

**METABOLOMICS IN DER TUMORDIAGNOSTIK:
MASSENSPEKTROMETRISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUM METABOLISCHEN
PROFIL MODIFIZIERTER NUCLEOSIDE**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2008

vorgelegt von

Dino Bullinger

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 01.10.2004 bis 30.04.2008 unter der Anleitung von Prof. Dr. Stefan Laufer, Prof. Dr. Christoph H. Gleiter und Dr. Bernd Kammerer am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen und am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Klinische Pharmakologie angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2008

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. S. Laufer

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. C. H. Gleiter

Mein Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden, Kollegen und Kooperationspartnern, ohne deren Hilfe und Unterstützung die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Besonders bedanken möchte ich mich bei....

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

... *Prof. Dr. Stefan Laufer* für die Betreuung der Arbeit, die Übernahme des Erstgutachtens und die freundliche finanzielle Unterstützung in den letzten drei Monaten.

... *Prof. Dr. Christoph Gleiter* für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung der Arbeit, die Übernahme des Zweitgutachtens und die Finanzierung.

... *Dr. Richard Fux* für seine Unterstützung bei der Planung und Durchführung der klinischen Studien.

... *Dr. Ursula Delabar* für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft in analytischen und administrativen Angelegenheiten sowie für ihre immer gute Laune.

... *Prof. Dr. Andreas Zell* und *Carsten Henneges* für die bioinformatische Auswertung der Metabolitenmuster.

... *Graeme Nicholson* für die Durchführung der FT-ICR-MS-Messungen.

... *Konstanze Geiger* für die Durchführung der Zellkulturarbeiten und *Dr. Hans Neubauer* für die wissenschaftliche Diskussions- und Kooperationsbereitschaft.

... *Dr. Gabriela Zurek*, *Dr. Matthias Pelzing*, *Dr. Ralf Falter* und *Dr. Thomas Zey* von der Firma Bruker Daltonics für die LC-ESI-MS-Messungen.

... *Dr. Jens Fuchser* von der Firma Bruker Daltonics für die APEX-QE-FT-MS-Messungen.

... *Natascha Friese* für die Kooperation in der klinischen Studie AKP-23.

... *Prof. Dr. Klaus-Peter Zeller* für die Diskussion der Strukturhypothesen in den Fragmentierungshierarchien.

... *PD Dr. Stefan Plontke* und allen Mitarbeitern der HNO-Station IV am Uniklinikum Tübingen für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung.

... *Prof. Dr. Claus Belka* und allen Mitarbeitern der Abteilung Radioonkologie am Uniklinikum Tübingen für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung.

... allen Mitarbeitern der Abteilung Klinische Pharmakologie, insbesondere bei *Monika Weber* für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen administrativen Angelegenheiten.

... allen derzeitigen und ehemaligen Doktoranden und Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Laufer für die nette Aufnahme im Arbeitskreis, die gute Arbeitsatmosphäre sowie alle gemeinsamen Unternehmungen innerhalb und außerhalb des Unialltags.

... meinen Laborkollegen im M-Park *Maissa Sakr, Claudia Mayer, Frank Zwanziger, Stefanie Siebenberg, Mohanad Zbidah* und *Marc Weißer* für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

... meinen ehemaligen Laborkollegen *Dr. Rainer Kahlich, Elmar Schwichtenberg, Anke Schmidt, Stefanie Reit* und *Olga Schick* für das gute Arbeitsklima, zahlreiche fachliche Diskussionen und gemeinsame Unternehmungen.

... meiner Laborkollegin und Mitdotorandin *Dr. Antje Frickenschmidt* für die Einführung an der Ionenfalle, die Einarbeitung in die Nucleosidthematik sowie die zahlreichen gemeinsamen Unternehmungen in und um Tübingen.

... meinem Laborkollegen und Mitdotoranden *Dr. Holger Scheible* für die kompetente Unterstützung in allen Fragen und Problemen rund um das Thema Massenspektrometrie, die zahlreichen Gespräche und Diskussionen sowie die schönen Unternehmungen außerhalb des Unialltags.

... *Gabriele* für ihre liebevolle Unterstützung, die schönen vergangenen drei Jahre und die Vorfreude auf die kommende gemeinsame Zeit.

... meinen Eltern *Cornelia* und *Rudolf Bullinger* für ihr uneingeschränktes Vertrauen, ihre Unterstützung und ihren Zuspruch insbesondere auch in schwierigeren Zeiten.

meinen Eltern und Gabriele

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Form veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Publikationen:

1. Identification of urinary nucleosides by ESI-TOF-MS

Bullinger, D., Frickenschmidt, A., Pelzing, M., Zey, T., Zurek, G., Laufer, S., Kammerer, B., *LC-GC Europe*, 16-17, 2005

2. Metabolic signature of breast cancer cell line MCF-7: profiling of modified nucleosides via LC-IT MS coupling

Bullinger, D., Neubauer, H., Fehm, T., Laufer, S., Gleiter, C. H., Kammerer, B., *BMC Biochemistry*, (8), 25, 2007

3. Metabonomics in cancer diagnosis: Mass spectrometry based profiling of urinary nucleosides from breast cancer patients

Frickenschmidt, A., Fröhlich, H., Bullinger, D., Zell, A., Laufer, S., Gleiter, C.H., Liebich, H., Kammerer, B., *Biomarkers*, akzeptiert 3/2008

4. Bioinformatical evaluation of modified nucleosides as biomedical markers in diagnosis of breast cancer

Bullinger, D., Fröhlich, H., Klaus, F., Neubauer, H., Frickenschmidt, A., Henneges, C., Zell, A., Laufer, S., Gleiter, C. H., Liebich, H. Kammerer, B., *Analytica Chimica Acta*, akzeptiert 4/2008

5. Identification of urinary modified nucleosides and ribosylated metabolites in humans via combined ESI-FTICR MS and ESI-IT MS analysis

Bullinger, D., Fux, R., Nicholson, G., Plontke, S., Belka, C., Laufer, S., Gleiter, C. H., Kammerer, B., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, eingereicht 2/2008

Vorträge und Posterpräsentationen:

1. Identifizierung von modifizierten Nucleosiden mit massenspektrometrischen Techniken

Bullinger, D., Vortrag im Rahmen des *2. Tübinger Massenspektrometrie-seminars*, 2005

2. Metabolic Profiling mit modernen massenspektrometrischen Techniken

Bullinger, D., Vortrag im Rahmen des *3. Tübinger Massenspektrometrie-seminars*, 2007

3. Identification of modified nucleosides in urine by LC-MicroTOF-MS

Bullinger, D., Frickenschmidt, A., Zurek, G., Zey, T., Pelzing, M., Laufer, S., Gleiter, C. H., Liebich, H., Kammerer, B., Posterpräsentation, *GDCh-Tagung ANAKON*, 2005

4. Identification of modified nucleosides in urine using combined mass spectrometric techniques

Bullinger, D., Frickenschmidt, A., Zurek, G., Zey, T., Pelzing, M., Laufer, S., Gleiter, C. H., Fröhlich, H., Kammerer, B., Posterpräsentation, *DPhG-Jahrestagung Mainz*, 2005

5. Identification of urinary modified nucleosides via combined LC-IT MS and LC-TOF MS analysis

Bullinger, D., Fröhlich, H., Frickenschmidt, A., Zurek, G., Zey, T., Pelzing, M., Laufer, S., Gleiter, C. H., Kammerer, B., Posterpräsentation, *DPhG-Jahrestagung Erlangen*, 2007

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	15
1.1	Krebserkrankungen in Deutschland.....	15
1.2	Tumorgenese und Tumorprogression	17
1.3	Tumormarker.....	22
1.3.1	Tumormarkerklassen	22
1.3.2	Statistische Kenngrößen der Tumormarkerdiagnostik	23
1.3.3	Indikationen zur Tumormarkerbestimmung	26
1.3.4	Neue Targets in der Tumormarkerforschung.....	28
1.4	Metabolomics, Metabonomics und Metabolic Profiling.....	31
1.4.1	Begriffsdefinitionen	32
1.4.2	Ribonucleinsäuren und modifizierte Nucleoside	33
1.5	Analytik.....	42
1.5.1	Elektrospray-Ionisierung.....	42
1.5.2	Ionenfallenmassenspektrometrie	44
1.5.3	Fourier Transformation Ionen Zyklotron Massenspektrometrie	48
2	AUFGABENSTELLUNG	53
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	55
3.1	Klinische Studie AKP-24: Massenspektrometrische Untersuchung ribosylierter Metaboliten im 24h-Urin von Tumorpatienten	55
3.1.1	Studienziel	55
3.1.2	Studienplanung und Durchführung	56
3.1.3	Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung.....	58
3.1.4	Massenspektrometrische Analytik	66

3.1.5	Metabolitenidentifizierung mit kombinierten massenspektrometrischen Techniken	89
3.1.6	ESI-IT-MS ⁿ -Messungen im negative mode	154
3.2	Metabolic Profiling in Zellkulturüberständen von MCF-7 und MCF-10A	174
3.2.1	Bisherige Arbeiten	174
3.2.2	Allgemeines zu den verwendeten Zelllinien	176
3.2.3	Zellkultivierung	177
3.2.4	Probenaufbereitung.....	178
3.2.5	LC-IT-MS-Analytik	178
3.2.6	Semiquantitative Auswertung des Metabolitenmusters.....	186
3.3	Analytik von modifizierten Nucleoside im Plasma von Mammakarzinompatientinnen	194
3.3.1	Bisherige Arbeiten	194
3.3.2	Sammlung der Plasmaproben.....	195
3.3.3	Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung	195
3.3.4	Semiquantitative Auswertung des Metabolitenmusters.....	198
3.3.5	Quantifizierung von U und Ψ mittels Matrixsimulation.....	199
3.4	Analytik von modifizierten Nucleosiden in Brustkrebsgewebe.....	204
3.4.1	Bisherige Arbeiten	204
3.4.2	Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung	205
3.4.3	Auswertung des Metabolitenmusters	206
3.5	Klinische Studie AKP-23: Musterbestimmung ribosylierter Metaboliten im Spontanurin von Mammakarzinompatientinnen ...	209
3.5.1	Studienziel.....	209
3.5.2	Studienplanung und Durchführung.....	209
3.5.3	Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung	212
3.5.4	LC-IT-MS-Messungen	215
3.5.5	Auswertung und Datengenerierung.....	215
3.5.6	Methodenvalidierung	217

3.5.7	Erstellung des Metabolitenmusters.....	220
3.5.8	Methoden der Bioinformatik als Klassifizierungssysteme	227
3.5.9	Ergebnis der Featureselektion.....	238
3.5.10	Biochemische Diskussion der Featurekombinationen	239
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	245
5	MATERIAL UND METHODEN	251
5.1	Standardsubstanzen.....	251
5.2	Probenaufarbeitung.....	252
5.2.1	Packen der Säulen und Gelkonditionierung.....	252
5.2.2	Urin (20 ml).....	253
5.2.3	Urin (1 ml).....	255
5.2.4	Zellkulturüberstände	257
5.2.5	Plasma.....	258
5.2.6	Gewebe	260
5.3	MS-Analytik	262
5.3.1	Chemikalien.....	262
5.3.2	Geräte.....	262
5.3.3	Massenspektrometrische Methoden	264
6	METABOLITENVERZEICHNIS	271
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	279

Abkürzungsverzeichnis

<i>ACN</i>	Acetonitril
<i>AFP</i>	Alpha-Fetoprotein
<i>AMPK</i>	AMP-aktivierte Proteinkinase
<i>amu</i>	atomic mass unit
<i>ANN</i>	Artificial Neural Network
<i>APPI</i>	Atmospheric Pressure Photoionization
<i>BPC</i>	Base Peak Chromatogram
<i>CA 15-3</i>	Cancer Antigen 15-3
<i>CE</i>	Kapillarelektrophorese
<i>CEA</i>	Carcino-Embryonales Antigen
<i>CID</i>	Collision Induced Dissociation
<i>CNL</i>	Constant Neutral Loss
<i>CRM</i>	Charge Residue Model
<i>CV</i>	Cross Validation (Kreuzvalidierung)
<i>Da</i>	Dalton
<i>DC</i>	Dünnschichtchromatographie
<i>EC</i>	Externe Kalibrierung
<i>E.coli</i>	Escherichia Coli
<i>EI</i>	Electron Impact
<i>EIC</i>	Extracted Ion Chromatogram
<i>FA</i>	Ameisensäure
<i>FAB</i>	Fast Atom Bombardment
<i>FID</i>	Free Induction Decay
<i>FDI</i>	Field Desorption Ionization
<i>FN</i>	False negative
<i>FP</i>	False positive
<i>FT-ICR-MS</i>	Fourier Transformation Ionen Zyklotron Resonanz Massenspektrometrie
<i>GC</i>	Gaschromatographie
<i>HAc</i>	Essigsäure
<i>HPLC</i>	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
<i>IC</i>	Interne Kalibrierung

<i>IEM</i>	Ion Evaporation Model
<i>Istd</i>	Interner Standard
<i>IT-MS</i>	Ionenfallen Massenspektrometrie
<i>kD</i>	Kilodalton
<i>LOO</i>	Leave-One-Out-Kreuzvalidierung
<i>MALDI</i>	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
<i>MCC</i>	Matthews Correlation Coefficient
<i>MeOH</i>	Methanol
<i>mRNA</i>	Messenger RNA
<i>miRNA</i>	Micro RNA
<i>[MH]⁺</i>	Quasimolekülion, protoniert
<i>[MK]⁺</i>	Quasimolekülion, Kaliumaddukt
<i>[MNa]⁺</i>	Quasimolekülion, Natriumaddukt
<i>MS</i>	Massenspektrometrie
<i>MSI</i>	Microsatellite instability
<i>MSⁿ</i>	n-fache MS-Fragmentierung
<i>m/z</i>	Masse / Ladungs-Verhältnis
<i>ncRNA</i>	Non-coding RNA
<i>NG</i>	Neutral Gain
<i>NH₄Ac</i>	Ammoniumacetat
<i>NPW</i>	Negativ-prädiktiver Wert
<i>oa</i>	Orthogonal acceleration
<i>OFS</i>	Oscillating Feature Search
<i>PAP</i>	Prostata-spezifische saure Phosphatase
<i>PCA</i>	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
<i>ppm</i>	Parts per million
<i>PPW</i>	Positiv-prädiktiver Wert
<i>PSA</i>	Prostata-spezifisches Antigen
<i>QC</i>	Qualitätskontrollprobe
<i>RBF</i>	Radial Basis Function
<i>RFE</i>	Recursive Feature Elimination
<i>RNA</i>	Ribonucleinsäure
<i>ROC</i>	Receiver-Operator-Curve
<i>RP</i>	Reversed Phase

<i>rpm</i>	Rounds per minute
<i>rRNA</i>	Transfer RNA
<i>RSD</i>	Relative Standardabweichung
<i>RT</i>	Retention time (Retentionszeit)
<i>SBS</i>	Sequential Backward Selection
<i>SD</i>	Standardabweichung
<i>SELDI</i>	Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization
<i>SFS</i>	Sequential Forward Selection
<i>SNP</i>	Single-nucleotide polymorphism
<i>snRNP</i>	Small nuclear ribonucleinproteins
<i>snRNA</i>	Small nuclear RNA
<i>snoRNA</i>	Small nucleolar RNA
<i>SV</i>	Support Vektoren
<i>SVM</i>	Support Vector Machine
<i>tRNA</i>	Transfer RNA
<i>TIC</i>	Total Ion Current (Totalionenstrom)
<i>TFA</i>	Trifluoressigsäure
<i>TM</i>	Tumormarker
<i>TN</i>	True negative
<i>TOF</i>	Time of Flight
<i>TP</i>	True positive
<i>UV</i>	Ultraviolett

Anm.: Die verwendeten Abkürzungen der untersuchten Verbindungen sind im Metabolitenverzeichnis in Kapitel 6 gesondert aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen in Deutschland

Krebs stellt in der Bundesrepublik Deutschland nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Jeder vierte Todesfall in Deutschland wird durch eine Krebserkrankung verursacht. Im Jahr 2005 starben insgesamt 210000 Menschen an den Folgen einer Tumorerkrankung (vgl. Abb. 1). Brustkrebs ist die häufigste Form der Krebserkrankungen bei Frauen (etwa jede zehnte Frau erkrankt daran). Bei Männern liegen die Fallzahlen bei Lungen-, Darm- und Prostatakrebs am höchsten (vgl. Abb. 2). Die häufigsten Krebsarten bei Kindern sind Leukämie, ZNS-Tumoren und Lymphome. Die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr liegt zwischen 330000 und 380000 mit einer Gesamtzahl von derzeit vier bis fünf Millionen Krebserkrankten^[1]. Betrachtet man die Entwicklung der letzten Jahre und Jahrzehnte, so stieg die Häufigkeit von Krebsneuerkrankungen, die Mortalitätsrate hingegen sank^[2]. Dies ist auf die demographische Entwicklung sowie kontinuierliche Verbesserungen in der medizinischen Versorgung zurückzuführen. Der wachsende Anteil älterer Menschen in der Bevölkerung führt zu einem Anstieg der Gesamterkrankungszahl, da sich Krebsleiden grundsätzlich im hohen Lebensalter häufen. Das Krebserkrankungsrisiko über 80jähriger Männer in Deutschland ist demnach etwa 300 mal, das gleichaltriger Frauen 200 mal höher als jenes 10-15jähriger Jugendlicher gleichen Geschlechts. Neben dem steigenden Lebensalter sowie der genetischen Veranlagung können auch äußere Einflüsse wie Lebensgewohnheiten, Ernährungsweisen, Freizeitverhalten, Arbeitsplatzsituation und Umweltfaktoren eine wichtige Rolle für die Erkrankungswahrscheinlichkeit spielen. Unter den vermeidbaren Risikofaktoren ist das Rauchen in unserer Gesellschaft von entscheidender Bedeutung. 25-30% aller Krebstodesfälle sind durch Rauchen verursacht^[3]. Die Tatsache, dass immer mehr Frauen rauchen, führte in dieser Bevölkerungsgruppe in den letzten Jahren zu einem erheblichen Anstieg der Bronchialkarzinom-Neuerkrankungen^[2]. Im Allgemeinen führen

jedoch die stetig verbesserte Krebsfrüherkennung sowie effizientere Behandlungsmethoden zu deutlich gestiegenen Heilungschancen im Krankheitsfall. Im Vergleich der 80er und 90er Jahre kam es bei annähernd allen bösartigen Tumoren zu einem Anstieg der 5-Jahres-Überlebensraten^[2].

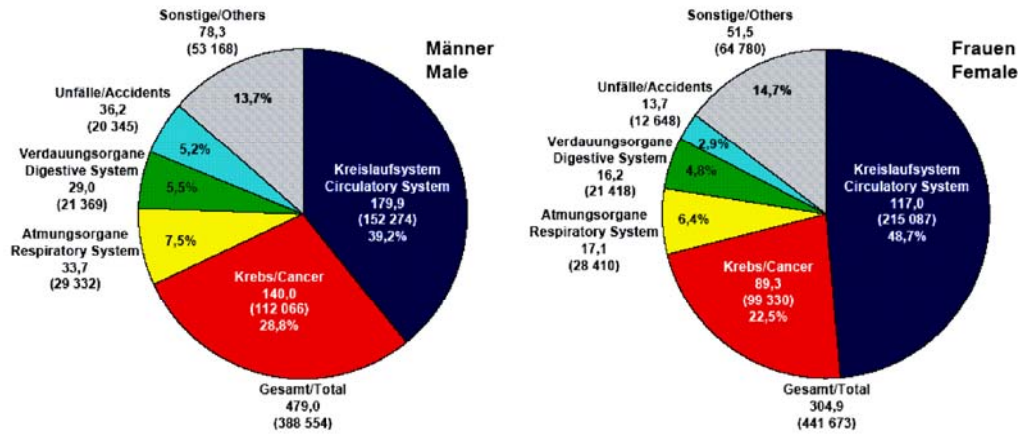


Abbildung 1: Die häufigsten Todesursachengruppen in Deutschland 2005 nach^[4]. Legende: Todesursachengruppe, altersstandardisierte Mortalitätsrate, (Anzahl Todesfälle), prozentualer Anteil an allen Todesfällen.

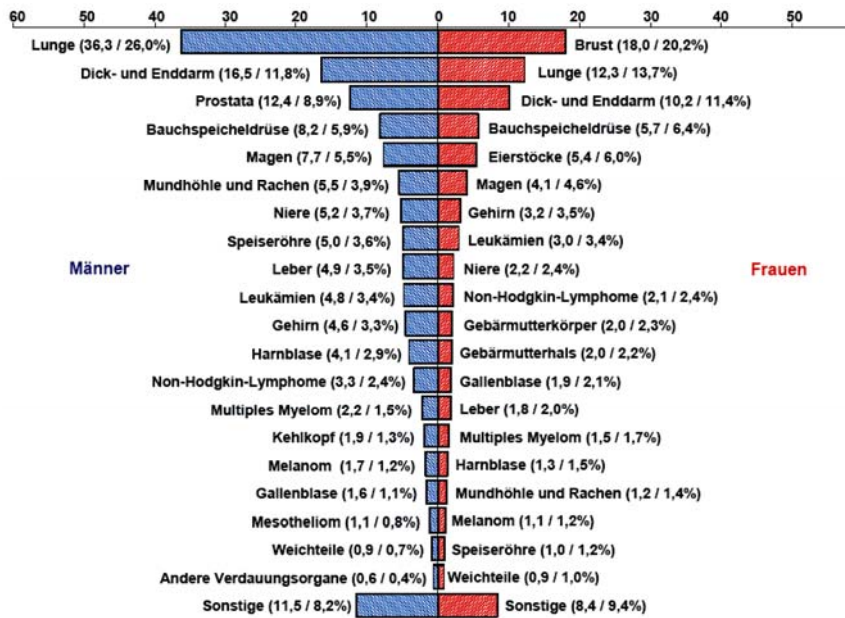


Abbildung 2: Statistik der 20 häufigsten Krebstodesursachen im Jahr 2005 nach^[4]. Zahlen in Klammern: (altersstandardisierte Mortalitätsrate pro 100000 / prozentualer Anteil an gesamten Krebstodesfällen).

1.2 Tumorgenese und Tumorprogression

Das menschliche Zellwachstum ist einer strengen Regulation unterworfen, die durch unterschiedliche Anforderungen des Körpers und äußere Einflüsse bestimmt wird. Wachstumsprozess und Zunahme des Körpergewichtes bei Säuglingen und Kindern beruhen auf der Tatsache, dass in dieser Phase mehr Zellen gebildet werden als absterben. Im Erwachsenenalter hingegen stehen die Bildung und das Absterben von Zellen im Gleichgewicht^[5]. Unter bestimmten Umständen kann dieses regulative System pathogene Veränderungen erfahren, die eine maligne Transformation der normalen Zelle in eine Tumorzelle zur Folge haben. In einem komplexen, mehrschichtigen Prozess kommt es hierbei zur Anhäufung genetischer Mutationen, welche direkt in entscheidende zelluläre Vorgänge wie *Proliferation* (Zellteilung), Zelldifferenzierung und *Apoptose* (programmierter Zelltod) eingreifen^[6;7] (vgl. Abb. 3). Generell entwickeln sich maligne Tumorerkrankungen erst nach mehreren durchlaufenen Zellmutationen (drei - zwanzig, abhängig von der jeweiligen Krebsart). Da diese Prozesse über einen Zeitraum von Jahren und Jahrzehnten erfolgen, tritt Krebs vornehmlich als Erkrankung des Alters auf^[5].

Die für die Tumorgenese entscheidenden Genspezies lassen sich in drei Hauptklassen einteilen^[6]. Die Klasse der *Onkogene* geht aus molekularen Modifikationen regulärer Zellgene, den sogenannten *Protoonkogenen*, hervor. Diese kodieren für zellregulative Komponenten wie z.B. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Elemente der Signaltransduktionskette oder Transkriptionsfaktoren^[8]. Durch Punkt-, Insertions- und Deletionsmutationen von DNA-Basen, Genamplifikationen (örtlich begrenzte Verdopplung eines DNA-Strangs) oder chromosomale Translokationen, kommt es zu einer Funktionssteigerung der in Stoffwechselfvorgängen regulativ wirkenden Protoonkogenen^[9;10]. Die mutativ gebildeten Onkogene exprimieren entsprechend den angeführten Mechanismen modifizierte Onkoproteine, überexprimieren Protoonkoproteine oder exprimieren letztere an translokalisierten Stellen^[5]. In allen Varianten resultiert eine für maligne Tumorzellen charakteristische, hochregulierte Zellproliferationsrate mit autonomem Wachstumsstimulus^[8].

Die Koexpression von Onkogenen ist generell dominant und kann so den Effekt konträr wirkender Genspezies, sogenannter Tumorsuppressorgene, aufheben^[8]. Für eine maligne Phänotypisierung einer Zelle ist im Falle der Onkogene die Mutation eines Allels ausreichend^[9]. Im Jahr 2004 waren insgesamt 291 Onkogene in der Literatur beschrieben. Dies entspricht über 1% des regulären humanen Genoms^[11].

Tumorsuppressorgene sind normale Bestandteile jeder Zelle und üben einen regulierenden Einfluss auf Zellzyklus und Zellwachstum aus^[8]. Die proliferationshemmende Wirkung erfolgt über verschiedene exprimierte Proteinklassen. So kann der Durchgang durch bestimmte Phasen des Zellzyklus über intrazelluläre Proteine reguliert oder inhibiert werden. Wachstumsfaktoren, die als Rezeptoren für sezernierte Hormone wirken, können die Zellteilung hemmen. Eine weitere Proteinklasse überwacht definierte Kontrollpunkte des Zellzyklus und hält diesen an, wenn geschädigte DNA oder anomale Chromosomen vorliegen. Des Weiteren kodieren Tumorsuppressorgene für Proteine, die eine Apoptose fördern^[5]. Im Gegensatz zu Onkogenen agieren Tumorsuppressorgene rezessiv. Voraussetzung für eine maligne Transformation ist also eine Funktionsverlustmutation in beiden Allelen^[12].

Die dritte Klasse der für eine maligne Zelltransformation entscheidenden Genspezies ist die der *Mutatorgene*^[8]. Diese sind in ihrer normalen Funktion für den Erhalt und die Integrität des menschlichen Genoms verantwortlich. Mutationsbedingte Defekte führen im Verlauf der Tumorgenese zu fehlerhafter Replikation und Reparatur der DNA und damit kaskadenförmig zu weiteren, zufälligen Mutationen im gesamten Genom^[13]. Analog den Tumorsuppressorgenen muss auch beim rezessiven Mutatorgen ein Defekt in beiden Allelen vorliegen, um eine Krebserkrankung auslösen zu können^[9].

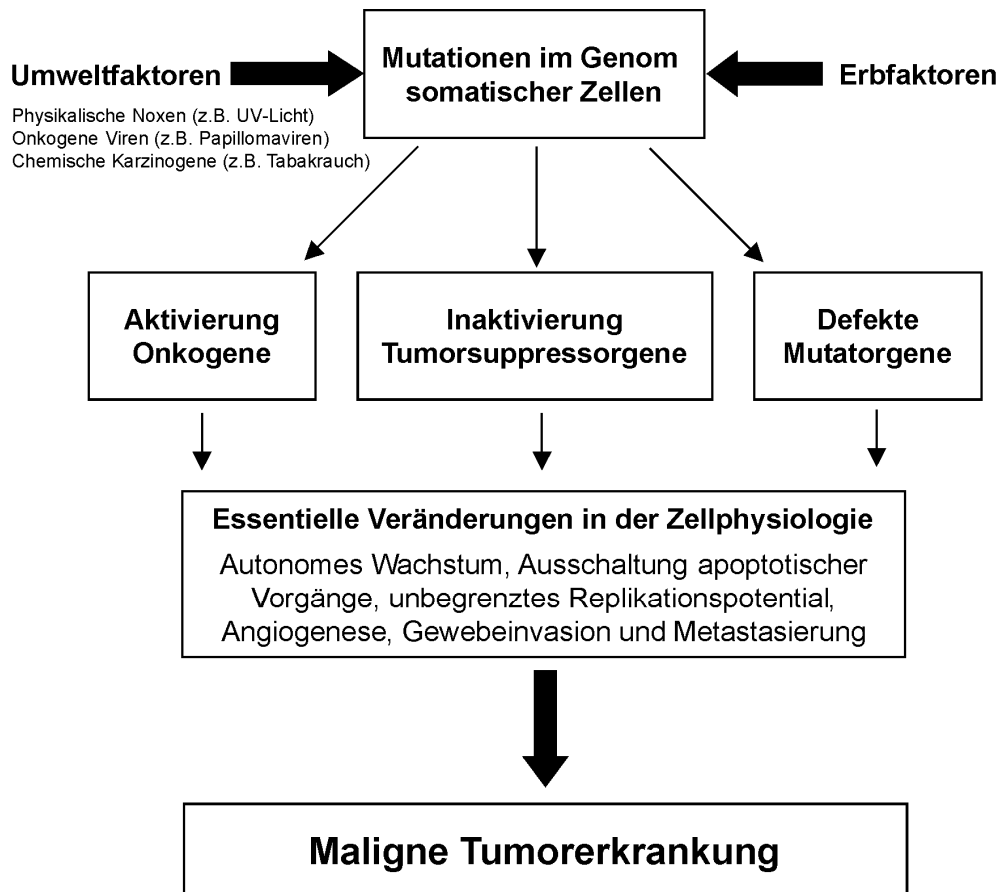


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Tumorgenese, modifiziert nach^[6;14].

Ein zusätzlicher Faktor, der für den Prozess der Tumorgenese diskutiert wird, ist die Expression des Ribonucleoproteins *Telomerase*. Dieses Enzym heftet repetitive DNA-Sequenzen an die Enden der Chromosom-Telomere und verhindert so das durch kontinuierliche Telomerverkürzung induzierte Absterben der Zelle^[5]. Während die Telomerase in Keim- und Stammzellen wie auch in diversen Krebszellen exprimiert wird, ist sie in den meisten differenzierten, somatischen Zelltypen nicht detektierbar^[15]. Eine tumorbezogene Spezifität, auch im Bezug auf den Einsatz als möglicher Biomarker für Malignität sowie als Target für Krebstherapeutika, steht gegenwärtig in der wissenschaftlichen Diskussion^[16-18].

Die meisten der insgesamt 300 Zellarten des menschlichen Körpers können über die beschriebenen Mutationen eine Transformation zur Tumorzelle durchlaufen und so eine der etwa 200 bekannten menschlichen Krebsarten auslösen. Diese lassen sich in zwei Hauptklassen unterteilen. Aus den Zellen des Endo-

oder Ektoderms (Deckgewebe von Haut und Schleimhäuten) gehen die als *Karzinome* charakterisierten Tumoren hervor. Die Klasse der *Sarkome* bilden sich aus Zellen von Stützgewebe und Weichteilen (z.B. Bindegewebe, Knochen, Knorpel, Muskel, Fettgewebe usw.). Eine Sonderform der Sarkomklasse stellt die *Leukämie* dar. Hier kommt es nicht wie bei den meisten anderen malignen Zellen zu einer Ausbildung eines soliden Tumors durch Zusammenschluss von Zellverbänden, sondern zur Transformation einzelner, unabhängiger Krebszellen im Blutkreislauf^[5].

Maligne Krebszellen zeigen im Vergleich zu normalen Zellspezies ein deutlich beschleunigtes invasives Wachstum sowie eine erhöhte Zellteilungsrate. Über das Eindringen in umgebendes Gewebe und das Blut-Lymphgefäßsystem können maligne Tumorzellen in andere Organe und Kompartimente wandern und dort Tochtergeschwülste ausbilden. Dieser Prozess wird als *Metastasierung* bezeichnet. Für die invasiven Eigenschaften von Tumorzellen spielt die *Angiogenese*, also die Befähigung zur Bildung neuer Blutgefäße, die zentrale Rolle^[19]. Die über diesen Prozess sichergestellte Versorgung neu gebildeter Tumorzellen ist Grundvoraussetzung für das autonome Wachstum des Tumors und die Metastasierung in andere Kompartimente^[20]. Die Angiogenese wird über die Bildung von Wachstumsfaktoren reguliert. Tumoren sezernieren hierzu angiogenetische Stimulantien wie den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), den transformierenden Wachstumsfaktor α (TGF α) und den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)^[5]. Die neu gebildeten Blutgefäße der Tumorgenese zeigen stark entartete Strukturen mit exzessiver Verästelung, ungleichmäßigem Durchmesser und allgemein erhöhter, vaskulärer Permeabilität^[20]. Der metastatische Übergang von Tumorzellen in die zirkuläre Blutversorgung wird hierdurch forciert^[19].

Die Ausbildung entarteter Zellen führt nicht zwangsläufig zur Entwicklung einer Krebserkrankung. Neoplasien, die keine invasiven Eigenschaften aufweisen und von geringer Größe sind (z.B. Warzen) werden als benigne (gutartige) Tumoren bezeichnet. Sie sind dem normalen Zelltypus noch in vielen Funktionen ähnlich, über Adhäsionsmoleküle fixiert und in der Regel von einer Bindegewebskapsel umgeben. Sie verbleiben demnach im jeweiligen Gewebe. Ein

ernstes medizinisches Problem benigner Neoplasien ergibt sich nur dann, wenn aufgrund eines erhöhten Platzbedarfs des Tumors periphere Gewebe in Mitleidenschaft gezogen werden, oder eine erhöhte Sekretion biologisch aktiver Substanzen (z.B. Hormone) zu beobachten ist. In beiden Fällen ist der benigne Tumor jedoch über einen chirurgischen Eingriff meist problemlos zu entfernen^[5].

Die pathologische Klassifizierung eines Tumors beruht auf den Grundlagen des sogenannten *TNM-Systems*^[21]. Die T-Kategorie beschreibt die Größe und Ausdehnung des Primärtumors. Von T1 bis T4 steigen Größe und eventuelle Infiltration peripherer Gewebe an. T0 beschreibt den Fall, dass kein Primärtumor diagnostiziert wurde. Die Angabe Tis wird für in situ Tumoren (keine Infiltration der Basalmembran) verwendet. Die Zusätze der N-Kategorie beschreiben Zahl und Lage der vom Tumor befallenen regionalen, also einer bestimmter Körperregion zugehörigen, Lymphknoten. N0 steht analog zur T-Kategorie für den negativen Befund eines Lymphknotenbefalls, N1-N3 für zunehmenden Befall. Über die M-Kategorie wird eine Metastasierung des Primärtumors angegeben. Prinzipiell wird nur zwischen der Abwesenheit (M0) und der Anwesenheit (M1) von Metastasen unterschieden. Eine zusätzliche Angabe der Lage der Metastasen kann optional erfolgen.

Neben den TNM-Hauptparametern kann abhängig von der jeweiligen Erkrankung die Charakterisierung in weitere Kategorien erfolgen. Das G-Kürzel steht für „Grading“. Er gibt den Grad der Tumordifferenzierung an und beschreibt den Umfang der Veränderungen des Tumorgewebes im Vergleich zum normalen Gewebe. Die Klassen reichen von G1 (gut differenzierbar) über G2-G4 (wenig oder undifferenziert). Die R-Klassifizierung erfasst den Grad eines Residualtumors nach operativer Behandlung (R0: keine Resttumor, R1 und R2: Resttumor unterschiedlichen Ausmaßes). Weiterhin bestehen die Parameter der L- (= Lymphgefäßinvasion) und der V- (= Veneninvasion)-Klassifizierung. Abhängig von der Art der Krebserkrankung erfolgen weitere, spezifische Einteilungen. Wie alle medizinischen Klassifizierungssysteme unterliegt auch das TNM-System einer kontinuierlichen Aktualisierung^[22], durchgeführt und veröffentlicht durch die Internationale Vereinigung gegen Krebs (Union Internationale contre le Cancer, UICC).

1.3 Tumormarker

Entscheidend für die Heilungschancen von Tumorerkrankung ist deren frühzeitige Erkennung und Diagnose. Wichtiger Bestandteil des hierzu angewandten klinischen Konzepts ist die Bestimmung sogenannter *Tumormarker*. Unter diesem Begriff werden allgemein alle in Körperflüssigkeiten zirkulierende bzw. in oder auf Tumorzellen exprimierte, nachweis- oder messbaren Substanzen zusammengefasst, die auf einen Tumor hinweisen oder zu seiner Charakterisierung und Messung seiner Ausbreitung und dem Ansprechen auf verschiedene Therapieformen beitragen können^[23].

1.3.1 Tumormarkerklassen

Die Klasse der Tumormarker (TM) lässt sich grundsätzlich in verschiedene Untergruppen einteilen. Neben den morphologischen, immunohistochemischen Oberflächenmarkern und den Markern genetischer Anomalien finden insbesondere die zirkulierenden oder humoralen Tumormarker breite Anwendung^[24]. Zu Letzteren zählen Substanzen von Protein-, Lipid-, Glykolipid- oder Kohlenhydratcharakter sowie differenzierbare Epitope (Teil eines großen Antigenmoleküls, der sich an Antikörper bindet), die in oder auf Tumorzellen oder in ihrer Umgebung gebildet werden und als zirkulierende Antigene in Körperflüssigkeiten wie Serum, Aszites oder Pleuraexsudat übergehen^[23]. Einen Überblick über die derzeit gängigsten Markersubstanzen dieser Klasse gibt Tab. 1. Der Nachweis zirkulierender Tumormarker erfolgt mit verschiedenen analytischen Verfahren wie Radioimmunoassays, immunoradiometrische Assays, Enzymimmunoassays sowie Fluoreszenz- und Lumineszenzimmunoassays^[24].

Tabelle 1: Diagnostisch bedeutsame, zirkulierende Tumormarker, modifiziert nach^[23].

TM	Indikation	Biochemie
CEA	Kolorektales Karzinom, Mammakarzinom	Glykoprotein, 180 kD, Kohlenhydratanteil 45–60%
AFP	Hodentumoren, Leberzellkarzinom	Glykoprotein, 70 kD, Kohlenhydratanteil 4%
CA 125	Ovarialkarzinom	Glykoprotein, 200 kD, Kohlenhydratanteil 25%, mab OC 125
CA 19-9	Pankreaskarzinom, Gallenwegskarzinom	Glykolipid, 36 kD, Hapten der Lewis-a-Blutgruppenderminante
CA 72-4	Magenkarzinom, Ovarialkarzinom	Mucinähnliches Glykoprotein TAG 72, 400 kD
CA 15-3	Mammakarzinom	Glykoprotein der Milchfettmembran-Mucin-Familie, 300 kD
PSA	Prostatakarzinom	Glykoprotein, 33 kD, Kallikreinverwandte Serinprotease
HCG	Keimzellentumoren, Trophoblasttumoren	Glykoproteohormon, 2 Ureinheiten α/β -Kette, 14/24 kD
NSE	Keimzelliges Bronchialkarzinom, neuroendokrine Tumoren	Glykolytisches Enzym, Isoform der Enolase, 87 kD
SCCA	Plattenepithelkarzinom	Glykoprotein, 42 kD, Tumorantigen-4-Isoantigen
CYFRA 21-1	Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	Cytokeratin 19-Fragment, 30 kD

1.3.2 Statistische Kenngrößen der Tumormarkerdiagnostik

Die diagnostische Güte eines Tumormarkers wird in erster Linie durch die klinisch-statistischen Parameter der *Sensitivität* und *Spezifität* definiert.

Die *Sensitivität* oder Empfindlichkeit gibt das Verhältnis richtig prognostizierter Tumorerkrankungen zur Gesamtzahl der tatsächlichen Tumorerkrankungen in einem definierten Testkollektiv an. Für die etablierten Tumormarker ergeben sich im Frühstadium der Erkrankung sehr niedrige Sensitivitätswerte von 10-30%. Diese steigen mit Manifestierung der Krankheit auf 30-50% an, erreichen jedoch erst im disseminierten Stadium der Erkrankung diagnostisch relevante Werte von 70-90%^[23]. Die *Spezifität* ist definiert als Verhältnis richtig zugeordneter Gesunder zur tatsächlichen Gesamtzahl aller Gesunden eines Testkollektivs. Nach internationalen Vereinbarungen ist die entsprechende Referenzgrenze (Schwellenwert, Cut-Off) auf einen Wert von 95% festgelegt. Auf diese Weise stellt man sicher, dass ein positives Testergebnis mit größter Wahrscheinlichkeit einen Tumor bedeutet, erhält aber gleichzeitig auch eine erhöhte

Anzahl an falsch-negativen Ergebnissen. Generell sollten jedoch Sensitivitätsvergleiche zwischen verschiedenen Tumormarkern bei gleicher maligner Erkrankung und festgelegter Spezifität von 95% gegenüber der diagnostisch wichtigeren Gruppe der benignen Erkrankungen erfolgen^[23].

Tumormarker mit 100% Sensitivität (bei Tumoren auch im Frühstadium immer detektierbar) und 100% Spezifität (keine Detektion bei Gesunden und Personen mit benignen Erkrankungen) wie in Abb. 4 in der Idealvorstellung aufgezeigt, existieren bisher nicht^[25]. In der klinischen Realität (Abb. 4) ergeben sich falsch-negative und falsch-positive Befunde in Abhängigkeit vom gewählten Cut-Off (Bsp.: CYFRA 21-1 beim Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom: Sensitivität ~ 50% / Spezifität 95%). Eine Erhöhung der Spezifität geht in der Regel mit einer Verringerung der Sensitivität einher.

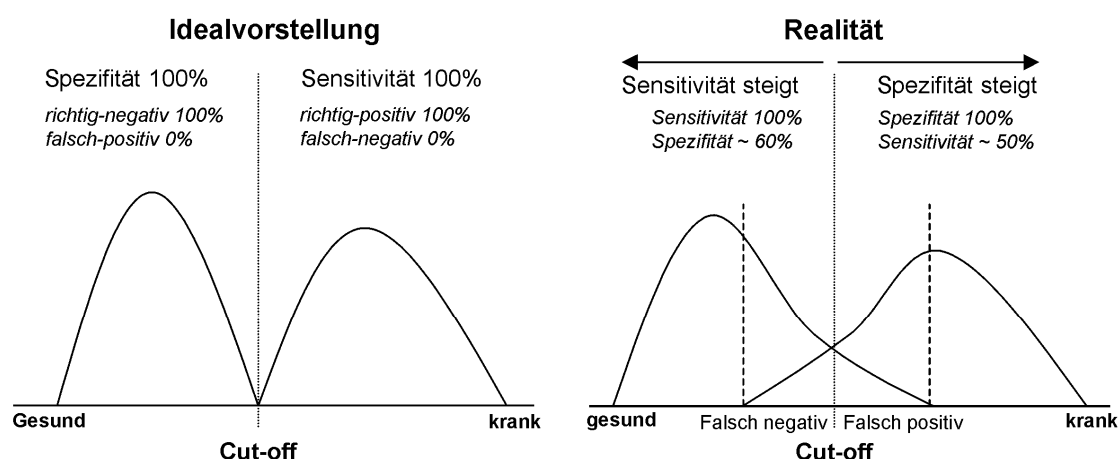


Abbildung 4: Idealvorstellung und Wirklichkeit der statistischen Verteilung der Kenngrößen in der Tumormarkerdiagnostik. Modifiziert nach^[25].

Weitere diagnostisch relevante Parameter sind der *positiv-prädiktive Wert* (PPW, Verhältnis der richtig Testpositiven zu allen Testpositiven) und der *negativ-prädiktive Wert* (NPW, Verhältnis der richtig Testnegativen zu allen Testnegativen). Für das Gesamt-Diskriminanzvermögen eines Tumormarkers kann die *Genauigkeit oder Effizienz* (Verhältnis von richtig Testpositiven und richtig Testnegativen zu allen Testprobanden) bzw. der sogenannte *Youden-Index* (= Sensitivität + Spezifität – 1) angegeben werden.

Für die Evaluierung der Performance eines diagnostischen Tests wird häufig die graphische Darstellungstechnik der Receiver-Operator-Curve genutzt^[26].

Wie in Abb. 5 beispielhaft dargestellt, werden die diagnostischen Parameter der Spezifität und Sensitivität gegeneinander aufgetragen. Jeder der eingezeichneten Punkte entspricht einer bestimmten Einstellung der Klassifizierungsparameter. Je näher sich die generierte Kurve dem linken, oberen Eck annähert, desto geeigneter sind die ausgewählten Testkriterien. Die ROC dient also demnach der Bestimmung von Parametern, die eine optimale Trenngröße für ein gegebenes, klinisches Klassifizierungsproblem darstellen. Hierzu zählen auch der Vergleich und die Evaluierung verschiedener Diagnoseverfahren in variierenden Testsituationen^[27].

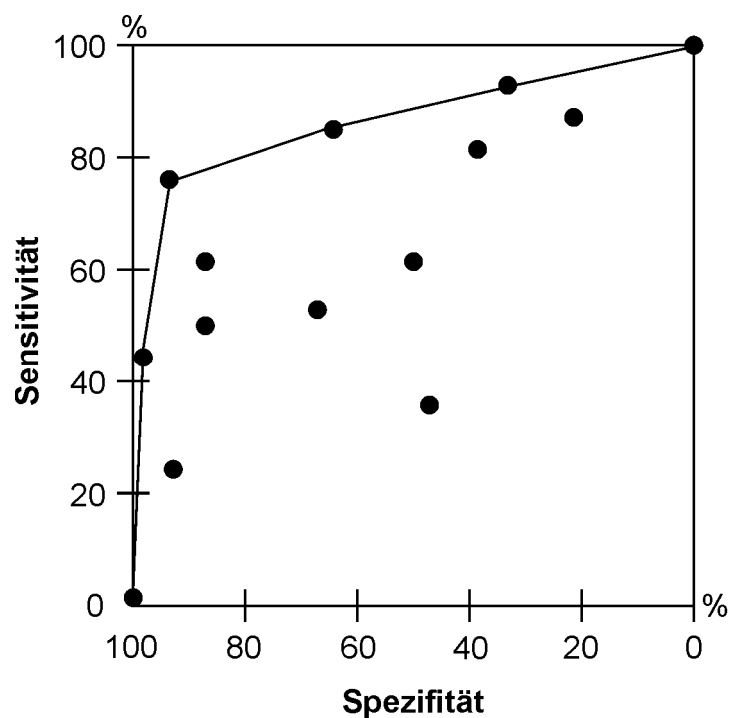


Abbildung 5: Hypothetische, optimale Receiver-Operator-Curve (ROC), modifiziert nach^[26].

1.3.3 Indikationen zur Tumormarkerbestimmung

Die Indikation für die Bestimmung von Tumormarkern gliedert sich nach den verschiedenen Stadien des Krankheitsverlaufes. Die wichtigsten Einsatzgebiete sind:

- Früherkennung (Screening)
- Tumorlokalisation
- Primäre Tumordiagnostik
- Prognose
- Therapieüberwachung (Monitoring)
- Rezidiverkennung^[23]

Für die eigentlich angestrebte Primärindikation des Screenings, also die Früherkennung einer Krebserkrankung bei der Untersuchung asymptomatischer Patienten existieren bis zum jetzigen Zeitpunkt mit Ausnahme des prostata-spezifischen Antigens (PSA) keine geeigneten Tumormarker^[23;24]. Die geringe Prävalenz bestimmter Krebserkrankungen in der Gesamtbevölkerung als auch die unbefriedigende Werte für die klinisch-diagnostischen Parameter der Sensitivität und Spezifität sind als Hauptgründe für diesen Umstand zu nennen. Ein weiteres generelles Problem in der Anwendung bestimmter Tumormarker zum Screening sind Überdiagnose und Übertherapie^[28]. So kommt es bei der Anwendung des bereits angesprochenen PSA auch zur Detektion latenter Krebsfälle, die niemals zum Ausbruch der aggressiven, letalen Krebsform führen würden. Die hierdurch eingeleiteten, eigentlich unnötigen Therapien können zu sekundären, gesundheitlichen Beeinträchtigungen des Patienten führen und belasten darüber hinaus durch die entstehenden Kosten das Gesundheitssystem^[29]. PSA wird gegenwärtig in Verbindung mit einer digitalen, rektalen Untersuchung und je nach Primärdiagnose mit weitergehenden Untersuchungen zum Screening für Prostatakrebs beim Mann ab dem 50. Lebensjahr empfohlen. In derzeit laufenden Studien wird jedoch die klinische Relevanz von PSA als Tumormarker erneut kritisch untersucht^[30]. Im Fall eines Anstiegs der Prävalenz bei Risikogruppen (genetische Disposition, exogene Faktoren, Symptomatik) steigt auch die Bedeutung bestimmter Tumormarker für die Diagnose an^[31].

Für die Tumorlokalisation sind die meisten gängigen Marker unbrauchbar, da im Allgemeinen keine Tumororgan-Spezifität besteht. Ausnahmen sind PSA und PAP beim Prostatakarzinom, Thyreoglobulin beim Schilddrüsenkarzinom und β -HCG bei Keimzelltumoren^[23;24].

Der Beitrag derzeitiger Markersubstanzen bei der Primärdiagnostik wird allgemein als sehr gering eingestuft. Bildgebende und endoskopische Verfahren mit anschließender histologischer Untersuchung von Biopaten stellen in diesem Bereich nach wie vor das Mittel der Wahl dar. Sie werden auch nach der primären Bestimmung eines erhöhten, auf eine Erkrankung hindeutenden Tumormarkerwertes als abschließende Referenzdiagnose herangezogen.

Ein stark expandierendes Einsatzgebiet für Tumormarker ist gegenwärtig die Prognosefindung, also die Einschätzung des erkrankungsfreien Intervalls nach einer kurativen Behandlung. Hierbei wird die bekannte Korrelation zwischen dem gemessenen, prätherapeutischen Basalwert und dem Rezidivrisiko zum prognostizierten Verlauf maligner Erkrankungen, wie z.B. dem Magenkarzinom, Keimzelltumoren und hepatozellulären Karzinomen genutzt^[23].

Das Haupteinsatzgebiet der gängigen Tumormarker ist die Therapie- und Verlaufskontrolle (Monitoring) nach erfolgter Operation sowie nach applizierter Radio-, Chemo- oder Hormontherapie. Eine erstellte Tumormarker-Kinetik, d.h. die serielle Bestimmung in Korrelation mit dem Therapieverlauf, lässt auf das Ansprechen des Patienten auf die jeweilig angewandten Behandlungsmaßnahmen rückschließen. Ein fallender Markerspiegel ($> 50\%$) deutet auf eine erfolgreiche Therapie hin, ein Anstieg ($> 25\%$) auf eine Progression. Ein konstanter bis leicht fallender Wert ($< 25\%$) spricht für eine pathologische Persistenz und therapeutische Resistenz. Zu beachten ist allerdings, dass diese Korrelation in den ersten Tagen einer Radio- und Chemotherapie bzw. nach einer größeren Manipulation am Tumor zu einem diffusen Spiegelanstieg infolge eines Tumorzerfalls kommen kann^[31]. Der Tumormarkerverlauf kann des Weiteren für Entscheidungen über den Fortlauf der Behandlung mit Restaging, adjuvanten Therapien oder Follow-up-Intervallen herangezogen werden^[23].

Auch für die Früherkennung eines möglichen Tumorrezidivs werden häufig Spiegelbestimmungen bestimmter Markerkomponenten durchgeführt. In bis zu 50% der Fälle kann ein Krankheitsrückfall mit einer Vorzeitigkeit von ein bis sechs Monaten im Vergleich zu anderen diagnostischen z.T. invasiven Verfahren, vorausgesagt bzw. eindeutige Hinweise gewonnen werden. So wird z.B. bei einer Kolonkarzinom-Operationen ein Wiederanstieg des CEA-Wertes nach postoperativer Normalisierung als dringender Verdacht auf ein Rezidiv bzw. eine Metastasierung gewertet^[23].

1.3.4 Neue Targets in der Tumormarkerforschung

Aus den zuvor aufgeführten Problemen beim Einsatz etablierter Tumormarker ergibt sich die Notwendigkeit der Suche nach neuartigen Markersubstanzen. Biologische und technologische Fortschritte eröffnen zunehmend neue Möglichkeiten für das Auffinden sowie die Evaluierung und Anwendung neuartiger Biomarker bei Krebserkrankungen^[32]. Durch intensive Erforschung der molekularen Pathogenese konnte eine Reihe neuer, regulatorischer Systemkomponenten identifiziert werden^[33]. Forschungsbereiche wie Genomics (Untersuchung des genetischen Profils eines biologischen Systems), Transcriptomics (Untersuchung des mRNA-Transkriptprofils), Proteomics (Analyse des Proteinmusters), Bioinformatik und Nanotechnologie sowie deren Kombination kommen hierbei zum Einsatz^[33;34]. Die im Folgenden aufgeführten, neuartigen Targets und deren mögliche Verwendung zu Screening und Diagnostik befinden sich gegenwärtig in der wissenschaftlichen Diskussion. Eine direkte klinische Anwendung wird bisher nicht beschrieben, da die eingesetzten Techniken zum jetzigen Zeitpunkt nur unzureichende Reproduzierbarkeit und Robustheit aufweisen^[35].

1.3.4.1 Genomics

Eine Reihe neuartiger, genetischer Komponenten konnte für einen möglichen Einsatz als Tumormarker identifiziert werden.

Hierzu zählt das tumorassoziierte Phänomen der *microsatellite instability (MSI)*. Microsatellites sind repetitive DNA-Sequenzen, die stark polymorphe Ausprä-

gung (Sequenzlänge) in der menschlichen Bevölkerung aufweisen. Diese eigentlich stabilen Nucleotideinheiten können durch defekte DNA-Reparatursysteme und Fehler beim proof-reading durch Exonucleasen mutieren, d.h. es kommt zunehmend zu Veränderungen in der Länge der sich wiederholenden Sequenzen^[34;36]. Es resultiert eine erhöhtes Risiko für eine Krebserkrankung. MSI wurde bei verschiedenen Krebsarten wie z.B. Kolonkarzinom^[37], Mammakarzinom^[38] und Blasenkarzinom^[39] detektiert.

Die *Single-nucleotide polymorphisms (SNPs)* gehören zu den häufigsten genetischen Variationen. Es handelt sich um einzelne Basensubstitutionen die unregelmäßig über das gesamte Genom verteilt sind und eine vererbare Prädisposition für Tumorerkrankungen hervorrufen können^[34;40]. SNPs werden im Zusammenhang mit dem Verlust der Heterozygotität, d.h. der Mutation beider Allele von Tumorsuppressorgenen und der dadurch induzierten Ausbildung von Bronchialkarzinomen genannt^[41]. Neuartige SNPs wurden im Gen für die regulative Untereinheit 3 der Protein Phosphatase 1 in Gewebeproben von Kolonkarzinom- und Leberkarzinompatienten gefunden^[42].

DNA-Hypermethylierungen und *Chromatin-Modifikationen* werden infolge epigenetischer Veränderungen beobachtet^[43]. Hierbei handelt es sich um Mutationen in der Genexpression, die nicht auf Veränderungen in der DNA-Nucleotidsequenz beruhen^[44]. Der Prozess der Methylierung basiert auf der kovalenten Addition einer Methylfunktion von S-Adenosylmethionin (SAM) auf die 5-Position des Pyrimidinrings von Cytosin in CpG-Motiven. In Tumorzellen kommt es zu Hypermethylierungen an Stellen (sogenannten CpG-Inseln), welche normalerweise vor dem Methylierungsprozess geschützt sind^[34]. Über diese Prozesse können Tumorsuppressorgene inaktiviert und Onkogene aktiviert werden. DNA-Methylierungsmarker können potentiell in der Krebsdiagnose sowohl für die Primärdetektion als auch für die Klassifizierung eingesetzt werden. Die Detektion kann abhängig von der jeweiligen Krebsart in verschiedenen biologischen Matrices wie Sputum, Magensaft, Blut, Urin und Stuhl erfolgen^[43]. Als aktuelle Beispiele sind hypermethylierte ESR1, APC, HSD17B4, H1C1 und RASSF1A Gene in Serum-DNA von Mammakarzinompatientinnen^[45] und der

Nachweis der SFRP2-Gen-Methylierung im Stuhl von Kolonkarzinompatienten^[46] zu nennen.

Für die Analytik genetischer, tumorassoziierter Defekte stehen im Rahmen der Genomics / Transcriptomics-Forschung eine Reihe neuartiger Technologien zur Verfügung. Neben etablierten Verfahren wie PCR und Northern Blot ergeben sich durch cDNA und Oligonucleotid Chip-Microarrays sowie SAGE (seriell analysis of gene expression) neue analytische Möglichkeiten, die insbesondere dem „high-throughput“-Prinzip Rechnung tragen^[33]. Die Genchip-Technik vergleicht Genexpressionsprofile und deren Varianzen zwischen verschiedenen biologischen Systemen (z.B. Tumorzellen / gesunde Zellen). Häufig müssen die enormen Datenmengen über die Anwendung mathematischer Algorithmen ausgewertet werden^[47]. Bei der SAGE-Analyse wird im untersuchten Expressionsprofil neben der Identifizierung exprimierter Gene auch deren quantitativer Expressionslevel bestimmt. Zelluläre mRNA wird über eine Reverse-Transkriptase in cDNA konvertiert. Jede cDNA hat ein unikales Tag (10-11 Bp), welches zur Identifizierung einzelner Transkripte eingesetzt werden kann. Die quantitative Auswertung erfolgt über die Proportionalität der Tag-Konzentration zur entsprechenden mRNA-Konzentration^[34]. Charakteristische Unterschiede in Expressionsprofilen wurden unter anderem beim Magenkarzinom^[48] und beim Prostatakarzinom^[49] gefunden.

1.3.4.2 Proteomics

Auf dem Proteinlevel vollziehen sich infolge einer malignen Transformation charakteristische Modifikationen im Zellstoffwechsel, die die Grundlagen für die Proteomics-Forschung im Bereich der Krebserkrankungen bilden. Hierzu zählen verändertes Expressionsverhalten, molekulare Proteinmodifikationen (z.B. posttranslationale Phosphorylierung und Glykosylierung), Aktivitätsänderungen und aberrierende Lokalisationen^[50].

Lim et al. konnten drei Proteine (Vimentin, hsp70 und Actin) nachweisen, die ausschließlich im Falle des Mammakarzinoms posttranslationale Hyperphosphorylierungen an Tyrosinresten aufwiesen^[51]. *Zhao et al.* identifizierten aus dem Serum von Pankreaskarzinompatienten Proteinkomponenten mit

charakteristischen Glykosylierungsstellen^[52]. Neben den etablierten Verfahren der Gelelektrophorese gewinnt die Massenspektrometrie mit Techniken wie MALDI-TOF, Tandem-Massenspektrometrie und Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization (SELDI-TOF) zunehmend an Bedeutung^[53]. Das Prinzip von SELDI-TOF beruht auf der Retardierung der Proteine aus komplexen biologischen Proben auf oberflächenaktivierten Chips mit anschließender TOF-MS-Detektion. Hierzu steht eine Reihe verschiedener Oberflächen zur Verfügung, die eine selektive Isolierung aufgrund hydrophober, hydrophiler, ionischer, Antikörper-Antigen, Rezeptor-Ligand und anderer Wechselwirkungen zulässt^[54]. Über die generierten Proteinprofile konnten potentielle Biomarker beim Prostatakarzinom^[55], Blasenkarzinom^[56] und Mammakarzinom^[57] gefunden werden.

1.4 Metabolomics, Metabonomics und Metabolic Profiling

Neben der Untersuchung des genomischen Profils (Genomics) und des exprimierten Proteinmusters (Proteomics) rücken zunehmend auch die Bestandteile des Metaboloms, also die Stoffwechsel-Endprodukte eines biologischen Systems, in den Fokus der klinischen Forschung^[58;59]. Wie in Abb. 6 zu sehen ist, stellen die Metaboliten die finale Ebene im systembiologischen Konzept der sogenannten „Omics“-Wissenschaften dar. Sie reflektieren die integrative Funktion verschiedenster regulatoriver Zellprozesse und definieren den Phenotyp einer Zelle als Antwort auf genetische und umweltbedingte Veränderungen^[60].

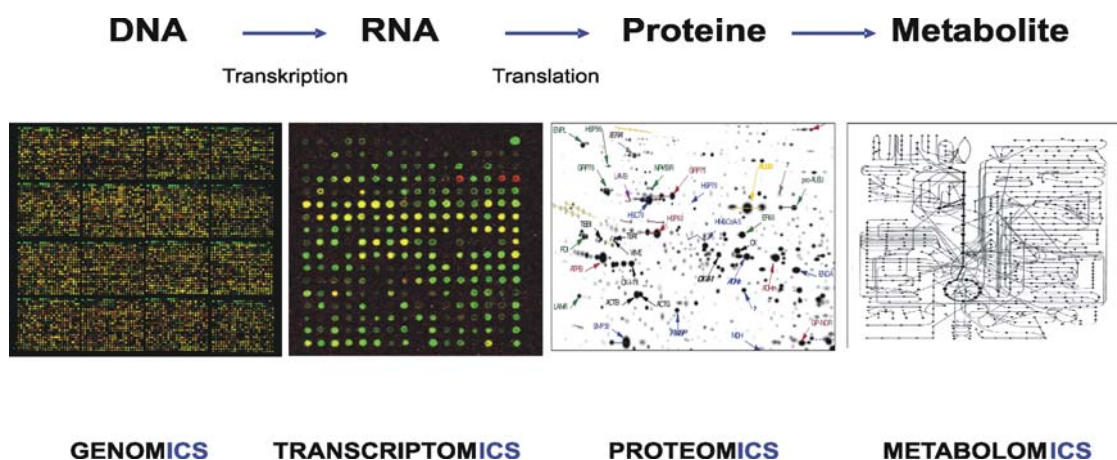


Abbildung 6: Einteilung der „Omics“-Wissenschaften im Kontext der Systembiologie.

1.4.1 Begriffsdefinitionen

Der Begriff *Metabolom* wurde von *Oliver et al.* im Jahr 1998 eingeführt^[61]. Das Metabolom ist definiert als Gesamtheit aller Komponenten (Metaboliten) geringen Molekulargewichtes (< 1000 Da), die in einer Zelle oder einem Organismus gebildet werden und an regulativen Stoffwechselfvorgängen beteiligt sind^[60;62]. Für die Analytik des Metaboloms werden verschiedene Begriffsdefinitionen verwendet, welche im Folgenden näher erläutert werden sollen. Der Begriff *Metabolomics* ist definiert als möglichst vollständige Identifizierung und Quantifizierung aller Metaboliten eines biologischen Systems (z.B.: Bakterien, Pflanzen, Säugetiere). Unter *Metabonomics* versteht man die quantitative Erfassung (meist mittels NMR-Spektroskopie) dynamischer, multiparametrischer Stoffwechselreaktionen eines biologischen Systems auf pathophysiologische Stimuli oder genetische Modifikationen^[63]. Beide zuvor angeführten Ansätze stellen in der Praxis aufgrund der erheblichen physikalischen und chemischen Variabilität der verschiedenen Metabolitenklassen und den damit verbundenen Anforderungen an Probenaufarbeitung und Analytik große Herausforderungen dar^[62]. Eine praktikablere Variante der Metabolomics wird unter dem Begriff *Metabolic Profiling* zusammengefasst. Hierbei wird mit einer spezifischen analytischen Methode ein vordefiniertes Set an Metaboliten aus festgelegten Stoffwechselwegen identifiziert und quantifiziert^[62;64].

Das Metabolic-Profiling-Konzept wurde bereits bei unterschiedlichsten Fragestellungen wie der Aufklärung pflanzlicher Stoffwechselfvorgänge^[65;66], der Medikamentenentwicklung^[67-69] sowie zur Untersuchung verschiedener Krankheiten wie Myokardialerkrankungen^[70;71], Diabetes^[72] und Krebs^[73;74] eingesetzt. Neben der NMR-Spektroskopie^[75-77] kommt insbesondere die Massenspektrometrie als analytische Technik zum Einsatz^[53;60;78]. Im klinischen Bereich werden Stoffwechselstörungen verschiedener Metabolitenklassen wie organischer Säuren, Aminosäuren, Fettsäuren und Hormone mit LC-MS und GC-MS routinemäßig in biologischen Flüssigkeiten wie Urin, Blut und Cerebrospinalflüssigkeit untersucht^[79]. GC-MS-Analytik ist generell auf verdampfbare bzw. derivatisierbare Substanzen im unteren Molekulargewichtsbereich limitiert. Die Entwicklung massenspektrometrischer Techniken mit Möglichkeit zur LC-Kopplung

(z.B.: ESI-MS) war für erweiterte Applikationsbereiche wie stark hydrophile Metaboliten und labile Makromoleküle von entscheidender Bedeutung^[79]. Deutlich geringere Anforderungen an die Probenaufbereitung und damit verbundene, höhere Durchsatzraten erlauben die Anwendung zu Monitoringzwecken. So wird über Direktinjektion in ein ESI-MS/MS-System ohne vorherige chromatographische Trennung eine quantitative Bestimmung von Phenylalanin und Tyrosin in Blutropfen zum Screening von Neugeborenen auf Phenylketonurie (PKU) eingesetzt^[80].

Auch bei Krebserkrankungen kommt es im Verlauf der Tumorprogression zu charakteristischen Stoffwechselstörungen und damit verbundenen Veränderungen im metabolischen Profil. Potentielle Biomarker-Zielstrukturen für einen Metabolic-Profiling-Ansatz bei Tumorerkrankungen sind die Komponenten des zellulären RNA-Metabolismus. Diese wurden in der durchgeführten Arbeit als zentrale Stoffklasse analysiert.

1.4.2 Ribonucleinsäuren und modifizierte Nucleoside

1.4.2.1 Ribonucleinsäuren

Unter der Stoffklasse der Ribonucleinsäuren (RNS, engl. RNA) fasst man einzelsträngige Polymere zusammen, die aus verknüpften Ribonucleotiden aufgebaut sind. Die einzelnen Bausteine bestehen aus einer Zuckerkomponente (Ribose), die über eine N-glykosidische Bindung an eine sogenannte Nucleinbase gebunden ist. Über 3',5'-Phosphatbrücken erfolgt die Polymerisierung zum Makromolekül. Generell finden sich in RNA-Molekülen vier Basenstrukturen, die Pyrimidine Cytosin und Uracil sowie die Purine Adenin und Guanin, in variierender Abfolge. In Verknüpfung mit der Riboseeinheit spricht man von den Nucleosiden Cytidin, Uridin, Adenosin und Guanosin. Die entsprechenden monophosphorylierten Analoga werden als Nucleotide bezeichnet (vgl. Abb.7).

RNA-Moleküle werden nach chemischer Struktur und Funktionalität in verschiedene Spezies unterteilt. Die *Messenger RNA (mRNA)* kopiert im Transkriptionsprozess die genetische Information der DNA. Die übernommene Basensequenz wird im Translationsvorgang nach den Grundlagen des genetischen

Codes zur Reihenfolge der Aminosäuren in den gebildeten Proteinen umgesetzt^[5]. Die Abfolge von drei aufeinanderfolgenden Basen (Triplet) in 5'→3'-Richtung entspricht hierbei einer Informationseinheit, dem sogenannten Codon.

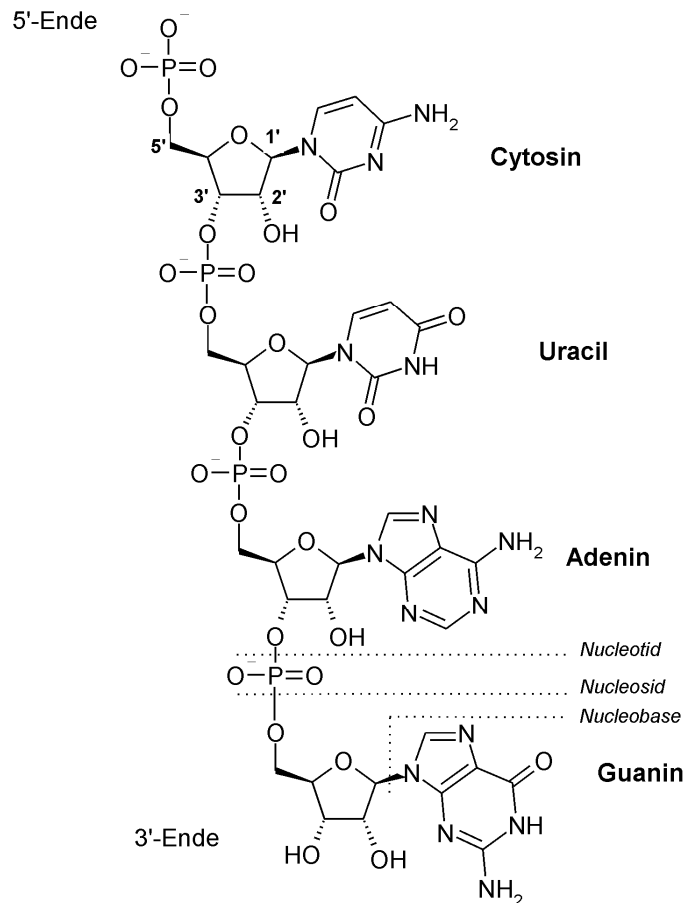


Abbildung 7: Prinzipieller Aufbau der RNA, Abfolge der gezeigten Nucleobasen willkürlich.

Die *ribosomale RNA (rRNA)* bildet als strukturelle und funktionelle Komponente zusammen mit einer Vielzahl an Proteinen die Ribosomen, an denen die Biosynthese der Proteine (Translation) stattfindet. Durch die Bindung der mRNA an die Ribosomeneinheiten wird das Anfügen einzelner Aminosäuren an die wachsenden Proteinketten katalysiert. Die Ribosomen bestehen generell aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, welche wiederum aus unterschiedlich langen rRNA-Molekülen und diversen Proteinen zusammengesetzt sind. Die Einteilung erfolgt nach dem sogenannten Sedimentationskoeffizienten in der Svedberg-Einheit [S], mit welcher die Sedimentationsgeschwindigkeit suspendierter Teilchen in einer standardisierten Zentrifugation angegeben wird. Die große 60S Ribosomenuntereinheit bei Eukaryonten setzt sich beispielsweise

aus einer großen 28S rRNA (4800 Basen), zwei kleineren rRNAs mit 5,8S (160 Basen) und 5S (120 Basen) sowie einer Vielzahl verschiedener Proteine zusammen.

Die *Transfer RNA (tRNA)* ist aus etwa 70-80 Nucleotideinheiten aufgebaut. Durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Uracil bzw. Guanin und Cytosin kommt es zur Ausbildung der charakteristischen Kleeblattstruktur. Die tRNA entziffert bei der Translation den mRNA-Code. Über komplementäre *Watson-Crick-Basenpaarungen (A/U, C/G)* wird hierbei das von der mRNA definierte Codon über das entsprechenden Anticodon der tRNA abgelesen und so die jeweilige Aminosäure auf die wachsende Polypeptidkette übertragen. Für jede der zwanzig natürlich in Proteinen vorkommenden Aminosäuren existiert jeweils mindestens eine zugehörige tRNA. Im aktiven Aminoacyl-tRNA-Molekül ist die zugehörige Aminosäure an den sogenannten 3'-Akzeptorarm des Polynucleotids gebunden. Über die Bindung von mRNA sowie der verschiedenen Aminoacyl-tRNAs an das Ribosom wird die Effizienz des Translationsvorgangs erheblich verstärkt. Bei der Proteinbiosynthese können so drei bis fünf Aminosäuren pro Sekunde an die wachsende Polypeptidkette angefügt werden^[5].

Neben den vorgestellten, am Translationsprozess beteiligten RNA-Arten sind weitere Vertreter der Klasse der sogenannten non-coding RNAs bekannt. Dies sind alle RNA-Arten, die nach der Transkription nicht in Proteine translatiert werden, sondern anderweitige Funktionen erfüllen. Definitionsgemäß werden alle RNA-Spezies außer mRNA unter dieser Bezeichnung zusammengefasst, also auch tRNA und rRNA^[81]. Als wichtigste Vertreter seien an dieser Stelle die snRNA, die snoRNA und die miRNA genannt.

Unter dem Begriff *small nuclear RNA (snRNA)* versteht man katalytisch aktive, stabile RNA-Moleküle des Zellkerns, die posttranskriptional aus größeren Precursor-Molekülen gebildet werden^[82]. Uridinreiche snRNAs mit einer Länge von 107 bis 210 Nucleotiden assoziieren mit Proteinkomponenten und bilden Zellkern-Ribonucleoproteinpartikel, die sogenannten snRNPs. Diese spielen eine entscheidende Rolle beim sogenannten pre-mRNA-Spleißen. Hierbei wird

aus dem inaktiven mRNA-Primärtranskript über Umesterungsreaktionen das Intron entfernt und durch anschließendes Zusammenfügen der beiden entstandenen Exons die reife, biologisch aktive mRNA gebildet^[5;83].

Die Gruppe der *small nucleolar RNA (snoRNA)* setzt sich aus katalytisch aktiven, im Nucleolus lokalisierten RNA-Molekülen zusammen, die analog zu den snRNAs an Proteine binden. Die resultierenden Nucleolus-Riboproteinpartikel (snoRNPs) sind an der Spaltung der pre-tRNA, der Formation der korrekten pre-rRNA-Struktur sowie an der Festlegung spezifischer Modifikationsstellen (u.a. Pseudouridin, 2'-O-Methylierung) in der pre-rRNA beteiligt^[84].

Micro RNAs (miRNA) sind kurze Polynucleotidmoleküle (in der aktiven Form 21-24 Nucleotide), welche die Genexpression posttranskriptional über Basenpaarung mit mRNA-Molekülen regulieren können^[81;85]. Auf diese Weise greifen miRNAs in wichtige zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose ein^[86]. Seit der Entdeckung im Jahr 1993^[87] wurden knapp 3000 miRNA-Spezies gefunden. Es ergaben sich direkte Zusammenhänge zwischen miRNA-Expression und dem Auftreten diverser Krankheiten. So ist beispielsweise über die Hälfte der humanen miRNA-Gene in Bereichen lokalisiert, die bekanntermaßen an der Entstehung und Entwicklung von Krebserkrankungen beteiligt sind^[88]. Es wurde gezeigt, dass miRNA-Expressionsprofile deutliche, krankheitsbedingte Modifikationen aufweisen, welche sich vermutlich direkt auf den Zellzyklus und apoptotische Vorgänge auswirken^[89]. Das veränderte Expressionsmuster wird gegenwärtig für die Anwendung als Biomarker bei verschiedensten Tumorerkrankungen diskutiert^[90-92].

1.4.2.2 Modifizierte Nucleoside

Neben den erwähnten regulären Ribonucleosiden A, C, G und U, enthalten RNA-Moleküle grundsätzlich eine Reihe strukturell veränderter Nucleosidstrukturen, die sogenannten modifizierten Nucleoside. Diese werden posttranskriptional über spezifische, modifizierende Enzymsysteme im Polynucleotidmolekül gebildet. Die Ausprägung der Modifikation gestaltet sich sehr variantenreich und erstreckt sich von einfachen Methylierungen, Hydroxylierungen und Acetylierungen, über Isomerisierungen und Thiolierungen bishin zu Additionsreaktionen

komplexer Seitenketten in hypermodifizierten Nucleosiden (vgl. Kap. 6). Die Einführung von Modifikationen im RNA-Makromolekül erfolgt in der Regel mit hoher Ortsspezifität, wobei bestimmte Enzymsysteme wie die Pseudouridinsynthase in *E.Coli* bzw. Hefe auch Reaktionen an verschiedenen Positionen sowie unterschiedlichen RNA-Spezies katalysieren können^[93].

In der RNA Modification Database^[94], welche alle bislang identifizierten, modifizierten Nucleoside auflistet, sind gegenwärtig 107 Strukturen eingetragen. Die größte Anzahl und strukturelle Vielfalt finden sich, wie in Tab. 2 zu sehen, in den verschiedenen tRNA-Spezies. Diese sind bis heute auch in Bezug auf die biochemischen Hintergründe der Modifikationen am intensivsten untersucht.

Tabelle 2: Verteilung von modifizierten Nucleosiden nach RNA-Spezies und Phylogenetik.

	Anzahl bekannter Nucleosidstrukturen
<i>Verteilung nach RNA-Spezies</i>	
tRNA	90
rRNA	30
mRNA	15
snRNA	10
<i>Phylogenetische Verteilung</i>	
Archaeobakterien	64
Bakterien	51
Eukaryonten	42

Für die generelle Funktion der tRNA ist die Einführung modifizierter Nucleoside nicht essentiell, sie spielt jedoch eine entscheidende Rolle für die Aktivitäts- und Effizienzsteigerung^[95]. Konkrete Auswirkungen ergeben sich für die Spezifität und Kapazität der Basenpaarung durch Einführung von modifizierten Nucleosiden in der Wobble-Position (5'-Position 34) des tRNA-Anticodons. Als wahrscheinliche Ursachen werden die Beeinflussungen der Konformations-Rigidität der entsprechenden Base und ihrer Befähigung zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur 3'-Base des Codons angenommen. Auf diese Weise kommt es zu erweiterten oder eingeschränkten Decodierungskapazitäten. Ersteres ist beispielsweise bei Inosin (Basenpaarung mit A, C, U) und 5-

Carboxymethoxyuridin (A, G, U) der Fall, letzteres bei N⁴-Acetylcytidin (G) und 5-Methylaminomethyl-2-thiouridine (A)^[96]. Auf Position 37 der 3'-Seite von tRNA-Molekülen mit A / U-reichen Anticodons finden sich häufig hypermodifizierte Nucleosidstrukturen. Diese verstärken die Wechselwirkungen zwischen Codon und Anticodon und kompensieren so die grundsätzlich schwächere AU-Bindung^[97]. Des Weiteren werden durch die Anwesenheit modifizierter Strukturen wie m¹G an Position 37 unzulässige Basenpaarungen vermieden und somit die Einhaltung des korrekten Leserasters gewährleistet. So resultiert das Fehlen der G37-Methylmodifikation in der *S. typhimurium*-Mutante *trmD3* in einem a+1 frameshift in der Basenpaarung der tRNA^{Pro} mit irregulärer Basenpaarung an den Positionen 35, 36, 37 statt 34, 35, 36^[96]. Modifikationen an Positionen außerhalb der Anticodon-Region dienen vermutlich der Stabilisierung der tRNA-Struktur^[95].

Über die Rolle modifizierter Nucleoside in anderen RNA-Spezies ist gegenwärtig weit weniger bekannt als bei der tRNA. Die Besetzung spezifischer Stellen in rRNA-Molekülen mit ψ -Resten wurde als möglicher, entscheidender Faktor für das hydrophile / hydrophobe Oberflächenmuster von Ribosomen diskutiert. Die resultierenden Wechselwirkungen bestimmen die Interaktion von rRNA und tRNA im Translationsprozess^[98]. Der Einbau an spezifische Stellen der großen pre-rRNA wird außerdem im Zusammenhang mit der Signalisierung spezifischer Spaltstellen in der rRNA-Prozessierung und der Stabilisierung von Sekundär- und Tertiärstruktur vermutet^[99].

Neben selektiven Desaminierungen von Adenin- und Cytosinresten zu den entsprechenden Hypoxanthin- und Uracilderivaten sind nucleosidspezifische Modifizierungen in mRNA auf enzymatische Methylierungen an Base oder Zuckereinheit begrenzt. Über die biologische Funktion ist bis heute nur wenig bekannt. Generell wird eine Effizienzsteigerung des pre-mRNA-Splicings (entfernen von Intronsequenzen aus dem Polynucleotidmolekül)^[100] sowie der Einfluss auf Transportprozesse der mRNA aus dem Zellkern ins Cytoplasma^[101] angenommen. Am 5'-terminalen Ende der mRNA wird generell eine Methylierung an N-7 der endständigen Guanosineinheit beobachtet. Die zwei nachfolgenden, über eine Triphosphatgruppe verbundenen Nucleotideinheiten können

grundsätzlich an der 2'-Position der Zuckereinheit methyliert sein^[102]. Die resultierende m⁷Cap-Struktur beeinflusst die Initialisierung und Effizienz des Translationsvorgangs. Als entscheidender Faktor wird hierbei die stabile positive Ladung im Imidazolsystem des N-7-methylierten Guanosins diskutiert. Durch Wechselwirkung mit den benachbarten Phosphatgruppen wird die Bildung eines Konformers angenommen, welches mit den cap-gebundenen Proteinen effizient interagieren kann^[103].

Die posttranskriptionale Hypermethylierung der 5'-Cap-Struktur von snRNAs (m⁷G → m^{2,2,7}G) wird als essentieller Faktor für intrazellulären Transport angesehen. Es wird angenommen, dass ein spezifischer Rezeptor die Einschleusung der snRNPs in den Zellkern über die Erkennung der intakten Cap-Struktur reguliert^[104]. Intramolekulare Modifikationen wie der Einbau von ψ -Resten, die N⁶-Methylierung von Adenosin sowie 2'-O-Methylierungen werden für die strukturelle Stabilität der Konformation bestimmter Regionen in den snRNA-Molekülen diskutiert^[105].

1.4.2.3 RNA-Metabolismus

Nach Abschluss der Protein-Biosynthese werden die beteiligten RNA-Arten abgebaut (vgl. Abb. 8). Über Nucleasen, Phosphodiesterasen und Phosphatasen wird das Polynucleotidmolekül bis auf die Ebene der Ribonucleoside katabolisiert. Die Purinnucleoside A, G und I werden von den entsprechenden Phosphorylasen zu den freien Basen Adenin, Guanin und Hypoxanthin abgebaut. Abhängig von der jeweiligen Zellart können diese über den sogenannten *Salvage Pathway* wiederverwertet oder als Harnsäure ausgeschieden werden. Die Reutilisierung über die korrespondierenden Mononucleotide verläuft über die zwei hochspezifischen Enzymsysteme Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT) und Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT)^[106]. Eine Phosphoribosylierung von freien Pyrimidinbasen konnte bislang nur im Fall des Uracils beschrieben werden^[107]. Pyrimidinnucleoside können hingegen mit ATP und Kinaseenzymen (Uridin-Cytidinkinase, Thymidinkinase) zu den entsprechenden Mononucleotiden umgesetzt und in den Zellstoffwechsel zurückgeführt werden. Ein Teil der im RNA-Metabolismus anfallenden Nucleoside und Nucleobasen

wird von der Zelle ausgeschieden und weiter katabolisiert. Purinderivate werden als Harnsäure ausgeschieden, bei Pyrimidinverbindungen erfolgt, unter Abspaltung von Ammoniak und Kohlendioxid, der Abbau zu β -Alanin bzw. β -Aminoisobutyrat. Letztere können weiter zu Malonyl-CoA bzw. Methylmalonyl-CoA verstoffwechselt werden^[106].

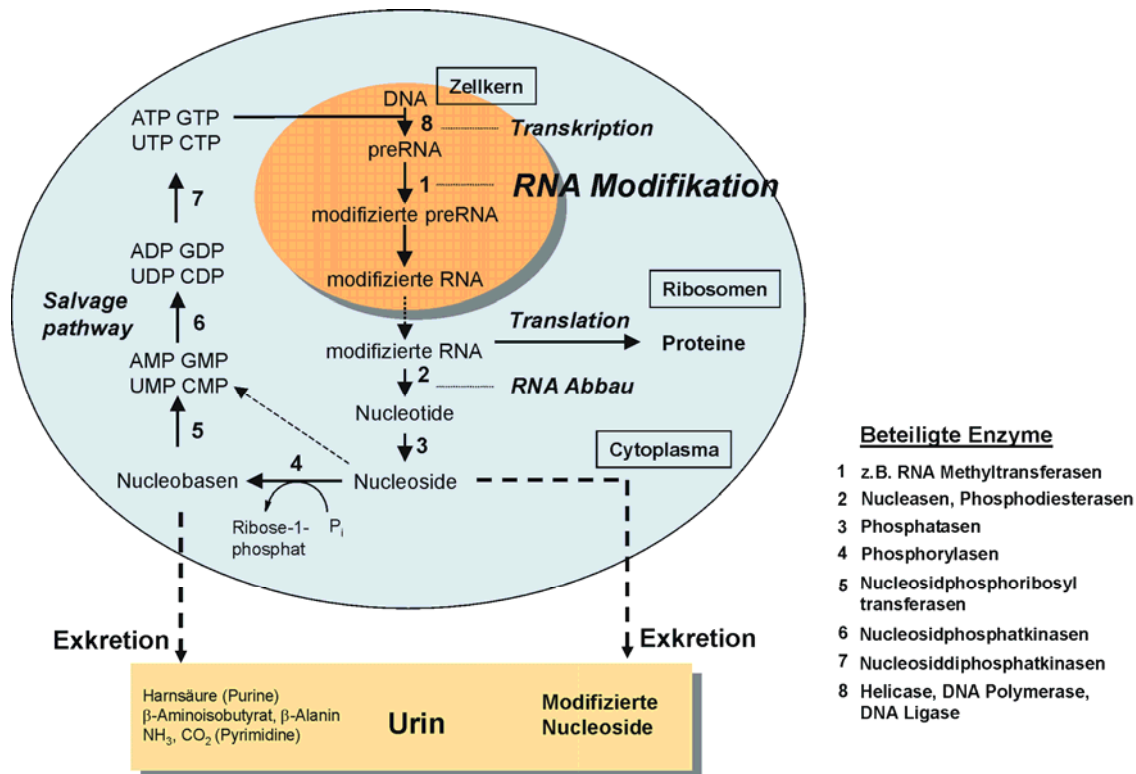


Abbildung 8: Zellulärer RNA-Metabolismus.

Für die beim RNA-Metabolismus anfallenden modifizierten Nucleosidstrukturen existieren keine spezifischen Enzymsysteme für die Wiederverwertung. Folglich werden diese als biochemische Endprodukte aus der Zelle, über die Blutbahn und letztlich im Urin ausgeschieden^[108]. Die Exkretion modifizierter Nucleoside kann somit direkt auf den zellulären RNA-Umsatz bezogen werden^[109]. Intensiviert ablaufende Wachstums- und Entwicklungsprozesse führen im Säuglingsalter zu stark erhöhten Ausscheidungsraten der RNA-Metaboliten, die bis zu einem Alter von 16-18 exponentiell abnehmen^[110]. Bei Erwachsenen bleibt die Exkretion hingegen annähernd konstant und zeigt außerdem keine signifikante Abhängigkeit bezüglich des Geschlechts^[111;112].

Als reguläre Bestandteile des RNA-Metabolismus können ausgeschiedene modifizierte Nucleoside generell in Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin nachgewiesen werden. Bei Erkrankungen, die mit starken metabolischen Funktionsstörungen verbunden sind, kommt es zu auffälligen Veränderungen in der Exkretion der RNA-Metaboliten. Erhöhte Ausscheidungsraten wurden in diesem Zusammenhang unter anderem bei der Rheumatoiden Arthritis^[113], AIDS^[114] und insbesondere bei verschiedenen Krebsarten wie Brustkrebs^[115], Leukämie^[116], Lungenkrebs^[117], malignen Lymphomen^[118], Speiseröhrenkrebs^[119], Gehirntumoren^[120] und Darmkrebs^[121] als neuartige Biomarker diskutiert. Auch die Anwendung zum Monitoring von Krankheitsverlauf und Therapieresponse bei Krebserkrankungen wurde vorgeschlagen^[122-124].

Die tumorassoziierte, vermehrte Bildung und Ausscheidung modifizierter Nucleoside beruht auf vielschichtigen molekularen Veränderungen im RNA-Metabolismus. *Borek et al.* konnten nachweisen, dass der allgemeine tRNA-Umsatz im Tumorgewebe verglichen mit gesundem Gewebe deutlich erhöht ist^[125]. Dies ist auf die invasiven und unkontrollierten Wachstumseigenschaften von Tumorzellen zurückzuführen. Neben dem rein quantitativen Aspekt gesteigerter Metabolismusraten, wurde von Abweichungen im Muster und der Aktivität bestimmter modifizierender Enzymklassen berichtet. In diesem Zusammenhang sind insbesondere Methyltransferasen von Bedeutung. Eine direkte Verknüpfung ergibt sich zwischen der Ausscheidung methylierter Nucleoside und einer veränderten Funktion der korrespondierenden Enzymsysteme bei Tumorerkrankungen. Erhöhte Methyltransferase-Aktivitäten konnten in verschiedenen neoplastischen Geweben nachgewiesen werden^[126-128]. Es wird angenommen, dass die erhöhte Aktivität nicht auf veränderte, zelluläre Enzymkonzentrationen, sondern vielmehr auf Alterationen der Enzymspezifitäten zurückzuführen ist. Diese führt bei Tumorerkrankungen zu Veränderungen der Methylierungsraten im RNA-Substrat sowie Abweichungen in der Gesamtzahl und der Ortsspezifität eingeführter Methylgruppen^[129]. Allgemein wird vermutet, dass infolge der neoplastischen Transformation von Tumorzellen hypermethylierte RNA-Strukturen bevorzugt synthetisiert werden^[130].

1.5 Analytik

1.5.1 Elektrospray-Ionisierung

Allen in dieser Arbeit eingesetzten massenspektrometrischen Techniken liegt das Elektrospray-Ionisierungsprinzip (electrospray ionization = ESI) zugrunde. Dieses von *Dole*^[131] und *Fenn*^[132] entwickelte Verfahren wird insbesondere in der Bioanalytik zur Bestimmung nicht flüchtiger und/oder thermisch labiler Substanzen wie Proteinen, Peptiden, Oligonucleotiden und Arzneistoffen eingesetzt^[133]. Durch den im Vergleich zu anderen Ionisierungsmethoden wie z.B. der Electron Impact (EI) Ionisierung sehr weichen, niedrig-energetischen Ionisierungsprozess, können ungewollte, vorzeitige „in-source“-Fragmentierungsreaktionen an instabilen Molekülen verhindert werden. ESI-Ionisierungsquellen ermöglichen die Kopplung der Flüssigchromatographie an gängige Massenanalysatoren wie Quadrupol-Instrumente, Ionenfallen, Fourier Transformation Ionen Zyklotron Massenspektrometer sowie Flugzeitanalysatoren. Die im flüssigen Medium in das Massenspektrometer eingebrachten Analyten werden hierzu in die Gasphase überführt und gleichzeitig ionisiert, womit die beiden Grundvoraussetzungen für eine massenspektrometrische Detektion erfüllt sind. Eine schematische Darstellung des ESI-Ionisierungsprozesses findet sich in Abb. 9.

Das flüssige Eluat wird bei Atmosphärendruck über eine Stahlkapillare in ein Feld mit starker Potentialdifferenz (kV-Bereich) versprüht. Dieser Prozess wird durch parallel eingeblasenes Verneblungsgas (Stickstoff) forciert. Im elektrischen Feld bildet die Stahlkapillare die eine Elektrode (im Fall des hier beschriebenen positive modes die Anode) und der gegenüberliegende Eingang zum eigentlichen Massenspektrometer die Gegenelektrode (Kathode). Aufgrund des elektrischen Zugs bildet die einströmende Flüssigkeit am Kapillarausgang zunächst die Form eines sogenannten *Taylor-Konus*, welcher letztlich in Form eines Tröpfchens von der Kapillarspitze abgelöst wird. Im Tröpfchen kommt es zu einer Ladungsverteilung.

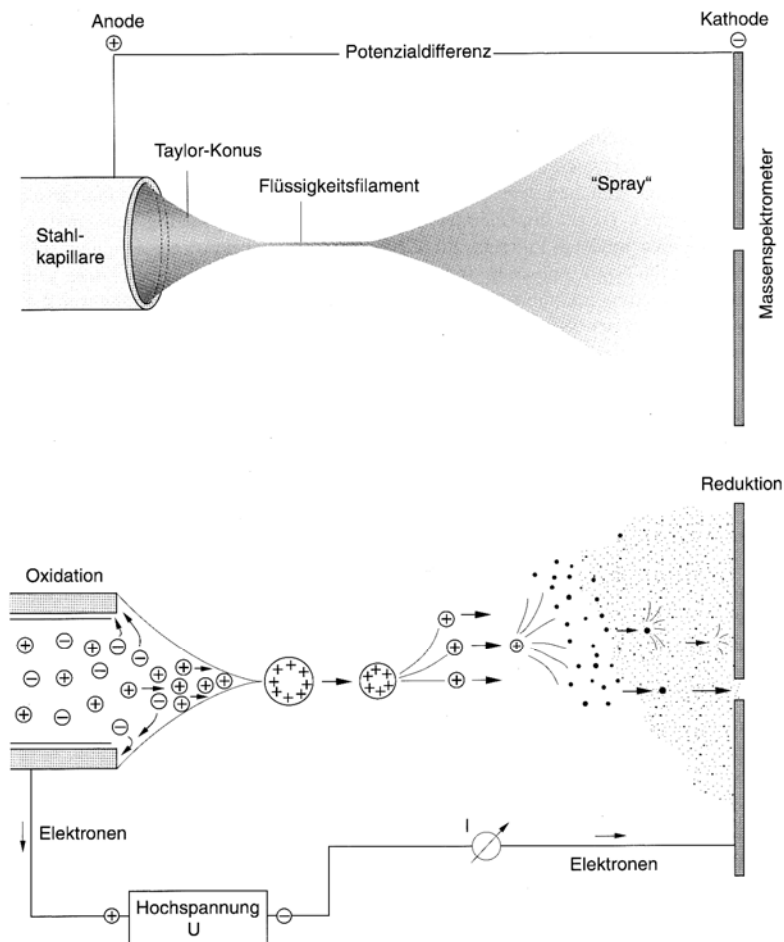


Abbildung 9: Schematischer Ablauf des ESI-Ionisierungsprozesses, nach^[133].

Die enthaltenen Lösungsmittelprotonen wandern an der Oberfläche, die Analytmoleküle ins Innere des Lösungsmitteltropfens. Durch einen aus der MS-Öffnung eingeblasenen heißen Stickstoffstrom (Badegas) verarmen die Tröpfchen zusehends an Lösungsmittel, und die positiven Ladungen werden aufkonzentriert. An dem Punkt, an welchem die gegenseitige Abstoßung der positiven Ladungen im Tröpfchen durch sukzessive Abnahme des Lösungsmittelvolumens größer wird als die Oberflächenspannung (das sog. *Rayleigh-Limit*) kommt es zu spontanen Mikroexplosionen (*Coulombexplosion*). Hierbei zerbricht das Tröpfchen in viele kleinere Tröpfchen. Dieser Vorgang setzt sich kaskadenförmig fort bis die Analytmoleküle schließlich in die Gasphase übergehen. Bei diesem Vorgang werden die Protonen auf funktionelle Gruppen der Analytmoleküle transferiert und führen so zur Ionisierung. Für den beschriebenen Prozess des Phasenübergangs werden zwei Theorien diskutiert: Das *Charge Residue*

Model (CRM) und das *Ion Evaporation Model* (IEM)^[134]. Laut CRM-Modell werden die Gasphasen-Ionen an dem Punkt gebildet, an welchem keine weitere Verdampfung des Lösungsmittels mehr möglich ist. Das IEM-Modell nimmt hingegen eine direkte Emission der Ionen zu einem früheren Zeitpunkt (ab einem Tröpfchenradius von $R \approx 10\text{-}20\text{ nm}$) des Verdampfungsvorgangs an. Abhängig von Molekülgröße und chemischer Struktur entstehen einfach ($< 1000\text{ Da}$) oder mehrfach geladene ($> 1000\text{ Da}$) Quasimolekülionen^[135], welche schließlich in den Hochvakuumbereich des eigentlichen Massenanalysators gelangen. In der vorliegenden Arbeit wurden primär zwei Analysator-Techniken eingesetzt, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.5.2 Ionenfallenmassenspektrometrie

Die heutige Ionenfallenmassenspektrometrie (ion trap mass spectrometry = IT-MS) basiert auf den grundlegenden Arbeiten von *Paul*^[136] aus dem Jahr 1959 und wurde von *Stafford*^[137] im Jahr 1984 für die praktische und kommerzielle Nutzung zugänglich gemacht. Die eigentliche Ionenfalle besteht aus einer hyperbolisch geformten Ringelektrode und zwei seitlich begrenzenden Endkappenelektroden (vgl. Abb. 10). In der Mitte der Endkappen befinden sich konzentrische Öffnungen zum Einlass bzw. Auswurf der Ionen.

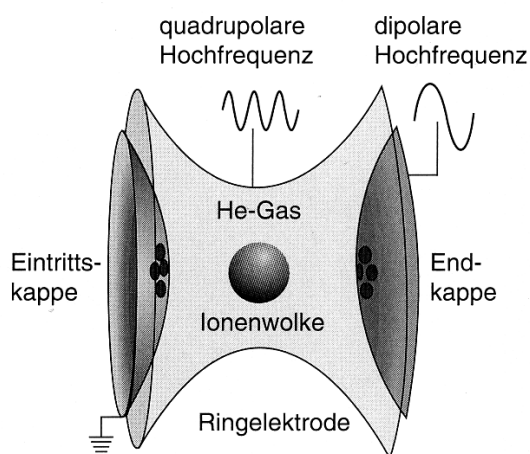


Abbildung 10: Prinzipieller Aufbau einer Ionenfalle nach^[133].

Über die Ringelektrode wird eine hochfrequente Wechselspannung im Radiowellenbereich eingespeist. Die resultierende, oszillierende Potentialdifferenz

zwischen Ringelektrode und den geerdeten Endkappenelektroden (Gleichspannung) baut ein dreidimensionales, periodisches Quadrupolfeld auf. In der Mitte der Falle entsteht so eine feldfreie Potentialmulde. In dieser können, abhängig von den Feldparametern Frequenz und Amplitude, Ionen mit definierten m/z -Verhältnissen auf stabilen, kreisförmigen Bahnen (sog. *Lissajous-Figuren* oder *Trajektorien*) gefangen werden. Die Ionenbewegung in der Ionenfalle kann über den mathematischen Zusammenhang der *Mathieuschen Gleichung* (1) beschrieben werden:

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \quad (1)$$

Hierbei repräsentiert u die Raumkoordinaten x , y und z und ξ einen dimensionslosen Parameter, der äquivalent durch $\Omega t/2$ beschrieben werden kann (Ω = Frequenz, t = Zeit). Die ebenfalls dimensionslosen, mathieuschen Parameter a_u und q_u werden auch als „Trapping Parameter“ bezeichnet. Sie geben die Beziehung zwischen einem Ion mit definiertem m/z und den Eigenschaften der Ionenfalle wie deren Dimensionen sowie Stärke und Frequenz der angelegten elektrostatischen Felder (Wechselspannung V , Gleichspannung U) an^[138]. Die Lösung der Mathieuschen Gleichung kann über zwei Arten von Ionenbewegungen (periodisch / instabil, periodisch / stabil) beschrieben werden und wird graphisch im *Mathieuschen Stabilitätsdiagramm* (vgl. Abb. 11) dargestellt. In diesem wird der Parameter a_u ($\sim U/m$) gegen q_u ($\sim V/m$) aufgetragen. Die Regionen radialer ($r = x, y$) und axialer (z) Stabilität sind grau unterlegt. Sie werden von den periodisch instabilen Lösungen der Mathieuschen Gleichung begrenzt. Durch sukzessive Erhöhung der Wechselspannungsamplitude V (q in Abb. 11) können die auf stabilen Trajektorien gefangenen Ionen nach steigendem m/z resonant angeregt und beim Erreichen der Instabilitätslinie aus der Ionenfalle Richtung Detektor ejiziert werden. Für höheres Auflösungsvermögen und schnellere Scanzeiten erfolgt die Kopplung des quadrupolaren Feldes der Ringelektrode mit einem dipolaren Feld der Endkappenelektroden. Durch additive Überlagerung der beiden eingespeisten elektrostatischen Felder kommt es zur Ausbildung von Multipolfeldern höherer Ordnung (Hexa-, Okto-, Dekapolfelder). Durch den Multipoleffekt können die gefangenen Ionen mit ansteigen-

dem q innerhalb kürzester Zeit destabilisiert und anschließend neutralisiert (Störmassen) oder detektiert werden^[133].

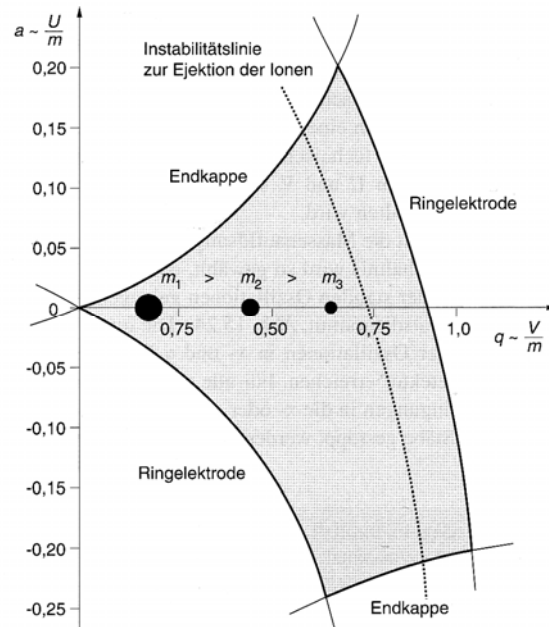


Abbildung 11: Mathieusches Stabilitätsdiagramm.

Die Ionen treten über die Fokussierungsoptik mit einem bestimmten Betrag kinetischer Energie über die Eintrittskappe in die Falle ein. Dieser Energiebetrag würde dazu führen, dass die meisten Ionen nicht auf stabile Kreisbahnen gezwungen werden könnten. Sie würden stattdessen aus der Potentialmulde heraus driften und gegen die Fallenwandung prallen. Um dies zu verhindern, ist die Ionenfalle mit Heliumgas gefüllt ($p \approx 3\text{-}6 \times 10^{-6}$ mbar). Die inerten Heliumatome entziehen den eintretenden Ionen durch leichte Zusammenstöße kinetische Energie und zwingen sie dadurch in die Potentialmulde. Das Heliumgas erfüllt zudem eine weitere Aufgabe: Durch gezielte, energiereiche Zusammenstöße der eingefangenen Ionen mit den Heliumatomen werden kollisionsinduzierte Fragmentierungsreaktionen ausgelöst (*Collision Induced Dissociation* = *CID*).

