

Aus der Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Klinische Pharmakologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. M. Schwab

**Untersuchung modifizierter Nucleoside aus dem Urin
von Mammakarzinom-Patientinnen als potentielle
Tumormarker**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Natascha Friese
aus
Ostfildern-Ruit

2010

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Gleiter

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 Medizinische Aspekte des Mammakarzinoms	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Diagnostik.....	2
1.1.3 Therapie.....	2
1.2 Tumormarker	3
1.2.1 Einteilung	4
1.2.2 Keimlinienzellmarker	4
1.2.3 Marker im Tumorgewebe	5
1.2.4 Zirkulierende Marker	6
1.3 Modifizierte Nucleoside	7
1.3.1 Aufbau	7
1.3.2 Vorkommen	9
1.3.3 Synthese und Abbau	11
1.3.4 Funktion.....	11
1.3.5 Rolle als Tumormarker.....	12
1.4 Analytische Methoden	12
1.4.1 Affinitätschromatographie	12
1.4.2 Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)	14
1.4.3 Electrospray-Ionization High-Capacity-Trap Massenspektrometrie (ESI-HCT MS).....	15
1.4.4 Support Vector Machine (SVM)	18
1.5 Zielsetzung	20
2 MATERIAL UND METHODIK	22
2.1 Probengewinnung	22
2.1.1 Mammakarzinom-Patientinnen	22
2.1.2 Gesunde Probandinnen.....	25
2.1.3 Kreatininbestimmung	26
2.2 Affinitätschromatographie	27
2.2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	27
2.2.2 Schema der Urinaufbereitung	28
2.2.3 Validierung der Methode.....	31
2.3 MS-Analytik	32
2.3.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	32
2.3.2 Massenspektrometrische Methode	33
2.4 Auswertung und Datengenerierung	35
2.5 Support Vector Machine (SVM)	36

3	ERGEBNISSE	41
3.1	Optimierung der Probenaufbereitung	41
3.1.1	Waschschritt vor Elution	41
3.1.2	zeitlicher Ablauf der Elution.....	42
3.1.3	Vermeidung von Verschleppungen	44
3.1.4	Einfluss der Reinigungsprozedur	44
3.2	Validierung der Methode	45
3.2.1	Reproduzierbarkeit	46
3.2.2	Linearität	46
3.3	bioinformatische Auswertung	48
4	DISKUSSION	50
4.1	Optimierung der Probenaufbereitung	50
4.2	Validierung der Methode	51
4.3	bioinformatische Auswertung	51
5	ZUSAMMENFASSUNG	54
6	ABBILDUNGEN UND TABELLEN	55
7	LITERATURVERZEICHNIS	57
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	64
9	METABOLITENVERZEICHNIS	66
10	DANKSAGUNG	73
11	LEBENS LAUF	74

1 Einleitung

In diesem Kapitel sollen zunächst die medizinischen Aspekte des Mammakarzinoms dargestellt und die Notwendigkeit der Forschung auf dem Gebiet der Diagnostik herausgearbeitet werden. Dazu wird der aktuelle Stand der Forschung in Bezug auf Tumormarker allgemein und speziell beim Mammakarzinom vorgestellt. Es folgt eine Einführung in die Chemie der modifizierten Nucleoside und die verwendeten analytischen Methoden. Abschließend wird das Ziel der Arbeit formuliert.

1.1 Medizinische Aspekte des Mammakarzinoms

1.1.1 Epidemiologie

Nach Angaben der International Association on Research of Cancer (IARC) ist das Mammakarzinom die weltweit häufigste maligne Erkrankung der Frau. Jährlich entwickeln ungefähr 1,2 Millionen Frauen einen bösartigen Tumor der Brust, 410 000 versterben daran.^[1] In Deutschland erkrankten im Jahr 2002 nach Schätzungen des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister etwa 55 000 Frauen neu an Brustkrebs, 18 000 verstarben.^[2]

Berechnet bis zum 75. Lebensjahr beträgt das mittlere Lebenszeitrisko einer Frau zwischen 9 % und 10 %, das heißt, jede zehnte Frau wird im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkranken.^[3]

Das mittlere Erkrankungsalter für ein Mammakarzinom liegt mit 62 Jahren sieben Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter für Krebs allgemein.^[3]

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt nach aktuellen Schätzungen über alle Tumorstadien gesehen bei 79 %.^[2]

1.1.2 Diagnostik

Fällt im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung ein suspekter Befund auf oder tastet eine Frau bei sich selber einen Knoten, kommen als erste diagnostische Maßnahmen die ärztliche Tastuntersuchung sowie Ultraschall und Mammographie als bildgebende Verfahren zum Einsatz.

Zur Diagnosesicherung wird eine Biopsie entnommen. In den meisten Fällen werden hierzu geschlossene, nicht operative Verfahren, wie die Hochgeschwindigkeits-Stanzbiopsie oder die Vakuumstanzbiopsie eingesetzt.

Die so gewonnene Gewebeprobe wird histologisch untersucht und nach ihrer Bösartigkeit eingeteilt (Grading).

Zur besseren Therapieplanung wird darüber hinaus der Hormonrezeptorstatus festgestellt.^[3]

Liegen spezifische Symptome vor oder besteht ein hohes Risiko, dass der Tumor schon gestreut hat, werden verschiedenste radiologische Techniken (Röntgen, Ultraschall, CT, MRT, PET-CT, Szintigraphie) zum präoperativen Staging angewendet.^[4]

Auf die Möglichkeit der Verwendung von Tumormarkern im Rahmen der Diagnostik wird in Kapitel 1.2 eingegangen.

1.1.3 Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Am Anfang steht meist die Operation, die brusterhaltend, wiederherstellend oder ablativ sein kann.

Verschiedene adjuvante und neoadjuvante Behandlungsmöglichkeiten ergänzen die operative Therapie. Zum Einsatz kommen dabei sowohl die Bestrahlung als auch eine medikamentöse Therapie mit Zytostatika, Hormonen / Antihormonen, Antikörpern und Immunmodulatoren.^[5]

1.2 Tumormarker

Tumormarker sind Proteine oder andere biologische Substanzen im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten, deren erhöhte Konzentration auf einen Tumor bzw. ein Tumorrezidiv hinweisen können. Aufgrund ihrer geringen Spezifität sind sie allerdings – bis jetzt – nicht zum Screening, sondern, je nach Marker und Tumorentität, nur zur Verlaufskontrolle geeignet.

Unter Spezifität versteht man den Anteil der richtig negativen Untersuchungsergebnisse geteilt durch die Gesamtzahl der Probanden ohne die Erkrankung. Die Sensitivität hingegen ist der Anteil der richtig positiven Untersuchungsergebnisse geteilt durch die Gesamtzahl der Probanden mit der Erkrankung.

Beide betragen im Idealfall 100 %. Im praktischen Umgang mit Tumormarkern hat es sich jedoch als günstig erwiesen, den cut-off-Punkt bei einer Spezifität von 95 % anzusetzen und daraus die Sensitivität zu berechnen. Wählt man nämlich eine höhere Spezifität, um mehr Gesunde als gesund zu erkennen, resultiert daraus meist eine niedrigere Sensitivität, das heißt Kranke werden nicht mehr als krank erkannt.

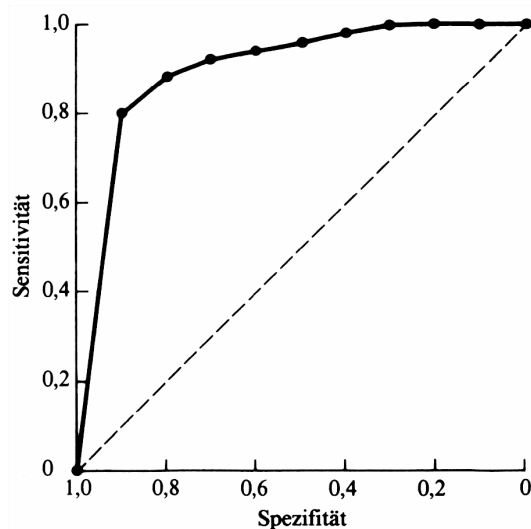


Abbildung 1: Darstellung der gegenseitigen Abhängigkeit von Sensitivität und Spezifität. Je weiter sich die Kurve eine Sensitivität und Spezifität von 1,0 ($x=0$, $y=1$) annähert, desto mehr nimmt die Nützlichkeit eines Tests zu.

1.2.1 Einteilung

Bis jetzt konnte die Idee, Tumormarker zum Mammakarzinom-Screening zu verwenden, aufgrund unbefriedigender Resultate nicht verwirklicht werden.^[6, 7] Es besteht also weiterhin Forschungsbedarf im Hinblick auf die Entwicklung in der Praxis einsetzbarer Methoden zur Vorhersage, ob ein bösartiger Prozess im Körper eines Menschen stattfindet oder nicht und wenn ja wo.

Es existieren bereits zahlreiche klassische, nicht zum Screening geeignete Tumormarker, die im Folgenden kurz systematisiert werden sollen.

In der ersten Gruppe sind die Keimlinienzellmarker zusammengefasst, die es auf genetischer Ebene ermöglichen, das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, abzuschätzen.^[8]

Des Weiteren existieren Tumormarker, die vom Tumorgewebe selbst produziert werden und somit per se einen malignen Prozess anzeigen. Dazu gehören zum Beispiel die Marker HER-2/neu, Cathepsin D sowie Östrogen- und Progesteronrezeptoren.^[8]

Die letzte Gruppe beinhaltet die zirkulierenden Marker, zu denen maligne Zellen und freie DNA, Tumor-assoziierte Antigene (TAA), Antikörper gegen TAAs sowie die Marker der Tumorbiologie gerechnet werden.^[8]

Auf einzelne Tumormarker, die die American Society of Clinical Onkology (ASCO) im Update des Jahres 2000 ^[9] zum Teil für den Einsatz bei Mammakarzinom empfiehlt, wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2.2 Keimlinienzellmarker

Zu den Keimlinienzellmarkern gehören zum Beispiel BRCA1 und BRCA2 (Breast Cancer Gene). Je nachdem, ob diese Gene, die in Leukozyten isoliert

werden können, in der normalen, mutierten oder deletierten Form vorliegen, kann eine Aussage über das individuelle Risiko einer Patientin getroffen werden. Liegt ein entsprechendes Ergebnis vor, können frühzeitig präventive Maßnahmen ergriffen werden.^[8]

1.2.3 Marker im Tumorgewebe

1.2.3.1 Her-2/neu

Her-2/neu gehört zur Familie der Epidermal Growth Factor Receptors, die für Wachstum, Differenzierung und Mobilität epithelialer Zelltypen verantwortlich sind.

Es handelt sich um ein 185 *kDa* schweres Transmembran-Glykoprotein mit intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität.^[10] Durch Bindung eines Liganden werden über Homo- und Heterodimerbildungen subzelluläre Signaltransduktionswege aktiviert.^[11]

Eine Amplifikation bzw. Überexpression dieses Rezeptors wird in 20 – 40 % der Mammakarzinome beobachtet.^[12, 13, 14] Dieses Phänomen scheint mit einer schlechteren Prognose und einer relativ schlechten Ansprechbarkeit des Tumors auf endokrine Therapie, Chemotherapie, Radiotherapie und Herceptin verbunden zu sein.^[11]

Von der ASCO wird deshalb empfohlen, die Her-2/neu Überexpression bei jedem primären Mammakarzinom zu bestimmen. Gleichzeitig warnt sie aber auch davor, Rückschlüsse, die in Bezug auf Prognose und Therapie gezogen werden, überzubewerten.^[9]

1.2.3.2 Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Dockt Östradiol, ein Steroidhormon, an einen intrazellulären Östrogenrezeptor an, wird über verschiedene Signalkaskaden die Synthese von Progesteronrezeptoren einerseits, von Wachstumsfaktoren wie Transforming

Growth Factor (TGF), Epidermal Growth Factor (EGF) und Insulin like Growth Factor (IGF 1) andererseits hoch reguliert.^[15] Antiöstrogene wie Tamoxifen wirken antiproliferativ, indem sie kompetitiv die Östrogenrezeptoren hemmen und die Freisetzung von TGF β fördern, das seinerseits durch Östrogen gehemmt wird und einen antiproliferativen Effekt hat.^[16]

Die ASCO empfiehlt, bei jeder an einem Mammakarzinom erkrankten Frau den Hormonrezeptorstatus zu bestimmen, damit bei positivem Status eine endokrine adjuvante Therapie in Betracht gezogen werden kann.^[9]

1.2.3.3 Cathepsin D

Cathepsin D ist eine lysosomale Aspartatprotease, die durch Verdau der Basalmembran und der extrazellulären Matrix die Krebszellmigration und -invasion fördern kann. Dadurch kann es zur Tumordinvasion und Metastasierung beitragen.^[17] Es konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym in proliferierendem im Vergleich zu ruhendem Mammagewebe in erhöhten Konzentrationen nachweisbar ist.^[18]

Die Empfehlung der ASCO zum Einsatz von Cathepsin D als Tumormarker bei Mammakarzinom-Patientinnen ist aufgrund der schlechten Datenlage zurückhaltend.^[9]

1.2.4 Zirkulierende Marker

1.2.4.1 Karzinoembryonales Antigen (CEA)

Das 180 *kDa* schwere CEA ist ein zur Immunglobulin-Superfamilie gehörendes Glykoprotein.^[19] Es kommt in jeder gesunden Zelle als homotypisches interzelluläres Adhäsionsmolekül vor, wird aber im Rahmen von Adenokarzinomen, vor allem des Kolon, der Leber, Mamma und Lunge, überexprimiert.^[18] Kolorektale Karzinome und deren Lebermetastasen weisen die höchste CEA-Konzentration auf. Bei anderen Tumorentitäten ist die

Einleitung

Serumkonzentration des karzinoembryonalen Antigens weitaus kleiner, deshalb weisen schon geringfügige Erhöhungen auf fortgeschrittene Tumorstadien hin.^[19]

Da CEA auch unabhängig von malignen Prozessen im Körper, zum Beispiel im Rahmen von Schwangerschaft, bei Rauchern, Hepatitiden usw., in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden kann,^[19] empfiehlt die ASCO die Verwendung von CEA als Tumormarker bei Mammakarzinom nicht.^[9]

1.2.4.2 CA 15-3

Das 30 *kDa* schwere CA 15-3 ist ein zur Milchfettkügelchen-Muzin-Familie gehörendes hochmolekulares Kohlenhydrat-Antigen.^[20] Es kann homogen verteilt im Zytoplasma von Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden.^[21] Erhöhte Konzentrationen finden sich aber auch bei benignen Veränderungen und im normalen Milchgangsepithel.^[22]

Aufgrund der derzeitigen Datenlage empfiehlt die ASCO CA 15-3 nicht als Marker für Screening, Diagnose, Staging oder Überwachung der Therapie.^[9]

1.3 Modifizierte Nucleoside

1.3.1 Aufbau

Nucleoside sind aus je einer Base und einem Zucker aufgebaut, die über eine N-glykosidische Bindung verknüpft sind. Beim Zucker handelt es sich je nach Art der Nucleinsäure um eine Ribose oder eine Desoxyribose. Zu den wichtigsten Basen zählen die Purinbasen Adenin und Guanin, die bedeutendsten Pyrimidinbasen sind Cytosin, Thymin (vor allem in der DNA) und Uracil (vor allem in der RNA). Von einem Nucleotid spricht man, wenn das C(5')-Atom mit einem Phosphatrest verestert ist.

Einleitung

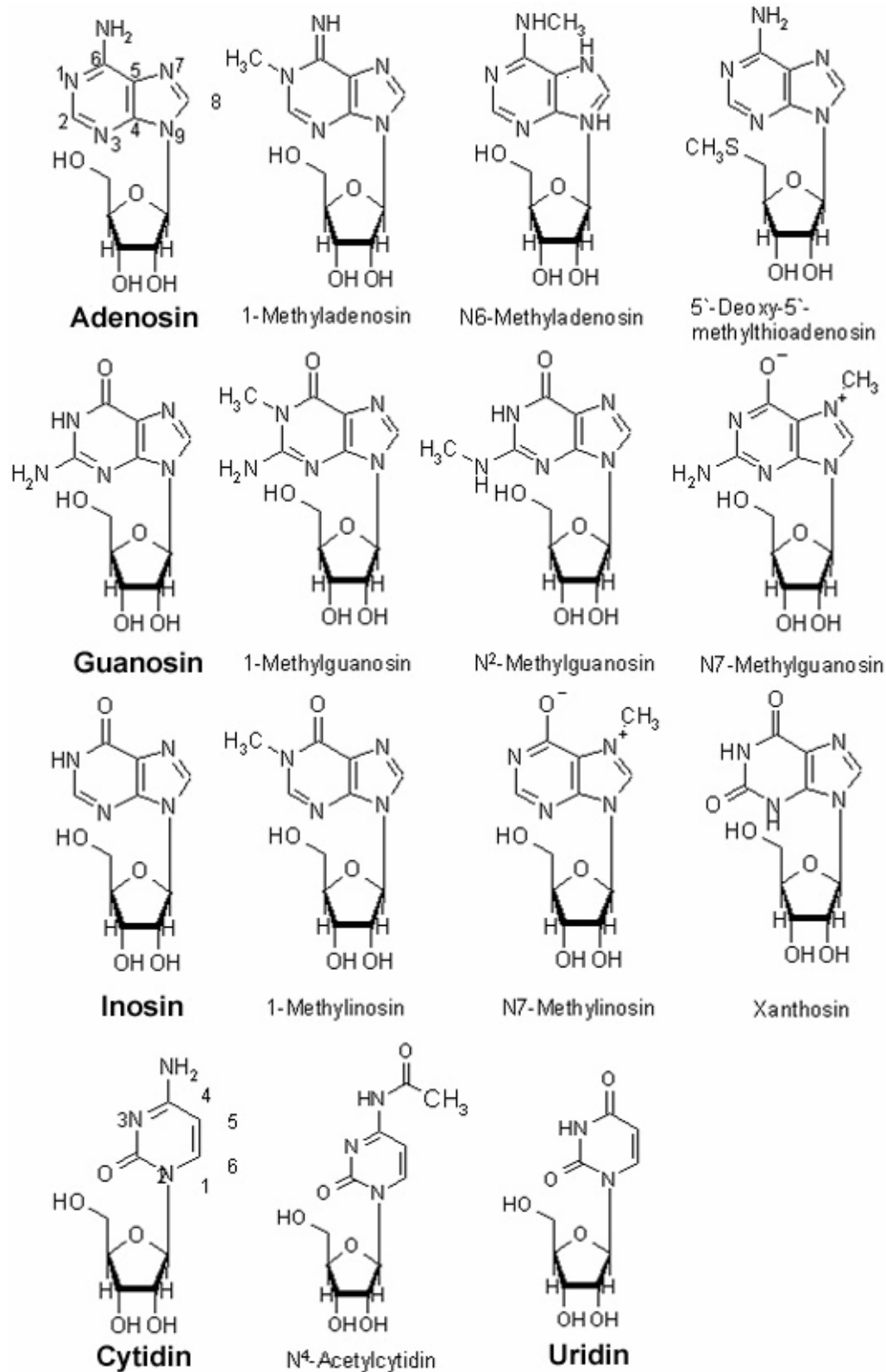


Abbildung 2: Strukturformeln modifizierter und nicht modifizierter (fett) Nucleoside.

