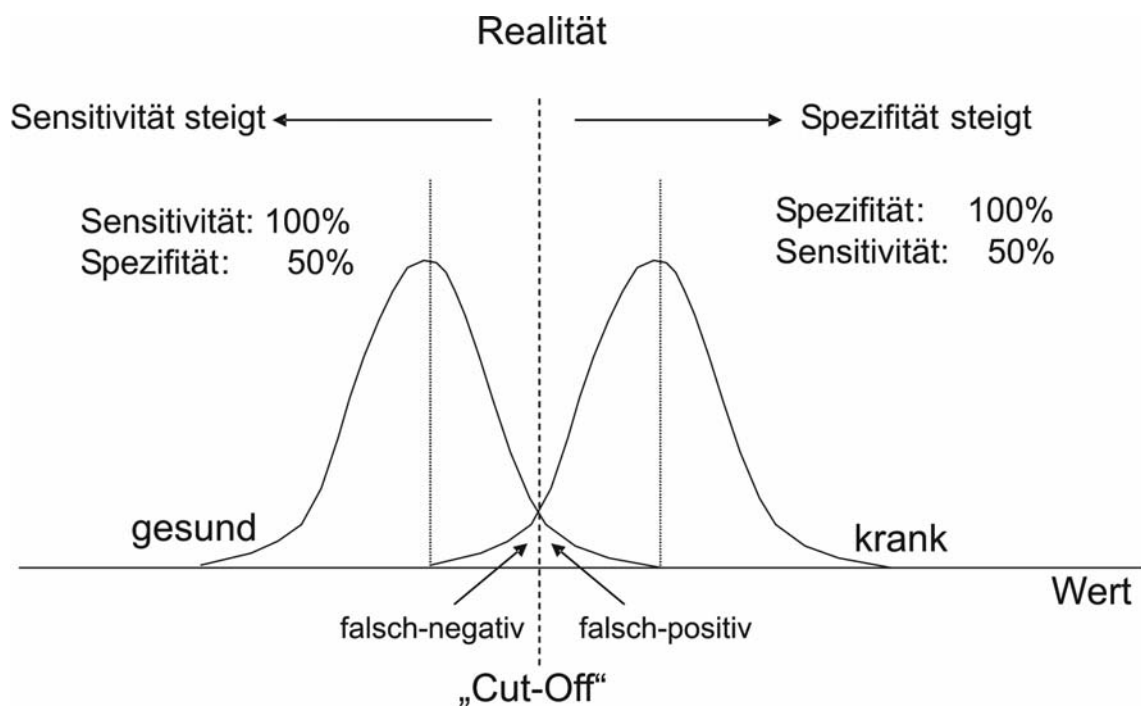


Abbildung 7: Beispiel für einen Realfall bei Tumormarkern (Abbildung modifiziert nach Fateh-Moghadam und Stieber)⁵⁸

Die Abhängigkeit der Spezifität und der Sensitivität voneinander kann in sogenannten ROC-Kurven (Receiver Operator Characteristic) graphisch dargestellt werden, wie in Abbildung 8 beispielhaft gezeigt. Je weiter sich die Kurve dem linken oberen Bereich annähert, desto verlässlicher ist der jeweilige Test für eine Klassifizierung. Bei Annäherung an die gestrichelte Linie nimmt die Nützlichkeit ab.⁵⁹

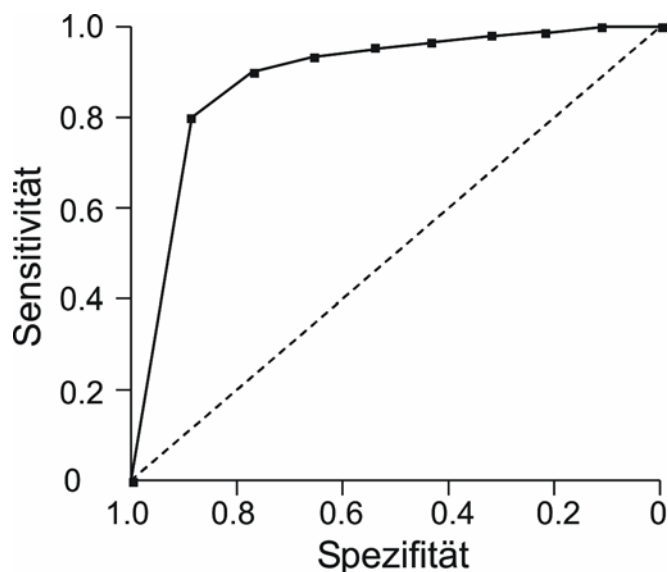


Abbildung 8: Beispiel für die graphische Darstellung der Abhängigkeit von Sensitivität und Selektivität

Meist wird eine Spezifität von 95 % gewählt, um nur wenige falsch-positive Ergebnisse zu erhalten. Allerdings sinkt damit die Sensitivität.

Überblick über bisherige Arbeiten zur Klassifizierung

In verschiedenen Studien wurden bioinformatische Methoden angewendet, um Patienten aufgrund von analytischen Daten zu klassifizieren.

In der Literatur wird für eine Gruppe von Mammakarzinompatientinnen in den Stadien T1 und T2, ausgehend von den Werten des Markers CA 15-3, eine Sensitivität zwischen 14 und 23 % bei einer Spezifität von 95 % angegeben.⁶⁰ Dies lässt auf die mangelnde Eignung dieses Parameters zur Diagnose schließen.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde ein neuronales Netz zur Klassifizierung von Brustkrebspatientinnen und Kontrollproben nach Quantifizierung von 16 Nucleosiden mittels HPLC-UV verwendet.⁶¹ In den Proben dieser Studie wurden außerdem die Marker CA 15-3 und CEA bestimmt. Selbst bei

Kombination beider Marker wurde nur eine Sensitivität von 14.5 % erreicht, d.h. nur 14.5 % der erkrankten Personen wurden als solche erkannt. Die Spezifität war hierbei nicht bekannt. Dies zeigt, dass diese Methode ungeeignet für die Diagnose von Brustkrebs ist.

Bei Betrachtung der einzelnen Nucleosidkonzentrationen und Vergleich der beiden Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test konnte für fünf der untersuchten Nucleoside (Pseudouridin, Inosin, 1-Methylinosin, Guanosin und 3-Methyluridin) eine signifikante Erhöhung bei der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen festgestellt werden. Die ermittelten Sensitivitäten bei einer Spezifität von 95 % liegen jedoch bei diesen Nucleosiden nur zwischen 7 und 37 %. Bei einer geringeren Spezifität von ca. 83 % bewegen sich die Sensitivitäten zwischen 22 und 67 %.

Bei Auswertung mit dem neuronalen Netz ergaben sich eine Spezifität von 83.4 % und eine Sensitivität von 73.5 %. Dieses Ergebnis ist eine Steigerung gegenüber den bekannten Markern CA 15-3 und CEA sowie dem Ergebnis bei Betrachtung der einzelnen Nucleoside. Allerdings ist das Ergebnis nicht ausreichend, um eine routinemäßige Anwendung zuzulassen.

Yang et al. bezogen 113 aus Urin isolierte cis-Diole in eine Auswertung mittels Hauptkomponentenanalyse ein.⁶² Dabei wurden Urinproben von gesunden Kontrollpersonen und Proben von Patienten mit Leberkrebs, Hepatitis oder Leberzirrhose mittels HPLC-UV untersucht und eine Klassifizierung vorgenommen. Ausgehend von 15 Nucleosiden wurden 83 % der Leberkrebs-Patienten richtig identifiziert. Für die bekannten Marker für diese Erkrankung ergaben sich Sensitivitäten zwischen 6 und 73 %. Ausgehend von allen 113 Komponenten erfolgten durch eine auf zwei Hauptkomponenten basierende Hauptkomponentenanalyse weniger falsch-positive Zuordnungen als bei Anwendung des Leberkrebs-Markers AFP.

2.3 Analytische Methoden zur Untersuchung von Nucleosiden

Für die Quantifizierung modifizierter Nucleoside im Urin wurden verschiedene Methoden entwickelt. Die Extraktion erfolgte immer durch Affinitätschromatographie an Phenylboronsäuregel, welches Uziel et al. entwickelten, um spezifisch cis-Diol-Strukturen zu isolieren.⁶³

Gehrke et al. etablierten eine analytische Methode zur Trennung von Nucleosiden mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und UV-Detektion.⁶⁴ Liebich et al. entwickelten diese weiter⁴⁰ und beschrieben daneben eine Methode mit Kapillarelektrophorese.⁶⁵

In den letzten Jahren wurden zusätzlich zur UV-Detektion massenspektrometrische Detektionsverfahren eingesetzt, wie ESI-ITMS (Ionenfallen-MS)^{66;67}, ESI Tandem MS⁶⁸ und Fast Atom Bombardment (FAB)⁶⁹.

ESI ist die am weitesten verbreitete Ionisierungstechnik, da sie die Möglichkeit bietet, an eine HPLC gekoppelt zu werden. Dies ist mit anderen Ionisierungstechniken wie MALDI, EI, CI oder FAB nur eingeschränkt möglich. Daneben erfolgt durch ESI eine sanfte Ionisierung, während bei anderen Methoden eine komplexe Fragmentierung erfolgt, die häufig schwer zu kontrollieren ist. Bei der Ionenfalle kann die Fragmentierung durch Optimierung der Ionisierungsparameter präzise gesteuert und an bestimmte Substanzklassen angepasst werden. Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Ionisierungstechniken ist die Möglichkeit, in der Gasphase Quasimolekularionen zu erzeugen.

Bei MALDI und FAB werden Matrices verwendet, deren Ionen und Fragmente auch in den Spektren auftreten. Wird im Massenbereich dieser Ionen gemessen, müssen diese berücksichtigt werden.

Ein Ionenfallen-Massenspektrometer hat gegenüber einem Triple-Quadrupol außerdem den Vorteil, dass MS^n -Experimente durchgeführt werden können, während der Triple-Quadrupol auf MS/MS-Spektren beschränkt ist.

Auf die verwendeten Methoden und deren Anwendung bei der Untersuchung von Nucleosiden wird in den einzelnen Kapiteln näher eingegangen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung einer MS-kompatiblen HPLC-Methode zur Trennung von Nucleosiden

3.1.1 Überblick über bisher publizierte HPLC-Methoden zur Trennung von Nucleosiden

Bereits in den Jahren 1967 bis 1974 wurden Nucleoside, Nucleinbasen und Mononucleotide durch Kationen- und Anionenaustausch-Chromatographie mit UV-Detektion getrennt.⁷⁰⁻⁷³

1978 entwickelten Gehrke et al. eine HPLC-Trennung von Nucleosiden aus biologischen Materialien. Auf einer C18-Säule wurden 24 Nucleoside mit einem Elutionsmittel aus 6 % Methanol in 0.01 % Ammoniumdihydrogenphosphat (pH 7.0) getrennt. Die Detektion erfolgte bei 254 nm.⁷⁴ Die Extrahierung der Nucleoside aus dem untersuchten Urin erfolgte hier unter Verwendung eines Boronat-Affinitäts-Gels, das nach einer modifizierten Methode nach Uziel et al. synthetisiert wurde. An diesem Gel werden die Nucleoside unter alkalischen Bedingungen (pH 8-9) über ihre cis-Diol-Funktion an der Ribose reversibel an die Boronsäure gebunden. Nach Waschsritten zur Entfernung anderer Substanzen, wie z.B. Salzen, werden die Nucleoside im Sauren eluiert.⁶³ Das Prinzip der Affinitätschromatographie ist in Abbildung 9 gezeigt. Zu beachten ist hierbei, dass nur solche Nucleoside erfasst werden, die über freie OH-Funktionen in 2` und 3`-Position verfügen. Desoxyribose kann z.B. aufgrund der fehlenden cis-Diolgruppe nicht gebunden werden.

In der gleichen Arbeitsgruppe wurde die Methode 1979 weiterentwickelt und auf die Trennung von Nucleosiden aus tRNA-Hydrolysaten angepasst.⁷⁵

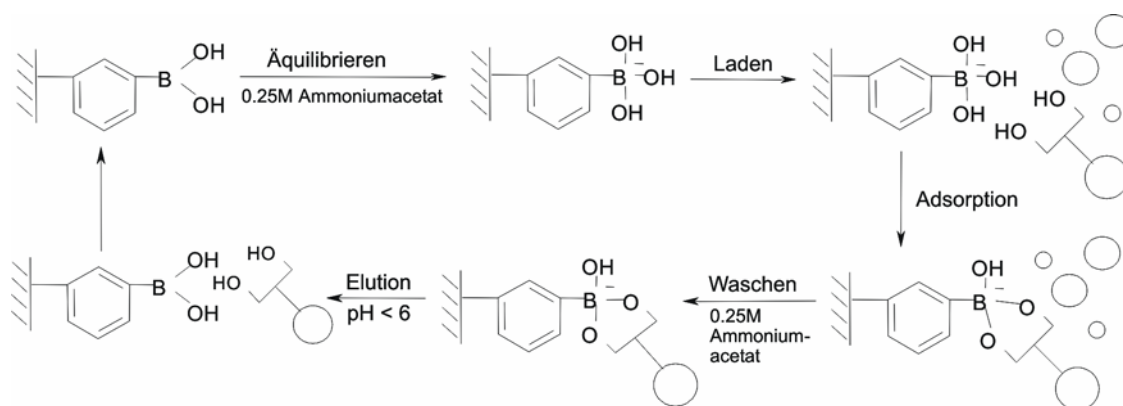


Abbildung 9: Prinzip der Affinitätschromatographie an Phenylboronsäure zur Isolierung von cis-Diolen

Liebich et al. stellten 1997 eine HPLC-UV-Methode (Detektion bei 260 nm) zur Quantifizierung von Nucleosiden aus Urin vor, mit der 16 Nucleoside erfasst wurden. Als Lösungsmittel diente ein Gradient aus 25 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer und Methanol-Wasser (3/2). Die Extraktion der Nucleoside aus Urin erfolgte auch hier an Phenylboronsäuregel.^{40;76} Der Nachteil dieser Methode besteht in der UV-Detektion, da insbesondere Minorkomponenten, die mit anderen Komponenten koeluieren, nicht erfasst werden.

In dieser Arbeit wurde ausgehend von der von Liebich et al. etablierten Methode eine HPLC-Methode entwickelt, die auch für die Anwendung mit massenspektrometrischer Detektion geeignet ist. Bei der massenspektrometrischen Detektion sind Kationen wie Natrium und Kalium zu vermeiden, da bei deren Anwesenheit eine erhebliche, nicht reproduzierbare Adduktbildung auftritt.

Esmans et al. berichten über zahlreiche Methoden zur Bestimmung von Nucleosiden mittels Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion nach Elektrospray-Ionisierung. Bei diesen Methoden wurde meist Ammoniumacetat eingesetzt, um eine Natrium- oder Kaliumadduktbildung zu verhindern.⁶⁹

Ito et al. etablierten eine Methode zum Screening von Störungen im Purin- oder Pyrimidin-Stoffwechsel mittels LC-ESI Tandem-MS, wobei die Trennung von Nucleinbasen und Nucleosiden vor der massenspektrometrischen Detektion auf einer C18-Säule und einem Gradienten aus Ammoniumformiatpuffer (pH 5.0) und Methanol erfolgte.⁷⁷

Dudley et al. entwickelten eine Methode zur Trennung von Nucleosiden aus Urin auf einer C18-Säule mit anschließender massenspektrometrischer Detektion mittels Ionenfalle. Auch hier wurde ein Gradient aus Ammoniumacetat (pH 5.0) und Methanol als Eluent verwendet.^{66;68}

3.1.2 Methodenoptimierung

3.1.2.1 Standardlösung

Für die Methodenoptimierung wurde eine Nucleosidstandardlösung der in Tabelle 2 genannten Zusammensetzung gewählt. Zum Vergleich sind die von Lieich et al. mit HPLC-UV ermittelten mittleren Konzentrationen der Nucleoside in Urinproben von 29 gesunden Probanden angegeben. Die Standardlösung spiegelt in etwa die realen Verhältnisse der Nucleoside in humanem Urin wider. Ausgenommen sind 6-Methyladenosin, welches in Urin als Minorkomponente vorkommt, und 1-Methylinosin, welches in Urin in wesentlich höheren Konzentrationen enthalten ist.

3.1.2.2 Anpassung der bestehenden Methode an die Kopplung mit MS-Geräten

Ausgehend von der von Liebich et al. etablierten Methode wurde eine an die zusätzliche massenspektrometrische Detektion angepasste Methode entwickelt. Dazu wurden die folgenden Änderungen und Optimierungen vorgenommen:

1. Säule

Die bisherige Methode basiert auf einer Trennung auf einer LiChroCART Lichrospher[®] Säule (RP 18 e, 4.6x250 mm, 5 µm Korngröße, Merck) bei einem

Fluss von 1 mL/min. Dieser Fluss ist zu hoch, um direkt in die Ionenfalle eingeleitet zu werden. Eine Möglichkeit wäre, den Fluss vor der Ionenfalle zu splitten und nur einen Bruchteil einzuleiten. Um einen daraus folgenden Verlust von Probensubstanz zu vermeiden, wurde eine Säule mit geringerem Durchmesser bei einem Fluss von 125 $\mu\text{L}/\text{min}$ benutzt (LiChroCART Superspher[®] 100 RP 18 e, 2x125 mm, 4 μm Korngröße, Merck). Mit dieser Säule und bei geringem Fluss kann das gesamte Eluat direkt in die Ionenfalle geleitet werden.

Tabelle 2: Zusammensetzung des zur Optimierung verwendeten Nucleosidstandards, zum Vergleich angegeben: mittlere Konzentrationen in Urin von gesunden Probandinnen nach ⁷⁶

Nucleosid	C [nmol/ mL]	C [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	C in Urin⁷⁶ [nmol/μmol Creatinin]
Cytidin	4.05	0.99	0.07
Uridin	8.2	2.01	0.21
Guanosin	4.05	1.15	0.06
Adenosin	17.1	4.59	0.21
Inosin	16.3	4.39	0.30
Xanthosin	16.15	4.61	0.59
m5U	15.95	4.14	n.u.
m3U	8.3	2.15	0.11
m1I	4.05	1.15	1.13
m1G	16.0	4.77	0.74
m2G	4.35	1.30	n.u.
m6A	16.45	4.64	n.u.
m1A	83.7	23.61	2.19
Pseudouridin	638.8	156.57	25.52
MTA	9.1	2.72	0.12
DHU	170.8	42.05	6.37
Isoguanosin (IS)	125	35.41	-

2. Ammoniumformiatpuffer statt Kaliumdihydrogenphosphat

Um eine HPLC-Methode zu entwickeln, die auch gekoppelt mit massenspektrometrischen Detektionsverfahren anwendbar ist, wurde die von Liebich et al. verwendete KH_2PO_4 -Lösung durch Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5.0) ersetzt, um eine Kaliumadduktbildung zu vermeiden. Der Gradient wurde für die optimale Trennung der Nucleoside angepasst wie in der folgenden Zusammenfassung der Methode gezeigt.

3.1.2.3 Zusammenfassung

Die optimierte HPLC-Methode für die massenspektrometrischen Detektion ist im Folgenden dargestellt:

Gerät: HPLC UV: Chemstation 1100 (Hochdruckgradientenpumpe, Degaser, Autosampler, PDA-Detektor), Agilent (Waldbronn)

Säule: Merck LiChroCART Superspher[®] 100 RP 18 e, 2x125 mm, 4 μm
mit Vorsäule (LiChroCART Superspher[®] 100 RP 18 e, 2x10 4 μm)

Flussrate: 125 $\mu\text{L}/\text{min}$

Detektion: UV, 210 und 260 nm

Temperatur: 30 °C

Eluent: Gradient aus 5 mM Ammoniumformiatpuffer und MeOH/H₂O (3/2, v/v), 0.1 % FA wie in Tabelle 3 angegeben

Tabelle 3: Optimierter Gradient für die HPLC-Trennung

Zeit [min]	Ammoniumformiatpuffer 5 mM, pH 5 [%]	MeOH/H ₂ O <small>bidest.</small> (3/2, v/v), 0.1 % FA [%]
0	100	0
30	85	15
40	40	60
50	100	0
55	100	0

Ein Nucleosid-Standardchromatogramm bei Anwendung der optimierten Methode ist in Abbildung 10 gezeigt.

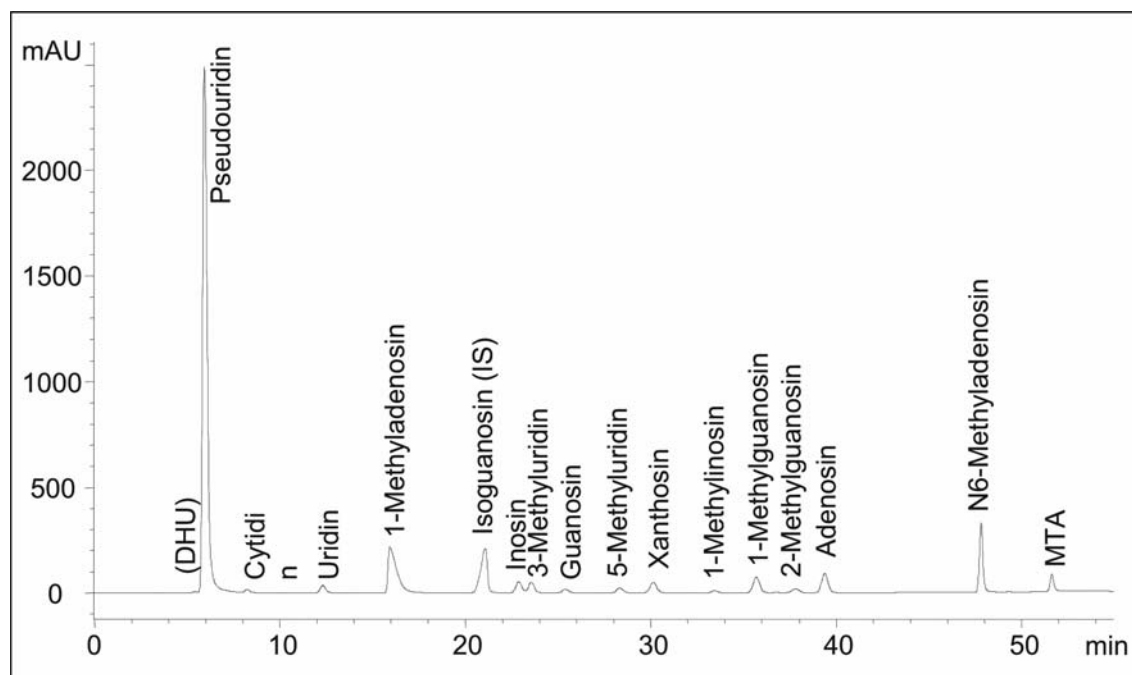


Abbildung 10: Standard-HPLC-Chromatogramm (UV-Detektion bei 260 nm)

3.2 MALDI-TOF-Analytik von Nucleosiden aus Urin

3.2.1 Überblick über publizierte Methoden zur Messung von Nucleosiden und kleinen Molekülen mittels MALDI-TOF-MS

Obwohl die MALDI-TOF-Massenspektrometrie vorwiegend für große Moleküle wie Proteine und Polymere oder Peptide im Bereich der Proteomics-Forschung Anwendung findet, gibt es einige Beispiele für die erfolgreiche Anwendung auf verschiedene kleine Moleküle im Massenbereich unter 1500 Da.⁷⁸⁻⁸⁰ Die hierbei üblichen Matrices sind 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA). Andere Studien ergaben, dass auch feine Metall- oder Metalloxidpulver als Matrices für die Bestimmung von kleinen Molekülen eingesetzt werden können.⁸⁰

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie zeichnet sich vor allem durch die Möglichkeit aus, in einem großen Massenbereich zu messen (bis zu 1.5 Millionen Da). Außerdem können hohe Sensitivitäten erreicht werden und im Vergleich zu anderen Techniken hohe Massengenauigkeiten. Die Analyse ist in kurzer Zeit durchführbar und unempfindlich gegen Kontaminationen.⁷⁸

Lidgard et al. benutzten ebenfalls DHB und CHCA als Matrices zur Bestimmung kleiner Moleküle mittels MALDI-TOF-MS.⁸¹ Für die Nucleoside Guanosin, Adenosin, 2'-Deoxyadenosin, Thymidin und Cytidin wurde hier CHCA-Matrix verwendet. In den Spektren zeigten sich sowohl die protonierten Molekülmassen als auch das jeweilige Basenfragment, das durch Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen dem Zucker und der Nucleinbase entsteht.

Zwei Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Lokalisierung von Pseudouridin in tRNA nach Derivatisierung des Pseudouridins und RNase-Verdau.^{82;83} Beide Gruppen verwendeten ein MALDI-TOF-Massenspektrometer für diese Untersuchungen. Die eingesetzten Matrices waren 3-Hydroxypicolinsäure (HPA)⁸² bzw. eine Mischung aus 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP) und Diammoniumcitrat.⁸³

Insbesondere für die Identifizierung von bereits bekannten Nucleosiden aus Urin ist die Bestimmung der genauen Masse von besonderem Wert, da davon ausgehend eine Summenformel generiert werden kann. Hierfür ist die MALDI-TOF-Massenspektrometrie aufgrund des TOF-Analysators gut geeignet.

Die genaue Masse ergibt sich bei interner Kalibrierung aufgrund der Fokussierung durch ein Reflektorfeld. Dabei unterliegen auch Ionen gleicher Masse aufgrund von geringfügig unterschiedlichen Abständen zur Beschleunigungselektrode nach der Ionisierung noch einer gewissen Geschwindigkeitsverteilung. Um diese zu kompensieren, wird nach der Auftrennung im Flugrohr ein Gegenfeld angelegt, in das die Ionen mit höherer kinetischer Energie weiter eindringen als diejenigen mit geringerer kinetischer Energie. Sie werden dann in entgegengesetzter Richtung beschleunigt, wobei die Ionen mit geringerer Energie früher reflektiert werden. Die Detektion erfolgt an dem Punkt, an dem die Ionen gleicher Masse gleichzeitig eintreffen. Durch Optimierung der Parameter des MALDI-TOF-MS können auf diese Weise hohe Massengenauigkeiten erreicht werden. Ausgehend von der genauen Masse wird mittels Massenkalkulator (Molecular Weight Calculator 6.22, Matthew Monroe) die Summenformel berechnet. Diese wird anschließend zur gezielten Datenbanksuche nach Nucleosidstrukturen eingesetzt.

3.2.2 Messung von Standardnucleosiden

Für die Methodenentwicklungen wurden Nucleosidlösungen mit einer Konzentration von ca. 1 mg/mL in 0.1 % TFA bzw. 1 % TFA angesetzt. Aus diesen Stammlösungen wurden alle weiteren Lösungen hergestellt. Die untersuchten Standardnucleoside waren: Adenosin, 1-Methyladenosin, N6-Methyladenosin, MTA, Cytidin, Inosin, Guanosin, Uridin, Pseudouridin und Xanthosin.

3.2.2.1 MALDI-TOF-Messungen

Um die Messung von Nucleosiden mittels MALDI-TOF-MS zu optimieren, wurden verschiedene Präparationstechniken, Matrices und Targets verwendet, die unter 5.3 beschrieben sind.

Optimierung der Methodenparameter

Wahl des Targets

Für die Messungen standen zwei verschiedene Targetarten zur Verfügung: herkömmliche Edelmetalltargets und AnchorChip-Targets mit unterschiedlichen Anchor-Größen (200, 400, 600, und 800 µm Durchmesser). Bei AnchorChip-Targets handelt es sich um hydrophob beschichtete Edelmetalltargets mit hydrophilen „Ankern“. Die Probelösung verdunstet nach Probenaufgabe langsam und die Kristallisation erfolgt konzentriert auf der Ankerfläche und gleichmäßiger als beim gewöhnlichen Edelmetalltarget.

Für den Vergleich der beiden Targets wurden die Nucleosidstandardlösungen in 0.1 % TFA je auf einem Spot eines Edelmetalltargets und einem 400 µm-Anchor eines AnchorChip-Targets mit der Dried-Droplet-Methode und DHB-Matrix wie unter 5.3.4 beschrieben präpariert. Als Beispiel sind in Abbildung 11 die Spektren für Uridin gezeigt. Bei dem Edelmetalltarget ist der Molekülpeak des Uridins im Vergleich zu den übrigen Peaks, die als Matrixpeaks identifiziert wurden, klein, während er beim AnchorChip-Target wesentlich größer erscheint. Für die übrigen Nucleoside ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Daher wurde für alle folgenden Messungen das AnchorChip-Target verwendet.

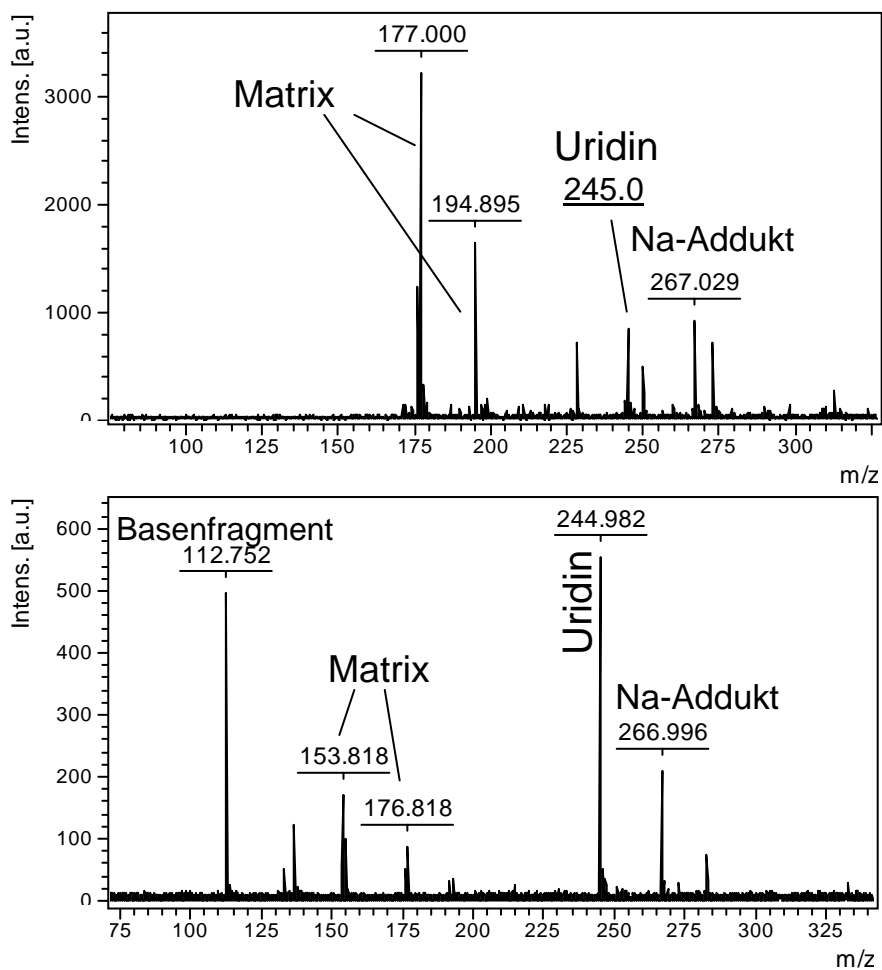


Abbildung 11: MALDI-TOF-Spektren von Uridin, Präparation: Dried Droplet mit DHB-Matrix, je 1.7 nmol absolut, a) auf Edelmetalltarget (S/N 65), b) auf 400µm AnchoChip-Target (S/N 95))

Auswahl der Anchor-Größe

Da bei einem 200 µm-Anchor eine höhere Aufkonzentrierung stattfindet als bei einem 400 µm-Anchor, wurde vermutet, dass durch die Verwendung eines 200 µm-Anchors eine weitere Sensitivitätssteigerung im Vergleich zum 400 µm-Anchor erreicht werden kann. Um dies zu überprüfen, wurde eine Dried-Droplet Präparation mit DHB-Matrix der Standardnucleoside jeweils auf einem 200 µm-Anchor und einem 400 µm-Anchor durchgeführt. Wie am Beispiel von Guanosin in Abbildung 12 zu sehen, war jedoch kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Anchor-Größen feststellbar. Das Verhältnis des

Guanosinpeaks zu den Matrixpeaks ist vergleichbar. Da bei einem 400 μm -Anchor eine größere Fläche zum Messen zur Verfügung steht, was insbesondere für die spätere Aufnahme von PSD-Spektren von Vorteil ist, wurden in den weiteren Versuchen die 400 μm -Anchors verwendet.

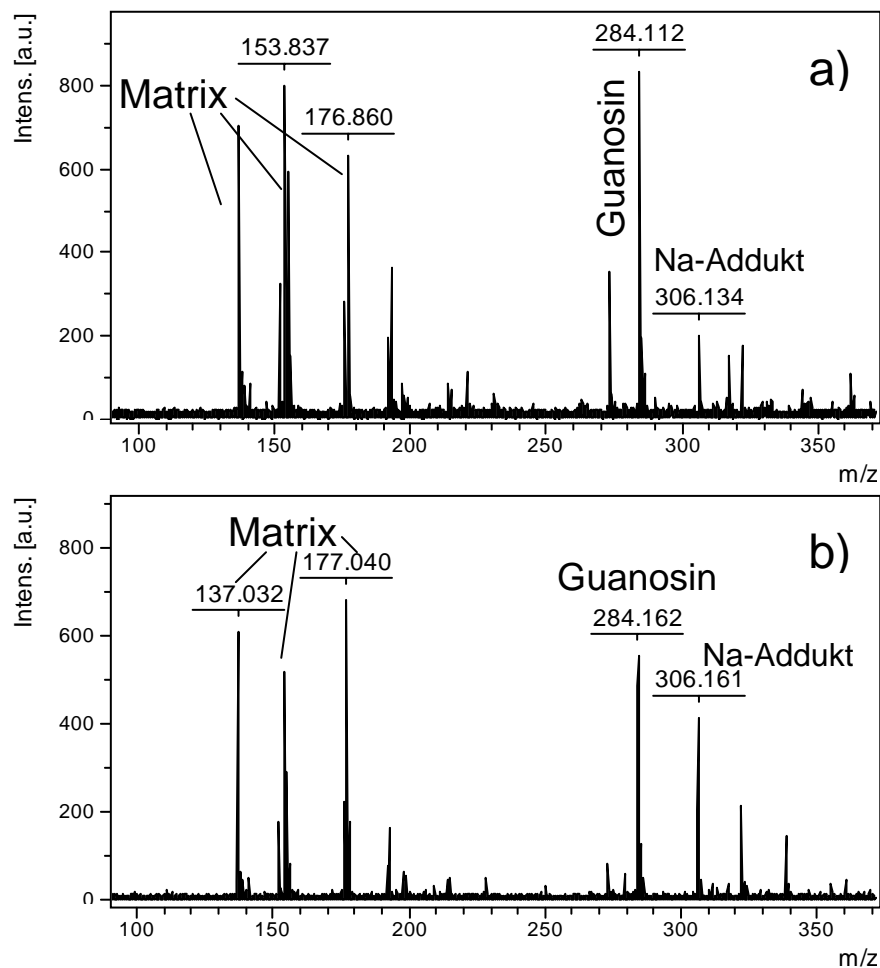


Abbildung 12: MALDI-Spektren von Guanosin, Präparation: Dried-Droplet mit DHB-Matrix, je 2 pmol absolut, a) auf 200 μm Anchor (S/N 93), b) auf 400 μm Anchor (S/N 90)

Säurekonzentration der Standardlösungen

Auch wenn die Matrix bereits als Protonenspender fungiert, ist ein Zusatz von Säure (TFA) in der jeweiligen Messlösung für die Protonierung von Vorteil. Daher wurden zum Vergleich Lösungen der Nucleoside in 0.1 % TFA und 1 % TFA hergestellt, 1:1000 verdünnt und diese vermessen. Wie in Abbildung

13 am Beispiel von Adenosin zu erkennen ist, ergab sich kein erkennbarer Unterschied für die verschiedenen Säurekonzentrationen. Die Säurekonzentration von 0.1 % TFA als Lösungsmittel wurde daher beibehalten.

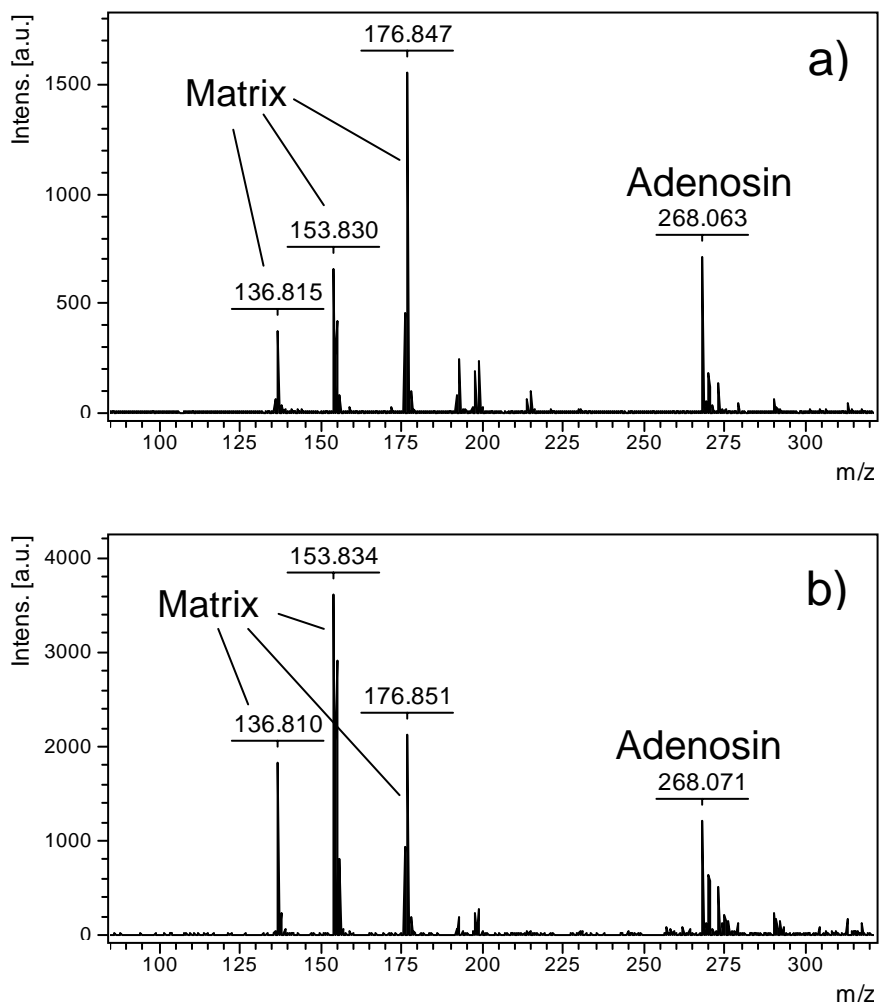


Abbildung 13: MALDI-TOF-Spektren von Adenosin, Präparation: Dried-Droplet mit DHB-Matrix, je 1.9pmol absolut, a) in 0.1 % TFA, b) in 1 %TFA

Sensitivität

Eine hohe Sensitivität ist insbesondere bei Messung von Fraktionen aus der HPLC-Trennung von Bedeutung, da hier Minorkomponenten enthalten sind, die identifiziert werden sollen.

Vergleich von DHB und CHCA-Matrix mit abgeschätzten Nachweisgrenzen

Zum Vergleich der Nachweisgrenzen für die beiden Präparationstechniken (Dried-Droplet mit DHB-Matrix und Thin-Layer-Methode mit CHCA-Matrix, vgl. 5.3.4) wurden die Nucleoside Adenosin, 1-Methyladenosin, Cytidin, Inosin, Uridin, Pseudouridin und Xanthosin mit beiden Methoden untersucht. Dazu wurden Lösungen von ca. 1 mg/ mL in 0.1 %TFA verwendet, von denen bei beiden Methoden je 0.5 μ L auf das AnchorChip-Target (0.4 μ m) aufgegeben wurde. Wie in Abbildung 14 am Beispiel von Xanthosin gezeigt, wird das Signal des Xanthosin-Molekülpeaks bei der CHCA-Methode bereits bei einer absoluten Konzentration von 1.8 nmol von zahlreichen Matrixpeaks begleitet und überragt. Bei Verwendung der DHB-Methode liefert Xanthosin bei vergleichbarer Konzentration eindeutig das vorherrschende Signal. Für die weiteren untersuchten Nucleoside ergaben sich ähnliche Ergebnisse, daher ist für Messungen mit hoher Sensitivität die DHB-Dried-Droplet-Methode zu bevorzugen.

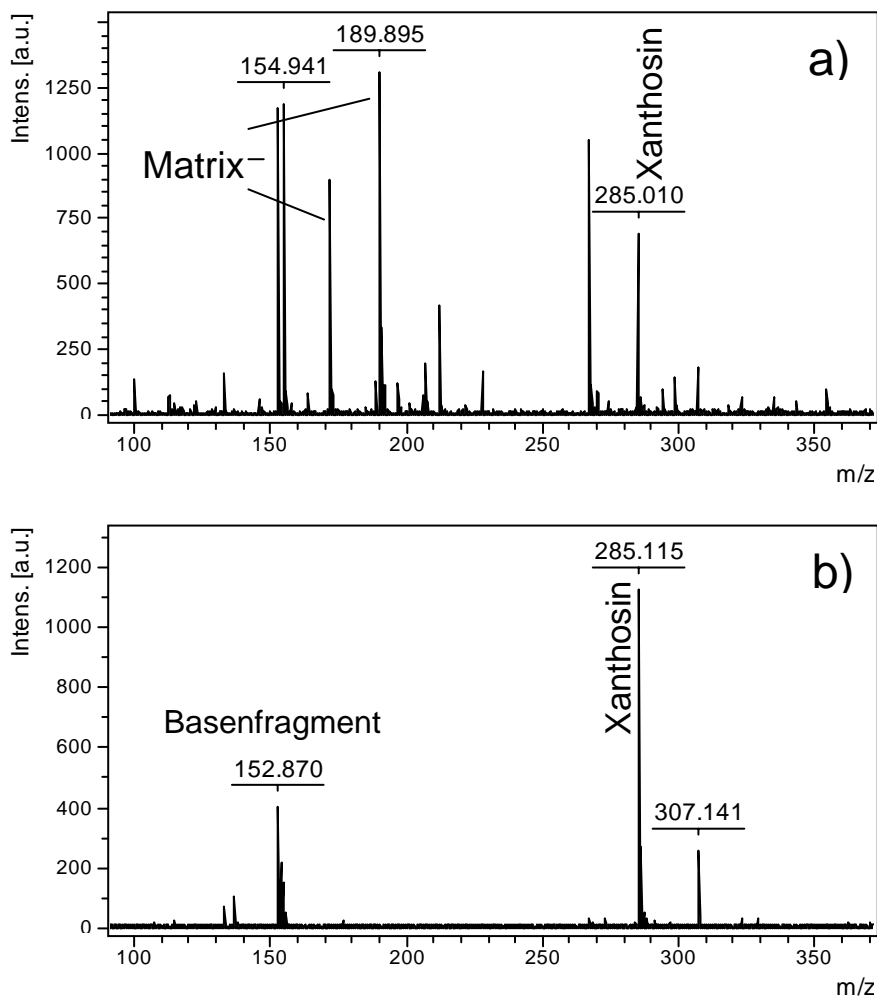


Abbildung 14: MALDI-TOF-Spektren von Xanthosin, je 1.8 pmol absolut a) CHCA Thin-Layer-Präparation (S/N 123), b) DHB Dried-Droplet-Präparation (S/N 135)

Für die Abschätzung der Nachweisgrenzen wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Nucleoside in absoluten Konzentrationen von 2 nmol, 200 pmol, 20 pmol, 2 pmol und 100 fmol mit der Dried-Droplet-Methode mit DHB-Matrix gemessen. Als Nachweisgrenzen wurden diejenigen Konzentrationen festgelegt, bei der die Intensität des Molekülmassenpeaks des jeweiligen Nucleosids ca. 3-mal höher lag als das Untergrundrauschen im Spektrum. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Ermittelte absolute Nachweisgrenzen der MALDI-TOF-Methode mit DHB-Präparation

Nucleosid	Nachweisgrenze
Adenosin	100 fmol
1-Methyladenosin	100 fmol
N6-Methyladenosin	100 fmol
MTA	100 fmol
Cytidin	< 2 pmol
Guanosin	< 2 pmol
Inosin	< 10 pmol
Uridin	< 4 pmol
Pseudouridin	< 10 pmol
Xanthosin	< 2 pmol

Von den beiden verwendeten Präparationstechniken erwies sich die Dried-Droplet-Methode mit DHB als am besten geeignet, um Nucleoside mit hoher Sensitivität zu messen. Allerdings wurde hier eine Reduktion bei einigen Nucleosiden beobachtet, insbesondere bei Adenosin und seinen Metaboliten. Der Vergleich der Präparationen mit beiden Matrices ist in Abbildung 15 gezeigt. Bei der DHB-Präparation ist eine Veränderung im Isotopenmuster zu sehen. Die erhöhte Intensität des um 2 Da größeren Massenpeaks spricht für die Reduktion einer Doppelbindung.

Ähnliche Effekte wurden von Koomen und Russel beobachtet.⁸⁴ Zur Vermeidung dieses Phänomens sollte CHCA als Matrix verwendet werden, allerdings mit einem Verlust an Sensitivität.

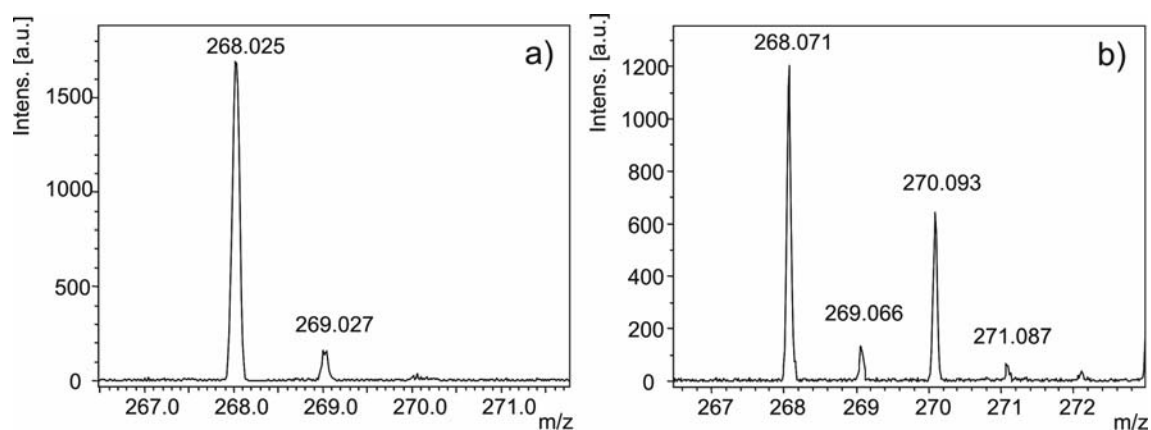


Abbildung 15: a) Adenosin mit CHCA Matrix präpariert, b) Adenosin mit DHB präpariert

DHB hat die Eigenschaft, große unregelmäßige Kristalle zu formen, daher ist die resultierende Massengenauigkeit nicht optimal. Es wurde eine Massengenauigkeit von unter 100 ppm bei externer und unter 40 ppm bei interner Kalibrierung ermittelt. Bei einer gleichmäßigen CHCA Thin Layer Matrix dagegen konnte bei interner Kalibrierung eine Massengenauigkeit von unter 10 ppm erreicht werden.

Mit der Dried-Droplet-Methode und DHB Matrix wurden 18 Nucleoside mittels MALDI-TOF-MS gemessen. Es wurden Auflösungen zwischen 5000 und 9000 erreicht. Die abgeschätzten Nachweisgrenzen (bei $S/N \approx 300$) liegen zwischen 100 fmol und 10 pmol, wobei die Nucleoside geringerer Basizität, insbesondere diejenigen mit Pyrimidinbasen, eine höhere Nachweisgrenze zeigen als diejenigen mit Purinbasen. Dudley et al. konnten mittels LC-ESI-IMS Nachweisgrenzen zwischen 19 und 110 pmol erreichen.⁶⁶ Im Vergleich ist also MALDI-TOF eine weitaus sensitivere Methode mit hoher Auflösung und Massengenauigkeit.

Interne Kalibrierung auf DHB/CHCA mit Vergleich der Massengenauigkeit

Zum Test der Massengenauigkeit wurden Lösungen von zwei Arzneistoffen, Atenolol und Cimetidin, mit interner Kalibrierung sowohl mit der CHCA-ThinLayer-Methode als auch mit der DHB-Dried-Droplet-Methode vermessen.

Dazu wurde je 0.5 μL DHB (5 g/l in TA) auf einen 400 μm -Anchor gegeben, getrocknet und jeweils 0.5 μL MALDI-Standard, Atenolollösung und Cimetidinlösung (je 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 0.1 % TFA) aufgegeben und 4-mal gemessen. Die resultierenden Massengenauigkeiten sowie Auflösungen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Massengenauigkeit (MG) und Auflösung bei Anwendung der DHB-Dried-Droplet-Methode

Cimetidin		Atenolol	
MG [ppm]	Auflösung	MG [ppm]	Auflösung
33	4262	35	3472
6	5284	43	3590
18	3419	16	4098
27	3657	8	3839

Die Massengenauigkeiten schwanken erheblich und sind mit 43 ppm zu hoch, um eine Summenformel von unbekanntem Substanzen zu generieren. Auch die Auflösungen sind mit Werten zwischen 3400 und 5300 nicht optimal.