Die Durchführung von Fragmentierungsexperimenten ist das entscheidende Leistungsmerkmal der Ionenfalle. Aufgrund der diskontinuierlichen Arbeitsweise können eingefangene Ionen über mehrstufige Zyklen prozessiert und analysiert werden. Mit sogenannten MS^n -Messungen kann eine analysierte Verbindung

theoretisch n-fach fragmentiert werden. Die hierbei generierten Fragmentierungsmuster können wichtige Informationen zur Strukturaufklärung unbekannter Substanzen liefern. Der prinzipielle Ablauf einer solchen MS^n -Messung ist in Abb. 12 dargestellt.

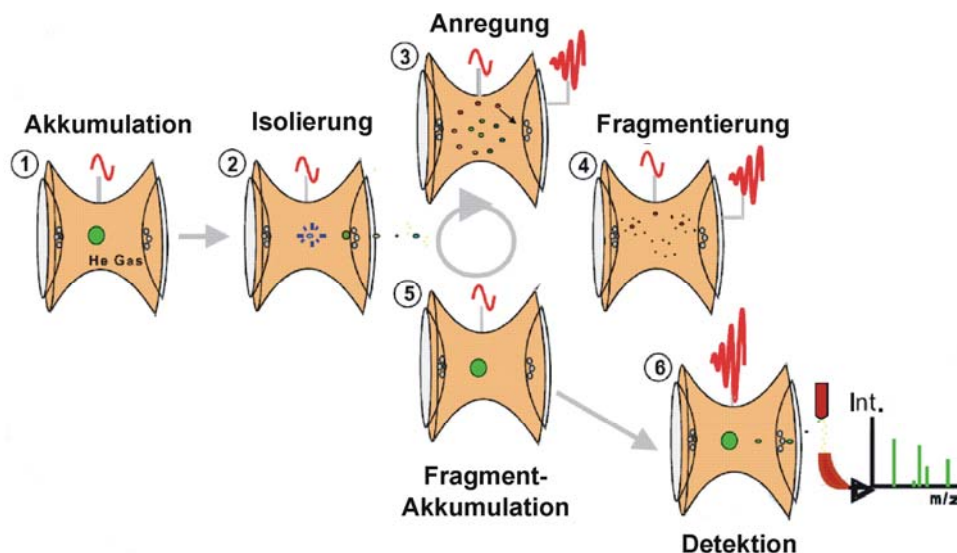


Abbildung 12: MS^n -Zyklen einer Ionenfalle, modifiziert nach Bruker Daltonics.

Im ersten Schritt erfolgt die Ionenakkumulation. Hierzu werden über einen definierten Zeitraum oder bis zu einer bestimmten Gesamtzahl Ionen in die Falle eingelassen und akkumuliert. Die Kontrolle des Akkumulationsausmaßes ist essentiell, um Überladungseffekte der Falle zu vermeiden. Will man einen reinen MS-Scan durchführen, werden die vorhandenen Ionen bereits hier über den Ausgangspalt der Falle zum Detektor geleitet. Für Fragmentierungsexperimente erfolgt im zweiten Schritt die Isolierung der gewünschten Ionensorte mit definiertem m/z -Verhältnis. Alle anderen Ionen müssen hierzu aus der Falle entfernt werden. Dies geschieht durch gezielte multipolare Anregung überlagernder Wechselfeldern von Ringelektrode und Endkappe. Die Störionen nehmen durch die resonante Anregung Energie auf, beschreiben in der Folge instabile Bahnen (vgl. Mathieusches Stabilitätsdiagramm) und werden letztlich an der Fallenwandung neutralisiert. Im dritten Schritt wird die Zielmasse gezielt über die Einspeisung der dipolaren Hilfswchselfeldern von den Endkappenelektroden angeregt. Hierdurch kommt es wie im vierten Schritt gezielt zu Kollisionen mit den in der Falle enthaltenen Heliumatomen. Durch

die Zusammenstöße wird das Mutterion in einzelne Tochterionen fragmentiert. Die gebildeten Fragmente können nun entweder detektiert werden, oder einem weiteren MS-Zyklus zugeführt werden (d.h. aus den verschiedenen Tochterionen wird wiederum eines isoliert und prozessiert).

1.5.3 Fourier Transformation Ionen Zyklotron Massenspektrometrie

Die heutige FT-ICR-MS-Technik wurde im Jahr 1974 von *Comisarow und Marshall* eingeführt^[139]. Kernstück des FT-ICR-MS ist ebenfalls eine Ionenfalle. Bei der verwendeten Penning-Ionenfalle wird im Gegensatz zur Paul-Ionenfalle (vgl. 1.5.2) eine elektrostatische Spannung angelegt, die von einem starken, homogenen Magnetfeld B (bis zu 25 Tesla^[140]) entlang der Symmetrieachse der Falle überlagert wird^[141]. In der Praxis haben sich nach kubischen Formen insbesondere zylindrisch aufgebaute Zellen bewährt. In Abb. 13A ist der prinzipielle Aufbau einer kubischen Penningfalle dargestellt. Die Zelle besteht aus insgesamt sechs Elektroden, die zu je drei Paaren angeordnet sind. Zwei Elektroden begrenzen die Zelle in z -Richtung, bilden also Eingangs- und Ausgangselektrode. Diese werden Trapping-Elektroden genannt, da sie die in die Falle eintretenden Ionen in ihrer Bewegungsrichtung z durch ein elektrostatisches Feld abbremsen. Der Mantel der kubischen bzw. zylindrischen Form wird von zwei Paaren gegenüber liegender Elektroden gebildet. Ein Paar dient hierbei der dipolaren Anregung der nachzuweisenden Ionen, das andere Paar ist für die eigentliche Detektion zuständig.

Das beim Ionisierungsprozess gebildete Ion tritt in die Falle ein und wird durch das anliegende Magnetfeld mit Feldlinien in z -Richtung auf eine Kreisbahn mit verhältnismäßig kleinem Radius in x/y -Richtung gezwungen (vgl. Abb. 13A).

Die Homogenität und Stärke des supraleitenden Magneten sorgt für stabile und reproduzierbare Umlaufbahnen (sog. Zyklotronbewegungen), die durch Gleichung (2) beschrieben werden.

$$\omega = \frac{z}{m} \times B \quad (2)$$

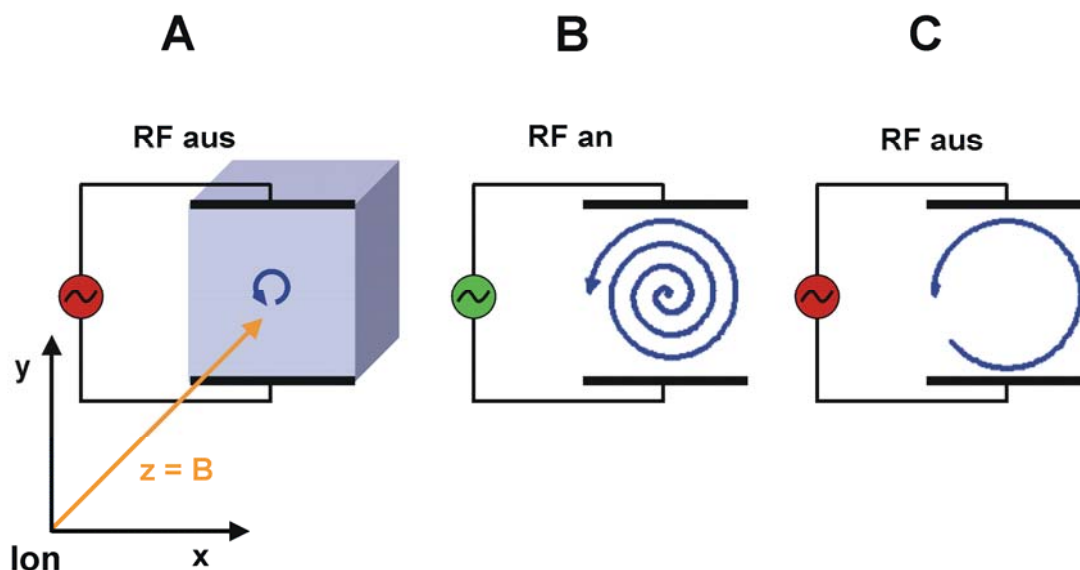


Abbildung 13: Trapping (A) und resonante Anregung (B) von Ionen in einer kubischen Penningfalle.

Hierbei steht ω für die Zyklotronfrequenz, z/m für das reziproke Masse / Ladungs-Verhältnis und B für die Magnetfeldstärke. Die Frequenz ist also nur abhängig von der Feldstärke und umgekehrt proportional zu m/z des eintretenden Ions. Somit ist ω für alle Ionen mit gegebenen m/z unabhängig von ihrer Geschwindigkeit gleich. Diese Eigenschaft macht die Ionen Zyklotron Resonanz besonders interessant für massenspektrometrische Anwendungen, da die Fokussierung unterschiedlicher Translationsenergien für die exakte m/z -Bestimmung nicht essentiell ist^[142].

Die Zyklotronfrequenz als solche ist nicht zur Detektion geeignet. Zur eigentlichen Messung erfolgt deshalb zunächst eine resonante, elektrostatische Anregung über ein von den Mantelelektroden eingestrahltes, oszillierendes Radiofrequenzfeld (vgl. Abb. 13B). Im Resonanzfall werden die Ionen beschleunigt und somit der Radius ihrer Kreisbahn vergrößert. Die Frequenz bleibt hierbei gleich, da sie nur von m/z , nicht aber von der kinetischen Energie abhängig ist. Unmittelbar nach der dipolaren Anregung befinden sich alle Teilchen gleichen Masse / Ladungs-Verhältnisses in kohärenten Ionenpaketen und kreisen auf der vergrößerten Umlaufbahn (vgl. Abb. 13C). In Abb. 14 ist das Funktionsprinzip der eigentlichen Detektion dargestellt.

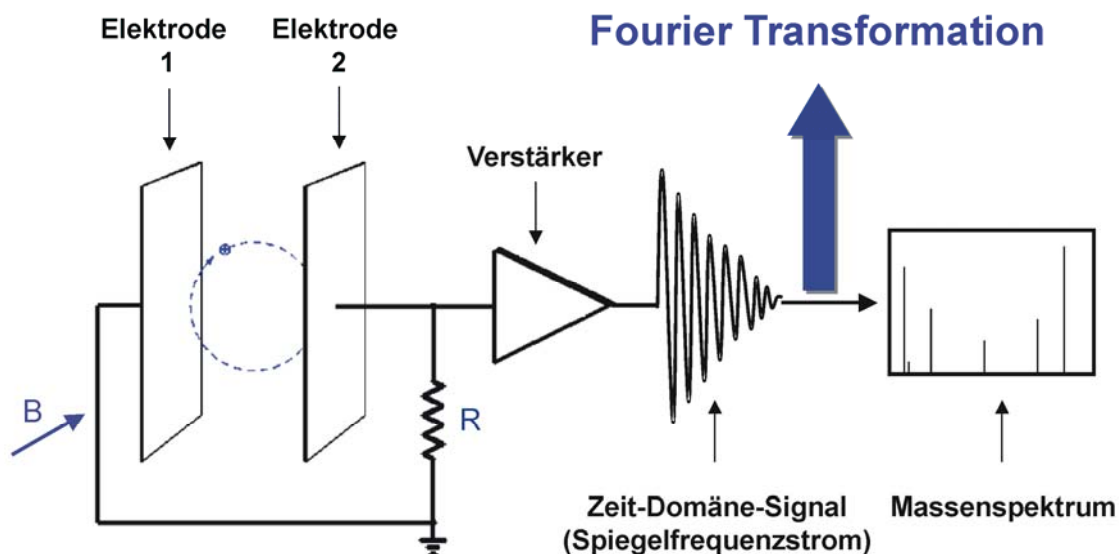


Abbildung 14: Detektionsprinzip der FT-ICR-MS.

Die kohärenten Ionenpakete kreisen auf ihrer durch den Radiofrequenzimpuls induzierten Kreisbahn. Die abgebildeten Mantelelektroden 1 und 2 bilden das Detektionselektrodenpaar. Die Detektion erfolgt bei der ICR-Messung auf indirekte Weise über einen sogenannten Spiegelfrequenzstrom. Die positiv geladenen Ionen kreisen von Elektrode 1 in Richtung Elektrode 2. Das hierbei erzeugte elektrische Feld zieht Elektronen im externen Stromkreis durch den Widerstand in Richtung Elektrode 2. Im zweiten Halbzyklus verlassen die Elektronen Elektrode 2 und fließen in Richtung Elektrode 1. Dies wird an einem Vorverstärker als Spiegelfrequenzstrom abgegriffen. Die Frequenz dieses Spiegelstroms ist identisch mit der Zyklotronfrequenz des Ions, die Amplitude wiederum proportional zur Anzahl der Ionen in der ICR-Zelle. Die Intensität des Detektionssignals nimmt wie in Abb. 14 zu sehen mit der Zeit ab. Man spricht vom sogenannten *Free Induction Decay* (FID). Grund für dieses Phänomen ist die graduelle Auflösung der ursprünglich kohärenten Ionenpakete.

Abb. 13 und 14 stellen das grundlegende Funktionsprinzip der ICR-Messung anhand einer Ionensorte mit definiertem m/z -Verhältnis dar. In der Praxis kann ein ganzer Masse / Ladungs-Bereich durch einen kurzen (ms Bereich), linear anwachsenden Hochfrequenzimpuls angeregt und simultan gemessen werden. Das resultierende Interferogramm ist ein komplexes Zeitdomänensignal aus n sich überlagernden Spiegelstromfrequenzen. Über *Fouriertransformation* kann

das Zeitsignal in die Frequenzdomäne umgerechnet werden, welche dann wiederum einem Massenspektrum zugeordnet werden kann (vgl. Abb. 15). Bei der Fouriertransformation handelt es sich um eine mathematische Integraltransformation, die einer Funktion (in diesem Fall der Zeitdomäne) eine andere Funktion (in diesem Fall die Frequenzdomäne) zuordnet.

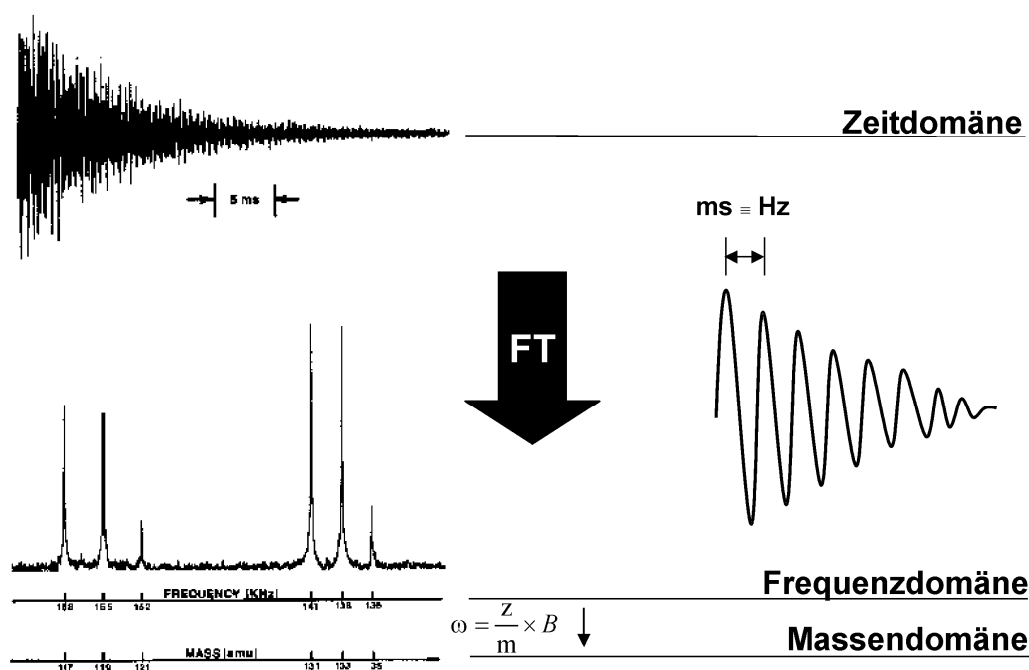


Abbildung 15: Prinzip der Fourier Transformation bei der FT-ICR-MS-Messung. Modifiziert nach^[143].

Über die mathematische Beschreibung der Zyklotronfrequenz (vgl. Gl. 2) können die resultierenden Einzelfrequenzen auf die m/z -Skala korreliert und ein korrespondierendes Massenspektrum generiert werden. FT-ICR-MS-Messungen zeichnen sich durch höchste Massengenauigkeit, Auflösung und Sensitivität aus^[142]. Die Bestimmung von exakten Massenwerten beruht auf der Möglichkeit, Ionenresonanzfrequenzen äußerst präzise messen zu können und diese über einen mathematischen Zusammenhang in die Massendomäne umzurechnen^[142;144]. Aufgrund des Massendefektes der Elemente weichen alle Isotopenmassen von der eigentlichen Nominalmasse um einen bestimmten Betrag ab (Ausnahme $^{12}\text{C} = 12,000000$ amu). Folglich ergeben sich für isobare Verbindungen (Verbindungen identischer, nominaler Masse) unterschiedliche Massenwerte je nach Molekularzusammensetzung. Als Beispiel seien hier die

Moleküle N_2 (28,006148 amu), CO (27,994915 amu) und C_2H_2 (28,031300 amu) aufgeführt^[145]. Je höher die Nominalmasse, desto größer wird die Anzahl möglicher Elementarzusammensetzungen mit charakteristischen Massenwerten. Auflösungsvermögen und Massengenauigkeit von FT-ICR-MS-Geräten erlauben die exakte Zuordnung einer Summenformel über die Bestimmung der akkuraten Masse und liefern so entscheidende Hinweise für die Strukturaufklärung unbekannter Komponenten^[146]. Auf diese Weise können chemische Verbindungen in komplexen Matrices wie Erdöl^[147], Bakterienkulturmedium^[148], Myokardialgewebe^[149] und Urin^[150] differenziert, analysiert und identifiziert werden. Die Möglichkeit unterschiedlichste Ionisierungsquellen wie EI, FDI^[151], ESI, APPI^[152] sowie MALDI^[148] für FT-ICR-MS-Messungen einzusetzen, erlaubt die Analytik von Verbindungen unterschiedlichster Polarität und Molekülgröße.

2 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten massenspektrometrisch-analytische Methoden zur Messung von modifizierten Nucleosiden und ribosylierten Metaboliten in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten und Matrices entwickelt und eingesetzt werden. Die analysierten Metabolitenmuster sollten hinsichtlich tumorassoziiierter Veränderungen im RNA-Metabolismus und in damit verknüpften Stoffwechselwegen untersucht und in ihrem Anwendungspotential als neuartige Biomarker evaluiert werden.

Die Arbeit gliederte sich in mehrere, aufeinander aufbauende Teilaspekte.

Mittels kombinierter massenspektrometrischer Techniken (IT-MS, FT-ICR-MS, oa-TOF-MS) sollten bislang unbekannte, ribosylierte Metaboliten im Minorcomponentenbereich des Urins von Tumorpatienten strukturell aufgeklärt werden. Hierfür sollte eine geeignete Methodik zur Aufreinigung der zu identifizierenden Komponenten aus 24h-Urin entwickelt werden.

Des Weiteren sollte der biologische und biochemische Hintergrund der identifizierten Metaboliten diskutiert werden, um so deren potentiellen Bezug zur Tumorgenese beurteilen zu können. Ziel war es, aus den erhaltenen Daten neue Arbeitshypothesen mit einem aussagekräftigen, tumorassoziierten Metabolitenmuster für eine Klassifizierungsstudie zu generieren. Komponenten ohne direkte pathophysiologische Relevanz waren hierbei gezielt auszuschließen.

Das kontinuierlich erweiterte Set identifizierter Metaboliten im Urin sollte im weiteren Verlauf der Arbeit zur bioinformatischen Mustererkennung im Rahmen einer klinischen Studie eingesetzt werden. Ziel war es, das Tumormarker-Potential der eingeschlossenen Metabolitenklassen für die Diagnose des Mammakarzinoms zu evaluieren.

Ein weiterer Teilaspekt dieser Arbeit war die Untersuchung des Metabolitenmusters auf verschiedenen biogenen Ebenen. Hierzu sollten Methoden für die

Analytik modifizierter Nucleoside und strukturverwandter Metaboliten in Zellkulturüberständen, Gewebe, Blutplasma und Urin erarbeitet werden. Die Ausscheidungsmuster waren auf ihre Aussagekraft bezüglich der Tumorerkrankung zu beurteilen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Klinische Studie AKP-24: Massenspektrometrische Untersuchung ribosylierter Metaboliten im 24h-Urin von Tumorpatienten

3.1.1 Studienziel

Ziel der Studie war die Identifizierung bislang unbekannter, ribosylierter Metaboliten im menschlichen Urin mit kombinierten massenspektrometrischen Methoden. Zum einen sollten über das mit 24h-Urin zur Verfügung stehende, große Probenvolumen bereits detektierte, unbekannte Metaboliten in ausreichender Menge aufgereinigt und identifiziert werden. Zum anderen sollte im Minorkomponentenbereich gezielt nach neuartigen, tumorrelevanten Metaboliten gesucht und diese strukturell aufgeklärt werden. Die Suche wurde auf modifizierte Nucleoside aus dem RNA-Metabolismus und peripher-verknüpfte Stoffwechselwege wie den Histidin-Metabolismus, den Nicotinamid / Nicotinat-Stoffwechsel, die Purin-Biosynthese und den Polyamin / Methionin- Zyklus fokussiert.

Im Bereich der RNA-Metaboliten konnte bislang lediglich ein Nucleosid entdeckt werden, welches ausschließlich im Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung auftrat^[153]. Im Urin eines Patienten mit terminalem HNO-Tumor (T4) wurde das zuvor unbekannte Nucleosid 5'-Deoxycytidin identifiziert. Anzumerken ist, dass das Cytidinderivat in dieser Studie nur bei einem Patienten detektiert werden konnte, bei allen anderen untersuchten Probanden (insgesamt 80 mit verschiedenen Tumorarten und T1-T3) hingegen nicht. Unklar blieb, ob das Auftreten generell von der HNO-Tumorbildung und speziell vom fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung des Patienten abhing. Sollte letzteres der Fall sein, wäre die Anwendung als Tumormarker nutzlos, da diese generell auf die möglichst frühzeitige Detektion einer Tumorentwicklung abzielt. Statistisch relevante Studien wurden bis zum heutigen Tag nicht durchgeführt. Ein möglicher Einsatz

von 5'-Deoxycytidin als hochsensitiver Biomarker für HNO-Tumorerkrankungen bleibt demzufolge zweifelhaft.

3.1.2 Studienplanung und Durchführung

Für die Durchführung der Studie wurden die in Tab. 3 definierten Rekrutierungsparameter in Form eines Prüfplans formuliert.

Tabelle 3: Ein- und Ausschlusskriterien des Prüfplans.

Tumorpatienten	
Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gesicherte Diagnose einer malignen, nicht vorbehandelten Tumorerkrankung (Bronchial-Karzinom, Rektum-Karzinom, HNO-Tumor) ▪ Präoperativer Zustand ▪ Alter: ≥ 18 Jahre ▪ Unterschriebene Einverständniserklärung 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tumorspezifische Vorbehandlung (Chemotherapie, Hormontherapie, Bestrahlungstherapie) ▪ Postoperativer Zustand ▪ Alter: < 18 Jahre ▪ Tumor-Rezidiv ▪ Schwangerschaft ▪ Bestehende Autoimmunerkrankung ▪ Bestehende HIV-Infektion ▪ Bestehende akute oder chronische Hepatitis ▪ Bestehende chronische mittel- bis schwergradige Einschränkung der Nierenfunktion ▪ Bestehender akuter Harnwegsinfekt ▪ Bestehende Niereninsuffizienz ▪ Teilnahme an einer Arzneimittelstudie im Zeitraum von vier Wochen vor der geplanten Studienteilnahme ▪ Arzneimitteleinnahme von immunmodulierenden Arzneimitteln (z.B.: Glukocorticoide, Interferone, monoklonale Antikörper usw.), Mistelpräparaten, Antibiotika, Virustatika, Allopurinol oder Dipyridamol im Zeitraum von vier Wochen vor der geplanten Studienteilnahme

Ziel war es, das eingeschlossene Studienkollektiv soweit zu normieren, dass externe, verfälschende Faktoren keinen oder nur einen definierten Einfluss auf das Urin-Metabolitenmuster haben konnten. Die Rekrutierung wurde am Universitätsklinikum Tübingen in der Abteilung für Radioonkologie sowie der HNO-Station IV durchgeführt. In Absprache mit den verantwortlichen Ärzten wurde das Studienkollektiv auf männliche und weibliche Patienten mit Bronchialkarzinom, Rektumkarzinom und HNO-Tumor festgelegt, da hierbei die höchste Rekrutierungsrate zu erwarten war. Das ursprüngliche Rekrutierungsziel von 24 Tumorpatienten mit $n = 8$ für jede der definierten Krebserkrankungen konnte aufgrund der zu eng gefassten Ausschlusskriterien in der veranschlagten Zeit nicht erreicht werden. Letztlich wurden zwei Patienten mit Bronchialkarzinom, drei Patienten mit HNO-Tumor und vier Rektumkarzinom-Patienten nach den formulierten Bedingungen des Prüfplans rekrutiert.

3.1.2.1 24h-Urinsammlung

Die Sammlung des 24h-Urins erfolgte jeweils am Tag vor der eigentlichen Probenaufarbeitung mit dem UriSet 24 der Firma Sarstedt (Nümbrecht). In diesem klinisch erprobten Sammelbehältnis wird der gesammelte Urin durch Zugabe einer geringen Menge verdünnter Salzsäure in den sauren pH-Bereich gebracht und stabilisiert. Die Sammlung begann mit dem zweiten Urin des Tages (der erste Morgenurin wurde verworfen) und endete am nächsten Tag mit der Sammlung des Morgenurins. Der Sammelurin wurde anschließend sofort für die Probenaufarbeitung vorbereitet, um lange Standzeiten zu vermeiden. Nach dem Abfüllen von Rückstellmustern wurden 300 ml des Sammelurins für die Probenaufarbeitung eingesetzt.

3.1.3 Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung

3.1.3.1 Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der Sammelurinproben erfolgte mittels Boronat-Affinitätsgel. Das grundlegende chromatographische Prinzip ist eine selektive, reversible Bindung von cis-diol Funktionen (im Fall der Nucleoside die 2',3'-cis-diol-Einheit der Ribose) an einen Phenylboronat-Träger im alkalischen pH-Bereich. Durch einen pH-Shift ins Saure können die über einen cyclischen Boronatester gebundenen cis-diole wieder eluiert werden (vgl. Abb. 16).

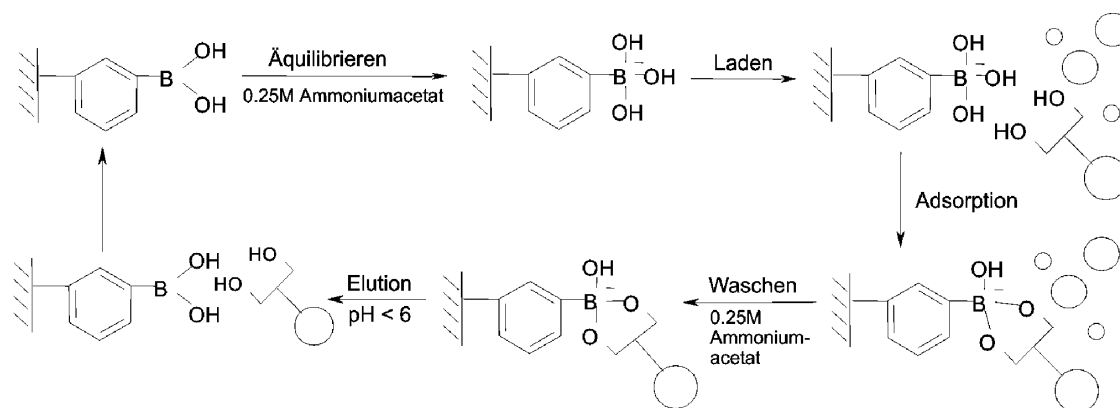


Abbildung 16: Prinzip der Phenylboronat-Affinitätschromatographie.

Bisherige Methodenentwicklungen zur Aufreinigung von Nucleosiden mit Phenylboronat-Affinitätschromatographie beruhten neben der Verwendung von SPE-Kartuschen^[154;155] zumeist auf der Gelvariante „Affigel 601“ (biorad, München). Letzteres wurde im Jahr 2001 durch das „Affigel boronate“ ersetzt. Laut Hersteller wurde das neue Gelmaterial durch eine andere Trägermatrix (Polyacrylamid), eine kleinere Partikelgröße sowie eine höhere Boronatbelegung modifiziert. In der Praxis ergab sich deshalb die Notwendigkeit, die von *Liebich et al.* 1997 validierte Methode, welche in der Arbeitsgruppe bisher angewandt wurde^[156;157], auf das neue Säulenmaterial hin zu optimieren und zu validieren.

Tabelle 4: Schema der Affinitätschromatographie für 10 ml Urin, nach Liebich et al.^[156].

Schritt	Lösung
1 Konditionierung	45 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,5
2 Probe	10 ml Urin, pH 8,5
3 Waschschrift 1	20 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,5
4 Waschschrift 2	6 ml MeOH / H ₂ O 1:1 (v/v)
5 Elution	25 ml 0,1 M FA in MeOH / H ₂ O 1:1 (v/v)
6 Regenerierung 1	25 ml 0,1 M FA in MeOH / H ₂ O 1:1 (v/v)
7 Regenerierung 2	25 ml MeOH / H ₂ O 1:1 v/v)

Konditionierung mit 45 ml 0,25 M NH₄Ac, pH 8,5 für neue Probenaufarbeitung oder
Lagern des Gels in 50 ml 0,1 M NaCl bei Beendigung der Probenaufarbeitung

Auffallend war der im Vergleich zum alten Gelmaterial stark erhöhte Gegendruck, der zu einer sehr langsamen Säulendurchflussrate der verschiedenen Fließmittel bei Atmosphärendruck führte. Aufgrund dieser Tatsache konnte das ursprüngliche Vorhaben, ein großes Probenvolumen von 300 ml des für die Studie gesammelten 24h-Urins in einem Affinitätschromatographiezyklus aufzuarbeiten, nicht durchgeführt werden. In einem Vorversuch wurden dann die bestehenden Säulendimensionen für 10 - 20 ml Urin auf eine Urinmenge von 300 ml angeglichen. Hierzu wurden alle Parameter des ursprünglichen Schemas in der 15-fachen Menge verwendet (7,5 g Affigel boronate statt 0,5 g, 675 ml NH₄Ac-Konditionierungslösung statt 45 ml usw.). Der resultierende Gegendruck des Gelbettes und die damit einhergehende lange Analysenzeit für einen Chromatographiezyklus ließ jedoch eine Anwendung für die Proben der klinischen Studie nicht zu. Als Alternative wurde die Möglichkeit gewählt, das Endvolumen von 300 ml Sammelurin über 15 einzelne Chromatographiezyklen zu je 20 ml Urin mit den bestehenden Säulen- und Fließmitteldimensionen aufzuarbeiten. Als eine offensichtliche Ursache der genannten Probleme ist die im Vergleich zum alten Gel verkleinerte Partikelgröße anzunehmen. Des Weiteren wurde ein deutliches pH- und Methanolgehalt- abhängiges Schrumpfen beim Aufbringen der NH₄Ac-Lösung (0,25 M, pH 8,5; Schritt 1 und 3, Tab. 4) sowie ein Ausdehnen beim Aufbringen der MeOH / H₂O-Lösung (Schritt 4, Tab.

4) des Gelbetts beobachtet. Auch dieses Phänomen zeigte eine deutlich negative Auswirkung auf die Fließgeschwindigkeit. Besonders beim starken Ausdehnen des Gelmaterials kam es zeitweise (insbesondere in den ersten Minuten nach Aufbringen der MeOH / H₂O-Waschlösung) zu einem vollständigen Erliegen des Säulenflusses. Um eine ausreichend hohe Analysengeschwindigkeit zu gewährleisten, wurde deshalb eine Druckluftzufuhr an den Säuleneingang angeschlossen und die Fließgeschwindigkeit auf ca. 3-4 ml/min justiert. Nach Aussage der Herstellerfirma weisen die Gelpartikel des neuen Affinitätsgels eine Organiktoleranz von ca. 20 Vol% auf. Bei der Erstellung der neuen Methode wurde deshalb darauf geachtet, den Ablauf des Fließmittelschemas an diese Eigenschaft anzupassen und den Methanolanteil in den verschiedenen Elutionsschritten möglichst gering zu halten. Bestimmte Nucleoside zeigten bereits in den Waschsritten eine vermehrte Elution. Für eine möglichst quantitative Erfassung aller bis zu diesem Zeitpunkt identifizierten cis-diol-Metaboliten im eigentlichen Elutionsschritt musste deshalb die Methode modifiziert werden. In einem ersten Schritt wurde der pH-Wert der NH₄Ac-Lösung (0,25 M) von pH 8,5 auf pH 8,8 angehoben, um eine vollständige Bindung aller Metaboliten zu gewährleisten. In Vorexperimenten wurde eine teilweise unvollständige Elution in Schritt 5 beobachtet. So fanden sich in den Regenerierungslösungen 1 und 2 bei der eigentlichen Elution nicht erfasste Metabolitenrückstände. Aus diesem Grund wurde die Elutionskraft in Schritt 5 durch eine Erhöhung des Säuregehalts auf 0,2 M FA und eine Volumenvergrößerung auf 50 ml Elutionslösung verstärkt. Ausgehend von diesen Modifikationen wurde nun eine optimierte Methode für die Aufarbeitung von 20 ml Urin erstellt. Hierzu wurden jeweils Waschschritt 2 und Regenerierungsschritt 2 aufgefangen und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5,0) gelöst und anschließend mit LC-MS analysiert. In Waschschritt 1 konnte keine vorzeitige Elution beobachtet werden.

Für die Einschätzung des Prozentsatzes einer unerwünschten Vorelution bzw. einer unvollständigen Hauptelution wurden die Peakflächen ausgesuchter Metaboliten in Waschlösung bzw. Regenerierungslösung auf die Peakflächen im eigentlichen Eluat bezogen (vgl. Tab. 5). Es wurde darauf geachtet, möglichst die komplette Bandbreite verschiedener Metaboliten (ribosylierte Pyrimidine, Purine, Imidazole und Pyridine) mit variierender Polarität abzudecken. Die Ergebnisse aus Tab. 5 lassen deutlich erkennen, dass verstärkt polare Verbindungen wie etwa IAA-R, ψ und 273 eine vorzeitige Elution bei Verwendung einer 1:1 Mischung MeOH / H₂O zeigen, aber auch deutlich unpolare Substanzen wie X, t⁶A und m⁶t⁶A. Dies lässt auf verschiedene Sekundärwechselwirkungen bei der Bindung bestimmter Strukturklassen an die Phenylboronatbelegung des Gels schließen. *Tuytten et al.* stellten in diesem Zusammenhang das in Abb. 17 gezeigte, erweiterte Retentionsmodell vor.

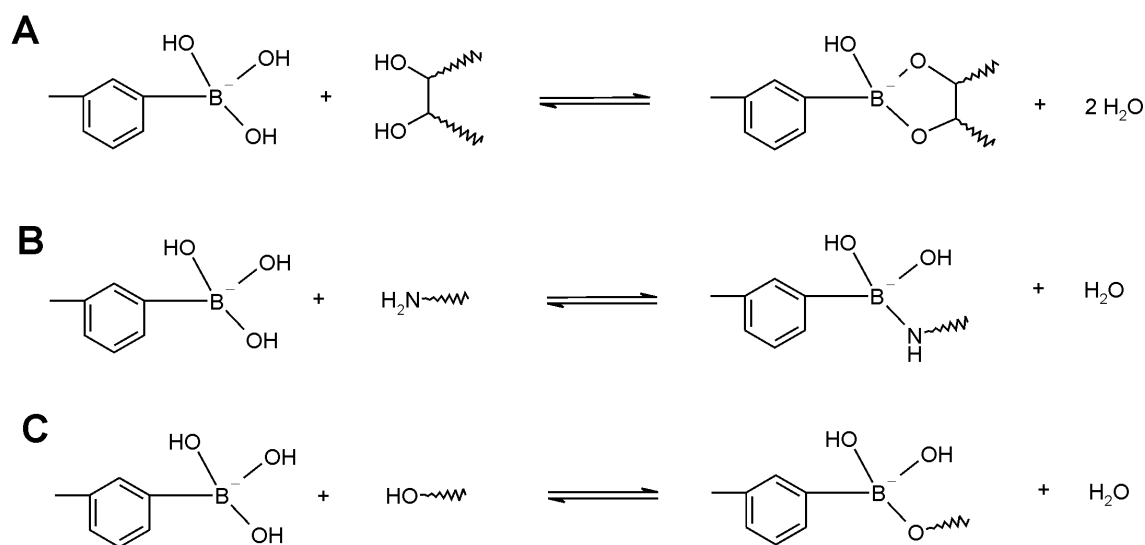


Abbildung 17: Erweitertes Retentions-Modell für die Phenylboronat-Affinitätschromatographie, modifiziert nach^[158], A: reguläre cis-diol-Bindung, B: Bindung einer exozyklischen Aminofunktion (z.B. Adenosin), C: Bindung einer exozyklischen Hydroxyfunktion (z.B. Guanosin).

Das Volumen der eingesetzten Waschlösung beeinflusst deutlich die Menge an vorzeitig herausgewaschenen Metaboliten. Auch die verwendete Probenmenge ist von entscheidender Bedeutung. Wie man am Vergleich der vorzeitigen Elution im Waschschrift 2 zwischen den Elutionsschemata 1 und 2 bzw. 3 und 4 erkennen kann, ist das bestehende Basisfließmittelschema für Urinmengen

über 10 ml nicht geeignet. Bei weiteren Tests (vgl. Tab. 5, Fließmittelschemata 5, 6, 7) konnte eine signifikante Verbesserung des Problems der vorzeitigen Elution erreicht werden, indem der Methanolgehalt von Waschlösung 2 auf 20% gesenkt wurde. Bei dem resultierenden Mischverhältnis von MeOH / H₂O 2:8 (v/v) konnte zum einen noch eine gute Reinigungswirkung mit Waschlösung 2 erhalten werden. Zum anderen wurde die vorzeitige Elution bestimmter Metaboliten auf ein Minimum reduziert. Die im Verlauf der Studie als N⁶-SAR identifizierte Komponente stellt hier eine Ausnahme dar. Dies ist vermutlich auf die ladungsinduzierte Abstoßung im basischen pH-Bereich zwischen dem vor und nach der Probenaufgabe (NH₄Ac-Lösung, pH 8,8) negativ geladenen Phenylboronatgel und der deprotonierten Dicarbonsäureeinheit des N⁶-SAR zurückzuführen (vgl. Abb. 18). Die resultierende Abschwächung der Primärbindung der cisdiol Funktion führt zur beobachteten, vorzeitigen Elution dieser Verbindung. Diese Vermutung wird durch das analoge, wenn auch deutlich abgeschwächte Verhalten weiterer, carbonsäurehaltiger Metaboliten wie IAA-R, t⁶A, m⁶t⁶A und ms²t⁶A gestützt. Auch bei X kann eine ladungsinduzierte Abstoßung vermutet werden, da der N-3-Wasserstoff aufgrund der beiden benachbarten Carbonylfunktionen eine hohe Azidität aufweist (pks 5,7)^[158].

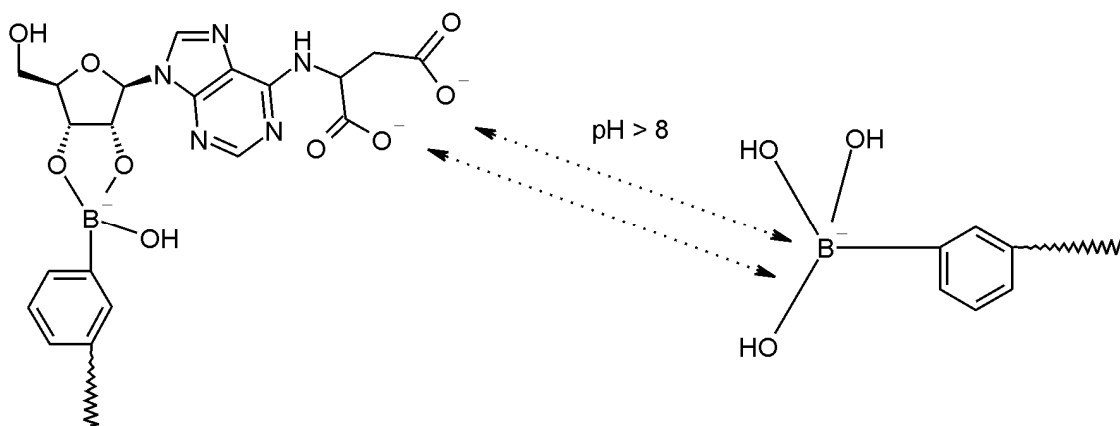


Abbildung 18: Ladungsinduzierte Abstoßungswirkung im basischen pH-Bereich zwischen dem negativ geladenen Phenylboronatgel und der negativ geladenen N⁶-SAR-Struktur.

Eine verringerte Bindungskapazität von ψ und eine daraus resultierende, frühzeitige Elution wurde bereits von *Uziel et al.* beobachtet^[159]. Da ψ einen deutlich höheren pks-Wert als die zuvor genannten Carbonsäuren und X aufweist, kann

das Elutionsverhalten von ψ nicht mit einer ladungsinduzierten Abstoßung erklärt werden. Vielmehr wird als Ursache eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen O^4 der Pseudouridinebase und der 2'-Hydroxyfunktion der Ribose angenommen. Dies könnte in einer kompetitiven Inhibierung der Boronatester-Formierung und damit in einer geringeren Retention auf der Affinitätssäule resultieren.

Da außer den zuvor ausgeführten Problemen keine unerwünschten Elutionseffekte bei Schema 7 (Tab. 5) auftraten, bildete dieser Ablauf die Grundlage für die optimierte Methode. Zur zusätzlichen Verstärkung der Elutionskraft wurde der Methanolgehalt in der Elutionslösung von 20% auf 50% (\rightarrow 0,2 N FA in MeOH / H₂O 1:1 (v/v)) erhöht. Das finale Elutionsschema findet sich unter 5.2.2.3.

Von den 24h-Sammelurinproben der Krebspatienten wurden je 300 ml zur affinitätschromatographischen Aufreinigung eingesetzt. Wie bereits erwähnt, wurden diese in 15 Einzelschritten zu je 20 ml aufgearbeitet. Für jede Probe wurde hierzu eine neue Säule mit 0,5 g Affigel boronate gepackt (vgl. 5.2.1).

3.1.3.2 Vorreinigung mit präparativer DC

Die vereinigten am Rotationsverdampfer eingeeengten Eluate wurden im Folgenden einer weiteren Aufreinigungsprozedur mittels präparativer Dünnschichtchromatographie unterzogen. Zum einen sollten hierdurch störende Urinkomponenten abgetrennt, zum anderen eine chromatographische Vortrennung in einzelne Polaritätsbereiche erreicht werden.

In Vorexperimenten wurde zunächst ein geeignetes Fließmittelgemisch für die Trennung verschieden polarer Standardnucleoside auf präparativen DC-Platten (Schichtdicke 1 mm) entwickelt. Eine Fließmittelzusammensetzung, bestehend aus ACN / H₂O 1:6 (v/v) stellte sich hierbei als am besten geeignet heraus. Abb. 19 zeigt die resultierende chromatographische Trennung. Für die anschließende Extraktion des Plattenmaterials wurden bei der Methodenentwicklung verschiedene Lösungsmittelgemische getestet. Eine Mischung aus MeOH / H₂O 3:2 (v/v) unter Zusatz von 1% FA zeigte die höchste Extraktionseffizienz. Bei

allen anderen getesteten Gemischen (Ethylacetat, ACN, ACN + 0,1% FA, MeOH, MeOH + 0,1% FA, MeOH / H₂O 3:2 (v/v), MeOH / H₂O 3:2 (v/v) + 0,1% FA, MeOH / H₂O 2:8 (v/v) + 0,1% FA, H₂O + 0,1% FA) wurde für die bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Komponenten eine verzögerte und unvollständige Extraktion beobachtet. Eine ausführliche Beschreibung der optimierten Methode findet sich unter 5.2.2.3.

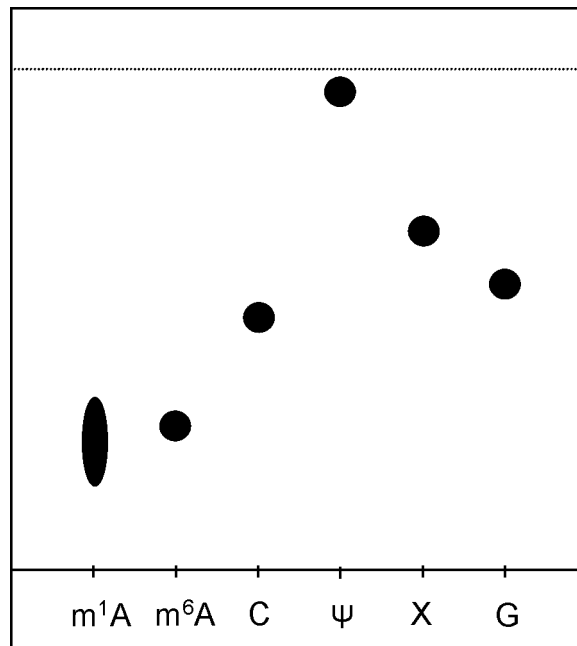


Abbildung 19: Darstellung der chromatographischen Trennung ausgewählter Nucleosidstandards auf einer präparativen SIL RP-18W/UV₂₅₄ – DC-Platte mit einem Fließmittelgemisch ACN / H₂O 1:6 (v/v).

3.1.4 Massenspektrometrische Analytik

3.1.4.1 Optimierung der Ionenfallen-Technik

Eine mit cis-diol spezifischer Affinitätschromatographie aufgereinigte Urinprobe weist auch nach der angewandten Vortrennung mit präparativer DC eine große Anzahl zu detektierender Verbindungen in einem großen Konzentrationsbereich auf. Die eingesetzte Ionenfalle musste insbesondere an die Anforderungen der Analytik von Minorkomponenten angepasst werden. In der Methodenentwicklung wurde auf die bisher in der Arbeitsgruppe eingesetzte Sechs-Segment-Einteilung der Auto-LC-MS³-Methode^[160] verzichtet. Besagte Segmentierung erfolgt prinzipiell zur Anordnung des LC-MS-Laufs in für bekannte modifizierte Standardnucleoside massenspektrometrisch optimierte Teilbereiche. Für die Suche nach bislang unbekanntem Metaboliten stellte sich diese Einstellung jedoch als ungeeignet heraus, da die Ionenfalle an den Segmentgrenzen zu lange braucht um die Einstellungen des neuen Segments zu laden. Infolge des Rechenvorgangs geht in diesem Bereich Messzeit verloren (vgl. Abb. 20), was insbesondere für die Detektion von Minorkomponenten problematisch ist.

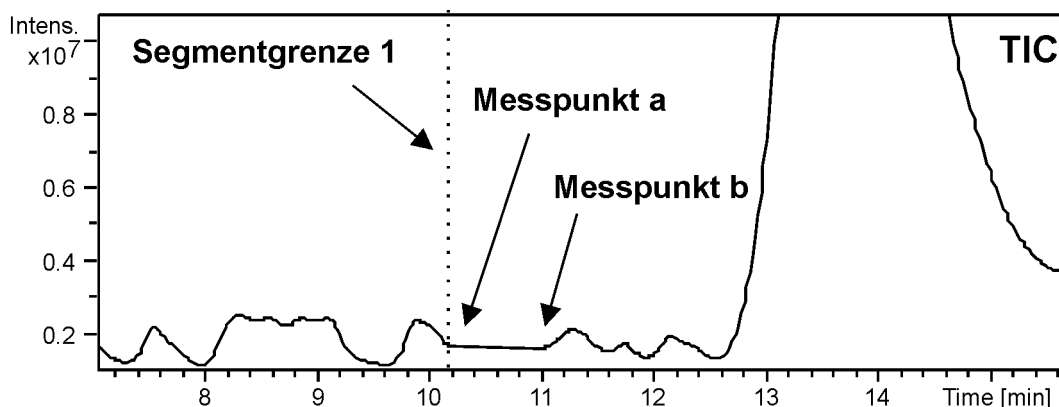


Abbildung 20: Problematik des Messzeitverlustes an den Segmentgrenzen der Auto-LC-MS³-Methode. An Segmentgrenze 1 liegt zwischen dem letzten Messpunkt (a) von Segment 1 und dem ersten Messpunkt (b) von Segment 2 eine messfreie Rechenzeit von fast einer Minute (TIC, Nucleosidstandard).

Aufgrund des auffällig hohen Background-Rauschens in den zuvor eingesetzten Methoden, wurden die Parameter bei der eigentlichen Elektrosprayionisierung optimiert. Wie man in Abb. 21A erkennt, ergibt sich bei den ursprünglichen

Einstellungen (Nebulizer Gas (NG): 25 Psi, Dry Gas (DG): 7 l/min und Dry Temperature (DT): 325°C in einem Scan-Bereich von 50-500 m/z eine starkes Basislinienrauschen mit vielen Spikes. Letztere resultieren aus unvollständig desolvatisierten Lösungsmittelmolekülen sowie Clusterformationen des Ammoniumformiats, welche insbesondere im unteren Massenbereich auftreten können. Zur Optimierung wurde die untere Grenze des Scanbereichs auf m/z 200 angehoben (Massen unterhalb dieses Wertes sind bei der untersuchten Metabolitenklasse nicht zu erwarten) und die Gas- und Temperaturwerte (NG 45 Psi, DG 9 l/min, DT 350°C) erhöht. Die resultierende Verminderung des Basislinienrauschens ist in Abb. 21B dargestellt.

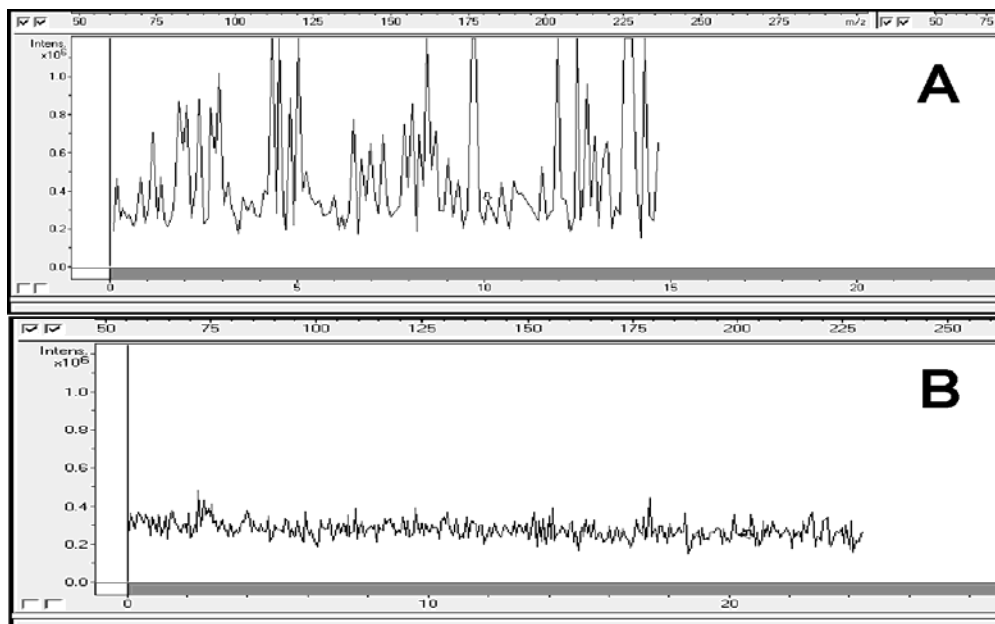


Abbildung 21: Online-Aufzeichnung (Base Peak) des Elektrosprays bei verschiedenen Parametern. A (alte Einstellungen): NG 25 Psi, DG: 7 l/min, DT 325°C. B (neue Einstellungen): NG 45 Psi, DG 9l/min, DT 350°C. Über LC eingeleitete Fließmittelzusammensetzung: Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5) / MeOH:H₂O (3:2 (v/v) + 0,1% FA im Verhältnis 98:2 (Startbedingungen von LC-Gradient 5.3.2.3.)

Für die Ionisierungsoptimierung wurde über die Retentionszeit die jeweilige exakte Fließmittelzusammensetzung von 20 Standardnucleosiden beim Eintritt in die Ionisierungsquelle bestimmt. Hierzu wurde zunächst mittels Thioharnstoff die chromatographische Totzeit des LC-MS-Systems ermittelt (= 3,0 min) und diese von der eigentlichen Retentionszeit abgezogen. Der hierfür erhaltene Zeitwert y konnte nun im Gradientendiagramm auf die entsprechende, tatsäch-

liche Fließmittelzusammensetzung extrapoliert werden. Zur Optimierung der massenspektrometrischen Einstellungen für ein Standardnucleosid x wurde nun die entsprechende Fließmittelzusammensetzung über die LC-Pumpe eingestellt und ins MS geleitet. Über ein T-Stück wurde gleichzeitig Standardnucleosid x (Konzentration jeweils ca. 10 µg/ml) über die Spritzenpumpe zum LC-Fluss zugesplittet und die MS-Einstellungen optimiert (vgl. 5.3.3.1). Aus den erhaltenen Werten der einzelnen Standards wurde für jeden MS-Parameter der Mittelwert bestimmt und so eine Methode entwickelt, die für eine möglichst große Bandbreite an Metabolitstrukturen eine bestmögliche Detektion liefert.

Ein generelles Problem bei der Analytik von Minorkomponenten ist die mögliche Überlagerung durch einzelne, im Urin in hoher Konzentration vorkommende modifizierte Nucleoside wie Ψ , m^1A , m^1I und m^2_2G . Die Ionenfalle selektiert prinzipiell die Verbindung mit höchster Intensität pro Zeiteinheit für Fragmentierungsprozesse. Coeluiierende, unbekannte Minorkomponenten werden so potentiell für eine MS^3 -Fragmentierung nicht erkannt. Um dieses Problem zu umgehen, wurde bei der entwickelten Methode eine „exclusion list“ erstellt. In diese Liste wurden Nucleoside eingegeben, die zum damaligen Zeitpunkt bereits identifiziert waren und so von der Auto- MS^3 -Fragmentierung ausgeschlossen werden konnten. Mit der optimierten Methode (LC-MS-Methode 1, vgl. 5.3.3.2) konnte so gezielt nach neuartigen Verbindungen im isolierten cis-diol-Metabolitenmuster gesucht werden.

3.1.4.2 Auto-LC-IT-MS³-Messungen

Die Metabolitenidentifizierung erfolgte über eine Kombination verschiedener massenspektrometrischer Techniken. Über die bereits beschriebene Auto-LC-MS³-Analytik sollten die aufgereinigten Fraktionen zunächst auf bisher unbekannte Metaboliten gescreent werden. In Abb. 22 ist der Trennungseffekt der eingesetzten präparativen DC und die dadurch erreichte Einteilung des cis-diol-Musters in verschiedene Polaritätsbereiche von unpolar (Fraktion 1) bis polar (Fraktion 12) zu erkennen.

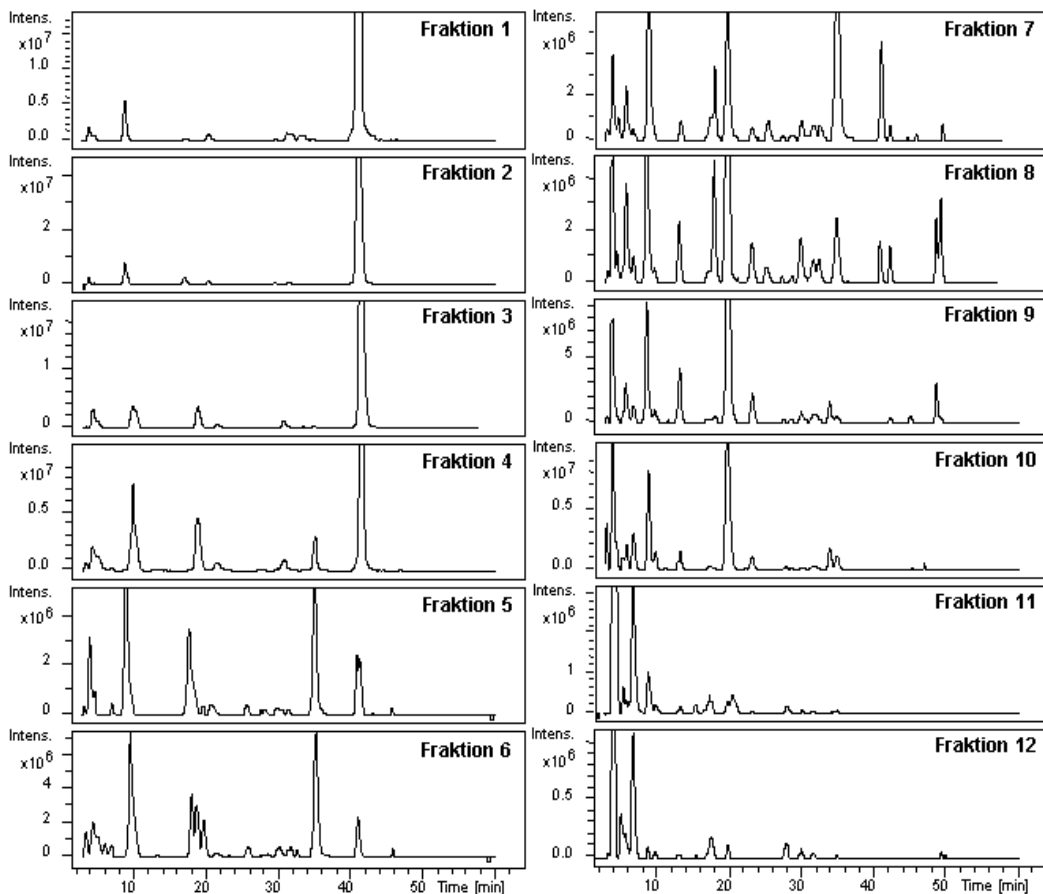


Abbildung 22: CNL 132-Spuren der zwölf Einzelfraktionen aus der DC-Trennung einer aufgearbeiteten 24h-Urinprobe eines männlichen Rektumkarzinompatienten mit der entwickelten Auto-LC-IT-MS³-Methode.

Durch die in der MS-Methode verwendeten exclusion-Einstellungen sind isolierte Hauptkomponenten des Urins wie z.B. m¹A und m²₂G in den prozessierten CNLs nicht dargestellt. Die Aussagekraft einer MS³-Fragmentierung für die

Komponentenidentifizierung ist, insbesondere bei der Analytik hypermodifizierter, ribosylierter Metaboliten, nur von eingeschränktem Informationsgehalt. Bei genannten Verbindungen ist der MS^2 -Schritt generell auf die Eliminierung der neutralen Zuckereinheit durch Spaltung der labilen C-N-glykosidischen Bindung fixiert. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass bei ribosylierten Metaboliten mit der stabileren C-C-glykosidischen Bindung (z.B. Ψ) keine Abspaltung der intakten Zuckereinheit, sondern Fragmentierungsreaktionen innerhalb der konjugierten Ribose zu beobachten sind^[161]. Abb. 23 zeigt den Vorschlag für eine 1,2-Eliminierungsreaktion beim Ribose-Neutralverlust am Beispiel des C-N-verknüpften Adenosins. Die abgespaltene 2-Hydroxymethyl-2,3-dihydrofuran-3,4-diol-Struktur wird zur einfacheren Lesbarkeit im weiteren Verlauf der Arbeit als *dehydratisierte Ribose* bezeichnet.

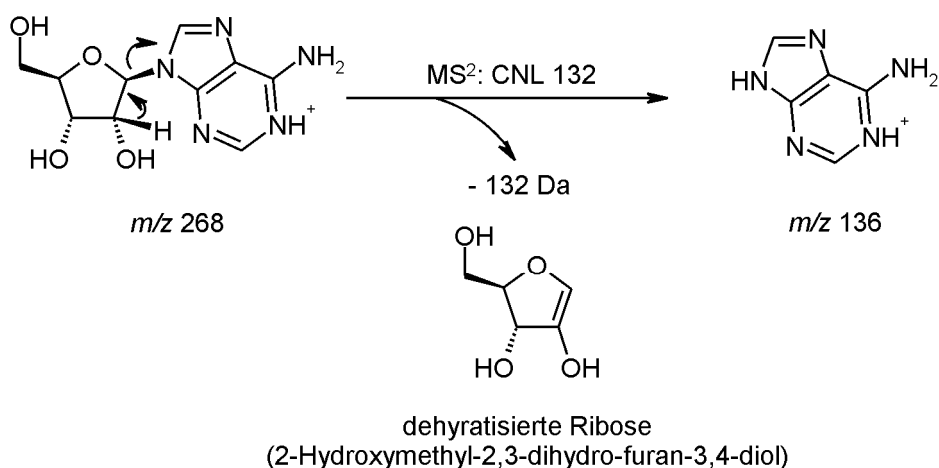


Abbildung 23: Vorschlag für einen 1,2-Eliminierungsmechanismus beim Zuckerneutralverlust (CNL 132) am Beispiel des protonierten Adenosins.

Für die anschließende Fragmentierung des Heterozyklus steht demnach nur noch ein Fragmentierungsschritt zur Verfügung. Dieser kann zur Identifizierung der jeweiligen Struktur nur bedingt beitragen. Für eine aussagekräftigere Analyse der unbekannt Metaboliten musste aufgrund der MS^3 -Limitierung der Bruker Ionenfalle in LC-gekoppelten Messungen eine semipräparative Aufreinigung erfolgen. Auf diese Weise ließen sich die isolierten Metaboliten mittels Spritzenpumpeninjektion einer MS^n -Analytik mit zusätzlichen Fragmentierungsschritten des Heterozyklus unterziehen.

3.1.4.3 Semipräparative Aufreinigung mit HPLC-MS

Für die semipräparative Aufreinigung selektierter Metaboliten wurden 250-300 µl der DC-Fraktionslösung mit der jeweils höchsten Komponentenanreicherung in das LC-MS-System injiziert und mit MS-Methode 5 (vgl. 5.3.3.6) gemessen. Hierbei wurde die Ausgangskapillare des LC-Systems an ein Rheodyne-Schaltventil an der Ionenfalle angeschlossen und die aufgetrennten Metaboliten unter on-line-EIC-Kontrolle zur jeweiligen Retentionszeit in einem Eppendorf-Cup aufgefangen. Bei Metaboliten mit hoher Konzentration konnten die IT-MSⁿ-Messungen direkt erfolgen. Minorkomponenten hingegen wurden zunächst mittels SpeedVac bzw. Lyophilisierung aufkonzentriert. Die erhaltenen Metabolitlösungen wurden auch für die FT-MS-Spritzenpumpenmessungen (vgl. 3.1.4.6) verwendet.

3.1.4.4 ESI-IT-MSⁿ-Messungen

Die semipräparativ aufgereinigten Metaboliten wurden über ein Spritzenpumpensystem mit einer Flussrate von 300 µl/h in die Ionenfalle injiziert und im positiven Ionisierungsmodus mit MS-Methode 2 (vgl. 5.3.3.3) analysiert. Die Fragmentierungsparameter *fragmentation amplitude* (definiert die angelegte Fragmentierungsenergie) und *cut-off* (bestimmt die untere Grenze des Scan-Bereichs für Tochterfragmente in der MSⁿ-Messung) wurden manuell angepasst. Beide Parameter beeinflussen sich bei der Messung gegenseitig. Je näher der cut-off am *m/z*-Wert der zu fragmentierenden Muttermasse liegt, desto schwerer erfolgt deren Spaltung und desto höher muss folglich die Fragmentierungsenergie eingestellt werden. Generell werden auch die entsprechenden Tochterionen in Abhängigkeit vom cut-off stabilisiert. Wählt man einen sehr niedrigen Wert, so werden insbesondere die Tochterionen mit niedrigem *m/z* stabilisiert und man läuft Gefahr, Fragment-Ionen mit hohem *m/z* aufgrund fehlender Stabilität nicht detektieren zu können. Um alle Tochterionen in ausreichender Intensität erfassen zu können, wurden bestimmte Fragmentierungswege deshalb mit verschiedenen Parametereinstellungen untersucht. Mit einem möglichst moderaten Wert der *fragmentation amplitude* wurde in Abhängigkeit

vom benötigten m/z -Bereich der jeweiligen Tochtermassen ein cut-off-Wert zwischen 25-60% des m/z -Wertes der Muttermasse gewählt. Die durchgeführten CID-Fragmentierungsexperimente sind durch die Abspaltung charakteristischer Neutralteilchen gekennzeichnet. Eine Auflistung der am häufigsten zu beobachteten Neutralverluste gibt Tab. 6 wieder.

Tabelle 6: Übersicht häufig zu beobachtender Neutralverluste in der CID-Fragmentierung.

Massenverlust Δm	Neutralteilchen	Formel
15	Methylradikal	$\bullet\text{CH}_3$
16	Methan	CH_4
17	Ammoniak	NH_3
18	Wasser	H_2O
27	Blausäure	HCN
	Isoblausäure	HNC
28	Kohlenmonoxid	CO
	Ethen	CH_2CH_2
29	Methylenamin	CH_2NH
30	Formaldehyd	CH_2O
31	Methylamin	NH_2CH_3
32	Methanol	CH_3OH
33	Hydroxylamin	NH_2OH
41	Acetonitril	CH_3CN
	Methylisonitril	CH_3NC
42	Ethenon	CH_2CO
	Aminonitril	NH_2CN
43	Iminomethanon	HNCO
44	Kohlendioxid	CO_2
45	Aminocarbaldehyd	NH_2CHO
46	Ameisensäure	HCOOH
48	Methanthiol	CH_3SH
54	Methylencyanamid	CH_2NCN
56	Methylcyanamid	$\text{CH}_3\text{NH}\text{CN}$
57	Methyliminomethanon	CH_3NCO
59	Iminomethanthion	HNCS
60	Essigsäure	CH_3COOH
	Ameisensäuremethylester	CH_3OCHO

Neben den erwähnten Neutralverlusten konnten in den durchgeführten Messungen auch Ion-Molekül-Anlagerungsreaktionen beobachtet werden. Diese auch als *neutral gains* bezeichneten Abläufe sind in verschiedenen massenspektrometrischen Studien auch im Zusammenhang mit modifizierten Nucleosiden und strukturverwandten Verbindungen beschrieben und konnten bei verschiedenen Gerätetypen wie Q-TOF-, Triple-Quadrupol und Ionenfalleninstrumenten nachgewiesen werden^[162-164]. Die Adduktbildung erfolgt durch Anlagerung von Neutralteilchen wie ACN, MeOH und H₂O an bestimmte Fragment-Ionen in der Kollisionszelle. ACN, H₂O und MeOH-Anlagerungen resultieren vermutlich aus beim ESI-Prozess und im Verlauf der Ionenfokussierung nicht vollständig entfernten Lösungsmittelmolekülen. Die Addition von H₂O kann zusätzlich auf ein nicht vollständig wasserfreies Kollisionsgas sowie Wasserrückstände an aktiven Stellen in den Gaszuleitungen und im eigentlichen MS-System zurückgeführt werden. Ersteres konnte von *Tuytten et al.* bei Triple-Quadrupolmessungen durch Spiken des eingesetzten Argon-Kollisionsgases mit H₂¹⁸O nachgewiesen werden^[162]. Neben dem vermuteten H₂O-neutral gain erfolgte die Anlagerung des sauerstoffmarkierten Wassers mit dem entsprechenden Massenshift von 2 Da.

Neutral-gain-Reaktionen mit MeOH und H₂O wurden auch bei den ESI-IT-MS-Messungen in dieser Arbeit beobachtet. Für den Beleg der postulierten Adduktbildung wurde in einem Experiment der als m^{2,2,7}G identifizierte Metabolit in verschiedenen Lösungsmitteln (100% ACN, MeOH / H₂O 3:2 + 0,1% FA) mittels Spritzenpumpe in die Ionenfalle injiziert. Die MSⁿ-Messungen ergaben die in Abb. 24 gezeigten Spektren. Wie man deutlich erkennt, zeigt sich die vermutete H₂O-Adduktformation (m/z 149 → m/z 167) auch bei 100% organischem Lösungsmittel. Wasserrückstände im eigentlichen MS-System tragen demnach zu dem beobachteten neutral gain bei. Die postulierte MeOH-Anlagerung (m/z 149 → m/z 181) konnte hingegen nur in der MeOH / H₂O-Lösung nachgewiesen werden. Hierdurch wird zum einen bestätigt, dass Fragment m/z 181 definitiv durch eine Anlagerungsreaktion gebildet wird. Zum anderen stellt eine unvoll-

ständig Desolvatisierung im ESI-Prozess die Ursache für die MeOH-Adduktbildung dar.

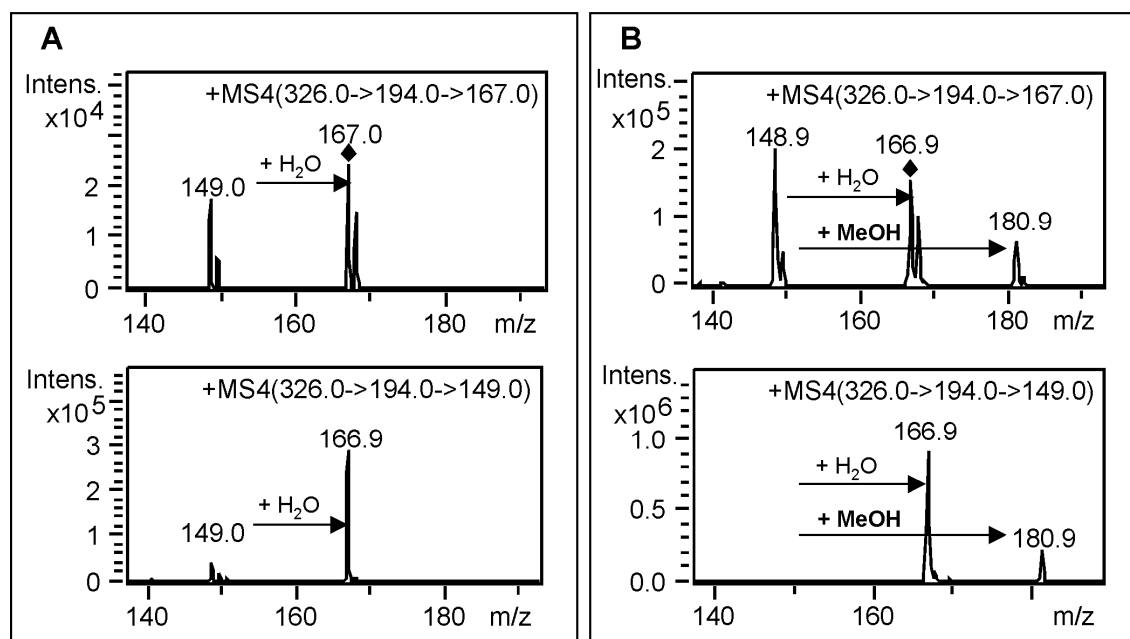


Abbildung 24: Neutral Gain-Reaktionen von $m^{2,2,7}G$ in verschiedenen Lösungsmitteln. A: gelöst in 100% ACN (nur H₂O-neutral gain). B: gelöst in MeOH / H₂O 3:2 + 0,1 % FA (H₂O- und MeOH-neutral gain).

Die unbekannt Metaboliten konnten abhängig von der jeweiligen Konzentration und dem Ionisierungspotential bis zum MS⁶-Fragmentierungsschritt analysiert werden. Die beobachteten Neutralverluste und neutral gains (kursiv markiert) sind in Tab. 7 aufgeführt. Letztere sind in den ausgearbeiteten Fragmentierungshierarchien (vgl. 3.1.5) mit „NG“ gekennzeichnet. Die beobachteten Fragmentierungsmuster lieferten einen wichtigen Beitrag zur Strukturaufklärung der analysierten Verbindungen.

Tabelle 7: Ergebnisse der IT-MSⁿ-Messungen der semipräparativ aufgereinigten Metaboliten, geordnet nach steigender Retentionszeit (RT) der Metaboliten in der LC-MS-Analytik; Fr.: DC-Fraktion mit größter Anreicherung. [BH]⁺: protonierte Base aus MS², entstanden durch Zuckerneutralverlust der Ribosyleinheit (-132 Δm) bzw. Methylthioribosesulfoxid (-178 Δm) bei Metabolit Nr. 15, kursiv: neutral gains.

Nr.	RT	Fr.	MS	MS ²	MS ³	MS ⁴	MS ⁵	MS ⁶
1	3,0	12	302	170	153 (BH ⁺ -NH ₃) 126 (BH ⁺ -CO ₂)	135 (153-H ₂ O) 125 (107+H ₂ O) 107 (153-HCOOH) 109 (126-NH ₃) 97 (126-CH ₂ NH)	107 (135-CO) 82 (109-HNC) 68 (CH ₃ NC) 82 (97-CH ₃) 70 (97-HCN) 56 (97-CH ₃ NC)	
2	3,5	12	288	156	110 (BH ⁺ -HCOOH)	93 (110-NH ₃) 83 (110-HCN)	66 (93-HCN) 56 (83-HCN)	
3	4,0	11	259	127	99 (81+H ₂ O) 81 (BH ⁺ -HCOOH)	81 (99-H ₂ O) 54 (BH ⁺ -HCN) 99 (81+H ₂ O)		
4	4,6	4	255	123	106 (BH ⁺ -NH ₃) 96 (78+H ₂ O) 80 (BH ⁺ -HNCO) 78 (BH ⁺ -NH ₃ -CO)	78 (106-CO) 78 (96-H ₂ O) 68 (96-CO) 53 (80-HCN) 51 (80-CH ₂ NH) 51 (78-HCN)	51 (78-HCN) 51 (78-HCN) 41 (68-HCN)	
5	5,0	4	212	80	53 (BH ⁺ -HCN) 51 (BH ⁺ -CH ₂ NH)			
6	7,0	11	346	214	197 (BH ⁺ -NH ₃) 168 (BH ⁺ -HCOOH)	151 (197-HCOOH) 125 (197-C ₃ H ₄ O ₂) 113 (197-C ₄ H ₄ O ₂) 96 (197-C ₄ H ₇ NO ₂)	96 (113-NH ₃) 70 (113-HNCO)	
7	7,0	11	302	170	153 (BH ⁺ -NH ₃) 125 (BH ⁺ -NH ₃ -CO)	125 (153-CO) 100 (82+H ₂ O) 82 (125-HNCO)	100 (82+H ₂ O) 82 (125-HNCO) 53 (82-CH ₂ NH)	53 (82-CH ₂ NH)
8	7,5	4	228	96	78 (BH ⁺ -H ₂ O) 68 (BH ⁺ -CO)	51 (78-HCN) 41 (68-HCN)		
9	9,5	4	286	154	136 (BH ⁺ -H ₂ O) 112 (BH ⁺ -CH ₂ CO) 95 (BH ⁺ -CH ₃ CONH ₂)	95 (136-CH ₃ CN) 95 (112-NH ₃) 68 (95-HCN)	68 (95-HCN)	
10	10,5	9	259	127	110 (BH ⁺ -NH ₃) 128 (110+H ₂ O)	128 (110+H ₂ O) 82 (110-CO)	55 (82-HCN)	
11	14,0	10	275	143	97 (BH ⁺ -HCOOH)	69 (97-CO)		

Nr.	RT	Fr.	MS	MS ²	MS ³	MS ⁴	MS ⁵	MS ⁶
20	46,5	4	362	230	212 (BH ⁺ -H ₂ O) 112 (BH ⁺ -C ₇ H ₆ CO) 95 (BH ⁺ -C ₇ H ₇ CONH ₂)	95 (212-C ₇ H ₇ CN) 95 (112-NH ₃) 68 (95-HCN)	68 (95-HCN)	
21	49,5	9	427	295	150 (BH ⁺ -C ₅ H ₇ NO ₄)	133 (150-NH ₃) 123 (150-HCN) 94 (150-CH ₃ NHCN)	124 (106+H ₂ O) 106 (133-HCN) 108 (123-CH ₃) 96 (123-HCN) 94 (123-CH ₂ NH) 67 (94-HCN)	79 (106-HCN)
22	50,0	8	459	327	208 (BH ⁺ -C ₄ H ₉ NO ₃) 182 (BH ⁺ -C ₅ H ₇ NO ₄)	165 (208-HNCO) 165 (182-NH ₃) 134 (182-CH ₃ SH)	150 (165-CH ₃) 138 (165-HCN) 107 (134-HNC)	123 (150-HCN) 80 (107-HCN)
23	51,5	1	342	210	192 (BH ⁺ -H ₂ O) 112 (BH ⁺ -C ₅ H ₁₀ CO) 95 (BH ⁺ -C ₅ H ₁₀ CONH ₂)	95 (150-C ₅ H ₁₁ CN) 95 (112-NH ₃) 68 (95-HCN)	68 (95-HCN)	

3.1.4.5 Bisherige Arbeiten zur Aufklärung von Fragmentierungsprozessen bei modifizierten Nucleosiden

In den untersuchten Heterozyklen ergeben sich prinzipiell mehrere mögliche Positionen für die zu beobachteten Abspaltungsreaktionen. So ist beispielsweise eine HCN-Eliminierung im Adenin-Grundgerüst (Nucleobase des Adenosins) von C-2 / N-1, C-2 / N-3, C-8 / N-7 und C-8 / N-9 denkbar (vgl. Abb. 25).

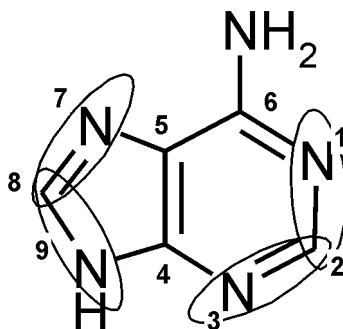


Abbildung 25: Mögliche Positionskombinationen für den HCN-Neutralverlust im Adeningrundgerüst.

Eine exakte, positionsspezifische Bestimmung der CID-Neutralverluste kann generell über die Messung isotoopenmarkierter Standards erfolgen. Der einfachste Weg ist der Wasserstoff-Deuterium-Austausch an basischen funktionellen Gruppen. Aufgrund möglicher intramolekularer Wasserstofftransferreaktio-

nen in kollisionsaktivierten Heterozyklen ist jedoch die Aussagekraft dieser Standards deutlich geringer als die von stabilen Markierungen an Kohlenstoff-, Stickstoff-, Schwefel- oder Sauerstoff-Ringatomen^[165]. Generell kann die Untersuchung der Fragmentierungshierarchien von Nucleosiden über die entsprechenden Nucleobasen erfolgen, da Erstere durch Abspaltung der neutralen, dehydratisierten Riboseeinheit (vgl. Abb. 23) in MS² direkt in Letztere übergehen. Die über Fragmentierung an der labilen C-N-Bindung von Ribonucleosiden gebildeten Basen sind chemisch identisch mit den eigentlichen Original-Heterozyklen^[166]. Die mit isotoopenmarkierten Nucleobasen aufgeklärten Initialfragmentierungen sollen im Folgenden näher vorgestellt werden, da sie auch für die Fragmentierungsmuster der in dieser Studie identifizierten Metaboliten wichtige Informationen liefern.

Die Fragmentierungshierarchie für die Adenosinbase Adenin wurde von *Nelson und McCloskey* mit einem Triple-Quadrupolinstrument in CID-Experimenten isotoopenmarkierter Analoga (¹³C, ²H und ¹⁵N) schematisch aufgeklärt^[165]. Als bevorzugte Protonierungsstelle konnte über thermodynamische Berechnungen die N¹-Position festgelegt werden. Für die protonierte Adeninstruktur ergaben sich vier Hauptfragmentierungswege. Die ablaufenden Reaktionen konnten auf eine initiale Öffnung des Pyrimidinrings an den Positionen N-1 und C-2 bzw. N-1 und C-6 zurückgeführt werden (vgl. Abb. 26). Die Abspaltung von Ammoniak erfolgt nach Ringöffnung an N-1 und C-2 in gleichen Teilen von N-1 und N-6, da beide Positionen nach der Ringöffnung chemisch identisch vorliegen. Aus dieser ringgeöffneten Struktur resultiert auch die Abspaltung der NH₂CN-Gruppe (vgl. Abb. 26B). Die Eliminierung von HCN konnte nach Auswertung der Isotoopenmarkierungs-Experimente mit 90%iger Spezifität auf die Positionen N-1 und C-2 festgelegt werden. Wie in Abb. 26C zu sehen ist, geht dieser Abspaltung eine Ringöffnung zwischen N-1 und C-6 voraus. Als vierter Fragmentierungsweg wurde die Bildung von Ammoniumionen aus N-1 unter Abspaltung einer neutralen, ringgeöffneten Puringrundstruktur nachgewiesen.

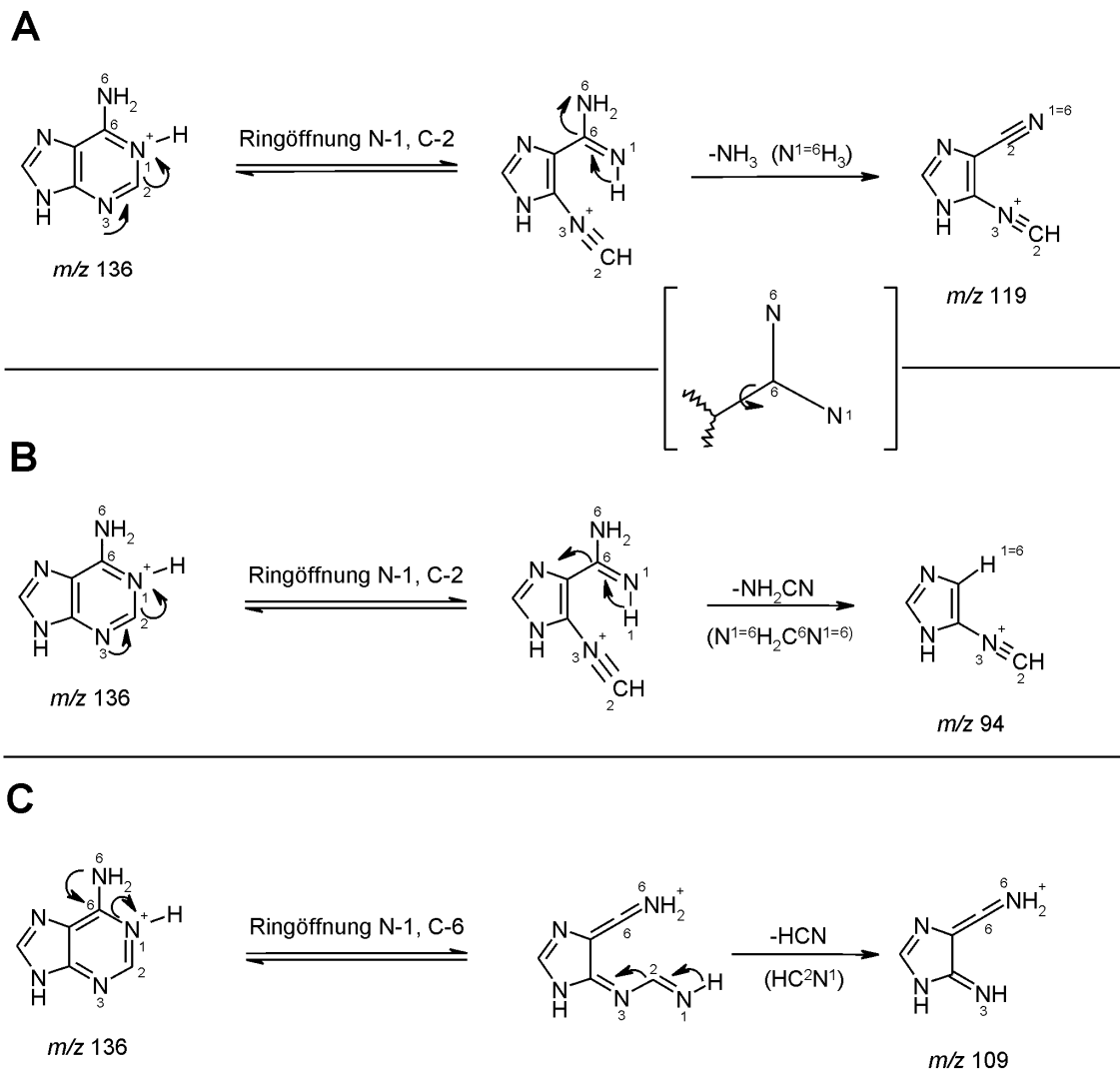
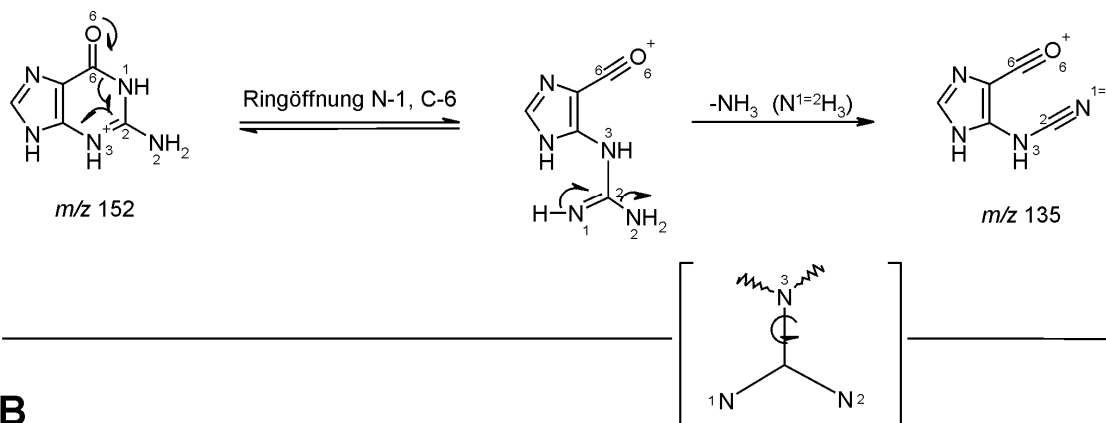


Abbildung 26: Positionsspezifische Initialfragmentierungswege des Adeningrundgerüsts, modifiziert nach Nelson und McCloskey^[165]. A: Neutralverlust Ammoniak, B: Neutralverlust NH_2CN , C: Neutralverlust HCN . N^6 und N^1 sind nach der N-1 / C-2-Ringöffnung chemisch identisch.

Die Fragmentierungshierarchie der Guaninbase ist durch zwei Hauptreaktionen gekennzeichnet: Die Abspaltungen von NH_3 und NH_2CN aus dem Pyrimidinring^[167]. Gregson und McCloskey standen für die Verifizierung der ablaufenden Reaktionen Guaninstandards mit einzelner ^{15}N - und ^{18}O -Markierung aller Heteroatome zur Verfügung. Wahrscheinliche Positionen für den Angriff eines Protons sind N-1, N-3 und O^6 , mit einer 1:1 Mischung aus den entsprechenden Keto- und Enol-Formen. Die beiden genannten Fragmentierungswege werden über eine Ringöffnung an den Positionen N-1 und C-6 eingeleitet. N-1 und N^2 liegen in der Folge chemisch identisch vor. Die anschließenden Abspaltungen

von NH_3 (vgl. Abb. 27A) und NH_2CN (vgl. Abb. 27B) konnten über die ^{15}N -Markierungsexperimente unter äquivalentem Einbezug von N-1 und N⁶ nachgewiesen werden.

A



B

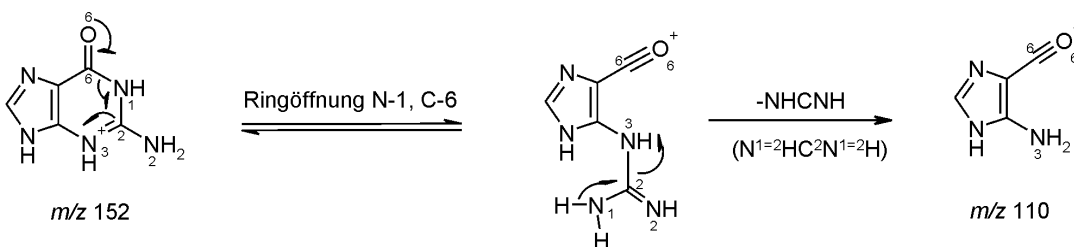


Abbildung 27: Positionsspezifische Initialfragmentierungswege des Guaningrundgerüsts, modifiziert nach Gregson und McCloskey^[167]. A: Neutralverlust NH_3 , B: Neutralverlust NH_2CN als Carbodiimid (NHCNH). N-1 und N² sind nach der Ringöffnung chemisch identisch.

Die CID-Fragmentierung der Uridinbase Uracil ist durch drei Hauptwege charakterisiert. *Nelson und McCloskey* analysierten die beteiligten Positionen mittels ^2H , ^{13}C , ^{15}N und ^{18}O markierter Uracile^[166]. Die Abspaltung von Ammoniak konnte auf die N-3-Position mit anschließender CO-Eliminierung an O⁴ festgelegt werden. Als zweite CID-Reaktion wurde der Verlust eines Wassermoleküls äquivalent an den Positionen O⁴ und O⁶ nachgewiesen, mit darauffolgender, selektiver CO-Eliminierung von den Positionen C-2 und O². Der ablaufende dritte Fragmentierungsweg in Form einer HNCN-Abspaltung konnte mit 90%iger Spezifität den Positionen N-3, C-2 und O⁶ zugeordnet werden (mit einem Anteil von etwa 10% erfolgt diese Reaktion auch an den Positionen N-1, C-2 und O²). Die aufgeführten NH_3 bzw. H_2O -Neutralverluste werden auf eine Pyrimidin-Ringöffnung an den präferierten Protonierungsstellen O⁴ bzw. O⁶

zurückgeführt. Für die HNCO-Abspaltung wird ein Retro-Diels-Alder-Mechanismus angenommen (vgl. Abb. 28C). Die Abspaltung von H₂O konnte bei den eigenen Ionenfallen-Experimenten nicht beobachtet werden, was vermutlich auf die Verwendung unterschiedlicher Kollisionsgase zurückzuführen ist. Das von Nelson eingesetzte Argon zeigt im Vergleich zum in dieser Arbeit verwendeten Helium eine allgemein höhere Fragmentierungseffizienz.

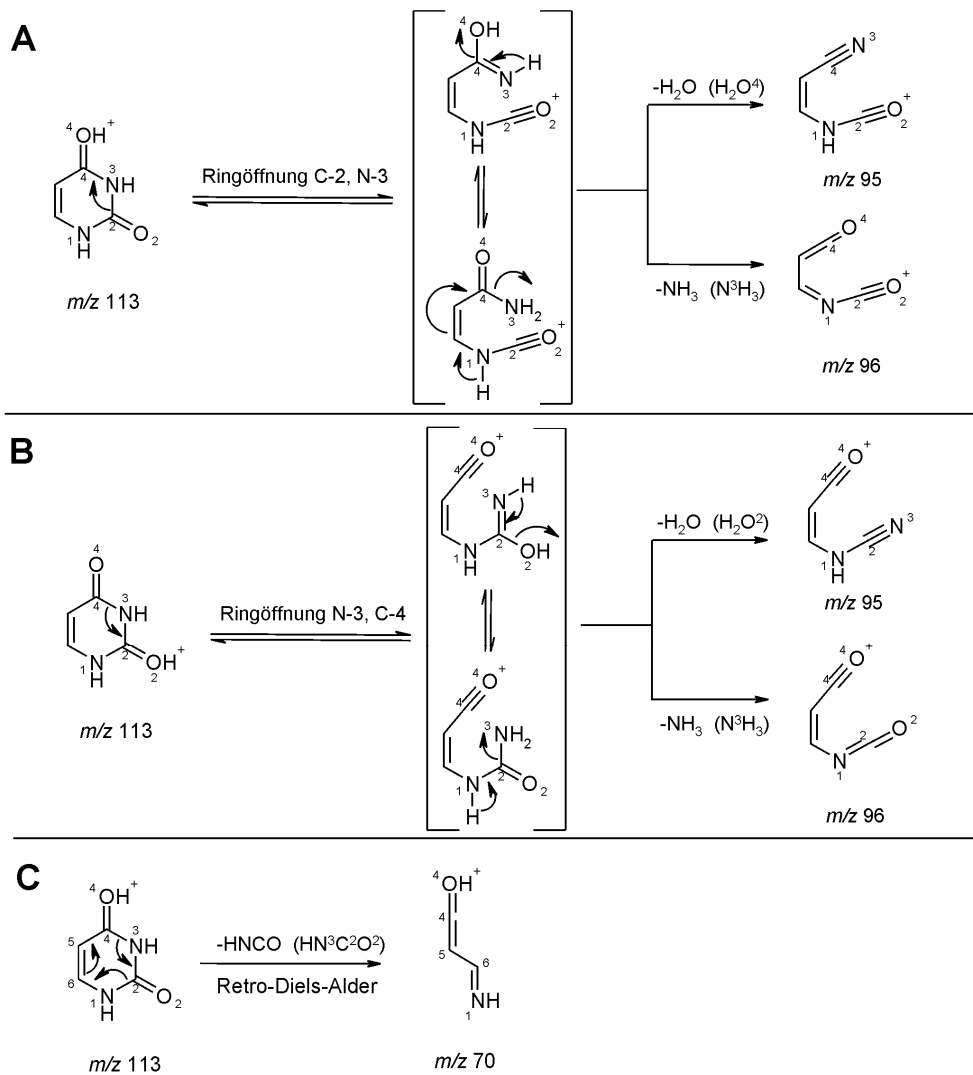
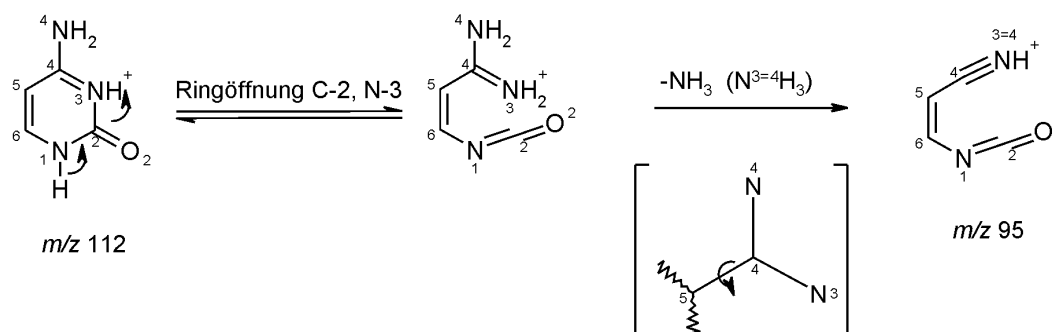


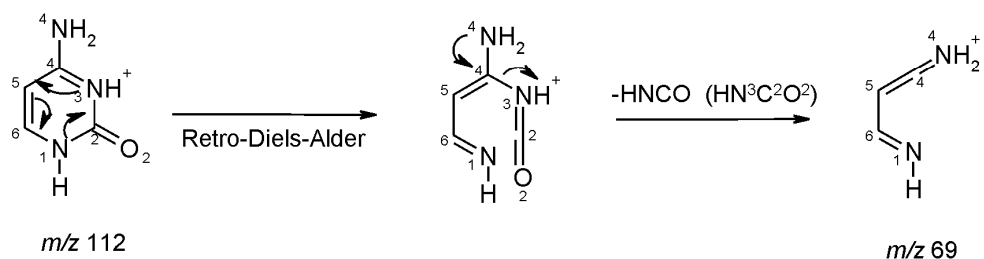
Abbildung 28: Positionsspezifische Initialfragmentierungswege des Uracilgrundgerüsts, modifiziert nach Nelson und McCloskey^[166]. A, B: Neutralverluste von NH₃ und H₂O, C: Neutralverlust HNCO nach einem Retro-Diels-Alder-Mechanismus.

Jensen *et al.* beschrieben CID-Studien zur Fragmentierungshierarchie von Cytidin, Cytosin und abgeleiteter Derivate^[168]. Mittels Ionenfallen-Massenspektrometrie wurden ¹⁵N-markierte Cytidinstandards in MSⁿ-Experimenten untersucht und Reaktionsmechanismen für die ablaufenden Neutralverluste generiert. Als Protonierungsstelle wurde der N-3-Stickstoff angenommen. Es ergaben sich drei Hauptfragmentierungswege mit Neutralverlusten von NH₃, H₂O und HNCO (vgl. Abb. 29).

A



B



C

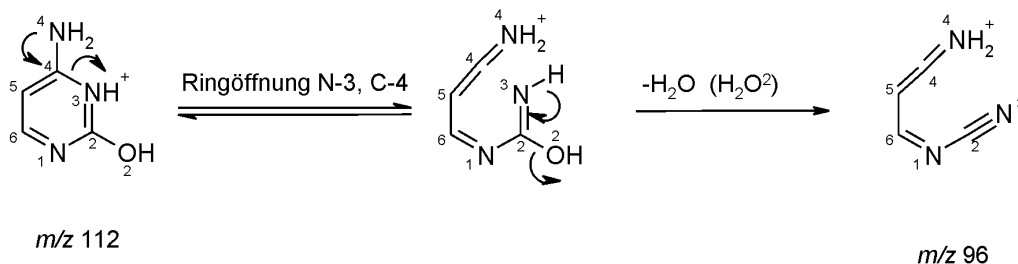


Abbildung 29: Positionsspezifische Initialfragmentierungswege des Cytosinringgrundgerüsts, modifiziert nach Jensen *et al.*^[168]. A: Neutralverlust NH₃, B: Neutralverlust HNCO, C: Neutralverlust H₂O.

Die Ammoniakabspaltung konnte durch die ^{15}N -Markierung äquivalent an den Positionen N-3 und N⁴ nachgewiesen werden. Analog zu Uracil wurde auch beim Cytosin eine initiale Ringöffnung zwischen C-2 und N-3 mit anschließender gleichwertiger NH_3 -Eliminierung an den nun chemisch identischen Stickstoffatomen angenommen (N-1 ist nicht am NH_3 -Verlust beteiligt). Wie auch schon von *Nelson und McCloskey* für die Uracilbase beschrieben, wurde für die Wasserabspaltung im Cytosin eine 1,2-Eliminierungsreaktion aus dem N-3,C-4-Enol-Tautomer angenommen. Der HNC=O-Neutralverlust über einen Retro-Diels-Alder-Mechanismus konnte primär den Atomen N-3, C-2 und O² zugeordnet werden. Ein geringer Prozentsatz dieser Abspaltreaktion wurde in den Fragmentierungsexperimenten der isotopenmarkierten Standards allerdings auch an den kombinierten Positionen N-1, C-2 und O² nachgewiesen.

3.1.4.6 FT-ICR-MS-Messungen

Die semipräparativ aufgereinigten Metaboliten wurden an einem 4,7 Tesla APEX II ESI-FT-ICR-MS der Firma Bruker Daltonics (Bremen) analysiert. Hierzu wurden die Metabolitlösungen mittels Spritzenpumpeninjektion (Flussrate 80 $\mu\text{l/h}$) über eine im 60° -Winkel stehende capillary sprayer needle in das Gerät injiziert. Die Messung erfolgte im positive mode bei einer Capillary Exit Spannung zwischen 15 und 25 V, abhängig von der Stabilität des jeweiligen Metabolits. Für die interne und externe Kalibrierung wurde eine homologe Reihe von Polyethylenglykolen (PEG 400) verwendet. Die Auswertung der generierten, hochaufgelösten Massenspektren erfolgte über die XMASS Software Version 5.0.10 (Bruker Daltonics). Die FT-ICR-MS-Messungen wurden in Kooperation mit Herrn Graeme Nicholson vom Institut für organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Bei einigen Metaboliten konnte aufgrund der extrem geringen Konzentrationen sowie Ionensuppressionseffekten durch den PEG-Kalibranten keine interne Kalibrierung durchgeführt werden. Die in diesen Fällen eingesetzte externe Kalibrierung führte zu deutlich schlechteren Massengenauigkeiten (1,6 - 5,4 ppm, vgl. interne Kalibrierung: 0,01 – 0,8 ppm). In den Abb. 30 und 31 sind die mit interner Kalibrierung generierten FT-MS-Spektren der Metaboliten m/z 286 und m/z 427 gezeigt.

Durch die Bestimmung der exakten Massenposition konnten für jede Verbindung Summenformelvorschläge generiert werden. Die Liste möglicher Molekularzusammensetzungen konnte über bereits bekannte Eigenschaften der jeweiligen, unbekanntes Verbindung stark eingegrenzt werden. So wurden aus den Daten der Auto-LC-MS³-Analytik generell Na⁺- und K⁺-Addukte ausgeschlossen, da entsprechende Verbindungen keine reguläre MS³-Fragmentierung aufweisen. Der Ausschluss chlorierter und bromierter Verbindungen erfolgte anhand des Isotopenmusters. Aufgrund der charakteristischen Neutralverluste in MS² (z.B. 132 Da für dehydratisierte Ribose) wurde eine generelle Mindestanforderung an die Summenformel über die konjugierte Zuckereinheit definiert.