Die bis heute zirka hundert entdeckten Modifizierungen leiten sich von den fünf Hauptnucleosiden ab.^[23] Dabei treten neben ein- oder mehrfacher Methylierung an Base oder Zucker Isomerisierung, Reduktion, Thiolierung, Deaminierung bis hin zu Hypermodifikation mit komplexen Seitenketten auf.

1.3.2 Vorkommen

Modifizierte Nucleoside treten in niedriger Konzentration sowohl in der DNA als auch in mRNA, rRNA und snRNA auf. Die höchsten Konzentrationen finden sich jedoch in der tRNA.^[24]

tRNA besteht aus zirka achtzig Nucleotiden, die teilweise über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind und so im zweidimensionalen Raum die typische Kleeblattstruktur ausbilden. Reife tRNA entsteht im Rahmen der posttranskriptionellen Prozessierung. Ein hochmolekularer Enzymkomplex katalysiert die Entfernung von Introns, schneidet das 3'- und 5'-Ende und fügt dort bestimmte Nucleotide ein. An dieser Stelle finden auch die meisten Modifizierungen statt.

Im Rahmen der Translation hat tRNA die Aufgabe, im Zytosol befindliche Aminosäuren zu binden und zu den Ribosomen zu transportieren, wo in Zusammenarbeit mit rRNA, Aminoacyl-tRNA-Ligasen sowie den Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren das auf der DNA codierte und auf mRNA transkribierte Protein synthetisiert wird.

Ist dieser Prozess abgeschlossen, werden alle beteiligten RNA-Arten in mehreren Schritten abgebaut und entweder wieder in den Zyklus eingeschleust oder renal eliminiert.^[25]

Einleitung

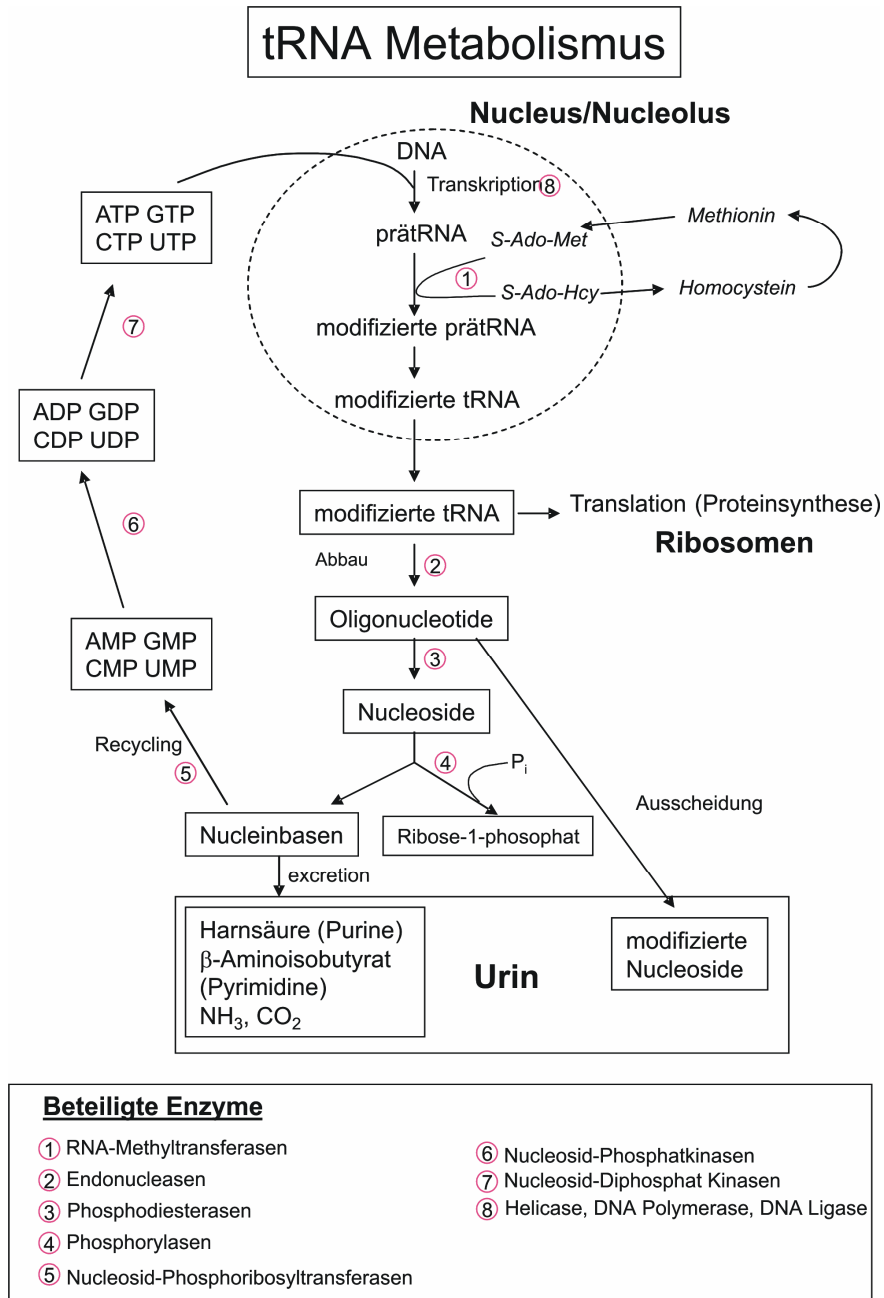


Abbildung 3: Überblick über den tRNA-Metabolismus.

1.3.3 Synthese und Abbau

Modifizierte Nucleoside entstehen im Anschluss an die Transkription in der prä-RNA im Zellkern. Die dafür zuständigen Enzyme sind hochspezifisch und ortsständig.^[26] Ihre Aktivität hängt mit der dreidimensionalen Struktur der tRNA sowie mit der Nucleotidsequenz in der Umgebung des zu modifizierenden Nucleosids zusammen.^[27]

Die modifizierten Nucleoside werden, da sie nicht wie die unveränderten Hauptnucleoside wieder verwendet werden können, über Transportproteine aus der Zelle in den Blutkreislauf eingeschleust.^[28] Anschließend werden sie über die Niere eliminiert.

Da die modifizierten Nucleoside weitgehend quantitativ mit dem Urin ausgeschieden werden, kann ihre Konzentration im Harn einen Hinweis auf den RNA-Metabolismus im Körper geben.^[29 - 31] Bei Erwachsenen ist der RNA-Umsatz dabei konstant^[32 - 35], lediglich bei Kindern unter sechzehn Jahren ist er deutlich erhöht.^[35, 36]

1.3.4 Funktion

Durch die Modifizierung einzelner Nucleoside in der tRNA wird die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Nucleobasen gezielt beeinflusst, was in einer leicht veränderten dreidimensionalen Struktur des Gesamtmoleküls resultiert.^[37] Dadurch kann auch die Translation und damit die Funktion des entstehenden Proteins beeinflusst werden.^[38] Man vermutet, dass modifizierte Nucleoside unabdingbar für die optimale Interaktion zwischen Komponenten der Proteinbiosynthese und der tRNA sind.^[29] Darüber hinaus spricht für die Beeinflussung der Zellphysiologie durch modifizierte Nucleoside, dass sie bei der Transkription ein Verschieben des Leserasters verhindern und damit einen Einfluss auf die Gen-Expriemierung haben.^[39] Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass zum Beispiel in malignen Zellen und nach Karzinogenexposition in eukaryontischen Zellen hypo- bzw. hypermodifizierte tRNA entsteht.^[40]

1.3.5 Rolle als Tumormarker

Modifizierte Nucleoside werden quantitativ mit dem Urin ausgeschieden. Sie sind somit ein Maß für den RNA-Metabolismus. Tumorgewebe unterliegt einem erhöhten Stoffwechsel und damit auch einem erhöhten RNA-Metabolismus.^[41] Folglich können durch Messung spezifischer Nucleoside im Urin Aussagen über verschiedene Tumorerkrankungen gemacht werden. Dies ist in einigen Studien vor allem bezüglich Mammakarzinom ^[42 - 46], Lungenkarzinom ^[47 - 49] und Leukämie ^[50 - 52] geschehen. Man geht davon aus, dass modifizierte Nucleoside als Tumormarker eingesetzt werden könnten.^[53]

1.4 Analytische Methoden

1.4.1 Affinitätschromatographie

Eine Methode zur Trennung gelöster Substanzen ist die Flüssigkeitschromatographie. Grundprinzip ist die Wechselwirkung eines zu analysierenden Stoffes zwischen stationärer und mobiler Phase.

Zwei Verfahren stehen hierbei zur Auswahl, die Dünnschicht- und die Säulenchromatographie, wobei die Affinitätschromatographie auf dem Säulenprinzip beruht. Für die stationäre Phase wird eine Säule mit einem Gel gefüllt, das je nach Zielsetzung variiert. In der mobilen Phase gelöst wird der Analyt an diesem Gel vorbeigeführt. Durch die Wechselwirkung der gelösten Substanzen mit der Oberfläche kommt es zur Trennung des Substanzgemischs.^[54]

Einleitung

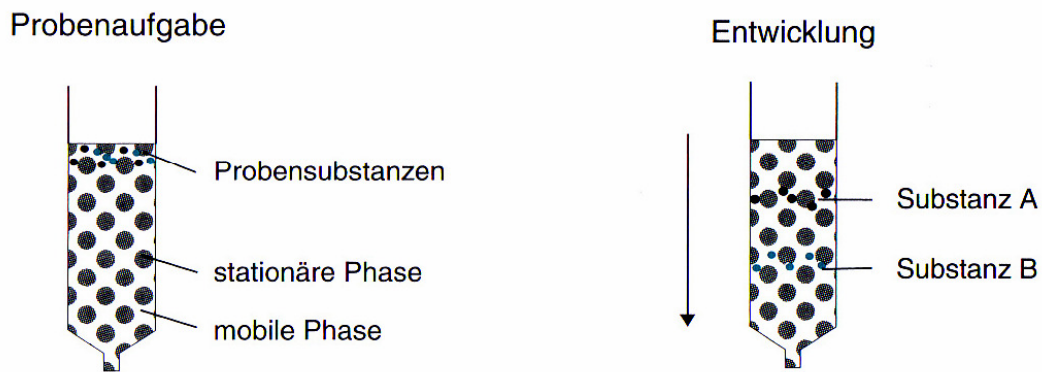


Abbildung 4: Prinzip der chromatographischen Trennung.

Zur Elution modifizierter Nucleoside aus Urin eignet sich Phenylboronsäure, die eine hohe Affinität zu den cis-diol-Gruppen des Riboseanteils der Nucleoside hat.^[55] Im alkalischen Bereich erfolgt eine Komplexbildung zwischen Phenylboronsäure und Nucleosiden. Die unerwünschten Urinbestandteile werden mithilfe von Ammoniumacetat und einer Methanol-Ammoniumacetat-Mischung ausgewaschen. Wird anschließend der pH-Wert abgesenkt, werden die Nucleoside eluiert.

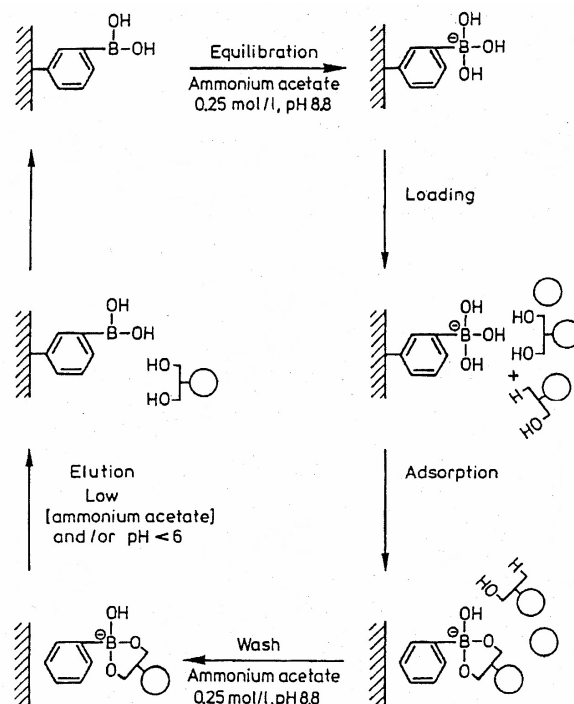


Abbildung 5: Interaktion zwischen cis-diol-Gruppen und Phenylboronsäure.

1.4.2 Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Die HPLC beruht auf den gleichen grundsätzlichen Überlegungen, die in Kapitel 1.4.1 angestellt wurden.

Der Unterschied zur konventionellen Flüssigkeitschromatographie liegt in der Verwendung einer stationären Phase mit relativ kleinen Partikeln. Diese 3 – 5 μm großen Partikel erzeugen in der Säule einen hohen Gegendruck, der nur mithilfe von Pumpensystemen, die einen Druck von zirka 400 *bar* erzeugen, überwunden werden kann.

Ein Vorteil gegenüber den mit Normaldruck arbeitenden Säulen ist aufgrund der größeren Oberfläche die höhere Trennleistung und die kürzeren Trennzeiten.

Bei der RP-HPLC werden unpolare Gele als stationäre Phase verwendet, die in hydrophober Wechselwirkung mit dem in der wässrigen, polaren Phase gelösten Analyten stehen. Zur Elution werden unpolare, organische Lösungsmittel verwendet.

Der Vorteil gegenüber der HPLC liegt in einer kürzeren Äquilibrierzeit und dem kostengünstigen Einsatz von wässrigen Laufmitteln.^[54]

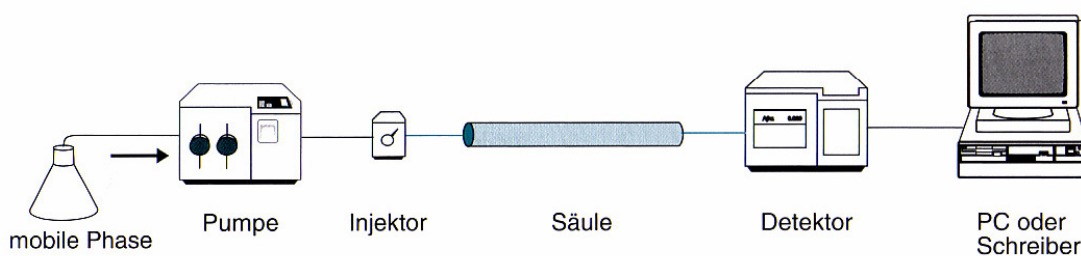


Abbildung 6: Aufbau der HPLC-Anlage.

1.4.3 Electrospray-Ionization High-Capacity-Trap Massenspektrometrie (ESI-HCT MS)

Mithilfe der Massenspektrometrie lässt sich die Masse freier Ionen in der Gasphase bestimmen.

Ein Massenspektrometer besteht aus drei Komponenten, einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Für die Ionisierung der zu untersuchenden Probe und ihre Übertragung in den Gasraum stehen verschiedene Techniken wie die Electrospray-Ionization (ESI) oder die Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization (MALDI) zur Verfügung. Im Analysator werden die geladenen Teilchen hinsichtlich ihres Masse/Ladungsquotienten (m/z) getrennt. Hierzu kann zum Beispiel ein Time-of-Flight-Analysator (TOF) oder die High-Capacity-Trap (HCT) verwendet werden. Im Detektor werden die getrennten Ionen erfasst und die relativen Intensitäten gegen m/z in einem Massenspektrum aufgetragen.

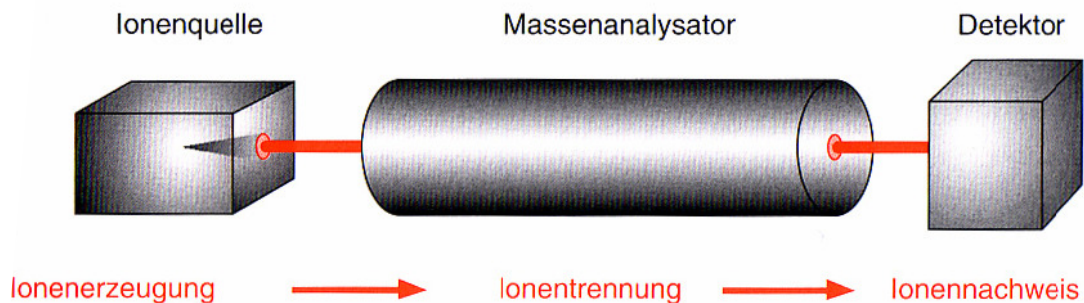


Abbildung 7: Prinzipieller Aufbau eines Massenspektrometers.

Die bei dieser Arbeit eingesetzte ESI ist aufgrund der sanften Ionisation mit wenig Fragmentierungen ein häufig angewendetes Verfahren in der Bioanalytik von Peptiden, Proteinen und anderen Substanzklassen. Sie wird verwendet, um gelöste Moleküle möglichst schonend in den Gasraum zu überführen und zu ionisieren. Dabei werden kleinste geladene Flüssigkeitstropfen fein in einem elektrischen Feld verteilt.

Einleitung

Über eine Stahlkapillare wird die Probelösung in einen Raum zwischen der Kapillare und einer Lochblende eingeführt, in dem ein elektrisches Feld von mehreren kV aufgebaut wird und das abhängig von der geforderten Ladung der Ionen gepolt ist. Im Positivmodus ist die Kapillare positiv gepolt, die Anionen werden angezogen. Die Kationen werden nach außen an die Flüssigkeitsoberfläche gedrückt. An der Spitze der Kapillare wird die Flüssigkeit in Form eines Taylor-Konus in Richtung Kathode gezogen. Der kontinuierliche Flüssigkeitsstrom in Richtung Lochblende wird nach kurzer Zeit instabil und zerfällt. Die Kationen lagern sich aufgrund der gegenseitigen Abstoßung an der Tropfenoberfläche an. Durch das verdampfende Lösungsmittel werden sie immer näher zusammengedrängt. Sobald eine gewisse Ladungsdichte, das so genannte Rayleigh-Limit, überschritten ist, führt eine Coulomb-Explosion zur Entstehung noch kleinerer Tröpfchen. Dieser Prozess wiederholt sich so lange, bis die Ionen gleichmäßig in der Gasphase verteilt sind.