Außerdem wurde wie unter 5.3.4 beschrieben eine CHCA-Dünnschicht hergestellt, 0.5 μL des Kalibrier-Standards (siehe 5.3.5) und je 0.5 μL der beiden Lösungen der Arzneistoffe auf einen Spot pipettiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Nach 7-maligem Messen wurden die Massengenauigkeiten und Auflösungen verglichen wie in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6: Massengenauigkeit (MG) und Auflösung bei Anwendung der CHCA-Thin-Layer-Methode

Cimetidin		Atenolol		Fehler der Kalibranten [ppm]
MG [ppm]	Auflösung	MG [ppm]	Auflösung	
2.5	6896	3.9	5969	1.0 – 6.3
9.6	7446	2.4	6802	1.0 – 4.4
0.3	8117	9.5	8290	1.7 – 9.2
1.7	6956	6.2	6924	0.5 – 4.2
5.3	7910	2.8	7324	0.5 – 3.7
1.7	9282	2.0	8026	0.7 – 3.9
3.4	8125	5.0	8873	0.1 – 4.7

Die Massengenauigkeiten liegen unter 10 ppm, sowohl bei den Kalibranten als auch bei den gemessenen Substanzen Atenolol und Cimetidin. Auch die Auflösung ist mit Werten zwischen 6000 und 9000 sehr gut.

Für eine interne Kalibrierung und optimale Auflösung und Massengenauigkeit ist also die Thin-Layer-Methode mit CHCA-Matrix besser geeignet.

3.2.2.2 Aufnahme von PSD-Spektren

Bei der Aufnahme von Post Source Decay (PSD)-Spektren werden Massen selektiert, deren Fragmentierungsverhalten untersucht werden soll. In den Spektren werden die Fragmente, die durch metastabilen Zerfall nach der Ionenquelle entstehen, abgebildet.

Die untersuchten Nucleoside zerfallen unter Verlust von 132 Da. Dieses Phänomen lässt sich mit der charakteristischen Struktur der Nucleoside erklären, denen die Ribose als Zucker gemeinsam ist. Die N-glycosidische Bindung zwischen Nucleobase und Zucker ist labil und wird leicht gespalten. Eine Ausnahme bildet Pseudouridin, erklärbar durch die stärkere C-C-Bindung an Stelle der labilen N-glycosidischen Bindung der übrigen Nucleoside. Dudley et al. beobachteten bei der Fragmentierung von Pseudouridin mittels LC-Ionenfallen-MS die Fragmente m/z 209, 179 und 155.⁶⁸ Diese Massen waren auch im PSD-Spektrum von Peudouridin zu sehen (vgl. Abbildung 16). Das

Fragment m/z 155 entsteht durch Aufspaltung der Ribose, wie von Crow et al. bei FAB-MS/MS-Messungen beschrieben.⁸⁵

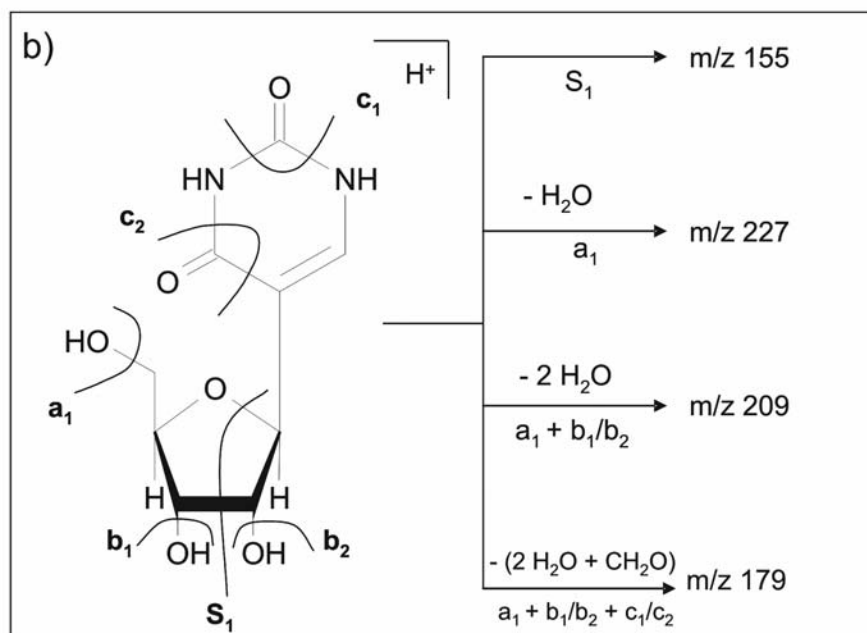
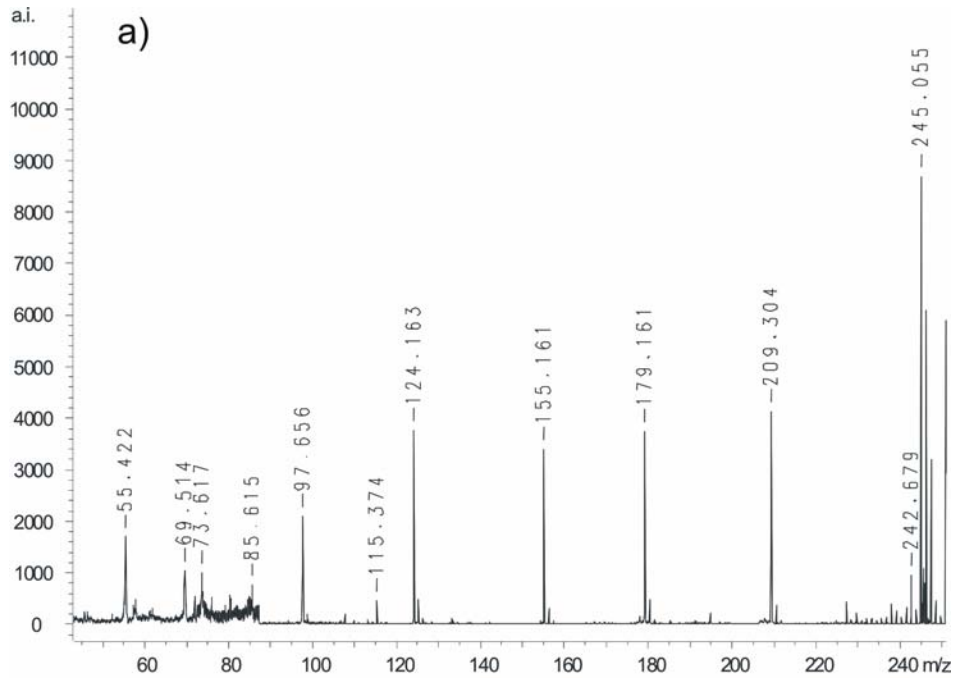


Abbildung 16: PSD-Spektrum und Fragmentierungsschema von Pseudouridin (modifiziert nach Dudley et al.⁶⁸)

Die übrigen Nucleoside zeigen im PSD-Spektrum die Nucleinbase als Peak von hoher Intensität. Daneben sind weitere Fragmente zu erkennen, die für jedes Nucleosid charakteristisch sind. Isomere Strukturen ergeben weitgehend identische PSD-Spektren, sie müssen durch die Retentionszeiten bei der HPLC-Trennung und ihre UV-Spektren unterschieden werden.

Uridin, DHU, 3-Methyluridin und 5-Methyluridin zerfallen unter Bildung eines Fragments mit m/z 133. Im PSD-Spektrum von DHU sind die Fragmente m/z 115, m/z 157 und m/z 181 zu sehen. Uridin zeigt entsprechende um je 2 Da kleinere Fragmente (m/z 113, m/z 155, m/z 179). Diese Spaltprodukte enthalten daher vermutlich die intakte Nucleinbase. Die Fragmente m/z 155 und m/z 179 treten sowohl bei Uridin als auch bei Pseudouridin auf. Diese Fragmente können durch S1-Fragmentierung (vgl. Abbildung 16) bzw. Abspaltung von Wasser erklärt werden, wie von Dudley et al. beschrieben. Die S1-Fragmentierung wurde erstmals von Crow et al. bei Fast Atom Bombardment (FAB) Experimenten berichtet.⁸⁵ Auch Wilson und McCloskey beobachteten diese Fragmentierung in Experimenten mit CI-Fragmentierung.⁸⁶

Das Fragment m/z 136 trat in den PSD-Spektren von Adenosin und den Metaboliten 1-Methyladenosin, N6-Methyladenosin und MTA auf. Die methylierten Adenosine bilden unter Abspaltung der Methylgruppe die Adeninbase. Beide Methyladenosine zeigen außerdem eine S1-Spaltung.

Eine Zusammenfassung der Fragmentmassen aller untersuchter Nucleoside ist in Tabelle 7 zu sehen. Zum Vergleich sind die entsprechenden Fragmente in FAB-, CI- und ESI-Fragmentierungsexperimenten angegeben.

Tabelle 7: Fragmentmassen aus den PSD-Spektren der untersuchten Nucleoside (n.u.: nicht untersucht)

Nucleosid	Charakteristische PSD-Fragmente (m/z)	FAB ⁸⁵	CI ⁸⁶	ESI ⁶⁸
Adenosin	136, 166, 181	268, 250, 237, 178, 164, 136	268, 136, 164, 178, 135, 150, 176	268, 250, 136
1-Methyladenosin	136, 150, 180, 192	n.u.	268, 136, 164, 150, 178, 192	n.u.
N6-Methyladenosin	136, 150, 180, 192	n.u.	282, 150, 178, 192, 136	n.u.
MTA	136, 163	n.u.	n.u.	n.u.
Cytidin	112, 137, 228	244, 154, 140, 133	244, 112, 140, 154	244, 112
Inosin	137, 261	n.u.	n.u.	269, 137
1-Methylinosin	136, 151, 201, 271	n.u.	n.u.	n.u.
Guanosin	136, 152, 271, 194	266, 253, 194, 180, 152	n.u.	284, 266, 152
Isoguanosin	136, 152, 271	n.u.	n.u.	n.u.
1-Methylguanosin	166, 136, 211	298, 267, 208, 194, 166	n.u.	n.u.
N2-Methylguanosin	166, 136, 211	298, 208, 180, 166	n.u.	n.u.
DHU	115, 133, 157, 181, 229	247, 229, 157, 143, 115, 133	n.u.	n.u.
Uridin	113, 133, 155, 179, 231	245, 227, 155, 141, 113, 133	245, 113, 141, 155	245, 227, 113
3-Methyluridin	127, 133, 169	259, 241, 169, 155, 127, 133	n.u.	n.u.
5-Methyluridin	127, 133, 169	n.u.	n.u.	n.u.
Pseudouridin	155, 179, 209, 113	245, 227, 214, 155, 137, 133, 209	245, 113, 141, 155, 179, 209	245, 209, 179, 155
Xanthosin	136, 153, 200, 271	n.u.	n.u.	n.u.

3.2.3 Anwendung der optimierten Methode auf Nucleoside aus Urinproben

3.2.3.1 Proben und Vorbereitung

Fünf aufgearbeitete Urinproben, davon zwei von Brustkrebspatientinnen und drei Kontrollproben, wurden semipräparativ mit der unter 3.3.9 beschriebenen Methode getrennt, die einzelnen Peaks in Fraktionen gesammelt und in je 10 μL 0.1 % TFA aufgenommen. Je 1 μL dieser Lösungen wurde, wie unter 5.3.9 beschrieben, mit DHB-Matrix für die MALDI-TOF-Messung präpariert. Massen im Bereich zwischen 240 und 450 Da wurden darüber hinaus mittels MALDI-PSD untersucht, um aus dem Fragmentierungsverhalten Rückschlüsse auf die Struktur ziehen zu können und Hinweise auf Nucleosidstrukturen zu erhalten.

3.2.3.2 MALDI-TOF- und PSD-Ergebnisse

Bei der semipräparativen Auftrennung der extrahierten Nucleoside wurden in den 37 Peakfraktionen von Probe FK 380 (HPLC-Chromatogramm siehe Abbildung 17) zehn Nucleoside anhand der Retentionszeit und der UV-Spektren identifiziert. Ausgenommen Uridin, Inosin, 5-Methyluridin, N6-Methyladenosin und Guanosin wurden die im Nucleosidstandard enthaltenen Nucleoside auch in den untersuchten Urinproben nachgewiesen, Bei diesen Nucleosiden handelt es sich um Minorkomponenten im Urin.⁸⁷

Die MALDI-TOF-Messungen der entsprechenden Fraktionen bestätigten die Zuordnung zu den bekannten Standardnucleosiden. Als Beispiel sind in Abbildung 18 und Abbildung 19 das MALDI-TOF-Spektrum von Fraktion 19 sowie das im Anschluss daran aufgenommene PSD-Spektrum von m/z 285 gezeigt. Im MALDI-TOF-Spektrum treten neben dem Xanthosin weitere Massen auf, die der verwendeten DHB-Matrix zugeordnet wurden. M/z 139, 154, 172 und 177 sind typische Massen der DHB-Matrix, was bei der Auswertung der MALDI-TOF-Spektren berücksichtigt wurde.

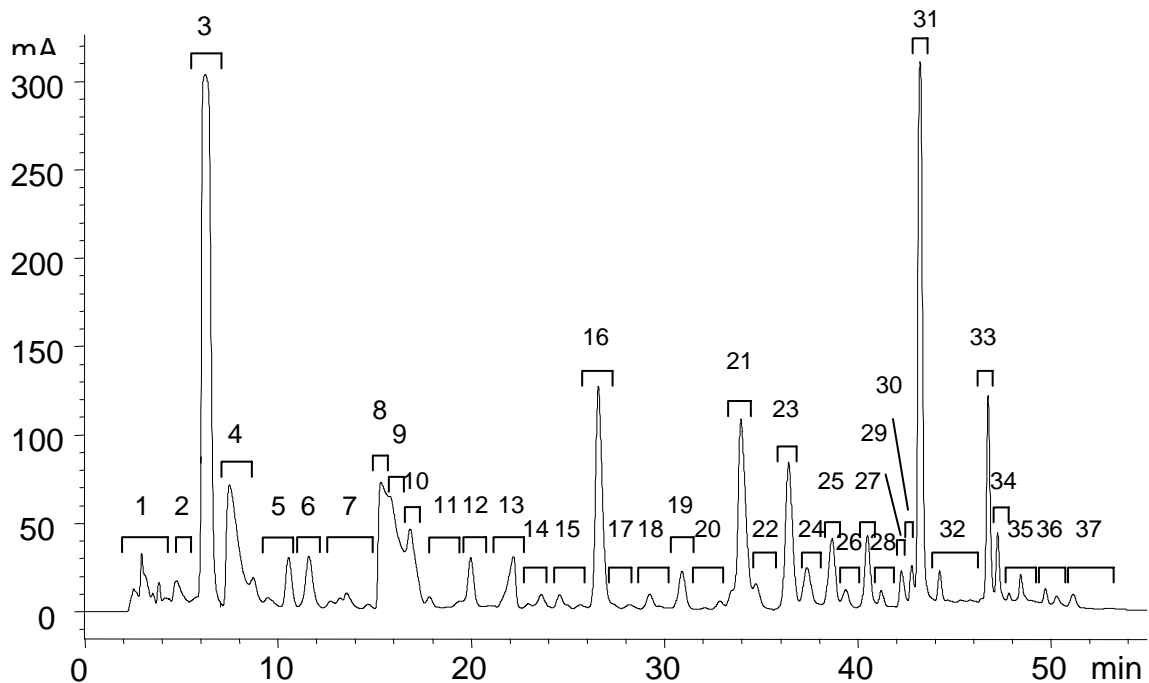


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm der untersuchten Urinprobe FK 380

Neben den bekannten Nucleosiden traten in den Fraktionen verschiedene Massen auf, die mittels PSD-MALDI untersucht wurden. Durch Basenfragmente mit einer Massendifferenz von 132 u zur selektierten Masse erhält man Hinweise auf Nucleosidstrukturen, die bei der Fragmentierung die Ribose abspalten. In Tabelle 8 sind alle mit PSD untersuchten Massen angegeben, die in den Fraktionen der Probe FK 380 auftraten. Neben den bekannten Standardnucleosiden sind hier alle weiteren Substanzen aufgeführt, die im PSD-Spektrum einen Neutralverlust von 132 u zeigten sowie solche Komponenten, bei denen dies nicht der Fall war. Insbesondere die zweite Gruppe soll weiter betrachtet werden, da es sich bei diesen Komponenten vermutlich um Nucleoside handelt.

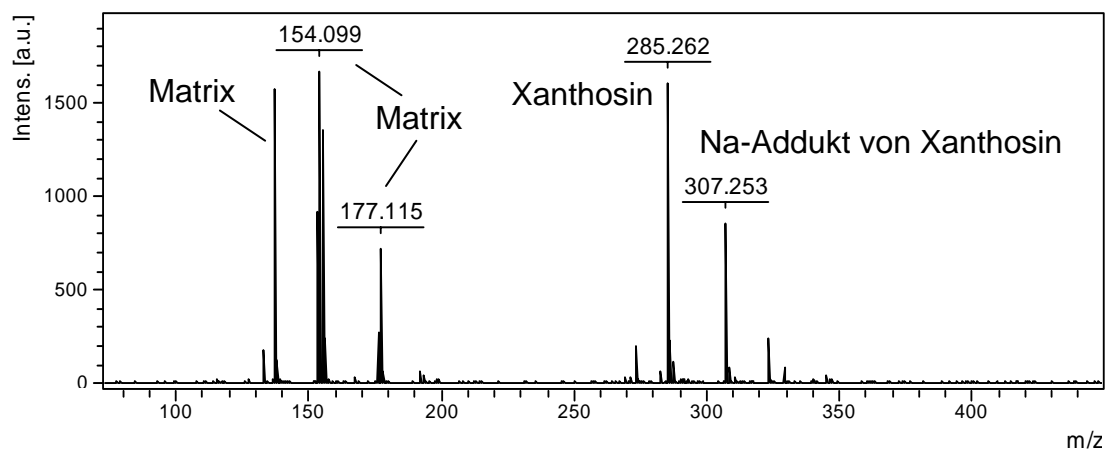


Abbildung 18: MALDI-TOF-Spektrum von Fraktion 19

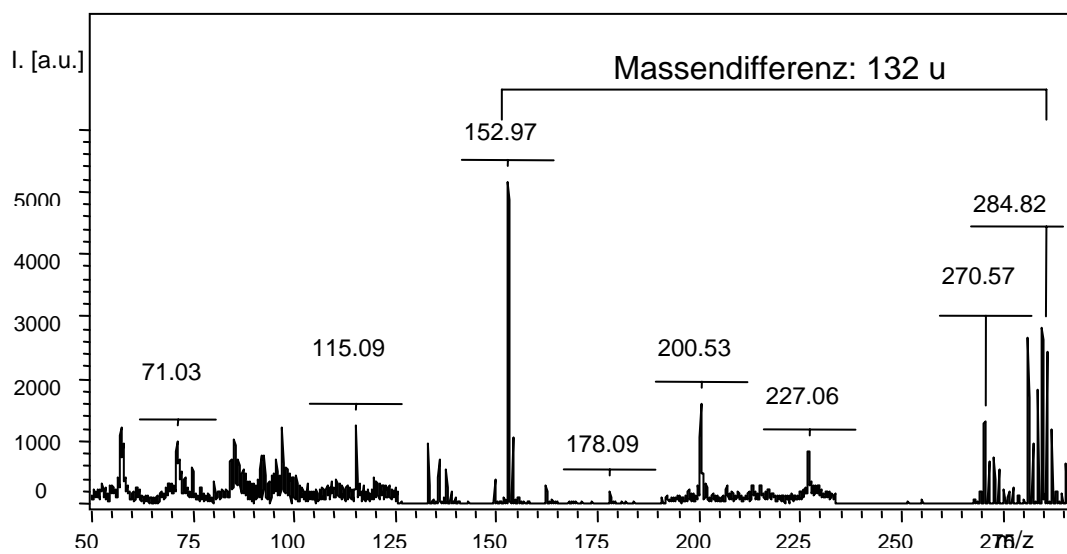


Abbildung 19: PSD-Spektrum von m/z 285 aus Fraktion 19

Tabelle 8: In den Fraktionen von Probe FK 380 enthaltene Komponenten

Fraktion	Bekannte Nucleoside ($[M+H]^+$)	Weitere Massen mit CNL 132 u im PSD	Sonstige mit PSD untersuchte Massen
1	-	-	-
2	DHU (247)	255, 269	259, 285, 392
3	Pseudouridin (245)	-	250, 267
4	-	-	298
5	-	-	304
6	Cytidin (244)	282, 346	230, 255
7	-	258	317
8	m1A (282)	267	-
9	m1A (282)	-	-
10	m1A (282)	-	-
11	m1A (282)	271, 252	-
12	-	271	-
13	Isoguanosin (284)	-	-
14	-	298	371, 429
15	-	271	253, 282, 286
16	-	271	-
17	-	-	212, 241
18	-	271, 282, 293	310
19	Xanthosin (285)	-	-
20	-	-	408
21	1ml (283)	384	-
22	-	293	265, 385
23	m1G (298)	-	265
24	-	244, 286	-
25	m1G (298)	-	314, 314
26	m2G (298)	-	-
27	Adenosin (268)	299	-
28	-	299	-
29	-	326	-
30	-	326	-
31	-	312	-
32	-	326	279, 303, 319
33	-	413	-
34	-	313, 413	393
35	-	-	283, 311, 340
36	MTA (298)	-	314
37	-	-	327, 394, 459, 481

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse aller fünf untersuchten Urinproben zusammengefasst, wobei nur diejenigen Massen in Elutionsreihenfolge angegeben sind, die im PSD-Spektrum einen Neutralverlust von 132 u zeigten. Dabei ist zu beachten, dass bei den verschiedenen Proben eine unterschiedliche Anzahl von Fraktionen aufgefangen wurde. Es ist wahrscheinlich, dass in einigen Proben bestimmte Nucleoside von anderen in diesen Fraktionen unterdrückt wurden. Dies trifft insbesondere auf die Kontrollproben zu, bei denen weniger Fraktionen gesammelt wurden. Daher ist es nicht sinnvoll, aufgrund dieser Ergebnisse Kontrollproben und Proben von Brustkrebspatientinnen zu vergleichen.

Tabelle 9: Vergleich der in den fünf Urinproben auftretenden Massen ($[M+H^+]$) mit Verlust von 132 u im PSD-Spektrum (in Elutionsreihenfolge angegeben), Proben A: gesunde Probandinnen, Proben FK: Mammakarzinompatientinnen

Probe A 96 21 Fraktionen	Probe A 104 21 Fraktionen	Probe A 129 21 Fraktionen	Probe FK 380 37 Fraktionen	Probe FK 411 38 Fraktionen
			247 (DHU)	247 (DHU)
	255		255	255
	259	259		
				300
			269	
244 (Cytidin)	244 (Cytidin)		244 (Cytidin)	244 (Cytidin)
				228
			282	
			346	346
258	258		258	258
282 (m1A)	282 (m1A)	282 (m1A)	282 (m1A)	282 (m1A)
			267	267
271	271	271	271	271
268	268	268		
284 (IsoG)	284 (IsoG)	284 (IsoG)	284 (IsoG)	284 (IsoG)
252			252	
				269 (Inosin)
	298	298	298	298
				255

Probe A 96 21 Fraktionen	Probe A 104 21 Fraktionen	Probe A 129 21 Fraktionen	Probe FK 380 37 Fraktionen	Probe FK 411 38 Fraktionen
271	271	271	271	271
				259 (m3 u)
	282	282	282	282
			293	
285 (Xanthosin)	285 (Xanthosin)	285 (Xanthosin)	285 (Xanthosin)	285 (Xanthosin)
				268
				328
283 (m1l)			283 (m1l)	283 (m1l)
			384	384
			293	
298 (m1G)	298 (m1G)	298 (m1G)	298 (m1G)	298 (m1G)
244	244	244	244	244
286	286	286	286	286
298 (m2G)	298 (m2G)	298 (m2G)	298 (m2G)	298 (m2G)
				301
			268 (Adenosin)	268 (Adenosin)
			299	
				376
				398
326	326	326	326	326
				301
312	312	312	312	312
	384			
	269			
	253			
413	413	413	413	413
			313	313
298 (MTA)	298 (MTA)	298 (MTA)	298 (MTA)	298 (MTA)

Eine der Komponenten, die in allen Proben auftrat, war m/z 271, die in Probe FK 380 in Fraktion 12 nachgewiesen wurde. Das MALDI-TOF-Spektrum dieser Fraktion ist in Abbildung 20 gezeigt. Das anschließend aufgenommene PSD-Spektrum von m/z 271 (siehe Abbildung 21) enthält einen intensiven Massenpeak bei 139 Da, welcher eine Massendifferenz von 132 u zu m/z 271 aufweist. Dies spricht für eine Substanz, die die Ribose enthält. Diese Komponente wurde weiter untersucht, wie im folgenden Kapitel beschrieben.

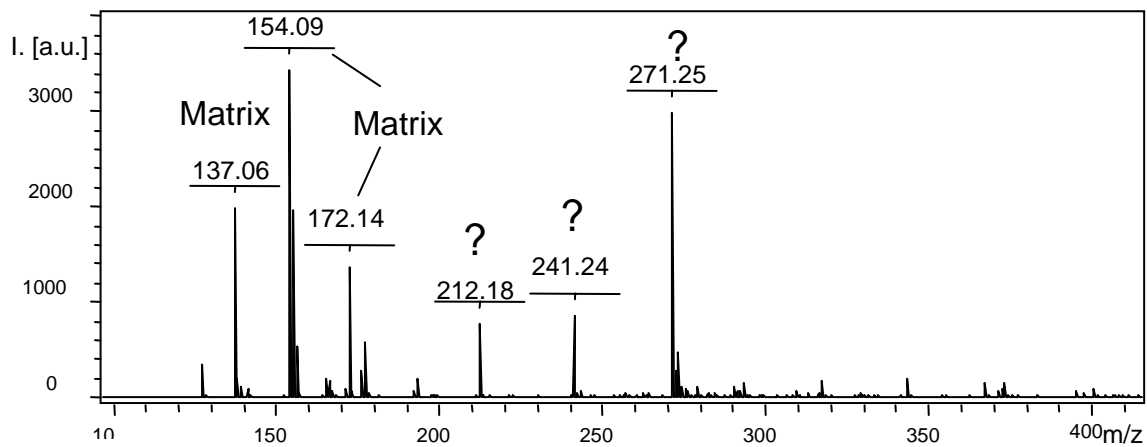


Abbildung 20: MALDI-TOF-Spektrum von Fraktion 12

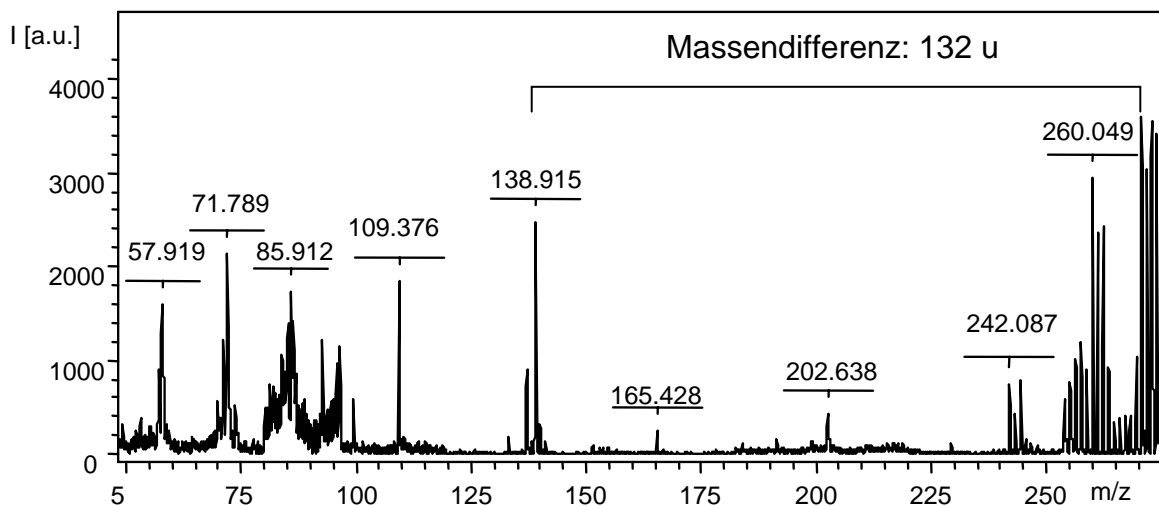


Abbildung 21: PSD-Spektrum von m/z 271 aus Fraktion 12

3.2.3.3 Ermittlung einer genauen Masse und Generierung einer Summenformel zur Identifizierung von bislang unbekanntem Nucleosiden mittels Datenbanksuche

Um unbekannte Substanzen zu identifizieren, ist es hilfreich, eine genaue Masse zu generieren. Daraus lassen sich mögliche Summenformeln berechnen (Molecular Weight Calculator 6.22), die durch Kriterien für Nucleoside eingeschränkt werden können. Nucleoside bestehen aus mindestens neun Kohlenstoffatomen, drei Sauerstoffatomen und zwei Stickstoffatomen. Ausgehend von diesen Einschränkungen und einer Massengenauigkeit von unter 10 ppm bleiben nur wenige mögliche Summenformeln zur Auswahl. Zu diesen können mittels SciFinder (2003) entsprechende Strukturen ermittelt werden, die wiederum eine Riboseeinheit aufweisen müssen. Dabei ist zu beachten, dass eine interne Kalibrierung nur für solche Komponenten möglich ist, die in ausreichender Konzentration vorliegen. Unter Umständen ist eine Aufkonzentrierung notwendig.

Als Beispiel für die oben beschriebene Prozedur wurde eine Xanthosinstandardlösung mittels interner Kalibrierung am MALDI-TOF-MS vermessen. Es ergab sich eine monoisotopische Masse von 285.0818 u. Der Molecular Weight Calculator berechnete für diese Masse unter Annahme einer Massengenauigkeit von 10 ppm 24 mögliche Summenformeln, von denen nur eine die oben erwähnten Kriterien für Nucleoside erfüllte. Eine SciFinder-Suche ergab 132 Treffer, die durch Vorgabe der Ribose als Strukturelement auf 40 eingegrenzt wurde. Einer dieser Treffer war Xanthosin. Bei den meisten anderen handelte es sich um Syntheseprodukte und keine natürlichen Substanzen.

Für die Datenbanksuche nach neuen Nucleosiden in den untersuchten Urinproben wurden von ausgewählten Substanzen aus den HPLC-Fractionen, die in den PSD-Spektren einen Neutralverlust von 132 Da zeigen, eine interne Kalibrierung, wie unter 5.3.5 beschrieben, vorgenommen.

Acht der bisher unbekanntenen Nucleoside zeigten sich in mindestens vier der fünf untersuchten Urinproben. Dies sind m/z 258 (Fraktion 7 in Probe Fk 380), zwei m/z 271 (Fraktionen 12 und 16), m/z 298 (Fraktion 14) m/z 286 (Fraktion 24), m/z 326 (Fraktion 30), m/z 312 (Fraktion 31) sowie m/z 413 (Fraktion 33). In den Proben der Brustkrebspatientinnen wurde in der zweiten Fraktion außerdem m/z 255 nachgewiesen, welches eine hohe Intensität zeigte. Diese HPLC-Fraktionen wurden mit der beschriebenen Methode untersucht. Die Ergebnisse der internen Kalibrierung sowie die auftretenden PSD-Fragmente sind in Tabelle 10 gezeigt.

Tabelle 10: Ergebnisse der internen Kalibrierung für ausgewählte Substanzen aus Urinproben

HPLC Fraktion	RT [min:sec]	m/z [Da] (MG [ppm])	PSD Fragmente	Nucleosid-Vorschlag
2	5:00-6:00	255.09817	114, 123	Unbekanntes Nucleosid
8	12:20-15:00	258.10966, (2.6)	126, 138, 154	Methylcytidin
12	19:30-21:30	271.09417, (4.3)	139, 152, 164, 255	PCNR
14	23:00-24:20	298.11331, (6.2)	166, 281, 136, 150, 130, 147	7-Methylguanosin
16	26:00-27:40	271.09257, (1.6)	139, 152, 164, 255	PCNR
24	37:30-38:40	308.08740, (4.5)	154, 136, 200, 112	N4-Acetylcytidin
29	42:00-43:40	326.14514, (4.0)	136, 158, 176, 194	Trimethylguanosin
30	43:00-43:50	312.12905, (5.4)	138, 165, 180, 196, 296	N2,N2-Dimethylguanosin
33	46:20-47:00	413.13964, (5.9)	136, 214, 272, 282, 389	N6-Carbamoylthreonyl-adenosin

Die Substanz mit m/z 255 aus Fraktion 2 zeigte im PSD-Spektrum den Verlust der Ribose, allerdings brachte die auf der ermittelten Masse basierende Datenbanksuche nur synthetisch erzeugte Strukturen und keine natürlich vorkommenden Substanzen als Ergebnisse.

Neben diesem noch unbekanntem Nucleosid wurden ein methyliertes Guanosin, ein acetyliertes Cytidin, zwei PCNR-Isomere, ein weiteres methyliertes Guanosin, ein zweifach methyliertes Guanosin, ein dreifach methyliertes Guanosin und N6-Threonylcarbamoyladenosen identifiziert.

In den HPLC-Fractionen 12 und 16 traten Komponenten mit m/z 271 und einem Basenfragment m/z 139 auf. In Fraktion 16 wurde durch interne Kalibrierung eine Masse von m/z 271.0918 ermittelt. Unter Annahme einer Massengenauigkeit von 10 ppm wurden für diese Masse 16 Summenformeln berechnet, von denen nur zwei die Nucleosidkriterien erfüllten. Nur eine dieser Formeln erbrachte bei einer SciFinder-Recherche Ergebnisse. Es blieben 33 Strukturen, die Ribose enthielten, zurück. Darunter waren 1-Ribosylpyridin-4-on-3-carboxamid und 1-Ribosylpyridin-2-on-5-carboxamid (Strukturen siehe Abbildung 22). Bei den übrigen Strukturen handelte es sich um keine natürlich vorkommenden Substanzen.

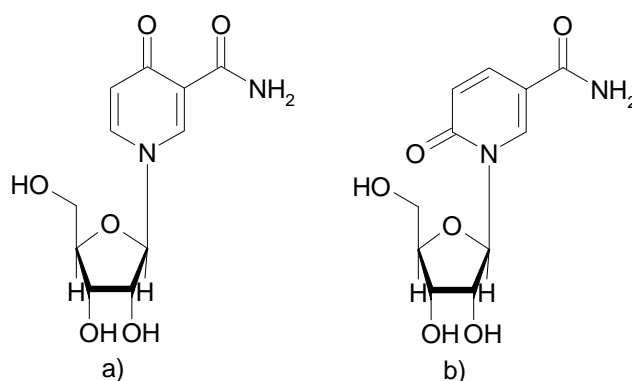


Abbildung 22: Strukturen von a) 1-Ribosylpyridin-4-on-3-carboxamid und b) 1-Ribosylpyridin-2-on-5-carboxamid

1- β -D-Ribofuranosylpyridin-4-on-3-carboxamid wurde von Dutta et al. bereits 1979 aus humanem Urin isoliert und identifiziert.⁸⁸ Mills et al. identifizierten 1989 zusätzlich 1-Ribosylpyridin-2-on-5-carboxamid in Urin.⁸⁹ Beide Komponenten scheinen in der untersuchten Urinprobe vorzuliegen, da m/z 271 in zwei Fraktionen nachgewiesen wurde. Der Ursprung dieser beiden

Komponenten liegt vermutlich bei Nicotinamidmononucleotid (NMN) oder Nicotinamiddinucleotid (NAD).⁹⁰

Da 1-Methylguanosin und N2-Methylguanosin bereits in anderen Fraktionen identifiziert wurden, ist die wahrscheinlichste Struktur für das Nucleosid in Fraktion 14 N7-Methylguanosin, welches ein bekannter Bestandteil von Urin ist.

N2,N2-Dimethylguanosin und N6-Threonylcarbamoyladenosen sind bekannte Nucleoside und wurden bereits im Zusammenhang mit Brustkrebs als Tumormarker vorgeschlagen.⁹¹

Fraktion 29 enthielt ein Nucleosid der Masse m/z 326, das im PSD-Spektrum ein Basenfragment von m/z 194 zeigte. Diese Masse lässt auf ein dreifach methyliertes Guanosin schließen, was durch die Bestimmung einer genauen Masse bestätigt wurde. Es handelt sich vermutlich um N2,N2-7-Trimethylguanosin, das einzige bekannte Trimethylguanosin mit drei Methylgruppen an der Nucleinbase.

3.3 Untersuchung von Nucleosiden mittels Ionenfallen-MS

3.3.1 Überblick über bisher veröffentlichte Methoden zur massenspektrometrischen Detektion von Nucleosiden

Es gibt zahlreiche Veröffentlichungen zur massenspektrometrischen Untersuchung von Nucleosiden und Nucleinbasen, wobei verschiedene Verfahren zur Ionisierung und unterschiedliche massenspektrometrische Techniken angewendet wurden. Für die direkte Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens von Standardsubstanzen wurde zur Ionisierung meist die Elektronenstoßionisation (EI) eingesetzt. Diese Studien beschäftigten sich mit der Elektronenstoß-Fragmentierung von Adenin⁹², Guanin⁹³, Cytidin und einigen seiner Derivate⁹⁴ und weiteren Pyrimidinbasen⁹⁵.

Die Fragmentierung der Nucleinbasen wurde teilweise gezielt durch den Einsatz einer Kollisionszelle erreicht, in der die ionisierten Moleküle durch Stöße mit einem Kollisionsgas (z.B. N₂, He, Ar) fragmentieren (Collision Induced Dissociation, CID). Bei diesen Studien findet die Ionisierung meist durch Fast Atom Bombardment (FAB) statt, wobei die zu untersuchende Substanz in flüssiger, schwerflüchtiger Matrix (z.B. Glycerin) mit einem Partikelstrom von Gasen wie Xenon oder Argon beschossen wird. Die so untersuchten Substanzen umfassen unter anderem Uracil und seine Derivate⁹⁶, Guanin⁹⁷ und verschiedene methylierte Guanosine⁹⁸. Font et al. untersuchten antiretrovirale Nucleoside mit CID nach Elektrosprayionisation (ESI).⁹⁹

FAB ist ebenso wie MALDI und ESI ein sanftes Ionisierungsverfahren, bei dem hauptsächlich positiv geladene Molekülonen entstehen. Bei der Auswertung der Spektren sind Cluster aus Matrix und Probe sowie Clusterionen der Matrix mit sich selbst zu berücksichtigen.

Beim Vergleich des Fragmentierungsverhaltens der durchgeführten ESI-MS-Untersuchungen mit den Literaturdaten ist zu beachten, dass EI-MS-Spektren sich von ESI-MS-Spektren unterscheiden. Dies ist auf den unterschiedlichen

Verlauf des Zerfalls bei der Ionisierung zurückzuführen. Bei der EI wird meist ein Elektron aus dem Molekül herausgeschlagen, sodass ein geladenes Radikalkation entsteht. Im Allgemeinen verbleibt nach der Ionisierung ein Teil der Energie im Molekülion. Durch diesen Energieüberschuss kommt es zur Fragmentierung in Radikalkationen, Kationen oder Neutralteilchen, die wiederum zerfallen. Dabei werden häufig Umlagerungen unter Verschiebung von Wasserstoffatomen beobachtet.¹⁰⁰

Bei der ESI-MS werden hauptsächlich Quasimolekülionen gebildet, die im Falle der positiven ESI einfach positiv geladen sind. Durch Anregung der Kationen im Massenspektrometer durch Stöße mit Gasmolekülen (He, Ar) können Fragmentierungen induziert werden, deren Ausmaß durch die zugeführte Energie gesteuert werden kann. Hier erfolgt die Fragmentierung am häufigsten unter Verlust von Neutralteilchen wie Ammoniak oder Wasser, wobei wieder Kationen entstehen.

Für die Untersuchung von Nucleosiden und Nucleinbasen aus biologischen Matrices muss vor der massenspektrometrischen Detektion eine Auftrennung erfolgen, die in der Regel über HPLC-Verfahren erfolgt.

Zur Detektion werden überwiegend Ionenfallen-Massenspektrometer (Ion Trap, ITMS) und Triple-Quadrupol-Massenspektrometer eingesetzt. Bei beiden Verfahren wird nach der Massenselektion eine Fragmentierung durch Stöße mit Gasmolekülen (z.B. Argon, Helium) angeregt. Es kommt häufig zum Verlust von Neutralteilchen wie HCN, Wasser oder Ammoniak. Der Vorteil der Ionenfalle gegenüber dem Triple-Quadrupol ist die Möglichkeit, MS^n -Spektren aufzunehmen. Während der Triple-Quadrupol auf MS/MS-Spektren beschränkt ist, sind bei der Ionenfalle mehrere Fragmentierungszyklen hintereinander möglich. Insbesondere bei der Untersuchung von Nucleosiden ist dies ein entscheidender Vorteil, da im ersten Fragmentierungsschritt die N-glycosidische Bindung zwischen Ribose und Nucleinbase gespalten wird und im Massenspektrum das Basenfragment zu sehen ist. Zur Charakterisierung eines Nucleosids ist aber besonders die Struktur der Base wichtig, sodass MS^3 - und MS^4 -Spektren von dem entsprechenden Basenfragment essentiell für die

Strukturaufklärung sind. Um unbekannte Nucleoside zu charakterisieren, ist daher eine LC-ESI-ITMS-Methode sinnvoll.

Dudley et al. etablierten verschiedene Methoden zur Untersuchung von Nucleosiden aus Urin, die auf der Trennung mittels Flüssigkeitschromatographie (HPLC oder CapLC), anschließender ESI-Ionisierung und Detektion mit Ionenfalle oder Triple-Quadrupol beruhen.^{66-68;101}

Für die Quantifizierung ist ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer zu bevorzugen, da hier eine höhere Sensitivität und Spezifität durch Messung im *Selected Ion Monitoring* (SIM)-Modus erreicht werden kann.⁶⁶

3.3.2 Spritzenpumpeninjektionen von Standard-Nucleosiden zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens durch MSⁿ-Experimente mit der Ionenfalle

Die Fragmentierungsmuster von 21 Nucleosiden und sechs korrespondierenden Nucleinbasen wurden mittels Spritzenpumpeninjektion von Standardlösungen (100 µg/ mL in 0.1 % TFA) ermittelt. Diese Standards waren Adenosin (A), 1-Methyladenosin (m1A), N6-Methyladenosin (m6A), N6,N6-Dimethyladenosin (m⁶₆A), 5`-Deoxy-5`-methylthioadenosin (MTA), Cytidin (C), 5-Methylcytidin (m5C), N4-Acetylcytidin (ac4C), Inosin (I), 1-Methylinosin (m1I), 7-Methylinosin (m7I), Guanosin (G), 1-Methylguanosin (m1G), 2-Methylguanosin (m2G), 7-Methylguanosin (m7G), N2,N2-Dimethylguanosin (m²₂G), Uridin (U), 5,6-Dihydrouridin (DHU), 3-Methyluridin (m3U), 5-Methyluridin (m5U), Xanthosin (X) und die Basen Adenin, Cytosin, Guanin, Hypoxanthin, Uracil und Xanthin. Zunächst wurden die Basiseinstellungen des IT-MS-Systems (Kapillarspannung, Cap Exit Spannung, Skimmerspannung, Octopole Spannungen, Trap Drive) für jedes Nucleosid optimiert und anschließend durch manuelle MSⁿ-Experimente im Massenbereich zwischen 50 und 500 Da die Fragmentierung untersucht.

3.3.2.1 Vergleich der Fragmentierungsmuster von Nucleosiden und Nucleinbasen

Nucleinbasen

Nelson und McCloskey untersuchten die Collision Induced Dissociation der Nucleinbasen Adenin und Uracil.^{92;96} Das Fragmentierungsverhalten dieser beiden Basen ist durch den Neutralverlust von Ammoniak gekennzeichnet. Bei der Purinbase Adenin wurde außerdem der Verlust von HCN nachgewiesen, während die Pyrimidinbase Uracil Wasser abspaltet.

Diese Fragmentierungen wurden auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten beobachtet. Die am häufigsten auftretende Fragmentierung der Nucleinbasen Adenin, Cytosin, Guanin, Uracil und Xanthin war der Verlust von Ammoniak. Bei den Purinen war eine Abspaltung von HCN in weiteren Fragmentierungsschritten charakteristisch. Im Fall von Hypoxanthin wurde die Abspaltung von Wasser beobachtet, wie auch bei Uracil, hier allerdings nur geringfügig.

Nucleoside

Bei den untersuchten Nucleosiden zeigte sich im ersten Fragmentierungsschritt ein charakteristischer Zerfall in Nucleinbase und Ribose, wobei der Zucker als Neutralteilchen abgespalten wird, während die Base in protonierter Form im Massenspektrum auftritt und im MS³-Schritt weiter fragmentiert werden kann. Der Verlust der Ribose wird auf die schwache N-glykosidische Bindung zurückgeführt.

Die weitere Fragmentierung der jeweiligen Basen ist identisch mit der oben beschriebenen Fragmentierung der Nucleinbasen. In Abbildung 23 sind die MS⁴-Spektren von Guanosin und der Vorschlag für die Fragmentierungskaskade dargestellt.

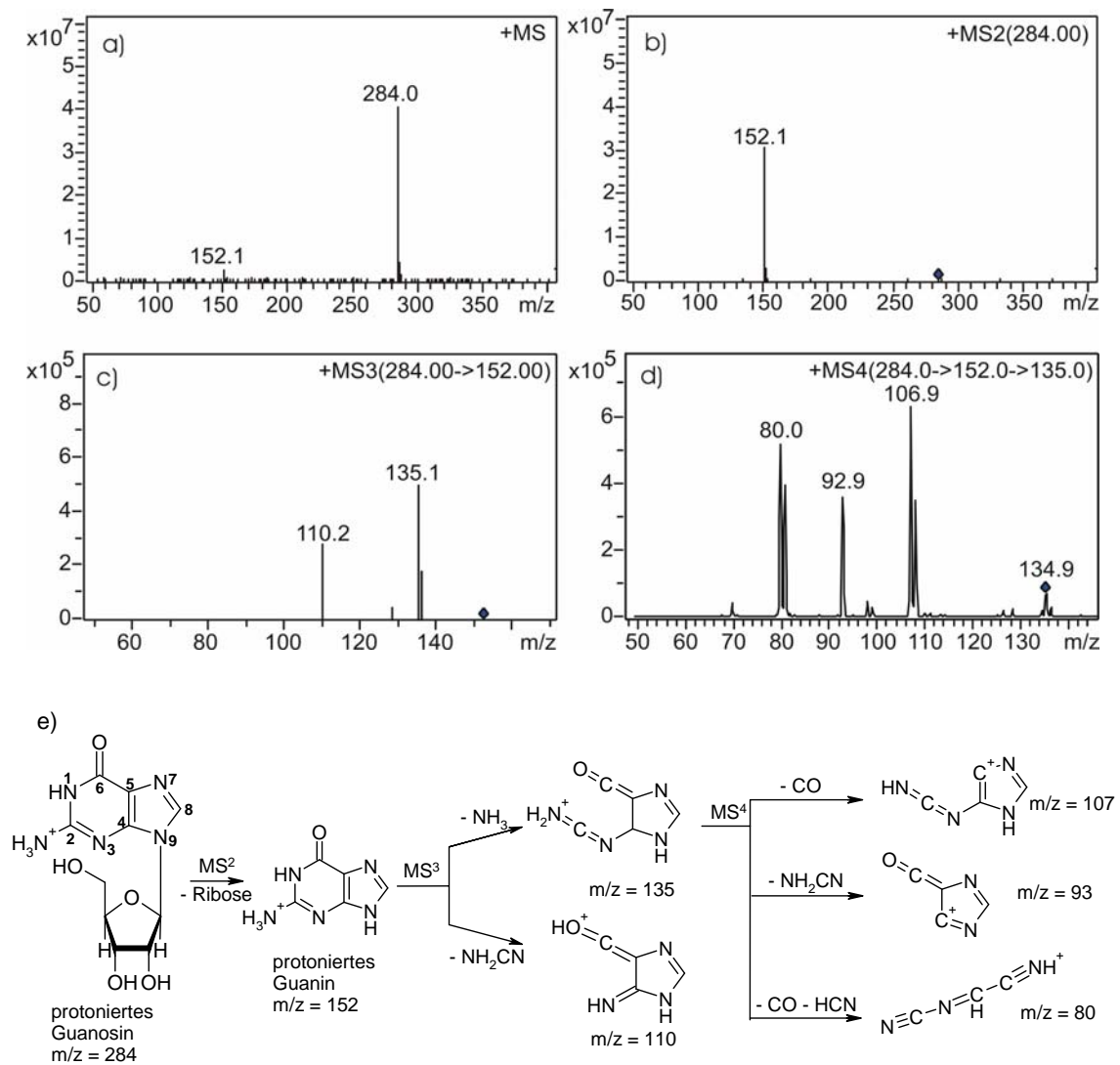


Abbildung 23: MS^n -Spektren und Fragmentierungsvorschlag für Guanosin (a) MS -Spektrum, (b) MS^2 -Spektrum, (c) MS^3 -Spektrum, (d) MS^4 -Spektrum, (e) Fragmentierung von Guanosin

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Fragmentierung der Nucleinbasen und der korrespondierenden Nucleoside.