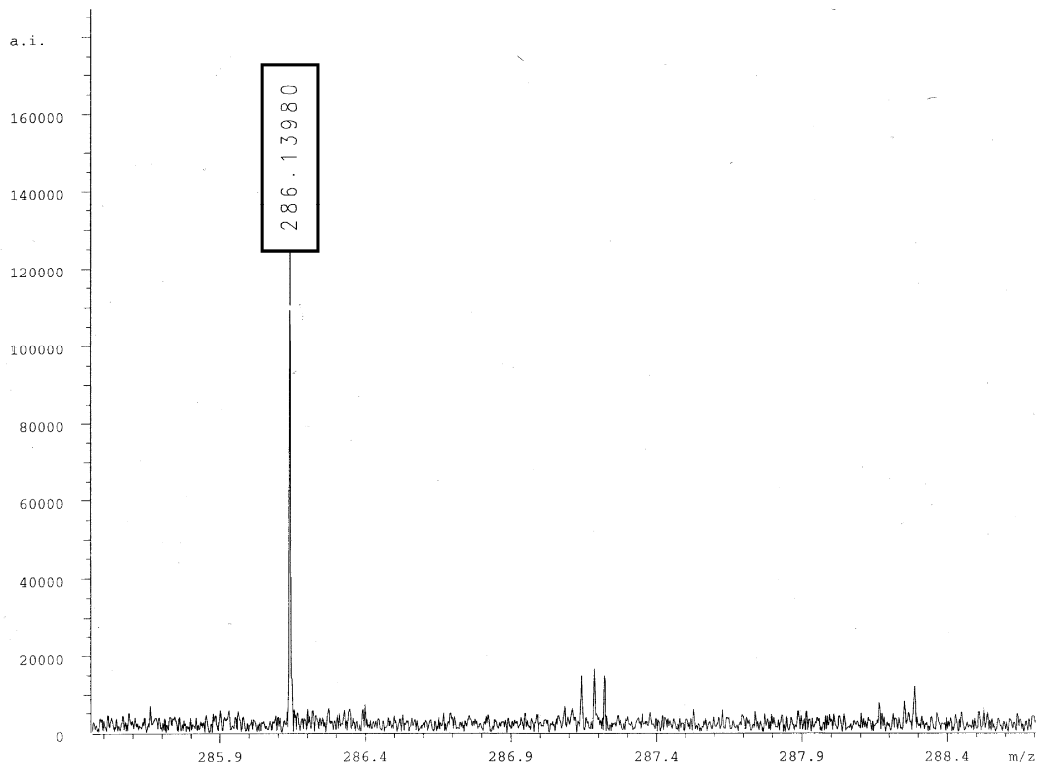


Abbildung 30: FT-ICR-MS-Spektrum von Metabolit Nr. 9 (m/z 286).

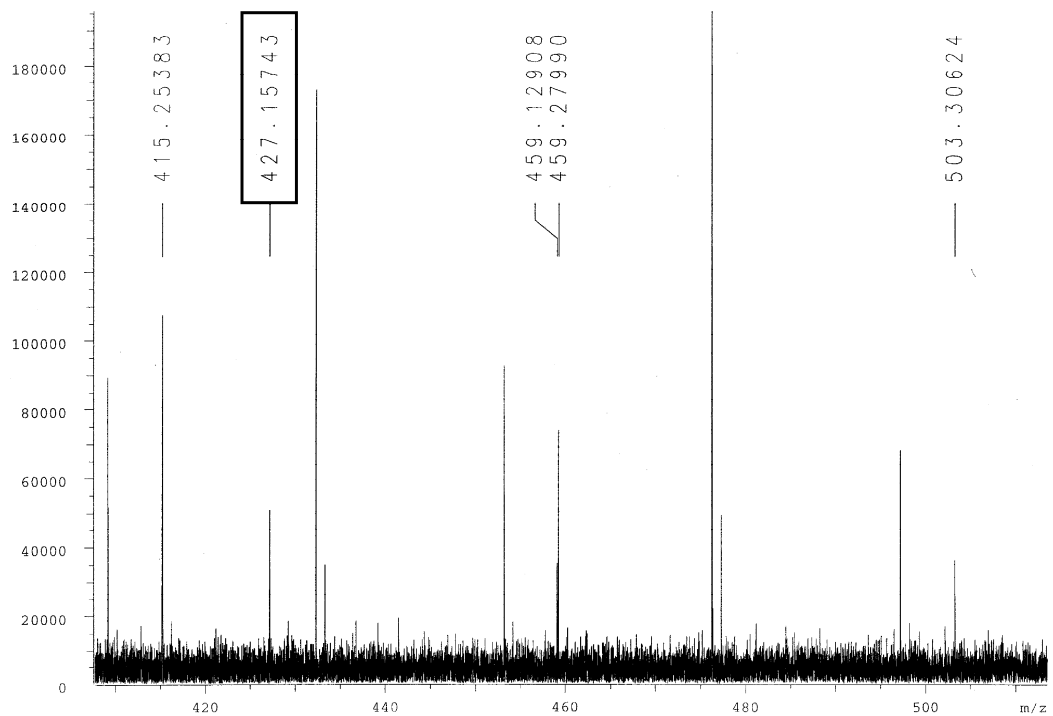


Abbildung 31: FT-ICR-MS-Spektrum von Metabolit Nr. 21 (m/z 427).

Die Eliminierung der neutralen, dehydratisierten Riboseeinheit ($C_5H_8O_4$) ist grundsätzlich nur an der labilen C-N-glykosidischen Bindung zu beobachten. Da alle untersuchten Metaboliten einen charakteristischen Zucker-Neutralverlust aufwiesen, konnte die Mindestanforderung an die Summenformel auf $C_5H_{10}O_4N$ erweitert werden. Diese grundlegende Anforderung konnte für einzelne untersuchte Metaboliten spezifisch angepasst und erweitert werden. Aus der MS^n -Fragmentierung wurden die detektierten Neutralverluste (NH_3 , H_2O , CH_3OH , $HCOOH$, HCN , CO usw.) mit der entsprechenden molekularen Zusammensetzung zur Mindestanforderung der Summenformel addiert.

Aus der generierten Molekularzusammensetzung lässt sich ein weiterer wichtiger Hinweis auf die Struktur eines unbekanntes Metabolits gewinnen. Über die Berechnung der *Doppelbindungsäquivalente* (*DBE*) nach Gl. 3 kann auf die Anzahl an Mehrfachbindungen und Ringschlüssen geschlossen werden.

$$DBE = \frac{(2n + 2) - (m - k)}{2} \quad \text{für } C_nH_mO_lN_k \quad (3)$$

So ergibt sich beispielsweise für Adenosin mit Summenformel $C_{10}H_{13}N_5O_4$ ein DBE-Wert von 7: drei Ringsysteme in Ribose und Puringerüst sowie vier Doppelbindungen im Puringerüst. Zu beachten ist, dass die gewählten Elemente jeweils nur in ihrem niedrigsten Valenzzustand berücksichtigt werden. Eine S-O-Doppelbindung wie beispielsweise in Sulfoxiden wird demnach nicht gezählt, da der Schwefel in diesem Fall die erhöhte vierwertige Bindigkeit aufweist. Bei der Berechnung von ESI-generierten Analyten muss für den korrekten, DBE-Wert das im Ionisierungsprozess addierte Proton (H^+) abgezogen werden (der DBE-Wert erhöht sich hierbei um 0,5 und wird geradzahlig). Bei Verbindungen die bereits im Grundzustand kationisch vorliegen, hängt der korrespondierende DBE-Wert von der formulierten mesomeren Grenzstruktur ab. Ein Beispiel hierfür ist das bereits von *Frickenschmidt* beschriebene, kationische NA-R (vgl. Abb. 32)^[157].

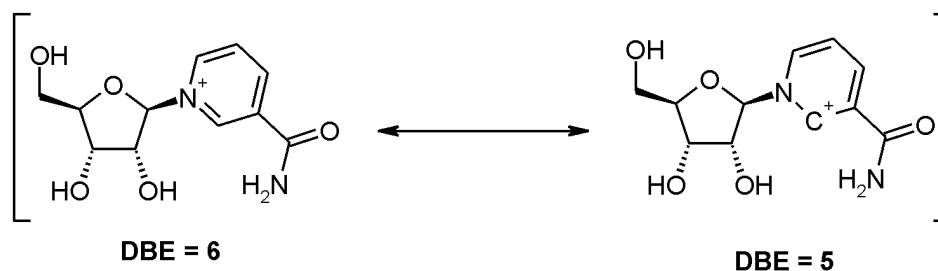


Abbildung 32: Doppelbindungsäquivalente (DBE) im kationischen NA-R.

Die FT-ICR-MS-Messungen der semipräparativ aufgereinigten Metaboliten ergaben die in Tab. 8 aufgeführten Analysenwerte. Über die generierten Summenformelvorschläge wurden die entsprechenden DBE-Werte errechnet.

Tabelle 8: FT-MS-Resultate der semipräparativ aufgereinigten Metaboliten. SF: Summenformelvorschlag, DBE: Doppelbindungsäquivalente, EC: externe Kalibrierung, IC: interne Kalibrierung. Nummerierung analog zu Tab. 7.

Nr.	Masse [MH] ⁺	SF [MH] ⁺	Δ ppm	DBE
1	302,133096	C ₁₂ H ₂₀ N ₃ O ₆	-5,182 (EC)	4/5
2	288,117455	C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O ₆	-5,403 (EC)	5
3	259,092493	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₆	0,116 (IC)	5
4	255,097021	C ₁₁ H ₁₅ N ₂ O ₅	-2,066 (EC)	5/6
5	212,091875	C ₁₀ H ₁₄ NO ₄	0,665 (IC)	4/5
6	346,124416	C ₁₃ H ₂₀ N ₃ O ₈	-0,217 (IC)	6
7	302,098211	C ₁₁ H ₁₆ N ₃ O ₇	-0,215 (IC)	6
8	228,086564	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅	-0,373 (IC)	4/5
9	286,139795	C ₁₂ H ₂₀ N ₃ O ₅	0,168 (IC)	5
10	259,103713	C ₉ H ₁₅ N ₄ O ₅	0,066 (IC)	5
11	275,087519	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₇	0,516 (IC)	5
12	300,155447	C ₁₃ H ₂₂ N ₃ O ₅	0,166 (IC)	5
13	384,115290	C ₁₄ H ₁₈ N ₅ O ₈	0,784 (IC)	9
14	314,171190	C ₁₄ H ₂₄ N ₃ O ₅	0,455 (IC)	5
15	314,091755	C ₁₁ H ₁₆ N ₅ O ₄ S	0,013 (IC)	7
16	398,147732	C ₁₆ H ₂₄ N ₅ O ₅ S	-3,853 (EC)	8
17	326,146067	C ₁₃ H ₂₀ N ₅ O ₅	0,527 (IC)	7
18	333,075056	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O ₇ S	-0,126 (IC)	6
19	328,186588	C ₁₅ H ₂₆ N ₃ O ₅	-0,332 (IC)	5
20	362,170440	C ₁₈ H ₂₄ N ₃ O ₅	-1,677 (EC)	9
21	427,157426	C ₁₆ H ₂₃ N ₆ O ₈	0,557 (IC)	9
22	459,129077	C ₁₆ H ₂₃ N ₆ O ₈ S	-0,396 (IC)	9
23	342,202622	C ₁₆ H ₂₈ N ₃ O ₅	0,804 (IC)	5

3.1.4.7 LC-ESI-*oa*-TOF-MS-Messungen

In Kooperation mit der Firma Bruker Daltonics wurde die Urinprobe einer Brustkrebspatientin auf unbekannte ribosylierte Metaboliten mit LC-ESI-TOF-MS-Analytik untersucht^[169]. Mit dieser Technik sind Massengenauigkeiten unter 5 ppm sowie die Messung des exakten Isotopenmusters möglich. Letztere, ausgedrückt über den sogenannten SigmaFit™-Wert, stellt neben der exakten Masse ein zusätzliches Kriterium für die Generierung eines Summenformelvorschlags dar^[170;171]. Ein Wert von $\leq 0,05$ wird im Allgemeinen als valide eingestuft^[172]. Die mit der GMF™-Software errechnete Molekularzusammensetzung wurde in Verbindung mit den Fragmentierungsdaten aus den LC-IT-MS³-Messungen^[160] für eine Datenbanksuche (SciFinder) eingesetzt. Hierdurch gelang es, fünf literaturbekannte Metaboliten im analysierten Urin zu identifizieren (Nr. 1-5, Tab 9). Zur Überprüfung der analytischen Verlässlichkeit der eingesetzten Methode wurde analog zur Urinprobe ein Nucleosidstandard mit bekannten Verbindungen untersucht (Nr. 6-11, Tab. 9).

Tabelle 9: Ergebnisse der ESI-*oa*-TOF-MS-Messungen, SF: Summenformelvorschlag. Kursiv: bekannte Standardnucleoside.

Nr.	RT	Masse [MH] ⁺	SF [MH] ⁺	Δ ppm	SigmaFit	Metabolit
1	3,0	259,0925	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₆	0,329	0.0072	IAA-R
2	7,0	346,1259	C ₁₃ H ₂₀ N ₃ O ₈	3,930	0,0038	acp ³ U
3	17,5	298,1154	C ₁₁ H ₁₆ N ₅ O ₅	2,685	0,0556	m ⁷ G
4	21,5	296,1358	C ₁₂ H ₁₈ N ₅ O ₄	1,473	0,0044	m ¹ ₆ A
5	24,5	384,1171	C ₁₄ H ₁₈ N ₅ O ₈	5,374	0,0039	N ⁶ -SAR
6	4,3	247,0926	<i>C₉H₁₅N₂O₆</i>	<i>0,651</i>	<i>0,0026</i>	<i>DHU</i>
7	12,0	282,1190	<i>C₁₁H₁₆N₅O₄</i>	<i>0,752</i>	<i>0,0051</i>	<i>m¹A</i>
8	29,0	283,1041	<i>C₁₁H₁₅N₄O₅</i>	<i>1,537</i>	<i>0,0068</i>	<i>m¹I</i>
9	32,5	286,1036	<i>C₁₁H₁₆N₃O₆</i>	<i>1,003</i>	<i>0,0042</i>	<i>ac⁴C</i>
10	41,5	312,1309	<i>C₁₂H₁₈N₅O₅</i>	<i>2,190</i>	<i>0,0086</i>	<i>m²₂G</i>
11	46,5	413,1437	<i>C₁₅H₂₁N₆O₈</i>	<i>5,173</i>	<i>0,0064</i>	<i>t⁶A</i>

Die erhaltenen Ergebnisse korrelieren mit den Daten aus den anschließend in dieser Arbeit durchgeführten FT-MS / IT-MSⁿ-Messungen.

3.1.5 Metabolitenidentifizierung mit kombinierten massenspektrometrischen Techniken

Die mit IT-MSⁿ gemessenen Fragmentierungshierarchien wurden in Kombination mit den charakteristischen, über hochauflösende FT-MS-Messungen erhaltenen Molekularzusammensetzungen zur Strukturaufklärung der unbekannt Metaboliten eingesetzt. Es konnten verschiedene Strukturklassen identifiziert werden, die sich anhand der Grundstruktur des an die Ribose konjugierten Heterozyklus einteilen lassen. Neben den Pyrimidin- und Purinbasen aus der Klasse der modifizierten Nucleoside wurden diverse Pyridin- und Imidazolkomponenten gefunden. Die identifizierten Metaboliten konnten in allen untersuchten 24h-Urinproben der Studie AKP-24 detektiert werden und ließen sich auch in den im Verlauf dieser Arbeit analysierten Urinen gesunder Kontrollprobanden nachweisen. Im Folgenden wird die Strukturaufklärung der einzelnen Stoffwechselprodukte, nach Metabolitenklasse geordnet, vorgestellt.

3.1.5.1 Modifizierte Nucleoside

Aus der Klasse der modifizierten Nucleoside konnten insgesamt acht Komponenten identifiziert werden. Alle Verbindungen zeigten in den Auto-LC-MS³-Messungen den üblichen Neutralverlust von 132 Da in MS² und tragen somit eine unmodifizierte, konjugierte Riboseeinheit.

Adenosin-Strukturen

- In DC-Fraktion 2 der untersuchten Patientenproben konnte ein Metabolit mit m/z 398 (Nr. 16, Tab. 7/8) detektiert werden. In der RNA-Datenbank^[94] sind zwei mögliche Strukturvorschläge modifizierter Nucleoside mit äquivalentem m/z -Verhältnis aufgeführt (2-Methylthio-N⁶-(cis-hydroxyiso-pentenyl)-adenosin und 5-Taurinomethyl-2-thiouridin). Ausgehend von der Summenformelberechnung $[C_{16}H_{24}N_5O_5S]^+$ aus den FT-MS-Messungen konnte der Uridinmetabolit ausgeschlossen werden. Der aufgeführte Adenosinmetabolit weist hingegen eine exakt übereinstimmende Molekularzusammensetzung auf. Weitere Informationen für die eindeutige Strukturaufklärung ergeben sich aus der Fragmentierungshierarchie der IT-MSⁿ-Messungen, welche in Abb. 33 gezeigt ist.

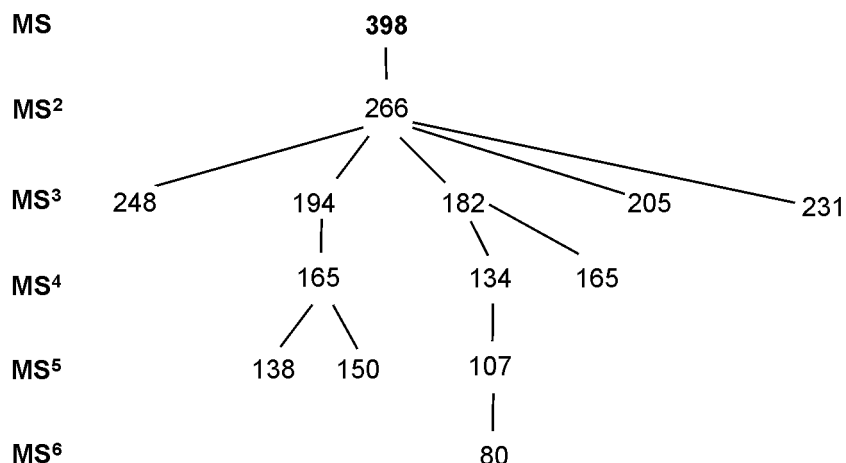


Abbildung 33: Schematische Darstellung der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von 2-Methylthio-N⁶-(cis-hydroxyiso-pentenyl)-adenosin (ms^2io^6A , m/z 398).

In Abb. 34 sind die korrespondierenden Fragmentierungsreaktionen (vgl. Tab. 7) unter Einbezug der postulierten Reaktionsmechanismen dargestellt, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll. Fragmentierungsweg **A** zeigt, ausgehend von der protonierten Purinbase m/z 266, eine Wassereliminierung an der N⁶-substituierten Seitenkette zu m/z 248 unter Erweiterung des konjugierten Systems. Fragmentierungsweg **B** beginnt mit der charakteristischen Abspaltung von 2-Methyl-prop-2-en-1-ol ($-72 \Delta m$) aus der Hydroxyisopentenyl-Einheit des modifizierten Adenosins über einen 1,2-Eliminierungsmechanismus. Dem folgenden Neutralverlust von CH₂NH zu m/z 165 im MS⁴-Schritt schließen sich zwei MS⁵-Fragmentierungen an. Die Abspaltung des Methylradikals in der Methylthiofunktion führt zu Fragment m/z 150. Der HCN-Neutralverlust zu Fragment-Ion m/z 138 findet vermutlich im Imidazolring der Purinstruktur unter Ringverengung zum Azirin statt. Analoge Reaktionen wurden von *Oresmaa et al.* für verschiedene Imidazolderivate beschrieben^[173]. Fragmentierungsweg **C** wird aus der an N-1 protonierten Purinbase durch Abspaltung von 2-Methylbuta-2,3-dien-1-ol über eine McLafferty-Umlagerung eingeleitet. In der resultierenden 2-Methylthioadenin-Struktur m/z 182 erfolgen, analog zu den von *Nelson et al.* für Adenin beschriebenen Vorgängen, Pyrimidin-Ringöffnungen an den Positionen N-1 und C-2 bzw. N-1 und C-6 (vgl. Abb. 26B/C). Erstere resultiert in einem NH₃-Neutralverlust in MS⁴, der nach *Nelson und McCloskey*

äquivalent von den Positionen N-1 und N⁶ abläuft, da beide Stickstoffe nach der Ringöffnung frei drehbar und somit chemisch identisch sind^[165].

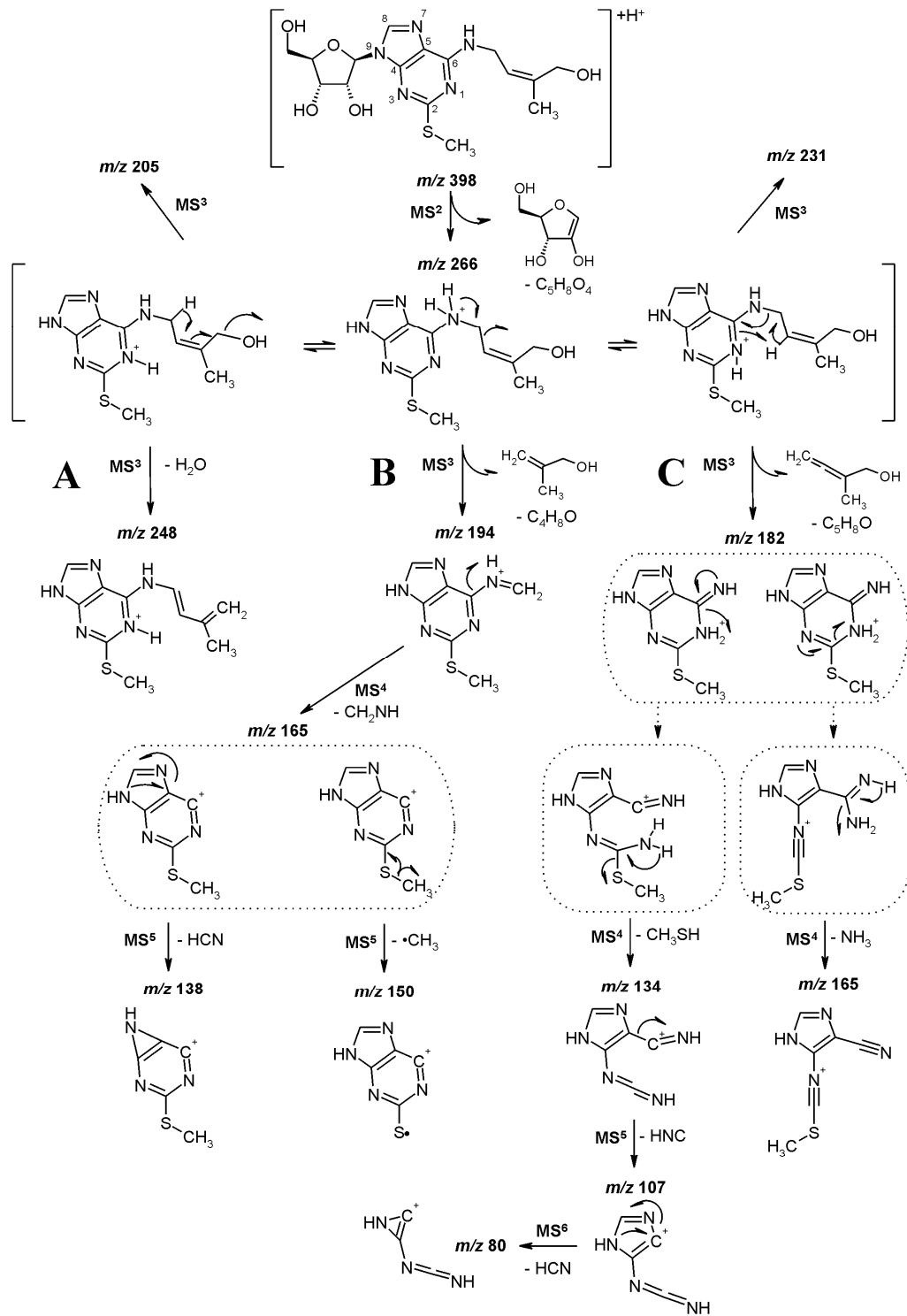


Abbildung 34: Postulierte Fragmentierungsmechanismen von 2-Methylthio-N⁶-(cis-hydroxyisopentenyl)-adenosin (ms²io⁶A, m/z 398).

Die Öffnung des Pyrimidinrings an N-1 / C-6 führt im weiteren Verlauf zu einer charakteristischen Abspaltung von CH_3SH ($-48 \Delta m$) an der C-2-Position durch 1,2-Eliminierung. Im darauffolgenden MS^5 -Schritt erfolgt ein HNC-Neutralverlust zu m/z 107, dem sich in MS^6 eine Abspaltung von HCN im Imidazolring unter Ringverengung zur entsprechenden Azirin-Struktur m/z 80 anschließt. Anhand der charakteristischen MS^n -Fragmentierung und dem Summenformelvorschlag aus den FT-MS-Messungen konnte der unbekannte Metabolit m/z 398 als 2-Methylthio- N^6 -(cis-hydroxyisopentenyl)-adenosin identifiziert werden. Dieses modifizierte Nucleosid wurde bereits in eigenen vorangegangenen Arbeiten detektiert^[157], die endgültige Verifizierung der Struktur gelang jedoch erst in dieser Arbeit. In der Literatur ist $\text{ms}^2\text{io}^6\text{A}$ bislang nicht als Bestandteil des menschlichen Urins beschrieben.

• Ein Metabolit mit m/z 427 (Nr. 21, Tab. 7/8) konnte primär aus DC-Fraktion 9 isoliert werden. In den durchgeführten FT-MS-Messungen wurde ein exaktes Masse / Ladungs-Verhältnis von 427,157426 bestimmt. Für den korrespondierenden Summenformelvorschlag $[\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_8]^+$ ergaben sich bei der Suche in der RNA-Datenbank^[94] zwei hypermodifizierte Nucleoside als mögliche Metabolitstrukturen (N^6 -Hydroxynorvalylcarbamoyladenosin (hn^6A) und N^6 -Methyl- N^6 -threonylcarbamoyladenosin ($\text{m}^6\text{t}^6\text{A}$)). Die genannten Verbindungen unterscheiden sich in der Stellung einer Methylfunktion (vgl. Abb. 35).

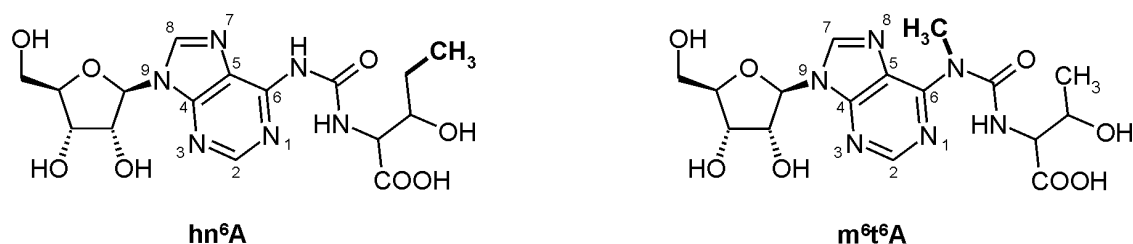


Abbildung 35: Strukturvorschläge für stellungsisomere, modifizierte Nucleoside der Summenformel $[\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_8]^+$ aus der RNA-Datenbank^[94].

Bei der weiteren Strukturaufklärung wurden die Vorteile einer MS^n -Fragmentierung ($n > 3$) deutlich. Während die LC-gekoppelte MS^3 -Fragmentierung noch ein zunächst ein wenig aussagekräftiges Muster lieferte (m/z 427 \rightarrow m/z 295 \rightarrow m/z 150), ergaben sich bereits im darauffolgenden MS^4 -Schritt erste eindeutige Hinweise auf die zugrundeliegende Basisstruktur. Das MS^4 -Spektrum war

identisch mit dem MS³-Spektrum der Standardkomponente m⁶A (vgl. Abb. 36) und ließ folglich bereits auf die Methylierung der N⁶-Position und damit m⁶t⁶A schließen.

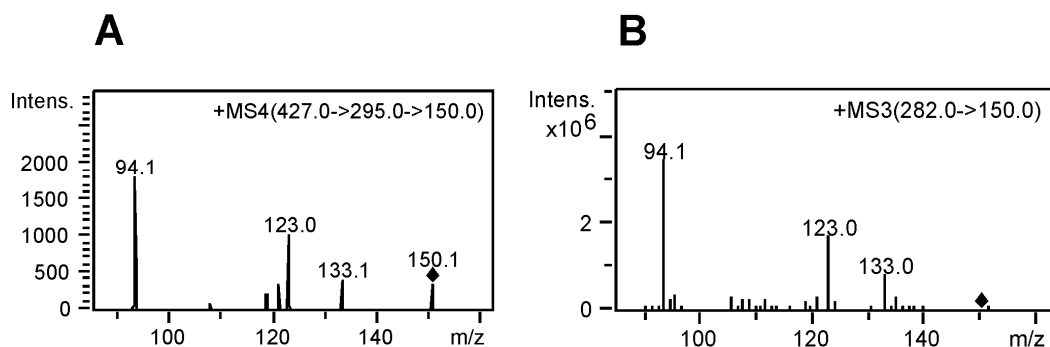


Abbildung 36: Vergleich des MS⁴-Spektrums von Metabolit m/z 427 aus den MSⁿ-Spritzenpumpenmessungen (A) mit dem MS³-Spektrum der Standardkomponente m⁶A aus LC-Auto-MS³-Messungen (B).

Für die weitere Verifizierung dieser Annahme wurde eine Abspaltung der Threonineinheit unter alkalischen Bedingungen durchgeführt, wie sie bereits von *Chedda et al.* für t⁶A^[174] und *Kimura-Harada et al.* für m⁶t⁶A aus *E.coli*-tRNA^[175] beschrieben wurde.

Zur Überprüfung der Reaktionsbedingungen wurde zunächst der vorhandene Standard t⁶A, das N⁶-demethylierte Analogon zu m⁶t⁶A untersucht. Hierzu wurde eine Lösung von t⁶A in 0,1 N Natronlauge angesetzt (~0,1 mg/ml) und diese in einem Glasvial für 40 min bei 100°C im Wasserbad zur Reaktion gebracht. Die Lösung wurde anschließend im Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von ~ 5 eingestellt und mit LC-MS-Methode 4 (vgl. 5.3.3.5) analysiert. Für die alkalische Hydrolyse wurde bei t⁶A die Abspaltung der Adenosinstruktur nach folgendem Reaktionsschema erwartet:

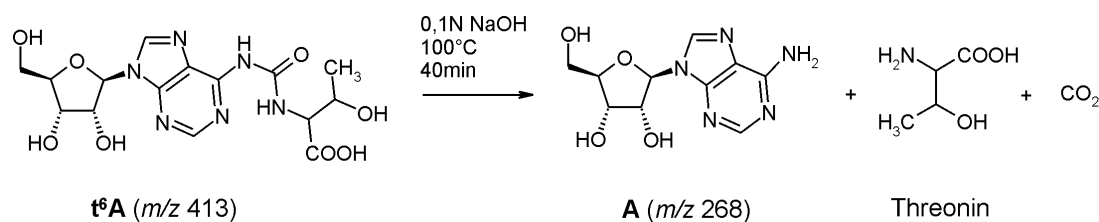


Abbildung 37: Reaktionsschema der alkalischen Hydrolyse des Standards t⁶A.

Der vermutete Reaktionsablauf konnte mit den durchgeführten Auto-LC-MS³-Messungen bestätigt werden.

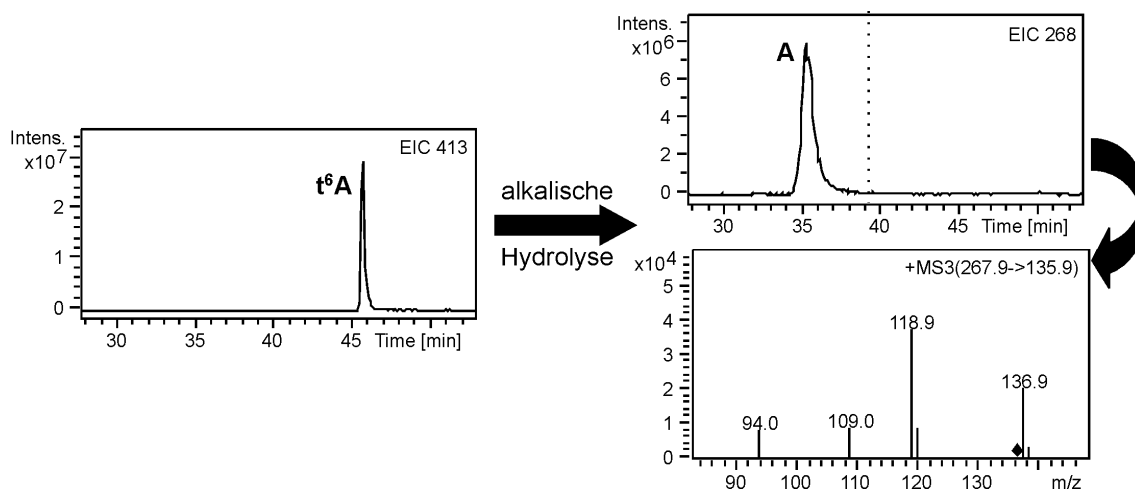


Abbildung 38: Auto-LC-MS³-Messungen vor und nach alkalischer Hydrolyse von t^6A mit MS³-Spektrum des gebildeten Adenosins.

Für die unbekannte Verbindung m/z 427 wird bei Betrachtung der beiden in Frage kommenden Strukturvorschläge in Abb. 35 ein analoger Reaktionsverlauf angenommen. Zur praktischen Versuchsdurchführung wurden 100 μ l der semipräparativ aufgereinigten Lösung von m/z 427 mit 100 μ l 0,2 N NaOH versetzt und analog zum t^6A -Standard hydrolysiert. Sollten sich die auf den IT-MSⁿ-Messungen beruhenden Vermutungen der m^6t^6A -Struktur bestätigen, würde unter den gegebenen Bedingungen die Abspaltung der Threonineinheit zur Freisetzung des Nucleosids m^6A führen (vgl. Abb. 39).

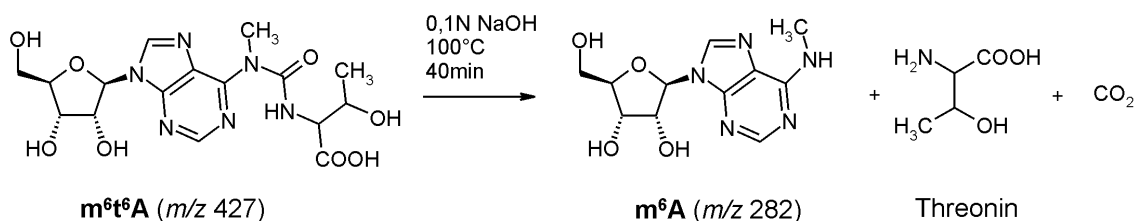


Abbildung 39: Reaktionsschema für die alkalische Hydrolyse von m^6t^6A .

Dagegen würde die alkalische Hydrolyse von hn^6A analog zur t^6A -Reaktion das AdenosinGrundgerüst abspalten. Aus den durchgeführten Versuchen konnte somit direkt auf die zugrundeliegende Struktur des zu identifizierenden Metabolits anhand des freigesetzten Nucleosids geschlossen werden. Die Durchführung ergab wie in Abb. 40 zu sehen eine Umsetzung zum Nucleosid m^6A . Dies

konnte über identische Retentionszeiten und Auto-MS³ Fragmentierungsmuster mit der entsprechenden Standardverbindung verifiziert werden.

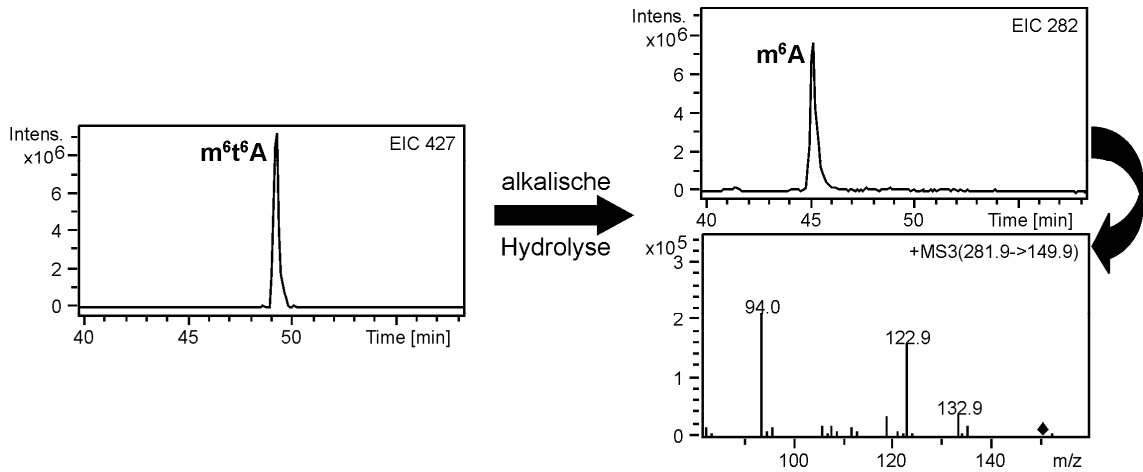


Abbildung 40: Auto-LC-MS³-Messungen vor und nach alkalischer Hydrolyse von m/z 427, MS³ Spektrum des Spaltproduktes m⁶A.

Die durchgeführten IT-MSⁿ-Messungen ergaben die in Abb. 41 gezeigte, vollständige Fragmentierungshierarchie.

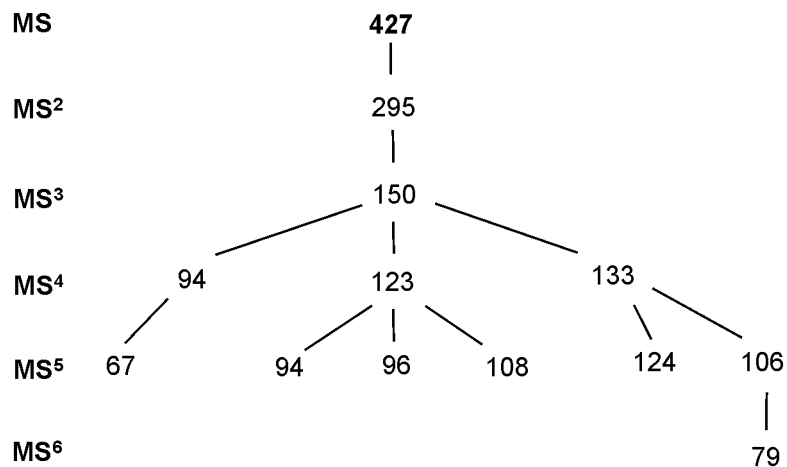


Abbildung 41: Schematische Darstellung der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von N⁶-Methyl-N⁶-threonylcarbamoyladenodin (m⁶t⁶A, m/z 427).

Die korrespondierenden Fragmentierungsreaktionen mit den postulierten Reaktionsmechanismen sind in Abb. 42 dargestellt.

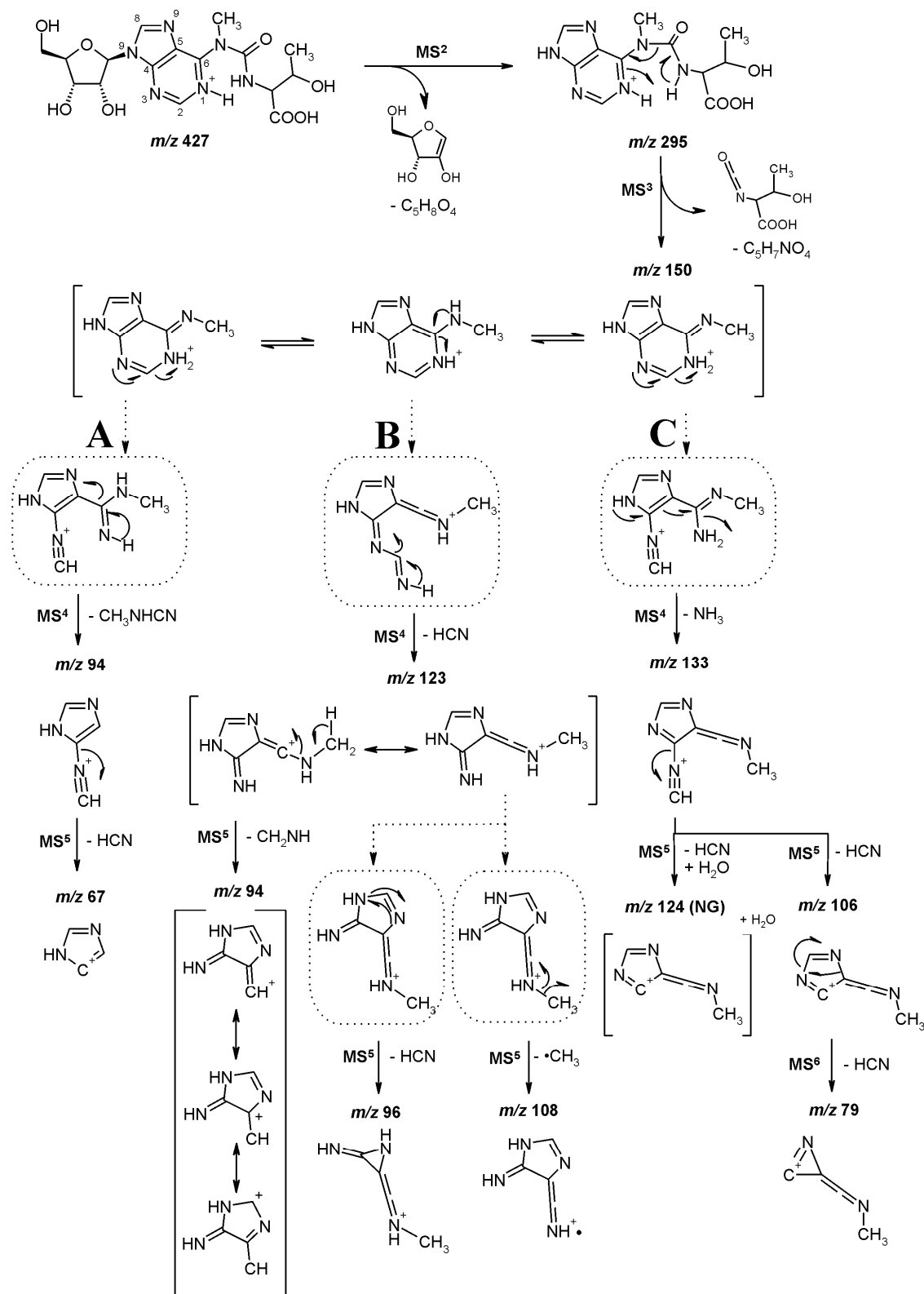


Abbildung 42: Postulierte Fragmentierungsmechanismen von N^6 -Methyl- N^6 -threonylcarbamoyladenine (m^6tA , m/z 427), NG: neutral gain.

Nach der üblichen Abspaltung der dehydratisierten Riboseeinheit (-132 Δm) in MS^2 erfolgt im anschließenden MS^3 -Schritt die Eliminierung von 3-Hydroxy-2-isocyanatobutansäure ($C_5H_7NO_4$) über eine McLafferty-Umlagerung. Verschiedene Ringöffnungs-Reaktionen, analog zu den Mechanismen bei Adenin (vgl. Abb. 26), leiten den darauffolgenden MS^4 -Zyklus von m/z 150 (entspricht protoniertem 6-Methyladenin) ein. Es ergeben sich drei Hauptfragmentierungswege. Fragmentierungsweg **A** beginnt, ausgehend von einer N-1 / C-2-Öffnung, mit dem Neutralverlust von CH_3NHCN über eine 1,2-Eliminierungsreaktion. Aus dem resultierenden Tochterfragment m/z 94 erfolgt schließlich die Abspaltung von HCN zum Imidazol-Kation m/z 67. Mit einer HCN -Eliminierung startet Fragmentierungsweg **B**. *Nelson und McCloskey* konnten auch bei methylierten Adeninderivaten den präferierten Austritt der Blausäure unter Involvement der Positionen N-1 und C-2 mit initialer Pyrimidin-Ringöffnung an C-6 und N-1 festlegen^[165]. Aus dem gebildeten Tochterion m/z 123 bilden sich im anschließenden MS^5 -Zyklus drei Folgefragmente. Über einen 1,2-Eliminierungsmechanismus erfolgt der Austritt von CH_2NH unter Bildung von m/z 94. Neben der Abspaltung eines Methylradikals zu m/z 108 kommt es zu einem HCN -Neutralverlust, vermutlich im Imidazolsystem unter Ringverengung zur formalen Aziridin-Struktur m/z 96. Denkbar ist bei letztgenannter Reaktion auch die Involvement des Iminosubstituenten (Eliminierung von HNC). Fragmentierungsweg **C** beginnt nach Ringöffnung an N-1 / C-2 mit einer NH_3 -Eliminierung zum Fragment-Ion m/z 133. Im anschließenden MS^5 -Schritt ergeben sich zwei Tochterfragmente aus einer HCN -Abspaltung an C-4, wobei m/z 124 durch eine konzertierte Wasseranlagerung (neutral gain) gebildet wird. Aus m/z 106 erfolgt in MS^6 eine weitere HCN -Eliminierung im Imidazol unter Ringverengung zur Azirin-Struktur m/z 79.

Aus der Kombination charakteristischer MS^n -Fragmentierung, Summenformelvorschlag sowie nasschemischer Verfahren (alkalische Hydrolyse), konnte der unbekannte Metabolit m/z 427 als N^6 -Methyl- N^6 -threonylcarbamoyladenosen (m^6t^6A) identifiziert werden. Dieses hypermodifizierte Nucleosid wurde bislang nicht in humanem Urin detektiert.

• Ein weiteres hypermodifiziertes Nucleosid mit m/z 459 (Nr. 22, Tab. 7/8), isoliert aus DC-Fraktion 9, konnte in dieser Studie strukturell aufgeklärt werden. Die FT-MS-Messungen ergaben eine molekulare Zusammensetzung von $[C_{16}N_{23}N_6O_8S]^+$, welche wiederum auf das aus der RNA-Datenbank bekannte, schwefelhaltige t^6A -Derivat 2-Methylthio- N^6 -threonylcarbamoyladenosen (ms^2t^6A) hindeutete. Da es sich also potentiell um ein hypermodifiziertes Adenosin mit Threonyl-Seitenkette handeln konnte, wurde, wie bei t^6A und m^6t^6A beschrieben, eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Analog zu den bereits beschriebenen Hydrolysereaktionen müsste bei der postulierten Struktur 2-Methylthioadenosin (ms^2A) nach folgendem Reaktionsschema entstehen:

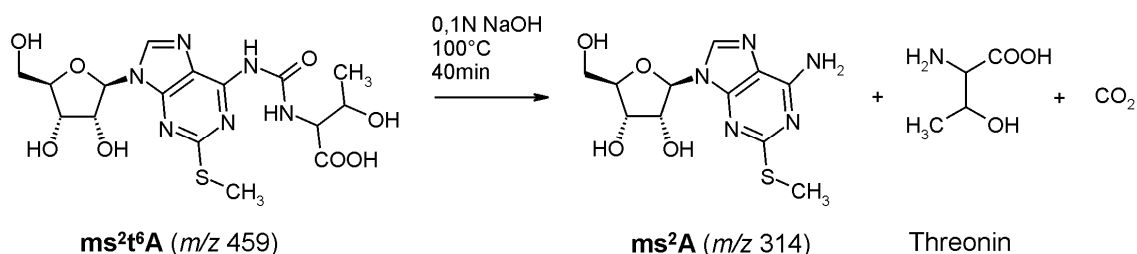


Abbildung 43: Reaktionsschema für die alkalische Hydrolyse von ms^2t^6A .

Anders als bei t^6A und m^6t^6A war ms^2A nicht als Standard erhältlich, und konnte somit nicht zur Vergleichsmessung mit dem abgespaltenen Nucleosidrest herangezogen werden.

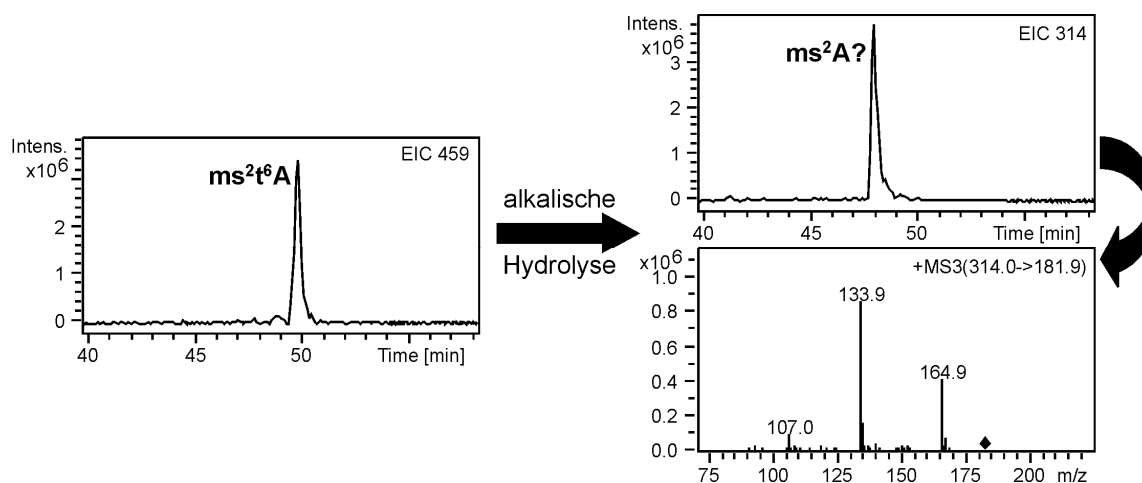


Abbildung 44: Auto-LC- MS^3 -Messungen vor und nach alkalischer Hydrolyse von m/z 459, MS^3 -Spektrum des Spaltproduktes (vermutlich ms^2A).

Die Auto-LC-MS³-Messungen ergaben wie erwartet die Abspaltung einer Verbindung mit m/z 314, passend zu ms²A (vgl. Abb. 44). Auch das erhaltene Fragmentierungsmuster mit dem Riboseneutralverlust (-132 Δm) im MS²-Schritt und der charakteristischen Eliminierung der CH₃SH-Funktion (48 Da, m/z 182 → m/z 134) in der Nucleobase ließen auf die ms²A-Struktur schließen.

Weitere Aspekte für die strukturelle Aufklärung konnten über die durchgeführten IT-MSⁿ-Messungen gewonnen werden, deren schematischer Verlauf in Abb. 45 dargestellt ist.

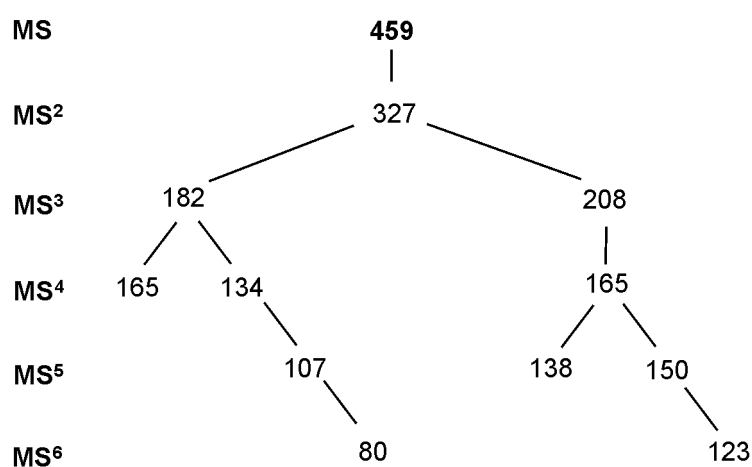


Abbildung 45: Schematische Darstellung der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von 2-Methylthio-N⁶-threonylcarbamoyladenosen (ms²t⁶A, m/z 459).

Abb. 46 zeigt die korrespondierenden Fragmentierungsreaktionen mit den postulierten Reaktionsmechanismen. Nach Abspaltung der dehydratisierten Ribose entsteht zunächst in MS² die korrespondierende Base m/z 327. Die in der Gasphase im chemischen Gleichgewicht vorliegenden Protonierungsstellen an N-1 bzw. N⁶ führen zur Aufspaltung der Fragmentierungshierarchie in MS³. Fragmentierungsweg **A** führt analog zu den Beobachtungen bei m⁶t⁶A zur Abspaltung von 3-Hydroxy-2-isocyanatobutansäure (C₅H₇NO₄) über eine McLafferty-Umlagerung. Im hierbei gebildeten Fragment-Ion m/z 182 erfolgt im anschließenden MS⁴-Zyklus zunächst eine Ringöffnung am Pyrimidinsystem. Wie bei Adeninbasen üblich, kann diese Öffnung an den Stellen N-1 / C-2 bzw. C-6 / N-1 ablaufen (vgl. Abb. 26). Erstere führt unter äquivalenter Ammoniak-

Eliminierung von den nun chemisch identischen Stickstoffpositionen N-1 und N⁶ zu Fragment m/z 165.

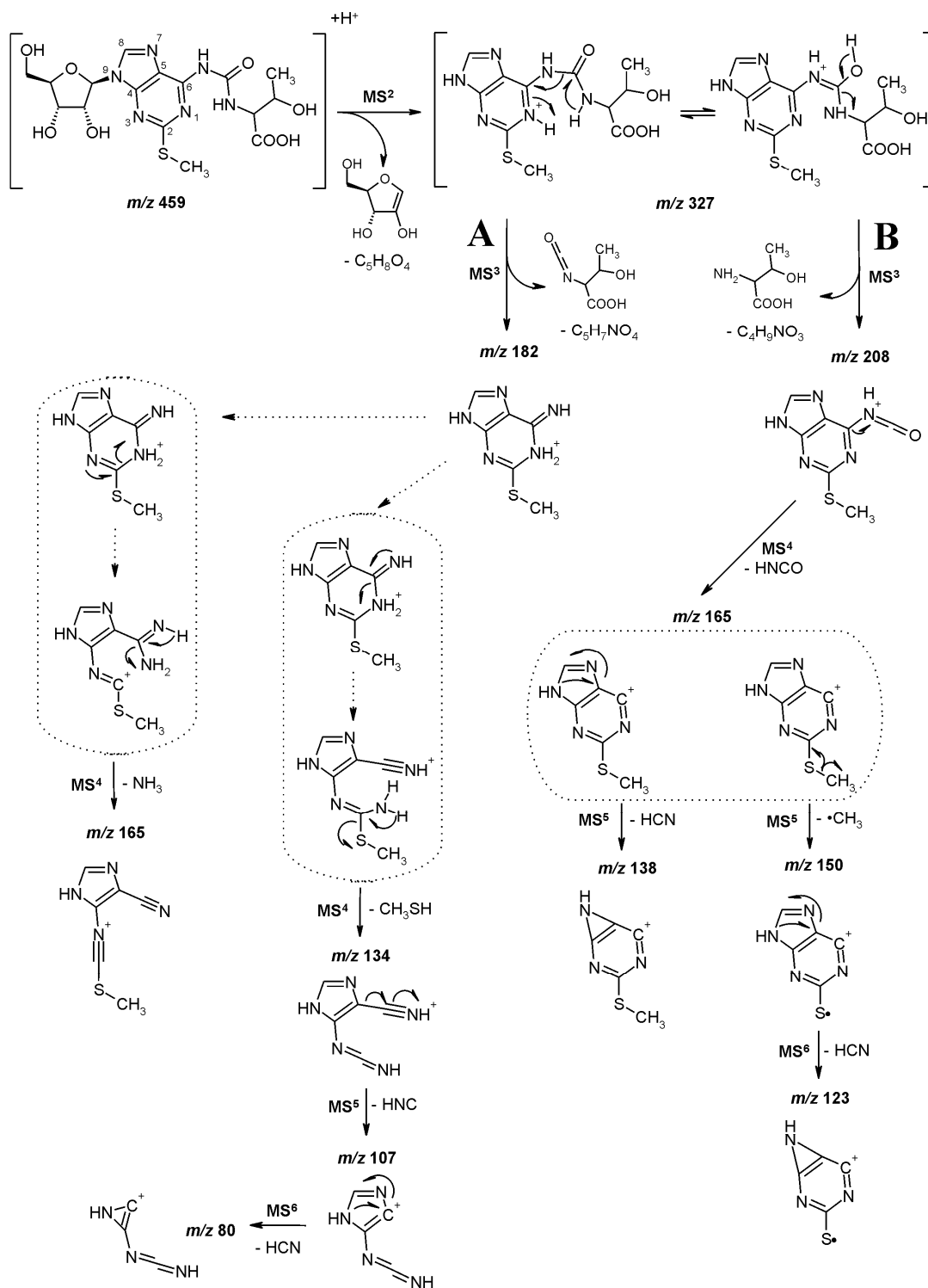


Abbildung 46: Postulierte Fragmentierungsmechanismen von 2-Methylthio- N^6 -threonylcarbamoyladenine (ms^2t^6A , m/z 459)

Die Ringöffnung an C-6 / N-1 leitet zunächst einen für die postulierte Struktur charakteristischen CH_3SH -Neutralverlust ($-48 \Delta m$) ein. Im gebildeten Fragment-Ion m/z 134 erfolgt zunächst die Eliminierung von HNC und in MS^6 schließlich eine erneute HCN-Abspaltung im Imidazolring unter Ringverengung zum Azirin-Ion m/z 80.

Fragmentierungsweg **B** wird vermutlich aus der N^6 -protonierten Base m/z 327 initialisiert. Die Eliminierung von 3-Hydroxy-2-aminobutansäure ($\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$) führt in MS^3 zu Fragment-Ion m/z 208. Im folgenden MS^4 -Schritt wird die residuale C-6-Seitenkette als HNCO abgespalten. Die hierbei gebildete Struktur m/z 165 fragmentiert im anschließenden MS^5 -Zyklus unter HCN-Eliminierung im Imidazolring (vermutlich mit Ringverengung zum Azirin) zu m/z 138. Diese Reaktion wird auch im Anschluss an eine vorangegangene Methylradikal-Abspaltung zum Fragment-Ion m/z 150 beobachtet.

Die aufgeführten Informationen aus Fragmentierungshierarchie, Summenformel und dem Verhalten bei der alkalischen Hydrolyse führten zur eindeutigen Identifizierung des unbekanntes Metabolits m/z 459 als 2-Methylthio- N^6 -threonylcarbamoyladenosen ($\text{ms}^2\text{t}^6\text{A}$). Wie auch im Fall von $\text{m}^6\text{t}^6\text{A}$ finden sich in der einschlägigen Literatur keine Berichte über ein Vorkommen dieser Verbindung im menschlichen Urin.

Guanosin-Strukturen

- Aus der Stoffklasse der Guanosine wurde ein Metabolit mit m/z 326 (Nr. 17, Tab. 7/8) aus DC-Fraktion 2 isoliert. Das mit FT-MS gemessene Masse / Ladungs-Verhältnis von 326,146067 konnte einer Molekularzusammensetzung von $[\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_5]^+$ zugeordnet werden, welche exakt der Summenformel des bekannten modifizierten Nucleosids $\text{N}^2, \text{N}^2, 7$ -Trimethylguanosen entspricht. Weitere charakteristische Hinweise ergaben sich aus dem IT- MS^n -Fragmentierungsmuster, dessen Ablauf in Abb. 47 dargestellt ist.

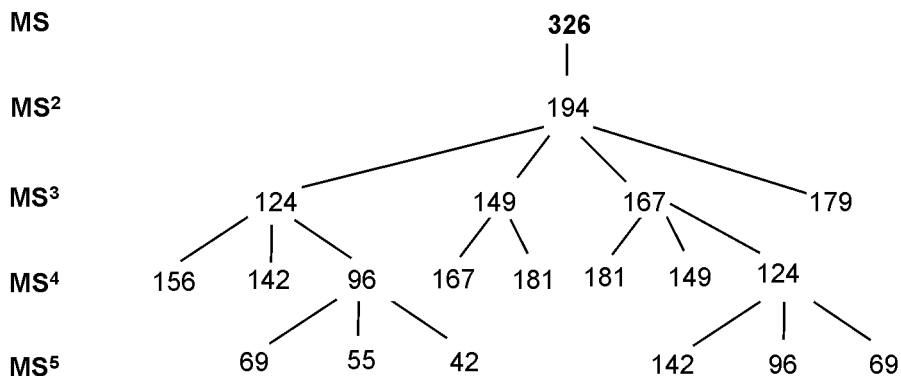


Abbildung 47: Schematische Darstellung der MS^n -Fragmentierungshierarchie von $N^2,N^2,7$ -Trimethylguanodin ($m^{2,2,7}G$, m/z 326).

Die zugehörigen Fragmentierungsreaktionen mit den postulierten Reaktionsmechanismen sind in Abb. 48 gezeigt. Die nach der Eliminierung der dehydratisierten Ribose gebildete Trimethylguanidinbase m/z 194 liegt in der Gasphase mit verschiedenen Protonierungsstellen vor. In Abhängigkeit von der jeweiligen Position der positiven Ladung kommt es im anschließenden MS^3 -Schritt zur Aufspaltung der Fragmentierungshierarchie in vier Einzelpfade. Fragmentierungsweg **A** beginnt mit der von *Gregson und McCloskey* postulierten Pyrimidin-Ringöffnung an den Positionen C-6 / N-1 (vgl. Abb. 27). Nach dem Mechanismus einer 1,2-Eliminierung erfolgt im MS^3 -Zyklus die charakteristische Abspaltung der $(CH_3)_2NCN$ -Funktion und hierdurch der Nachweis der Dimethylierung an Position N^2 der Ausgangsverbindung m/z 326. Die resultierende Struktur m/z 124 zeigt im nachfolgenden MS^4 -Schritt drei Tochterionen, von denen zwei (m/z 142 und m/z 156) auf Ion-Molekülreaktionen (neutral gains) mit H_2O bzw. $MeOH$ beruhen. Tochterion m/z 96 wird durch CO -Abspaltung (C-6 / O^6) gebildet. Letzteres wird im anschließenden MS^5 -Zyklus zu drei weiteren Fragmenten gespalten. Über eine HCN -Eliminierung im residualen Imidazolring entsteht die N -methylierte Azirin-Struktur m/z 69. Die genannte Ringverengung des Imidazols erfolgt zusätzlich unter Einbezug der N -Methylfunktion und den resultierenden Eliminierungsreaktionen von CH_3NC bzw. CH_2NCN zu den Tochterionen m/z 55 bzw. m/z 42. Fragmentierungsweg **B** verläuft mit hoher Wahrscheinlichkeit über Protonierung an N^2 , wobei in MS^3 die vollständige Dimethylamino-Funktion zu m/z 149 abgespalten wird.

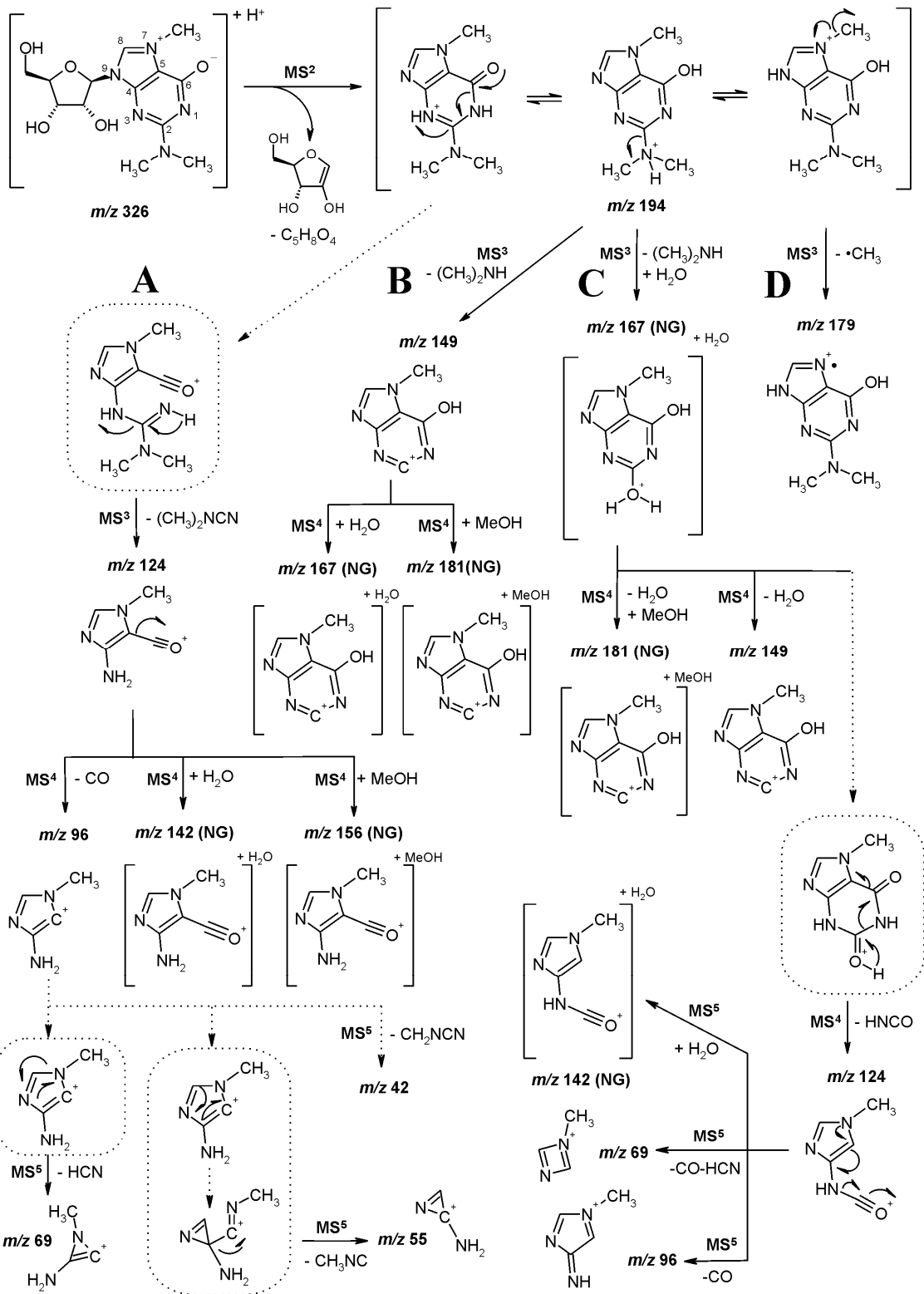


Abbildung 48: Postulierte Fragmentierungsmechanismen von $N^2,N^2,7$ -Trimethylguanosin ($m^{2,2,7}G$, m/z 326), NG: neutral gain.

Im anschließenden MS⁴-Zyklus erfolgen zwei neutral gain-Reaktionen unter Addition von H₂O (*m/z* 167) und CH₃OH (*m/z* 181). Fragmentierungsweg **C** startet ebenfalls aus der N²-protonierten Basenstruktur. Hierbei kommt es bei der Eliminierung von (CH₃)₂NH zur konzertierten Anlagerung eines Wassermoleküls zu *m/z* 167. Im anschließenden MS⁴-Schritt ergeben sich drei Tochterionen. Neben der Wasserabspaltung zu *m/z* 149 erfolgt unter gleichzeitiger Anlagerung von CH₃OH die Bildung von *m/z* 181. Bei der einzigen regulär ablaufenden Fragmentierungsreaktion (HNCO) wird als Ausgangsstruktur das Wasseraddukt in Position C-2 angenommen. Unter Protonenwanderung an den Imidazolring wird im nachfolgenden MS⁴-Schritt durch HNCO-Eliminierung das Tochterion *m/z* 124 gebildet. Aus diesem ergeben sich im MS⁵-Zyklus weitere drei Tochterfragmente. Neben einem weiteren neutral gain eines Wassermoleküls zu *m/z* 142 erfolgt die Abspaltung von CO zu *m/z* 96. Gleichzeitig ergibt die konsekutive Eliminierung von CO und HCN, unter Ringverengung des Imidazols, die Struktur *m/z* 69, ein N-Methyldiazet-Kation. Fragmentierungsweg **D** besteht lediglich aus der Abspaltung eines Methylradikals zum Radikalkation *m/z* 179, aus welchem keine weiteren Fragmentierungsreaktionen zu beobachten sind.

Das über die generierte Summenformel und die charakteristischen Fragmentierungsreaktionen identifizierte Guanosinnucleosid konnte zusätzlich über die vergleichende Analyse (Retentionszeit und Fragmentierungsmuster) mit dem kommerziell erhältlichen Standard verifiziert werden. m^{2,2,7}G ist als natürlicher Bestandteil des menschlichen Urins bekannt^[176].

Uridin-Strukturen

- Aus DC-Fraktion 11 wurde ein Metabolit mit *m/z* 302 (Nr. 7, Tab. 7/8) semipräparativ aufgereinigt. Über die FT-MS-Messung konnte eine korrespondierende Summenformel von [C₁₁H₁₆N₃O₇]⁺ kalkuliert werden. Die Suche in der RNA-Datenbank ergab mit dem modifizierten Uridin 5-Carbamoylmethyluridin (ncm⁵U) eine mögliche Nucleosidstruktur^[94]. Mit den durchgeführten IT-MSⁿ-

Messungen konnte diese Annahme bestätigt werden. Abb. 49 zeigt die zugehörige Fragmentierungshierarchie mit den postulierten Mechanismen.

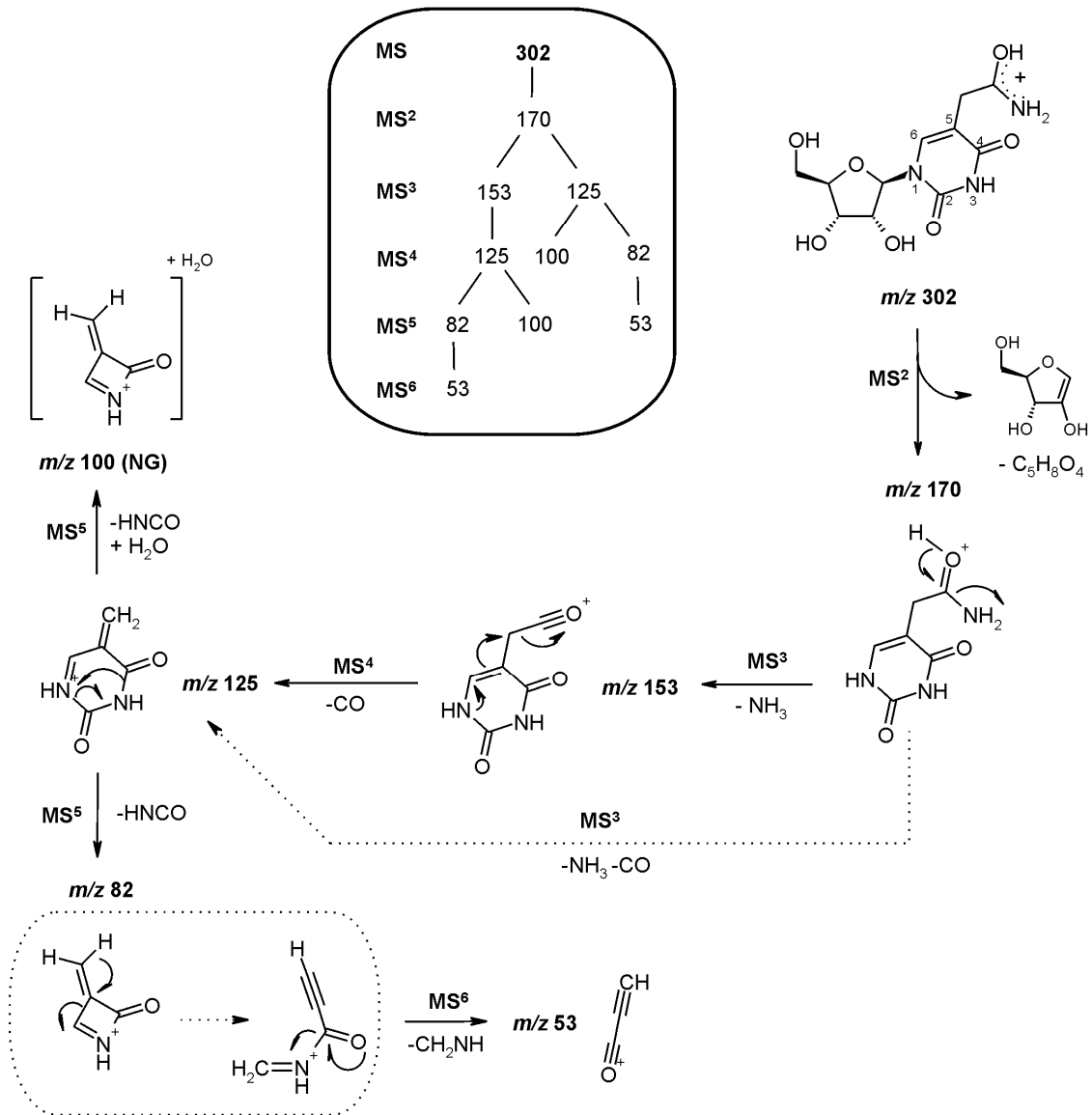


Abbildung 49: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von 5-Carbamoylmethyluridin (ncm⁵U, m/z 302), NG: neutral gain.

Für die ablaufenden Fragmentierungsreaktionen wird die Protonierung an der terminalen Carbamoylfunktion angenommen. Nach der Abspaltung der Zuckereinheit in MS² erfolgt im anschließenden MS³-Schritt eine 1,2-Ammoniakeliminierung zu Fragment-Ion m/z 153. Im MS⁴-Zyklus kommt es zur CO-Abspaltung unter Verschiebung der positiven Ladung auf Position N-1. Die

beiden zuvor genannten Reaktionen werden auch konzertiert über den Neutralverlust der vollständigen Carbamoylgruppe (als $\text{NH}_3 + \text{CO}$ oder NH_2CHO) beobachtet. In beiden Fällen resultiert das Tochterfragment m/z 125, welches im folgenden MS^5 -Zyklus zwei Fragment-Ionen bildet. Die HNCO-Eliminierung von den Positionen N-3, C-2 und O^2 führt zu m/z 82, wobei unter gleichzeitiger Anlagerung eines Wassermoleküls auch m/z 100 entsteht. Für die Abspaltung von HNCO wird eine intermediäre Ringverengung der Pyrimidinstruktur zum Azet angenommen. Im anschließenden MS^6 -Schritt erfolgt über die erneute Ringöffnung eine CH_2NH -Eliminierung zum Tochterion m/z 53.

Chheda et al. konnten ncm^5U bereits im Jahr 1999 im menschlichen Urin nachweisen^[177]. In der vorliegenden Arbeit gelang die Strukturbestätigung über die generierte Summenformel aus den FT-MS-Messungen und dem charakteristischen Fragmentierungsmuster.

- Ein weiterer Uridinmetabolit mit m/z 346 (Nr. 6, Tab. 7/8) wurde aus DC-Fraktion 11 isoliert. Dieser bereits in früheren Arbeiten analysierten Komponente^[157] konnte über die FT-MS-Messungen eine Summenformel von $[\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_8]^+$ zugewiesen werden, welche sich mit der postulierten Molekularkomposition aus der LC-ESI-TOF-MS-Analytik deckt (vgl. 3.1.4.7). Die IT- MS^n -Messungen (vgl. Abb. 50) lieferten zusätzliche Informationen zur eindeutigen Identifizierung des Metabolits als 3-(3-Aminocarboxypropyl)-uridin (acp^3U). Die Zuckerabspaltung ($-132 \Delta m$) aus der vermutlich an der Seitenketten-Aminofunktion protonierten Ausgangsverbindung m/z 346 führt im MS^2 -Schritt zur Base m/z 214. Im anschließenden MS^3 -Zyklus werden die Abspaltungen beider funktioneller Gruppen aus der Aminocarboxyl-Struktur beobachtet. Die 1,2-Eliminierung eines HCOOH -Neutralteilchens führt zu m/z 168. Bei der Abspaltung der NH_3 -Funktion wird eine anchimere Assistenz (Nachbargruppeneffekt) von O^4 der Pyrimidinbase in Form eines nucleophilen Angriffs angenommen.

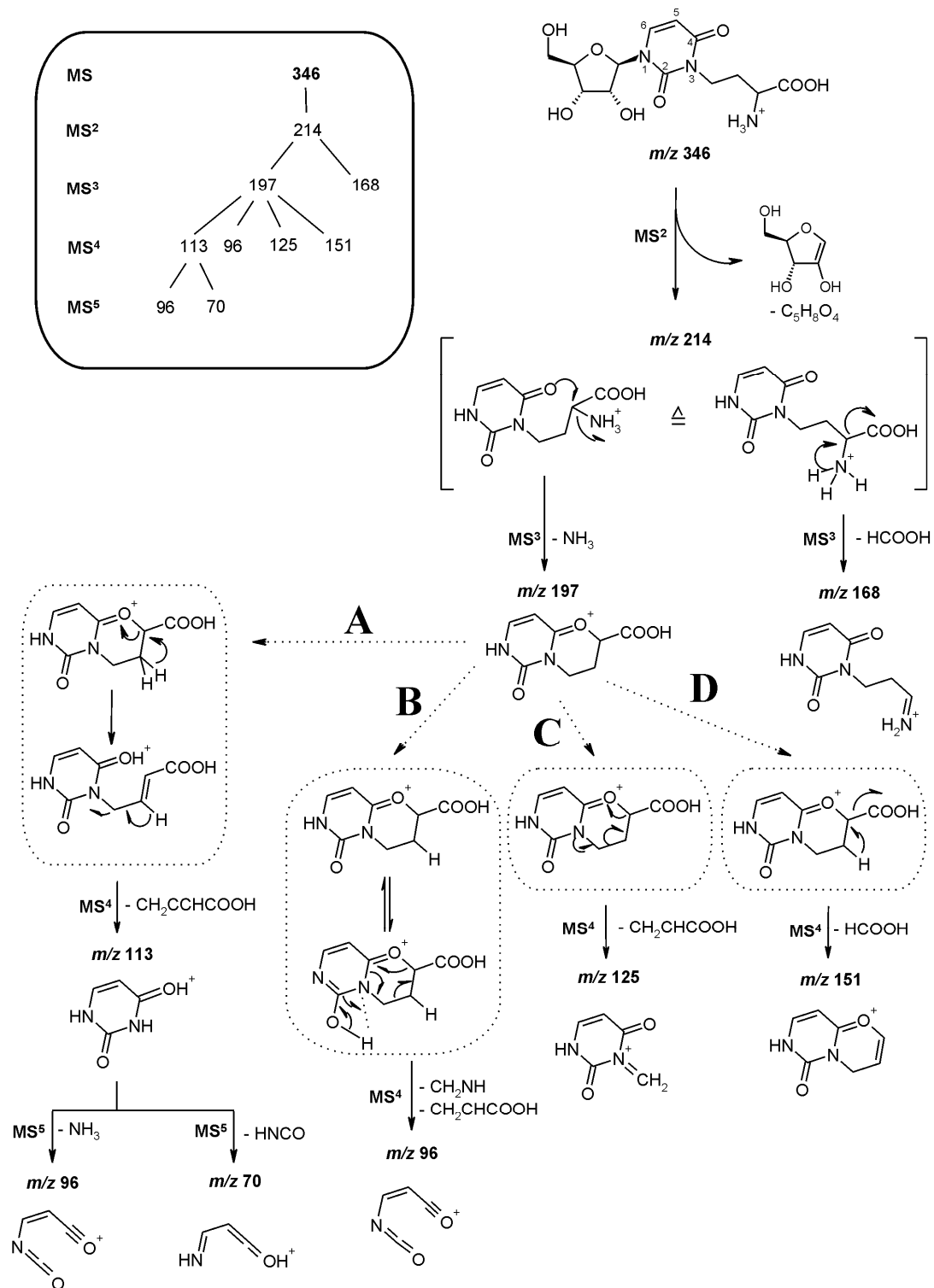


Abbildung 50: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von 3-(3-Aminocarboxypropyl)-uridin (*acp*³U, *m/z* 346).

Unter Cyclisierung resultiert das Tochterion m/z 197, welches im anschließenden MS^4 -Schritt die Aufspaltung in vier Fragmentierungswege zeigt. In Fragmentierungsweg **A** wird, vermutlich über eine erneute Ringöffnung, die Eliminierung von Allencarbonsäure zu m/z 113 beobachtet. Dieses Fragment-Ion ergibt einen eindeutigen Hinweis auf die Basisstruktur des Metabolits, da es sich hierbei um die protonierte Uracilbase handelt. Folgerichtig werden im anschließenden MS^5 -Zyklus die charakteristischen Fragmentierungsreaktionen des Uracils (NH_3 , $HNCO$) beobachtet (vgl. Abb. 28). Das durch NH_3 -Abspaltung gebildete Tochterion m/z 96 ist auch die finale Struktur von Fragmentierungsweg **B**. Die Bildung erfolgt in diesem Fall über die konzertierte Eliminierung von CH_2NH und Acrylsäure. Die alleinige Abspaltung der Acrylsäure führt in Fragmentierungsweg **C** zum 3-N-Methylenuracil-Kation m/z 125. Im vierten Fragmentierungsweg **D** ist die Abspaltung von Ameisensäure über einen 1,2-Eliminierungsmechanismus zu beobachten. Unter Erweiterung des konjugierten Systems resultiert das Tochterion m/z 151.

Der über FT-MS und IT- MS^n -Messungen identifizierte Uridinmetabolit acp^3U konnte bereits im Jahr 1988 von der Arbeitsgruppe um Chheda aus menschlichem Urin isoliert und charakterisiert werden^[178].

- Ein Metabolit mit m/z 333 (Nr. 18, Tab. 7/8) konnte in DC-Fraktion 7 detektiert und isoliert werden. In der RNA-Datenbank sind drei mögliche Nucleosidstrukturen mit passendem Masse / Ladungs-Verhältnis gelistet (5-Oxyessigsäure-methylester-2-uridine, 5-Carboxyhydroxymethyl-methylester-2-uridin und 5-Methoxycarbonylmethyl-2-thiouridin (mcm^5s^2U))^[94]. Die beiden erstgenannten Metaboliten weisen eine identische Summenformel auf, während die der dritten Komponente abweicht. Über die durchgeführten FT-MS-Messungen mit einer kalkulierten Summenformel von $[C_{12}H_{17}N_2O_7S]^+$ konnten die beiden Uridinderivate ohne Schwefel ausgeschlossen werden. Die errechnete Molekularzusammensetzung passte hingegen exakt zur Summenformel von mcm^5s^2U . Die finale Strukturbestätigung gelang über die IT- MS^n -Messungen, welche in Abb. 51 dargestellt sind.

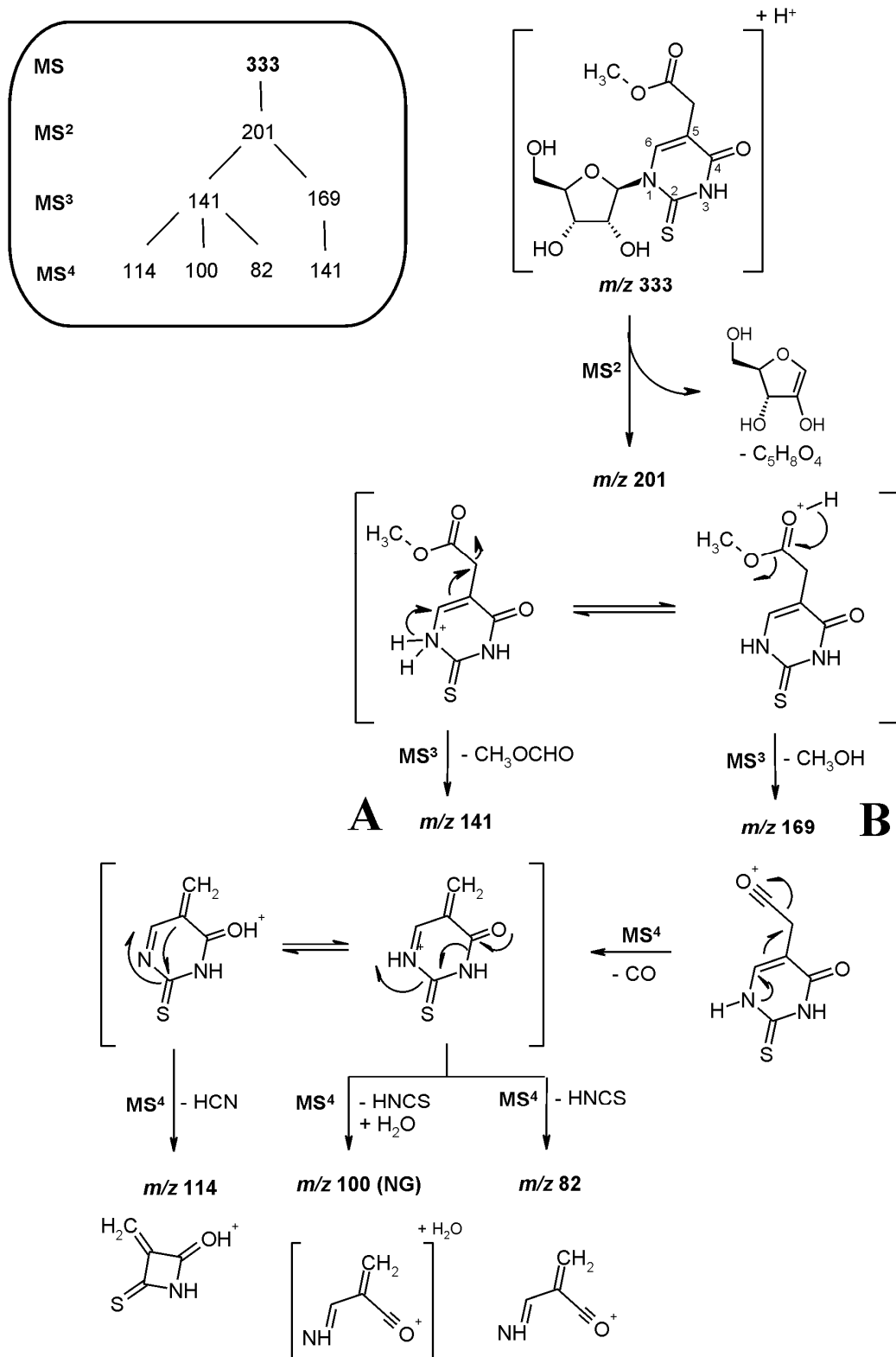


Abbildung 51: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von 5-Methoxycarbonylmethyl-2-thiouridin (mcm^5s^2U , m/z 333), NG: neutral gain.

Hierbei bildet sich in MS^2 nach dem Neutralverlust der dehydratisierten Ribose ($-132 \Delta m$) aus der Ausgangsverbindung m/z 333 die Thiouracilbase m/z 201. In MS^3 spaltet sich die Fragmentierungshierarchie in zwei Wege auf, welche vermutlich über verschiedene Protonierungsstellen des Molekülions initialisiert werden und charakteristische Indizien für die Strukturaufklärung liefern. Fragmentierungsweg **A** startet aus Protonierungsposition N-1 und resultiert über Umlagerungsprozesse in der charakteristischen Abspaltung der C-5-konjugierten Methylester-Funktion als Ameisensäuremethylester (CH_3OCHO , $-60 \Delta m$). Das gebildete Tochterion m/z 141 zeigt in der anschließenden MS^4 -Fragmentierung drei weitere Spaltprodukte, welche vermutlich aus verschiedenen Protonierungspositionen initialisiert werden. Die Protonierung an O^4 führt unter HCN-Eliminierung an den festgelegten Positionen N-1 / C-6 mit Ringverengung der Pyrimidin-Grundstruktur zum Azetidin-Kation zur Bildung von m/z 114. Außerdem erfolgt die für Thiouracile charakteristische Abspaltung von HNCS ($-59 \Delta m$) mit der Bildung von m/z 82. Diese Reaktion ist gleichzeitig mit konzertierter H_2O -Anlagerung zum Adduktion m/z 100 zu beobachten. In Fragmentierungsweg **B** erfolgt in MS^3 die Abspaltung von Methanol aus der C-5-konjugierten Methylester-Funktion über einen 1,2-Eliminierungsmechanismus. Als Protonierungsstelle wird hierbei der Carbonylsauerstoff der Estergruppe angenommen. Der anschließende Neutralverlust von CO aus m/z 169 führt im MS^4 -Schritt folgerichtig zum MS^3 -Fragment-Ion m/z 141 aus Weg A.

Wie bereits bei $ms^{2io^6}A$, $m^{6t^6}A$ und $ms^{2t^6}A$ beschrieben, ist auch im Fall des identifizierten $mcm^{5s^2}U$ eine Ausscheidung im menschlichen Urin bislang nicht eindeutig nachgewiesen.

3.1.5.2 Metaboliten aus dem Histidin-Metabolismus

Viele der aus dem cis-diol-Muster des Urins isolierten Metaboliten konnten als vermeintliche Komponenten des Histidin-Stoffwechsels identifiziert werden.

- Aus der polarsten DC-Fraktion 12 wurden zwei Metaboliten mit m/z 302 (Nr. 1, Tab. 7/8) bzw. m/z 288 (Nr. 2, Tab. 7/8) isoliert. Die FT-MS-Analyse ergab die korrespondierenden Summenformeln von $[C_{12}H_{20}N_3O_6]^+$ bzw. $[C_{11}H_{18}N_3O_6]^+$ und bestätigte somit die erste, aufgrund der Massendifferenz von

14 Da aufgestellte Annahme, m/z 302 könnte das methylierte Derivat von m/z 288 sein. Komponente m/z 288 konnte über die Summenformel und die IT-MSⁿ-Analyse (in Abgleich mit dem vorhandenen Histidin-Basenstandard) als 1-Ribosyl-L-histidin (His-R) identifiziert werden. Abb. 52 zeigt die zugehörige Fragmentierungshierarchie mit den postulierten Reaktionsmechanismen. Ausgehend von verschiedenen Protonierungsstellen, die laut *Bleiholder et al.* äquivalent im Imidazolring und der Aminofunktion der terminalen Carboxyaminomethylgruppe angeordnet sind^[179], kommt es in MS² zunächst zum üblichen Neutralverlust der konjugierten Zuckereinheit (-132 Δm). Die gebildete Histidinbase m/z 156 spaltet im MS³-Schritt HCOOH aus der Seitenkette ab. Der anschließende Fragmentierungsverlauf wird vermutlich über die zuvor angesprochenen, unterschiedlichen Protonierungsstellen initialisiert. Fragmentierungsweg **A** beginnt mit der Eliminierung von NH₃ aus der protonierten Aminofunktion in der decarboxylierten Seitenkette. Mechanistisch kann hierbei eine Cyclokondensation unter Bildung des tertiär stabilisierten Kations m/z 93 angenommen werden. Im darauffolgenden MS⁵-Schritt erfolgt ein HCN-Neutralverlust unter Ringverengung des Imidazols zum Aziridinsystem m/z 66. Fragmentierungsweg **B** ist durch doppelte HCN-Eliminierung gekennzeichnet. Über die Tautomerisierung des Enamins m/z 110 zur Imin-Struktur resultiert in MS⁴ der erste HCN-Neutralverlust vermutlich aus der Seitenkette (1,2-Eliminierung). Im anschließenden MS⁵-Zyklus erfolgt die zweite HCN-Abspaltung unter analoger Ringverengung des Imidazols zum methylierten Aziridinsystem m/z 56. Die Eliminierungsreaktionen von B sind prinzipiell auch in umgekehrter Reihenfolge möglich.

Imamura et al. isolierten His-R aus dem Urin von Patienten mit Histidinämie, einer autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankung, die mit einer erhöhter Ausscheidung von Histidin und seiner Metaboliten einhergeht^[180].

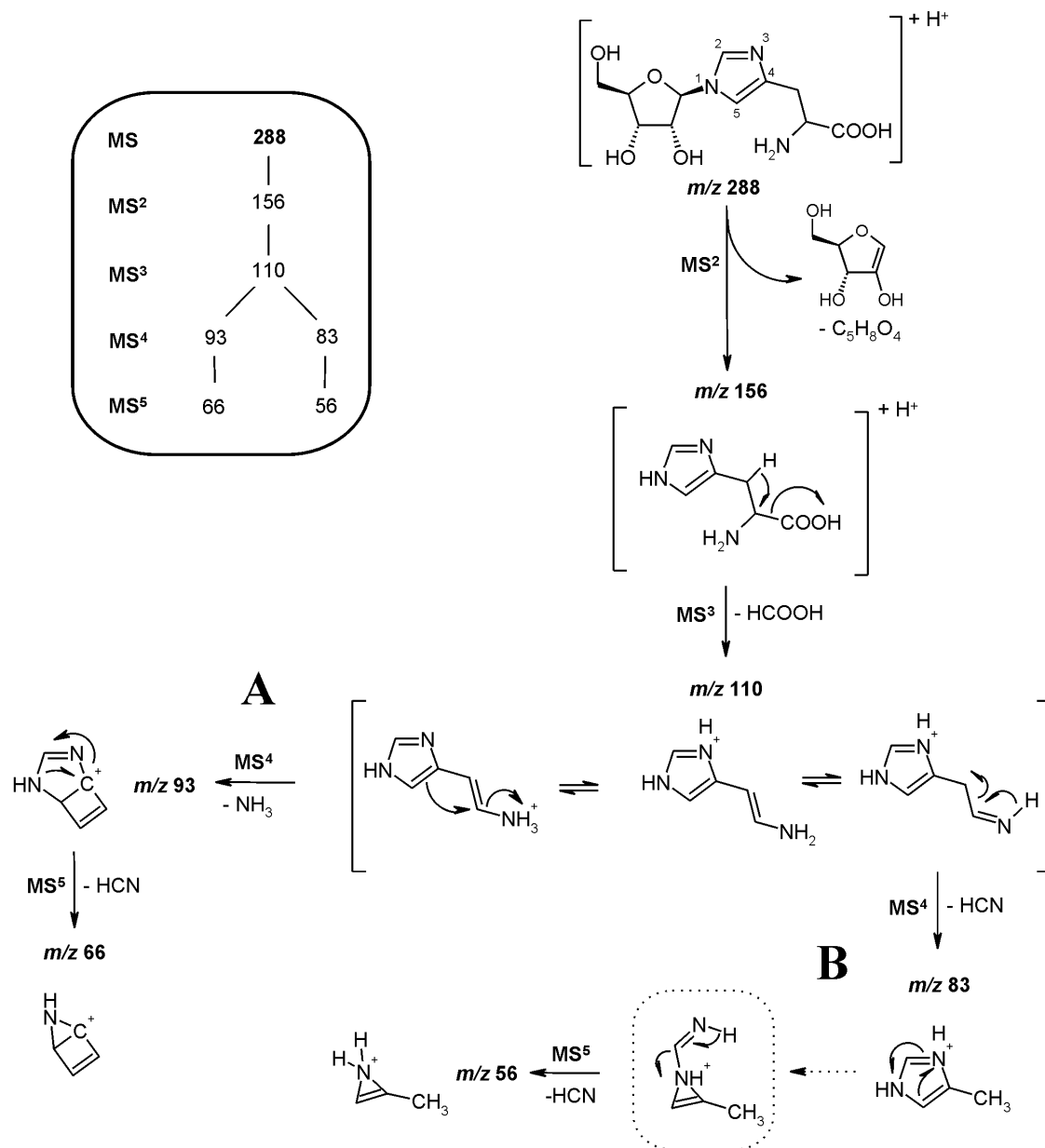


Abbildung 52: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von 1-Ribosyl-L-histidin (His-R, m/z 288).

• Beim vermeintlichen Methylderivat m/z 302 stellte sich die Frage nach der Position der Methylfunktion in der Histidinbase. Erste Hinweise lieferte eine Publikation von *Piraud et al.*, in der N-methylierte Histidine (N-1 und N-3-Methylhistidin) über ESI-MS/MS-Analytik an einem Triple-Quadrupol untersucht wurden^[181]. Für die beiden möglichen Stellungsisomere ergaben sich deutlich unterschiedliche Fragmentierungsmuster, von denen das des obengenannte 1-Methylhistidins mit der Base von Metabolit m/z 302 übereinstimmte. Über die MS^n -Messung des kommerziell verfügbaren Standards an der Bruker Ionenfalle konnte dies bestätigt werden, und somit 1-Methylhistidin als konjugierte Base der unbekanntes Komponente identifiziert werden. Die gemessenen IT- MS^n -Fragmentierungsmuster des semipräparativ aufgereinigten Metabolits sind in Abb. 53 dargestellt.

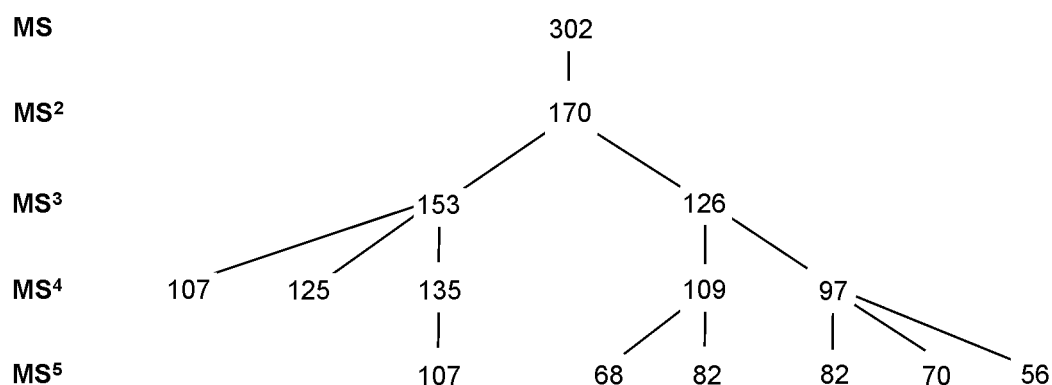


Abbildung 53: Schematische Darstellung der MS^n -Fragmentierungshierarchie von 1-Ribosyl-3-methyl-5-(2-aminocarboxyethyl)-imidazolium (I-7, m/z 302).

Die zugehörigen Fragmentierungsreaktionen mit den postulierten Reaktionsmechanismen sind in Abb. 54 gezeigt. Die kationische, an der N-3-Position ribosylierte Ausgangsverbindung wird zunächst über den Zucker-Neutralverlust zur Base m/z 170 fragmentiert. Über zwei 1,2-Eliminierungsreaktionen erfolgen im anschließenden MS^3 -Schritt die Abspaltungen von NH_3 bzw. CO_2 aus der Aminocarboxyethyl-Seitenkette. Warum letztere nicht in Form eines Ameisensäure-Neutralverlustes verläuft (vgl. Fragmentierungshierarchie His-R, Abb. 52) konnte nicht geklärt werden. Der über die Ammoniak-Abspaltung eingeleitete Fragmentierungsweg **A** zeigt im anschließenden MS^4 -Schritt drei Tochterionen.

Über eine 1,2-Eliminierung erfolgt hier interessanterweise der reguläre HCOOH-Neutralverlust (statt CO₂) unter Bildung von m/z 107. Unter gleichzeitiger Wasseraddukt-Bildung entsteht m/z 125. Tochterion m/z 107 kann auch über eine zweigeteilte Reaktion unter Wasseraustritt in MS⁴ und anschließender CO-Eliminierung in MS⁵ gebildet werden. Nach der H₂O-Abspaltung kommt es hierbei zur Ausbildung des 1-Methyl-4-(3-oxo-propa-1,2-dienyl)-imidazol-Kations m/z 135. Der CO-Neutralverlust führt zur intermediären Bildung eines Carbens, welches sich schließlich zur stabileren Alkinstruktur m/z 107 umlagert.

Nach dem CO₂-Neutralverlust teilt sich Fragmentierungsweg **B** in zwei Unterwege, die wiederum über zwei verschiedene 1,2-Eliminierungsmechanismen von NH₃ und CH₂NH eingeleitet werden. Ausgehend von m/z 109 erfolgen in **B1** Neutralverluste von HCN und CH₃NC im Imidazolring. Für beide Mechanismen wird die in den vorangegangenen Beispielen bereits beschriebene Ringverengung zu den entsprechenden Azirin-Strukturen m/z 82 und m/z 68 angenommen. Die CH₂NH-Eliminierung zu m/z 97 in **B2** führt im anschließenden MS⁵-Schritt zur Ausbildung von drei weiteren Fragment-Ionen. Über die Abspaltung eines Methylradikals entsteht das Radikalkation m/z 82. Die parallel zu beobachtenden HCN und CH₃NC-Neutralverluste führen unter zu B1 analogen Mechanismen zur Dimethylazirin-Struktur m/z 70 und zum Monomethylazirin m/z 56.

Aus der Kombination des Summenformelvorschlags und charakteristischer MSⁿ-Fragmentierung konnte der unbekannte Metabolit m/z 302 als 1-Ribosyl-3-methyl-5-(2-aminocarboxyethyl)-imidazolium (vgl. Abb. 69, I-7) identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um einen bislang unbekanntem Metabolit, der mit hoher Wahrscheinlichkeit im Histidin-Metabolismus gebildet wird.