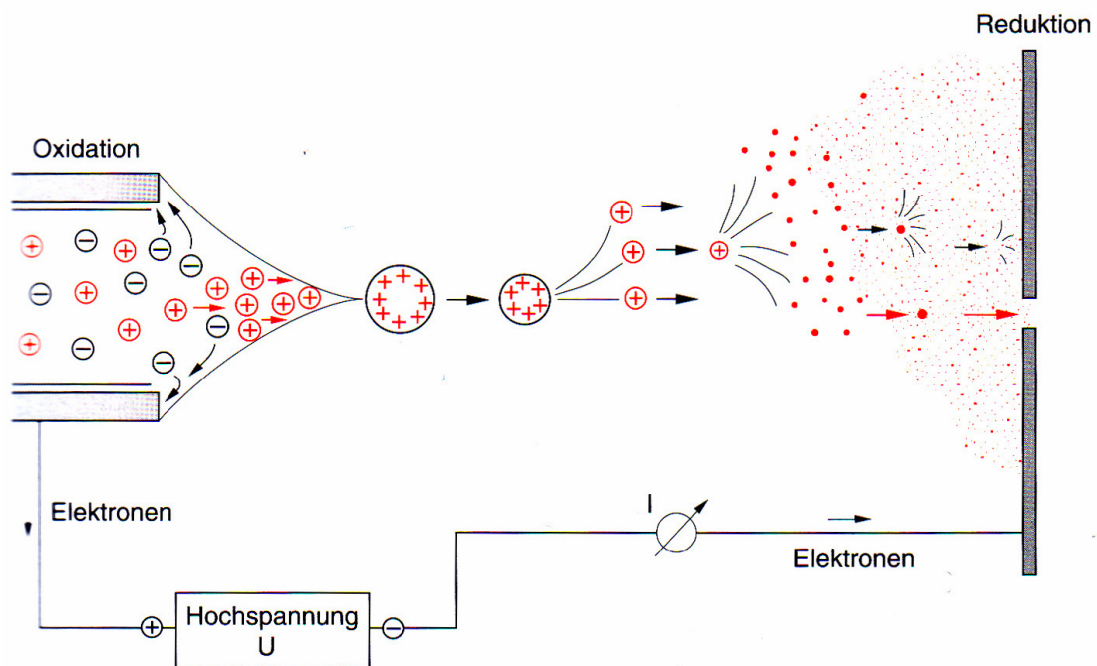


Abbildung 8: Prinzip der ESI.

Bei dieser Arbeit kam als Analysator eine HCT zu Einsatz, die geladene Teilchen einfängt und sie innerhalb eines elektrischen Feldes auf eine Kreisbahn zwingt und dort akkumuliert.

Einleitung

Aufgebaut ist die HCT aus zwei Ringelektroden, die zu beiden Seiten hin durch Endkappenelektroden abgeschlossen wird. Zum Ein- und Auslass der Elektroden befinden sich in der Mitte der Endkappen kleine, konzentrische Öffnungen. Durch Anlegen einer hochfrequenten Wechselspannung mit definierter Amplitude und Frequenz wird ein dreidimensionales elektrisches Feld erzeugt. Dieses Feld erzeugt einen Potentialtopf, in dem Ionen abhängig von ihrer kinetischen Energie eingefangen werden. Da die aus der Ionenquelle einschießenden Ionen eine relativ hohe kinetische Energie besitzen und daher nicht in der Potentialmulde gehalten werden können, müssen sie abgebremst werden. Dies wird durch die Füllung der Falle mit inertem Heliumgas bei zirka $1,5 \times 10^{-5} \text{ bar}$ erreicht. Durch Kollision mit Heliumatomen verlieren die Ionen einen Teil ihrer kinetischen Energie und können eingefangen werden. Die Akkumulationszeit beträgt zwischen einigen Zehntel Millisekunden und hundert Sekunden. Während dieser Zeit findet die Messung statt. Wird an den Endkappen eine Resonanzfrequenz angelegt und diese gesteigert, nehmen die Ionen Energie auf, bis sie die Potentialmulde verlassen können und ausgestoßen werden.^[54]

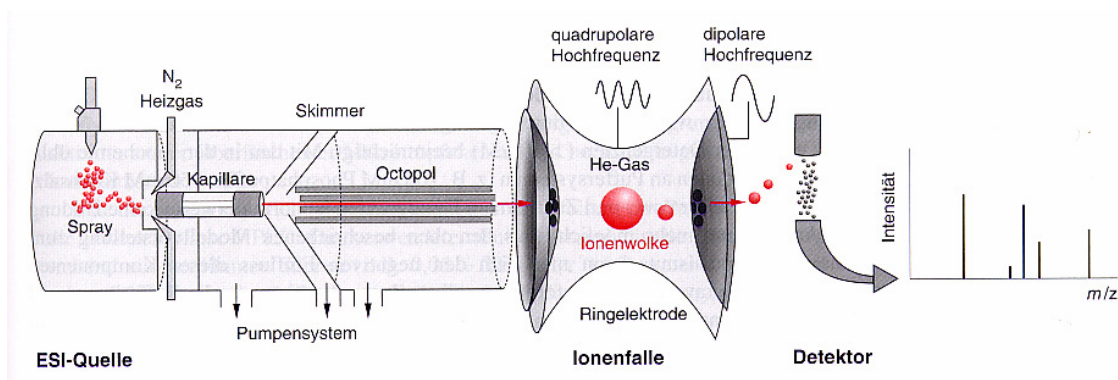


Abbildung 9: Aufbau der kompletten ESI-HCT MS.

1.4.4 Support Vector Machine (SVM)

Zur Erstellung von Klassifizierungssystemen werden in der Bioinformatik verschiedene Methoden verwendet. Zu den gebräuchlichsten Verfahren zählt die Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA), bei der umfangreiche Datensätze strukturiert werden, indem statistische Variablen durch einige aussagekräftige Hauptkomponenten dargestellt werden. Anwendung findet diese Methode zum Beispiel in einer Studie zur Klassifizierung von Leberkrebspatienten im Vergleich zu Gesunden und Patienten mit sonstigen Leberkrankheiten.^[56] Eine andere Methode, bei der ein präspezifizierter Datensatz aus Ein- und Ausgabedaten eingesetzt wird, mit dem ein dreischichtiges, über Knotenpunkte verbundenes System solange trainiert wird, bis die resultierende Gewichtung der einzelnen Neuronenstränge die maximale Anzahl richtiger Ausgabewerte errechnet, ist das Künstliche Neuronale Netz (Artificial Neural Network, ANN). Auch dieses Verfahren wird in der medizinischen Forschung häufig angewendet, so zum Beispiel in einer Studie zur Klassifizierung von bös- und gutartigen Tumoren im Vergleich zu Gesunden^[57] oder bei der Analyse von Ribonucleosiden im Urin von Tumorpatienten im Vergleich zu Kontrollproben von Gesunden.^[58]

Eine SVM ist ein Large Margin Classifier, der eine Menge von Objekten so in Klassen unterteilt, dass um die Klassengrenzen herum ein möglichst breiter Bereich frei von Objekten bleibt. Es ist ein in Computerprogrammen umgesetztes, rein mathematisches Verfahren der Mustererkennung, das geeignet ist, aus komplexen Zusammenhängen spezifische Informationen für die Klassifizierung großer Datenmengen abzuleiten.

Im Rahmen der Krebsforschung wurde die SVM mehrfach eingesetzt, unter anderem auch zur Untersuchung der modifizierten Nucleoside. Wurde in einer Studie von Mao et al. das Nucleosidmuster im Urin von Blasenkrebspatienten mit gesunden Kontrollprobanden verglichen,^[59] konzentrierte sich unsere Arbeitsgruppe auf das Mammakarzinom. Hier konnte in einer auf HPLC-UV-

Einleitung

Daten basierenden Studie mithilfe einer Leave One Out-Kreuzvalidierung (LOO) eine für den Gesamtdatensatz unter Einbeziehung von elf Nucleosiden maximale Klassifizierungsleistung von 85 % Spezifität und 74 % Sensitivität erreicht werden. In einer weiteren Studie mit einunddreißig Nucleosiden konnten Spezifität und Sensitivität auf 89,9 % und 87,7 % verbessert werden. Annähernd gleich gute Ergebnisse bei insgesamt geringeren Datensätzen konnten mithilfe des Recursive Feature Elimination-Algorithmus (RFE) erreicht werden, bei dem die relevantesten Metabolite aus der LOO-Kreuzvalidierung ausgewählt werden.^[60]

Für die Entwicklung einer Support Vector Machine benötigt man eine Menge von Trainingsobjekten, für die bekannt ist, welcher Klasse sie zugehören. Die Objekte werden im Vektorraum durch einen Vektor repräsentiert. Die SVM passt eine mehrdimensionale Hyperebene in diesen Raum ein. Sie teilt Trainingsobjekte in zwei Klassen und fungiert als Trennebene. Da eine eindeutige Trennung mit einer Hyperebene nur bei linear trennbaren Objekten möglich ist, ist in realen Anwendungsfällen im Allgemeinen die Verwendung des Kernel-Algorithmus angebracht. Dieser ermöglicht es, auch im Fall nicht linear trennbarer Daten eine nicht lineare Hyperebene zu berechnen.^[61]

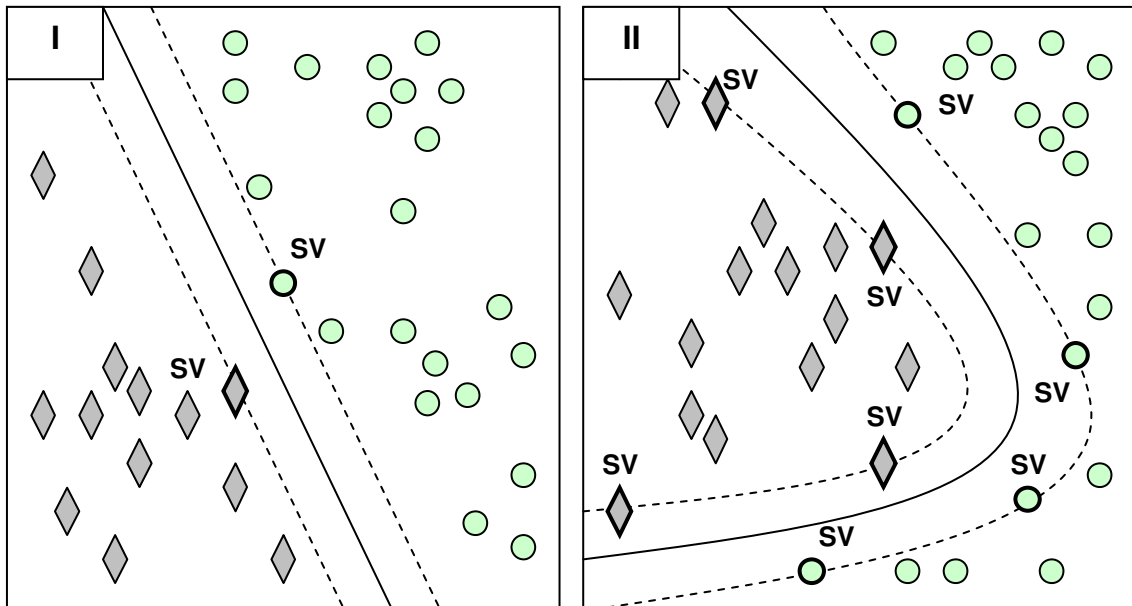


Abbildung 10: Klassifizierung mit einer SVM. I lineares Trennproblem, II komplexeres Trennproblem. Kreis: Kollektiv 1, Raute: Kollektiv 2, SV: Support Vektoren, schwarze Linie: Hyperebene.

Mittels Ähnlichkeitsmaßen $k(x_i, y_i)$ wird die berechnete Hyperebene abgebildet. Die Ähnlichkeitsmaße, auch Mercer-Kernels genannt, haben die Eigenschaften eines Skalarproduktes. Sie können die Eingabedaten in einen hochdimensionalen Raum projizieren, in dem eine entsprechende Hyperebene gefunden werden kann.^[62]

1.5 Zielsetzung

Die Weiterentwicklung und Verbesserung der von Uziel et al. entwickelten Methode der Affinitätschromatographie^[55] steht bei dieser Studie zunächst im Vordergrund. Folgende Fragen sind zu beantworten:

- Wie kann der Waschschrift vor Elution optimiert werden, ohne vorzeitig Nucleoside zu lösen?
- Wie ist der zeitliche Ablauf der Elution?
- Wie können Verschleppungen verhindert werden?

Einleitung

- Wie wirkt sich die Reinigungsprozedur der Kolben auf die Verschleppung aus?

Wenn diese Fragen geklärt sind und ein optimales Aufarbeitungsschema erstellt ist, folgt die Validierung der Methode.

Den Abschluss bildet die Auswertung der Daten von je fünfundachtzig Mammakarzinom-Patientinnen und Kontrollprobandinnen. Durch den Einsatz einer ESI-HCT MS und die Verwendung einer SVM wird eine Verbesserung von Sensitivität und Spezifität gegenüber vorangegangenen Arbeiten erwartet, bei denen zum Beispiel mit UV und Neuronalem Netz ^[63] gearbeitet wurde.

2 Material und Methodik

In diesem Kapitel soll auf die Zusammensetzung des Kollektivs der Mammakarzinom-Patientinnen sowie der Vergleichsgruppe der gesunden Probandinnen eingegangen werden. Danach erfolgt eine Beschreibung der in der Studie verwendeten Methoden Affinitätschromatographie, Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), Electrospray-Ionization High-Capacity-Trap Massenspektrometrie (ESI-HCT MS) und Support Vector Machine (SVM).

2.1 Probengewinnung

2.1.1 Mammakarzinom-Patientinnen

Die Rekrutierung der durchschnittlich 57,5 Jahre alten Mammakarzinom-Patientinnen erfolgte in Kooperation mit der Universitäts-Frauenklinik Tübingen. Fünfundzwanzig der insgesamt hundertzwei Urinproben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Harald Seeger aus den Rückstellproben einer früheren Studie für die Aufarbeitung zur Verfügung gestellt. Bis dahin lagerten sie bei -20 °C im Labor der Universitäts-Frauenklinik.

Die restlichen siebenundsiebzig Proben wurden von November 2006 bis Februar 2007 vom Pflegepersonal der Stationen 1 – 3 der Universitäts-Frauenklinik Tübingen gewonnen. Die Patientinnen gaben präoperativ mindestens 15 ml spontanen Mittelstrahlurin ab, der bis zur Aufarbeitung bei -20 °C im Labor der Klinischen Pharmakologie aufbewahrt wurde.

Als Einschlusskriterien für die Aufnahme in die Studie galten:

- gesicherte Diagnose eines primären, nicht vorbehandelten Mammakarzinoms

Material und Methodik

- weibliches Geschlecht
- 25 – 80 Jahre alt
- Zustand vor einer geplanten Tumor-Operation
- unterschriebene Einverständniserklärung

Die Ausschlusskriterien wurden folgendermaßen definiert:

- < 25 oder > 80 Jahre alt
- Zustand nach Tumor-Operation
- Tumor-Rezidiv
- Schwangerschaft
- Vorliegen einer Autoimmunerkrankung
- Niereninsuffizienz
- bestehende HIV-Infektion
- bestehende akute oder chronische Hepatitis
- Teilnahme an einer Arzneimittelstudie in den letzten drei Monaten (Ausschluss durch entsprechende Passage in der Einverständniserklärung)
- Tumorspezifische Medikation (Chemotherapie / Hormontherapie; aktuell oder in der Vergangenheit)
- Einnahme folgender Arzneimittel im Zeitraum von vier Wochen vor der Studienteilnahme
 - immunmodulierende Arzneimittel
 - Mistelpräparate
 - Antibiotika und Virustatika
 - Allopurinol
 - Dipyridamol
- Zustand nach radioonkologischer Behandlung (Bestrahlung)

Keine der Patientinnen wurde aufgrund der Kriterien ausgeschlossen oder verweigerte die Teilnahme an der Studie. Von den hundertzwei untersuchten

Patientinnen befanden sich sechs im Stadium Tis, achtundfünfzig im Stadium T1, vierundzwanzig im Stadium T2, fünf im Stadium T3 und eine im Stadium T4. Bei acht Patientinnen lag kein histologischer Befund vor.

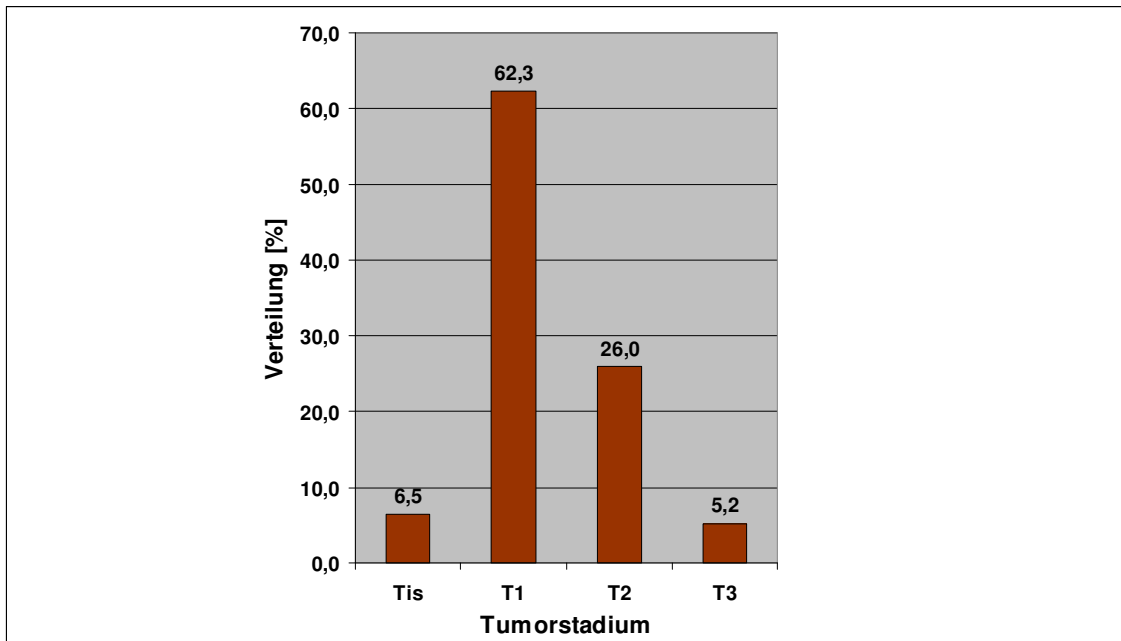


Abbildung 11: T-Klassifizierung der Tumoren der Mammakarzinom-Patientinnen [%].