Tabelle 11: Vergleich: Fragmentierung von Nucleosiden und Nucleinbasen

Substanz	MS	MS ²	MS ³	MS ⁴	MS ⁵
Adenosin	268	136	94	67	
			109		
			119	67	
				92	65
Adenin	136	119	94	67	
			67		
			92		
Cytidin	244	112	95	68	
			90		
			69		
Cytosin	112	95	69		
			68	40.5	
Inosin	269	137	94	67	
			110	82	
			119	92	
Hypoxanthin	137	119	94	67	
			110	82	
			77		
			92	65	
Guanosin	284	152	110	82	69.2
			135	80	
				93	
				107	80
Guanin	152	135	110	82	69
			80		
			93		
			107	80	
Uridine	245	113	70		
			96	68	40.6
Uracil	113	96	70		
			68		
Xanthosin	285	153	110	82	55.4
			136	81	
				93	65
				108	
Xanthin	153	136	110	82	
			81		
			93		
			108		

3.3.2.2 Fragmentierungsschemata für die untersuchten Nucleoside

Die Ergebnisse der MS^n -Experimente von Standardnucleosiden sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Da keine isotope markierten Verbindungen zur Verfügung standen, handelt es sich bei den folgenden Schemata (Abbildung 24 bis 44) lediglich um Vorschläge für die Fragmentierung. Diese müssen in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

Tabelle 12: Ergebnisse der manuellen MS^n -Experimente

Nucleosid	MS	MS ²	MS ³	MS ⁴
Adenosin	268 (MH ⁺)	136 (BH ⁺)	119 (BH ⁺ -NH ₃)	92 (119 -HCN)
			109 (BH ⁺ -HCN)	
			94 (BH ⁺ -NH ₂ CN)	67 (94 -HCN)
1-Methyladenosin	282 (MH ⁺)	150 (BH ⁺)	133 (BH ⁺ -NH ₃)	106 (133 -HCN)
				92 (133 - CH ₃ CN)
			123 (BH ⁺ -HCN)	
			109 (BH ⁺ -CH ₃ NC)	
		94 (BH ⁺ -CH ₂ NH -HCN)		
N6-Methyladenosin	282 (MH ⁺)	150 (BH ⁺)	133 (BH ⁺ -NH ₃)	106 (133 - HCN)
				92 (133 - CH ₃ CN)
				79 (133 - 2 HCN)
			123 (BH ⁺ -HCN)	108
				96 (123 - HCN)
				82 (123 - CH ₃ CN)
108 (BH ⁺ -NH ₂ CN)				
94 (BH ⁺ - CH ₂ NH - HCN)	69			
	79			
N6,N6-Dimethyladenosin	296 (MH ⁺)	164 (BH ⁺)	121 (BH ⁺ -CH ₂ NCH ₃)	94 (121 -HCN)
				108
			149 (BH ⁺ -CH ₃ ⁺)	
			135 (BH ⁺ -CH ₂ NH)	
		96		
5 ⁻ -Deoxy-5 ⁻ -methylthioadenosin	298 (MH ⁺)	136 (BH ⁺)	119 (BH ⁺ -NH ₃)	92 (119 -HCN)
			109 (BH ⁺ -HCN)	82 (109 -HCN)
			94 (BH ⁺ -NH ₂ CN)	67 (94 -HCN)

Nucleosid	MS	MS ²	MS ³	MS ⁴
Cytidin	244 (MH ⁺)	112 (BH ⁺)	95 (BH ⁺ -NH ₃)	68 (95 -HCN)
			69 (BH ⁺ -HNCO)	
5-Methylcytidin	258 (MH ⁺)	126 (BH ⁺)	109 (BH ⁺ - NH ₃)	
			95 (BH ⁺ - NH ₂ CH ₃)	
			83 (BH ⁺ - HNCO)	
			69	
N4-Acetylcytidin	286 (MH ⁺)	154 (BH ⁺)	112 (BH ⁺ -CH ₂ CO)	95 (112 -NH ₃)
				69 (112 -HNCO)
Inosin	269 (MH ⁺)	137 (BH ⁺)	119 (BH ⁺ -H ₂ O)	92 (119 -HCN)
			110 (BH ⁺ -HCN)	82 (110 -CO)
			94 (BH ⁺ -HCNO)	67 (94 -HCN)
1-Methylinosin	283 (MH ⁺)	151 (BH ⁺)	128	110
				98
			133 (BH ⁺ -H ₂ O)	79 (133 - 2xHCN)
				96
			110 (CH ₃ NC)	82 (110 -CO)
			94 (151 - CH ₃ NCO)	
7-Methylinosin	283 (MH ⁺)	151 (BH ⁺)	133 (BH ⁺ -H ₂ O)	106 (133 -HCN)
				79 (133 -2HCN)
			124 (BH ⁺ -HCN)	
			108 (BH ⁺ -HNCO)	
96 (BH ⁺ -HNC -CO)				
Guanosin	284 (MH ⁺)	152 (BH ⁺)	135 (BH ⁺ -NH ₃)	107 (135 -CO)
				93 (135 -NH ₂ CN)
			110 (BH ⁺ -NH ₂ CN)	80 (135 -CO -HCN)
1-Methylguanosin	298 (MH ⁺)	166 (BH ⁺)	149 (BH ⁺ -NH ₃)	94 (149 -HCN - CO)
			109 (BH ⁺ -CH ₃ NCO)	
2-Methylguanosin	298 (MH ⁺)	166 (BH ⁺)	149 (BH ⁺ -NH ₃)	121 (149 -CO)
			110 (BH ⁺ -CH ₃ NHCN)	
7-Methylguanosin	298 (MH ⁺)	166 (BH ⁺)	149 (BH ⁺ -NH ₃)	121 (149 -CO)
				107 (149 -NH ₂ CN)
				94 (149 -HCN -CO)
				80 (149 -NH ₂ CN - HCN)
			124 (BH ⁺ -NH ₂ CN)	

Nucleosid	MS	MS ²	MS ³	MS ⁴
N ₂ ,N ₂ - Dimethylguanosin	312 (MH ⁺)	180 (BH ⁺)	162 (BH ⁺ - H ₂ O)	
			153 (BH ⁺ - HCN)	
			137 (BH ⁺ - H ₃ CNCH ₂)	
			122 (BH ⁺ - CH ₃ •)	
			110 (137 - HCN)	
Uridin	245 (MH ⁺)	113 (BH ⁺)	96 (BH ⁺ -NH ₃)	68 (96 -CO)
			70 (BH ⁺ -HNCO)	
DHU	247 (MH ⁺)	115 (BH ⁺)	98 (BH ⁺ -NH ₃)	
			73 (BH ⁺ - C ₂ H ₂ O)	
3-Methyluridin	259 (MH ⁺)	127 (BH ⁺)	109 (BH ⁺ - H ₂ O)	
			96 (BH ⁺ - NH ₂ CH ₃)	
5-Methyluridin	259 (MH ⁺)	127 (BH ⁺)	110 (BH ⁺ -NH ₃)	
			82 (BH ⁺ - NH ₃ - CO)	
Xanthosin	285 (MH ⁺)	153 (BH ⁺)	136 (BH ⁺ -NH ₃)	108 (136 -CO)
				81 (136 -HCN -CO)
				93 (136 -HNCO)
			110 (BH ⁺ -HNCO)	82 (110 -CO)

Das Fragment mit der höchsten Intensität in den MS³-Spektren der untersuchten Nucleoside war meistens das durch Abspaltung von Ammoniak entstandene. Daneben konnte sowohl im MS³ als auch in höheren Fragmentierungsschritten der Verlust von HCN beobachtet werden und bei Nucleosiden, die eine Ketogruppe enthalten, der Verlust von CO nach der Abspaltung von Ammoniak. Auf weitere charakteristische Abspaltungen von Neutralteilchen kann durch die in Tabelle 12 gezeigten Massendifferenzen geschlossen werden.

Adenosin und abgeleitete Nucleoside

Wie von Nelson und McCloskey für Adenin beschrieben, wird im zweiten Fragmentierungsschritt bei Adenosin und 5`-Deoxy-5`-methylthioadenosin aus der Adeninbase Ammoniak abgespalten, und zwar nach Ringöffnung des Pyrimidins sowohl von N⁶ als auch N¹. Bei N⁶-Methyladenosin ist die Abspaltung von N⁶ aufgrund der Methylgruppe nicht möglich, während bei

1-Methyladenosin N¹ blockiert ist, sodass bei den methylierten Adenosinen jeweils nur eine Möglichkeit zur Abspaltung zur Verfügung steht. Die weitere Fragmentierung der Isomere verläuft somit verschieden und kann zur Unterscheidung herangezogen werden. Die Fragmentierungsvorschläge für Adenosin und die von ihm abgeleiteten Nucleoside sind in Abbildung 24 bis Abbildung 28 gezeigt.

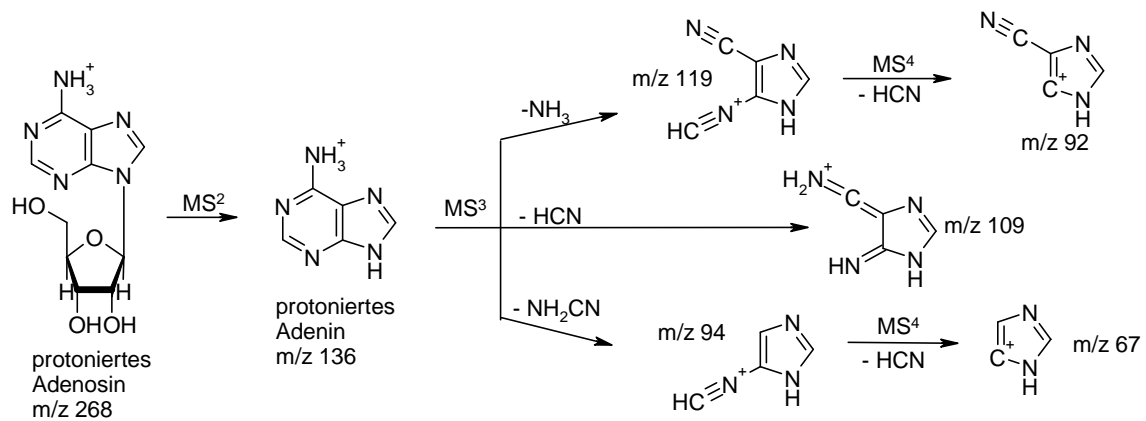


Abbildung 24: Fragmentierungsvorschlag für Adenosin (erweitert nach ⁹²)

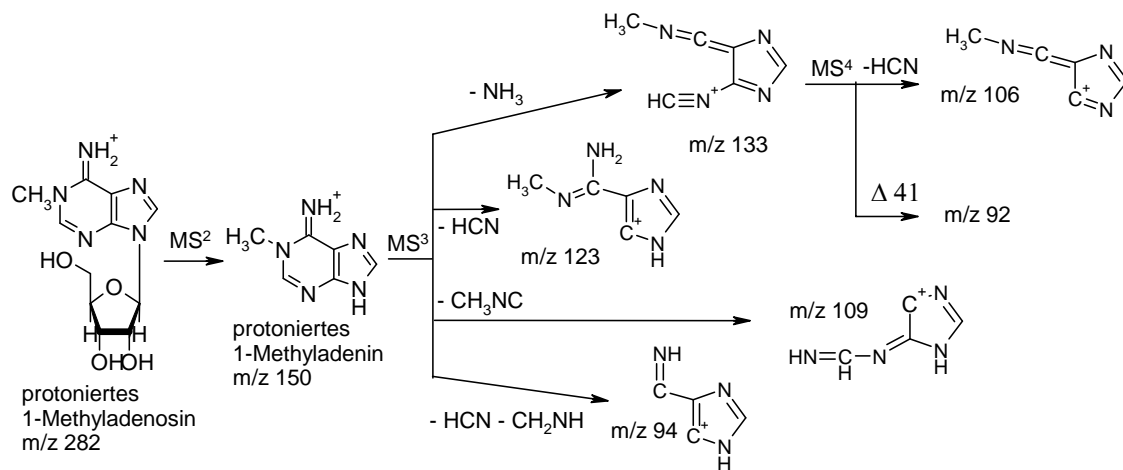


Abbildung 25: Fragmentierungsvorschlag für 1-Methyladenosin

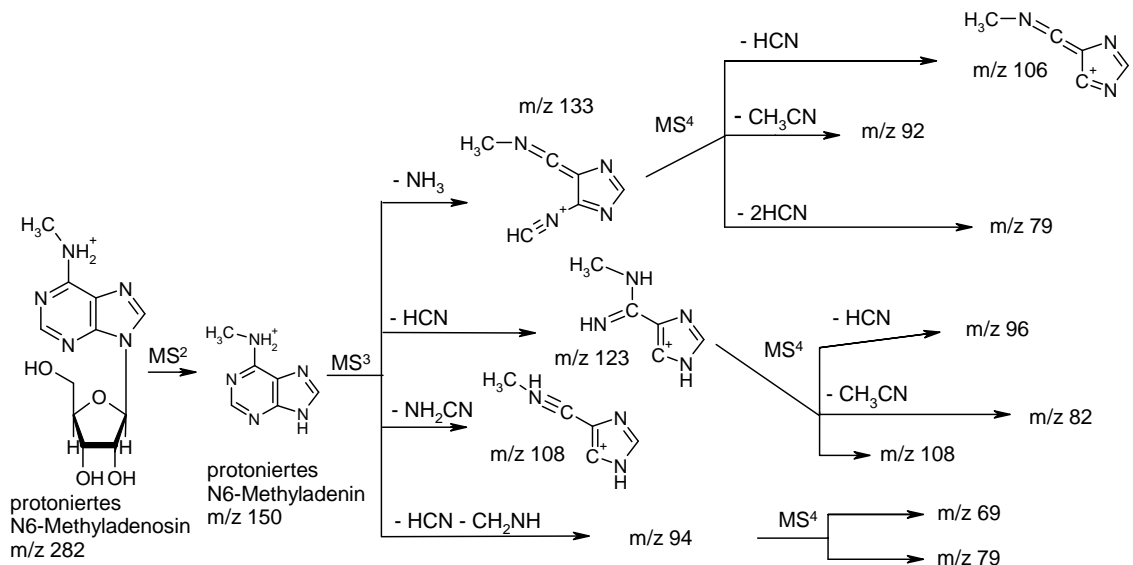


Abbildung 26: Fragmentierungsvorschlag für N6-Methyladenosin

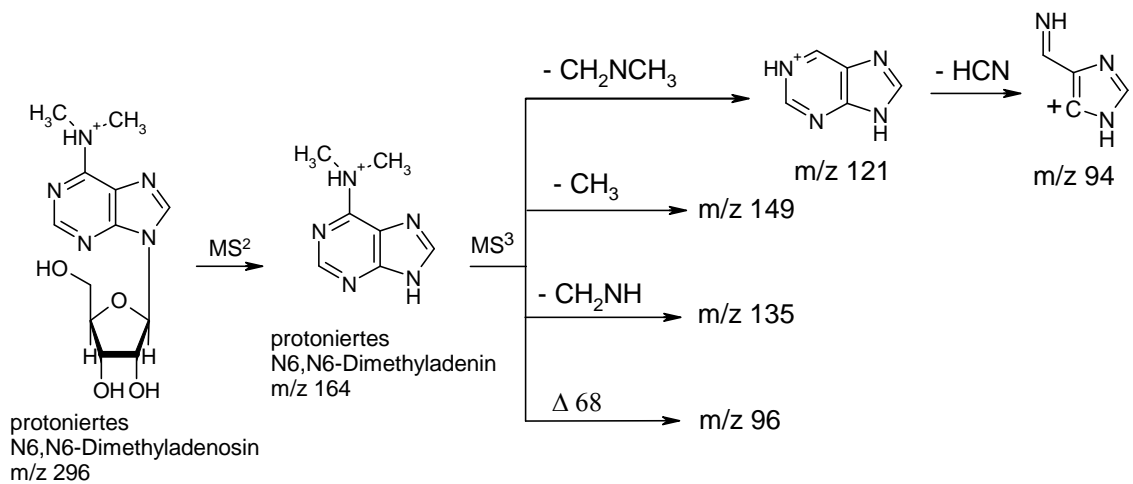


Abbildung 27: Fragmentierungsvorschlag für N6,N6-Dimethyladenosin

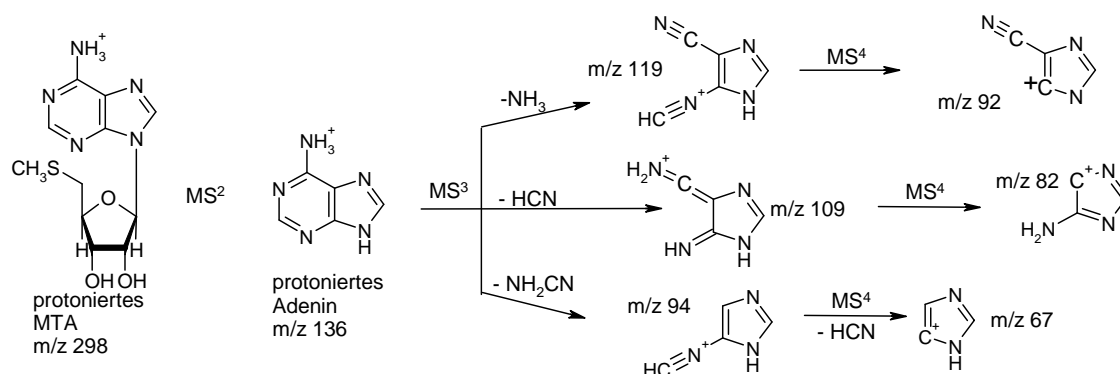


Abbildung 28: Fragmentierungsvorschlag für MTA

Guanosin und abgeleitete Nucleoside

Guanosin ist ein Purin-Nucleosid mit einer Aminogruppe in C2-Position. Die Abspaltung von Ammoniak nach Ringöffnung ist prinzipiell von N² und N1 möglich. Die Abspaltung aus der Imidazoleinheit ist unwahrscheinlich, während die Pymiridineinheit zwischen N1 und O⁶ sowie C2 und N3 zwei schwache Bindungen besitzt, die leicht gespalten werden können.⁹⁸ Die weitere Fragmentierung des Fragmentes m/z 135 ergibt ein Fragment m/z 107. Die Massendifferenz von 28 u spricht für den Verlust von CO (C6 und O⁶). Das Fragment m/z 110 entsteht durch retro-Diels-Alder-Reaktion unter Abspaltung von Cyanamid, wie von Rice und Dudek beschrieben.⁹³

Die drei isomeren Methylguanosine zeigen ähnliche Fragmente in den MS² und MS³-Spektren. Wie Guanosin verlieren sie in den MS³-Experimenten zunächst Ammoniak, wobei ein Fragment m/z 149 entsteht. Bei 1-Methylguanosin ist N1 durch die Methylgruppe blockiert, daher wird Ammoniak vermutlich an N² abgespalten. Das zweite MS³-Fragment m/z 109 könnte durch Abspaltung von CH₃NCO (C¹, N1, C6 und O⁶) entstanden sein. Das MS³ Fragment m/z 94 ist ein mögliches Produkt der Eliminierung von HCN und CO aus m/z 149. 2-Methylguanosin zeigt aufgrund der Position der Methylgruppe in Position N² in MS³- und MS⁴-Experimenten eine abweichende Fragmentierung im Vergleich zu den anderen Methylguanosinen. Hier ist die Abspaltung von Ammoniak nur an Position N1 möglich. Im nächsten Fragmentierungsschritt wird vermutlich

CH_3NHCN (C_{methyl} , N^2 , $\text{C}2$, $\text{N}3$) eliminiert, wobei m/z 110 entsteht. Der vorgeschlagene Mechanismus für die Fragmentierung ist in Abbildung 31 gezeigt.

Das Fragment m/z 124 aus dem MS^3 -Spektrum von 7-Methylguanosen ist wahrscheinlich auf den Verlust von NH_2CN (N^2 , $\text{C}2$, $\text{N}3$) zurückzuführen. NH_2CN ist ein Fragment, das bei Nucleosiden häufig vorkommt. Auf dessen Abspaltung kann durch eine Massendifferenz von 42 geschlossen werden, wie z.B. auch bei Adenosin und Guanosen.

Durch die oben beschriebene unterschiedliche Fragmentierung ist es möglich, zwischen den drei Methylguanosen-Isomeren zu unterscheiden. In Abbildung 29 bis Abbildung 32 sind die Vorschläge für die Fragmentierungswege von Guanosen und seinen Metaboliten gezeigt.

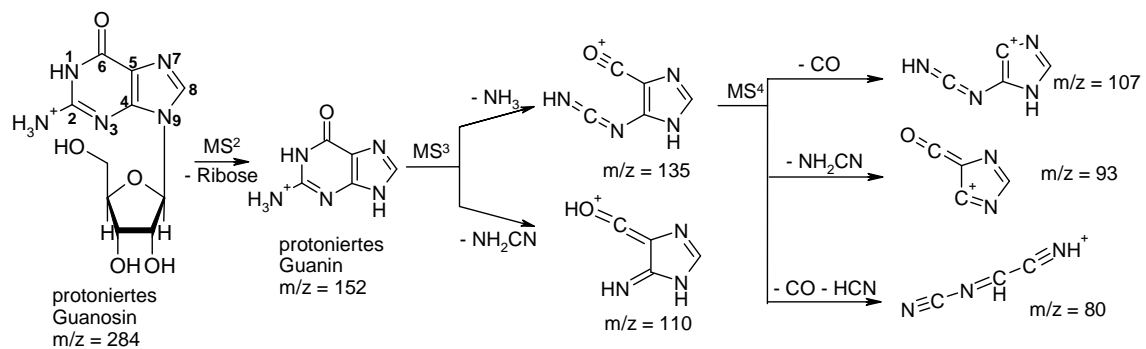


Abbildung 29: Fragmentierungsvorschlag für Guanosen (erweitert nach ⁹⁷)

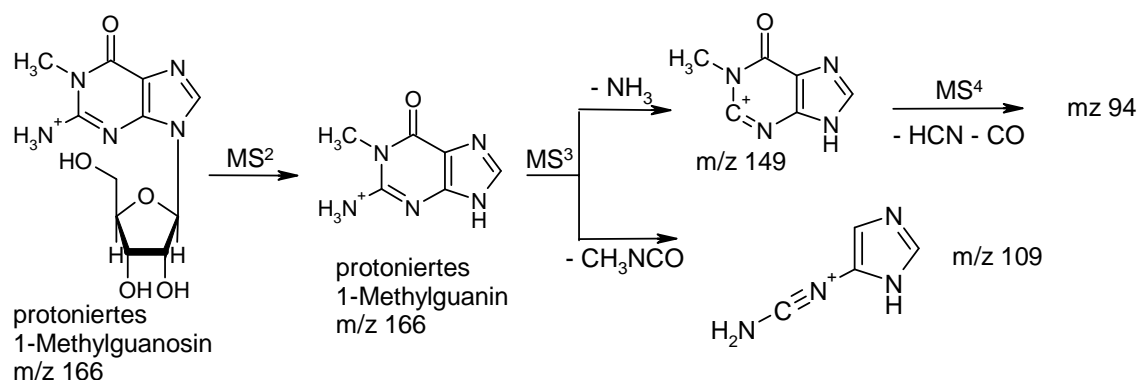
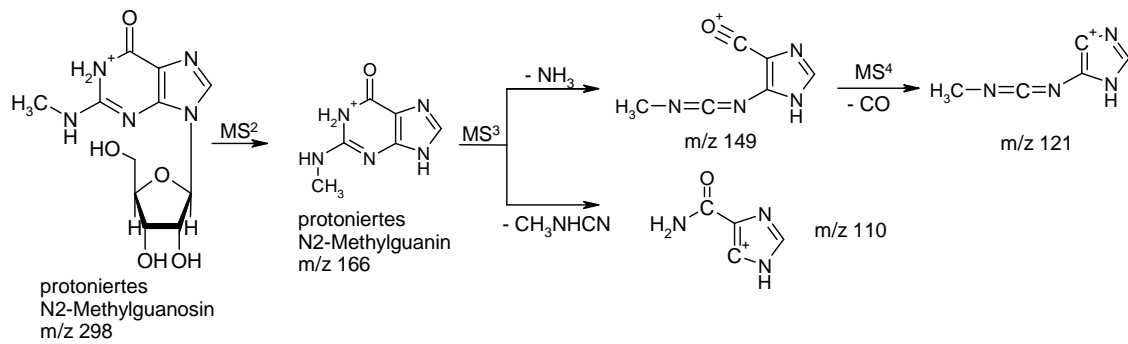


Abbildung 30: Fragmentierungsvorschlag für 1-Methylguanosen



1. Ringöffnung

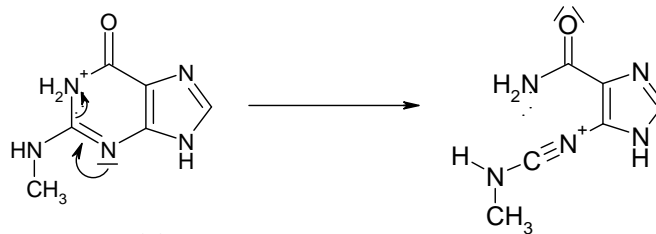
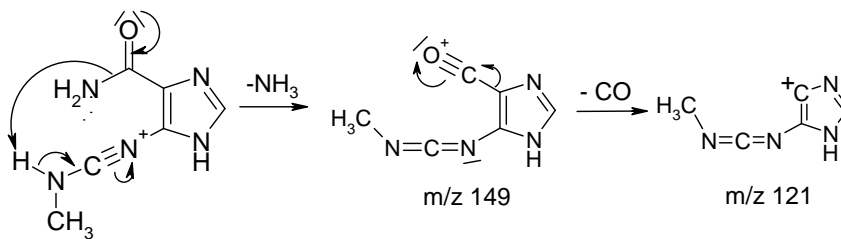
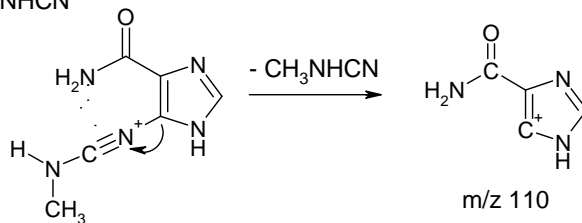
2. Abspaltung von NH₃ und CO3. Abspaltung von CH₃NHCN

Abbildung 31: Fragmentierungsvorschlag mit Mechanismus für 2-Methylguanosin

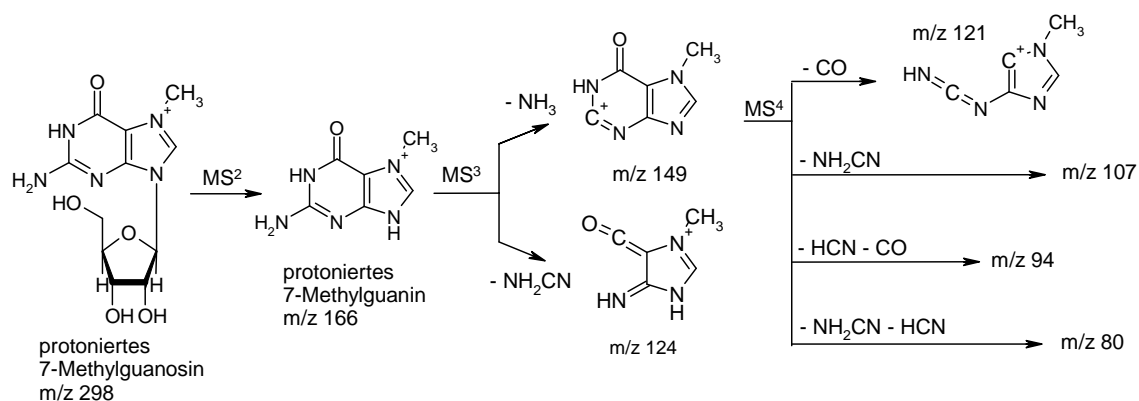


Abbildung 32: Fragmentierungsvorschlag für 7-Methylguanin

N₂,N₂-Dimethylguanin, die Nucleinbase von N₂,N₂-Dimethylguanidin, erzeugt im MS³-Fragmentierungsschritt die Fragmente m/z 110, m/z 122, m/z 137, m/z 153 und m/z 162. Ein Vorschlag für den Fragmentierungspfad ist in Abbildung 33 gezeigt.

Das Fragment m/z 162 mit einer Massendifferenz von 18 u zum Basenfragment spricht für den Verlust von Wasser. Das Fragment m/z 153 könnte durch die Abspaltung von HCN entstanden sein, wobei diese im 5-Ring erfolgen muss.

Durch Eliminierung von H₃CNCH₂ wird die Seitenkette entfernt, wobei das Fragment m/z 137 entsteht. Anschließend kann HCN unter Bildung von m/z 110 abgespalten werden.

Eine andere Erklärung für das Fragment m/z 137 ist der Verlust von HNCO. Außerdem tritt im MS³ ein Fragment m/z 122 auf, welches zu m/z 137 eine Massendifferenz von 15 u aufweist. Diese Massendifferenz ist ein Hinweis auf den Verlust eines Methylradikals von N² im Anschluss an die HNCO-Abspaltung.

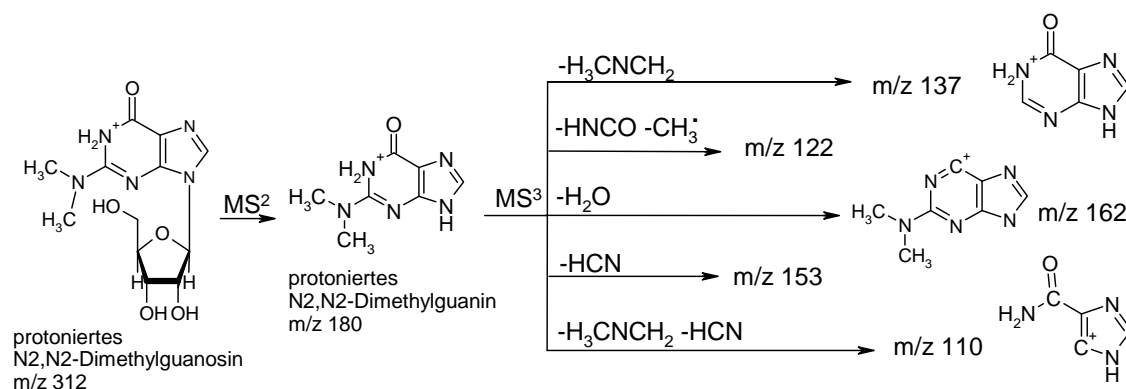


Abbildung 33: Fragmentierungsvorschlag für N₂,N₂-Dimethylguanosin

Inosin und abgeleitete Nucleoside

Inosin und seine Metabolite besitzen eine Ketogruppe und zeichnen sich durch den Verlust von Wasser (O⁶) aus. Die Abspaltung von Ammoniak wird nicht beobachtet. Der auffälligste Unterschied zu den übrigen Nucleosiden mit Ketogruppe ist die freie C2-Position. Substituenten wie Amino- oder Ketogruppen destabilisieren möglicherweise die N1-C2-Bindung. Diese Bindung ist bei Inosin stabiler. Daher wird nur die Eliminierung von Wasser beobachtet. Das Fragmentierungsschema von Inosin zeigt Abbildung 34.

Die an Position 1 bzw. 7 methylierten Inosine lassen sich, ähnlich wie die methylierten Guanosine, anhand ihrer MS³-Spektren voneinander unterscheiden (vgl. Abbildung 35 und Abbildung 36).

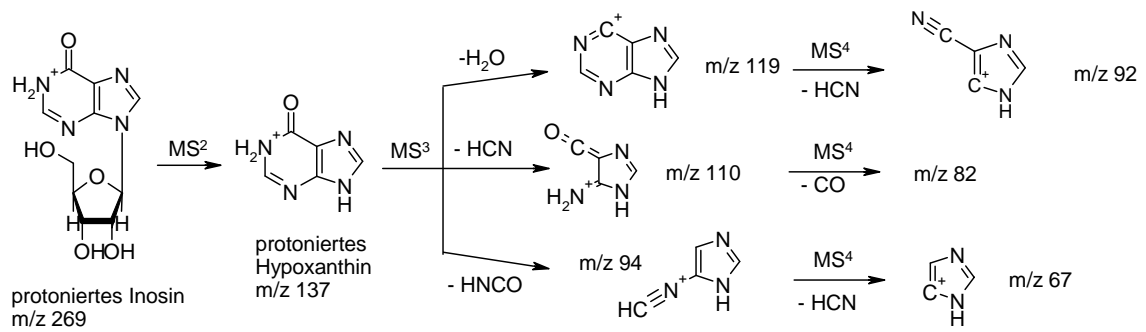


Abbildung 34: Fragmentierungsvorschlag für Inosin

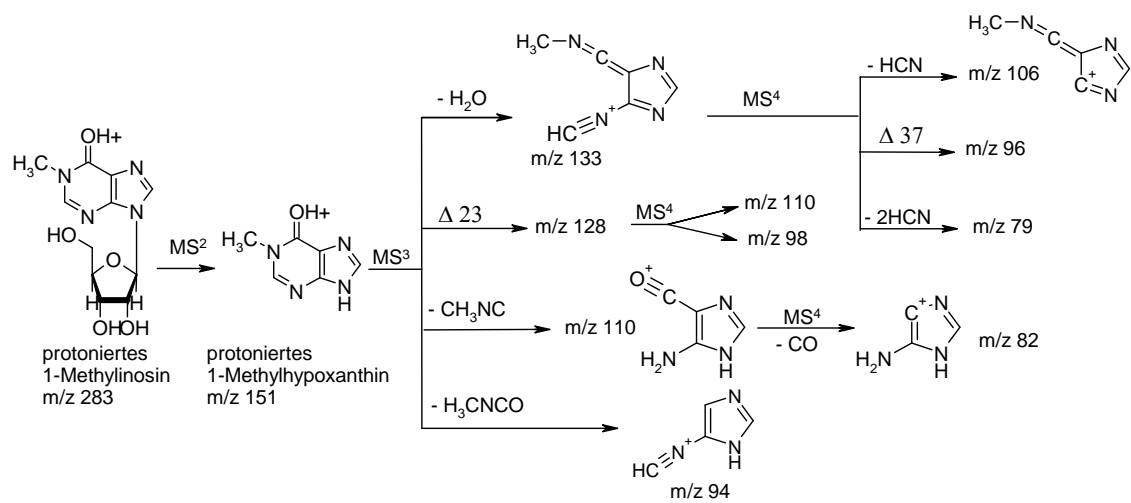


Abbildung 35: Fragmentierungsvorschlag für 1-Methylinosin

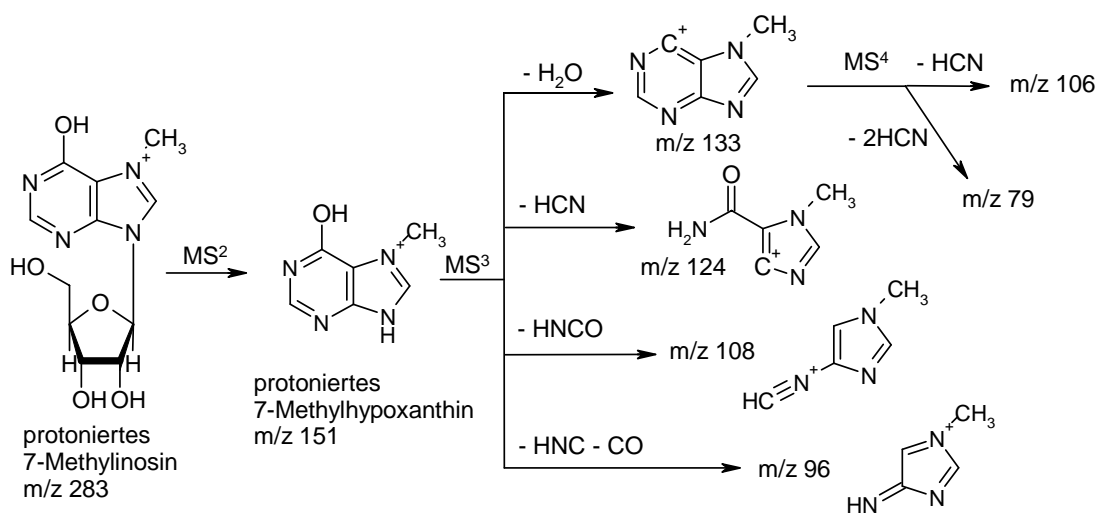


Abbildung 36: Fragmentierungsvorschlag für 7-Methylinosin

Uridin und abgeleitete Nucleoside

Nelson et al. untersuchten den Zerfall von Uracil und dessen Metaboliten mittels CID (Collision Induced Dissociation) und ermittelten zwei verschiedene Fragmentierungswege.⁹⁶ Die protonierte Uracilbase zerfällt, indem zunächst Ammoniak (N3) und anschließend CO (C4, O⁴) abgespalten werden. Der zweite Fragmentierungsweg nach Nelson und McCloskey beginnt mit dem Verlust von Wasser (sowohl von O² als auch O⁴), gefolgt von der Eliminierung von HNCO (hauptsächlich N3, C2 und O²).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde nur der zuerst beschriebene dieser beiden Fragmentierungswege beobachtet.

Die Abspaltung von HNCO wurde ebenfalls beobachtet, wie in Abbildung 37 dargestellt, allerdings keine Eliminierung von Wasser. Dieser Unterschied könnte auf die unterschiedlichen Kollisionsgase zurückgeführt werden. In der Ionenfalle wird Helium verwendet, während bei der Kollisionszelle Argon eingesetzt wird. Argon ist schwerer und daher effizienter für die Generierung von Fragmentationen.¹⁰²

Die Bildung des Fragmentions m/z 70 durch Abspaltung von HNCO aus der protonierten Uracilbase erfolgt unter retro-Diels-Alder-Reaktion, wie von Nelson und McCloskey beschrieben.⁹⁶

Bei 5,6-Dihydrouridin erfolgt analog zum Uridin Abspaltung von Ammoniak. Aufgrund der fehlenden Doppelbindung kommt es nicht zum retro-Diels-Alder-Mechanismus, sondern zur Abspaltung von C₂H₂O unter Bildung von m/z 73 wie in Abbildung 38 gezeigt.

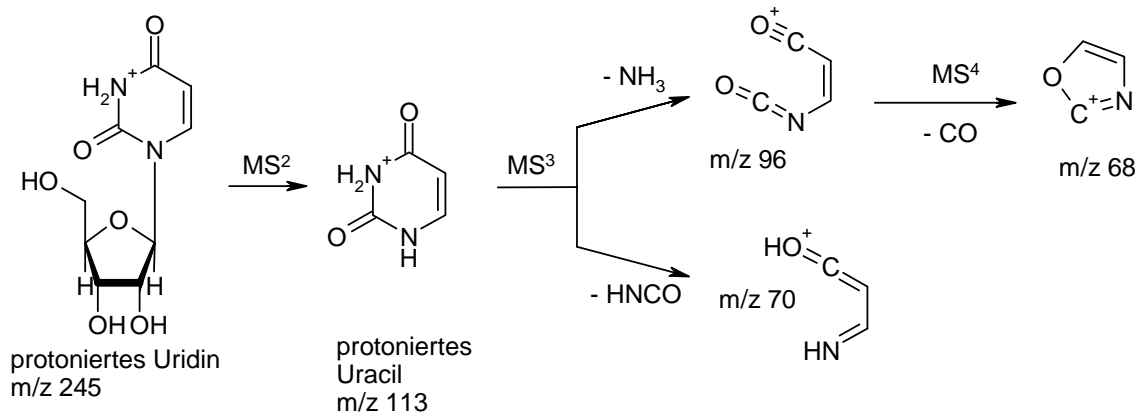
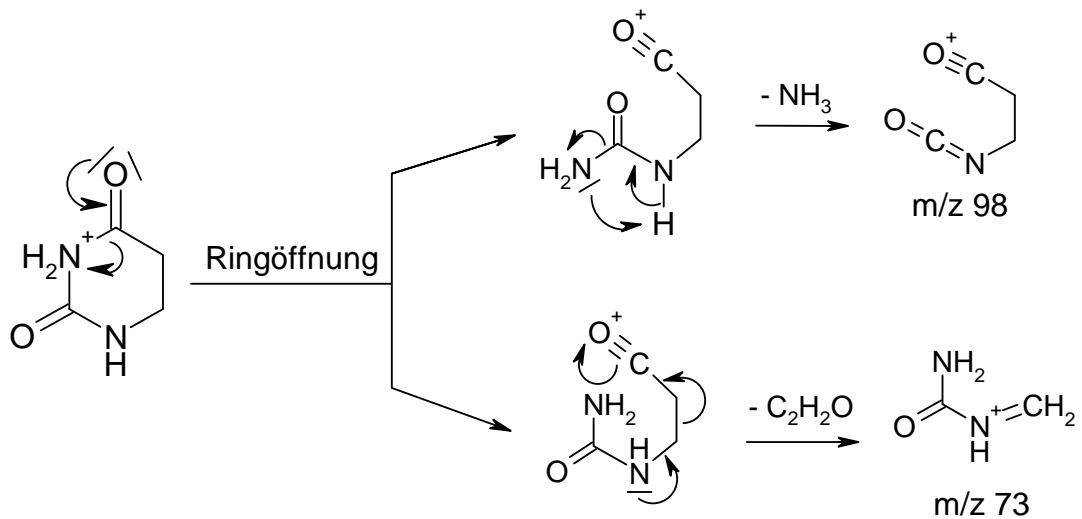
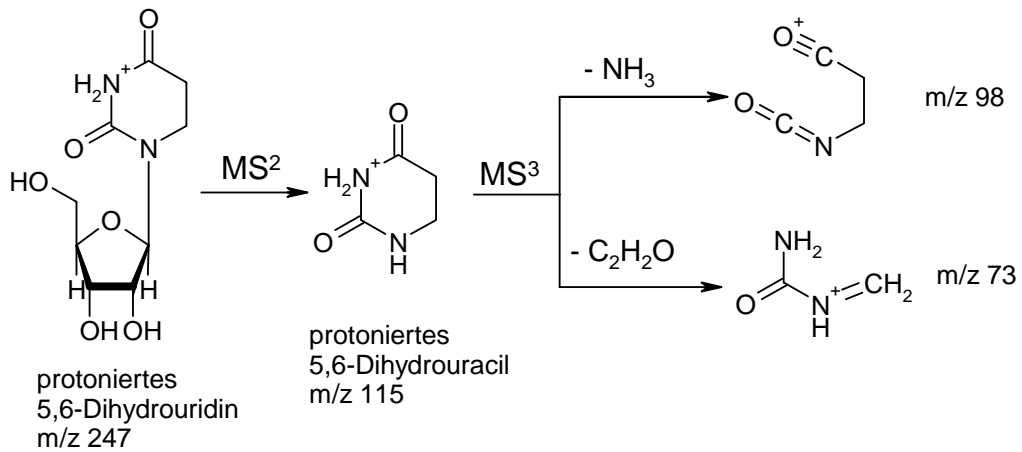
Abbildung 37: Fragmentierungsvorschlag für Uridin (erweitert nach ⁹⁶)

Abbildung 38: Fragmentierungsvorschlag mit Mechanismus für DHU

Nelson und McCloskey zeigten die Fragmentierung von 3-Methyluracil und 5-Methyluracil mittels CID. Dabei ergaben sich für 3-Methyluracil u.a. die Fragmente m/z 109 ($MH^+ - H_2O$), m/z 96 ($MH^+ - CH_3NH_2$) und m/z 70 ($MH^+ - CH_3NCO$) und für 5-Methyluracil u.a. m/z 110 ($MH^+ - NH_3$) und m/z 84 ($MH^+ - HNCO$).⁹⁶

Die ESI-ITMS-Fragmentierung der entsprechenden Nucleoside ergab ähnliche, aber nicht identische Fragmente. Bei 3-Methyluridin sind ebenfalls die Fragmente m/z 109 und m/z 96 zu sehen (Abbildung 39). 5-Methyluridin verliert bei Anwendung von CID nach Nelson und McCloskey im MS^3 durch den retro-Diels-Alder-Mechanismus $HNCO$. Dieses Fragment konnte bei den durchgeführten Fragmentierungsexperimenten nicht nachgewiesen werden, dafür aber analog zu Nelson und McCloskey m/z 110 und m/z 82, welches durch Abspaltung von Ammoniak sowie CO erklärt werden kann, wie in Abbildung 40 zu sehen.

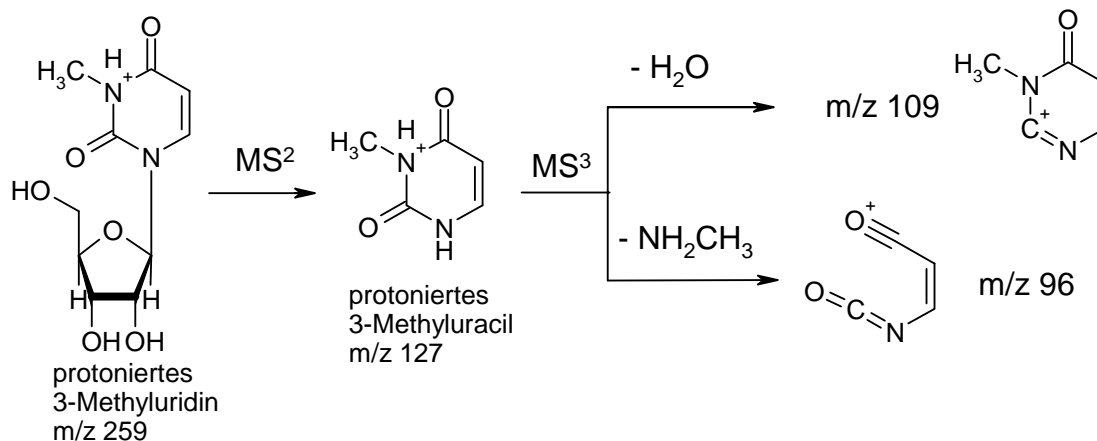


Abbildung 39: Fragmentierungsvorschlag für 3-Methyluridin

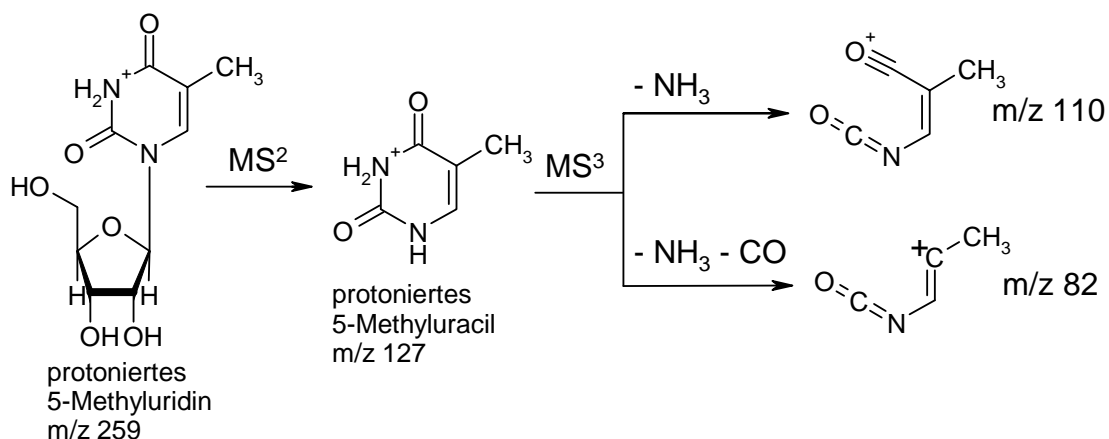
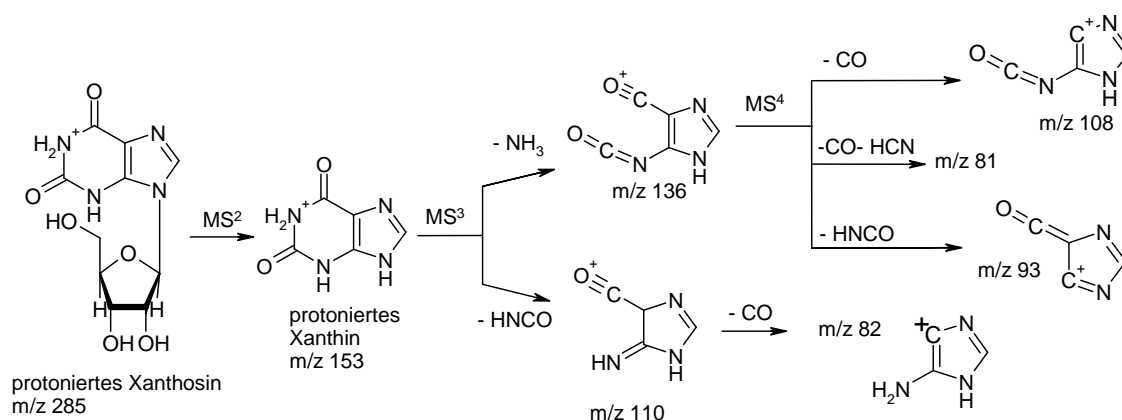


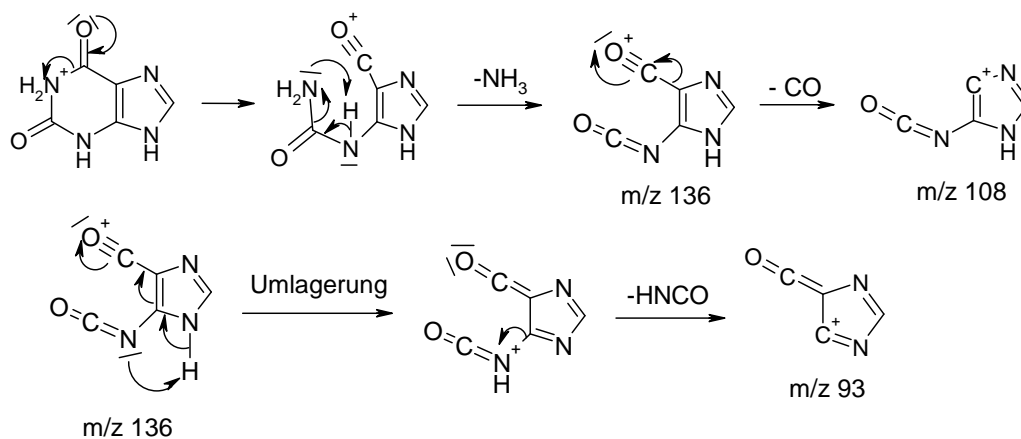
Abbildung 40: Fragmentierungsvorschlag für 5-Methyluridin

Xanthosin

Xanthosin verhält sich bei der Fragmentierung ähnlich wie Uridin. Beide Nucleoside besitzen zwei Ketogruppen in analogen Positionen (C2, C4), die durch ein Stickstoffatom getrennt sind. Wie bei Uridin wurde bei Xanthosin keine Abspaltung von Wasser beobachtet, sondern eine Eliminierung von HNCO durch retro-Diels-Alder-Reaktion (N1, C2 und O²). Im Anschluss erfolgt der Verlust von CO (C2 und O²) unter Bildung von m/z 82. Der zweite Mechanismus zur Ringöffnung ist die Abspaltung von Ammoniak (N1), wobei m/z 136 entsteht. Anschließend können sowohl HNCO (N3, C2, O²) als auch CO (O² oder O⁶) und HCN eliminiert werden. Das Fragmentierungsschema mit Mechanismus für Xanthosin ist in Abbildung 41 gezeigt.