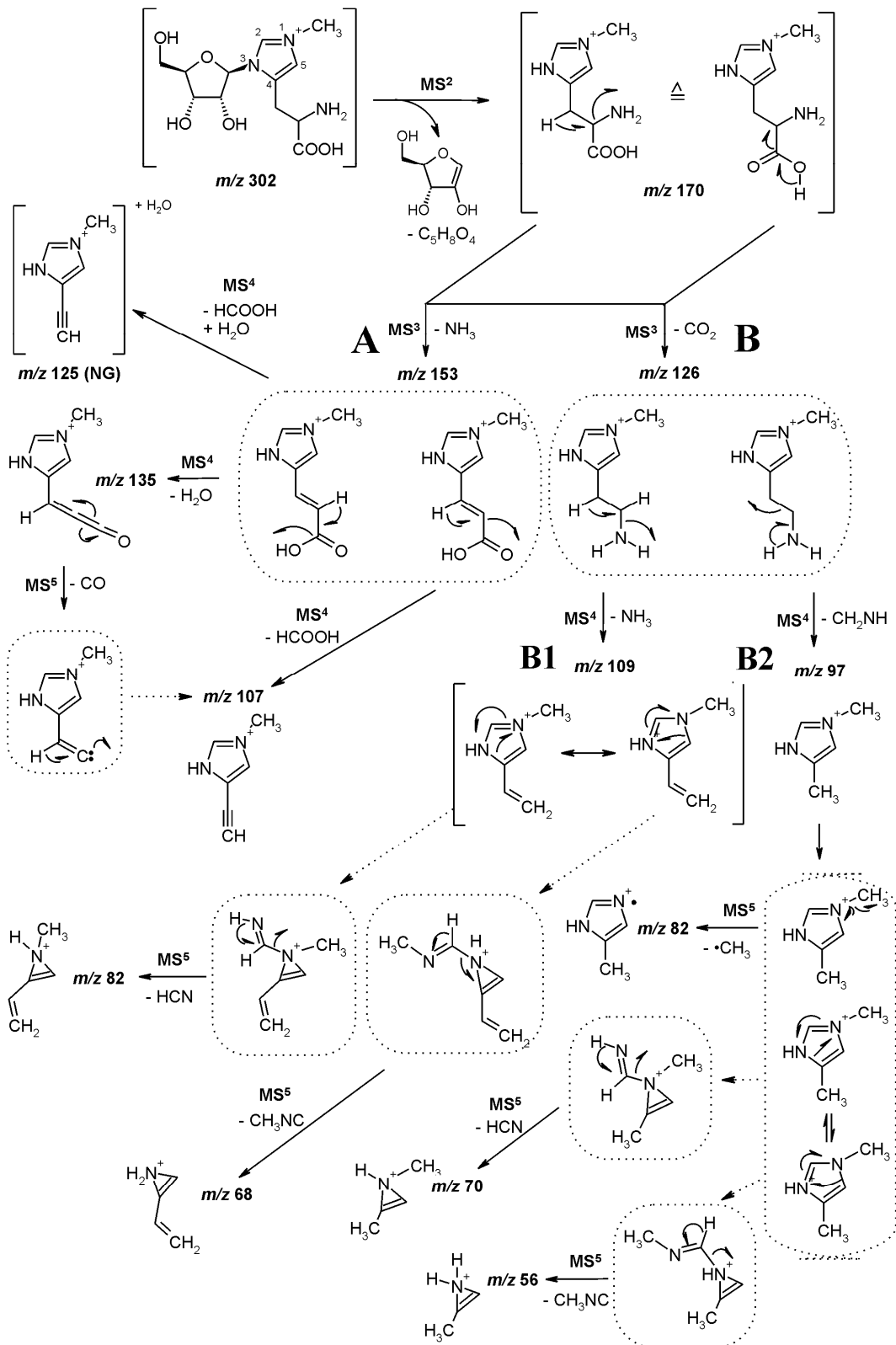


Abbildung 54: Postulierte Fragmentierungsmechanismen von 1-Ribosyl-3-methyl-5-(2-amino-carboxyethyl)-imidazolium (I-7, m/z 302), NG: neutral gain.

• Ein weiterer Metabolit (m/z 259, Nr. 3, Tab. 7/8) aus dem Histidin-Stoffwechsel, der bereits über kombinierte IT-MS und LC-ESI-MS-TOF-Messungen in der Arbeitsgruppe analysiert wurde (vgl. 3.1.4.7), konnte im Verlauf dieser Studie aus DC-Fraktion 11 isoliert und strukturell verifiziert werden. Über FT-MS-Analytik konnte die korrespondierende Summenformel von $[\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_6]^+$ mit einem ppm-Fehler von 0,116 bestätigt werden. Zusätzlich ergaben sich über die MS^n -Messungen charakteristische Fragmentierungsreaktionen, welche in Abb. 55 dargestellt sind.

Der MS^2 -Schritt führt wie bei N-glykosidisch verknüpften, ribosylierten Metaboliten üblich, zum Neutralverlust der Zuckereinheit unter Bildung der protonierten Base m/z 127. Wichtigster Hinweis zur strukturellen Aufklärung ist die im anschließenden MS^3 -Schritt erfolgende Abspaltung von HCOOH aus der C-4-Essigsäure-Seitenkette. Im resultierenden Tochterfragment m/z 81 wird zu einem gewissen Anteil eine Wasseradduktbildung (neutral gain) beobachtet, welche ebenfalls in MS^3 zu m/z 99 führt. Im MS^4 -Zyklus kann dieses Addukt unter erneuter Abspaltung des addierten Wassermoleküls zurück zur Ausgangsverbindung umgesetzt werden. Im 4-Methylenimidazol-Kation m/z 81 wird im anschließenden MS^4 resp. MS^5 -Schritt unter Ringverengung des Imidazols zum 2-Methylenaziridin-Kation m/z 54 Blausäure eliminiert.

Im Vergleich mit dem kommerziell verfügbaren 4-Carboxymethyl-imidazol und der beobachteten identischen Basenfragmentierung konnte die Struktur des unbekanntes Metabolits m/z 259 verifiziert werden. Es handelt sich demnach um das bekannte, bereits im menschlichen Urin nachgewiesene^[182] Histidin-Abbauprodukt 1-Ribosyl-4-carboxymethyl-imidazol (IAA-R).

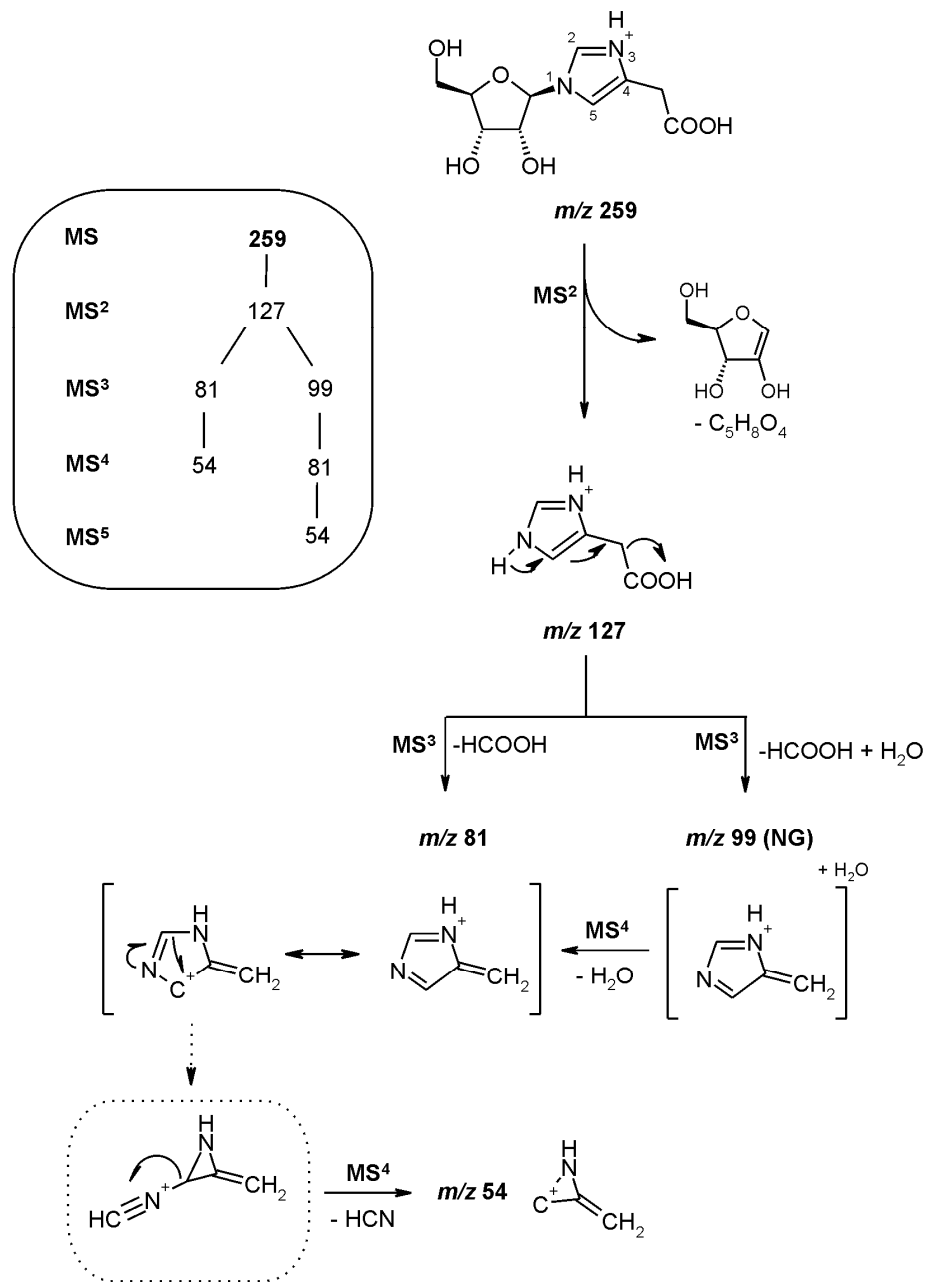


Abbildung 55: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von 1-Ribosyl-4-carboxymethyl-imidazol (IAA-R, m/z 259).

• Ein weiteres vermeintliches Abbauprodukt des endogenen Histidins konnte in DC-Fraktion 10 detektiert werden. Für m/z 275 (Nr. 11, Tab. 7/8) konnte nach semipräparativer Aufreinigung eine Summenformel von $[C_{10}H_{15}N_2O_7]^+$ über FT-MS bestimmt werden. Über den Vergleich der Molekularzusammensetzungen und der resultierenden Massendifferenz von 16 Da konnte für m/z 275 die Strukturhypothese eines Oxo-Derivats von IAA-R aufgestellt werden. Diese

Annahme konnte über die durchgeführten IT-MSⁿ-Messungen (vgl. Abb. 56) bestätigt werden.

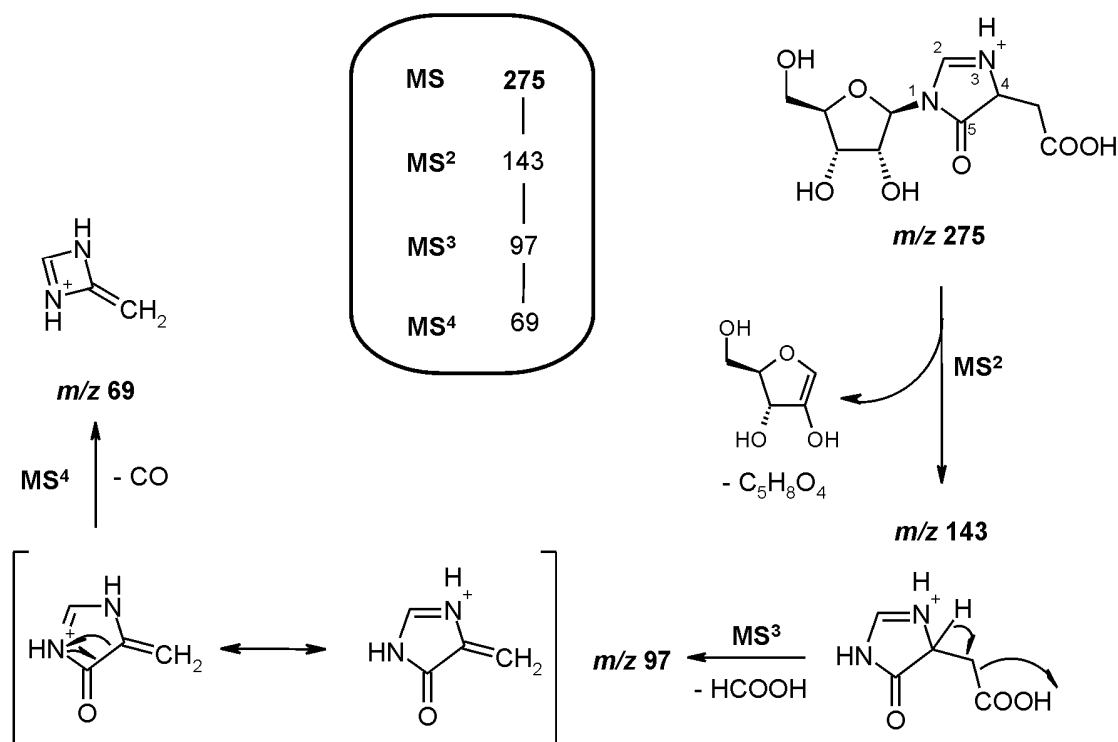


Abbildung 56: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von 1-Ribosyl-4-carboxymethyl-5-oxo-imidazol (I-8, m/z 275).

Die lineare Fragmentierungshierarchie führt in MS² über den Zucker-Neutralverlust zur protonierten Base m/z 143. Die anschließende MS³-Fragmentierung zeigt analog zu IAA-R die Abspaltung von HCOOH aus der Essigsäure-Seitenkette unter Bildung von m/z 97. Der in der Summenformel angegebene, zusätzliche Sauerstoff wird im darauffolgenden MS⁴-Zyklus als Kohlenmonoxid aus dem Imidazolsystem eliminiert. Hierbei entsteht, vermutlich unter Ringverengung zum 2-Methyldiazet-Kation, Fragment-Ion m/z 69.

Die identifizierte Struktur 1-Ribosyl-4-carboxymethyl-5-oxo-imidazol (vgl. Abb. 69, I-8) ist in der Literatur nicht beschrieben, findet sich jedoch in Form der unkonjugierten Base als Abbauprodukt des Histidinmetabolits 4-Carboxymethylimidazol^[183].

• Eine Metabolitenserie mit ansteigendem Massenshift von 14 Da (m/z 286, 300, 314, 328 und 342, Nr. 9, 12, 14, 19, 23, Tab. 7/8). konnte in den DC-Fractionen 1-4 detektiert und isoliert werden. Bereits in den Auto-LC-MS³-Messungen konnten charakteristische Gemeinsamkeiten wie eine Wasserabspaltung sowie zwei konsistente Fragment-Ionen bei m/z 112 und m/z 95 im MS³-Schritt beobachtet werden (vgl. Abb. 57). Als grundlegende Elemente wurden eine gemeinsame Basisstruktur sowie eine über Methyleinbau kontinuierlich verlängerte Alkylseitenkette angenommen. Die letztgenannte Hypothese konnte über die chromatographischen Eigenschaften der unbekannt Substanzklasse gestützt werden. Wie in Abb. 57 zu sehen, ergab sich auf der eingesetzten RP-18-Säule eine kontinuierlich ansteigende Retentionszeit mit wachsender Alkylkette.

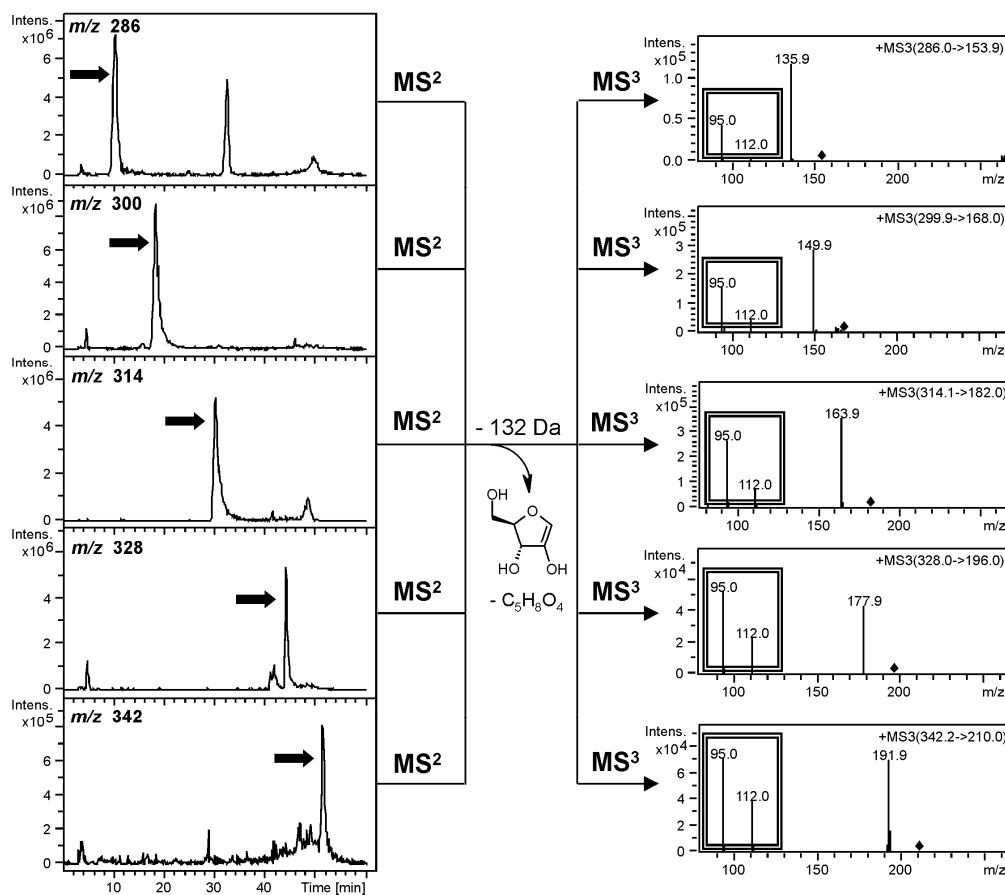


Abbildung 57: Auto-LC-MS³-Analytik einer Metabolitenserie (m/z 286, 300, 314, 328, 342) mit den korrespondierenden EICs (links) und zugehörigen MS³-Spektren (rechts).

Die durchgeführten FT-MS-Messungen bestätigten die Annahme eines Methylen-Massenshifts von 14 Da in den strukturhomologen Verbindungen durch kontinuierliche Erweiterung der kalkulierten Summenformel um ein CH₂-Element (vgl. Tab. 8).

Als mögliche endogene Komponenten mit Alkylkettenverlängerung wurden die kurzkettigen Fettsäuren in Betracht gezogen, wobei in der Literatur keine Verbindung zum RNA-Metabolismus beschrieben ist. Bei der Überprüfung des humanen Histidin-Metabolismus über die KEGG-Datenbank^[183] fiel die Komponente 4-Ethyl-N-(ethylcarbonylamino)-imidazol (Trivialname: N- ω -Acetylhistamin, Molekularzusammensetzung [C₇H₁₂N₃O]⁺) auf, welche durch Addition von Essigsäure an das Histamingrundgerüst gebildet wird. Die genannte Verbindung erfüllt die Bedingungen aus der Summenformel des unbekanntes Metabolits *m/z* 286. Zieht man von dieser die konjugierte Riboseeinheit [C₅H₈O₄] ab, stimmen beide Molekularzusammensetzungen überein. Da N- ω -Acetylhistamin als Standard kommerziell verfügbar ist, konnte diese Hypothese durch das mit dem Metabolit *m/z* 286 exakt übereinstimmende IT-MSⁿ-Fragmentierungsmuster, verifiziert werden.

Aus der Kombination des Methylen-Massenshifts sowie durch den kontinuierlich ansteigenden Neutralverlust (286 \rightarrow CH₃CN, 300 \rightarrow CH₃CH₂CN, 314 \rightarrow CH₃(CH₂)₂CN, 328 \rightarrow CH₃(CH₂)₃CN, 342 \rightarrow CH₃(CH₂)₄CN) in den IT-MS⁴-Messungen (vgl. Tab. 7), erfolgte die Strukturaufklärung der unbekanntes Metabolitenserie. Es handelt sich demnach um ribosylierte Histamine, die an der N- ω -Position an verschiedene kurzkettige Fettsäuren (C \geq 2) konjugiert sind (vgl. Abb. 69, I-1 – I-5). Abb. 58 zeigt die vollständige Fragmentierungshierarchie mit den postulierten Reaktionsmechanismen für Metabolit *m/z* 286. Die Fragmentierung der homologen Metaboliten verläuft analog und wird im Zusammenhang mit der wachsenden Alkylseitenkette über das Kürzel *R* symbolisiert.

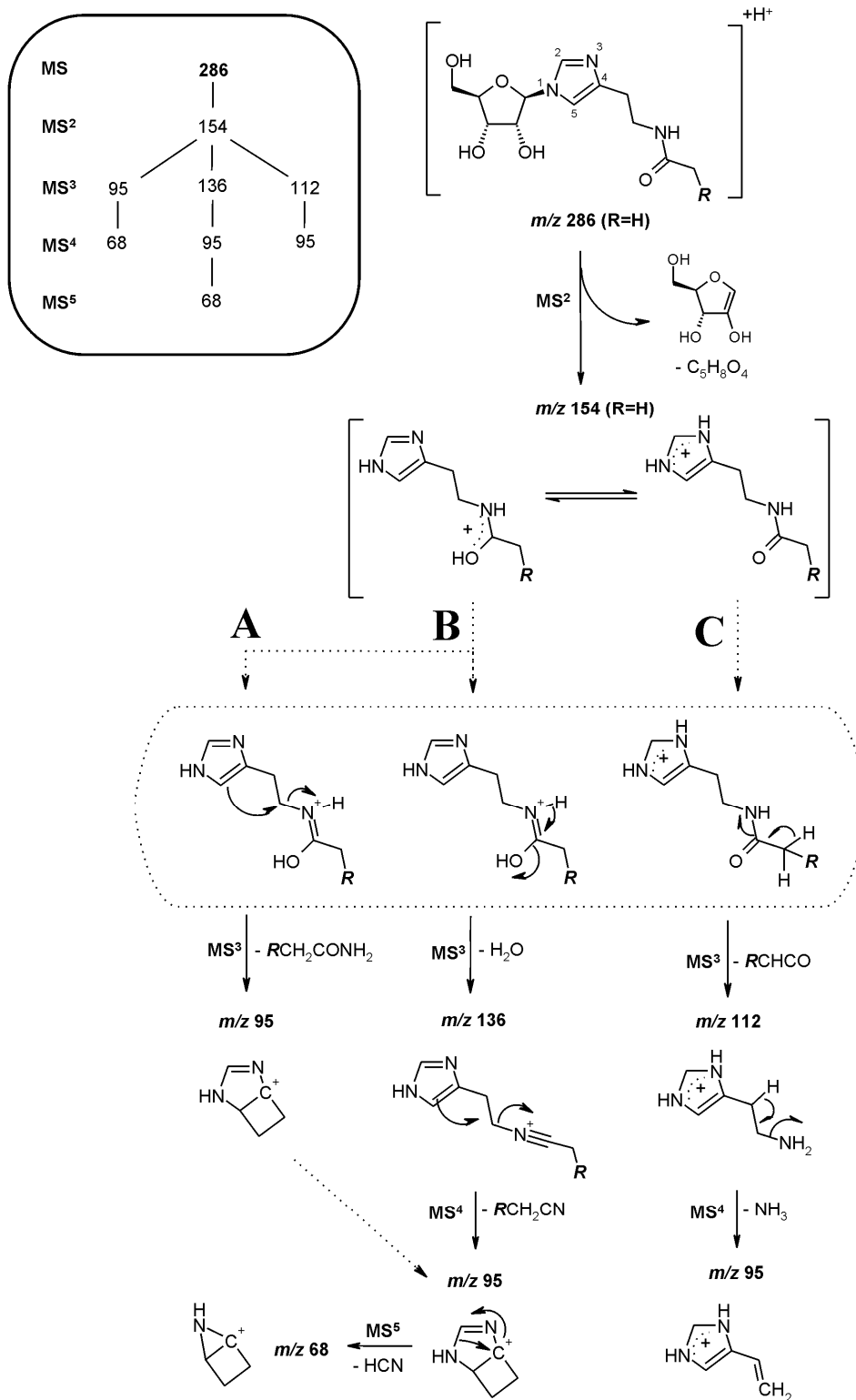


Abbildung 58: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MS^n -Fragmentierungshierarchie von 1-Ribosyl-4-ethyl-N-(ethylcarbonylamino)-imidazol (I-1, m/z 286) und homologen Strukturen der identifizierten Metabolitenklasse. **R:** H (m/z 286), $-CH_3$ (m/z 300), $-CH_2CH_3$ (m/z 314), $-(CH_2)_2CH_3$ (m/z 328), $-(CH_2)_3CH_3$ (m/z 342), $-C_6H_5$ (m/z 362).

Der Fragmentierungsverlauf startet wie am Beispiel von m/z 286 gezeigt mit dem Zuckerneutralverlust zur protonierten Base m/z 154. Diese liegt in der Gasphase vermutlich mit unterschiedlichen Protonierungsstellen vor. Der anschließende MS^3 -Zyklus spaltet die Fragmentierungshierarchie in drei Einzelwege auf. Fragmentierungsweg **A**, eingeleitet über die charakteristische Eliminierung der terminalen Acetamid-Funktion (bzw. Propylamid, Butylamid usw.), verläuft vermutlich über die Amid-protonierte Basenstruktur. Mechanistisch wird für die Bildung von m/z 95 eine Ringkondensation unter Ausbildung eines tertiären Kations angenommen. Im anschließenden MS^5 -Schritt erfolgt die Eliminierung von HCN aus dem Imidazolsystem, vermutlich über die Ringverengung zum ringkondensierten Aziridin m/z 68. Fragmentierungsweg **B** beginnt mit einer Wassereliminierung an der Amid-Protonierungsstelle. Im darauffolgenden MS^4 -Schritt spaltet sich über eine erneute Cyclokondensation CH_3CN bzw. bei den homologen Verbindungen CH_3CH_2CN , $CH_3(CH_2)_2CN$ usw. ab. Das hierbei gebildete m/z 95 ist identisch mit der isobaren Verbindung aus Pfad A und spaltet folgerichtig unter Austritt von HCN zu m/z 68. Fragmentierungsweg **C** wird aus der Basenstruktur mit Protonierung der Imidazol-Stickstoffe initialisiert. Über einen 1,2-Eliminierungsmechanismus erfolgt in MS^3 der Neutralverlust von CH_2CO , welcher sich bei den Strukturhomologen der identifizierten Metabolitenserie wieder sukzessiv um einen Massenshift von 14 Da erhöht. Die anschließende Abspaltung von NH_3 resultiert im 4-Vinylimidazol-Kation m/z 95.

Nach der strukturellen Aufklärung der bislang nicht in der Literatur beschriebenen Metabolitenklasse stellt sich die Frage nach dem biochemischen Ursprung der einzelnen Komponenten. Eine Kettenverlängerung des N- ω -Acetylhistamins ist im menschlichen Stoffwechsel nicht bekannt. Die Konjugation homologer, kurzkettiger Fettsäuren (C2-C4) an Histamin wurde im Zusammenhang mit der Aktivität endosymbiontischer Darmbakterien beschrieben^[184]. Die resultierenden Metaboliten N- ω -Acetylhistamin, N- ω -Propionylhistamin, N- ω -Butyrylhistamin konnten auch im menschlichen Urin detektiert werden. Die Ausscheidungsrate zeigte deutliche Abhängigkeit vom intestinalen Aminosäuretransport, der bakteriellen Darmflora und Nahrungsaspekten (z.B. Fermentation von Ballaststoffen). Eine Ribosylierung der genannten Metaboliten wurde bislang nicht in der Litera-

tur beschrieben, und auch über die ablaufenden Resorptionsprozesse ist nichts bekannt.

- Eine Komponente mit m/z 362 (Nr. 20, Tab. 7/8), isoliert aus DC-Fraktion 4, wies ein analoges Verhalten im Fragmentierungsmuster (H_2O -Eliminierung, Basisfragmente m/z 112 und 95) auf, war aber nicht konsistent mit dem Methylen-Massenshift von 14 Da. Die entscheidende strukturelle Information konnte aus den FT-MS-Messungen erhalten werden. Der kalkulierte Summenformelvorschlag $[C_{18}H_{24}N_3O_5]^+$ zeigte wie erwartet das gleiche Basiselement „ N_3O_5 “ mit einer abweichenden C-H-Kombination und einem DBE-Wert von neun. Im Vergleich zu den restlichen Metaboliten der identifizierten Serie, welche alle fünf Doppelbindungsäquivalente aufweisen, ergeben sich somit vier zusätzliche DBEs für die konjugierte Alkylseitenketten. Die einzig mögliche Struktur zur Erfüllung dieser Kriterien ist ein Benzenring. Unter Einbezug der verbleibenden Kohlenstoff- und Wasserstoffatome aus der kalkulierten Summenformel konnte Phenylelessigsäure als gesuchtes Strukturelement identifiziert werden. Diese ist als bakterielles Abbauprodukt nicht-absorbierten Phenylalans im menschlichen Darm bekannt^[185]. Das vermutlich durch Addition der Phenylelessigsäure an die Ribosylhistamin-Struktur gebildete 1-Ribosyl-4-ethyl-N-(benzylcarbonyl)-amino-imidazol (vgl. Abb. 69, I-6) ist ebenso wie die zuvor genannte Metabolitenserie bislang nicht in der Literatur beschrieben.

3.1.5.3 Metaboliten aus dem Nicotinat / Nicotinamid-Stoffwechsel

Die in dieser Arbeit analysierten, ribosylierten Pyridinderivate können wahrscheinlich dem Nicotinat / Nicotinamid-Stoffwechsel zugeordnet werden. Die Identifizierung der entsprechenden Komponenten wird im Folgenden näher vorgestellt.

- Metabolit m/z 255 (Nr. 4, Tab. 7/8), bereits in vorangegangenen Arbeiten mittels ESI-*oa*-TOF-MS analysiert^[157], konnte in annähernd allen DC-Fractionen detektiert werden. Die semipräparative Isolierung erfolgte aus der Fraktion mit der höchsten Anreicherung: Fraktion 4. Die FT-MS-Messung ergab eine Summenformel von $[C_{11}H_{15}N_2O_5]^+$, die auch über die erwähnten TOF-MS-

Messungen kalkuliert wurde. Entscheidende Hinweise zur Strukturbestätigung wurden aus den IT-MSⁿ-Messungen erhalten, die in Abb. 59 dargestellt sind.

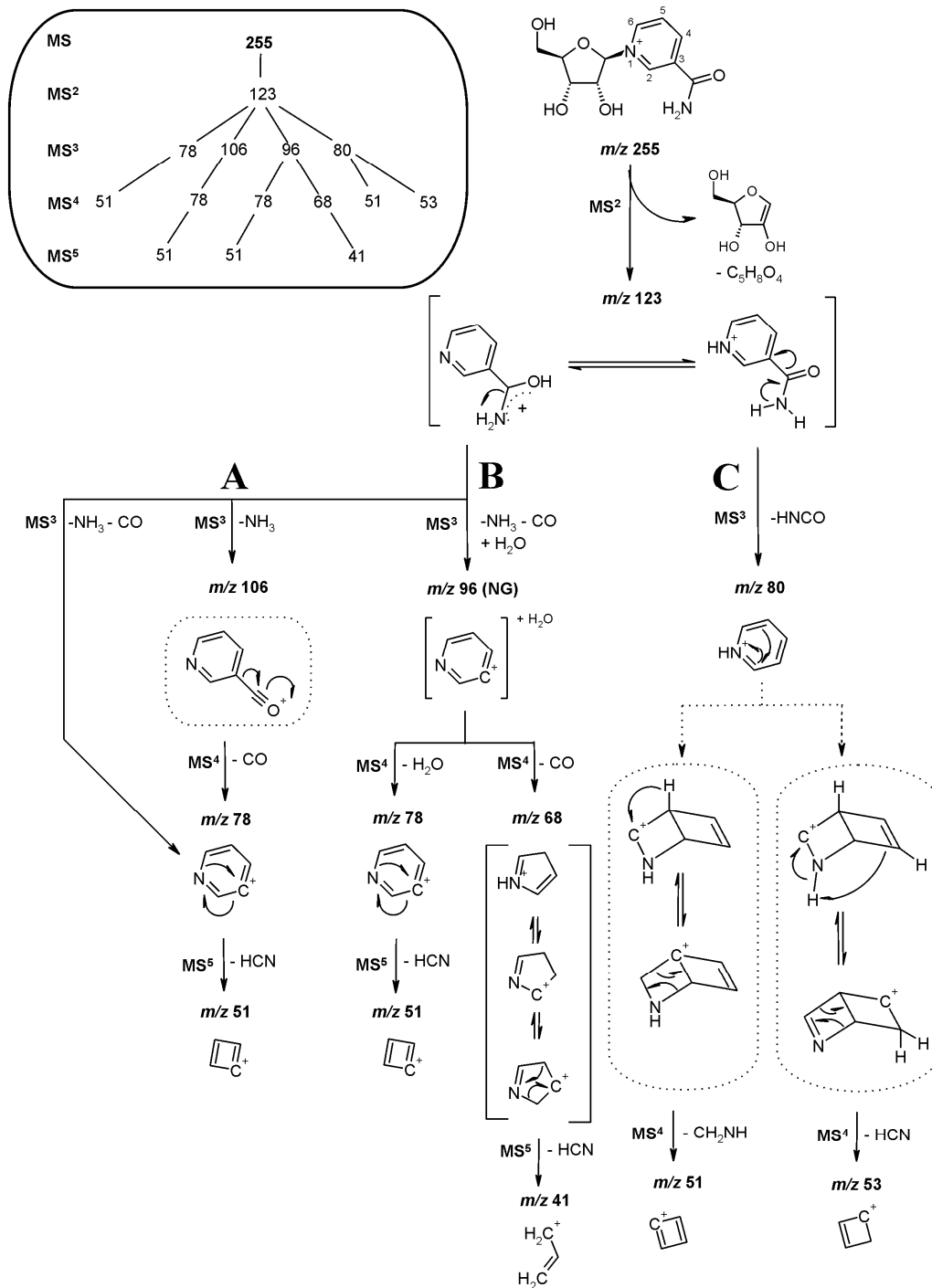


Abbildung 59: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von 1-Ribosyl-3-carbamoyl-pyridinium (NA-R, m/z 255).

Die MS²-Fragmentierung führt unter Abspaltung der dehydratisierten Ribose (-132 Δm) zum Nicotinamid m/z 123, welches in der Gasphase im chemischen Gleichgewicht mit verschiedenen Protonierungsstellen vorliegen kann. Die anschließende MS³-Fragmentierung teilt die Fragmentierungshierarchie in drei Haupttrouten auf. Fragmentierungsweg **A** wird vermutlich aus der protonierten Amidfunktion initialisiert. Der NH₃-Abspaltung über einen 1,2-Eliminierungsmechanismus zu m/z 106 schließt sich in MS⁴ die Abspaltung der residualen Seitenkette als CO an. Aus dem resultierenden m/z 78 erfolgt im MS⁵-Zyklus die Eliminierung von HCN. Als Mechanismus wird hierbei die Ringverengung zum Cyclobutadien-Kation m/z 51 angenommen, wie bereits von *Hau et al* beschrieben^[186]. Der vorgestellte Fragmentierungsweg verläuft auch über eine direkte Abspaltung der vollständigen Amidfunktion als (NH₃ + CO oder NH₂CHO) in MS³. Der nachfolgende HCN-Neutralverlust erfolgt dann konsequenterweise bereits in MS⁴. Auch Fragmentierungsweg **B** beginnt vermutlich aus dem Amid-protonierten Tautomer. Parallel zur konzertierten Abspaltung der vollständigen Amidfunktion kommt es hier zur Wasseranlagerung. Das resultierende Addukt-Ion m/z 96 zeigt im nachfolgenden MS⁴-Schritt zum einen die erneute Wasserabspaltung und anschließende HCN-Eliminierung in Analogie zu Pfad A. Gleichzeitig kann das addierte Wassermolekül, wahrscheinlich unter vorheriger H-Wanderung an den Ringstickstoff, unter Einschluss eines Ring-Kohlenstoffs als CO eliminiert werden. Das resultierende Pyrrolkation m/z 68 spaltet im anschließenden MS⁵-Zyklus HCN ab. Hierdurch bildet sich das Allylkation m/z 41. Fragmentierungsweg **C** startet mit hoher Wahrscheinlichkeit unter Protonierung des Ringstickstoffs. Die Eliminierung von HNCO aus der Amidfunktion führt zum Pyridiniumion m/z 80. Dieses lagert sich vor der nachfolgenden MS⁴-Fragmentierung intermediär zu bicyklischen Azahexen-Strukturen um, aus welchen unter Eliminierung von HCN bzw. CH₂NH das Cyclobuten-Kation m/z 53 bzw. das Cyclobutadien-Kation m/z 51 gebildet werden.

Aus der Kombination charakteristischer MSⁿ-Fragmentierung und dem erhaltenen Summenformelvorschlag konnte Metabolit m/z 255 als 1-Ribosyl-3-

carbamoyl-pyridinium (NA-R) identifiziert werden. NA-R ist bereits als natürlicher Bestandteil des menschlichen Urins beschrieben^[187].

• Ebenfalls aus DC-Fraktion 4 konnte ein Metabolit mit m/z 212 (Nr. 5, Tab. 7/8) isoliert werden. Aus den FT-MS-Messungen resultierte eine charakteristische Summenformel von $[C_{10}H_{14}NO_4]^+$ mit einem korrespondierenden DBE-Wert von fünf. Durch den regulär ablaufenden Zuckerneutralverlust ($-132 \Delta m$) in den IT-MSⁿ-Messungen kann der Stickstoff der erhaltenen Summenformel auf die Position der C-N-glykosidischen Bindung festgelegt werden. Die Anzahl der Kohlen- und Wasserstoffe ergeben in Kombination mit dem DBE-Wert nur eine mögliche Struktur, die des bislang nicht in der Literatur beschriebenen 1-Ribosyl-pyridiniums (vgl. Abb. 69, P-1). Das übereinstimmende Fragmentierungsmuster mit dem vorhandenen Standard Pyridin führte zur finalen Verifizierung der Strukturhypothese. Abb. 60 zeigt die generierte Fragmentierungshierarchie, die bereits bei NA-R in Pfad A näher erläutert wurde (vgl. Abb. 59 und zugehörige Erklärung).

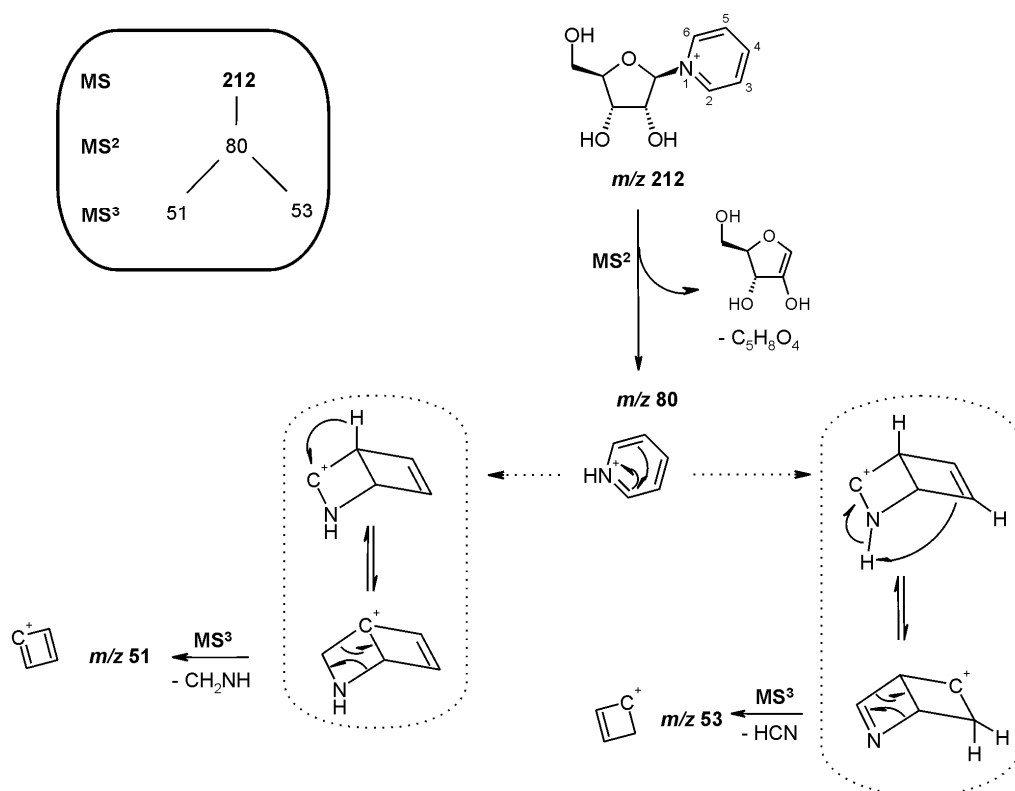


Abbildung 60: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von 1-Ribosyl-pyridinium (P-1, m/z 212).

• Eine weitere, ribosylierte Pyridinstruktur mit m/z 228 (Nr. 8, Tab. 7/8) wurde ebenfalls in DC-Fraktion 4 detektiert und für nachfolgende Untersuchungen semipräparativ aufgereinigt. Aus den FT-MS-Messungen konnte eine Summenformel von $[C_{10}H_{14}NO_5]^+$ generiert werden, die auf ein monooxidiertes Derivat von m/z 212 hindeutete. Die isolierte Verbindung wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten untersucht und dabei die vorläufige Strukturhypothese 1-Ribosyl-4-hydroxy-pyridinium aufgestellt^[157]. Wie in Abb. 61 gezeigt, sind jedoch prinzipiell mehrere Positionen der Hydroxyfunktion im Pyridinring denkbar.

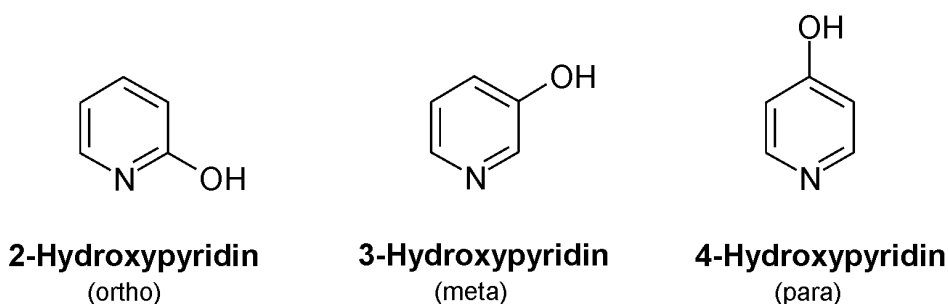


Abbildung 61: Stellungsisomere des Hydroxypyridins.

Für die Identifizierung des korrekten Stellungsisomers wurden zunächst Fragmentierungsmessungen an der Ionenfalle durchgeführt. Hierfür standen der semipräparativ aufgereinigte Metabolit m/z 228 sowie die drei Hydroxypyridinstandards zur Verfügung. Die generierten Fragmentierungsmuster (vgl. Abb. 62) ließen aufgrund der zu beobachtenden Intensitätsverteilung der beiden in MS^2 bzw. MS^3 detektierten Einzelfragmente m/z 78 ($-H_2O$) und m/z 68 ($-CO$) bereits auf das meta-Isomer schließen.

Um diese Vermutung zu stützen, wurde zusätzlich eine Methode zur chemischen Abspaltung der Riboseeinheit an der C-N-glykosidischen Bindung unter Freisetzung der Hydroxypyridinbase entwickelt. Die entstandene Komponente sollte anschließend über den chromatographischen Vergleich einer der drei möglichen Standard-Hydroxypyridine zugeordnet werden.

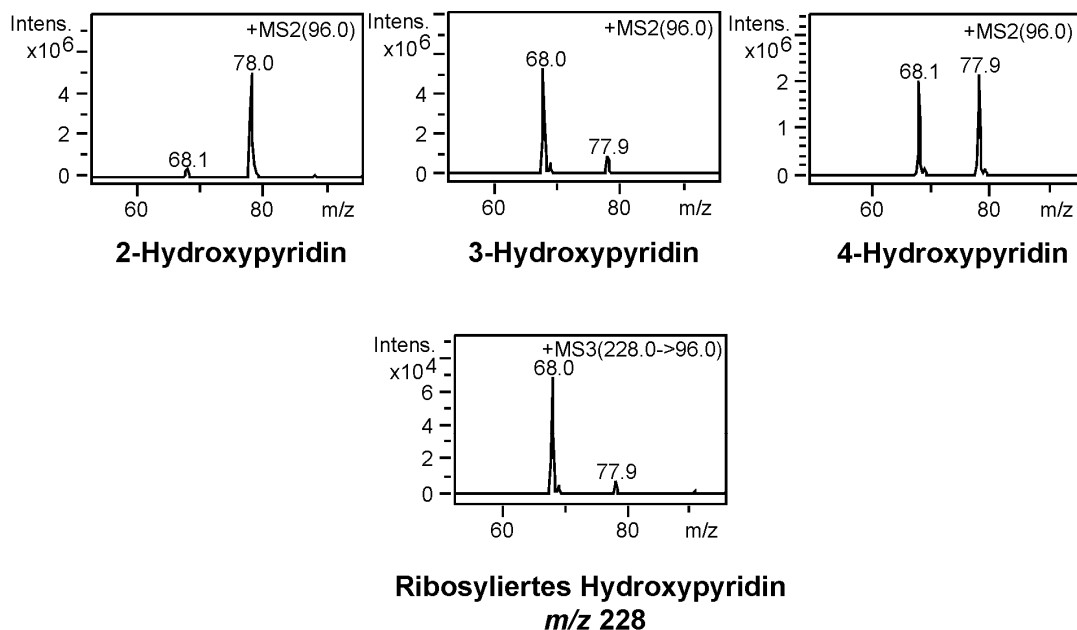


Abbildung 62: IT-MS²-Vergleich der Hydroxypyridinstandards mit der MS³-Fragmentierung des vermuteten, ribosylierten Hydroxypyridin-Metabolits m/z 228.

In der Literatur finden sich verschiedene Vorschläge zur Spaltung der C-N-glykosidischen Bindung. *Meng et al.* berichteten über die Spaltung einer N-Alkyl Bindung in N¹-substituierten Pyrimidinderivaten mittels einer Mischung aus H₃PO₂ und Iod in Essigsäure^[188]. *Maes et al.* untersuchten die Spaltung der C-N-glykosidischen Bindung in Glykoprotein-N-Glykanen durch Methanolyse mit 0,5 M methanolischer HCl^[189]. Des Weiteren finden sich Publikationen zur photolytischen Spaltung von Nucleosiden in wässriger Lösung mittels hochenergetischer UV-Bestrahlung^[190] sowie enzymatische Ansätze zur Spaltung^[191]. Auch die Verwendung von anorganischen Säuren wie HCl, H₂SO₄ und HClO₄^[192] wurde bereits zur Freisetzung von Nucleobasen erprobt, teilweise jedoch mit unerwünschten Nebenreaktionen am Heterozyklus.

Da die vermutete Hydroxypyridinribosid-Struktur in der Literatur nicht beschrieben ist, und somit auch keine Angaben zu dessen chemischer Stabilität existieren, wurden zunächst erste Vorversuche zur Abspaltung der Riboseeinheit im sauren Milieu durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Ansätze der semipräparativ aufgereinigten Lösung des Hydroxypyridinribosids mit konz. HCl, konz. H₂SO₄ sowie 70%iger HClO₄ (pH 0-1) hergestellt und diese anschließend im Wasserbad 6h Stunden auf 80°C erhitzt. Für die Kontrolle einer möglichen

Spaltreaktion wurden in bestimmten zeitlichen Abständen Proben gezogen, diese mit Ammoniaklösung (25%ig) auf pH ~ 5 eingestellt und anschließend mit LC-MS vermessen. Analog wurde ein Versuch im basischen Milieu mit einer mittels 25%iger Ammoniaklösung auf pH 13-14 eingestellten Metabolitenlösung durchgeführt (pH-Einstellung für die LC-MS-Messung mit Ameisensäure). Bei keinem der genannten Ansätze konnte eine Reaktion der Hydroxypyridinribosid-Struktur beobachtet werden.

Aufgrund der offensichtlich hohen chemischen Stabilität wurde nach anderen Möglichkeiten zur Spaltung der C-N-glykosidischen Bindung gesucht. *Gehrke et al.* beschrieben ein Hydrolyseverfahren von RNA, DNA und Nucleotiden unter Freisetzung der intakten Nucleobasen aus tierischem Material und Bakterienkulturen, basierend auf einer Trifluoressigsäure / Ameisensäuremischung^[193]. Dieses Verfahren wurde von *Herbel und Montag* aufgegriffen und zur Bestimmung von Purin- und Pyrimidinbasen in proteinreichen Lebensmitteln eingesetzt^[192]. Die hydrolytische Spaltung von Nucleosiden, Nucleotiden und Polynucleotiden erfolgte hierbei in einem DAB II-Druckaufschlussgefäß der Firma Berghof-Analytik mit TFA / FA (1:1, v/v) bei 240°C über einen Zeitraum von 90 min. Generell wurde die Beobachtung gemacht, dass die Abspaltung der intakten Nucleobase entscheidend von der Temperatur und damit dem anliegenden Druck im Aufschlussgefäß abhängig ist. Für Uridinmonophosphat mit der chemisch-stabilsten C-N-glykosidischen Bindung aller Nucleotide konnte selbst bei 120-stündiger Rückflusshydrolyse nur eine 18%ige Spaltung des Mononucleotids erreicht werden. Im Gegensatz hierzu beobachteten *Herbel und Montag* eine vollständige Hydrolyse nach 70 min bei 240°C im Druckaufschlussgefäß.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden Versuche zur Spaltung der C-N-glykosidischen Bindung im Hydroxypyridinribosid durchgeführt. Die Aufschlüsse erfolgten am Berghof-Institut für Analytik und Umweltengineering in Tübingen mit dem DAB III-Aufschlusssystem. Hierbei wurden verschiedene Temperaturen (240°C, 200°C) und Hydrolysezeiten (1; 2; 2,5 und 4 Stunden) getestet.

Als optimale Bedingungen für die Hydrolyse des Hydroxypyridinribosids stellte sich der Ansatz mit folgenden Parametern heraus:

300 µl der semipräparativ aufgereinigten Lösung des Hydroxypyridinribosids wurden mit 10 ml Trifluoressigsäure / Ameisensäure (1:1, v/v) in das 250 ml-Teflونغefäß des DAB III überspült. Das verschlossene Teflونغefäß wurde anschließend in einen Druckaufschlussbehälter eingesetzt und im Heizblock 60 min (inkl. Aufheizzeit) auf 200 °C erhitzt. Nach Beendigung des Aufschlusses wurde die Hydrolyselösung im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Säuregemisch wurde anschließend im Stickstoffstrom bei ~50°C auf einer Heizplatte abgeblasen und das Residuum in 1 ml 5 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 5,5) aufgenommen. Säurerückstände wurden mit 25%iger Ammoniaklösung neutralisiert (pH 5-6) und 10 µl der erhaltenen Lösung analysiert.

Für den chromatographischen Nachweis der Hydroxypyridine wurde eine LC-MS-Methode entwickelt. Die Trennung der drei Stellungsisomere inklusive Pyridin-N-oxid und Pyridin erfolgte auf einer RP-8 Säule (Grom Saphir C8, 3 µm, 150 x 2 mm) nach LC-MS-Methode 3 (vgl. 5.3.3.4). Abb. 63 zeigt die resultierende Trennung und den endgültigen Nachweis des 3-Hydroxypyridin-Stellungsisomers als konjugierte Komponente von Metabolit m/z 228 über identische Retentionszeiten und Spiking-Experimente.

Um eine mögliche Verfälschung des Ergebnisses durch Umlagerungsreaktionen der verschiedenen Hydroxypyridin-Stellungsisomere bei den genannten Bedingungen abschätzen zu können, wurde analog eine Standardlösung des 3-Hydroxypyridins aufgeschlossen. In der Auswertung der erhaltenen Hydrolyselösung konnten keine Umlagerungsprodukte detektiert und somit die Stabilität des 3-Hydroxypyridins bestätigt werden.

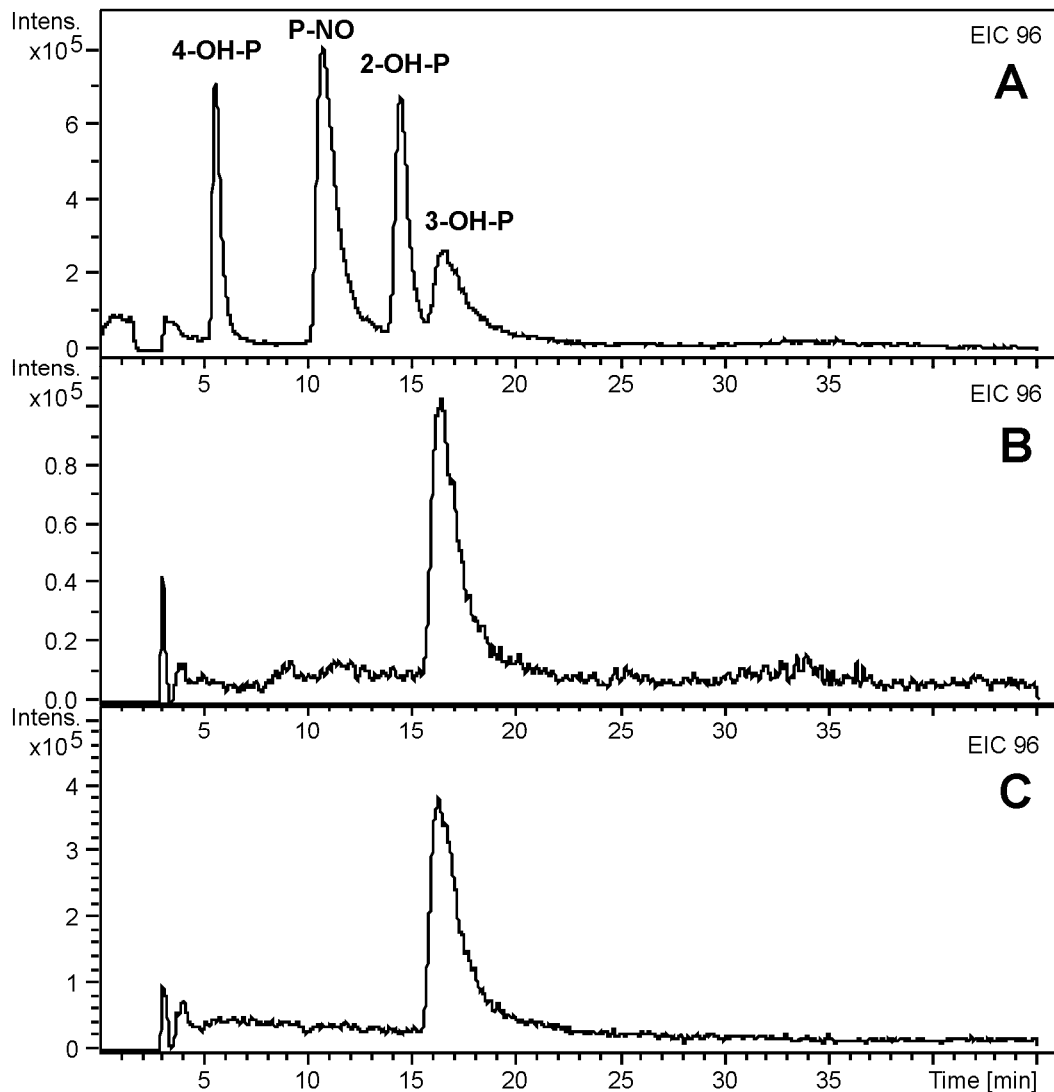


Abbildung 63: Nachweis des 3-Hydroxypyridins als Heterozyklus des unbekannten Metabolits m/z 228 mit LC-MS-Analytik. **A:** Standard (OH-P: Hydroxypyridine, P-NO: Pyridin-N-oxid), **B:** Saurer Aufschluss von m/z 228 bei 200°C (60 min), **C:** Aufschlusslösung B, gespiked mit 3-Hydroxypyridin.

Die in Abb. 64 dargestellte Fragmentierungshierarchie ist bereits größtenteils aus den Mechanismen von NA-R und P-1 bekannt (vgl. Abb. 59, 60). Nach der Abspaltung der Zuckereinheit ($-132 \Delta m$) in MS^2 ergeben sich zwei Fragmentierungswege. Fragmentierungsweg **A** wird vermutlich aus dem N-protonierten Tautomer m/z 96 initialisiert. Im anschließenden MS^3 -Schritt erfolgt analog zum Fragmentierungsverhalten des postulierten Wasser-Adduktions m/z 96 in Pfad B von NA-R (vgl. Abb. 59) die Abspaltung von CO unter Ringverengung zum Pyrrolkation m/z 68. Im Anschluss kommt es im MS^4 -Schritt zur erneuten Ringöffnung mit Austritt eines HCN-Neutralteilchens. Es bildet sich das Allylkation

m/z 41. Auch Fragmentierungsweg **B** verläuft in Analogie zu Pfad B des NA-R. Nach Abspaltung von H_2O aus dem O-protonierten Tautomer m/z 96 zum Tochterion m/z 78 erfolgt im MS^4 -Zyklus die Ringverengung zum Cyclobutadien-Kation m/z 51 unter Eliminierung von HCN.

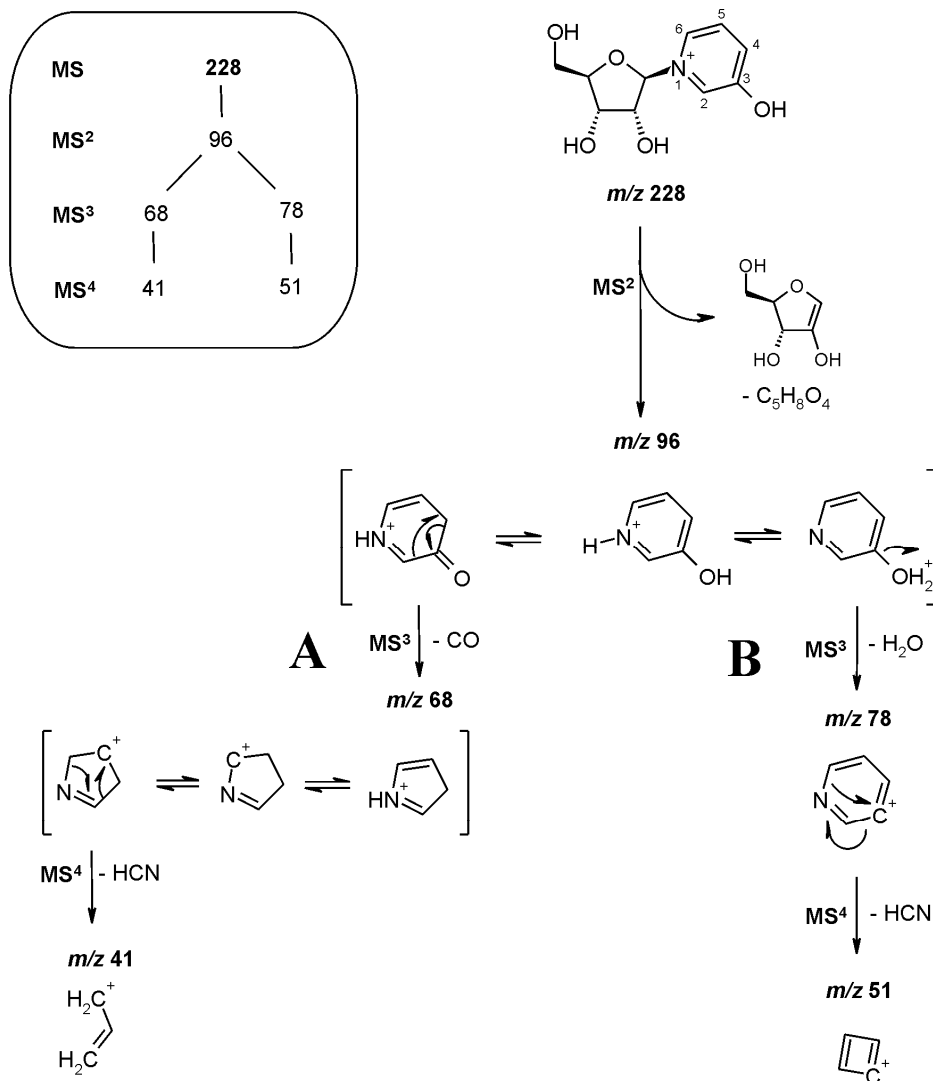


Abbildung 64: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MS^n -Fragmentierungshierarchie von 1-Ribosyl-3-hydroxy-pyridinium (P-2, m/z 228).

Das identifizierte 1-Ribosyl-3-hydroxy-pyridinium (vgl. Abb. 69, P-2) ist als Metabolit bislang nicht in der Literatur beschrieben und kann mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Nicotinat / Nicotinamid-Stoffwechsel zugeordnet werden.

3.1.5.4 Metaboliten aus der Purin-Biosynthese

• Der aus DC-Fraktion 9 isolierte Metabolit mit m/z 259 (Nr. 10, Tab. 7/8) konnte im Verlauf der Studie als 1-Ribosyl-4-carbamoyl-5-amino-imidazol (Trivialname AICA Ribosid) identifiziert werden. Der literaturbekannte Metabolit ist ein Intermediat der Purin-Biosynthese und Bindeglied zum Histidin-Metabolismus. Es wird in diesem Zusammenhang auf Kap. 3.2 verwiesen, in welchem die Stoffwechseleigenschaften von AICA Ribosid näher erläutert sind. Die Strukturaufklärung basierte auf der mit FT-MS-Messungen bestimmten Molekularzusammensetzung $[C_9H_{15}N_4O_5]^+$ sowie auf einem charakteristischen MS^n -Fragmentierungsmuster, welches in Abb. 65 dargestellt ist.

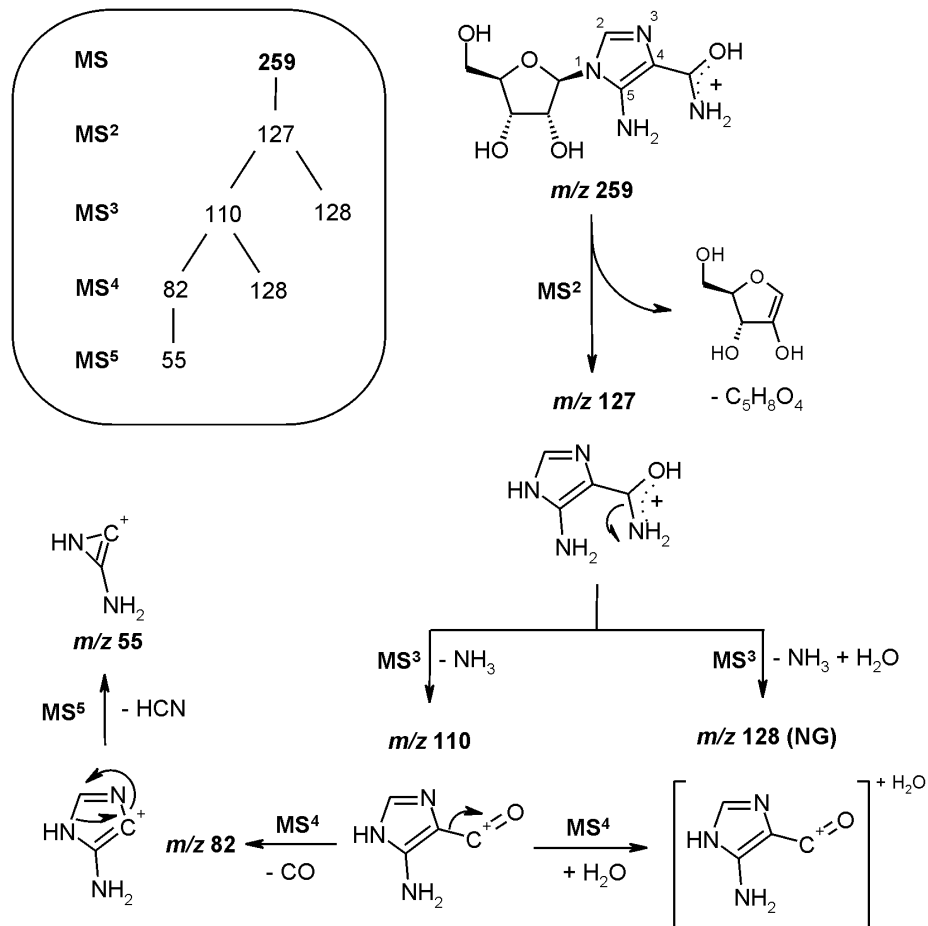


Abbildung 65: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MS^n -Fragmentierungshierarchie von 1-Ribosyl-4-carbamoyl-5-amino-imidazol (AICA Ribosid, m/z 259).

Die Fragmentierung startet mit der üblichen Abspaltung der Zuckereinheit als $C_5H_8O_4$. Als Protonierungsstelle wird die Carboxamid-Seitenkette angenommen. Im anschließenden MS^3 -Zyklus erfolgt die Eliminierung von NH_3 . Gleichzeitig ist die neutral gain-Reaktion eines Wassermoleküls zu Adduktion m/z 128 zu beobachten. Der MS^4 -Schritt von m/z 110 führt anschließend zur Abspaltung von CO aus der Seitenkette. Diese nachfolgende Reaktion verifiziert die Eliminierung von NH_3 aus der Carboxamid-Struktur. Die prinzipiell ebenfalls mögliche NH_3 -Eliminierung vom 5-Aminosubstituenten kann beim anschließend beobachteten CO-Neutralverlust ausgeschlossen werden. Tochterion m/z 82 fragmentiert im abschließenden MS^5 -Zyklus unter Eliminierung eines HCN-Neutralteilchens. Mechanistisch wird hierfür die Ringverengung der Imidazolstruktur zum entsprechenden 2-Aminoazirin-Kation m/z 55 angenommen.

Die finale Verifizierung der identifizierten Struktur gelang über den Vergleich von Fragmentierungsmuster und Retentionszeit mit der kommerziell verfügbaren Referenzsubstanz.

- Aus DC-Fraktion 10 konnte ein weiterer Metabolit aus der Purin-Biosynthese isoliert werden. Der Verbindung mit m/z 384 (Nr. 13, Tab. 7/8) konnte mit den durchgeführten FT-MS-Messungen eine Summenformel von $[C_{14}H_{18}N_5O_8]^+$ zugeordnet werden. Dieses Ergebnis bestätigt die bereits über LC-ESI-TOF-MS generierte Molekularzusammensetzung (vgl. 3.1.4.7) und den Strukturvorschlag des N^6 -Succinyladenosins (N^6 -SAR). In der IT- MS^n -Analytik ergab sich ein äußerst charakteristisches Fragmentierungsmuster, das insbesondere durch komplexe Abspaltungen von C-H-O-Elementen aus der Succinyl-Seitenkette gekennzeichnet ist. In Abb. 66 ist zunächst der schematische Verlauf dargestellt.

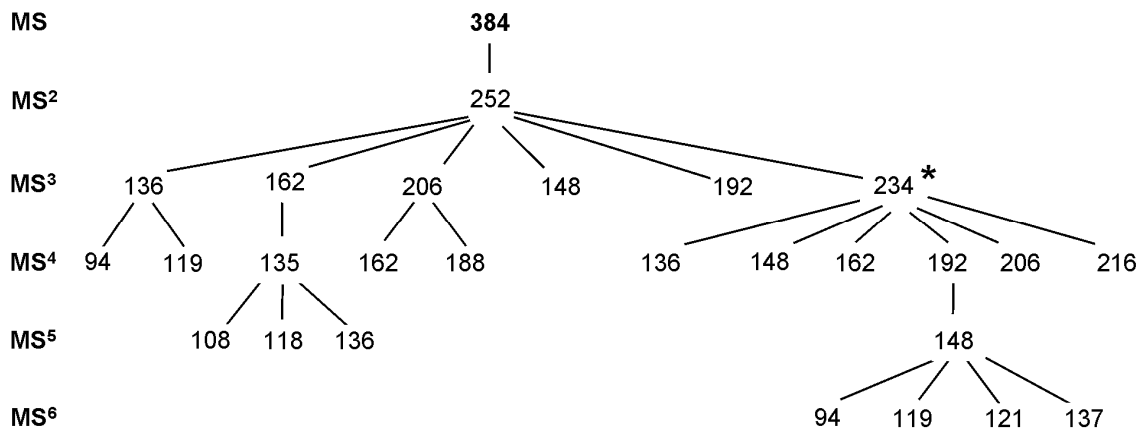


Abbildung 66: Schematische Darstellung der MSⁿ-Fragmentierungshierarchie von N⁶-Succinyladenosin (N⁶-SAR, m/z 384). *Zugehöriger Fragmentierungsweg F ist in der Darstellung der postulierten Fragmentierungsmechanismen (vgl. Abb. 67) separat dargestellt.

Nach der üblichen Zuckerabspaltung (-132 Δm) in MS² zur N⁶-Succinyladeninbase spaltet sich die Fragmentierungshierarchie bereits im anschließenden MS³-Zyklus in sechs Einzelwege auf (vgl. Abb. 67). Der Verlauf von Fragmentierungsweg **A** liefert den eindeutigen Hinweis auf Adenin als Grundkörper des Metabolits. Über den Mechanismus einer 1,2-Eliminierungsreaktion wird die Abspaltung der vollständigen Succinyl-Seitenkette (als Fumarsäure (trans) oder Maleinsäure (cis)) unter Bildung der protonierten Adeninbase m/z 136 beobachtet. Im anschließenden MS⁴-Schritt erfolgen analog zu den unter 3.1.4.5 dargestellten Mechanismen des Adeninstandards die Eliminierungsreaktionen von NH₃ und NH₂CN über eine Pyridin-Ringöffnung an den Positionen N-1 und C-2. Es resultieren die beiden Tochterionen m/z 119 und m/z 94 (die zusätzliche Abspaltung von HCN (→ m/z 109) konnte nicht beobachtet werden). In Fragmentierungsweg **B** kommt es zu Eliminierungsreaktionen der beiden Carbonsäureeinheiten der Succinylfunktion. Unter konsekutiver Abspaltung von Kohlendioxid und Essigsäure wird das Fragment-Ion m/z 148 gebildet. Fragmentierungsweg **C** wird über eine ähnliche Reaktion initialisiert, wobei die beiden Succinyl-Carbonsäuren in diesem Fall als Kohlendioxid und Ameisensäure eliminiert werden. Für das gebildete Tochterion m/z 162 wird im anschließenden MS⁴-Schritt zunächst eine Ringöffnung an den Positionen N-1 / C-2 angenommen. Die von *Nelson und McCloskey* postu-

lierte Ringöffnung an C-6 und C-1 (vgl. Abb. 26) beim Austritt eines HCN-Neutralteilchens ist aufgrund der Folgereaktionen, insbesondere der NH₃-Eliminierung, eher unwahrscheinlich. Der zu beobachtende HCN-Neutralverlust erfolgt konsequenterweise unter Einbezug der Positionen N-3 und C-2. Ausgehend vom hierbei gebildeten Tochterion m/z 135 kommt es im nachfolgenden MS⁵-Schritt zur Bildung von drei Fragment-Ionen. Der HCN-Neutralverlust zu m/z 108 verläuft höchstwahrscheinlich über eine Ringverengungsreaktion des Imidazolsystems zum korrespondierenden Azirin-Kation. Die gleichzeitig beobachtete NH₃-Eliminierung zum Tochterion m/z 118 in MS⁵ erfolgt vermutlich unter H-Shift mit anschließender 1,2-Eliminierung aus der residualen Amidinstruktur. Neben den beiden genannten Fragment-Ionen konnte im MS⁵-Zyklus auch die Bildung eines Wasseradduktes (m/z 136) beobachtet werden. Die in den Fragmentierungswegen B und C beschriebenen, konsekutiven Eliminierungen von CO₂ mit einem Säureelement, verlaufen auch ohne die gleichzeitige Abspaltung von Kohlendioxid. In Fragmentierungsweg D ist im MS³-Schritt die 1,2-Eliminierung eines Essigsäuremoleküls unter Bildung von Fragment-Ion m/z 192 zu beobachten. Fragmentierungsweg E wird über einen erneuten 1,2-Eliminierungsmechanismus von Ameisensäure eingeleitet. Im gebildeten Tochterion m/z 206 können anschließend zwei weitere 1,2-Eliminierungsreaktionen beobachtet werden. Der Neutralverlust von CO₂ im MS⁴-Zyklus resultiert im N⁶-Ethenyladenin m/z 162. Die Wasserabspaltung führt zur Ketenstruktur m/z 188. Fragmentierungsweg F wird über einen H₂O-Neutralverlust initialisiert, wobei dieser angesichts der nachfolgenden Fragmentierungsreaktionen (F1-F6*) auf die Essigsäurefunktion festgelegt werden kann. Die Folgereaktionen sind auf der nachfolgenden Seite separat dargestellt. F1 zeigt die bereits in Pfad A beobachtete Abspaltung der vollständigen residualen Succinyleinheit unter Bildung der protonierten Adeninbase m/z 136. In F2 erfolgt die konzertierte Eliminierung von CO₂ und CH₂CO aus der Succinyl-Seitenkette. Das gebildete Tochterfragment m/z 148 zeigt im anschließenden MS⁵-Schritt drei Folgefragmente. Die Ringöffnung der Pyrimidin-Teilstruktur erfolgt aufgrund der nachfolgenden Reaktionen höchstwahrscheinlich an den Positionen N-1 / C-2. Aus der resultierenden N-Methylenformamidin-Struktur

ergeben sich die Abspaltungen von CH_2NCN und CH_2NH zu den Tochterfragmenten m/z 94 und m/z 119. Zusätzlich erfolgt eine HCN -Eliminierung von den Positionen N-3 / C-2 unter Bildung von m/z 121. Bei **F3** ist ein konzertierter Neutralverlust von CO und CO_2 aus der Succinyl-Seitenkette unter Bildung von m/z 162 zu beobachten. Die Abspaltung von CO aus der Ketenstruktur verläuft vermutlich über ein intermediäres Carben, welches sich anschließend zur stabileren Vinylstruktur umlagert. Das angesprochene Ketenelement wird in **F4** vollständig als CH_2CO eliminiert. Es bildet sich das Tochterion m/z 192, welches im anschließenden MS^5 -Schritt die zweite Säurefunktion als CO_2 abspaltet und so zu m/z 148, dem aus F2 bekannten Intermediat, umgesetzt wird. Die zuvor beschriebene CO -Eliminierung aus der Ketenstruktur ist auch ohne konzertierte CO_2 -Abspaltung zu detektieren und bildet in **F5** das Fragment-Ion m/z 206. Die Wassereliminierung in **F6** führt zur Ausbildung einer N^6 -konjugierten Diketenstruktur mit m/z 216.

Die vorgestellte Komplexität der Fragmentierungshierarchie konnte über die IT-MS^n -Analyse des kommerziell verfügbaren, 5'-monophosphorylierten N^6 -SAR-Analogons Adenylosuccinylsäure bestätigt werden und führte somit zur eindeutigen Identifizierung des Metabolits aus der Purin-Biosynthese. N^6 -SAR konnte bereits von der Arbeitsgruppe um Chheda aus Urinen von Rektumkarzinompatienten und gesunden Kontrollprobanden isoliert und charakterisiert werden^[194].

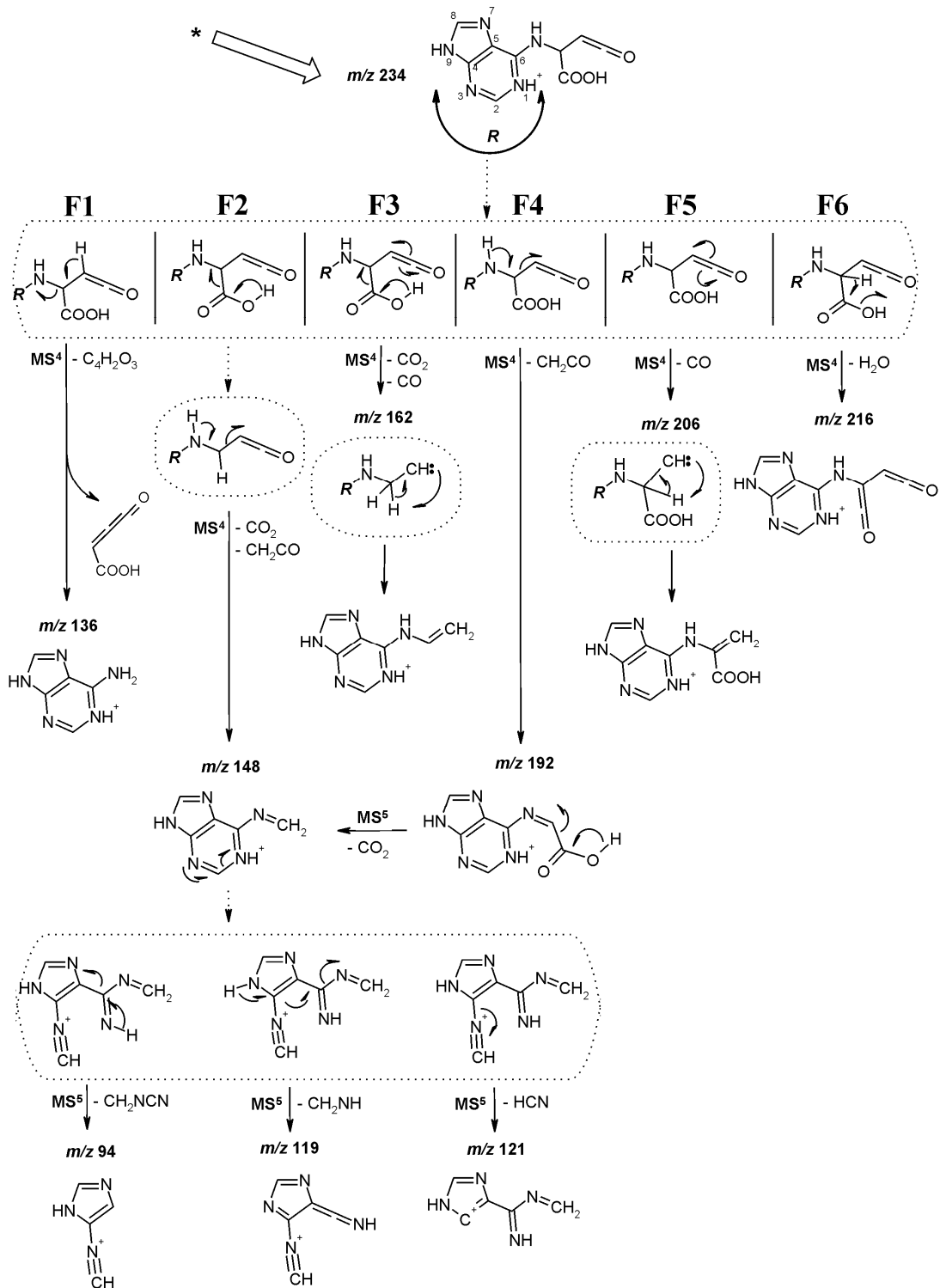


Abbildung 67: Postulierte Fragmentierungsmechanismen von N^6 -Succinyladenosin (N^6 -SAR, m/z 384).

3.1.5.5 Metaboliten aus dem Methionin / Polyamin-Zyklus

• In DC-Fraktion 3 wurde ein Metabolit mit m/z 314 (Nr. 15, Tab. 7/8) detektiert und zur weiteren Analyse semipräparativ aufgereinigt. Ein erstes, eindeutiges Charakteristikum für die Strukturaufklärung ergab sich aus dem unüblichen Neutralverlust von 178 Da in MS^2 , was auf eine Modifikation in der konjugierten Ribose schließen ließ. Die zunächst durchgeführten FT-MS-Messungen ergaben einen Summenformelvorschlag von $[C_{11}H_{16}N_5O_4S]^+$. Aus der IT- MS^n -Analytik (vgl. Abb. 68) ergab sich nach dem postulierten Neutralverlust einer modifizierten Ribose im anschließenden MS^3 -Schritt das charakteristische Fragmentmuster des Adenins (m/z 136) mit den Eliminierungen von NH_3 , HCN und NH_2CN .

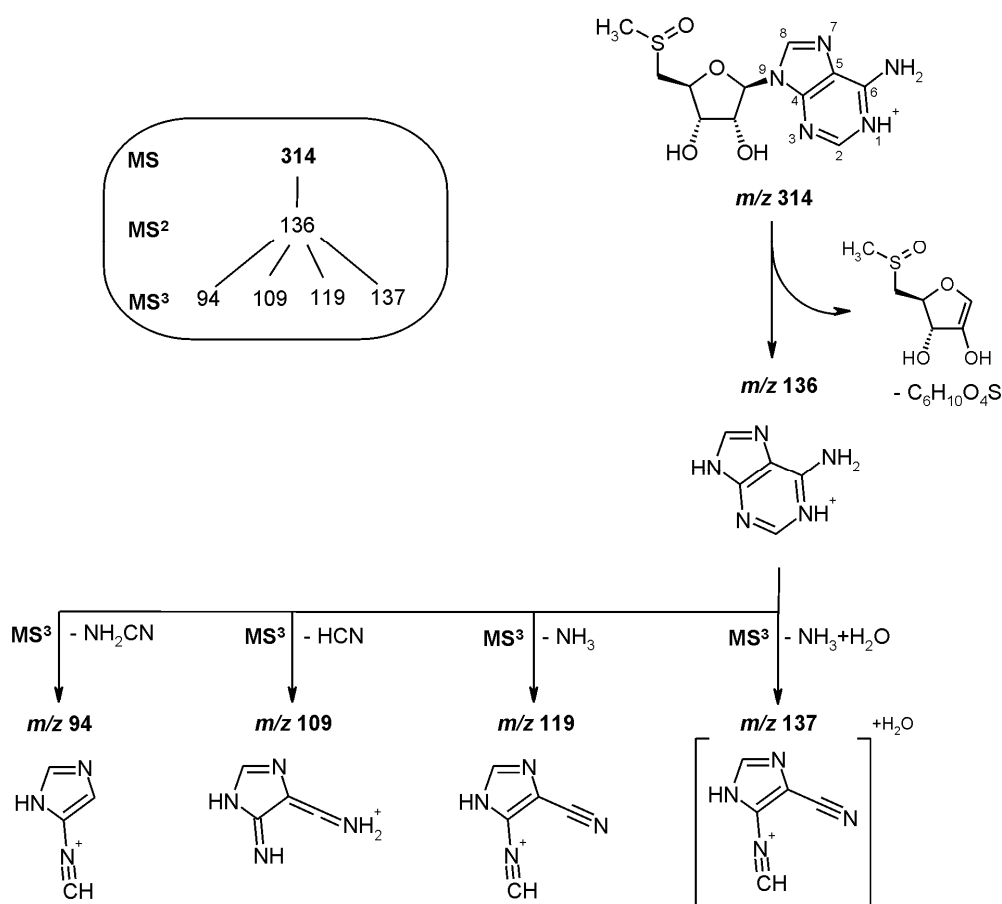


Abbildung 68: Schematische Darstellung (Kasten) und postulierte Mechanismen der MS^n -Fragmentierungshierarchie von 5'-Deoxy-5'-methyl-thioadenosinsulfoxid (MTA-SO, m/z 314).

Die entsprechenden Mechanismen sind bereits in Abb. 26 (Adenin) gezeigt. Eine Komponente mit ähnlichen Fragmentierungseigenschaften ist MTA, ein Nebenprodukt der Polyamin-Biosynthese. Dieser Metabolit spaltet im MS²-Schritt die konjugierte 5'-Methylthioribose (-162 Δm) unter Freisetzung der protonierten Adeninbase ab. Aus der Kombination des Summenformelvorschlages und des Massenshifts von 16 Da (Sauerstoff) beim MS²-Neutralverlust, konnte der unbekannte Metabolit folglich als das S-oxidierte Derivat von MTA, 5'-Deoxy-5'-methyl-thioadenosinsulfoxide (MTA-SO) identifiziert werden. Das Vorkommen dieser Verbindung im menschlichen Urin wurde erstmals von *Mills et al.* beschrieben^[195]. Bei den kalkulierten Doppelbindungsäquivalenten ist wie unter 3.1.4.6 beschrieben, die Sulfoxid-Doppelbindung aufgrund der erhöhten Valenz auszuschließen. Der resultierende DBE-Wert von sieben ist demnach auf die restliche Adenosinstruktur verteilt.

Abb. 69 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit identifizierten, bislang nicht in der Literatur beschriebenen Metaboliten des menschlichen Urins. Eine Liste aller identifizierten Strukturen findet sich in Tab. 10.

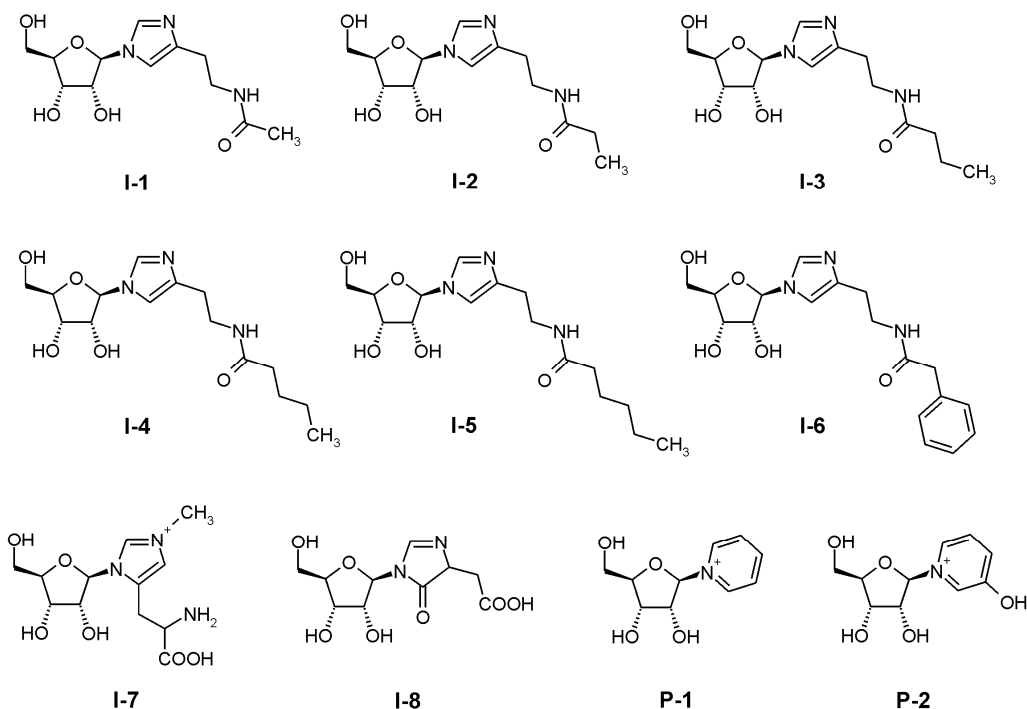


Abbildung 69: Strukturen von identifizierten, bislang unbekanntem Metaboliten im menschlichen Urin. I (Grundstruktur Imidazol), P (Grundstruktur Pyridin).

Tabelle 10: Liste aller identifizierten Metaboliten, geordnet nach Metabolitenklasse. Nummerierung analog zu Tab. 7/8. Zugehörige Strukturformeln im Metabolitenverzeichnis (vgl. Kap. 6).

Nr.	RT	[MH] ⁺	Metabolit identifiziert als
Modifizierte Nucleoside			
6	7,0	346	3-(3-Aminocarboxypropyl)-uridin
7	7,0	302	5-Carbamoylmethyluridin
16	40,0	398	2-Methylthio-N ⁶ -(cis-hydroxyiso-pentenyl)-adenosin
17	41,0	326	N ² ,N ² ,7-Trimethylguanosin
18	42,5	333	5-Methoxycarbonylmethyl-2-thiouridin
21	49,5	427	N ⁶ -Methyl-N ⁶ -threonylcarbamoyladenosin
22	50,0	459	2-Methylthio-N ⁶ -threonylcarbamoyladenosin
Histidin-Metaboliten			
1	3,0	302	1-Ribosyl-3-methyl-5-(2-aminocarboxyethyl)-imidazolium
2	3,5	288	1-Ribosyl-L-histidin
3	4,0	259	1-Ribosyl-4-carboxymethyl-imidazol
9	9,5	286	1-Ribosyl-4-ethyl-N-(methylcarbonylamino)-imidazol
11	14,0	275	1-Ribosyl-4-carboxymethyl-5-oxo-imidazol
12	16,5	300	1-Ribosyl-4-ethyl-N-(ethylcarbonylamino)-imidazol
14	28,0	314	1-Ribosyl-4-ethyl-N-(propylcarbonylamino)-imidazol
19	43,0	328	1-Ribosyl-4-ethyl-N-(butylcarbonylamino)-imidazol
20	46,5	362	1-Ribosyl-4-ethyl-N-(benzylcarbonyl)-amino-imidazol
23	51,5	342	1-Ribosyl-4-ethyl-N-(pentylcarbonylamino)-imidazol
Metaboliten aus dem Nicotinat / Nicotinamid-Stoffwechsel			
4	4,6	255	1-Ribosyl-3-carbamoyl-pyridinium
5	5,0	212	1-Ribosyl-pyridinium
8	7,5	228	1-Ribosyl-3-hydroxy-pyridinium
Metaboliten aus der Purin-Biosynthese			
10	10,5	259	1-Ribosyl-4-carbamoyl-5-amino-imidazol
13	24,5	384	N ⁶ -Succinyladenosin
Metabolit aus dem Methionin / Polyamin-Zyklus			
15	31,5	314	5'-Deoxy-5'-methyl-thioadenosinsulfoxide

3.1.5.6 MS-Daten und Strukturhypothesen für weitere isolierte Metaboliten

Mit den generierten MS-Daten konnte wie zuvor aufgeführt eine Reihe bisher unbekannter Verbindungen identifiziert werden. Bei einigen isolierten Metaboliten reichten die durchgeführten IT-MSⁿ und FT-ICR-MS-Messungen nicht für eine eindeutige Aufklärung der unbekannt Strukturen aus.

Tabelle 11: IT-MSⁿ-Resultate weiterer Metaboliten, geordnet nach steigender Retentionszeit (RT) in der LC-MS-Analytik. Fr.: DC-Fraktion mit größter Anreicherung. [BH]⁺: protonierte Base aus MS², entstanden durch Zuckerneutralverlust der unmodifizierten Ribose (-132 Δm), kursiv: neutral gains. Nummerierung fortlaufend zu Tab. 7/8.

Nr.	RT	Fr.	MS	MS ²	MS ³	MS ⁴	MS ⁵	MS ⁶
24	6,0	9	273	141	123 (BH ⁺ -H ₂ O)	95 (123-CO) 81 (123- CH ₂ CO)	68 (95-HCN)	
25	9,0	2	256	124	109 (BH ⁺ -•CH ₃) 108 (BH ⁺ -CH ₄) 106 (BH ⁺ -H ₂ O) 96 (BH ⁺ -CO) 93 (BH ⁺ -NH ₂ CH ₃) 80 (BH ⁺ -CO-CH ₄)	80 (108-CO)		
26	10,0	2	325	193	175 (BH ⁺ -H ₂ O) 162 (BH ⁺ -NH ₂ CH ₃) 134 (BH ⁺ -NH ₂ CH ₃ -CO)	157 (175-H ₂ O) 147 (175-CO) 134 (175-CH ₃ CN) 132 (175-HNCO) 130 (175-NH ₂ CHO) 120 (175-CO-HCN) 118 (175-CH ₃ NCO) 134 (162-CO) 118 (162-CO ₂) 106 (162- 2x CO) 106 (134-CO)	116 (134-H ₂ O) 106 (134-CO)	78 (106-CO)
27	10,0	2	226	94	96 (78+H ₂ O) 78 (BH ⁺ -CH ₄) 67 (BH ⁺ -HCN) 65 (BH ⁺ -CH ₂ NH) 53 (BH ⁺ -CH ₃ CN)	78 (96-H ₂ O)		
28	12,5	2	327	195	177 (BH ⁺ -H ₂ O)	146 (177-NH ₂ CH ₃) 118 (177 -NH ₂ CH ₃ -CO)	128 (146-H ₂ O) 118 (146-CO)	91 (118-HCN)
29	18,0	7	301	169	150 (BH ⁺ -19?) 137 (BH ⁺ -CH ₃ OH)	95 (150-CO-HCN) 127 (109+H ₂ O)	68 (95-HCN) 109 (127-H ₂ O)	127 (109+H ₂ O) 100 (82+H ₂ O) 82 (109-HCN) 66 (109-HNCO)
						109 (137-CO)		

Nr.	RT	Fr.	MS	MS ²	MS ³	MS ⁴	MS ⁵	MS ⁶
30	32,0	2	293	161	143 (BH ⁺ -H ₂ O) 116 (BH ⁺ -H ₂ O-HCN)	161 (143+H ₂ O) 134 (116+H ₂ O) 116 (143-HCN) 89 (116-HCN)	89 (116-HCN)	
31	34,5	9	376	244	227 (BH ⁺ -NH ₃) 226 (BH ⁺ -H ₂ O) 162 (BH ⁺ -82) 155 (BH ⁺ -89) 148 (BH ⁺ -96) 137 (BH ⁺ -107) 136 (BH ⁺ -108) 135 (BH ⁺ -109)	148 (162-14) 145 (162-NH ₃) 135 (162-HCN) 121 (162-CH ₃ CN) 108 (162-2 x HCN) 94 (162-HCN-CH ₃ CN) 128 (110+H ₂ O) 119 (137-H ₂ O) 110 (137-HCN) 94 (137-43) 119 (136-NH ₃) 109 (136-HCN) 94 (136-NH ₂ CN) 118 (135-NH ₃) 108 (135-HCN) 94 (135-CH ₃ CN) 81 (135-2 x HCN)	118 (135-NH ₃) 108 (135-HCN) 94 (135-CH ₃ CN) 81 (135-2 x HCN)	
32	40,5	8	299	167	149 (BH ⁺ -H ₂ O) 128 (110+H ₂ O) 110 (BH ⁺ -CH ₃ NCO)	128 (110+H ₂ O) 82 (110-CO)		
33	46,0	6	313	181	167 (149+H ₂ O) 149 (BH ⁺ -32) 142 (124+H ₂ O) 137 (BH ⁺ -44) 124 (BH ⁺ -CH ₃ NCO) 120 (BH ⁺ -61) 110 (BH ⁺ -71) 108 (BH ⁺ -73) 98 (BH ⁺ -83) 96 (BH ⁺ -CH ₃ NCO-CO)	149 (167-H ₂ O) 141 (123+H ₂ O) 123 (167-44) 126 (108+H ₂ O) 120 (137-NH ₃) 110 (137-HCN) 108 (137-CH ₂ NH) 96 (137-CH ₃ CN) 93 (137-44) 109 (124-•CH ₃) 96 (124-CO)	106 (123-NH ₃) 96 (123-HCN) 93 (120-HCN) 93 (110-NH ₃) 83 (110-HCN) 81 (110-CH ₂ NH) 79 (96-NH ₃) 69 (96-HCN) 69 (96-HCN)	42 (69-HCN)

Tabelle 12: FT-MS Resultate weiterer Metaboliten, SF: Summenformelvorschlag, DBE: Doppelbindungsäquivalente, EC: externe Kalibrierung, IC: interne Kalibrierung. Nummerierung analog zu Tab. 11.

Nr.	Masse [MH] ⁺	SF [MH] ⁺	Δ ppm	DBE
24	273,108103	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₆	-0,037 (IC)	5
27	226,107604	C ₁₁ H ₁₆ NO ₄	0,973 (IC)	5
28	327,154400	C ₁₅ H ₂₃ N ₂ O ₆	-2,026 (EC)	6
29	301,103068	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ O ₇	0,136 (IC)	6
31	376,092708	C ₂₀ H ₁₄ N ₃ O ₅ oder C ₁₂ H ₁₈ N ₅ O ₇ S	-0,237 (IC) -1,734 (IC)	16 7
33	313,114289	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ O ₆	0,090 (IC)	7

In einigen Fällen konnten mit den generierten Daten plausible Strukturhypothesen erstellt werden, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

- Für Metabolit Nr. 24 (m/z 273) konnte per FT-MS-Messung eine Summenformel von [C₁₁H₁₇N₂O₆]⁺ (DBE = 5) bestimmt werden, was strukturell auf ein monomethyliertes Derivat von IAA-R ([C₁₀H₁₅N₂O₆]⁺) schließen lässt. Prinzipiell ist die formelle Methylenenerweiterung der IAA-R-Struktur über eine Kettenverlängerung zur entsprechenden Propionsäure oder eine Methylierung der Imidazolring-Stickstoffe denkbar. Der Methylester kann anhand der beobachteten Fragmentierungsreaktionen ausgeschlossen werden. Aufgrund der unter 3.1.6.3. beschriebenen Messungen von m/z 273 im negative mode und der hierbei beobachteten Methylradikalabspaltung (nicht möglich bei der Kettenverlängerung) ist die Methylierung im Ringsystem sehr wahrscheinlich. Als Referenzsubstanz stand 1-Methyl-4-carboxymethyl-imidazol als eine der beiden möglichen Stellungsisomere für die MSⁿ-Analytik zur Verfügung. Wie im Vergleich der MSⁿ-Spektren mit dem des unbekanntes Metabolits m/z 273 zu erkennen ist (vgl. Abb. 70), zeigt der Standard eine, insbesondere im Eliminierungsverlauf der Carbonsäurefunktion, divergierende Fragmentierungshierarchie. Diese wird im Fall des Standards als Ameisensäure (-46 Δm), bei m/z 273 stufenweise über H₂O und CO-Eliminierung abgespalten. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich nach allen gewonnenen Informationen bei Metabolit m/z 273 um das, bislang nicht in der Literatur beschriebene, 1-Ribosyl-3-methyl-4-carboxy-

methyl-imidazolium (vgl. Abb. 70B). Eine finale Überprüfung dieser Hypothese steht noch aus und muss über die Synthese des entsprechenden Standards in weiteren Arbeiten erfolgen.

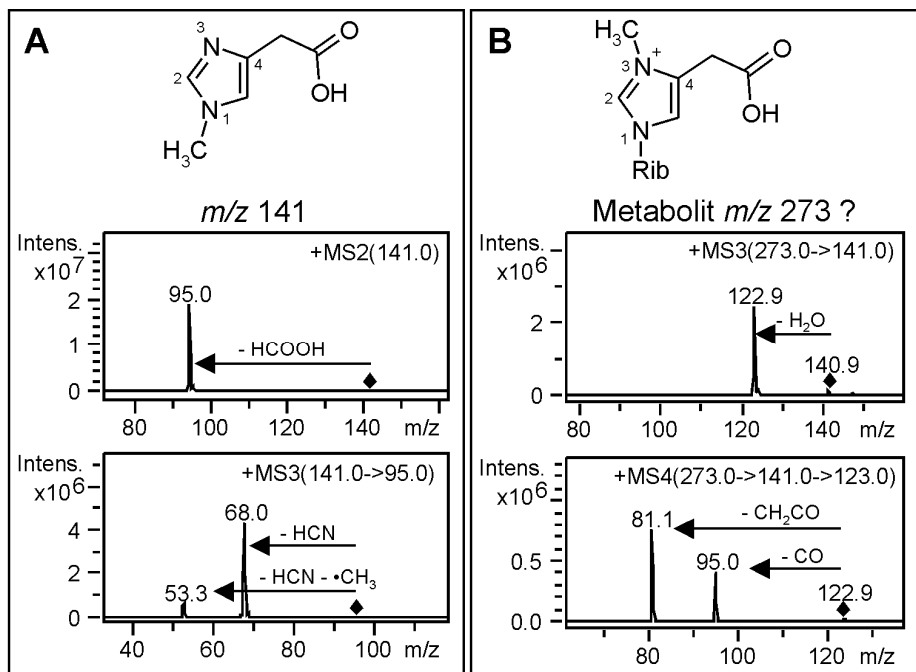


Abbildung 70: Vergleich der MSⁿ-Fragmentierung des Standards 1-Methyl-4-carboxymethylimidazol (m/z 141) (A) und des unbekannten Metabolits m/z 273 (B), vermutlich 1-Ribosyl-3-methyl-4-carboxymethylimidazolium.

- Für Metabolit Nr. 25 (m/z 256) und Nr. 26 (m/z 325) konnten im Verlauf dieser Arbeit keine FT-MS-Daten gewonnen werden. Die durchgeführten MSⁿ-Messungen zeigen bei beiden Verbindungen ein uncharakteristisches Fragmentierungsmuster, weshalb zum jetzigen Zeitpunkt keine verlässlichen Aussagen zu den entsprechenden Strukturen gemacht werden können.

- Wie aus den FT-MS Messungen (Summenformelvorschlag $[C_{11}H_{16}NO_4]^+$) von Metabolit Nr. 27 (m/z 226) zu erkennen ist, könnte es sich bei der unbekannten Struktur um ein methyliertes Derivat der bereits identifizierten Komponente 1-Ribosyl-pyridinium (m/z 212) handeln. Die MS³-Fragmentierung zeigt die für Pyridinstrukturen typische Doppeliminierung des Ringstickstoffs als HCN und CH₂NH (vgl. Abb. 59 und 60). Aus den MSⁿ-Daten konnten auch Rückschlüsse auf die entsprechende Methylierungsposition gezogen werden. Der charakteristische Neutralverlust CH₃CN ist in dieser Form lediglich bei einer Methylierung in ortho-Position möglich. Somit ergibt sich für den unbekannten

Metabolit die Strukturhypothese eines 1-Ribosyl-2-methyl-pyridiniums. Abschließende Messungen stehen bislang noch aus. Eine geeignete Möglichkeit zur Verifizierung der Methylposition wäre die Anwendung der unter 3.1.5.3 vorgestellten Technik zur Abspaltung der Riboseeinheit durch druckgestützte Säurehydrolyse. Die freigesetzte Methylpyridineinheit könnte anschließend über eine chromatographische Trennmethode im Vergleich zu den entsprechenden Standards zugeordnet werden.