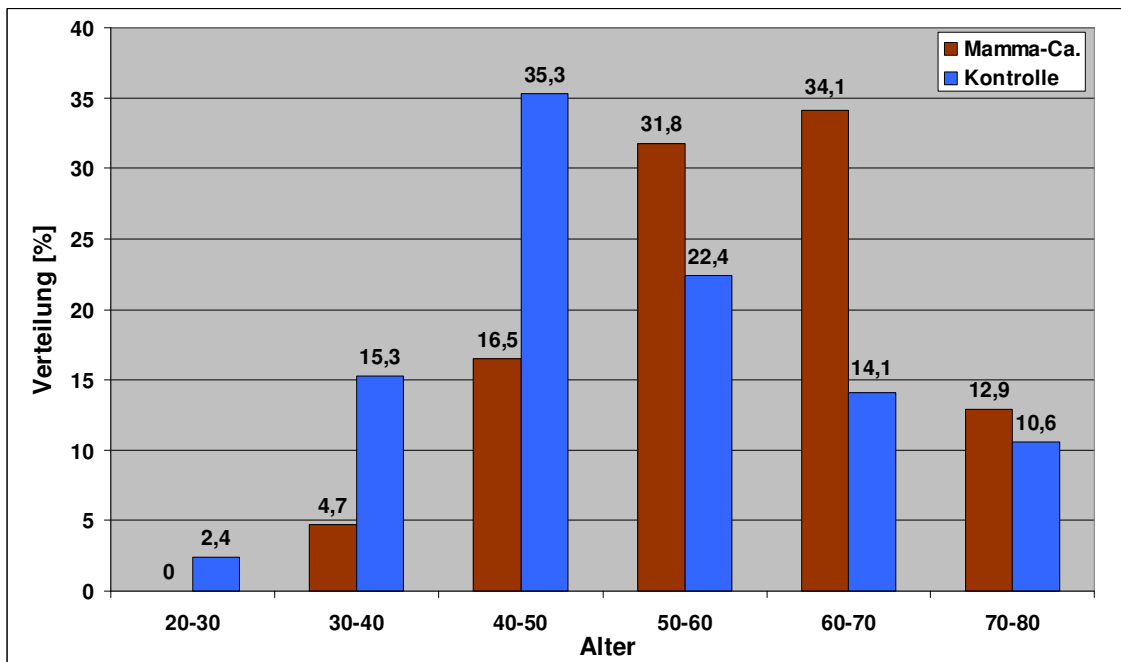


Abbildung 12: Altersverteilung der Patientinnen und Probandinnen [%].

2.1.2 Gesunde Probandinnen

Die Rekrutierung der durchschnittlich 51,5 Jahre alten gesunden Probandinnen erfolgte in Kooperation mit der Universitäts-Frauenklinik Tübingen und der Praxis Dr. Friese in Weil der Stadt.

Neunundzwanzig der insgesamt hundertvier Urinproben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Harald Seeger aus den Rückstellproben einer früheren Studie für die Aufarbeitung zur Verfügung gestellt. Bis dahin lagerten sie bei -20 °C im Labor der Universitäts-Frauenklinik.

Die restlichen fünfundsiebzig Proben wurden in der Praxis Dr. Friese in Weil der Stadt gewonnen. Die Probandinnen gaben mindestens 15 ml spontanen Mittelstrahlurin ab, der zunächst für 24 h bei -4 °C, dann bis zur Aufarbeitung bei -20 °C im Labor der Klinischen Pharmakologie tief gefroren wurde. Ein Fragebogen sollte gewährleisten, dass die Probandinnen die Einschlusskriterien erfüllten, beziehungsweise nicht durch die Ausschlusskriterien von der Studie ausgeschlossen werden mussten.

Als Einschlusskriterien für die Aufnahme in die Studie galten:

- weibliches Geschlecht
- 25 – 80 Jahre alt
- unterschriebene Einverständniserklärung

Die Ausschlusskriterien wurden folgendermaßen definiert:

- < 25 oder > 80 Jahre alt
- Schwangerschaft
- Vorliegen relevanter Erkrankungen
- Teilnahme an einer Arzneimittelstudie in den letzten drei Monaten (Ausschluss durch entsprechende Passage in der Einverständniserklärung)
- maligne Tumorerkrankungen seit der Geburt

- Einnahme folgender Arzneimittel im Zeitraum von vier Wochen vor der Studienteilnahme
 - immunmodulierende Arzneimittel
 - Mistelpräparate
 - Antibiotika und Virustatika
 - Allopurinol
 - Dipyridamol

Ein Ethikvotum für diese klinische Studie liegt vor (Studiencode: AKP-23).

2.1.3 Kreatininbestimmung

Die Kreatininbestimmung erfolgte in Kooperation mit dem Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen. Mithilfe eines automatisierten Prozesses wurde in je 500 μ l Urin an einem Hitachi 917 Automatic Analyzer (Boehringer Mannheim) der Kreatininwert nach einer modifizierten Jaffé-Methode gemessen. Diese beruht auf der photometrischen Messung der Extinktion eines Kreatinin-Pikrinsäurekomplexes, der bei alkalischem pH aus Kreatinin und Pikrin gebildet wird. Die Extinktion ist in geeigneten Grenzen direkt proportional zur Kreatinin-Konzentration.

Mithilfe des Kreatininwertes, ein von der Muskelmasse abhängiger, annähernd konstanter physiologischer Parameter, kann der Verdünnungsgrad von Urinen normalisiert werden. Dies ermöglicht es, anstelle von 24 h-Urin, dessen Gewinnung sich aufgrund mangelnder Compliance oft schwierig darstellt, Spontanurin zu verwenden.

2.2 Affinitätschromatographie

2.2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- Glassäulen (Länge: ca. 15 cm, Durchmesser: ca. 1,5 cm, Fritte Porosität: 2)
- Glassäulenaufsatz (Länge: ca. 18,5 cm, Durchmesser: ca. 2 cm)
- Rotationsverdampfer Rotavapor R200 (Büchi, Essen) mit CVC 2000 II Vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim)
- Zentrifuge 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
- Zentrifuge 1S-R Multifuge (Heraeus, Hanau)
- Vortexer 7-2020 (Neolab, Heidelberg)
- pH-Meter 540GLP (WTW, Weilheim)
- pH-Papier (Merck, Darmstadt)
- Wasseraufbereitungsanlage Simplicity 185 (Millipore, Billerica / USA)
- Kolbenhubpipetten Research / Reference 10/100/1000 + Verbrauchsmaterial (Eppendorf, Hamburg)
- Pipette Pipetman 10 ml (Gilson, Middleton / USA)
- Analytische Waage Genius ME (Satorius, Göttingen)
- Schüttelwasserbad JulaboSW23 (Julabo, Seelbach)

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

- Interner Standard Isoguanosin: 0,1 *mM* / 2,83 *mg* Isoguanosin in 100 *ml* bidestilliertes Wasser (Prof. J. H. Kim, Universität Seoul / Südkorea)

2.2.2 Schema der Urinaufbereitung

2.2.2.1 Packen der Säule

Zunächst wurden 500 *mg* Affigel boronate (Biorad, München) in einem kleinen Becherglas abgewogen und 15 *ml* bidestilliertes Wasser hinzugefügt. Nach dem Ende der fünfzehnminütigen Quellzeit wurde das Gel in eine ca. 150 *mm* hohe Chromatographiesäule mit einem Innendurchmesser von ca. 15 *mm* und einer eingeschmolzenen Glasfritte der Porosität 2 gespült, in der sich bereits 5 *ml* bidestilliertes Wasser befand. Zur Beseitigung von Verunreinigungen und Aktivierung des Gels wurde anschließend folgendes Schema verwendet:

- 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* HCOOH 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* HCOOH in MeOH / H₂O 2:8 (v/v)
- 30 *ml* MeOH / H₂O 2:8 (v/v)

Zur Lagerung wurden 50 ml 0,1 M NaCl auf die Säule gegeben. Bei Licht und Raumtemperatur kann die gepackte Säule mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Pro Säulenpackung sind bis zu zwanzig Extraktionsläufe möglich.

Die Druckluftversorgung zur Überwindung des hohen Gegendrucks der gepackten Säule wurde generell auf 3 – 4 ml/min eingestellt.

2.2.2.2 Vorbereitung der Urinproben

Die Urinproben sowie der ebenfalls bei -20 °C gelagerte interne Standard Isoguanosin wurden zeitnah im Wasserbad bei 25 °C aufgetaut und anschließend auf dem Vortexmixer 15 sec gemischt. Die Urinproben wurden für 5 min bei 10 000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Nach folgendem Schema wurde die Probe vorbereitet:

- 1 ml Urin
- 9 ml 0,25 M NH₄Ac (pH 8,8)
- 50 µl interner Standard

Die Proben wurden auf dem Vortexmixer gut durchmischt und bis zur Verarbeitung im Kühlschrank gelagert.

2.2.2.3 Extraktion der Nucleoside

Die Extraktion der Nucleoside erfolgte anhand des folgenden Schemas. Zunächst wurde die Säule äquilibriert:

- 45 ml 0,25 M NH₄Ac (pH 8,8)
- Probe (siehe 2.2.2.2)
- 10 ml 0,25 M NH₄Ac (pH 8,8)
- 4 ml 0,25 M NH₄Ac (pH 8,8) / MeOH 9,5:0,5 (v/v)

Dann wurde das Eluat in einem Spitzkolben aufgefangen:

- 6 ml MeOH / H₂O 2:8 (v/v)
- 50 ml 0,2 M HCOOH in MeOH / H₂O 1:1 (v/v)

Zum Schluss erfolgte noch ein Reinigungsschritt:

- 25 ml MeOH / H₂O 2:8 (v/v)

Um einen gleichmäßigen Durchfluss zu gewährleisten, wurde Druckluft mit 3 – 4 ml/min auf die Säule aufgebracht. Dabei war vor allem beim Eluat auf einen langsamen Durchfluss zu achten.

Nach Beendigung des Durchlaufes konnte der Zyklus von Neuem gestartet werden oder die Säule wurde in 50 ml 0,1 M NaCl gelagert.

Um die Säule zu konditionieren wurde zu Beginn eines jeden Arbeitstages zunächst eine Eigenurinprobe aufgearbeitet, deren Eluat nicht weiter verarbeitet wurde. Zur Vermeidung von Verschleppungen der Nucleoside wurde anschließend ein blank, bei dem die Urinprobe durch 10 ml 0,25 M NH₄Ac (pH 8,8) ersetzt wurde, gemacht. Dieser wurde nach je zwei Aufarbeitungen wiederholt, sodass sich für einen Arbeitstag insgesamt folgendes Schema ergab:

- Eigenurin
- blank
- Probe
- Probe
- blank
- Probe
- Probe

- blank
- Probe
- Probe

2.2.2.4 Konzentration der Nucleoside

Die 56 *ml* Eluat wurden mithilfe eines Rotationsverdampfers bei 40 °C konzentriert, bis keine Flüssigkeit mehr zu erkennen war. Das Residuum mit den aufkonzentrierten Nucleosiden wurde in 0,5 *ml* 5 *mM* Ammoniumformiatpuffer (pH 5,0) gelöst und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C tief gefroren.

2.2.3 Validierung der Methode

2.2.3.1 Reproduzierbarkeit

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden 10 *ml* Spontanurin einer gesunden Probandin mit 500 μ l internem Standard am Vortexmixer gemischt. Daraus wurden 10 Proben à 1 *ml* hergestellt und mit 0,25 *M* NH₄Ac (pH 8,8) auf 10 *ml* aufgefüllt. Diese Proben wurden nach dem in 2.2.2.3 beschriebenen Schema aufgearbeitet. Auch hier stand am Anfang eine Eigenurinprobe, nach je zwei Proben wurde ein blank gemacht.

2.2.3.2 Linearität

Um zu überprüfen innerhalb welchen Bereiches die Peakfläche im Chromatogramm proportional zur Konzentration der Nucleoside im Urin ist, wurden zwei mal fünf Eichlösungen mit 0,25 *ml*, 0,5 *ml*, 1 *ml*, 2,5 *ml* und 4 *ml* Urin aus zwei verschiedenen Urinproben hergestellt. Die entsprechende Urinmenge wurde dazu mit 0,25 *M* NH₄Ac (pH 8,8) auf 10 *ml* aufgefüllt und mit 50 μ l internem Standard gemischt. Dann erfolgten die in 2.2.2.3 beschriebenen

Arbeitsschritte. Auch hier stand am Anfang eine Eigenurinprobe, nach je zwei Proben wurde ein blank gemacht.

2.3 MS-Analytik

Die MS-Analytik wurde abteilungsintern in Kooperation mit Herrn Dino Bullinger durchgeführt.

2.3.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- 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 (Merck, Darmstadt)
- HPLC-System
 - Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn) mit
 - 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)
- Gradient MS-Methoden 1,4,5
 - Fließmittel: 5 mM Ammoniumformiatpuffer (pH 5,0) und MeOH / H₂O 3:2 (v/v) + 0,1 % HCOOH
 - Flussrate: 125 µl/min

Tabelle 1: Trennung von cis-diol-Metaboliten (Standard-Gradientensystem).

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

- Ionenfallen-Massenspektrometer
 - Esquire-HCT-Ionenfallenmassenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen)
- Datenerfassung
 - Bruker Esquire Control, Version 5.1
- Auswertung
 - Bruker Data Analysis, Version 3.1
- Essigsäure, 100 %, Normapur (VWR, Darmstadt)
- Ameisensäure, reinst (Merck, Darmstadt)
- Methanol, hypergrade für LC/MS (Merck, Darmstadt)
- Ammoniumacetat, puriss. p. a., for HPLC (Fluka, München)
- Ammoniumformiat, puriss. p. a. (Sigma, München)
- bidestilliertes Wasser aus hauseigener Anlage

2.3.2 Massenspektrometrische Methode

Die massenspektrometrische Auswertung erfolgte durch eine LC-MS-Methode ohne Fragmentierungsprozesse. Die massenspektrometrische Analytik der einzelnen Nucleoside wurde nach Tabelle 2 verbessert. Mit der optimierten Methode konnten die in die Auswertung eingeschlossenen Metabolite quantitativ erfasst werden.

Material und Methodik

Tabelle 2: Ionenfallenoptimierung mittels Spritzenpumpeninjektion von Standardverbindungen.

	DHU	Ψ	C	U	m¹A	IsoG	I
FM A/B [%]	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
Capillary [V]	-4500	-4500	-4000	-4500	-2150	-4000	-4200
Skimmer [V]	19.2	26.2	22.0	24.8	15.0	31.7	26.2
Cap Exit [V]	50.0	50.0	54.1	50.0	95.1	111.5	54.1
Oct 1 [V]	7.2	8.1	7.7	7.2	7.8	8.7	7.2
Oct 2 [V]	1.57	1.57	1.89	1.78	1.77	1.68	1.77
Trap Drive	33.7	35.0	34.7	34.3	37.6	38.5	35.9
Oct Rf[Vpp]	111.5	115.6	111.5	95.1	145.1	127.9	132.0
Lens 1 [V]	-3.7	-4.4	-3.2	-3.4	-2.2	-3.7	-3.4
Lens 2 [V]	-49.8	-58.7	-51.3	-51.3	-49.8	-57.2	-57.2
L1 + L2 [V]	-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
FM A/B [%]	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
Capillary [V]	-4155	-4050	-4500	-4500	-4000	-3800	-3000
Skimmer [V]	26.2	15.0	23.4	24.8	22.0	17.8	20.6
Cap Exit [V]	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	62.3	50.0
Oct 1 [V]	7.54	8.13	7.54	7.54	7.24	7.83	7.54
Oct 2 [V]	1.89	2.20	1.78	1.78	1.68	1.78	1.89
Trap Drive	35.3	38.5	36.1	37.0	36.8	39.4	38.6
Oct Rf[Vpp]	99.2	107.4	119.7	58.2	103.3	107.4	111.5
Lens 1 [V]	-3.9	-5.2	-3.9	-3.9	-3.2	-4.4	-4.2
Lens 2 [V]	-60.2	-64.6	-57.2	-58.7	-48.4	-64.6	-60.2
L1 + L2 [V]	-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	
FM A/B [%]	85.0 / 15.0	80.6 / 19.4	49.2 / 50.8	48.0 / 52.0	58.8 / 41.2	67.5 / 32.5	
Capillary [V]	-4500	-2300	-4500	-3500	-4500	-2200	
Skimmer [V]	15.0	15.0	30.3	15.0	28.9	15.0	
Cap Exit [V]	62.3	82.8	86.9	86.9	99.18	70.49	
Oct 1 [V]	8.13	8.13	8.43	8.43	8.7	8.7	
Oct 2 [V]	1.89	1.47	1.57	1.68	1.99	1.57	
Trap Drive	38.6	35.8	40.3	38.4	47.0	40.2	
Oct Rf[Vpp]	144.3	119.7	127.9	119.7	152.5	136.1	
Lens 1 [V]	-3.4	-3.9	-3.4	-4.2	-4.2	-3.7	
Lens 2 [V]	-63.1	-57.2	-52.8	-57.2	-58.7	-66.1	
L1 + L2 [V]	-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 bei Eintritt in die Ionenfalle. Aus den ermittelten Parametern für die einzelnen Standardverbindungen wurden jeweils die Mittelwerte gebildet und als optimierte Ionisierungsparameter eingesetzt.

Tabelle 3: LC-MS-Methode.

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

2.4 Auswertung und Datengenerierung

Der semiquantitativen Bestimmung ging die Ermittlung der Peakfläche der einzelnen Metabolite aus den Extracted Ion Chromatograms (EICs) voraus. Nach Einbeziehung der Natrium- und Kaliumaddukte wurden die entstehenden Summen-EICs mit einem Gauß-Algorithmus geglättet und manuell integriert. Anschließend wurden diese auf den internen Standard Isoguanosin und den Kreatininwert der Probe bezogen.

Zusammenfassend ergibt sich für den semiquantitativen Verhältniswert W:

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

2.5 Support Vector Machine (SVM)

Die bioinformatische Auswertung erfolgte in Kooperation mit Herrn Carsten Hennekes aus der Arbeitsgruppe Prof. Andreas Zell vom Zentrum für Bioinformatik Tübingen (ZBIT).

Zunächst erfolgte die Berechnung der Kernel-Matrix $Q = [k(x_i, y_i)]$ über einen Radial Basis Function (RBF) Kernel:

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

Ein Problem 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 so genannten „Slack-Variablen“ (Schlupfvariablen) ξ_i :

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

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

$$\xi_i \geq 0 \forall i = 1, \dots, l$$

Die Lösung dieses dualen Problems liegt im Expansionskoeffizienten α_i :

$$\min_{\alpha} \frac{1}{2} \alpha^T Q \alpha - 1^T \alpha$$

$$\text{s. t. } y^T \alpha = 0$$

$$0 \leq \alpha_i \leq C \forall i = 1, \dots, l$$

Durch eine Modellwahl mit verfeinerter Gittersuche wurden in den Berechnungen freie Parameter wie σ (bestimmt die Einflussbreite der Beziehung $\|x - y\|$) und C (Regularisierungsparameter für die Fehlklassifikation der SVM in den Trainingsdaten), deren Wert einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Klassifizierungsleistung der SVM haben, optimiert. Dafür wurde in einem definierten Bereich mit gegebener Schrittweite ($\log(C)=[-14\dots 8$, Schrittweite 4] und $\log(\sigma)=[-8\dots 5$, Schrittweite 5] die Vorhersagequalität für alle möglichen Paare von σ und C berechnet und nach und nach verbessert.

Eine weitere Optimierung der bioinformatischen Methode stellt der Einsatz des Quotienten aus den Variablen a_i (semiquantitativ ermittelte Konzentration Metabolit a) und b_i (semiquantitativ ermittelte Konzentration Metabolit b) dar, da im Normalfall nur die gemessenen absoluten Konzentrationswerte als Eingabedaten verwendet werden.^[57,58] Dies spiegelt die Tatsache wider, dass zwischen den einzelnen Metaboliten über die entsprechenden Enzymsysteme Abhängigkeiten bestehen, die im Falle einer Tumorerkrankung in charakteristischer Art und Weise verändert sein können.