1. Ringöffnung und Abspaltung von NH_3 und CO



2. Retro-Diels-Alder-Eliminierung von HNCO und Abspaltung von CO

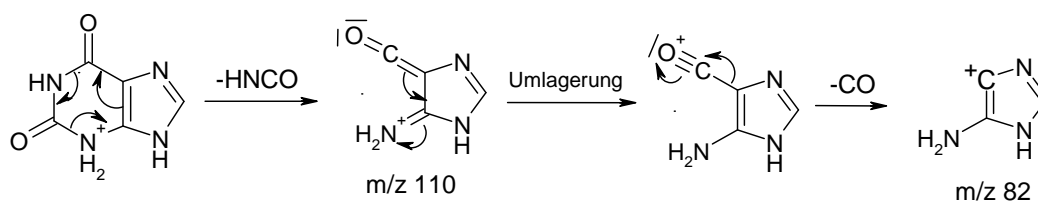


Abbildung 41: Fragmentierungsvorschlag mit Mechanismus für Xanthosin

Cytidin und abgeleitete Nucleoside

Cytidin ist ein weiteres Pyrimidin-Nucleosid, das wie Uridin im MS^3 der Cytosinbase Ammoniak verliert (N^3 oder N^4). Es entsteht ein Fragment m/z 95, welches im nächsten Fragmentierungsschritt HCN abspaltet. Daneben tritt ein Fragment m/z 69 auf, das durch retro-Diels-Alder-Reaktion unter Abspaltung von HNCO entsteht. Das Fragmentierungsschema ist in Abbildung 42 gezeigt.

Aus N^4 -Acetylcytidin bildet sich nach Abspaltung der Riboseeinheit zunächst unter Eliminierung der Acetylgruppe Cytidin, welches wie oben beschrieben weiter zerfällt (vgl. Abbildung 43).

5-Methylcytidin zeigt im Fragmentierungsverhalten im Gegensatz zum Cytidin eine Abspaltung von HNCO. Daneben werden Ammoniak (N^3 oder N^4) und NH_2CH_3 eliminiert (Abbildung 44).

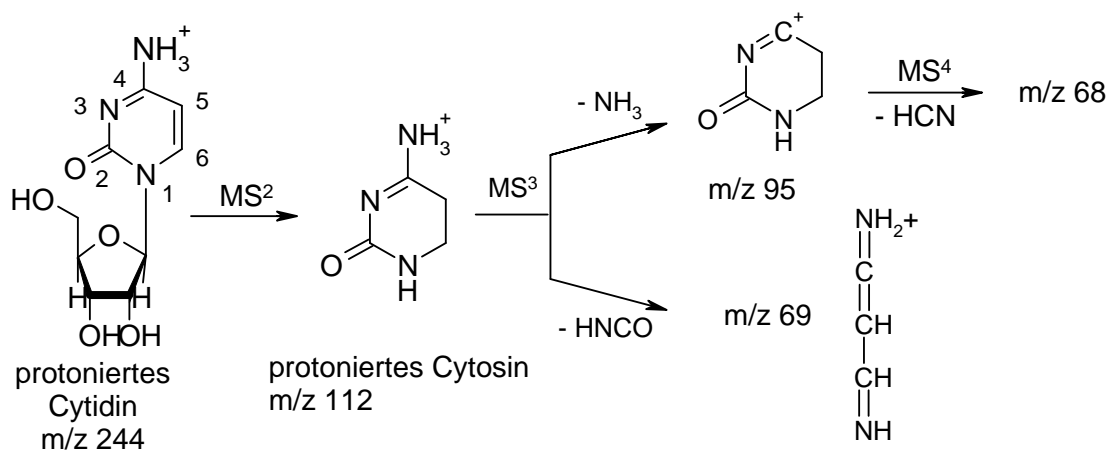


Abbildung 42: Fragmentierungsvorschlag für Cytidin

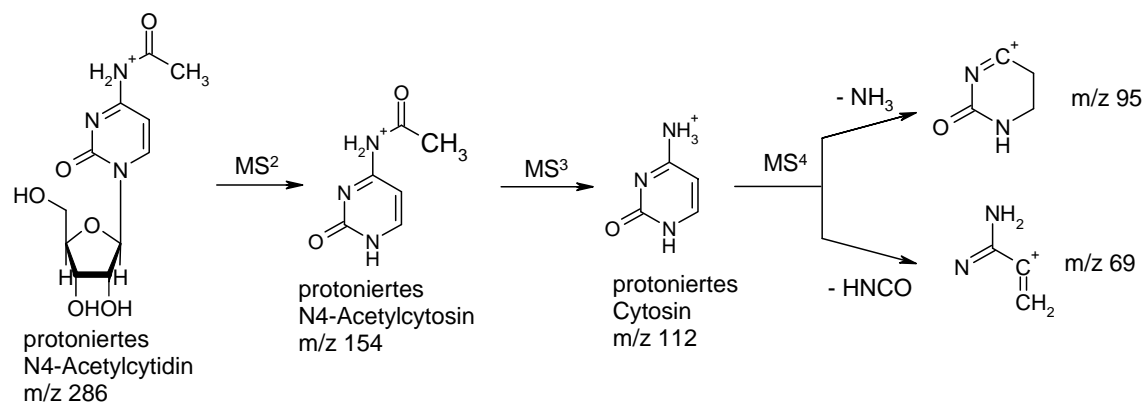


Abbildung 43: Fragmentierungsvorschlag für N4-Acetylcytidin

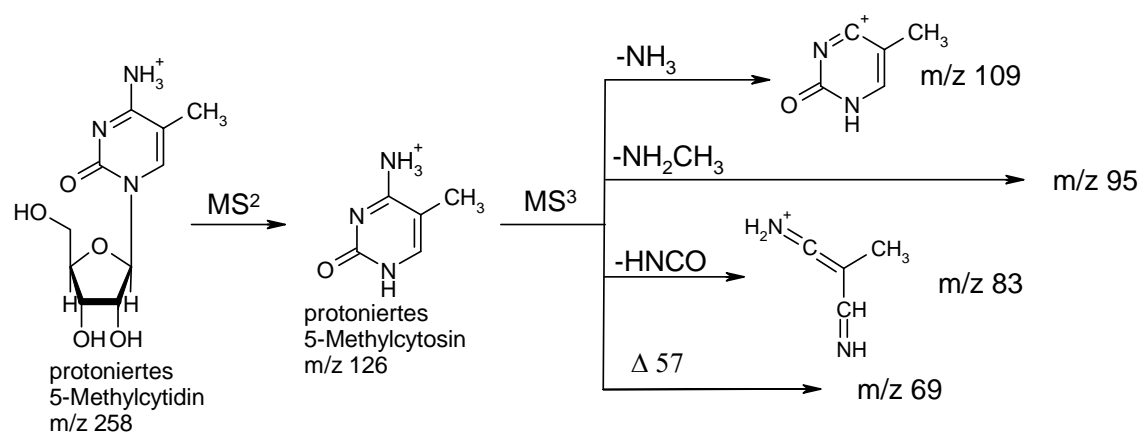


Abbildung 44: Fragmentierungsvorschlag für 5-Methylcytidin

Aufgrund der Strukturen der untersuchten Nucleoside und deren Fragmentierungsmuster konnten verschiedene Massendifferenzen bestimmten Fragmentierungen zugeordnet werden. Eine Übersicht über die häufig auftretenden neutralen Verluste bei der Fragmentierung bietet Tabelle 13.

Tabelle 13: Übersicht zur Zuordnung von Massendifferenzen bei der Fragmentierung von Nucleosiden

Massendifferenz	Neutralverlust von
17	NH ₃
18	H ₂ O
27	HCN
28	CO
29	CH ₂ NH
30	HCHO
31	NH ₂ CH ₃
41	CH ₃ CN
42	NH ₂ CN oder C ₂ H ₂ O
43	HNCO
44	CO ₂ oder C ₂ H ₄ O
46	HCOOH
57	CH ₃ NCO
60	CH ₃ COOH

3.3.2.3 Auto-MS³-Methode

Für die Entwicklung einer neuen LC-auto-MS³-Methode wurden zunächst die Tune Parameter der Ionenfalle für die zur Verfügung stehende Standardnucleosid-Lösungen (je 10 µg/ mL in MeOH/H₂O, 1/1, v/v, 0.1 % FA) mittels Spritzenpumpeninjektion untersucht. Die Basis-Parameter des Ionenfallen-MS-Systems (Kapillarspannung, Cap Exit Spannung, Skimmerspannung, Octopol Spannungen, Trap Drive) wurden einer Optimierung in Bezug auf Ionenintensität unterzogen. Da die optimalen Tune Parameter für die verschiedenen Nucleoside unterschiedlich ausfielen, wurde der HPLC-Lauf in sechs Zeitsegmente mit jeweils zwei bis vier Nucleosiden der Standardlösung eingeteilt, um für alle Nucleoside möglichst hohe Intensitäten zu erhalten. Der Massenbereich wurde für alle Segmente zwischen 50 und 500 Da gewählt, da alle bekannten Nucleoside Massen in diesem Bereich aufweisen.

Die Parameter der Ionenfalle wurden für maximale Sensitivität im positiven Ionenmode im Massenbereich von 50 bis 500 Da optimiert. Dazu wurden 16 Standardnucleoside in Konzentrationen von 10 µg/ mL mittels Spritzenpumpe injiziert. Für die einzelnen Segmente wurden die Parameter so gewählt, dass die Intensitäten für alle in den einzelnen Segmenten liegenden Standardnucleoside möglichst maximal waren. Dazu wurde aus den optimierten Werten ein Mittelwert gebildet. Bei stark unterschiedlichen Optima wurden die Werte denen der Minorkomponenten angenähert, um diese in jedem Fall erfassen zu können.

Weiterhin wurden bevorzugte Massen für die Fragmentierung angegeben. Diese werden im Fall ihres Auftretens auch dann fragmentiert, wenn sie nicht die höchste Intensität der gleichzeitig eluierenden Komponenten aufweisen.

Die optimierten Tune Parameter der MS³-Methode sind unter 3.5 genannt.

Reproduzierbarkeit der Retentionszeit

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurde der Nucleosidstandard elfmal eingespritzt. Die Standardabweichung der Retentionszeiten lag zwischen 0.02 und 0.36 min.

Nachweisgrenzen

Um die Nachweisgrenzen der im Nucleosidstandard enthaltenen Nucleoside zu ermitteln, wurde die Standardlösung 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:5000 verdünnt. Diese Lösungen wurden nach aufsteigender Konzentration gemessen. Die Nachweisgrenzen wurden bei derjenigen Konzentration festgelegt, bei der ein Signal/Rausch-Verhältnis von ca. 3 vorlag. Die abgeschätzten Nachweisgrenzen der Nucleoside bewegen sich zwischen 100 fmol und 9.6 pmol, wie in Tabelle 14 zu sehen. Diese Nachweisgrenzen sind besser als die von Dudley et al. mit der Ionenfalle bestimmten.⁶⁸

Tabelle 14: Vergleich der ermittelten Nachweisgrenzen mit Literaturdaten

	NWG [pmol]	Dudley et al. (Ionenfalle)⁶⁸	Dudley et al. LC/ITMS⁶⁶	Dudley et al. CapLC/QTMS⁶⁶
Cytidin	0.6	45 pmol	22.5 pmol	1.85 pmol
Uridin	1.2	110 pmol	-	-
Guanosin	0.6	41.3 pmol	-	-
Adenosin	0.3	28.5 pmol	14.25 pmol	28.1 fmol
Inosin	0.5	45.5 pmol	-	-
Xanthosin	0.5	82.4 pmol	-	-
m5U	2.4	-	-	-
m3U	1.2	-	-	-
m1I	0.1	-	-	-
m1G	0.2	-	7.1 pmol	16.85 fmol
m2G	0.1	-	-	-
m6A	0.2	-	-	-
m1A	0.1	-	2.59 pmol	17.8 fmol
Pseudouridin	9.6	19 pmol	-	-
MTA	0.4	-	-	-
Isoguanosin	0.2	-	-	-
DHU	5.1	-	-	-

3.3.3 Urinproben

Das Nucleosidmuster in Urinproben unterliegt gewissen Schwankungen, aber bei Brustkrebspatientinnen und in Kontrollproben treten prinzipiell die gleichen Komponenten auf. Daher wurde mit der auto-LC-MS³-Methode eine Urinprobe einer 63-jährigen Brustkrebspatientin mit einem *Carcinoma Duktale In Situ* (DCIS) untersucht, um die enthaltenen Nucleoside näher zu charakterisieren.

Das in Abbildung 45 dargestellte Constant Neutral Loss Chromatogramm zeigt alle Komponenten der extrahierten Urinprobe, die einen Neutralverlust von 132 u im ersten Fragmentierungsschritt aufweisen. Diese Massendifferenz weist auf Nucleoside hin, bei denen die Riboseeinheit abgespalten wird. Es werden somit alle Nucleoside aus der Urinprobe erfasst, die die Riboseeinheit als Zucker besitzen. Am Zucker modifizierte Nucleoside werden nicht erfasst, sie können jedoch in Constant Neutral Loss Chromatogrammen mit anderen Neutralverlusten gezeigt werden. Ein Beispiel stellt MTA dar, bei dem Methylthioribose als Zuckereinheit vorliegt. An den Hydroxygruppen der Positionen 3 und 4 der Ribose modifizierte Nucleoside werden aufgrund der fehlenden cis-Diol-Struktur bei der Extraktion nicht erfasst.

In der untersuchten Urinprobe konnten neben dem internen Standard 38 Substanzen mit einem Neutralverlust von 132 u detektiert werden. Die MS³-Spektren liefern wertvolle Hinweise auf die Struktur der Komponenten. Dabei werden die Ergebnisse der Spritzenpumpenexperimente als Vergleich zur Auswertung herangezogen. Die Nucleoside DHU, Cytidin, Uridin, 1-Methyladenosin, 5-Methyluridin, 3-Methyluridin, Xanthosin, 1-Methylinosin, 1-Methylguanosin, 5-Methylcytidin, N4-Acetylcytidin, 2-Methylguanosin, Adenosin, N6-Methyladenosin, N2,N2-Dimethylguanosin, MTA und t6A wurden bereits anhand der Retentionszeiten im Vergleich mit einem Standardchromatogramm in der Urinprobe identifiziert. Auch ohne diese Zuordnung konnten die entsprechenden Nucleoside anhand der Massenspektren identifiziert werden.

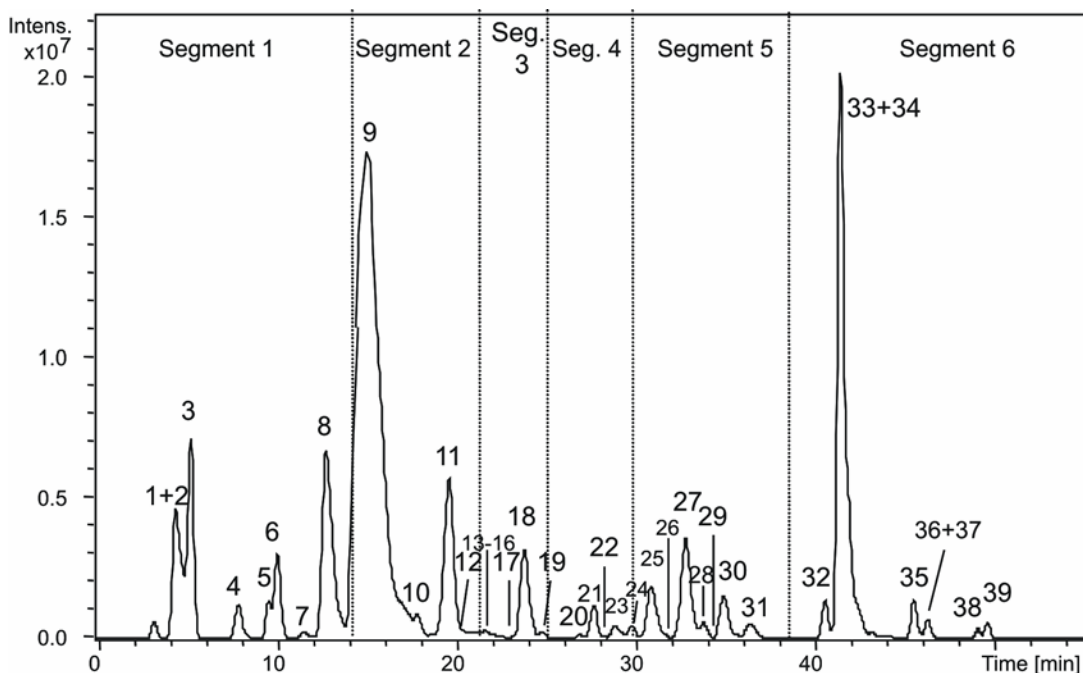


Abbildung 45: Constant Neutral Loss Chromatogramm (132 u)

Weitere Peaks konnten einem Strukturisomer von Adenosin, N¹,N⁶-Dimethyladenosin, N²,N²,N⁷-Trimethylguanosen, 3-(3-Amino-3-carboxypropyl)-uridin, 5-Methylaminomethyl-2-selenouridin, N⁶-Succinyladenosin, 2-Methyl-N⁶-(cishydroxyisopentenyl)-adenosin und zwei PCNR-Isomeren zugeordnet werden. Die Zuordnungen erfolgten über die Summenformel, die aufgrund der genauen Masse berechnet wurde, sowie mit Hilfe des Fragmentierungsmusters, wie in Tabelle 15 zusammengefasst. Da keine isotopenmarkierten Verbindungen zur Verfügung standen, handelt es sich bei den folgenden Schemata (Abbildung 46 bis Abbildung 59) lediglich um Vorschläge für die Fragmentierung. Diese müssen in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

Tabelle 15: Fragmentierungsmuster der in der untersuchten Urinproben enthaltenen Nucleoside (normal: identifizierte Nucleoside, kursiv: Strukturvorschläge aufgrund von Summenformel und Fragmentierung)

	Nucleosid	MS	MS²	MS³
1	1-D-Ribofuranosyl-1H-imidazol-4-essigsäure	259	127	81
2	Nicotinamidribosid	255	123	80, 96, 106
3	5,6-Dihydrouridin (DHU)	247	115	73, 98
4	Cytidin	244	112	69, 95
5	1-Ribosylpyridin-4-on	228	96	68, 78
6	<i>3-(3-Amino-3-carboxypropyl)-uridin</i>	346	214	113, 168, 197
7	Uridin	245	113	70, 96
8	5-Methylcytidin	258	126	69, 83, 95, 109
9	1-Methyladenosin	282	150	82, 94, 109, 123, 133
10	<i>1-Ribosylpyridin-2-on-5-carboxamid</i>	271	139	78, 94, 96, 112, 122
11	Isoguanosin (Interner Standard)	284	152	135
12	<i>N4-Acetyl-N4-methylcytidin oder N4-Propionylcytidin</i>	300	168	95, 112, 150
13	5-Methyluridin	259	127	82, 110
14	Inosin	269	137	84, 94, 110, 119
15	7-Methylguanosin	298	166	96, 107, 124, 142, 149
16	Guanosin	284	152	110, 128, 135
17	?	301	169	109, 127, 137
18	<i>1-Ribosylpyridin-3-on-4-carboxamid</i>	271	139	78, 94, 112, 122
19	<i>1,N6-Dimethyladenosin</i>	296	164	96, 108, 123, 135, 149
20	3-Methyluridin	259	127	96, 109
21	Xanthosin	285	153	110, 136
22	<i>2-Aminopurin-9-ribosid</i>	268	136	94, 109, 119
23	?	293	161	91, 116, 134, 143

	Nucleosid	MS	MS²	MS³
24	<i>5-Methylaminomethyl-2-selenouridin</i>	351	219	155, 173, 201
25	1-Methylinosin	283	151	94, 110, 128
26	<i>N6-Succinyladenosin</i>	384	252	136, 148, 162, 192, 206, 234
27	1-Methylguanosin	298	166	109, 128, 136, 149
28	N4-Acetylcytidin	286	154	112
29	?	293	161	91, 106, 116, 134, 143
30	2-Methylguanosin	298	166	110, 149, 135, 128
31	Adenosin	268	136	94, 112, 119, 109
32	<i>2-Methylthio-N6-(cishydroxyisopentenyl)adenosin</i>	398	266	194, 165, 182, 248, 231
33	<i>N2,N2,7-Trimethylguanosin</i>	326	194	124, 136, 149, 167, 179
34	N2,N2-Dimethylguanosin	312	180	110, 122, 137, 153, 162
35	N6-Methyladenosin	282	150	94, 123, 133
36	N6-Threonylcarbamoyladenosin (t6A)	413	281	150, 162
37	?	313	181	96, 110, 124, 137, 167
38	5'-Deoxy-5'-methylthioadenosin (MTA)	298	163	97, 115, 145
39	?	459	327	182, 208

Im Rahmen einer Kooperation mit Frau Dr. Gabriela Zurek und Herrn Dr. Matthias Pelzing von der Firma Bruker (Bremen) wurde eine Urinprobe mittels LC-ESI-MS/MS (microTOF, Bruker, Bremen) untersucht.¹⁰³ Diese Methode bietet aufgrund des Einsatzes eines Flugzeitmassenspektrometers den Vorteil, Massengenauigkeiten unter 5 ppm zu erreichen. Ausgehend von diesen Massengenauigkeiten wird durch die in der Auswertungssoftware DataAnalysis 3.2 enthaltene GMF (Generate Molecular Formula)-Funktion eine Summenformel berechnet. Neben der genauen Masse wird außerdem das Isotopenmuster beurteilt und in das Ergebnis einbezogen.

Die bei der Messung einer Urinprobe ermittelten Massen mit den durch GMF ermittelten Summenformeln sind in Tabelle 16 gezeigt. Dabei wurden die untersuchten Komponenten zum besseren Vergleich mit den Nummern der entsprechenden Fraktionen aus den Ergebnissen der LC-MS³-Messungen gekennzeichnet. Diese Ergebnisse wurden neben der Fragmentierung bei der weiteren Auswertung berücksichtigt.

Tabelle 16: Ergebnisse der LC-ESI-*oa*-TOF-Messungen

Fraktion	Gemessene Masse [M+H] ⁺	Berechnete Summenformel	Massengenauigkeit [ppm]
2	255.0977	C ₁₁ H ₁₅ N ₂ O ₅	0.329
5	228.0875	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅	3.741
6	346.1259	C ₁₃ H ₂₀ N ₃ O ₈	3.930
12	300.1557	C ₁₃ H ₂₂ N ₃ O ₅	0.956
15	298.1154	C ₁₁ H ₁₆ N ₅ O ₅	0.228
17	301.1398	C ₁₃ H ₂₁ N ₂ O ₆	1.430
19	296.1358	C ₁₂ H ₁₈ N ₅ O ₄	1.473
22	268.1045	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₄	1.878
23	293.1137	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₅	1.575
26	384.1171	C ₁₄ H ₁₈ N ₅ O ₈	5.374
29	293.1141	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₅	3.240
34	312.1309	C ₁₂ H ₁₈ N ₅ O ₅	2.190
36	413.1437	C ₁₅ H ₂₁ N ₆ O ₈	5.173
37	313.1758	C ₁₅ H ₂₅ N ₂ O ₅	0.597

Strukturvorschläge für die unbekanntes Substanzen im Urin

Das in Fraktion 1 vorkommende Ribosederivat wurde während der Zeit, in der diese Arbeit durchgeführt wurde, von Herrn Dino Bullinger als 1-D-Ribofuranosyl-1H-imidazol-4-essigsäure identifiziert.¹⁰³

Das in Fraktion 6 enthaltene Nucleosid hat eine protonierte Masse von 346 u. Ein Nucleosid dieser Masse ist bekannt: 3-(3-Amino-carboxypropyl)-uridin wurde bereits in Urin nachgewiesen.⁴⁴ Nishimura et al. wiesen die direkte Übertragung des 3-Amino-3-carboxypropyl-Rests von S-Adenosylmethionin auf Uridin in tRNA von E. Coli nach, wobei 3-(3-Amino-carboxypropyl)-uridin entsteht, und isolierten das beteiligte Enzym.^{104;105}

Die LC-ESI-MS-TOF-Messungen ergaben mit einer Massengenauigkeit von 3.93 ppm eine Summenformel, die der des protonierten 3-(3-Amino-carboxypropyl)-uridins entspricht (vgl. Tabelle 16). Dies liefert einen weiteren Hinweis auf die Identität.

Das Nucleosid in Fraktion 6 ergibt im MS²-Spektrum ein Basenfragment der Masse 214, welches im MS³-Spektrum die Massen m/z 113, m/z 168 und m/z 197 zeigt. Das Fragment m/z 197 weist eine Massendifferenz von 17 u zur Base auf, was für die Abspaltung von Ammoniak spricht. 3-(3-Amino-carboxypropyl)-uridin enthält eine Aminogruppe, die abgespalten werden kann. Die Differenz von 46 u des Fragments m/z 168 ist ein Hinweis auf den Verlust eines Ameisensäuremoleküls, welches ebenfalls möglich ist. Schließlich führt die Eliminierung der Seitenkette zur Bildung der Uracilbase. Aufgrund der beschriebenen Fragmentierung und der ermittelten Summenformel konnte Fraktion 6 als 3-(3-Amino-carboxypropyl)-uridin identifiziert werden. Der vorgeschlagene Fragmentierungsweg ist in Abbildung 46 dargestellt.

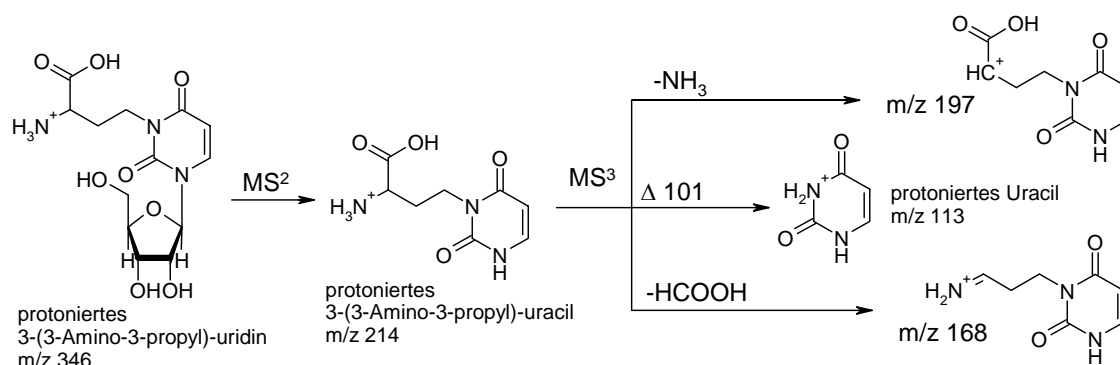


Abbildung 46: Fragmentierungsvorschlag für 3-(3-Amino-carboxypropyl)uridin

In den Fraktionen 10 und 18 traten zwei Isomere der Masse 271 auf. Bei den MALDI-TOF-Untersuchungen konnte diese Masse bereits dem Ribosylpyridinoncarboxamid zugeordnet werden, von dem im Urin zwei Isomere vorkommen. Die Isomere können nun durch ihre Fragmentierung unterschieden werden.

In humanem Urin wurden zwei Isomere von Ribosylpyridinoncarboxamid identifiziert, 1-Ribosypyridin-4-on-3-carboxamid⁸⁸ und 1-Ribosylpyridin-2-on-5-carboxamid⁸⁹, deren Strukturen in Abbildung 47 gezeigt sind. Ihr Auftreten in Urin ist vermutlich auf NMN oder NAD als Quellen zurückzuführen.⁹⁰

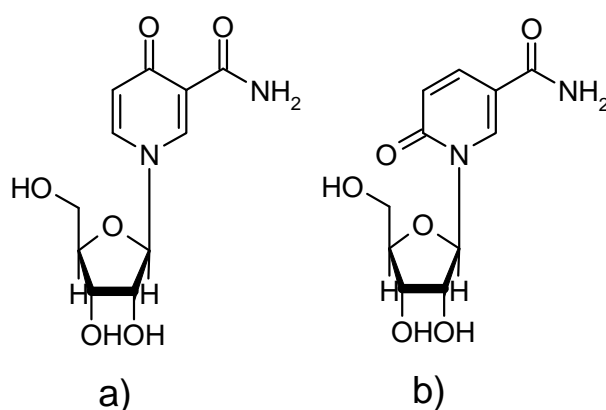


Abbildung 47: Strukturen von a) 1-Ribosypyridin-4-on-3-carboxamid und b) 1-Ribosylpyridin-2-on-5-carboxamid

Für die Differenzierung der Isomere wurde eine Lösung von Pyridin-2-on-5-carboxamid ($[M+H]^+=139$ Da) mittels Spritzenpumpeninjektion untersucht. Pyridin-2-on-carboxamid wurde am Pharmazeutischen Institut der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn von Herrn Dr. J. Burbiel synthetisiert und von Frau Prof. Dr. C. E. Müller zur Verfügung gestellt. Im MS^2 -Spektrum (Abbildung 48) zeigten sich m/z 71, m/z 79, m/z 88, m/z 96, m/z 112 und m/z 122.

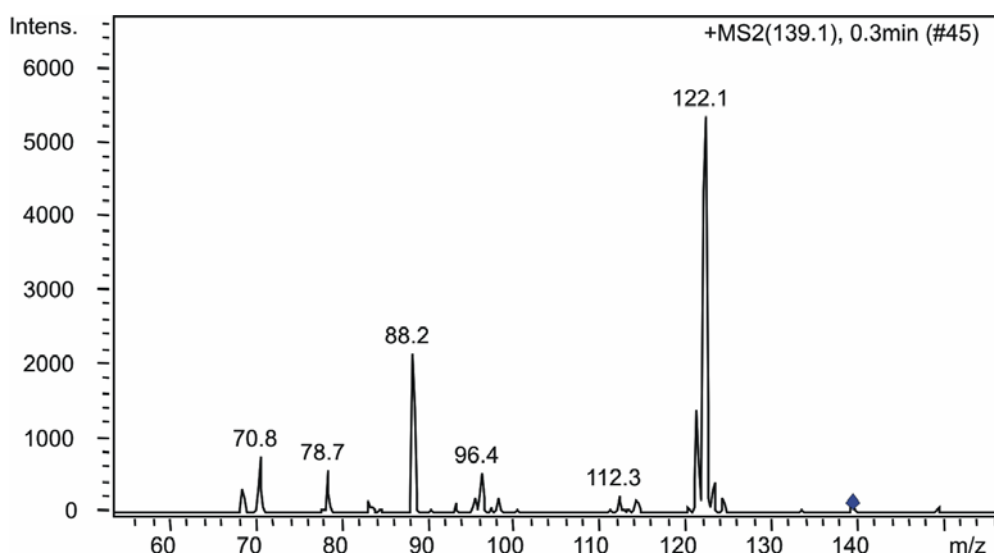


Abbildung 48: MS^2 -Spektrum von Pyridin-2-on-5-carboxamid

Die Massendifferenz von 43 u des Fragments m/z 96 spricht für den Verlust von HNCO. Dies ist nur beim 2,5-PCNR-Isomer möglich, da hier die Ketogruppe an Position 2 liegt. Das Fragment mit der höchsten Intensität, m/z 122, kann durch den Verlust von Ammoniak erklärt werden. Nach Abspaltung von HCN (27 u) bleibt m/z 112 zurück. Der Fragmentierungsweg für 1-Ribosylpyridin-2-on-5-carboxamid ist in Abbildung 49 zu sehen.

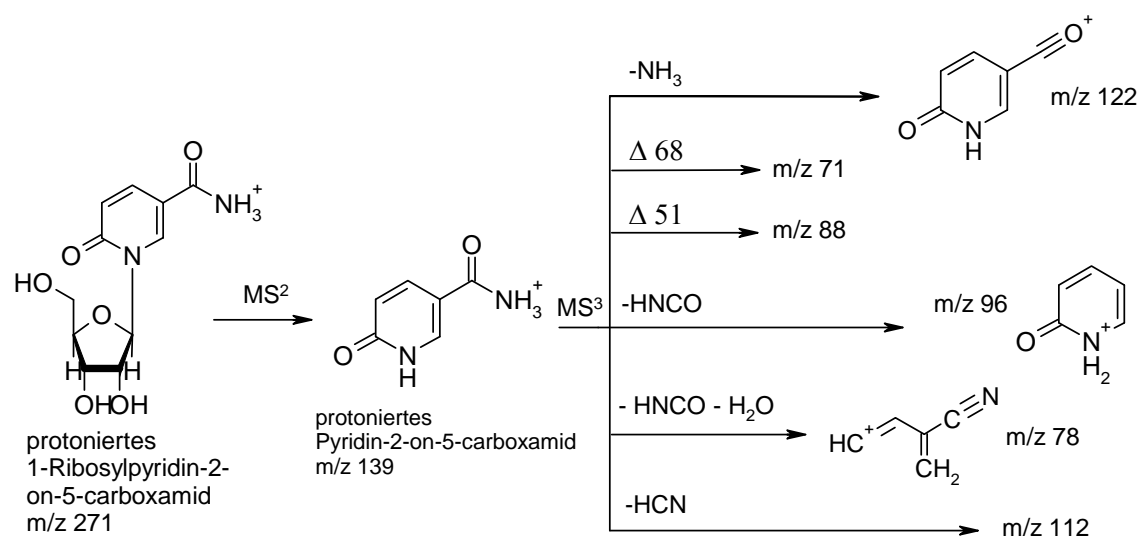


Abbildung 49: Fragmentierungsvorschlag für 1-Ribosylpyridin-2-on-5-carboxamid

In den MS³-Spektren der Isomere aus der Urinprobe finden sich vergleichbare Fragmente, ausgenommen m/z 96, das nur bei Fraktion 10 auftritt. Die Massendifferenz von 43 u zum Basenfragment spricht für die Abspaltung von HNCO. Diese Abspaltung ist bei beiden Isomeren an der Seitenkette möglich. Aufgrund des Konzentrationsverhältnisses wird angenommen, dass Fraktion 10 1-Ribosylpyridin-2-on-5-carboxamid enthält und Fraktion 18 das Isomer 1-Ribosypyridin-4-on-3-carboxamid. Das MS/MS-Spektrum des Pyridin-2-on-5-carboxamids und das MS³-Spektrum von Fraktion 10 stimmen nicht vollständig überein. Allerdings wird dies darauf zurückgeführt, dass die Intensitäten der MS³-Fragmente von Fraktion 10 sehr gering sind und somit einige nicht erfasst werden können.

In Fraktion 19 konnte ein Nucleosid der Masse 296 u nachgewiesen werden. Diese Masse entspricht der eines Dimethyladenosins, auch die Ergebnisse der LC-ESI-MS/MS-Messungen bestätigten die Summenformel (vgl. Tabelle 16). Allerdings unterschieden sich die MS³-Fragmente von denen des N⁶,N⁶-Dimethyladenosins, das in den vorhergehenden Spritzenpumpenexperimenten (vgl. 3.3.2) untersucht wurde. Ein weiteres mögliches Isomer ist das 1,N⁶-

Dimethyladenosin, das in Urin vorkommt.⁴⁴ Der Vorschlag für die Fragmentierung ist in Abbildung 50 gezeigt. Durch radikalische Abspaltung einer Methylgruppe von der protonierten Base entsteht das Fragment m/z 149, das bei beiden Dimethyladenosinen zu sehen ist. Auch das Fragment m/z 135 tritt bei beiden Dimethyladenosinen zu sehen ist. Auch das Fragment m/z 135 tritt bei beiden Isomeren auf, wobei die Abspaltung von CH_2NH bei 1,N6-Dimethyladenosin wahrscheinlich erscheint, ebenso wie die anschließende Abspaltung von HCN unter Bildung von m/z 108. Die weiteren Fragmente unterscheiden die isomeren Formen. Im MS^3 -Spektrum von Fraktion 19 der Urinprobe erscheinen außerdem m/z 123 und m/z 96, für die jedoch keine Erklärung gefunden werden konnte.

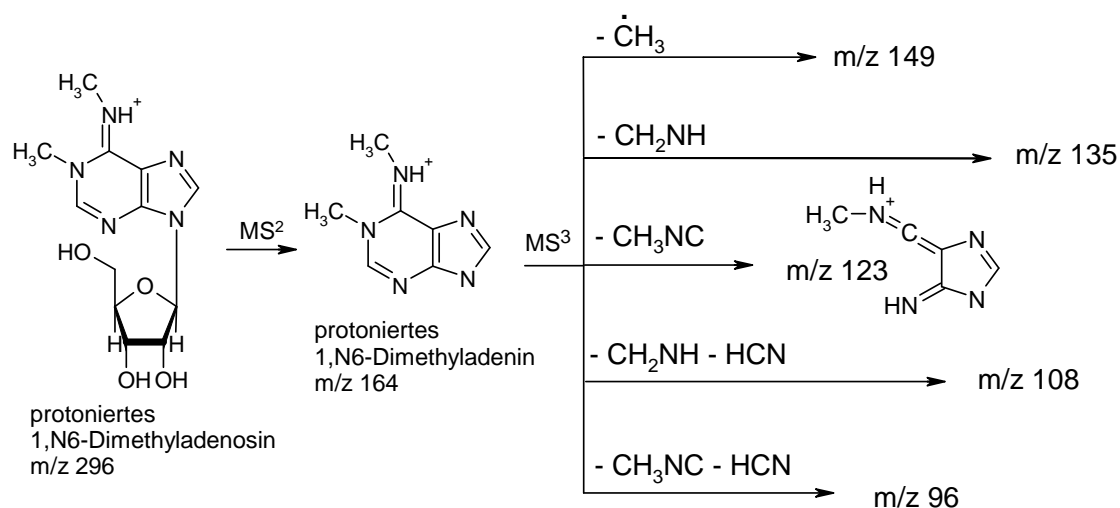


Abbildung 50: Fragmentierungsvorschlag für 1,N6-Dimethyladenosin

Die Fragmente des in Fraktion 2 gefundenen Nucleosids der Masse 255 u lassen auf einige Strukturelemente schließen. So wird vom Basenfragment m/z 123 Ammoniak abgespalten (m/z 106), außerdem HCN (m/z 96) und HNCO (m/z 80). Diese Abspaltungen wären bei der in Abbildung 51 gezeigten Struktur, dem Nicotinamidribosid, wie vorgeschlagen möglich. Die Struktur ist dem PCNR ähnlich, nur die Ketogruppe fehlt. Wie beim PCNR entsteht ein Fragment, bei dem die Carboxamidgruppe abgespalten wurde. Die Eliminierung von HCN ist

eine verbreitete Fragmentierungsmöglichkeit, und der Verlust von Ammoniak verläuft wie beim PCNR.

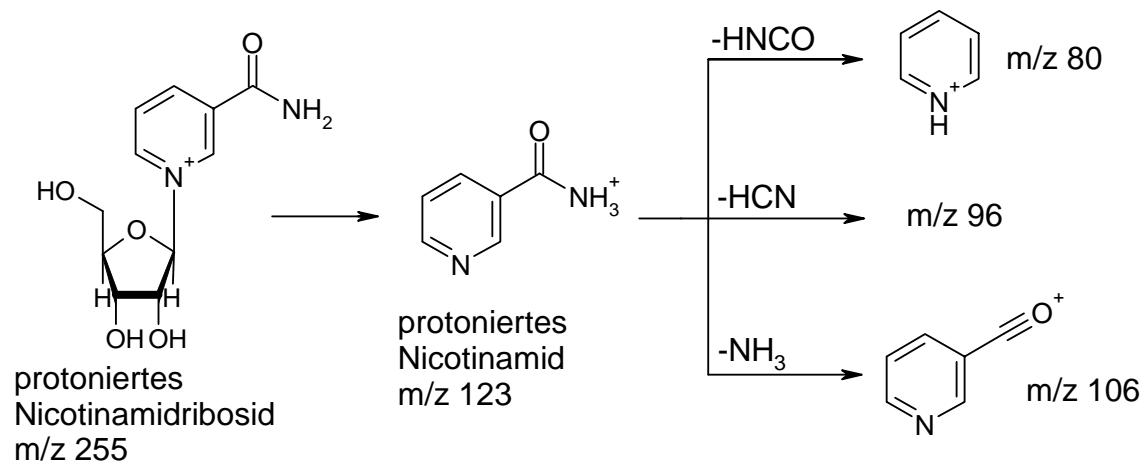


Abbildung 51: Fragmentierungsvorschlag für Nicotinamidribosid

Zusätzlich zu den beschriebenen Messungen wurde diese Fraktion mittels ESI-*oa*-TOF-MS untersucht und eine genaue Masse von 255.0977 u ermittelt. Es ergab sich die Summenformel C₁₁H₁₅N₂O₅ (M=255.0975 Da), die mit der Summenformel von Nicotinamidribosid übereinstimmt. Aufgrund dieser Vermutung wurde eine 100 µg/mL-Lösung des kommerziell erhältlichen Nicotinamids mittels Spritzenpumpe in die Ionenfalle injiziert und manuelle MSⁿ-Experimente durchgeführt. Es ergab sich das in Abbildung 52 gezeigte Spektrum. Die Fragmentierung des Basenfragments der im Urin vorkommenden Komponente mit [M+H]⁺ = 255 Da stimmt mit der des Nicotinamids überein. Das Nucleosid in Fraktion 2 wurde somit als Nicotinamidribosid identifiziert.

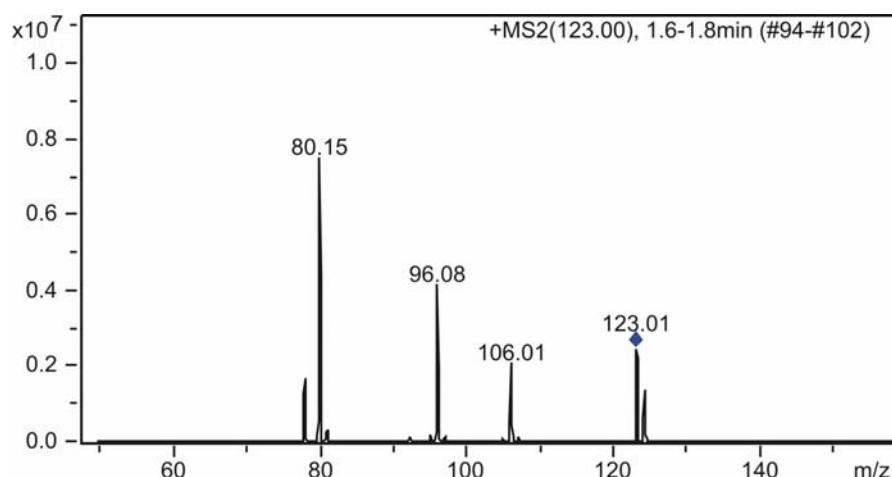
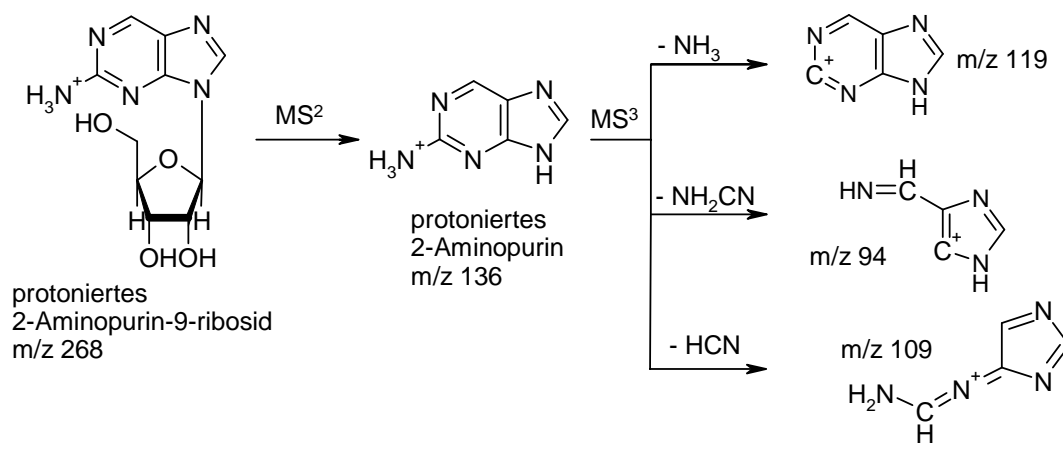
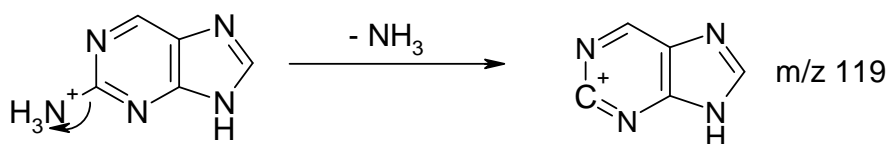
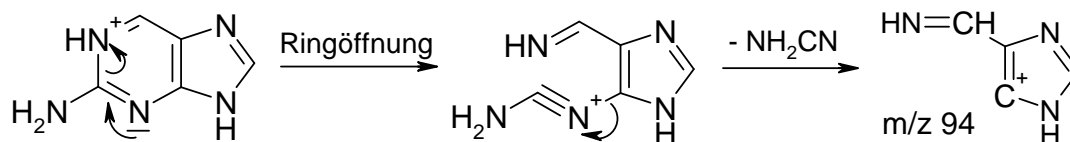


Abbildung 52: MS^2 -Spektrum von Nicotinamid

MacGregor und Burkhalter wiesen bei Ratten die Ausscheidung von Nicotinamidribosid in Galle nach Verabreichung von Nicotinsäure nach.¹⁰⁶ Morris et al. bestimmten dieses Nucleosid in humanem Urin mittels HPLC.¹⁰⁷ Weitere Untersuchungen dieses Nucleosids in Urin sind nicht bekannt.

In Fraktion 22 wurde ein Nucleosid mit einem Basenfragment der Masse $[M+H]^+ = 136$ Da nachgewiesen, welche der Masse der Adeninbase entspricht. Auch die beobachtete Fragmentierung ist der des Adenosins sehr ähnlich, es könnte sich daher um ein Isomer handeln. Die Massendifferenz von 42 u zwischen dem Basenfragment und m/z 94 spricht für die Abspaltung von NH_2CN . Diese Abspaltung wäre z.B. bei 2-Amino-9-ribofuranosylpurin möglich, das die Aminogruppe an Position 2 besitzt. Das Fragment m/z 119 entsteht durch Eliminierung von Ammoniak unter Bildung des Puringerüsts. Der Fragmentierungsvorschlag mit dem Mechanismus ist in Abbildung 53 gezeigt. Die Summenformel des Adenosin-Isomers wurde durch die LC-ESI-*oa*-TOF-Messungen bestätigt (vgl. Tabelle 16).