- Für Metabolit Nr. 28 (m/z 327) konnte über die hochaufgelöste Masse ein Summenformelvorschlag von $[C_{15}H_{23}N_2O_6]^+$ mit korrespondierenden sechs Doppelbindungsäquivalenten generiert werden. Die MS^n -Fragmentierungshierarchie ergab keine, für die strukturelle Aufklärung charakteristische Neutralverluste. Eine durchgeführte Datenbanksuche (SciFinder), mit der Molekularzusammensetzung und der konjugierten Ribosyleinheit als funktionelle Gruppe, resultierte in keinen sinnvollen Strukturvorschlägen.

- Metabolit Nr. 29 ergab in den FT-MS-Messungen ein exaktes Masse / Ladungs-Verhältnis von 301,103068 mit korrespondierender Summenformel $[C_{12}H_{17}N_2O_7]^+$. Die zunächst vermutete ribosylierte Harnsäurestruktur (Summenformel: $[C_{10}H_{13}N_4O_7]^+$) konnte hierdurch ausgeschlossen werden. Durch die Anzahl von zwei Stickstoffen sind Purinstrukturen (vier Stickstoffe) generell nicht möglich. Modifizierte Uridine, Imidazole und Pyridine könnten hingegen die potentielle Grundstruktur bilden. Die MS^n -Messungen lieferten bis auf den charakteristischen CH_3OH -Neutralverlust, welcher bei konjugierten Methoxyfunktionen oder auch Methylestern beobachtet werden kann (vgl. Abb. 51), keine aussagekräftigen Informationen. Auch die Datenbanksuche im SciFinder ergab keine sinnvollen Strukturvorschläge. Die exakte Strukturaufklärung, basierend auf den ermittelten Daten, bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten.

- Für Metabolit Nr. 30 (m/z 293) konnte mit den ermittelten Daten keine Strukturhypothese aufgestellt werden. Die FT-MS-Messung der Komponente war trotz Aufkonzentrierung nicht möglich. Auch die Informationen aus der IT- MS^n -Analytik mit einer uncharakteristischen HCN-Eliminierungsserie und eini-

gen H₂O-Adduktbildungen lieferten keinerlei Anhaltspunkte für die weitere Strukturaufklärung.

• Mit einem exakten Masse / Ladungs-Verhältnis von 376,092708 aus der durchgeführten FT-MS-Messung konnte für Metabolit Nr. 31 eine Summenformel von [C₂₀H₁₄N₃O₅]⁺ kalkuliert werden. Aus dieser ergibt sich ein sehr hoher DBE-Wert von 16, der ein hochkomplexes Ringsystem mit einer großen Anzahl an Mehrfachbindungen anzeigt und von regulären Komponenten der untersuchten Stoffklassen kaum erreicht werden kann. Die zweite mögliche Summenformel von [C₁₂H₁₈N₅O₇S]⁺ mit realistischen sieben Doppelbindungsäquivalenten wurde deshalb, trotz eines deutlich höheren ppm-Fehlers von -1,734, ebenfalls ins Kalkül gezogen. Eine zusätzliche Messung an einem APEX-Qe-FT-MS-Gerät, durchgeführt von Herrn Dr. Jens Fuchser von der Firma Bruker Daltonics, konnte diese Vorgehensweise bestätigen. Die Auswertung lieferte bei einem gemessenen *m/z* von 376,09222 ebenfalls beide zuvor genannten Summenformelvorschläge, allerdings mit einem deutlich kleineren ppm-Fehler von 0,186 für [C₁₂H₁₈N₅O₇S]⁺ im Vergleich zu -1,543 für [C₂₀H₁₄N₃O₅]⁺. Zusätzlich wurde die Isotopenmusteranalyse durchgeführt und der korrespondierende SigmaFit errechnet (vgl. 3.1.4.7). Auch hier ergab sich für das schwefelhaltige Derivat ein deutlich besserer Wert von 0,0883 im Vergleich zu 0,1349 für den zweiten Summenformelvorschlag. Die weitere Strukturaufklärung basiert daher auf der Molekularzusammensetzung [C₁₂H₁₈N₅O₇S]⁺. Die IT-MSⁿ-Messungen ergaben aus der MS³-Spaltung der Base *m/z* 244 neben Masseverlusten kleiner, uncharakteristischer Neutralteilchen wie H₂O und NH₃ interessante Eliminierungsreaktionen großer funktioneller Einheiten. Einen hohen Informationsgehalt weist insbesondere Fragment *m/z* 136 auf, welches nominell der protonierten Adeninbase entspricht. Im anschließenden MS⁴-Schritt ergaben sich folgerichtig die typischen Adenin-Fragmente *m/z* 119, 109 und 94 (vgl. Abb. 26). Ungeklärt bleibt in diesem Zusammenhang die Aufspaltung in ein „Triplett“ der MS³-Fragment-Ionen *m/z* 135, 136, 137.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurden die errechneten Doppelbindungsäquivalente herangezogen. Die vermutete Adenosin-Grundstruktur besetzt bereits alle sieben DBE (vgl. 3.1.4.6), so dass für eine konjugierte Seitenkette keine

zusätzlichen Ringschlüsse oder Mehrfachbindungen mehr möglich wären. Eine Ausnahme würde, wie bereits aus der Berechnung von MTA-SO bekannt, das Vorliegen von Schwefel-Sauerstoffdoppelbindungen bilden. Aus dem Summenformelvorschlag bleiben nach Abzug der vier Sauerstoffe aus der konjugierten Ribose noch drei für die Seitenketten. Gebunden an Schwefel könnte es sich formell um ein konjugiertes Sulfon handeln. Diese ungewöhnliche Modifikation wurde erstmals im Jahr 2001 von *Suzuki et al.* in mitochondrialer Säuger-tRNA nachgewiesen^[196]. Für die Biosynthese der beiden identifizierten Komponenten 5-Taurinomethyl-uridin und 5-Taurinomethyl-2-thiouridin wurde die direkte Konjugation der Aminosäure Taurin an spezifische Uridinpositionen in tRNA-Molekülen postuliert^[197]. Eine Taurin-Modifikation von Adenosinen ist bislang nicht in der Literatur beschrieben. Abb. 71 zeigt die aus den gewonnenen Daten generierte Strukturhypothese für den Metabolit m/z 376.

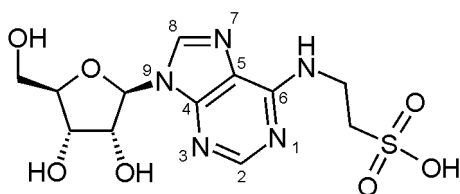


Abbildung 71: Strukturhypothese für Metabolit m/z 376: 9-Ribosyl-6-aurinopurin (die Aminofunktion an C-6 kann im Trivialnamen formell sowohl der Taurinfunktion als auch dem Adenosin zugeordnet werden).

Aus der postulierten Struktur sind einige der zunächst unklaren Neutralverluste in MS^3 nachvollziehbar. So ergibt sich das Fragment-Ion m/z 162 vermutlich aus der Abspaltung der Sulfongruppe als H_2SO_3 (-82 Δm) und m/z 148 aus der entsprechenden Methylsulfonsäure CH_3HSO_3 (-96 Δm).

- Die beiden isolierten Metaboliten Nr. 32 und 33 (m/z 299 bzw. 313) basieren mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einer gemeinsamen Xanthosin-Grundstruktur (m/z 285, $[C_{10}H_{13}N_4O_6]^+$), wobei die generierten MS-Daten auf das entsprechende mono- bzw. dimethylierte Derivat hindeuten. Für die Ermittlung der Methylposition im vermuteten Monomethylxanthosin standen als Referenzstandards die Xanthinbasen 1-Methylxanthin und 3-Methylxanthin zur Verfügung.

Wie in Abb. 72 zu sehen ist, ergaben sich in den IT-MS-Messungen annähernd identische Fragmentierungsmuster zwischen dem semiquantitativ aufgereinigten Metabolit m/z 299 und 1-Methylxanthin. Die Unterschiede in der Intensität des Fragment-Ions m/z 128 können vernachlässigt werden, da es sich hierbei um eine Wasseranlagerung (neutral gain) handelt. Das 3-Methylxanthinderivat konnte ausgeschlossen werden, da hier im MS^2 -Schritt keine CH_3NCO -Eliminierung, sondern ausschließlich die Abspaltung von $HNCO$ (m/z 167 \rightarrow m/z 124) zu beobachten war. Bei der unbekanntem Verbindung handelt es sich also vermutlich um 1-Methylxanthosin. Die freie Base ist ein bekannter Metabolit des Coffeins^[198;199], das ribosylierte Analogon ist hingegen nicht als Stoffwechselprodukt in der Literatur beschrieben.

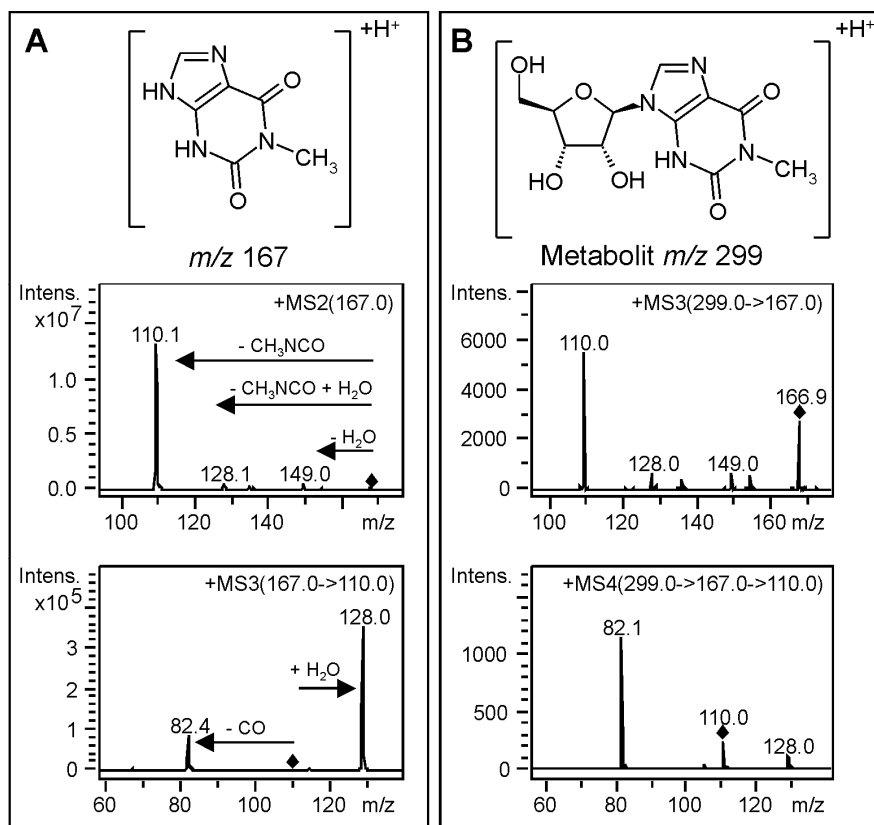


Abbildung 72: Vergleich der MS^n -Fragmentierung des Standards 1-Methylxanthin (A) und des unbekanntem Metabolit m/z 299 (B), vermutlich das ribosylierte Analogon 1-Methylxanthosin.

Über die FT-MS-generierte Summenformel $[C_{12}H_{17}N_4O_6]^+$ für m/z 313 konnte die vermutete doppelte Methylmodifikation verifiziert werden (bei m/z 299 war aufgrund der äußerst geringen Konzentration keine FT-MS-Messung möglich).

Die dimethylierten Xanthinbasen Paraxanthin (1,7-Dimethylxanthin), Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) und Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin), allesamt Metaboliten des Coffeins, standen als Referenzsubstanzen zur Verfügung und wurden für den Vergleich der Fragmentierungsmuster mittels Spritzenpumpeninjektion an der Ionenfalle gemessen (vgl. Abb. 73).

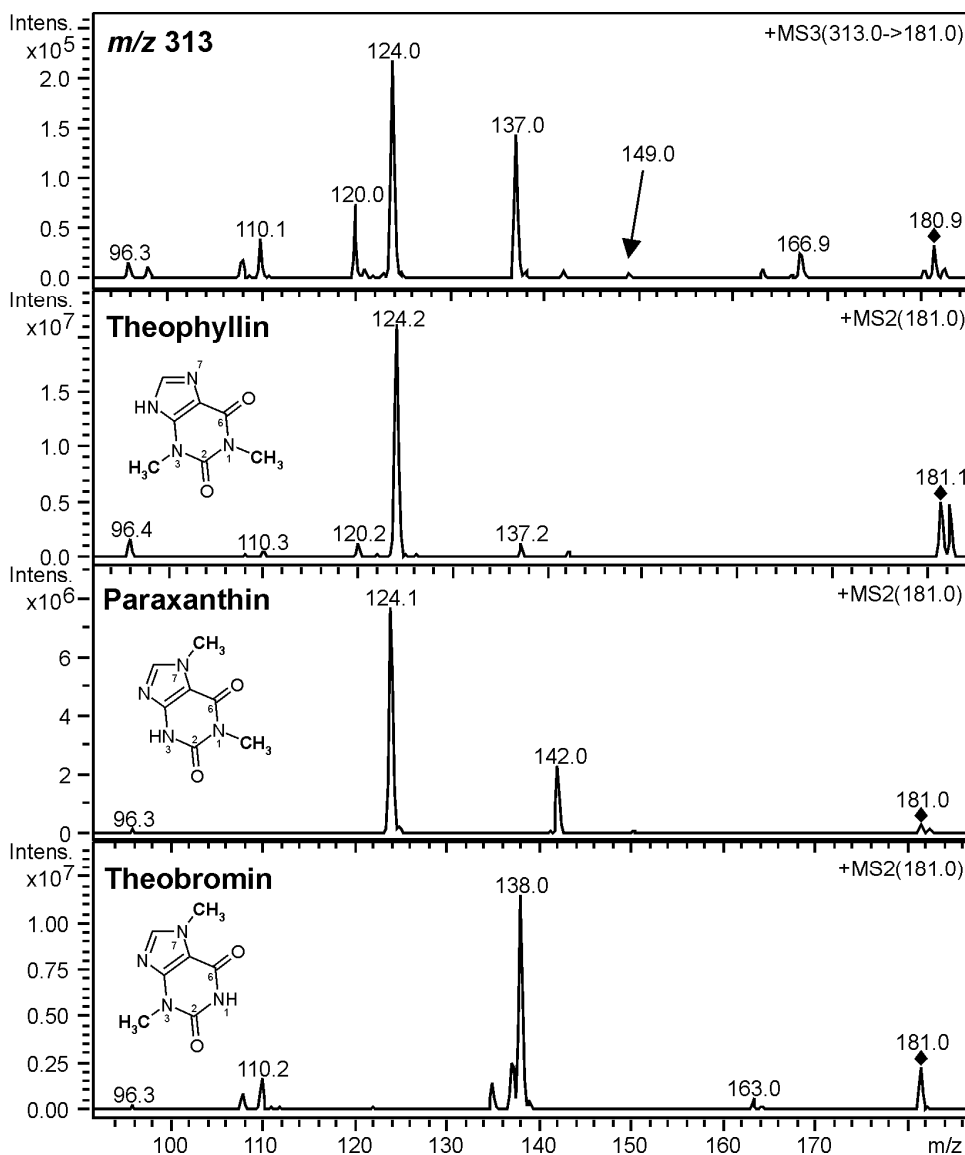


Abbildung 73: Vergleich der MS^n -Fragmentierungsmuster des vermuteten, dimethylierten Xanthosinderivats m/z 313 mit den möglichen Dimethylxanthin-Basenstandards.

Vergleicht man die Initialfragmentierung des semipräparativ aufgereinigten Metabolits m/z 313 mit den analysierten Dimethylxanthinstandards ergeben sich charakteristische Fragmentierungshierarchien. Der Neutralverlust von CH_3NCO

erfolgt ausschließlich bei den N-1-methylierten Xanthinen. Bei Theobromin wird diese Abspaltung nicht beobachtet, obwohl diese auch prinzipiell von der methylierten N-3-Position unter Einschluss von C-2 und O² denkbar wäre. Stattdessen kommt es zum Neutralverlust von HNCO (m/z 138). Theobromin konnte folglich aufgrund abweichender MS²-Fragmentierungsmuster als konjugierte Base des Metabolits m/z 313 ausgeschlossen werden. Paraxanthin zeigt zwar Gemeinsamkeiten mit der Basenfragmentierung von m/z 313, es fehlen jedoch einige Minorfragmente wie m/z 137, 120, 110. Der Vergleich mit Theophyllin ergibt das ähnlichste Fragmentierungsmuster, jedoch mit Abweichungen in den einzelnen Intensitäten (z.B. m/z 137, 120, 110). Einen wichtigen Aspekt liefert in diesem Zusammenhang die Bildung des vermuteten Adduktions m/z 167, welches lediglich bei m/z 313, aber nicht bei den Standardbasen zu detektieren war. Wie in der Fragmentierungshierarchie in Tab. 11 zu sehen, wird m/z 167 über die Anlagerung eines Wassermoleküls an das Fragment m/z 149 gebildet. Der resultierende Massenübergang von 32 Da (m/z 181 → m/z 149) entspricht einem CH₃OH-Verlust, welcher statt einer doppelten N-Methylierung wie in Theophyllin auf die Involvierung einer Sauerstoff-Methylierung hindeuten könnte. Der zu beobachtende Neutralverlust von 57 Da (m/z 181 → m/z 124) als CH₃NCO wäre in diesem Fall prinzipiell auch als CH₃OCN denkbar. Für den Metabolit m/z 313 können nach Abschätzung der gewonnenen Daten die in Abb. 74 gezeigten Strukturhypothesen aufgestellt werden. Aufgrund der nach dem Neutralverlust von 57 Da (CH₃OCN oder CH₃NCO) beobachteten Eliminierungen eines Methylradikals und CO aus m/z 124 in MS³ (vgl. Tab. 11), sind die Strukturen 3,O²-Dimethylxanthosin bzw. 3,O⁶-Dimethylxanthosin aus der Reihe der O-methylierten Xanthosine hoch wahrscheinlich. Bei diesen Verbindungen wären die beiden genannten Abspaltungen nach der Eliminierung von CH₃OCN (Positionen O², C-2, N-1 bzw. O⁶, C-6, N-1) möglich, bei allen anderen O-methylierten Derivaten hingegen nicht. O-methylierte Xanthinstandards standen in dieser Arbeit nicht zur Verfügung und müssten für eine finale Strukturaufklärung synthetisiert werden.

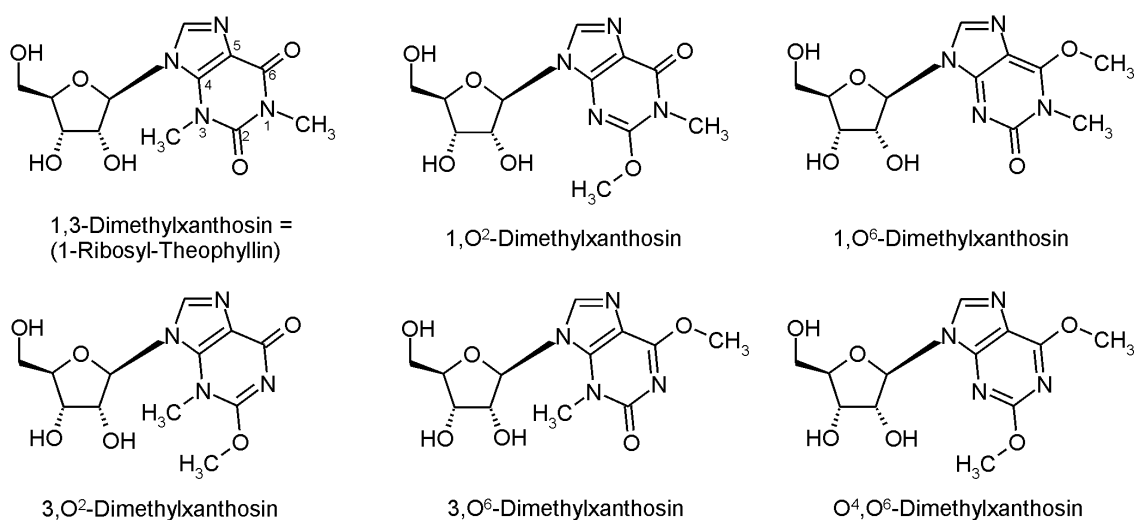


Abbildung 74: Strukturvorschläge für Metabolit m/z 313.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Strukturhypothesen für die Metaboliten aus Tab. 11.

Nr.	RT	[MH] ⁺	Strukturhypothese
24	6,0	273	1-Ribosyl-3-methyl-4-carboxymethyl-imidazolium
25	9,0	256	---
26	10,0	325	---
27	10,0	226	1-Ribosyl-2-methyl-pyridinium
28	12,5	327	---
29	18,0	301	---
30	32,0	293	---
31	34,5	376	9-Ribosyl-6-taurinopurin
32	40,5	299	1-Methylxanthosin
33	46,0	313	3,O ² -Dimethylxanthosin oder 3,O ⁶ -Dimethylxanthosin

3.1.6 ESI-IT-MSⁿ-Messungen im negative mode

3.1.6.1 Bisherige Arbeiten

Neben den zahlreichen Veröffentlichungen zur massenspektrometrischen Analytik von Ribonucleosiden im positive mode gibt es nur wenige Publikationen zur MS-Analytik im negative mode. Dies kann mit den deutlich geringeren Ionisierungsausbeuten infolge des basischen Charakters der Purin- und Pyrimidinstrukturen erklärt werden. Trotz dieser Einschränkung kann der negative mode wichtige Aspekte bei der Strukturanalytik von Nucleosiden liefern. In diesem Zusammenhang wurde auf charakteristische Fragment-Ionen und die generell übersichtlicheren Spektren mit einer deutlich geringeren Anzahl an Fragmentierungswegen hingewiesen^[200].

Neben der auch im negative mode zu beobachtenden Abspaltung der kompletten, intakten Zuckereinheit an der C-N-glykosidischen Bindung, wird in den meisten Publikationen über Eliminierungsreaktionen in der Zuckereinheit berichtet^[201;202]. *Claereboudt et al.* untersuchten die Fragmentierungsmuster von ¹⁵N-markiertem U mittels FAB-CID-MS/MS^[203]. Hierbei konnten charakteristische Fragment-Ionen beobachtet werden, die in Abb. 75 schematisch dargestellt sind. Auffällig sind die kombinierten Eliminierungen von Kohlenhydratelementen wie C₃H₆O₃ (-90 Δm) und C₂H₄O₂ (-60 Δm) aus der konjugierten Ribose sowie HNCO (-43 Δm, bestätigt aus der Isotopenmarkierung) aus der Pyrimidinbase. Ein weiteres Fragment-Ion mit *m/z* 152 (-91 Δm) konnte über einen konsekutiven Neutralverlust von CH₂O und H₂O aus dem Ribosylrest sowie HNCO aus der Uracilbase erklärt werden. Analoge Eliminierungsreaktionen wurden auch für das Pyrimidinnucleosid C beobachtet. *Sakurai et al.* analysierten die vier Basisnucleoside A, C, G und U mittels FAB-Tandemmassenspektrometrie^[204]. Neben den bereits genannten Neutralverlusten der dehydratisierten Ribose (C₅H₈O₄) sowie der C₃H₆O₃-Eliminierung, wurde die Abspaltung einer C₄H₈O₃-Funktion (-104 Δm) aus dem Ribosylrest detektiert. Interessanterweise wurden die Spaltreaktionen innerhalb der Zuckereinheit nur bei C, G und U beobachtet, nicht jedoch bei A, welches ausschließlich zur deprotonierten Adeninbase spaltete. *Zhang und Wang* nutzten die charakteristischen Spaltreaktionen der

Zuckereinheit im negative mode zur massenspektrometrischen Unterscheidung von 2'-O- und 3'-O-Methylierung bei Ribonucleosiden. In IT-MS/MS-Experimenten konnte der Neutralverlust der C₃H₆O₃-Einheit ausschließlich bei den 2'-O-Methylvarianten von C, G und A detektiert werden, während im Falle der Uridine eine Unterscheidung aufgrund der C₂H₄O₂-Eliminierung möglich war. Letztere war beim 3'-O-Methyluridin, nicht aber beim 2'-O-Methyluridin, zu beobachten^[205].

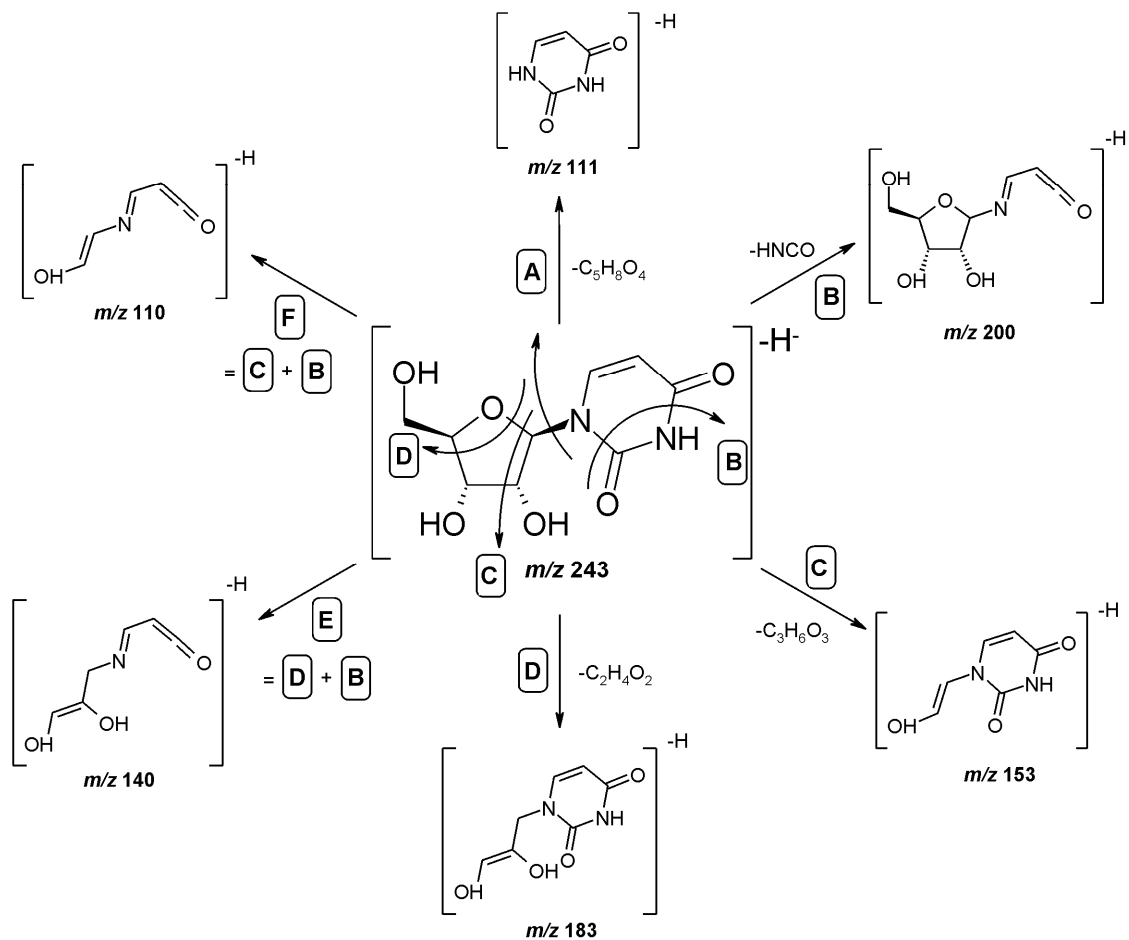


Abbildung 75: MS²-Fragmentierungsmuster von Uridin im negative mode, modifiziert nach Claereboudt et al.^[203]. Anm.: Fragmentierung D ist im Massenspektrum nicht isoliert zu sehen und nur zur besseren Übersicht dargestellt. Unter konsekutiver Eliminierung von HNCO entsteht stattdessen direkt m/z 140.

3.1.6.2 IT-MSⁿ-Messung von Nucleosidstandards im negative mode

Die bisherigen Arbeiten im negative mode beschränken sich zumeist auf MS/MS-Analytik mit einfacher Fragmentierung der jeweiligen Muttermasse. Zur expliziten Weiterfragmentierung einzelner Tochterionen, unter anderem der entstehenden deprotonierten Base [B]⁻, sind bislang nur wenige Daten publiziert^[204;206]. Insbesondere für stellungsisomere Modifikationen an Purin- und Pyrimidinbasen könnten diese Messungen jedoch wichtige Informationen zur strukturellen Zuordnung liefern. Die Aufklärung der entsprechenden MSⁿ-Fragmentierungshierarchien wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit mittels Ionenfallenanalytik durchgeführt.

Für die Messung wurden zunächst Lösungen von Nucleosidstandards (Konzentration ~ 0,1 mg/ml) in 0,1%iger wässriger Ammoniaklösung angesetzt und diese mittels Spritzenpumpeninjektion (Flussrate: 300 µl/h) an der Ionenfalle gemessen. In der eingesetzten MS-Methode 2 (vgl. 5.3.3.3) erfolgte analog zu den Messungen im positive mode die manuelle Parameteranpassung von fragmentation amplitude und cut-off. Um charakteristische Eliminierungsreaktionen innerhalb der Riboseeinheit detektieren zu können, wurde der cut-off zunächst auf einen Wert oberhalb des *m/z*-Wertes der zugehörigen Base festgelegt. Hierdurch konnte eine gezielte Analyse der beschriebenen Zuckerspaltungen erfolgen. Für die Fragmentierung zur deprotonierten Base [B]⁻, wurde der cut-off unterhalb des entsprechenden *m/z*-Wertes angesetzt. Anschließend wurden [B]⁻ und andere dominante Tochterionen aus MS/MS weitergehenden Fragmentierungszyklen unterzogen. Abhängig von der jeweiligen chemischen Grundstruktur und der resultierenden Ionisierungsausbeute, konnten auf diese Weise Fragmentierungsreaktionen bis zu MS⁵ durchgeführt werden. Tab. 14 listet die in den IT-MSⁿ-Experimenten beobachteten Neutralverluste auf.

Tabelle 14: Ergebnisse der IT-MSⁿ-Messungen von Standardnucleosiden im negative mode, geordnet nach Nucleosid-Grundstrukturen Adenosin, Cytidin, Guanosin, Uridin, [M] = [M-H]⁻: deprotonierte Muttermasse, [B]⁻: deprotonierte Base (nach Zucker-neutralverlust), Rib: dehydratisierte Ribose, kursiv: neutral gains.

	MS [M] ⁻	MS ²	MS ³	MS ⁴	MS ⁵
A	266	134 [B] ⁻	107 ([B] ⁻ -HCN) 92 ([B] ⁻ -NH ₂ CN)	80 (107-HCN) 65 (92-HCN)	
m¹A	280	243 ([M] ⁻ -37) 148 [B] ⁻	133 ([B] ⁻ -•CH ₃) 107 ([B] ⁻ -CH ₃ NC)	80 (107-HCN)	
m⁶A	280	148 [B] ⁻	133 ([B] ⁻ -•CH ₃) 119 ([B] ⁻ -CH ₂ NH) 117 ([B] ⁻ -NH ₂ CH ₃)	117 (133-16) 106 (133-HCN) 105 (133-28) 79 (133-2 x HCN)	
t⁶A	411	365 ([M] ⁻ -HCOOH) 292 ([M] ⁻ -119) 279 [B] ⁻ 160 ([M] ⁻ -251) 144([M] ⁻ -Adenosin)	100 (144-CO ₂)	72 (100-CO)	
MTA	296	183 ([M] ⁻ -113) 134 [B] ⁻	107 ([B] ⁻ -HCN) 92 ([B] ⁻ -NH ₂ CN)	80 (107-HCN) 65 (92-HCN)	
C	242	199 ([M] ⁻ -HNCO) 152 ([M] ⁻ -C ₃ H ₆ O ₃) 126 ([M] ⁻ -116) 110 [B] ⁻ 109 ([M] ⁻ -HNCO-C ₃ H ₆ O ₃)	181 (199-H ₂ O) 109 (199- C ₃ H ₆ O ₃) 91 (199-C ₃ H ₈ O ₄) 134 (152-H ₂ O) 109 (152-HNCO) 91 (152-HNCO-H ₂ O) 67 ([B] ⁻ -HNCO) 91 (109-H ₂ O) 81 (109-CO) 67 (109-CH ₂ CO)		
ac⁴C	284	241 ([M] ⁻ -HNCO) 194 ([M] ⁻ -C ₃ H ₆ O ₃) 152 [B] ⁻	199 (241-CH ₂ CO) 163 (241-78) 134 (241-107) 151 (241- C ₃ H ₆ O ₃) 109 (241-Rib) 110 ([B] ⁻ -CH ₂ CO)	91 (110-19) 82 (110-CO) 67 (110-HNCO)	

	MS [M] ⁻	MS²	MS³	MS⁴	MS⁵	
G	282	150 [B]⁻	133 ([B] ⁻ -NH ₃) 108 ([B] ⁻ -NH ₂ CN) 107([B] ⁻ -HNCO)	106 (133-HCN) 105 (133-CO) 90 (133-HNCO) 78 (133-CO-HCN)		
IsoG	282	243 ([M] ⁻ -39) 150 [B]⁻	133 ([B] ⁻ -NH ₃) 108 ([B] ⁻ -NH ₂ CN) 107 ([B] ⁻ -HNCO)	80 (107-HCN)		
m¹G	296	164 [B]⁻	149 ([B] ⁻ -•CH ₃) 133 ([B] ⁻ -NH ₂ CH ₃) 121 ([B] ⁻ -HNCO) 106 ([B] ⁻ -•CH ₃ -HNCO)	106 (149-HNCO) 106 (133-HCN) 105 (133-CO) 90 (133-HNCO) 78 (133-HCN-CO) 106 (121-•CH ₃) 79 (106-HCN)		
m²G	296	164 [B]⁻	149 ([B] ⁻ -•CH ₃) 133 ([B] ⁻ -NH ₂ CH ₃) 121 ([B] ⁻ -HNCO) 106 ([B] ⁻ •CH ₃ -HNCO)	106 (149-HNCO) 106 (133-HCN) 105 (133-CO) 90 (133-HNCO) 78 (133-HCN-CO) 106 (121-•CH ₃) 79 (106-HCN)		
m²₂G	310	292 ([M] ⁻ -H ₂ O) 244 ([M] ⁻ -66) 220 ([M] ⁻ -C ₃ H ₆ O ₃) 192 ([M] ⁻ -118) 178 [B]⁻	163 ([B] ⁻ -•CH ₃) 133 ([B] ⁻ -((CH ₃) ₂ NH)	106 (133-HCN) 105 (133-CO) 90 (133-HNCO)		
U	243	200 ([M] ⁻ -HNCO) 153 ([M] ⁻ -C ₃ H ₆ O ₃) 152 ([M] ⁻ -HNCO-CH ₄ O ₂) 140 ([M] ⁻ -HNCO-C ₂ H ₄ O ₂) 122 ([M] ⁻ -HNCO-C ₂ H ₆ O ₃) 111 [B]⁻ 110 ([M] ⁻ -HNCO-C ₃ H ₆ O ₃)	152 (200-CH ₄ O ₂) 140 (200-C ₂ H ₄ O ₂) 122 (200-C ₂ H ₆ O ₃) 110 (200-C ₃ H ₆ O ₃) 83 [B] ⁻ -CO) 67 [B] ⁻ -44)	122 (140-H ₂ O) 82 (140-CH ₂ O-CO) 82 (110-CO)	94 (122-CO)	

3.1 Klinische Studie AKP-24: Massenspektrometrische Untersuchung ribosylierter Metaboliten im 24h-Urin von Tumorpatienten 159

	MS	MS²	MS³	MS⁴	MS⁵
		[M] ⁻			
DHU	245	202 ([M] ⁻ -HNCO) 174 ([M] ⁻ -HNCO-CO) 155 ([M] ⁻ -C ₃ H ₆ O ₃) 129 ([M] ⁻ -116) 113 [B]⁻	129 (174-45) 114 (174-C ₂ H ₄ O ₂) 99 (174-75) 84 (174- C ₃ H ₆ O ₃) 95 [B] ⁻ -H ₂ O) 85 [B] ⁻ -CO)	99 (129-CH ₂ O)	71 (99-CO)
ψ	243	183 ([M] ⁻ -C ₂ H ₄ O ₂) 153 ([M] ⁻ - C ₃ H ₆ O ₃) 140 ([M] ⁻ -HNCO-C ₂ H ₄ O ₂)	140 (183-HNCO) 111 (183-C ₃ H ₄ O ₂) 110 (153-HNCO)	122 (140-H ₂ O) 113 (140-HCN) 96 (140-44) 82 (110-CO)	83 (113-CH ₂ O) 55 (82-HCN)
m³U	257	167 ([M] ⁻ - C ₃ H ₆ O ₃) 125 [B]⁻	81 [B] ⁻ -44) 68 [B] ⁻ -CH ₃ NCO)		
m⁵U	257	214 ([M] ⁻ -HNCO) 167 ([M] ⁻ - C ₃ H ₆ O ₃) 125 [B]⁻	154 (214-C ₂ H ₄ O ₂) 124 (214-C ₃ H ₆ O ₃) 96 (214- C ₃ H ₆ O ₃ .CO) 136 (NH ₂ CH ₃) 124 (167-HNCO) 110 ([B] ⁻ -•CH ₃) 97 ([B] ⁻ -CO) 81 ([B] ⁻ -44)	109 (124-•CH ₃) 96 (124-CO) 80 (124-44)	
I	267	177 ([M] ⁻ - C ₃ H ₆ O ₃) 149 ([M] ⁻ - C ₃ H ₆ O ₃ -CO) 135 [B]⁻	126 (108+H ₂ O) 108 (135- HCN) 92 (135-HNCO)	65 (92-HCN)	
m¹I	281	149 [B]⁻	134 (149-•CH ₃)	117 (134-NH ₃) 107 (134-HCN) 106 (134-CO) 79 (134-HCN-CO)	
X	283	193 ([M] ⁻ - C ₃ H ₆ O ₃) 151 [B]⁻	133 (151-H ₂ O) 126 (108+H ₂ O) 108 (151-HNCO)	126 (108+H ₂ O) 80 (108-CO)	

Adenosin-Strukturen

Wie bereits von *Sakurai et al.* für Messungen mit einem Tandemmassenspektrometer (Kollisionsgas Xenon) beschrieben^[204], konnten auch in der durchgeführten Ionenfallen-Analytik der Adenosine keine stabilen Tochterionen aus internen Zuckerspaltungen im MS²-Schritt detektiert werden. Die C₃H₆O₃-Abspaltung tauchte bei A sporadisch, aber nicht reproduzierbar im MS²-Spektrum auf und wurde deshalb nicht in die Tabelle aufgenommen. Die Fragmentierung der deprotonierten Adeninbase wies im MS³-Spektrum die auch im positive mode üblichen Neutralverluste von HCN und NH₂CN^[157] auf. Die von *Sakurai et al.* auch für den negative mode beschriebene Ammoniak-Abspaltung konnte hingegen nicht beobachtet werden. Dies kann auf die Unterschiede in den verwendeten Kollisionsgasen und MS-Systemen zurückgeführt werden (Sakurai: Triple-Quadrupol, Xenon / in dieser Arbeit: Ionenfalle, Helium). Die sich anschließenden HCN-Neutralverluste in MS⁴ sind analog zu den Reaktionen im positive mode. Die Messungen der methylierten Adenosine m¹A und m⁶A zeigten als Hauptfragmentierungsweg in MS³ die Abspaltung eines Methylradikals (-15 Δm). Diese Eliminierungsreaktion wurde bereits von *Hocart und Schlunegger* bei N-methylierten Adeninen beschrieben^[206]. Im positive mode konnte diese Reaktion nur als Minorprozess beobachtet werden. Eine Unterscheidungsmöglichkeit der N¹ / N⁶-Methyl-Stellungsisomere ergab sich aus den weiteren Fragmenten in MS³. Während m¹A CH₃NC abspaltete, war dieser Prozess bei m⁶A nicht zu beobachten. Stattdessen kam es hier zur Eliminierung von NHCH₂ bzw. NH₂CH₃, vermutlich unter Einschluss der N⁶-methylierten Position. Die im positive mode üblichen Abspaltungen von NH₃ und HCN konnten nicht beobachtet werden. Letztere waren erst im MS⁴-Zyklus bei beiden Stellungsisomeren zu detektieren.

Interessante Aspekte ergaben sich bei der Analytik des hypermodifizierten Adenosins t⁶A. Während in den positive-mode-Messungen fast ausschließlich die bei Nucleosiden übliche Abspaltung der neutralen Zuckereinheit (-132 Δm) zu beobachten ist^[157], spielte dieser Prozess im negative mode nur eine untergeordnete Rolle. Als Hauptfragmentierungsweg stellte sich die Bildung von *m/z* 144 heraus, was vermutlich auf die Abspaltung der kompletten Basisnucleosid-

Struktur (Adenosin) zurückzuführen ist. Diese Annahme konnte im Nachhinein über ein analoges Verhalten von strukturell verwandten Metaboliten ($m^{6t}A$, $ms^{2t}A$) verifiziert werden (vgl. 3.1.6.3). Der Adenosinmetabolit MTA zeigte mit der Abspaltung des neutralen Methylthioriboserestes (-162 Δm) in MS^2 und den bekannten Neutralverlusten der freigesetzten Adeninbase in MS^3 und MS^4 (vgl. Fragmentierung Adenosin) das erwartete Fragmentierungsmuster.

Cytidin-Strukturen

Die Messung des Cytidinstandards ergab neben der Spaltung zum deprotonierten Cytosin m/z 110 mit anschließender MS^3 -Eliminierung von HNCO aus der Pyrimidinbase einige der unter 3.1.6.1 beschriebenen Fragmentierungsreaktionen in der konjugierten Zuckereinheit ($C_3H_6O_6$, -90 Δm). Auch der Abgang von HNCO allein ($\rightarrow m/z$ 199), sowie in Kombination mit dem genannten Kohlenhydratelement ($\rightarrow m/z$ 109), konnte aus der intakten Nucleosidstruktur beobachtet werden. Der Austritt des $C_2H_4O_2$ -Elements allein und in Kombination mit HNCO (vgl. Abb. 75), sowie die Abspaltung einer $C_4H_8O_3$ -Funktion (-104 Δm)^[204], waren hingegen im MS^2 -Spektrum nicht zu erkennen. Der MS^3 -Zyklus ergab für die Fragment-Ionen m/z 199 und m/z 109 weitere charakteristische Abspaltungen von H_2O , CO und Kohlenhydratelementen aus dem korrespondierenden Zuckerrest.

Das mit einer Acetylgruppe modifizierte Cytidin ac^4C fragmentierte im MS^2 -Schritt unter Abspaltung von HNCO aus der Pyrimidinbase, $C_3H_6O_6$ aus der Ribosyleinheit sowie der vollständige dehydratisierten Ribose. Die bei der letztgenannten Eliminierungsreaktionen freigesetzte Base $[B]^-$ m/z 152 spaltete im nachfolgenden MS^3 -Schritt analog zum Fragmentierungsverhalten im positive mode^[157] zunächst CH_2CO aus der konjugierten Acetylfunktion ab. Das Fragmentierungsmuster in MS^4 zeigte die Eliminierung von CO und HNCO sowie einen nicht erklärbaren Massenverlust von 19 Da. Eine zum positive mode analoge NH_3 -Eliminierung konnte nicht beobachtet werden. Das durch HNCO-Abspaltung aus der deprotonierten Nucleosidstruktur entstandene Fragment-Ion m/z 241 eliminierte in MS^3 neben CH_2CO aus der Acetylfunktion

an N^4 die konjugierte Ribose sowie Kohlenhydratelemente aus selbiger. Der nicht eindeutig definierbare Massenverlust von 78 Da setzt sich möglicherweise aus der kombinierten Abspaltung von CH_2CO und zwei Wassermolekülen aus der Ribosefunktion zusammen.

Guanosin-Strukturen

Mit Ausnahme von m^2_2G konnten bei den analysierten Guanosinnucleosiden keine stabilen Ionen aus Fragmentierungsreaktionen innerhalb der Zuckereinheit beobachtet werden, wie sie für G sowie methylierte Derivate in verschiedenen Publikationen beschrieben wurden^[201;204]. Auch hier könnten die unterschiedlichen Kollisionsgase und MS-Systeme die möglichen Ursachen sein.

Nach der Abspaltung der dehydratisierten Ribose ($-132 \Delta m$) zur Guaninbase m/z 150 konnten in der nachfolgenden MS^3 -Fragmentierung von G die Eliminierungen von NH_3 , NH_2CN (analog zum positive mode, vgl. Abb. 27 und^[157]) sowie zusätzlich die Abspaltung von $HNCO$ beobachtet werden, die beiden letztgenannten als Minorprozesse. Im MS^4 -Schritt zeigte das Abspaltungsmuster von m/z 133 Abweichungen zu den Messungen im positive mode. Die hierbei ablaufende Eliminierungsreaktion von NH_2CN konnte nicht detektiert werden, stattdessen jedoch die Abspaltung von HCN und $HNCO$. Das in dieser Arbeit als interner Standard eingesetzte IsoG zeigte im MS^3 -Schritt von $[B]^+$ eine prinzipiell gleiche Fragmentierung, allerdings mit deutlichen Unterschieden in den relativen Intensitäten der einzelnen Fragment-Ionen. Während bei G die NH_3 -Eliminierung den Hauptfragmentierungsweg darstellte und die $HNCO$ -Abspaltung nur in sehr geringem Maß ablief, war dieses Verhältnis bei IsoG gerade umgekehrt. Auch im MS^4 -Schritt waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Die variantenreiche Fragmentierung bei G reduzierte sich in der IsoG-Struktur auf eine HCN -Eliminierung.

Wie auch bei den Adenosinderivaten m^1A und m^6A zu beobachten war, spalteten die N-methylierten Guanosinderivate m^1G , m^2G und m^2_2G ebenfalls Methylradikale ab. Bei der Betrachtung der beiden monomethylierten Komponenten fiel das absolut identische Fragmentierungsmuster auf. Insbesondere der bei

beiden Metaboliten in MS³ detektierte HNCO-Neutralverlust (-43 Δm) ist in diesem Zusammenhang rätselhaft. Während diese Reaktion bei m²G ohne weiteres über die Positionen N-1, C-6 und O⁶ möglich ist, blockiert die N-1-Methylierung in m¹G die genannte Abspaltung. Unter diesen strukturellen Voraussetzungen könnte allenfalls die Eliminierung einer CH₃NCO-Funktion (-57 Δm) ablaufen, die jedoch im gemessenen Spektrum nicht zu detektieren war. Eine Erklärung für das beschriebene Phänomen ist möglicherweise der Ablauf einer kationotropen Umlagerungsreaktion der m¹G-Methylfunktion von N-1 nach N² unter anionischen Bedingungen in der Gasphase. Abb. 76 zeigt den hierzu postulierten Mechanismus. Die Beweisführung der vorgestellten Hypothese müsste über isotoopenmarkierte Standards erfolgen, die in der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung standen. Interessanterweise ergibt sich die vollständige Angleichung der Fragmentierungshierarchien ausschließlich im negative mode. Im positive mode sind beide Stellungsisomere bereits im MS³-Schritt über die Eliminierungen von CH₃NCO (m¹G) bzw. CH₃NHCN (m²G) leicht zu unterscheiden^[157].

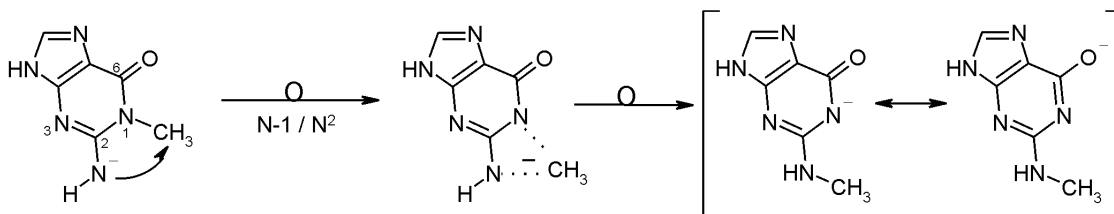


Abbildung 76: Postulierte Umlagerungsreaktion der 1-Methylguaninstruktur unter Wanderung der Methylfunktion von Position N-1 zu Position N².

Beim dimethylierten Guanosin m²₂G konnte im MS²-Schritt eine Abspaltung von C₃H₆O₃ aus der Riboseeinheit beobachtet werden. In einer im Vergleich zum positive mode deutlich reduzierten Fragmentierungsvarianz ergab der MS³-Schritt von [B]⁻ neben der Eliminierung eines Methylradikals die Abspaltung der vollständigen N²-Dimethylgruppe als (CH₃)₂NH. Ein Masseverlust von 43 Da (HNCO) wie bei den beiden monomethylierten Analoga konnte hier nicht detektiert werden und schloss sich erst im MS⁴-Zyklus mit zusätzlichen Eliminierungsreaktionen von CO und HCN an.

Uridin-Strukturen

Bei der Messung der Uridinnucleoside konnten verschiedene, unter 3.1.6.1 beschriebene, Fragmentierungsreaktionen innerhalb der Zuckereinheit sowie deren kombinierte Eliminierung mit HNCO aus dem Pyrimidinzyklus beobachtet werden.

Die initiale HNCO-Abspaltung aus U in MS² (m/z 243 \rightarrow m/z 200) führte im nachfolgenden MS³-Schritt zu extensiven Eliminierungsreaktionen verschiedener Kohlenhydrateinheiten sowie in MS⁴ und MS⁵ zu weiteren Fragmentierungen (H₂O, CO, CH₂O) aus der residualen Zuckereinheit. Interessante Aspekte ergaben sich beim MS³-Schritt der deprotonierten Uracilbase m/z 111, der im Vergleich zu den entsprechenden Messungen im positive mode (Eliminierung von NH₃ und HNCO) deutliche Unterschiede aufwies. Es konnten der Austritt von CO sowie ein nicht geklärter Massenverlust von 44 Da beobachtet werden. Wie bereits von *Nelson und McCloskey* für die freie Base beschrieben, konnte auch in dieser Arbeit im Gegensatz zur vollständigen Nucleosidstruktur keine HNCO-Eliminierung detektiert werden^[166]. In diesem Zusammenhang wurde auch auf die falsche Zuordnung in der Publikation von *Sakurai et al.*^[204] verwiesen, die ebenfalls das Fragment-Ion m/z 67 (-44 Δm) in einer Tabelle listen, dieses aber fälschlicherweise über die Abspaltung von HNCO (-43 Δm) erklären. DHU zeigte ein zu U vergleichbares MSⁿ-Fragmentierungsmuster. Beim MS³-Schritt von [B]⁻ konnte jedoch der zuvor beschriebene Massenverlust von 44 Da nicht beobachtet werden. Stattdessen resultierte aus einer Wassereliminierung ein zusätzliches Fragment bei m/z 95. Der negative mode wies in der Basenfragmentierung wiederum deutliche Unterschiede zum positive mode auf, in welchem die Abspaltungen von NH₃ und CH₂CO zu beobachten sind^[157].

Beim Uridinisomer ψ konnte aufgrund der stabileren C-C-Verknüpfung von Zucker und Base konsequenterweise keine Eliminierung der vollständigen Zuckereinheit detektiert werden. Die zu beobachtenden Fragment-Ionen resultieren allesamt aus internen Zuckerspaltungen sowie dem Verlust kleinerer Neutralteilchen wie HCN, HNCO sowie H₂O, CO und CH₂O aus Pyrimidin- bzw. Zuckerrest. Konsistent mit den identischen Basenstrukturen ergab sich im MS⁴-

Schritt auch bei ψ der bei U beschriebene, nicht aufgeklärte Massenverlust von 44 Da.

Die Messung der methylierten Uridinderivate m^3U und m^5U ergab charakteristische Unterschiede im Fragmentierungsmuster. Auffällig waren zunächst die deutlich stabileren MS^2 -Fragment-Ionen bei m^5U , bei welchem neben der Spaltung zu $[B]^-$ auch die Eliminierungen von HNCO und $C_3H_6O_3$ mit hoher Intensität zu beobachten waren. Letztgenannte wurden auch beim N-3-methylierten Analogon detektiert, allerdings mit deutlich geringerer Intensität. Ein charakteristisches Merkmal zur strukturellen Unterscheidung beider Stellungsisomere ergab sich im MS^3 -Zyklus der jeweiligen deprotonierten Basen. Bei m^3U kam es zum Neutralverlust der CH_3NCO -Gruppe aus der Pyrimidinstruktur, während die ansonsten für methylierte Nucleoside typische Eliminierung eines Methylradikals nicht auftrat. Diese konnte hingegen bei der m^5U -Struktur mit einer C-gebundenen Methylmodifikation beobachtet werden. Das restliche MS^3 -Fragmentierungsmuster von $[B]^-$ aus m^5U glich dem der unmodifizierten Uracilbase mit Neutralverlusten von CO und 44 Da (ungeklärt). Die MS^3 -Fragmentierungshierarchien der freien Basen unterschieden sich deutlich von den entsprechenden positive-mode-Messungen, die im Fall von m^3U von einer NH_3 und $NH_3 + CO$ -Abspaltungen sowie bei m^5U von H_2O und NH_2CH_3 -Eliminierungen gekennzeichnet sind^[157].

Inosin-Strukturen

Beim untersuchten Inosinstandard konnten neben der Freisetzung der deprotonierten Base $[B]^-$ m/z 135 zwei Eliminierungsreaktionen ($C_3H_6O_6$ allein und in Kombination mit CO) in der Zuckereinheit detektiert werden. Die Weiterfragmentierung von $[B]^-$ in MS^3 ergab neben den, auch im positive mode vorkommenden Neutralverlusten von HCN und HNCO ein Fragment mit m/z 126. Die zugehörige Massendifferenz von 9 Da (m/z 135 \rightarrow m/z 126) kann keiner regulären Fragmentierungsreaktion zugeordnet werden, sondern ist vermutlich auf einen H_2O -Addition an m/z 108 zurückzuführen (vgl. 3.1.4.4, neutral gains im positive mode).

Bei der Messung des an N-1 methylierten Inosins m^1I konnten keine stabilen Abspaltungsreaktionen aus der Zuckereinheit beobachtet werden. Die MS^3 -Fragmentierung von $[B]^-$ m/z 149 ergab die übliche Methylradikaleliminierung, gefolgt von NH_3 , HCN und CO -Neutralverlusten. Im Vergleich zu den MS^3 -Messungen im positive mode^[157] (Neutralverluste von H_2O , CH_3NC , CH_3NCO) resultierten deutliche Unterschiede in der Fragmentierungshierarchie, initialisiert durch die bei N-methylierten Nucleosiden grundsätzlich beobachtete Methylradikalabspaltung.

Xanthosin

Die MS^n -Analytik von X zeigte im MS^2 -Schritt in geringerer Intensität die Eliminierung von $C_3H_6O_6$ aus der Ribosyleinheit sowie den Hauptfragmentierungsweg über die freie, deprotonierte Xanthinbase m/z 151. Im MS^3 -Zyklus von $[B]^-$ war die Eliminierung von $HNCO$ zu m/z 108 als deutlich intensivstes Fragment zu detektieren. Daneben konnten Minorfragmente bei m/z 126 und m/z 108 beobachtet werden, wobei letzteres analog zu I vermutlich über einen neutral gain von H_2O an Fragment-Ion m/z 108 entsteht. Die CO -Abspaltung in MS^4 verlief analog zu den korrespondierenden positive-mode-Messungen^[157]. Dieser Reaktionsverlauf legt gleichzeitig die vorangegangene $HNCO$ -Eliminierung auf die Positionen N-1 und C-2 im Puringrundgerüst fest, da nur in diesem Fall ein anschließender CO -Neutralverlust möglich ist.

3.1.6.3 Messung von semipräparativ aufgereinigten Metaboliten im negative mode

Die semipräparativ aufgereinigten Metaboliten konnten aufgrund der geringen Konzentrationen nur eingeschränkt im insensitiveren negative mode gemessen werden. Tab. 15 zeigt eine Auswahl selektierter Komponenten mit denen eine MS^n -Messung möglich war. Die Metabolitlösungen wurden mit 0,2%iger wässriger Ammoniaklösung 1:1 verdünnt und mittels Spritzenpumpeninjektion (Flussrate: 300 μ l/h) an der Ionenfalle gemessen. In der eingesetzten MS-Methode 2 (vgl. 5.3.3.3) erfolgte ebenfalls eine manuelle Parameteranpassung von fragmentation amplitude und cut-off. Generell konnten bei den teilweise hypermodifizierten Strukturen deutlich weniger Eliminierungsreaktionen von Kohlenhydratelementen aus der Ribosyleinheit beobachtet werden.

Der als IAA-R identifizierte Metabolit (Nr. 3, Tab. 15) zeigte nur eine eingeschränkte Fragmentierungshierarchie. Neben einer Wasserabspaltung und zwei ungeklärten Fragmenten bei m/z 222 und m/z 169 konnte in MS^2 die standardmäßige Eliminierung der dehydratisierten Ribose (-132 Δ m) zur korrespondierenden Base $[B]^-$ m/z 125 beobachtet werden. Analog zu den Messungen im positive mode (vgl. Tab. 7) ergab sich im MS^3 -Schritt die Abspaltung der terminalen Säurefunktion, jedoch nicht als HCOOH, sondern als CO_2 , wie im negative mode üblich^[207].

Metabolit m/z 271 (Nr. 24, Tab. 15, vermutlich 1-Ribosyl-3-methyl-4-carboxymethyl-imidazolium) wies in der MS^2 -Fragmentierung einen kombinierten Neutralverlust von $C_3H_6O_3$ mit H_2O und die Spaltung zu $[B]^-$ auf. Charakteristische strukturelle Merkmale ergaben sich aus der anschließenden MS^3 -Fragmentierung, die durch die Eliminierung von CO_2 sowie die Abspaltung eines Methylradikals die Strukturhypothese eines N-methylierte Analogons von IAA-R unterstützen.

Der MS^2 -Schritt des identifizierten Uridinderivats acp^3U (Nr. 6, Tab. 15) ergab drei stabile Fragment-Ionen. Die vermutlich aus internen Zuckerspaltreaktionen entstandenen Fragmente m/z 283 und m/z 253, zeigten gegenüber den bei

Uridin bekannten $C_2H_4O_2$ und $C_3H_6O_3$ -Eliminierungen einen nicht erklärbaren Massenshift von 1 Da. Eine konsekutive Eliminierung von CH_2O , H_2O und $HNCO$ ($-91 \Delta m$) wie unter 3.1.6.1 beschrieben, ist aufgrund der Modifikation von acp^3U an der N-3-Position nicht möglich. Bei der MS^3 -Fragmentierung von m/z 212 konnten analoge Fragmentierungsmuster zu den in Tab. 7 aufgeführten Messungen im positive mode beobachtet werden. Die Neutralverluste von NH_3 sowie $C_4H_7NO_2$ zur deprotonierten Uracilbase m/z 111 verliefen äquivalent. Die terminale Säurefunktion wird wie im negative mode üblich als CO_2 abgespalten. Die Wasserabspaltung zu m/z 194 findet mit hoher Wahrscheinlichkeit zumindest teilweise im Uracil-Ringsystem und nicht an der Carboxyaminopropylgruppe statt, da die anschließenden $HNCO$ und CO_2 -Eliminierungen in MS^4 nur so möglich sind. Die parallel ablaufende H_2O -Eliminierung in der Seitenkette führte wie im positive mode zur Uracilbase $[B]^-$ und einer ringgeöffneten Struktur m/z 95 (vgl. m/z 96, Fragmentierungsmuster acp^3U , Abb. 50).

Aus der Serie der identifizierten Ribosylhistamine mit N- ω -Fettsäureverknüpfung ergab lediglich die entsprechende Acetylkomponenten I-1 eine analysierbare Fragmentierung im negative mode. In MS^2 konnten neben der Spaltung zu $[B]^-$ keine weiteren Fragmente beobachtet werden. Der MS^3 -Zyklus war durch die Abspaltungen von CH_2CO ($-42 \Delta m$) und CH_3CONH_2 ($-59 \Delta m$) aus der terminalen Acetamidfunktion gekennzeichnet und verlief analog zu den positive-mode-Messungen (vgl. Abb. 58).

AICA Ribosid zeigte im negative mode das zu erwartende Fragmentierungsmuster, wobei bereits im MS^2 -Schritt Abspaltreaktionen aus der C-4-verknüpften Carbamoylfunktion auftraten (m/z 239 und m/z 212). Die Weiterfragmentierung von $[B]^-$ ergab Unterschiede zum positive mode. Neben der analogen NH_3 -Abspaltung waren zusätzlich Neutralverluste von H_2O und $HCNO$ zu beobachten.

Die negative-mode-Messungen des nicht identifizierten Metabolits Nr. 29, Tab. 15 (m/z 299) ergab keine zusätzlichen aussagekräftigen Hinweise, die für die weitere Strukturaufklärung nützlich sein könnten. Lediglich der Neutralverlust der CH_3OH -Funktion konnte bestätigt werden.

Die Analyse von N⁶-SAR zeigte, wie auch im positive mode beobachtet (vgl. Abb. 67), ein relativ komplexes Fragmentierungsmuster. Neben der Zuckerabspaltung zu [B]⁻ waren in MS² in erster Linie Teilfragmentierungen der konjugierten Succinylfunktion zu beobachten. Die anschließende MS³-Fragmentierung ergab einige der bereits in den positive-mode-Messungen aufgeklärten Abspaltungsreaktionen in der Dicarbonsäureeinheit. Einen interessanten Aspekt lieferten die Fragment-Ionen *m/z* 134 und *m/z* 115. Ersteres, vermutlich die deprotonierte Adeninbase, entsteht wie auch im positive mode aus der Abspaltung der kompletten Succinylfunktion. Über den gegenläufigen Prozess, also die Abspaltung der Adeninbase und Verbleib der negativen Ladung am Succinylrest, kann offensichtlich im negative mode das 3-Carboxyprop-2-enoat (*m/z* 115) gebildet werden (vgl. Abb. 77).

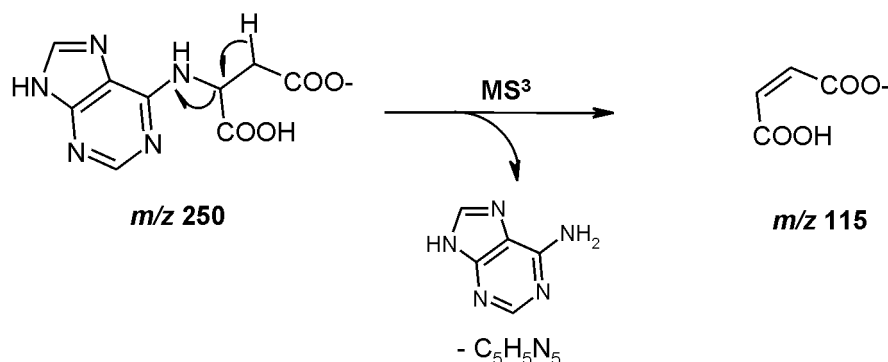


Abbildung 77: Charakteristische Abspaltungsreaktion (MS³) der neutralen Adeninbase unter Freisetzung des 3-Carboxyprop-2-enoats (Doppelbindungskonfiguration nicht bekannt, vermutlich Racemat) bei der negative-mode-Messung von N⁶-SAR.

Die postulierte 9-Ribosyl-6-taurinopurin-Struktur Nr. 31 (*m/z* 374) zeigte als einzige Komponente die unter 3.1.6.1 beschriebenen C₂H₄O₂ bzw. C₃H₆O₃-Abspaltungen aus dem Ribosylrest. Bei der MS³-Spaltung von [B]⁻ *m/z* 242 konnten, wie auch im positive mode, neben der NH₃-Eliminierung auch die größeren Massenverluste von 82 Da (vermutlich H₂SO₃) und 108 Da beobachtet werden. Letzterer führte mit dem resultierenden Fragment-Ion *m/z* 134 zur deprotonierten Adeninbase. Die anschließende MS⁴-Fragmentierung von *m/z* 134 zeigte folgerichtig ein analoges Verhalten wie der analysierte Adenosinstandard (vgl. 3.1.6.2). So konnten Abspaltungen von HCN und NH₂CN detektiert werden, die NH₃-Eliminierung blieb wie auch beim Standard aus. Eine

charakteristische Analogie ergab sich zum Fragmentierungsverhalten von N⁶-SAR (vgl. Abb. 77). Auch bei m/z 374 kam es zur Abspaltung der Adeninbase unter Verbleib der negativen Ladung am Säurerest, in diesem Fall der Sulfonsäure. Wie in Abb. 78 gezeigt, wird hierbei das Ethenylsulfonat (m/z 107) freigesetzt.

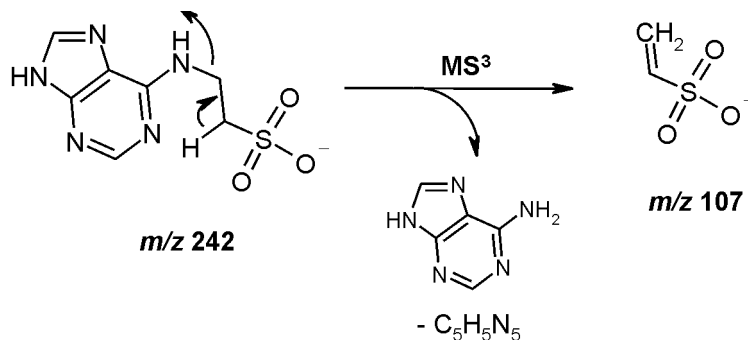


Abbildung 78: Charakteristische Abspaltungsreaktion (MS^3) der neutralen Adeninbase unter Freisetzung des Ethenylsulfonats m/z 107 bei der negative-mode-Messung von m/z 374 (Nr. 31).

Für das identifizierte Uridinderivat mcm^5s^2U ergaben die negative-mode-Messungen im MS^2 -Schritt neben der Eliminierung zur Base $[B]^-$ eine vorzeitige Abspaltung der CH_3OH -Gruppe aus der terminalen Methylesterfunktion. Diese Reaktion war auch in MS^3 als einzige Fragmentierung aus $[B]^-$ zu beobachten.

Metabolit Nr. 33 (m/z 311), ein Dimethyl-Xanthosinderivat, wies im MS^2 -Spektrum neben der Fragmentierung zur freien Base $[B]^-$ kleinere Massenverluste (H_2O und CO_2) auf. Fragment-Ion m/z 183 ($-128 \Delta m$) kann in diesem Zusammenhang nicht erklärt werden. In der Weiterfragmentierung von $[B]^-$ ergab sich die übliche Abspaltung eines Methylradikals sowie ein Massenverlust von 45 Da ($NH_3 + CO$ oder NH_2CHO). Dieses Fragmentierungsmuster deutet darauf hin, dass zumindest ein Stickstoff im Pyrimidingerüst der Xanthosinbase nicht methyliert ist, da der beschriebene 45 Da-Massenverlust ausschließlich von einer freien Amidfunktion möglich ist. Demnach sprechen auch die Ergebnisse im negative mode eher gegen ein ribosyliertes Theophyllin und für die vorgeschlagenen O-methylierten Dimethylxanthosine (vgl. 3.1.5.6).

Interessante Zusammenhänge ergaben sich aus dem Vergleich der Fragmentierungsmuster der Standardkomponente t^6A (vgl. 3.1.6.2) und den beiden, als m^6t^6A und ms^2t^6A identifizierten Adenosinmetaboliten. Der übliche Ribosyl-Neutralverlust von 132 Da zur freien Base konnte nicht detektiert werden. Stattdessen resultierte der MS^2 -Zyklus bei beiden Verbindungen einheitlich im Fragment-Ion m/z 144, was auf eine Abspaltung der neutralen Nucleosideinheit unter Freisetzung der konjugierten Threonylcarbamoylfunktion schließen lässt (vgl. Abb. 79). Auch die Weiterfragmentierung im MS^3 -Schritt führte über eine CO_2 -Eliminierung bei allen drei Adenosinderivaten zu m/z 100 und in MS^4 durch Abspaltung von Kohlenmonoxid zu m/z 72. Das beobachtete Fragmentierungsverhalten kann folglich als charakteristisches Kriterium bei der Strukturaufklärung von Nucleosiden mit Threonylcarbamoyl-Modifikation herangezogen werden.

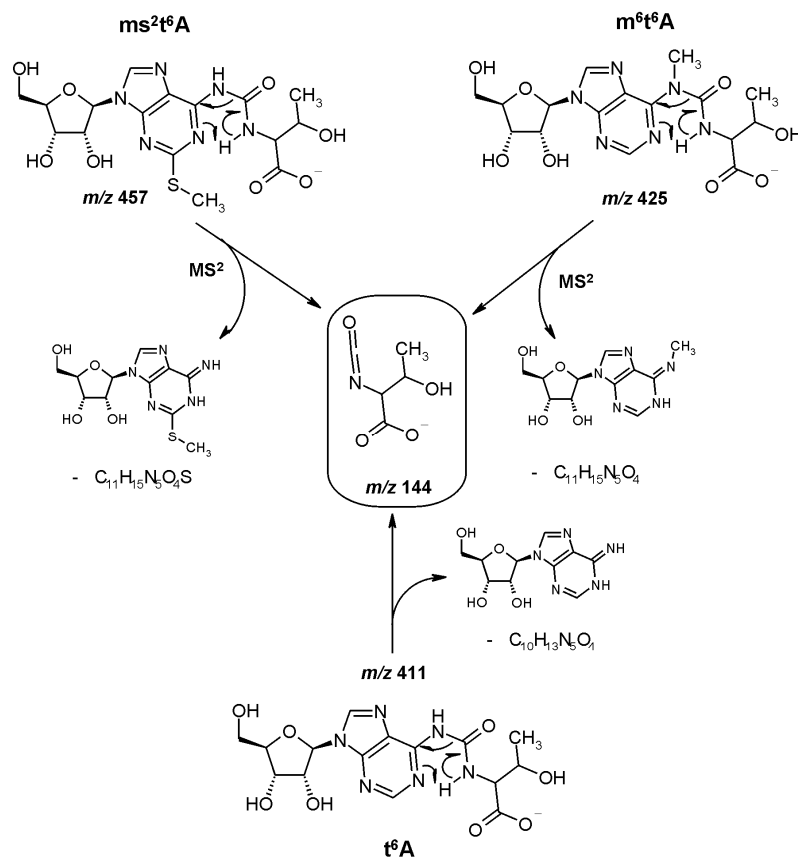


Abbildung 79: Charakteristische McLafferty-Umlagerung mit Eliminierung der neutralen Basis-Nucleosidstruktur unter Freisetzung von 3-Hydroxy-2-isocyanatobutanoat (m/z 144) aus der konjugierten Threonylcarbamoyl-Modifikation.

Tabelle 15: Ergebnisse der IT-MSⁿ-Messungen von semipräparativ aufgereinigten Metaboliten im negative mode, geordnet nach steigender Retentionszeit in der LC-MC-Analytik, Nummerierung analog zu Tab. 7/11, [M] = [M-H]⁻: deprotonierte Muttermasse, [B]⁻: deprotonierte Base (nach Zuckerneutralverlust), Rib: dehydratisierte Ribose. Für die nicht identifizierten Metaboliten ist zur leichteren Zuordnung in Spalte 2 (Abk.) das m/z des positive mode [MH]⁺ angegeben.

Nr.	Abk.	MS [M] ⁻	MS ²	MS ³	MS ⁴
3	IAA-R	257	239 ([M] ⁻ - H ₂ O) 222 ([M] ⁻ - 35) 169 ([M] ⁻ - 88) 125 [B]⁻	81 ([B] ⁻ - CO ₂)	
24	273	271	163 ([M] ⁻ - C ₃ H ₆ O ₃ -H ₂ O) 139 [B]⁻	135 (163- CO) 117 (163- CO-H ₂ O) 107 (163- CO-CO) 121 ([B] ⁻ - H ₂ O) 95 ([B] ⁻ - CO ₂) 80 ([B] ⁻ - CO ₂ - •CH ₃)	93 (121- CO) 80 (95- •CH ₃)
6	acp ³ U	344	283 ([M] ⁻ - 61) 253 ([M] ⁻ - 91) 212 [B]⁻	195 ([B] ⁻ - NH ₃) 194 ([B] ⁻ - H ₂ O) 168 ([B] ⁻ - CO ₂) 151 ([B] ⁻ - CO ₂ -NH ₃) 150 ([B] ⁻ - 62) 111 ([B] ⁻ - C ₄ H ₇ NO ₂)	151 (194- HNCO) 150 (194- CO ₂) 111 (194- C ₄ H ₅ NO) 95 (194- C ₄ H ₇ N ₂ O)
9	I-1	284	152 [B]⁻	110 ([B] ⁻ - CH ₂ CO) 93 ([B] ⁻ -CH ₃ CONH ₂)	
10	AICA Ribosid	257	239 ([M] ⁻ - H ₂ O) 212 ([M] ⁻ - NH ₃ -CO) 125 [B]⁻	108 ([B] ⁻ - NH ₃) 107 ([B] ⁻ - H ₂ O) 82 ([B] ⁻ - HNCO)	
29	301	299	167 [B]⁻	135 ([B] ⁻ - CH ₃ OH)	123 (135- 12) 107 (135- CO) 79 (135-CH ₃ NHCN oder - 2 x CO)

Nr.	Abk.	MS [M] ⁻	MS ²	MS ³	MS ⁴
13	N ⁶ -SAR	382	364 ([M] ⁻ - H ₂ O)	232 ([B] ⁻ - H ₂ O)	188 (232- CO ₂) 134 (232- C ₄ H ₂ O ₃)
			338 ([M] ⁻ - CO ₂)		
			301 ([M] ⁻ - 81)		
			266 ([M] ⁻ - 116)		
			250 [B] ⁻		
			206 ([B] ⁻ - CO ₂)		
			188 ([B] ⁻ - CO ₂ -H ₂ O)		
			134 ([B] ⁻ - C ₄ H ₄ O ₄)		
			115 ([B] ⁻ - Adenin)		
			206 ([M] ⁻ - Rib- CO ₂)		
31	376	374	314 ([M] ⁻ - C ₂ H ₄ O ₂)	225 ([B] ⁻ - NH ₃) 178 ([B] ⁻ - 64) 160 ([B] ⁻ - 82)	133 (160- HCN) 92 (160- 68) 107 (134- HCN) 92 (134- NH ₂ CN)
			284 ([M] ⁻ - C ₃ H ₆ O ₃)		
			266 ([M] ⁻ - C ₃ H ₆ O ₃ - H ₂ O)		
			242 [B] ⁻		
			134 ([B] ⁻ - 108)		
			107 ([B] ⁻ - Adenin)		
			18		
33	313	311	293 ([M] ⁻ - H ₂ O)	119 (183- 64) 164 ([B] ⁻ - •CH ₃) 134 ([B] ⁻ - NH ₂ CHO)	105 (134- CH ₂ NH)
			267 ([M] ⁻ - 44)		
			183 ([M] ⁻ - 128)		
			179 [B] ⁻		
21	m ⁶ t ⁶ A	425	144 (425- m ⁶ A)	100 (144- CO ₂)	72 (100- CO)
22	ms ² t ⁶ A	457	144 (457- ms ² A)	100 (144- CO ₂)	72 (100- CO)
			118 (457- C ₁₂ H ₁₃ N ₅ O ₅ S)		

3.2 Metabolic Profiling in Zellkulturüberständen von MCF-7 und MCF-10A

3.2.1 Bisherige Arbeiten

In der vorliegenden Arbeit wurden Unterschiede im Ausscheidungsverhalten verschiedener, ribosylierter Metaboliten in Zellkulturüberständen der Brustepithel-Zelllinie MCF-10A und der Brustkrebszelllinie MCF-7 analysiert.

Ähnliche Ansätze zur Untersuchung der Exkretion von RNA-Metaboliten sind bereits in der Literatur beschrieben. *Uziel und Selkirk* analysierten ausgeschiedene Nucleosidkomponenten in den Zellkulturüberständen von Hamster-Fibroblasten^[208]. Im über Affinitätschromatographie aufgereinigten Kulturmedium konnten insgesamt elf Ribonucleosidstrukturen detektiert werden. Hierbei wurden charakteristische Unterschiede im Ausscheidungsmuster von Pyrimidinnucleosiden (U, C) und dem modifizierten Nucleosid ψ in Abhängigkeit vom Wachstumsstatus der Zellen beobachtet. Bei C und U wurden in der Phase des exponentiellen Wachstums ein Konzentrationsminimum und in der darauffolgenden Einleitung der Ruhephase ein starker Anstieg bis zur Konfluenz beobachtet. Für das Verhalten in der Wachstumsphase wurde die vermehrte Reutilisierung für den Wiederaufbau der RNA vermutet. Im Falle von ψ kam es im Verlauf des Wachstumsprozesses zu einer kontinuierlichen Akkumulation im Kulturmedium mit einer stark erhöhten Rate in der Wachstumsphase und einer abflachenden Ausscheidung bei reduziertem Wachstum bis zur Konfluenz. Dies belegt das generelle Verhalten modifizierter Nucleoside, die als biochemische Endprodukte des RNA-Metabolismus aus der Zelle ausgeschieden werden und anders als die regulären Ribonucleoside nicht wiederverwertet werden können (vgl. 1.4.2.3).

Verglichen mit der Analytik von Blut- und Urinproben kann mittels der Untersuchung von Zellkulturüberständen ein unverfälschtes Metabolitenmuster zellulären Ursprungs generiert werden. Ausgeschlossen werden können auf diesem Wege patternveränderte Einflüsse auf dem Exkretionsweg wie extrazelluläre Biotransformationsvorgänge und Kontamination durch bakterielle Metaboliten

(vgl. 3.1.5.2). Zelluläre Stoffwechselwege sind häufig miteinander verbunden. Veränderungen in einem Kompartiment können so biochemische Prozesse eines verknüpften Metabolismusweges beeinflussen. Neben dem zentral in dieser Arbeit untersuchten RNA-Metabolismus wurde folglich auch die biochemische Peripherie analysiert. Der Histidin-Metabolismus und die Purin-Biosynthese sind direkt am Aufbau der Mononucleotide AMP und GMP und somit an der Polynucleotidsynthese beteiligt. Aus dem Polyamin / Methionin-Zyklus geht der ubiquitäre Methyldonor S-Adenosylmethionin (SAM) hervor, welcher entscheidend in RNA-Methylierungsreaktionen, der häufigsten Nucleosidmodifikation, involviert ist. Ein schematischen Überblick der untersuchten Stoffwechselwege ist in den Abb. 80 und 81 dargestellt.

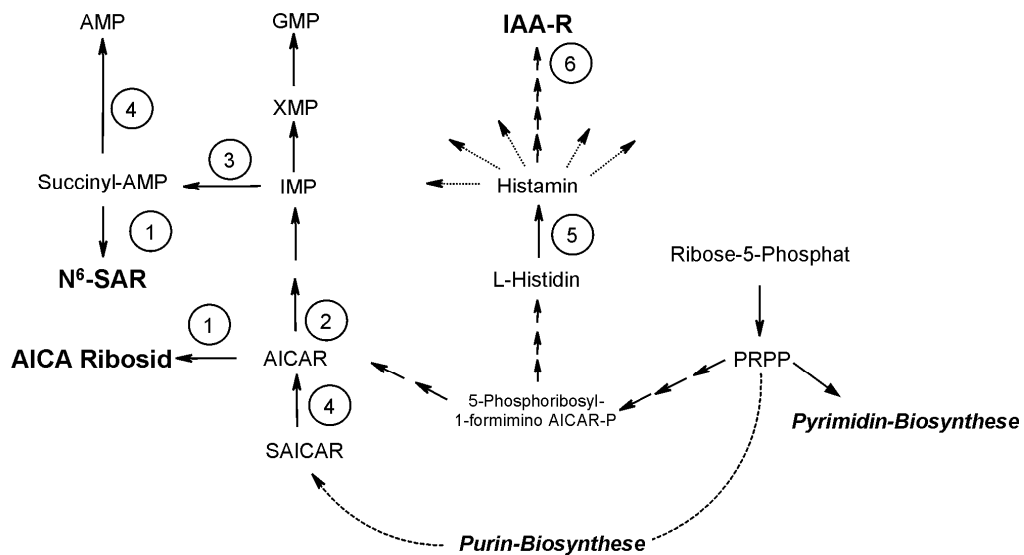


Abbildung 80: Verknüpfung von Purin-Biosynthese und Histidin-Metabolismus., fett: analysierte Metaboliten, Abkürzung PRPP: 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat, Involvierte Enzyme: 1) 5'-Nucleotidase (EC 3.1.3.5), 2) AICA-Transformylase (EC 2.1.2.3), 3) Adenylsuccinatsynthetase (EC 6.3.4.4), 4) Adenylosuccinatlyase (EC 4.3.2.2, katalysiert sowohl die Umwandlung von Succinyl-AMP in AMP und SAICAR (N-Succinyl-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonucleotid) in AICA Ribotid), 5) Histidindecaboxylase (EC 4.1.1.22), 6) Phosphatasen und 5'-Nucleotidasen.

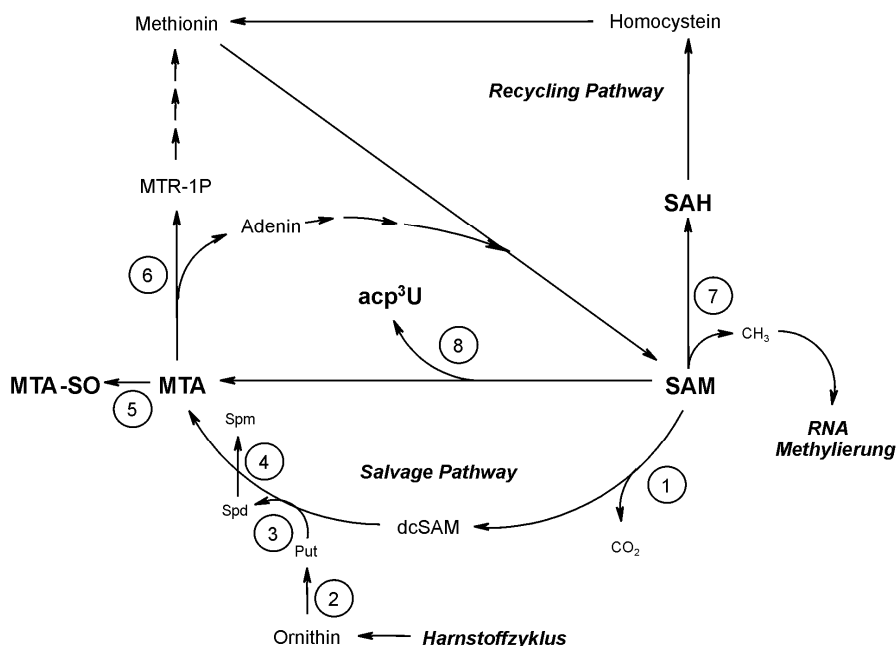


Abbildung 81: Polyamin / Methionin-Zyklus. Fett: analysierte Metaboliten, Abkürzungen: Put (putrescin), Spd (Spermidin), Spm (Spermin), dcSAM (decarboxyliertes S-Adenosylmethionin), MTR-1P (S-Methyl-5-thio-D-ribose-1-phosphat), beteiligte Enzyme: 1) S-Adenosylmethionindecarboxylase (EC 4.1.1.50), 2) Ornithindecaboxylase (EC 4.1.1.17), 3) Propylaminotransferase I (EC 2.5.1.16), 4) Propylaminotransferase II (EC 2.5.1.22), 5) Oxygenasen, 6) Methylthioadenosinphosphorylase (EC 2.4.2.28), 7) Methyltransferasen, 8) tRNA-Uridin-Aminocarboxypropyltransferase (EC 2.5.1.25).

3.2.2 Allgemeines zu den verwendeten Zelllinien

3.2.2.1 MCF-7

Die MCF-7 Zelllinie ist die am häufigsten eingesetzte und untersuchte humane Brustkrebszelllinie. Die Primärzellen wurden aus einem Pleuralerguss einer postmenopausalen 69jährigen kaukasischen Frau isoliert^[209]. Die Patientin hatte sich zu diesem Zeitpunkt bereits einer Bestrahlungs- und Anti-Hormontherapie unterzogen. Das östrogenabhängige Wachstum, die Antiöstrogensensitivität sowie das geringe Metastasierungspotential führte zur Annahme, dass es sich bei MCF-7-Zellen um ein Adenokarzinom des Brustepithels im Frühstadium handelt^[210]. MCF-7-Zellen weisen verschiedene Charakteristika von differenziertem Brustepithel auf. Hierzu zählen intrazelluläres ER-(estrogenrezeptor)-Signaling sowie die Möglichkeit zur Ausbildung haubenförmiger Morphologien. Der Hormonstatus ist ER α -, ER β - und Progesteron-Rezeptor

(PR)-positiv. Allgemein eignen sich MCF-7- Zellen sehr gut für die Untersuchung maligner Progression, da sich aus ihnen mittels selektiver Stimuli (z.B. Tamoxifen) Tochterzellen mit verändertem Phänotyp erzeugen lassen, die z.B. eine Resistenz gegenüber Tamoxifenbehandlungen aufweisen. MCF-7-Zellen zeigen keine Aktivität der Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP), dem Schlüsselenzym des Polyamin / Methionin-Zyklus.

3.2.2.2 MCF-10A

MCF-10A-Zellen wurden von *Soule et al.* als spontan immortalisierte Brustepithel-Zelllinie beschrieben^[211]. Die charakterisierten Zellen wurden aus Gewebe einer Brustamputation einer prämenopausalen 36jährigen kaukasischen Frau mit Fibrozystischer Mastopathie isoliert. MCF-10A-Zellen gleichen mehr luminalen Epithelzellen als Myoepithelzellen und exprimieren Antigene für verschiedene Keratine und epitheliale Sialomucine^[212]. Die Zellen zeigen keine onkogenen Eigenschaften im Mausmodell und kein tumorspezifisches, Ankerplatz-unabhängiges Wachstum. Zeichen terminaler Differenzierung und Seneszenz konnten bislang nicht beobachtet werden. MCF-10A-Zellen reagieren auf Insulin, Glukokortikoide, Cholera Endotoxin und EGF (human epidermal growth factor). Der Hormonrezeptorstatus ist ER α - und PR-negativ.

3.2.3 Zellkultivierung

Die Zellkulturarbeiten wurden von Dr. Hans Neubauer und Konstanze Geiger aus der Arbeitsgruppe Tumorprogression der Universitäts-Frauenklinik Tübingen durchgeführt. Für die Kultivierung der Zellen wurden je Zelllinie $1 \cdot 10^6$ Zellen in vier Plastikschaalen ausgesät und in Kompletmedium für vier Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach Trypsinisierung wurde die Zellzahl einer Flasche in einer Zählkammer bestimmt. Die gemittelte Zellzahl war in den beiden untersuchten Zelllinien gleich und ermöglichte so den direkten semi-quantitativen Vergleich. In den restlichen drei Flaschen wurde nun das Kompletmedium gegen Basalmedium ohne Zusätze ausgetauscht. Letzteres ist nötig, da das Kompletmedium fötales Kälberserum (FCS) enthält und somit schon mit größeren Mengen an Nucleosiden „vorkontaminiert“ ist^[157]. Nach

viertägiger Kultivierung wurden die Überstände abgenommen und Zellrückstände abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 20°C). Der gereinigte Überstand wurde anschließend bei -20°C bis zur Probenaufbereitung eingefroren.

3.2.4 Probenaufbereitung

Die eingesetzte Methode zur affinitätschromatographischen Aufreinigung der Zellkulturüberstände ist unter 5.2.4.4 näher erläutert.

3.2.5 LC-IT-MS-Analytik

Die aufgearbeiteten Zellkulturüberstände wurden zunächst mit Auto-LC-MS³-Messungen analysiert (LC-MS-Methode 4, vgl. 5.3.3.5). Anhand der Retentionszeiten und der generierten MS³-Fragmentierungsmuster konnte eine genaue Zuordnung der enthaltenen Metaboliten erfolgen und zum größten Teil auf die Daten der Identifizierung ribosylierter Komponenten im 24h-Urin (vgl. 3.1.5) zurückgegriffen werden. Die Metaboliten SAM und SAH aus dem Polyamin / Methionin-Zyklus wurden im Zuge der Zellkulturmessungen über den Vergleich von Fragmentierungsmustern und Retentionszeiten mit den Referenzsubstanzen identifiziert (vgl. Abb. 82 und 83). Eindeutige Hinweise auf die entsprechenden Strukturen lieferten die charakteristischen Neutralverluste der konjugierten Thioriboseeinheiten in MS² sowie die bekannten Fragmentierungsreaktionen der protonierten Adeninbase m/z 136 in MS³ (vgl. Abb. 26). Der ebenfalls identifizierte Metabolit 5'-Deoxyadenosin (m/z 252) stand nicht als Standardsubstanz zur Verfügung. Analog zur Vorgehensweise bei den 24h-Urinproben erfolgte zunächst eine semipräparative Aufreinigung aus ca. 300 µl eines MCF-10A-Zellkulturüberstands. Die anschließende IT-MSⁿ-Spritzenpumpeninjektion (vgl. Abb. 84) mit dem zu beobachteten Zuckerneutralverlust von 116 Da (dehydratisierte Deoxyribose) und dem bekannten MS³-Spektrum für die Adeninbase ergab erste wichtige Hinweise auf die strukturelle Identität.

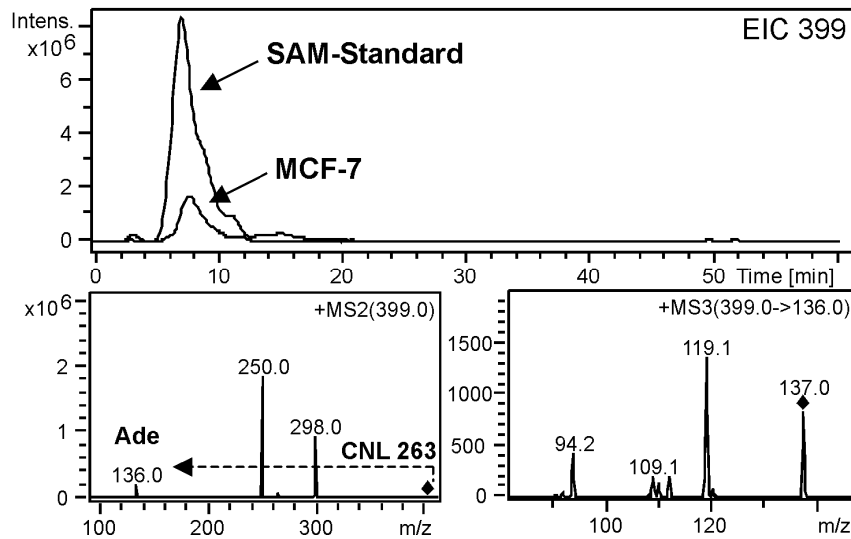


Abbildung 82: Identifizierung von *S*-Adenosylmethionin (SAM) über Retentionszeit und MS^n -Fragmentierungsmuster.

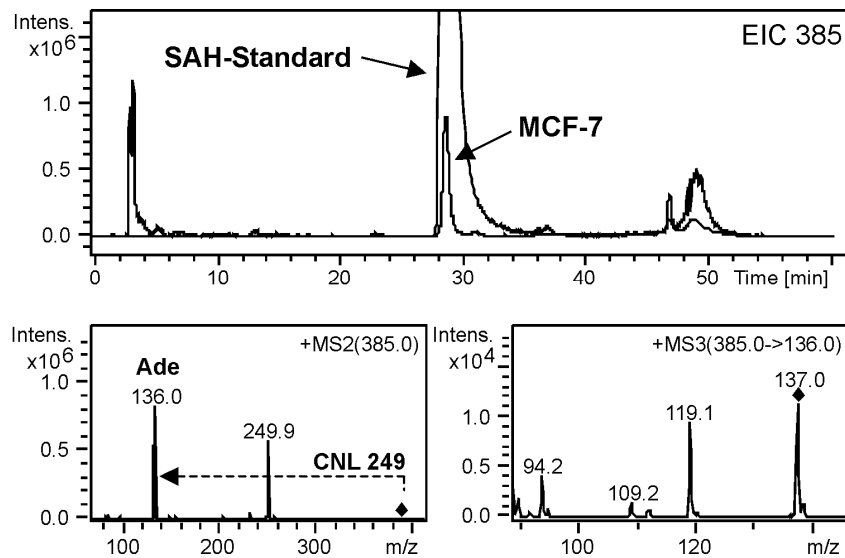


Abbildung 83: Identifizierung von *S*-Adenosylhomocystein (SAH) über Retentionszeit und MS^n -Fragmentierungsmuster.

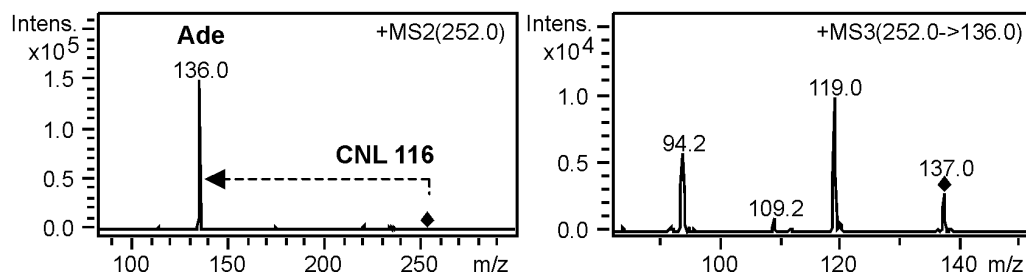


Abbildung 84: IT- MS^n -Messung (Spritzenpumpeninjektion) des semipräparativ aufgereinigten Metabolits m/z 252 (5'-Deoxyadenosin).

Zusätzlich wurde eine FT-MS-Messung von Herrn Dr. Jens Fuchser von der Firma Bruker Daltonics an einem APEX-Qe-FT-MS-Gerät durchgeführt. Die ermittelte exakte Massenposition von m/z 252,10859 ergab die Summenformel von 5'-Deoxyadenosin ($[C_{10}H_{14}N_5O_3]^+$, ppm-Fehler: -2,1). Die entsprechenden 2'- und 3'-Stellungsisomere der Deoxyribose konnten bei den Bedingungen der durchgeführten Analytik ausgeschlossen werden, da mit der Boronat-Affinitätschromatographie ausschließlich 2'-3'-cis-diol-Strukturen extrahiert werden. Die CID-Fragmentierungsexperimente bei der Auto-LC-MS³-Analytik erlaubten die Generierung von CNL-Chromatogrammen. Diese zeigen in der Darstellung ausschließlich die detektierten Komponenten an, welche im ersten Fragmentierungsschritt einen definierten Masseverlust aufweisen. Bei Nucleosiden und anderen ribosylierten Metaboliten erfolgt die Initialfragmentierung im positive mode grundsätzlich durch Spaltung der labilen C-N-glykosidischen Bindung. Hierbei wird die Zuckereinheit als Neutralteilchen eliminiert und zurück bleibt der geladene Heterozklus (z.B. die Purin- und Pyrimidinbasen). Da die untersuchten Metaboliten unterschiedlich modifizierte Riboseeinheiten (vgl. Abb. 85) besitzen, ergeben sich über den entsprechenden Neutralverlust wertvolle Hinweise zur Struktur der konjugierten Riboseeinheit.

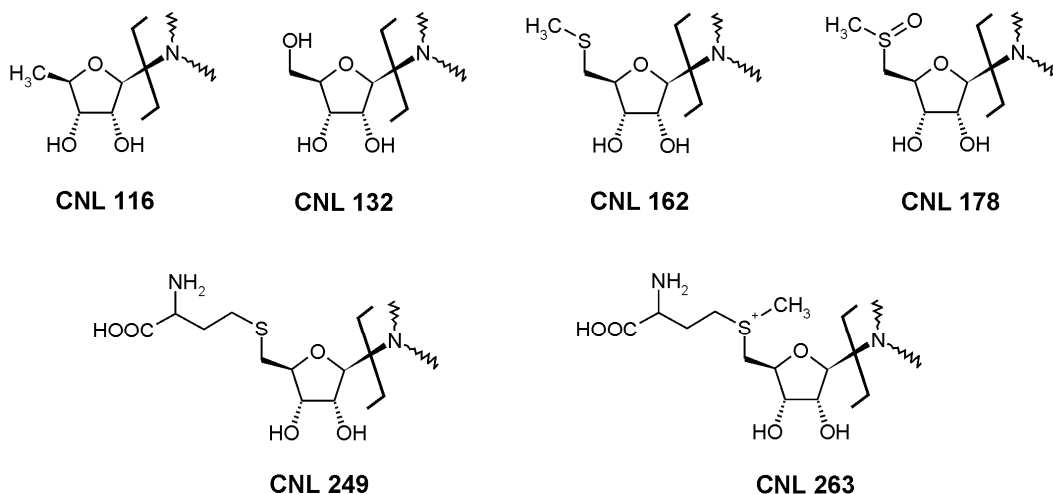


Abbildung 85: Neutralverluste verschiedener Riboseeinheiten im MS²-Zyklus.

Eine Massendifferenz von 132 Da ist ein Indikator für Metaboliten mit regulärer Ribosestruktur, 116 Da deutet auf eine Deoxyribose hin. Die Metaboliten MTA (-162 Δm), MTA-SO (-178 Δm), SAH (-249 Δm) und SAM (-263 Δm) eliminieren die korrespondierenden Thioribosyleinheiten.

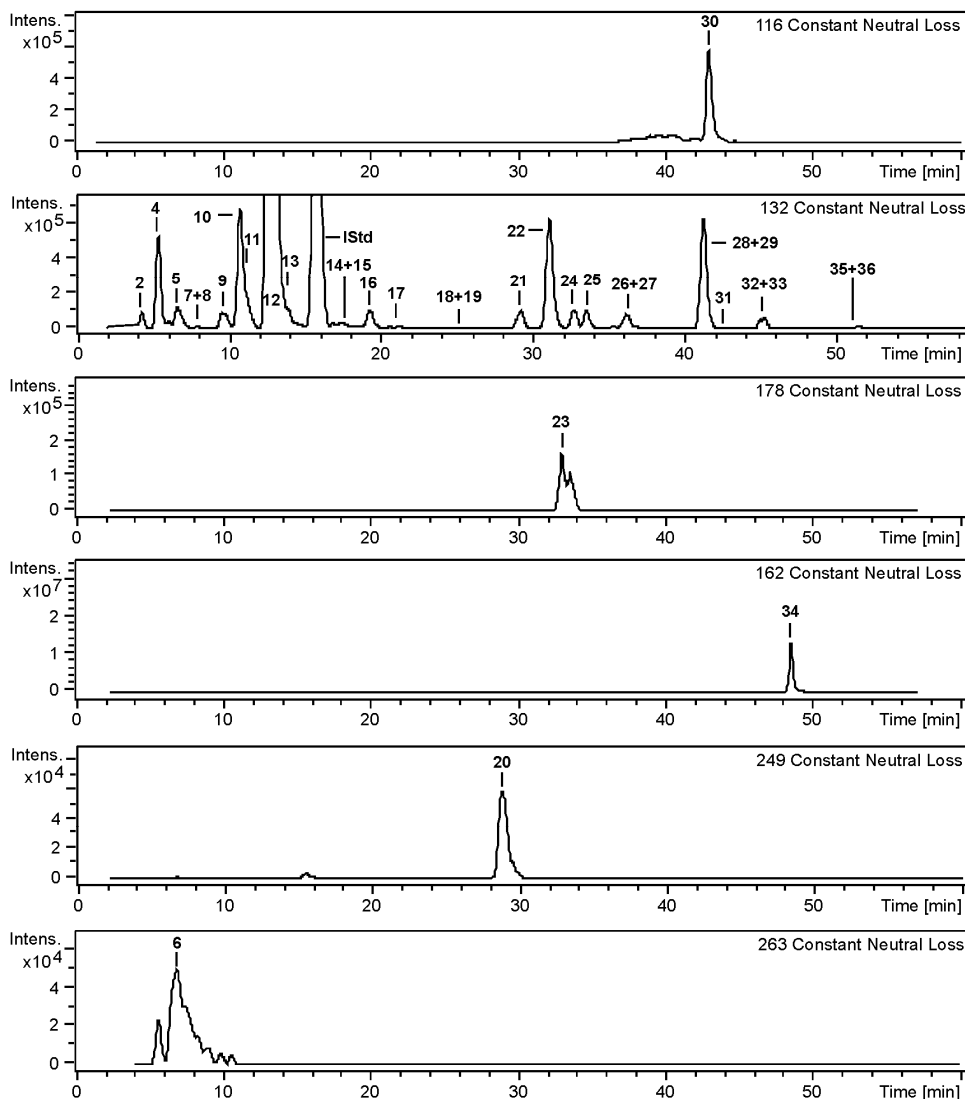


Abbildung 86: CNL-Chromatogramme, gemessen in Zellkulturüberständen von MCF-7-Brustkrebszellen. Die verschiedenen CNL-Werte (116, 132, 162, 178, 249 und 263 Δm) sind charakteristisch für die abgespaltene Ribosestruktur. Die angegebene Nummerierung bezieht sich auf Tab. 16. Nicht gezeigt sind die Verbindungen Nr. 1 (IAA-R, kommt in den Zellkulturüberständen von MCF-7 nicht vor) und Nr. 3 (ψ , keine Abspaltung der kompletten Ribosyleinheit an der stabilen C-C-glykosidischen Bindung).