Daraus ergibt sich für diese Studie, die mit fünfunddreißig analysierten Metaboliten arbeitet, eine Datenmenge von $35 \times 34 = 1190$ Kombinationsmöglichkeiten, die die SVM verarbeiten muss.

Ein erstes Problem stellt die Tatsache dar, dass die numerische Breite des Wertebereichs b im Verhältnis a/b von 0 bis ∞ reichen kann. Ein nicht definierter Wert ergibt sich dann, wenn Metabolit b nicht detektiert ist und durch 0 dividiert werden muss. Darüber hinaus erfordert die Menge der anfallenden Daten einen hochselektiv arbeitenden Algorithmus, der nur die Paarungen mit dem höchsten Informationsgehalt verwendet.

Die Lösung des numerischen Problems liegt in der Verwendung einer arctan-Codierung von a/b . Hierbei werden für $b < a$ und $a < b$ verschiedene Zielmengen genutzt (gerichtete Codierung). Darüber hinaus ist der

resultierende Wertebereich minimal. Dies ermöglicht es, die SVM mit geringeren Veränderungen der Gewichtungen zu trainieren und justieren. Mithilfe der arctan-Codierung kann ein konstanter Wert für die Division durch 0 als Grenzwert $\lim b \rightarrow \infty = \pi/2$ definiert werden. Außerdem normalisiert sie die numerische verschiedenen Konzentrationsverhältnisse auf einen Wertebereich.

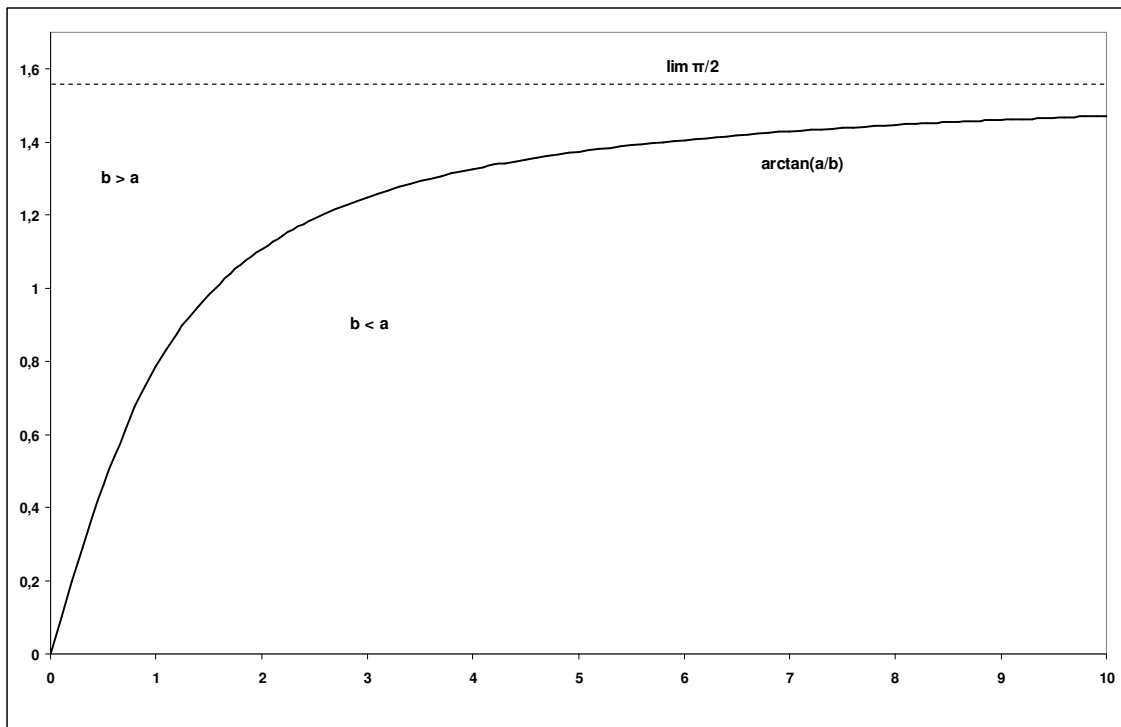


Abbildung 13: arctan-Codierung für verschiedene Wertebereiche von a/b -Verhältnissen für $b < a$ und $b > a$.

Zur Vorbereitung des Trainingsdatensatzes für die SVM wurde ein zur Wrapper-Klasse gehörender Oscillating Feature Search (OFS)-Algorithmus eingesetzt.^[64] Er funktioniert wie ein Filter, der vor der eigentlichen Featureselektion in einem black-box-Ansatz über verschiedene Suchstrategien eine Vorauswahl statistisch signifikanter Attribute trifft.

Die Suchfunktion des OFS-Algorithmus arbeitet in Schwingphasen, wobei jede Phase in einen down- und einen up-swing eingeteilt ist. Als erstes werden die n schlechtesten Merkmale W aus einer gegebenen Partition X_d der Größe d aus der gesamten Merkmalsmenge Y ausgeschlossen. Dann erfolgt die Addition der n besten Merkmale B zur reduzierten Untermenge X_{d-nW} . Im nächsten Schritt

ändern die Swings ihre Richtung. Während der up-swing die optimale Merkmalsuntermenge X_{d+nW} bestimmt, wird diese im down-swing wieder zu einem neuen X_d reduziert. Hat sich eine Verbesserung eingestellt, wird die nächste Phase eingeleitet und n vergrößert. Tritt keine Verbesserung ein, werden die swing-Parameter angepasst oder der Algorithmus beendet.

Heuristische Optimierungsverfahren wie die Sequential Forward Selection (SFS) und die Sequential Backward Selection (SBS) werden verwendet, um die zeitintensive Schwingphasenoptimierung J zu beschleunigen. Das Prinzip der SBS besteht darin, nach und nach alle ungeeigneten Features aus allen Merkmalen zu entfernen. Die SFS hingegen beginnt mit einer leeren Merkmalsmenge und addiert so lange geeignete Features, bis die gewünschte Partitionsgröße erreicht ist.

Wie bei maschinellen Lernverfahren üblich,^[65] wurde die Güte der in den entsprechenden Rechendurchläufen resultierenden Featurekombinationen über eine Fehlermatrix bestimmt:

Tabelle 4: Fehlermatrix einer SVM-Klassifizierung.

	klassifiziert als krank	klassifiziert als gesund
<i>Mamma-Ca.</i>	richtig positiv (TP)	falsch negativ (FN)
<i>Kontrolle</i>	falsch positiv (FP)	richtig negativ (TN)

Die erhaltene Klassifizierungsleistung kann nun entweder über die Parameter Sensitivität / Spezifität oder über den Matthews Correlation Coefficient (MCC) angegeben werden:

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

Der MCC drückt die Information aus der Fehlermatrix in einem Wert zwischen -1 und +1 aus. Je näher der Wert an +1 heranrückt, desto besser sind die beiden Klassen eingeordnet. Einem Wert von +1 würde also einer Sensitivität / Spezifität von 100 % entsprechen. In dieser Arbeit spielt der MCC als Optimierungskriterium des OFS-Algorithmus eine Rolle.

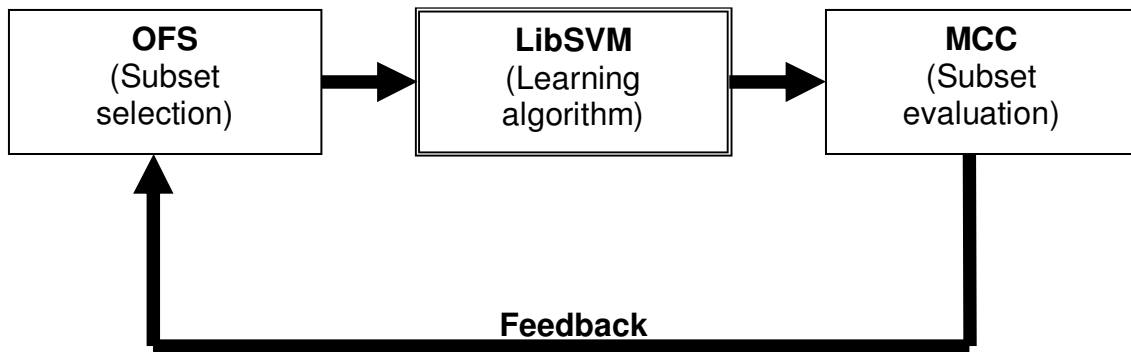


Abbildung 14: Optimierungsstrategie der durchgeführten Featureselektion.

Um die Daten optimal nutzen zu können und gleichzeitig das Problem der Überanpassung (gute Vorhersagen nur innerhalb des eingelesenen Datensatzes, schlechte Vorhersagen bei unbekanntem Proben) zu umgehen, wurde in dieser Arbeit das Kreuzvalidierungsverfahren eingesetzt. Dazu wurde der Datensatz in zehn gleiche Teile geteilt (10-fach Kreuzvalidierung). 9/10 der Gesamtdatenmenge wurden als Trainingskollektiv eingesetzt. Die SVM sollte nun das ihr unbekannte 1/10 richtig in krank bzw. gesund klassifizieren. Die Leave-One-Out (LOO)-Kreuzvalidierung gilt als annähernd unverzerrtes Maß der wahren Generalisierungsleistung des maschinellen Lernverfahrens.^[66]

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Probenaufbereitung

3.1.1 Waschschrift vor Elution

Aufgrund der begrenzt zur Verfügung stehenden Urinmenge wurde das Probenvolumen im Gegensatz zu früheren Studien, die mit 10 *ml* Urin arbeiteten, generell auf 1 *ml* festgesetzt.

In vorangegangenen Tests hatte sich der MeOH / H₂O Waschschrift vor der Elution als ursächlich für schlechte Ergebnisse erwiesen. Deshalb sollte dieser als erstes verbessert werden. Sowohl die Zusammensetzung des Gemischs (MeOH / H₂O und MeOH / NH₄Ac) als auch die Volumina wurden variiert. Das Eluat des Waschschrifts vor der eigentlichen Elution wurde aufgefangen, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und nach Lösung in 0,5 *ml* 5 *mM* Ammoniumformiatpuffer (pH 5,0) bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C tiefgefroren.

In Tabelle 5 werden die integrierten Peakflächen ausgesuchter Metabolite jeweils auf die des Metaboliten in der Elutionslösung bezogen und prozentual verglichen. Als annähernd ideale Lösung erwies sich 4 *ml* 0,25 *M* MeOH / NH₄Ac (pH 8,8) 0,5:9,5 (v/v). Sie zeigte ausreichende Waschwirkung, ohne Metabolite vorzeitig zu lösen. Einzige Ausnahme ist der Metabolit N⁶-SAR, dessen vorzeitige Elution nicht verhindert werden konnte.

Ergebnisse

Tabelle 5: Optimierung des Waschschriffs vor Elution Die Peakfläche Eluat [%] repräsentiert den Mittelwert aus der Doppelbestimmung.

	4 ml 0,25 M MeOH / NH₄Ac, (pH 8,8) 0,5:9,5 (v/v)	6 ml 0,25 M MeOH / NH₄Ac, (pH 8,8) 2:8 (v/v)	6 ml MeOH / H₂O 0,5:9,5 (v/v)	6 ml MeOH / H₂O 1:9 (v/v)
<i>IAA-R</i>	---	---	3,3	6,9
ψ	---	0,2	0,7	1,0
<i>273</i>	---	0,8	1,0	6,7
<i>m¹A</i>	---	---	0,7	0,6
<i>N⁶-SAR</i>	1,9	8,0	30,0	65,5
<i>m¹I</i>	---	---	1,0	0,5
<i>m¹G</i>	---	---	1,1	0,5
<i>m²G</i>	---	---	0,7	0,4

3.1.2 zeitlicher Ablauf der Elution

Zur Klärung der Frage, wann genau welche Metabolite eluiert werden, wurde ein Test mit insgesamt 150 ml 0,2 N HCOOH in MeOH / H₂O 2:8 (v/v) gemacht. Um sicherzustellen, dass keine Metabolite in der Säule gebunden bleiben, wurde die Menge der Elutionslösung von 50 ml auf 150 ml verdreifacht. In sechs Schritten à 25 ml wurde das Eluat aufgefangen, im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und in 0,5 ml 5 mM Ammoniumformiatpuffer (pH 5,0) gelöst. Eluat 1, das die ersten 25 ml der Elutionslösung repräsentiert, wurde als Bezugsgröße für Eluat 2 bis 6 (25 ml – 50 ml, 50 ml – 75 ml, usw.) gewählt. Es stellte sich heraus, dass bereits in Eluat 1, das heißt in den ersten 25 ml, ein Großteil der Metabolite eluiert werden. Während in Eluat 2 nicht zu vernachlässigende Rückstände zwischen 5 % und 16 % enthalten waren, fielen diese in Eluat 3 unter 1 %.

Ergebnisse

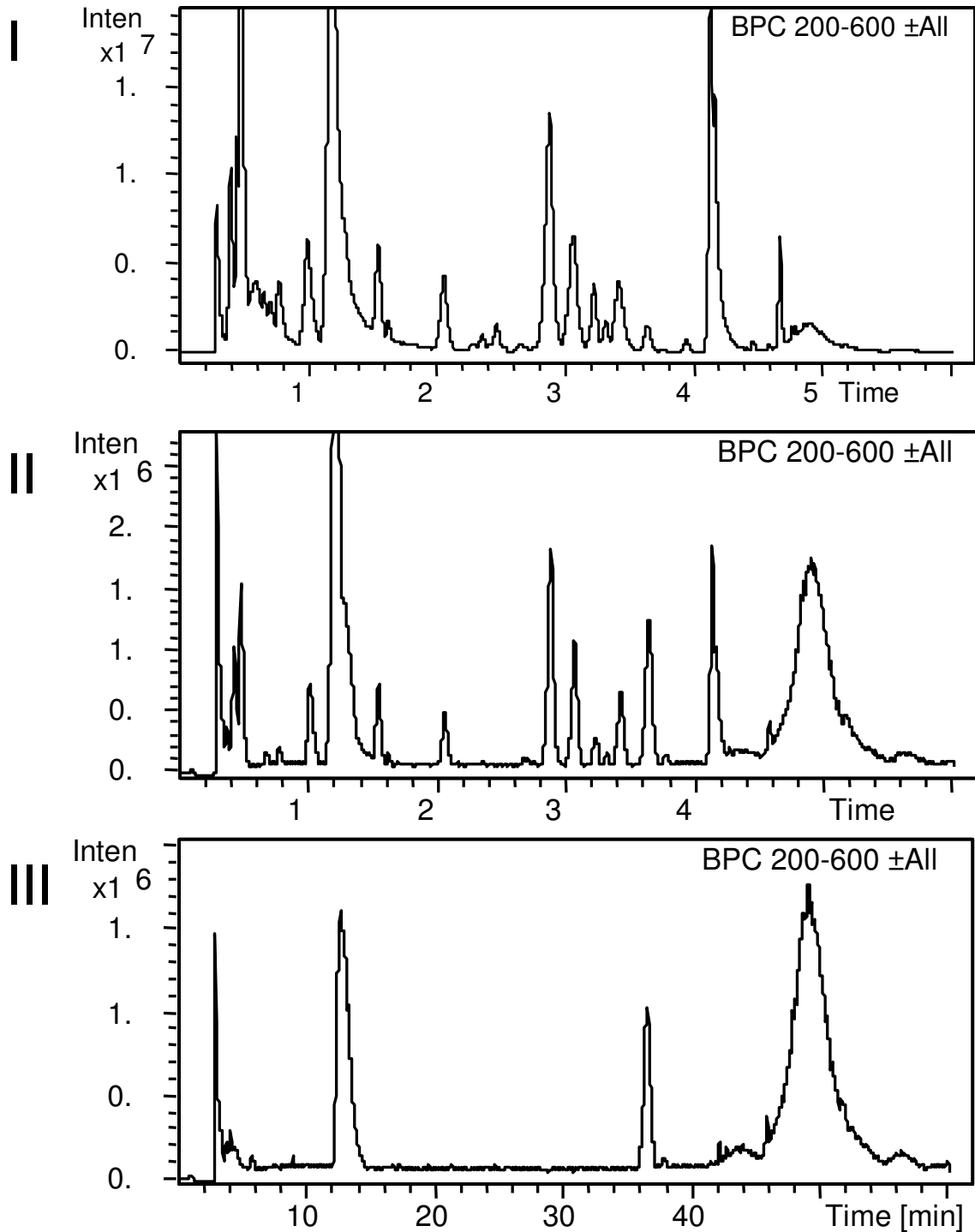


Abbildung 15: Base Peak Chromatogramme von m/z 200-600. I 0 – 25 ml, II 25 – 50 ml, III 50 – 75 ml. Die drei Peaks in III bei 12, 36 und 50 min sind Verunreinigungen, der Peak bei 50 min sind Verunreinigungen aus Probe und LC-Säule.

3.1.3 Vermeidung von Verschleppungen

Eine Erhöhung des Methanolgehaltes von 20 % auf 50 % (0,2 N HCOOH in MeOH / H₂O 1:1 (v/v)) sollte die Elutionskraft noch verbessern und die Verschleppung von Nucleosiden verhindern. Dem selben Zweck diene auch der Einbau von blanks in das Aufarbeitungsschema. Nach je zwei Proben wurde ein blank mit 10 ml NH₄Ac anstelle von 10 ml Urin durchgeführt. Damit sollte die Säule von etwaigen Verunreinigungen gesäubert und Verschleppungen vermieden werden.

3.1.4 Einfluss der Reinigungsprozedur

Bei weiterhin schlechten Resultaten trotz Verbesserung des Elutionsschemas, wurde festgestellt, dass die Kolben durch das übliche Ausspülen mit destilliertem Wasser nicht rückstandsfrei gesäubert werden konnten. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden gebrauchte Kolben mit unterschiedlichen Reinigungsprozeduren behandelt, anschließend mit 50 ml 0,2 N HCOOH in MeOH / H₂O 1:1 (v/v) gefüllt, einrotiert und das Residuum in 0,5 ml 5 mM Ammoniumformiatpuffer (pH 5,0) gelöst. Abbildung 15 zeigt das Ausmaß der Verschleppung, das für einzelne Metabolite bis zu 15 % der korrespondierenden Peakfläche im eigentlichen Probeneluat beträgt und damit einen relevanten Einfluss auf die quantitative Auswertung hat.