1. Abspaltung von NH₃2. Ringöffnung und Abspaltung von NH₂CN

3. Umlagerung und Abspaltung von HCN nach Ringöffnung

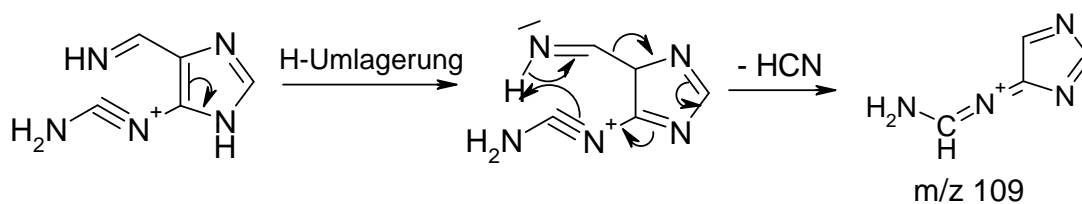


Abbildung 53: Fragmentierungsvorschlag mit Mechanismus für 2-Aminopurin-9-ribosid

Aufgrund dieser Vermutung wurde eine 100 µg/µL-Lösung des kommerziell erhältlichen 2-Aminopurins mittels Spritzenpumpe in die Ionenfalle injiziert und manuelle MSⁿ-Experimente durchgeführt. Das MS²-Spektrum ist in Abbildung 54 gezeigt. Die dort auftretenden Fragmente m/z 119, m/z 109, m/z 94 und

m/z 82 stimmen gut mit denen im MS³-Spektrum von m/z 268 aus der Urinprobe überein. Dort ergaben sich m/z 94, m/z 119 und m/z 109. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich um 2-Aminopurin-9-ribosid handelt. Allerdings sollte dies durch eine Aufkonzentrierung und nähere Untersuchung bestätigt werden, da es sich um eine Minorkomponente im Urin handelt, bei der die Intensitäten im MS³ sehr gering sind.

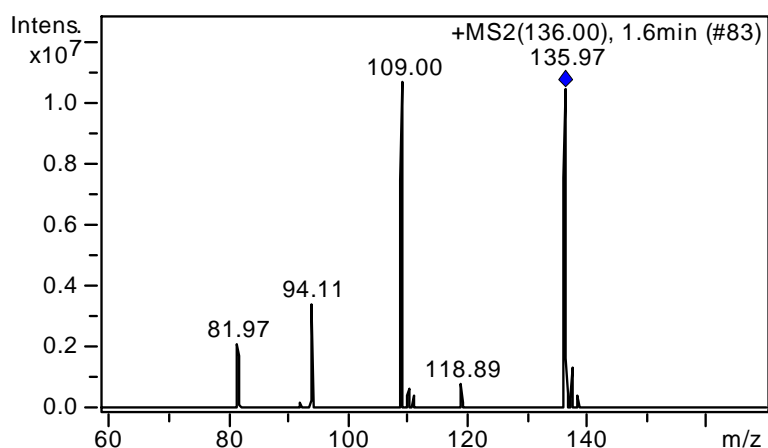


Abbildung 54: MS²-Spektrum von 2-Aminopurin

5-Methylaminomethyl-2-selenouridin (siehe Abbildung 55) ist ein Nucleosid der Masse 351, das in tRNA nachgewiesen wurde.²² In Fraktion 24 tritt ein Nucleosid dieser Masse auf, allerdings kann aufgrund der Fragmentierung nicht eindeutig bestimmt werden, ob es sich um 5-Methylaminomethyl-2-selenouridin handelt. Die Massendifferenz von 18 u zwischen dem MS²-Fragment m/z 219 und dem MS³-Fragment m/z 201 spricht für eine Ketogruppe, die in dem genannten Nucleosid enthalten ist. Das Fragment m/z 173 zeigt eine Massendifferenz von 46 u. Dies spricht für die Anwesenheit einer Carbonsäuregruppe. Das Fragment m/z 155 könnte durch erneute Eliminierung eines Wassermoleküls aus m/z 173 entstehen. Diese Annahmen passen jedoch nicht zur Struktur des 5-Methylaminomethyl-2-selenouridins. In diesem Fall wäre eine präparative Isolierung des Nucleosids und anschließende Strukturaufklärung mittels NMR sinnvoll.

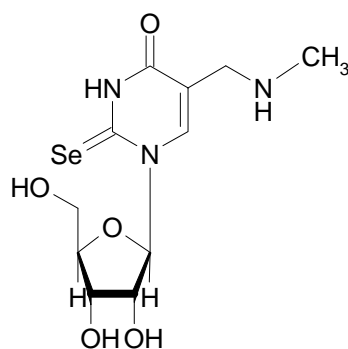


Abbildung 55: Struktur von 5-Methylaminomethyl-2-selenouridin

In Fraktion 26 wurde ein Nucleosid der Masse $[M+H]^+=384$ Da nachgewiesen. N6-Succinyladenosin ist ein Nucleosid dieser Masse, welches in Urin vorkommt.^{44;108} Es ergaben sich 6 Fragmente im MS³-Spektrum, die durch den in Abbildung 56 gezeigten Fragmentierungsweg von N6-Succinyladenosin erklärt werden können. Durch die LC-ESI-oa-TOF-Messungen wurde die Summenformel des N6-Succinyladenosins bestätigt (vgl. Tabelle 16).

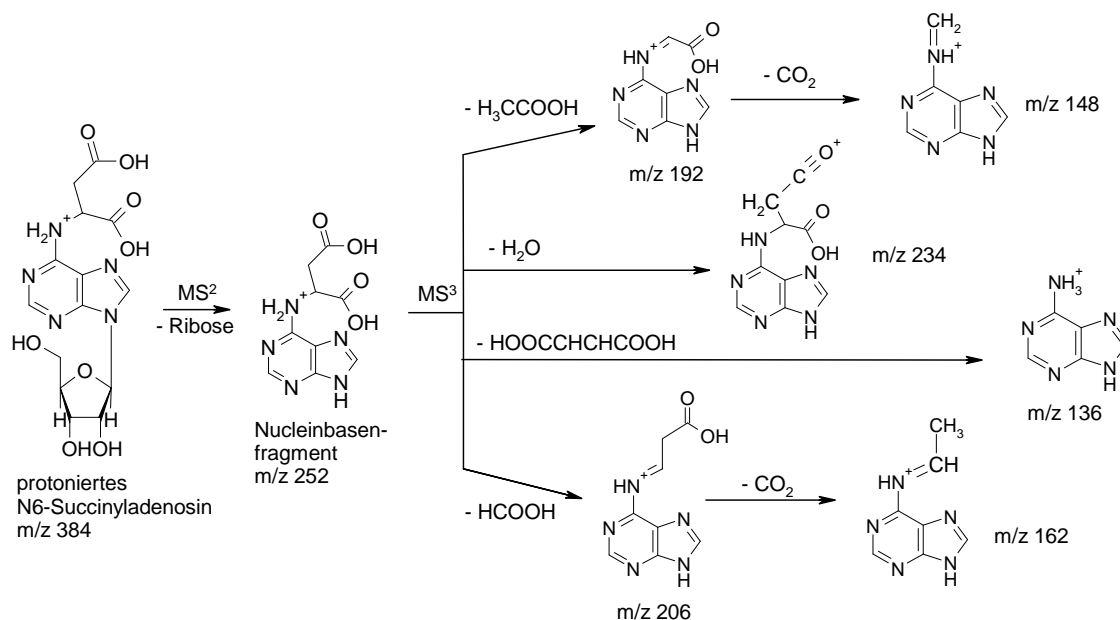


Abbildung 56: Fragmentierungsvorschlag für N6-Succinyladenosin

In Fraktion 32 konnte ein Nucleosid der Masse $[M+H]^+=398$ Da nachgewiesen werden. Diese Masse entspricht dem Nucleosid 2-Methylthio-N6-(cishydroxyisopentenyl)adenosin, welches in tRNA vorkommt.^{109;22} Aufgrund der komplexen Seitenkette an C6 ist auch die Fragmentierung nicht trivial zu erklären. Es können dennoch alle beobachteten Fragmente des MS³-Spektrums, ausgenommen m/z 231, anhand der möglichen Fragmentierung von 2-Methylthio-N6-(cishydroxyisopentenyl)adenosin erklärt werden, wie in Abbildung 57 zu sehen. Die Seitenkette wird an vier verschiedenen Stellen gespalten. Im einfachsten Fall wird Wasser abgespalten, der Verlust der ganzen Seitenkette führt zu m/z 165.

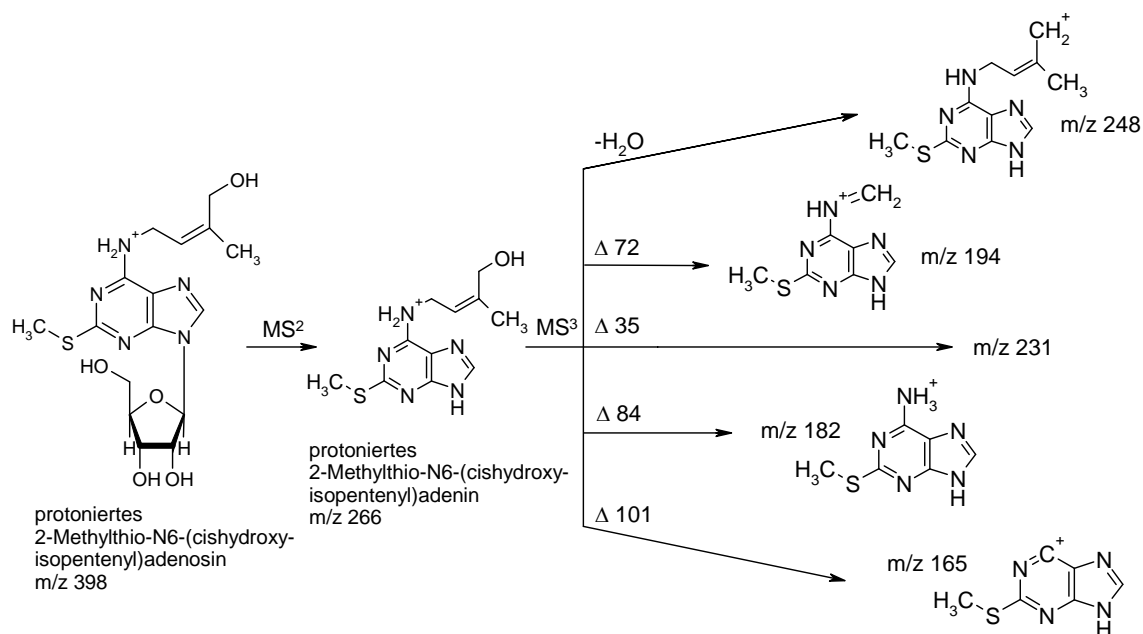


Abbildung 57: Fragmentierungsvorschlag für 2-Methylthio-N6-(cishydroxyisopentenyl)adenosin

Bei dem in Fraktion 33 enthaltenen Nucleosid der Masse $[M+H]^+=326$ Da handelt es sich um N2,N2,7-Trimethylguanodin, ein in Urin vorkommendes Nucleosid.^{101;110} Die Summenformel wurde bereits durch die Bestimmung einer genauen Masse mittels interner Kalibrierung bei der MALDI-TOF-Messung bestätigt (vgl. 3.2.3.3).

Wie in Abbildung 58 zu sehen, wird radikalisch eine Methylgruppe abgespalten. Durch anschließende Eliminierung der Dimethylaminogruppe erklärt sich das Fragment m/z 136. Außerdem wird von der protonierten Base HCN eliminiert. Durch anschließenden Verlust der Dimethylaminogruppe bzw. von Wasser ergeben sich die übrigen zwei Fragmente (m/z 124 und m/z 149).

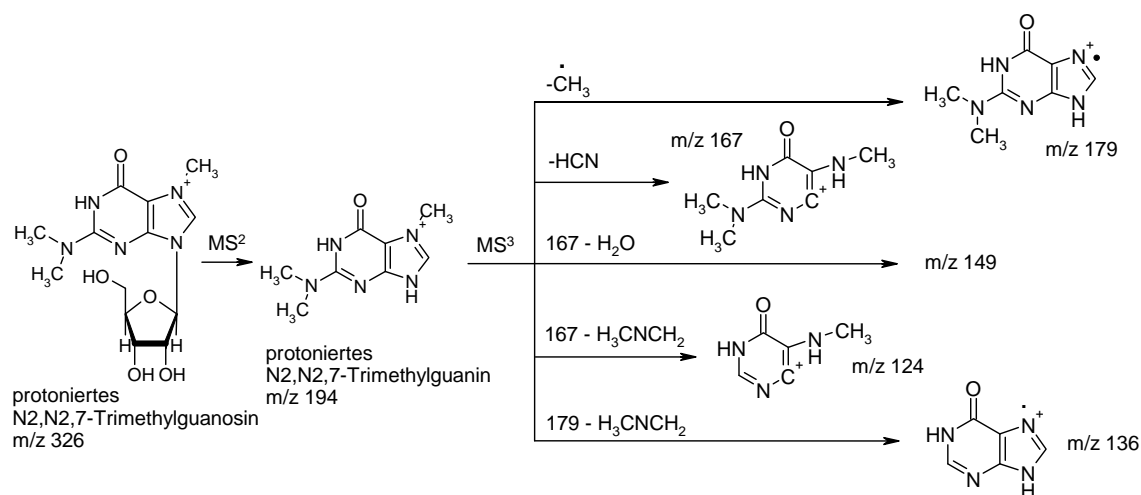


Abbildung 58: Fragmentierungsvorschlag für N₂,N₂,7-Trimethylguanidin

In Fraktion 5 wurde ein Nucleosid der Masse $[M+H]^+=228$ Da nachgewiesen. Das einzige Nucleosid mit entsprechender Masse, das in Urin bisher identifiziert wurde, ist 2'-Deoxycytidin. Diese Struktur kann ausgeschlossen werden, da hier die cis-Diolstruktur, auf der das Prinzip der angewendeten Affinitätschromatographie beruht, fehlt.

Die LC-ESI-*oa*-TOF-Messungen ergaben eine Masse von 228.0875, die mit einer Massengenauigkeit von 3.741 ppm der Summenformel C₁₀H₁₄NO₅ zugeordnet wurde (vgl. Tabelle 16).

In den MS³-Spektren treten Fragmente mit m/z 68 und m/z 78 auf. Die Differenzen der beiden Fragmentionen zum Basenfragment m/z 96 betragen 18 bzw. 28 u, was auf den Verlust von Wasser und CO hinweist. Dies sind typische Abspaltungen bei Nucleosiden, die Ketogruppen enthalten, wie z.B. auch bei

Inosin. Dieses Fragmentierungsmuster lässt daher den Schluss zu, dass im Basenteil eine Ketogruppe enthalten ist.

Eine zu der Fragmentierung passende Struktur der Summenformel $C_{10}H_{14}NO_5$ stellt das 1-Ribofuranosylpyridinon dar, wie in Abbildung 59 zu sehen. Diese Struktur ist kein Nucleosid im eigentlichen Sinn, sondern könnte ein Abbauprodukt von Nicotinamidmononucleotid (NMN) oder Nicotinamidnucleotid (NAD) sein, wie auch die bereits nachgewiesenen PCNR-Isomere.

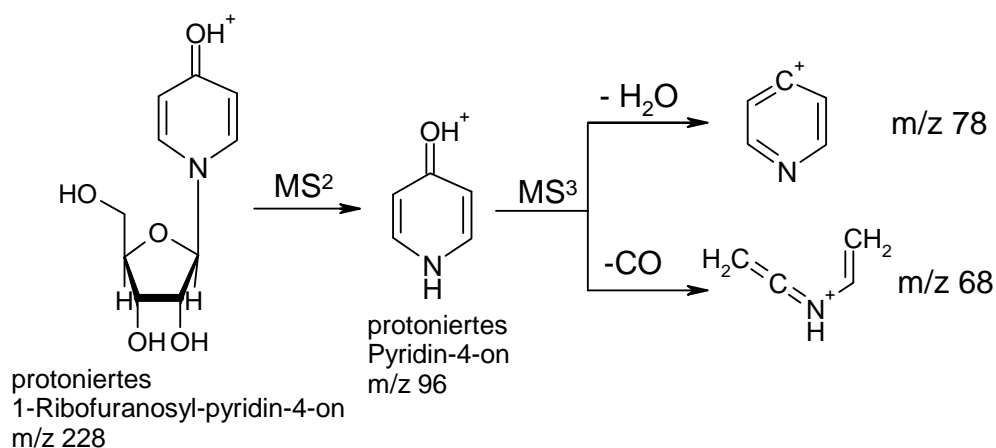


Abbildung 59: Fragmentierungsvorschlag für 1-Ribofuranosylpyridinon

Das in Fraktion 12 vorkommende Nucleosid hat eine Masse von $[M+H]^+ = 300$ Da. Das einzige bekannte Nucleosid dieser Masse ist das N⁴-Acetyl-2'-O-methylcytidin, welches in tRNA vorkommt.¹¹¹ N⁴-Acetyl-2'-O-methylcytidin kann jedoch ausgeschlossen werden, da es eine Modifikation an der Ribose aufweist und daher nicht mit der Affinitätschromatographie extrahiert wird.

Die LC-ESI-*oa*-TOF-Messungen ergaben eine genaue Masse von 300.1557, aus der die Summenformel $C_{13}H_{22}N_3O_5$ generiert wurde (vgl. Tabelle 16).

Die Fragmente m/z 112 und m/z 95 im MS³-Spektrum lassen den Schluss zu, dass es sich um ein Cytidin-Derivat handelt, da m/z 112 der Masse eines protonierten Cytosins entspricht. Aufgrund dieser Fragmentierung und der

Summenformel wird daher vermutet, dass es sich um ein an der Nucleinbase methyliertes N4-Acetylcytidin handelt. Die Möglichkeiten für eine solche Struktur sind in Abbildung 60 gezeigt.

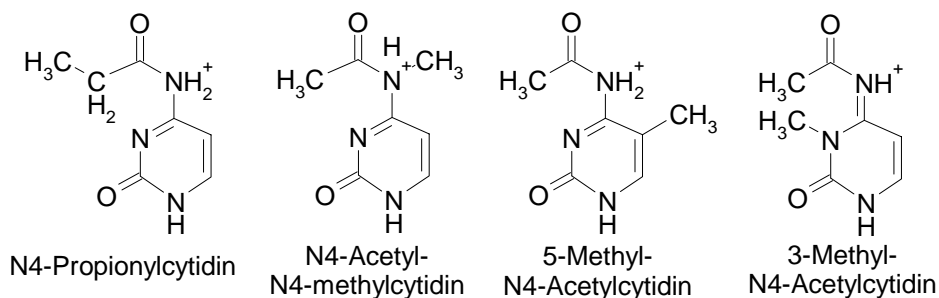


Abbildung 60: Mögliche Strukturen für die Base mit m/z 168

Das Fragment m/z 150 weist auf eine Wasserabspaltung hin, die bei allen Strukturvorschlägen möglich wäre. Bei Abspaltung der Seitenkette, welche als wahrscheinlich angesehen wird, bliebe je nach Struktur das 2-Pyrimidinon bzw. ein Methylpyrimidinon zurück. Es gibt kein Fragment, das einem Methylpyrimidinon entspricht, daher wird angenommen, dass die Methylierung an der Seitenkette vorliegt, wie bei N4-Propionylcytidin oder N4-Acetyl-N4-Methylcytidin. N4-Acetyl-N4-Methylcytidin ist in der Literatur nicht beschrieben, für die Struktur von N4-Propionylcytidin ergeben sich einige Referenzen, jedoch nicht im Zusammenhang mit RNA oder Urin.

Fraktion 17 enthält ein Ribosederivat mit m/z 301. Bei der Fragmentierung der potentiellen Nucleinbase m/z 169 ergaben sich die Fragmente m/z 109, m/z 127 und m/z 137. Die Massendifferenz von 32 u zum letzten Fragment spricht für die Abspaltung von zwei Wassermolekülen. Die Masse m/z 127 tritt als Basenfragment bei den Methyluridin-Isomeren auf. Gleiches gilt für das Fragment m/z 109, welches bei Fragmentierung der 3-Methyluridin-Base entsteht (vgl. Tabelle 12). Es könnte sich also um ein Derivat von 3-Methyluridin handeln. Das Fragment m/z 127 weist eine Massendifferenz von 42 u zu m/z 169 auf. Diese Differenz ist ein Anzeichen für die Abspaltung von NH_2CN oder

auch C_2H_2O . Die LC-ESI-*oa*-TOF-Messungen ergaben die berechnete Summenformel $C_{13}H_{21}N_2O_6$. 3-Methyluridin hat die Summenformel $C_{10}H_{14}N_2O_6$ (protoniert). Zwischen diesen beiden Summenformeln ergibt sich ein Unterschied von C_3H_7 . Dies entspricht einem Propylrest. Weitere Aussagen zu machen, ist schwierig, da sich in der Literatur keine Nucleoside der berechneten Summenformel finden, die im Zusammenhang mit tRNA oder Urin stehen.

Für die in den Fraktionen 23, 29, 37 und 39 nachgewiesenen Nucleoside der Massen $[M+H]^+$ 293 Da, 313 Da und 459 Da gibt es in den beiden Reviews über Nucleoside in Urin und RNA keine entsprechenden Nucleoside.^{22;44}

Nucleoside der Masse $[M+H]^+ = 293$ Da fanden sich in zwei Fraktionen. Auch die Fragmentierung stimmt weitgehend überein, daher wird vermutet, dass es sich um Isomere handelt. Bei den LC-ESI-*oa*-TOF-Messungen wurde für beide Isomere eine Summenformel von $C_{14}H_{17}N_2O_5$ berechnet (vgl. Tabelle 16). Das Fragmentierungsmuster zeigt eine Abspaltung von Wasser mit anschließendem Verlust von HCN sowie Eliminierung von HCN und HNCO. Daraus kann auf eine Ketogruppe geschlossen werden, die sonstigen Fragmente lassen keine eindeutigen Schlüsse auf die Struktur zu.

Fraktion 37 enthält ein Nucleosid der Masse $[M+H]^+ = 313$ Da, für die mittels LC-ESI-*oa*-TOF eine Summenformel von $C_{15}H_{25}N_2O_5$ berechnet wurde (vgl. Tabelle 16). Wird davon die Ribose als Fragment abgezogen, ergibt sich eine Summenformel von $C_{10}H_{17}N_2O$ für die protonierte Base. Die Fragmente im MS^3 -Spektrum geben einige Informationen über die Struktur. So scheint das Fragment m/z 137 mit einer Massendifferenz von 44 u durch Abspaltung von CO_2 entstanden zu sein, was auf eine Carboxygruppe hinweist. Daneben tritt zwischen den Fragmenten m/z 137 und m/z 96 eine Massendifferenz von 17 u auf. Dies spricht für die Abspaltung von Ammoniak. Diese Beobachtungen passen allerdings nicht zu der berechneten Summenformel, da dort nach Eliminierung der Ribose nur ein Sauerstoffatom für das Basenfragment

verbleibt. Somit dürfte keine Carboxygruppe vorhanden sein. Weitere Aussagen können derzeit nicht gemacht werden.

Das Nucleosid mit der höchsten Masse ($[M+H]^+ = 459$ Da) findet sich in Fraktion 39. Der einzige Hinweis auf ein Nucleosid ist die Massendifferenz von 132 u zum Basenfragment m/z 181 im MS^2 -Spektrum. Im MS^3 -Spektrum finden sich zwei Fragmente m/z 208 und m/z 182, aufgrund derer keine Aussagen gemacht werden können, da sie eine zu hohe Massendifferenz zum Basenfragment aufweisen.

Zusammenfassung

Anhand des Fragmentierungsverhaltens, teilweise in Verbindung mit einer berechneten Summenformel, konnten Strukturvorschläge für die nachgewiesenen Nucleoside gemacht werden. Einige Nucleoside bzw. Ribosylderivate wurden durch Vergleich der Fragmentierung mit der jeweiligen Nucleinbase identifiziert. Um die übrigen Strukturvorschläge zu verifizieren, sollte eine weiterführende Strukturanalyse durchgeführt werden. Da es sich bei den meisten Nucleosiden um Minorkomponenten handelt, ist es mit der angewendeten HPLC-Methode nicht möglich, durch semipräparative Trennung reine Substanzen zu erhalten, die z.B. anhand von NMR-Messungen identifiziert werden könnten. Die Synthese von weiteren Nucleinbasen zum Vergleich der Fragmentierung könnte ebenfalls zur weiteren Strukturaufklärung beitragen.

3.3.4 Untersuchung von Zellkulturüberständen

3.3.4.1 Untersuchte Medien und Zellen

Die Zellkulturinkubationen wurden von Frau Ute Hilcher in der Abteilung Tumorprogression der Frauenklinik der Universität Tübingen durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Zellkulturmedien und Zelllinien untersucht. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 5.1.3 beschrieben.

Untersuchte Zellkulturmedien

McCoy's Medium ohne Zusätze	(McCoy's)
McCoy's Medium mit 10 % FCS, Abx	(McCoy's ++)
McCoy's Medium mit 10 % FCS, Abx, G 418	(McCoy's +++)
RPMI Medium ohne Zusätze	(RPMI)
RPMI Medium mit 10 % FCS, Abx	(RPMI ++)
RPMI Medium mit 10 % FCS, Abx, HEPES	(RPMI +++)
MCF10A Medium ohne Zusätze	
MCF10A Basismedium	
MCF7 Basismedium	
SKBR3 Basismedium	

Untersuchte Zellkulturüberstände (je 10⁷ Zellen)

- Brustkrebszelllinie MCF7 in RPMI ohne Zusätze
- Brustkrebszelllinie MCF7 in MCF10A-Medium ohne Zusätze
- Brustepithelzelllinie MCF10A in RPMI ohne Zusätze
- Brustepithelzelllinie MCF10A in MCF10A-Medium ohne Zusätze
- Brustkrebszelllinie SKBR 3 in RPMI ohne Zusätze

3.3.4.2 Ergebnisse

Eignung der verwendeten Zellkulturmedien

Bei McCoy's Medium sind bereits ohne Zusätze die Nucleoside Uridin, Inosin, Guanosin, Xanthosin und Adenosin enthalten, wie in Abbildung 61 zu sehen. Dieses Medium ist also ungeeignet zum Nachweis von Nucleosiden aus Zellkulturüberständen.

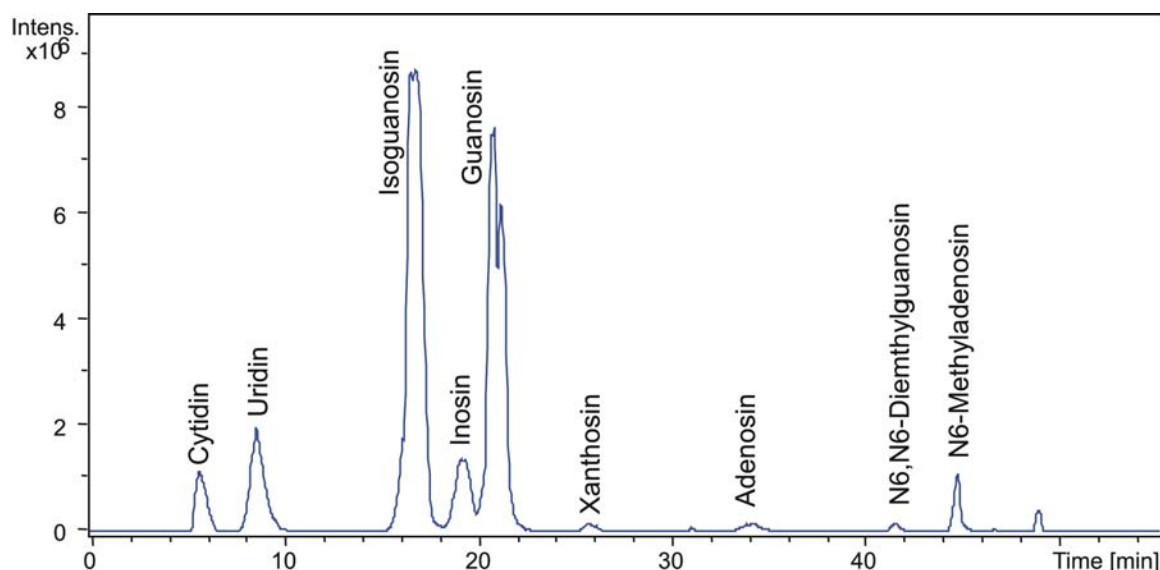


Abbildung 61: UV-Chromatogramm (260 nm) von McCoy's Medium ohne Zusätze

RPMI-Medium ohne Zusätze enthält lediglich das Nucleosid Xanthosin, welches bei der weiteren Auswertung berücksichtigt werden muss. Der Vergleich der Constant Neutral Loss Chromatogramme (m/z 132) der drei untersuchten RPMI-Medien ist in Abbildung 62 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass nur das Medium ohne jegliche Zusätze geeignet ist, um die Ausscheidung von Nucleosiden durch die Zellkulturen zu ermitteln, da durch den Zusatz von FCS (Kälberserum) bereits im Medium die Nucleoside Uridin, Inosin, Guanosin, Xanthosin, 1-Methylinosin, 1-Methylguanosenin, N4-Acetylcytidin, 2-Methylguanosenin, N2,N2-Dimethylguanosenin und t6A vorliegen.

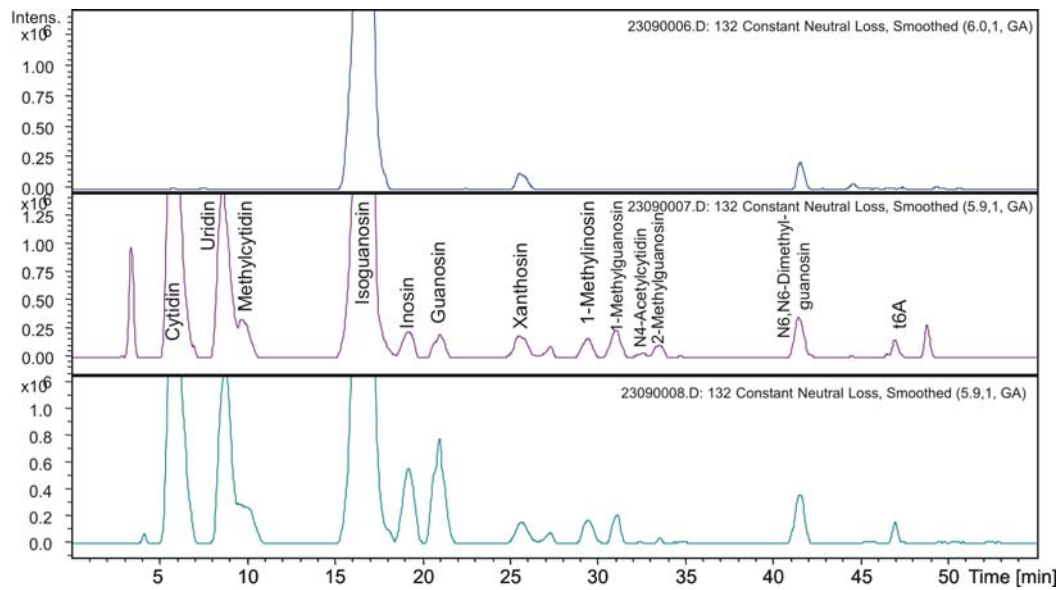


Abbildung 62: Vergleich RPMI Medium (oben), RPMI ++ (Mitte), RPMI +++ (unten), Constant Neutral Loss Chromatogramme (132 u)

MCF10A-Medium ohne Zusätze ergibt ein vergleichbares Chromatogramm wie das RPMI-Medium, wie in Abbildung 63 zu erkennen. Diese beiden Medien können für die Zellkulturversuche verwendet werden.

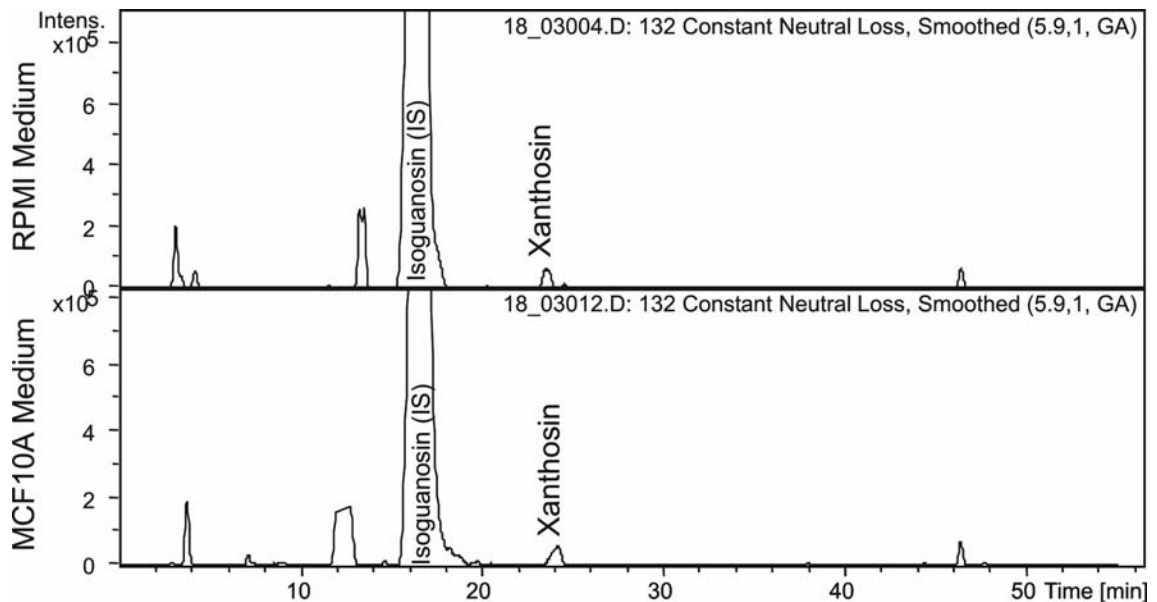


Abbildung 63: Vergleich der Zellkulturmedien für MCF7 und MCF10A-Zelllinien, Constant Neutral Loss Chromatogramme (132 u)

Vergleich von MCF7 und MCF10A-Zellen

Für die Brustepithelzelllinie MCF10A und die Brustkrebszelllinie MCF7 werden gewöhnlich spezielle, aber unterschiedliche Kulturmedien verwendet. Um die Zelllinien vergleichen zu können und sicherzugehen, dass die auftretenden Unterschiede nicht durch die unterschiedlichen Medien zustande kommen, wurden die Zelllinien MCF10A und MCF7 jeweils im Basismedium für MCF10A und dem Basismedium für MCF7 (RPMI-Medium) kultiviert. Beide Medien wurden aus oben genannten Gründen ohne Zusätze verwendet.

Für die Auswertung wurden UV-Chromatogramme und Constant Neutral Loss-Chromatogramme (CNL) verwendet. In den UV-Chromatogrammen sind Unterschiede gut zu erkennen, allerdings werden hier sämtliche Verbindungen detektiert und nicht nur die Nucleoside. Die CNL-Chromatogramme, in denen alle Substanzen gezeigt werden, die im ersten Fragmentierungsschritt 132 u verlieren, zeigen nur die Komponenten, die die Ribose enthalten. Allerdings werden hier Nucleoside, die diesen charakteristischen Zerfall nicht zeigen, nicht erfasst. Zu diesen Nucleosiden gehören Pseudouridin und MTA. Diese Nucleoside werden im UV-Chromatogramm anhand der Retentionszeit und des Fragmentierungsmusters identifiziert.

Die UV- bzw. Constant Neutral Loss-Chromatogramme (132 u) der Zelllinien MCF7 und MCF10A wurden so übereinander abgebildet, dass der interne Standard Isoguanosin die gleiche Fläche bedeckt. Dies soll zu einer Normierung führen, um die Zelllinien vergleichen zu können. Die entsprechenden UV-Chromatogramme der Versuche mit RPMI- und MCF10A-Medium sind in Abbildung 64 und Abbildung 65 gezeigt.

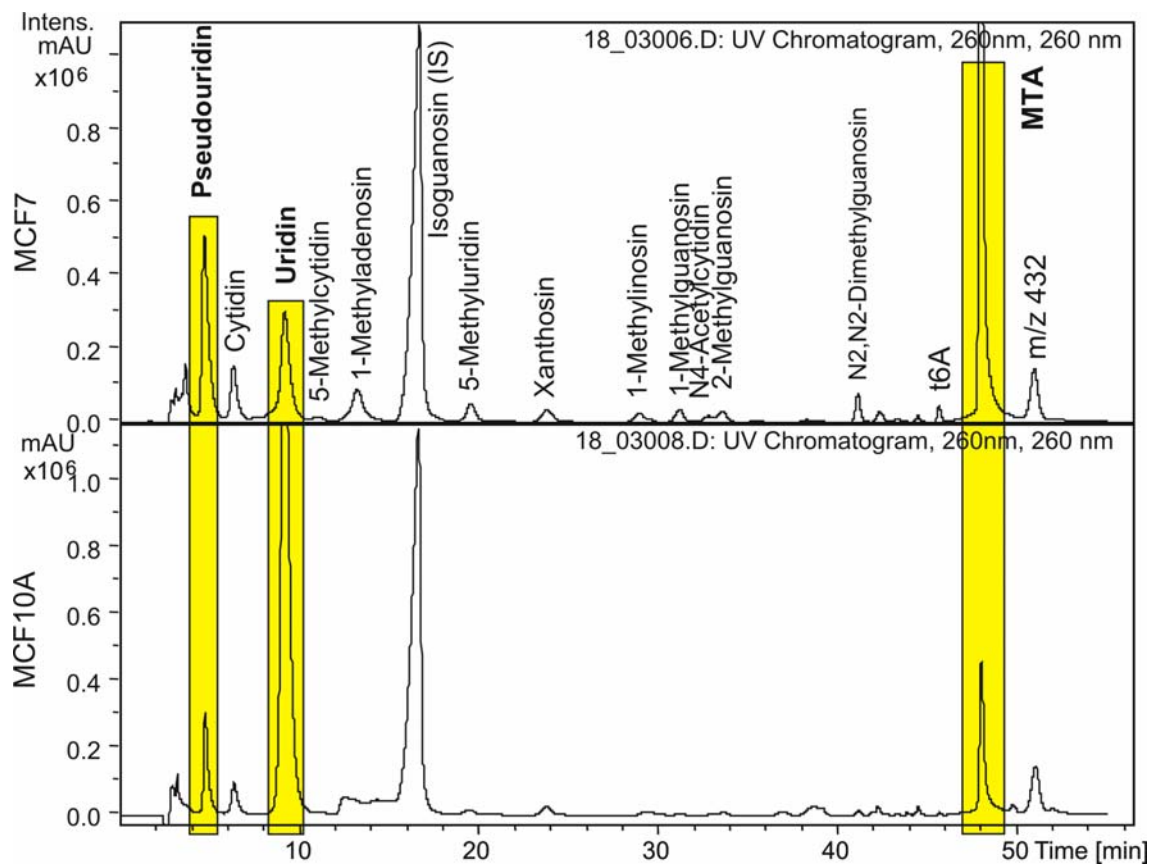


Abbildung 64: Vergleich der Zellkulturüberstände von MCF7 und MCF10A, kultiviert in RPMI-Medium, UV-Chromatogramme (260nm)

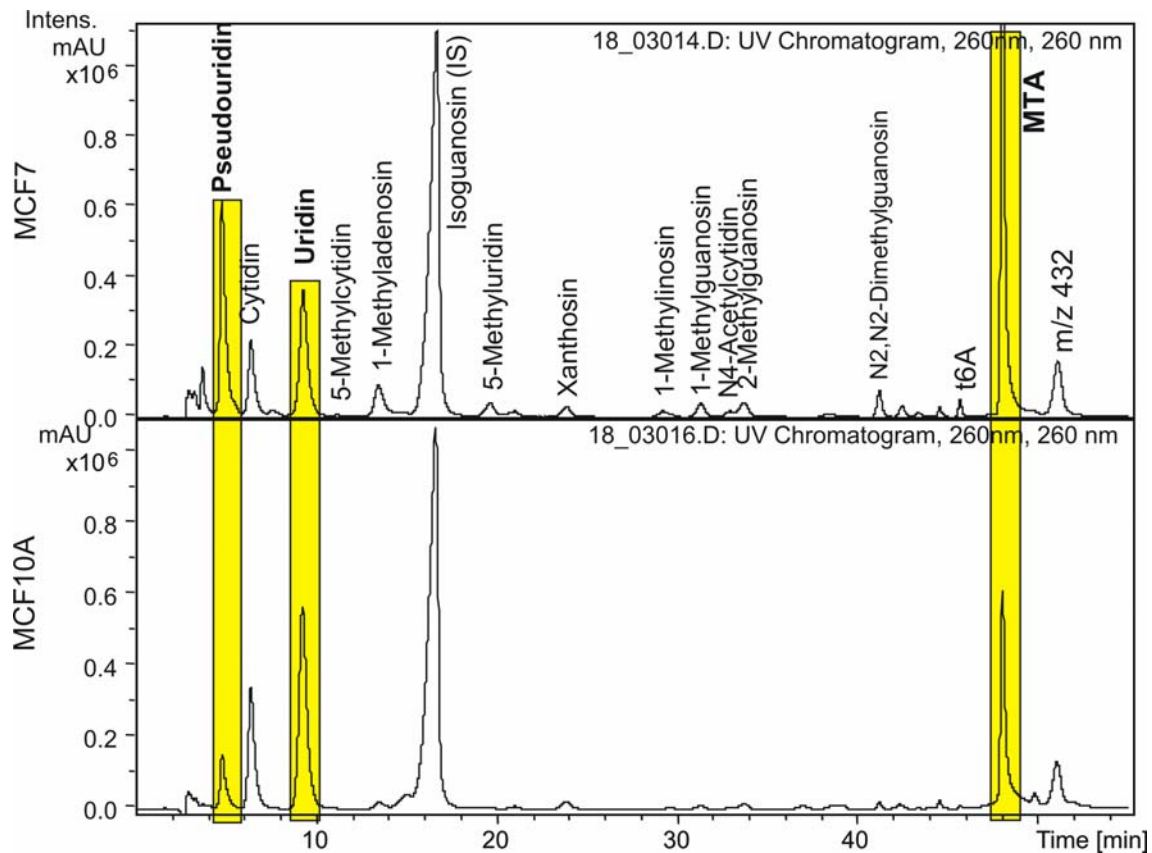


Abbildung 65: Vergleich der Zellkulturüberstände von MCF7 und MCF10A, kultiviert in MCF10A-Medium, UV-Chromatogramme (260nm)

Die UV-Chromatogramme der Kulturen in den beiden verschiedenen Medien stimmen weitgehend überein. Zwischen den beiden Zelllinien MCF7 und MCF10A sind einige wesentliche Unterschiede zu erkennen: in der MCF7-Zelllinie ist der Peak des 5`-Methylthioadenosins (MTA) im Gegensatz zum internen Standard Isoguanosin wesentlich größer als bei der MCF10A-Zelllinie. Dagegen ist bei der Brustepithelzelllinie MCF10A der Uridinpeak wesentlich größer und der Pseudouridinpeak kleiner.

MTA

MTA ist kein in RNA vorkommendes modifiziertes Nucleosid, sondern Teil der Methioninbiosynthese, wie in Abbildung 66 gezeigt. Viele Tumorzelllinien, u.a. MCF7, zeigen ein Methionin-abhängiges Wachstum, während dies bei gesunden Zellen nicht beobachtet wurde.¹¹²⁻¹¹⁵ Die Methioninbildung kann auf zwei Wegen erfolgen. Eine Möglichkeit bietet der *Salvage Pathway*, wobei S-Adenosylmethionin unter Bildung von Spermin und Spermidin (\rightarrow Polyaminbiosynthese) zu MTA umgesetzt wird. Dieses wird durch ein Enzym, die MTA-Phosphorylase (MTAP), zu Methylthioribose-1-phosphat umgesetzt. Dabei wird Adenosin abgespalten. Aus dem Methylthioribose-1-phosphat entsteht über weitere Reaktionsschritte wieder Methionin.

Methioninbiosynthese

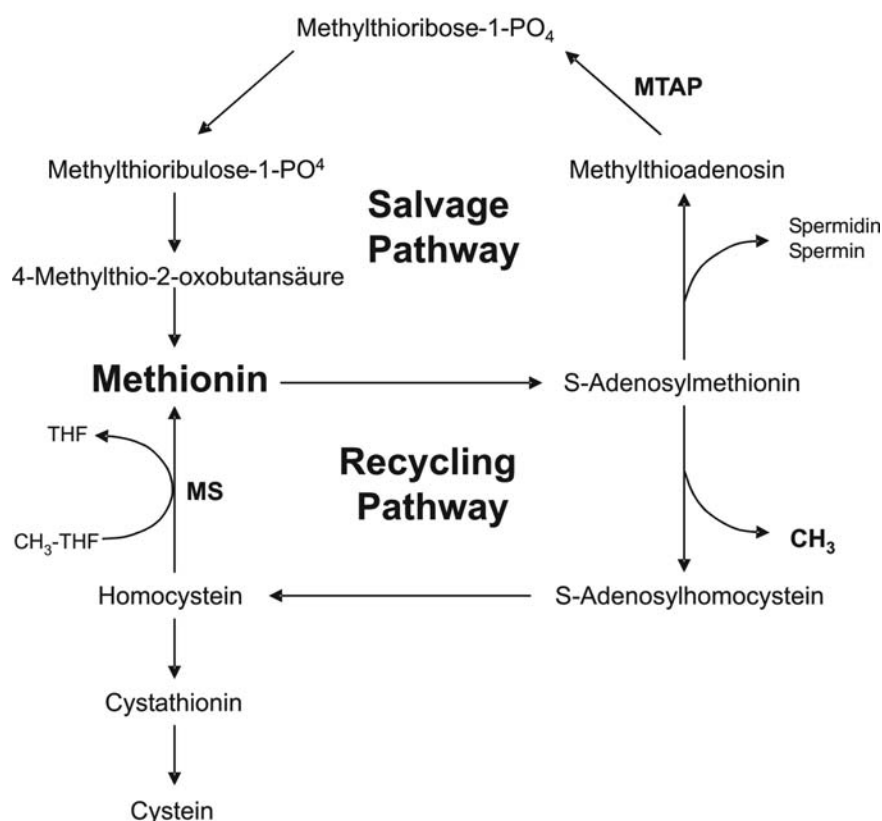


Abbildung 66: Übersicht über die Methioninbiosynthese (modifiziert nach Tang et al.¹¹⁵)

Das MTAP-Gen liegt auf dem Chromosom 9p21, das bei Tumorzellen oft mit dem Tumorsuppressionsgen p16 inaktiviert ist.¹¹⁶ Auch bei MCF-Zelllinien wurde festgestellt, dass das Chromosom 9p21 inaktiviert ist.¹¹⁷ Die vermehrte Ausscheidung von MTA durch die untersuchte MCF7-Zelllinie ist durch diesen Defekt erklärbar, da das MTA nicht abgebaut werden kann. Zudem kann vermutet werden, dass aufgrund der MTA-Anreicherung die Methioninbildung vermehrt über den *Recycling Pathway* erfolgt. S-Adenosylmethionin ist der vorherrschende Methylüberträger im Organismus. Auch die Methylierungen an den Nucleosiden innerhalb der prä-tRNA entstehen auf diese Weise unter Mitwirkung von spezifischen Methyltransferasen. Im *Recycling Pathway* der Methioninbiosynthese bildet S-Adenosylmethionin unter Methylabspaltung S-Adenosylhomocystein. Dieses wird zu Homocystein abgebaut, welches zum Methionin methyliert wird.

Uridin/Pseudouridin

Um den Unterschied im Verhältnis von Uridin und Pseudouridin zu verdeutlichen, sind in Abbildung 67 die Ionenchromatogramme von $[M+H]^+ = 245$ Da der Zelllinien MCF7 und MCF10A in RPMI Medium gezeigt. Während bei der Brustkrebszelllinie MCF7 der Pseudouridinpeak eine signifikant höhere Intensität zeigt als der des Uridins, verhält es sich bei der Brustepithelzelllinie MCF10A andersherum. Pseudouridin ist ein modifiziertes Nucleosid, das aus Uridin gebildet wird und das bei verschiedenen Krebserkrankungen in erhöhten Konzentrationen im Urin ausgeschieden wird.^{52;56;118-120} Der Unterschied im Verhältnis von Uridin und Pseudouridin bei den Tumorzellen und den gesunden Zellen stimmt mit dieser Beobachtung überein.