Bei Nucleosiden mit einer stabilen C-C-glykosidischen Bindung wie bei Ψ erfolgt keine Abspaltung der Ribosefunktion. Stattdessen kommt es zu Spaltreaktionen in der Zuckereinheit. Wie in Abb. 86 zu sehen, kann über eine Darstel-

lung der jeweiligen Neutralverluste eine Einteilung in verschiedene Strukturspezies erfolgen. Besonders bei der Analytik komplexer Matrices kann so für bekannte Metabolitenklassen eine erhebliche Selektivitätssteigerung erreicht werden.

Mit den angewandten Auto-LC-MS³-Messungen konnten über den charakteristischen Neutralverlust der konjugierten Zuckereinheit in MS² sowie der anschließenden Fragmentierung des Heterozyklus in MS³ insgesamt 26 Ribonucleoside aus dem RNA-Metabolismus und zehn zusätzliche Komponenten aus verknüpften Stoffwechselwegen identifiziert werden. Hierzu wurden die Fragmentierungsmuster und Retentionszeiten mit den entsprechenden Standards bzw. den vorhandenen Daten aus der Identifizierungsstudie (vgl. 3.1.5) verglichen. Nach erfolgter Identifizierung der enthaltenen Strukturen erfolgte eine semiquantitative Auswertung des Metabolitenmusters mit LC-MS-Methode 5 (vgl. 5.3.3.6). Die integrierten Peakflächen der einzelnen Stoffwechselprodukte wurden auf die Peakfläche des internen Standards bezogen und verglichen. Hierbei wurde nicht wie üblicherweise auf eine reine Auswertung der H⁺-Quasimolekülonen zurückgegriffen, sondern auch die jeweiligen Natrium (Na⁺)- und Kaliumaddukte (K⁺) miteinbezogen. Grund hierfür war die zu beobachtende, stark strukturabhängige Alkali-Affinität bestimmter Metaboliten in den gemessenen Zellkulturüberständen. Die Alkaliadduktbildung ist bei der quantitativen Analytik mit ESI-MS-Systemen ein generelles Problem^[213;214] und wurde in diesem Zusammenhang auch bei Nucleosidkomponenten beschrieben^[163]. Spurenkontaminationen in der Probe können auch durch Anwendung verschiedener Aufarbeitungsprozesse nicht gänzlich verhindert werden und führen so im Verlauf der Analysensequenzen zu einer Grundkontamination des Gerätes. Abhängig von der Konzentration des zu messenden Analyten und dessen spezifischer Alkaliionen-Affinität kann es, wie in Abb. 87 zu sehen, zu erheblichen Na⁺ bzw. K⁺-Adduktbildungen kommen. Je geringer hierbei die Absolutmenge des ins Massenspektrometer gelangenden Metabolits ist, desto stärker wirkt sich die Alkali-Grundkontamination im Gerät prozentual auf die gemessene Adduktverteilung aus.

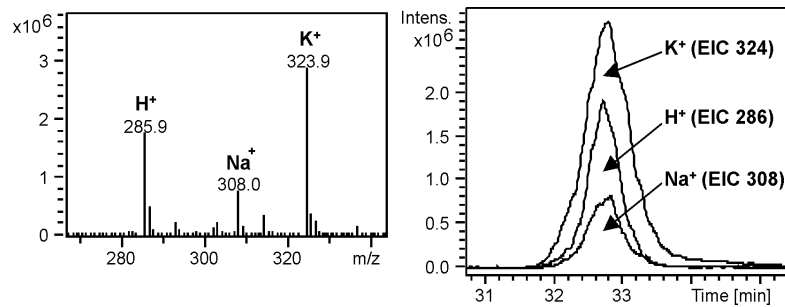


Abbildung 87: Adduktbildung (H^+ , Na^+ , K^+) beim modifizierten Nucleosid ac^4C ($[MH]^+$ = 286). Rechts: Verhältnis der EIC-Peakflächen der Einzeladdukte.

Um eine zu starke Verfälschung bei der Quantifizierung der einzelnen Metaboliten zu gewährleisten, wurde bei der Berechnung grundsätzlich die Summe der H^+ -, Na^+ - und K^+ -Flächen als Gesamtfläche berechnet. Die resultierenden Summen-EICs wurden mit einem Gauß-Algorithmus geglättet und anschließend manuell integriert. Einige der analysierten Metaboliten zeigten signifikante Unterschiede zwischen der Brustkrebszelllinie und der Brustepithel-Referenzzelllinie (vgl. Abb. 88 und 89), die vermutlich durch die Zellantwort auf die pathophysiologische Mutation hervorgerufen wurden. Im Einzelnen ergaben sich die in Tab. 16 aufgeführten Werte für den semiquantitativen Vergleich der Zellkulturüberstände von MCF-7 und MCF-10A.

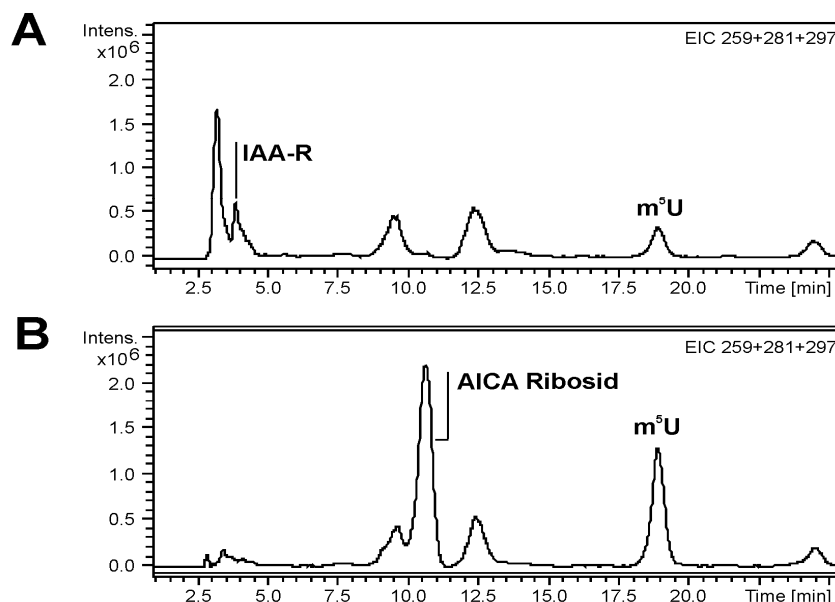


Abbildung 88: EICs 259 + 281 + 297 (Summe aus H^+ -, Na^+ - und K^+ -Addukten) von IAA-R, AICA Ribosid und m^5U . A: MCF-10A Brustepithelzelllinie, B: MCF-7 Brustkrebszelllinie.

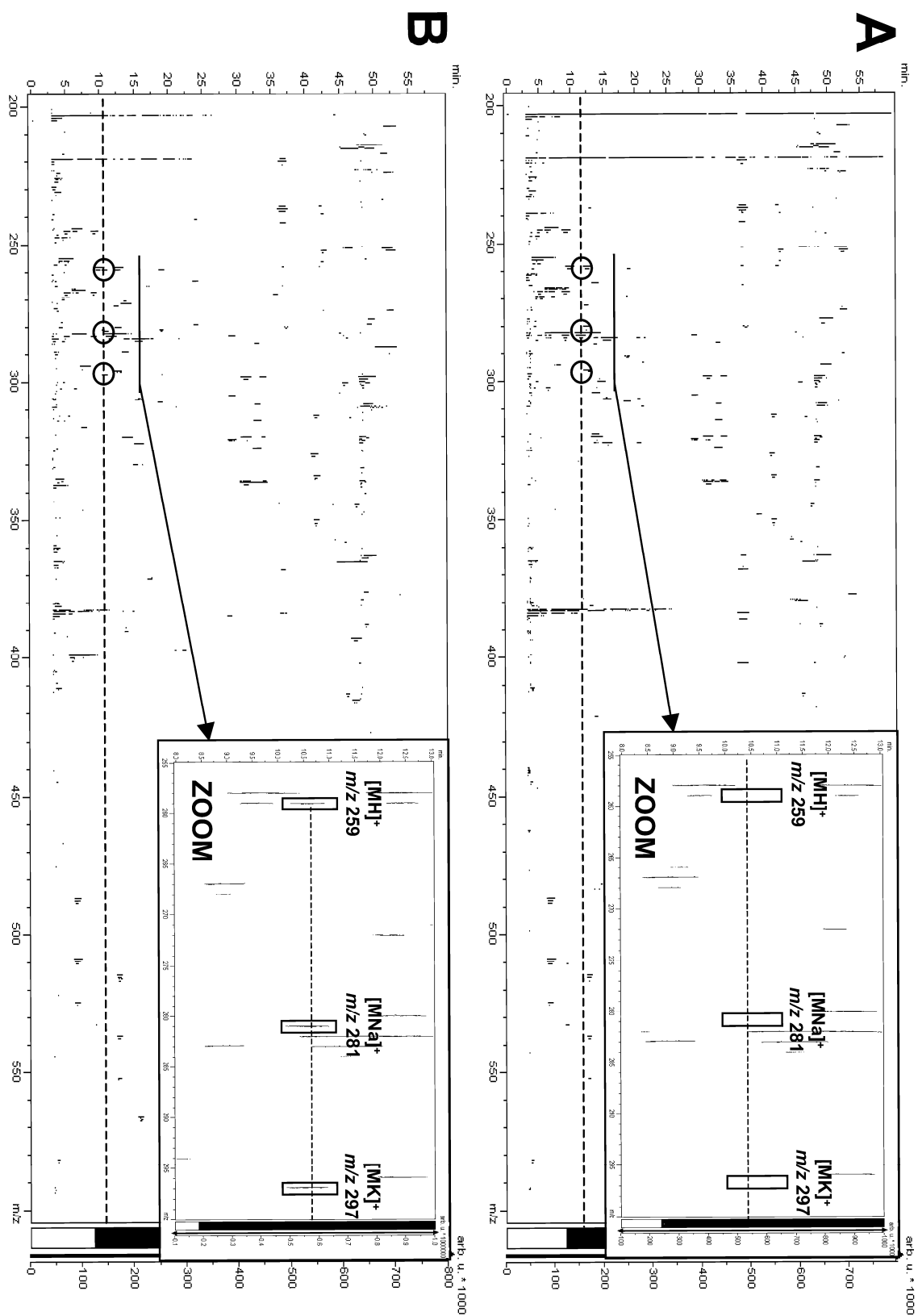


Abbildung 89: 2D-Konturplots, generiert aus LC-MS-Messungen. A: MCF-10A Brustepithelzelllinie, B: MCF-7 Brustkrebszelllinie. Dargestellter Zoombereich von AICAR Ribosid, 6,0-13,0 min, m/z 255-300.

Tabelle 16: Vergleich des Metabolitenmusters in Zellkulturüberständen von MCF-10A und MCF-7-Zellen, Flächenquotient = Peakfläche (Summe $[MH]^+$, $[MNa]^+$, $[MK]^+$ Analyt) / Peakfläche (Summe $[MH]^+$, $[MNa]^+$, $[MK]^+$ interner Standard Isoguanosin), n.d.: nicht detektierbar. Geordnet nach steigender Retentionszeit.

Nr.	Metabolit	MCF-10A (n = 3)	MCF-7 (n = 3)
		Flächenquotient*1000 Mittelwert \pm SD	Flächenquotient*1000 Mittelwert \pm SD
1	IAA-R	19,83 \pm 1,07	n.d.
2	DHU	210,30 \pm 19,13	261,58 \pm 14,58
3	Ψ	513,38 \pm 26,77	658,02 \pm 30,67
4	NA-R	1985,96 \pm 206,67	729,10 \pm 43,95
5	C	2044,16 \pm 190,68	1066,82 \pm 86,71
6	SAM	n.d.	335,55 \pm 21,75
7	ncm ⁵ U	32,47 \pm 0,73	18,10 \pm 0,96
8	acp ³ U	7,13 \pm 0,63	12,89 \pm 0,60
9	U	1103,56 \pm 30,38	504,13 \pm 80,28
10	m ³ C	382,01 \pm 9,65	458,36 \pm 16,08
11	AICA Ribosid	n.d.	251,47 \pm 22,35
12	m ¹ A	2170,75 \pm 104,62	2067,45 \pm 67,84
13	m ⁵ C	437,16 \pm 25,90	446,30 \pm 14,00
14	I	147,28 \pm 9,77	46,89 \pm 10,41
15	m ⁵ U	35,90 \pm 1,48	141,70 \pm 4,01
16	G	79,84 \pm 8,73	15,31 \pm 3,02
17	3,4-PCNR	56,25 \pm 27,64	46,70 \pm 4,94
18	m ³ U	20,30 \pm 1,25	26,91 \pm 0,59
19	X	13,10 \pm 0,27	18,96 \pm 1,84
20	SAH	7,53 \pm 0,43	47,77 \pm 0,98
21	m ¹ I	282,12 \pm 32,66	269,92 \pm 6,25
22	m ¹ G	648,74 \pm 5,15	700,59 \pm 10,64
23	MTA-SO	23,73 \pm 0,95	32,40 \pm 6,31
24	ac ⁴ C	296,08 \pm 4,84	298,65 \pm 6,69
25	m ² G	293,26 \pm 14,32	206,55 \pm 7,32
26	A	5,97 \pm 0,10	32,57 \pm 7,16
27	N ⁶ -SAR	130,04 \pm 2,59	97,78 \pm 3,40
28	m ² ₂ G	460,45 \pm 19,86	587,62 \pm 9,99
29	m ^{2,2,7} G	129,55 \pm 7,07	263,28 \pm 5,54
30	5'-dA	101,50 \pm 16,49	81,81 \pm 2,47
31	mcm ⁵ s ² U	10,55 \pm 0,23	12,60 \pm 0,34
32	m ⁶ A	22,97 \pm 11,04	32,67 \pm 12,12
33	t ⁶ A	42,34 \pm 1,83	67,25 \pm 0,44
34	MTA	3452,12 \pm 213,17	5668,00 \pm 125,15
35	m ⁶ t ⁶ A	3,11 \pm 0,04	5,96 \pm 0,46
36	ms ² t ⁶ A	3,68 \pm 0,15	3,47 \pm 0,16

3.2.6 Semiquantitative Auswertung des Metabolitenmusters

3.2.6.1 Modifizierte Nucleoside

Wie aus Tab. 16 zu erkennen ist, ergaben sich zwischen der Brustepithelzelllinie MCF-10A und der Brustkrebszelllinie MCF-7 deutliche Unterschiede in der Ausscheidung von Ribonucleosiden. Im Fall der modifizierten Nucleoside konnte eine erhöhte Exkretion von DHU, ψ , acp^3U , m^3C , m^5U , m^3U , X, m^1G , m^2_2G , $\text{m}^{2,2,7}\text{G}$, $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$, t^6A und $\text{m}^6\text{t}^6\text{A}$ in den Zellkulturüberständen von MCF-7 beobachtet werden. Hierzu wurde ein Nucleosid-Konzentrationslevel als „erhöht“ angesehen, wenn der gemessene Flächenquotient (Analyt / interner Standard) in der Brustkrebszelllinie den in der Referenzzelllinie um die doppelte Standardabweichung überschritt (2σ -Konzept^[215]). Das methylierte Adenosin m^6A wurde trotz der Erfüllung dieser Voraussetzung nicht in die Liste der erhöhten Nucleoside eingeschlossen, da unter alkalischen Bedingungen (vgl. Affinitätschromatographie) dessen Bildung aus m^1A über eine Dimroth-Umlagerung beschrieben wird^[216;217].

Insbesondere die stark erhöhten Ausscheidungen von m^5U (Verhältnis der Flächenquotienten MCF-7 / MCF-10A $\sim 4:1$), $\text{m}^{2,2,7}\text{G}$ ($\sim 2:1$), $\text{m}^6\text{t}^6\text{A}$ ($\sim 2:1$) und acp^3U ($\sim 2:1$) waren auffällig und sollen im Folgenden näher interpretiert werden.

m^5U kommt in eukaryontischer tRNA und rRNA vor^[218]. *Roe und Tsen* beschrieben dessen mögliche Involvierung in die Regulation von Translationsprozessen in der Säugerleber^[219]. Die Bildung von m^5U ist assoziiert mit der Stabilisierung der makromolekularen RNA-Struktur. Ein Fehlen von m^5U in Kombination mit fehlenden 2'-O-Methylguanosin- und ψ -Modifikationsstellen führte in tRNAs von *E.coli* Bakterien zu einer verringerten Wachstumsrate und Defekten in den ablaufenden Translationsprozessen^[220].

$\text{m}^{2,2,7}\text{G}$ ist in eukaryontischer mRNA und snRNA beschrieben^[218]. Trimethyliertes Guanodin ist Teil der m_3Cap -Struktur, eine snRNA-spezifische Variante der regulären, monomethylierten m^7G -Cap am 5'-Ende. Die nasszierende snRNA, zunächst ausgestattet mit einer m^7G -Cap, wandert vom Zellkern ins Cytoplas-

ma und bindet dort an snRNPs. Anschließend erfolgt ein SAM-induzierter Transfer der zwei zusätzlichen Methylgruppen an den m⁷G-Rest, und der snRNA/Protein-Komplex wandert zurück in den Nucleus^[104]. snRNAs zählen zur Gruppe der nicht codierenden RNAs (ncRNAs). Diese RNA-Spezies wurden bereits mit der Entstehung bestimmter Krankheiten, unter anderem Krebserkrankungen^[221], in Verbindung gebracht. snRNAs können die Expression von Genen unterdrücken. Vermutet wird eine direkte Bindung an mRNA-Moleküle, was einen Abbruch der Proteinproduktion zur Folge hat. Angenommen wird außerdem, dass snRNAs die Genexpression epigenetisch regulieren können, und die gebildeten ncRNA-Spezies in höheren Organismen ein endogenes Kontrollsystem für die programmierten Genexpressionsmuster darstellen^[221]. Folglich kann die erhöhte Bildung und Ausscheidung von m^{2,2,7}G in Zellkulturüberständen der Brustkrebszelllinie MCF-7 als Indikation für tumorassoziierte Veränderung der epigenetischen Genexpression interpretiert werden.

Die Bildung von m⁶t⁶A wurde bisher in *E.coli* tRNA^{Thr}, Weizenkeim-tRNA und Rattenleber-tRNA^{Ser} beschrieben. Es wird angenommen, dass die N⁶-Methylgruppe dieses Nucleosids die Effizienz des Ablesevorgangs der *E.coli* tRNA erhöht^[222]. Eine ähnliche Auswirkung kann auch für die Translationsvorgänge in Tumorzellen wie MCF-7 angenommen werden. Die Bildung in menschlichen Zellen wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Die Detektion von m⁶t⁶A in den untersuchten Zellkulturüberständen bestätigt den humanen Ursprung des Nucleosids. Dieser wurde bei der Identifizierung von m⁶t⁶A in den, in dieser Arbeit untersuchten Urinproben, noch diskutiert. Denkbar wäre prinzipiell auch eine Ausscheidung dieses modifizierten Nucleosids von den in der menschlichen Darmflora angesiedelten *E.coli* Bakterien, anschließende Resorption über die Darmschleimhaut und letztlich die Ausscheidung mit dem Urin.

Das modifizierte Nucleosid acp³U kommt in verschiedenen Säuger-tRNAs vor. Es wird posttranskriptional über den Transfer einer Aminocarboxypropyl-Gruppe von SAM auf definierte Uridinpositionen im RNA-Makromolekül gebildet, wobei MTA als Abbauprodukt entsteht (vgl. Abb. 81)^[223]. Die vermehrte Bildung von acp³U ist deshalb direkt assoziiert mit einer erhöhten Bildungsrate und Exkreti-

on von MTA wie sie auch in den Zellkulturüberständen von MCF-7-Zellen beobachtet werden konnten.

Für die im Vergleich zu gesunden Zellen veränderte Basenzusammensetzung von tRNA in Tumorzellen werden generell unterschiedliche Ursachen angenommen. *Randerath et al.* vermuteten tumorassoziierte Veränderungen in der Konzentration bestimmter tRNAs, Bildung von tRNAs mit abgewandelten Sequenzen sowie veränderte Modifikationen^[224].

Die Methylierung als häufigste Modifikation von Ribonucleosiden erfolgt über den enzymatischen Transfer der Methylfunktion des ubiquitären Methyl donors SAM auf definierte Positionen im RNA-Makromolekül. Erhöhte Aktivitäten von RNA-modifizierenden Enzymen wie z.B. Methyltransferasen wurden u.a. bei Brustkrebskrankungen beschrieben^[129] und erklären die erhöhte Bildung und anschließende Ausscheidung der analysierten methylierten Ribonucleoside.

Neben der Hauptaufgabe der tRNA in den biochemischen Translationsprozessen wurden weitere Funktionen wie die Beteiligung als Cosubstrat in enzymatischen Reaktionen beschrieben^[225]. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass implementierte Modifikationen sowie die Aktivität modifizierender Enzyme als regulatorische Elemente zwischen den Vorgängen der Translation und anderen enzymatischen Metabolisierungsreaktionen fungieren. Die Bildung und der Modifikationsgrad verschiedener tRNA-Spezies wird hierbei abhängig vom physiologischen Status der Zelle (z.B. der Wachstumsrate) kontrolliert^[226]. Die beobachtete vermehrte Exkretion bestimmter modifizierter Nucleoside kann somit auf die durch das Tumorstadium induzierte Akkumulation bestimmter tRNA-Formen mit spezifischer Basenkomposition zurückgeführt werden.

3.2.6.2 Nicht-modifizierte Nucleoside

Auch bei der Ausscheidung der regulären, nicht-modifizierten Nucleoside zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen MCF-7 und MCF-10A: G (Verhältnis der Flächenquotienten MCF-7 / MCF-10A ~ 1:5), U (~ 1:2), C (~1:2) und A (~5:1). Bei Letzterem muss eine mögliche Aktivität der Adenosindesaminase, welche A in I umwandelt, beachtet werden. Das analysierte Verhältnis der

Flächenquotienten MCF-7 / MCF-10A betrug $\sim 1:3$. Die geringere Konzentration regulärer Ribonucleoside in den Überständen der Brustkrebszellen kann auf den allgemein erhöhten Zell-Turnover und die daraus resultierende Steigerung des RNA-Umsatzes zurückgeführt werden. Dieses in Tumorzellen hinlänglich beschriebene Phänomen^[125] führt im Fall der MCF-7-Zellen zu einem erhöhten Bedarf an Ribonucleosiden zum Wiederaufbau der verschiedenen RNA-Spezies und somit vermutlich zu einer verminderten Exkretion bzw. einer erhöhten Resorption aus den Zellkulturüberständen zurück in die Zelle.

3.2.6.3 SAM und SAH

Die beschriebene gesteigerte Aktivität von Methyltransferasen in Tumorzellen ist verbunden mit dem ubiquitären Methyl donor SAM und seinem Abbauprodukten SAH (vgl. Abb. 81). In den MCF-7-Zellkulturüberständen konnte SAM nachgewiesen werden, in denen von MCF-10A nicht. Eine erhöhte SAM-Exkretion wurde in Zellen mit Methionin-abhängigem Wachstum von *Christa et al.* beschrieben^[227]. Viele humane Tumorzelllinien (wie z.B. MCF-7) und primäre Tumorzellen zeigen diese charakteristische Eigenschaft mit der Fähigkeit zum Wachstum in Methionin-haltigem Medium und Verlust derselbigen bei Austausch gegen den Methioninprecursor Homocystein^[228].

SAH ist das SAM-Abbauprodukt in enzymatisch-induzierten Methyltransferreaktionen, z.B. der Methylierung von RNA-Molekülen. Diese, in der Tumorgenese vermehrt ablaufende Reaktion, führt somit zu einer erhöhten Bildung und Akkumulation von SAH in der Zelle. Aufgrund des nachgewiesenen inhibitorischen Effekts von SAH auf Methylierungsreaktionen^[229] kommt es vermutlich in der Folge zur vermehrten Ausscheidung des Abbauproduktes. Diese Zellreaktion konnte anhand des stark erhöhten Levels (~ 7 -fach im Vergleich zu MCF-10A) von SAH in den Zellkulturüberständen der MCF-7-Zellen dokumentiert werden. Allgemein kann angenommen werden, dass die tumorassoziierte Veränderung der Zellphysiologie zu einer deregulierten Bildung von SAM für essentielle Transmethylierungsreaktionen und folglich zu einer vermehrten Ausscheidung von SAM und SAH führt.

3.2.6.4 MTA und MTA-SO

Bei der Analyse der Zellkulturüberstände konnte eine signifikant erhöhte Exkretion von MTA und dessen oxidierten Metabolit MTA-SO in der Tumorzelllinie beobachtet werden. MTA ist kein Stoffwechselprodukt des RNA-Metabolismus, sondern Bestandteil des Polyamin / Methionin-Zyklus. Es wird wie in Abb. 81 dargestellt als Nebenprodukt der Polyamin-Biosynthese gebildet. Hierbei wird von dcSAM eine Propylamino-Funktion auf die Polyaminkomponenten Putrescin und Spermidin übertragen. Letztere sind regulative Komponenten des zellulären Wachstumsprozesses. Bei Brustkrebs wurden erhöhte Konzentrationen der Polyaminkomponenten in biologischen Flüssigkeiten ermittelt^[230]. Zusätzlich konnte eine hochregulierte Expression der, an der Polyamin-Biosynthese beteiligten Enzyme Ornithindecaboxylase und S-Adenosylmethionindecaboxylase im Tumorgewebe nachgewiesen werden^[231]. Eine Verringerung des intrazellulären Polyaminlevels führte zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums und Veränderungen in der Zelldifferenzierung. Der Polyamin-Zyklus wird daher als möglicher Angriffspunkt für Chemotherapeutika diskutiert^[232].

Generell kann die erhöhte Exkretion von MTA in den MCF-7-Zellkulturüberständen als Folge einer hochregulierten Polyamin-Biosynthese der Tumorzelle betrachtet werden. In humanen Leukämiezellen ist der Zusammenhang zwischen Erhöhungen der Polyaminsynthese und der MTA-Exkretionsrate bereits beschrieben^[233].

Eine weiterer Aspekt, den es bezüglich des Phänomens der erhöhten Ausscheidung von MTA zu beachten gilt, ist dessen intrazelluläre Metabolisierung. Über das Enzym MTAP (Methylthioadenosin-Phosphorylase) wird MTA zu Adenin und S-Methyl-5'-thio-D-ribose-1-phosphat (MTR-1P) abgebaut. In einigen Brustkrebszelllinien wie z.B. MCF-7 ist das MTAP-Gen inaktiviert^[234]. MTA wird demzufolge in MCF-7-Zellen nicht abgebaut und reichert sich an. Akkumulierendes MTA weist stark zelltoxische Eigenschaften auf^[235] und inhibiert Aminopropyltransferasen, Methyltransferasen^[236] sowie das Zellwachstum im Allgemeinen^[237]. Die genannten Prozesse sind an wichtigen Abläufen in der

Tumorgenese beteiligt. Es erscheint daher plausibel, dass MCF-7-Tumorzellen das angereicherte MTA aufgrund der genannten toxischen und inhibitorischen Effekte vermehrt ausscheiden, um den mutierten Zellwachstumsprozess aufrecht zu erhalten.

Des Weiteren kann angenommen werden, dass die für MCF-7-Zellen essentielle Methioninsynthese aufgrund der deaktivierten MTAP vermehrt über den Recycling-Pathway (vgl. Abb. 81) abläuft. Der erste Schritt dieser Route ist die Demethylierung von SAM zu SAH. Die erhöhten Ausscheidungsraten dieser Metaboliten in MCF-7-Zellen stützen diese These und erklären darüber hinaus die verstärkte Exkretion einiger methylierter Nucleosidkomponenten deren Bildung ebenso direkt von dieser Route des Methionin / Polyamin-Zyklus abhängen.

Für die Bildung von MTA-SO wird die *in vivo* Oxidation mittels Peroxiden und Superoxiden oder enzymatische Biotransformation in der Leber angenommen^[238]. In einer vorangegangenen Arbeit von *Frickenschmidt* wurden verschiedene Nucleoside, unter anderem MTA, mit Rattenlebermikrosomen inkubiert^[157]. Im Versuchsansatz konnten verschiedene Strukturen wie NA-R (vermutlich aus dem zugesetzten NADPH) sowie C, U, A (evtl. aus den Mikrosomen) und m¹A nachgewiesen werden. Eine direkte Modifizierung von MTA wurde nicht beschrieben. Ein im Nachhinein im Inkubationsansatz entdeckter MTA-Metabolit (vgl. Abb. 90) ist das, in dieser Arbeit mit IT-MS und FT-ICR-MS strukturell aufgeklärte MTA-SO (vgl. 3.1.5.5). Somit kann die Bildung von MTA-SO beim Menschen zu einem gewissen Anteil auf die CYP450-induzierte Oxidierung^[239] von MTA in der Leber zurückgeführt werden. Welche intrazellulären Oxidationssysteme für die Bildung von MTA-SO in den untersuchten Brustzelllinien eine Rolle spielen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht abgeschätzt werden.

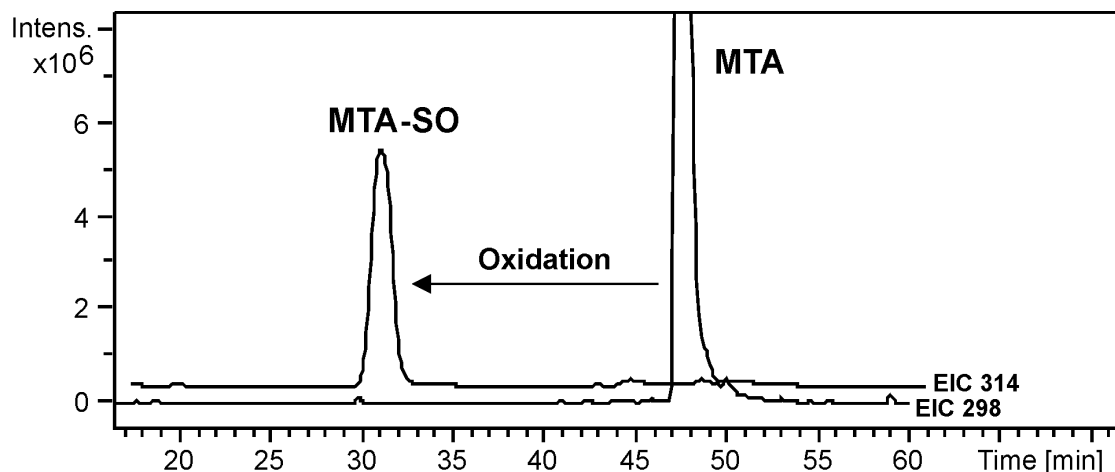


Abbildung 90: Inkubation von MTA mit Rattenlebermikrosomen. Die entsprechenden EICs m/z 298 (MTA) und m/z 314 (MTA-SO) zeigen die oxidative Umsetzung des Ausgangsproduktes MTA zum entsprechenden Sulfoxid.

3.2.6.5 Histidin-Metabolismus und Purin-Biosynthese

Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Zelllinien konnte in der Exkretion von AICA Ribosid beobachtet werden, welches ausschließlich in den Zellkulturüberständen von MCF-7 detektierbar war (vgl. Abb. 80). AICA Ribosid ist das dephosphorylierte Analogon von AICA Ribotid (AICAR), einem Intermediat der Purin-Biosynthese und des Histidin-Metabolismus sowie Precursor und biochemischen Imitator von AMP (vgl. Abb. 80).

Ein Charakteristikum von Tumorzellen sind hochregulierte anabolische Prozesse wie die Lipid-, Protein- und DNA-Biosynthese. Diese energieverbrauchenden Abläufe werden über den Energie-Status der Zelle, basierend auf dem intrazellulären ATP / AMP-Verhältnis, reguliert. *Swinnen et al.* untersuchten den Einfluss von extrazellulär zugeführtem AICA Ribosid auf invasive MDA-MB-231-Brustkrebszellen. AICA Ribosid wurde von der Tumorzelle aufgenommen und zu AICAR phosphoryliert. Es resultierte eine signifikante Inhibierung von tumorassoziierten, anabolischen Prozessen, der Zellproliferation und der Kolonieformation sowie Apoptose bei stark erhöhten Konzentrationen. Außerdem konnte konsequenterweise auch eine Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinasen (AMPK) beobachtet werden^[240]. Letztere werden bei niedrigem ATP / AMP-Verhältnis über die allosterische Bindung von AMP aktiviert und stoppen die genannten energieverbrauchenden Prozesse durch Inaktivierung der involvier-

ten Enzyme. Des Weiteren wird über die Aktivierung der AMPKs die Expression bekannter Tumorsuppressorgene wie p21, p27 und p53 in die entsprechenden Zellzyklus-hemmenden Inhibitorproteine erhöht^[241]. AMPKs werden generell auch im Zusammenhang mit apoptotischen Vorgängen genannt, wobei abhängig vom Zelltyp sowohl eine Aktivierung als auch eine Schutzfunktion in der Literatur beschrieben wurden^[242]. Bezogen auf die verstärkte Exkretion in den MCF-7-Brustkrebszellen kann angenommen werden, dass intrazelluläres AICAR als Zellmembran-permeables AICA Ribosid ausgeschieden wird, um dessen inhibitorische Effekte auf das Tumorwachstum zu umgehen.

Auffällige Unterschiede zwischen den analysierten Zellkulturüberständen wurden auch im Histidin-Metabolismus beobachtet. Der ribosylierte Histidinmetabolit IAA-R konnte in den MCF10-A-Überständen detektiert werden, nicht aber in denen von MCF-7.

Allgemein existieren eine Reihe schlüssiger Hinweise, die Histamin, einem Precursor von IAA-R, eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung maligner Tumorerkrankungen zuweisen. So konnte eine erhöhte enzymatische Aktivität der Histidindecarboxylase in Brustkrebsgewebe^[243] und funktionelle Histaminrezeptoren in Tumorzelllinien nachgewiesen werden^[244]. Der Einsatz spezifischer Inhibitoren der Histidindecarboxylase führte zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums in verschiedenen Tiermodellen^[245] und *in vitro*^[246]. Die erhöhte Biosynthese von *de novo* synthetisiertem, tumorassoziiertem Histamin ist demnach vermutlich am Erhalt der maximalen Wachstums- und Proliferationsrate über bislang unbekannte, intrazelluläre Targets beteiligt. Die Imitierung der Polyaminkomponenten Putrescin und Spermidin wird in diesem Zusammenhang diskutiert. Des Weiteren wurden erhöhte Histaminlevel in Verbindung mit einer möglichen Stabilisierung kondensierter Polynucleotidspezies, der Formierung von Nucleinsäure-Protein-Polyamin-Komplexen, der Kontrolle der Aminoacyl-tRNA und der Proteinsynthese erwähnt^[247]. *Reynolds et al.* wiesen darauf hin, dass erhöhte Histaminkonzentrationen beim Mammakarzinom auf mögliche, immunsuppressive Effekte zurückzuführen seien^[248].

Die Tatsache, dass der Histaminmetabolit IAA-R nur in den Zellkulturüberständen der Brustepithelzelllinie MCF-10A gefunden wurde, stützt die Vermutung, dass naszierendes, *de novo* synthetisiertes Histamin in MCF-7-Zellen für bestimmte Prozesse der Tumorgenese benötigt wird, und daher nicht weiter metabolisiert bzw. ausgeschieden wird.

3.3 Analytik von modifizierten Nucleoside im Plasma von Mammakarzinompatientinnen

3.3.1 Bisherige Arbeiten

Der Großteil der Arbeiten zur Messung modifizierter Nucleoside in biologischen Flüssigkeiten konzentrierte sich auf die Urinanalytik. Die Untersuchung im Blut (Plasma, Serum) fand weit weniger Beachtung, ist sie doch aufgrund verschiedener Aspekte wie die im Vergleich zum Urin deutlich geringere Konzentration (10-100fach) sowie die erhöhte Matrixbelastung (Proteingehalt) erschwert^[249]. Als generelle Vorteile, verglichen zur Urinanalytik, werden zum einen die Möglichkeit einer direkten Konzentrationsmessung ohne Bezug auf den Kreatininwert und zum anderen eine geringere Beeinflussung der aus der Zelle ausgeschiedenen Metaboliten durch Biotransformationsreaktionen genannt^[112].

Bisherige Arbeiten beruhen in der Regel auf HPLC-UV-Messungen^[249-252]. *Takeda et al.* untersuchten modifizierte Nucleoside im Serum von Patienten mit Urämie mittels Kapillar-LC-FAB-MS^[253]. *Xu et al.* berichteten eine signifikante Erhöhung (Mittelwert normales Serum + 2σ) der Ribonucleoside ψ , m^1I , m^1G , m^1A , m^6A , MTA, I und G im Serum von Patienten mit verschiedenen Krebsarten^[249]. *McEntire et al.* untersuchten 29 Komponenten (davon 15 identifizierte Ribonucleoside) im Serum von Bronchialkarzinompatienten^[254]. Insbesondere die erhöhten Konzentrationen von ψ , ac^4C , m^2_2G und t^6A trugen zu einem Klassifizierungsansatz bei, bei welchem 84% der Tumorpatienten im Vergleich zu Patienten mit nicht-neoplastischen Erkrankungen korrekt zugeordnet werden konnten. *Mitchell et al.* quantifizierten zehn Serum-Ribonucleoside bei 37 Gesunden und verglichen diese mit einzelnen Krebspatienten unterschiedlicher Erkrankungsformen und -stadien^[112]. Innerhalb des gesunden Studienkollektivs

zeigten sich relativ konstante Konzentrationswerte. Auffallend starke Erhöhungen der Konzentrationslevel ergaben sich im Fall der Tumorpatienten (u.a. Leukämie und Bronchialkarzinom) für ψ , ac^4C , m^1I , m^2_2G , t^6A .

3.3.2 Sammlung der Plasmaproben

Für die massenspektrometrische Auswertung des Nucleosidmusters im Plasma wurden aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen zehn Blutproben von Mammakarzinompatientinnen gesammelt, die zu diesem Zeitpunkt in Behandlung waren und deren Tumor operativ entfernt werden sollte. Die Patientinnen litten an Tumoren der Stadien T1 (n = 7), T2 (n = 2) und T3 (n = 1). Die Blutentnahme erfolgte präoperativ. Zum Vergleich wurden weitere zehn Blutproben gesunder Probandinnen aus der Blutspendezentrale der Universität Tübingen untersucht. Die Probensammlung und -aufbereitung wurde von Frau Stefanie Reit im Rahmen einer Diplomarbeit an der Universität Tübingen durchgeführt.

3.3.3 Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung

Die Bestimmung der Ribonucleoside im Blut wurde in der vorliegenden Arbeit auf Plasmaebene durchgeführt. Die Verwendung von Serum erschien ungeeignet, da hierbei aufgrund des notwendigen Koagulationsprozesses eine zusätzliche Beeinflussung des Nucleosidmusters, z.B. durch enzymatische Abbaureaktionen, nahe liegt. Hierbei sind u.a. die Aktivitäten der Adenosin- und Cytidindeaminase zu beachten, die A in I bzw. C in U umwandeln^[255]. Diese Reaktionen werden bei der Verwendung von Plasma verringert, da dieses nach der Zentrifugation direkt eingefroren werden kann.

Für die Aufarbeitung von Plasmaproben ist die Aufreinigungsprozedur vor den eigentlichen Messungen von entscheidender Bedeutung. In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden für die Analytik modifizierter Nucleoside etabliert, unter anderem die Proteinabtrennung über Größenausschlussfiltration^[112;249;251;254] sowie die Fällung mit organischen Lösungsmitteln^[255] und starken Säuren wie Perchlorsäure^[250] und Trichloressigsäure^[252].

Die Verwendung der genannten Säuren zur Proteinfällung wurde aufgrund möglicher chemischer Einflüsse auf die teilweise labilen Nucleosidstrukturen ausgeschlossen. Zu Testzwecken wurden die Methoden der Größenausschlussfiltration (Ultrafiltrationseinheit 30000 MWCO (Ausschlussgrenze 30000 Da, Millipore, Billerica, USA) als auch die Fällung mit Acetonitril durchgeführt. Hierzu wurde je 1 ml Plasma der gleichen Charge eingesetzt, mit 50 µl internem Standard versetzt und anschließend die Proteine entfernt.

Bei der Ultrafiltration wurde die Plasmalösung in die Filtrationseinheit pipettiert und anschließend bei 2000 g und 4 °C für 1,5 h zentrifugiert. Nach der genannten Zeit waren ca. 750 µl der Lösung filtriert, während sich die restlichen ca. 300 µl noch im Filteraufsatz befanden. Das Residuum wurde in ca. 1 ml NH₄Ac-Lösung (pH 8,8, 0,25 M) gelöst und erneut zentrifugiert, wobei wiederum ein Rest im Filteraufsatz zurückblieb. Die gesammelten Filtrate wurden vereinigt, mit NH₄Ac-Lösung (pH 8,8, 0,25 M) auf 10 ml aufgefüllt und anschließend mit Affinitätschromatographie aufgearbeitet (vgl. 5.2.2.3).

Im Fall der ACN-Fällung wurde die angesetzte Plasmalösung vorsichtig mit 1 ml eiskaltem Acetonitril versetzt, durchmischt und anschließend vom ausgefallenen Protein abzentrifugiert (19800 rpm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde abpipettiert, das überschüssige Acetonitril am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand mit NH₄Ac-Lösung (pH 8,8, 0,25 M) auf 10 ml aufgefüllt und anschließend mit Affinitätschromatographie aufgearbeitet (vgl. 5.2.2.3). Aus den Ergebnissen in Vorversuchen wurde das Verhältnis von Plasma zu ACN auf 1:1 (v/v) festgelegt. Erhöht man den Anteil des organischen Fällungsmittels (z.B. auf 1:6 (v/v)), besteht die Gefahr, dass die Nucleosidkomponenten beim Fällern nicht in die Lösung übergehen und es so zu erheblichen Verlusten der Analyten kommt.

In Abb. 91 sind die LC-MS-Läufe (LC-MS-Methode 5, vgl. 5.3.3.6) gezeigt. Die generierten BPCs zeigen, dass die ACN-Methode (A) eine deutlich bessere Aufreinigung des Plasmas liefert. Die Auswirkung der Restmatrix auf die Auswertung der Peakflächen ist am Beispiel der EICs *m/z* 245 und der korrespondierenden Komponenten U und ψ zu erkennen. Während die Fällung mittels

ACN scharfe, gut auswertbare Peaks ergibt, zeigen die entsprechenden EIC-Spuren bei der Größenausschlussfiltration eine erheblich schlechtere Peakform. Auch die generelle Restkontamination der aufgereinigten Probe ist bei der Filtrationsmethode deutlich höher (vgl. Abb. 91B, RT: 10-20 min).

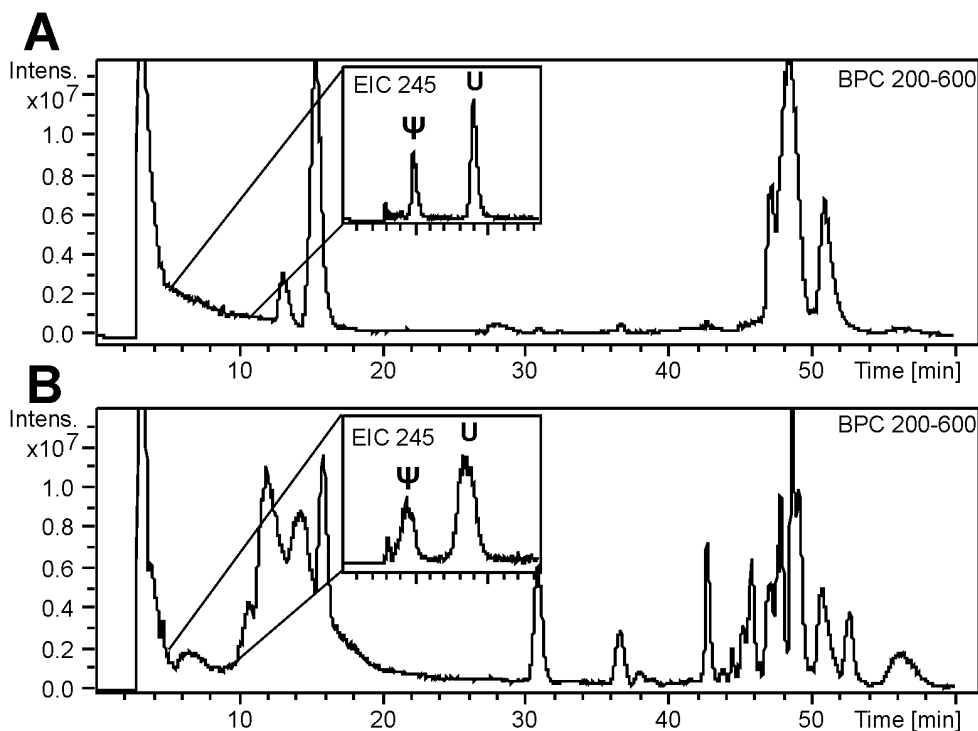


Abbildung 91: Vergleich der BPCs m/z 200-600 sowie der EICs $m/$ 245 (U und ψ) bei verschiedenen Fällungsmethoden zur Aufarbeitung von 1 ml Plasma. A: Fällung mit 1 ml eiskaltem ACN, B: Proteinabtrennung über Größenausschlussfiltration (Membran Cut-Off: 30000 Da).

Als geeignete Methode für die Probenvorbereitung wurde folglich die Proteinfällung mittels ACN gewählt, da diese eine ausreichende Aufreinigung aufweist, die Standzeit der aufgetauten Plasmaproben im Vergleich zur Größenausschlussfiltration stark minimiert sowie die an enzymatischen Veränderungen beteiligten Enzyme durch Fällung direkt inaktiviert.

Bei den anschließenden Probenaufbereitungen wurde das Volumen des aufgearbeiteten Plasmas auf 5 ml erhöht. Die höheren absoluten Konzentrationen der extrahierten Metaboliten ermöglichten so eine bessere Auswertung. Die Affinitätschromatographie erfolgte gemäß 5.2.5.3. Für die LC-MS-Messung kam LC-MS-Methode 5 (vgl. 5.3.3.6) zum Einsatz.

3.3.4 Semiquantitative Auswertung des Metabolitenmusters

Mit der optimierten Methode konnten insgesamt 30 Nucleoside und ribosylierte Metaboliten im Plasma detektiert werden. Nach der Identifizierung der enthaltenen Strukturen erfolgte eine semiquantitative Auswertung des Metabolitenmusters. Die integrierten Peakflächen der einzelnen Stoffwechselprodukte wurden auf die Peakfläche des internen Standards bezogen und verglichen (vgl. Tab. 17).

Tabelle 17: Vergleich des Metabolitenmusters im Blutplasma von gesunden Kontrollprobandinnen und Mammakarzinompatientinnen, Flächenquotient = Peakfläche (Summe $[MH]^+$, $[MNa]^+$, $[MK]^+$ Analyt) / Peakfläche [Summe $[MH]^+$, $[MNa]^+$, $[MK]^+$ interner Standard Isoguanosin), 1000: Faktor. Geordnet nach steigender Retentionszeit.

Nr.	Metabolit	Kontrolle (n = 10)	MammaCA (n = 10)
		Flächenquotient*1000 Mittelwert \pm SD (RSD [%])	Flächenquotient*1000 Mittelwert \pm SD (RSD [%])
1	IAA-R	95.7 \pm 108.4 (113.3)	131.6 \pm 86.5 (65.8))
2	DHU	709.9 \pm 131.0 (18.5)	738.2 \pm 175.7 (23.8)
3	NA-R	42.9 \pm 13.0 (30.2)	43.1 \pm 19.8 (45.9)
4	Ψ	1249.8 \pm 155.8 (12.5)	1394.8 \pm 328.4 (23.6)
5	SAM	125.1 \pm 107.6 (86.0)	194.0 \pm 135.8 (70.0)
6	C	194.3 \pm 57.4 (29.5)	185.8 \pm 112.1 (60.3)
7	acp ³ U	30.6 \pm 3.8 (12.6)	37.5 \pm 10.6 (28.2)
8	P-2	126.6 \pm 85.8 (67.8)	117.2 \pm 80.4 (68.6)
9	ncm ⁵ U	29.8 \pm 6.9 (23.2)	34.7 \pm 8.3 (24.0)
10	U	1608,3 \pm 419.5 (26.1)	1943.4 \pm 535.3 (27.6)
11	m ³ C	238.3 \pm 53.3 (22.4)	178.4 \pm 63.8 (35.8)
12	AICA Ribosid	71.8 \pm 47.9 (66.7)	17.3 \pm 8.5 (49.3)
13	m ¹ A	2830.6 \pm 344.3 (12.6)	2483.2 \pm 745.9 (30.0)
14	2,5-PCNR	113.2 \pm 88.0 (77.8)	151.3 \pm 84.4 (55.8)
15	I	84.4 \pm 40.4 (47.9)	614.36 \pm 1087.9 (177.1)
16	m ⁵ U	182.3 \pm 35.6 (19.5)	155.3 \pm 39.0 (25.1)
17	3,4-PCNR	658.9 \pm 125.0 (19.0)	450.7 \pm 259.4 (57.6)
18	m ³ U	22.6 \pm 5.8 (25.7)	24.9 \pm 6.7 (27.0)
19	N ⁶ -SAR	28.1 \pm 6.4 (22.6)	37.9 \pm 13.2 (34.9)
20	X	30.0 \pm 4.2 (13.9)	30.2 \pm 8.6 (28.5)
21	m ¹ I	727.5 \pm 83.0 (11.4)	813.2 \pm 216.7 (26.7)
22	m ¹ G	412.4 \pm 55.3 (13.4)	377.4 \pm 115.1 (30.5)
23	ac ⁴ C	716.1 \pm 242.9 (33.9)	722.0 \pm 177.8 (24.6)
24	m ² G	49.7 \pm 19.8 (39.9)	44.6 \pm 21.7 (48.6)
25	m ^{2,2,7} G	76.3 \pm 29.4 (38.5)	80.2 \pm 29.7 (37.1)
26	m ² ₂ G	349.7 \pm 52.3 (15.0)	475.9 \pm 118.2 (24.8)
27	mcm ⁵ s ² U	99.1 \pm 16.9 (17.0)	108.2 \pm 38.4 (35.5)
28	m ⁶ A	18.9 \pm 8.4 (44.5)	24.2 \pm 15.7 (64.83)
29	t ⁶ A	68.3 \pm 5.7 (8.3)	85.3 \pm 24.5 (28.7)
30	MTA	78.6 \pm 15.2 (19.4)	70.9 \pm 37.8 (53.3)

Für die Auswertung wurden die EIC-Flächen der H^+ -, Na^+ - und K^+ - Addukte der LC-MS-Läufe aufsummiert. Signifikante Erhöhungen (Mittelwert Kontrollgruppe + 2σ) konnten bei den modifizierten Nucleosiden m^2_2G und t^6A detektiert werden. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Aussagen von *McEntire et al.* und *Mitchell et. al.*, die ebenfalls erhöhte Konzentrationen der genannten Metaboliten im Serum von Tumorpatienten berichteten^[112;254]. Die übrigen Metaboliten zeigten keine aussagekräftigen Unterschiede zwischen beiden Kollektiven. Auffällig waren in diesem Zusammenhang die teilweise sehr hohen Standardabweichungen der Metaboliten innerhalb einer Gruppe, was eine generelle Aussage zum beobachteten Exkretionsverhalten erschwert.

3.3.5 Quantifizierung von U und Ψ mittels Matrixsimulation

Der in dieser Arbeit generell angewandte semiquantitative Ansatz, also die Verwendung von normierten Peakflächenverhältnissen, ist für die Auswertung eines größeren Metabolitenmusters das Mittel der Wahl. Dies gilt insbesondere, weil für die meisten der identifizierten Strukturen keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, und eine reguläre Quantifizierung aller eingeschlossener Metaboliten so ohnehin nicht möglich wäre.

Um dennoch die Aspekte eine vollquantitative Auswertung untersuchen zu können, wurden aus dem Gesamtmetabolitenmuster zwei Zielstrukturen selektiert. Die gewählten Ribonucleoside U und Ψ waren in der Arbeitsgruppe als Standards vorhanden. Signifikant erhöhte Pseudouridin-Konzentrationen im Blut sind bei Krebserkrankungen in der Literatur mehrfach beschrieben^[256;257] und folglich bereits in den Fokus potentieller Tumormarker gerückt. Das modifizierte Nucleosid Ψ wird enzymatisch über Pseudouridinsynthasen aus spezifischen Uridinresten im RNA-Makromolekül gebildet^[258;259]. Die bei Tumorerkrankungen gefundenen, erhöhten Ψ -Konzentrationen müssten sich demnach auch im Verhältnis der beiden Ribonucleoside zueinander widerspiegeln. Die genannten Fragestellungen sollten mit der quantitativen Auswertung im Blutplasma untersucht werden.

Die Quantifizierung endogener Verbindungen ergibt grundsätzlich das Problem, dass keine analytfreie Matrix zur Verfügung steht. Da Matrix-induzierte Ionen-

suppression bei der massenspektrometrischen Detektion jedoch erheblichen Einfluss auf das Messergebnis nehmen kann, müssen diese Effekte bei der quantitativen Auswertung berücksichtigt werden^[260]. Die Messung der Kalibrierstandards sollte demnach unter möglichst analogen Bedingungen wie die der Proben erfolgen. Unter den gegebenen Bedingungen waren prinzipiell zwei Ansätze denkbar. Zum einen das Spiken einer Plasmaprobe oder gepoolten Plasmas mit einer Lösung bekannten Gehaltes von U und Ψ , zum anderen die Herstellung einer analytfreien Matrix (Matrixsimulation). Bei ersterem kann über die Differenz zwischen der nativen Nucleosidkonzentrationen als Basiswert und der bekannten, zugespikten Konzentration die Kalibrierfunktion errechnet werden. Bei der Verwendung einer analytfreien Matrix kann nach dem Zuspiken der entsprechenden Kalibrierstandards eine direkte Auswertung erfolgen. In der durchgeführten Arbeit wurde die Methode der Matrixsimulation gewählt. Für die Herstellung der analytfreien Matrix wurde die allgemein zur Isolierung von Nucleosiden in biologischen Flüssigkeiten eingesetzte Affinitätschromatographie in der umgekehrten Funktionsweise verwendet. Die Bindung von cis-diol-Strukturen am Boronatgel diente demnach nicht zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Nucleoside, sondern zur deren selektiven Entfernung aus der Plasmamatrix.

3.3.5.1 Herstellung einer Nucleosid-freien Plasmamatrix

Die Herstellung der Nucleosid-freien Matrix erfolgte analog der Affinitätschromatographie-Methode unter 5.2.5.3. Nach dem Auftauen und der Durchmischung am Vortexer wurde der pH-Wert des gepoolten Plasmas zunächst mit einer wässrigen 2,5%igen Ammoniaklösung auf 8,8 eingestellt. Da die im Plasma enthaltenen Nucleoside im Basischen an das Boronatgel binden, konnte das bei der Probenaufgabe durch die Säule geflossene Plasma als Nucleosid-freie Matrix aufgefangen werden. Das Säulenmaterial wurde anschließend über die Durchführung des kompletten Fließmittelschemas von den gebundenen Nucleosidkomponenten befreit und so für die Aufreinigung der nächsten 5 ml Plasma regeneriert. Das erhaltene Blankplasma wurde mit einer 0,1 M Salzsäurelösung wieder auf den ursprünglichen pH-Wert gebracht und bis zur Weiter-

verwendung bei -20°C eingefroren. Die Reinigungswirkung des Affinitätsgels mit kompletter Entfernung von U und Ψ ist in Abb. 92A dargestellt. Das erhaltene Blankplasma konnte somit zur Matrixsimulation bei den Standards (vgl. Abb. 92B) eingesetzt werden.

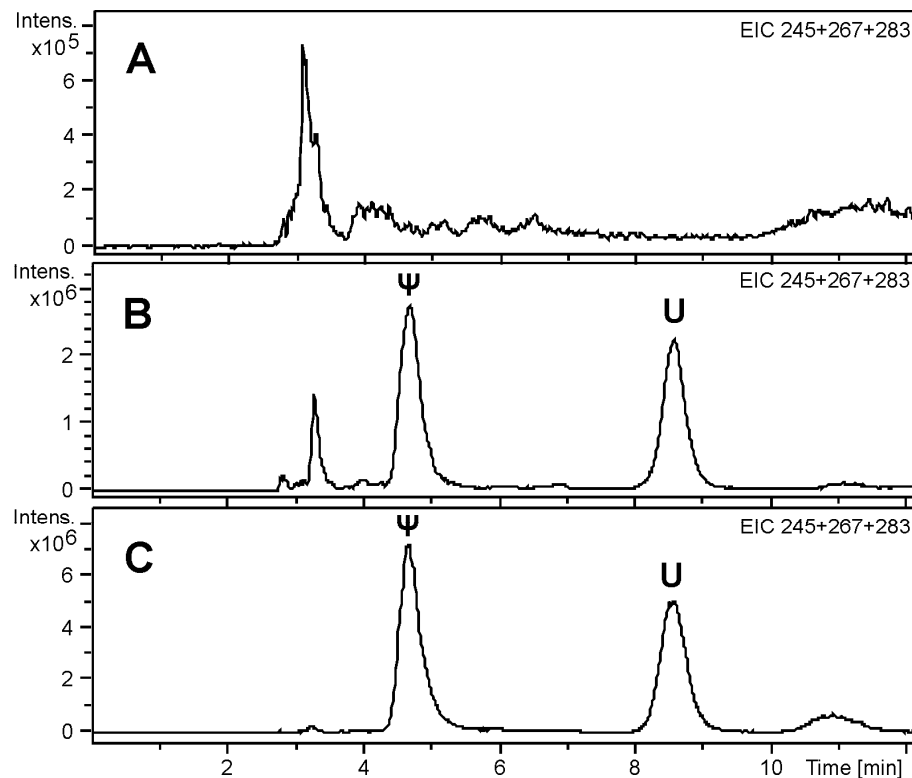


Abbildung 92: EICs von U und Ψ (Summe aus H^+ -, Na^+ - und K^+ -Addukten). A: Nucleosid-freies Blankplasma, B: gespicktes Blankplasma ($c = 300 \text{ ng/ml}$ für U und ψ), C: Probe einer Brustkrebspatientin (5 ml Plasma).

3.3.5.2 Herstellung von Kalibrierstandards und Qualitätskontrollen

Für die Herstellung geeigneter Kalibrierstandards und Qualitätskontrollen wurde eine Stammlösung von U und Ψ (je $250 \mu\text{g/ml}$) nach dem unter 5.2.5.4 aufgeführten Schema verdünnt. Von den Arbeitslösungen wurden anschließend jeweils $250 \mu\text{l}$ mit $4,75 \text{ ml}$ der Nucleosid-freien Matrix versetzt, und die erhaltenen Lösungen analog zu den Patienten- und Probandenproben über Affinitätschromatographie (vgl. 5.2.5.3) aufgereinigt. Abhängig von den jeweiligen Konzentrationen von U und Ψ in den Plasmaproben der Studienteilnehmer, wurden aus den aufgearbeiteten Standards geeignete Konzentrationswerte für die Erstellung der Eichgerade und der QCs definiert (vgl. Tab. 18/19).

Tabelle 18: Kalibrierstandards für die Bestimmung von U und Ψ mit Matrixsimulation.

Standard	U in [ng/ml]	Ψ in [ng/ml]
1	400	400
2	600	600
3	800	800
4	1000	1000
5	1800	1400
R^2	0.9999	0.9970
Steigung	0.1783	0.1782
Achsenabschnitt	18.528	30.618

Tabelle 19: Qualitätskontrollproben für die Bestimmung von U und Ψ mit Matrixsimulation.

QCs	U_{Einwaage} [ng/ml]	U_{Messwert} [ng/ml]	Abw. [%]	Ψ_{Einwaage} [ng/ml]	Ψ_{Messwert} [ng/ml]	Abw. [%]
QC ₁	500.0	479.9	-4.03	500.0	496.7	-0.66
QC ₂	900.0	876.2	-2.65	700.0	664.9	-5.01
QC ₃	1400.0	1410.4	0.74	900.0	839.1	-6.77

Die Quantifizierung von U und Ψ in den Plasmaproben von Mammakarzinompatientinnen und gesunden Kontrollprobandinnen ergab die in Tab. 20 aufgeführten Werte. Für U wurden gemittelte Konzentrationen von 840 ng/ml (gesunde Kontrollprobandinnen) und 997 ng/ml (Patientinnen) ermittelt. Bei Ψ ergaben sich im Fall der Tumorpasientinnen leicht, jedoch nicht signifikant erhöhte Mittelwert-Konzentrationen von 621 ng/ml (SD: 173 ng/ml) im Vergleich zu 548 ng/ml (SD: 82 ng/ml) bei den gesunden Kontrollprobandinnen (vgl. Abb. 93). Die erhaltenen Werte stimmen sehr gut mit den Literaturwerten zur Konzentration von U und Ψ in Serum überein^[249]. Diese liegen im Mittel bei etwa 980 ng/ml U und 660 ng/ml Ψ . Eine signifikante, tumorassoziierte Erhöhung der Ψ -Konzentration, wie in mehreren Arbeiten berichtet, konnte nicht beobachtet werden. Auch das gebildete Verhältnis U / Ψ (Mittelwerte: Tumorpasientinnen (1.680), gesunde Kontrollgruppe (1,558)) ergab keine signifikante Alteration bei den analysierten Plasmaproben der Mammakarzinompatientinnen.

Tabelle 20: Quantitative Auswertung von U und Ψ in den Plasmaproben von Mammakarzinompatientinnen und gesunden Kontrollprobandinnen.

Mammakarzinompatientinnen										
Nr.	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
T-Klasse	T3	T2	T1	T1	T1	T2	T1	T1	T1	T1
U [ng/ml]	580,9	929,2	1136,2	1081,6	562,2	1352,2	964,4	950,3	1469,4	938,8
Ψ [ng/ml]	626,7	491,5	663,5	527,1	588,9	669,8	423,6	1042,9	683,4	492,7
U / Ψ	0,927	1,890	1,712	2,052	0,955	2,019	2,277	0,911	2,150	1,905

Gesunde Kontrollprobandinnen										
Nr.	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
U [ng/ml]	1225.1	801.8	907.6	863.2	887.4	1177.3	795.9	729.9	448.2	563.8
Ψ [ng/ml]	654.5	580.0	459.3	455.8	520.7	598.9	476.6	559.2	686.9	487.5
U / Ψ	1.872	1.382	1.976	1.894	1.704	1.966	1.670	1.305	0.652	1.157

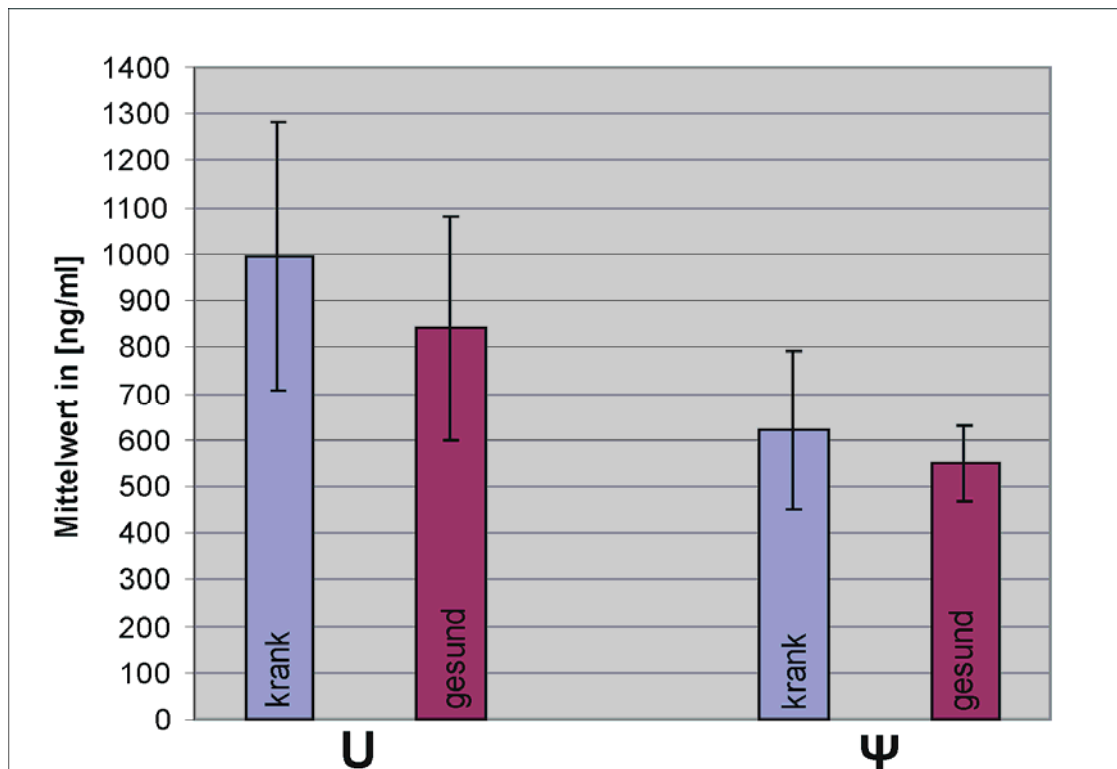


Abbildung 93: Graphische Darstellung der gemessenen Mittelwertkonzentrationen [ng/ml] von U und Ψ mit Standardabweichung im Plasma von Mammakarzinompatientinnen (n = 10) und gesunden Kontrollprobandinnen (n = 10).

3.4 Analytik von modifizierten Nucleosiden in Brustkrebsgewebe

3.4.1 Bisherige Arbeiten

In der vorliegenden Arbeit sollten die Konzentrationsverhältnisse verschiedener Ribonucleoside in Brustkrebsgewebe bestimmt und mit denen aus gesundem Brustnetzgewebe verglichen werden.

Die Extraktion von Ribonucleosiden aus Gewebeproben erfordert eine mehrstufige Aufreinigungsprozedur. *Khym* veröffentlichte 1975 eine Methode zur Extraktion von Nucleotiden aus Zellextrakten mittels Perchlorsäure bzw. Trichloressigsäure^[261]. Die überschüssige Säure wird anschließend mit einem wasserunlöslichen Amin (Trioctylamin), gelöst in einem wasserunlöslichen Lösungsmittel (1,1,2-Trichlorotrifluoroethan), entfernt. Der Vorteil dieser Methode ist die Extraktion der Säure statt deren Neutralisierung mit Kaliumhydroxid^[262]. Dies ist insbesondere für eine nachfolgende massenspektrometrische Detektion geeignet, da so eine übermäßige Kontamination des Massenspektrometers mit Kaliumsalzen verhindert werden kann. Die entwickelte Aufreinigungsprozedur führt zu einer quantitativen Extraktion von Nucleotiden, sowie Nucleosiden und Purin-/ Pyrimidinbasen im wässrigen Teil des gebildeten Zweiphasensystems.

Koshida et al. nutzten die *Khym*-Methode mit Trichloressigsäure zur Untersuchung der Ribonucleoside U und Ψ in humanem Nierengewebe^[263]. Nach chirurgischer Entfernung von fünf tumorbefallenen Nieren, wurden diese in gesundes und krankes Gewebe unterteilt, die Ribonucleoside extrahiert und anschließend mittels HPLC-UV analysiert. Interessanterweise fanden sich im gesunden Nierengewebe, verglichen mit dem Tumorgewebe, stark erhöhte Konzentrationswerte für Ψ (ca. 7-fach). Auch die Uridinmessungen ergaben bis zu 10-fach erhöhte Konzentrationen im gesunden Teil der Nieren, allerdings mit großen Schwankungsbreiten bei den einzelnen untersuchten Nieren und den daraus aufgearbeiteten Gewebeabschnitten.

3.4.2 Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung

Ausgehend von den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Arbeiten wurde eine Aufreinigungsmethode für die Analytik von Ribonucleosiden in Brustgewebe entwickelt. Hierzu wurden zunächst die von Khym beschriebenen Ansätze mit Zusatz von Trichloressigsäure bzw. Perchlorsäure zur Proteinpräzipitation getestet. Die eingesetzten Gewebeproben wurden freundlicherweise von Prof. Harald Seeger aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen zur Verfügung gestellt.

Im ersten Ansatz wurden 127,0 mg Tumorgewebe einer Brustkrebspatientin mit 2 ml 0,3 M Trichloressigsäure (TCA) sowie 50 µl internen Standard (0,25 mM in bidest. Wasser) versetzt und das erhaltene Gemisch homogenisiert. Im zweiten Ansatz erfolgte die analoge Aufarbeitung von 102,5 mg des gleichen Gewebes unter Verwendung von 2 ml 0,4 M Perchlorsäure (HClO₄).

Beide Ansätze wurde anschließend bei 2500 g und 4°C für 30 min zentrifugiert, der erhaltene klare Überstand abdekantiert und mit der gleichen Menge einer frisch angesetzten Lösung aus Trioctylamin und 1,1,2-Trichlorotrifluoroethan 1:2 (v/v) versetzt. Die erhaltene Lösung wurde am Vortexer durchmischt und anschließend bei 1000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hatte sich ein Zweiphasensystem gebildet, von welchem die obere wässrige Schicht im TCA-Ansatz gut mit einer Pipette abgetrennt werden konnte. Beim Ansatz mit HClO₄ wurde eine deutlich schlechtere Phasentrennung beobachtet. Für die nachfolgenden Probenaufarbeitungen zur semiquantitativen Auswertung wurde deshalb grundsätzlich TCA eingesetzt. Die Ribonucleosidfraktion in den erhaltenen wässrigen Gewebeextrakten wurde anschließend über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierzu wurden 2,5 ml Gewebeextrakt mit 7,5 ml 0,25M NH₄Ac-Lösung (pH 8,8) versetzt und nach 5.2.6.3 extrahiert. Die einrotierten Eluate wurden in 0,5 ml Ammoniumformiatpuffer (pH 5, 5 mM) aufgenommen und 10 µl der erhaltenen Lösung in das LC-MS-System eingespritzt. Zunächst erfolgten Auto-LC-MS³-Messungen (LC-MS-Methode 4, vgl. 5.3.3.5) zur Identifizierung der detektierten Metaboliten über Fragmentierungsmuster und Retentionszeit.

Für einen semiquantitativen Vergleich der Nucleosidkonzentrationen stand eine, in kanzeröses (249,0 mg) und gesundes Gewebe (374,2 mg) separierte Gewebeprobe einer Brustkrebspatientin zur Verfügung. Diese wurden mit Affinitätschromatographie aufgearbeitet (vgl. 5.2.6.3) und mit LC-MS-Methode 5 (vgl. 5.3.3.6) analysiert.

3.4.3 Auswertung des Metabolitenmusters

Mit den durchgeführten Auto-LC-MS³-Messungen konnten insgesamt zwölf Ribonucleosidkomponenten über Retentionszeit und Fragmentierungsmuster identifiziert werden (vgl. Abb. 94). Daneben wurden in den entsprechenden EICs die Metaboliten DHU, Ψ , ac⁴C, m³C, 2,5-PCNR und SAH nachgewiesen, die aufgrund zu geringer Konzentrationen oder Elution an der Segmentgrenze (vgl. 3.1.4.1) von der MS³-Fragmentierungsfunktion ausgeschlossen wurden.

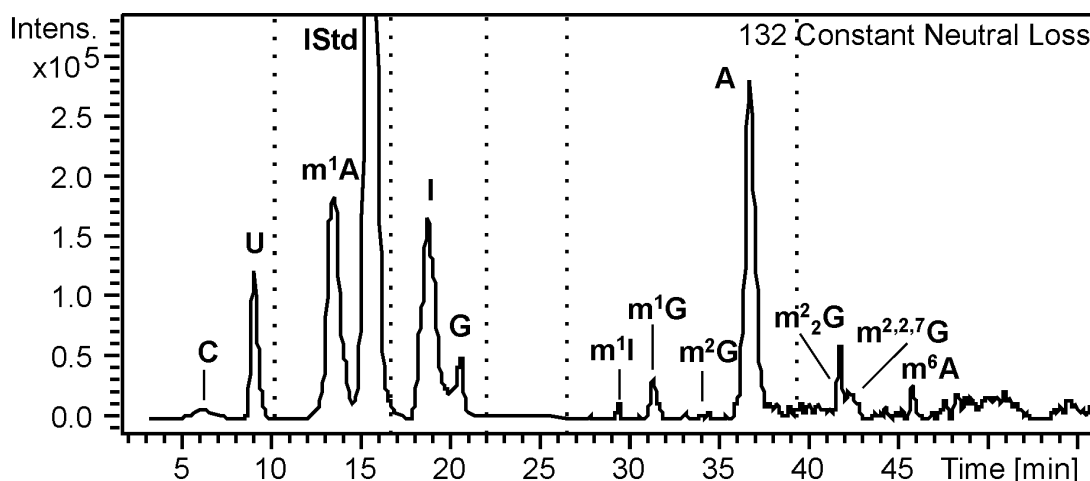


Abbildung 94: Auto-LC-MS³-Messungen der Gewebeprobe (127 mg) einer Brustkrebspatientin, aufgearbeitet mit der TCA-Methode.

Nach erfolgter Identifizierung der einzelnen Komponenten erfolgte die semiquantitative Auswertung des Metabolitenmusters in kanzerösem und gesundem Gewebe. Die integrierten EIC-Peakflächen (Summe aus H⁺, Na⁺ und K⁺) der einzelnen Stoffwechselprodukte wurden auf die Peakfläche des zugesetzten internen Standards sowie die eingesetzte Gewebemenge bezogen und anschließend verglichen. Es ergaben sich die in Tab. 21 aufgeführte, normierten Werte.

Tabelle 21: Vergleich des Metabolitenmusters in gesundem und kanzerösem Brustgewebe. Flächenquotient = Peakfläche (Summe $[MH]^+$, $[MNa]^+$, $[MK]^+$ Analyt) / Peakfläche (Summe $[MH]^+$, $[MNa]^+$, $[MK]^+$ interner Standard Isoguanosin), 100000: Faktor. Geordnet nach steigender Retentionszeit.

Nr.	Metabolit	Brustnetzgewebe (Flächenquotient / 374.2 mg)*100000	Tumorgewebe (Flächenquotient / 249.0 mg)*100000
1	IAA-R	0.95	n.d.
2	DHU	1.53	0.53
3	NA-R	0.38	n.d.
4	P-1	8.87	n.d.
5	Ψ	8.27	2.83
6	C	3.19	4.32
7	P-2	0.81	n.d.
8	U	164.06	120.88
9	m^3C	5.26	1.46
10	AICA Ribosid	2.63	n.d.
11	m^1A	43.60	17.79
12	2,5-PCNR	0.81	n.d.
13	I	216.67	210.57
14	G	95.31	55.54
15	3,4-PCNR	30.95	12.12
16	SAH	11.31	3.75
17	m^1I	10.46	2.50
18	m^1G	9.31	3.24
19	ac^4C	1.74	0.46
20	m^2G	1.78	0.88
21	MTA-SO	3.88	n.d.
22	A	12.99	5.44
23	$m^{2,2,7}G$	3.00	0.72
24	m^2_2G	8.57	2.65
25	m^6A	0.48	n.d.
26	t^6A	0.57	n.d.

Mittels LC-MS-Messungen konnten bei der semiquantitativen Auswertung insgesamt 26 Metaboliten im gesunden Gewebe und 17 Metaboliten im Tumorgewebe nachgewiesen und ausgewertet werden. Die erhaltenen Werte zeigten grundsätzlich erhöhte relative Konzentrationen der identifizierten Komponenten im gesunden Teil des Gewebeschnittes, auch bei den üblicherweise in Tumorzellen verstärkt gebildeten modifizierten Nucleosiden. Die von *Koshida et al.* publizierten, im Vergleich zum Nieren-Tumorgewebe stark erhöhten Konzentrationen von U und Ψ im gesunden Teil der Niere konnten für die untersuchten

Brustgewebeschnitte bestätigt werden. Generell ist der direkte Vergleich zwischen kanzerösem und gesundem Gewebe fehlerbehaftet, da die Schnitte grundsätzlich nicht so durchgeführt werden können, dass reines Gewebematerial einer Klasse erhalten wird. Die großen Schwankungsbreiten in verschiedenen Bereichen der in der Koshida-Publikation untersuchten Nieren untermauern diese These. Gesunde und neoplastische Gewebe weisen allgemeine deutliche Unterschiede bei den drei Grundstrukturen (vaskulär, interstitiell und zellulär) auf. Das Tumorgewebe ist u.a. durch große Zellzwischenräume, hohe Kollagenkonzentrationen, geringe Proteoglykan- und Hyaluronatkonzentrationen, erhöhte interstitielle Durchflussraten und -drücke, Abwesenheit gut differenzierter Lymphsysteme, hohe Diffusionskoeffizienten für Makromoleküle und hohe Konvektionsraten gekennzeichnet^[264]. Insbesondere das interstitielle Element kann einen erheblichen Einfluss auf den Transport (Diffusion, Konvektion) der Metaboliten nehmen. Bei Tumoren wurden in diesem Zusammenhang über deutlich geringere interstitielle Widerstände berichtet, die generell auf eine gesteigerte Stoffanreicherung von z.B. Medikamenten im Gewebe schließen lassen^[265]. Ein weiterer Aspekt, den es zu beachten gilt, ist die unterschiedliche Blutversorgung. Während die Blutgefäße im gesunden Gewebe von einer intakten Basalmembran umgeben sind, zeigt diese bei Tumoren deutliche Beschädigungen oder fehlt gänzlich^[266]. Ferner ist die Blutflussrate bei soliden Tumoren im Allgemeinen geringer als im zugehörigen gesunden Gewebeteil^[267]. Die genannten Aspekte könnten sich auch auf die Anreicherung bzw. den Abtransport endogener Metaboliten wie Nucleoside im Gewebe auswirken, können jedoch nach jetzigem Kenntnisstand nicht verlässlich interpretiert werden.

Für einen statistisch aussagekräftigeren Vergleich und eine finale Beurteilung des Metabolitenmusters im Gewebe muss in weiteren Arbeiten eine größere Probenanzahl verschiedener Gewebeabschnitte untersucht werden. Auch die eingesetzte Probenmenge sollte in den folgenden Versuchsansätzen erhöht werden, um höhere Konzentrationen und damit eine verlässlichere Auswertung zu gewährleisten. Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit eine geeignete Methode zur Isolierung der entsprechenden Metaboliten etabliert.

3.5 Klinische Studie AKP-23: Musterbestimmung ribosylierter Metaboliten im Spontanurin von Mammakarzinompatientinnen

3.5.1 Studienziel

Basierend auf der durchgeführten Identifizierung bislang unbekannter ribosylierter Stoffwechselprodukte aus 24-h-Urin und den Erkenntnissen aus der Zellkulturanalytik sollte zunächst ein erweitertes Set an aussagekräftigen Metaboliten definiert werden. Hierzu wurden zwei Kriterien erhoben, die für einen Einschluss der jeweiligen Komponente erfüllt sein mussten. Zum einen waren analytisch-relevante Kriterien wie Linearität und Reproduzierbarkeit zu überprüfen, zum anderen musste der biologische und biochemische Ursprung der jeweiligen Komponente einen für die Tumorerkrankung relevanten Hintergrund aufweisen. Nach Erstellung eines Metabolitensets sollte dieses auf seine Aussagekraft bei der Klassifizierung von Mammakarzinompatientinnen (n = 85) im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (n = 85) untersucht werden. Für die Auswertung sollten bioinformatische Auswerteverfahren zum Einsatz kommen.

3.5.2 Studienplanung und Durchführung

Für die Studien wurden definierte Parameter in Form eines Prüfplans formuliert. Die Rekrutierung der Mammakarzinompatientinnen wurde in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen im Zeitraum von November 2006 bis Februar 2007 durchgeführt. Die Patientinnen gaben präoperativ spontanen Mittelstrahlurin ab, der bis zur Aufarbeitung bei -20°C tief gefroren wurde. Zusätzlich wurden aus den Beständen einer früheren Studie freundlicherweise 25 Rückstellproben von Prof. Harald Seeger für die Aufarbeitung zur Verfügung gestellt (Lagerung bei -20°C). Die Proben der Kontrollgruppe wurden in der Praxis von Dr. Karl-Heinz Friese (Weil der Stadt) gesammelt. Die Probandinnen gaben spontanen Mittelstrahlurin ab, der zunächst für 24 h bei -4°C, dann bis zur Aufarbeitung bei -20°C tief gefroren wurde. Die Probenrekrutierung und -aufarbeitung erfolgte in Kooperation mit Frau cand. med. Natascha Friese (Dissertation in der Abteilung Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Tübingen).

Tabelle 22: Ein- und Ausschlusskriterien des Prüfplans (Mammakarzinompatientinnen).**Mammakarzinompatientinnen**

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Weibliches Geschlecht ▪ Gesicherte Diagnose einer primären, nicht vorbehandelte Mammakarzinom-Erkrankung ▪ Präoperativer Zustand ▪ Alter: 25-80 Jahre ▪ Unterschriebene Einverständniserklärung 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tumorspezifische Vorbehandlung (Chemotherapie, Hormontherapie, Bestrahlungstherapie) ▪ Postoperativer Zustand ▪ Alter: < 25 Jahre ; > 80 Jahre ▪ Tumor-Rezidiv ▪ Schwangerschaft ▪ Bestehende Autoimmunerkrankung ▪ Bestehende HIV-Infektion ▪ Bestehende akute oder chronische Hepatitis ▪ Bestehende Niereninsuffizienz ▪ Teilnahme an einer Arzneimittelstudie in den letzten drei Monaten vor der geplanten Studienteilnahme ▪ Arzneimittelleinnahme von immunmodulierenden Arzneimitteln, Mistelpräparaten, Antibiotika, Virustatika, Allopurinol oder Dipyridamol im Zeitraum von vier Wochen vor der geplanten Studienteilnahme

Tabelle 23: Ein- und Ausschlusskriterien des Prüfplans (Kontrollprobandinnen).**Kontrollprobandinnen**

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alter: 25-80 Jahre ▪ Weibliches Geschlecht ▪ Unterschriebene Einverständniserklärung 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alter: < 25 Jahre ; > 80 Jahre ▪ Schwangerschaft ▪ Bestehende relevante Erkrankungen (Autoimmunerkrankung, HIV-Infektion, akute oder chronische Hepatitis, Niereninsuffizienz) ▪ Maligne Tumorerkrankung seit Geburt ▪ Teilnahme an einer Arzneimittelstudie in den letzten drei Monaten vor der geplanten Studienteilnahme ▪ Arzneimittelleinnahme von immunmodulierenden Arzneimitteln, Mistelpräparaten, Antibiotika, Virustatika, Allopurinol oder Dipyridamol im Zeitraum von vier Wochen vor der geplanten Studienteilnahme

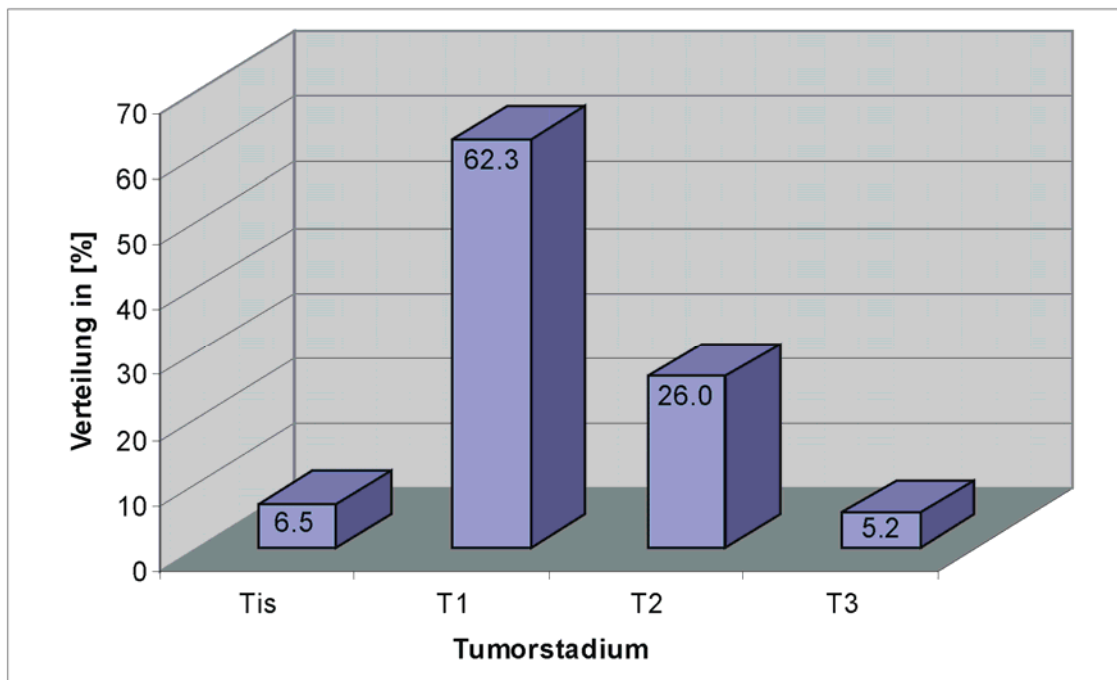


Abbildung 95: Prozentuale Verteilung der Tumorstadien im rekrutierten Patientenkollektiv.

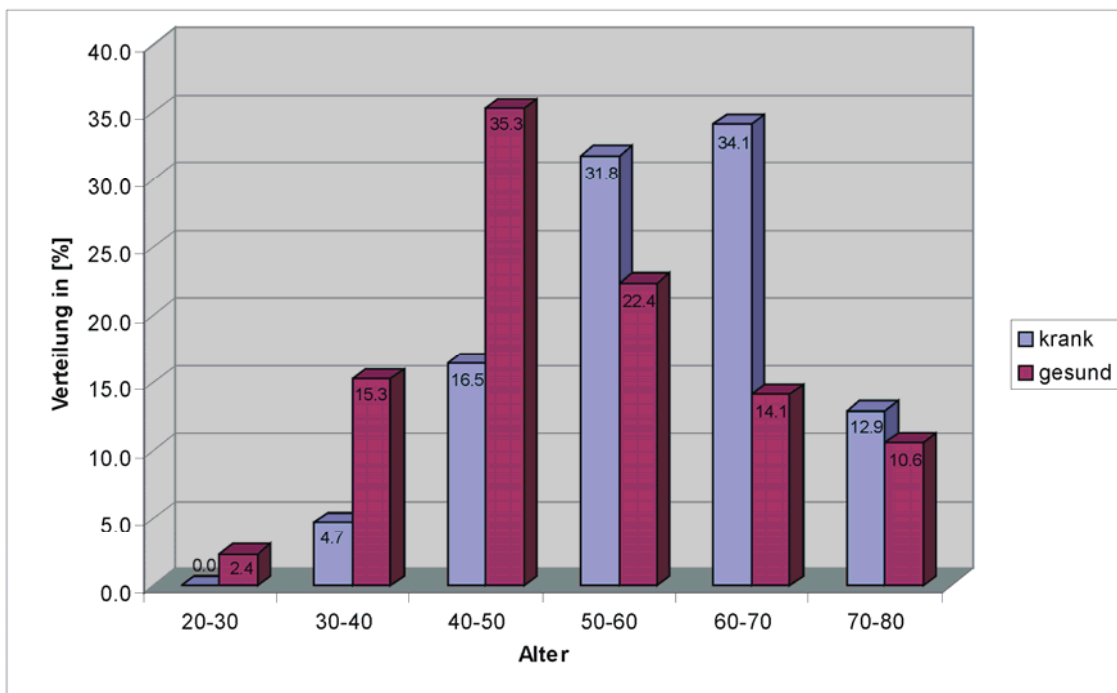


Abbildung 96: Prozentuale Altersverteilung im rekrutierten Patienten- und Probandenkollektiv.

3.5.3 Methodenentwicklung zur Probenaufbereitung

Die Aufarbeitungsmethode für die Spontanurinproben musste zunächst an veränderte Grundparameter angepasst werden. Die generellen Auswirkungen des neuen Affinitätsgels mit modifizierten Partikeln wurden bereits unter 3.1.3.1 beschrieben. Die sukzessive Erweiterung des Metabolitensets durch die Identifizierung bislang unbekannter Komponenten erforderte eine generelle Anpassung der Probenaufarbeitung an verschiedenen Strukturklassen. Da bei vielen der in der Studie aufgearbeiteten Proben weit weniger als 10 ml Urin zur Verfügung stand, wurde das Probenvolumen auf 1 ml festgelegt.

Wie bereits unter 3.1.3.1 erwähnt, stellte sich der MeOH / H₂O-Waschschritt vor der eigentlichen Elution als kritischer Punkt bei der Aufreinigung von Nucleosiden und ribosylierten Komponenten heraus. Ausgehend von der optimierten Methode für die Aufreinigung von 20 ml Urin (vgl. 5.2.2.3) wurde dieser Schritt für eine möglichst quantitative Erfassung aller bekannten Analyten weiter optimiert. Hierzu wurden die in Tab. 24 aufgeführten Zusammensetzungen und Volumina für den Waschschritt getestet.

Tabelle 24: Optimierung des Waschschritts vor der Elution.

	% Peakfläche Eluat*			
	6 ml MeOH / H ₂ O, 1:9 (v/v)	6 ml MeOH / H ₂ O 0,5:9,5 (v/v)	6 ml MeOH / NH ₄ Ac (0,25 M pH 8,8); 2:8 (v/v)	4 ml MeOH / NH ₄ Ac (0,25 M pH 8,8); 0,5:9,5 (v/v)
IAA-R	6,9	3,3	---	---
ψ	1,0	0,7	0,2	---
273	6,7	1,0	0,8	---
m¹A	0,6	0,7	---	---
N⁶-SAR	65,5	30,0	8,0	1,9
m¹I	0,5	1,0	---	---
m¹G	0,5	1,1	---	---
m²₂G	0,4	0,7	---	---

* jeweils Mittelwert aus Doppelbestimmung

Die entsprechenden Lösungen wurden bei der Aufarbeitung von 1 ml Urin aufgefangen, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und schließlich in 0,5 ml Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5,0) gelöst. Um einen statistischen Wert für das Ausmaß einer unerwünschten Vorelution zu erhalten, wurden die integrierten Peakflächen ausgesuchter Metaboliten jeweils auf die des Metaboliten in der Elutionslösung bezogen und prozentual verglichen. Als geeignetes Mischungsverhältnis, welches noch eine ausreichende Waschwirkung der Probenaufgabe ohne vorzeitige Elution bestimmter Metaboliten zeigt, stellte sich eine Lösung aus MeOH / NH₄Ac (0,25 M, pH 8,8), 0,5:9,5 (v/v), 4 ml heraus. Lediglich die vorzeitige Elution des Metabolits N⁶-SAR konnte nicht komplett unterbunden werden.

Auch der zeitliche Ablauf der eigentlichen Elution wurde für die Methodenoptimierung untersucht. Hierzu wurde eine Urinprobe (1 ml) aufgearbeitet und der Elutionsvorgang auf insgesamt 150 ml Elutionslösung 0,2 N FA in MeOH / H₂O 2:8 (v/v), eingeteilt in sechs 25 ml-Schritte, erweitert. Die entsprechenden Lösungen wurden einzeln aufgefangen, einrotiert, in 0,5 ml Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5,0) gelöst und mit LC-MS analysiert (LC-MS-Methode 5, Kap. 5.3.3.6). Für die Auswertung des zeitlichen Elutionsverlaufs wurde Eluat 1 (0 – 25 ml) als Bezugsgröße gewählt. Die sich anschließenden Elutionsschritte (Eluat 2: 25 – 50 ml, Eluat 3: 50 – 75 ml usw.) wurden dann prozentual auf Eluat 1 bezogen. Es zeigte sich, dass bereits nach 25 ml der Elutionslösung (Eluat 1) ein Großteil der retardierten Metaboliten eluiert werden konnte. Dennoch fanden sich in Eluat 2 bei einigen Metaboliten (NA-R, DHU, ψ , ncm⁵U, m³C, m¹A, 2,5-PCNR, IsoG, I, 3,4-PCNR, m³U, m¹I, m¹G, ac⁴C, m²G, A, m²₂G und m^{2,2,7}G) noch beträchtliche Rückstände zwischen 5% und 16%. Die prozentualen Metabolitmengen im darauffolgenden Eluat 3 fielen unter 1%. Aus den gewonnenen Daten konnte demnach ein für die quantitative Elution ausreichendes Volumen von 50 ml definiert werden. Zur zusätzlichen Absicherung wurde die Elutionskraft durch Anheben des Methanolgehaltes von 20% auf 50% in der Elutionslösung (\rightarrow 0,2N FA in MeOH / H₂O 1:1 (v/v)) erhöht.

Demnach ergab sich für die Aufreinigung der Nucleoside aus 1 ml Urin die unter 5.2.3.3 aufgeführte, optimierte Methode. Zwischen zwei Aufarbeitungen wurden anstatt einer Urinprobe 10 ml der 0,25 M NH_4Ac -Lösung aufgegeben, um die Säule zu reinigen und mögliche Verschleppungen von Substanzen zu vermeiden.

Wie sich während der Testphase der einzelnen Fließmittelschemata herausstellte, kann es zu Verschleppungen in dem beim Einrotieren des Eluats verwendeten Glaskolben kommen (vgl. Abb. 97).

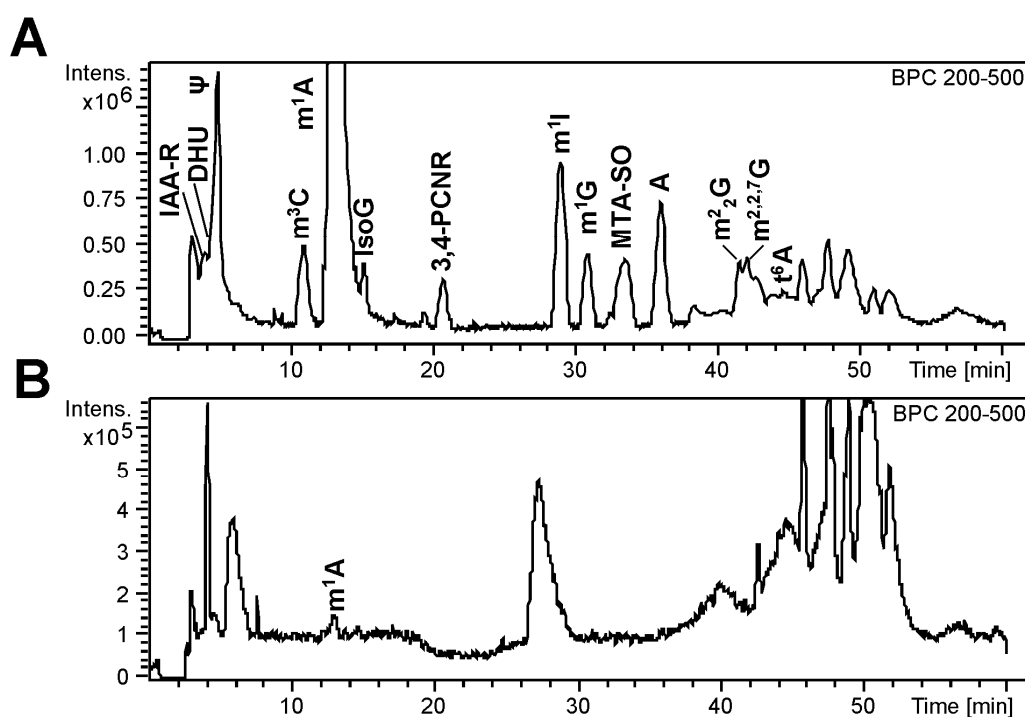


Abbildung 97: Metabolitenverschleppung beim Einrotieren. A: Reinigung des Kolbens mit Bürste und bidest. Wasser (~Raumtemp.), B: Reinigung mittels kochendem Wasser, Bürste und mehrfachem Ausspülen mit bidest. Wasser (nicht markierte Peaks: Verunreinigungen).

Zur Überprüfung der Auswirkung der Reinigungsprozedur wurde zunächst 1 ml Urin regulär aufgearbeitet, das Eluat im Glaskolben bis zur Trockene eingengt und der Kolben schließlich gereinigt. Hierzu kamen verschiedene Verfahren zum Einsatz. In Abb. 96A wurde der Kolben mit Bürste und bidest. Wasser (Raumtemperatur) gereinigt, anschließend mit 50 ml Elutionslösung (0,2 N FA in $\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$ 1:1 (v/v)) gefüllt und erneut am Rotationsverdampfer eingengt. Das Residuum wurde in 0,5 ml Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5,0) gelöst

und mit LC-MS analysiert. Man erkennt deutliche Verschleppungen bestimmter Metaboliten, welche teilweise erheblichen Einfluss auf die quantitative Auswertung haben können. So entsprechen die Peakflächen von DHU, ψ , m^1A , 3,4-PCNR, m^1I und A etwa 10-15% der korrespondierenden Peakfläche im eigentlichen Probeneluat. Über eine definierte Aufreinigungsprozedur konnten die Verschleppungseffekte komplett unterbunden werden. Hierzu wurde der Kolben mehrfach mit kochendem Wasser gespült und dabei mit einer Bürste gereinigt. Nach dem Ausspülen mit bidest. Wasser konnten in einem analog zur ersten Probe aufgearbeiteten Versuchsansatz keine Verschleppungen mehr detektiert werden (vgl. Abb. 96B). Das eingezeichnete m^1A als einziges detektierbares Nucleosid entspricht nur noch 0,1% der Peakfläche im Eluat und ist bei der quantitativen Auswertung vernachlässigbar.

3.5.4 LC-IT-MS-Messungen

Für die massenspektrometrische Auswertung des Metabolitenpatterns wurde ausgehend von der Optimierung für die LC-Auto-MS³-Messungen eine LC-MS-Methode ohne Fragmentierungsprozesse erstellt. Die unter 5.3.3.1 beschriebenen, für Standardnucleoside optimierten MS-Parameter konnten hierzu direkt in die neue Methode übernommen werden. Nach Deaktivierung der MS³-Fragmentierungsfunktion ergab sich somit eine Methode zur quantitativen Erfassung der in die Auswertung eingeschlossenen Metaboliten (LC-MS-Methode 5, Abschnitt 5.3.3.6).

3.5.5 Auswertung und Datengenerierung

Für die semiquantitative Bestimmung wurden aus den EICs die Peakflächen der einzelnen Metaboliten ermittelt. Hierbei wurden analog zu den Zellkulturüberständen (vgl. 3.2.5) die jeweiligen Natrium (Na^+)- und Kaliumaddukte (K^+) mit einbezogen. Die resultierenden Summen-EICs wurden mit einem Gauß-Algorithmus geglättet und anschließend manuell integriert. Für die analytische Normierung wurden diese jeweils auf die Peakfläche (H^+ , Na^+ , K^+) des internen Standards Isoguanosin sowie auf den Kreatininwert (mg/dl) der Probe bezogen.

Für die Ermittlung der semiquantitativen Verhältniswerte W ergab sich demnach folgender Zusammenhang:

$$W = \left(\frac{Area_{Analyt} (H^+ + Na^+ + K^+)}{(Area_{Std} (H^+ + Na^+ + K^+) \times Kreatinin [mg / dl])} \right) \times 1000 \quad (4)$$

Die Kreatinin-Verhältnissbildung ist eine Standardmethode für die Normierung der Ausscheidungsraten von Metaboliten im Urin^[268-270] und wird allgemein auch bei der quantitativen Analytik von Ribonucleosiden eingesetzt^[121;156;271;272]. Die Bildung und Exkretion von Kreatinin, einem Abbauprodukt von Kreatin und Kreatinphosphat im Muskelstoffwechsel, sind annähernd konstante physiologische Parameter. Über die Bestimmung des korrespondierenden Kreatininwertes im Urin kann der unterschiedliche Verdünnungsgrad (Wassergehalt) von Urinen normalisiert werden und eine aufwändige 24h-Urinsammlung durch Spontanurinproben ersetzt werden^[273]. Die Bestimmung der Kreatininwerte in den analysierten Urinproben erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen an einem Hitachi 917 Automatic Analyzer (Boehringer Mannheim). Der Kreatininwert wurde in je 500 μ l Urin nach einer modifizierten Jaffé-Methode bestimmt^[274]. Die Messung beruht auf der photometrischen Bestimmung eines Kreatinin-Pikrinsäurekomplexes im alkalischen pH-Bereich. Die Extinktion ist im linearen Bereich direkt proportional zur Kreatinin-Konzentration. Für die Bestimmung des Metabolitenmusters stand nach den Ergebnissen der Identifizierungsstudie das in Tab. 25 gelistete Set mit 51 größtenteils identifizierten Komponenten zu Verfügung. Einige der in Kap. 3.1.5 strukturell aufgeklärten Verbindungen konnten aufgrund zu geringer Konzentrationen in 1 ml Urin nicht in diese Studie eingeschlossen werden (z.B. I-8). Das generierte Metabolitenmuster wurde zunächst auf analytisch relevante Parameter wie Linearität und Reproduzierbarkeit geprüft.