Ergebnisse

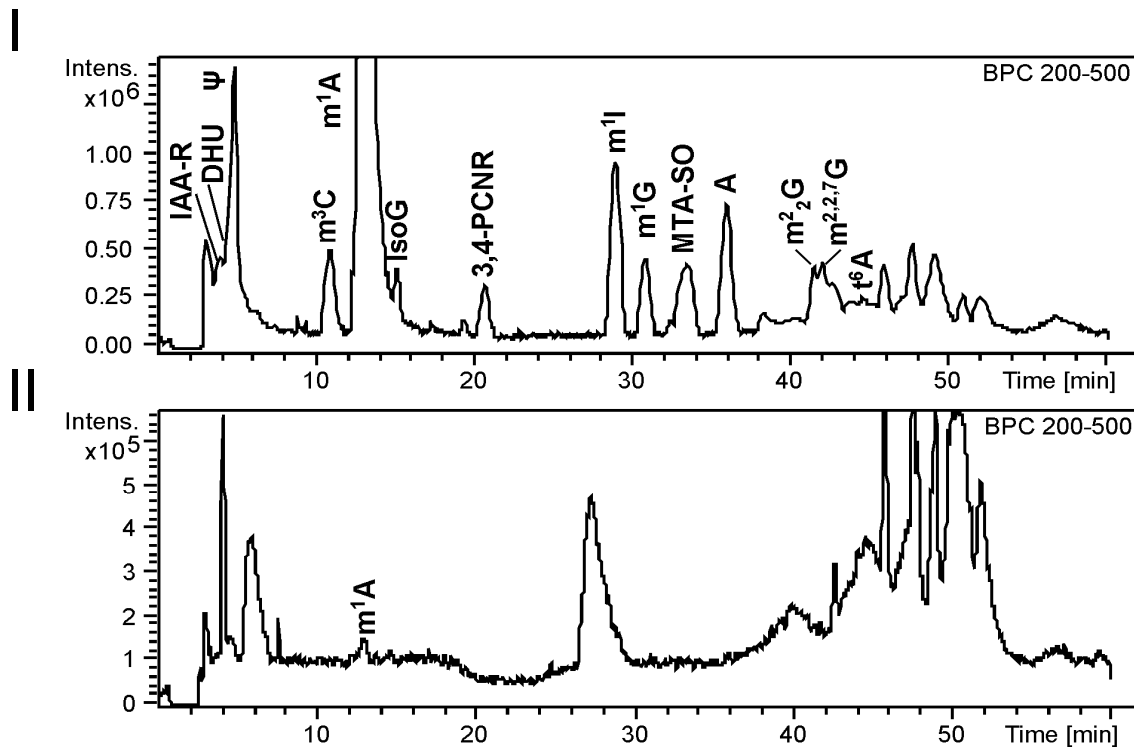


Abbildung 16: Verschleppung durch verunreinigte Glaskolben. I Reinigung mit Bürste und Wasser bei Raumtemperatur. II Reinigung mit kochendem Wasser, Bürste und mehrfachem Ausspülen mit bidestilliertem Wasser.

Mithilfe eines standardisierten Reinigungsschemas konnten die Kolben so gesäubert werden, dass keine relevanten Verschleppungen mehr nachweisbar waren. Die optimale Reinigungsmethode setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- mehrfaches Ausspülen mit kochendem destilliertem Wasser
- Reinigung mit einer dicken (grobe Vorreinigung) und einer dünnen Bürste (gezielte Reinigung des Spitzkolbenbodens)
- Ausspülen mit bidestilliertem Wasser

3.2 Validierung der Methode

Aus zwei Gründen konnte keine klassische analytische Methodvalidierung durchgeführt werden. Erstens schwankt die Matrix in biologischen Flüssigkeiten

wie Urin stark in der Zusammensetzung, was eine Matrixsimulation deutlich erschwert. Zweitens wurden viele letztlich in die Studie eingeschlossenen Metabolite erst im Laufe der Methodenentwicklung in einer parallel laufenden Sammelurinstudie entdeckt und identifiziert. Für eine klassische Validierung standen in den meisten Fällen weder Standardverbindungen noch die entsprechenden deuterierten Standards zur Verfügung.

Für eine semiquantitative Analytik wurden im Folgenden zwei der wichtigsten analytischen Parameter, Reproduzierbarkeit und Linearität, untersucht.

3.2.1 Reproduzierbarkeit

Tabelle 6 zeigt das Ergebnis der Validierungstests. Damit eine Komponente in die bioinformatische Auswertung aufgenommen werden konnte, musste folgende Bedingung erfüllt sein:

- relative Standardabweichung (RSD) $\leq 15\%$

3.2.2 Linearität

Tabelle 6 zeigt das Ergebnis der Validierungstests. Damit eine Komponente in die bioinformatische Auswertung aufgenommen werden konnte, musste folgende Bedingung erfüllt sein:

- Regressionskoeffizient $R^2 \geq 0,95$

Insgesamt zehn Metabolite erfüllten die unten genannten Bedingungen nicht. Sie blieben in der Auswertung unberücksichtigt.

Vier Komponenten (39, 43, 45, 47, Tabelle 6) tauchten bei den für die Validierungstests gesammelten Proben nicht auf. Sie wurden, auch aufgrund mangelnder biochemischer Relevanz, aus der Studie ausgeschlossen.

Ergebnisse

Tabelle 6: Ergebnis der Validierungstests. Fett: Metabolite, die aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit und / oder Linearität ausgeschlossen wurden. Abkürzungen siehe Metabolitenverzeichnis.

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	SV*	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	AICA 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	SV	0,9974	6,2
38	398	40,0	ms ² io ⁶ A	0,9983	4,5
39	299	40,5	SV	---	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

Ergebnisse

45	313	46,0	SV	---	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

3.3 bioinformatische Auswertung

Tabelle 7 zeigt die für die bioinformatische Auswertung verwendeten Metabolit-Kombinationen, mit denen sich die besten Ergebnisse erzielen ließen.

Tabelle 7: Metabolit-Kombinationen.

1	atan (1/7)*	I-7 / ncm⁵U	31	atan (20/3)	X / ψ
2	atan (1/12)	I-7 / m¹A	32	atan (20/35)	X / ms²t⁶A
3	atan (2/21)	DHU / SAH	33	atan (21/30)	SAH / m²₂G
4	atan (2/22)	DHU / m¹I	34	atan (22/30)	m¹I / m²₂G
5	atan (3/1)	ψ / I-7	35	atan (23/18)	m¹G / m³U
6	atan (3/18)	ψ / m³U	36	atan (25/5)	ac⁴C / C
7	atan (5/7)	C / ncm⁵U	37	atan (25/10)	ac⁴C / m³C
8	atan (5/11)	C / AICA Ribosid	38	atan (25/22)	ac⁴C / m¹I
9	atan (6/18)	acp³U / m³U	39	atan (26/19)	m²G / N⁶-SAR
10	atan (6/19)	acp³U / N⁶-SAR	40	atan (26/28)	m²G / ms²io⁶A
11	atan (8/23)	P-2 / m¹G	41	atan (26/30)	m²G / m²₂G
12	atan (9/21)	U / SAH	42	atan (27/2)	376 / DHU
13	atan (9/26)	U / m²G	43	atan (27/13)	376 / 2,5-PCNR
14	atan (10/27)	m³C / 376	44	atan (28/9)	ms²io⁶A / U
15	atan (11/5)	AICA Ribosid / C	45	atan (28/16)	ms²io⁶A / 3,4-PCNR
16	atan (11/33)	AICA Ribosid / MTA	46	atan (28/19)	ms²io⁶A / N⁶-SAR
17	atan (12/10)	m¹A / m³C	47	atan (29/34)	m^{2,2,7}G / m⁶t⁶A
18	atan (12/18)	m¹A / m³U	48	atan (29/35)	m^{2,2,7}G / ms²t⁶A
19	atan (13/9)	2,5-PCNR / U	49	atan (30/21)	m²₂G / SAH
20	atan (13/20)	2,5-PCNR / X	50	atan (31/2)	mcm⁵s²U / DHU
21	atan (14/16)	m⁷G / 3,4-PCNR	51	atan (31/22)	mcm⁵s²U / m¹I
22	atan (14/21)	m⁷G / SAH	52	atan (31/24)	mcm⁵s²U / 293
23	atan (14/26)	m⁷G / m²G	53	atan (33/11)	MTA / AICA Ribosid

Ergebnisse

24	atan (16/22)	3,4-PCNR / m¹I	54	atan (33/16)	MTA / 3,4-PCNR
25	atan (16/35)	3,4-PCNR / ms²t⁶A	55	atan (33/17)	MTA / m⁶₁A
26	atan (18/10)	m³U / m³C	56	atan (33/34)	MTA / m⁶t⁶A
27	atan (18/21)	m³U / SAH	57	atan (34/12)	m⁶t⁶A / m¹A
28	atan (19/6)	N⁶-SAR / acp³U	58	atan (34/19)	m⁶t⁶A / N⁶-SAR
29	atan (19/23)	N⁶-SAR / m¹G	59	atan (35/3)	ms²t⁶A / ψ
30	atan (19/30)	N⁶-SAR / m²₂G			

Mithilfe der in 2.5 beschriebenen Methode konnte für die Sensitivität ein Wert von 83,5 %, für die Spezifität ein Wert von 90,6 % erreicht werden. Alle statistischen Kenngrößen zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: statistische Kenngrößen.

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

4 Diskussion

4.1 Optimierung der Probenaufbereitung

Der Aufarbeitung des Urins von je fünfundachtzig Mammakarzinom-Patientinnen und Kontrollprobandinnen musste eine Optimierung der Probenaufbereitung vorausgehen. Es galt, den bis dahin problematischen Waschschrift vor Elution zu untersuchen und zu verbessern. Ferner stand das Verständnis des zeitlichen Ablaufs der eigentlichen Elution im Vordergrund. Auch Möglichkeiten zur Vermeidung von Verschleppungen wurden getestet. Den Abschluss bildete die Auswertung verschiedener Reinigungsprozeduren, um Verschleppungen in Zukunft möglichst komplett zu vermeiden.

Bei der Testung verschiedener Konzentrationen und Volumina für den Waschschrift vor Elution stellte sich 4 ml 0,25 M MeOH / NH₄Ac (pH 8,8) 0,5:9,5 (v/v) als optimale Lösung heraus. Bis auf N⁶-SAR konnten mit dieser Zusammensetzung eine ausreichende Waschwirkung ohne vorzeitige Elution erreicht werden.

Die Analyse des zeitlichen Ablaufs der Elution zeigte, dass mit 50 ml Elutionslösung 99 % der retardierten Metabolite eluiert werden können.

Zusätzlich wurde der Methanolgehalt in der Elutionslösung von 20 % auf 50 % angehoben, um Verschleppungen sicher vermeiden zu können.

Die Auswertung der Reinigungsprozeduren macht deutlich, wie wichtig festgelegte Schemata auch nach Beendigung der Aufarbeitung sind. Durch ein definiertes Vorgehen beim Säubern der Kolben konnte sichergestellt werden, dass keine Verbindungen von einem Durchlauf zum nächsten verschleppt werden.

4.2 Validierung der Methode

Für die Validierung der Methode wurden bestimmte Kriterien festgelegt, die für eine Aufnahme in die bioinformatische Auswertung erfüllt sein mussten (3.2.1, 3.2.2). Von den einundfünfzig geprüften Komponenten erfüllten zehn mindestens eines der Kriterien der Linearität oder Reproduzierbarkeit nicht. Sie wurden folglich nicht in die bioinformatische Auswertung aufgenommen.

4.3 bioinformatische Auswertung

Mit der neu entwickelten Klassifizierungsmethode lassen sich tumorassoziierte Verschiebungen im Muster methylierter Nucleoside nachweisen. Diese Verschiebungen beruhen auf einer in Tumorzellen zu beobachtenden Veränderung der Enzymsysteme, die eine vermehrte Modifizierung von Polynucleotidmolekülen nach sich zieht. Eine Änderung in Expression und Aktivität der modifizierenden Enzymsysteme mit daraus resultierender Verschiebung der Konzentrationsquotienten von Nucleosidgrundstrukturen, spricht prinzipiell für einen neoplastischen Prozess. Entsprechende Vorgänge wurden bereits beim Mammakarzinom beschrieben.^[66]

Modifizierte Nucleosidgrundstrukturen aus der Gruppe der modifizierten Uridine (Kombinationen 6 und 50) sowie der modifizierten Adenosine (Kombination 57) und modifizierten Cytidine (Kombination 37) erwiesen sich als charakteristische Metabolitverhältnisse mit hohem Informationsgehalt und wurden daher in die Auswertung aufgenommen. (Tabelle 7)

Von großer Bedeutung für die Klassifizierung ist der Methionin / Polyamin-Zyklus und seine direkt, bzw. peripher gebildeten Metabolite. Besonders wichtig sind dabei die Abbauprodukte des an vielen enzymatischen Reaktionen als Co-Substrat beteiligten SAM, für das stark divergierende Exkretionsverhältnisse zu verknüpften Stoffwechselprodukten bestimmt werden konnten.

Diskussion

Nucleoside werden posttranskriptional durch spezifische Methyltransferasen verändert. Dabei wird SAM zu SAH, einem Methyltransferaseninhibitor, abgebaut. In Tumorzellen mit erhöhter Methylierungsaktivität fällt also vermehrt SAH an. Damit der Methylierungsprozess durch die inhibitorische Funktion von SAH nicht zum Erliegen kommt, muss die Tumorzelle dieses Stoffwechselprodukt ausscheiden. Das in tumorösem Gewebe veränderte Verhältnis aus SAH und modifizierten Nucleosiden wurde von der SVM zur Klassifizierung eingesetzt (Featurekombinationen 22, 27, 43).

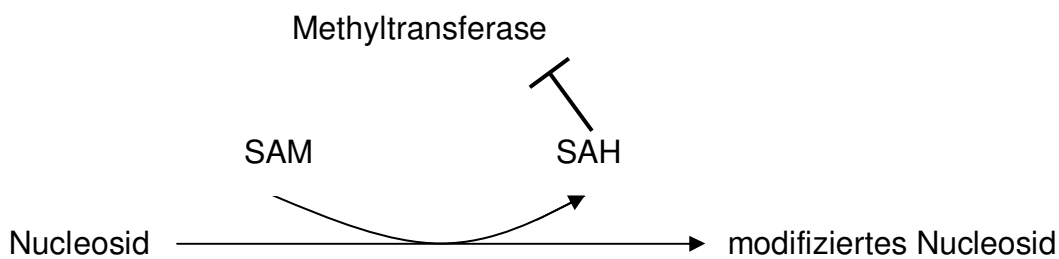


Abbildung 17: Methylierungsprozess in einer gesunden Zelle.

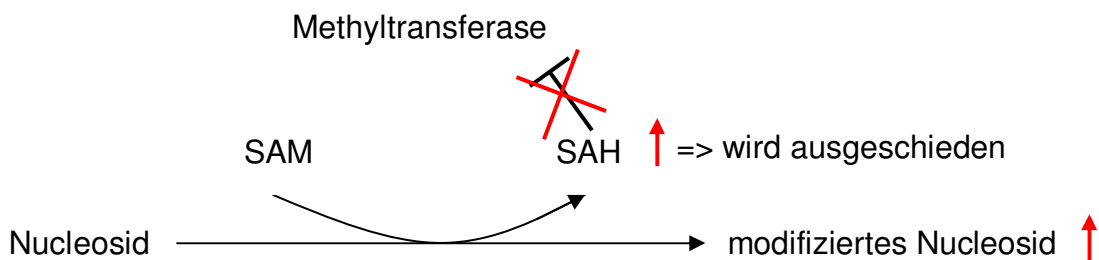


Abbildung 18: Methylierungsprozess in einer Tumorzelle.

Nach dem gleichen Prinzip funktioniert der Abbau von SAM zu MTA, entweder direkt, oder über die decarboxylierte Zwischenstufe dcSAM (Featurekombination 55 und 56).

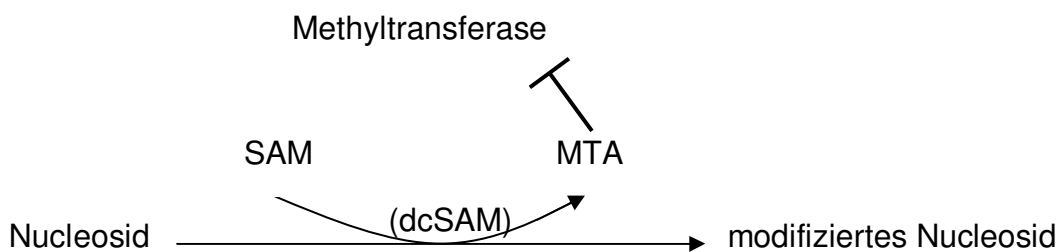


Abbildung 19: Methylierungsprozess in einer gesunden Zelle.

Diskussion

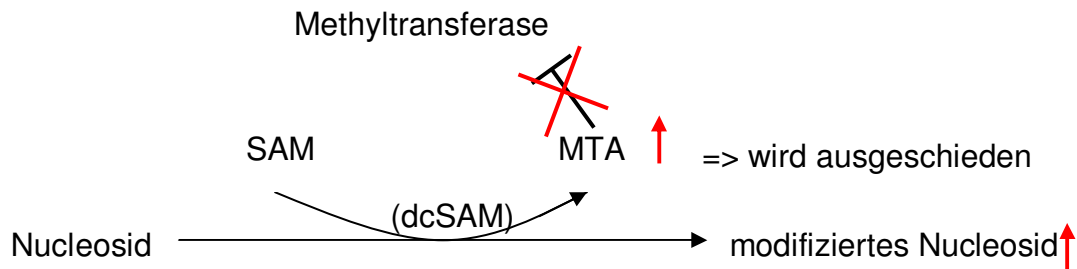


Abbildung 20: Methylierungsprozess in einer Tumorzelle.

Eine weitere Kombination, die in die Auswertung aufgenommen wurde, ist die zwischen dem unmodifizierten Nucleosid C und dessen acetyliertem Modifikationsprodukt ac^4C (Featurekombination 36). Gesteigerte Exkretionsraten des acetylierten Cytidins wurden bereits in Studien, die sich mit Tumorgenese auseinandersetzen, beschrieben.^[67, 68]

Rückschlüsse auf ein tumoröses Geschehen lässt auch Kombination 41 zu. Das in eukaryontischer tRNA und rRNA vorkommende monomethylierte Guanosinderivat m^2G und dessen dimethyliertes Analogon m^2_2G wurden bereits in mehreren Studien als mögliche Tumormarker beschrieben.^[57, 69,70] Im Vergleich zu gesundem Gewebe konnte bei Leber- und Nierentumoren eine deutlich gesteigerte Aktivität der tRNA- N^2 , N^2 -dimethyltransferase, die monomethyliertes m^2G in dimethyliertes m^2_2G umwandelt, festgestellt werden.^[71] Die Verschiebung des Verhältnisses von m^2G zu m^2_2G ermöglicht folglich durch die Featureselektion die Diskriminierung zwischen kranken und gesunden Probandinnen und wurde als aussagekräftiges Kriterium ausgewählt.

5 Zusammenfassung

Die Tatsache, dass jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom erkrankt und eventuell auch daran stirbt, es aber immer noch keine aussagekräftigen Tumormarker zur Früherkennung und Überwachung des Krankheitsverlaufes gibt, macht deutlich, wie wichtig Forschung auf dem Gebiet der Tumordiagnostik ist.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Optimierung der Probenaufarbeitung mittels Affinitätschromatographie und der Validierung dieser verbesserten Methode.

Im Anschluss stand die Aufarbeitung der Urine von fünfundachtzig Mammakarzinom-Patientinnen und ebenso vielen Kontrollprobandinnen.