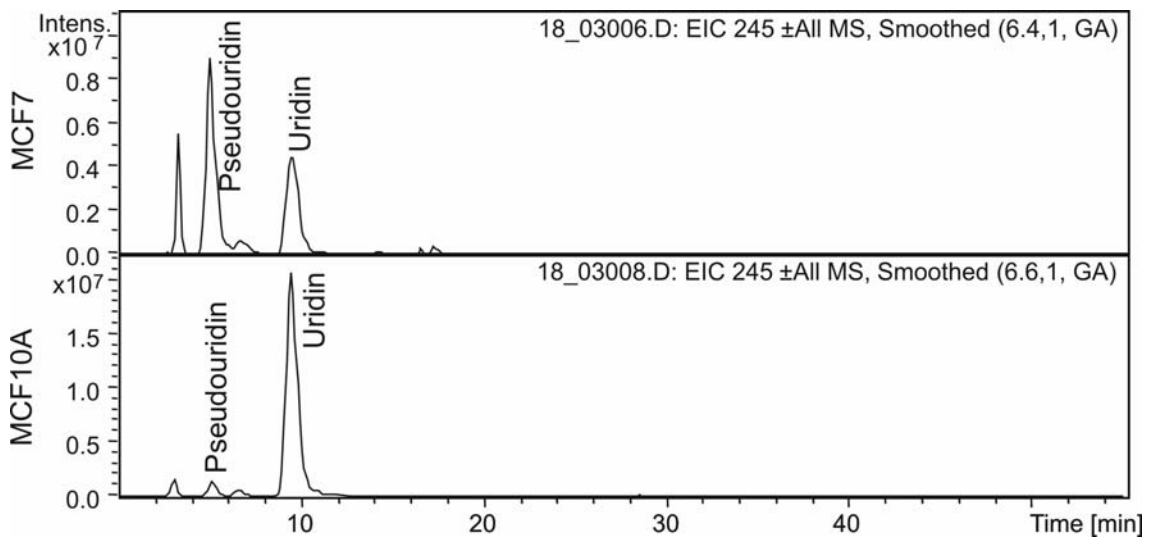


Abbildung 67: Ionenchromatogramme von $m/z=245$, Vergleich von MCF7 und MCF10A in RPMI

Um neben diesen auffälligen Unterschieden auch Abweichungen in den Minorkomponenten erkennen zu können, wurden außerdem die Base Peak-Chromatogramme verglichen. Ein vergrößerter Ausschnitt der beiden Zellkulturüberstände ist in Abbildung 68 zu sehen. Zum Vergleich sind auch die CNL-Chromatogramme gezeigt. Die auffälligsten Unterschiede sind mit gelben Fenstern markiert.

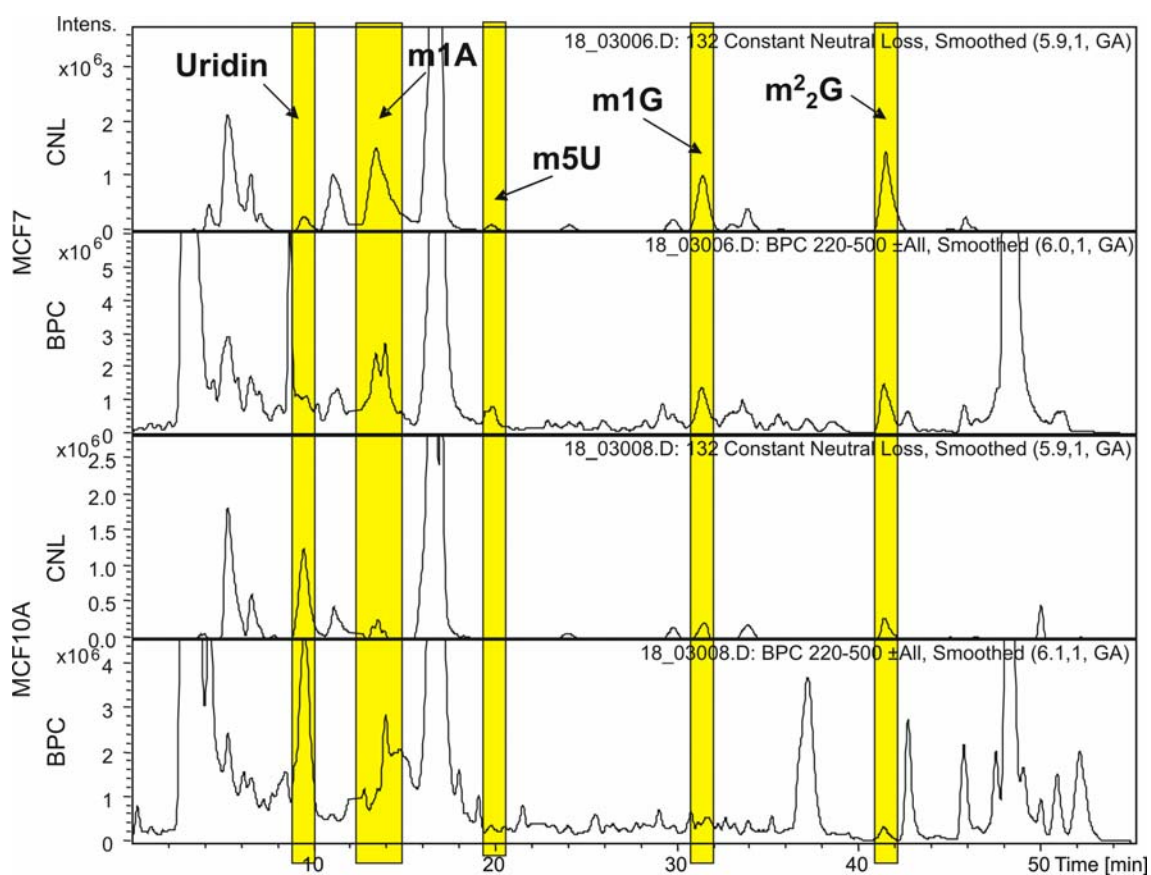


Abbildung 68: Vergleich der Zellkulturüberstände von MCF7 und MCF10A in RPMI Medium, Base Peak Chromatogramme (BPC, 220-500 Da) und Constant Neutral Loss (CNL)-Chromatogramme (132 u)

Da in den Basepeak-Chromatogrammen nur die jeweils intensivsten Massen berücksichtigt werden und die Massenspektren variieren, wurden die Massen der markierten Peaks in Ionenchromatogrammen extrahiert. Sie sind überlagert in Abbildung 69 dargestellt. Der Unterschied im Uridin/Pseudouridin-Verhältnis wurde bereits oben diskutiert, daher wurde m/z 245 nicht einbezogen. Ausgenommen m/z 252 sind die betrachteten Nucleoside im Überstand von MCF7 in höheren Konzentrationen enthalten als bei MCF10A. Es handelt sich um die methylierten Nucleoside 1-Methyladenosin, 5-Methyluridin, 1-Methylguanosin, 2-Methylguanosin und N2,N2-Dimethylguanosin. Die vermehrte Ausscheidung von methylierten Nucleosiden kann durch den oben beschriebenen Gendefekt der MCF7-Zellen erklärt werden. Bei der

Methioninbiosynthese wird aufgrund der fehlenden MTA-Phosphatase S-Adenosylmethionin vermehrt über den *Recycling-Pathway* zu Methionin abgebaut, wobei zunächst die Methylgruppe abgespalten wird. Diese kann auf Nucleoside übertragen werden.

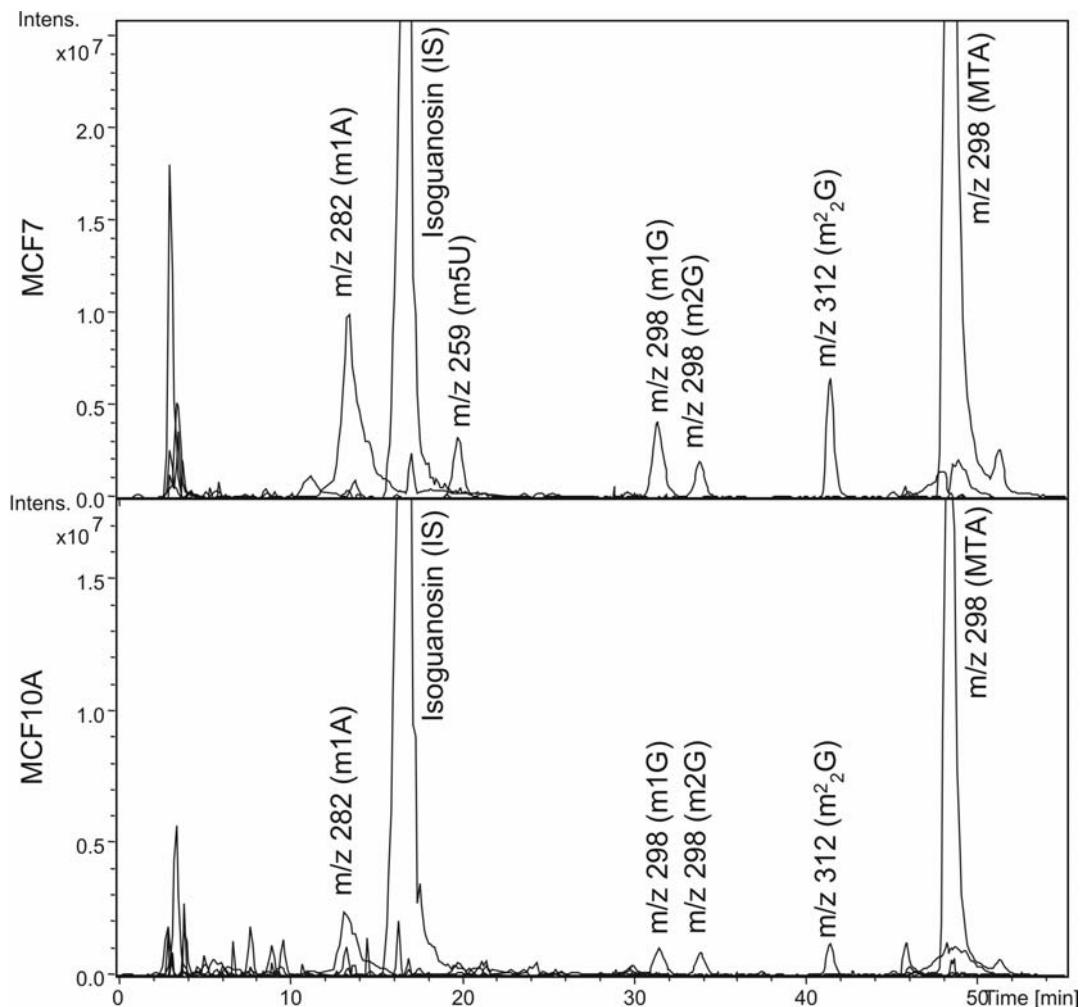


Abbildung 69: Vergleich der Ionenchromatogramme von m/z 282, m/z 298 und m/z 312 (übereinander gelegt) der Zellkulturüberstände von MCF10A und MCF7 in RPMI Medium

In Abbildung 70 und Abbildung 71 sind die CNL-Chromatogramme der Überstände von MCF7 und MCF10A gezeigt. Diese Chromatogramme geben eine Übersicht über die auftretenden Nucleoside bzw. Ribosederivate. Die Standardisierung durch den internen Standard ist jedoch als problematisch

anzusehen, da es sich um nachträglich prozessierte Daten handelt und die MS-Methode nicht für eine Quantifizierung entwickelt wurde. Es lässt sich aber dennoch sagen, dass beide Zelllinien prinzipiell die gleichen Nucleoside ausscheiden. Eine Ausnahme bildet die Komponente mit einer Retentionszeit von 50 min, die nur bei der MCF10A-Zelllinie zu sehen ist. Es handelt sich um eine Substanz mit $[M+H]^+ = 404$ Da. Im MS^3 -Spektrum des Basenfragments m/z 272 treten die Fragmente m/z 255, m/z 228 und m/z 211 auf. Das Fragment m/z 255 zeigt eine Differenz von 17 u zum Basenfragment. Dies spricht für eine Abspaltung von Ammoniak. Die Differenz von 44 u des Fragments m/z 228 zum Basenfragment ist ein Hinweis auf die Abspaltung von Ameisensäure. Die unbekannte Substanz enthält also eine Carbonsäuregruppe. Das Fragment m/z 211 scheint durch Abspaltung von Ammoniak und Ameisensäure entstanden zu sein. Eine vollständige Strukturaufklärung war mit den zur Verfügung stehenden MS-Daten nicht möglich.

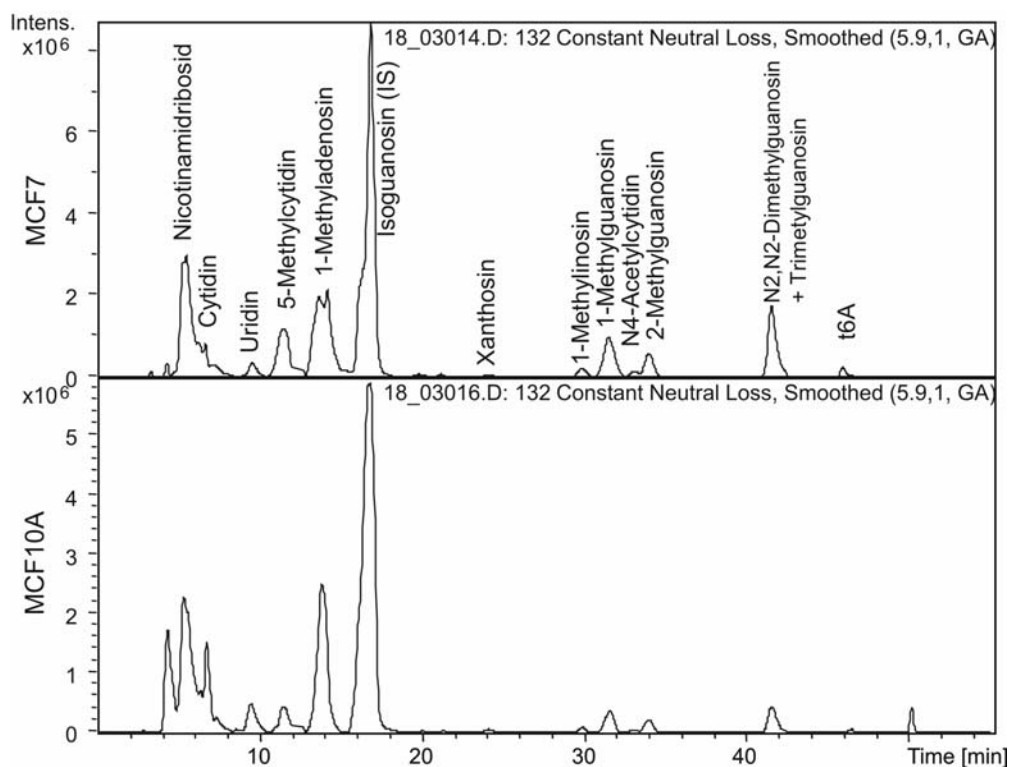


Abbildung 70: Vergleich der Zellkulturüberstände von MCF7 und MCF10A in MCF10A-Medium, Constant Neutral Loss Chromatogramme (132 u)

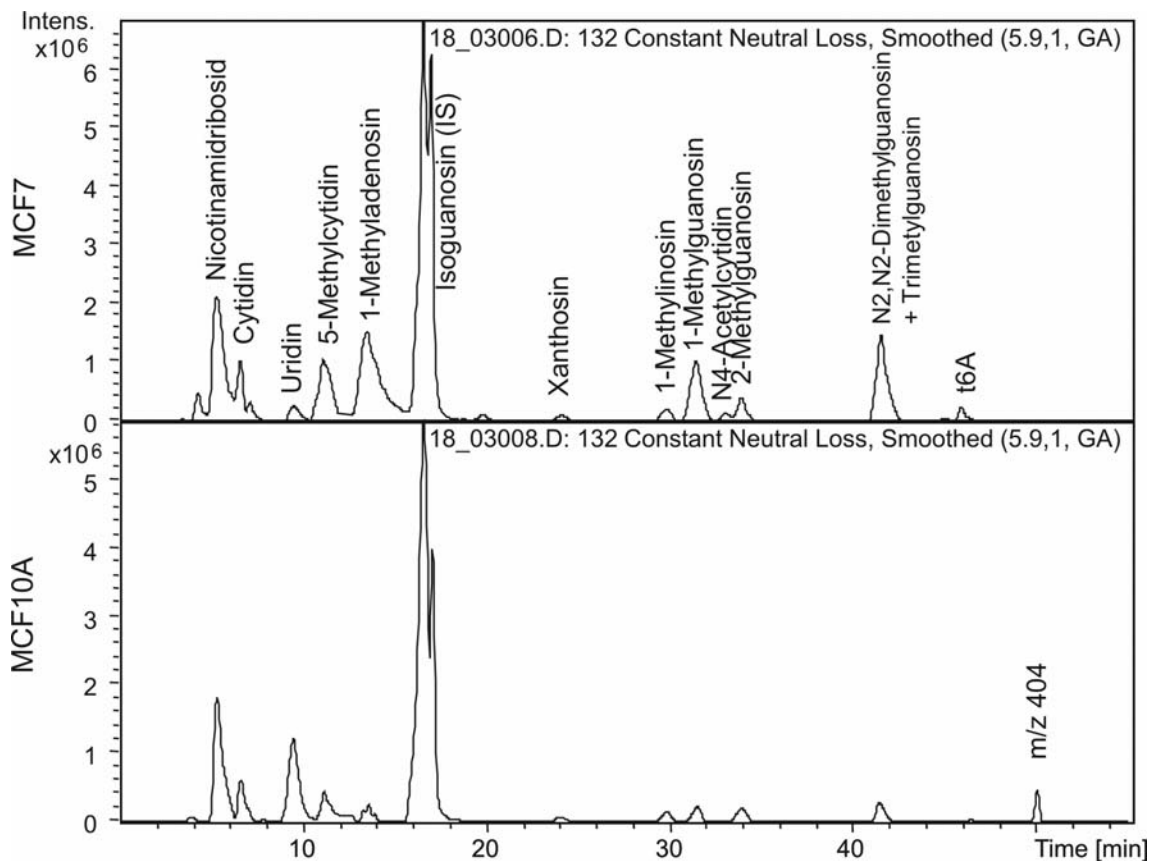


Abbildung 71: Vergleich der Zellkulturüberstände von MCF7 und MCF10A in RPMI Medium, Constant Neutral Loss Chromatogramme (132 u)

Vergleich MCF7 – SKBR3

Beim Vergleich der UV-Chromatogramme (Abbildung 72) der beiden Brustkrebszelllinien MCF7 und SKBR3 fällt auf, dass die SKBR3-Zellen insbesondere die unmodifizierten Nucleoside Cytidin und Uridin in hohen Konzentrationen ausscheiden. Im Gegensatz zu den MCF7-Zellen ist im Chromatogramm des SKBR3-Überstands auch Guanosin zu erkennen. Dagegen wird MTA nur von den MCF7-Zellen abgegeben. Eine Erklärung dafür könnte ein intaktes 9p21-Chromosom sein, während dieses bei MCF7-Zellen inaktiv ist. Allerdings ist das gänzliche Fehlen von MTA bei den SKBR3-Zellen ungewöhnlich, da es auch bei den Brustepithelzellen MCF10A nachgewiesen werden konnte.

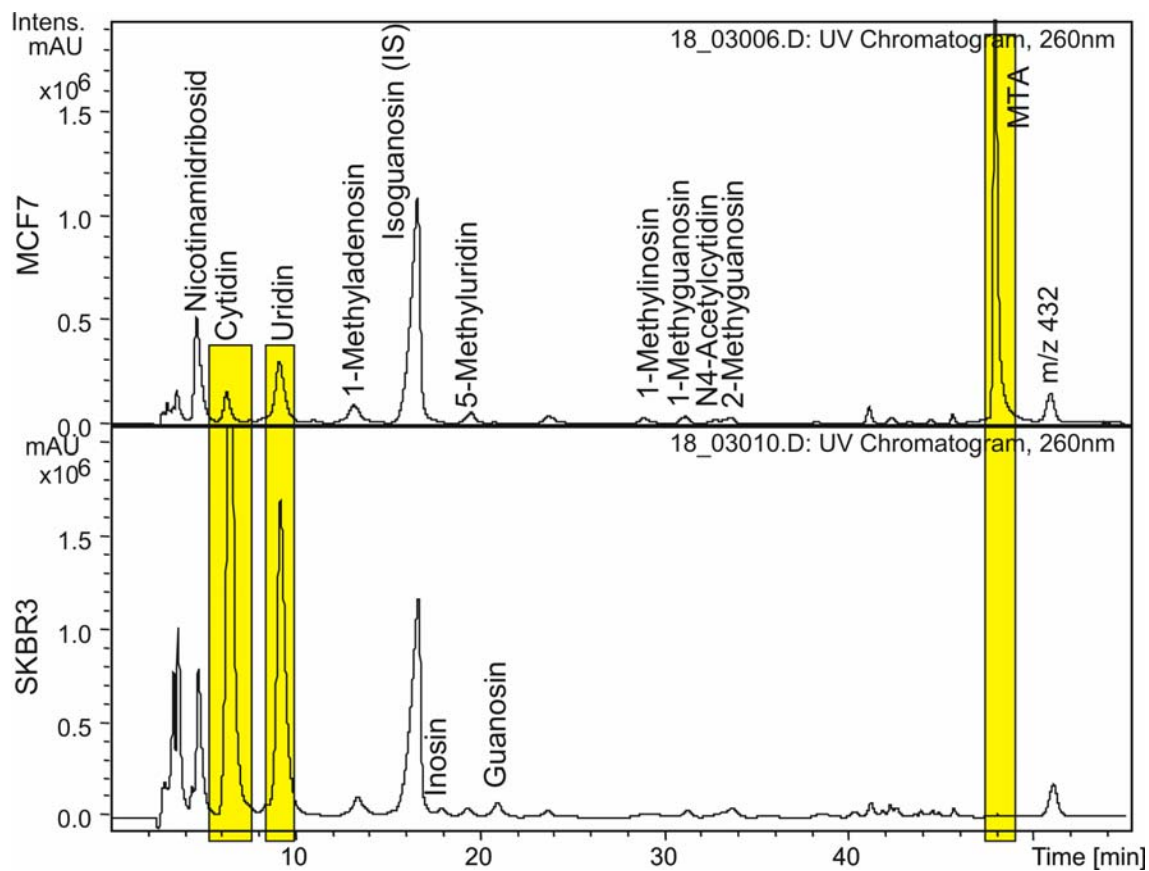


Abbildung 72: Vergleich der Zellkulturüberstände von MCF7 und SKBR3 in RPMI Medium, UV-Chromatogramme (260 nm)

Im CNL-Chromatogramm (Abbildung 73) werden die Beobachtungen aus dem UV-Chromatogramm bestätigt. Neben den bisher genannten Nucleosiden konnten m/z 255 (vermutlich Nicotinamidribosid), 5-Methylcytidin, Inosin, 5-Methyluridin, 1-Methylinosin, 1-Methylguanosen, N4-Acetylcytidin, 2-Methylguanosen, N2,N2-Dimethylguanosen, N2,N2,7-Trimethylguanosen, N6-Methyladenosin und t6A nachgewiesen werden.

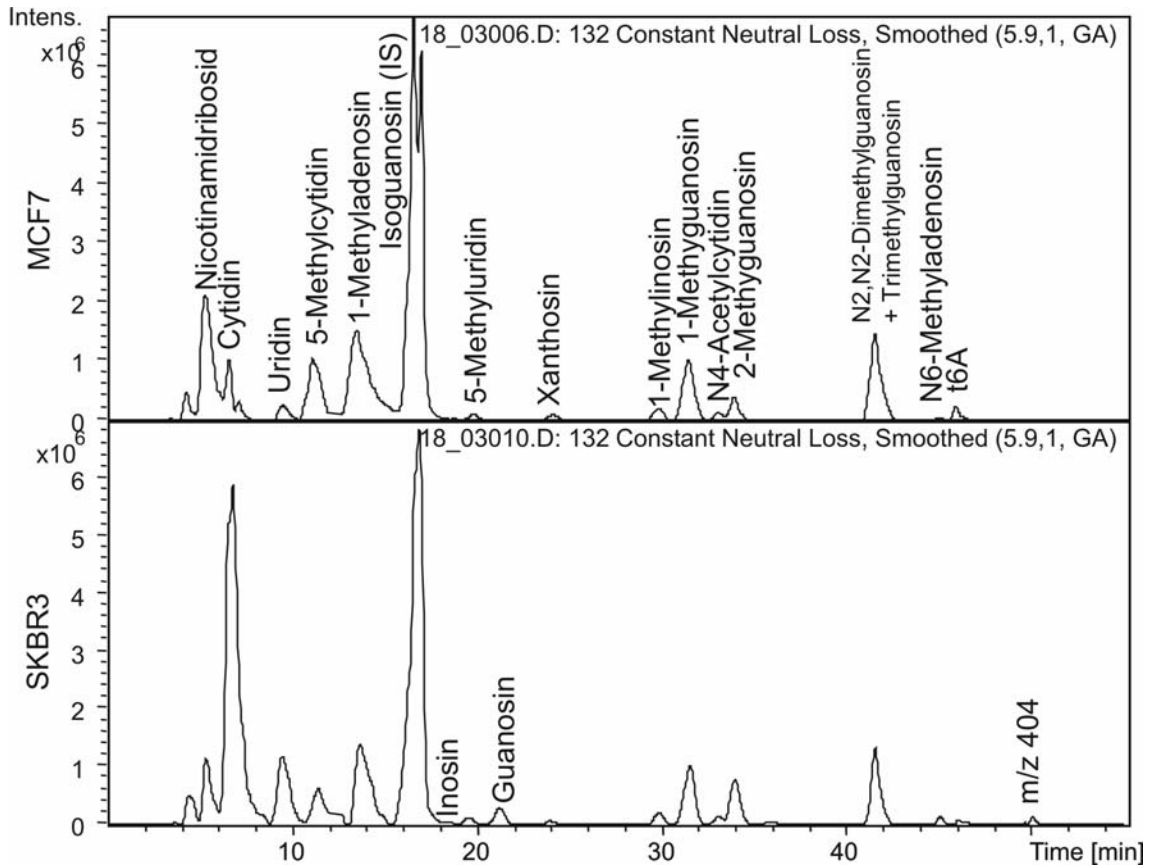


Abbildung 73: Vergleich der Zellkulturüberstände von MCF7 und SKBR3 in RPMI Medium, Constant Neutral Loss Chromatogramme (132 u)

Gezielte Untersuchung auf die bisher im Urin nachgewiesenen Nucleoside und sonstigen Ribosederivate

Um die Zellkulturüberstände auf die, wie unter 3.3.3 beschriebenen und in Tabelle 15 zusammengefassten, im Urin nachgewiesenen Nucleoside und sonstigen Ribosederivate zu untersuchen, wurden die jeweiligen Ionenspuren aus den Chromatogrammen extrahiert. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse für alle untersuchten Zellkulturmedien und die Überstände zusammengefasst. Die Basismedien für MCF7, MCF10A und SKBR3 sind die Medien, die für die Vorkulturen dieser Zelllinien verwendet wurden. Sie wurden untersucht, um auszuschließen, dass Artefakte aus ihnen fälschlich als Stoffwechselprodukte der Zellen betrachtet werden.

In den Basismedien konnten lediglich 1-Methyladenosin und Xanthosin nachgewiesen werden. Daher wird davon ausgegangen, dass es sich bei den Nucleosiden in den Chromatogrammen der Zellkulturüberstände um Stoffwechselprodukte der Zellen handelt. Die in unterschiedlichen Medien kultivierten Zelllinien zeigen weitgehend vergleichbare Nucleoside.

Zusammenfassung und Ausblick

Ein auffälliger Unterschied zwischen gesunden Brustepithelzellen und Brustkrebszellen ergab sich bei Betrachtung des 5`-Methylthioadenosins (MTA), welches bei den Krebszellen in hoher Konzentration ausgeschieden wird. Dieses Phänomen erklärt sich durch einen Gendefekt, durch den die Bildung der MTA-Phosphorylase, die für den MTA-Abbau verantwortlich ist, unterbunden wird.

Weitere Unterschiede ergaben sich im Verhältnis von Uridin zu Pseudouridin, welches bei den Mammakarzinomzellen zugunsten des Pseudouridins verschoben war. Diese Beobachtung korreliert mit entsprechenden Literaturdaten bei denen im Urin von Brustkrebspatientinnen erhöhte Pseudouridinkonzentrationen festgestellt wurden.

Um weitere Aussagen machen zu können, sollten weitere Zellkulturüberstände untersucht werden, damit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet wird. Daneben wäre ein Upscaling sinnvoll, da die Konzentrationen in den Zellkulturüberständen gering sind. Die Intensitäten der Nucleoside liegen je nach Substanz etwa um ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als bei den Urinproben. So könnten auch Minorkomponenten erfasst und genauer untersucht werden.

3.4 Mikrosomeninkubationen von MTA und Pseudouridin

3.4.1 Einleitung

Nucleoside werden in der lebenden Zelle laufend neu gebildet, um RNA aufzubauen. Nach der Translation wird die RNA wieder abgebaut, wobei die meisten modifizierten Nucleoside im Gegensatz zu den normalen nicht wieder verwertet werden können, da die entsprechenden Phosphorylasen für die Spaltung in Nucleinbase und Ribose-1-phosphat fehlen.

Die meisten Modifikationen der Nucleoside finden posttranskriptional in den Zellen statt. Es ist aber denkbar, dass auch auf dem Weg zur Ausscheidung noch Veränderungen der Nucleoside erfolgen. Das Hauptorgan zur Metabolisierung von Stoffen ist die Leber. Die Leberepithelzellen (Hepatozyten) enthalten zahlreiche am Stoffwechsel beteiligte Enzyme, die in den Mitochondrien oder den Membranen des Endoplasmatischen Reticulums (ER) lokalisiert sind. Am glatten ER befinden sich unter anderen die für Oxidationen verantwortlichen Hydroxylasen und Oxidasen. Zur Untersuchung von Metabolismusreaktionen werden häufig Lebermikrosomen eingesetzt. Diese bestehen aus Bruchstücken des ER, die bei der fraktionierten Zentrifugation von Leberzellhomogenaten entstehen. Der wesentliche Bestandteil des mikrosomalen Enzymsystems ist die Gruppe der Cytochrom P 450-Enzyme. Die durch dieses Enzymsystem stattfindenden Modifikationen gehören zu den so genannten Phase-I-Reaktionen, zu denen neben den Oxidationen auch Reduktionen, Alkylierungen und Desalkylierungen sowie hydrolytische Spaltungen zählen.^{35;121}

Da bei den Untersuchungen von Zellkulturüberständen insbesondere bei MTA und Pseudouridin Konzentrationsunterschiede zu erkennen waren, wurde der Metabolismus dieser beiden Nucleoside durch Mikrosomeninkubationen untersucht. MTA ist allerdings kein modifiziertes Nucleosid aus der RNA, sondern Teil der Methioninbiosynthese.

Die Durchführung der Mikrosomeninkubationen ist unter 5.1.4 beschrieben. Die Messung erfolgte mit der unter 5.5 beschriebenen auto-LC-MS³-Methode.

3.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Aus den erhaltenen Daten wurden Constant Neutral Loss (CNL) Chromatogramme der Masse 132 generiert, in denen alle Substanzen gezeigt sind, die im ersten Fragmentierungsschritt einen Verlust von 132 u, d.h. der Ribose, aufweisen. Außerdem wurden zur Identifizierung der Nucleoside die Retentionszeiten sowie die Fragmentierung herangezogen. Zur gezielten Suche nach potenziellen Modifikationen bei den untersuchten Nucleosiden wurden zusätzlich Ionenchromatogramme verwendet. Dabei wurde auf Oxidationen, Methylierungen und Demethylierungen geachtet.

Die Blindinkubation ergab, dass bereits in der Mikrosomenlösung Nucleoside enthalten sind. Dies ist nicht verwunderlich, da es sich bei Mikrosomen um Zellbruchstücke handelt und in jeder Zelle Nucleoside vorliegen. Wie in Abbildung 74 zu sehen, zeigten sich im CNL-Chromatogramm sieben Peaks mit den Massen 255 (Nicotinamidribosid), 244 (Cytidin), 245 (Uridin), m/z 257 (?), 269 (Inosin), 282 (1mA) und 268 (Adenosin). Dies ist bei der weiteren Auswertung zu berücksichtigen.

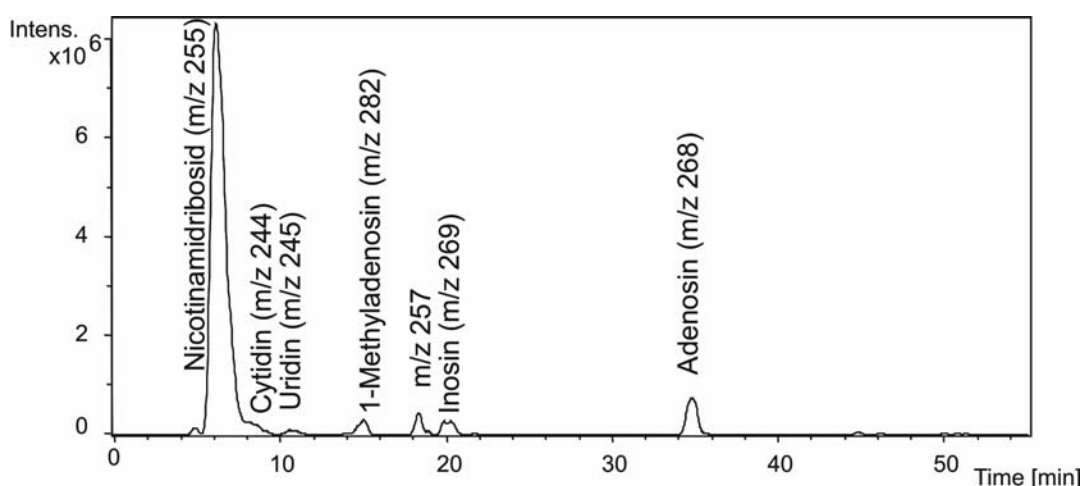


Abbildung 74: CNL-Chromatogramm (132 u) der Mikrosomenblindinkubation

Um sicherzustellen, dass potenzielle Veränderungen durch die Mikrosomeninkubation erfolgten und nicht schon vor der Inkubation in der Lösung waren, wurden die verwendeten Standardlösungen jeweils verdünnt und ebenfalls mit der auto-LC-MS³-Methode vermessen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Ergebnisse der Mikrosomeninkubationen von MTA und Pseudouridin

Inkubiertes Nucleosid	Auftretende Nucleoside in der eingesetzten Lösung in Tris-Puffer	Nucleoside in der aufgearbeiteten Lösung der Mikrosomeninkubation
Mikrosomen-blindinkubation	-	Nicotinamidribosid (m/z 255) Cytidin (m/z 244) Uridin (m/z 245) 1mA (m/z 282) Inosin (m/z 269) Adenosin (m/z 268)
MTA	MTA (m/z 298)	Nicotinamidribosid (m/z 255) Cytidin (m/z 244) Uridin (m/z 245) 1mA (m/z 282) Adenosin (m/z 268) MTA (m/z 298)
Pseudouridin	Pseudouridin (m/z 245)	Nicotinamidribosid (m/z 255) Cytidin (m/z 244) Uridin (m/z 245) Inosin (m/z 269) 1-Methyladenosin (m/z 282) Adenosin (m/z 268) Pseudouridin (m/z 245)

Diskussion

Weder bei MTA noch bei Pseudouridin wurden Modifizierungen durch die Mikrosomeninkubation festgestellt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bereits in den Mikrosomen die Nucleoside Uridin und Adenosin enthalten sind. Diese Nucleoside treten auch bei den Inkubationen von Pseudouridin und MTA auf. Es wäre denkbar, dass sie auch durch die mikrosomalen Enzyme aus Pseudouridin bzw. MTA entstehen. Um den Ursprung dieser Nucleoside zu bestimmen, müssten zusätzlich Inkubationen mit den reinen CYP-Enzymen durchgeführt werden.

In verschiedenen Publikationen wird die N-Demethylierung von Coffein durch CYP1A1 und CYP1A2 beschrieben.¹²²⁻¹²⁴ Die beiden Isoenzyme zeigen eine überlappende Substratspezifität.¹²⁵ Bei Coffein handelt es sich um dreifach methyliertes Xanthin, sodass eine vergleichbare Reaktion bei anderen Nucleosiden vermutet werden kann.

Die Isoenzyme CYP1A1 und CYP1A2 katalysieren bei Arzneistoffen neben der Demethylierung auch eine Dealkylierung und Hydroxylierung.¹²⁶

Bei MTA wäre eine Oxidation zum 5`-Deoxy-5`-methylthioinosin möglich, die allerdings nicht beobachtet wurde. Auch Hydroxylierungen konnten bei beiden Nucleosiden nicht nachgewiesen werden.

Die Nucleoside Pseudouridin und MTA wurden durch die Lebermikrosomen nicht verändert. Es ist aber zu beachten, dass die Inkubationen nur ein Lebermodell darstellen und im Körper noch andere Vorgänge möglich sind, durch die Metaboliten der Nucleoside gebildet werden können. Da sie bei den Mammakazinomzelllinien (vgl. 3.3.4) in erhöhter Konzentration auftraten, kann vermutet werden, dass sie auch im Urin vermehrt ausgeschieden werden und damit potenzielle Tumormarker darstellen. Die erhöhten Konzentrationen von MTA im Urin sind auf den häufig bei Tumorzellen beobachteten MTA-Phosphorylase-Gendefekt zurückzuführen.

3.5 Nano-ESI-Messungen von Nucleosiden aus Urin am Triple-Quadrupol

3.5.1 Einleitung

Bei der herkömmlichen ESI-Ionisierung, meist nach chromatographischer Trennung, werden zur Überführung der Probe in die Gasphase Kapillaren mit Durchmessern zwischen 50 und 100 μm verwendet, die den üblichen Flussraten von 5 bis 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ angepasst sind.

Insbesondere im Bereich der Bioanalytik, wo die Probemenge oft limitiert ist, werden mikro- oder nano-LC-Methoden angewendet und die Ionisierungsmethode entsprechend angepasst (mikro-Elektrospray oder nano-Elektrospray). Die Flussraten sind dabei erheblich geringer, bei der mikro-ESI zwischen 0.2 und 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ und bei der nano-ESI zwischen 5 und 20 nL/min . Der Ionenstrom ist eher von der Konzentration des Analyten als von der versprühten Probenmenge abhängig. Bei höheren Flussraten geht ein größerer Anteil des Sprays im Ionisierungsraum verloren. Wird aber die nano-Spraykapillare vor die Interface-Platte fokussiert, wird die Probe nahezu vollständig in das Massenspektrometer überführt, sodass eine geringere Flussrate mit einer erhöhten Empfindlichkeit einhergeht.

Bei der nano-ESI-Methode werden Glaskapillaren, die mit einer Metallschicht überzogen sind, verwendet. Der Innendurchmesser beträgt nur wenige Mikrometer. Einige Mikroliter Probenlösung werden in die Nadel überführt und mittels Druckluft in die Spitze der Nadel gedrückt. Es entstehen mikroskopische Tröpfchen, die durch das elektrische Feld zur Orifice-Platte beschleunigt werden. Die Flussraten betragen ca. 5 bis 20 nL/min , sodass auch bei einem geringen Probenvolumen eine lange Messzeit zur Verfügung steht. Diese Messzeit kann zur Optimierung der Messbedingungen und Akkumulierung von Spektren bei schwachen Intensitäten genutzt werden.

Die Messung am Triple-Quadrupol-Massenspektrometer bietet den Vorteil, Constant Neutral Loss Spektren aufnehmen zu können, während dies bei der Ionenfalle nur durch nachträgliches Prozessieren bei der Auswertung möglich ist. Die CNL-Spektren zeigen nur diejenigen in der Probe enthaltenen Komponenten, die den vorgegebenen Neutralverlust zeigen. Wie bereits erwähnt, wird bei Nucleosiden im ersten Fragmentierungsschritt die Ribose abgespalten.

Daneben werden manuelle MS/MS-Experimente durchgeführt, um aufgrund des Fragmentierungsverhaltens, ähnlich wie bei den Ionenfallenmessungen, weitere Informationen über die Struktur zu erhalten.

3.5.2 Untersuchung von Nucleosiden aus Urin

Zur Überprüfung der nano-ESI-Methode wurde die Urinprobe FK 214 von einer Brustkrebspatientin zunächst mit der auto-LC-MS³-Methode untersucht, wie unter 5.5 beschrieben. Es wurden 30 µL der aufgearbeiteten Probe injiziert, um möglichst hohe Konzentrationen aller Nucleoside, insbesondere der Minorkomponenten, zu erhalten. Anschließend wurde die Probe erneut der HPLC-Trennung unterzogen, allerdings ohne MS-Detektion. Stattdessen wurden 43 Fraktionen gesammelt, wie im Chromatogramm in Abbildung 75 gezeigt.

Die Ergebnisse der Auswertung nach massenspektrometrischer Detektion sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Ausgehend von den Ergebnissen der auto-LC-MS³-Messung wurden einzelne dieser Fraktionen ausgewählt, in denen potentiell neue Nucleoside enthalten waren. In Tabelle 19 sind die bekannten Nucleoside angegeben. Die Darstellung beschränkt sich für alle Fraktionen auf die Hauptkomponenten.

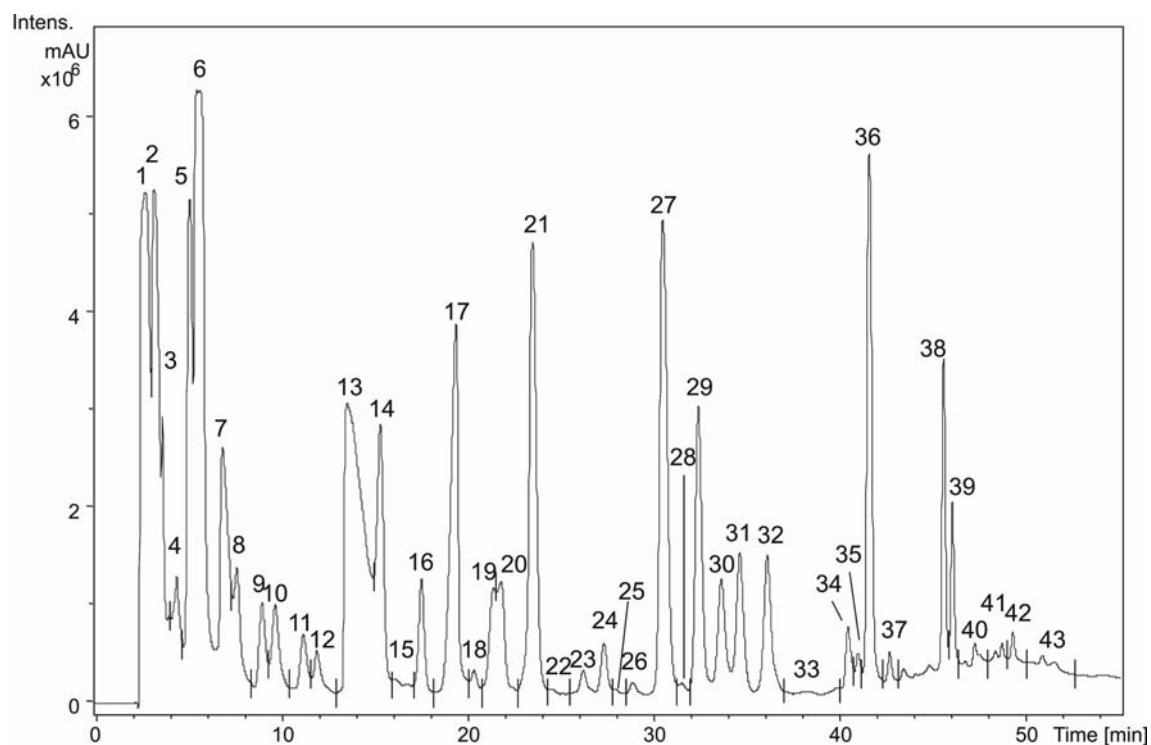


Abbildung 75: HPLC-UV-Chromatogramm (210 nm) von Urinprobe FK 214

Durch die MSⁿ-Messungen an der Ionenfalle konnte ermittelt werden, welche Komponenten einen Neutralverlust von 132 u zeigten. Diese unbekanntes Ribosederivate sind mit Fragezeichen gekennzeichnet. Einige der Fraktionen, die solche Substanzen enthielten, wurden mittels nano-ESI untersucht. Dies waren die Fraktionen 4 (m/z 259), 7 (m/z 399), 14 (m/z 367), 19 (m/z 269), 20 (m/z 301), 26 (m/z 351) und 39 (m/z 313).

Diese Fraktionen wurden mit der nano-ESI-Methode untersucht, wie unter 5.6 beschrieben, um weitere Informationen über diese Minorkomponenten zu erhalten. Es wurden MS-Full-Scan-Spektren, Constant Neutral Loss-Spektren und MS/MS-Spektren aufgenommen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der untersuchten Peaks ist in Tabelle 20 gezeigt. Für die Full-Scan-Spektren sind jeweils die drei Massen mit den höchsten Intensitäten angegeben.

Tabelle 19: Ergebnis der LC-MS3-Trennung von Probe FK 214

Fraktion	[M+H] ⁺	Nucleosid (falls bekannt)	Fraktion	[M+H] ⁺	Nucleosid (falls bekannt)
1	221	kein Nucleosid	23	259	5-Methyluridin
2	259	?	24	285	Xanthosin
3	330	kein Nucleosid	25	293	?
4	259	?	26	351	?
5	247	5,6-Dihydrouridin	27	283	1-Methylinosin
6	245	Pseudouridin	28	253	kein Nucleosid
7	399	kein Nucleosid	29	298	1-Methylguanosin
8	244	Cytidin	30	286	N4-Acetylcytidin
9	228	?	31	298	2-Methylguanosin
10	346	?	32	268	Adenosin
11	245	Uridin	33	393	kein Nucleosid
12	258	Methylcytidin	34	398	?
13	282	1-Methyladenosin	35	326	Trimethylguanosin
14	367	Kein Nucleosid	36	312	N2,N2-Dimethylguanosin
15	282	1-Methyladenosin	37	201	Kein Nucleosid
16	271	PCNR	38	413	t6A
17	284	Isoguanosin (IS)	39	313	?
18	371	kein Nucleosid	40	281	kein Nucleosid
19	269	Inosin	41	298	MTA
20	301	?	42	459	?
21	271	PCNR	43	393	kein Nucleosid
22	296	?			

Tabelle 20: Ergebnisse der nano-ESI-Messungen von einzelnen Peakfraktionen

Peakfraktion	MS	CNL	Massen im MS/MS-Spektrum
4	255	255	123, 106, 96, 80, 78
	286	246	114, 86, 73
	223	259	127, 109, 81
		273	141, 95
7	299	281	206, 149
	417	244	191, 153, 135, 112
	186	212	177, 166, 149, 121, 96, 80
		255	209, 181, 163, 123
		266	134, 129, 97, 59
		273	141, 123
14	282	282	150, 133, 119, 109, 92, 82
19	150	269	137, 19, 110, 94, 82
	172	284	152, 135, 123, 110, 99
	186	291	159, 128, 109
		298	166, 149, 124
		282	150, 133, 119
20	212	281	263, 245, 235, 218, 209, 199, 149 etc.
	195	269	215, 171, 137
	266	301	169, 137, 109
		323	233, 191, 163, 123, 101
39	186	313	181, 124, 96, 69
	223	281	162, 136, 119
	335	413	281, 162, 136, 119

In den verschiedenen Peakfraktionen konnten sowohl einige bekannte bzw. in den vorherigen Ionenfallenmessungen auftretende als auch unbekannte Nucleoside/Ribosylderivate nachgewiesen werden.

Peakfraktion 4 enthielt eine Komponente mit m/z 255. Die Fragmentierung ergab ein Spektrum mit dem Basenfragment m/z 123 sowie einigen anderen Massenpeaks, die mit denen aus den MS^3 -Spektren der Ionenfallenmessungen übereinstimmen und zur Fragmentierung von Nicotinamidribosid passen.

In Fraktion 7 konnte m/z 244 durch die Fragmentierung als Cytidin identifiziert werden. Die Fragmentierung stimmt mit der aus den Untersuchungen an der Ionenfalle überein.

In Fraktion 14 wurde m/z 282 durch die Fragmente im MS/MS-Spektrum als 1-Methyladenosin identifiziert. Auch hier war die Fragmentierung mit der aus den Ionenfallenmessungen vergleichbar.

In Fraktion 19 traten drei Massenpeaks mit einem Neutralverlust von 132 u auf, die aufgrund ihrer Retentionszeit und Fragmentierung bekannten Nucleosiden zugeordnet werden konnten. Dies sind Inosin (m/z 269), Guanosin (m/z 284) und 7-Methylguanosin (m/z 298).

Die Komponente mit m/z 301 aus Fraktion 31 konnte bereits in den Ionenfallenmessungen im Urin nachgewiesen werden. Auch die Fragmentierung stimmt überein.

Die Komponente mit m/z 413 in Fraktion 39 konnte bereits durch die Messungen an der Ionenfalle als N6-Threonylcarbamoyladenosin identifiziert werden, welches in Peakfraktion 38 eluiert.