3.5.6 Methodvalidierung

Viele der letztlich in die Studie eingeschlossenen Metaboliten konnten erst während der Methodenentwicklung in der parallel laufenden Sammelurinstudie (vgl. 3.1) entdeckt und identifiziert wurden. Für eine klassische analytische Methodvalidierung standen folglich weder die Referenzsubstanzen, noch die üblicherweise eingesetzten deuterierten Standards zur Verfügung. Ein weiteres Problem stellte die bei biologischen Flüssigkeiten wie Urin grundsätzlich in ihrer Zusammensetzung stark schwankende Matrix dar. Eine wie bei der Aufarbeitung der Plasmaproben (vgl. 3.3.5) durchgeführte Matrixsimulation zur Testung der Linearität war aufgrund der fehlenden Standards und der sehr viel höheren „Nucleosidkontamination“ im Urin nicht möglich.

3.5.6.1 Linearität

Für die Bestimmung der Linearität wurden zwei verschiedene Spontanurine gesammelt und diese jeweils in Arbeitslösungen zu 0,25 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml und 4 ml Urin aufgeteilt. Die jeweilige Menge Urin wurde mit 0,25 M NH_4Ac -Lösung (pH 8,8) auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt und anschließend mit 50 μl internen Standard (0,1 mM Isoguanosin in bidest. Wasser) versetzt. Die Mischung wurde 15 sec mit dem Vortexer durchmischt und anschließend nach der beschriebenen, optimierten Methode (vgl. 5.2.3.3) aufgearbeitet. Die Auswertung der einzelnen Metaboliten erfolgte über die Summe der jeweiligen H^+ -, Na^+ - und K^+ -EICs.

3.5.6.2 Reproduzierbarkeit

Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden 10 ml Spontanurin mit 500 μl internen Standard (0,1 mM Isoguanosin in bidest. Wasser) versetzt und am Vortexer gemischt. Die erhaltene Urinlösung wurde in 10 Aliquote á 1 ml aufgeteilt. Je ein Aliquot wurde mit 0,25 M NH_4Ac -Lösung (pH 8,8) auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt, 15 sec mit dem Vortexer durchmischt und anschließend nach 5.2.3.3 aufgearbeitet. Die Auswertung der einzelnen Metaboliten erfolgte über die Summe der jeweiligen H^+ -, Na^+ - und K^+ -EICs.

In Tab. 25 sind die Ergebnisse der Linearitäts- und Reproduzierbarkeitsprüfung aufgeführt. Für den Einschluss in die Bioinformatik wurden definierte Parameter festgelegt. Das Kriterium der Linearität wurde ab einem Regressionskoeffizienten von $R^2 \geq 0,95$ als erfüllt angesehen, die Reproduzierbarkeit ab einer relativen Standardabweichung (RSD) $\leq 15\%$. Insgesamt erfüllten zehn Verbindungen diese Bedingungen nicht und wurden folglich nicht für die weitere Auswertung berücksichtigt.

Die Komponenten Nr. 39, 43, 45 und 47 in Tab. 25 waren in den aufgearbeiteten Spontanurinen der Linearitätsprüfung nicht detektierbar. Aufgrund fehlender biochemischer Relevanz (vgl. 3.5.7) wurden diese jedoch ohnehin aus der Studie ausgeschlossen.

Tabelle 25: Ergebnisse der Linearitäts- und Reproduzierbarkeitsbestimmung, geordnet nach steigender Retentionszeit. Normale Schrift: Metaboliten die beide Validierungskriterien erfüllen, fett: Metaboliten die aufgrund fehlender Linearität und/oder Reproduzierbarkeit ausgeschlossen wurden. *Strukturvorschlag vgl. Kap. 3.1.5.6.

Nr.	[MH ⁺]	RT	Metabolit	R ²	RSD %
1	302	3,0	I-7	0,9875	7,4
2	259	4,0	IAA-R	0,9280	7,9
3	247	4,3	DHU	0,9855	6,0
4	245	4,5	Ψ	0,9889	3,3
5	255	4,6	NA-R	0,7555	28,6
6	212	5,0	P-1	0,9771	5,7
7	399	5,3	SAM	0,9358	13,7
8	273	6,0	1-Ribosyl-3-methyl-4-carboxymethyl-imidazolium*	0,8948	8,2
9	244	6,5	C	0,9815	12,0
10	346	7,0	acp ³ U	0,9957	3,5
11	302	7,0	ncm ⁵ U	0,9977	4,0
12	228	7,5	P-2	0,9932	2,1
13	245	8,5	U	0,9981	8,4
14	286	9,5	I-1	0,9963	7,2
15	258	9,5	m ³ C	0,9787	2,7
16	259	10,5	AlCA Ribosid	0,9942	6,0
17	282	12,0	m ¹ A	0,9949	3,1
18	271	14,0	2,5-PCNR	0,9903	3,7
19	300	16,5	I-2	0,9985	9,7
20	298	17,5	m ⁷ G	0,9727	10,2
21	269	18,0	I	0,9911	3,0
22	271	20,5	3,4-PCNR	0,9955	2,1
23	296	21,5	m ⁶ ₁ A	0,9959	2,9
24	259	23,5	m ³ U	0,9972	3,0
25	268	24,0	1-Ribopyranosyladenin	0,9822	6,7
26	384	24,5	N ⁶ -SAR	0,9568	11,3
27	285	25,0	X	0,9974	4,0
28	385	27,5	SAH	0,9926	4,4
29	314	28,0	I-3	0,9979	7,4
30	283	29,0	m ¹ I	0,9969	3,8
31	298	31,0	m ¹ G	0,9920	4,5
32	314	31,5	MTA-SO	0,9540	44,9
33	293	32,0	?	0,9918	14,9
34	286	32,5	ac ⁴ C	0,9934	7,6
35	298	33,5	m ² G	0,9979	8,2
36	268	34,0	A	0,9960	2,0
37	376	34,5	9-Ribosyl-6-aurinopurin*	0,9974	6,2
38	398	40,0	ms ² io ⁶ A	0,9983	4,5
39	299	40,5	1-Methylxanthosin*	---	19,1
40	326	41,0	m ^{2,2,7} G	0,9911	2,7
41	312	41,5	m ² ₂ G	0,9925	4,7
42	333	42,5	mcm ⁵ s ² U	0,9981	4,6
43	328	43,0	I-4	---	16,3
44	282	44,5	m⁶A	0,7887	34,7
45	313	46,0	3,O ² - oder 3,O ⁶ -Dimethylxanthosin*	---	14,9
46	413	46,5	t ⁶ A	0,9963	3,5
47	362	46,5	I-6	---	47,0
48	298	48,0	MTA	0,9987	13,3
49	427	49,5	m ⁶ t ⁶ A	0,9920	5,5
50	459	50,0	ms ² t ⁶ A	0,9887	3,9
51	342	51,5	I-5	0,9961	7,8

3.5.7 Erstellung des Metabolitenmusters

3.5.7.1 Endogen und exogen beeinflusste Metaboliten

Die Untersuchung der endo- und exogenen Einflussfaktoren ist für die biologische Verlässlichkeit eines Metabolitenmusters essentiell. Ein häufig angewandter Ansatz im Forschungsgebiet der Metabolomics ist die Betrachtung eines kompletten Datensatzes ohne vorherige Bestimmung des biochemischen Hintergrundes der eingeschlossenen Verbindungen^[275;276]. Dies kann bei einem quantitativen bioinformatischen Auswerteansatz, wie in der vorliegenden Studie beschrieben, rasch zu falsch positiven Ergebnissen bezüglich der klinischen Parameter Sensitivität und Spezifität führen. Da die Urinsammlung der beiden miteinander verglichenen Populationen (Mammakarzinompatientinnen / gesunde Kontrollgruppe) unter verschiedenen, innerhalb der einzelnen Gruppe aber sehr homogenen Umständen ablief, könnten z.B. externe Einflussfaktoren wie Ernährung, Zeitpunkt der Urinsammlung u.a. zu einer ungewollten, nicht-tumorrelevanten Unterscheidung führen. Ein Beispiel wäre die als Dimethylxanthosinderivat identifizierte Komponente m/z 313 (Nr. 45, Tab. 25), vermutlich ein ribosylierter, bisher nicht beschriebener Metabolit des Coffeins (vgl. 3.1.5.6). Wie sich im Zuge der Untersuchung des Ausscheidungsverhaltens dieser Verbindung über einen Zeitraum von 24h herausstellte, liegt eine starke Abhängigkeit bezüglich der Kaffeeaufnahme vor. In den gezeigten EICs in Abb. 98 ist die tageszeitabhängige Ausscheidung eines männlichen Probanden (Alter: 27 Jahre) dargestellt.

Der Proband hatte zwei Tage vor der 24h-Urinsammlung das Kaffeetrinken eingestellt und erst am Tag der Urinsammlung um 16.00 Uhr wieder Kaffee (ca. 1 l) zu sich genommen. Der Metabolit ist zunächst nicht im Spontanurin detektierbar. Etwa vier Stunden nach der Kaffeeaufnahme kommt es zu einem sukzessiven Anstieg des vermeintlichen Coffeinmetabolits mit maximaler Ausscheidung am nächsten Morgen um etwa 8.00 Uhr (Ende der 24h-Urinsammlung).

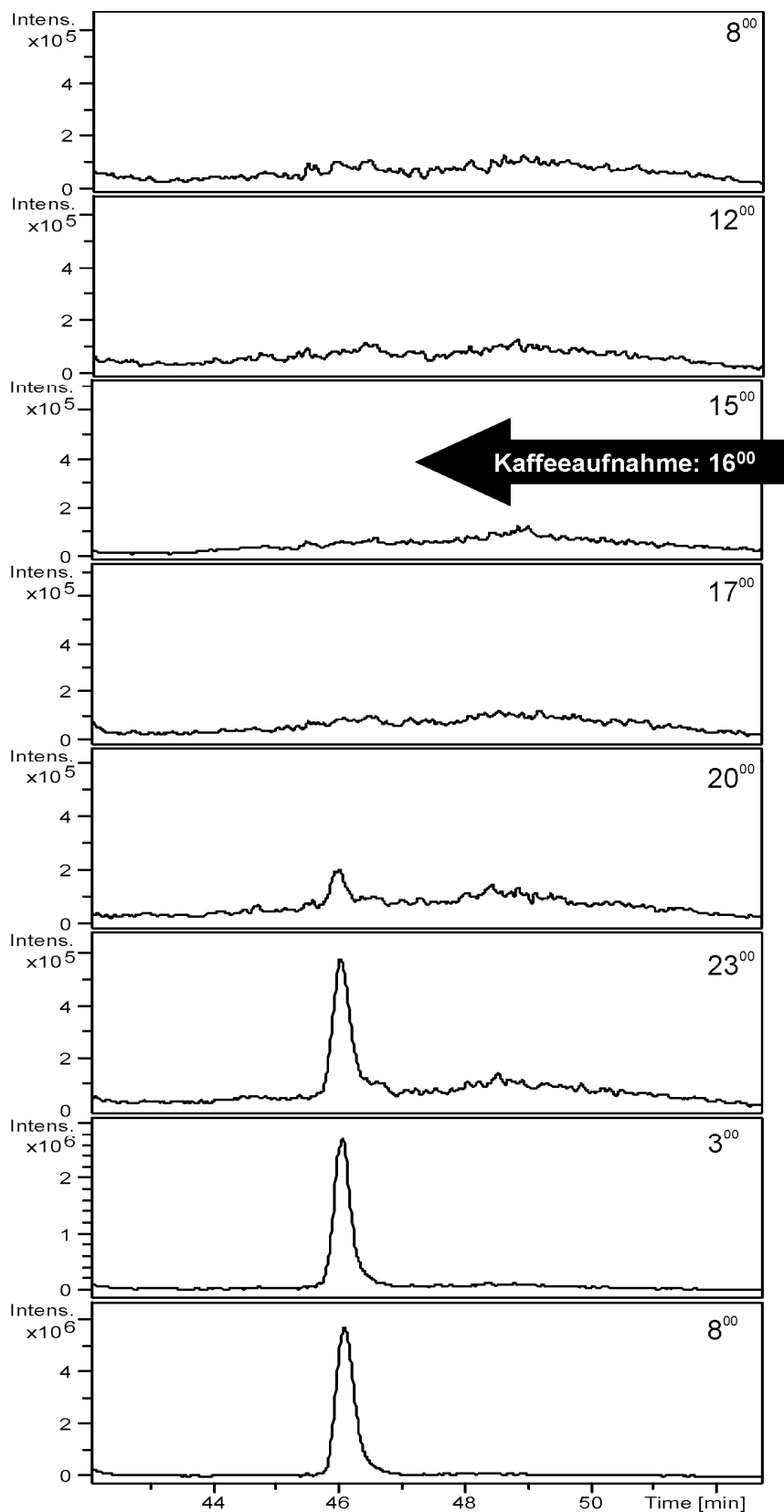


Abbildung 98: EIC 313 der 24h-Ausscheidung des vermeintlichen Coffeinmetabolits m/z 313.

Bei einer Kontrollprobandin (Alter: 24 Jahre), die weder Kaffee noch ähnliche coffeinhaltige Getränke und Nahrungsmittel zu sich nimmt, konnte der Metabolit in keiner der gemessenen Spontanurinproben detektiert werden. Bei zwei Probanden (m, Alter: 29 Jahre / w, Alter: 27 Jahre) mit normalem, über den ganzen Tag verteilten Kaffeegenuss kam der Metabolit in jeder der gesammelten Urinproben vor. Eine graphische Darstellung des Ausscheidungsverhaltens der genannten Kontrollprobanden ist in Abb. 99 dargestellt.

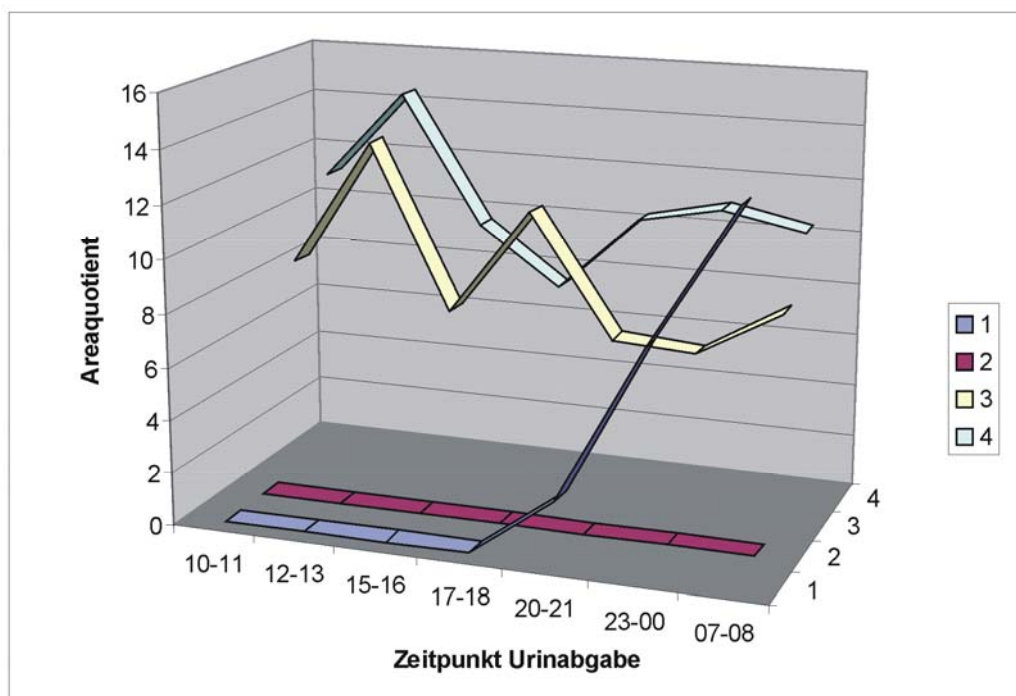


Abbildung 99: Tageszeitabhängige Ausscheidung des vermeintlichen Coffeinmetabolits m/z 313 der vier untersuchten Kontrollprobanden. 1: männlich, Alter: 27 Jahre, Kaffeeaufnahme um 16.00 Uhr, zuvor zwei Tage ohne Kaffeeaufnahme; 2: weiblich, Alter: 24 Jahre, trinkt weder Kaffee noch ähnliche, coffeinhaltige Getränke; 3: männlich, Alter: 29 Jahre, regulärer, über den ganzen Tag verteilter Kaffeegenuss; 4: weiblich, Alter: 27 Jahre, regulärer, über den ganzen Tag verteilter Kaffeegenuss. Areaquotient = Summe Peakflächen (H^+ , Na^+ , K^+) von Metabolit m/z 313 / Summe Peakflächen (H^+ , Na^+ , K^+) Interner Standard Isoguanosin.

Unabhängig vom wahrscheinlich nahrungsbedingten Ursprung des Dimethylxanthosin-Metabolits, erforderte die stark tageszeitabhängige Ausscheidung den Ausschluss dieser Verbindung aus der tumorassoziierten Analytik des Metabolitenmusters. In diesem Zusammenhang wurde auch der Metabolit m/z 299 (Nr. 39, Tab. 25) ausgeschlossen, da es sich hierbei vermutlich um den monomethylierten Coffeinmetabolit 1-Methylxanthosin handelt (vgl. 3.1.5.6).

Auch diese Verbindung zeigte im 24h-Ausscheidungsverlauf eine deutliche Abhängigkeit von der Kaffeeaufnahme.

Weiterhin wurden Komponenten ausgeschlossen, bei welchen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Sekundärmetaboliten endosymbiontischer Bakterien der humanen Darmflora handelt. Wie bereits unter 3.1.5.2 beschrieben, zählen hierzu die Metabolitenserie fettsäurekonjugierter, ribosylierter Histaminderivate (Nr. 14, 19, 29, 43 und 51, I-1 – I-5, Tab. 25) wie auch das strukturell analoge, mit Phenyllessigsäure konjugierte Histaminribosid I-6 (Nr. 47, Tab. 25).

3.5.7.2 Einflüsse durch die Probenaufarbeitung

Ein wichtiger Aspekt bei der Auswertung eines Metabolitenmusters ist die Überprüfung möglicher aufbereitungsbedingter Einflüsse auf die zu analysierenden Komponenten. In der Literatur sind derartige, unerwünschte Reaktionen während der regulären Nucleosid-Probenaufarbeitung bereits beschrieben. So wird für das methylierte Nucleosid m^1A eine Dimroth-Umlagerung zu m^6A unter alkalischen Bedingungen beschrieben^[216;217]. Die Verbindung m^6A wurde deshalb aus der Liste der einzuschließenden Metaboliten gestrichen. Das m^1A -Stellungsisomer hingegen wurde eingeschlossen, da die ablaufende Umlagerungsreaktion keinen nennenswerten Einfluss auf die Peakfläche dieser Hauptkomponente hat.

Im Verlauf der durchgeführten Arbeit konnte eine ursächlich von den gewählten Aufbereitungsbedingungen ausgehende Isomerisierungsreaktion beobachtet werden. Die Riboseeinheit des im Urin enthaltenen Grundnucleosids A wird aller Wahrscheinlichkeit nach von der Ribofuranosyl- in die Ribopyranosylform umgewandelt. Eine derartige Reaktion ist im alkalischen Milieu bereits in der Literatur beschrieben^[277] und konnte mit einer Behandlung eines Adenosin-Standards unter analogen Reaktionsbedingungen bestätigt werden. Als Abbauprodukt wird nach dem in Abb. 100 gezeigten Schema die bisher nicht identifizierte Komponente m/z 268 (1-Ribopyranosyladenin) gebildet.

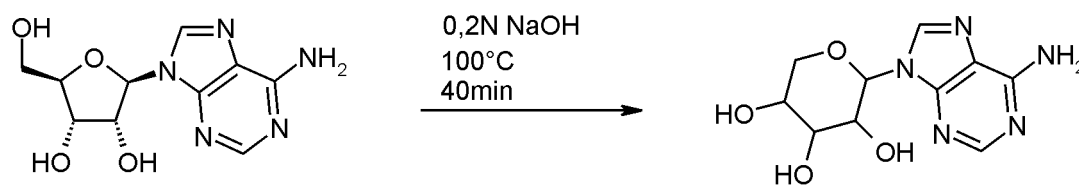


Abbildung 100: Vermutete Abbaureaktion von Adenosin zu der entsprechenden Pyranoseform unter alkalischen Bedingungen.

Wie in Abb. 101 zu sehen, ist die MS³-Fragmentierung von A und dem gebildeten Abbauprodukt m/z 268 identisch was die Vermutung übereinstimmender Nucleobasen bestätigt. Die verschobene Retentionszeit zwischen beiden Verbindungen spricht für eine Modifikation der Zuckereinheit, vermutlich einer Umlagerung von der Ribofuranosyl- in die Ribopyranosylform.

Eine analoge Reaktion konnte auch im Säuren bei den Bedingungen der eingesetzten Probenaufarbeitung beobachtet werden. Als entscheidender Schritt für die beschriebene Umlagerungsreaktion konnte das Einrotieren des Affinitätschromatographie-Eluats bestimmt werden. Hierzu wurde eine Adenosin-Stammlösung in 50 ml Elutionslösung (0,2 N FA in MeOH / H₂O 1:1 (v/v)) gelöst und anschließend bei 40°C am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5,0) aufgenommen und mit LC-MS-Methode 4 (vgl. 5.3.3.5) analysiert (vgl. Abb. 102). Die beobachtete Umlagerungsreaktion der Ribose konnte bei keinem anderen Nucleosid nachgewiesen werden.

Aufgrund der aufarbeitungsbedingten Bildung wurde 1-Ribopyranosyladenin (Nr. 25, Tab. 25) wie auch die korrespondierende Ausgangsverbindung A (Nr. 36, Tab. 25) aus dem analysierten Metabolitenset gestrichen. Nach dem Ausschluss nicht-tumorrelevanter Metaboliten und Abbauprodukte konnte so ein Set von 35 Komponenten für die bioinformatische Auswertung erstellt werden (vgl. Tab. 26).

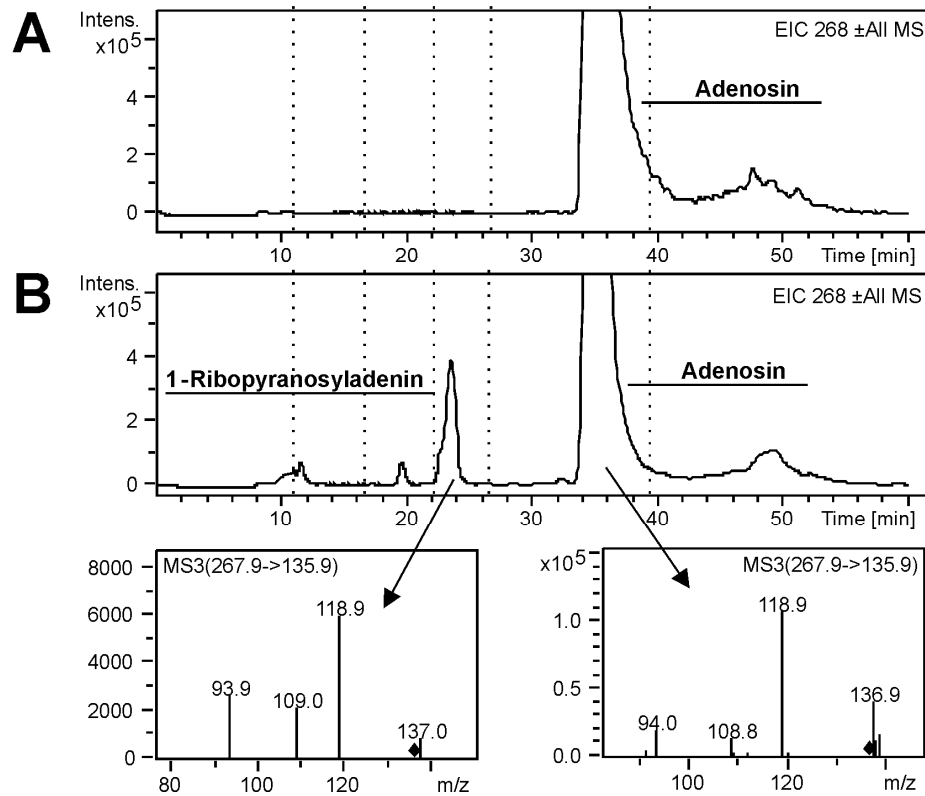


Abbildung 101: Auto-LC-MS³-Messungen eines Adenosin-Standards vor (A) und nach alkalischer Hydrolyse (B).

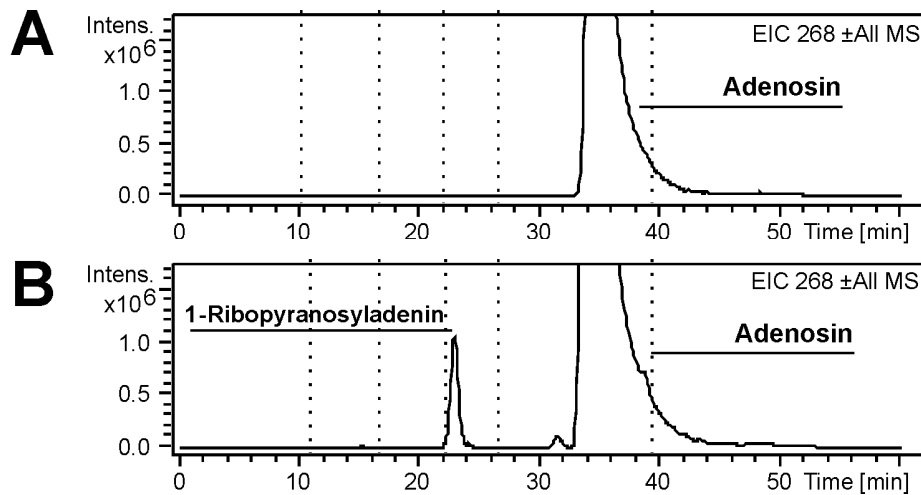


Abbildung 102: Auto-LC-MS³-Messungen eines Adenosin-Standards vor (A) und nach dem Einrotieren (B) bei 40°C in 0,2 N FA in MeOH/H₂O 1:1 (v/v).

Tabelle 26: Eingeschlossene Metaboliten für die bioinformatische Mustererkennung.

Nr.	[MH ⁺]	RT	Metabolit	Metabolismusweg [#]
1	302	3,0	I-7	vermutlich H
2	247	4,3	DHU	R
3	245	4,5	Ψ	R
4	212	5,0	P-1	vermutlich N
5	244	6,5	C	R
6	346	7,0	acp ³ U	R
7	302	7,0	ncm ⁵ U	R
8	228	7,5	P-2	vermutlich N
9	245	8,5	U	R
10	258	9,5	m ³ C	R
11	259	10,5	AICA Ribosid	N
12	282	12,0	m ¹ A	R
13	271	14,0	2,5-PCNR	N
14	298	17,5	m ⁷ G	R
15	269	18,0	I	R
16	271	20,5	3,4-PCNR	N
17	296	21,5	m ⁶ ₁ A	R
18	259	23,5	m ³ U	R
19	384	24,5	N ⁶ -SAR	P
20	285	25,0	X	R
21	385	27,5	SAH	MP
22	283	29,0	m ¹ I	R
23	298	31,0	m ¹ G	R
24	293	32,0	?	?
25	286	32,5	ac ⁴ C	R
26	298	33,5	m ² G	R
27	376	34,5	9-Ribosyl-6-aurinopurin*	?
28	398	40,0	ms ² io ⁶ A	R
29	326	41,0	m ^{2,2,7} G	R
30	312	41,5	m ² ₂ G	R
31	333	42,5	mcm ⁵ s ² U	R
32	413	46,5	t ⁶ A	R
33	298	48,0	MTA	MP
34	427	49,5	m ⁶ t ⁶ A	R
35	459	50,0	ms ² t ⁶ A	R

[#] R: RNA-Metabolismus, H: Histidin-Metabolismus, N: Nicotinat / Nicotinamid-Stoffwechsel, MP: Methionin / Polyamin-Zyklus, P: Purin-Biosynthese, ?: nicht bekannt. *SV: Strukturvorschlag vgl. Kap 3.1.5.6.

3.5.8 Methoden der Bioinformatik als Klassifizierungssysteme

3.5.8.1 Überblick über bisherige Arbeiten

Metabolic Profiling-Ansätze wie in der vorliegenden Studie erfordern aufgrund der großen, anfallenden Datenmengen Auswertesysteme, mit denen sich auch aus sehr komplexen Zusammenhängen spezifische Informationen für Klassifizierungen ableiten lassen. Statistische und bioinformatische Methoden bieten für diese Problemstellung vielfältige Lösungsansätze.

Zu den am häufigsten eingesetzten Verfahren zählt die *Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA)*. Diese dient dazu, die Dimensionalität umfangreicher Datensätze zu strukturieren und zu vereinfachen, indem die Mehrzahl der statistischen Variablen durch wenige aussagekräftige sog. Hauptkomponenten dargestellt wird. *Yang et al.* setzten die PCA zur Klassifizierung von Leberkrebspatienten (n = 48) im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (n = 55) und Patienten mit Lebererkrankungen wie Hepatitis (n = 50) und Leberzirrhose (n = 27) ein^[278]. Hierzu wurden 113, mehrheitlich nicht identifizierte Verbindungen aus dem cis-diol-Muster in Urin mittels HPLC-UV analysiert und auf den internen Standard und den Kreatininwert normiert. Der komplette Datensatz erlaubte auf der Basis von zwei definierten Hauptkomponenten eine annähernd vollständige Unterscheidung zwischen Krebserkrankungen auf der einen und Hepatitis / Leberzirrhose auf der anderen Seite (nur 7,4% aller Fälle der letztgenannten Gruppe wurden fälschlicherweise als Tumorerkrankung eingestuft). Eine Unterscheidung innerhalb der Gruppe nicht-kanzeröser Lebererkrankungen war nicht möglich. Bei Auswahl eines verkleinerten Datensatzes von 15 Nucleosiden konnten 83% der Leberkrebskrankungen korrekt zugeordnet werden. Die parallel bestimmten klassischen Tumormarker wie AFP und CEA zeigten deutlich schlechtere Werte von 6-73%.

Auch die sogenannten *Künstlichen Neuronalen Netze (Artificial Neural Network, ANN)* finden in medizinischen Klassifizierungs-Fragestellungen breite Anwendungen. Bei der zumeist im klinischen Bereich eingesetzten Methodik der

überwachten ANN wird ein präspezifizierter Datensatz aus Eingabe- und Ausgabedaten eingesetzt. Mit diesem wird ein dreischichtig-aufgebautes (Input-Layer, Hidden-Layer, Output-Layer), über Knotenpunkte (artifizielle Neuronen) durchgehend verbundenes System, solange trainiert, bis die resultierende Gewichtung der einzelnen Neuronenstränge die maximale Anzahl richtiger Ausgabewerte (z.B. krank vs. gesund) errechnet. Die eingestellten Parameter können anschließend auf unabhängige Validierungs- und Testdatensätze angewendet werden^[279].

Seidel et al. nutzten die ANN-Methodik zur Klassifizierung von 68 Patienten mit verschiedenen malignen und benignen Tumoren und 41 gesunden Kontrollprobanden. Auf der Basis von HPLC-UV-Daten wurden 18 modifizierte Ribonucleosidstrukturen quantifiziert. Separat betrachtet wiesen die einzelnen Konzentrationen deutliche Unterschiede zwischen gesunden, benignen und malignen Fällen auf. Mit ANN-Analyse konnte bei der Klassifizierung von Tumorerkrankten vs. gesunden Kontrollprobanden eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 85% erreicht werden^[280].

Zhao et al. analysierten mittels Kapillarelektrophorese zwölf Ribonucleoside im Urin von 25 Krebspatienten mit 14 verschiedenen Tumorarten und einem Kontrollkollektiv bestehend aus 25 gesunden Probanden. Der Datensatz wurde unterteilt in einen Trainingsdatensatz (15 krank / 15 gesund) und einen Testdatensatz (10 krank / 10 gesund). Die Auswertung mittels ANN ergab im erstgenannten Kollektiv einen Wert von je 100% für Sensitivität und Spezifität. Im Testkollektiv konnten 90% der Tumorerkrankten und 80% der Gesunden richtig klassifiziert werden^[281].

In der durchgeführten Arbeit wurde die Support Vector Machine (SVM) als bioinformatisches Klassifizierungsverfahren angewandt. Im Zusammenhang mit Krebserkrankungen wurde diese bereits zur Untersuchung von tumorassoziierten Veränderungen des Genmusters^[282;283], des Proteinprofils^[284;285] und des Metabolitenpatterns^[286;287] eingesetzt. Auch die Stoffklasse der modifizierten Nucleoside und strukturell verwandter Metaboliten wurde als Datensatz für SVM-basierte Mustererkennung untersucht.

Mao et al. nutzten CE-MS-Analytik zum Vergleich des Nucleosidmusters in Urin von 20 nicht-klassifizierten Blasenkrebspatienten und 20 gesunden Kontrollprobanden. Aus insgesamt 44 kreatininnormierten Komponenten (modifizierte Nucleoside und nicht identifizierte cis-diol-Metaboliten) konnte mit der SVM eine maximale Klassifizierungsleistung von 100% Spezifität und 90% Sensitivität bei 5-facher Kreuzvalidierung erreicht werden. Aus den statistischen Histogrammen wurden drei nicht identifizierte Komponenten (m/z 317, m/z 290, m/z 304), die aufgrund ihres hohen Informationsgehaltes am häufigsten von der SVM ausgewählt wurden, als mögliche Tumormarker postuliert^[276].

Die SVM wurde auch innerhalb der Arbeitsgruppe bei der Untersuchung und Klassifizierung von Brustkrebs eingesetzt. In einer auf HPLC-UV-Daten basierenden Studie wurden elf Nucleoside im Urin von 51 Brustkrebspatientinnen (Tis, T1, T2) und 65 gesunden Frauen quantifiziert, auf den Kreatininwert der jeweiligen Probe sowie den internen Standard Isoguanosin bezogen und anschließend einer bioinformatischen Auswertung unterzogen. Mit einer sogenannten „*Leave One Out*“-Kreuzvalidierung (LOO) (vgl. 3.5.8.2) konnte eine für den Gesamtdatensatz maximale Klassifizierungsleistung von 85% Spezifität und 74% Sensitivität erreicht werden. Angewandt auf einen unabhängigen Datensatz von 14 Brustkrebspatientinnen und 15 gesunden Probandinnen ergab der trainierte SVM-Algorithmus eine Spezifität von 86% und eine Sensitivität von 94%. Die Nucleoside mit dem höchsten Informationsgehalt bezüglich der Unterscheidung in krank vs. gesund waren I, m^3U , m^1I , m^1G und A^[288].

In einer weiteren Arbeit wurden Urinproben von 113 Brustkrebspatientinnen (Tis-T4) und 99 gesunden Kontrollprobandinnen untersucht. Hierzu wurde ein Datensatz, bestehend aus 31 Ribonucleosiden und ribosylierten Komponenten, mit LC-IT-MS analysiert. Die resultierenden Peakflächen der einzelnen Metaboliten wurden in einem semiquantitativen Ansatz auf den Kreatininwert und den internen Standard Isoguanosin normiert und anschließend mit SVM auf charakteristische Unterschiede zwischen den Kollektiven untersucht. Bei Einbezug aller 31 Komponenten ergab sich mit LOO-Kreuzvalidierung eine Spezifität von 89,9% und eine Sensitivität von 87,7%. Mit der Anwendung des sogenannten

„Recursive Feature Elimination (RFE)“-Algorithmus wurden zusätzlich die relevantesten Metaboliten aus der LOO-Kreuzvalidierung ausgewählt. Zu diesen zählten einige erst im Verlauf dieser Arbeit identifizierten Komponenten wie P-2, N⁶-SAR, m^{2,2,7}G und ms²⁶A sowie die bereits bekannten Verbindungen 3,4-PCNR, m¹G und MTA. Trotz resultierender Datenreduktion konnten zum kompletten Datensatz vergleichbare Spezifitäts- und Sensitivitätswerte von 88,9% bzw. 89,4% erreicht werden^[289]. Drei weitere Metaboliten (1-Ribopyranosyladenin, m⁶A und *m/z* 313, Nr. 25, 44, 45, Tab. 25), die laut RFE ebenfalls eine überdurchschnittliche Klassifizierungsleistung zeigten, wurden aus der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie aufgrund fehlender Tumorrelevanz ausgeschlossen.

Die meisten der gegenwärtig in der Brustkrebs-Routineanalytik eingesetzten Tumormarker wie CEA und CA 15-3 werden nicht für die Früherkennung und die Therapieüberwachung empfohlen^[290]. In klinischen Studien werden bei einer gegebenen Spezifität von 95% Sensitivitätswerte von 18% (CEA) bzw. 26% (CA 15-3) bei Primärdiagnosen, 52% bzw. 69% bei metastasierten Mammakarzinomen und 12% bzw. 20% bei Rezidiven erreicht^[291]. Die vorgestellten Anwendungsbeispiele von modifizierten Nucleosiden und strukturell verwandten Komponenten als Diskriminierungsparameter bei Brustkrebs zeigen eine deutliche Verbesserung der Klassifizierungsleistung und rechtfertigen somit deren möglichen Einsatz in der Tumordiagnostik.

3.5.8.2 Klassifizierung mit der Support Vector Machine (SVM)

Die in der vorliegenden Studie eingesetzte Support Vector Machine, ein sogenannter *Maximal-Margin-Classifier*, zählt zur Klasse der nichtparametrischen Lernalgorithmen. Im Gegensatz zu parametrischen Lernalgorithmen, die störanfällige, meist auf die Normalverteilung der Daten bezogene Wahrscheinlichkeitsmodelle annehmen, minimieren nichtparametrische Systeme hypothetische Annahmen für den trainierten Datensatz. Sie zeigen folglich eine deutlich erhöhte statistische Robustheit in den Klassifizierungsvorhersagen^[292].

Das grundlegende Prinzip der SVM ist die Teilung von zwei Wert-Kollektiven (im Fall dieser Studie die Trennung von Krebspatienten und gesunden Kontrollprobandinnen) mittels einer optimal separierenden Hyperebene wie in Abb. 103 dargestellt.

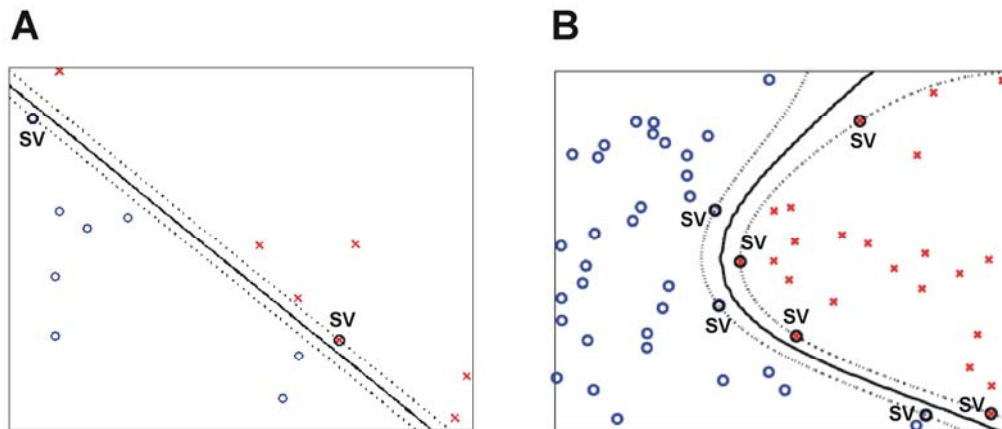


Abbildung 103: Grundprinzip der SVM-Datentrennung durch Generierung einer optimal separierenden Hyperebene (schwarze Linie). A: lineares Trennproblem, B: nicht-lineare Trennung in einem hochdimensionalen Raum. Kreise: Kollektiv 1, Kreuze: Kollektiv 2 SV: Support Vektoren.

Die Hyperebene wird so konstruiert, dass ihr Abstand zu den am nächsten gelegenen Punkten, den sogenannten Support Vektoren (SV), maximiert wird. Eine Klassifizierung ist wie in Abb. 103A zu sehen neben einfacheren, linearen Datentrennungen auch bei komplexeren Zusammenhängen (vgl. Abb. 103B) möglich. Hierzu wird die berechnete Hyperebene mittels Ähnlichkeitsmaßen $k(x_i, y_j)$, den sogenannten Mercer-Kernels, abgebildet. Kernels sind mathemati-

sche Funktionen, die die Eigenschaften eines Skalarproduktes aufweisen und die Eingabedaten (Datenmerkmale, Features) in einem hochdimensionalen Raum projizieren können, in welchem eine bessere Hyperebene gefunden werden kann^[293]. Die Berechnung der resultierenden Kernel-Matrix $Q = [k(x_i, y_j)]$ erfolgte in dieser Arbeit über einen sogenannten *Radial Basis Function (RBF) Kernel*:

$$k(x_i, y_j) = \exp\left(-\frac{\|x_i - y_j\|^2}{2\sigma^2}\right) \quad (5)$$

Das Optimierungsproblem der in dieser Studie eingesetzten C-SVM^[294] ergibt sich für gegebene reelle Vektoren $x_i \in \mathbb{R}^n$, $i = 1, \dots, l$ und die korrespondierenden Klassen $y_i \in \{-1, +1\}$ über die Formulierung von Gewichtungsvektor w , Bias b (systematischer Fehler) und den sogenannten „*Slack-Variablen*“ (Schlupfvariablen) ξ_i :

$$\min_{w, b, \xi_i} \frac{1}{2} w^T w + C \times \sum_{i=1}^l \xi_i \quad (6)$$

$$\text{s.t. } y_i (w^T \phi(x_i) + b) \geq 1 - \xi_i \quad (7)$$

$$\xi_i \geq 0 \quad \forall i = 1, \dots, l \quad (8)$$

Dieses duale Problem wird über die sogenannten *Expansionskoeffizienten* α_i gelöst:

$$\min_{\alpha} \frac{1}{2} \alpha^T Q \alpha - 1^T \alpha \quad (9)$$

$$\text{s.t. } y^T \alpha = 0 \quad (10)$$

$$0 \leq \alpha_i \leq C \quad \forall i = 1, \dots, l \quad (11)$$

In den durchgeführten Berechnungen wurden freie Parameter wie σ (bestimmt die Einflussbreite der Beziehung $\|x - y\|$) und C (Regularisierungsparameter für die Fehlklassifikation der SVM in den Trainingsdaten), deren Wert erheblichen Einfluss auf die Klassifizierungsleistung der SVM haben, durch eine Modellauswahl mit verfeinerter Gittersuche optimiert. Hierzu wurde die Vorhersa-

gequalität für alle möglichen Paare von σ und C in einem bestimmten Bereich mit gegebener Schrittweite ($\log(C) = [-14\dots 8, \text{Schrittweite } 4]$ und $\log(\sigma) = [-8\dots 5, \text{Schrittweite } 5]$) errechnet und zunehmend verbessert.

In der Regel werden in Metabolomics-basierten Studien die gemessenen absoluten Konzentrationswerte als Eingabedaten für maschinelle Lernverfahren eingesetzt und zwischen den zu klassifizierenden Kollektiven verglichen^[280;281;295]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Ansatz erweitert. Der biochemische Fluss innerhalb eines bzw. zwischen verschiedenen Metabolismushwegen wird über korrespondierende Enzymsysteme reguliert. Auf diese Weise entstehen zwischen den einzelnen Substraten Abhängigkeiten, die sich auch im Hinblick auf pathophysiologische Alterationen wie Tumorerkrankungen in charakteristischen Verhältnissen der Metaboliten zueinander widerspiegeln können. Für die bioinformatische Mustererkennung wurde deshalb der Quotient aus den Variablen a_i (semiquantitativ ermittelte Konzentration Metabolit a) und b_i (semiquantitativ ermittelte Konzentration Metabolit b) gebildet.

Auf diese Weise wurde, bei einer Gesamtzahl von 35 analysierten Metaboliten (vgl. Tab. 26), eine erhebliche Datenmenge von $35 \times 34 = 1190$ Einzelkombinationen generiert und als Datenmerkmale in die SVM eingelesen. Generell ergaben sich aus dieser Konstellation zwei Probleme. Zum einen kann die numerische Breite des Wertebereichs b im Verhältnis a/b von 0 bis $\rightarrow\infty$ reichen. Ist Metabolit b nicht zu detektieren, ergibt sich aus der resultierenden Division durch 0 ein nicht definierter Wert. Zum anderen erfordert die große anfallende Datenmenge einen hochselektiv arbeitenden Algorithmus, der für eine praktikable Nutzung aus dem Wertekollektiv die Paarungen mit dem höchsten Informationsgehalt herausfiltert. Das numerische Problem wurde über die Verwendung einer arctan-Codierung von a/b gelöst. Wie in Abb. 104 zu sehen ist, nutzt diese mathematische Funktion verschiedene Zielmengen für $b < a$ und $a < b$ (gerichtete Codierung). Zusätzlich ist der resultierende Wertebereich sehr klein, was das Auftreten numerischer Probleme verhindert. Die SVM kann auf diese Weise mit geringeren Veränderungen der Gewichtungen trainiert und rejustiert werden. Generell normalisiert die arctan-Codierung die numerisch verschiede-

nen Konzentrationsverhältnisse auf einen Wertebereich. Außerdem kann ein konsistenter Wert für die Division durch 0 als Grenzwert $\lim_{b \rightarrow \infty} = \pi/2$ definiert werden.

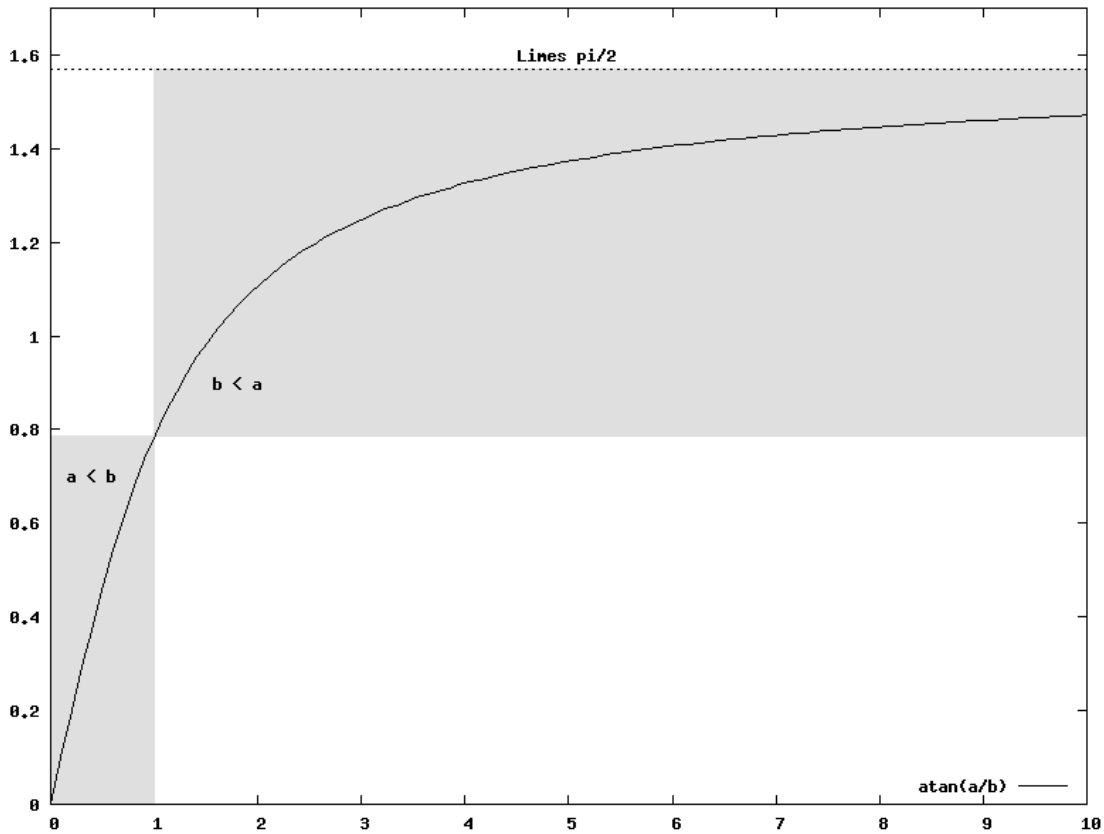


Abbildung 104: Verschiedene Wertebereiche der arctan-Kodierung von a/b -Verhältnissen für $b < a$ und $a < b$.

Für die Suche und Optimierung von Featurekombinationen können prinzipiell verschiedene Arten von Algorithmen angewendet werden^[296]. Der Filteralgorithmus trifft im zur Verfügung stehenden Datensatz vor der eigentlichen Featureselektion eine Vorauswahl statistisch signifikanter Attribute. In der durchgeführten Arbeit wurde der zur Wrapper-Klasse zählende *Oscillating Feature Search (OFS)-Algorithmus* eingesetzt^[297]. Diese Algorithmen extrahieren in einem black-box-Ansatz über verschiedene Suchstrategien die optimale Featurekombination anhand des mit dem implementierten Lernalgorithmus (z.B. SVM) errechneten Klassifizierungsergebnisses. Der OFS-Algorithmus bereitet demnach für die SVM einen Trainingsdatensatz vor, welcher aus den zu eva-

luierenden Features besteht und erhält von dieser eine Fehlerschätzung zurück, aufgrund derer die nächste Featurekombination ausgewählt wird.

Die Suchfunktion des verwendeten OFS-Algorithmus arbeitet in Schwingphasen. Jede Phase ist in einen down- und einen up-swing eingeteilt. Aus einer gegebenen Partition X_d der Größe d aus der gesamten Merkmalsmenge Y werden zunächst die n schlechtesten Merkmale W ausgeschlossen. Im darauffolgenden swing werden die n besten Merkmale B zur reduzierten Untermenge X_{d-nW} addiert. In der nächsten Phase ändern die swings ihre Richtung. Der up-swing berechnet nun eine optimale Merkmalsuntermenge X_{d+nW} , während der down-swing diese wieder zu einem neuen X_d reduziert. Zwischen zwei Phasen überprüft der OFS, ob sich eine Verbesserung eingestellt hat. Ist dies der Fall wird n vergrößert und eine neue Phase injiziert. Stellt sich hingegen keine Verbesserung ein, werden die swing-Parameter angepasst oder der Algorithmus beendet.

Da die optimale Berechnung der Schwingphasenoptimierung J sehr zeitintensiv sein kann, verwendet der OFS heuristische Optimierungsverfahren wie die *Sequential Forward Selection (SFS)* und die *Sequential Backward Selection (SBS)*^[298]. Die SFS startet mit einer leeren Merkmalsmenge und fügt so lange „beste“ Features hinzu, bis die gewünschte Partitionsgröße erreicht ist. Die SBS beginnt mit allen Merkmalen und entfernt sukzessiv alle ungeeigneten Features. Die Güte der in den jeweiligen Rechendurchläufen resultierenden Featurekombinationen wurde wie bei maschinellen Lernverfahren üblich^[299] über eine *Fehlermatrix (confusion matrix)* bestimmt:

Tabelle 27: Fehlermatrix einer SVM-Klassifizierung. Spalten: vorausgesagte Klasse Proband X , Zeilen: tatsächliche Klasse Proband X .

	klassifiziert als krank	klassifiziert als gesund
krank	richtig positiv (TP)	falsch negativ (FN)
gesund	falsch positiv (FP)	richtig negativ (TN)

Die erhaltene Klassifizierungsleistung kann über die Parameter der Sensitivität und Spezifität, sowie über den sogenannten *Matthews Correlation Coefficient* (MCC) angegeben werden. Der MCC ist definiert als

$$MCC = \frac{TP \times TN - FP \times FN}{\sqrt{(TP + FP)(TP + FN)(TN + FP)(TN + FN)}} \quad (12)$$

und codiert die komplette Information aus der confusion matrix in einem Wert zwischen -1 und +1. Bei einem Wert von -1 werden die beiden Klassen „invers korrekt“ zugeordnet, d.h. alle Krebspatienten werden als gesund und alle gesunden Probanden als krank eingestuft. Je näher der Wert in Richtung +1 tendiert, desto besser ist die korrekte Einordnung beider Klassen (ein Wert von +1 würde demnach je 100% Sensitivität und Spezifität bedeuten). Der MCC wurde in der vorliegenden Arbeit als Optimierungskriterium des OFS-Algorithmus eingesetzt (vgl. Abb. 105).

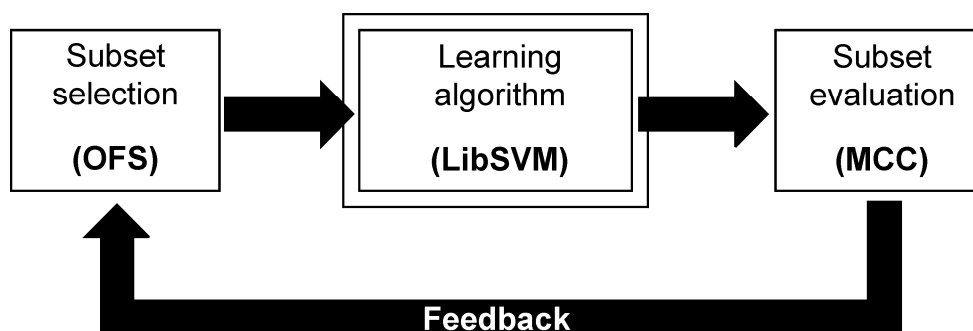


Abbildung 105: Prinzipielle Optimierungsstrategie der durchgeführten Featureselektion.

Grundsätzlich besteht bei der statistischen Evaluierung der Klassifizierung mit maschinellen Lernverfahren das Problem der *Überanpassung (overfitting)* im System, d.h. der implementierte Algorithmus macht nur innerhalb des eingelesenen Datensatzes gute Vorhersagen, scheitert aber bei unbekanntem Proben. Es gibt prinzipiell zwei Methoden, um dieses Phänomen zu umgehen. Der vorliegende Datensatz kann in ein Trainings- und ein Testkollektiv geteilt werden. Die Tatsache, dass für eine korrekte Evaluierung keine normierte Methodik existiert, und die Größe des für die SVM verwendeten Trainingsdatensatzes kleiner ist, sprechen gegen dieses Verfahren (schlechtere Datennutzung). Beide Probleme können mit den in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommenen Kreuzvalidierungsverfahren minimiert werden. Bei der 10-fach

Kreuzvalidierung (cross-validation, CV) wurde der eingesetzte Datensatz in zehn gleiche Teile separiert. In zehn Durchläufen konnten nun jeweils 9/10 der Gesamtdatenmenge als Trainingskollektiv eingesetzt und mit diesem die korrespondierende, dem SVM-System unbekannt 1/10-Testmenge in krank vs. gesund klassifiziert werden. Die Gesamtfehlerquote (ausgedrückt in Sensitivität und Spezifität bzw. MCC) wurde über den Durchschnittswert des Fehlers in den zehn Einzelmessungen angegeben. Bei der *Leave-One-Out (LOO)-Kreuzvalidierung* handelt es sich um einen Spezialfall der zuvor beschriebenen K-fachen Kreuzvalidierung^[300]. Hierbei entspricht der K-Wert der Datenpunktzahl n des eingesetzten Datensatzes. In der vorliegenden Arbeit (85 Brustkrebspatientinnen + 85 Kontrollprobandinnen) wurde demnach sequentiell eine Probe aus dem Datensatz ausgeschlossen und die SVM auf die restlichen 169 Proben trainiert. Anschließend wurde die zuvor ausgeschlossene Probe klassifiziert. Der LOO gilt als annähernd unverzerrtes Maß der wahren Generalisierungsleistung des maschinellen Lernverfahrens^[299]. Die resultierenden LOO-Sensitivitäts- / Spezifitätswerte geben hierbei generell eine eher pessimistische Einschätzung der tatsächlichen Generalisierungsleistung wieder.

Die bioinformatische Auswertung des Metabolitenmusters erfolgte in Kooperation mit Herrn Carsten Henneges aus der Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Zell am Zentrum für Bioinformatik der Universität Tübingen (ZBIT).

3.5.9 Ergebnis der Featureselektion

Die beste Klassifizierungsleistung in der durchgeführten Studie konnte mit dem in Tab. 28 angegebenen Datensatz von 59 Metabolit-Kombinationen erreicht werden.

Tabelle 28: Auswahl der Featurekombinationen mit der besten Klassifizierungsleistung.

1 atan (1/7)*	I-7 / ncm ⁵ U	31 atan (20/3)	X / ψ
2 atan (1/12)	I-7 / m ¹ A	32 atan (20/35)	X / ms ² t ⁶ A
3 atan (2/21)	DHU / SAH	33 atan (21/30)	SAH / m ² ₂ G
4 atan (2/22)	DHU / m ¹ I	34 atan (22/30)	m ¹ I / m ² ₂ G
5 atan (3/1)	Ψ / I-7	35 atan (23/18)	m ¹ G / m ³ U
6 atan (3/18)	Ψ / m ³ U	36 atan (25/5)	ac ⁴ C / C
7 atan (5/7)	C / ncm ⁵ U	37 atan (25/10)	ac ⁴ C / m ³ C
8 atan (5/11)	C / AICA Ribosid	38 atan (25/22)	ac ⁴ C / m ¹ I
9 atan (6/18)	acp ³ U / m ³ U	39 atan (26/19)	m ² G / N ⁶ -SAR
10 atan (6/19)	acp ³ U / N ⁶ -SAR	40 atan (26/28)	m ² G / ms ² io ⁶ A
11 atan (8/23)	P-2 / m ¹ G	41 atan (26/30)	m ² G / m ² ₂ G
12 atan (9/21)	U / SAH	42 atan (27/2)	376 / DHU
13 atan (9/26)	U / m ² G	43 atan (27/13)	376 / 2,5-PCNR
14 atan (10/27)	m ³ C / 376	44 atan (28/9)	ms ² io ⁶ A / U
15 atan (11/5)	AICA Ribosid / C	45 atan (28/16)	ms ² io ⁶ A / 3,4-PCNR
16 atan (11/33)	AICA Ribosid / MTA	46 atan (28/19)	ms ² io ⁶ A / N ⁶ -SAR
17 atan (12/10)	m ¹ A / m ³ C	47 atan (29/34)	m ^{2,2,7} G / m ⁶ t ⁶ A
18 atan (12/18)	m ¹ A / m ³ U	48 atan (29/35)	m ^{2,2,7} G / ms ² t ⁶ A
19 atan (13/9)	2,5-PCNR / U	49 atan (30/21)	m ² ₂ G / SAH
20 atan (13/20)	2,5-PCNR / X	50 atan (31/2)	mcm ⁵ s ² U / DHU
21 atan (14/16)	m ⁷ G / 3,4-PCNR	51 atan (31/22)	mcm ⁵ s ² U / m ¹ I
22 atan (14/21)	m ⁷ G / SAH	52 atan (31/24)	mcm ⁵ s ² U / 293
23 atan (14/26)	m ⁷ G / m ² G	53 atan (33/11)	MTA / AICA Ribosid
24 atan (16/22)	3,4-PCNR / m ¹ I	54 atan (33/16)	MTA / 3,4-PCNR
25 atan (16/35)	3,4-PCNR / ms ² t ⁶ A	55 atan (33/17)	MTA / m ⁶ ₁ A
26 atan (18/10)	m ³ U / m ³ C	56 atan (33/34)	MTA / m ⁶ t ⁶ A
27 atan (18/21)	m ³ U / SAH	57 atan (34/12)	m ⁶ t ⁶ A / m ¹ A
28 atan (19/6)	N ⁶ -SAR / acp ³ U	58 atan (34/19)	m ⁶ t ⁶ A / N ⁶ -SAR
29 atan (19/23)	N ⁶ -SAR / m ¹ G	59 atan (35/3)	ms ² t ⁶ A / ψ
30 atan (19/30)	N ⁶ -SAR / m ² ₂ G		

* Nummerierung der Einzelfeatures analog zu Tab. 26.

Mit dem angegebenen Datensatz ergaben sich die in Tab. 29 aufgeführten statistischen Kenngrößen.

Tabelle 29: Statistische Kenngrößen der generierten Featureselektion.

	Sensitivität	Spezifität	MCC	TP	FN	TN	FP
CV (10)	83,5	90,6	0,743	71	14	77	8
LOO	83,5	85,9	0,694	71	14	73	12

Mit der neu entwickelten Strategie zur Mustererkennung (Bildung von Metabolitenverhältnissen, arctan-Codierung, SFS-Algorithmus, SVM) konnte auch bei Datensätzen vorangegangener Arbeiten eine deutliche Steigerung der Klassifizierungsleistung erreicht werden. So konnten die Sensitivitäts- / Spezifitätswerte aus den bereits veröffentlichten Daten von 89,4% / 88,9% auf 93,8% / 98,0% (27 Featurekombinationen) verbessert werden, was die Leistungsfähigkeit des eingeführten Verfahrens deutlich unterstreicht.

3.5.10 Biochemische Diskussion der Featurekombinationen

Aus den erhaltenen Featurekombinationen lassen sich charakteristische, tumorrelevante Zusammenhänge erkennen.

Wie bereits erwähnt, spielen methylierende Enzymsysteme eine entscheidende Rolle beim veränderten RNA-Metabolismus bei Krebserkrankungen^[130;301]. Auffällig sind in diesem Zusammenhang die selektierten Verhältnisse bestimmter, methylierter Nucleosidkomponenten. Die Featurekombinationen 17, 18, 26, 34, 35, 47 und 48 (m^1A / m^3C , m^1A / m^3U , m^3U / m^3C , m^1I / m^2_2G , m^1G / m^3U , $m^{2,2,7}G / m^{6,6}A$ und $m^{2,2,7}G / m^{2,6}A$) in Tab. 28 lassen erkrankungsbedingte Verschiebungen im Muster methylierter Nucleoside erkennen. *Tsutsui et al.* berichteten bereits 1966 signifikante Unterschiede in den Verhältnissen der monophosphorylierten, methylierten Nucleoside m^6A , m^5C , m^2G und m^2_2G zwischen isolierter tRNA aus gesunden Leberzellen und Novikoff-Hepatoma-Zellen^[129]. Als biochemischer Hintergrund für die verschobenen Metabolitenverhältnisse wurden Alterationen in der Spezifität der beteiligten Methyltransferasen angenommen. Die entsprechenden Enzymsysteme können auf diese Weise bei der malignen Transformation eine erweiterte Anzahl an Positionen im Polynucleotidmolekül modifizieren. Auch beim Mammakarzinom wird eine

analoge Abweichung der Methylierungsspezifitäten im Vergleich zu gesundem Gewebe beschrieben^[128]. Die in der durchgeführten Studie beobachteten Veränderungen in den Exkretionsverhältnissen methylierter Nucleoside basieren vermutlich auf diesem Phänomen und spiegeln sich in Selektion der entsprechenden, klassifizierungsrelevanten Featurekombinationen wieder.

Als Stoffwechselweg mit beträchtlichem Klassifizierungspotential stellte sich im Verlauf der Auswertung der Methionin / Polyamin-Zyklus und die direkten bzw. peripher gebildeten Metaboliten heraus. Es ergibt sich eine auffällige Analogie zu den Ergebnissen des Metabolic-Profiling in Zellkulturüberständen (vgl. 3.2). Auch hier konnten charakteristische, tumorassoziierte Veränderungen dieses Metabolismusweges und der resultierenden Metabolitenausscheidung nachgewiesen werden. Insbesondere für die verschiedenen Abbauprodukte des zentralen, an vielen enzymatischen Reaktionen als Cosubstrat beteiligten SAM konnten stark divergierende Exkretionsverhältnisse zu verknüpften Stoffwechselprodukten bestimmt werden. Abb. 106 zeigt hierzu einen schematischen Überblick über die korrespondierenden Stoffwechselreaktionen. Die riboseverknüpfte Methionineinheit von SAM stellt für viele enzymatische Reaktionen übertragbare funktionelle Gruppen bereit. Die Bildung des modifizierten Uridinderivats acp^3U erfolgt durch selektive Übertragung der Carboxyaminopropyl-Einheit auf Uridineinheiten im RNA-Molekül^[223]. In diesem Zusammenhang ist die Featurekombination 12 (U / SAH) von Bedeutung. Der hohe Informationsgehalt für die Klassifizierungsleistung beruht vermutlich auf Verschiebungen der konträr verlaufenden Abbaureaktionen ($SAM \rightarrow SAH$ und $SAM \rightarrow U \rightarrow acp^3U$). Im Falle der Tumorerkrankung führen die erhöhten, zellulären Methylierungskapazitäten zu einer vermehrten Bildung von SAH und zu einem veränderten U / SAH-Verhältnis. Diese Vermutung wird untermauert durch die Tatsache, dass auch der Quotient 3 (DHU / SAH) zwischen Brustkrebspatientinnen und Gesunden abweicht. DHU ist ein durch enzymatische Reduktion modifiziertes Uridinderivat.

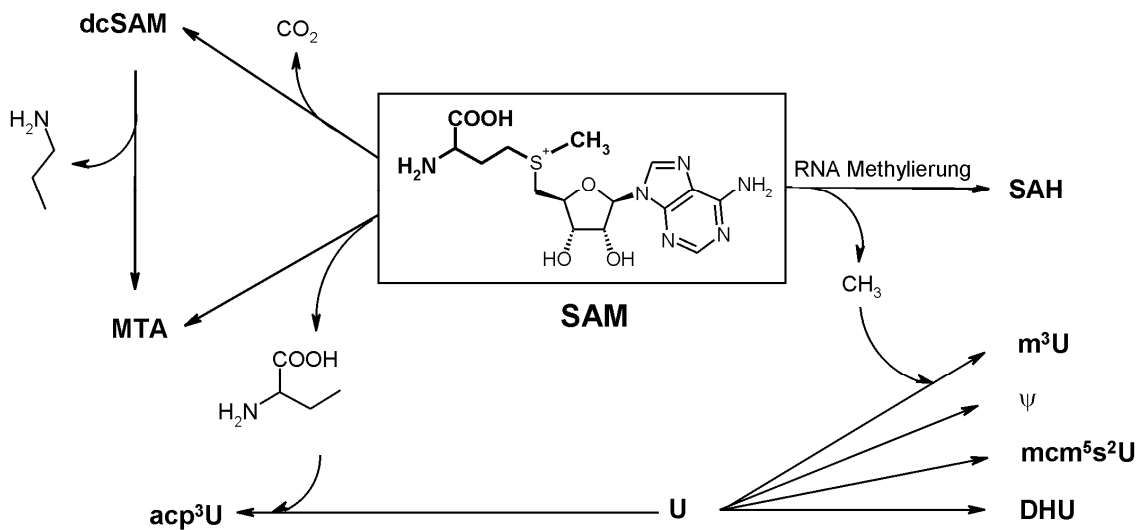


Abbildung 106: Schematische Darstellung der Hauptreaktionswege von S-Adenosylmethionin im zellulären Methionin / Polyamin-Zyklus.

Deutlichster Hinweis auf eine tumorassoziierte Veränderung im Reaktionsablauf von SAM-induziertem Carboxyaminopropyl- und SAM-induziertem Methyltransfer ist Kombination 9. Die beiden modifizierten Nucleoside acp^3U bzw. m^3U stellen die korrespondierenden Primärmetaboliten von Uridin in den genannten Reaktionen dar und tragen als Featurequotient entscheidend zur resultierenden Klassifizierungsleistung der SVM bei.

Auch innerhalb der Gruppe der modifizierten Uridine konnten charakteristische Verhältnisse verschiedener Modifikationsarten gefunden werden. Die Kombinationen 6 (Ψ / m^3U) und 50 (mm^5s^2U / DHU) wurden als aussagekräftige Klassifikatoren in die Featureselektion integriert. Analog ist die Gruppe der modifizierten Adenosine mit der Kombination 57 (m^6t^6A / m^1A) sowie die modifizierten Cytidine mit der Kombination 37 (ac^4C / m^3C) in der Auswahl der Metabolitenverhältnisse mit höchstem Informationsgehalt vertreten. Verschiebungen der Konzentrationsquotienten einer Nucleosidgrundstruktur sind generell auf tumorassoziierte Änderungen in Expression und Aktivität der beteiligten, modifizierenden Enzyme zurückzuführen.

Die Deregulierung der SAM-induzierten Methylierungsaktivität bei Tumorerkrankungen spiegelt sich in drei weiteren Featurekombinationen (22, 27 und 49)

direkt wieder. Die methylierten Nucleoside m^7G , m^3U und m^2_2G werden posttranskriptional durch spezifische Methyltransferasen über Transfer der aktivierten SAM-Methylfunktion im RNA-Molekül gebildet. Das beteiligte SAM-Cosubstrat wird hierbei zu SAH abgebaut (vgl. Abb. 104). Die in Tumorzellen verstärkt ablaufenden Methylierungsreaktionen führen so zu einer vermehrten Bildung und Exkretion modifizierter, methylierter Nucleoside, die mit einem verstärkten Abbau von SAM zu SAH einhergeht. SAH ist als potenter Inhibitor von Methyltransferase-Reaktionen bekannt^[229]. Eine erhöhte Exkretion konnte bereits in der MCF-7 Brustkrebszelllinie im Vergleich zur gesunden Brustepithelzelllinie MCF-10A beobachtet werden (vgl. 3.2.6.3). In Tumorzellen wird demnach durch die hochregulierten Methylierungsreaktionen verstärkt SAH gebildet, dieses aber zur Umgehung des inhibitorischen Einflusses vermehrt ausgeschieden. Als Folge kommt es vermutlich zu Verschiebungen in den entsprechenden Konzentrationsverhältnissen zwischen methylierten Nucleosiden und SAH. Dieses Phänomen wurde von der SVM mit den selektierten Featurekombinationen m^7G / SAH , m^3U / SAH und m^2_2G / SAH für die Klassifizierung zwischen Brustkrebspatientinnen und gesunden Kontrollprobandinnen erkannt.

In diesem Zusammenhang können auch die Featurekombinationen 55 und 56 (MTA / m^6_1A und MTA / m^6_tA) genannt werden. MTA ist das direkte Abbauprodukt von SAM bei der Übertragung der Aminocarboxypropyleinheit auf U und indirektes Abbauprodukt über die decarboxylierte Zwischenstufe dcSAM. Letzteres ist durch die Übertragung der Propylaminogruppe auf die Polyaminkomponenten Putrescin und Spermidin an zellulären Wachstumsprozessen, die auch in der Tumorgenese eine wichtige Funktion einnehmen, beteiligt^[230;231;302]. Der tumorassoziierte, deregulierende Eingriff in den Reaktionsverlauf des Methionin / Polyamin-Zyklus führt ausgehend vom Vorläufermolekül SAM vermutlich zunächst zu einer Akkumulation von MTA. Aufgrund dessen bekannten inhibitorischen Eigenschaften auf Methyltransferasereaktionen^[236], kommt es in der Tumorgenese jedoch gleichzeitig zu einer vermehrten Exkretion der Verbindung. Dieses Phänomen konnte bereits in den untersuchten Zellkulturüberständen beobachtet werden (vgl. 3.2.6.4). Im Zusammenhang mit den

konträr über den Abbau SAM \rightarrow SAH induzierten Methylierungsreaktionen an den Adenosinkomponenten m^6_1A und m^6t^6A kommt es folglich zu Verschiebungen in den ausgeschiedenen Metabolitenverhältnissen.

Interessante, tumorrelevante Rückschlüsse ergibt auch die Kombination 36 mit dem unmodifizierten Nucleosid C und dessen acetylierten Modifikationsprodukt ac^4C . Letzteres wird in rRNA und tRNA gebildet^[94], vermutlich mit Acetyl-CoA als Acetyl-donor und einem korrespondierenden Acetyltransferasesystem. In eukaryontischer tRNA wird ac^4C ausschließlich an Position 12 der D-Schleife eingeführt. Über die genaue biologische Funktion ist bisher wenig bekannt. Angenommen wird eine generelle Stabilisierung der tRNA-Struktur^[303]. Erhöhte Ausscheidungsraten des acetylierten Cytidins wurden bereits im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen beschrieben^[304;305]. Die Selektion der C / ac^4C -Kombination für die bioinformatische Klassifizierung geht konform mit den Ergebnissen der Zellkulturarbeiten, die deutliche Unterschiede in der Cytidinsekretion bei Brustkrebszellen und normalen Zellen aufzeigten. Auch wenn bei den analysierten Tumorzellen keine erhöhte Ausscheidung von ac^4C beobachtet werden konnte, ergibt die Verhältnisbildung der beiden Komponenten einen guten Klassifizierungsparameter.

Eine weitere biochemisch relevante Auswahl stellt Featurekombination 41 dar. Das monomethylierte Guanosinderivat m^2G und dessen dimethyliertes Analogon m^2_2G kommen beide in eukaryontischer tRNA und rRNA vor^[94] und wurden bereits mehrfach als mögliche Tumormarker postuliert^[280;306;307]. Bei der Bildung der methylierten Guanosine wird m^2G als Precursor über die tRNA- N^2 , N^2 -dimethyltransferase in das entsprechende m^2_2G -Konstrukt umgewandelt^[308]. Bei Leber- und Nierentumoren konnte im Vergleich zu gesundem Gewebe eine deutlich gesteigerte Aktivität des genannten Enzymsystems beobachtet werden, welche zwangsläufig zu einer vermehrten Bildung von m^2_2G führte^[309]. Die resultierende, tumorinduzierte Verschiebung im Verhältnis m^2G / m^2_2G wurde auch bei Diskriminierung zwischen Brustkrebspatientinnen und gesunden Kontrollprobandinnen durch die Featureselektion als aussagekräftiges Kriterium ausgewählt.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die in der Arbeitsgruppe etablierte Methode zur affinitätschromatographischen Isolierung von modifizierten Nucleosiden aus Urin an die veränderten Grundparameter angepasst. Hierzu zählten die Evaluierung eines neuen Gelmaterials, die Applikation der Chromatographie auf verschiedene biologische Flüssigkeiten und Matrices (Urin, Zellkulturüberstände, Blutplasma, Gewebe) sowie die Anpassung an ein kontinuierlich erweitertes Set identifizierter Metaboliten.

Für die gezielte Identifizierung bislang unbekannter Metaboliten wurde eine selektive Methode zur Isolierung ribosylierter Verbindungen aus 24h-Urin entwickelt. Über die eingesetzte Aufreinigung mit präparativer DC konnte die Einteilung der extrahierten Urinmetaboliten in verschiedene Polaritätsbereiche erreicht werden. Eine optimierte Auto-LC-MS³-Methode ermöglichte die systematische Suche nach neuen Strukturen. Durch einen weiteren Aufreinigungsschritt mit semipräparativer HPLC wurden einzelne Metaboliten für eine weiterführende MS-Analytik isoliert. Auf diese Weise konnten die unbekannt Strukturen mit IT-MS⁴⁻⁶-Analytik untersucht werden. Über die gleichzeitig durchgeführte Bestimmung der exakten Massenposition mittels FT-ICR-MS konnten den jeweiligen Strukturen eine korrespondierende Summenformel zugeordnet werden. Mit interner Kalibrierung wurden Massengenauigkeiten von 0,01-0,8 ppm erreicht. Die teilweise erfolgte externe Kalibrierung ergab Massengenauigkeiten von 1-5 ppm. Des Weiteren wurde ein nasschemisches Verfahren für die Spaltung der C-N-glykosidischen Bindung ribosylierter Pyridinderivate mit anschließendem LC-MS-Nachweis der freigesetzten Pyridinbase sowie eine Methode zur Identifizierung Threonylcarbamoyl-konjugierter Nucleoside mittels alkalischer Hydrolyse etabliert. Über Spritzenpumpenmessungen von Standardnucleosiden und semipräparativ aufgereinigten Komponenten im negative mode konnten neue Erkenntnisse über das Fragmentierungsverhalten der untersuchten Metabolitenklassen gewonnen werden. Aus den kombinierten Informationen der verschiedenen massenspektrometrischen Techniken konnten

insgesamt 23 Metaboliten identifiziert werden. Neben der Stoffklasse der modifizierten Nucleoside wurden auch Komponenten aus verknüpften Stoffwechselwegen wie der Purin-Biosynthese, dem Histidin-Metabolismus, dem Polyamin / Methionin-Zyklus sowie dem Nicotinat / Nicotinamid-Metabolismus gefunden.

Mit den Strukturen 1-Ribosyl-pyridinium (P-1), 1-Ribosyl-3-hydroxy-pyridinium (P-2), 1-Ribosyl-3-methyl-5-(2-aminocarboxyethyl)-imidazolium (I-7) und 1-Ribosyl-4-carboxymethyl-5-oxo-imidazol (I-8) sowie einer Serie ribosylierter Histaminderivate mit an der N- ω -Position konjugierten Carbonsäuren (I-1 – I-6), konnten insgesamt zehn neue, d.h. bislang nicht in der Literatur beschriebene Urinmetaboliten identifiziert werden. Ebenso wurde die Ausscheidung der modifizierten Nucleoside 2-Methylthio-N⁶-(cis-hydroxyisopentenyl)-adenosin (ms²io⁶A), 5-Methoxycarbonylmethyl-2-thiouridin (mcm⁵s²U), N⁶-Methyl-N⁶-threonylcarbamoyladenosin (m⁶t⁶A) sowie 2-Methylthio-N⁶-threonylcarbamoyladenosin (ms²t⁶A) erstmals im humanen Urin massenspektrometrisch verifiziert. Für weitere fünf unbekannte Metaboliten konnten plausible Strukturhypothesen generiert werden. Eine tumorspezifische Exkretion der neu identifizierten Metaboliten konnte im Rahmen der klinischen Studie AKP-24 mit Proben von Patienten mit Bronchialkarzinom (n = 2), Rektumkarzinom (n = 4) und HNO-Tumor (n = 3) nicht beobachtet werden. Die genannten Strukturen wurden bei allen 24h-Urinen der Tumorpatienten als auch bei Urinproben von gesunden Probanden, u.a. in der klinischen Studie AKP-23, detektiert. Im weiteren Fortgang der Arbeit wurden die Komponenten nach dem Mangel an qualitativer Aussagekraft auf ihre quantitative Relevanz im Ausscheidungsmuster untersucht.

Über die Analytik von Zellkulturüberständen wurde das Exkretionsverhalten der identifizierten Stoffwechselprodukte in Brustkrebszellen (MCF-7) und Brustepithelzellen (MCF-10A) untersucht. Es konnten charakteristische Unterschiede bei der Ausscheidung bestimmter Metaboliten detektiert werden, die auf die pathophysiologische Mutation und die resultierende Zellantwort zurückgeführt werden können. So ergab die semiquantitative Auswertung eine signifikant erhöhte Exkretion der methylierten Nucleoside m⁵U, m^{2,2,7}G und m⁶t⁶A. Das allgemein bekannte Phänomen der gesteigerten Aktivität bestimmter Methyltransferasen bei Brustkrebserkrankungen konnte hierdurch bestätigt werden.

Auffällige Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien konnten in diesem Zusammenhang auch bei der Ausscheidung des Cofaktors von methylierenden Enzymsystemen, SAM und dessen Abbauprodukt SAH, beobachtet werden. SAM wurde ausschließlich in den Überständen der Brustkrebszelllinie detektiert, SAH mit deutlich erhöhten Konzentrationen, was wiederum auf die gesteigerte Methyltransferase-Aktivität in der Tumorgenese hinweist. Weitere charakteristische Unterschiede ergaben sich im Ausscheidungsverhalten der Metaboliten MTA (Komponente des Methionin / Polyamin-Zyklus, Nebenprodukt der in der Tumorgenese hochregulierten Polyamin-Biosynthese) und AICA Ribosid. Letzteres, lediglich in den Zellkulturüberständen von MCF-7 nachgewiesen, reflektiert als dephosphoryliertes Analogon des AMP-Precursors AICAR den Energiestatus der Zelle. Die Ausscheidung aus der Tumorzelle konnte als Unterdrückung der nachgewiesenen inhibitorischen Eigenschaften von AICAR auf das Tumorwachstum interpretiert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Metabolitenmuster in Zellkulturüberständen den charakteristischen, multifaktoriellen Prozess der Tumorgenese reflektieren und somit in der Suche nach potentiellen Biomarkern bei Krebserkrankungen wichtige Informationen liefern können.

Die Analytik des Metabolitenmusters in Blutplasma von Mammakarzinompatientinnen ergab in der semiquantitativen Auswertung der Metabolitenmuster eine signifikante Konzentrationserhöhung der modifizierten Nucleoside m^2_2G und t^6A . Für eine vollquantitative Bestimmung von U und Ψ wurde eine Methode mit Matrixsimulation entwickelt. Hierbei wurde die Affinitätschromatographie nicht zur Isolierung, sondern zur gezielten Entfernung der Nucleoside aus Plasma eingesetzt. Die erhaltene, nucleosidfreie Matrix konnte als Blankplasma für die Quantifizierung der beiden Metaboliten eingesetzt werden. Die Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mammakarzinompatientinnen und den gesunden Kontrollprobandinnen in Bezug auf die Nucleoside U und Ψ .

Für die Untersuchung des Metabolitenmusters in Gewebe konnte eine selektive Probenaufbereitung etabliert werden. Erste semiquantitative Auswertungen

ergaben keine charakteristischen nucleosidischen Metabolitenmuster in den untersuchten Gewebeschnitten.

In der klinischen Studie AKP-23 wurde das Potential des Ausscheidungsmusters ribosylierter Metaboliten im Urin zur Klassifizierung von Mammakarzinompatientinnen evaluiert. Zur Generierung eines verlässlichen, tumorassoziierten Metabolitenmusters konnte auf die Ergebnisse der Identifizierungsstudie AKP-24 zurückgegriffen werden. Infolge fehlender pathophysiologischer Relevanz, wurden vermeintliche Sekundärmetaboliten endosymbiontischer Bakterien, Abbauprodukte aus Nahrungsbestandteilen (z.B. Coffeinmetaboliten) sowie durch die Probenaufarbeitung beeinflusste Strukturen ausgeschlossen. Zusätzlich wurden die analytischen Parameter der Linearität und Reproduzierbarkeit der einzelnen Metaboliten überprüft. Insgesamt konnten für die Klassifizierungsstudie ein Set von 35 Komponenten aus dem RNA-Metabolismus, der Purin-Biosynthese, dem Histidin-Metabolismus, dem Polyamin / Methionin-Zyklus sowie dem Nicotinat / Nicotinamid-Metabolismus definiert werden.

Mit einer optimierten, affinitätschromatographischen Aufreinigungsmethode wurden die Urinproben von 85 Mammakarzinompatientinnen und 85 gesunden Kontrollprobandinnen aufgearbeitet und mit LC-IT-MS-Messungen analysiert. Nach semiquantitativer Auswertung erfolgte die bioinformatische Mustererkennung mittels Support Vector Machine. Hierbei wurde ein neuer Ansatz verfolgt. Es wurde nicht wie üblicherweise auf Absolutkonzentrationen einzelner Komponenten als Eingabedaten zurückgegriffen, sondern Metabolitenverhältnisse analysiert. Aufgrund biochemischer Verknüpfungen in den eingeschlossenen Stoffwechselwegen, entstehen zwischen bestimmten Substraten Abhängigkeiten, die sich in einer tumorassoziierten Verschiebung einzelner Verhältnisse widerspiegeln. So ergab die biochemische Auswertung der mit SVM selektierten Metabolitkombinationen charakteristische Veränderungen im Muster der methylierten Ribonucleoside (z.B. m^2G / m^2_2G). Wie bereits bei der Analytik der Zellkulturüberstände festgestellt, konnten auch bei den untersuchten Urinproben Metaboliten aus dem Methionin / Polyamin-Zyklus wie SAH (Abbauprodukt des ubiquitären Methyl donors SAM) und MTA als aussagekräftiger Biomarker bei Brustkrebs identifiziert werden. Die genannten Komponenten wurden mehr-

fach, in Kombination mit verschiedenen methylierten Nucleosiden, als Klassifizierungskriterium von der SVM ausgewählt.

Mit der neuen Technik konnte im analysierten Testkollektiv eine Sensitivität von 83,5% und eine Spezifität von 90,6% mit 59 Metabolitkombinationen erreicht werden. Die analoge Auswertung alter Datensätze ergab eine Steigerung der statistischen Kenngrößen von 89,4% / 88,9% auf 93,8% / 98,0% bei 27 Featurekombinationen, und bestätigt damit die erhöhte Klassifizierungseffizienz der neu entwickelten Methode. Die Diskriminierungsleistung etablierter Brustkrebsmarker wie CEA und CA 15-3 wurde deutlich und reproduzierbar übertroffen.

Eine vollquantitative Triple-Quadrupol-Analytik der genannten, stark tumorassoziierten Metaboliten mit den entsprechenden isotope markierten Standards könnte zur Etablierung eines verbesserten, nicht-invasiven Diagnosesystems bei Brustkrebserkrankungen führen.

5 Material und Methoden

5.1 Standardsubstanzen

Als analytische Referenzsubstanzen standen die folgenden, kommerziell erhältlichen Verbindungen zur Verfügung:

A, m¹A, m⁶A, MTA, SAH, SAM, C, m³C, ac⁴C, G, m¹G, m²G, m²₂G, U, DHU, Ψ, m³U, m⁵U, X, AICA Ribosid, Adenylosuccinylsäure (Natriumsalz), 4-Carboxymethyl-imidazol (Natriumsalz), Nicotinamid, N-ω-Acetylhistamin, L-Histidin, 2-Hydroxypyridin, 3-Hydroxypyridin, 4-Hydroxypyridin, *Sigma (München)*

t⁶A, m^{2,2,7}G (Acetat), *Biolog (Bremen)*

Pyridin, *Gruessing (Filsum)*

1-Methyl-L-histidine, *Calbiochem/Merck (Nottingham, UK)*

Der Nucleosidstandard m¹I wurde freundlicherweise von Herrn Dr. J. Burbiel aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. C. M. Müller (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

Der in dieser Arbeit eingesetzte interne Standard Isoguanosin wurde freundlicherweise von Frau Prof. J. H. Kim (Universität Seoul, Südkorea) zur Verfügung gestellt.

5.2 Probenaufarbeitung

5.2.1 Packen der Säulen und Gelkonditionierung

500 mg Affigel boronate (Biorad, München) werden zunächst in einem Becherglas in 15 ml Millipore-Wasser suspendiert. Nach einer Quellzeit von 15 min wird das Material unter Nachspülen in die mit 5 ml Millipore-Wasser gefüllte Glassäule überführt. Anschließend wird das Affinitätsgel nach folgendem Schema für die Extraktionsprozedur konditioniert:

- 10 ml H₂O
- 10 ml MeOH / H₂O 2:8 (v/v)
- 10 ml H₂O
- 10 ml MeOH / H₂O 2:8 (v/v)
- 10 ml H₂O
- 20 ml 0,1 M NaCl
- 30 ml MeOH / H₂O 2:8 (v/v)
- 30 ml 0,2 M FA in MeOH / H₂O 2:8 (v/v)
- 30 ml 0,25 M NH₄Ac (pH 8,8)
- 30 ml MeOH / H₂O 2:8 (v/v)
- 30 ml 0,25 M NH₄Ac (pH 8,8)
- 30 ml MeOH / H₂O 2:8 (v/v)
- 30 ml 0,2 M FA in MeOH / H₂O 1:1 (v/v)
- 30 ml MeOH / H₂O 2:8 (v/v)
- 50 ml 0,1 M NaCl > Lagerung des Gels

Die gepackte Säule kann in 0,1 M NaCl mehrere Wochen bei Raumtemperatur und Licht gelagert werden. Abhängig von Probenmatrix und -volumen können bis zu 20 Extraktionsläufe pro Säulenpackung erfolgen. Aufgrund des hohen Gegendrucks der gepackten Säule wird bei der durchgeführten Affinitätschromatographie die Fließgeschwindigkeit grundsätzlich mittels Druckluftversorgung auf 3-4 ml/min eingestellt.

5.2.2 Urin (20 ml)

5.2.2.1 Chemikalien

- Acetonitril, gradient grade *Merck (Darmstadt)*
- Affigel boronate *Biorad (München)*
- Ameisensäure, reinst *Merck (Darmstadt)*
- Ammoniumacetat, reinst *Merck (Darmstadt)*
- Ammoniumhydroxidlösung, purum, 24% *Fluka (München)*
- Ammoniumformiat, puriss. p.a. *Sigma (München)*
- Demineralisiertes Millipore-Wasser
- Methanol, gradient grade *Merck (Darmstadt)*
- Natriumchlorid, zur Analyse *Merck (Darmstadt)*

5.2.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Analytische Waage Genius ME *Satorius (Göttingen)*
- DC-Glasplatten (1 mm, SIL RP-18W/UV₂₅₄) *Machery-Nagel (Düren)*
- DC-Kammer (BxHxT = 21 cm x 20 cm x 9 cm)
- Glassäulen (Länge ~ 15 cm, Durchmesser ~ 1,5 cm, Fritte Porosität 2)
- Glassäulen-Aufsatz (Länge ~ 18,5 cm, Durchmesser ~ 2 cm)
- Pipetten, Research / Reference 10/100/1000 *Eppendorf (Hamburg)*
- Pipette, Pipetman 10 ml *Gilson (Middleton, USA)*
- pH-Meter 540GLP *WTW (Weilheim)*
- pH-Papier *Merck (Darmstadt)*
- Rotationsverdampfer Rotavapor R200 mit CVC 2000 II Vakuumpumpe *Büchi (Essen)
Vacuubrand (Wertheim)*
- Speed Vac SPD111 *Thermo (San Jose, USA)*
- UriSet24 *Sarstedt (Nümbrecht)*
- Ultraschallbad Sonorex RK510 *Bandelin (Berlin)*
- UV-Lampe Original Hanau Fluotest *Bachhofer (Reutlingen)*
- Vortexer 7-2020 *Neolab (Heidelberg)*
- Zentrifuge 5417 R *Eppendorf (Hamburg)*
- Zentrifuge 1S-R Multifuge *Heraeus (Hanau)*
- Wasseraufbereitungsanlage Simplicity 185 *Millipore (Billerica, USA)*

5.2.2.3 Probenaufbereitung

Aus dem gesammelten 24h-Urin werden 300 ml in Einzelschritten zu je 20 ml aufgearbeitet. Hierzu werden ~ 22 ml Urin unter Kontrolle mit dem pH-Meter zunächst mit 25%iger, dann mit 2,5%iger Ammoniaklösung auf pH 8,8 eingestellt. Der gebildete Niederschlag wird abzentrifugiert (3000 g, 10 min, 4°C) und vom Überstand 20 ml für die Extraktion eingesetzt. Der Ablauf der Affinitätschromatographie erfolgt nach dem in Tab. 30 gezeigten Schema.

Tabelle 30: Schema der Affinitätschromatographie für 20 ml Urin.

Schritt	Lösung
1 Konditionierung	45 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,8
2 Probe	20 ml Urin, pH 8,8
3 Waschschrift 1	20 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,8
4 Waschschrift 2	6 ml MeOH / H ₂ O 2:8 (v/v)
5 Elution	50 ml 0,2 M FA in MeOH / H ₂ O 1:1 (v/v)
6 Regenerierung	25 ml MeOH / H ₂ O 2:8 (v/v)

Konditionierung mit 45 ml 0,25 M NH₄Ac, pH 8,8 für neue Probenaufarbeitung oder

Lagern des Gels in 50 ml 0,1 M NaCl bei Beendigung der Probenaufarbeitung

Die vereinigten Eluate werden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt (40°C) und in 1 ml Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5) gelöst. Von dieser Lösung werden 300 µl mit einem Schmelzpunktröhrchen auf einer Länge von 12 cm mittig auf die Startlinie der präparativen DC (20 x 10 cm) aufgetragen. Der Abstand von den Plattenrändern sollte je 1,5 cm seitlich und 1 cm vom unteren Ende betragen. Seitlich der Urinprobe werden zur Kontrolle der chromatographischen Trennung Lösungen der Standardnucleoside G, m⁶A und Ψ (je ~ 0,5 mg/ml) aufgetragen. Die Entwicklung (~ 45 min) erfolgt mit einem Fließmittelgemisch von 84 ml ACN / H₂O 1:6 (v/v) auf einer Nettolaufstrecke von 6 cm. Die entwickelte DC-Platte wird zunächst bei Raumtemperatur, anschließend mit kalter Fönluft getrocknet. Nach Kontrolle mit der UV-Lampe (254 nm) wird die Nettolaufstrecke der DC-Platte in zwölf Einzelfractionen zu je 0,5 cm eingeteilt (Fraktion 1: 0 (Startlinie) - 0,5 cm, Fraktion 2: 0,5 – 1,0 cm usw.),

mittels Spatel separat ausgekratzt und in je einen 25 ml Messkolben überführt. Die Extraktion des Plattenmaterials erfolgt mit einem Gemisch aus MeOH / H₂O 3:2 (v/v) + 1% FA. Die Messkolben mit dem Plattenmaterial der DC-Einzelfractionen (zwölf pro Urinprobe) werden mit 20 ml der Extraktionslösung gefüllt, geschüttelt und anschließend 15 min in das Ultraschallbad gestellt. Nach erneutem starkem Schütteln wird die Plattenmaterialsuspension erneut 15 min beschallt. Die Suspension wird nun in einem 50 ml Falcon Tube vom Plattenmaterial abzentrifugiert (3000 g, 10 min, 20°C) und der Überstand in einen Glas-Spitzkolben (100 ml) überführt. Das DC-Plattenmaterial wird anschließend erneut in 20 ml Extraktionsgemisch suspendiert und nochmals der beschriebenen Ultraschallbad-Prozedur unterzogen. Nach erneuter Zentrifugation werden die Überstände im Spitzkolben vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt (40°C). Das Residuum wird in 1 ml Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5) aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. In einem weiteren Zentrifugationsschritt (19800 rpm, 5 min, 20°C) wird das restliche DC-Plattenmaterial abgetrennt und der erhaltene Überstand bis zur LC-MC Analyse bei -20°C eingefroren.

5.2.3 Urin (1 ml)

5.2.3.1 Chemikalien

vgl. 5.2.2.1

zusätzlich:

- Interner Standard Isoguanosin (0,1 mM / 2,83 mg Isoguanosin in 100 ml bidest. H₂O)

5.2.3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

vgl. 5.2.2.2.

5.2.3.3 Probenaufbereitung

Die Urinproben sowie der ebenfalls bei -20°C gelagerte interne Standard werden im Wasserbad bei 25 °C aufgetaut und anschließend 15 sec am Vortexer

gemischt. Der Urin wird anschließend zentrifugiert (10000 rpm, 5 min, 4 °C) und der Überstand abdekantiert. Zu 1 ml der jeweiligen Urinprobe werden 50 µl interner Standard pipettiert und mit 0,25 M NH₄Ac (pH 8,8) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird gut durchmischt und anschließend nach dem Schema in Tab. 31 mittels Affinitätschromatographie aufgearbeitet.

Tabelle 31: Schema der Affinitätschromatographie für 1 ml Urin.

Schritt	Lösung
1 Konditionierung	45 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,8
2 Probe	1 ml Urin + 9ml 0,25 M NH ₄ Ac (pH 8,8) + 50µl IStd
3 Waschschrift 1	10 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,8
4 Waschschrift 2	4 ml MeOH / 0,25 M NH ₄ Ac (pH 8,8) 0,5:9,5 (v/v)
5 Elution	6 ml MeOH / H ₂ O 2:8 (v/v) 50 ml 0,2 M FA in MeOH / H ₂ O 1:1 (v/v)
6 Regenerierung	25 ml MeOH / H ₂ O 2:8 (v/v)

Konditionierung mit 45 ml 0,25 M NH₄Ac, pH 8,8 für neue Probenaufarbeitung oder

Lagern des Gels in 50 ml 0,1 M NaCl bei Beendigung der Probenaufarbeitung

Das Eluat wird bei 40°C am Rotationsverdampfer eingengt und das Residuum in 0,5 ml Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5) gelöst. Bis zur LC-MS-Analyse erfolgt die Lagerung bei -20°C.

Anm.: Bei jeder neu gepackten Säule der Mammakarzinom-Klassifizierungsstudie (vgl. 3.5) wurde zur Konditionierung des Systems zunächst ein blank (Urinprobe ersetzt durch 10 ml 0,25 M NH₄Ac, pH 8,8), danach 1 ml einer Eigenurinprobe sowie ein erneuter blank aufgearbeitet. Anschließend erfolgt die Probenaufarbeitung der für die Studie gesammelten Urinproben. Nach jeder zweiten Probe wurde ein erneuter blank-Durchlauf mit 10 ml 0,25 M NH₄Ac, pH 8,8 durchgeführt, um mögliche Verunreinigungen und Verschleppungen im System zu entfernen.

5.2.4 Zellkulturüberstände

5.2.4.1 Zellkulturen

- MCF-7-Zellen *American Type Culture Collection (Manassas, USA)*
- MCF-10A-Zellen *American Type Culture Collection (Manassas, USA)*

5.2.4.2 Chemikalien

vgl. 5.2.2.1

zusätzlich:

- Interner Standard Isoguanosin (0,25 mM / 7,08 mg Isoguanosin in 100 ml bidest. H₂O)
- Kulturmedium MCF-7-Zellen, Zusammensetzung:
 - RPMI 1640 Basalmedium *(Biochrome, Berlin)*
 - 10% fötales Kälberserum (FCS) *(Biochrome, Berlin)*
 - 1% Penicillin-Streptomycin *(Biochrome, Berlin)*
 - HEPES *(Invitrogen, Karlsruhe)*
- Kulturmedium MCF10A-Zellen, Zusammensetzung:
 - Mammary Epithelial Cell Basalmedium *(Promocell, Heidelberg)*
 - Supplement Pack Mammary Epithelial Cell Growth Medium mit Rinderhypophysenextrakt, human epidermal growth factor (EGF; rekombinant), Rinderinsulin und Hydrocortison *(Promocell, Heidelberg)*
 - 1% Penicillin-Streptomycin *(Biochrome, Berlin)*
 - Choleratoxin *(List Biological Laboratories, Campbell, USA)*

5.2.4.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

vgl. 5.2.2.2

5.2.4.4 Probenaufbereitung

Die Zellkulturüberstände sowie der ebenfalls bei -20°C gelagerte interne Standard werden im Wasserbad bei 25 °C aufgetaut und anschließend 15 sec am

Vortexer gemischt. Danach werden 10 ml des jeweiligen Zellkulturüberstands mit 100 µl internen Standard versetzt, mit 2,5%iger Ammoniaklösung auf pH 8,8 eingestellt und am Vortexer gemischt. Die anschließende affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgt nach dem in Tab. 32 dargestellten Schema. Das Eluat wird bei 40°C am Rotationsverdampfer eingengt und das Residuum in 0,5 ml Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5) gelöst. Bis zur LC-MS-Analyse erfolgt die Lagerung bei -20°C.

Tabelle 32: Schema der Affinitätschromatographie für 10 ml Zellkulturüberstand.

Schritt	Lösung
1 Konditionierung	45 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,8
2 Probe	10 ml Zellkulturüberstand + 100 µl IStd
3 Waschschritt 1	20 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,8
4 Waschschritt 2	6 ml MeOH / H ₂ O 1:1 (v/v)
5 Elution	50 ml 0,2 M FA in MeOH / H ₂ O 1:1 (v/v)
6 Regenerierung	25 ml MeOH / H ₂ O 1:1 (v/v)

Konditionierung mit 45 ml 0,25 M NH₄Ac, pH 8,8 für neue Probenaufarbeitung oder
Lagern des Gels in 50 ml 0,1 M NaCl bei Beendigung der Probenaufarbeitung

5.2.5 Plasma

5.2.5.1 Chemikalien

vgl. 5.2.2.1

zusätzlich:

- Interner Standard Isoguanosin (0,1 mM / 2,83 mg Isoguanosin in 100 ml bidest. H₂O)

5.2.5.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

vgl. 5.2.2.2

5.2.5.3 Probenaufbereitung

Nach der Blutabnahme werden die Vollblutproben zeitnah zentrifugiert (4000 g, 10 min, 20°C), um zelluläre Bestandteile abzutrennen. Das gewonnene Plasma wird abpipettiert und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Zur Aufbereitung werden die Proben im Wasserbad bei 25 °C aufgetaut und anschließend 15 sec am Vortexer gemischt. Je 5 ml Plasma werden entnommen und mit 50 µl internen Standard versetzt. Die anschließende Ausfällung der Plasmaproteine erfolgt mit 5 ml eiskaltem Acetonitril. Die Proben werden anschließend erneut zentrifugiert (19800 rpm, 5 min, 4 °C) und die Überstände abdekantiert. Das restliche Acetonitril wird am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand mit 0,25 M NH₄Ac-Lösung (pH 8,8) auf 10 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgt die Affinitätschromatographische Aufreinigung nach dem in Tab. 33 dargestellten Schema. Das erhaltene Eluat wird bei 40°C am Rotationsverdampfer eingengt und das Residuum in 0,5 ml Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5) gelöst. Bis zur LC-MS-Analyse erfolgt die Lagerung bei -20°C.

Tabelle 33: Schema der Affinitätschromatographie für 5 ml Plasma.

Schritt	Lösung
1	Konditionierung 45 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,8
2	Probe 5 ml Plasma* + 0,25 M NH ₄ Ac (pH 8,8) + 50µl IStd
3	Waschschritt 1 10 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,8
4	Waschschritt 2 10 ml MeOH / 0,25 M NH ₄ Ac (pH 8,8) 1:1 (v/v)
5	Elution 6 ml MeOH / H ₂ O 2:8 (v/v) 50 ml 0,2 M FA in MeOH / H ₂ O 1:1 (v/v)
6	Regenerierung 25 ml MeOH / H ₂ O 2:8 (v/v)

Konditionierung mit 45 ml 0,25 M NH₄Ac, pH 8,8 für neue Probenaufarbeitung oder

Lagern des Gels in 50 ml 0,1 M NaCl bei Beendigung der Probenaufarbeitung

* Fällung mit ACN und Einengen am Rotationsverdampfer

5.2.5.4 Herstellung der Standards für die matrixsimulierte Quantifizierung von U und Ψ

Zur Herstellung der Kalibrierstandards und Qualitätskontrollen wurde zunächst eine Stammlösung (SL) mit je 5,000 mg U bzw. Ψ in 20 ml bidest. Wasser angesetzt ($c = 0,25$ mg/ml). Diese Stammlösung wurde nach folgendem Schema zu neun Arbeitslösungen (AL) verdünnt.