Die mithilfe einer ESI-HCT MS gewonnenen Daten wurden mithilfe einer Support Vector Machine (SVM) ausgewertet. Mit dieser bioinformatischen Klassifizierungsmethode ließen sich tumorassoziierte Verschiebungen der Verhältnisse von Exkretionsraten einzelner modifizierter Nucleoside und peripherer Stoffwechselprodukte untereinander nachweisen. Diese Verschiebungen beruhen einerseits auf einer in Tumorzellen zu beobachtenden Veränderung der Aktivität modifizierender Enzymsysteme, andererseits auf unterschiedlichem Exkretionsverhalten bei erhöhtem zellulären turnover.

Unter Einsatz der in dieser Arbeit ermittelten nucleosidischen Profile konnte eine Klassifizierung von Brustkrebspatientinnen und gesunden Probandinnen mit einer Klassifizierungsleistung von 83,5 % Sensitivität und 90,6 % Spezifität erreicht werden.

6 Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Goldman L. Quantitative Aspekte der klinischen Problemlösung, 6-13, in: Straub PW. Harrison – Prinzipien der Inneren Medizin, Band 1. Übersetzung der 11. Auflage von „Harrison´s principles of internal medicine“ Schwabe & Co. AG. Basel 1987

Abbildung 2: Frickenschmidt A. Massenspektrometrische Untersuchungen von modifizierten Nucleosiden und ihre Evaluierung als Tumormarker bei Brustkrebs. Dissertation. Universität Tübingen 2006

Abbildung 3: Frickenschmidt A. Massenspektrometrische Untersuchungen von modifizierten Nucleosiden und ihre Evaluierung als Tumormarker bei Brustkrebs. Dissertation. Universität Tübingen 2006

Abbildung 4: Dominik A, Steinhilber D. Instrumentelle Analytik, 2. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2002

Abbildung 5: Hagemeier E, Kemper K, Boos K-S, Schlimme E. Development of a chromatographic method for the quantitative determination of minor ribonucleosides in physiological fluids. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1984;22:175-184

Abbildung 6: Dominik A, Steinhilber D. Instrumentelle Analytik, 2. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2002

Abbildung 7: Dominik A, Steinhilber D. Instrumentelle Analytik, 2. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2002

Abbildung 8: Dominik A, Steinhilber D. Instrumentelle Analytik, 2. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2002

Abbildung 9: Dominik A, Steinhilber D. Instrumentelle Analytik, 2. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2002

Abbildung 10: eigen

Abbildung 11: eigen

Abbildung 12: eigen

Abbildung 13: eigen

Abbildung 14: eigen

Abbildung und Tabellen

Abbildung 15: eigen

Abbildung 16: eigen

Abbildung 17: eigen

Abbildung 18: eigen

Abbildung 19: eigen

Abbildung 20: eigen

Tabelle 1: eigen

Tabelle 2: Bullinger D. Metabolomics in der Tumordiagnostik: Massenspektrometrische Untersuchungen zum Metabolischen Profil modifizierter Nucleoside. Dissertation. Universität Tübingen 2008

Tabelle 3: Bullinger D. Metabolomics in der Tumordiagnostik: Massenspektrometrische Untersuchungen zum Metabolischen Profil modifizierter Nucleoside. Dissertation. Universität Tübingen 2008

Tabelle 4: eigen

Tabelle 5: eigen

Tabelle 6: Bullinger D. Metabolomics in der Tumordiagnostik: Massenspektrometrische Untersuchungen zum Metabolischen Profil modifizierter Nucleoside. Dissertation. Universität Tübingen 2008

Tabelle 7: Bullinger D. Metabolomics in der Tumordiagnostik: Massenspektrometrische Untersuchungen zum Metabolischen Profil modifizierter Nucleoside. Dissertation. Universität Tübingen 2008

Tabelle 8: eigen

7 Literaturverzeichnis

- [1] Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. IARC CancerBase No. 5 - Globocan 2000, Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. International Agency for Research on Cancer. Lyon 2001 (Updated 2002)
- [2] Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und RKI. Krebs in Deutschland, 5. Auflage. Saarbrücken 2006;52-55
- [3] Giersiepen K, Heitmann C, Janhsen K, Lange C. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Brustkrebs. Robert Koch-Institut. Berlin 2005;5:7-14,21
- [4] Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e. V. in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. sowie in der Deutschen Krebsgesellschaft e. V.. Diagnostic And Treatment Of Patients With Primary and Metastatic Breast Cancer. München 2007;43
- [5] Deutsche Krebsgesellschaft e. V.. Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau. Frankfurt / Main 2004;11-15,34-40
- [6] Xu G, Schmid HR, Lu X, Liebich HM, Lu P. Excretion pattern investigation of urinary normal and modified nucleosides of breast cancer patients by RP-HPLC and factor analysis method. *Biomed. Chromatogr.* 2000;14:459-463
- [7] Xu G, Liebich HM, Lehmann R, Müller-Hagedorn S. Capillary electrophoresis of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients. *Methods. Mol. Biol.* 2001;162:459-474
- [8] Stearns V, Yamauchi H, Hayes DF. Circulating tumor markers in breast cancer: accepted utilities and novel prospects. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998;52:239-259
- [9] Bast RCJr, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche HJr, Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG, Somerfield MR. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* 2001;19:1865-1878
- [10] King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 1985;229:974-976

Literaturverzeichnis

- [11] Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*. 2001;19:2334-2356
- [12] King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 1985;229:974-976
- [13] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-182
- [14] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF. Studies of HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244:707-712
- [15] Holtkamp W. Klinische Bedeutung der Steroidhormonrezeptor-Bestimmung in Mammakarzinomgeweben. *Dtsch. Med. Wochenschr.*. 1990;115:1442-1447
- [16] Spona J, Thomas L. Steroidhormon-Rezeptoren, in: Thomas L. Labor und Diagnose, 4. erweiterte Auflage. Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH. Marburg 1992;1246-1251
- [17] Liebert A, Quietzsch D, Beier L. Comparison of the tumor associated proteases cathepsin D (CATH D) and urokinase-type plasminogen activator (uPA) in cytosols of human breast cancer patients. *Anticancer Res.*. 1999;19:2571-2576
- [18] American Society of Clinical Oncology. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*. 1996;14:2843-2877
- [19] Wagener C. CEA (Carcinoembryonales Antigen), in: Thomas L. Labor und Diagnose, 4. erweiterte Auflage. Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH. Marburg 1992;1146-1153
- [20] Lamerz R. CA 15-3, in: Thomas L. Labor und Diagnose, 4. erweiterte Auflage. Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH. Marburg 1992; 1188-1193
- [21] Hilkens J, Buijs F, Hilgers J, Hageman P, Calafat J, Sonnenberg A, van der Valk M. Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *Int. J. Cancer.*. 1984;34:197-206

Literaturverzeichnis

- [22] Kufe D, Inghirami G, Abe M, Hayes D, Justi-Wheeler H, Schlorn J. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma*. 1984;3:223-232
- [23] Limbach PA, Crain PF, McCloskey JA. Summary: the modified nucleosides of RNA. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:2183-2196
- [24] Söll DG. Introduction and Overview, B1-B11 in: Gehrke CW, Kuo KCT. Journal of Chromatography Library – volume 45B, Chromatography and Modification of Nucleosides, part B: biological roles and function of modification, 1. Auflage. Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo 1990
- [25] Brown TA. Moderne Genetik, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin 1999
- [26] Melton DA, De Robertis EM, Cortese R. Order and intracellular location of the events involved in the maturation of a spliced tRNA. *Nature*. 1980; 284(5752):143-148
- [27] Bjoerk GR, Ericson JU, Gustafsson CED, Hagervall TG, Joensson YH, Wikstroem PM. Transfer RNA modification. *Annual Review of Biochemistry*. 1987;56:263-287
- [28] Baldwin SA, Beal PR, Yao SYM, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pfluegers Archiv*. 2004;447(5):735-743
- [29] Nakano K, Nakao T, Schram KH, Hammargren WM, McClure TD, Katz M, Petersen E. Urinary excretion of modified nucleosides as biological marker of RNA turnover in patients with cancer and AIDS. *Clinica Chimica Acta.* 1991;218(2):169-183
- [30] Sander G, Topp H, Heller-Schoch G, Wieland J, Schoch G. Ribonucleic acid turnover in man: RNA catabolites in urine as measure for the metabolism of each of the three major species of RNA. *Clinical Science*. 1986;71(4):367
- [31] Topp H, Duden R, Schoch G. 5,6-Dihydrouridine: a marker ribonucleoside for determining whole body degradation rates of transfer RNA in man and rats. *Clinica Chimica Acta*. 1993;218(1):73-82
- [32] Itoh K, Aida S, Ishiwata S, Sasaki S, Ishida N, Mizugaki M. Urinary excretion patterns of modified nucleosides, pseudouridine and 1-methyladenosine, in healthy individuals. *Clinica Chimica Acta*. 1993;217(2):221-223

Literaturverzeichnis

- [33] Liebich HM, Di Stefano C, Wixforth A, Schmid HR. Quantitation of urinary nucleosides by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1997;763(1-2):193-197
- [34] Mitchell EP, Evans L, Schultz P, Madsen R, Yarbrow JW, Gehrke CW, Kuo K. Modified nucleosides in human serum. *Journal of Chromatography*. 1992;581(1):31-40
- [35] Prankel BH, Clemens PC, Burmester JG. Urinary excretion of nucleosides varies with age and protein metabolism. *Clinica Chimica Acta*. 1995;234(1,2):181-183
- [36] Sander G, Huelsemann J, Topp H, Heller-Schoech G, Schoech G. Protein and RNA turnover in preterm infants and adults: a comparison based on urinary excretion of 3-methylhistidine and of modified one-way RNA catabolites. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 1986;30(2):137-142
- [37] Kim SH. Crystal structure of yeast tRNA (Phe) and general structure features of other tRNAs, in: Schimmel PR, Söll D, Abelson JN. Transfer RNA: Structure, properties and recognition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbour NY 1979;83-100
- [38] Björk GR, Kohli J. Synthesis and function of modified nucleosides, B13-B67, in: Gehrke CW, Kuo KCT. *Journal of Chromatography Library – volume 45B, Chromatography and Modification of Nucleosides, part B: biological roles and function of modification*, 1. Auflage. Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo 1990
- [39] Björk GR, Durand JM, Hagervall TG, Leipuviene R, Lundgren HK, Nilsson K, Chen P, Qian Q, Urbonavicius J. Transfer RNA modification: influence on translational frameshifting and metabolism. *FEBS Lett*. 1999;452:47-51
- [40] Dirheimer G. Chemical nature, properties, location and physiological and pathological variations of modified nucleosides in tRNAs. Recent Results. *Cancer Res.* 1983;84:15-46
- [41] Borek E, Baliga BS, Gehrke CW, Kuo CW, Belman S, Troll W, Waalkes TP. High turnover rate of transfer RNA in tumor tissue. *Cancer Res.* 1977;37(9):3362-3366
- [42] Dieterle F, Müller-Hagedorn S, Liebich HM, Gauglitz G. Urinary nucleosides as potential tumor markers evaluated by learning vector quantization. *Artificial intelligence in medicine*. 2003;28(3):265-279
- [43] Ravdin PM, Clark GM. A practical application of neural network analysis for predicting outcome of individual breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1992;22(3):285-293

Literaturverzeichnis

- [44] Sasco AJ, Rey F, Reynaud C, Bobin JY, Clavel M, Niveleau A. Breast cancer prognostic significance of some modified urinary nucleosides. *Cancer Letters*. 1996;108(2):157-162
- [45] Tormey DC, Waalkes TP, Ahmann D, Gehrke CW, Zumwatt RW, Snyder J, Hansen H. Biological markers in breast carcinoma. I. Incidence of abnormalities of CEA, HCG, three polyamines, and three minor nucleosides. *Cancer*. 1975;35(4):1095-1100
- [46] Tormey DC, Waalkes TP, Gehrke CW: Biological markers in breast carcinoma-clinical correlations with pseudouridine, N2,N2-dimethylguanosine, and 1-methylinosine. *Journal of Surgical Oncology*. 1975;14(3):267-273
- [47] Hammargren WM, Schram KH, Nakano K, Yasaka T. Identification of a novel nucleoside, 1,N6-dimethyladenosine, in human cancer urine. *Analytica Chimica Acta*. 1991;247(2):201-209
- [48] Tamura S, Fujii J, Nakano T, Hada T, Higashino K. Urinary pseudouridine as a tumor marker in patients with small cell lung cancer. *Clinica Chimica Acta*. 1986;154(2):125-132
- [49] Waalkes TP, Abeloff MD, Ettinger DS, Woo KB, Gehrke CW, Kuo KC, Borek E. Modified ribonucleosides as biological markers for patients with small cell carcinoma of the lung. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*. 1982;18(12):1267-1274
- [50] Heldman DA, Grever MR, Trewyn RW. Differential excretion of modified nucleosides in adult acute leukemia. *Blood*. 1983;61(2):291-296
- [51] Heldman DA, Grever MR, Speicher CE, Trewyn RW: Urinary excretion of modified nucleosides in chronic myelogenous leukemia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1983;101(5):783-792
- [52] Itoh K, Konno T, Sasaki T, Ishiwata S, Ishida N, Misugaki M. Relationship of urinary pseudouridine and 1-methyladenosine to activity of leukemia and lymphoma. *Clinica Chimica Acta*. 1992;206(3):181-189
- [53] Marvel CC, Del Rowe J, Bremer EG, Moskal JR. Altered RNA turnover in carcinogenesis. The diagnostic potential of modified base excretion. *Molecular and Chemical Neuropathology*. 1994;21(2-3):353-368
- [54] Lottspeich F, Zorbas H. Bioanalytik, 1.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg-Berlin 1998
- [55] Uziel M, Smith LH, Taylor SA. Modified nucleosides in urine: selective removal and analysis. *Clin Chem..* 1976;22:1451-1455

- [56] 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 Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;813:(1-2) 59-65
- [57] Seidel A, Brunner S, Seidel P, Fritz G, 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
- [58] Zhao R, Xu G, Yue B, Liebich HM, 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
- [59] 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
- [60] Bullinger D, Fröhlich H, Klaus F, Neubauer H, Frickenschmidt A, Hennes C, Zell A, Laufer S, Gleiter CH, Liebich HM, Kammerer B. Bioinformatical evaluation of modified nucleosides as biomedical markers in diagnosis of breast cancer. *Anal Chim Acta.* 2008;618(1):29-34
- [61] http://de.wikipedia.org/wiki/Support_Vector_Machine
- [62] Christianini N, Shawe-Taylor J. An introduction to support vector machines and other kernel-based learning methods, 1 ed.. Cambridge University Press, Cambridge 2000
- [63] Klaus FW. Modifizierte Nucleoside als potenzielle Tumormarker beim Mammakarzinom. Dissertation. Universität Tübingen 2004
- [64] Somol P, Pudil P. Oscillating search algorithms for feature selection, *Proceedings of the International Conference on Pattern Recognition (ICPR'00)*. 2000;2:406-409
- [65] Duda R, Hart P, Stork G, Pattern Classification, 2 ed.. Wiley Interscience. New York 2000
- [66] Borek E. Transfer RNA and transfer RNA modification in differentiation and neoplasia. Introduction, *Cancer Res.* 1971;31(5):596-597
- [67] 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

Literaturverzeichnis

- [68] 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
- [69] La S, Cho J, Kim JH, Kim KR. Capillary electrophoretic profiling and pattern recognition analysis of urinary nucleosides from thyroid cancer patients. *Anal Chim Acta.* 2003;486(2):171-182
- [70] Liebich HM, Müller-Hagedorn S, Klaus F, Meziane K, Kim KR, Frickenschmidt A, Kammerer B. Chromatographic, capillary electrophoretic and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of urinary modified nucleosides as tumor markers. *Journal of Chromatography.* 2005;1071(1-2):271-275
- [71] Craddock VM. Increased activity of transfer RNA N²-guanine dimethylase in tumors of liver and kidney. *Biochimica et Biophysica Acta, Nucleic Acids and Protein Synthesis.* 1972;272 (2):288-296

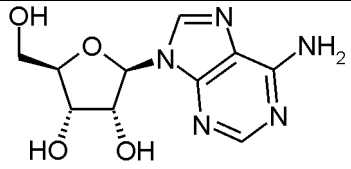
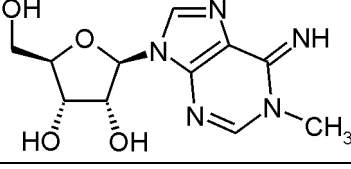
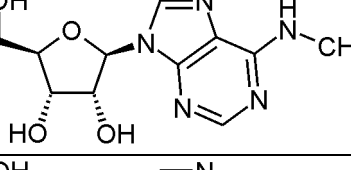
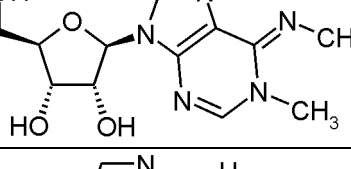
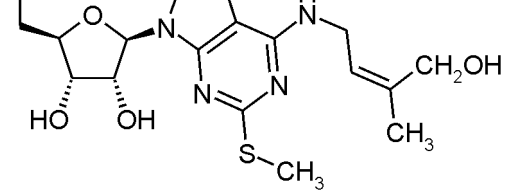
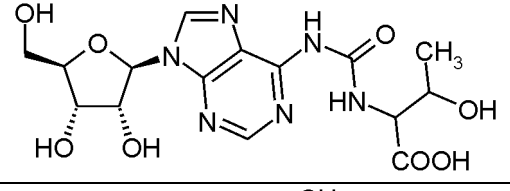
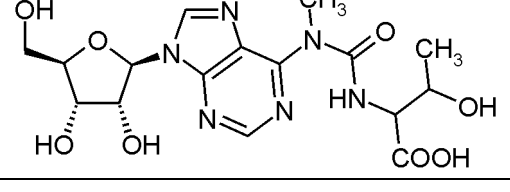
8 Abkürzungsverzeichnis

<i>ANN</i>	Artificial Neural Network
<i>ASCO</i>	American Society of Clinical Oncology
<i>BRCA</i>	Breast Cancer Gene
<i>CA 15-3</i>	Cancer Antigen 15-3
<i>CEA</i>	Carcino-Embryonales Antigen
<i>CT</i>	Computertomografie
<i>Da</i>	Dalton
<i>DNA</i>	Desoxyribonucleinsäure
<i>EGF</i>	Epidermal Growth Factor
<i>EK</i>	Extracted Ion Chromatogram
<i>ESI</i>	Electrospray-Ionization
<i>HCT</i>	High-Capacity-Trap
<i>HIV</i>	Humanes Immundefizienz-Virus
<i>HPLC</i>	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
<i>IARC</i>	International Association on Research of Cancer
<i>IGF</i>	Insulin Like Growth Factor
<i>LC</i>	Liquid Chromatography
<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>MRT</i>	Magnetresonanztomografie
<i>MS</i>	Massenspektrometrie
<i>MSⁿ</i>	n-fache MS-Fragmentierung
<i>m/z</i>	Masse / Ladungs-Verhältnis
<i>NH₄Ac</i>	Ammoniumacetat
<i>OFS</i>	Oscillating Feature Search
<i>PCA</i>	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
<i>PET</i>	Positronen Emissions Tomografie
<i>ppm</i>	Parts per million
<i>RBF</i>	Radial Basis Function
<i>RFE</i>	Recursive Feature Elimination
<i>RNA</i>	Ribonukleinsäure
<i>RP</i>	Reversed Phase
<i>rpm</i>	Rounds per minute
<i>rRNA</i>	Transfer RNA
<i>RSD</i>	relative Standardabweichung
<i>SBS</i>	Sequential Backward Selection
<i>SFS</i>	Sequential Forward Selection
<i>snRNA</i>	Small nuclear RNA
<i>SVM</i>	Support Vector Machine
<i>TAA</i>	Tumor-assoziiertes Antigen
<i>TGF</i>	Transforming Growth Factor

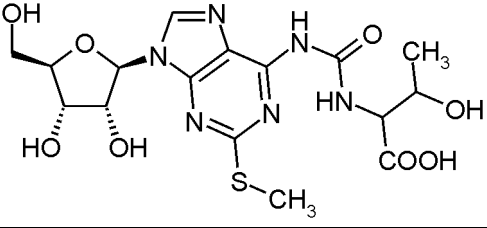
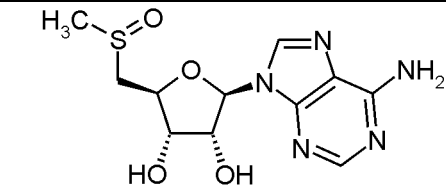
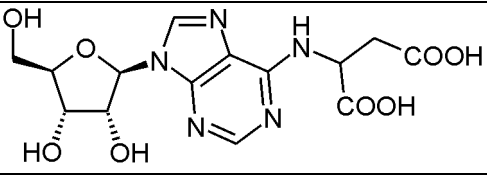
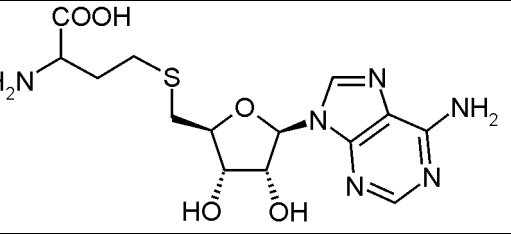
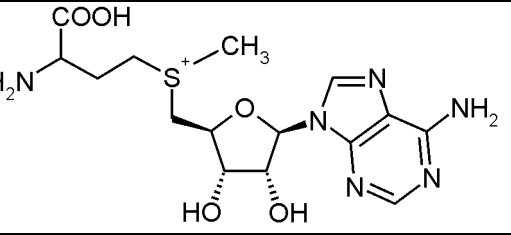
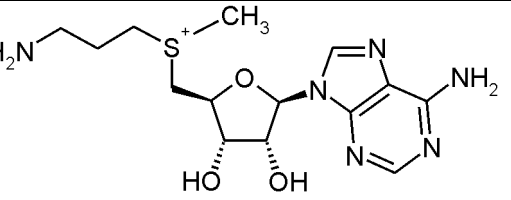
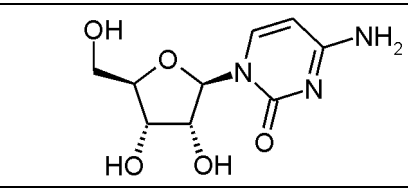
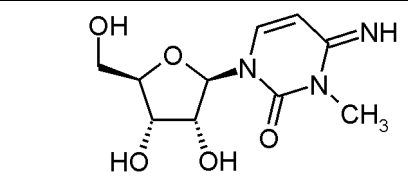
Abkürzungsverzeichnis

<i>TOF</i>	Time-of-Flight-Analysator
<i>tRNA</i>	Transfer RNA
<i>UV</i>	Ultraviolett
<i>ZBIT</i>	Zentrum für Bioinformatik Tübingen

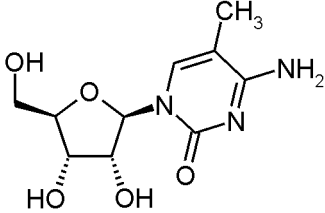
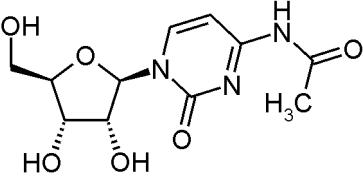
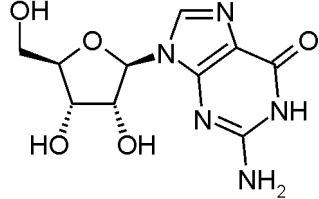
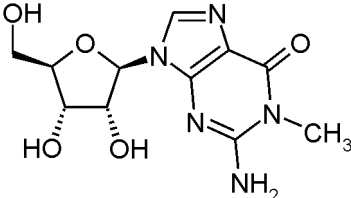
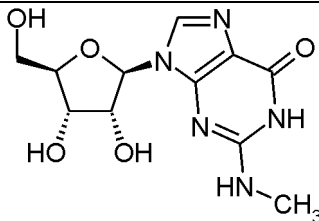
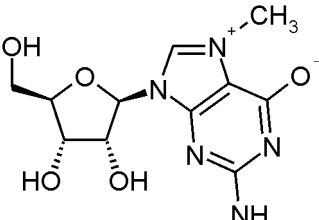
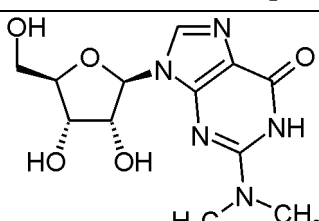
9 Metabolitenverzeichnis

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	

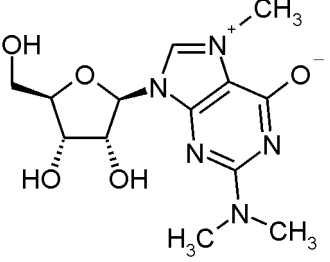
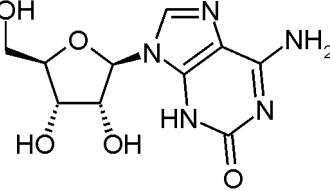
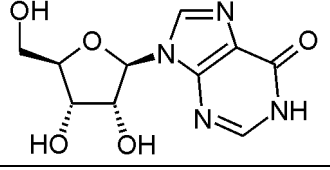
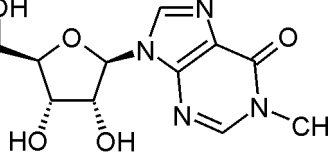
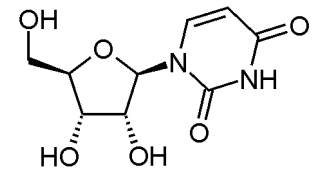
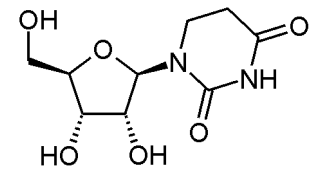
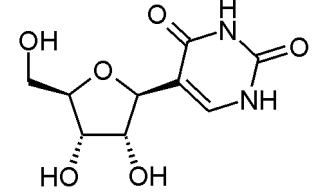
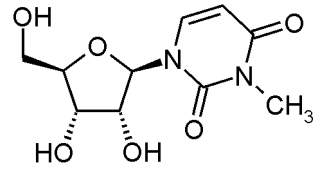
Metabolitenverzeichnis

<p>2-Methylthio-N⁶- threonylcarbamoyladenosen</p>	<p>ms²t⁶A</p>	
<p>5'-Deoxy-5'- methylthioadenosinsulfoxid</p>	<p>MTA-SO</p>	
<p>N⁶-Succinyladenosen</p>	<p>N⁶-SAR</p>	
<p>S-Adenosylhomocystein</p>	<p>SAH</p>	
<p>S-Adenosylmethionin</p>	<p>SAM</p>	
<p>Decarboxyliertes S- Adenosylmethionin</p>	<p>dcSAM</p>	
<p>Cytidin</p>	<p>C</p>	
<p>3-Methylcytidin</p>	<p>m³C</p>	

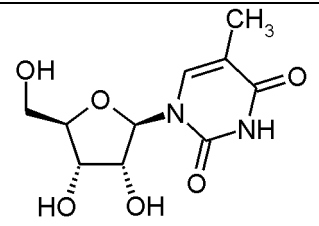
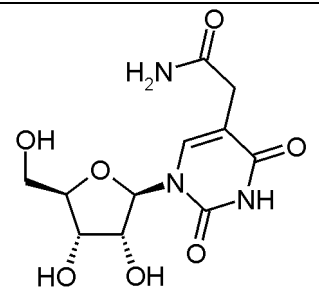
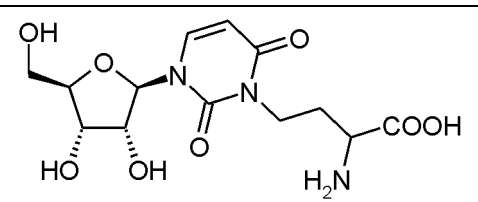
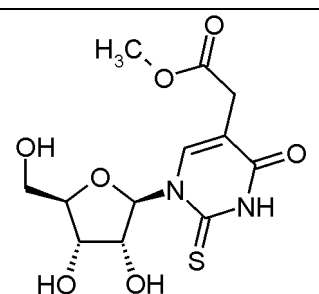
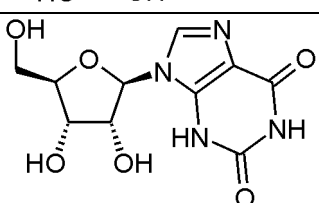
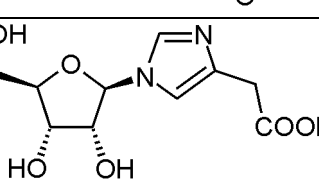
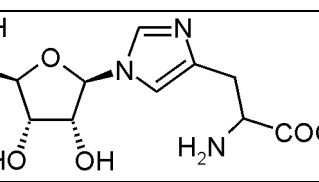
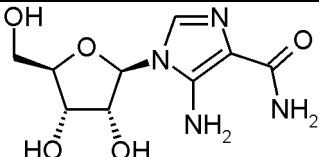
Metabolitenverzeichnis

5-Methylcytidin	m⁵C	
N ⁴ -Acetylcytidin	ac⁴C	
Guanosin	G	
1-Methylguanosin	m¹G	
N ² -Methylguanosin	m²G	
7-Methylguanosin	m⁷G	
N ² ,N ² -Dimethylguanosin	m²₂G	

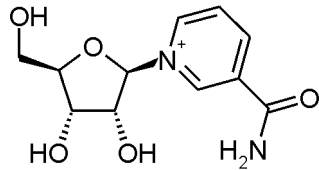
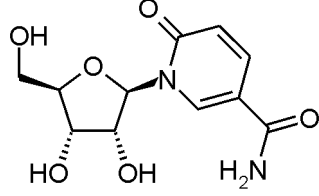
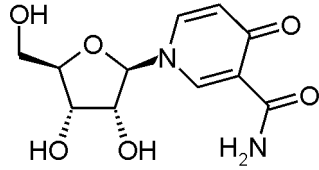
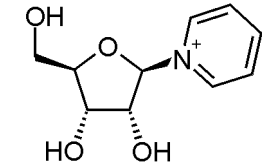
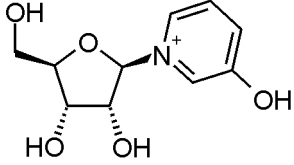
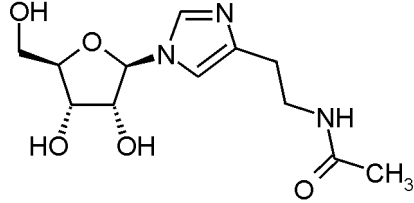
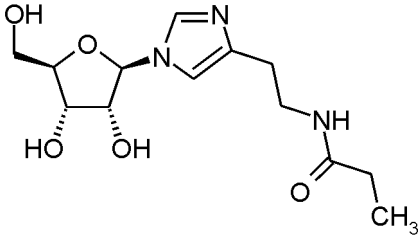
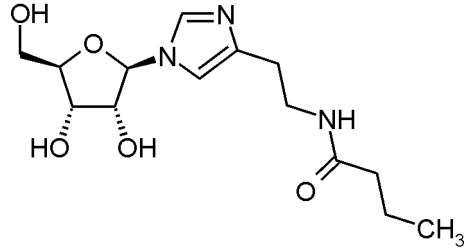
Metabolitenverzeichnis

N ² ,N ² ,7-Trimethylguanodin	m^{2,2,7}G	
Isoguanodin	IsoG	
Inosin	I	
1-Methylinosin	m¹I	
Uridin	U	
5,6-Dihydrouridin	DHU	
Pseudouridin	ψ	
3-Methyluridin	m³U	

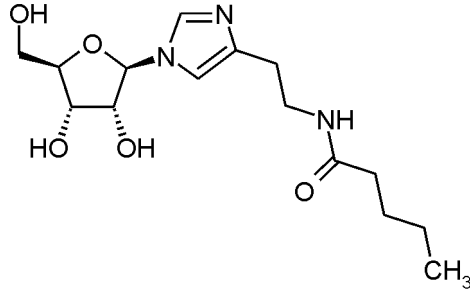
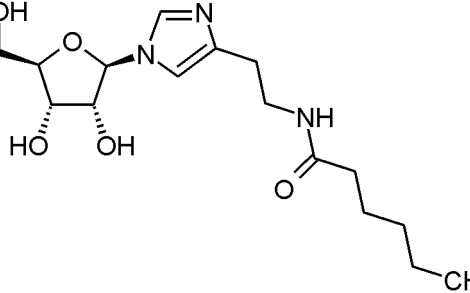
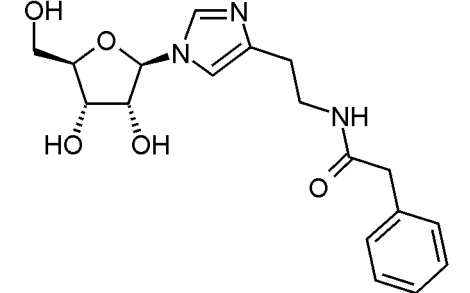
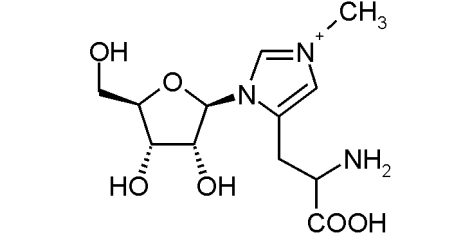
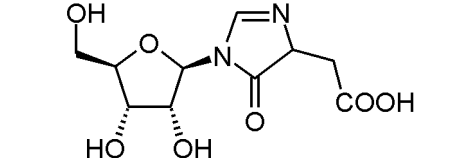
Metabolitenverzeichnis

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

Metabolitenverzeichnis

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	

Metabolitenverzeichnis

<p>1-Ribosyl-4-ethyl-N-(butylcarbonylamino)-imidazol</p>	<p>I-4</p>	
<p>1-Ribosyl-4-ethyl-N-(pentylcarbonylamino)-imidazol</p>	<p>I-5</p>	
<p>1-Ribosyl-4-ethyl-N-(benzylcarbonyl)-aminoimidazol</p>	<p>I-6</p>	
<p>1-Ribosyl-3-methyl-5-(2-aminocarboxyethyl)-imidazolium</p>	<p>I-7</p>	
<p>1-Ribosyl-4-carboxymethyl-5-oxoimidazol</p>	<p>I-8</p>	

Anm.: Die Kürzel der modifizierten Nukleoside und sonstiger, literaturbekannter Metabolite erfolgen analog zu den gängigen Abkürzungen. Tabelle aus: Bullinger D. *Metabolomics in der Tumordiagnostik: Massenspektrometrische Untersuchungen zum Metabolischen Profil modifizierter Nucleoside*. Dissertation. Universität Tübingen 2008. Die in dieser Arbeit neu identifizierten Metabolite werden mit den Symbolen P-X für Pyridine bzw. I-X für Imidazole abgekürzt.

10 Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei

Herrn *Prof. Dr. C. H. Gleiter* für die Überlassung des Themas,

Herrn *PD Dr. B. Kammerer* und für die ausgezeichnete Betreuung,

Herrn *Dr. D. Bullinger* für die ausführliche Einarbeitung sowie die Begleitung meiner Labortätigkeit,

Herrn *Dr. M. Zwirner*, Herrn *Prof. Dr. H. Seeger* und Herrn *PD Dr. J. Huober* sowie den Pflgeteams der Stationen 1 – 3 der Universitätsfrauenklinik für die Mithilfe bei der Probenrekrutierung,

allen *Patientinnen* und *Kontrollprobandinnen* für die Bereitstellung von Urin,

meinen *Eltern* sowie dem *Praxisteam* für die tatkräftige Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit,

meinem *Mann*, der immer für mich da war.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Natascha Friese
Geburtsdatum	08.01.1984
Geburtsort	Ostfildern-Ruit
Familienstand	verheiratet, eine Tochter

Schulbildung

1990 – 1994	Grundschule in Weil der Stadt
1994 – 2003	Johannes-Kepler-Gymnasium in Weil der Stadt (Abschluss: Abitur, Note 1,0)

Studium

Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen

SS 2004 –	Vorklinischer Abschnitt
WS 2005 / 2006	(Abschluss: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2,0)
SS 2006 –	Klinischer Abschnitt
WS 2008 / 2009	(Abschluss (20.05.2010): Ärztliche Prüfung, Note 2,0)

Berufspraxis

Dez. 2003 – Feb. 2004 Krankenpflegepraktikum im Theresienkrankenhaus in
Mannheim

Aug. 2006 – Sep. 2006 Famulatur in der Praxis Dr. Friese in Weil der Stadt
(Fachbereich HNO)

Lebenslauf

Mär. 2007 – Apr. 2007 Famulatur in der in der Notaufnahme im Kreiskrankenhaus in Böblingen (Fachbereich Innere Medizin)

Jul. 2007 – Aug. 2007 Famulatur im Paracelsus-Krankenhaus in Bad Liebenzell (Fachbereich Innere Medizin)

Sep. 2007 – Okt. 2007 Famulatur im Katharinenhospital in Stuttgart (Fachbereich HNO)

Feb. 2009 – Jun. 2009 1. Terial des Praktischen Jahres im Klinikum Sindelfingen-Böblingen (Fachbereich Chirurgie)

Jun. 2009 – Okt. 2009 2. Terial des Praktischen Jahres in der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik Tübingen

Okt. 2009 – Jan. 2010 3. Terial des Praktischen Jahres im Klinikum Sindelfingen-Böblingen (Fachbereich Innere Medizin)

Kenntnisse / Fähigkeiten / Interessen

EDV	Microsoft Office
Fremdsprachen	Englisch, Französisch, Spanisch
Interessen	Klavier, Tanzen, Kochen, Handarbeit
Sonstiges	Führerschein Klasse B