Daneben wurden mehrere Komponenten in den Fraktionen untersucht, die bei der Fragmentierung einen Neutralverlust von 132 u zeigten. Zur Identifizierung dieser potenziellen Nucleoside könnte ein Upscaling hilfreich sein, um eine Messung mit hoher Massengenauigkeit durchführen zu können und somit eine Summenformel zu berechnen.

3.5.3 Zusammenfassung

Bei den durchgeführten nano-ESI-Experimenten zeigten sich in den untersuchten Fraktionen diverse Substanzen, die einen Neutralverlust von 132 u aufweisen und in den Ionenfallen-Messungen nicht auftraten. Dies spricht für eine höhere Sensitivität. Diese Methode bietet den Vorteil, auch Minorkomponenten näher untersuchen zu können, da eine wesentlich längere Messzeit zur Verfügung steht. Bei den LC-auto-MS³-Messungen an der Ionenfalle wird jeweils nur der Massenpeak mit der höchsten Intensität für die weitere Fragmentierung selektiert. Der Vorteil der Messungen mit dem Triple-Quadrupol ist bei Vergleich der intensivsten Massen im MS Full-Scan und im CNL-Spektrum ersichtlich (vgl. Tabelle 20). Diese stimmen selten überein. Bei der LC-auto-MS³-Methode an der Ionenfalle würden in diesem Fall nur die intensivsten unbekanntesten Massen für die Fragmentierung gewählt. Bei den nano-ESI-Messungen kann manuell eine beliebige Anzahl von auftretenden Massen fragmentiert werden.

Allerdings ist bei Messungen am Triple-Quadrupol die Fragmentierung auf MS²-Spektren begrenzt und die Strukturaufklärung anhand dieser nur sehr begrenzt möglich.

Die Untersuchung von Peakfraktionen mit nano-ESI-MS könnte aber in Verbindung mit anschließendem gezieltem Upscaling und Anwendung von weiteren Methoden zur Strukturaufklärung von Minorkomponenten im Urin beitragen.

3.6 HPLC-MS-Methode zur Messung von Nucleosiden in Urinproben und Auswertung mit Methoden der Bioinformatik

3.6.1 Einleitung

Modifizierte Nucleoside sind die Endprodukte des RNA-Stoffwechsels und werden mit zahlreichen anderen Metaboliten im Urin ausgeschieden. Die Veränderung des Musters von Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten als Reaktion auf genetische oder ökologische Veränderungen steht im Mittelpunkt des sogenannten „Metabolomics“-Konzepts. Dieses versteht sich allgemein als quantitatives Profiling der metabolischen Reaktion lebender Systeme auf pathophysiologische Stimuli oder genetische Modifikationen. Das untersuchte „Metabolom“ ist dabei die Gesamtheit aller Metabolite eines biologischen Systems. Im Metabolomics-Konzept werden also nicht isolierte, sondern sämtliche Veränderungen innerhalb der Zellen eines Organismus betrachtet, was zu einem besseren Verständnis der gesamten physiologischen Vorgänge im Hinblick auf äußere Einflüsse führt.

Die Relevanz der Identifizierung von Metaboliten und der Unterscheidung von physiologisch verschiedenen Gruppen (z.B. gesund - krank) aufgrund von Veränderungen des Musters der entsprechenden Metabolite in biologischen Flüssigkeiten wurde in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben.¹²⁷⁻¹³²

Die vorherrschenden Techniken zur Generierung der Daten waren dabei die NMR¹³³⁻¹³⁵ und die Massenspektrometrie^{131;132;136-138}. Die Anwendungsgebiete umfassen die Herstellung von Arzneimitteln^{131;138}, Aufklärung und Einsatz von Biomarkern in der Diagnostik von Krankheiten^{127;134;138} sowie die Nahrungsmittelforschung¹²⁹.

Die am häufigsten angewendete statistische Methode zur Klassifizierung in den genannten Studien war die Hauptkomponentenanalyse (PCA).

Yang et al. bezogen 113 aus Urin isolierte cis-Diole in eine Auswertung mittels Hauptkomponentenanalyse ein. Dabei wurden Urinproben von gesunden Kontrollpersonen und Proben von Patienten mit Leberkrebs, Hepatitis oder Leberzirrhose mittels HPLC-UV untersucht und eine Klassifizierung vorgenommen. Ausgehend von 15 Nucleosiden wurden 83 % der Proben von Leberkrebspatienten korrekt zugeordnet. Für die bekannten Marker für diese Erkrankung ergaben sich Sensitivitäten zwischen 6 und 73 %. Ausgehend von allen 113 Komponenten ergab die Hauptkomponentenanalyse (zwei Hauptkomponenten) eine geringere Anzahl von falsch-positiven Ergebnissen im Vergleich zur Anwendung des üblichen Tumormarkers AFP (alpha-fetoprotein).⁶²

In einer neuen Publikation stellt dieselbe Arbeitsgruppe eine erweiterte Methode vor, bei der zusätzlich eine massenspektrometrische Detektion erfolgt.¹³⁸ In beiden Studien wurden die integrierten Peakflächen auf einen internen Standard und die Kreatininkonzentration im Urin bezogen.

In einer dieser Arbeit vorangegangenen Arbeit wurde ein neuronales Netz zur Klassifizierung von Brustkrebspatientinnen und Kontrollproben nach Quantifizierung von 16 Nucleosiden mittels HPLC-UV verwendet.⁶¹ In den Proben dieser Studie wurden außerdem die Marker CA 15-3 und CEA bestimmt. Selbst bei Kombination beider Marker wurde nur eine Sensitivität von 14.5 % erreicht, d.h. nur 14.5 % der erkrankten Personen wurden als solche erkannt. Dies zeigt erneut, dass diese Marker ungeeignet für die Diagnose von Brustkrebs sind.

Bei Betrachtung der einzelnen Nucleosidkonzentrationen und Vergleich der beiden Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test konnte für fünf der untersuchten Nucleoside (Pseudouridin, Inosin, 1-Methylinosin, Guanosin und 3-Methyluridin) eine signifikante Erhöhung bei der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen festgestellt werden. Die ermittelten Sensitivitäten bei einer Spezifität von 95 % liegen jedoch bei diesen Nucleosiden nur zwischen 7 und 37 %. Bei einer geringeren Spezifität von ca. 83 % bewegen sich die Sensitivitäten zwischen 22 und 67 %.

Bei Auswertung mit dem neuronalen Netz ergab sich eine Spezifität von 83.4 % und eine Sensitivität von 73.5 %. Dieses Ergebnis ist eine Steigerung gegenüber den bekannten Markern CA 15-3 und CEA sowie dem Ergebnis bei Betrachtung der einzelnen Nucleoside.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Klassifizierung eine Support Vector Machine (SVM) eingesetzt. Support Vector Machines sind Lern-Algorithmen, die in der Lage sind, eine große Anzahl von Input-Vektoren zu verarbeiten. Es gibt zahlreiche Anwendungsgebiete, wie die Charakterisierung von Molekülen¹³⁹⁻¹⁴¹ oder in Proteomics im Zusammenhang mit Krankheitsbildern¹⁴²⁻¹⁴⁴. Das übliche Ziel ist die Klassifizierung auf der Basis einer variierenden Anzahl von Deskriptoren.

Support Vector Machines wurden bereits zur Diagnose von Krebserkrankungen (Eierstock- und Lungenkrebs) eingesetzt, wobei massenspektrometrische Daten die Grundlage bildeten.^{145;146}

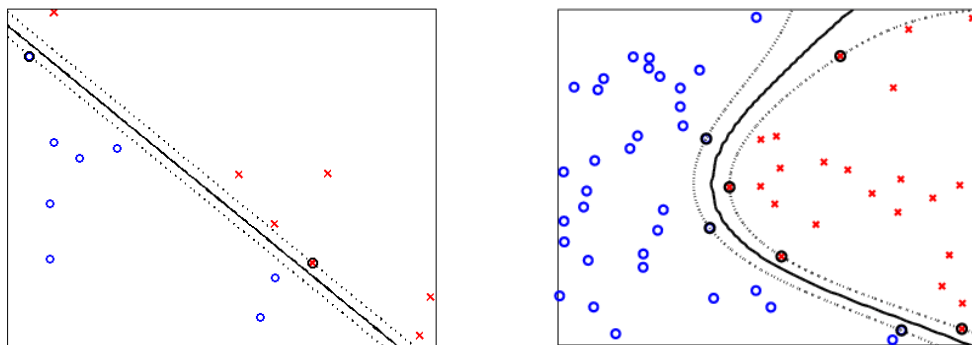


Abbildung 76: a) Beispiel einer SVM-Klassifizierung von roten Kreuzen und blauen Kreisen durch eine optimal trennende Hyperebene (schwarze Linie) mit Support Vectors (umkreiste Datenpunkte auf dem Rand des Zwischenraums) b) Beispiel einer nicht-linearen SVM Klassifizierung

Das Grundkonzept einer SVM-Klassifizierung ist in Abbildung 76 dargestellt. Die zu trennenden Klassen sind durch rote Kreuze und blaue Kreise symbolisiert. Sie sollen durch eine optimal separierende Hyperebene getrennt

werden. Die Hyperebene wird so erstellt, dass die Abstände zwischen der Ebene und den ihr am nächsten liegenden Punkten (den so genannten Support Vektoren) maximiert werden. Die Ebene hängt dabei nur von diesen Support Vectors ab, die übrigen Datenpunkte spielen für ihre Lage keine Rolle. In Abbildung a ist eine lineare Trennung möglich, während die Trennung in Abbildung b komplizierter ist. Solche nicht-linearen Klassifizierungen können durch Abbilden der Daten in einen höher dimensional Raum ausgeführt werden, indem dort eine optimale Hyperebene zur Trennung berechnet wird. Dieses Abbilden wird meist durch so genannte Kernel Funktionen erreicht, einer speziellen Klasse von Ähnlichkeitsmaßen. Eine häufig verwendete Kernel Funktion ist die *Radial Basis Function Kernel* (RBF-Kernel):

$$k(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \exp\left(-\frac{\|\mathbf{x} - \mathbf{y}\|^2}{2\sigma^2}\right)$$

Die Klassifizierung durch die SVM wurde durch eine *Leave-one-out* (LOO) Kreuzvalidierung bewertet. Der LOO bietet eine Möglichkeit zur Abschätzung der Generalisierungsleistung von maschinellen Lernverfahren.¹⁴⁷ Zur Berechnung des LOO wird jeder einzelne der 212 Werte ausgeklammert und das Modell mit den jeweils restlichen Werten trainiert. Im Anschluss an jede dieser Berechnungen wird die zuvor ausgeklammerte Probe als krank oder gesund eingestuft. Aus den Ergebnissen dieser Vorhersagen ergeben sich die Sensitivität und die Spezifität.

Da sich die Konzentrationen unterschiedlicher Nucleoside numerisch auf verschiedenen Skalen bewegen können, werden die Eingabedaten so normalisiert, dass jedes Nucleosid für sich genommen eine Mittelwertkonzentration von 0 und eine Standardabweichung von 1 erhält (berechnet über alle verfügbaren Trainingsdaten). Dies entspricht einer Skalierung der Konzentrationen jedes Nucleosids. Die entsprechenden Umrechnungsfaktoren werden dann verwendet, um vorher unbekannte

Testbeispiele ebenfalls zu reskalieren. Support Vektor Machines haben verschiedene Hyperparameter (z.B. das Sigma in dem RBF-Kernel), die auf die Leistung der SVM einen erheblichen Einfluß haben können. Diese Parameter werden auf Basis der aktuellen Trainingsdaten optimal eingestellt.

3.6.2 MS-Methode

Optimierung der MS Parameter

Die einzelnen Nucleoside zeigen sehr verschiedene Optima für die Ionenfallenparameter, insbesondere bei der Skimmerspannung, der Capillary Exit Spannung, den Octopolspannungen, Trap Drive und Octopol RF Amplitude. Eine Möglichkeit wäre die Einteilung in Segmente wie bei der unter 3.3.2.3 beschriebenen LC-MS³-Methode, wobei hier die große Anzahl der Nucleoside und die teilweise überlappenden Retentionszeiten Probleme darstellen. Bereits eine geringfügige Verschiebung der Retentionszeiten könnte zum Verlust von Daten führen, da auf Segmentgrenzen liegende Substanzen ihre Peakform verlieren. Daher wurden die ermittelten Parameter jeweils auf einen Mittelwert festgelegt, um für alle Nucleoside einen Kompromiss zu finden.

Die Skimmerspannung wurde auf einen minimalen Wert gesetzt, um das Fragmentieren der Nucleoside zu verhindern, was einen Verlust der Signalintensität für die Nucleosidmassen bedeuten würde. Es wurde ebenfalls überlegt, die Skimmerspannung sehr hoch zu wählen, um alle Nucleoside vollständig zu den Basenfragmenten umzusetzen und diese als Zielmassen zu messen. Allerdings stellte sich dieser Ansatz als nicht umsetzbar heraus, da die verschiedenen Nucleoside zu unterschiedliche Fragmentierungseigenschaften aufweisen. So wurden einige Nucleoside bei hoher Skimmerspannung, wie erwünscht, vollständig in Zucker und Base gespalten, während bei anderen bereits die Base weiter gespalten wurde.

Eine Multiple Reaction Monitoring (MRM) Methode wäre die beste Wahl in Bezug auf die Selektivität und Genauigkeit. Allerdings ist die Anzahl der

ausgewählten Nucleoside hier auf zehn begrenzt, sodass diese Methode erst in Betracht gezogen werden kann, wenn diejenigen Nucleoside ermittelt wurden, die den höchsten Informationsgehalt bei der Klassifizierung aufweisen.

Da auch die in Tabelle 15 unter 2.3.3 genannten Nucleoside einbezogen werden sollten, deren Struktur noch nicht geklärt ist, konnte keine gewöhnliche Quantifizierung vorgenommen werden. Um dennoch eine Aussage über die Relevanz des jeweiligen Nucleosids als Tumormarker machen zu können, wurden die Peakflächen der einbezogenen Substanzen normiert, indem sie auf die Fläche des enthaltenen internen Standards bezogen wurden. Daneben wurden sie in Beziehung zum Kreatiningehalt gesetzt. Diese Methode wird häufig angewendet, um quantifizierte Nucleosidkonzentrationen von verschiedenen Proben zu vergleichen, da der Kreatiningehalt ein konstanter Parameter im Urin ist.^{40;148;149}

3.6.2.1 Reproduzierbarkeit

Für den Nachweis der Reproduzierbarkeit wurde die Nucleosidstandardlösung 11-mal in die HPLC injiziert. Anschließend wurden die Flächen in den extrahierten Ionenchromatogrammen (EIC`s) integriert, auf die Peakfläche des internen Standards bezogen und aus den Ergebnissen Mittelwert sowie Standardabweichung berechnet, wie in Tabelle 21 gezeigt.

Tabelle 21: Ergebnis der Reproduzierbarkeitsüberprüfung

Nucleosid	Masse	Mittelwert	Std. Abw.	Abweichung [%]
Pseudouridin	245	1.89	0.118	6.26
Cytidin	244	0.16	0.005	3.11
Uridin	245	0.06	0.003	5.02
Inosin	269	0.20	0.003	1.70
5-Methyluridin	259	0.11	0.006	5.04
Guanosin	284	0.01	0.001	10.16
Xanthosin	285	0.23	0.010	4.52
3-Methyluridin	259	0.23	0.008	3.68
1-Methylinosin	283	1.75	0.075	4.27
1-Methylguanosin	298	0.94	0.037	3.90
N4-Acetylcytidin	286	0.84	0.046	5.45
2-Methylguanosin	298	0.20	0.011	5.77
Adenosin	268	0.37	0.012	3.32
N2,N2-Dimethylguanosin	312	1.95	0.165	8.47
N6-Methyladenosin	282	0.59	0.031	5.21
t6A	413	0.37	0.028	7.60
MTA	298	0.16	0.012	7.65

Die Abweichung der Flächenverhältnisse der Standardnucleoside lag zwischen 1.7 und 8.5 %, ausgenommen Guanosin. Diese Abweichung wurde als akzeptabel für die weitere Auswertung eingestuft. Außerdem wurden 5-mal je 10 µL aufgearbeiteter Urin eingespritzt, um auch die bisher nicht aufgeklärten Massen in die Auswertung mit einbeziehen zu können. Neben den Standardnucleosiden wurden 19 weitere Substanzen erfasst, bei denen es sich vermutlich um Nucleoside handelt.¹⁵⁰

Die Abweichungen lagen zwischen 1.7 und 8.4 % und sind damit mit den Ergebnissen der Standardlösung vergleichbar.

3.6.2.2 Linearität

Um die Linearität in Bezug auf den internen Standard Isoguanosin zu überprüfen, wurde eine Urinprobe aufgearbeitet (10 mL, Eluat in 500 µL aufgenommen), je 1:2, 1:5, 1:10, 1:50 und 1:100 verdünnt, diese Lösungen jeweils 1:1 mit internem Standard (Isoguanosin, 0.25 M) versetzt und je 10 µL injiziert. Für die Auswertung wurden EIC`s (Extracted Ion Chromatogram) der Massen aus den LC-auto-MS³ Messungen (CNL) verwendet, diese mit dem in DataAnalysis integrierten Smoothing Algorithmus (Gauß Funktion) behandelt und die Flächen integriert. Diese Flächen wurden auf die Fläche des internen Standards bezogen und die Ergebnisse für die lineare Regression eingesetzt.

Wie in Tabelle 22 zu sehen, ergab sich Linearität für alle 37 Komponenten, ausgenommen Cytidin, Nicotinamidribosid, 5-Methylcytidin, Uridin und 5-Methyluridin. Diese fünf Komponenten wurden daher beim weiteren Vorgehen nicht mehr einbezogen. Zusätzlich wurde das Ribose-Derivat mit m/z 300 ausgeschlossen, da es in den Ionenchromatogrammen der vermessenen Urinproben keinen gleichmäßigen Peak zeigte. Es ergeben sich also 31 Substanzen, die in die Auswertung einfließen.

3.6.2.3 Auswahl der Massen für die Auswertung mit Methoden der Bioinformatik

Es werden 31 Nucleoside in die bioinformatische Auswertung einbezogen, um ihre Eignung als Tumormarker zu überprüfen. Anschließend können diejenigen Massen, bei denen sich zwischen Patienten- und Kontrollproben Unterschiede zeigen, speziell weiter auf ihre Struktur hin untersucht werden, um sie in eine Quantifizierung einbeziehen zu können. Die finale Zuordnung der einbezogenen Nucleoside zu den zur Vereinfachung für die Auswertung benutzten Nummern ist in Tabelle 22 gezeigt.

Tabelle 22: Ergebnis der Linearitätsprüfung (**Fett: identifizierte Nucleoside**, kursiv: aufgrund von Fragmentierungsmuster und/oder berechneter Summenformel vorgeschlagene Strukturen)

	[M+H] ⁺	Substanz	R ²
1	259	1-D-Ribofuranosyl-1H-imidazol-4-essigsäure	0.9929
2	255	Nicotinamidribosid	Nicht linear
3	247	5,6-Dihydrouridin	0.9883
4	245	Pseudouridin	0.9865
5	244	Cytidin	Nicht linear
6	346	<i>3-(3-Amino-3-carboxypropyl)uridin</i>	<i>0.9950</i>
7	228	<i>1-Ribosylpyridin-4-on</i>	<i>0.9864</i>
8	258	5-Methylcytidin	Nicht linear
9	245	Uridin	Nicht linear
11	271	1-Ribosylpyridin-2-on-5-carboxamid	0.9830
12	384	<i>N6-Succinyladenosin</i>	<i>0.9939</i>
13	298	7-Methylguanosin	0.9995
14	269	Inosin	0.9933
15	259	5-Methyluridin	Nicht linear
16	300	Unbekanntes Ribose-Derivat	0.9937
17	271	<i>1-Ribosylpyridin-3-on-4-carboxamid</i>	<i>0.9946</i>
18	285	Xanthosin	0.9960
19	296	<i>1,N6-Dimethyladenosin</i>	<i>0.9967</i>
20	301	Unbekanntes Ribose-Derivat	0.9966
21	259	3-Methyluridin	0.9875
22	268	<i>2-Aminopurin-9-ribosid</i>	0.9771
23	293	Unbekanntes Ribose-Derivat	0.9951
24	283	1-Methylinosin	0.9937
25	298	1-Methylguanosin	0.9909
26	293	Unbekanntes Ribose-Derivat	0.9951
27	286	N4-Acetylcytidin	0.9384
28	298	2-Methylguanosin	0.9916
29	268	Adenosin	0.9926
30	398	<i>2-Methylthio-N6-(cishydroxyisopentenyl)adenosin</i>	<i>0.9944</i>

	[M+H] ⁺	Substanz	R ²
31	326	<i>N2,N2,7-Trimethylguanosin</i>	0.9942
32	312	N2,N2-Dimethylguanosin	0.9906
33	282	N6-Methyladenosin	0.9647
34	413	t6A	0.9958
35	313	Unbekanntes Ribose-Derivat	0.9967
36	298	MTA	0.9938
37	459	Unbekanntes Ribose-Derivat	0.9890

Tabelle 23: Zuordnung der einbezogenen Komponenten zu den für die Evaluierung verwendeten Nummern (fett: bekannte Nucleoside, kursiv: noch nicht bestätigte Strukturvorschläge)

	[M+H] ⁺	Nucleosid		[M+H] ⁺	Nucleosid
1	259	1-D-Ribofuranosyl-1H-imidazol-4-essigsäure	17	384	<i>N6-Succinyladenosin</i>
2	247	5,6-Dihydrouridin	18	283	1-Methylinosin
3	245	Pseudouridin	19	298	1-Methylguanosin
4	228	<i>1-Ribosylpyridin-4-on</i>	20	286	N4-Acetylcytidin
5	346	<i>3-(3-Amino-3-carboxypropyl)uridin</i>	21	293	Ribose-Derivat 3
6	271	<i>1-Ribosyl-pyridin-2-on-5-carboxamid</i>	22	298	2-Methylguanosin
7	269	Inosin	23	268	Adenosin
8	298	7-Methylguanosin	24	398	2-Methylthio-N6-(cishydroxyisopentenyl)-adenosin
9	301	Ribose-Derivat 1	25	326	<i>N2,N2,7-Trimethylguanosin</i>
10	293	Ribose-Derivat 2	26	312	N2,N2-Dimethylguanosin
11	271	<i>1-Ribosyl-pyridin-3-on-4-carboxamid</i>	27	282	N6-Methyladenosin
12	296	<i>1,N6-Dimethyladenosin</i>	28	313	Ribose-Derivat 4
13	259	3-Methyluridin	29	413	t6A
14	285	Xanthosin	30	298	MTA
15	268	<i>2-Aminopurin-9-ribosid</i>	31	459	Ribose-Derivat 5
16	351	<i>5-Methylaminomethyl-2-selenouridin</i>			

3.6.3 Proben

Es wurden 113 Urinproben von Brustkrebspatientinnen mit verschiedenen Mammakarzinomen in unterschiedlichen Stadien sowie 99 Urinproben von gesunden Probandinnen untersucht. Die Aufarbeitung dieser Proben wurde von Frau Kahina Meziane und Herrn Dr. Fabian Klaus im Rahmen von Doktorarbeiten durchgeführt.

3.6.4 Auswertung

Für die bioinformatische Auswertung wurden die Peakflächen der jeweiligen Massen in den extrahierten und geglätteten Ionenchromatogrammen auf die Peakfläche des internen Standards und auf die Kreatininkonzentration im Urin bezogen und die Ergebnisse für die bioinformatische Auswertung eingesetzt. Eine dreidimensionale Darstellung der integrierten Ionenchromatogramme von einer Urinprobe ist in Abbildung 77 gezeigt.

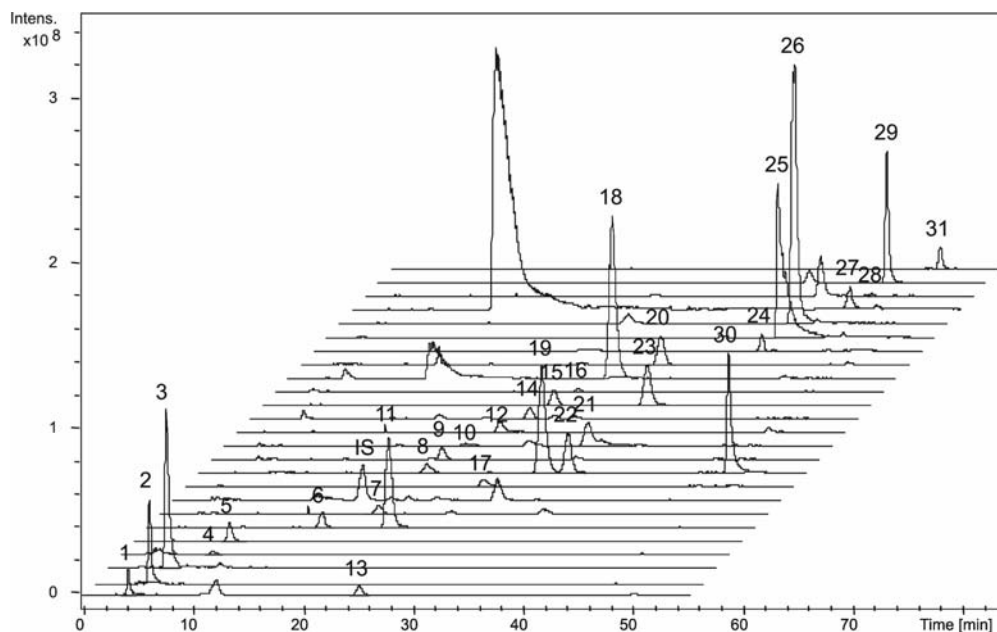


Abbildung 77: Integrierte Ionenchromatogramme einer Urinprobe, Peakzuordnung vgl.

Tabelle 23

Die weitere Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Herrn Holger Fröhlich vom Zentrum für Bioinformatik der Universität Tübingen.

Es wurde überprüft, wie gut die 99 gesunden Probandinnen und 113 Mamma-karzinom-Patientinnen aufgrund der analytischen Daten durch eine SVM mit RBF-Kernel Funktion in die zwei Gruppen eingeteilt werden können. Für die Bewertung wurde der *Leave-One-Out-Error (LOO)* berechnet, wie oben beschrieben.

Mit dieser Methode wurden für die Einteilung durch die SVM eine LOO-Sensitivität von 87.67 % und eine LOO-Spezifität von 89.90 % erreicht.

Zur besseren Übersicht wurde für die 31 Nucleoside der statistische Informationsgehalt für die Klassifizierung berechnet.¹⁵¹ Das Ergebnis ist in Abbildung 78 gezeigt. Der Informationsgehalt der Nucleoside ist sehr unterschiedlich, sodass eine Eliminierung derjenigen mit geringem Informationsgehalt nahe liegend erscheint. Die Nucleoside der Massen m/z 228, 293 und 351 haben einen hohen Informationsgehalt, während er z.B. bei 3-(3-Amino-3-carboxypropyl)uridin sehr gering ist.

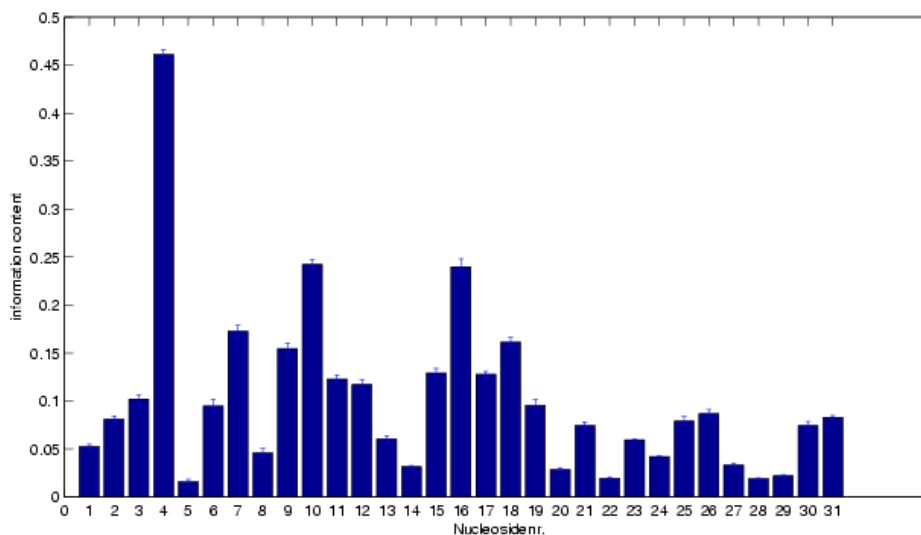


Abbildung 78: Statistischer Informationsgehalt der einzelnen Nucleoside für die Klassifizierung

Im Anschluss wurde untersucht, welche Kombination von Nucleosiden den größten Einfluss auf die Klassifizierung hat.

Dazu ist anzumerken, dass dies nicht unbedingt die Nucleoside mit dem höchsten Informationsgehalt sind, sondern diejenigen, die in Kombination miteinander das beste Ergebnis liefern. So stellten Guyon et al. fest, dass auch Attribute, deren Informationsgehalt gering ausfiel, in Kombination mit anderen die Vorhersage verbesserten.¹⁵²

Zur Eliminierung der Nucleoside, die das geringste Gewicht haben, wurde ein *Recursive Feature Elimination (RFE)* Algorithmus verwendet. Das Ergebnis des ersten Schritts ist in Abbildung 79 gezeigt. Im nächsten Schritt wird das Nucleosid mit dem geringsten Informationsgehalt eliminiert, auf die verbleibenden erneut der RFE Algorithmus angewendet und die Gewichte erneut berechnet. Auf diese Weise werden nacheinander die für die Klassifizierung unwichtigsten Komponenten ausgeklammert.

Um eine gewisse Robustheit des Modells gegen natürliche Schwankungen im Datensatz zu gewährleisten, wurden nur die Nucleoside als relevant betrachtet, die in jedem Trainings-Datensatz mit dem RFE Algorithmus auftraten. Zu diesen zählen die Nucleoside mit den Nummern 4 (m/z 228), 9 (m/z 301), 11 (m/z 271), 15 (m/z 268), 17 (m/z 384), 19 (m/z 298), 25 (m/z 326), 27 (m/z 282), 28 (m/z 313), 30 (m/z 298) und 31 (m/z 459). Für einige dieser Nucleoside wurden unter 3.3.3 Strukturvorschläge gemacht, andere müssen weiter auf ihre Struktur hin untersucht werden, insbesondere die Nucleoside mit m/z 313 und m/z 459.

Die LOO-Sensitivität betrug nach Anwendung des RFE Algorithmus 89.39 %, die LOO-Spezifität 88.89 %. Dieses Ergebnis ist mit dem vorherigen vergleichbar, bei dem alle 31 Nucleoside einbezogen wurden.

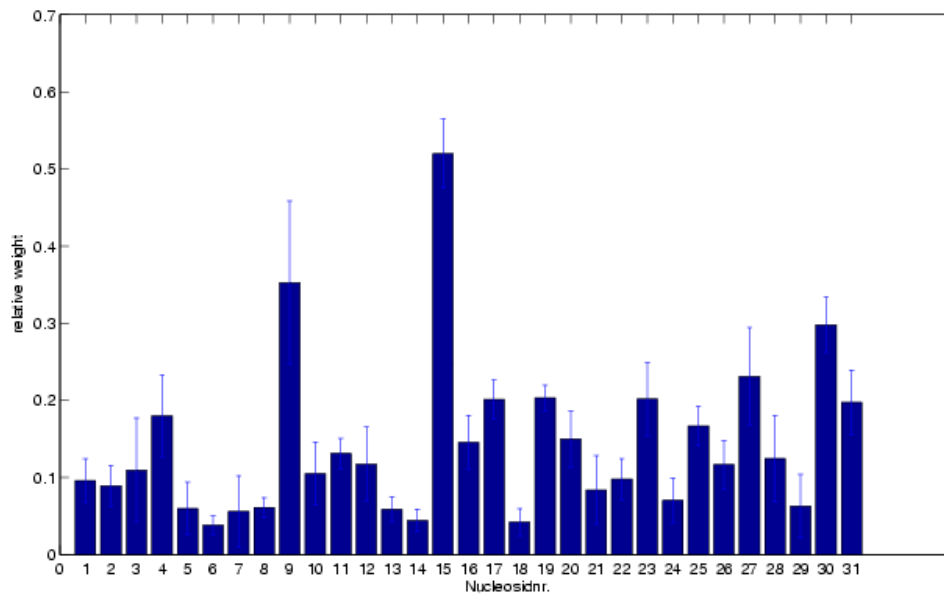


Abbildung 79: Relatives Gewicht der 31 Nucleoside im SVM-Modell

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die in vorangegangenen Arbeiten etablierte HPLC-UV-Methode zur Trennung und Detektion von Nucleosiden modifiziert, um eine Kopplung mit massenspektrometrischer Detektion zu ermöglichen. Außerdem wurden mit dieser Methode Nucleoside aus Urinproben von Brustkrebspatientinnen semipräparativ getrennt, um die erhaltenen Fraktionen mittels MALDI-TOF-MS und nano-ESI-MS auf bisher unbekannte Nucleoside und sonstige Ribosylderivate zu untersuchen.

Dazu wurde eine offline MALDI-TOF-Methode zur Untersuchung von Nucleosiden aus Urin entwickelt. Außerdem wurden Post-Source-Decay (PSD)-Spektren zur weiteren strukturellen Charakterisierung der Nucleoside eingesetzt. Durch die charakteristische Fragmentierung von Nucleosiden in Nucleinbase und Ribose sowie aus dem für einzelne Nucleoside charakteristischen Fragmentierungsmuster ergeben sich Informationen über die Struktur. Es wurden zwei verschiedene Präparationstechniken angewendet, um eine optimale Sensitivität und Massengenauigkeit zu gewährleisten. Es ergab sich eine Massengenauigkeit von unter 10 ppm. Ausgehend von dieser Massengenauigkeit wurden Summenformeln berechnet und eine gezielte Datenbanksuche durchgeführt. Durch Anwendung dieser Methode auf einzelne Fraktionen der semipräparativen Trennung von Nucleosiden aus der Urinprobe einer Brustkrebspatientin wurden für acht Komponenten Summenformeln generiert. Aus diesen ergaben sich mittels Datenbankrecherche Strukturen von in Urin vorkommenden Ribosylderivaten.

Bei der entwickelten HPLC-UV-Methode wurde zusätzlich ein Ionenfallen-Massenspektrometer zur Detektion verwendet. Zunächst wurden Standardlösungen von Nucleosiden und Nucleinbasen mittels Spritzenpumpeninjektion und manuellen MS^n -Experimenten an der Ionenfalle untersucht. Aufgrund der ermittelten Fragmentierungsmuster wurden Vorschläge für die Fragmentierungswege gemacht. Insbesondere die Fragmentierung der

Nucleinbase unter Neutralverlust von kleinen Molekülen gibt wertvolle Hinweise auf die Strukturelemente.

Anschließend wurde eine auto-LC-MS³-Methode entwickelt, die auf Informationen zur Struktur von unbekanntem Komponenten im Urin abzielt. Mit dieser Methode wurden Urinproben von Brustkrebspatientinnen untersucht. Es konnten insgesamt 38 Ribosylderivate nachgewiesen werden. Darunter befanden sich 16 bereits identifizierte Nucleoside. Sechs weitere wurden im Rahmen dieser Arbeit identifiziert, teilweise durch Vergleich der Retentionszeit und Fragmentierung mit Standardsubstanzen, teilweise durch Vergleich der Fragmentierung mit der des Nucleinbasen-Standards. Außerdem wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Firma Bruker LC-ESI-MS-TOF-Messungen mit hoher Massengenauigkeit durchgeführt, aufgrund derer Summenformeln berechnet wurden. Diese wurden ebenfalls in die Strukturanalysen einbezogen. Für 11 weitere Substanzen konnten aufgrund der Fragmentierung und der Summenformel Strukturvorschläge gemacht werden.

Mit der entwickelten auto-LC-MS³-Methode wurden neben den Urinproben Zellkulturüberstände und Mikrosomeninkubationen untersucht. Es wurden Zellkulturüberstände von MCF7-Brustkrebs-Zelllinien mit denen von gesunden MCF10A Brustepithelzellen verglichen. Auffällige Unterschiede ergaben sich bei der Betrachtung des 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosins (MTA) und des Uridin/Pseudouridin-Verhältnisses. MTA ist kein aus der RNA stammendes Nucleosid, sondern ein Teil der Methioninbiosynthese, die bei einigen Tumorzelllinien durch einen Gendefekt gestört ist. Somit könnte es auch unabhängig vom RNA-Metabolismus einen Tumormarker darstellen.

Bei den Mikrosomeninkubationen der Nucleoside 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosin (MTA) und Pseudouridin konnten keine Modifikationen durch das mikrosomale Enzymsystem nachgewiesen werden.

Eine weitere offline-Methode zur näheren Untersuchung der Peakfraktionen stellt die nano-ESI-MS dar. Mit dieser Methode wurden in einigen Peakfraktionen potentielle Nucleoside nachgewiesen, die in den

vorangegangenen Untersuchungen noch nicht auftraten und deren Massen keinen bekannten Nucleosiden zugeordnet werden konnten. Die nähere Untersuchung der entsprechenden Peakfraktionen könnte zur Identifizierung von bisher unbekanntem Nucleosiden führen.

Die Anwendung der genannten massenspektrometrischen Methoden führte zur Identifizierung einiger Nucleoside in den untersuchten Urinproben. Weitere potenzielle Nucleoside müssen durch weitere strukturanalytische Methoden untersucht werden. Eine Kombination der eingesetzten Methoden erwies sich als gute Möglichkeit, verschiedene Informationen über die unbekanntem Komponenten zu erhalten.

Schließlich wurde eine HPLC-MS-Methode für eine halbquantitative Messung von Nucleosiden entwickelt. Mit dieser Methode wurden 113 Urinproben von Brustkrebspatientinnen in verschiedenen Stadien und 99 Urinproben gesunder Probandinnen vermessen. 30 Substanzen wurden in die anschließende Klassifizierungsstudie mit Methoden der Bioinformatik einbezogen. Unter diesen Substanzen befanden sich 11 bereits bekannte Nucleoside, sechs im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Nucleoside, acht potentielle Nucleoside, für die aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen Strukturvorschläge gemacht werden konnten, sowie fünf Ribosederivate, deren Struktur noch unbekannt ist. In Kooperation mit Herrn Holger Fröhlich und Prof. Dr. Andreas Zell vom Zentrum für Bioinformatik der Universität Tübingen konnten die Proben der Kontrollgruppe von denen der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen unterschieden werden. Dazu wurde eine Support Vector Machine eingesetzt. Es ergab sich eine Sensitivität von 87.67 % und eine Spezifität von 89.90 %. Diese Werte übertreffen die der etablierten Tumormarker. Weitere Klassifizierungsstudien und eine weitere Optimierung der HPLC-MS-Methode könnten daher zur Entwicklung einer nicht-invasiven Methode zur Diagnose von Brustkrebs führen.

5 Material und Methoden

5.1 Probenvorbereitung

5.1.1 Chemikalien und Geräte

- Affigel 601 Biorad (Bremen)
- Methanol, HPLC gradient grade Merck (Darmstadt)
- Ammoniumacetat, zur Analyse Merck (Darmstadt)
- Ammoniak, 25 %, zur Analyse Merck (Darmstadt)
- Ameisensäure, zur Analyse Merck (Darmstadt)
- Demineralisiertes Millipore-Wasser
- Ammoniumformiat, zur Analyse Merck (Darmstadt)
- Isoguanosin zur Verfügung gestellt von Frau Prof. J.H. Kim von der Universität Seoul, Südkorea
- pH-Papier Merck (Darmstadt)
- Glassäulen
- Rotationsverdampfer

5.1.2 Urin (Affinitätschromatographie)

500 mg des in Millipore-Wasser gequollenen Affigels werden in eine Glassäule überführt und mit 45 mL einer 0.25 M NH_4Ac pH 8.5 Lösung äquibriert. Im Urin wird zunächst der Kreatiningehalt bestimmt, auf den die Nucleosidkonzentrationen anschließend bezogen werden. Außerdem wird der pH-Wert gemessen und gegebenenfalls durch Zugabe von Ammoniak alkalisch gemacht. Der Urin wird für 10 Minuten bei 4000 t zentrifugiert und 10 mL des Überstands mit 0.5 mL internem Standard (Isoguanosin, 0.25 M in H_2O) versetzt.

Die Lösung wird auf die äquibrierte Säule gegeben und anschließend mit 20 mL 0.25 M NH_4Ac und zweimal 3 mL $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1, v/v) gewaschen. Die Nucleoside werden mit 25 ml 0.1 M HCOOH in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1, v/v) eluiert, die erhaltene Lösung am Rotationsverdampfer bei 40°C eingengt und das Residuum in 0.5 mL 5 mM Ammoniumformiatpuffer pH 5.0 aufgenommen.

Das Gel wird mit 25 mL 0,1 M HCOOH in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) und 25 mL $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) regeneriert und vor der nächsten Extraktion wie oben beschrieben erneut äquibriert.

5.1.3 Zellkulturüberstände

Die Zellkulturüberstände bzw. Medien werden gegebenenfalls durch Zugabe von Ammoniak alkalisch gemacht und je 10 mL mit 0.5 mL interner Standardlösung versetzt. Anschließend erfolgt die Probenaufgabe und Aufarbeitung wie bei Urin gemäß 5.1.2.

5.1.4 Mikrosomeninkubationen

5.1.4.1 Verwendete Geräte, Chemikalien und Lösungen

Geräte

Feinwaage	Sartorius (Göttingen)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Vakuum-Probenkonzentrierer Speed-Vac	Thermo Life Sciences (Holbroke, USA)

Chemikalien

- β -NADP	Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Glucose-6-phosphat Natriumsalz	Fluka (Buchs, Schweiz)
- Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan- hydrochlorid	Fluka (Buchs, Schweiz)

Standardnucleoside

Adenosin, 1-Methyadenosin, N6-Methyladenosin, N6-Dimethyladenosin, MTA, Cytidin, N4-Acetylcytidin, Guanosin, 1-Methyguanosin, N2-Methylguanosin, Uridin, 3-Methyluridin, 5-Methyluridin, Pseudouridin, DHU, Inosin, Xanthosin, alle von Sigma-Aldrich (Steinheim)

N2,N2-Dimethylguanosin von Biolog (Bremen)

Lösungen

- Trispuffer 0.1 M, pH 7.4

1.144 g Tris-HCl und 0.332 g Tris-Base werden in 100 mL demineralisiertem H₂O gelöst und die Lösung in 5 Aliquots à 20 mL in Falcontubes aufgeteilt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

- Glucose-6-Phosphat

56.4 mg Glucose-6-Phosphat werden in 2 mL demineralisiertem H₂O gelöst, in 8 Aliquots à 250 µL aufgeteilt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

- Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase [(140 U/mg), Yeast lyophilized, Fluka 49273, 1 mg] wird direkt in 500 µL Trispuffer gelöst, in ein 2 mL-Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µL demineralisiertem H₂O sowie 400 µL Trispuffer versetzt. Die Lösung wird in 26 Aliquots à 50 µL aufgeteilt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

- β-NADP

30.7 mg β-NADP werden in 2 mL demineralisiertem H₂O gelöst, in 8 Aliquots à 254 µL aufgeteilt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

- MgCl₂·6H₂O

325.3 mg MgCl₂·6H₂O werden in 20 mL demineralisiertem H₂O gelöst, in 20 Aliquots à 1 mL aufgeteilt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

- Rattenlebermikrosomen

Lösung, gelagert bei -80 °C, Proteingehalt 20 mg/mL

5.1.4.2 Durchführung der Inkubationen

Für die Mikrosomeninkubationen werden die Lösungen wie folgt zusammenpipettiert:

Trispuffer 0.1M, pH 7.4	80 μ L
MgCl₂·6H₂O	5 μ L
β-NADP	5 μ L
Glucose-6-Phosphat	5 μ L
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	1 μ L
Probe	wie in Tabelle 24 angegeben

Die Mikrosomenlösung wird bei 37 °C 5 Minuten vorinkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Die Probenlösungen werden ebenfalls 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert, dann je 1 μ L der Mikrosomenlösung zugefügt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Proteine durch Zufügen von je 500 μ L eiskaltem Acetonitril gefällt, die Lösungen zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt. Das Lösungsmittel wird im Speedvac entfernt, der Rückstand in 10 mL 0.25 M Ammoniumacetatlösung aufgenommen und die Nucleoside mit Hilfe der Affinitätschromatographie nach 5.1.2 extrahiert. Nach Entfernen des Elutionsmittels wird der Rückstand in 200 μ L 5 mM Ammoniumformiatpuffer, pH 5 gelöst und die Lösung anschließend mit der entwickelten auto-LC-MS³-Methode vermessen. Parallel werden die Lösungen vermessen, die für die Inkubationen eingesetzt wurden. Außerdem wird eine Mikrosomen-Blind-Inkubation ohne Zusatz einer Probelösung durchgeführt.

Tabelle 24: Eingesetzte Nucleosidlösungen für die Mikrosomeninkubationen

Nucleosid	C [μg/μL], in Trispuffer	Eingesetztes Volumen [μL]
MTA	1.46	2
Pseudouridin	2.2	3

5.2 MS-kompatible HPLC-UV-Methode zur Trennung von Nucleosiden aus Urin

5.2.1 Chemikalien

- Methanol, HPLC gradient grade Merck (Darmstadt)
- Ameisensäure, zur Analyse Merck (Darmstadt)
- Bidest. Wasser aus hausinterner Destillieranlage

5.2.2 Gerät

HPLC System: HPLC 1100 von Agilent (Waldbronn),
bestehend aus Vakuum Degaser (G 1379 A), quaternärer
Pumpe (G 1376 A), thermostatisiertem Autosampler (G
1330 A und G 1313 A), Säulenofen (G 1316 A) und DAD
Detektor (G 1315 B)

5.2.3 Säulen

LiChroCART Superspher[®] 100 RP 18 e, 2x150 mm, 4 µm, Merck (Darmstadt)
mit Vorsäule: LiChroCART Superspher[®] 100 RP 18 e, 2x10 mm, 4 µm

5.2.4 Methodenparameter

Fluss: 125 µL/min

Detektion: 210 und 260 nm

Temperatur: 30 °C

Gradient: A: 5 mM Ammoniumformiatpuffer, pH 5.0

B: MeOH/H₂O_{bidest.} (3/2, v/v), 0.1 % FA

Zeit (min)	A 5 mM, pH 5 [%]	B (3/2, v/v), 0.1 % FA [%]
0	100	0
30	85	15
40	40	60
50	100	0
55	100	0

5.3 MALDI-TOF-Messungen von Nucleosiden

5.3.1 Chemikalien

- Acetonitril, HPLC gradient grade Merck (Darmstadt)
- Bidest. Wasser aus hausinterner Destillationsanlage
- Ameisensäure, zur Analyse Merck (Darmstadt)
- α -Cyano-hydroxymethylsäure Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Dihydroxybenzoesäure Fluka (Buchs, Schweiz)
- untersuchte Standardnucleoside:
Adenosin, 1-Methyladenosin, N6-Methyladenosin, MTA, Cytidin, Inosin,
Guanosin, Uridin, Pseudouridin, Xanthosin

alle von Sigma-Aldrich
(Steinheim)

5.3.2 Gerät

MALDI-TOF-Massenspektrometer autoflex, Bruker Daltonics, Bremen

5.3.3 Verwendete Targets

- AnchorChip™ Target MTP AnchorChip 400/384 T F, Bruker Daltonics (Bremen)
- Edelmetalltarget MTP 384, Bruker Daltonics (Bremen)

5.3.4 Präparationstechniken

Präparation von DHB auf AnchorChip™ Target (Dried Droplet Methode) für Messung mit hoher Sensitivität

1 µL DHB-Matrixlösung (5 g/L in TA (ACN/H₂O, 1/2, v/v)) wird auf das AnchorChip™ Target gegeben. Kurz vor der Trockne wird 1 µL der Probenlösung aufgegeben und nach vollständigem Trocknen am MALDI-TOF-MS vermessen. Die häufig auftretenden Matrixmassen sind in der folgenden Tabelle gezeigt:

Masse [m/z]
137
155 ([M+H] ⁺)
177 ([M+Na] ⁺)
193 ([M+K] ⁺)
273
367
372
399

Präparation von CHCA auf AnchorChip™ Target (Thin Layer Methode) für Messung mit hoher Massengenauigkeit

Zunächst wird eine Dünnschicht („Thin Layer“) von CHCA hergestellt, indem einige Mikroliter CHCA-Lösung (gesättigt in EtOH/Aceton, 1/1) über eine Anchor-Reihe des schräg gehaltenen Targets fließen gelassen werden. Auf diese Spots wird nun je 1 μL Probenlösung gegeben und nach Trocknen am MALDI-TOF-MS vermessen.

5.3.5 Interne und externe Kalibrierung

Für die interne und externe Kalibrierung wird eine Kalibrierlösung aus den fünf Arzneistoffen Bamipin, Coffein, Etophyllin, Pyrimethamin und Phenylbutazon verwendet. Um ein gleichmäßiges Signal aller Kalibranten zu erhalten, wird eine Lösung mit folgender Zusammensetzung in TA (Acetonitril/ H_2O , 1/2, v/v, 0.1 % TFA) gewählt:

Kalibrant	C [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Monoisotopische Masse [$\text{M}+\text{H}$] ⁺
Coffein	270.25	195.088220
Etophyllin	235.75	225.098790
Pyrimethamin	49.5	249.090699
Baminpin	20.72	281.201779
Phenylbutazon	238.75	309.16032

Bei interner Kalibrierung wird die Konzentration der Kalibrierlösung an die der Probenlösung angepasst, bis eine vergleichbare Intensität der Kalibriersubstanzen und der zu kalibrierenden Substanz vorliegt.

5.3.6 MALDI-TOF-Methode

Die Optimierung der Parameter für die Messung von Nucleosiden am MALDI-TOF-MS ergab folgende Parameter:

Parameter	Optimierter Wert
Massenbereich	50-1000 Da
Mode	Positiv
N ₂ -Druck	2000 mbar
Spannung Ion Source 1	19 kV
Spannung Ion Source 2	16.8 kV
Linsenspannung	8.7 kV
Reflektorspannung	20 kV
Pulsed Ion Extraction	40 ns

5.3.7 PSD-Methode

Für die Aufnahme von PSD-Spektren zur Fragmentierung von Nucleosiden wurde eine Methode mit den in Tabelle 25 aufgeführten Parametern verwendet.

Tabelle 25: Parameter der PSD-Methode

Segment	Reflektorspannung [kV]	Ref. Det. Gain	Laser Power Abs.	Linsenspannung [kV]
1	19.00	6.0	20	8.5
2	17.57	10.0	30	8.5
3	15.20	10.0	30	8.5
4	12.45	10.0	30	8.5
5	10.08	10.0	30	8.5
6	8.16	15.0	30	8.5
7	6.60	15.0	30	8.5
8	5.46	15.0	40	8.5
9	4.33	15.0	40	8.5

In jedem Segment werden 200 bis 500 Laserschüsse aufaddiert, bis eine ausreichende Signalintensität erreicht ist.

5.3.8 Messung von Standardnucleosiden

Es wurden Nucleosidlösungen mit Konzentration von ca. 1 mg/mL in 0.1 % TFA bzw. 1 % TFA angesetzt und aus diesen Stammlösungen alle weiteren Lösungen hergestellt. Die untersuchten Standardnucleoside waren: Adenosin, 1-Methyladenosin, N6-Methyladenosin, MTA, Cytidin, Inosin, Guanosin, Uridin, Pseudouridin und Xanthosin (alle von Sigma-Aldrich (Steinheim)).

5.3.9 Messung von Nucleosiden aus Urinproben

5.3.9.1 Probenvorbereitung

Die Nucleoside werden nach 3.1.1 aus den Urinproben extrahiert. Diese Aufreinigung erfolgte durch Frau Kahina Meziane und Herrn Dr. Fabian Klaus.

5.3.9.2 HPLC-Trennung und Fraktionierung von Nucleosiden aus Urin

Die Trennung der Nucleoside erfolgt gemäß 3.2. Es werden 30 µL der Extraktlösungen in die HPLC injiziert. Im Anschluss an die Trennung werden die einzelnen Peaks in Fraktionen gesammelt, diese lyophilisiert und in je 10 µL 0.1 % FA aufgenommen.

5.3.9.3 MALDI-TOF-Messung

Die einzelnen Peakfraktionen werden mit den unter 5.3.4 beschriebenen Präparationstechniken am MALDI-TOF-MS vermessen.

5.4 Spritzenpumpeninjektionen von Nucleinbasen und Nucleosiden an der Ionenfalle

5.4.1 Chemikalien

- Methanol hypergrade Merck (Darmstadt)
- Bidest. Wasser aus hausinterner Destillationsanlage
- untersuchte Nucleinbasen: alle von Fluka (Buchs, Schweiz)

Adenin, Cytosin, Guanin, Uracil, Hypoxanthin und Xanthin

- untersuchte Standardnucleoside:

Adenosin, 1-Methyladenosin, N6-Methyladenosin, MTA, N6,N6-Dimethyladenosin, Cytidin, 5-Methylcytidin, N4-Acetylcytidin, Inosin, 1-Methylinosin, 7-Methylinosin, Guanosin, 1-Methylguanosin, N2-Methylguanosin, 7-Methylguanosin, Uridin, 3-Methyluridin, 5-Methyluridin, Xanthosin

alle von Sigma-Aldrich (Steinheim)

N2,N2-Dimethylguanosin von Biolog (Bremen)

5.4.2 Gerät

Ionenfallen-MS: Esquire HCT mit Elektrospray (ESI)-Quelle (Bruker, Bremen)

Spritzenpumpe: 74900 Serie (Cole Parmer, Illinois, USA)

Software: Bruker Esquire Control 5.1
Bruker Data Analysis 3.1

5.4.3 MS-Parameter

Die optimierten Parameter für die einzelnen Nucleinbasen und Nucleoside zeigen Tabelle 26 bis Tabelle 30.

Tabelle 26: Parameter der Spritzenpumpeninjektionen für die untersuchten Nucleinbasen

	Guanin	Hypoxanthin	Adenin	Cytosin	Uracil	Xanthin
Capillary [V]	-5000	-5000	-5000	-5000	-5000	-5000
End plate offset [V]	-500	-500	-500	-500	-500	-500
Nebulizer [psi]	30	30	30	30	30	30
Dry Gas [l/min]	7	7	7	7	7	7
Temperatur [°C]	325	325	325	325	325	325
Skimmer [V]	40	40	30	64	40	60
Cap Exit [V]	160	100	135	140	120	124
Oct 1 [V]	10-16	12	7	6	7.5	10
Oct 2 [V]	1	1.5	1	1.2	1	1.1
Trap Drive [V]	30	60	55	45	75	57
Oct RF [Vpp]	50-100	6080	50	50	100	100
Lens 1 [V]	-5	-5	-5	-5	-5	-5
Lens 2 [V]	-60	-60	-60	-60	-60	-60

Tabelle 27: Parameter der Spritzenpumpeninjektionen für Nucleoside, a

	A	C	U	G	I	X
Capillary [V]	-5000	-5000	-5000	-5000	-4000	-5000
End plate offset [V]	-500	-500	-500	-500	-500	-500
Nebulizer [psi]	30	30	30	25	25	25
Dry Gas [l/min]	7	7	7	7	7	7
Temperatur [°C]	325	325	325	325	325	325
Skimmer [V]	46	35	15	25	10	22
Cap Exit [V]	130	125	50	60-100	75	50-100
Oct 1 [V]	6	7.5	4.76	7,5	6,5	7,5
Oct 2 [V]	1.4	3.2	1.5	1,7	1,7	1,7
Trap Drive [V]	34	45	33.8	35	32	36
Oct RF [Vpp]	60	105	50	50-100	110	125
Lens 1 [V]	-5	-5	-5	-5	-5	-5
Lens 2 [V]	-60	-60	-60	-60	-60	-60

Tabelle 28: Parameter der Spritzenpumpeninjektionen für Nucleoside, b

	ac4C	m5C	m7G	MTA	M⁶₆A
Capillary [V]	-5000	-5000	-5000	-4000	-5000
End plate offset [V]	-500	-500	-500	-500	-500
Nebulizer [psi]	25	25	25	20	25
Dry Gas [l/min]	7	7	7	7	7
Temperatur [°C]	325	325	325	330	325
Skimmer [V]	35	30	30	35	35
Cap Exit [V]	100	75	140	90	135
Oct 1 [V]	8	6	8	67	8
Oct 2 [V]	1.7	2.0	1.4	2.5	1.7
Trap Drive [V]	37	34	40	35	40
Oct RF [Vpp]	100	75	110	110	100
Lens 1 [V]	-5	-5	-5	-5	-5
Lens 2 [V]	-60	-60	-60	-60	-60

Tabelle 29: Parameter der Spritzenpumpeninjektionen für Nucleoside, c

	m1A	m6A	m1G	m2G	m²₂G
Capillary [V]	-5000	-5000	-5000	-5000	-4500
End plate offset [V]	-500	-500	-500	-500	-500
Nebulizer [psi]	25	25	30	30	10
Dry Gas [l/min]	7	7	9	9	4
Temperatur [°C]	325	325	330	330	325
Skimmer [V]	40	25	35	35	20
Cap Exit [V]	75	140	75	75	110
Oct 1 [V]	12	8	5	5	9
Oct 2 [V]	1.7	2.3	1.3	1.3	2.0
Trap Drive [V]	35.7	37	35	35	35
Oct RF [Vpp]	110	110	175	175	100
Lens 1 [V]	-5	-5	-5	-5	-5
Lens 2 [V]	-60	-60	-60	-60	-60

Tabelle 30: Parameter der Spritzenpumpeninjektionen für Nucleoside, d

	m5U	ψ	m3U	m1I	m7I
Capillary [V]	-5000	-4500	-4000	-5000	-5000
End plate offset [V]	-500	-500	-500	-500	-500
Nebulizer [psi]	25	30	25	25	25
Dry Gas [l/min]	7	9	7	7	7
Temperatur [°C]	325	330	325	325	325
Skimmer [V]	40	40	10	44	40
Cap Exit [V]	75	109.4	75	130	75
Oct 1 [V]	7	12	6,5	18	7.5
Oct 2 [V]	2.0	1.7	1,7	1.0	1.7
Trap Drive [V]	34	35.4	32	40	35
Oct RF [Vpp]	75	141.4	110	100	125
Lens 1 [V]	-5	-5	-5	-5	-5
Lens 2 [V]	-60	-60	-60	-60	-60

5.4.4 Messung

Die Nucleosidlösungen werden mittels Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 240 $\mu\text{L/h}$ in die Ionenfalle injiziert und manuell MS- und MSⁿ-Spektren aufgenommen. Für die MSⁿ-Spektren wird die Fragmentierungsamplitude (gerätespezifische Einheit) ausgehend von 0.8 langsam erhöht, bis die Fragmentierung vollständig ist.

5.5 Auto-LC-MS3-Methode zur Identifizierung von Nucleosiden aus Urin

5.5.1 Chemikalien

- Methanol, HPLC gradient grade Merck (Darmstadt)
- Ameisensäure, zur Analyse Merck (Darmstadt)
- Bidest. Wasser aus hausinterner Anlage

5.5.2 Geräte

HPLC System: HPLC 1100 von Agilent (Waldbronn), bestehend aus Vakuum Degaser (G 1379 A), quaternärer Pumpe (G 1376 A), thermostatisiertem Autosampler (G 1330 A und G 1313 A), Säulenofen (G 1316 A) und DAD Detektor (G 1315 B)

Ionenfallen-MS: Esquire HCT von Bruker (Bremen) mit Elektrospray (ESI)-Quelle

Software: Bruker Esquire Control 5.1
Bruker Data Analysis 3.1

5.5.3 Säule

LiChroCART Superspher[®] 100 RP 18 e, 2x150 mm, 4 µm, Merck (Darmstadt)

5.5.4 HPLC-Methode

Die Trennung der Nucleoside erfolgt nach der unter 3.3.1 beschriebenen Methode. Es werden je 15 µL der Lösungen in die HPLC injiziert.

5.5.5 MS-Parameter

Die optimierten Parameter für die Ionenfallendetektion von Nucleosiden sind in Tabelle 31 zusammengestellt.

Tabelle 31: MS-Parameter der auto-LC-MS³-Methode

	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	Segment 5	Segment 6
Polarity	Positive					
Smart Target	150000					
Max Accu Time	15 ms					
Scanbereich	50-500					
Averages	3					
Tune	Standard-enhanced mode, capillary: -5 kV, End plate offset: -500 V Nebulizer: 25 psi, Dry Gas: 7.0 L/min, Dry Temp.: 325 °C					
Skimmer- spannung [V]	25	40	15	25	25	40
Cap Exit	75	110	65	60	80	113.3
Oct 1 DC	6.5	12	6.5	6.5	7.0	12.0
Oct 2 DC	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
Trap Drive	35.7	36.7	35	36	41	39.2
Oct RF	110	144.4	110	110	125	152.4
Lens 1	-5.0					
Lens 2	-60.0					
Auto MS³	Threshold abs.: 20000, Threshold rel.: 10 % Fragmentation Amplitude: 0.8					
Massenbereich	240-300					240-420
Advanced	Isolation width: 4					
Pref. Masses	244, 245, 247, 255, 258	271, 282, 284, 298	259, 269, 271, 284	259, 285, 268, 293	283, 286, 298, 268, 384	282, 298, 312, 326, 413, 398
<i>Auto MS (n>2)</i>	Threshold abs.: 300, Threshold rel.: 10 %, Fragmentation Amplitude: 2.0					
Precursor Ions	1	1	1	2	1	1
<i>Fragmentation</i>	Cut-Off: 40 %, Smart Fragmentation: 30-200 %					

5.6 Nano-ESI-Messungen von Nucleosiden aus Urin am Triple-Quadrupol

5.6.1 Geräte und Materialien

HPLC-UV-MS (triple-Quadrupol): Surveyor MS-Pumpe, Surveyor Autosampler, Surveyor PDA-Detektor, TSQ Quantum Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit nano-ESI-Quelle, Thermo Electron (San José, USA)

Nano-ESI-Nadeln (New Objective)

Gelader Pipettenspitzen (Eppendorf)

5.6.2 Methodenparameter

Je 2 μL der wie unter 5.3.9.2 beschrieben gewonnenen Peakfraktionen werden mittels Gelader Pipettenspitzen in die nano-ESI-Nadeln überführt. Die Nadel wird in die Halterungsvorrichtung der nano-ESI-Quelle eingesetzt und die Flüssigkeit mittels einer Spritze bis in die Spitze der Nadel gedrückt. Die Nadel wird mit Hilfe einer Kamera zur Vergrößerung in einigen Millimetern Entfernung zentral vor dem Orifice platziert. Die Temperatur der Ionentransferkapillare beträgt 250 °C, die Messung erfolgt im positiven Elektrospray-Modus. Für die Messung wird die Spray-Spannung ausgehend von 100 V langsam erhöht, bis sich ein stabiles Signal ergibt. Für die Aufnahme von MS-Fullscan-Spektren wird Q3 mit einer Peak Width von 0.7 benutzt.

Anschließend wird ein Constant Neutral Loss Spektrum von 132 u aufgenommen. Die hier auftretenden Massenpeaks werden im MS/MS-Schritt fragmentiert. Der Kollisionsgasdruck (Argone) beträgt 1.0 mTorr.

5.7 HPLC-MS-Methode zur Messung von Nucleosiden in Urinproben und bioinformatische Auswertung

5.7.1 Chemikalien

- Affigel 601 Biorad (Bremen)
- Methanol, HPLC hypergrade Merck (Darmstadt)
- Ammoniumacetat, zur Analyse Merck (Darmstadt)
- Ammoniak, 25 %, zur Analyse Merck (Darmstadt)
- Ameisensäure, zur Analyse Merck (Darmstadt)
- Demineralisiertes Millipore-Wasser
- Bidest. Wasser aus hausinterner Destillationsanlage
- Ammoniumformiat, zur Analyse Merck (Darmstadt)

5.7.2 Geräte

- HPLC System: HPLC 1100 von Agilent (Waldbronn)
bestehend aus Vakuum Degaser (G 1379 A), quaternärer Pumpe (G 1376 A), thermostatisiertem Autosampler (G 1330 A und G 1313 A), Säulenofen (G 1316 A) und DAD Detektor (G 1315 B)
- Ionenfallen-MS: Esquire HCT von Bruker (Bremen) mit Elektrospray (ESI)-Quelle
- Software: Bruker Esquire Control 5.1
Bruker Data Analysis 3.1

5.7.3 Säule

LiChroCART Superspher[®] 100 RP 18 e, 2x150 mm, 4 µm, Merck (Darmstadt)
mit Vorsäule LiChroCART Superspher[®] 100 RP 18 e, 2x10 mm, 4 µm

5.7.4 HPLC-Methode

Die Trennung der Nucleoside erfolgt mittels eines Fließmittelgradienten aus 5 mM Ammoniumformiatpuffer, pH 5.0 (A) und Methanol/Wasser (3/2, v/v), 0.1 % TFA (B). Das Injektionsvolumen beträgt 15 µL. Die Flussrate beträgt 125 µL/min bei folgendem Gradienten:

t [min]	A [%]	B [%]
0	99	1
30	85	15
40	40	60
50	99	1
55	99	1

5.7.5 MS-Methode

Die optimierten Parameter für die massenspektrometrische Detektion der Nucleoside an der Ionenfalle sind in Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 32: MS-Parameter der LC-MS-Methode

Parameter	Optimierter Wert
Capillary Voltage	5 kV
End Plate Offset	-500 V
Nebulizer	35 psi
Dry Gas (N ₂)	7.00 L/min
Dry Temperature	325 °C
Capillary Exit	75 V
Skimmer	15 V
Octopol 1	7.5 V
Octopol 2	1.7 V
Octopol RF Amplitude	110 Vpp
Trap Drive	35.7 V

6 Literatur

- [1] Smollich M, Wülfing P: Mammakarzinom. Deutsche Apothekerzeitung 2006; 146. Jahrgang(6):49-55.
- [2] Braun S, Kiechle M, Harbeck N: Breast carcinoma. Biological principles, classification and prognostic factors. Internist 2002; 43(3):329-30, 333.
- [3] Schmid P, Possinger K: Adjuvant and neoadjuvant systemic therapy of breast carcinoma. Internist 2002; 43(3):341-4, 347.
- [4] Esteva FJ, Hortobagyi GN: Prognostic molecular markers in early breast cancer. Breast cancer research 2004; 6(3):109-118.
- [5] Mettlin C: Global breast cancer mortality statistics. Cancer Journal for Clinicians 1999; 49(3):138-144.
- [6] Brewster A, Helzlsouer K: Breast cancer epidemiology, prevention, and early detection. Current Opinion in Oncology 2001; 13(6):420-425.
- [7] Heinemann V: Chemotherapy and immunotherapy of metastasized breast carcinoma. Internist 2002; 43(3):354-363.
- [8] Nitz U, Dall P: New therapeutic approaches: stem cell assisted high dose chemotherapy and molecular techniques in breast carcinoma. Internist "==" , 43(3):364-372.
- [9] Stearns V, Yamauchi H, Hayes DF: Circulating tumor markers in breast cancer: accepted utilities and novel prospects. Breast Cancer Research and Treatment 1998; 52(1-3):239-259.
- [10] King CR, Kraus MH, Aaronson SA: Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. Science 1985; 229(4717):974-976.
- [11] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987; 235(4785):177-182.
- [12] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, +: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1998; 244(4905):707-712.
- [13] Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF: When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. Journal of Clinical Oncology 2001; 19(8):2334-2356.

- [14] Spyrtos F, Maudelonde T, Brouillet JP, Brunet M, Defrenne A, Andrieu C, Hacene K, Desplaces A, Rouesse J, Rochefort H. Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 1989; 2[8672], 1115-1118.
- [15] Rochefort H. Cathepsin D in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 1990; 16[1], 3-13.
- [16] Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *The New England journal of medicine* 1990; 322[5], 297-302.
- [17] Sun NCJ: Immunohistochemical localisation of carcinoembryonic antigen (CEA), CEAS, and nonspecific cross reacting antigen (NCA) in carcinoma of the lung. *Cancer* 1983; 52:1632-1641.
- [18] Gion M: Carcinoembryonic antigen, ferritin, and tissue polypeptide antigen in serum and tissue: Relationship with the receptor content in breast carcinoma. *Cancer* 1986; 57:917-922.
- [19] Kufe D, Inghirami G, Abe M, Hayes D, Justi-Wheeler H, Schlorn J: Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma* 1984; 3:223-232.
- [20] Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG, Somerfield MR: 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 19(6):1865-1878.
- [21] McCloskey JA, Crain PF: The RNA modification database-1998. *Nucleic Acids Research* 1998; 26(1):196-197.
- [22] Limbach PA, Crain PF, McCloskey JA: Summary: the modified nucleosides of RNA. *Nucleic Acids Research* 1994; 22(12):2183-2196.
- [23] Melton DA, De Robertis EM, Cortese R: Order and intracellular location of the events involved in the maturation of a spliced tRNA. *Nature* 1980; 284(5752):143-148.
- [24] Green CJ, Kammen HO, Penhoet EE: Purification and properties of a mammalian tRNA pseudouridine synthase. *Journal of Biological Chemistry* 1982; 257(6):3045-3052.
- [25] Singer CE, Smith GR, Cortese R, Ames BN: Mutant histidyl transfer RNA ineffective in repression and lacking two pseudouridine modifications. *Nature, New Biology* 1972; 238(81):72-74.

- [26] Bjoerk GR, Ericson JU, Gustafsson CED, Hagervall TG, Joensson YH, Wikstroem PM: Transfer RNA modification. Annual Review of Biochemistry 1987; 56:263-287.
- [27] Grosjean H, Goodenough-Lashua D: Mechanisms of RNA-Modifying and -Editing Enzymes; in: Grosjean H, Benne R, (eds): Modification and Editing of RNA. American Society for Microbiology Washington, DC, 1998, pp 135-168.
- [28] Keith JM, Winters EM, Moss B.: Purification and characterization of a HeLa cell transfer RNA(cytosine-5-)-methyltransferase. Journal of Biological Chemistry 1980; 255(10):4636-4644.
- [29] Ching YP, Zhou HJ, Yuan JG, Qiang BQ, Kung Hf, Jin DY. Identification and Characterization of FTSJ2, a Novel Human Nucleolar Protein Homologous to Bacterial Ribosomal RNA Methyltransferase. Genomics 2002; 79(1):2-6.
- [30] Umeda N, Suzuki T, Yukawa M, Ohya Y, Shindo H, Watanabe K, Suzuki T. Mitochondria-specific RNA-modifying Enzymes Responsible for the Biosynthesis of the Wobble Base in Mitochondrial tRNAs: Implications for the Molecular Pathogenesis of Human Mitochondrial Diseases. Journal of Biological Chemistry 2005; 280(2):1613-1624.
- [31] Zalkin H, Dixon JE. De novo purine nucleotide biosynthesis. Progress in nucleic acid research and molecular biology 1992; 42, 259-287.
- [32] Buddeke E: Nukleinsäuren; in: Buddeke E, (ed): Grundriss der Biochemie. Walter de Gruyter Berlin, 1994, pp 77-133.
- [33] Voet D, Voet J: Biochemie. 1. Auflage, VCH Weinheim, 1994.
- [34] Baldwin SA, Beal PR, Yao SYM, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. Pfluegers Archiv 2004; 447(5):735-743.
- [35] Lüllmann H, Mohr K: Taschenatlas der Pharmakologie. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2001.
- [36] Nakano K, Nakao T, Schram KH, Hammargren WM, McClure TD, Katz M, Petersen E: Urinary excretion of modified nucleosides as biological marker of RNA turnover in patients with cancer and AIDS. Clinica Chimica Acta 1991; 218(2):169-183.
- [37] Sander G, Topp H, Heller-Schoch G, Wieland J, Schoch G: Ribonucleic acid turnover in man:RNA catabolites in urine as measure for the metabolism of each of the three major species of RNA. Clinical Science 1986; 71(4):367
- [38] Topp H, Duden R, Schoch G: 5,6-Dihydrouridine: a marker ribonucleoside for determining whole body degradation rates of transfer RNA in man and rats. Clinica Chimica Acta 1993; 218(1):73-82.

- [39] Itoh K, Aida S, Ishiwata S, Sasaki S, Ishida N, Mizugaki M: Urinary excretion patterns of modified nucleosides, pseudouridine and 1-methyladenosine, in healthy individuals. *Clinica Chimica Acta* 1993; 217(2):221-223.
- [40] Liebich HM, Di Stefano C, Wixforth A, Schmid HR: Quantitation of urinary nucleosides by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A* 1997; 763(1-2):193-197.
- [41] Mitchell EP, Evans L, Schultz P, Madsen R, Yarbrow JW, Gehrke CW, Kuo K: Modified nucleosides in human serum. *Journal of Chromatography* 1992; 581(1):31-40.
- [42] Prankel BH, Clemens PC, Burmester JG: Urinary excretion of nucleosides varies with age and protein metabolism. *Clinica Chimica Acta* 1995; 234(1,2):181-183.
- [43] Sander G, Huelsemann J, Topp H, Heller-Schoech G, Schoech G: Protein and RNA turnover in preterm infants and adults: a comparison based on urinary excretion of 3-methylhistidine and of modified one-way RNA catabolites. *Annals of Nutrition & Metabolism* 1986; 30(2):137-142.
- [44] Schram KH: Urinary nucleosides. *Mass Spectrometry Reviews* 1998; 17(3):131-251.
- [45] Borek E, Baliga BS, Gehrke CW, Kuo CW, Belman S, Troll W, Waalkes TP: High turnover rate of transfer RNA in tumor tissue. *Cancer Research* 1977; 37(9):3362-3366.
- [46] Dieterle F, Muller-Hagedorn S, Liebich HM, Gauglitz G: Urinary nucleosides as potential tumor markers evaluated by learning vector quantization. *Artificial intelligence in medicine* 2003; 28(3):265-279.
- [47] Ravdin PM, Clark GM: A practical application of neural network analysis for predicting outcome of individual breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 1992; 22(3):285-293.
- [48] Sasco AJ, Rey F, Reynaud C, Bobin JY, Clavel M, Niveleau A: Breast cancer prognostic significance of some modified urinary nucleosides. *Cancer Letters* 1996; 108(2):157-162.
- [49] Tormey DC, Waalkes TP, Ahmann D, Gehrke CW, Zumwatt RW, Snyder J, Hansen H: Biological markers in breast carcinoma. I. Incidence of abnormalities of CEA, HCG, three polyamines, and three minor nucleosides. *Cancer* 1975; 35(4):1095-1100.
- [50] Tormey DC, Waalkes TP, Gehrke CW: Biological markers in breast carcinoma--clinical correlations with pseudouridine, N2,N2-dimethylguanosine, and 1-methylinosine. *Journal of Surgical Oncology* 1975; 14(3):267-273.

- [51] Hammargren WM, Schram KH, Nakano K, Yasaka T: Identification of a novel nucleoside, 1,N6-dimethyladenosine, in human cancer urine. *Analytica Chimica Acta* 1991; 247(2):201-209.
- [52] Tamura S, Fujii J, Nakano T, Hada T, Higashino K: Urinary pseudouridine as a tumor marker in patients with small cell lung cancer. *Clinica Chimica Acta* 1986; 154(2):125-132.
- [53] Waalkes TP, Abeloff MD, Ettinger DS, Woo KB, Gehrke CW, Kuo KC, Borek E: Modified ribonucleosides as biological markers for patients with small cell carcinoma of the lung. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 1982; 18(12):1267-1274.
- [54] Heldman DA, Grever MR, Trewyn RW: Differential excretion of modified nucleosides in adult acute leukemia. *Blood* 1983; 61(2):291-296.
- [55] Heldman DA, Grever MR, Speicher CE, Trewyn RW: Urinary excretion of modified nucleosides in chronic myelogenous leukemia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1983; 101(5):783-792.
- [56] Itoh K, Konno T, Sasaki T, Ishiwata S, Ishida N, Misugaki M: Relationship of urinary pseudouridine and 1-methyladenosine to activity of leukemia and lymphoma. *Clinica Chimica Acta* 1992; 206(3):181-189.
- [57] Marvel CC, Del Rowe J, Bremer EG, Moskal JR: Altered RNA turnover in carcinogenesis. The diagnostic potential of modified base excretion. *Molecular and Chemical Neuropathology* 1994; 21(2-3):353-368.
- [58] Fateh-Moghadam A, Stieber P. Criteria for the use of tumor markers. 1: Quality assurance--characteristics of the most important tumor markers. *Fortschritte der Medizin* 1996; 114[6], 30-33.
- [59] Goldman L: Quantitative Aspekte der klinischen Problemlösung; in: Straub PW, (ed): *Harrison – Prinzipien der Inneren Medizin, Band 1*. Schwabe & Co.AG Basel 1987, pp 6-13.
- [60] Lamerz R: CA 15-3; in: Thomas L, (ed): *Labor und Diagnose. Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH Marburg*, 1992, pp 1188-1193.
- [61] Klaus FW. Modifizierte Nucleoside als potenzielle Tumormarker beim Mammakarzinom. Dissertation, Universität Tübingen, 2004.
- [62] Yang J, Xu G, Zheng Y, Kong H, Pang T, Lu S, Yang Q: Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004; 813(1-2):59-65.
- [63] Uziel M, Smith LH, Taylor SA: Modified nucleosides in urine: selective removal and analysis. *Clinical Chemistry* 1976; 22(9):1451-1455.

- [64] Gehrke CW, Kuo KC: Ribonucleoside analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1989; 471:3-36.
- [65] Liebich HM, Xu G, Di Stefano C, Lehmann R: Capillary electrophoresis of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients. *Journal of Chromatography, A* 1998; 793(2):341-347.
- [66] Dudley E, Lemiere F, Van Dongen W, Langridge JI, El Sharkawi S, Games DE, Esmans EL, Newton RP: Analysis of urinary nucleosides. II. Comparison of mass spectrometric methods for the analysis of urinary nucleosides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001; 15(18):1701-1707.
- [67] Dudley E, Lemiere F, Van Dongen W, Langridge J, I, El Sharkawi S, Games DE, Esmans EL, Newton RP: Analysis of urinary nucleosides. III. Identification of 5'-deoxycytidine in urine of a patient with head and neck cancer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2003; 17(11):1132-1136.
- [68] Dudley E, El Sharkawi S, Games DE, Newton RP: Analysis of urinary nucleosides. I. Optimization of high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2000; 14(14):1200-1207.
- [69] Esmans EL, Broes D, Hoes I, Lemiere F, Vanhoutte K: Liquid chromatography-mass spectrometry in nucleoside, nucleotide and modified nucleotide characterization. *Journal of Chromatography, A* 1998; 794(1+2):109-127.
- [70] Brown PR, Bobick S, Hanley FL: Analysis of purine and pyrimidine bases and their nucleosides by high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1974; 99:587-595.
- [71] Stahl KW, Schlimme E, Bojanowski D: High-pressure liquid chromatography of modified purine mononucleotides and nucleosides. *Journal of Chromatography* 1973; 83:395-404.
- [72] Stahl KW, Schlimme E, Schäfer J: Liquid chromatographic analysis of nucleosides, purine base-modified adenosine derivatives and 3',5'-cyclic AMP. *Journal of Chromatography* 1973; 76(2):477-481.
- [73] Uziel MK, Koh C, Cohn WE: Rapid ion-exchange chromatographic microanalysis of ultraviolet-absorbing materials and its application to nucleosides. *Analytical Biochemistry* 1967; 25:77-98.
- [74] Gehrke CW, Kuo KC, Davis GE, Suits RD, Waalkes TP, Borek E: Quantitative high-performance liquid chromatography of nucleosides in biological materials. *Journal of Chromatography* 1978; 150(2):455-476.
- [75] Davis GE, Gehrke CW, Kuo KC, Agris PF: Major and modified nucleosides in tRNA hydrolysates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1979; 173(2):281-298.

- [76] Liebich HM, Lehmann R, Di Stefano C, Xu G, Voelter W: Analysis of Modified Nucleosides in Urine as Potential Tumour Markers by HPLC and CE. *GIT Labor-Fachzeitschrift Special Edition April 1997*; 92-93.
- [77] Ito T, Van Kuilenburg ABP, Bootsma AH, Haasnoot AJ, Van Cruchten A, Wada Y, Van Gennip AH: Rapid screening of high-risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urine-soaked filter paper strips. *Clinical Chemistry 2000*; 46(4):445-452.
- [78] Cohen LH, Gusev AI: Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry 2002*; 373(7):571-586.
- [79] Goheen SC, Wahl KL, Campbell JA, Hess WP: Mass spectrometry of low molecular mass solids by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Journal of Mass Spectrometry 1997*; 32(8):820-828.
- [80] Kinumi T, Saisu T, Takayama M, Niwa H: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis. *Journal of Mass Spectrometry 2000*; 35(3):417-422.
- [81] Lidgard R, Duncan MW: Utility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the analysis of low molecular weight compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry 1995*; 9(2):128-132.
- [82] Mengel-Jorgensen J, Kirpekar F: Detection of pseudouridine and other modifications in tRNA by cyanoethylation and MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Research 2002*; 30(23):e135.
- [83] Patteson KG, Rodicio LP, Limbach PA: Identification of the mass-silent post-transcriptionally modified nucleoside pseudouridine in RNA by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Nucleic Acids Research 2001*; 29(10):E49-9.
- [84] Koomen JM, Russell DH: Ultraviolet/matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric characterization of 2,5-dihydroxybenzoic acid-induced reductive hydrogenation of oligonucleotides on cytosine residues. *Journal of Mass Spectrometry 2000*; 35(8):1025-1034.
- [85] Crow FW, Tomer KB, Gross ML, McCloskey JA, Bergstrom DE: Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the determination of nucleosides. *Analytical Biochemistry 1984*; 139(1):243-262.
- [86] Wilson MS, McCloskey JA: Chemical ionization mass spectrometry of nucleosides. Mechanisms of ion formation and estimations of proton affinity. *Journal of the American Chemical Society 1975*; 97(12):3436-3444.
- [87] Xu G, Liebich H: Normal and modified nucleosides in urine as potential tumor markers determined by MEKC and HPLC. *American Clinical Laboratory 2001*; 20(2):22-32.

- [88] Dutta SP, Crain PF, McCloskey JA, Chheda GB: Isolation and characterization of 1- β -D-ribofuranosylpyridin-4-one-3-carboxamide from human urine. *Life Sciences* 1979; 24(15):1381-1388.
- [89] Mills GC, Davis NJ, Lertratanangkoon K: Isolation and identification of 1-ribosepyridone nucleosides from human urine. *Nucleosides & Nucleotides* 1989; 8(3):415-430.
- [90] Chang ML, Johnson BC: N-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide as a metabolite of nicotinic acid in man and monkey. *Journal of Biological Chemistry* 1961; 236:2096-2098.
- [91] Schlimme E, Boos KS, Schwarzenau E, Frister H, Ott FG, Raezke KP, Wilmers B: Dual column HPLC analysis of modified ribonucleosides as urinary pathobiochemical markers in clinical research. *Nucleosides & Nucleotides* 1990; 9(3):407-410.
- [92] Nelson CC, McCloskey JA: Collision-induced dissociation of adenine. *Journal of the American Chemical Society* 1992; 114(10):3661-3668.
- [93] Rice JM, Dudek GO: Mass spectra of nucleic acid derivatives. II. Guanine, adenine, and related compounds. *Journal of the American Chemical Society* 1967; 89(11):2719-2725.
- [94] Liehr JG, Von Minden DL, Hattox SE, McCloskey JA: Characterization of cytosine nucleosides by mass spectrometry. *Biomedical Mass Spectrometry* 1974; 1(4):281-285.
- [95] Rice JM, Dudek GO, Barber M: Mass spectra of nucleic acid derivatives. Pyrimidines. *Journal of the American Chemical Society* 1965; 87(20):4569-4576.
- [96] Nelson CC, McCloskey JA: Collision-induced dissociation of uracil and its derivatives. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 1994; 5(5):339-349.
- [97] Gregson JM, McCloskey JA: Collision-induced dissociation of protonated guanine. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 1997; 165/166:475-485.
- [98] Gregson JM, McCloskey JA: The dissociation chemistry of permethylated guanosines as articulated by MS/MS. *Tetrahedron Letters* 1993; 34(42):6665-6668.
- [99] Font E, Lasanta S, Rosario O, Rodriguez JF: Analysis of antiretroviral nucleosides by electrospray ionization mass spectrometry and collision induced dissociation. *Nucleosides & Nucleotides* 1998; 17(5):845-853.
- [100] R cker G, Neugebauer M, Willems G: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001.

- [101] Dudley E, Lemiere F, Van Dongen W, Tuytten R, El Sharkawi S, Brenton AG, Esmans EL, Newton RP: Analysis of urinary nucleosides. IV. Identification of urinary purine nucleosides by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2004; 18(22):2730-2738.
- [102] Bordas-Nagy J, Despeyroux D, Jennings KR: Comparison of helium and argon as collision gases in the high energy collision-induced decomposition of MH⁺ ions of peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 1992; 3(5):502-514.
- [103] Bullinger D, Frickenschmidt A, Pelzing M, Zey T, Zurek G, Laufer S, Kammerer B. Identification of urinary nucleosides by ESI-TOF-MS. *LC-GC Europe* Dec 2005, 16-17.
- [104] Nishimura S. Characterization and enzymic synthesis of 3-(3-amino-3-carboxypropyl)-uridine in transfer RNA: transfer of the 3-amino-3-carboxypropyl group from adenosylmethionine. *Biochem. Adenosylmethionine, Proc.Int.Symp.* 1977; 510-520.
- [105] Chheda GB, Tworek HA, Bhargava AK, Rachlin E, Dutta SP, Patrzyc HB: Isolation and characterization of 3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridine from human urine. *Nucleosides & Nucleotides* 1988; 7(4):417-429.
- [106] MacGregor JT, Burkhalter A: Biliary excretion of nicotinamide riboside. Role in the regulation of hepatic pyridine nucleotide dynamics. *Biochemical Pharmacology* 1973; 22(21):2645-2658.
- [107] Morris GS, Simmonds HA, Davies PM: Use of biological fluids for the rapid diagnosis of potentially lethal inherited disorders of human purine and pyrimidine metabolism. *Biomedical Chromatography* 1986; 1(3):109-118.
- [108] Chheda GB: Isolation and characterization of N⁶-succinyladenosine from human urine. *Nucleic Acids Research* 1977; 4(3):739-746.
- [109] Ericson JU, Bjoerk GR: tRNA anticodons with the modified nucleoside 2-methylthio-N⁶-(4-hydroxyisopentenyl)adenosine distinguish between bases 3' of the codon. *Journal of Molecular Biology* 1991; 218(3):509-516.
- [110] Dudley E, Lemiere F, Van Dongen W, Esmans E, El Sharkawi AMM, Games DE, Brenton AG, Newton RP: Urinary Modified Nucleosides as Tumor Markers. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2003; 22(5-8):987-989.
- [111] Kawai G, Hashizume T, Yasuda M, Miyazawa T, McCloskey JA, Yokoyama S: Conformational rigidity of N⁴-acetyl-2'-O-methylcytidine found in tRNA of extremely thermophilic archaebacteria (Archaea). *Nucleosides & Nucleotides* 1992; 11(2-4):759-771.
- [112] Guo HY, Herrera H, Groce A, Hoffman RM: Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture. *Cancer Research* 1993; 53(11):2479-2483.

- [113] Halpern BC, Ezzell R, Hardy DN, Clark BR, Ashe H, Halpern RM, Smith RA: Effect of methionine replacement by homocystine in cultures containing both malignant rat breast carcinosarcoma (Walker-256) cells and normal adult rat liver fibroblasts. *In Vitro*; 11(1):14-19.
- [114] Hoffman RM: Altered methionine metabolism and transmethylation in cancer. *Anticancer Research* 1985; 5(1):1-30.
- [115] Tang B, Li YN, Kruger WD: Defects in methylthioadenosine phosphorylase are associated with but not responsible for methionine-dependent tumor cell growth. *Cancer Research* 2000; 60(19):5543-5547.
- [116] Zhang H, Chen ZH, Savarese TM: Codeletion of the genes for p16INK4, methylthioadenosine phosphorylase, interferon- α 1, interferon- β 1, and other 9p21 markers in human malignant cell lines. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1996; 86(1):22-28.
- [117] Christopher SA, Diegelman P, Porter CW, Kruger WD: Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16cdkN2a/ARF, acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line. *Cancer Research* 2002; 62(22):6639-6644.
- [118] Amuro Y, Nakaoka H, Shimomura S, Fujikura M, Yamamoto T, Tamura S, Hada T, Higashino K: Serum pseudouridine as a biochemical marker in patients with hepatocellular carcinoma. *Clinica Chimica Acta* 1988; 178(2):151-158.
- [119] Liebich HM, Mueller-Hagedorn S, Klaus F, Meziane K, Kim KR, Frickenschmidt A, Kammerer B: Chromatographic, capillary electrophoretic and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of urinary modified nucleosides as tumor markers. *Journal of Chromatography, A* 2005; 1071(1-2):271-275.
- [120] Rasmuson T, Bjork GR, Hietala SO, Stenling R, Ljungberg B: Excretion of pseudouridine as an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Acta Oncologica* 1991; 30(1):11-15.
- [121] Mutschler E: *Arzneimittelwirkungen*. 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1996.
- [122] Casley WL, Menzies JA, Girard M, Larocque L, Mousseau N, Whitehouse LW, Moon TW: Differences in caffeine 3-demethylation activity among inbred mouse strains: a comparison of hepatic Cyp1a2 gene expression between two inbred strains. *Fundamental and Applied Toxicology* 1997; 40(2):228-237.
- [123] Cazeneuve C, Pons G, Rey E, Treluyer JM, Cresteil T, Thiroux G, D'Athis P, Olive G: Biotransformation of caffeine in human liver microsomes from fetuses, neonates, infants and adults. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1994; 37(5):405-412.

- [124] Ha HR, Chen J, Krahenbuhl S, Follath F: Biotransformation of caffeine by cDNA-expressed human cytochromes P-450. *European journal of clinical pharmacology* 1996; 49(4):309-315.
- [125] Eugster HP, Probst M, Wuergler FE, Sengstag C: Caffeine, estradiol, and progesterone interact with human CYP1A1 and CYP1A2. Evidence from cDNA-directed expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Drug Metabolism and Disposition* 1993; 21(1):43-49.
- [126] Bullock P, Pearce R, Draper A, Podval J, Bracken W, Veltman J, Thomas P, Parkinson A: Induction of liver microsomal cytochrome P450 in cynomolgus monkeys. *Drug Metabolism and Disposition* 1995; 23(7):736-748.
- [127] Gamache PH, Meyer DF, Granger MC, Acworth IN: Metabolomic applications of electrochemistry/Mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2004; 15(12):1717-1726.
- [128] Griffin JL: The potential of metabonomics in drug safety and toxicology. *Drug Discovery Today: Technologies* 2004; 1(3):285-293.
- [129] Kim H, Page GP, Barnes S: Proteomics and mass spectrometry in nutrition research. *Nutrition* 2004; 20(1):155-165.
- [130] Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, Nicholson JK: Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers* 2004; 9(1):1-31.
- [131] Plumb RS, Stumpf CL, Gorenstein MV, Castro-Perez JM, Dear GJ, Anthony M, Sweatman BC, Connor SC, Haselden JN: Metabonomics: the use of electrospray mass spectrometry coupled to reversed-phase liquid chromatography shows potential for the screening of rat urine in drug development. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002; 16(20):1991-1996.
- [132] Wilson ID, Plumb R, Granger J, Major H, Williams R, Lenz EM: HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2005; 817(1):67-76.
- [133] Beger RD. Metabonomics of Cancer. Abstracts, 57th Southeast/61st Southwest Joint Regional Meeting of the American Chemical Society, Memphis, TN, United States, November 1-4 2005.
- [134] Kleno TG, Kiehr B, Baunsgaard D, Sidelmann UG: Combination of 'omics' data to investigate the mechanism(s) of hydrazine-induced hepatotoxicity in rats and to identify potential biomarkers. *Biomarkers* 2004; 9(2):116-138.

- [135] Lenz EM, Bright J, Knight R, Westwood FR, Davies D, Major H, Wilson ID: Metabonomics with ¹H-NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry applied to the investigation of metabolic changes caused by gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat. *Biomarkers* 2005; 10(2-3):173-187.
- [136] Plumb RS, Stumpf CL, Granger JH, Castro-perez J, Haselden JN, Dear GJ: Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2003; 17(23):2632-2638.
- [137] Wang C, Kong H, Guan Y, Yang J, Gu J, Yang S, Xu G: Plasma Phospholipid Metabolic Profiling and Biomarkers of Type 2 Diabetes Mellitus Based on High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry and Multivariate Statistical Analysis. *Analytical Chemistry* 2005; 77(13):4108-4116.
- [138] Yang J, Xu G, Zheng Y, Kong H, Wang C, Zhao X, Pang T: Strategy for metabonomics research based on high-performance liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A* 2005; 1084(1-2):214-221.
- [139] Holloway DT, Kon M, DeLisi C: Integrating genomic data to predict transcription factor binding. *Genome Informatics Series* 2005; 16(1):83-94.
- [140] Lepp Z, Kinoshita T, Chuman H: Screening for New Antidepressant Leads of Multiple Activities by Support Vector Machines. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2006; 46(1):158-167.
- [141] Saeh JC, Lyne PD, Takasaki BK, Cosgrove DA: Lead Hopping Using SVM and 3D Pharmacophore Fingerprints. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2005; 45(4):1122-1133.
- [142] Furey TS, Cristianini N, Duffy N, Bednarski DW, Schummer M, Haussler D: Support vector machine classification and validation of cancer tissue samples using microarray expression data. *Bioinformatics* 2000; 16(10):906-914.
- [143] Honda K, Hayashida Y, Umaki T, Okusaka T, Kosuge T, Kikuchi S, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, Hirohashi S, Yamada T: Possible Detection of Pancreatic Cancer by Plasma Protein Profiling. *Cancer Research* 2005; 65(22):10613-10622.
- [144] Liu Y: Serum proteomic pattern analysis for early cancer detection. *Series in Mathematical Biology and Medicine* 2005; 8(Advances in Bioinformatics and Its Applications):163-172.
- [145] Duan K, Rajapakse JC: SVM-RFE peak selection for cancer classification with mass spectrometry data. *Series on Advances in Bioinformatics and Computational Biology* 2005; 1(Proceedings of the 3rd Asia-Pacific Bioinformatics Conference, 2005):191-200.

- [146] Rajapakse JC, Duan KB, Yeo WK: Proteomic cancer classification with mass spectrometry data. *American Journal of Pharmacogenomics* 2005; 5(5):281-292.
- [147] Luntz A, Brailovsky V: On estimation of characters obtained in statistical procedure of recognition. *Technicheskaya Kibernetica* 1969; 3.
- [148] Bartels H, Bohmer M, Heierli C: Serum creatinine determination without protein precipitation. *Clinica Chimica Acta* 1972; 37:193-197.
- [149] Liebich HM, Mueller-Hagedorn S, Bacher M, Scheel-Walter HG, Lu X, Frickenschmidt A, Kammerer B, Kim KR, Gerard H: Age-dependence of urinary normal and modified nucleosides in childhood as determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2005; 814(2):275-283.
- [150] Kammerer B, Frickenschmidt A, Mueller CE, Laufer S, Gleiter CH, Liebich H: Mass spectrometric identification of modified urinary nucleosides used as potential biomedical markers by LC-ITMS coupling. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005; 382(4):1017-1026.
- [151] Duda R, Hart P, Stork G.: *Pattern Classification*. 2. Auflage, Wiley Interscience 2001.
- [152] Guyon I, Elisseeff A: An Introduction into Variable and Feature Selection. *J Machine Learning Research* 2003; 3:1157-1182.

AUFLISTUNG DER AKADEMISCHEN LEHRER

Prof. Dr. U. Behrens	Anorganische Chemie, Universität Hamburg
Prof. Dr. C. Benndorf	Physikalische Chemie, Universität Hamburg
Prof. Dr. B. Bisping	Mikrobiologie, Universität Hamburg
Prof. Dr. F.-W. Büßer	Physik, Universität Hamburg
Prof. Dr. P. Grunwald	Physikalische Chemie, Universität Hamburg
Prof. Dr. H. Hahn	Botanik, Universität Hamburg
Prof. Dr. J. Heck	Anorganische Chemie, Universität Hamburg
Prof. Dr. H. Hühnerfuß	Organische Chemie, Universität Hamburg
Prof. Dr. R. Kramolowsky	Anorganische Chemie, Universität Hamburg
Prof. Dr. S. Laufer	Pharmazeutische Chemie, Universität Tübingen
Prof. Dr. H. Liebich	Biochemie, Universität Tübingen
Prof. Dr. A. Schmoldt	Toxikologie, Universität Hamburg
Prof. Dr. Dr. H. Steinhart	Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
Prof. Dr. J. Thiem	Organische Chemie, Universität Hamburg

LEBENS LAUF

05.04.1976 geboren in Hamburg

Schule

1982-1986 Grundschule Flughafenstraße, Hamburg

1986-1995 Gymnasium Hummelsbüttel, Hamburg

05/1995 Abitur

08-11/1995 Sprachschule Anglo World, Cambridge, England

Studium

04/1996-07/2002 Studium der Lebensmittelchemie an der
Universität Hamburg

02-11/2000 Diplomarbeit am Institut für Lebensmittelchemie der
Universität Hamburg mit dem Titel „Optimierung und
Anwendung einer Methode zur Bestimmung von
Steroidhormonmustern in Rinderfettgewebe“

03/2001 Erste Lebensmittelchemische Staatsprüfung

05-11/2001 Praktikum im Handels- und Umweltschutzlabor
Dr. Kaiser und Dr. Woldmann GmbH, Hamburg

11/2001-04/2002 Praktische Ausbildung am
Hygiene Institut Hamburg

07/2002 Zweite Lebensmittelchemische Staatsprüfung

Promotion

Seit 01/2003 Promotion am Lehrstuhl für Pharmazeutische und
Medizinische Chemie bei Prof. Dr. S. Laufer, Universität
Tübingen