Lsg.	Verdünnung mit bidest. Wasser	Konz*. [$\mu\text{g/ml}$]	Verdünnung mit blank Plasma	Konz. [ng/ml]
AL _{S1}	160 μl SL ad 5 ml	8	250 μl AL _{S1} ad 5ml	400
AL _{S2}	200 μl SL ad 5 ml	10	250 μl AL _{S2} ad 5ml	500
AL _{S3}	240 μl SL ad 5 ml	12	250 μl AL _{S3} ad 5ml	600
AL _{S4}	280 μl SL ad 5 ml	14	250 μl AL _{S4} ad 5ml	700
AL _{S5}	320 μl SL ad 5 ml	16	250 μl AL _{S5} ad 5ml	800
AL _{S6}	360 μl SL ad 5 ml	18	250 μl AL _{S6} ad 5ml	900
AL _{S7}	400 μl SL ad 5 ml	20	250 μl AL _{S7} ad 5ml	1000
AL _{S8}	560 μl SL ad 5 ml	28	250 μl AL _{S9} ad 5ml	1400
AL _{S9}	720 μl SL ad 5 ml	36	250 μl AL _{S10} ad 5ml	1800

* U und Ψ

Die Lösungen wurden so hergestellt, dass im letzten Verdünnungsschritt mit blank-Plasma immer ein gleichbleibend geringes Volumen an wässriger Arbeitslösung zugesetzt werden konnte. Auf diese Weise wurde die Matrixverfälschung minimiert und für alle Kalibrierstandards gleich gehalten.

5.2.6 Gewebe

5.2.6.1 Chemikalien

vgl. 5.2.2.1

zusätzlich:

- Interner Standard Isoguanosin (0,25 mM / 7,08 mg Isoguanosin in 100 ml bidest. H₂O)
- Perchlorsäure, 70%, p.a. *Merck (Darmstadt)*
- 1,1,2-Trichloro-trifluoroethan, spectr. grade *Acros (Geel, Belgien)*
- Trioctylamin, purum *Sigma (München)*
- Trichloressigsäure, p.a. *Fluka (München)*

5.2.6.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

vgl. 5.2.2.2

zusätzlich:

- Mini-Potter Gewebehomogenisator *B.Braun (Melsungen)*

5.2.6.3 Probenaufbereitung

Vom bei Raumtemperatur aufgetauten Gewebe werden 100-500 mg mit 2 ml 0,3 M Trichloressigsäure und 50 µl internen Standard versetzt. Das Gemisch wird anschließend mit einem Gewebehomogenisator homogenisiert und danach zentrifugiert (2500 g, 30 min, 4°C). Der klare Überstand wird abdekantiert und mit der gleichen Menge einer frisch angesetzten Lösung aus Trioctylamin und 1,1,2-Trichlorotrifluoroethan 1:2 (v/v) versetzt. Die erhaltene Lösung wird am Vortexer durchmischt und anschließend erneut zentrifugiert (1000 g, 5 min, 4°C). Aus dem gebildeten Zweiphasensystem wird die obere, wässrige Phase mit einer Pipette abgenommen und anschließend über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierzu werden 2,5 ml Gewebeextrakt mit 7,5 ml 0,25 M NH₄Ac-Lösung (pH 8,8) versetzt und nach dem Schema in Tab. 34 extrahiert. Das einrotierte Eluat wird in 0,5 ml Ammoniumformiatpuffer (pH 5, 5 mM) aufgenommen und bis zur LC-MS-Analyse bei -20°C gelagert.

Tabelle 34: Schema der Affinitätschromatographie für Gewebeproben.

Schritt	Lösung
1	Konditionierung 45 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,8
2	Probe 2,5 ml Gewebeextrakt + 7,5 ml 0,25 M NH ₄ Ac (pH 8,8) + 50µl IStd
3	Waschschritt 1 10 ml 0,25 M NH ₄ Ac, pH 8,8
4	Waschschritt 2 4 ml MeOH / 0,25 M NH ₄ Ac (pH 8,8) 0,5:9,5 (v/v)
5	Elution 6 ml MeOH / H ₂ O 2:8 (v/v) 50 ml 0,2 M FA in MeOH / H ₂ O 2:8 (v/v)
6	Regenerierung 25 ml MeOH / H ₂ O 2:8 (v/v)

Konditionierung mit 45 ml 0,25 M NH₄Ac, pH 8,8 für neue Probenaufarbeitung oder
Lagern des Gels in 50 ml 0,1 M NaCl bei Beendigung der Probenaufarbeitung

5.3 MS-Analytik

5.3.1 Chemikalien

- Ameisensäure, reinst *Merck (Darmstadt)*
- Ammoniumacetat, puriss. p.a., for HPLC *Fluka (München)*
- Ammoniumformiat, puriss. p.a. *Sigma (München)*
- Essigsäure, 100%, Normapur *VWR (Darmstadt)*
- Methanol, hypergrade für LC/MS *Merck (Darmstadt)*
- Bisdestilliertes Wasser aus hauseigener Anlage

5.3.2 Geräte

5.3.2.1 HPLC-Säule

LiChroCART Superspher[®] 100 RP-18 ec, 125 x 2 mm, 4 µm (*Merck, Darmstadt*)
mit Vorsäule LiChroCART Superspher[®] 100 RP-18 ec , 10 x 2 mm, 4 µm

5.3.2.2 HPLC-System

Eingesetzt wurde ein Agilent 1100 (*Agilent, Waldbronn*) HPLC-System, bestehend aus:

- G 1379 A, Vakuum Degaser
- G 1376 A, quaternäre LC-Pumpe
- G 1313 A, Autosampler
- G 1316 A, Säulenofen
- G 1315 B, Dioden Array Detektor (DAD)

5.3.2.3 Gradient für LC-MS-Methoden 1, 4, 5

Das Fließmittelsystem bestand aus (A) Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 5) und (B) MeOH / H₂O 3:2 (v/v) + 0,1% FA. Bei einer Flussrate von 125 µl/min kam der in Tab. 35 angegebene Gradient zum Einsatz.

Tabelle 35: Standard-Gradientensystem für die Trennung von *cis*-diol-Metaboliten.

Zeit in [min]	[%] Ammoniumformiatpuffer 5 mM, pH 5,0	[%] MeOH / H ₂ O (3:2, v/v) + 0,1% FA
0	98	2
30	85	15
40	40	60
50	98	2
60	98	2

5.3.2.4 Ionenfallen-Massenspektrometer

Eingesetzt wurde ein Esquire-HCT-Ionenfallenmassenspektrometer (*Bruker Daltonics, Bremen*). Die Datenerfassung erfolgte mit Bruker Esquire Control, Version 5.1, die Auswertung mit Bruker Data Analysis, Version 3.1.

5.3.3 Massenspektrometrische Methoden

5.3.3.1 Ionenfallenoptimierung mittels Spritzenpumpeninjektion von Standardverbindungen

	DHU	Ψ	C	U	m¹A	IsoG	I
<i>FM A/B [%]*</i>	97.2 / 2.8	97.1 / 2.9	96.2 / 3.8	95.3 / 4.7	93.5 / 6.5	92.4 / 7.6	91.2 / 8.8
<i>Capillary [V]</i>	-4500	-4500	-4000	-4500	-2150	-4000	-4200
<i>Skimmer [V]</i>	19.2	26.2	22.0	24.8	15.0	31.7	26.2
<i>Cap Exit [V]</i>	50.0	50.0	54.1	50.0	95.1	111.5	54.1
<i>Oct 1 [V]</i>	7.2	8.1	7.7	7.2	7.8	8.7	7.2
<i>Oct 2 [V]</i>	1.57	1.57	1.89	1.78	1.77	1.68	1.77
<i>Trap Drive</i>	33.7	35.0	34.7	34.3	37.6	38.5	35.9
<i>Oct Rf[Vpp]</i>	111.5	115.6	111.5	95.1	145.1	127.9	132.0
<i>Lens 1 [V]</i>	-3.7	-4.4	-3.2	-3.4	-2.2	-3.7	-3.4
<i>Lens 2 [V]</i>	-49.8	-58.7	-51.3	-51.3	-49.8	-57.2	-57.2
<i>L1 + L2 [V]</i>	-3.1 / -49.8	-2.7 / -58.7	-2.1 / -46.9	-2.3 / -41.0	-2.5 / -46.9	-2.0 / -42.5	-2.5 / -51.3
	m⁵U	G	m³U	X	m¹I	m¹G	ac⁴C
<i>FM A/B [%]</i>	91.0 / 9.0	90.5 / 9.5	88.8 / 11.2	88.7 / 11.3	86.8 / 13.2	86.2 / 13.8	85.4 / 14.6
<i>Capillary [V]</i>	-4155	-4050	-4500	-4500	-4000	-3800	-3000
<i>Skimmer [V]</i>	26.2	15.0	23.4	24.8	22.0	17.8	20.6
<i>Cap Exit [V]</i>	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	62.3	50.0
<i>Oct 1 [V]</i>	7.54	8.13	7.54	7.54	7.24	7.83	7.54
<i>Oct 2 [V]</i>	1.89	2.20	1.78	1.78	1.68	1.78	1.89
<i>Trap Drive</i>	35.3	38.5	36.1	37.0	36.8	39.4	38.6
<i>Oct Rf[Vpp]</i>	99.2	107.4	119.7	58.2	103.3	107.4	111.5
<i>Lens 1 [V]</i>	-3.9	-5.2	-3.9	-3.9	-3.2	-4.4	-4.2
<i>Lens 2 [V]</i>	-60.2	-64.6	-57.2	-58.7	-48.4	-64.6	-60.2
<i>L1 + L2 [V]</i>	-3.0 / -46.9	-2.9 / -66.1	-3.5 / -52.8	-3.0 / -52.8	-2.3 / -42.5	-3.2 / -51.3	-4.3 / -58.7
	m²G	A	m²G	m⁶A	t⁶A	MTA	
<i>FM A/B [%]</i>	85.0 / 15.0	80.6 / 19.4	49.2 / 50.8	48.0 / 52.0	58.8 / 41.2	67.5 / 32.5	
<i>Capillary [V]</i>	-4500	-2300	-4500	-3500	-4500	-2200	
<i>Skimmer [V]</i>	15.0	15.0	30.3	15.0	28.9	15.0	
<i>Cap Exit [V]</i>	62.3	82.8	86.9	86.9	99.18	70.49	
<i>Oct 1 [V]</i>	8.13	8.13	8.43	8.43	8.7	8.7	
<i>Oct 2 [V]</i>	1.89	1.47	1.57	1.68	1.99	1.57	
<i>Trap Drive</i>	38.6	35.8	40.3	38.4	47.0	40.2	
<i>Oct Rf[Vpp]</i>	144.3	119.7	127.9	119.7	152.5	136.1	
<i>Lens 1 [V]</i>	-3.4	-3.9	-3.4	-4.2	-4.2	-3.7	
<i>Lens 2 [V]</i>	-63.1	-57.2	-52.8	-57.2	-58.7	-66.1	
<i>L1 + L2 [V]</i>	-2.1 / -45.4	-3.6 / -52.8	-3.7 / -45.4	-3.5 / -54.3	-3.8 / -51.3	-3.1 / -60.2	

*FM A/B [%]: Zusammensetzung der LC-Fließmittel A und B (vgl. 5.3.2.3) bei Eintritt in die Ionenfalle. Aus den ermittelten Parametern für die einzelnen Standardverbindungen wurden jeweils die Mittelwerte gebildet und als optimierte Ionisierungsparameter für die MS-Methoden 1 und 5 eingesetzt.

5.3.3.2 LC-MS-Methode 1**Allgemeine Parameter**

<i>Mode</i>	Standard enhanced (8100 <i>m/z</i> /sec)
<i>Polarity</i>	Positive mode
<i>Nebulizer Gas</i>	45 psi
<i>Dry Gas</i>	9 l/min
<i>Dry Temperature</i>	350°C
<i>ICC Smart Target</i>	150000
<i>Max. Accu Time</i>	15 ms
<i>Scanbereich</i>	200 – 600 <i>m/z</i>
<i>Averages</i>	5
<i>Capillary</i>	- 4000 V
<i>End plate offset</i>	- 500 V
<i>Skimmer</i>	21,5 V
<i>Cap Exit</i>	65,8 V
<i>Oct 1 DC</i>	7,9 V
<i>Oct 2 DC</i>	1,76 V
<i>Trap Drive</i>	37,5
<i>Oct RF</i>	117,3 Vpp
<i>Lens 1</i>	- 3,0 V
<i>Lens 2</i>	- 50,9 V

MSⁿ-Parameter

<i>MS/MS Fragmentation Amplitude</i>	1,00 V
<i>No. of Precursor Ions</i>	2
<i>Threshold abs.</i>	50000
<i>Threshold rel.</i>	10 %
<i>Cut off</i>	45 %
<i>Smart Fragmentation</i>	30-200 %
<i>Averages</i>	5
<i>Isolation Width</i>	4,0
<i>ICC Smart Target</i>	150000
<i>Scanbereich</i>	30-470 <i>m/z</i>
<i>Exclusion List (m/z)</i>	244,5-247,5 / 281,5-285,5 / 297,5-298,5 / 311,5-312,5 / 390,0-392,0 / 412,5-413,5

MS^(n>2)-Parameter

<i>No. of Precursor Ions</i>	2
<i>Threshold abs.</i>	20000
<i>Threshold rel.</i>	10 %
<i>Fragmentation Amplitude</i>	1,30 V

5.3.3.3 MS-Methode 2

Die Messungen mit Spritzenpumpeninjektion wurden sowohl im positiven als auch im negativen Ionisierungsmodus mit der folgenden Basismethode durchgeführt. Abhängig von spezifischen Ionisierungs- und Fragmentierungseigenschaften der untersuchten Metaboliten erfolgte die manuelle Anpassung von cut off und fragmentation amplitude. Die Spritzenpumpe (*Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA*) wurde für die Messungen auf eine Flussrate von 300 µl/h eingestellt.

<i>Scanbereich</i>	30 – 500 <i>m/z</i> (abhängig von Muttermasse)
<i>MS mode</i>	Positive ionization, standard enhanced Negative ionization, standard enhanced
<i>Nebulizer Gas</i>	15-18 psi
<i>Dry Gas</i>	4-6 l/min
<i>Dry temperature</i>	250-280°C
<i>Capillary</i>	(-) 4000 V
<i>Optimizing Parameters</i>	Smart Parameter Setting SPS: <i>m/z</i> Muttermasse
<i>Cut off</i>	manuell
<i>Fragmentation amplitude</i>	manuell

5.3.3.4 LC-MS-Methode 3

Methode 3 wurde für die chromatographische Trennung und die massenspektrometrische Detektion der Hydroxypyridinstandards entwickelt.

Chromatographische Bedingungen

LC-MS-System: vgl. 5.3.2

Säule: Saphir C-8, 150 x 2 mm, 3 µm (*Alltech Grom, Rottenburg-Hailfingen*)

Flussrate: 125 µl/min

Zeit in [min]	[%] Ammoniumacetatpuffer 5 mM, pH 5,5	[%] MeOH / H ₂ O (3:2, v/v) + 0,1% HAc
0	99,5	0,5
15	99,5	0,5
25	0	100
35	99,5	0,5
45	99,5	0,5

Ionenfallenparameter

<i>Scanbereich</i>	50 – 400 <i>m/z</i>
<i>MS mode</i>	Positive ionization, standard enhanced
<i>Nebulizer Gas</i>	45 psi
<i>Dry Gas</i>	9 l/min
<i>Dry temperature</i>	350°C
<i>Cap voltage</i>	4000 kV
<i>Optimizing Parameters</i>	Smart Parameter Setting SPS: <i>m/z</i> 96

5.3.3.5 LC-MS-Methode 4

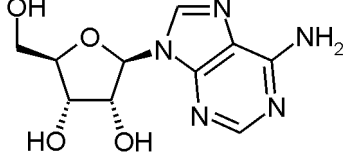
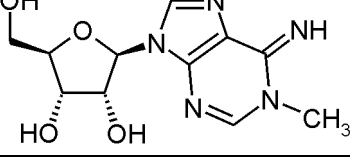
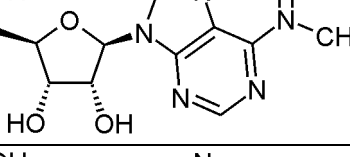
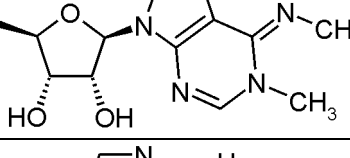
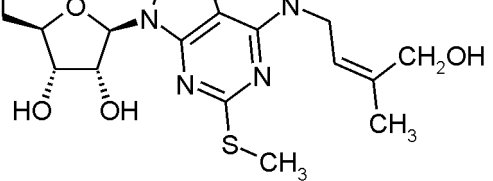
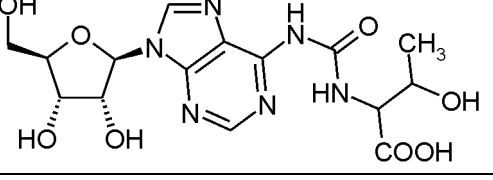
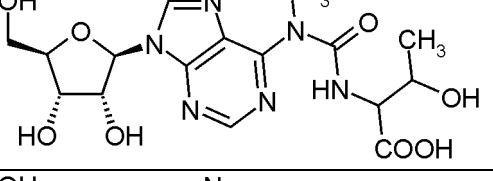
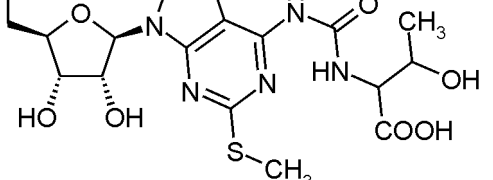
Parameter	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	Segment 5	Segment 6
<i>Mode</i>	Standard enhanced (8100 m/z/sec)					
<i>Polarity</i>	Positive mode					
<i>Neb Gas</i>	45 psi					
<i>Dry Gas</i>	9 l/min					
<i>Dry Temp</i>	350°C					
<i>ICC</i>	150000					
<i>Max. Accu Time</i>	15 ms					
<i>Scanbereich</i>	100 – 600 m/z					
<i>Averages</i>	5					
<i>Capillary</i>	- 4000 V					
<i>End plate offset</i>	- 500 V					
<i>Skimmer [V]</i>	40	40	40	40	40	40
<i>Cap Exit [V]</i>	92.8	110.4	92.6	92.7	92.7	113.3
<i>Oct 1 DC [V]</i>	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
<i>Oct 2 DC [V]</i>	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
<i>Trap Drive</i>	35.5	36.5	39.0	40.8	40.8	39.0
<i>Oct RF [Vpp]</i>	141.2	144.4	144.4	149.4	149.4	152.4
<i>Lens 1 [V]</i>	-5.0	-5.0	-5.0	-5.0	-5.0	-5.0
<i>Lens 2 [V]</i>	-60.0	-60.0	-60.0	-60.0	-60.0	-60.0
<i>Frag Amp</i>	0.8	1.0	0.8	0.8	1.2	1.2
<i>Cut Off [%]</i>	40	47	47	47	47	47
<i>Pref. Masses</i>	273,245, 255,258, 247,244	282,284, 259,269, 271	285,269, 271, 259, 284	259, 285	286, 268, 283, 298, 376,	312, 282, 298, 326, 459, 427, 413
MSⁿ-Parameter						
<i>Precursor Ions</i>	2	2	2	2	2	2
<i>Thresh. abs.</i>	20000	100000	100000	100000	20000	20000
<i>Thresh. rel. [%]</i>	10	20	20	20	20	20
<i>Smart Frag [%]</i>	30-200	30-200	30-200	30-200	30-200	30-200
<i>Averages</i>	5	5	5	5	5	5
<i>Isolation Width</i>	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
<i>ICC</i>	150000	150000	150000	150000	150000	150000
<i>Scanbereich</i>	50-470	50-470	50-470	50-470	50-470	50-470
MS^(n>2)-Parameter						
<i>Precursor Ions</i>	1	1	1	2	1	1
<i>Thresh. abs.</i>	5000	20000	50000	50000	50000	50000
<i>Thresh. rel. [%]</i>	10	10	10	10	10	10
<i>Frag Amp</i>	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3

5.3.3.6 LC-MS-Methode 5

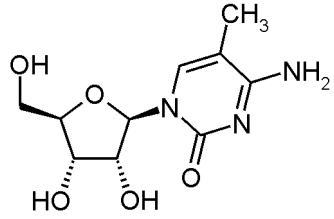
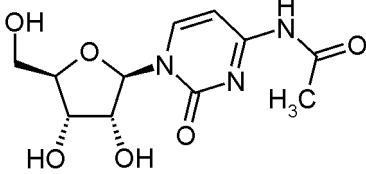
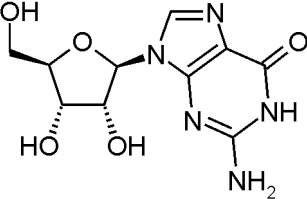
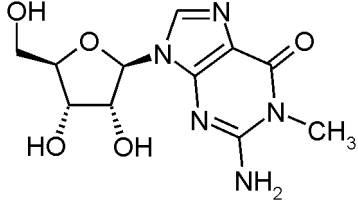
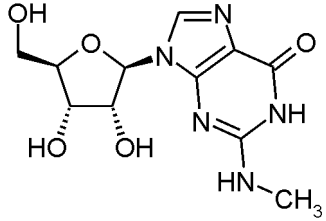
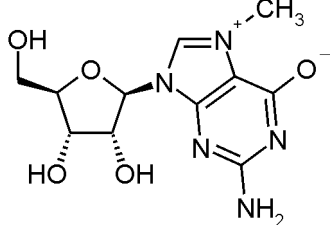
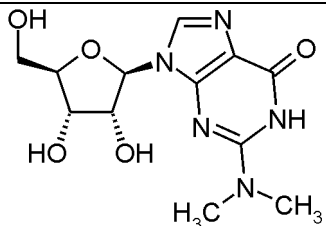
Diese LC-MS-Methode wurde für die quantitative Erfassung der identifizierten Metaboliten optimiert.

<i>Mode</i>	Standard enhanced (8100 <i>m/z</i> /sec)
<i>Polarity</i>	Positive mode
<i>Nebulizer Gas</i>	45 psi
<i>Dry Gas</i>	9 l/min
<i>Dry Temperature</i>	350°C
<i>ICC Smart Target</i>	150000
<i>Max. Accu Time</i>	15 ms
<i>Scanbereich</i>	200 – 600 <i>m/z</i>
<i>Averages</i>	5
<i>Capillary</i>	- 4000 V
<i>End plate offset</i>	- 500 V
<i>Skimmer</i>	21,5 V
<i>Cap Exit</i>	65,8 V
<i>Oct 1 DC</i>	7,9 V
<i>Oct 2 DC</i>	1,76 V
<i>Trap Drive</i>	37,5
<i>Oct RF</i>	117,3 Vpp
<i>Lens 1</i>	- 3,0 V
<i>Lens 2</i>	- 50,9 V

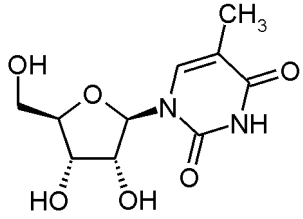
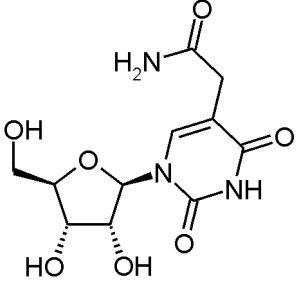
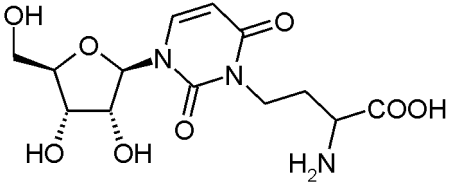
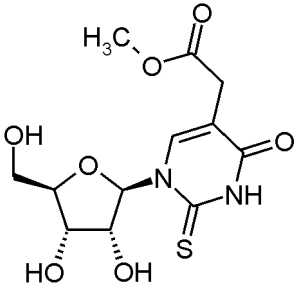
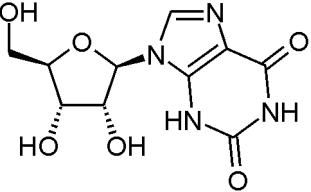
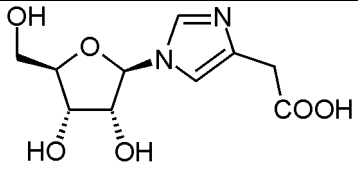
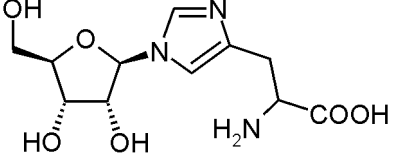
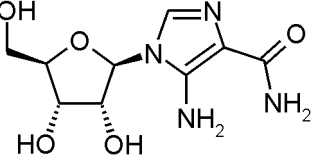
6 Metabolitenverzeichnis

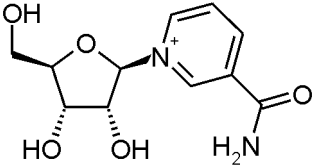
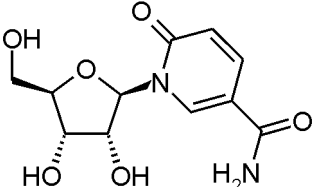
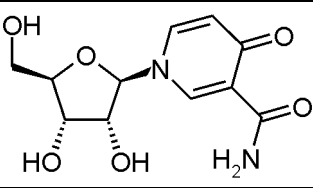
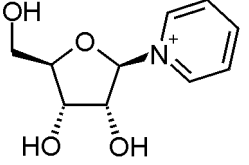
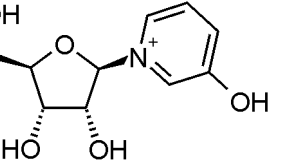
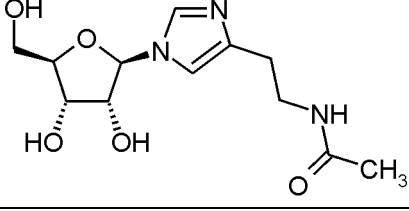
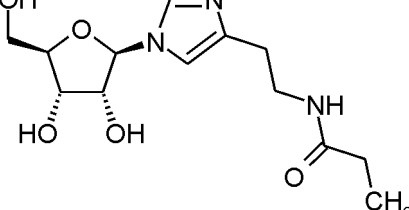
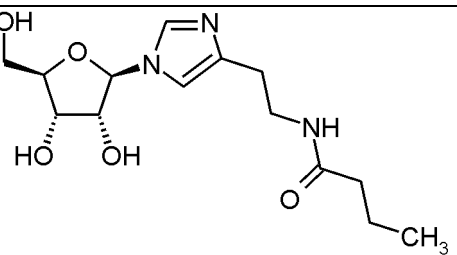
Metabolit	Abkürzung	Strukturformel
Adenosin	A	
1-Methyladenosin	m ¹ A	
N ⁶ -Methyladenosin	m ⁶ A	
1,N ⁶ -Dimethyladenosin	m ⁶ ₁ A	
2-Methylthio-N ⁶ -(cis-hydroxyisopentenyl)-adenosin	ms ² io ⁶ A	
N ⁶ -Threonylcarbamoyladenosin	t ⁶ A	
N ⁶ -Methyl-N ⁶ -threonylcarbamoyladenosin	m ⁶ t ⁶ A	
2-Methylthio-N ⁶ -threonylcarbamoyladenosin	ms ² t ⁶ A	

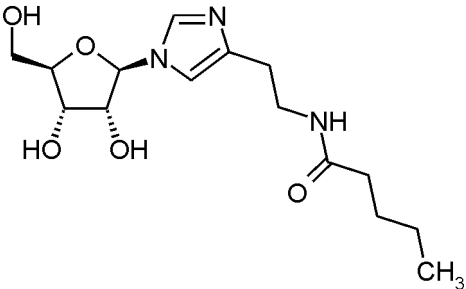
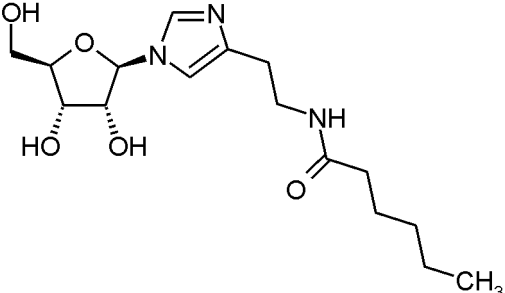
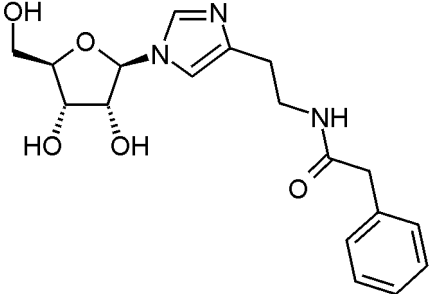
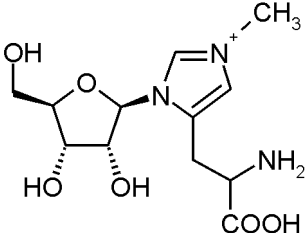
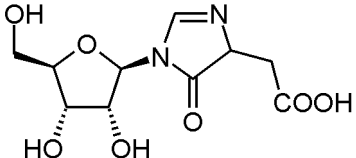
Metabolit	Abkürzung	Strukturformel
5'-Deoxy-5'-methylthioadenosin	MTA	
5'-Deoxy-5'-methylthioadenosinsulfoxid	MTA-SO	
N ⁶ -Succinyladenosin	N⁶-SAR	
S-Adenosylhomocystein	SAH	
S-Adenosylmethionin	SAM	
Decarboxyliertes S-Adenosylmethionin	dcSAM	
Cytidin	C	
3-Methylcytidin	m³C	

Metabolit	Abkürzung	Strukturformel
5-Methylcytidin	m^5C	
N^4 -Acetylcytidin	ac^4C	
Guanosin	G	
1-Methylguanosen	m^1G	
N^2 -Methylguanosen	m^2G	
7-Methylguanosen	m^7G	
N^2,N^2 -Dimethylguanosen	m^2_2G	

Metabolit	Abkürzung	Strukturformel
$N^2,N^2,7$ -Trimethylguanodin	$m^{2,2,7}G$	
Isoguanodin	IsoG	
Inosin	I	
1-Methylinosin	m^1I	
Uridin	U	
5,6-Dihydrouridin	DHU	
Pseudouridin	Ψ	
3-Methyluridin	m^3U	

Metabolit	Abkürzung	Strukturformel
5-Methyluridin	m⁵U	
5-Carbamoylmethyluridin	ncm⁵U	
3-(3-Amino-3-carboxypropyl)-uridin	acp³U	
5-Methoxycarbonylmethyl-2-thiouridin	mcm⁵s²U	
Xanthosin	X	
1-Ribosyl-4-carboxymethyl-imidazol	IAA-R	
1-Ribosyl-L-histidin	His-R	
1-Ribosyl-4-carbamoyl-5-amino-imidazol	AICA Ribosid	

Metabolit	Abkürzung	Strukturformel
1-Ribosyl-3-carbamoyl-pyridinium	NA-R	
1-Ribosyl-5-carbamoyl-2-oxo-pyridin	2,5-PCNR	
1-Ribosyl-3-carbamoyl-4-oxo-pyridin	3,4-PCNR	
1-Ribosyl-pyridinium	P-1	
1-Ribosyl-3-hydroxy-pyridinium	P-2	
1-Ribosyl-4-ethyl-N-(methylcarbonylamino)-imidazol	I-1	
1-Ribosyl-4-ethyl-N-(ethylcarbonylamino)-imidazol	I-2	
1-Ribosyl-4-ethyl-N-(propylcarbonylamino)-imidazol	I-3	

Metabolit	Abkürzung	Strukturformel
1-Ribosyl-4-ethyl-N-(butylcarbonylamino)-imidazol	I-4	
1-Ribosyl-4-ethyl-N-(pentylcarbonylamino)-imidazol	I-5	
1-Ribosyl-4-ethyl-N-(benzylcarbonyl)-aminoimidazol	I-6	
1-Ribosyl-3-methyl-5-(2-aminocarboxyethyl)-imidazolium	I-7	
1-Ribosyl-4-carboxymethyl-5-oxoimidazol	I-8	

Anm.: Die Kürzel der modifizierten Nucleoside und sonstiger literaturbekannter Metaboliten erfolgen analog zu den gängigen Abkürzungen. Die in dieser Arbeit neu identifizierten Metaboliten werden mit den Symbolen P-X für Pyridine bzw. I-X für Imidazole abgekürzt.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/141.php, 2008.
- [2] Robert Koch Institut und Statistisches Bundesamt: Gesundheitsbericht des Bundes. Gesundheit in Deutschland, Berlin, 2006.
- [3] World Health Organization (WHO), WHO-Studie Krebs gesamt ICD 140.208 ohne 173, 2008.
- [4] Becker, N. and Wahrendorf, J. Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990. 1998. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag. Fortschreibung im Internet: www.krebsatlas.de.
- [5] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. E., *Molekulare Zellbiologie*, 4 ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 2001
- [6] Dockhorn-Dworniczak, B., Simon, R., Brinkschmidt, C., Poremba, C., Böcker, W.: Molekularbiologie maligner Tumorerkrankungen, *Onkologe*, 1998, 4, 671-681.
- [7] Yokota, J.: Tumor progression and metastasis, *Carcinogenesis*, 2000, 21 (3), 497-503.
- [8] Poremba, C., Simon, R., Boecker, W., Dockhorn-Dworniczak, B.: Molekulare Ursachen der Tumorentstehung, *Onkologe*, 1999, 5, 847-854.
- [9] Brandt, B. H.: Molekulare Diagnostik von malignen Tumorerkrankungen, *Onkologe*, 2002, 8, 522-531.
- [10] Polsky, D., Cordon-Cardo, C.: Oncogenes in melanoma, *Oncogene*, 2003, 22 (20), 3087-3091.
- [11] Futreal, P. A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., Stratton, M. R.: A census of human cancer genes, *Nat Rev Cancer*, 2004, 4 (3), 177-183.
- [12] Duffy, M. J.: Cellular oncogenes and suppressor genes as prognostic markers in cancer, *Clin Biochem*, 1993, 26 (6), 439-447.
- [13] Loeb, L. A.: A mutator phenotype in cancer, *Cancer Res*, 2001, 61 (8), 3230-3239.
- [14] Hanahan, D., Weinberg, R. A.: The hallmarks of cancer, *Cell*, 2000, 100 (1), 57-70.
- [15] Avilion, A. A., Piatyszek, M. A., Gupta, J., Shay, J. W., Bacchetti, S., Greider, C. W.: Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues, *Cancer Res*, 1996, 56 (3), 645-650.

- [16] Sharma, A., Rajappa, M., Saxena, A., Sharma, M.: Telomerase activity as a tumor marker in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer, *Mol Diagn Ther*, 2007, 11 (3), 193-201.
- [17] Shay, J. W.: Meeting report: the role of telomeres and telomerase in cancer, *Cancer Res*, 2005, 65 (9), 3513-3517.
- [18] Miura, N., Kanamori, Y., Takahashi, M., Sato, R., Tsukamoto, T., Takahashi, S., Harada, T., Sano, A., Shomori, K., Harada, T., Kigawa, J., Ito, H., Terakawa, N., Hasegawa, J., Shiota, G.: A diagnostic evaluation of serum human telomerase reverse transcriptase mRNA as a novel tumor marker for gynecologic malignancies, *Oncol Rep*, 2007, 17 (3), 541-548.
- [19] Zetter, B. R.: Angiogenesis and tumor metastasis, *Annu Rev Med*, 1998, 49, 407-424.
- [20] Carmeliet, P., Jain, R. K.: Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature*, 2000, 407 (6801), 249-257.
- [21] Wittekind, C., Meyer, H. J., Bootz, F., *UICC: TNM Klassifikation maligner Tumoren*, 6 ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2006
- [22] Hermanek, P., Seib, H., Wittekind, C.: TNM - Aktuell Teil 1. Klinische Bedeutung und gegenwärtiger Stand, *Pathologe*, 1997, 18, 153-159.
- [23] Lamerz, R., Stieber, P.: Tumour markers, *Dtsch Med Wochenschr*, 2004, 129 (50), 2722-2730.
- [24] Fiebiger, W., Wiltshcke, C.: Tumor markers, *Acta Med Austriaca*, 2001, 28 (2), 33-37.
- [25] Fateh-Moghadam, A., Stieber, P.: Criteria for the use of tumor markers. 1: Quality assurance--characteristics of the most important tumor markers, *Fortschr Med*, 1996, 114 (6), 30-33.
- [26] Baker, S. G.: The central role of receiver operating characteristic (ROC) curves in evaluating tests for the early detection of cancer, *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95 (7), 511-515.
- [27] Richter, K., Lange, S.: Methods for evaluating diagnosis, *Internist*, 1997, 38 (4), 325-336.
- [28] Becker, N.: Screening from the epidemiological viewpoint, *Radiologe*, 2002, 42 (8), 592-600.
- [29] Hartwell, L., Mankoff, D., Paulovich, A., Ramsey, S., Swisher, E.: Cancer biomarkers: a systems approach, *Nat Biotechnol*, 2006, 24 (8), 905-908.
- [30] Hernandez, J., Thompson, I. M.: Prostate-specific antigen: a review of the validation of the most commonly used cancer biomarker, *Cancer*, 2004, 101 (5), 894-904.
- [31] Fateh-Moghadam, V. A., Stieber, P.: Criteria for using tumor markers. 2: Indications and interpretation, *Fortschr Med*, 1996, 114 (7), 38-40.

-
- [32] Pritzker Kenneth, P. H.: Cancer biomarkers: easier said than done, *Clin Chem*, 2002, 48 (8), 1147-1150.
- [33] Negm, R. S., Verma, M., Srivastava, S.: The promise of biomarkers in cancer screening and detection, *Trends Mol Med*, 2002, 8 (6), 288-293.
- [34] Srinivas, P. R., Kramer, B. S., Srivastava, S.: Trends in biomarker research for cancer detection, *Lancet Oncol*, 2001, 2 (11), 698-704.
- [35] Zhang, X., Li, L., Wei, D., Yap, Y., Chen, F.: Moving cancer diagnostics from bench to bedside, *Trends Biotechnol*, 2007, 25 (4), 166-173.
- [36] Oda, S., Maehara, Y., Ikeda, Y., Oki, E., Egashira, A., Okamura, Y., Takahashi, I., Kakeji, Y., Sumiyoshi, Y., Miyashita, K., Yamada, Y., Zhao, Y., Hattori, H., Taguchi, K., Ikeuchi, T., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M., Karran, P., Yoshida, M. A.: Two modes of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability, *Nucleic Acids Res*, 2005, 33 (5), 1628-1636.
- [37] Thibodeau, S. N., Bren, G., Schaid, D.: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon, *Science*, 1993, 260 (5109), 816-819.
- [38] Caldes, T., Perez-Segura, P., Tosar, A., de La, H. M., az-Rubio, E.: Microsatellite instability correlates with negative expression of estrogen and progesterone receptors in sporadic breast cancer, *Teratog Carcinog Mutagen*, 2000, 20 (5), 283-291.
- [39] Schneider, A., Borgnat, S., Lang, H., Regine, O., Lindner, V., Kassem, M., Saussine, C., Oudet, P., Jacqmin, D., Gaub, M. P.: Evaluation of microsatellite analysis in urine sediment for diagnosis of bladder cancer, *Cancer Res*, 2000, 60 (16), 4617-4622.
- [40] Erichsen, H. C., Chanock, S. J.: SNPs in cancer research and treatment, *Br J Cancer*, 2004, 90 (4), 747-751.
- [41] Lindblad-Toh, K., Tanenbaum, D. M., Daly, M. J., Winchester, E., Lui, W. O., Villapakam, A., Stanton, S. E., Larsson, C., Hudson, T. J., Johnson, B. E., Lander, E. S., Meyerson, M.: Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays, *Nat Biotechnol*, 2000, 18 (9), 1001-1005.
- [42] Takakura, S., Kohno, T., Shimizu, K., Ohwada, S., Okamoto, A., Yokota, J.: Somatic mutations and genetic polymorphisms of the PPP1R3 gene in patients with several types of cancers, *Oncogene*, 2000, 19 (6), 836-840.
- [43] Verma, M., Manne, U.: Genetic and epigenetic biomarkers in cancer diagnosis and identifying high risk populations, *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006, 60 (1), 9-18.
- [44] Drach, J., Kaufmann, H., Urbauer, E., Schreiber, S., Ackermann, J., Huber, H.: The biology of multiple myeloma, *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, 126 (8), 441-447.
- [45] Muller, H. M., Fiegl, H., Widschwendter, A., Widschwendter, M.: Prognostic DNA methylation marker in serum of cancer patients, *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1022, 44-49.
- [46] Muller, H. M., Oberwalder, M., Fiegl, H., Morandell, M., Goebel, G., Zitt, M., Muhlthaler, M., Ofner, D., Margreiter, R., Widschwendter, M.: Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening?, *Lancet*, 2004, 363 (9417), 1283-1285.

- [47] Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., Lander, E. S.: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring, *Science*, 1999, 286 (5439), 531-537.
- [48] Lee, J., Eom, E., Kim, D., Ha-Lee, Y. M., Lee, D.: Analysis of gene expression profiles of gastric normal and cancer tissues by SAGE, *Genomics*, 2003, 82 (1), 78-85.
- [49] Xu, L. L., Su, Y. P., Labiche, R., Segawa, T., Shanmugam, N., McLeod, D. G., Moul, J. W., Srivastava, S.: Quantitative expression profile of androgen-regulated genes in prostate cancer cells and identification of prostate-specific genes, *Int J Cancer*, 2001, 92 (3), 322-328.
- [50] Srinivas, P. R., Verma, M., Zhao, Y., Srivastava, S.: Proteomics for cancer biomarker discovery, *Clin Chem*, 2002, 48 (8), 1160-1169.
- [51] Lim, Y., Wong, C. Y., Ooi, L. L., Druker, B. J., Epstein, R. J.: Selective tyrosine hyperphosphorylation of cytoskeletal and stress proteins in primary human breast cancers: implications for adjuvant use of kinase-inhibitory drugs, *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (12 Pt 1), 3980-3987.
- [52] Zhao, J., Qiu, W., Simeone, D. M., Lubman, D. M.: N-linked glycosylation profiling of pancreatic cancer serum using capillary liquid phase separation coupled with mass spectrometric analysis, *J Proteome Res*, 2007, 6 (3), 1126-1138.
- [53] Diamandis, E. P.: Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations, *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3 (4), 367-378.
- [54] Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Conrads, T. P., Felschow, D.: The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification, *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292 (3), 587-592.
- [55] Paweletz, C. P., Gillespie, J. W., Ornstein, D. K., Simone, N. L., Brown, M. R., Cole, K. A., Wang, Q. H., Huang, J., Hu, N., Yip, T. T., Rich, W. E., Kohn, E. C., Linehan, W. M., Weber, T., Taylor, P., Emmert-Buck, M. R., Liotta, L. A., Petricoin, E. F., III: Rapid protein display profiling of cancer progression directly from human tissue using a protein biochip, *Drug Dev Res*, 2000, 49 (1), 34-42.
- [56] Vlahou, A., Schellhammer, P. F., Mendrinos, S., Patel, K., Kondylis, F., I, Gong, L., Nasim, S., Wright Jr, G. L., Jr.: Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine, *Am J Pathol*, 2001, 158 (4), 1491-1502.
- [57] Wulfkuhle, J. D., McLean, K. C., Paweletz, C. P., Sgroi, D. C., Trock, B. J., Steeg, P. S., Petricoin, E. F., III: New approaches to proteomic analysis of breast cancer, *Proteomics*, 2001, 1 (10), 1205-1215.
- [58] Kind, T., Tolstikov, V., Fiehn, O., Weiss, R. H.: A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer, *Anal Biochem*, 2007, 363 (2), 185-195.
- [59] Gamache, P. H., Meyer, D. F., Granger, M. C., Acworth, I. N.: Metabolomic applications of electrochemistry/Mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004, 15 (12), 1717-1726.

- [60] Villas-Boas, S. G., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J., Nielsen, J.: Mass spectrometry in metabolome analysis, *Mass Spectrom Rev*, 2005, 24 (5), 613-646.
- [61] Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., Baganz, F.: Systematic functional analysis of the yeast genome, *Trends Biotechnol*, 1998, 16 (9), 373-378.
- [62] Dunn, W. B., Bailey Nigel, J. C., Johnson, H. E.: Measuring the metabolome: current analytical technologies, *Analyst*, 2005, 130 (5), 606-625.
- [63] Nicholson, J. K., Lindon, J. C., Holmes, E.: 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, *Xenobiotica*, 1999, 29 (11), 1181-1189.
- [64] Ryan, D., Robards, K.: Metabolomics: The greatest omics of them all?, *Anal Chem*, 2006, 78 (23), 7954-7958.
- [65] Suzuki, H., Sasaki, R., Ogata, Y., Nakamura, Y., Sakurai, N., Kitajima, M., Takayama, H., Kanaya, S., Aoki, K., Shibata, D., Saito, K.: Metabolic profiling of flavonoids in *Lotus japonicus* using liquid chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Phytochemistry*, 2008, 69 (1), 99-111.
- [66] Chen, F., Duran, A. L., Blount, J. W., Sumner, L. W., Dixon, R. A.: Profiling phenolic metabolites in transgenic alfalfa modified in lignin biosynthesis, *Phytochemistry*, 2003, 64 (5), 1013-1021.
- [67] Gao, H., Materne, O. L., Howe, D. L., Brummel, C. L.: Method for rapid metabolite profiling of drug candidates in fresh hepatocytes using liquid chromatography coupled with a hybrid quadrupole linear ion trap, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21 (22), 3683-3693.
- [68] Nobilis, M., Pour, M., Senel, P., Pavlik, J., Kunes, J., Voprsalova, M., Kolarova, L., Holcapek, M.: Metabolic profiling of a potential antifungal drug, 3-(4-bromophenyl)-5-acetoxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-one, in mouse urine using high-performance liquid chromatography with UV photodiode-array and mass spectrometric detection, *J Chromatogr B*, 2007, 853 (1-2), 10-19.
- [69] Simon, M., McClanahan, R. H., Shah, J. F., Repko, T., Modi, N. B.: Metabolism of [3H]pentosan polysulfate sodium (PPS) in healthy human volunteers, *Xenobiotica*, 2005, 35 (8), 775-784.
- [70] Nicholls, S. J., Wang, Z., Koeth, R., Levison, B., DeFraino, B., Dzavik, V., Griffith, O. W., Hathaway, D., Panza, J. A., Nissen, S. E., Hochman, J. S., Hazen, S. L.: Metabolic profiling of arginine and nitric oxide pathways predicts hemodynamic abnormalities and mortality in patients with cardiogenic shock after acute myocardial infarction, *Circulation*, 2007, 116 (20), 2315-2324.
- [71] Sabatine, M. S., Liu, E., Morrow, D. A., Heller, E., McCarroll, R., Wiegand, R., Berriz, G. F., Roth, F. P., Gerszten, R. E.: Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia, *Circulation*, 2005, 112 (25), 3868-3875.
- [72] Yi, L., He, J., Liang, Y., Yuan, D., Chau, F.: Plasma fatty acid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on GC/MS and PLS-LDA, *FEBS Lett*, 2006, 580 (30), 6837-6845.

- [73] Baumbach, J. I., Vautz, W., Ruzsanyi, V., Freitag, L.: Early detection of lung cancer: Metabolic profiling of human breath with ion mobility spectrometers, *Modern Biopharmaceuticals*, 2005, 3, 1343-1358.
- [74] Perroud, B., Lee, J., Valkova, N., Dhirapong, A., Lin, P., Fiehn, O., Kultz, D., Weiss, R. H.: Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling, *Mol Cancer*, 2006, 5, 64.
- [75] Nemoto, T., Ando, I., Kataoka, T., Arifuku, K., Kanazawa, K., Natori, Y., Fujiwara, M.: NMR metabolic profiling combined with two-step principal component analysis for toxin-induced diabetes model rat using urine, *J Toxicol Sci*, 2007, 32 (4), 429-435.
- [76] Tarachiwin, L., Ute, K., Kobayashi, A., Fukusaki, E.: ¹H NMR based metabolic profiling in the evaluation of Japanese green tea quality, *J Agric Food Chem*, 2007, 55 (23), 9330-9336.
- [77] Connor, S. C., Gray, R. A., Hodson, M. P., Clayton, N. M., Haselden, J. N., Chessell, I. P., Bountra, C.: An NMR-based metabolic profiling study of inflammatory pain using the rat FCA model, *Metabolomics*, 2007, 3 (1), 29-39.
- [78] Want, E. J., Cravatt, B. F., Siuzdak, G.: The expanding role of mass spectrometry in metabolite profiling and characterization, *ChemBiochem*, 2005, 6 (11), 1941-1951.
- [79] Chace, D. H.: Mass spectrometry in the clinical laboratory, *Chem Rev*, 2001, 101 (2), 445-477.
- [80] Chace, D. H., Millington, D. S., Terada, N., Kahler, S. G., Roe, C. R., Hofman, L. F.: Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry, *Clin Chem*, 1993, 39 (1), 66-71.
- [81] Eddy, S. R.: Non-coding RNA genes and the modern RNA world, *Nat Rev Genet*, 2001, 2 (12), 919-929.
- [82] Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., Tollervey, D.: Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis, *EMBO J*, 1999, 18 (19), 5399-5410.
- [83] Newman, A. J.: The role of U5 snRNP in pre-mRNA splicing, *EMBO J*, 1997, 16 (19), 5797-5800.
- [84] Tollervey, D., Kiss, T.: Function and synthesis of small nucleolar RNAs, *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9 (3), 337-342.
- [85] Wienholds, E., Plasterk Ronald, H. A.: MicroRNA function in animal development, *FEBS Lett*, 2005, 579 (26), 5911-5922.
- [86] Eulalio, A., Huntzinger, E., Izaurralde, E.: Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing, *Cell*, 2008, 132 (1), 9-14.
- [87] Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, 1993, 75 (5), 843-854.

- [88] Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C. M.: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (9), 2999-3004.
- [89] Calin, G. A., Croce, C. M.: MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale, *Cancer Res*, 2006, 66 (15), 7390-7394.
- [90] Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., varez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., Golub, T. R.: MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature*, 2005, 435 (7043), 834-838.
- [91] Iorio, M., V, Ferracin, M., Liu, C., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Menard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., Croce, C. M.: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer, *Cancer Res*, 2005, 65 (16), 7065-7070.
- [92] Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T.: Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival, *Cancer Res*, 2004, 64 (11), 3753-3756.
- [93] Grosjean, H., Motorin, Y., Morin, A., in: *Modification and Editing of RNA*, (Eds.: Grosjean, H., Benne, R.), American Society for Microbiology, Washington, 1998, pp. 21-45.
- [94] The RNA Modification Database, <http://library.med.utah.edu/RNAmods/>, 2008.
- [95] Bjork, G. R., Ericson, J. U., Gustafsson, C. E., Hagervall, T. G., Jonsson, Y. H., Wikstrom, P. M.: Transfer RNA modification, *Annu Rev Biochem*, 1987, 56, 263-287.
- [96] Persson, B. C.: Modification of tRNA as a regulatory device, *Mol Microbiol*, 1993, 8 (6), 1011-1016.
- [97] Konevega, A. L., Soboleva, N. G., Makhno, V., I, Semenov, Y. P., Wintermeyer, W., Rodnina, M., V, Katunin, V., I: Purine bases at position 37 of tRNA stabilize codon-anticodon interaction in the ribosomal A site by stacking and Mg²⁺-dependent interactions, *RNA*, 2004, 10 (1), 90-101.
- [98] Lane, B. G., Ofengand, J., Gray, M. W.: Pseudouridine and O²'-methylated nucleosides. Significance of their selective occurrence in rRNA domains that function in ribosome-catalyzed synthesis of the peptide bonds in proteins, *Biochimie*, 1995, 77 (1-2), 7-15.
- [99] Ofengand, J., Fournier, T. M., in: *Modification and Editing of RNA*, (Eds.: Grosjean, H., Benne, R.), American Society for Microbiology, Washington, 1998, pp. 229-254.
- [100] Carroll, S. M., Narayan, P., Rottman, F. M.: N⁶-methyladenosine residues in an intron-specific region of prolactin pre-mRNA, *Mol Cell Biol*, 1990, 10 (9), 4456-4465.
- [101] Camper, S. A., Albers, R. J., Coward, J. K., Rottman, F. M.: Effect of undermethylation on mRNA cytoplasmic appearance and half-life, *Mol Cell Biol*, 1984, 4 (3), 538-543.

- [102] Bokar, J. A., Rottman, F. M., in: *Modification and Editing of RNA*, (Eds.: Grosjean, H., Benne, R.), American Society for Microbiology, Washington, 1998, pp. 183-199.
- [103] Rhoads, R. E., Hellmann, G. M., Remy, P., Ebel, J. P.: Translational recognition of messenger ribonucleic acid caps as a function of pH, *Biochemistry*, 1983, 22 (26), 6084-6088.
- [104] Lamond, A. L.: The trimethyl-guanosine cap is a nuclear targeting signal for snRNPs, *Trends Biochem Sci*, 1990, 15 (12), 451-452.
- [105] Massenet, S., Mouglin, A., Branlant, C., in: *Modification and Editing of RNA*, (Eds.: Grosjean, H., Benne, R.), American Society for Microbiology, Washington, 1998, pp. 201-227.
- [106] Löffler, G., Petrides, P. E., Heinrich, P. C., *Biochemie und Pathobiochemie*, 8 ed., Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007
- [107] Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G., Gerok, W., *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15 ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2005
- [108] Mandel, L. R., Srinivasan, P. R., Borek, E.: Origin of urinary methylated purines, *Nature*, 1966, 209 (5023), 586-588.
- [109] Xu, G., Liebich, H.: Normal and modified nucleosides in urine as potential tumor markers determined by MEKC and HPLC, *Am Clin Lab*, 2001, 20 (2), 22-32.
- [110] Liebich, H. M., Muller-Hagedorn, S., Bacher, M., Scheel-Walter, H.-G., Lu, X., Fricken-schmidt, A., Kammerer, B., Kim, K.-R., Gerard, H.: Age-dependence of urinary normal and modified nucleosides in childhood as determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B*, 2005, 814 (2), 275-283.
- [111] 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, *Clin Chim Acta*, 1993, 217 (2), 221-223.
- [112] Mitchell, E. P., Evans, L., Schultz, P., Madsen, R., Yarbrow, J. W., Gehrke, C. W., Kuo, K.: Modified nucleosides in human serum, *J Chromatogr*, 1992, 581 (1), 31-40.
- [113] Tebib, J. G., Reynaud, C., Cedoz, J. P., Letroublon, M. C., Niveleau, A.: Relationship between urinary excretion of modified nucleosides and rheumatoid arthritis process, *Br J Rheumatol*, 1997, 36 (9), 990-995.
- [114] Nakano, K., Nakao, T., Schram, K. H., Hammargren, W. M., McClure, T. D., Katz, M., Petersen, E.: Urinary excretion of modified nucleosides as biological marker of RNA turnover in patients with cancer and AIDS, *Clin Chim Acta*, 1993, 218 (2), 169-183.
- [115] Tormey, D. C., Waalkes, T. P., Gehrke, C. W.: Biological markers in breast carcinoma--clinical correlations with pseudouridine, N2,N2-dimethylguanosine, and 1-methylinosine, *J Surg Oncol*, 1980, 14 (3), 267-273.
- [116] Heldman, D. A., Grever, M. R., Speicher, C. E., Trewyn, R. W.: Urinary excretion of modified nucleosides in chronic myelogenous leukemia, *J Lab Clin Med*, 1983, 101 (5), 783-792.

- [117] Waalkes, T. P., Abeloff, M. D., Ettinger, D. S., Woo, K. B., Gehrke, C. W., Kuo, K. C., Borek, E.: Modified ribonucleosides as biological markers for patients with small cell carcinoma of the lung, *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1982, 18 (12), 1267-1274.
- [118] Rasmuson, T., Bjork, G. R., Damber, L., Holm, S. E., Jacobsson, L., Jeppsson, A., Littbrand, B., Stigbrand, T., Westman, G.: Evaluation of carcinoembryonic antigen, tissue polypeptide antigen, placental alkaline phosphatase, and modified nucleosides as biological markers in malignant lymphomas, *Recent Results Cancer Res*, 1983, 84, 331-343.
- [119] Masuda, M., Nishihira, T., Itoh, K., Mizugaki, M., Ishida, N., Mori, S.: An immunohistochemical analysis for cancer of the esophagus using monoclonal antibodies specific for modified nucleosides, *Cancer*, 1993, 72 (12), 3571-3578.
- [120] Marvel, C. C., Del, R. J., Bremer, E. G., Moskal, J. R.: Altered RNA turnover in carcinogenesis. The diagnostic potential of modified base excretion, *Mol Chem Neuropathol*, 1994, 21 (2-3), 353-368.
- [121] Gehrke, C. W., Kuo, K. C., Waalkes, T. P., Borek, E.: Patterns of urinary excretion of modified nucleosides, *Cancer Res*, 1979, 39 (4), 1150-1153.
- [122] Trewyn, R. W., Glaser, R., Kelly, D. R., Jackson, D. G., Graham, W. P., III, Speicher, C. E.: Elevated nucleoside excretion by patients with nasopharyngeal carcinoma. Preliminary diagnostic/prognostic evaluations, *Cancer*, 1982, 49 (12), 2513-2517.
- [123] Borek, E., Waalkes, T. P., Gehrke, C. W.: Tumor markers derived from nucleic acid components, *Cancer Detect Prev*, 1983, 6 (1-2), 67-71.
- [124] Nakano, K., Yasaka, T., Schram, K. H., Reimer, M. L., McClure, T. D., Nakao, T., Yamamoto, H.: Isolation and identification of urinary nucleosides. Applications of high-performance liquid chromatographic methods to the synthesis of 5'-deoxyxanthosine and the simultaneous determination of 5,6-dihydrouridine and pseudouridine, *J Chromatogr*, 1990, 515, 537-546.
- [125] Borek, E., Baliga, B. S., Gehrke, C. W., Kuo, C. W., Belman, S., Troll, W., Waalkes, T. P.: High turnover rate of transfer RNA in tumor tissue, *Cancer Res*, 1977, 37 (9), 3362-3366.
- [126] Mittelman, A., Hall, R. H., Yohn, D. S., Grace, J. T., Jr.: The in vitro soluble RNA methylase activity of SV40-induced hamster tumors, *Cancer Res*, 1967, 27 (8), 1409-1414.
- [127] Stewart, M. J., Corrance, M. H.: The methylation of transfer RNA in vitro by extracts of normal and malignant tissue, *Cancer Res*, 1969, 29 (9), 1642-1646.
- [128] Borek, E.: Transfer RNA and transfer RNA modification in differentiation and neoplasia. Introduction, *Cancer Res*, 1971, 31 (5), 596-597.
- [129] Tsutsui, E., Srinivasan, P. R., Borek, E.: TRNA methylases in tumors of animal and human origin, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1966, 56 (3), 1003-1009.
- [130] Mandel, L. R., Hacker, B., Maag, T. A.: Altered transfer RNA methylase patterns in Marek's disease tumors, *Cancer Res*, 1971, 31 (5), 613-616.

- [131] Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., Alice, M. B.: Molecular beams of macroions, *J Chem Phys*, 1968, 49 (5), 2240-2249.
- [132] Fenn, J. B.: Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture), *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003, 42 (33), 3871-3894.
- [133] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, 2 ed., Spektrum Akademischer Verlag, München 2006
- [134] Kebarle, P.: A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *J Mass Spectrom*, 2000, 35 (7), 804-817.
- [135] Jennings, K. R.: The changing impact of the collision-induced decomposition of ions on mass spectrometry, *Int J Mass Spectrom*, 2000, 200 (1/3), 479-493.
- [136] Paul, W. and Steinwedel, H. S.: Apparatus for separating charged particles of different specific charge, US Patent 2939952, 1960.
- [137] Stafford, G. C., Jr., Kelley, P. E., Syka, J. E. P., Reynolds, W. E., Todd, J. F. J.: Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology, *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, 1984, 60, 85-98.
- [138] March, R. E.: An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry, *J Mass Spectrom*, 1997, 32 (4), 351-369.
- [139] Comisarow, M. B., Marshall, A. G.: Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy, *Chemical Physics Letters*, 1974, 25 (2), 282-283.
- [140] Shi, S. D. H., Drader, J. J., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G.: Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in a high homogeneity 25 tesla resistive magnet, *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999, 10 (3), 265-268.
- [141] Werth, G.: Ion traps and their application in spectroscopy, *Hyperfine Interactions*, 1996, 99 (1-3), 3-30.
- [142] Marshall, A. G., Hendrickson, C. L., Jackson, G. S.: Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer, *Mass Spectrom Rev*, 1998, 17 (1), 1-35.
- [143] Skoog, D. A., Leary, J. J., *Instrumentelle Analytik*, 1 ed., Springer Verlag, Berlin 1996
- [144] Ledford, E. B., Jr., Ghaderi, S., White, R. L., Spencer, R. B., Kulkarni, P. S., Wilkins, C. L., Gross, M. L.: Exact mass measurement by Fourier transform mass spectrometry, *Anal Chem*, 1980, 52 (3), 463-468.
- [145] Budzikiewicz, H., Schäfer, M., *Massenspektrometrie*, 5 ed., Wiley-VCH, Weinheim 2005
- [146] Brown, S. C., Kruppa, G., Dasseux, J.: Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry, *Mass Spectrom Rev*, 2005, 24 (2), 223-231.
- [147] Pakarinen, J. M. H., Teraevaeinen, M. J., Pirskanen, A., Wickstroem, K., Vainiotalo, P.: A Positive-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Study of Russian and North Sea Crude Oils and Their Six Distillation Fractions, *Energy & Fuels*, 2007, 21 (6), 3369-3374.

- [148] Seipert, R. R., Barboza, M., Ninonuevo, M. R., LoCascio, R. G., Mills, D. A., Freeman, S. L., German, J. B., Lebrilla, C. B.: Analysis and quantitation of fructooligosaccharides using matrix-assisted laser desorption/ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal Chem*, 2008, 80 (1), 159-165.
- [149] Baykut, D., Grapow, M., Bergquist, M., Amirkhani, A., Ivonin, I., Reineke, D., Grussenmeyer, T., Hakansson, P., Zerkowski, H.-R., Baykut, G., Bergquist, J.: Molecular differentiation of ischemic and valvular heart disease by liquid chromatography/fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Eur J Med Res*, 2006, 11 (6), 221-226.
- [150] Kondakov, A., Lindner, B.: Structural characterization of complex bacterial glycolipids by Fourier transform mass spectrometry, *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*, 2005, 11 (5), 535-546.
- [151] Marshall, A. G., Kim, D. G., Klein, G. C., Stanford, L. A., Purcell, J. M., Schaub, T. M., Smith, D. F., Hendrickson, C. L., Rodgers, R. P.: Compositional characterization of petroleum by ultrahigh-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry with multiple ionization sources, *Preprints - American Chemical Society, Division of Petroleum Chemistry*, 2006, 51 (2), 564-566.
- [152] Purcell, J. M., Juyal, P., Kim, D. G., Rodgers, R. P., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G.: Sulfur Speciation in Petroleum: Atmospheric Pressure Photoionization or Chemical Derivatization and Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy & Fuels*, 2007, 21 (5), 2869-2874.
- [153] Dudley, E., Lemiere, F., Van Dongen, W., Langridge, J., I, El Sharkawi, S., Games, D. E., Esmans, E. L., Newton, R. P.: Analysis of urinary nucleosides. III. Identification of 5'-deoxycytidine in urine of a patient with head and neck cancer, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17 (11), 1132-1136.
- [154] Delabar, U., Kloor, D., Luippold, G., Muhlbauer, B.: Simultaneous determination of adenosine, S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in biological samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B*, 1999, 724 (2), 231-238.
- [155] Langridge, J., I, McClure, T. D., el-Shakawi, S., Fielding, A., Schram, K. H., Newton, R. P.: Gas chromatography/mass spectrometric analysis of urinary nucleosides in cancer patients; potential of modified nucleosides as tumour markers, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1993, 7 (6), 427-434.
- [156] Liebich, H. M., Di, S. C., Wixforth, A., Schmid, H. R.: Quantitation of urinary nucleosides by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*, 1997, 763 (1-2), 193-197.
- [157] Frickenschmidt, A.: Massenspektrometrische Untersuchungen von modifizierten Nucleosiden und ihre Evaluierung als Tumormarker bei Brustkrebs, Dissertation, Universität Tübingen, 2006.
- [158] Tuytten, R., Lemiere, F., Esmans, E. L., Herrebout, W. A., van, d., V, Maes Bert, U. W., Witters, E., Newton, R. P., Dudley, E.: Role of nitrogen lewis basicity in boronate affinity chromatography of nucleosides, *Anal Chem*, 2007, 79 (17), 6662-6669.
- [159] Uziel, M., Smith, L. H., Taylor, S. A.: Modified nucleosides in urine: selective removal and analysis, *Clin Chem*, 1976, 22 (9), 1451-1455.

- [160] Kammerer, B., Frickenschmidt, A., Muller, C. E., Laufer, S., Gleiter, C. H., Liebich, H.: Mass spectrometric identification of modified urinary nucleosides used as potential biomedical markers by LC-ITMS coupling, *Anal Bioanal Chem*, 2005, 382 (4), 1017-1026.
- [161] Dudley, E., El-Sharkawi, S., Games, D. E., Newton, R. P.: Analysis of urinary nucleosides. I. Optimisation of high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14 (14), 1200-1207.
- [162] Tuytten, R., Lemiere, F., Van, D. W., Esmans, E. L., Witters, E., Herrebout, W., van, d., V, Dudley, E., Newton, R. P.: Intriguing mass spectrometric behavior of guanosine under low energy collision-induced dissociation: H₂O adduct formation and gas-phase reactions in the collision cell, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, 16 (8), 1291-1304.
- [163] Frycak, P., Huskova, R., Adam, T., Lemr, K.: Atmospheric pressure ionization mass spectrometry of purine and pyrimidine markers of inherited metabolic disorders, *J Mass Spectrom*, 2002, 37 (12), 1242-1248.
- [164] Barcelo-Barrachina, E., Moyano, E., Galceran, M. T.: Determination of heterocyclic amines by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 2004, 1054 (1-2), 409-418.
- [165] Nelson, C. C., McCloskey, J. A.: Collision-induced dissociation of adenine, *J Am Chem Soc*, 1992, 114 (10), 3661-3668.
- [166] Nelson, C. C., McCloskey, J. A.: Collision-induced dissociation of uracil and its derivatives, *J Am Soc Mass Spectrom*, 1994, 5 (5), 339-349.
- [167] Gregson, J. M., McCloskey, J. A.: Collision-induced dissociation of protonated guanine, *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, 1997, 165/166, 475-485.
- [168] Jensen, S. S., Ariza, X., Nielsen, P., Vilarrasa, J., Kirpekar, F.: Collision-induced dissociation of cytidine and its derivatives, *J Mass Spectrom*, 2007, 42 (1), 49-57.
- [169] 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*, 2005, 16-17.
- [170] Kolmonen, M., Leinonen, A., Pelander, A., Ojanpera, I.: A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Anal Chim Acta*, 2007, 585 (1), 94-102.
- [171] Gottardo, R., Fanigliulo, A., Bortolotti, F., De, P. G., Pascali, J. P., Tagliaro, F.: Broad-spectrum toxicological analysis of hair based on capillary zone electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 2007, 1159 (1-2), 190-197.
- [172] Persönliche Kommunikation mit Dr. Thomas Zey, Applikationschemiker bei Bruker Daltonics (Bremen), 2006.
- [173] Oresmaa, L., Aulaskari, P., Vainiotalo, P.: Electrospray ionization mass spectrometric studies of some imidazole amidoximes and nitrolic acids and their esters, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20 (7), 1071-1076.
- [174] Chheda, G. B., Hall, R. H., Mozejko, J., Magrath, D., I, Schweizer, M. P., Stasiuk, L., Taylor, P. R.: Aminoacyl nucleosides. VI. Isolation and preliminary characterization of

- threonyladenine derivatives from transfer ribonucleic acid, *Biochemistry*, 1969, 8 (8), 3278-3282.
- [175] Kimura-Harada, F., Von Minden, D. L., McCloskey, J. A., Nishimura, S.: N-((9-D-ribofuranosylpurin-6-yl)-N-methylcarbamoyl) threonine, a modified nucleoside isolated from *Escherichia coli* threonine transfer ribonucleic acid, *Biochemistry*, 1972, 11 (21), 3910-3915.
- [176] Dudley, E., Lemiere, F., Van, D. W., Tuytten, R., El-Sharkawi, S., Brenton, A. G., Esmans, E. L., Newton, R. P.: Analysis of urinary nucleosides. IV. Identification of urinary purine nucleosides by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18 (22), 2730-2738.
- [177] Chheda, G. B., Patrzyc, H. B., Tworek, H. A., Dutta, S. P.: Isolation and characterization of 5-carbamoylmethyluridine and 5-carbamoylmethyl-2-thiouridine from human urine, *Nucleosides Nucleotides*, 1999, 18 (10), 2155-2173.
- [178] Chheda, G. B., Tworek, H. A., Bhargava, A. K., Rachlin, E., Dutta, S. P., Patrzyc, H. B.: Isolation and characterization of 3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridine from human urine, *Nucleosides Nucleotides*, 1988, 7 (4), 417-429.
- [179] Bleiholder, C., Suhai, S., Paizs, B.: Revising the proton affinity scale of the naturally occurring alpha-amino acids, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006, 17 (9), 1275-1281.
- [180] Imamura, I., Watanabe, T., Sakamoto, Y., Wakamiya, T., Shiba, T., Hase, Y., Tsuruhara, T., Wada, H.: N tau-Ribosylhistidine, a novel histidine derivative in urine of histidinemic patients. Isolation, structure, and tissue level, *J Biol Chem*, 1985, 260 (19), 10528-10530.
- [181] Piraud, M., Vianey-Saban, C., Petritis, K., Elfakir, C., Steghens, J., Morla, A., Bouchu, D.: ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17 (12), 1297-1311.
- [182] Bergmark, J., Granerus, G.: Ion exchange chromatography for quantitative analysis of radioactive histamine metabolites in human urine, *Scand J Clin Lab Invest*, 1974, 34 (4), 365-373.
- [183] KEGG Database, http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa00340, 2008.
- [184] van der Heiden, C., Wadman, S. K., de Bree, P. K., Wauters, E. A.: Increased urinary imidazolepropionic acid, N-acetylhistamine and other imidazole compounds in patients with intestinal disorders, *Clin Chim Acta*, 1972, 39 (1), 201-214.
- [185] van der Heiden, C., Wauters, E. A., Duran, M., Wadman, S. K., Ketting, D.: Gas chromatographic analysis of urinary tyrosine and phenylalanine metabolites in patients with gastrointestinal disorders, *Clin Chim Acta*, 1971, 34 (2), 289-296.
- [186] Hau, J., Stadler, R., Jenny, T. A., Fay, L. B.: Tandem mass spectrometric accurate mass performance of time-of-flight and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a case study with pyridine derivatives, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, 15 (19), 1840-1848.

- [187] Morris, G. S., Simmonds, H. A., Davies, P. M.: Use of biological fluids for the rapid diagnosis of potentially lethal inherited disorders of human purine and pyrimidine metabolism, *Biomed Chromatogr*, 1986, 1 (3), 109-118.
- [188] Meng, G., Zhao, L., Luo, Y. F., Chen, F. E.: Studies on a new usage of hypophosphorous acid-iodine system in N-C bond cleavage, *Chinese Chem Lett*, 2003, 14 (4), 351-354.
- [189] Maes, E., Strecker, G., Timmerman, P., Leroy, Y., Zanetta, J. P.: Quantitative cleavage of the N-glycosidic bond under the normal conditions of methanolysis used for the analysis of glycoprotein monosaccharides, *Anal Biochem*, 1999, 267 (2), 300-308.
- [190] Menshonkova, T. N., Simukova, N. A., Budowsky, E. I., Rubin, L. B.: The effect of high intensity ultraviolet irradiation on nucleic acids and their components. Cleavage of N-glycosidic bond in thymidine, adenosine and 2'-deoxyadenosine, *FEBS Lett*, 1980, 112 (2), 299-301.
- [191] Loverix, S., Geerlings, P., McNaughton, M., Augustyns, K., Vandemeulebroucke, A., Steyaert, J., Versees, W.: Substrate-assisted leaving group activation in enzyme-catalyzed N-glycosidic bond cleavage, *J Biol Chem*, 2005, 280 (15), 14799-14802.
- [192] Herbel, W., Montag, A.: Bestimmung der einzelnen Purin- und Pyrimidinbasen aus proteinhaltigen Lebensmitteln nach hydrolytischem Aufschluß durch automatische Ionenaustauscherchromatographie, *Z Lebensm Unters Forsch*, 1984, 178, 81-85.
- [193] Lakings, D. B., Gehrke, C. W.: Gas-liquid chromatographic analysis for purine and pyrimidine bases in hydrolysates of nucleic acid, *Clin Chem*, 1972, 18 (8), 810-813.
- [194] Chheda, G. B.: Isolation and characterization of N6-succinyladenosine from human urine, *Nucleic Acids Res*, 1977, 4 (3), 739-746.
- [195] Mills, J. S., Mills, G. C., McAdoo, D. J.: Isolation and identification of 5'-methylthioadenosine sulfoxide from human urine, *Nucleosides Nucleotides*, 1983, 2 (5), 465-478.
- [196] Suzuki, T., Suzuki, T., Wada, T., Saigo, K., Watanabe, K.: Novel taurine-containing uridine derivatives and mitochondrial human diseases, *Nucleic Acids Res Suppl*, 2001, 1, 257-258.
- [197] Suzuki, T., Suzuki, T., Wada, T., Saigo, K., Watanabe, K.: Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases, *EMBO J*, 2002, 21 (23), 6581-6589.
- [198] Bendriss, E. K., Markoglou, N., Wainer, I. W.: Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine, *J Chromatogr B*, 2000, 746 (2), 331-338.
- [199] Peri-Okonny, U. L., Wang, S., X, Stubbs, R. J., Guzman, N. A.: Determination of caffeine and its metabolites in urine by capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Electrophoresis*, 2005, 26 (13), 2652-2663.
- [200] Smith, D. L., Schram, K. H., McCloskey, J. A.: The negative ion mass spectra of selected nucleosides, *Biomed Mass Spectrom*, 1983, 10 (4), 269-275.

- [201] Crow, F. W., Tomer, K. B., Gross, M. L., McCloskey, J. A., Bergstrom, D. E.: Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the determination of nucleosides, *Anal Biochem*, 1984, 139 (1), 243-262.
- [202] Hua, Y., Wainhaus, S. B., Yang, Y., Shen, L., Xiong, Y., Xu, X., Zhang, F., Bolton, J. L., van Breemen, R. B.: Comparison of negative and positive ion electrospray tandem mass spectrometry for the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxidized deoxynucleosides, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2001, 12 (1), 80-87.
- [203] Claereboudt, J., Esmans, E. L., Claeys, M.: Mass spectral behavior of (M - H)⁻ ions of some pyrimidine nucleosides, *Biolog Mass Spectrom*, 1993, 22 (7), 419-421.
- [204] Sakurai, T., Matsuo, T., Kusai, A., Nojima, K.: Collisionally activated decomposition spectra of normal nucleosides and nucleotides using a four-sector tandem mass spectrometer, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1989, 3 (7), 212-216.
- [205] Zhang, Q., Wang, Y.: Differentiation of 2'-O- and 3'-O-methylated ribonucleosides by tandem mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006, 17 (8), 1096-1099.
- [206] Hocart, C. H., Schlunegger, U. P.: Negative-ion mass spectrometry of substituted adenine bases and adenosine nucleosides, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1989, 3 (8), 249-254.
- [207] Bandu, M. L., Watkins, K. R., Bretthauer, M. L., Moore, C. A., Desaire, H.: Prediction of MS/MS data. 1. A focus on pharmaceuticals containing carboxylic acids, *Anal Chem*, 2004, 76 (6), 1746-1753.
- [208] Uziel, M., Selkirk, J. K.: Pyrimidine nucleoside, pseudouridine, and modified nucleoside excretion by growing and resting fibroblasts, *J Cell Physiol*, 1979, 99 (2), 217-222.
- [209] Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M.: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma, *J Natl Cancer Inst*, 1973, 51 (5), 1409-1416.
- [210] Clarke, R., Dickson, R. B., Brunner, N.: The process of malignant progression in human breast cancer, *Ann Oncol*, 1990, 1 (6), 401-407.
- [211] Soule, H. D., Maloney, T. M., Wolman, S. R., Peterson, W. D., Jr., Brenz, R., McGrath, C. M., Russo, J., Pauley, R. J., Jones, R. F., Brooks, S. C.: Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10, *Cancer Res*, 1990, 50 (18), 6075-6086.
- [212] Tait, L., Soule, H. D., Russo, J.: Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10, *Cancer Res*, 1990, 50 (18), 6087-6094.
- [213] Oehme, M., Berger, U., Brombacher, S., Kuhn, F., Kolliker, S.: Trace analysis by HPLC-MS: contamination problems and systematic errors, *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21 (5), 322-331.
- [214] Mortier, K. A., Zhang, G., van Peteghem, C. H., Lambert, W. E.: Adduct formation in quantitative bioanalysis: effect of ionization conditions on paclitaxel, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004, 15 (4), 585-592.

- [215] Schram, K. H.: Urinary nucleosides, *Mass Spectrom Rev*, 1998, 17 (3), 131-251.
- [216] Wilson, M. H., McCloskey, J. A.: Isotopic labeling studies of the base-catalyzed conversion of 1-methyladenosine to N⁶-methyladenosine, *J Org Chem*, 1973, 38 (12), 2247-2248.
- [217] Sakurai, M., Ohtsuki, T., Watanabe, K.: Modification at position 9 with 1-methyladenosine is crucial for structure and function of nematode mitochondrial tRNAs lacking the entire T-arm, *Nucleic Acids Res*, 2005, 33 (5), 1653-1661.
- [218] Limbach, P. A., Crain, P. F., McCloskey, J. A.: Summary: the modified nucleosides of RNA, *Nucleic Acids Res*, 1994, 22 (12), 2183-2196.
- [219] Roe, B. A., Tsen, H. Y.: Role of ribothymidine in mammalian tRNA^{Phe}, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74 (9), 3696-3700.
- [220] Urbonavicius, J., Durand Jerome, M. B., Bjork, G. R.: Three modifications in the D and T arms of tRNA influence translation in *Escherichia coli* and expression of virulence genes in *Shigella flexneri*, *J Bacteriol*, 2002, 184 (19), 5348-5357.
- [221] Mattick, J. S., Makunin, I., V.: Small regulatory RNAs in mammals, *Hum Mol Genet*, 2005, 14 Spec No 1, R121-R132.
- [222] Qian, Q., Curran, J. F., Bjork, G. R.: The methyl group of the N⁶-methyl-N⁶-threonylcarbamoyl-adenosine in tRNA of *Escherichia coli* modestly improves the efficiency of the tRNA, *J Bacteriol*, 1998, 180 (7), 1808-1813.
- [223] Fontecave, M., Atta, M., Mulliez, E.: S-adenosylmethionine: nothing goes to waste, *Trends Biochem Sci*, 2004, 29 (5), 243-249.
- [224] Randerath, E., Chia, L. L., Morris, H. P., Randerath, K.: Transfer RNA base composition studies in Morris hepatomas and rat liver, *Cancer Res*, 1974, 34 (3), 643-653.
- [225] Ibba, M., Curnow, A. W., Soll, D.: Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal, *Trends Biochem Sci*, 1997, 22 (2), 39-42.
- [226] Björk, G. R., Rasmuson, T., in: *Modification and Editing of RNA*, (Eds.: Grosjean, H., Benne, R.), American Society for Microbiology, Washington, 1998, pp. 471-491.
- [227] Christa, L., Kersual, J., Perignon, J. L., Cartier, P. H.: Metabolism of 5'-methylthioadenosine in methionine-dependent and methionine-independent cells, *Adv Exp Med Biol*, 1986, 195 Pt B, 651-657.
- [228] Tang, B., Li, Y. N., Kruger, W. D.: Defects in methylthioadenosine phosphorylase are associated with but not responsible for methionine-dependent tumor cell growth, *Cancer Res*, 2000, 60 (19), 5543-5547.
- [229] Kerr, S. J.: Competing methyltransferase systems, *J Biol Chem*, 1972, 247 (13), 4248-4252.
- [230] Tormey, D. C., Waalkes, T. P., Kuo, K. C., Gehrke, C. W.: Biologic markers in breast carcinoma: clinical correlations with urinary polyamines, *Cancer*, 1980, 46 (4), 741-747.

- [231] Scalabrino, G., Ferioli, M. E.: Polyamines in mammalian tumors. Part I, *Adv Cancer Res*, 1981, 35, 151-268.
- [232] Shantz, L. M., Holm, I., Janne, O. A., Pegg, A. E.: Regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase activity by alterations in the intracellular polyamine content, *Biochem J*, 1992, 288 (Pt 2), 511-518.
- [233] Kamatani, N., Carson, D. A.: Abnormal regulation of methylthioadenosine and polyamine metabolism in methylthioadenosine phosphorylase-deficient human leukemic cell lines, *Cancer Res*, 1980, 40 (11), 4178-4182.
- [234] Christopher, S. A., Diegelman, P., Porter, C. W., Kruger, W. D.: Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(cdkN2a/ARF), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line, *Cancer Res*, 2002, 62 (22), 6639-6644.
- [235] Speth, M., Schulze, H. U.: Modulation of the activity of hepatic glucose-6-phosphatase by methylthioadenosine sulfoxide, *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1068 (2), 217-230.
- [236] Bataille, F., Rogler, G., Modes, K., Poser, I., Schuierer, M., Dietmaier, W., Ruemmele, P., Muhlbauer, M., Wallner, S., Hellerbrand, C., Bosserhoff, A.: Strong expression of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) in human colon carcinoma cells is regulated by TCF1/[beta]-catenin, *Lab Invest*, 2005, 85 (1), 124-136.
- [237] Sufrin, J. R., Spiess, A. J., Kramer, D. L., Libby, P. R., Miller, J. T., Bernacki, R. J., Lee, Y. H., Borchardt, R. T., Porter, C. W.: Targeting 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine phosphorylase by 5'-haloalkyl analogues of 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine, *J Med Chem*, 1991, 34 (8), 2600-2606.
- [238] Chheda, G. B., Patrycz, H. B., Bhargava, A. K., Crain, P. F., Sethi, S. K., McCloskey, J. A., Dutta, S. P.: Isolation and characterization of a novel nucleoside from the urines of chronic myelogenous leukemia patients, *Nucleosides & Nucleotides*, 1987, 6 (3), 597-611.
- [239] Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E.: Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58 (5-6), 737-747.
- [240] Swinnen, J., V, Beckers, A., Brusselmans, K., Organe, S., Segers, J., Timmermans, L., Vanderhoydonc, F., Deboel, L., Derua, R., Waelkens, E., De, S. E., Van de, S. T., Noel, A., Fougelle, F., Verhoeven, G.: Mimicry of a cellular low energy status blocks tumor cell anabolism and suppresses the malignant phenotype, *Cancer Res*, 2005, 65 (6), 2441-2448.
- [241] Rattan, R., Giri, S., Singh, A. K., Singh, I.: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase, *J Biol Chem*, 2005, 280 (47), 39582-39593.
- [242] Garcia-Gil, M., Bertini, F., Pesi, R., Voccoli, V., Tozzi, M. G., Camici, M.: 5'-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells via the mitochondrial pathway, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2006, 25 (9-11), 1265-1270.
- [243] Garcia-Caballero, M., Neugebauer, E., Rodriguez, F., Nunez, d. C., I, Heredia, A., Oosting, E., Vara, T. C.: Changes in histamine synthesis, tissue content and catabolism in human breast cancer, *Agents Actions*, 1989, 27 (1-2), 227-231.

- [244] Whitehead, R. J., Taylor, D. J., Evanson, J. M., Hart, I. R., Woolley, D. E.: Demonstration of histamine H₂ receptors on human melanoma cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 151 (1), 518-523.
- [245] Bartholeyns, J., Bouclier, M.: Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase, *Cancer Res*, 1984, 44 (2), 639-645.
- [246] Woolley, D. E., Eckley, D., Tetlow, L. C., Whitehead, R. J.: Effect of mast cell products and histamine on the proliferative behaviour of human melanoma and carcinoma cells in vitro, *Agents Actions*, 1993, 38, C182-C184.
- [247] Nolte, H., Stahl, S. P., Loft, H.: Stimulation of histamine synthesis from tumour cells by concanavalin A and A23187, *Agents Actions*, 1987, 20 (3-4), 291-294.
- [248] Reynolds, J. L., Akhter, J. A., Magarey, C. J., Schwartz, P., Adams, W. J., Morris, D. L.: Histamine in human breast cancer, *Br J Surg*, 1998, 85 (4), 538-541.
- [249] Xu, G., Enderle, H., Liebich, H., Lu, P.: Study of normal and modified nucleosides in serum by RP-HPLC, *Chromatographia*, 2000, 52 (3/4), 152-158.
- [250] Taylor, G. A., Dady, P. J., Harrap, K. R.: Quantitative high-performance liquid chromatography of nucleosides and bases in human plasma, *J Chromatogr*, 1980, 183 (4), 421-431.
- [251] Hartwick, R. A., Assenza, S. P., Brown, P. R.: Identification and quantitation of nucleosides, bases and other UV-absorbing compounds in serum, using reversed-phase high-performance liquid chromatography. I. Chromatographic methodology, *J Chromatogr*, 1979, 186, 647-658.
- [252] Karle, J. M., Anderson, L. W., Dietrick, D. D., Cysyk, R. L.: Determination of serum and plasma uridine levels in mice, rats, and humans by high-pressure liquid chromatography, *Anal Biochem*, 1980, 109 (1), 41-46.
- [253] Takeda, N., Yoshizumi, H., Niwa, T.: Detection and characterization of modified nucleosides in serum and urine of uremic patients using capillary liquid chromatography-frit-fast atom bombardment mass spectrometry, *J Chromatogr B*, 2000, 746 (1), 51-62.
- [254] McEntire, J. E., Kuo, K. C., Smith, M. E., Stalling, D. L., Richens, J. W., Jr., Zumwalt, R. W., Gehrke, C. W., Papermaster, B. W.: Classification of lung cancer patients and controls by chromatography of modified nucleosides in serum, *Cancer Res*, 1989, 49 (4), 1057-1062.
- [255] Colonna, A., Russo, T., Esposito, F., Salvatore, F., Cimino, F.: Determination of pseudouridine and other nucleosides in human blood serum by high-performance liquid chromatography, *Anal Biochem*, 1983, 130 (1), 19-26.
- [256] Tamura, S., Fujioka, H., Nakano, T., Hada, T., Higashino, K.: Serum pseudouridine as a biochemical marker in small cell lung cancer, *Cancer Res*, 1987, 47 (22), 6138-6141.
- [257] Salvatore, F., Russo, T., Colonna, A., Cimino, L., Mazzacca, G., Cimino, F.: Pseudouridine determination in blood serum as tumor marker, *Cancer Detect Prev*, 1983, 6 (6), 531-536.

- [258] Chen, J., Patton, J. R.: Cloning and characterization of a mammalian pseudouridine synthase, *RNA*, 1999, 5 (3), 409-419.
- [259] Cortese, R., Kammen, H. O., Spengler, S. J., Ames, B. N.: Biosynthesis of pseudouridine in transfer ribonucleic acid, *J Biol Chem*, 1974, 249 (4), 1103-1108.
- [260] Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., Chavez-Eng, C. M.: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal Chem*, 2003, 75 (13), 3019-3030.
- [261] Khym, J., X: An analytical system for rapid separation of tissue nucleotides at low pressures on conventional anion exchangers, *Clin Chem*, 1975, 21 (9), 1245-1252.
- [262] Chen, S. C., Brown, P. R., Rosie, D. M.: Extraction procedures for use prior to HPLC nucleotide analysis using microparticle chemically bonded packings, *J Chromatogr Sci*, 1977, 15 (6), 218-221.
- [263] Koshida, K., Harmenberg, J., Borgstrom, E., Wahren, B., Andersson, L.: Pseudouridine and uridine in normal kidney and kidney cancer tissues, *Urol Res*, 1985, 13 (5), 219-221.
- [264] Jain, R. K.: Transport of molecules in the tumor interstitium: a review, *Cancer Res*, 1987, 47 (12), 3039-3051.
- [265] Nugent, L. J., Jain, R. K.: Extravascular diffusion in normal and neoplastic tissues, *Cancer Res*, 1984, 44 (1), 238-244.
- [266] Jain, R. K.: Transport of macromolecules in tumor microcirculation, *Biotechnology Progress*, 1985, 1 (2), 81-94.
- [267] Gullino, P. M.: Extracellular compartments of solid tumors, *Cancer: Compr Treatise*, 1975, 3, 327-354.
- [268] Messerli, A. W., Seshadri, N., Pearce, G. L., Sachar, R., Hoogwerf, B. J., Sprecher, D. L.: Relation of albumin/creatinine ratio to C-reactive protein and to the metabolic syndrome, *Am J Cardiol*, 2003, 92 (5), 610-612.
- [269] Ribel-Madsen, S., Christgau, S., Gronemann, S. T., Bartels, E. M., nneskiold-Samsøe, B., Bliddal, H.: Urinary markers of altered collagen metabolism in fibromyalgia patients, *Scand J Rheumatol*, 2007, 36 (6), 470-477.
- [270] Davidson, D. F., Grosset, K., Grosset, D.: Parkinson's disease: the effect of L-dopa therapy on urinary free catecholamines and metabolites, *Ann Clin Biochem*, 2007, 44 (Pt 4), 364-368.
- [271] Szymanska, E., Markuszewski, M. J., Bodzioch, K., Kaliszan, R.: Development and validation of urinary nucleosides and creatinine assay by capillary electrophoresis with solid phase extraction, *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44 (5), 1118-1126.
- [272] Heldman, D. A., Grever, M. R., Miser, J. S., Trewyn, R. W.: Relationship of urinary excretion of modified nucleosides to disease status in childhood acute lymphoblastic leukemia, *J Natl Cancer Inst*, 1983, 71 (2), 269-273.

- [273] Barr, D. B., Wilder, L. C., Caudill, S. P., Gonzalez, A. J., Needham, L. L., Pirkle, J. L.: Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements, *Environ Health Perspect*, 2005, 113 (2), 192-200.
- [274] Bartels, H., Bohmer, M., Heierli, C.: Serum creatinine determination without protein precipitation, *Clin Chim Acta*, 1972, 37, 193-197.
- [275] 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, *J Chromatogr A*, 2005, 1084 (1-2), 214-221.
- [276] Mao, Y., Zhao, X., Wang, S., Cheng, Y.: Urinary nucleosides based potential biomarker selection by support vector machine for bladder cancer recognition, *Anal Chim Acta*, 2007, 598 (1), 34-40.
- [277] Suzuki, Y., Yatabe, S.: Isomerization of purine nucleosides in a dilute alkaline solution, *Bull Chem Soc Japan*, 1974, 47 (10), 2353-2359.
- [278] Yang, J., Xu, G., Zheng, Y., Kong, H., Pang, T., Lv, S., Yang, Q.: Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases, *J Chromatogr B*, 2004, 813 (1-2), 59-65.
- [279] Tafeit, E., Reibnegger, G.: Artificial neural networks in laboratory medicine and medical outcome prediction, *Clin Chem Lab Med*, 1999, 37 (9), 845-853.
- [280] Seidel, A., Brunner, S., Seidel, P., Fritz, G., I, Herbarth, O.: Modified nucleosides: an accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control, *Br J Cancer*, 2006, 94 (11), 1726-1733.
- [281] Zhao, R., Xu, G., Yue, B., Liebich, H. M., Zhang, Y.: Artificial neural network classification based on capillary electrophoresis of urinary nucleosides for the clinical diagnosis of tumors, *J Chromatogr A*, 1998, 828 (1-2), 489-496.
- [282] Meinhold-Heerlein, I., Bauerschlag, D., Zhou, Y., Sapinoso, L. M., Ching, K., Frierson, H., Jr., Brautigam, K., Sehoul, J., Stickeler, E., Konsgen, D., Hilpert, F., von Kaisenberg, C. S., Pfisterer, J., Bauknecht, T., Jonat, W., Arnold, N., Hampton, G. M.: An integrated clinical-genomics approach identifies a candidate multi-analyte blood test for serous ovarian carcinoma, *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (2 Pt 1), 458-466.
- [283] Fujarewicz, K., Jarzab, M., Eszlinger, M., Krohn, K., Paschke, R., Oczko-Wojciechowska, M., Wiench, M., Kukulska, A., Jarzab, B., Swierniak, A.: A multi-gene approach to differentiate papillary thyroid carcinoma from benign lesions: gene selection using support vector machines with bootstrapping, *Endocr Relat Cancer*, 2007, 14 (3), 809-826.
- [284] Lee, H. S., Cho, S., Lee, H. E., Kim, M. A., Kim, J. H., Park, D. J., Kim, J. H., Yang, H., Lee, B. L., Kim, W. H.: Protein expression profiling and molecular classification of gastric cancer by the tissue array method, *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (14), 4154-4163.
- [285] Oh, J. H., Nandi, A., Gurnani, P., Knowles, L., Schorge, J., Rosenblatt, K. P., Gao, J., X: Proteomic biomarker identification for diagnosis of early relapse in ovarian cancer, *J Bioinform Comput Biol*, 2006, 4 (6), 1159-1179.

- [286] Fan, X., Bai, J., Shen, P.: Diagnosis of breast cancer using HPLC metabonomics fingerprints coupled with computational methods, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2005, 6, 6081-6084.
- [287] Denkert, C., Budczies, J., Kind, T., Weichert, W., Tablack, P., Sehouli, J., Niesporek, S., Konsgen, D., Dietel, M., Fiehn, O.: Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors, *Cancer Res*, 2006, 66 (22), 10795-10804.
- [288] Bullinger, D., Fröhlich, H., Klaus, F., Neubauer, H., Frickenschmidt, A., Henneges, C., Zell, A., Laufer, S., Gleiter, C. H., Liebich, H. Kammerer, B.: Bioinformatical evaluation of modified nucleosides as biomedical markers in diagnosis of breast cancer, *Anal Chim Acta*, akzeptiert 4/2008.
- [289] Frickenschmidt, A., Fröhlich, H., Bullinger, D., Zell, A., Laufer, S., Gleiter, C.H., Liebich, H., Kammerer, B.: Metabonomics in cancer diagnosis: Mass spectrometry based profiling of urinary nucleosides from breast cancer patients, *Biomarkers*, akzeptiert 3/2008.
- [290] Khatcheressian, J. L., Wolff, A. C., Smith, T. J., Grunfeld, E., Muss, H. B., Vogel, V. G., Halberg, F., Somerfield, M. R., Davidson, N. E.: American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting, *J Clin Oncol*, 2006, 24 (31), 5091-5097.
- [291] Stieber, P., Untch, M., Sauer, H.: Stellenwert der Tumormarker beim Mammakarzinom, *Gynäkologe*, 1999, 32, 695-704.
- [292] Smola, A., Bartlett, P., Scholkopf, B., Schuurmans, D., *Advances in large-margin classifiers (neural information processing)*, 1 ed., MIT Press, Cambridge 2000
- [293] Christianini, N., Shawe-Taylor, J., *An introduction to support vector machines and other kernel-based learning methods*, 1 ed., Cambridge University Press, Cambridge 2000
- [294] Chang, C.C.; Lin, C.J., LIBSVM: a library for support vector machines, <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm>, 2001.
- [295] Zheng, Y., Kong, H., Xiong, J., Lv, S., Xu, G.: Clinical significance and prognostic value of urinary nucleosides in breast cancer patients, *Clin Biochem*, 2005, 38 (1), 24-30.
- [296] Cho, B. H., Yu, H., Lee, J., Chee, Y. J., Kim, I. Y., Kim, S. I.: Nonlinear support vector machine visualization for risk factor analysis using nomograms and localized radial basis function kernels, *IEEE Trans Inf Technol Biomed*, 2008, 12 (2), 247-256.
- [297] Somol, P., Pudil, P.: Oscillating search algorithms for feature selection, *Proceedings of the International Conference on Pattern Recognition (ICPR'00)*, 2000, 2, 406-409.
- [298] Devijver, P. A., Kittler, J., *Pattern recognition: A statistical approach*, 1 ed., Prentice Hall, London 1982
- [299] Duda, R., Hart, P., Stork G, *Pattern Classification*, second ed., Wiley Interscience, New York 2001
- [300] Luntz, A., Brailovsky, V.: On estimation of characters obtained in statistical procedure of recognition, *Technicheskaya Kibernetika*, 1969, 3.

- [301] Viale, G. L.: Transfer RNA and transfer RNA methylase in human brain tumors, *Cancer Res*, 1971, 31 (5), 605-608.
- [302] Manni, A., Grove, R., Kunselman, S., Aldaz, M.: Involvement of the polyamine pathway in breast cancer progression, *Cancer Lett*, 1995, 92 (1), 49-57.
- [303] Johansson Marcus, J. O., Bystrom, A. S.: The *Saccharomyces cerevisiae* TAN1 gene is required for N4-acetylcytidine formation in tRNA, *RNA*, 2004, 10 (4), 712-719.
- [304] Zheng, Y., Xu, G., Liu, D., Xiong, J., Zhang, P., Zhang, C., Yang, Q., Lv, S.: Study of urinary nucleosides as biological marker in cancer patients analyzed by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Electrophoresis*, 2002, 23 (24), 4104-4109.
- [305] Thomale, J., Nass, G.: Elevated urinary excretion of RNA catabolites as an early signal of tumor development in mice, *Cancer Lett*, 1982, 15 (2), 149-159.
- [306] La, S., Cho, J., Kim, J. H., Kim, K. R.: Capillary electrophoretic profiling and pattern recognition analysis of urinary nucleosides from thyroid cancer patients, *Anal Chim Acta*, 2003, 486 (2), 171-182.
- [307] Liebich, H. M., Mueller-Hagedorn, S., Klaus, F., Meziane, K., Kim, K. R., Frickschmidt, 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, *J Chromatogr A*, 2005, 1071 (1-2), 271-275.
- [308] Constantinesco, F., Motorin, Y., Grosjean, H.: Characterisation and enzymatic properties of tRNA(guanine 26, N (2), N (2))-dimethyltransferase (Trm1p) from *Pyrococcus furiosus*, *J Mol Biol*, 1999, 291 (2), 375-392.
- [309] Craddock, V. M.: Increased activity of transfer RNA N2-guanine dimethylase in tumors of liver and kidney, *Biochim Biophys Acta*, 1972, 272 (2), 288-296.

Auflistung meiner akademischen Lehrer

Prof. Dr. N. Auner	Anorganische Chemie, Universität Frankfurt
Prof. Dr. W. Brüggemann	Botanik, Universität Frankfurt
Prof. Dr. E. Egert	Organische Chemie, Universität Frankfurt
Prof. Dr. C. H. Gleiter	Klinische Pharmakologie, Universität Tübingen
Prof. Dr. C. Griesinger	Organische Chemie, Universität Frankfurt
PD Dr. S. Hashmi	Organische Chemie, Universität Frankfurt
Prof. Dr. K. Hensen	Physikalische Chemie, Universität Frankfurt
Prof. Dr. G. Kauert	Toxikologie, Universität Frankfurt
Prof. Dr. S. Laufer	Pharmazeutische Chemie, Universität Tübingen
Prof. Dr. A. Mosandl	Lebensmittelchemie, Universität Frankfurt
Prof. Dr. T. Prisner	Physikalische Chemie, Universität Frankfurt
Prof. Dr. E. A. Reinsch	Mathematik, Universität Frankfurt
Prof. Dr. G. von Rymon Lipinski	Lebensmitteltechnologie, Universität Frankfurt
Prof. Dr. H. Schmidt-Böcking	Physik, Universität Frankfurt
Prof. Dr. R. Schubert	Mikrobiologie, Universität Frankfurt
Prof. Dr. R. Tampé	Biochemie, Universität Frankfurt
Prof. Dr. S. Vieths	Immunologie, Universität Frankfurt
Prof. Dr. M. Wagner	Anorganische Chemie, Universität Frankfurt

Lebenslauf

Persönliche Daten

Dino Bullinger

geboren am 3. Mai 1978 in Werneck

Schulbildung

09/1984-07/1988

Grundschule Zeuzleben

09/1988-07/1997

Alexander-von-Humboldt-Gymnasium Schweinfurt

06/1997

Abitur

Zivildienst

08/1997-09/1998

Schule für Körperbehinderte, Schonungen

Hochschulstudium

10/1998-05/2003

Studium der Lebensmittelchemie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main

03/2001

Diplom-Chemiker-Vorprüfung

05/2003

Erste Lebensmittelchemische Staatsprüfung

Praktika

05/2003-11/2003

Industriepraktikum, British American Tobacco, Bayreuth

11/2003-05/2004

Amtspraktikum, Staatliches Untersuchungsamt Hessen, Wiesbaden

05/2004

Zweite Lebensmittelchemische Staatsprüfung, Befähigung als staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker

Promotion

seit 10/2004

Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. S. Laufer am Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen