

Methodenentwicklung für qualitative Metabolitanalysen und deren
beispielhafte Anwendung an ausgewählten Zelllinien

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. rer. nat.

der Fakultät Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Michelle Hartmann

aus

Geseke

Bielefeld 2013

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
2.1	Metabolomics	3
2.2	Einfluss auf die Detektion von Metaboliten aus Zellkulturen	5
2.2.1	Probenahmeverfahren	5
2.2.2	Detektionsmethoden	7
2.3	Einsatz von Zelllinien bei Metabolitanalysen	7
2.4	Darmkrebs	9
2.4.1	Auftreten von Darmkrebs in Deutschland und seine Klassifizierung	9
2.4.2	Einsatz von Darmkrebszelllinien bei Metabolitanalysen	11
2.4.3	Einsatz von Darmkrebsgewebe bei Metabolitanalysen	11
3	Zielsetzung	13
4	Methodische Grundlagen	15
4.1	Gaschromatographie/Massenspektrometrie	15
4.2	Hochleistungsflüssigchromatographie/Massenspektrometrie	16
4.3	Ionenmobilitätsspektrometrie	18
5	Material und Methoden	21
5.1	Chemikalien und Lösungen	21
5.2	Zelllinien	23
5.2.1	NCM460	23
5.2.2	Hep G2	23
5.2.3	SW-480	23
5.2.4	SW-1116	23

5.3	Zellkulturtechniken	24
5.3.1	Auftauen von gefrorenen Zellkulturen	24
5.3.2	Subkultivierung der Zelllinien SW-480, SW-1116 und Hep G2	24
5.3.3	Subkultivierung der Zelllinie NCM460	24
5.3.4	Bestimmung der Generationszeit	24
5.3.5	Kultivierung von Zellen auf Glas	25
5.4	Analytische Methoden	25
5.4.1	Gaschromatographie/Massenspektrometrie	25
5.4.1.1	Wachstumsbedingungen der Zelllinien	25
5.4.1.2	Geräteparameter für die Analysen der schwerflüchtigen und flüchtigen Metabolite	26
5.4.2	Multikapillarsäulen-Ionenmobilitätsspektrometrie	27
5.4.2.1	Wachstumsbedingungen der Zelllinien	27
5.4.2.2	Geräteparameter für die Analysen der flüchtigen Metabolite	28
5.4.3	Hochleistungsflüssigchromatographie/Massenspektrometrie	28
5.4.3.1	Wachstumsbedingungen der Zelllinien	28
5.4.3.2	Geräteparameter für die Analysen der nichtflüchtigen Metabolite	29
5.4.3.3	Aufkonzentrierungstechniken der Standardproben	30
5.4.3.4	Geräteparameter für die Analyse der Standardmessungen	31
5.5	Geräte	32
5.6	Softwareprodukte und Datenbanken	33
6	Ergebnisse und Diskussion	34
6.1	Kultivierung von Zellen für Metabolitanalysen	34
6.1.1	Bestimmung der Generationszeit	34
6.1.2	Auswirkung des Einsatzes von Antibiotika auf den Metabolismus	36
6.1.3	Auswirkung des Einsatzes verschiedener Kulturmedien	37
6.1.3.1	Veränderungen der Morphologie der Zellen	38
6.1.3.2	Veränderungen im Metabolismus	39

6.2	Etablierung der Methoden für Metabolitanalysen an Zelllinien	41
6.2.1	Methodenentwicklung für die Analyse flüchtiger Metabolite	41
6.2.1.1	Entwicklung einer direkten Probenahme	42
6.2.1.2	Kultivierungsgefäße bei Metabolitanalysen	46
6.2.2	Methodenentwicklung für die Analyse schwerflüchtiger Metabolite	48
6.2.3	Methodenentwicklung für die Analyse nichtflüchtiger Metabolite	50
6.2.3.1	Zellaufschluss und Quenchen des Metabolismus	51
6.2.3.2	Aufkonzentrierung der Probe	51
6.2.3.3	Auswertung der mittels HPLC/MS generierten Daten	54
6.3	Beispielhafte Anwendung der entwickelten Methoden an zwei Darmkrebszelllinien und einer normal epithelialen Darmzelllinie	57
6.3.1	Analyse flüchtiger Metabolite mittels GC/MS	58
6.3.1.1	Anreicherung der extrazellulären flüchtigen Metabolite an einer CW/DVB-Faser	58
6.3.1.1.1	Manuelle Auswertung der generierten Daten (CW/DVB-Faser)	59
6.3.1.1.2	Softwaregestützte Auswertung der generierten Daten (CW/DVB-Faser)	63
6.3.1.2	Anreicherung der extrazellulären flüchtigen Metabolite an einer PDMS-Faser	70
6.3.1.2.1	Manuelle Auswertung der generierten Daten (PDMS-Faser)	71
6.3.1.2.2	Softwaregestützte Auswertung der generierten Daten (PDMS-Faser)	72
6.3.2	Analyse schwerflüchtiger Metabolite nach Derivatisierung mittels GC/MS	73
6.3.2.1	Manuelle Auswertung der generierten Daten (nach Derivatisierung)	73
6.3.2.2	Softwaregestützte Auswertung der generierten Daten (nach Derivatisierung)	76
6.3.3	Analyse flüchtiger Metabolite mittels MCC-Ionenmobilitätsspektrometrie	77

6.3.4	Analyse nichtflüchtiger Metabolite mittels HPLC/MS	86
6.3.4.1	Softwaregestützte Auswertung der generierten Daten (MZmine)	90
6.3.4.2	Softwaregestützte Auswertung der generierten Daten (MeltDB)	95
7	Zusammenfassung	106
8	Ausblick	110
9	Referenzen	111
10	Anhang	122

1 Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
ACN	Acetonitril
apr	Gerätespezifische Einheit
CE	Kapillarelektrophorese
CW/DVB	Carbowax/Divinylbenzol
Da	Dalton
DMEM/F12	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium mit Hams-Medium (F 12) im Verhältnis 1:1 (v/v)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektrospray-Ionisierung
eV	Elektronenvolt
E_d	Elektrisches Feld der Driftstrecke
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FCS	Fötale Kälberserum
FT ICR	Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz
g	Generationszeit
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
G	Darmkrebbsgrad (1-4)
HNPCC	Erblicher Nicht-polypöser Darmkrebs
HPLC/MS	Hochleistungsflüssigchromatograph/Massenspektrometer
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
IT	Ionenfalle
IR	Infrarotspektroskopie
I.A.Z.	Institut für angewandte Zellkultur
K	Ionenmobilität
K_0	Reduzierte Ionenmobilität
$1 / K_0$	inverse Reduzierte Ionenmobilität
LC	Flüssigchromatographie
LIT	Lineare Ionenfalle
$[M + H]^+$	protonierte Molekülionen (Wasserstoffionen-Addukte)
$[M - H]^-$	deprotonierte Molekülionen (Wasserstoffionen-Dedukte)

MCC	Multikappilarsäule
MS	Massenspektrometrie
MS ⁿ	Fragmentierungsexperimente (n=Anzahl)
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NMR	Kernspinresonanz
p	Druck
p ₀	Standarddruck 101,3 kPa
PA	Polyacrylat
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDMS	Polydimethylsiloxan
ppb	Ein Milliardstel Volumenanteil
ppm	Ein Millionstel Volumenanteil
ppt	Ein Trillionstel Volumenanteil
RPMI 1640	Medium 1640 vom Royal Park Memorial Institute
SIM	Messung ausgewählter Ionen (selected ion monitoring)
SPE	Festphasenextraktion
SPME	Festphasenmikroextraktion
t	Inkubationszeit
T	Temperatur
T ₀	Standardtemperatur 273 K
T _v	vitale Gesamtzellzahl
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
u	atomare Masseneinheit
UICC	Union internationale contre le cancer (Organisation, die sich der Erforschung, Prävention und Behandlung von Krebserkrankungen widmet)
UV	Ultra Violett
ü.N.	über Nacht
V _d	mittlere Driftgeschwindigkeit der Analytionen

2 Einleitung

2.1 Metabolomics

Für die Charakterisierung eines Organismus oder einzelner Zellen stehen vier verschiedene Plattformen zur Verfügung: *Genomics*, *Transkriptomics*, *Proteomics* und *Metabolomics*. Unter diesen kommt *Metabolomics* eine besondere Bedeutung zu, was durch vergleichende Analysen verdeutlicht werden konnte. Studien, in denen z.B. gleichzeitig *Transkriptomics* und *Metabolomics* zur Anwendung kommen, zeigen, dass die Ergebnisse beider Plattformen nicht konform sind [1]. Außerdem belegen theoretische Analysen der Stoffwechselkontrolle [2, 3] und experimentelle Daten [4], dass eine x-fache Steigerung eines Transkripts oder Proteins nicht notwendigerweise zu einem x-fachen Anstieg ihrer Aktivität führt. Denn zu jeder Zeit ist die Rate enzymatischer Reaktionen von verschiedenen Faktoren wie dem verfügbaren Substrat, der Produkte bzw. deren Modifikationen und der Menge an Enzymen abhängig. So führen Veränderungen im Transkriptom oder Proteom nicht notwendigerweise zu einer Veränderung des Phänotyps. Als letztes "downstream"-Produkt des Genoms spiegelt das Metabolom die Aktivität einer Zelle viel stärker auf ihrer Funktionsebene (siehe Abb. 1).

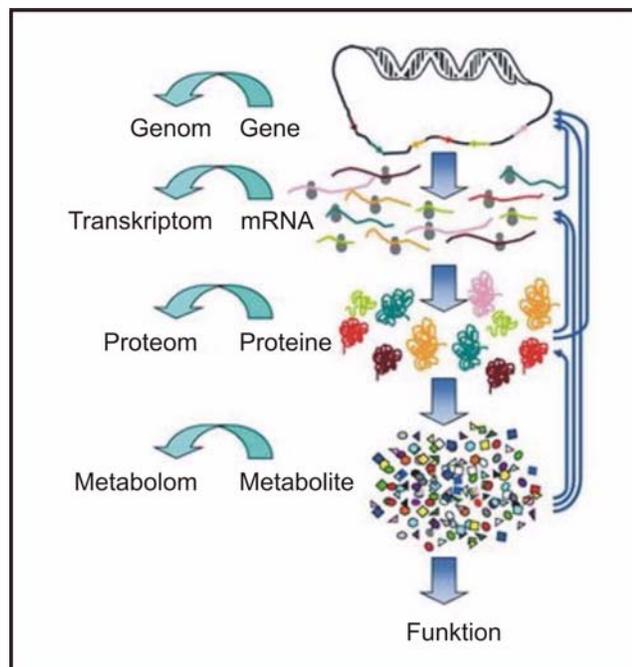


Abb. 1: Schematische Darstellung der vier Plattformen zur Charakterisierung eines Organismus oder einer Zelle (*Genomics*, *Transkriptomics*, *Proteomics* und *Metabolomics*) [22]. Die generelle Informationsweitergabe verläuft über die einzelnen Ebenen von oben nach unten, wobei zwischen allen -omics Bereichen ebenfalls regulatorische Interaktionen stattfinden (siehe blaue Pfeile, rechte Seite).

Metabolomics bezeichnet die Analyse des Metaboloms, das als die Gesamtheit organischer Substanzen (Metabolite) einer Zelle oder eines Organismus definiert wird, die an metabolischen Reaktionen beteiligt ist und zum Wachstum, der Erhaltung sowie ihrer normalen Funktion beiträgt [5]. Die geschätzte Größe des Metaboloms variiert von Spezies zu Spezies. Es wird davon ausgegangen, dass das Metabolom von *E. coli* ca. 1000 [6], das des Menschen ca. 3000 [7] und das des gesamten Pflanzenreiches ca. 200.000 Metabolite [8] umfasst.

Mittlerweile weist *Metabolomics* ein sehr breites Anwendungsspektrum auf, wozu u.a. die Analyse der Wirkung von Medikamenten und Umwelteinflüssen [9, 10], die Nutrigenomik [11], die persönliche Gesundheitsbewertung [12], die klinische Diagnostik [13, 14], *metabolic engineering* [15, 16] und die Entdeckung von möglichen Biomarkern für verschiedene Krankheiten wie Zuckerkrankheit oder Krebs [17 - 20] gehören.

Hierfür wurden verschiedene Strategien entwickelt (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Strategien zur Analyse des Metaboloms [21].

Strategie	Vorgehen
<i>Metabolome analysis</i>	Bestimmung des Metaboloms; keine analytische Technik oder die Kombination von Techniken kann derzeit alle Metabolite des Metaboloms bestimmen.
<i>Targeted analysis</i>	Quantitative Bestimmung von einem oder mehreren Metaboliten.
<i>Metabolite profiling</i>	Analyse zur Identifizierung einer großen Anzahl an Metaboliten durch spezifische Methoden; oft ein schneller, nicht notwendigerweise quantitativer Ansatz.
<i>Metabolic fingerprinting</i>	Analyse zur Identifizierung einer großen Anzahl intrazellulärer Metabolite durch spezifische Methoden; oft ein schneller, nicht notwendigerweise quantitativer Ansatz.
<i>Metabolic footprinting</i>	Analyse zur Identifizierung einer großen Anzahl extrazellulärer Metabolite durch spezifische Methoden; oft ein schneller, nicht notwendigerweise quantitativer Ansatz.

2.2 Einfluss auf die Detektion von Metaboliten aus Zellkulturen

Bereits die Kultivierung der Zellen, aber auch das eingesetzte Probenahmeverfahren bzw. die Detektionsmethode zeigen einen Einfluss auf den Nachweis von Metaboliten. Bei der Kultivierung werden verschiedene Medien eingesetzt, deren Zusammensetzungen variieren und somit jeweils unterschiedliche Ausgangsstoffe für den Zellstoffwechsel zur Verfügung stellen [23 - 25]. Diesen Medien müssen Zusatzstoffe entweder in Form des standardmäßig eingesetzten fötalem Kälberserums (FCS) oder neuerdings chemisch hergestellter Serumersatzstoffe zugeführt werden. Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass die Bestandteile des FCS bis heute nicht völlig aufgedeckt sind und die Zusammensetzung schwanken kann [26], während die Serumersatzstoffe mit definierten Konzentrationen bekannter Inhaltsstoffe hergestellt werden [27].

Neben diesen Zusatzstoffen werden den Kulturmedien der Zellen häufig Antibiotika zugesetzt, um bakteriellen Kontaminationen vorzubeugen [28]. Allerdings ist die Verwendung nicht zwingend, da steriles Arbeiten ebenfalls Kontaminationen verhindert und die Zellen unter diesem Umstand in einer natürlicheren Umgebung kultiviert werden können.

Demnach kann bereits die Art und Weise der Zellkultivierung, die Voraussetzung aller folgenden Analysen ist, einen Einfluss auf die Bildung oder Verstoffwechselung von Metaboliten ausüben.

Weiterhin müssen die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Stoffwechselprodukte wie deren Polarität, Thermostabilität und Flüchtigkeit in Hinblick auf die Wahl der Probenahme und der Detektionsmethode berücksichtigt werden. Je nachdem, welche Methoden eingesetzt werden, können unterschiedliche Stoffwechselprodukte aufgezeichnet werden.

2.2.1 Probenahmeverfahren

Der Einsatz einer Mikroliterspritze [29] oder die Headspace-Techniken, bei der z.B. SPME-Fasern (Solid Phase Micro Extraction) zum Einsatz kommen, gelten als Standardverfahren für gasförmige oder flüssige Proben. Zur Analyse schwerflüchtiger Metabolite müssen sie allerdings zuvor derivatisiert werden, wodurch die polaren Gruppen in weniger polare umgewandelt werden. Die Substanzen erhalten auf diese Weise eine verbesserte Flüchtigkeit sowie eine erhöhte Thermostabilität und können dadurch über GC/MS analysiert werden [30 - 33].

Die SPME wurde 1989 von Pawlizyn entwickelt [34]. Die Anreicherung der Analyte erfolgt an unterschiedlich beschichteten Fasern, die je nach Polarität, Flüchtigkeit und

Molekulargewicht der zu untersuchenden Substanzen gewählt werden (siehe Tab. 2). Bei diesem Vorgang wird die Faser in die Lösung eingetaucht [36] oder in die Gasphase über der Probe eingeführt [37]. Dadurch adsorbiert ein Aliquot aller Bestandteile von entsprechender Polarität an der Faser.

Tab. 2: SPME Fasern und ihr Anwendungsbereich [35].

Beschichtung	Polarität	Flüchtigkeit	Bevorzugter Molekulargewichtsbereich [u]
7 µm Polydimethylsiloxan (PDMS)	unpolar	flüchtig	60 - 275
30 µm PDMS	unpolar	flüchtig	60 - 275
100 µm PDMS	unpolar	flüchtig	60 - 275
85 µm Carboxen-PDMS	bipolar	flüchtig	30 - 225
65 µm PDMS-Divenylbenzol (DVB)	bipolar	flüchtig	50 - 300
85 µm Polyacrylat (PA)	polar	schwerflüchtig	80 - 300
65 µm Carbowax/ Divinylbenzol (CW/DVB)	polar	flüchtig	40 - 275

Nichtflüchtige Metabolite aus flüssigen Proben können z.B. durch Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) [38] und Vakuumtrocknung isoliert werden. Der Vorteil der SPE liegt in einer materialabhängigen, selektiven Aufkonzentrierung von Substanzen. Die Lösung wird auf SPE-Kartuschen gegeben, die Analyte zurückgehalten und anschließend in einem sehr viel geringeren Volumen eluiert. Durch die Wahl des Adsorptionsmittels (polar/unpolar) können spezifisch unterschiedliche Klassen von Metaboliten aufkonzentriert werden.

Bei der Vakuumtrocknung wird der Probe bei geringer Temperatur und herabgesetztem Druck das Lösungsmittel entzogen. Der niedrige Druck führt zu einer Senkung des Siedepunktes, wodurch auch bei niedrigen Temperaturen eine Verdampfung erreicht wird. Die Vakuumtrocknung stellt eine produkt schonende Möglichkeit der Aufkonzentrierung dar.

Da eine große Auswahl an Probenahmeverfahren besteht, deren Anwendung zum Nachweis unterschiedlicher Metabolite führt, ist es notwendig, verschiedene Methoden zu kombinieren, um einen möglichst großen Anteil der Analyte erfassen zu können.

2.2.2 Detektionsmethoden

Die Detektionsmethode wird je nach Aggregatzustand der Probe bzw. Flüchtigkeit der Metabolite gewählt (siehe Tab. 3).

Standardmäßig werden Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) [39 - 41] und Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (HPLC/MS) [42 - 48] eingesetzt, aber auch Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) [49], Infrarotspektroskopie (IR) [50] und Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) [51 - 57] finden in der Metabolomforschung Anwendung.

Tab. 3: Einsatzgebiete der unterschiedlichen Detektionsmethoden.

Method	Aggregatzustand der Probe	Flüchtigkeit der Metabolite
GC/MS	gasförmig	flüchtig/schwerflüchtig (nach Derivatisierung)
HPLC/MS	flüssig	nichtflüchtig
NMR	flüssig/Festkörper	schwerflüchtig (nach Derivatisierung)
IR	gasförmig/flüssig	flüchtig, schwer- und nichtflüchtig
IMS	gasförmig	flüchtig

In dieser Arbeit wurden GC/MS, LC/MS und IMS eingesetzt. Auf ihre jeweiligen Vorteile wird in Kapitel 4 eingegangen.

2.3 Einsatz von Zelllinien bei Metabolitanalysen

Zellkulturen weisen ein breites Einsatzspektrum auf: Mittlerweile werden tierische, menschliche und pflanzliche Zelllinien eingesetzt. Ein Vorteil der standardisierten Zellen liegt z.B. darin, dass durch die gleich bleibenden Wachstumsbedingungen jederzeit einheitliche Proben zur Verfügung stehen, so dass die Experimente reproduzierbar und vergleichbar werden.

Ein Forschungsschwerpunkt liegt in der Analyse von Krebszellen, insbesondere dem Auffinden von Unterschieden zu gesunden Zellen. Obwohl bekannt ist, dass das Metabolom von Zellkulturen in der Zusammensetzung heterogen ist, d.h. flüchtige, schwer- und nichtflüchtige Stoffe nebeneinander vorkommen, wurde deren Variabilität nicht ausreichend berücksichtigt. Bei den meisten Studien wurde vornehmlich nur *eine* Detektionsmethode eingesetzt, um Unterschiede aufzufinden (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Unterschiede von Krebszellen und gesunden Zellen.

Krebsform	Unterschiede von Krebszellen und gesunden Zellen	Nachweis- methode	Literatur
Lungenkrebs	2-Ethyl-1-hexanol, 2-Methylpentan 4-Methyloctan	GC/MS GC/MS	[73] [74]
Brustkrebs	5-Methyluridin, N2,N2,7-Trimethylguanosen, N6-Methyl-N6-Threonylcarbamoyladenosen, 3-(3 Aminocarboxypropyl)-Uridin, 1-Ribosyl-4-Carboxamido-5-Aminoimidazol, Sadenosylmethionin Cholin, Phosphocholin, Betain	HPLC/MS NMR	[75] [76]

Außerdem ist kritisch anzumerken, dass in allen in Tab. 4 aufgeführten Studien Antibiotika zum Einsatz kamen, ohne vorher zu untersuchen, ob deren Einsatz den Metabolismus der Zellen verändert.

2.4 Darmkrebs

2.4.1 Auftreten von Darmkrebs in Deutschland und seine Klassifizierung

Laut Robert-Koch-Institut nimmt Prostatakrebs bei Männern und Brustdrüsenkrebs bei Frauen den größten Anteil der Krebsneuerkrankungen ein, während Darmkrebs bei beiden Geschlechtern auf Platz zwei zu finden ist (siehe Abb.2).

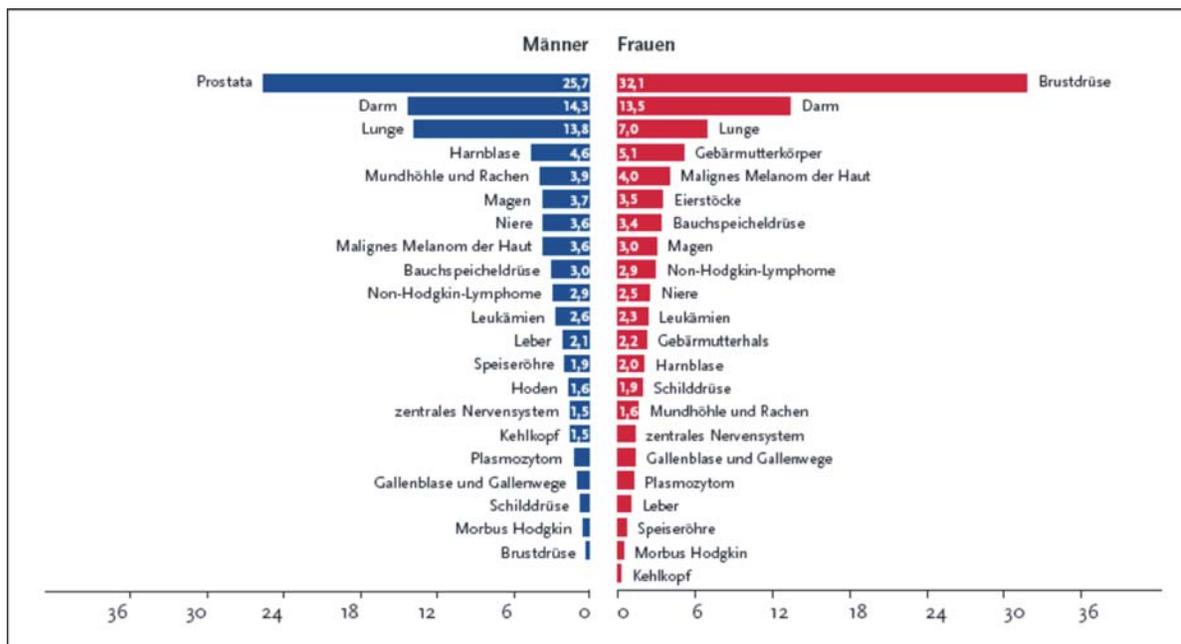


Abb. 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 (ohne nicht melanotischen Hautkrebs) [77].

Aufgrund der gehäuften Krebsneuerkrankungsrate bei beiden Geschlechtern kommt Darmkrebs eine besondere Bedeutung zu, weshalb eine genaue Charakterisierung dieser Krebsart angestrebt werden soll.

Für vergleichende Metabolitanalysen steht eine breite Palette an Darmkrebszelllinien unterschiedlicher Grade und Duke-Stadien zur Verfügung. Die Zelllinien wurden aus Tumoren etabliert, die bei der Entnahme klassifiziert wurden.

Der Grad (G1 - G4) beurteilt die Bösartigkeit nach Bewertungskriterien wie Teilungsrate oder Ähnlichkeit der Tumorzellen mit den Zellen des Organs, aus dem der Tumor hervorgegangen ist. Während G1-Tumore noch hochdifferenziert sind, zeigen G4-Tumore die schlechteste Differenzierung und sind am aggressivsten. Die Einteilung in Duke-Stadien wurde 1925 von Broder entwickelt, aber seitdem häufig verändert [78]. Heutzutage findet die Einteilung in UICC-Stadien Anwendung (siehe Abb. 3).

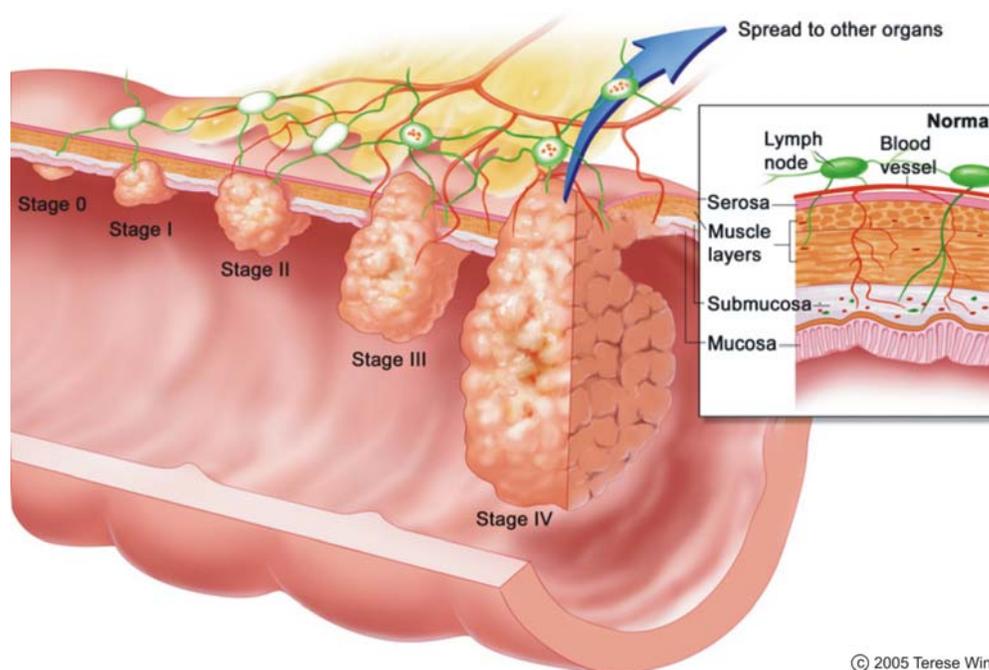


Abb. 3: Darmkrebsstadien gemäß UICC-Einteilung [79]. Von Stadium I bis IV fortschreitende Einwanderung von der Darmschleimhaut (I), über die Muskelschichten (II) in benachbarte Gewebe oder Lymphknoten (III) bis hin zur Ausbreitung in andere Organe und dem Nachweis von Fernmetastasen (IV).

Die Duke-Stadien A - D stimmen mit den UICC-Stadien I - IV überein (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Stadieneinteilung von Darmkrebs [80].

UICC-Einteilung, Duke-Stadien	Bedeutung
Stadium I (Klasse A)	Kleiner, noch nicht fortgeschrittener Tumor, der sich auf den Entstehungsort beschränkt. Er hat die Darmschleimhaut befallen oder ist zusätzlich in die Darmmuskelschicht eingedrungen.
Stadium II (Klasse B)	Größerer Tumor, der sich noch auf seinen Entstehungsort beschränkt. Er ist in alle Schichten der Darmwand eingedrungen.
Stadium III (Klasse C)	Bereits fortgeschrittener Tumor. Er ist in benachbartem Gewebe eingewandert, oder Tumorzellen sind in den benachbarten Lymphknoten nachweisbar.
Stadium IV (Klasse D)	Es wurden zusätzlich auch Fernmetastasen, etwa in der Lunge oder Leber, entdeckt.

Neben den unterschiedlichen Graden und Stadien von Darmkrebszelllinien, die in die vergleichenden Analysen einbezogen werden können, bietet diese Krebsart für experimentelle Untersuchungen außerdem den Vorteil, dass auf die normale epitheliale

Zelllinie NCM460 zurückgegriffen werden kann. Sie dient als Referenz, da sie weder infiziert noch mit exogenem genetischen Material transfeziert ist [81]. Aus diesem Grund bietet NCM460 die besondere Möglichkeit, den Normalzustand gesunder Darmzellen abzubilden.

2.4.2 Einsatz von Darmkrebszelllinien bei Metabolitanalysen

Die bisher durchgeführten Studien zu diesem Thema beschäftigen sich nahezu ausschließlich mit der Wirkung äußerer Einflüsse auf Darmkrebszellen. So wurde z.B. der Effekt von "Anticancer"-Metaboliten auf den Zellzyklus oder die Differenzierung untersucht [82 - 84]. Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Erforschung der Auswirkung von Medikamenten wie z.B. Sulindac [85], das zur Apoptose von Darmkrebszellen führt, oder Aspirin [86], das einen chemopräventiven Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen ausübt. Eine Charakterisierung von Stoffwechselprodukten in Hinblick auf die Detektion natürlich vorliegender Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Metabolismus von gesunden Zellen und Darmkrebszellen wurde bisher nicht ausreichend durchgeführt. Um ein möglichst vollständiges Spektrum abzubilden, ist eine Kombination unterschiedlicher Probenahmeverfahren und Detektionsmethoden sinnvoll. Für die Entwicklung neuer Ansätze haben Zelllinien gegenüber Biopsiematerial einen wichtigen Vorteil. Sie stehen in charakterisierter Form (Grad / Duke-Stadium) in unendlicher Menge zur Verfügung. Hierdurch wird es möglich, verschiedene Ansätze unter gleich bleibenden Bedingungen zu testen bzw. die Reproduzierbarkeit der neu entwickelten Methoden zu verifizieren.

2.4.3 Einsatz von Darmkrebsgewebe bei Metabolitanalysen

Die in Tab. 6 aufgeführten Analysen führen Unterschiede im Stoffwechsel von Tumor- und gesundem Gewebematerial auf. Da allerdings Biopsiematerial von einem Patienten lediglich in begrenzter Menge zur Verfügung steht und Proben unterschiedlicher Personen zu stark differieren können, sind sie für die Entwicklung neuer Ansätze nur begrenzt einsetzbar. Weiterhin zeigen die Ergebnisse dieser Studien eindeutig die Notwendigkeit, verschiedene Techniken miteinander zu kombinieren, da jede Methode zum Nachweis anderer Substanzen geführt hat, wodurch jeweils lediglich ein geringer Anteil der möglichen Unterschiede im Metabolismus aufgedeckt werden konnte.

Tab. 6: Unterschiede von Darmkrebszellen und gesunden Zellen.

Krebsform	Unterschiede von Darmkrebsgewebe und gesundem Gewebe	Nachweis- methode	Literatur
Darmkrebs	Lactat, Glutamat, Aspartat, Taurin, Spermin, Glutathion, Glycerophosphoethanolamin, Myo- und Scyllo-Inositol	NMR	[87]
	β-Alanin, Methionin, Hypoxanthin, 1,4-Benzoldicarbonsäure u.a.	GC/TOF/ MS	[88]
	Glycogen	FT-IR	[89]
	Phosphorylethanolamin, IMP, NADP, Glycerol-3-phosphorylcholin, Phosphorylcholin, Phosphocreatin und ATP	NMR	[90]

3 Zielsetzung

In nahezu allen bisherigen Metabolitanalysen an Zellkulturen wurde lediglich *eine* Probenahme mit *einer* Detektionsmethode eingesetzt, obwohl hierdurch ausschließlich ein Anteil der Stoffwechselprodukte aufgezeichnet werden kann, da die Techniken jeweils nur Analyte bestimmter chemischer Eigenschaften isolieren und nachweisen können.

Vor diesem Hintergrund ist das übergeordnete Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines breit gefächerten Ansatzes zum Nachweis von Metaboliten unterschiedlicher Flüchtigkeit und Aggregatzustände aus *einer* Zellkulturprobe. Dies soll durch die Optimierung der Kultivierungsbedingungen und der Entwicklung von adäquaten Probenahmestrategien in Kombination mit sensitiven Detektionsmethoden erreicht werden.

Zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen sollen zum einen die Auswirkung unterschiedlicher Serumersatzstoffe im direkten Vergleich zum Standard FCS, zum anderen die Wirkung von Antibiotika auf den Stoffwechsel der Zellkulturen untersucht werden. Im Speziellen soll geprüft werden, ob durch die Zugabe unterschiedlicher Nährmedien eine Veränderung des Metabolismus nachgewiesen werden kann.

Als Probenahmestrategien sollen je nach Flüchtigkeit der Analyte SPME (flüchtige Metabolite), Derivatisierung (schwerflüchtige Metabolite) und SPE bzw. Vakuumtrocknung (nichtflüchtige Metabolite) angewendet werden. Ein wichtiges Ziel im Bereich der SPME-Technik soll die Etablierung einer *direkten* Probenahme aus dem Zellkulturgefäß sein. Bisher wird bei der „indirekten“ Methode die Probe abgenommen, in ein Gefäß überführt und anschließend vermessen. Hier besteht jedoch die Gefahr, den Anteil der Analyte, die sich bis dahin in der Gasphase befunden haben, durch die Überführung zu verlieren.

Als Detektionsmethoden werden GC/MS, IMS und HPLC/MS aufgrund ihrer spezifischen Vorteile und ihrer unterschiedlichen Einsatzgebiete in Bezug auf den Aggregatzustand der Probe (gasförmig / flüssig) genutzt. Durch die Kombination verschiedener Probenahme- und Detektionsverfahren soll ein möglichst breites Spektrum der in Zelllinien auftretenden Metabolite aufgezeichnet werden.

Nachfolgend wird die Funktionalität der entwickelten Methoden beispielhaft am Zellkulturmodell von zwei Darmkrebszelllinien (SW-480 / SW-1116) unterschiedlicher Stadien und einer normal epithelialen Darmzelllinie (NMC460) überprüft. Der Fokus soll dabei auf der Detektion von Unterschieden und Gemeinsamkeiten im Metabolismus gerichtet sein, um Krebszellen von gesunden Zellen differenzieren zu können.

4 Methodische Grundlagen

Die drei Methoden, die für diese Arbeit speziell ausgewählt wurden, werden im Folgenden näher beschrieben bzw. die spezifischen Vorteile gegenüber den anderen Methoden dargestellt.

4.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Durch die Kopplung von Massenspektrometrie (MS) mit Gaschromatographie (GC) kann neben einer Trennung der Probe in ihre Einzelkomponenten zusätzlich eine spezifische Identifizierung der Analyte aufgrund ihrer charakteristischen molekularen Masse und Fragmentspektren erreicht werden [58 - 60]. Die Voraussetzungen für die Anwendung der GC sind die Verdampfbarkeit und Thermostabilität der zu analysierenden Substanzen. In den Gaschromatographen wird die Probe über den Injektor eingeführt und in einem Gasstrom (mobile Phase) über eine stationäre Phase in die Trennsäule geleitet und dabei in ihre Komponenten aufgetrennt. Bei der heute ausschließlich eingesetzten Verteilungschromatographie liegt der Trennung die unterschiedliche Verteilung der Komponenten zwischen der mobilen Phase und der stationären Phase zugrunde. Als mobile Phase wird ein inertes Gas wie z.B. Helium eingesetzt, damit es nicht mit den Komponenten der Probe in Wechselwirkung treten kann. Heutzutage kommen aufgrund der guten Trenneigenschaften hauptsächlich Kapillarsäulen zum Einsatz, denen die stationäre Phase als dünner Film auf der Innenwand anhaftet. Das Ende der Kapillarsäule des Gaschromatographen stellt gleichzeitig den Probeneinlass in das Massenspektrometer dar. Die Ionisierung der Analyte findet in der Ionenquelle statt. Die am weitesten verbreitete Ionisierungsmethode ist die Elektronenstoßionisierung. Bei dieser Form passiert die gasförmige Probe einen Elektronenstrahl. Dabei kollidieren die Elektronen mit den Probemolekülen, wodurch die Elektronen aus den neutralen Molekülen herausgeschlagen werden und diese positiv ionisiert werden. Je nach Stabilität des Moleküls und der eingesetzten Energie kann es weiter zerfallen. Durch die konstante Energie hervorgerufene maximierte Fragmentausbeute ist eine hohe Reproduzierbarkeit in Bezug auf die Art und Häufigkeit der Fragmentationen gegeben und kann folglich zur Identifizierung der Analyte eingesetzt werden. Die Nachweisgrenze ist stark substanzabhängig und reicht bis in den unteren ppt_v-Bereich. Die Ionentrennung erfolgt in den Analysatoren. Zu den gängigsten Analysatoren gehören Quadrupol und Ionenfalle. Nach der Massenselektion gelangen die Ionen zum Detektor, in dem sie ein elektrisches Signal generieren, das proportional zur Anzahl der

Ionen ist. Der Vorzug dieser Methode liegt zum einen in dem weiten Einsatzbereich (Detektion von flüchtigen und schwerflüchtigen Metaboliten, nach Derivatisierung) und zum anderen in der Identifizierbarkeit der detektierten Analyte mit Hilfe von Datenbanken.

4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie/Massenspektrometrie

Die Kopplung von Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und MS hat seit Mitte der 80er Jahre zu einem sehr leistungsstarken Analyseverfahren geführt [61 - 68]. Die Technik verbindet die Vorteile der Trennleistung der HPLC mit dem Informationsgehalt der Massenspektrometrie. Es können Substanzen im unteren ppm_v - ppb_v-Bereich detektiert werden. Die HPLC stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die gelöste Probe in der mobilen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert und dabei in ihre Einzelkomponenten separiert wird. Nach der HPLC-Trennung wird die Probe im Massenspektrometer ionisiert und analysiert. Elektrospray-Ionisierung (ESI) ist die am häufigsten benutzte Methode für die sensitive Analyse polarer und ionischer Substanzen. Die unter Atmosphärendruck ablaufenden Ionisierung stellt eine weiche Ionisierungsart dar, die kaum Fragmentationen hervorruft, sondern vornehmlich zur Bildung von Pseudomolekülionen ($[M+H]^+$ und $[M-H]^-$) führt. Die Lösung der Analyte wird aus einer Kapillare in ein starkes elektrisches Feld versprüht. Die Polarität der Hochspannung bestimmt das Vorzeichen der Ladung der entstehenden Tropfen. Die Ionen gleicher Polarität bewegen sich aufgrund der angelegten Spannung an der Spitze der Kapillare in entgegengesetzte Richtungen. Solange die Oberflächenspannung die Abstoßung der Ladungen ausgleicht, bleibt die Flüssigkeitsoberfläche stabil. Übersteigt die Coulomb-Abstoßung der unterschiedlichen Ladungen die Oberflächenspannung, kommt es zur Abstoßung kleiner Tropfen. Diese bilden ein Aerosol in Form eines Taylor *cones* (siehe Abb. 4).

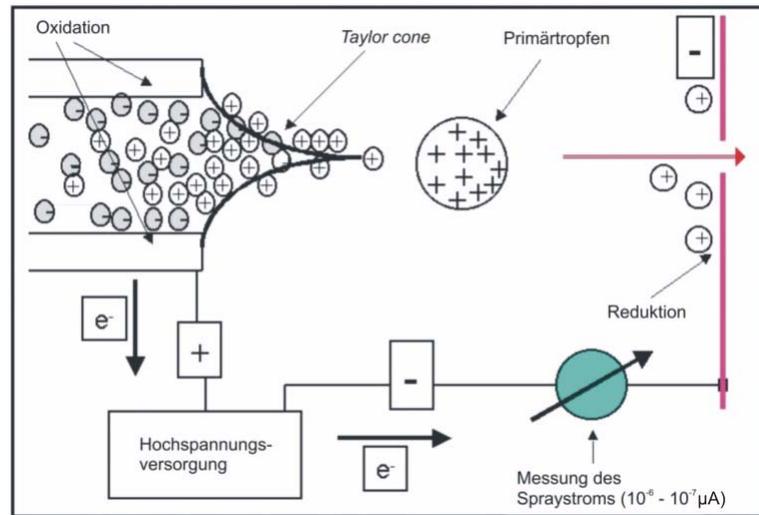


Abb. 4: Prinzip der Elektrospray-Ionisierung [69]. Durch die angelegte Hochspannung an der Kapillare erfolgt die Ionisierung der Probe. Unter Bildung eines Taylor Cones verlassen die Ionen die Kapillare als feines Aerosol. Durch ein entgegenströmendes Gas verkleinern sich die Tropfen bis freie Ionen hervorgehen, die in das Massenspektrometer eingeleitet werden.

Die geladenen Tropfen bewegen sich aufgrund des Potentialgefälles in Richtung des Massenspektrometers, wobei deren Größe durch Verdampfung des Lösungsmittels abnimmt, bis es schließlich zur Coulomb-Explosion, einem Auseinanderplatzen der Tropfen zu kleineren Tröpfchen, kommt. Dieser Sprayvorgang wird durch ein Inertgas (meist Stickstoff) unterstützt. Durch Wiederholungen dieses Prozesses gehen schließlich die freien Ionen aus den Tröpfchen hervor. Die Analytionen werden in das Hochvakuum des Massenspektrometers eingeleitet und dort über ihr unterschiedliches Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) analysiert und detektiert. Als besonders leistungsstark bei der Analyse komplexer Proben haben sich Hybridmassenspektrometer herausgestellt, bei denen verschiedene Massenanalytoren miteinander kombiniert werden. Z.B. wird das lineare Ionenfallen (LIT)-Massenspektrometer mit einem Fourier-Transform-Ionen-Cyclotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS) gekoppelt und die Vorteile beider Analytoren miteinander verbunden. Die LIT, dem FT-ICR-MS vorgeschaltet, ist in der Lage, Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses zu speichern und zu isolieren, um von diesen Fragmentierungsexperimente (MS^n) zur Substanzidentifizierung durchzuführen. Die in der LIT gesammelten Ionen werden anschließend in das FT-ICR-MS weitergeleitet, in dem die exakte Masse bestimmt wird. Somit kann die Kopplung dieser beiden Analytoren zur Strukturaufklärung der Analyte durch Fragmentierungsexperimente im LIT und zur Identifizierung der Analyte durch die Bestimmung der exakten Masse im FT ICR-MS eingesetzt werden.

Die Methode HPLC/MS wurde für diese Arbeit gewählt, da sie besonders gut geeignet ist, hochpolare, thermolabile und nichtflüchtige Metabolite zu detektieren, die der GC/MS nicht zugänglich sind. Ein weiterer Grund für ihren Einsatz liegt in der Generierung exakter Massen, die für die Identifizierung der Substanzen eingesetzt werden können.

4.3 Ionenmobilitätsspektrometrie

Die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) wurde von Cohen und Karasek im Jahr 1970 unter dem Begriff Plasma-Chromatographie eingeführt [70]. Sie dient der besonders schnellen Detektion von flüchtigen Substanzen im ppb_v-Bereich. Das IMS-System besteht aus drei Bereichen: dem Reaktionsraum, der Driftstrecke, die durch ein sich periodisch öffnendes Schaltgitter voneinander getrennt ist, und dem Detektor, der Faraday-Platte (siehe Abb. 5).

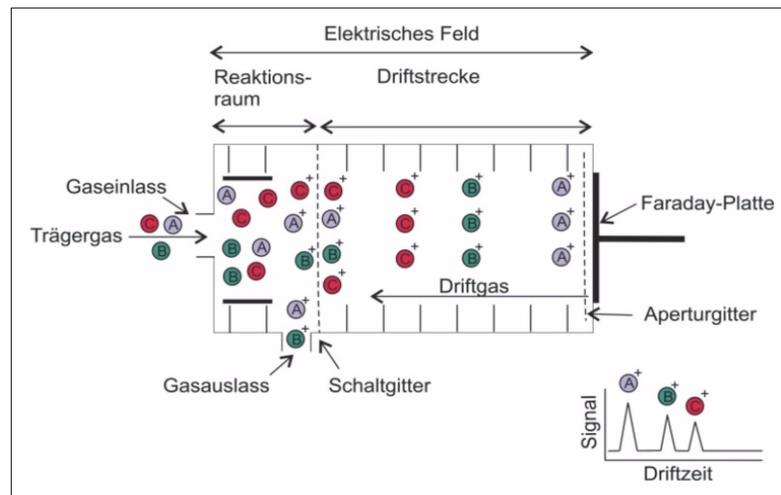


Abb. 5: Aufbau und Funktion eines Ionenmobilitätsspektrometers. Das IMS setzt sich aus dem Reaktionsraum, in dem die Ionisation der Probe stattfindet, und der Driftstrecke, in der die Ionen aufgetrennt werden, zusammen. An diesen Bereich schließt sich der Detektor, die Faraday-Platte, an.

Die Analytmoleküle einer Probe werden über ein Trägergas (Stickstoff oder Luft) in den Reaktionsraum des Ionenmobilitätsspektrometers geleitet und dort mit einer geeigneten Strahlungsquelle (radioaktiv oder UV-Lampe) unter Umgebungsdruck ionisiert. Durch das Öffnen des Schaltgitters gelangen die ionisierten Moleküle in die Driftstrecke, der ein homogenes elektrisches Feld anliegt. Hier strömt den Ionen, die sich auf Feldlinien auf die Faraday-Platte zubewegen, ein Driftgas (Stickstoff oder Luft) entgegen. Das Aperturgitter führt zu einer kapazitiven Entkopplung der Ionen in der Driftstrecke und der Faraday-Platte. Der durch das Auftreffen der Ionen auf der Faraday-Platte erzeugte Strom führt zu einem Messsignal, das detektiert werden kann.

Aufgrund der unterschiedlichen Struktur, Größe und Ladung der Analytionen erfolgt in der Driftstrecke, hervorgerufen durch die Zusammenstöße mit den neutralen Driftgas-Molekülen, eine Auftrennung der Ionen. Dabei entwickeln die Analytionen in der Driftstrecke eine mittlere Geschwindigkeit, die von dem gegebenen elektrischen Feld abhängig ist. Unter der Voraussetzung, dass das elektrische Feld E_d homogen ist, ergibt sich eine Proportionalität der Driftgeschwindigkeit V_d der Analytionen zu E_d (1).

$$V_d = K \times E_d \quad (1)$$

Der Proportionalitätskoeffizient K ist eine charakteristische Größe, die die Mobilität der Analyte angibt. Die Mobilität K lässt sich durch die Länge der Driftstrecke l_d , das elektrische Feld E_d und die Zeit t_d , die die Ionen benötigen, um die Faraday-Platte zu erreichen, berechnen (2).

$$K = \frac{l_d}{t_d \times E_d} \quad (2)$$

Die IMS-Analysen werden meist unter Umgebungsdruck und Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem idealen Gasgesetz steigt die Dichte des Driftgases bei Senkung der Temperatur oder Erhöhung des Druckes. Um die Vergleichbarkeit der Messdaten zu gewährleisten, wurde zunächst die reduzierte Ionenmobilität K_0 eingeführt, die die gegebenen Druck- und Temperaturparameter berücksichtigt (3). Da der Zusammenhang von Driftzeit und der reduzierten Ionenmobilität allerdings nicht linear ist, wurde in dieser Arbeit die inverse reduzierte Ionenmobilität $1 / K_0$ verwendet, die zur Linearität mit der Driftzeit und zu einer verbesserten Interpretation der Daten führt.

$$K_0 = K \times \left(\frac{p}{p_0} \right) \times \left(\frac{T_0}{T} \right) \quad \begin{array}{l} p_0 = 101,3 \text{ kPa und} \\ T_0 = 273 \text{ K} \end{array} \quad (3)$$

Aufgrund der unterschiedlichen Mobilitäten, mit der die Analytionen die Driftstrecke passieren, kann idealerweise eine Trennung der Ionen einer Probe erreicht werden. Zur besseren Trennung komplexer Proben wurde das Ionenmobilitätsspektrometer mit einer Multikapillarsäule (MCC) gekoppelt. Die MCC besteht aus ca. 1000 Einzelkapillaren, die zu einer Säule gebündelt werden. Die Trennung der Analyte über eine

MCC dauert Sekunden bis wenige Minuten, abhängig von ihrer Masse und den chemischen Eigenschaften, die zu unterschiedlichen Retentionszeiten auf der Säule führen. Der Vorteil von MCCs gegenüber herkömmlichen Kapillarsäulen ist ihr hoher Flussbereich, der von 5 bis 300 mL/min variiert werden kann. Kapillarsäulen hingegen werden üblicherweise mit bis zu 2 mL/min betrieben.

Durch die hohen Flussraten, die bei der IMS eingesetzt werden, können im Vergleich zu anderen Detektionsmethoden wie z.B. GC/MS enorm kurze Analysezeiten von wenigen Sekunden bis Minuten erreicht werden. Weiterhin ist das IMS-System aufgrund seiner geringen Größe und der Verwendung von Luft als Träger- bzw. Driftgas flexibler einsetzbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass IMS und GC/MS trotz des gleichen Anwendungsspektrums in Form von gasförmigen und/oder verdampfbaren Proben Vorzüge gegenüber der anderen Methode zeigen. Während IMS eine flexiblere Einsetzbarkeit und kürzere Analysezeiten aufweist, können die mittels GC/MS detektierten Analyte anhand von Datenbanken identifiziert werden. Um hochpolare, thermolabile und nichtflüchtige Metabolite zu detektieren bzw. zu identifizieren, konnte ausschließlich HPLC/MS angewendet werden, da sich die anderen beiden Methoden nicht für die Analyse dieser Stoffwechselprodukte eignen.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien und Lösungen (benutzte Abkürzungen in Klammern)

Acetonitril (ACN)	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure (HCOOH)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumacetat (NH ₄ Ac)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumformiat (NH ₄ HCOO)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DL-Asparaginsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Benzaldehyd	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Casytone-Lösung	Schärfe System, Reutlingen
1-Decanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DMEM/F12 mit L-Glutamin	PAA, Cölbe
Dodecanal \geq 95 %	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dodecansäuremethylester	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
DL-Glycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
1-Heptanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DL-Histidin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
LiChrolut EN (Adsorbensmaterial)	Merck, Darmstadt
M3 TM Base	Incub, San Antonio
Methanol (MeOH)	Roth, Karlsruhe
3-Methyl-1-butanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
2-Nonanon	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Oasis HLB (Adsorbensmaterial)	Waters GmbH, Eschborn
1-Octanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
D-a-Phenylglycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pentadecan-2-on	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DL-Phenylalanin	Merck, Darmstadt
Poly-D-Lysin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA-Lösung (1:250 v/v)	PAA, Cölbe
2-Undecanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Wasser für HPLC	Roth, Karlsruhe
ZIC-HILIC (Adsorbensmaterial)	SeQuant, Haltern

Alle Lösungsmittel wurden in Gradient-Grade-Qualität und die Chemikalien, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität bezogen. Das nicht für HPLC/MS-Standards und Messungen verwendete Wasser wurde mit einem Seralpur-Delta-UV-System (Seral, Ransbach-Baumbach) aufgereinigt. Das in der Zellkultur verwendete Wasser wurde autoklaviert.

Poly-D-Lysin	5 mg in 50 mL sterilem H ₂ O (c = 0,1 mg/mL)
PBS-Puffer (pH 7,2)	1,31 g K ₂ HPO ₄ 0,20 g KH ₂ PO ₄ 7,94 g NaCl in 1 L H ₂ O
Ammoniumacetatpuffer (c = 400 mM; pH 4,75)	3,08 g NH ₄ CH ₃ COO 2,31 mL CH ₃ COOH in 200 mL H ₂ O
Ammoniumformiatpuffer (c = 400 mM; pH 3,75)	2,52 g NH ₄ COOH 1,54 mL HCOOH in 200 mL H ₂ O
Ammoniumformiatpuffer (c = 4,7 mM; pH 3,75)	0,03 g NH ₄ COOH 17,90 µL HCOOH in 200 mL H ₂ O
Standardmischung (2 mM)	2,66 mg DL-Asparaginsäure 2,32 mg Fumarsäure 1,50 mg Glycin 3,10 mg DL-Histidin 3,30 mg DL-Phenylalanin - in 10 mL ACN/Formiatpuffer (20 mM) (80/20 v/v) - in 10 mL Formiatpuffer (20 mM)

5.2 Zelllinien

5.2.1 NCM460

Die epitheliale Zelllinie NCM460 wurde 1996 aus gesunder Darmmucosa eines 68-jährigen spanischen Mannes gewonnen und durch M.P. Moyer etabliert [81]. Diese Zelllinie ist weder infiziert, noch mit exogenem genetischem Material transfeziert, wodurch sie als Modellsystem einer normal epithelialen Darmzelllinie in den Stoffwechselanalysen eingesetzt werden kann. Die NCM460-Zellen wachsen einschichtig adhärent und in Suspension. Die adhärennten Zellen überwiegen bei dieser Zelllinie.

Bezugsquelle: Incell (San Antonio/ USA)

5.2.2 Hep G2

Die Leberkrebszelllinie Hep G2 wurde 1975 von D. Aden etabliert [91]. Die Zellen wurden hierfür einem 15-jährigen Argentinier aus einem Leberkarzinom entnommen.

Bezugsquelle: Kooperationspartner Dr. Castaneda (MPI in Dortmund/ Deutschland)

5.2.3 SW-480

SW-480 ist eine Darmkrebszelllinie, die aus dem kolorektalen Adenokarzinom eines 50-jährigen weißen Mannes gewonnen und von A. Leibovitz 1976 etabliert wurde [92]. Die Zellen wurden als Broders Grad 4 und Duke-Stadium B klassifiziert. Sie wachsen epithelial als adhärennte Monolayer-Zellen.

Bezugsquelle: Kooperationspartner Dr. Dietmaier (Uni Regensburg/ Deutschland)

5.2.4 SW-1116

Die Darmkrebszelllinie SW-1116 wurde 1976 ebenfalls von A. Leibovitz etabliert [92]. Die Zellen wurden einem 73-jährigen weißen Mann aus einem kolorektalen Adenokarzinom entnommen und als Broders Grad 2 und Duke-Stadium A klassifiziert. Sie wachsen epithelial als adhärennte Monolayer-Zellen.

Bezugsquelle: IAZ (München/ Deutschland)

5.3 Zellkulturtechniken

5.3.1 Auftauen von gefrorenen Zellkulturen

Die in Mikro-Schraubröhren aufbewahrten Zellen wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 8 mL DMEM/F12 mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) überführt und zentrifugiert (201 x g; 7 min). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in Medium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche (Firma Sarstedt/ Nümbrecht) eingesetzt und bei 37 °C und 5,5 % CO₂ kultiviert.

5.3.2 Subkultivierung der Zelllinien SW-480, SW-1116 und Hep G2

Zum Subkultivieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach einer Inkubation von 15 Minuten im Brutschrank wurde das Trypsin/EDTA mit der doppelten Menge an Medium mit 10 % FCS inaktiviert. Nach dem Zentrifugationsschritt (201 x g; 7 min) wurde der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen Medium resuspendiert und die Zellzahl mit dem Zellzählgerät bestimmt. Die Zelllinien wurden mit 30.000 Zellen/cm² eingesetzt.

5.3.3 Subkultivierung der Zelllinie NCM460

Diese Zelllinie wurde im Gegensatz zu den anderen Zelllinien in M3TM Base Medium mit 10 % FCS bei 37 °C und 5,5 % CO₂ kultiviert. Beim Subkultivieren wurde das Medium aufgrund der Suspensionszellen nicht abgesaugt, sondern mit einer Pipette abgenommen und mit den Zellen nach dem Ablöseschritt (s.o.) vereinigt und zentrifugiert (201 x g; 7 min). Der Überstand wurde verworfen, die Zellzahl bestimmt und 30.000 Zellen/cm² in die Zellkulturflasche eingesetzt. Vor den Messungen wurden die Zellen in DMEM/F12 mit 10 % FCS überführt und zweimal subkultiviert, um die Vergleichbarkeit mit den anderen Zelllinien zu gewährleisten.

5.3.4 Bestimmung der Generationszeit

Pro Zelllinie wurden 1 x 10⁶ Zellen eingesetzt. Die Zelllinien NCM460 und SW-480 wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen und die Zelllinie SW-1116 nach sechstägiger Inkubation abgelöst und die Zellzahl mit dem Zellzählgerät bestimmt. Für die Bestimmung der Generationszeit wurden je Zelllinie zwei biologische Replikate verwendet. Folgende Formel ermittelte die Generationszeit:

$$g = \log(2) \cdot \frac{\Delta t}{\Delta \log(T_V)}$$

g = Generationszeit

t = Inkubationszeit

T_V = Lebendzellzahl

5.3.5 Kultivierung von Zellen auf Glas

Um ein Anheften der Zellen, die bei einem physiologischen pH-Wert von 7,2 an ihrer Oberfläche negative Ladungen tragen, zu erreichen, wird die Glasoberfläche mit Poly-D-Lysin beschichtet. Hierzu werden die Glaskolben mit 1,5 mL Poly-D-Lysin (c = 0,1 mg/mL) beschichtet und 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Kolben dreimal mit 5 mL PBS-Puffer gewaschen und mit Medium befüllt.

5.4 Analytische Methoden

5.4.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

5.4.1.1 Wachstumsbedingungen der Zelllinien

Für die Analyse der flüchtigen Metabolite wurden die Zelllinien SW-480 und NCM460 vor den Messungen 1:4 geteilt und drei Tage bis zur Subkonfluenz in Glaskolben (35cm²) mit je 20 mL DMEM/F12-Medium mit 10 % FCS kultiviert. Die Zelllinie SW-1116 wurde aufgrund ihrer längeren Generationszeit vor der Messung 1:2 geteilt und acht Tage bis zur Subkonfluenz kultiviert. Es wurden je drei Kolben mit den unterschiedlichen Zelllinien und drei Kolben mit DMEM/F12 mit 10% FCS, die als Blindwert dienten, analysiert. Für die Analysen wurden Zellen mit einem Subkulturstadium von 2 bis 10 verwendet, um gleichbleibende Bedingungen (Generationszeit, Phänotyp u.a.) zu gewährleisten.

Für die Analyse schwerflüchtiger Metabolite wurden die Zelllinien NCM460 und SW-480 mit $3,5 \times 10^6$ Zellen und die Zelllinie SW-1116 mit 5×10^6 Zellen in Glaskolben (Wachstumsfläche $A = 85 \text{ cm}^2$) mit je 45 mL DMEM/F12-Medium mit 10 % FCS eingesetzt. Aufgrund der unterschiedlichen Generationszeiten, die 35 (SW-480, NCM460) bzw. ca. 180 Stunden (SW-1116) betragen, wurden die Zellen

unterschiedlich lange kultiviert. Nach der Verdopplung der Zellzahl erfolgte die Probenahme durch die Entnahme des Mediums bei SW-480 und NCM460 nach zwei bzw. bei SW-1116 nach acht Tagen, um zum Zeitpunkt der Messung gleiche Zellzahlen zu gewährleisten. Zur Separierung der sich im Medium befindenden Zellen wurde das Medium in 50 mL Schraubfläschchen überführt und zentrifugiert (500 x g; 7 min).

Für die Analyse des Einflusses von Antibiotika auf den Metabolismus wurden Hep G2-Zellen in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS vier Tage in Glaskolben (35cm²) mit je 20 mL DMEM/F12 Medium mit 10 % FCS kultiviert. Untersucht wurden je zwei Replikate der Zellen mit und ohne Zugabe von Antibiotika. Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) wurde dem Medium in einer Konzentration von 10.000 U/ml bzw. 10.000 mg/m) zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die flüchtigen Metabolite durch GC/MS analysiert.

5.4.1.2 Geräteparameter für die Analysen der schwerflüchtigen und flüchtigen Metabolite

Tab. 7: Geräteparameter zur Analyse flüchtiger Metabolite mittels GC/MS.

Typ	G1800A GCD System, Hewlett Packard, Waldbronn
Trennsäule	SB-11, 60 m, 0,32 mm Innendurchmesser, 0,2 µm Filmdicke, WGA, Moers
Trägergas	Helium
Flussrate	1 mL/min
Ionisierungsart	Elektronenstoß-Ionisation (EI)
Ionisierungsspannung	70 eV
Desorptionszeit	20 s
Injektionsart	splitlos
Injektortemperatur	200 °C
Detektortemperatur	240 °C
Massenbereich	35 - 350 u
Temperaturprogramm	35 °C (2 min)//5 °C/min//200 °C (10 min)
Analysendauer	45 min

Tab. 8: Geräteparameter zur Analyse der schwerflüchtigen Metabolite mittels GC/MS.

Typ	G1800A GCD System, Hewlett Packard, Waldbronn
Trennsäule	SB-11, 60 m, 0,32 mm Innendurchmesser, 0,2 µm Filmdicke, WGA, Moers
Trägergas	Helium
Flussrate	1 mL/min
Ionisierungsart	Elektronenstoß-Ionisation (EI)
Ionisierungsspannung	70 eV
Aufgabevolumen	2 µL
Injektionsart	splitlos
Injektortemperatur	250 °C
Detektortemperatur	240 °C
Massenbereich	35 - 450 u
Temperaturprogramm	70 °C (2 min)//3 °C/min//240 °C (10 min)
Analysendauer	68,7 min

5.4.2 Multikapillarsäulen-Ionenmobilitätsspektrometrie

5.4.2.1 Wachstumsbedingungen der Zelllinien

Für die Analyse der flüchtigen Metabolite wurden die Zelllinien SW-480 und NCM460 vor der Messungen 1:4 geteilt und drei Tage bis zur Subkonfluenz in Glaskolben (35cm²) mit je 20 mL DMEM/F12 Medium mit 10 % FCS kultiviert. Die Zelllinie SW-1116 wurde hingegen aufgrund ihrer längeren Generationszeit 1:2 geteilt und acht Tage kultiviert. Es wurden je drei Kolben mit den unterschiedlichen Zelllinien und drei Kolben mit DMEM/F12 mit 10% FCS, die als Blindwerte dienten, untersucht. Für gleich bleibende Bedingungen (Generationszeit, Phänotyp u.a.) der Analysen sorgte der Einsatz von Zellen mit einem Subkulturstadium von 2 bis 10.

5.4.2.2 Geräteparameter für die Analysen der flüchtigen Metabolite

Tab. 9: Geräteparameter zur Analyse der flüchtigen Metabolite mittels MCC-⁶³Ni-IMS.

Typ	Eigenbau ISAS (Dortmund)
Driftgas	synthetische Luft, 100 mL/min
Trägergas	synthetische Luft, 150 mL/min
Probengas (nur bei Probenahme aus der Zellkulturflasche)	synthetische Luft, 100 mL/min
Trennsäule	Multikapillarsäule OV-5, Sibertech Ltd. (Nowosibirsk/ Russland)
Säulentemperatur	30 °C
Ionisierungsquelle	⁶³ Ni (510 MBq)
Länge des Ionisierungsraumes	15 mm
elektrisches Feld	326 V/cm
Länge der Driftstrecke	12 cm
Durchmesser der Driftstrecke	15 mm
Gitteröffnungszeit	300 µs
Gitterimpulsfolge	100 ms
Driftspannung	4 kV

5.4.3 Hochleistungsflüssigchromatographie/Massenspektrometrie

5.4.3.1 Wachstumsbedingungen der Zelllinien

Zur Analyse der intrazellulären, nichtflüchtigen Metabolite wurden die Zelllinien NCM460 und SW-480 mit einer Dichte von $3,15 \times 10^6$ Zellen in Glaskolben (Wachstumsfläche $A = 85 \text{ cm}^2$) mit je 45 mL DMEM/F12 Medium mit 10 % FCS eingesetzt und drei Tage, die Zelllinie SW-1116 hingegen mit $6,5 \times 10^6$ Zellen acht Tage kultiviert. Pro Zelllinie wurden drei biologische Replikate, bestehend aus jeweils drei Glaskolben mit Zellen und drei Kolben mit DMEM/F12-Medium als Blindwerte untersucht.

Für alle folgenden Analysen wurden zur Qualitätssicherung Zellen mit Subkulturstadien 2 bis 10 verwendet.

5.4.3.2 Geräteparameter für die Analysen der nichtflüchtigen Metabolite

Tab. 10: Geräteparameter der Analyse der nichtflüchtigen Metabolite mittels HPLC/MS.

Massenspektrometer	LTQ FT™ Thermo Fisher Scientific, Bremen	
Säule	ZIC/HILIC 150 x 2 mm; 3,5 µm Partikelgröße	
Injektionsvolumen	5 µL	
Fließmittel	A: 95 % 5 mM Formiatpuffer, 5 % ACN (v/v) B: 95 % ACN, 5 % 5 mM Formiatpuffer (v/v)	
Flussrate	200 µL/min	
Ionisierung	Elektrospray-Ionisierung im positiven und negativen Modus	
Sheath Gas	70 psi-Einheiten	
Auxillary Gas	10 psi-Einheiten	
Sweep Gas	27 psi-Einheiten	
Transferkapillartemperatur	300 °C	
Ionisierungsspannung	5 kV	
Scanevents	1	Full Scan FT ICR ($m/z = 60 - 1000$) Auflösung 25.000 (FWHM $m/z = 400$)
	Datenabhängige Experimente	
	2	SIM Scan FT ICR Auflösung 50.000 (FWHM $m/z = 400$) intensivstes Ion von Scanevent 1
	3	MS ² -Experiment IT intensivstes Ion von Scanevent 1
	4	MS ³ -Experiment IT intensivstes Ion von Scanevent 3
	5	SIM Scan FT ICR Auflösung 50.000 (FWHM $m/z = 400$) zweitintensivstes Ion von Scanevent 1
	6	MS ² -Experiment IT zweitintensivstes Ion von Scanevent 1
7	MS ³ -Experiment IT intensivstes Ion von Scanevent 6	
Gradient	0 min 90 % D, 4 min 90 % D, 62 min 30 % D, 72 min 30 % D, 75 min 90 % D, 90 min 90 % D	

5.4.3.3 Aufkonzentrierungstechnikender Standardproben

Die Standardmischung (100 µM/Standardsubstanz) wurde für die SPE-Materialien LiChrolut EN, Oasis HLB und für die Vakuumtrocknung in Formiatpuffer (20 mM) und für das Adsorbens ZIC/HILIC in ACN/Formiatpuffer (80/20 v/v) gelöst. Darauf erfolgte die Aufkonzentrierung der Proben mit den einzelnen SPE-Materialien oder der Vakuumtrocknung.

5.4.3.3.1 SPE mittels LiChrolut EN und Oasis HLB

Die Glaskartuschen wurden jeweils mit 70 mg Oasis HLB- bzw. 200 mg LiChrolut EN-SPE-Material befüllt und nacheinander mit 3 mL MeOH und 3 mL Formiatpuffer konditioniert. Je 1 mL der in Formiatpuffer gelösten Standardmischung wurde auf das Adsorbens gegeben und das Filtrat aufgefangen. Der Waschschrift der Probe erfolgte mit MeOH/Formiatpuffer (20/80 v/v). Das Adsorptionsmaterial wurde unter Stickstoffstrom getrocknet, bevor die Probe mit 2 x 0,5 mL MeOH eluiert wurde.

5.4.3.3.2 SPE mittels ZIC/HILIC

Die Konditionierung der mit 100 mg ZIC/HILIC-SPE-Material befüllten Glaskartuschen erfolgte nacheinander mit 3 mL Formiatpuffer und 3 mL ACN. Für dieses Adsorptionsmaterial wurde die Standardmischung in ACN/Formiatpuffer (80/20 v/v) gelöst und 1 mL der Probe auf die Glaskartusche gegeben und das Filtrat aufgefangen. Als Waschschrift wurde 1 mL ACN/Formiatpuffer (80/20 v/v) eingesetzt und nach Durchlauf der Probe aufgefangen. Die Elution der Probe erfolgte mit 2 x 0,5 mL Formiatpuffer/ACN (95/5 v/v).

5.4.3.3.3 Vakuumtrocknung

Für die Vakuumtrocknung wurde 1 mL der in Formiatpuffer gelösten Standardmischung eingesetzt. Die Probe wurde in einem Spitzkolben in flüssigem Stickstoff gefroren und über Nacht unter Vakuum getrocknet ($p = 0,009$ mbar, $T = -65$ °C). Die Resuspendierung der getrockneten Probe erfolgte mit 2 x 0,5 mL ACN/Formiatpuffer (80/20 v/v).

5.4.3.4 Geräteparameter für die Analyse der Standardmessungen

Tab. 11: Geräteparameter der Standardmessungen mittels HPLC/MS.

Massenspektrometer	Finnigan LCQ™ Deca Thermo Fisher Scientific (San Jose/ USA)
Trennsäule	ZIC/HILIC 150 x 2 mm; 3,5 µm Partikelgröße SeQuant, Haltern
Injektionsvolumen	5 µL
Fließmittel	A: 95 % 5 mM Formiatpuffer, 5 % ACN (v/v) B: 95 % ACN, 5 % 5 mM Formiatpuffer (v/v)
Flussrate	200 µL/min
Ionisierung	Elektrospray-Ionisierung im positiven und negativen Modus
Sheath Gas	70 apr-Einheiten
Auxillary Gas	10 apr-Einheiten
Transferkapillar- temperatur	300 °C
Ionisierungsspannung	5 kV
Scanevents	Full Scan ($m/z = 60 - 500$)
Gradient	0 min 90 % B, 2 min 90 % B, 25 min 50 % B, 27 min 50 % B, 32 min 90 % B, 47 min 90 % B

5.5 Geräte

Autoklav: Systec V-65	Systec (Hünenberg/ Schweiz)
Gaschromatograph: G1800A GCD System	Hewlett Packard (Waldbronn)
Hochleistungsflüssigchromatograph/ Massenspektrometer ausgestattet mit: Massenspektrometer: Finnigan LCQ™ Deca Pumpe: Finnigan TSP P4000 Autosampler: Finnigan TSP AS3000 Online-Entgaser: Finnigan TSP P4000	Thermo Fisher Scientific (San Jose/ USA)
Hochleistungsflüssigchromatograph/ Massenspektrometer ausgestattet mit: Massenspektrometer: LTQ FT™ Pumpe: Surveyor MS Pumpe Autosampler mit Online-Entgaser: Surveyor Autosampler	Thermo Fisher Scientific (Bremen)
Multikapillarsäule-⁶³Ni- Ionenmobilitätsspektrometer: Eigenbau ISAS Dortmund	ISAS (Dortmund)
Lyophilisator ALPHA 2-4 LD <i>plus</i> Mikrozentrifuge MiniSpin® Mikroskop Olympus IX 7.1 Seralpur Delta UV Zellzählgerät Casy® Model DT Zentrifuge 5810R + Ausschwingrotor A-4-44 + Festwinkelrotor E34-6-38	Christ (Osterode) Eppendorf (Hamburg) Olympus (Hamburg) Seral (Ransbach-Baumbach) Schärfe System (Reutlingen) Eppendorf (Hamburg) Eppendorf (Hamburg) Eppendorf (Hamburg)

5.6 Softwareprodukte und Datenbanken

AMDIS 2.62, Nist 2.0	Qualitative Auswertung der Daten des GC/MS-Systems
BB_IMS-Analyse 0.8.5.1 (B. Bödeker)	Peakerkennung und qualitative Auswertung der Daten des IMS-Systems
BRENDA	Datenbank zur Suche von Enzymen, Stoffwechselwegen und Liganden
File converter (Xcalibur Software)	Konvertierung der Daten vom raw- zum cdf-Format
KEGG	Datenbank zur Ligandensuche mit exakten Massen
MassFrontier	Software zur Errechnung von Spaltungsmustern vorgegebener Strukturformeln
MZmine (frei verfügbare Software)	Peakdetektion und Alignment von HPLC/MS Datensätzen
MeltDB	Peakdetektion, Alignment und statistische Auswertung von GC/MS und HPLC/MS Datensätzen
Mass Frontier (Thermo Scientific)	Errechnung von Spaltungsmustern von Substanzen mit bekannten Strukturformeln
Qual Browser 2.0 (Xcalibur Software)	Qualitative Auswertung der HPLC/MS Daten
Recalibrate Offline (FT Software)	Separieren von ausgewählten Scanevents
R (Funktion von S. Bader, ISAS Dortmund)	Konvertierung der IMS Daten
R (Funktion von S. Bader, ISAS Dortmund)	Vergleich von zwei HPLC/MS Datensätzen zur Auffindung von Unterschieden
Toxic Substances Control Act (TSCA)	Datenbank zur Ligandensuche mit exakten Massen

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Kultivierung von Zellen für Metabolitanalysen

Zur Methodenentwicklung an Zelllinien ist es notwendig, die Kultivierung als Basis aller folgenden Untersuchungen zunächst zu überprüfen und nach Möglichkeit zu optimieren. Hierzu gehört u.a. die Ermittlung der Generationszeit, aber vor allem die Untersuchung der Auswirkungen von Antibiotika und Mediumzusätzen auf den Stoffwechsel der Zellen. Durch die Zugabe dieser Additiva werden den Zellen unterschiedliche Ausgangsstoffe für den Stoffwechsel zur Verfügung gestellt, was unter Umständen den natürlichen Metabolismus verändern kann.

6.1.1 Bestimmung der Generationszeit

Die Ermittlung der Generationszeit ist vor den eigentlichen Analysen ein notwendiger Schritt, um zu überprüfen, ob sie sich seit der Etablierung der Zelllinie verändert hat. Die zelllinienspezifische Wachstumsrate wird herangezogen, um die Einsatzdichte für die Experimente zu bestimmen. Hierdurch kann gewährleistet werden, dass zum Zeitpunkt der Messung alle Zelllinien die gleiche Zelldichte aufweisen und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben ist. Bei der Etablierung der Darmkrebszelllinien SW-480 und SW-1116 im Jahr 1976 hat bereits A. Leibovitz die Generationszeit bestimmt: Sie betrug für die Zelllinie SW-480 bei Passage 34 60 Stunden und bei Passage 73 50 Stunden, bei Zelllinie SW-1116 nach 3 Passagen 163 Stunden [92]. Die von M. P. Moyer 1996 etablierte normal epitheliale Zelllinie NCM460 wies zu dem damaligen Zeitpunkt eine Verdopplungsrate von 32 Stunden auf [81]. Die veränderte Wachstumsrate der Zelllinie SW-480 von Passage 34 zu 73 zeigt die Notwendigkeit der Bestimmung der Generationszeit, da sie sich über die Anzahl an Passagierungen verändern kann und dementsprechend eine angepasste Einsatzdichte für die Experimente gewählt werden muss. Die Generationszeit wurde für jede Zelllinie im Duplikat sowohl in Zellkulturflaschen als auch im Glaskolben bestimmt, um evtl. auftretende Abweichungen, die sich durch die verschiedenen Materialien der Kultivierungsgefäße ergeben, ermitteln zu können. Die Glaskolben wurden zur besseren Anheftung der Zellen mit Poly-D-Lysin beschichtet [93].

Die Generationszeiten wurden über die folgende Formel berechnet und die Ergebnisse in Tabelle 12 zusammengefasst.

$$g = \log(2) \cdot \frac{\Delta t}{\Delta \log(T_V)}$$

g = Generationszeit

t = Inkubationszeit

T_V = Lebendzellzahl

Tab. 12: Bestimmung der Generationszeit der Zelllinien.

Zelllinie	Generationszeit in der Zellkulturflasche [h]	Generationszeit im Glaskolben [h]
SW-480 (1)	31	35
SW-480 (2)	31	35
NCM460 (1)	33	35
NCM460 (2)	34	36
SW-1116 (1)	162	193
SW-1116 (2)	160	178

Anhand der Ergebnisse zeigte sich, dass die Darmkrebszelllinie SW-480 und die normal epitheliale Darmzelllinie NCM460 unabhängig vom Gefäß vergleichbare Generationszeiten aufwiesen. Die Darmkrebszelllinie SW-1116 zeigte hingegen Unterschiede in Bezug auf die Gefäßarten, die aber möglicherweise allein wegen der fünffach längeren Verdopplungsrate auffällig wurde.

Vermutlich ist die etwas längere Generationszeit im Glaskolben trotz der Poly-D-Lysin Beschichtung auf einen verzögerten Anhaftungseffekt der Zellen zurückzuführen.

Außerdem zeigten die Ergebnisse, dass sich die Wachstumsraten bei den Zelllinien SW-1116 und NCM460 seit ihrer Etablierung nahezu nicht verändert haben. Im Gegensatz dazu verkürzte sich die Verdopplungszeit der Zelllinie SW-480 von 60 bzw. 50 auf 31 Stunden (in der Zellkulturflasche). Um diesen beeinflussenden Effekt der Subkultivierungen zu vermeiden, wurden bei allen folgenden Experimenten lediglich die Subkulturstadien 2 - 10 verwendet.

6.1.2 Auswirkung des Einsatzes von Antibiotika auf den Metabolismus

Heutzutage werden bei der Kultivierung von Zellen routinemäßig Antibiotika zugesetzt. Dies sind natürlich gebildete, niedermolekulare Stoffwechselprodukte von Pilzen oder Bakterien, die schon in geringer Menge das Wachstum von anderen Mikroorganismen hemmen oder abtöten. Da Zellkulturmedien auch für Fremdkeime (Bakterien, Pilze u.a.) ideale Wachstumsbedingungen aufweisen, werden Antibiotika zugegeben. Um möglichen Kontaminationen vorzubeugen ist exakt steriles Arbeiten jedoch ebenso effektiv. Ein Nachteil von Antibiotika besteht darin, dass deren Zugabe eine Veränderung des Metabolismus hervorrufen kann.

Dieser Einfluss wurde vor bzw. nach dem Absetzen von Antibiotika an der Leberkrebszelllinie Hep G2 untersucht, die beim Kooperationspartner mit Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) kultiviert wurde. Die Kultivierung der Zellen ist in Abschnitt 5.4.1.1 aufgeführt.

Aufgrund der zu erwartenden niedrigen Analytkonzentrationen in der Gasphase der Zellen war ein Anreicherungsschritt mit der SPME-Technik vor den GC/MS-Analysen notwendig. Es wurden unterschiedliche Adsorptionszeiten zwischen 20 - 60 Minuten getestet. In Bezug auf die Peakintensität hat sich 40 Minuten als die optimale Adsorptionszeit herausgestellt, die in allen weiteren Experimenten mit SPME-Fasern eingesetzt wurde. Das zugehörige Diagramm befindet sich im Anhang (siehe Abb. 40).

Für die Analyse der Auswirkung von Antibiotika auf den Metabolismus von Zellen wurde eine mit CW/DVB beschichtete Faser (65 µm Filmdicke) gewählt, die der Adsorption polarer flüchtiger Analyte dient. Die Faser wurde nach jeder Injektion für 10 Minuten ausgeheizt, um einen Memorie-Effekt zu verhindern und sie dadurch wieder benutzbar zu machen.

Zur Beurteilung der Beeinflussung des Metabolismus wurden lediglich qualitative Unterschiede (Peak im Chromatogramm vorhanden, Peak nicht vorhanden) bei der Auswertung der generierten Daten herangezogen, da diese eine größere Aussagekraft als die Unterschiede in der Intensität eines Peaks aufweisen.

Anhand des Vergleichs der Chromatogramme zeigte sich, dass die Zugabe von Antibiotika einen Einfluss auf den Metabolismus der Zellen ausübt (siehe Tab. 13). Drei Peaks konnten als Unterschiede ermittelt werden, wobei zwei von ihnen über die Injektion der reinen Testsubstanzen als Octan-1-ol und Decan-1-ol identifiziert wurden. Die dritte, nicht identifizierte Substanz wies die charakteristischen Massen 58/43/59 u auf. Während alle drei bei den Zellen mit Antibiotika nicht mehr detektiert werden

konnten, wurden sie sowohl in beiden Medienvarianten (mit und ohne Pen/Strep) als auch bei den Zellen ohne Antibiotikazugabe gefunden. Da alle Proben gleich bearbeitet wurden, mussten die nachgewiesenen Substanzen von den Zellen metabolisiert worden sein.

Tab. 13: Unterschiede der detektierten Metabolite von Hep G2-Zellen mit und ohne Zugabe von Antibiotika.

Substanz bzw. charakteristische Massen [u]	Retentionszeit [min]	RPMI mit Pen/Strep	Hep G2 mit Pen/Strep	RPMI ohne Pen/Strep	Hep G2 ohne Pen/Strep
Octan-1-ol	22,07	+	-	+	+
Decan-1-ol	26,78	+	-	+	+
58/43/59	27,77	+	-	+	+

Anhand dieser Ergebnisse kann die Vermutung bestätigt werden, dass die Zugabe von Antibiotika zum Zellkulturmedium einen veränderten Metabolismus hervorruft. Um einer möglichst unbeeinflussten Metabolitanalyse mit hohen Qualitätsansprüchen gerecht zu werden, ist es unerlässlich, auf den Zusatz von Antibiotika bei der Kultivierung von Zellen zu verzichten. Die meisten Zellkulturstudien verfolgen bisher diesen Anspruch nicht [94, 95].

6.1.3 Auswirkung des Einsatzes verschiedener Kulturmedien

Auch das verwendete Kulturmedium kann zu einer Veränderung des Metabolismus führen. Zelllinien werden in chemisch definierten Medien gehalten. Die Rezeptur, die u.a. auf anorganischen Salzen, Aminosäuren und Vitaminen basiert, ist jeweils genormt. Im Gegensatz dazu ist das zugesetzte Serum, z.B. fötales Kälberserum (FCS), bisher chemisch nicht exakt analysiert. Es ist lediglich bekannt, dass es verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone, Transport- und Anhaftungsproteine enthält [96]. Eine schwankende Zusammensetzung des Serums kann natürlich zu wechselnden Ergebnissen bei Metabolitanalysen führen. Da diese Problematik, ausgehend vom FCS, bekannt ist, wurden Versuche seitens der Industrie unternommen, Ersatzstoffe für das Serum zu finden und als gebrauchsfertige Medien auf den Markt zu bringen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei serumreduzierte bzw. -freie Medien auf ihren metabolischen Einfluss im Vergleich zu konventionell kultivierten Zellen untersucht. Ziel war es, ein Medium zu ermitteln, das möglichst keine Veränderungen hervorruft und gleichzeitig standardisierte Bedingungen schafft.

Die Zellen der Darmkrebszelllinie SW-480 wurden für diese Studie in vier verschiedenen Medien kultiviert, an einer CW/DVB-Faser aufkonzentriert und mittels GC/MS analysiert [97]. Weiterhin wurde die Morphologie der Zellen unter den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen mikroskopisch überprüft. Zur einfacheren Benennung werden im weiteren Verlauf die vier unterschiedlichen Medien mit M1 bis M4 bezeichnet (siehe Tab. 14).

Tab. 14: Verwendete Medien und Zusatzstoffe.

	Medium	Zusatzstoffe	Mediumklassifikation
M1	DMEM/F12 mit L-Glutamin	10 % FCS	Standardmedium
M2	Advanced DMEM/F12	1 % FCS L-Glutamin	serumreduziertes Medium
M3	DMEM/F12 mit L-Glutamin	10 % Serex	serumfreies Medium
M4	Quantum 286 mit L-Glutamin	-	serumfreies Medium

Im Fall von M2 und M4 war eine Adaptierung an die veränderte Zusammensetzung des Mediums nicht notwendig, wohingegen die in M3 kultivierten Zellen durch eine schrittweise Absetzung des FCS gewöhnt werden mussten. Die Medien mit und ohne Zellen (Blindwert) wurden in Duplikaten in den mit Poly-D-Lysin beschichteten Glaskolben drei Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

6.1.3.1 Veränderungen der Morphologie der Zellen

Während die Zellen, die in serumfreien und serumreduzierten Medium (M2 und M4) wuchsen, keine Veränderungen in ihrer Morphologie aufwiesen (siehe Abb. 6 B bzw. D), zeigten sich bei den mit Serex kultivierten Zellen (M3) deutliche Veränderungen. Sie wuchsen nicht mehr als adhärenente Monolayerkultur sondern als schwimmender Zellklumpen (siehe Abb. 6 C).

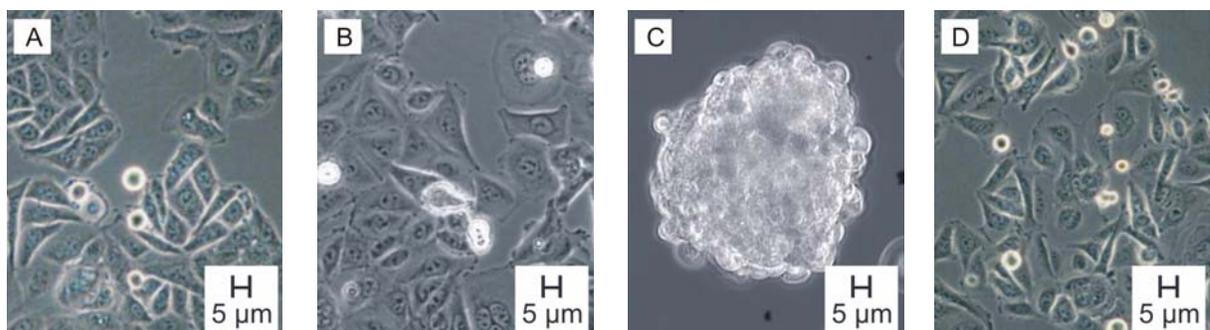


Abb. 6: Morphologie der Zelllinie SW-480 unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. A: M1, B: M2, C: M3, D: M4

A:

Dieses Ergebnis deutet bereits darauf hin, dass Serex aufgrund des veränderten Phänotyps als Serumersatz nicht geeignet ist. Das Phänomen des Ablösens könnte darauf zurückzuführen sein, dass diesem Medium bestimmte Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) fehlen, die u.a. der Anheftung der Zellen auf der Wachstumsoberfläche dienen.

6.1.3.2 Veränderungen im Metabolismus

Neben den Veränderungen des Phänotyps wurden ebenfalls solche des Metabolismus aufgedeckt: Insgesamt konnten ca. 50 Komponenten ermittelt werden, von denen sechs Analyte qualitative Unterschiede in den Chromatogrammen aufwiesen. Die Peaks wurden über die Injektion der reinen Testsubstanzen als Benzaldehyd, Dodecansäuremethylester, Decan-1-ol, Nonan-2-on, Undecan-2-ol und Pentadecan-2-on identifiziert.

Die im serumreduzierten Medium M2 kultivierten Proben ließen keine Unterschiede in Bezug auf diese Metabolite erkennen, obwohl die zugesetzte Menge an FCS um den Faktor 10 reduziert war.

Die GC/MS-Ergebnisse zeigen, dass die Substanzen Benzaldehyd, Dodecansäuremethylester und Decan-1-ol in beiden Medien detektiert wurden, wohingegen sie in Anwesenheit der Zellen nicht mehr nachweisbar waren. Da beide Probentypen exakt gleich behandelt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass diese Substanzen metabolisiert wurden.

Im Gegensatz dazu konnten die Substanzen Nonan-2-on, Undecan-2-ol und Pentadecan-2-on in beiden Medienvarianten erst in Anwesenheit der Zellen nachgewiesen werden. Das lässt wiederum den Schluss zu, dass diese Substanzen gebildet worden sind.

In den Chromatogrammen der serumfreien Medien M3 und M4 wurden weder Dodecansäuremethylester noch Decan-1-ol detektiert. Folglich standen diese Substanzen einer Verstoffwechslung wie im Fall von M1 und M2 nicht zur Verfügung. Ein weiterer Unterschied bestand darin, dass die Zellen in diesen beiden Medien Undecan-2-ol nicht bilden konnten. Lediglich die Ergebnisse in Bezug auf Benzaldehyd, Nonan-2-on und Pentadecan-2-on stimmten mit denen von M1 und M2 überein. Die Chromatogramme der in Tab. 15 zusammengefassten Daten befinden sich im Anhang (siehe Abb. 41/42).

Tab. 15: Metabolite der Zelllinie unter serumfreien, serumreduzierten und serumhaltigen Bedingungen.

	M1 (Standard)		M2 (serumreduziert)		M3 (serumfrei)		M4 (serumfrei)	
	Medium	Zellen	Medium	Zellen	Medium	Zellen	Medium	Zellen
Benzaldehyd	+	-	+	-	+	-	+	-
Dodecansäure- methylester	+	-	+	-	-	-	-	-
Decan-2-ol	+	-	+	-	-	-	-	-
Nonan-2-on	-	+	-	+	-	+	-	+
Pentadecan-2-on	-	+	-	+	-	+	-	+
Undecan-2-ol	-	+	-	+	-	-	-	-

Beide serumfreien Medien sind aufgrund einer Veränderung des Metabolismus bzw. des Phänotyps zur Standardkultivierung nicht geeignet. Da die Zellen in beiden Fällen nicht in der Lage waren, Undecan-2-ol zu bilden, muss FCS Bestandteile enthalten, die zur Bildung dieser Substanz beitragen. Obwohl ein vollständiger Verzicht von FCS im Moment noch nicht möglich ist, können die Schwankungen der Ergebnisse, die durch Fluktuationen in der Zusammensetzung des Serums ausgelöst werden, durch den Einsatz des Mediums Advanced DMEM/F12 deutlich minimiert werden.

Die Überprüfung der Kultivierungsbedingungen hat gezeigt, dass es wichtig ist, vor den Metabolitanalysen die Generationszeiten zu bestimmen. Die Einsatzdichte der Zellen muss hinsichtlich der registrierten Veränderungen angepasst werden, um vergleichbare Zelldichten zum Zeitpunkt der Messungen zu ermöglichen.

Weiterhin konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse gezeigt werden, dass der Einsatz von Antibiotika und Serumersatzstoffen zur Detektion unterschiedlicher Metabolite führt und somit eine Veränderung des Stoffwechsels hervorgerufen wird. Bei Metabolitanalysen sollte man, um einem hohen Qualitätsanspruch durch Abbildung eines natürlichen Metabolismus zu genügen, auf Antibiotika verzichten und nach Möglichkeit ein serumreduziertes Medium einsetzen.

6.2 Etablierung der Methoden für Metabolitanalysen an Zelllinien

Um das Ziel eines möglichst vielseitigen Ansatz von Metabolitanalysen zu verfolgen, werden verschiedene Probenahmetechniken mit entsprechenden Detektionsmethoden unter Berücksichtigung der chemischen Eigenschaften der Metabolite kombiniert. Da die Probenahmetechnik nicht separat von der Detektionsmethode betrachtet werden kann, werden beide Aspekte in Hinblick auf die Methodenentwicklung parallel behandelt.

6.2.1 Methodenentwicklung für die Analyse flüchtiger Metabolite

In bisherigen Arbeiten werden zur Kultivierung der Zellen sowohl Plastikflaschen [98] als auch Glaspetrischalen eingesetzt [99]. Nach der Inkubationszeit der Proben wird das Medium abgenommen, in Gefäße überführt und anschließend vermessen.

Durch das Überführen der Probe von dem Kultivierungs- in das Probenahmegefäß besteht jedoch die Gefahr, Metabolite geringer Konzentration zu verlieren.

Während der Kultivierung gasen die Stoffwechselprodukte nach ihrem spezifischen thermodynamischen Gleichgewicht aus und befinden sich zu einem bestimmten Anteil in der Gasphase. Durch den Wechsel der Behältnisse geht dieser Anteil verloren, so dass die Konzentration nach dem erneuten Einstellen des Gleichgewichts u.U. unter der Nachweisgrenze der eingesetzten Detektionsmethode liegt und die Metabolite nicht mehr nachgewiesen werden können.

Aus diesem wichtigen Grund ist es notwendig, eine *direkte* Probenahme aus dem Kultivierungsgefäß zu entwickeln. Aufgrund ihrer spezifischen Vorteile dienen GC/MS und IMS als Detektionsmethoden (siehe Kapitel 4).

6.2.1.1 Entwicklung einer direkten Probenahme

In dieser Arbeit wurde eine direkte Probenahme an zwei verschiedenen Kultivierungsgefäßen (Zellkulturflasche / Glaskolben) entwickelt und ihre Eignung hinsichtlich ihrer Praktikabilität (schnelle Probenahme) und Qualität der Ergebnisse (Summe der Hintergrundsignale in den Chromatogrammen) im Anschluss getestet.

Bei der Zellkulturflasche aus Plastik könnte die Probenahme direkt aus dem routinemäßig eingesetzten Kultivierungsgefäß ohne ein vorheriges Umsetzen erfolgen, was einen zeitlichen Vorteil bedeuten würde. Allerdings besteht die Vermutung, dass Glaskolben aufgrund ihres Materials zu weniger Hintergrund führen, wodurch weniger Überlagerungen von Signalen zu erwarten sind.

Für eine direkte Probenahme mussten zunächst die Deckel beider Gefäße modifiziert werden: Beim Glaskolben wurde hierzu der ursprüngliche Standarddeckel durchbohrt und mit einer Swagelok Rohrverschraubung (B.E.S.T. Fluidsysteme GmbH, München) versehen (siehe Abb. 7). Durch den abnehmbaren Blindverschluss konnte die Probe aus dem Kolben direkt für die GC/MS- und die IMS-Analysen entnommen werden.

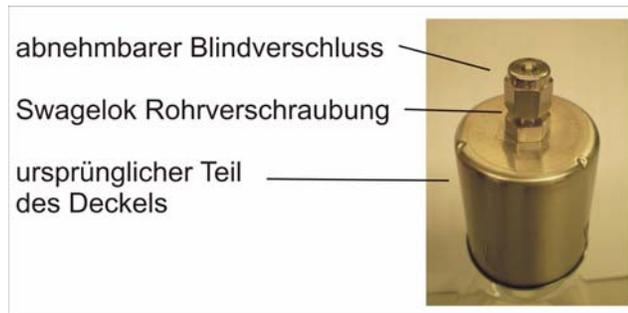


Abb. 7: Modifizierter Deckel des Glaskolbens. Der ursprüngliche Teil des Deckels wurde durchbohrt und mit einer verschließbaren Rohrverschraubung versehen.

Bei der Zellkulturflasche wurde der ursprüngliche Standarddeckel mit einem zweifach durchbohrten Teflonaufsatz verschraubt, dessen Öffnungen als Probeneingang bzw. Probenausgang fungierten (siehe Abb. 8).

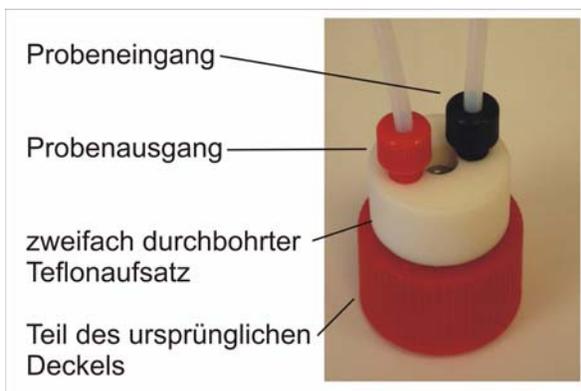


Abb. 8: Modifizierter Deckel der Zellkulturflasche. Der ursprüngliche Teil des Deckels wurde aufgebohrt und mit einem Teflonaufsatz verschraubt. In ihn wurden wiederum zwei Öffnungen eingebracht, die als Probeneingang bzw. -ausgang fungierten.

In einem zweiten Schritt mussten geeignete Methoden zur Entnahme der Probe aus beiden Kultivierungsgefäßen entwickelt werden: Das Medium DMEM/F12 mit 10 % FCS (je zwei Duplikate) wurde drei Tage bei 37 °C und 5,5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Als Probenahmetechnik für die GC/MS-Analysen wurde eine SPME-Faser eingesetzt, da sie zum einen eine Aufkonzentrierung der Metabolite bewirkt, zum anderen den Vorteil hat, dass sie lediglich zur Adsorption eines geringen Anteils der Analyte führt. So kann die Gasphase derselben Probe im direkten Anschluss in das IMS-System eingeleitet und analysiert werden.

Zunächst wird auf die Probenahme aus dem Glaskolben, anschließend aus der Zellkulturflasche eingegangen.

Die Glaskolben (Wachstumsfläche $A = 35 \text{ cm}^2$) wurden vor dem Einfüllen des Mediums mit Poly-D-Lysin beschichtet, um bei den folgenden Experimenten ein Absetzen der Zellen mit ihrer negativ geladenen Oberfläche durch die positive Ladung des Poly-D-Lysins zu ermöglichen. Um gleich bleibende Temperaturbedingungen während der Messung zu gewährleisten, wurde der Glaskolben über eine Kolbenheizung auf 37°C temperiert. Durch den neu entwickelten Deckel konnte nun die SPME-Faser direkt in den Gasraum über dem Medium des Kolbens eingeführt werden (siehe Abb. 9). Nach einer vierzigminütigen Adsorption der Analyte erfolgte die Desorption der Faser im Injektor des GC/MS-Systems.

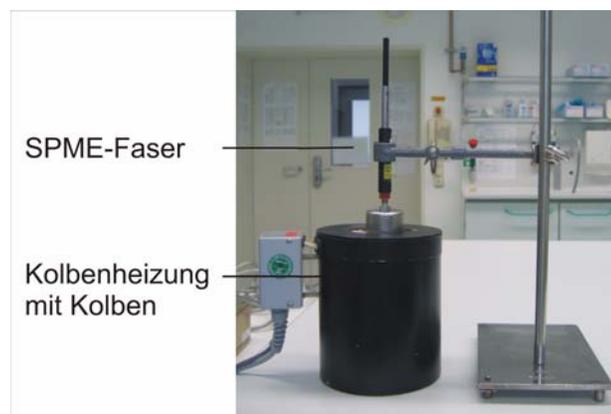


Abb. 9: Direkte Probenahme mittels SPME aus dem Glaskolben für die GC/MS-Analysen. Während der Messung wurde der Kolben über eine Heizung auf 37°C temperiert. Zur Probenahme wurde die Rohrverschraubung des Deckels geöffnet und die SPME-Faser in den Gasraum über den Zellen eingeführt.

Zur direkten Probenahme für die IMS-Analysen wurde der Glaskolben ebenfalls über eine Kolbenheizung auf 37°C erwärmt. Durch den neu entwickelten Deckel konnte nun die Gasatmosphäre über dem Medium für 15 Sekunden mittels einer Pumpe (80 mL/min) angezogen und in die Probenschleife eingeleitet werden (siehe Abb. 10). Um das Volumen der einzelnen Messungen konstant zu halten, wurde der Proben-einlass in das IMS-System durch ein 6-Wege-Ventil (Supelco, Deisenhofen) und eine Probenschleife mit 12 mL Volumen kontrolliert.

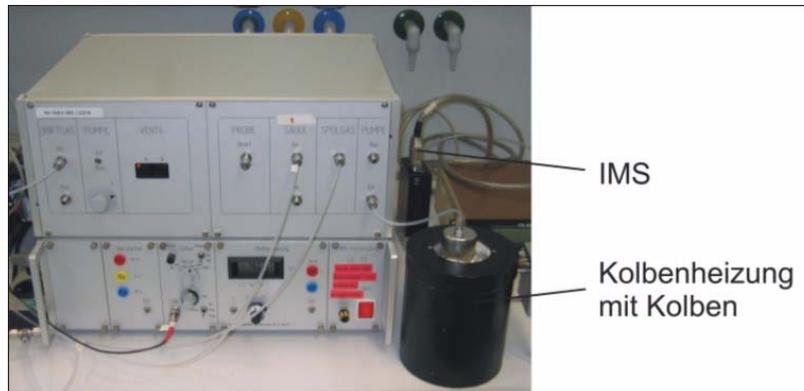


Abb. 10: Direkte Probenahme aus dem Glaskolben für IMS-Analysen. Die Temperierung des Glaskolben auf 37°C erfolgte über eine Kolbenheizung. Zur Probenahme wurde der Deckel des Kolbens über eine Zuleitung mit dem Ionenmobilitätsspektrometer verbunden und die Probe über eine Pumpe eingesogen.

In IMS-Studien mit biologischen Proben wurden Retentionszeiten von vornehmlich 8,3 Minuten (500 Spektren) aufgezeichnet [100-104]. Da humane Zelllinien nie zuvor durch IMS analysiert wurden, standen keine Referenzwerte zur Verfügung. Zu Beginn der Experimente wurden deshalb 600 Spektren (10 min) aufgezeichnet, im späteren Verlauf allerdings nur 350, weil im hinteren Retentionszeitbereich keine Signale nachgewiesen wurden. Diese Spektrenanzahl fand in allen folgenden Experimenten Anwendung.

Für die GC/MS-Analysen aus der Zellkulturflasche wurde das Medium über einer Heizplatte auf 37°C erwärmt. Eine Bohrung des speziell für die direkte Probenahme entwickelten Deckels wurde mit einem Blindstopfen verschlossen, während durch die andere die SPME-Faser in den Gasraum eingeführt wurde (siehe Abb. 11).

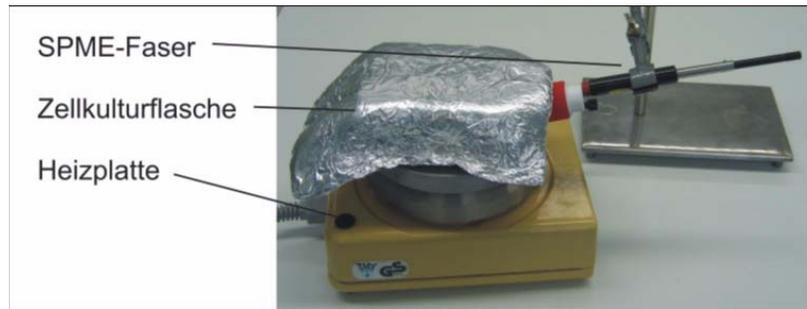


Abb. 11: Direkte Probenahme für GC/MS-Analysen mit einer SPME-Faser aus der Zellkulturflasche, die über eine Heizplatte auf 37°C temperiert wurde. Die Probenahme erfolgte durch das Einführen der SPME-Faser durch eine Öffnung des modifizierten Deckels in den Gasraum über den Zellen.

Nach der Probenahme für das GC/MS-System wurde dieselbe Zellkulturflasche ebenfalls für die IMS-Analysen eingesetzt. Über eine Öffnung des Deckels wurde das Probengas (100 mL/min) in die Flasche eingeführt und dann die Gasphase über den Zellen für 15 Sekunden in das IMS weitergeleitet (siehe Abb. 12).

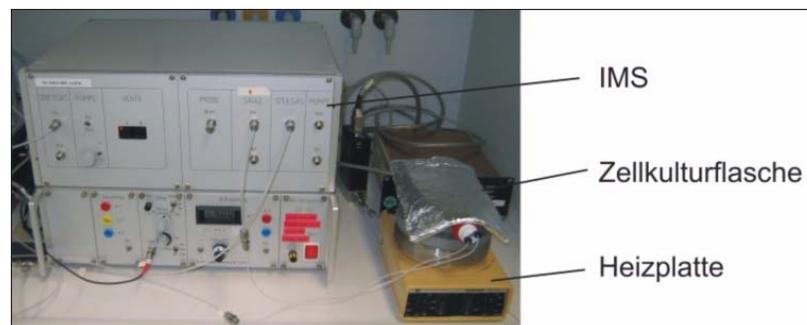


Abb. 12: Direkte Probenahme für die IMS-Analysen aus der Zellkulturflasche, die über eine Heizplatte auf 37°C temperiert wurde. Über eine Öffnung am modifizierten Deckel wurde das Probengas eingeleitet und die Gasphase über den Zellen in das Ionenmobilitätsspektrometer weitergeleitet.

Zum ersten Mal konnte eine direkte Probenahme sowohl für GC/MS- als auch IMS-Analysen aus dem Kultivierungsgefäß der Zellen entwickelt werden, so dass auch schwach konzentrierte Metabolite nicht durch die Überführung der Probe verloren gehen.

6.2.1.2 Kultivierungsgefäße bei Metabolitanalysen

Für die Kultivierung von Zellen werden sowohl Plastikflaschen, wie im Fall von Acevedo *et al.* [98], als auch Glaspetrischalen, wie z.B. von Chen *et al.* [99], eingesetzt. Da nun durch die neu entwickelte Probenahme die Gasphase in ihrer Originalzusammensetzung direkt aus den Kultivierungsgefäßen entnommen werden konnte, wurde deren Eignung für die Analyse flüchtiger Metabolite überprüft. Die Unterschiede beider Gefäße waren sehr deutlich. Die Proben aus den Zellkulturflaschen zeigten besonders in den Chromatogrammen der GC/MS-Analysen eine große Anzahl zusätzlicher Peaks, also Blindwertbeiträge, die auf Kunststoffzusätze des Kultivierungsgefäßes zurückgeführt werden konnten. Dies ist im Retentionsbereich um Minute 24 besonders offensichtlich (siehe Abb. 13).

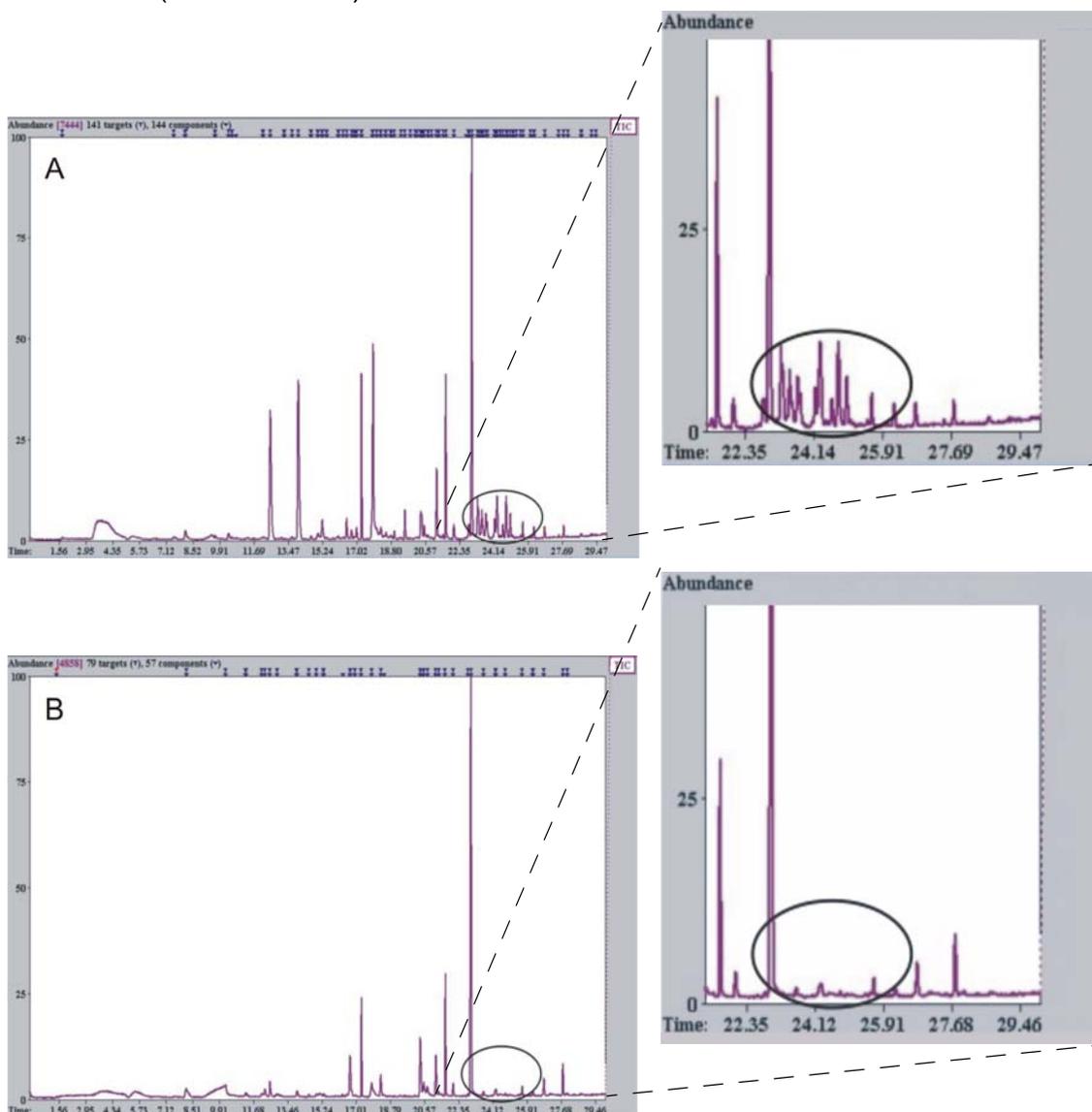


Abb. 13: Vergleich der TIC-Chromatogramme der GC/MS-Analysen verschiedener Probegefäße in Bezug auf Blindwertbeiträge. Der hervorgehobene Ausschnitt um Minute 24 zeigt die deutlichsten Signalunterschiede der Gefäße.

A: Medium DMEM/F12 in der Zellkulturflasche, B: Medium DMEM/F12 im Glaskolben

Vergleichsweise geringer fielen die Unterschiede der IMS-Chromatogramme aus: Das Material der Zellkulturflaschen führte zu zwei zusätzlichen Peaks (siehe Markierungen in Abb.14 A), die durch den Wechsel zum Glaskolben eliminiert werden konnten (siehe Abb.14 B).

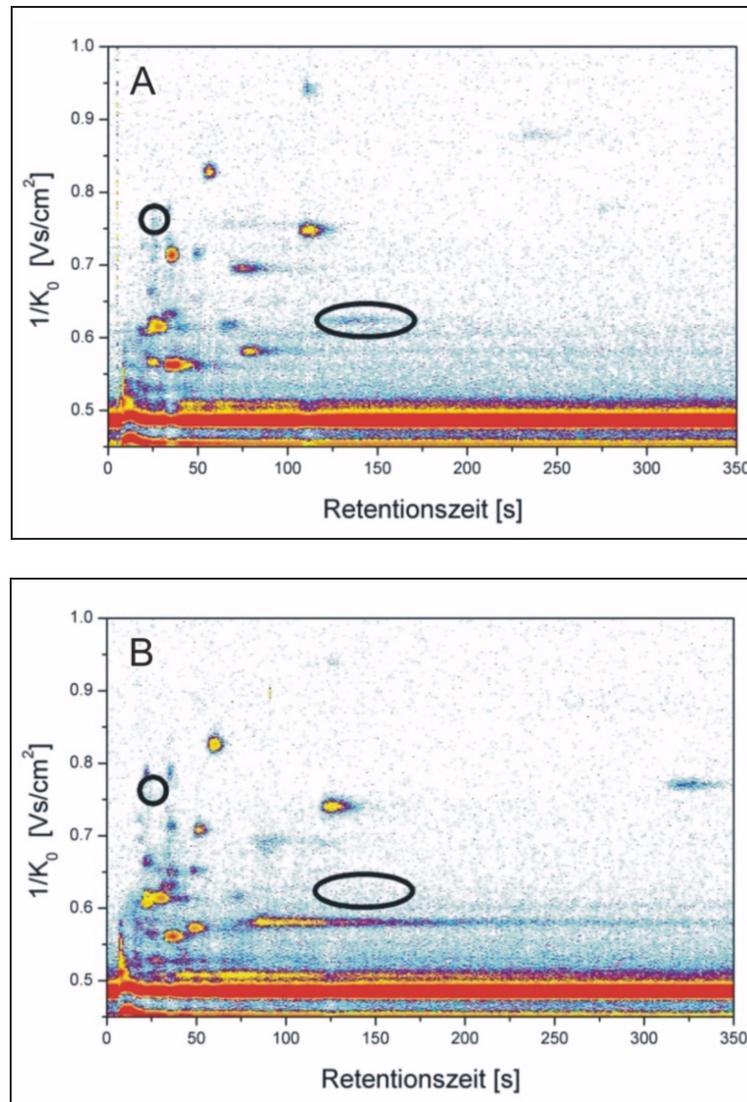


Abb. 14: Vergleich der IMS-Chromatogramme verschiedener Probegefäße in Bezug auf Blindwerteinträge. Das IMS-Chromatogramm der Zellkulturflasche zeigt zwei zusätzliche Peaks, die auf das Plastik zurückzuführen sind (Kreis/Oval).
 A: Medium DMEM/F12 in der Zellkulturflasche
 B: Medium DMEM/F12 im Glaskolben

Obwohl die Zellen vor den Experimenten in Glaskolben umgesetzt werden mussten, wurde der zeitliche Nachteil in Kauf genommen, da die Gefahr, schwach konzentrierte Analyte durch diverse Weichmacher und Antioxidanzienzusätze zu überlagern, entschärft wurde.

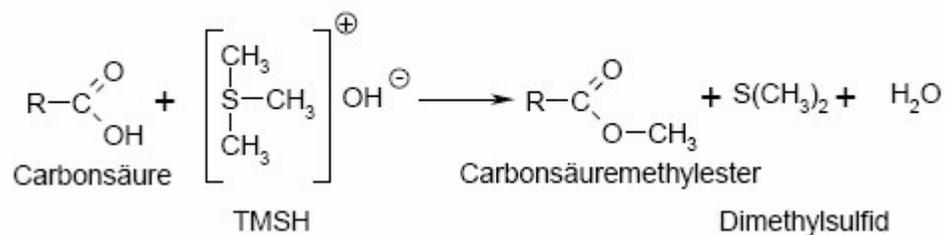
Die Entwicklung der direkte Probenahme und die Ermittlung des optimalen Kultivierungsgefäß in Form des Glaskolbens waren wichtige Schritte für die Analyse flüchtiger Metabolite von Zelllinien.

6.2.2 Methodenentwicklung für die Analyse schwerflüchtiger Metabolite

Als Teil der Probenahme kam hier ein Derivatisierungsmittel zum Einsatz, um die Verdampfbarkeit und Thermostabilität der schwerflüchtigen Metabolite zu erhöhen und sie damit der GC/MS zugänglich zu machen.

Die Derivatisierung findet allgemein bei der Analyse von schwerflüchtigen Metaboliten aus flüssigen Proben, wie z.B. Urin, Kulturmedium oder Blut breite Anwendung. Die Methode beruht darauf, dass der Probe über Gefrier- oder Vakuumtrocknung das Wasser entzogen, der Rückstand der Probe in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und mit dem gewählten Derivatisierungsmittel versetzt wird [105 - 108].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Alkylierungsreagenz Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) gewählt, da es sich zur Methylierung von Säuren (Fettsäuren [109], Benzoesäuren [110], Dicarbonsäuren [110]), deren Salzen und Derivaten, sowie von Phenolen [110] und Chlorphenolen [111] eignet und somit ein breites Anwendungsspektrum bietet. Das Reaktionsschema der Methylierung mittels TMSH am Beispiel von Carbonsäuren wird nachfolgend gezeigt.



Die Methodenentwicklung erfolgte an dem Medium und sollte im späteren Verlauf auf die extrazellulären Metabolite der Zelllinien übertragen werden. Als Detektionsmethode wurde GC/MS gewählt, da IMS nicht für flüssige Proben geeignet ist.

Weil die Probe durch den hohen Wasseranteil des Mediums stark verdünnt vorlag, musste sie vor den Analysen aufkonzentriert werden. Hierzu wurden 90 mL Medium von zwei Glaskolben (Wachstumsfläche $A = 85 \text{ cm}^2$) nach zweitägiger Inkubation abgenommen und in Rundkolben über Nacht vakuumgetrocknet ($p = 0,009 \text{ mbar}$, $T = -65 \text{ °C}$). Das getrocknete Gut wurde jeweils in 4 mL + 1 mL MeOH im Ultraschallbad resuspendiert und in ein 50 mL Teflonröhrchen überführt. Nach einem Zentrifugations-

schritt (2000 x g; 7 min), der zur Trennung der in Methanol löslichen von den nichtlöslichen Bestandteilen des Mediums führte, erfolgte die Einengung des Überstandes unter einem Stickstoffstrom auf ca. 1 mL.

Laut Literatur werden Proben mit TMSH in einem Verhältnis von 25:1 bis 2:1 v/v (Probe : TMSH) gemischt [112 - 114]. In Anlehnung kamen in dieser Arbeit drei unterschiedliche Mengen TMSH-Lösung (200 µl, 400 µl und 600 µl) zum Einsatz. Zur Derivatisierung wurde 0,2 M methanolische TMSH-Lösung der Probe zugegeben und 30 Minuten bei 70 °C im geschlossenen Gefäß inkubiert. Je 2 µL der Lösung wurde mit einer Mikroliterspritze direkt in den Injektor des GC/MS-Systems injiziert. Die qualitativen Unterschiede der Metabolite wurden vor und nach der Derivatisierung mit der Software AMDIS 2.62, Nist 2.0 untersucht. Dabei zeigte sich, dass bereits 200 µl TMSH-Lösung ausreichten, um die methylierbaren Substanzen des Mediums umzusetzen und selbst das dreifache Volumen (600 µl TMSH-Lösung) keine zusätzlichen Derivate hervorrufen konnte. Der Vergleich der Chromatogramme vor und nach der Derivatisierung führte zur Detektion von neun Analyten, die erst nach der Inkubation mit TMSH auftraten. Diese Peaks konnten folglich derivatisierten, schwerflüchtigen Substanzen zugeordnet werden. Da der Nachweis dieser Peaks lediglich die Funktionalität der entwickelten Methode beweisen sollte, wurden die Analyte nicht exakt identifiziert, sondern lediglich eine Gruppenzuordnung getroffen (siehe Tab. 16).

Tab. 16: Mittels GC/MS detektierte Peaks nach Derivatisierung des Mediums.

Retentionszeit [min]	Charakteristische Massen [u]	Gruppenzuordnung der Analyte	Medium ohne TMSH	Medium mit TMSH
6,14	74/59/99	Fettsäuremethylester	-	+
6,33	74/87/55	Fettsäuremethylester	-	+
7,34	58/43/42	Propansäurealkylamid	-	+
7,55	98/99/71	Stickstoffverbindung	-	+
7,91	42/55/85	-	-	+
12,33	74/41/54	Octansäurederivat	-	+
12,62	74/87	Octansäurederivat	-	+
19,46	115/114	Dicarbonsäurederivat	-	+
19,53	142/69/39	Furanderivat	-	+

Die erfolgreiche Derivatisierung der Analyte aus dem Medium wurde in Abbildung 15 exemplarisch an dem Peak, der bei Retentionszeit $t_R = 12,62$ min eluierte, dargestellt. Das Medium ohne TMSH-Zugabe (siehe Abb. 15, oberes Chromatogramm) zeigt keinen Peak mit den charakteristischen Massenspuren (74, 87 u) auf, wohingegen im unteren Chromatogramm nach Derivatisierung ein deutlicher Peak zu erkennen ist.

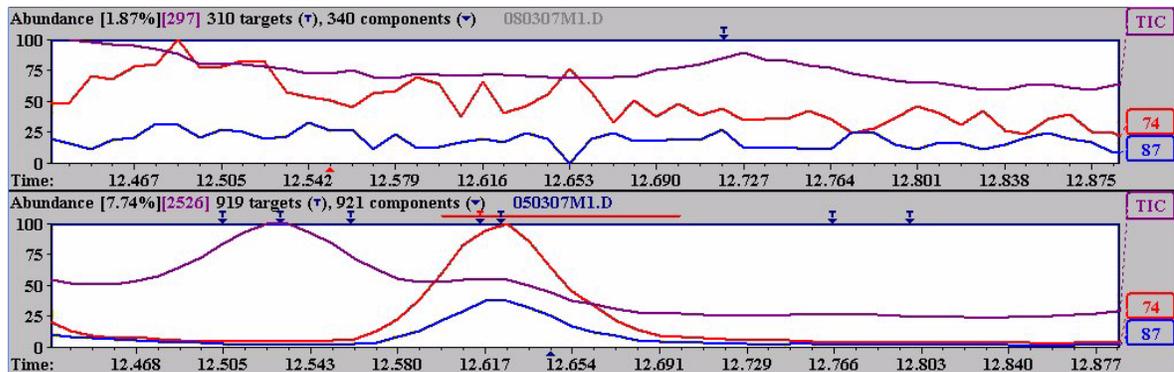


Abb. 15: TIC-Chromatogrammausschnitt des Mediums vor (oben) bzw. nach Derivatisierung mittels TMSH (unten).

Anhand dieser neun Substanzen konnte die erfolgreiche Methodenentwicklung schwerflüchtiger Metabolite am Kulturmedium belegt werden.

6.2.3 Methodenentwicklung für die Analyse nichtflüchtiger Metabolite

Als Detektionsmethode kam HPLC/MS zum Einsatz, da diese Methode besonders für thermolabile, nichtflüchtige Metabolite aus flüssigen Proben geeignet ist.

Die Probenahme umfasst vier Schritte: Aufschluss der Zellen, Quenchen des Metabolismus, Extraktion der Metabolite und Aufkonzentrierung der Probe.

Für den Aufschluss der Zellen wurden zwei Methoden (Einfrieren-Auftauen und mechanischer Aufschluss) bezüglich ihrer Effektivität miteinander verglichen.

Zum Quenchen des Zellmetabolismus werden laut Literatur verschiedene Lösungsmittel wie Acetonitril [115, 116], Ethanol [115] oder Perchlorsäure eingesetzt [115, 117, 118]. Die am häufigsten angewendete Methode bei humanen Zellen basiert auf einer Mischung aus Methanol und Wasser [115, 119]. In dieser Arbeit wurde, angelehnt an die Methode von Angus *et al.*, eiskaltes Methanol (60 %) verwendet [119].

Als Aufkonzentrierungstechniken wurden die Vakuumtrocknung und die Festphasenextraktion (SPE) getestet und in Bezug auf die Wiederfindungsrate der eingesetzten Substanzen verglichen. Bei der Vakuumtrocknung wird die flüssige Probe einem Vakuum ausgesetzt, wodurch der Siedepunkt der Substanzen reduziert und das Lösungsmittel verdampft wird. Es handelt sich dabei um eine produkt schonende Form

der Aufkonzentrierung. Die SPE führt zu einer materialabhängigen, selektiven Extraktion von Substanzen. Die Metabolite binden an das gewählte Adsorbensmaterial und können in einem geringen Volumen eluiert und dadurch aufkonzentriert werden [120]. Im Fall der SPE kann wie bei der SPME (siehe 6.1.2) das Adsorbensmaterial entsprechend der Polarität der Analyte ausgewählt werden.

6.2.3.1 Zellaufschluss und Quenchen des Metabolismus

Zum einen wurden die Zellen durch fünffaches Einfrieren-Auftauen aufgeschlossen (flüssiger Stickstoff / 37 °C Wasserbad, angelehnt an die Methode von Dowell *et al.*) [121], zum anderen durch mechanisches Öffnen unter Einsatz eines Glasschabers mit dem die Zellen vom Kolbenboden gekratzt wurden. Bei der optischen Überprüfung der Probe am Mikroskop zeigte sich, dass nach fünf Zyklen Einfrieren-Auftauen viele Zellen weiterhin intakt vorlagen. Im Gegensatz dazu waren nach dem mechanischen Aufschluss nahezu alle Zellen zerstört. Infolgedessen war diese Methode die effektivere und wurde in den Analysen am Zellkulturmodell verwendet.

6.2.3.2 Aufkonzentrierung der Probe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden LiChrolut EN, Oasis HLB und ZIC/HILIC auf ihre Eignung als SPE-Adsorbentien untersucht. Die Aufkonzentrierungsmethoden erfolgten anhand von je drei Replikaten einer Mischung aus fünf Standardsubstanzen (Asparaginsäure, Histidin, Glycin, Phenylalanin und Fumarsäure), die einen Bereich von sehr polar bis leicht unpolar abdeckten, entsprechend dem der zu erwartenden Metabolite. Die chemische Beschaffenheit bzw. das Einsatzspektrum der drei SPE-Materialien sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tab. 17: Chemische Beschaffenheit und Einsatzgebiet der eingesetzten Adsorptionsmittel.

Adsorptionsmittel	Polymerart	Art der extrahierten Metabolite	Art der einzusetzenden Lösung
LiChrolut EN	Ethylvinylbenzol/ Divinylbenzol	polar	polare Lösungen
Oasis HLB	m-Divinylbenzol und n-Vinylpyrrolidon	polar/ unpolar	polare Lösungen
ZIC/HILIC	zwitterionisch funktionelle Gruppe des Sulfobetaintyps	polar	organische Lösungsmittel

Um das Adsorptionsvermögen der einzelnen Materialien zu testen, wurde der Durchlauf des Adsorptionsschritts, des Waschschritts und der Elution aufgefangen und im negativen Ionisationsmodus am Finnigan LCQ™ Deca, unter Einsatz einer ZIC/HILIC-Säule (Sequant), vermessen. Diese Säule wird zur Adsorption polarer Substanzen verwendet. Vor der Messung wurde jeder Probe der Gerätestandard D-a-Phenylglycin (100 µM) zugesetzt, um Schwankungen detektieren zu können. Die Vakuumtrocknung erfolgte bei einer Temperaturen von -65 °C. Das verwendete Lösungsmittel war in diesem Fall weniger relevant, da sowohl Proben aus organischen als auch aus wässrigen Lösungen getrocknet werden können. Als Referenz kam die Standardmischung ohne vorherige Aufkonzentrierung in drei Replikaten, verteilt über die Untersuchungsreihe, zum Einsatz.

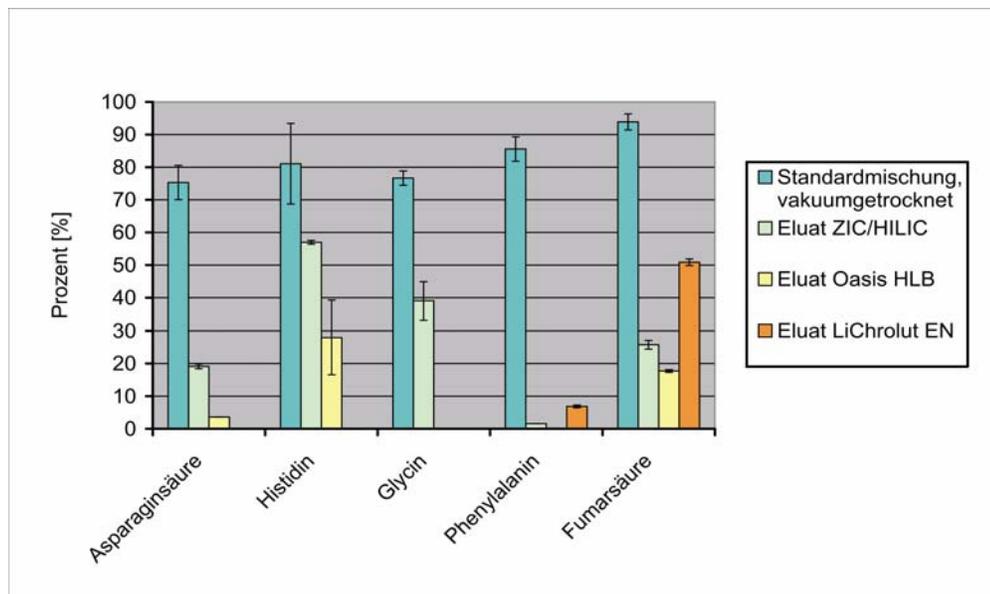


Abb. 16: Vergleich der Aufkonzentrierungsmethoden im negativen Ionisationsmodus mittels HPLC/MS. Die Prozentangaben wurden in Relation zu der nicht aufkonzentrierten Standardmischung (100%) berechnet.

Unter den zwei Aufkonzentrierungsmethoden zeigte die Vakuumtrocknung eindeutig das bessere Ergebnis (siehe Abb. 16). Alle fünf Standardsubstanzen wurden mit einer Wiederfindungsrate von mindestens 75 % (Asparaginsäure) detektiert; im Fall der Fumarsäure waren es sogar 95 % der zuvor vorhandenen Substanzmenge.

Die Aufkonzentrierung mit den SPE-Adsorbentien führte aufgrund ihrer Beschaffenheit zu unterschiedlich guten Ergebnissen, wobei das ZIC/HILIC-Material die besten Wiederfindungsraten aufwies. Hier konnten alle fünf Standardsubstanzen detektiert werden, allerdings nur mit Konzentrationen zwischen 1,6 % (Phenylalanin) und 57 % (Histidin) der ursprünglichen Menge. Ein direkter Zusammenhang der Polarität mit dem

Adsorptionsverhalten konnte nicht nachgewiesen werden. Die Asparaginsäure mit der stärksten Polarität der eingesetzten Substanzen zeigte die zweitschlechteste Wiederfindungsrate. Sie war lediglich in geringen Mengen im Adsorptionsschritt bzw. dem Waschschrift nachzuweisen. Die Asparaginsäure scheint eine so starke Bindung mit dem Material eingegangen zu sein, dass sie unter den gegebenen Bedingungen nicht eluierte und in der Kartusche zurückgehalten wurde. Auch die Fumarsäure zeigte nicht das angenommene Ergebnis. Sie hätte aufgrund ihres unpolaren Charakters nicht auf dem Säulenmaterial binden sollen, konnte aber dennoch im Elutionsschritt detektiert werden, wofür wahrscheinlich die Bindung der Carboxylgruppen an das Adsorbens verantwortlich war.

Die SPE mittels Oasis HLB führte lediglich zur Adsorption von Asparaginsäure (3,6 %), Histidin (27,9 %) und Fumarsäure (17,7 %). Obwohl dieses SPE-Material laut Hersteller dazu geeignet sein soll, sowohl polare als auch unpolare Substanzen zu adsorbieren, konnten Glycin und Phenylalanin nur im Adsorptions- bzw. dem Waschschrift nachgewiesen werden.

Das dritte getestete SPE-Material, LiChrolut EN, das bevorzugt polare Substanzen adsorbiert, zeigt im Vergleich das schlechteste Ergebnis. Bemerkenswerterweise wurden Phenylalanin und Fumarsäure mit der geringsten Polarität der getesteten Substanzen im Elutionsschritt nachgewiesen, wohingegen alle anderen Stoffe wiederum nur im Adsorptions- bzw. dem Waschschrift detektiert werden konnten. Dieses Material wies insgesamt die höchste Wiederfindungsrate für die Fumarsäure auf (50,8 %).

Die Vakuumtrocknung ist die bessere der zwei Aufkonzentrierungsmethoden in Bezug auf die Wiederfindungsrate der Substanzen. Allerdings muss angemerkt werden, dass auf diesem Wege keine Entsalzung der Probe stattgefunden hat, wie es im Fall der SPE möglich gewesen wäre.

6.2.3.3 Auswertung der mittels HPLC/MS generierten Daten

Nachdem die Voraussetzungen für die Analyse nichtflüchtiger Metabolite in Form von einer geeigneten Aufschluss- und Aufkonzentrierungsmethode gefunden wurden, musste eine geeignete Form der Auswertung entwickelt werden. Da die HPLC/MS-Daten aufgrund ihrer Menge nicht ausgewertet werden konnten, wurde eine Software basierte Lösung realisiert. Hierzu wurden die Datensätze von drei biologischen Replikaten der drei Zelllinien und des Blindwertes (Medium) eingesetzt. Das hochauflösende Massenspektrometer LTQ-FT bietet die Möglichkeit, verschiedene Scanevents durchzuführen. Neben den Full-Scans, die eine Massengenauigkeit von ≤ 20 ppm aufweisen, können SIM-Scans mit einer Massengenauigkeit von ≤ 1 ppm zur Identifizierung unbekannter Substanzen genutzt werden [122]. Zur Auswertung wurden zunächst die Full-Scans von den Daten der anderen Experimente (SIM-Scans) mit der Software Recalibrate Offline (FT Software) getrennt und weiterverwendet. Als nächster Schritt wurden die Daten mittels File converter (Xcalibur Software) vom raw-Format zum cdf-Format konvertiert, um sie in der frei zugänglichen Software MZmine [123] einsetzen zu können. Diese Software ermöglicht die Peakdetektion und ein Alignment von Datensätzen. Zur Ermittlung der optimalen Parameter für die zu untersuchenden Proben wurden drei unterschiedliche Parametersätze miteinander verglichen. Diese sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tab. 18: Parametersätze MZmine.

Version MZmine 0.60			
Parameter	Set 1.1	Set 1.2	Set 1.3
Filtering I: Cropping filter			
Minimum m/z value	60		
Maximum m/z value	1000		
Minimum RT value [s]	50		
Maximum RT value [s]	5200		
Filtering II: Chromatographic median filter			
Tolerance in m/z tolerance	0,001		
one-sided scan window length	1		
Peak picking: Recursive threshold peak detector			
m/z bin size [Da]	0,050		
Chromatographic threshold level [%]	10	95	
Noise level (absolut value)	10		
Minimum Peak height (absolut value)	100	1000	10000
Minimum peak duration [s]	5		
Minimum m/z peak width [Da]	0,001		
Maximum m/z peak width [Da]	0,006		
Tolerance in m/z variation [Da]	0,001		
Tolerance for intensity variation [%]	50		
Alignment: peak-pare aligner (slow)			
Balance between m/z and RT	50		
m/z tolerance size	0,001		
RT tolerance size (absolute)	60		

Um zu überprüfen, ob es sich bei den Peaks um tatsächliche oder Hintergrundsignale handelte, wurden 30 manuell überprüft, jeweils zehn aus dem vorderen, mittleren und hinteren Retentionszeitbereich. Über die Anpassung der Softwareparameter konnte eine Optimierung erreicht werden, wie in Abb. 17 bzw. Tab. 19 gezeigt wird.

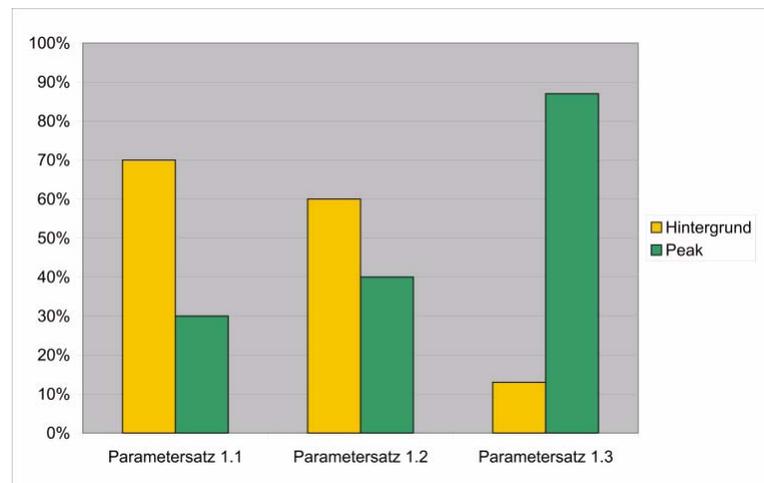


Abb. 17: Vergleich der Parametersätze zur Auswertung der Daten mit Hilfe der Software MZmine. Die Prozentangaben resultieren aus der manuellen Überprüfung von 30 Peaks (vorderer, mittlerer, hinterer Retentionsbereich), die als Peak oder Hintergrund eingestuft wurden.

Tab. 19: Gegenüberstellung der gesetzten Parameter mit der Anzahl detektierter Peaks.

Parametersatz	Detektierte Peaks
1.1	6963
1.2	2476
1.3	511

Während der Ansatz 1.1 zu 6963 detektierten Signalen mit 70 % Hintergrund führte, war es bei 1.2 bereits nur 60 % der 2476 Peaks. Der Parametersatz 1.3 zeigte das gewünschte Ergebnis: Von den 511 Peaks mussten nur noch 13 % eindeutig dem Hintergrund zugeordnet werden. Um möglichst wenige tatsächliche Signale bei den Analysen zu verlieren, wurden die 13 % Hintergrundsignale akzeptiert und keine engeren Vorgaben gewählt.

Nach der Ermittlung der optimalen Parameter erfolgte ein Alignment der jeweils drei biologischen Replikate der vier Proben, in denen lediglich die Peaks ausgegeben werden sollten, die in mindestens zwei der drei Proben auftraten. Die vier Datensätze wurden über eine Funktion der Software R (S. Bader, ISAS Dortmund) verglichen. Die daraus generierten Peaklisten, die Unterschiede zwischen dem Medium und den Zellen zeigten, wurden anschließend manuell überprüft.

Um die Signale der Addukte von denen der tatsächlichen Substanzen zu unterscheiden und zu eliminieren, wurde im positiven Ionisationsmodus auf Natriumformiat,

Ammonium, Natrium und Kalium, im negativen Modus auf Natriumformiat, Formiat und Chlorid überprüft. Außerdem wurden doppelt geladene Molekülonen und Isotopenpeaks aussortiert. Zur Überprüfung derselben Identität der Signale in den Zell- bzw. Mediummessungen kamen die SIM-Scans, die die exakte Masse zeigen, zum Einsatz. Da nur an den zwei intensivsten Peaks des Full-Scans SIM-Scans durchgeführt wurden, konnte bei einigen Signalen nicht auf die exakte Masse zurückgegriffen werden. In diesem Fall wurde das charakteristische Isotopenverhältnis genutzt.

Unter Zuhilfenahme verschiedener Softwareprodukte konnte die Auswertung der mit HPLC/MS generierten Daten realisiert werden, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Chromatogramme der nichtflüchtigen Metabolite der Zelllinien aufdecken zu können.

6.3 Beispielhafte Anwendung der entwickelten Methoden an zwei Darmkrebszelllinien und einer normal epithelialen Darmzelllinie

Nachdem Methoden der Probenahme und Detektion zur Analyse flüchtiger, schwer- und nichtflüchtiger Metabolite entwickelt wurden, sollen diese beispielhaft an zwei Darmkrebszelllinien SW-1116 und SW-480 und einer normal epithelialen Darmzelllinie NCM460 angewendet werden.

Um den natürlichen Metabolismus nicht zu verändern, wurde antibiotikafrei kultiviert. Die Ergebnisse der serumreduzierten oder serumfreien Kultivierung lagen zu Beginn der Experimente noch nicht vor. Da aber auch zu diesem Zeitpunkt bekannt war, dass Serum von Charge zu Charge Unterschiede in der Zusammensetzung aufweist und somit quantitative Unterschiede der Metabolitkonzentration angenommen werden müssen, wurden lediglich qualitative Unterschiede (Peak vorhanden / nicht vorhanden) in die Auswertung einbezogen. Von einer Substanz ist dann angenommen worden, dass sie von den Zellen produziert wurde, wenn sie in keiner der Mediumproben aber in den Zellchromatogrammen auftrat. Von einer metabolisierten Substanz ist dann ausgegangen worden, wenn sie zwar im Medium detektiert wurde, aber lediglich in der Hälfte (oder weniger) der Zellproben nachzuweisen war. Von diesen Annahmen konnte ausgegangen werden, da das Medium unter exakt den gleichen Bedingungen zur selben Zeit im Brutschrank kultiviert und auf demselben Wege aufgearbeitet wurde.

6.3.1 Analyse flüchtiger Metabolite mittels GC/MS

Die Analyse der flüchtigen Metabolite von jeweils sechs biologischen Replikaten erfolgte direkt aufeinanderfolgend mit dem GC/MS-System und dem IMS-System. Parallel zu den Proben wurden Blindwerte (DMEM/F12 mit 10 % FCS) in entsprechender Menge unter gleichen Bedingungen mitgeführt. Bei den Analysen fand die neu entwickelte direkte Probenahme (siehe 6.2.1.1) Anwendung, so dass die Gasphase direkt aus dem Zellkulturgefäß entnommen wurde.

Durch die Ergebnisse der Generationszeitbestimmung (siehe 6.1.1) wurden die verwendeten Zellen mit unterschiedlichen Einsatzdichten im Glaskolben ausgesät, um eine gleich große Zellzahl zum Zeitpunkt der Messung zu gewährleisten (siehe 5.4.1). Zur Adsorption der polaren Metabolite kam eine mit Carbowax/Divinylbenzol (CW/DVB) beschichtete 65 µm-Faser und für die apolaren Metabolite eine mit 100 µm-Polydimethylsiloxan (PDMS) beschichtete Faser zum Einsatz. Die verwendeten Geräteparameter sind in der Tabelle 7 (Abschnitt 5.4) zusammengefasst.

6.3.1.1 Anreicherung der extrazellulären, flüchtigen Metabolite an einer CW/DVB-Faser

Die Auswertung der generierten GC/MS-Daten wurde zunächst manuell, im späteren Verlauf der vorliegenden Arbeit softwaregestützt (MeltDB, Uni Bielefeld) durchgeführt. Bei der manuellen Variante wurden sowohl die Chromatogramme der Zellen mit denen des Mediums als auch die der Zellen untereinander visuell auf Unterschiede untersucht.

6.3.1.1.1 Manuelle Auswertung der generierten Daten (CW/DVB-Faser)

Durch die manuelle Auswertung konnten vier Unterschiede in dem Chromatogrammen der drei Zelllinien ermittelt werden (siehe Abb. 18). Die Darmkrebszelllinie SW-1116 produzierte zwei spezifische Substanzen, 3-Methylbutan-1-ol und Heptan-1-ol (siehe Abb. 18 bzw. Tab. 20, grüne Zellen), die weder im Medium noch in den anderen beiden Zelllinien nachgewiesen wurden.

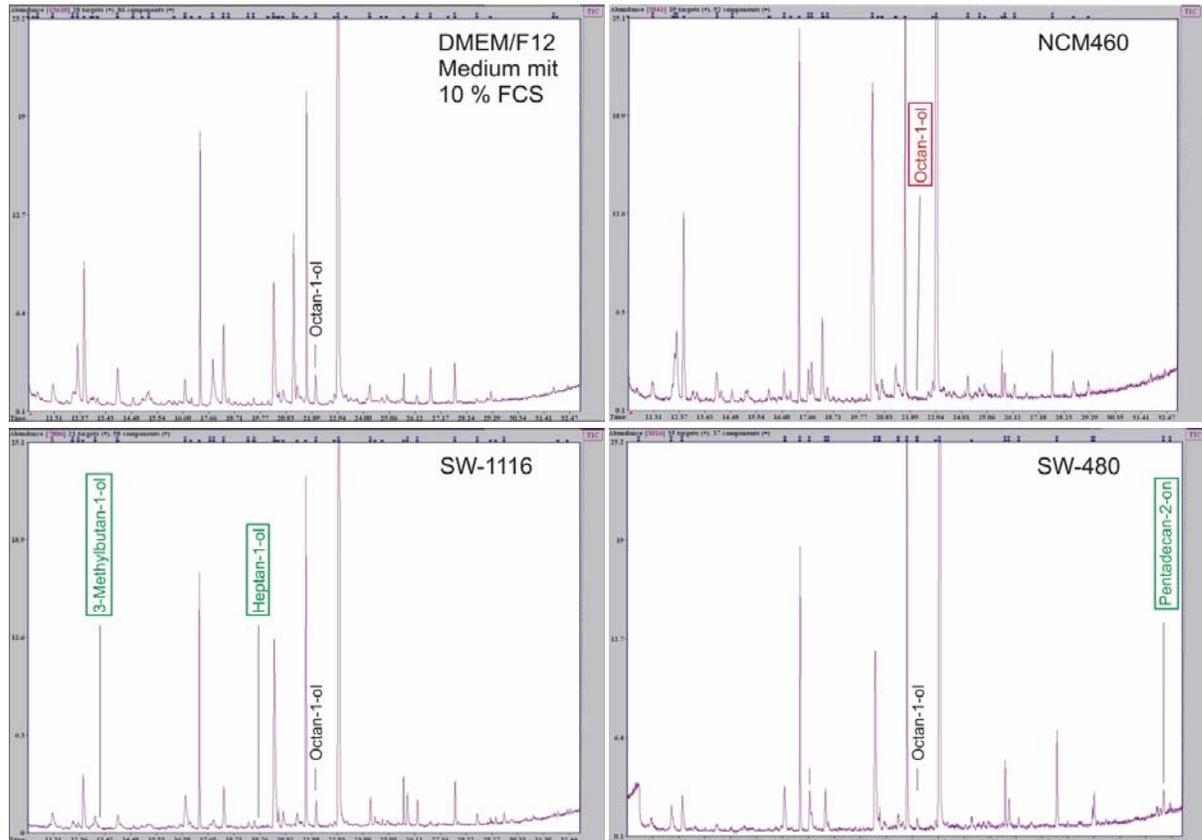


Abb. 18: Vergleich der TIC-Chromatogramme des Mediums und der Zelllinien. Aufgeführt sind die Substanzen, die die Unterschiede im Metabolismus der Zelllinien darstellen. Die Probenahme erfolgte mit einer CW/DVB-Faser.

schwarze Schrift: Substanzen im Medium bzw. einigen Zelllinien detektiert

rote Schrift: Substanz metabolisiert

grüne Schrift: Substanzen lediglich von einer der Zelllinien produziert

Tab. 20: Manuelle Auswertung der mittels GC/MS ermittelten Unterschiede im Bereich der metabolisierten und produzierten Substanzen der Zelllinien (CW/DVB-Faser). Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=6).

Substanzname	Retentionszeit [min]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
3-Methylbutan-1-ol	13,04 ± 0,03	-	-	6	-
Heptan-1-ol	19,46 ± 0,08	-	-	6	-
Octan-1-ol	22,03 ± 0,08	6	-	6	4
Pentadecan-2-on	32,15 ± 0,02	-	-	-	6

Bisher ist über 3-Methylbutan-1-ol bekannt, dass es u. a. von Hefen, Pseudomonaden (*P. putrefaciens*) und verschiedenen Pilzen wie z.B. *Paecilomyces variotii* gebildet werden kann bzw. beim Reifevorgang von Bananen entsteht [125 - 131]. Seine Bildung erfolgt durch Vergärung der Aminosäure Leucin. Menschliche Zellen sind aber zur Aminosäuregärung nicht fähig, so dass die Bildung von 3-Methylbutan-1-ol durch die Zelllinie SW-1116 hierdurch nicht erklärt werden kann. Allerdings konnte diese Substanz nicht nur bei der Darmkrebszelllinie SW-1116 nachgewiesen werden, sondern auch bei humanen Fibroblasten (hFB). Filipiak *et al.* konnte zeigen, dass hFB-Zellen im Gegensatz zu humanen Bronchialepithelzellen (HBEpC) und verschiedenen Lungenkrebszelllinien 3-Methylbutan-1-ol bilden können [132]. Die Ergebnisse dieser Studie stehen im Gegensatz zu den in dieser Arbeit generierten Daten, da in dem einen Fall ausschließlich gesunde Zellen, im anderen Fall ausschließlich Krebszellen diese Substanz produzieren konnten. Folglich ist die Bildung von 3-Methylbutan-1-ol anscheinend nicht auf das Krankheitsbild Krebs zurückzuführen.

Über den zweiten von der Krebszelllinie SW-1116 gebildeten Metabolit, Heptan-1-ol, ist bisher lediglich bekannt, dass er von Hefen und Bakterien (*Methylococcus capsulatus*) produziert werden kann [125, 126]. Diese Substanz ist zum ersten Mal im menschlichen Metabolismus nachgewiesen worden.

Octan-1-ol stellt die Substanz dar, durch die die Zelllinie NCM460 von den anderen unterschieden werden kann. Sie ist als ein Substrat bekannt, das sowohl von Bakterien wie *Comamonas terrigena* [133] als auch von menschlichen Zellen genutzt wird. Es konnte allerdings bisher ausschließlich in der Leber und im Hoden nachgewiesen werden [134, 135], während über eine Metabolisierung im Darm keine Informationen vorliegen. In dieser Arbeit aber konnte eine Verstoffwechslung von Octan-1-ol durch die normal epitheliale Darmzelllinie NCM460 nachgewiesen werden, da sie in den Mediumproben und in den Krebszelllinien aber in keiner der NCM460-Proben aufgezeichnet werden konnten (siehe Abb. 18 bzw. Tab. 20, rote Zelle).

Pentadecan-2-on, das bei der Zelllinie SW-480 in den Messungen auffällig wurde, zeigt laut Literatur einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Bakteriums *Clostridium butyricum* [127] und der HeLa-Zellen [128], wenn es als Kulturmediumadditiv zugesetzt wird. In dieser Arbeit aber wurde Pentadecan-2-on von den SW-480-Zellen produziert, es war nur in deren Chromatogrammen nachzuweisen (siehe Abb. 18 bzw. Tab. 20, grüne Zelle).

Zusammengefasst konnten insgesamt vier Unterschiede sowohl im Metabolismus der Krebszelllinien und der normal epithelialen Darmzelllinie als auch zwischen den beiden Krebszelllinien unterschiedlichen Stadiums aufgedeckt werden. Die Substanz Octan-1-ol, die lediglich von der normal epithelialen Darmzelllinie metabolisiert wurde, zeigt den Unterschied zum Metabolismus der beiden Krebszelltypen. Die jeweils spezifisch gebildeten Substanzen der Darmkrebszelllinien führen zu einer eindeutigen Abgrenzung der jeweiligen Zelllinie.

Neben den Unterschieden konnten auch Gemeinsamkeiten des Metabolismus aller Zelllinien aufgezeigt werden, und zwar durch die drei metabolisierten Substanzen Benzaldehyd, Decan-1-ol, Dodecansäuremethylester sowie durch die zwei produzierten Substanzen Nonan-2-on und Undecan-2-ol (siehe Tab. 21 bzw. Abb. 19).

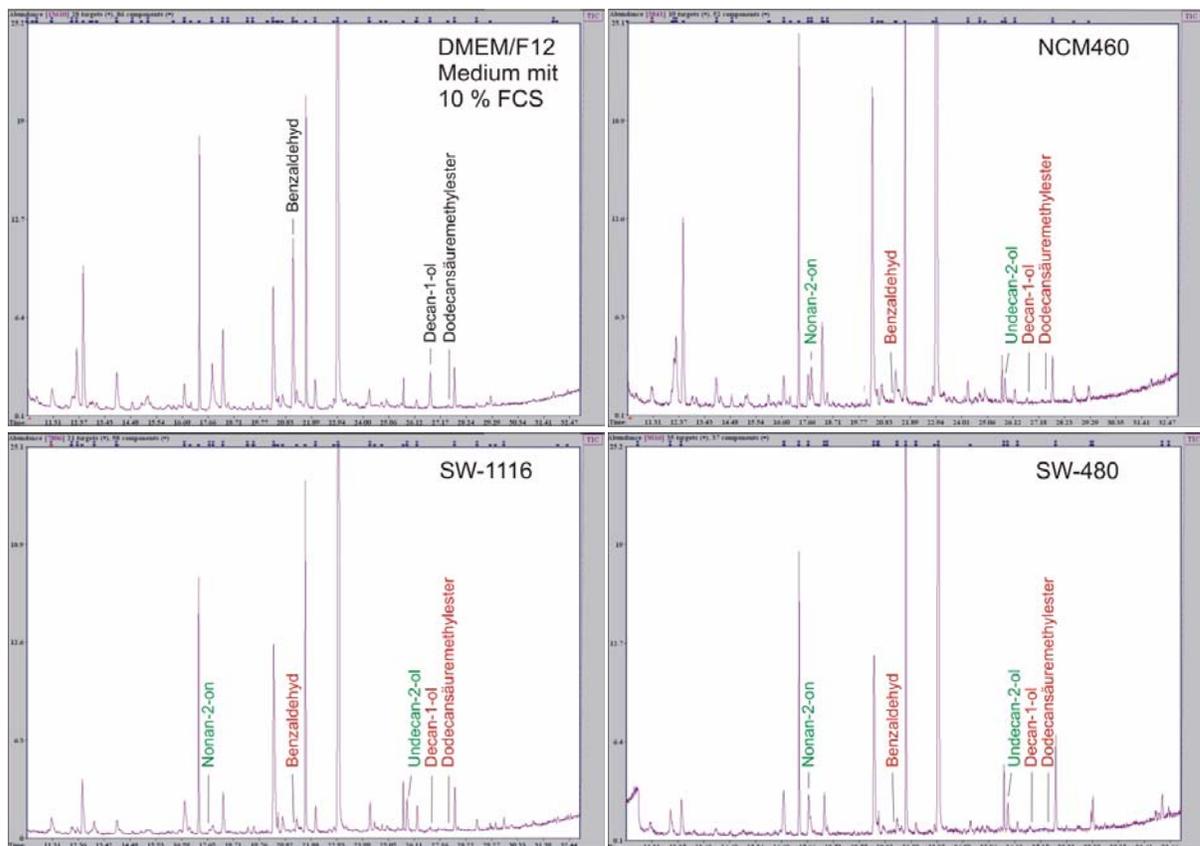


Abb. 19: Vergleich der TIC-Chromatogramme des Mediums und der Zelllinien. Aufgeführt sind die Substanzen, die die Gemeinsamkeiten im Metabolismus der Zelllinien darstellen. Die Probenahme erfolgte mit einer CW/DVB-Faser.

schwarze Schrift: Substanzen im Medium detektiert
rote Schrift: Substanz von allen Zellen metabolisiert
grüne Schrift: Substanzen von allen Zelllinien produziert

Tab. 21: Manuelle Auswertung der mittels GC/MS detektierten Gemeinsamkeiten im Bereich der metabolisierten und produzierten Substanzen der Zelllinien (CW/DVB-Faser). Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=6).

Substanzname	Retentionszeit [min]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
Nonan-2-on	17,67 ± 0,07	-	6	6	6
Benzaldehyd	21,13 ± 0,07	6	6 (Spuren)	6 (Spuren)	4 (Spuren)
Undecan-2-ol	25,77 ± 0,08	-	6	6	6
Decan-1-ol	26,77 ± 0,04	6	-	2 (Spuren)	-
Dodecansäure-methylester	27,51 ± 0,05	6	-	-	-

Benzaldehyd ist ein im Menschen bereits bekanntes Substrat, das in der Leber umgesetzt wird [136, 137]. Über die Verstoffwechslung von Benzaldehyd im Darm ist bisher in der Literatur kein Hinweis zu finden. Allerdings wurde diese Substanz sowohl im Serum als auch im Urin von Menschen nachgewiesen [138, 139]. Dies erklärt den Nachweis von Benzaldehyd in den Mediumproben, obwohl es kein Bestandteil des kommerziell hergestellten Mediums ist. Es handelt sich anscheinend um ein Bestandteil des Käberserums, das dem Medium zugesetzt wird.

In der Studie von Acevedo *et al.* [98] konnte gezeigt werden, dass das zuvor im Medium der Zellkulturflaschen mittels GC/MS detektierte Benzaldehyd in den Proben von Monolayer Hautzellen nicht mehr nachweisbar war und davon ausgegangen werden kann, dass diese Substanz metabolisiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde Benzaldehyd ebenfalls den metabolisierten Substanzen zugeordnet, obwohl es in nahezu allen Zellproben in geringen Konzentrationen aufgezeichnet werden konnte. Da es sich aber im Medium um einen der intensivsten Peaks handelte, musste von einer Verstoffwechslung dieser Substanz ausgegangen werden. Dies zeigt, dass die Metabolisierung von Benzaldehyd nicht zelltypspezifisch ist.

Im Gegensatz zu Benzaldehyd wurden die Substanzen Decan-1-ol und Dodecansäuremethylester bisher nicht mit dem menschlichen Metabolismus in Zusammenhang gebracht. Jedoch zeigte die in dieser Arbeit verwendete Leberkrebszelllinie Hep G2 auch Auffälligkeiten bezüglich dieser Substanz (siehe 6.1.2). Es handelte sich dabei um ein im RPMI 1640-Medium nachgewiesener Analyt, der nur von Hep G2-Zellen unter Antibiotikazugabe metabolisiert wurde. Somit scheint diese Substanz von unterschiedlichen Zellspezies (Leber, Darm) unter verschiedenen Bedingungen

verstoffwechselt zu werden (Leberkrebszellen in Anwesenheit von Antibiotika; Darmzellen bzw. Darmkrebszellen in Abwesenheit von Antibiotika).

Zu den Gemeinsamkeiten der drei Zelllinien zählen zwei produzierte Stoffe, Nonan-2-on und Undecan-2-ol. Beide Substanzen sind als flüchtige Metabolite von Honig bekannt [140] und wurden analog zu Decan-1-ol und Dodecansäuremethylester das erste Mal im menschlichen Stoffwechsel nachgewiesen.

6.3.1.1.2 Softwaregestützte Auswertung der generierten Daten (CW/DVB-Faser)

Zur Ermittlung der optimalen Parameter der Peakdetektion der Software wurden beispielhaft die Chromatogramme der Zelllinie SW-1116 unter Einsatz verschiedener Signal/Rausch-Verhältnisse (S/N: 10:1, 5:1, 3:1) ausgewertet und die Ergebnisse mit denen der manuellen Auswertung abgeglichen. In Tab. 22 wurden die zwei Parametersätze S/N 5:1 und S/N 3:1 gegenübergestellt.

Tab. 22: Gegenüberstellung unterschiedlicher Signal/Rausch-Verhältnisse (S/N 5 gegen S/N 3) der Chromatogramme der Zelllinie SW-1116 unter Einsatz der CW/DVB-Faser. Die Punktgröße repräsentiert die relative Peakintensität.

Chromatogramm	13:05	19:30	21:08	22:09	25:47	[min]
SW-1116 CW/DVB 1 (S/N 5)						
SW-1116 CW/DVB 2 (S/N 5)						
SW-1116 CW/DVB 3 (S/N 5)	•	•			•	
SW-1116 CW/DVB 4 (S/N 5)	•	•			•	
SW-1116 CW/DVB 5 (S/N 5)	•	•		•	•	
SW-1116 CW/DVB 6 (S/N 5)	•	•		•	•	

Chromatogramm	13:01	17:41	19:30	21:15	22:09	25:48	[min]
SW-1116 CW/DVB 1 (S/N 3)	•						
SW-1116 CW/DVB 2 (S/N 3)	•						
SW-1116 CW/DVB 3 (S/N 3)	•	•	•			•	
SW-1116 CW/DVB 4 (S/N 3)	•	•	•			•	
SW-1116 CW/DVB 5 (S/N 3)	•		•	•	•	•	
SW-1116 CW/DVB 6 (S/N 5)	•		•	•	•	•	

Während ein Verhältnis von 5:1 zum Nachweis von vier der sieben möglichen Substanzen führte, wurden durch ein Verhältnis von 3:1 sechs Analyte nachgewiesen. Allein Decan-1-ol, das nach manueller Auswertung in zwei der SW-1116-Chromatogramme in Spuren vorkommen sollte, konnte mit diesen Parametern nicht detektiert werden (siehe Tab. 21). Folglich wurde ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 nachfolgend auf alle Chromatogramme eingesetzt (siehe Tab. 23).

Tab. 23: Softwaregestützte Auswertung der mittels GC/MS detektierten Unterschiede im Bereich der metabolisierten und produzierten Substanzen der Zelllinien unter Einsatz der CW/DVB-Faser. Die Punktgröße repräsentiert die relative Peakintensität.

Chromatogramm	3-Methylbutan-1-ol Heptan-1-ol Octan-1-ol Pentadecan-2-on				[min]
	13:01	19:30	22:09	32:11	
Blindwert CW/DVB 1 (S/N 3)			•		
Blindwert CW/DVB 2 (S/N 3)			●		
Blindwert CW/DVB 3 (S/N 3)			•		
Blindwert CW/DVB 4 (S/N 3)			●		
Blindwert CW/DVB 5 (S/N 3)			•		
Blindwert CW/DVB 6 (S/N 3)			●		
NCM460 CW/DVB 1 (S/N 3)					
NCM460 CW/DVB 2 (S/N 3)					
NCM460 CW/DVB 3 (S/N 3)					
NCM460 CW/DVB 4 (S/N 3)					
NCM460 CW/DVB 5 (S/N 3)					
NCM460 CW/DVB 6 (S/N 3)					
SW1116 CW/DVB 1 (S/N 3)	•				
SW1116 CW/DVB 2 (S/N 3)	•				
SW1116 CW/DVB 3 (S/N 3)	•	•			
SW1116 CW/DVB 4 (S/N 3)	●	•			
SW1116 CW/DVB 5 (S/N 3)	●	●	•		
SW1116 CW/DVB 6 (S/N 3)	●	•	•		
SW480 CW/DVB 1 (S/N 3)			•	•	
SW480 CW/DVB 2 (S/N 3)			•	●	
SW480 CW/DVB 3 (S/N 3)				•	
SW480 CW/DVB 4 (S/N 3)				●	
SW480 CW/DVB 5 (S/N 3)				•	
SW480 CW/DVB 6 (S/N 3)				•	

Die softwaregestützte führt zu einer ähnlichen Aussage wie die manuelle Auswertung (siehe Tab. 24).

Tab. 24: Gegenüberstellung der Ergebnisse der softwarebasierten und manuellen Auswertemethode. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=6). Die Ergebnisse der manuellen Methode stehen in Klammern.

Substanzname	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
3-Methylbutan-1-ol	- (-)	- (-)	6 (6)	- (-)
Heptan-1-ol	- (-)	- (-)	4 (6)	- (-)
Octan-1-ol	6 (6)	- (-)	2 (6)	2 (4)
Pentadecan-2-on	- (-)	- (-)	- (-)	6 (6)

Während die Ergebnisse beider Methoden für 3-Methylbutan-1-ol und Pentadecan-2-on exakt identisch ausfielen, führte die Auswertung mit MeltDB für Heptan-1-ol lediglich zu vier anstatt sechs (SW-1116), für Octan-1-ol zu zwei anstatt vier (SW-480) und zwei anstatt sechs (SW-1116) möglichen Nachweisen (siehe Tab. 23/24). Da bei der Peakdetektion mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 gearbeitet wurde, müssen die fehlenden Signale nahe dem Rauschen der Chromatogramme gelegen haben.

Nach der manuellen Methode wird Octan-1-ol lediglich von NCM460, nach MeltDB von allen drei Zelllinien metabolisiert. Somit stimmen die Ergebnisse nicht überein. Die Auswertung der anderen drei Substanzen führt bei beiden Methoden zur selben Aussage, auch wenn Heptan-1-ol lediglich viermal (MeltDB) anstatt sechsmal (manuell) in den Chromatogrammen von SW-1116 erscheint.

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) zeigt sehr deutlich (siehe Abb. 20), wie die Zellen durch vier Substanzen voneinander separiert werden können: Durch Pentadecan-2-on kann die Darmkrebszelllinie SW-480 sowohl von den gesunden Darmzellen als auch von den anderen Darmkrebszellen unterschieden werden. Die Abgrenzung von SW-1116 gegenüber den anderen Zelllinien (SW-480, NCM460) erfolgt durch 3-Methylbutan-1-ol und Heptan-1-ol. Octan-1-ol dient der Separierung der gesunden Darmzellen von den beiden Krebszellarten. Demnach können über diese vier Substanzen zum einen die Krebsstadien und zum anderen die Krebszellen von gesunden Zellen unterschieden werden.

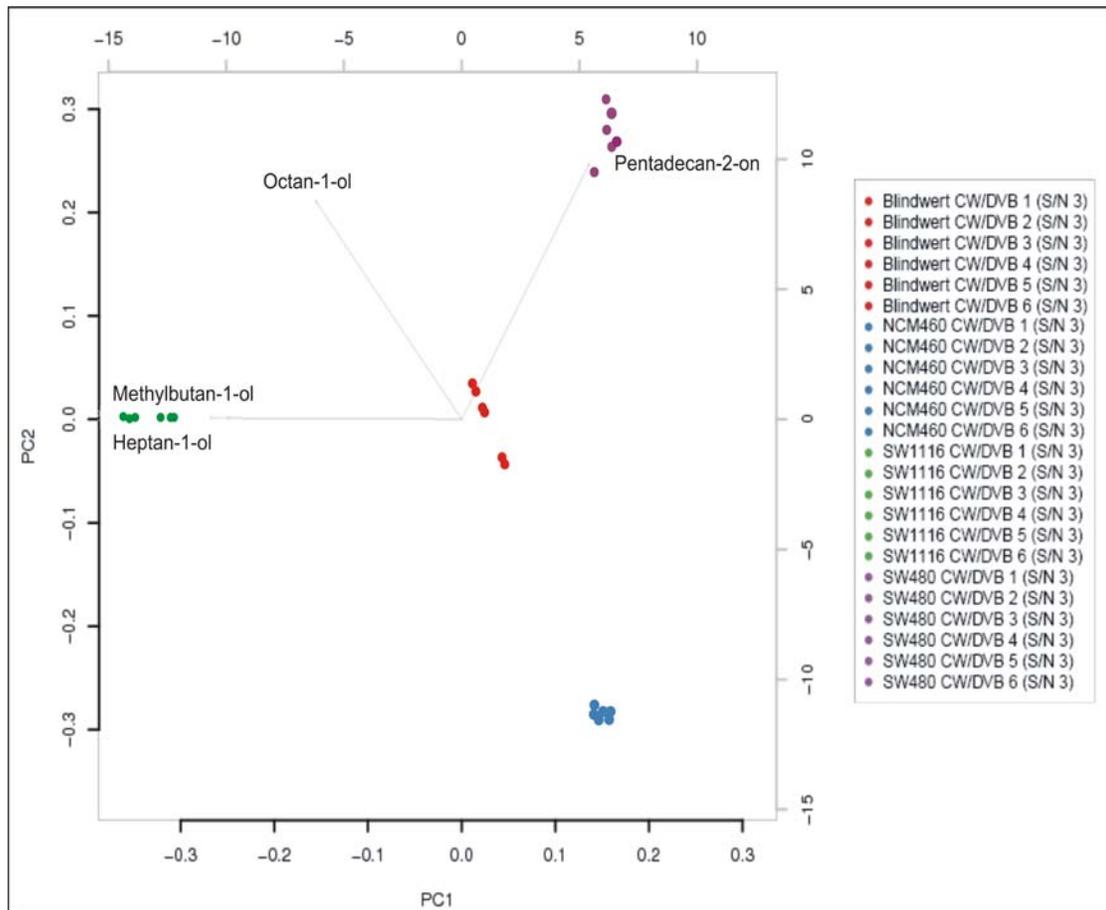


Abb. 20: Hauptkomponentenanalyse der Unterschiede im Metabolismus der Zelllinien, die mit einer CW/DVB-Faser und GC/MS als Detektionsmethode ermittelt wurden.

Die Clusteranalyse (siehe Abb. 21) veranschaulicht die große Ähnlichkeit der jeweiligen Datensätze innerhalb einer Gruppe (Medium, Zelllinien), wodurch die Proben eindeutig voneinander separiert werden können. Obwohl zu erwarten gewesen wäre, dass die zwei Krebszelllinien in Hinblick auf den Stoffwechsel die geringste Varianz aufweisen, zeigten SW-480 mit der normal epithelialen Darmzellen NCM460 mehr Gemeinsamkeiten im Metabolismus.

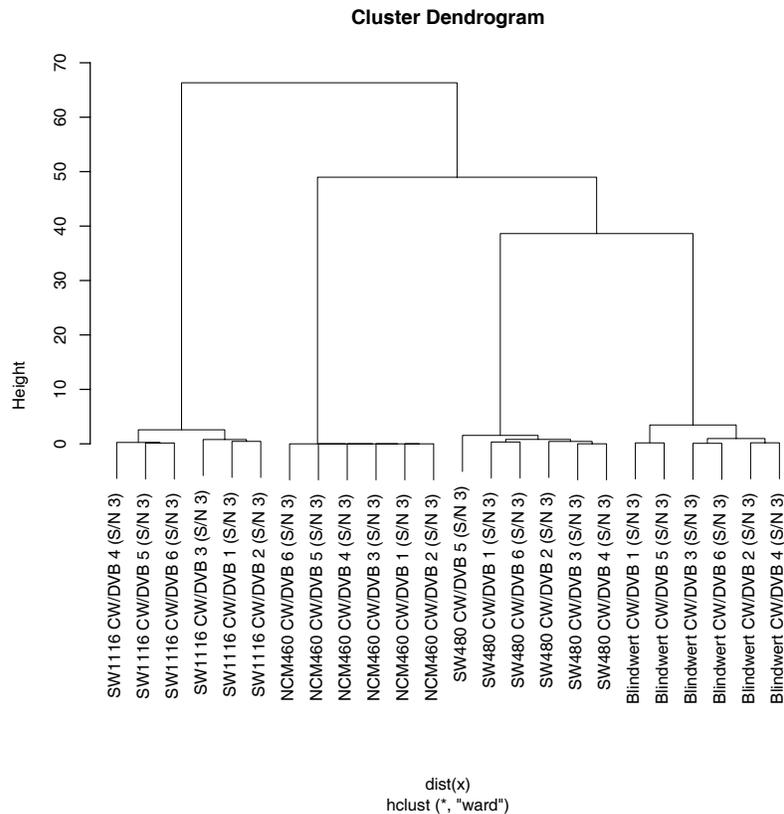


Abb. 21: Clusteranalyse der Unterschiede im Metabolismus der Zelllinien, die mit einer CW/DVB-Faser und GC/MS als Detektionsmethode ermittelt wurden.

Analog zu der manuellen wurden mit der softwarebasierten Auswertung die Datensätze ebenfalls auf Gemeinsamkeiten der Chromatogramme untersucht. Obwohl einige Signale durch die softwarebasierte Auswertung nicht nachgewiesen werden konnten, führen beide Methoden zu derselben Aussage in Bezug auf die Bildung und Metabolisierung der Substanzen (siehe Tab. 25 und 26).

Tab. 25: Softwaregestützte Auswertung der mit Hilfe von GC/MS detektierten Gemeinsamkeiten im Bereich der metabolisierten und produzierten Substanzen der Zelllinien unter Einsatz der CW/DVB-Faser. Die Punktgröße repräsentiert die relative Peakintensität. Ein roter Punkt steht für eine in der KEGG-Datenbank bekannte Substanz.

Chromatogramm	Nonan-2-on	Benzaldehyd	Undecan-2-ol	Decan-1-ol	Dodecansäuremethylester
	17:41	21:15	25:48	26:51	27:35 [min]
Blindwert CW/DVB 1 (S/N 3)		•		•	•
Blindwert CW/DVB 2 (S/N 3)		•		•	•
Blindwert CW/DVB 3 (S/N 3)		•		•	•
Blindwert CW/DVB 4 (S/N 3)		•		•	•
Blindwert CW/DVB 5 (S/N 3)		•		•	
Blindwert CW/DVB 6 (S/N 3)		•		•	
NCM460 CW/DVB 1 (S/N 3)	•		•		
NCM460 CW/DVB 2 (S/N 3)	•		•		
NCM460 CW/DVB 3 (S/N 3)	•		•		
NCM460 CW/DVB 4 (S/N 3)	•		•		
NCM460 CW/DVB 5 (S/N 3)	•		•		
NCM460 CW/DVB 6 (S/N 3)	•		•		
SW1116 CW/DVB 1 (S/N 3)					
SW1116 CW/DVB 2 (S/N 3)					
SW1116 CW/DVB 3 (S/N 3)	•		•		
SW1116 CW/DVB 4 (S/N 3)	•		•		
SW1116 CW/DVB 5 (S/N 3)		•	•		
SW1116 CW/DVB 6 (S/N 3)		•	•		
SW480 CW/DVB 1 (S/N 3)	•		•		
SW480 CW/DVB 2 (S/N 3)	•		•		
SW480 CW/DVB 3 (S/N 3)	•		•		
SW480 CW/DVB 4 (S/N 3)	•		•		
SW480 CW/DVB 5 (S/N 3)	•		•		
SW480 CW/DVB 6 (S/N 3)	•		•		

Tab. 26: Gegenüberstellung der Ergebnisse der softwarebasierten und manuellen Auswertemethode der Gemeinsamkeiten der Zellen. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=6). Ergebnisse der manuellen Methode stehen in Klammern.

Substanzname	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
Nonan-2-on	- (-)	6 (6)	2 (6)	6 (6)
Benzaldehyd	6 (6)	- (6 Spuren)	2 (6 Spuren)	- (4 Spuren)
Undecan-2-ol	- (-)	6 (6)	4 (6)	6 (6)
Decan-1-ol	6 (6)	- (-)	- (2 Spuren)	- (-)
Dodecansäuremethylester	4 (6)	- (-)	- (-)	- (-)

Trotz der nachgewiesenen Gemeinsamkeiten der drei Zelllinien lässt die Hauptkomponentenanalyse in Abb. 22 erkennen, dass zwar alle Proben deutliche Unterschiede zum Blindwert aufweisen, sich aber dennoch die Zelllinie SW-1116 von den anderen beiden differenziert. Dies ist zum einen auf den selteneren Nachweis von Nonan-2-on zurückzuführen und zum anderen auf die Substanz Benzaldehyd, die noch in zwei der sechs Proben nachzuweisen war (siehe Tab. 26, 25).

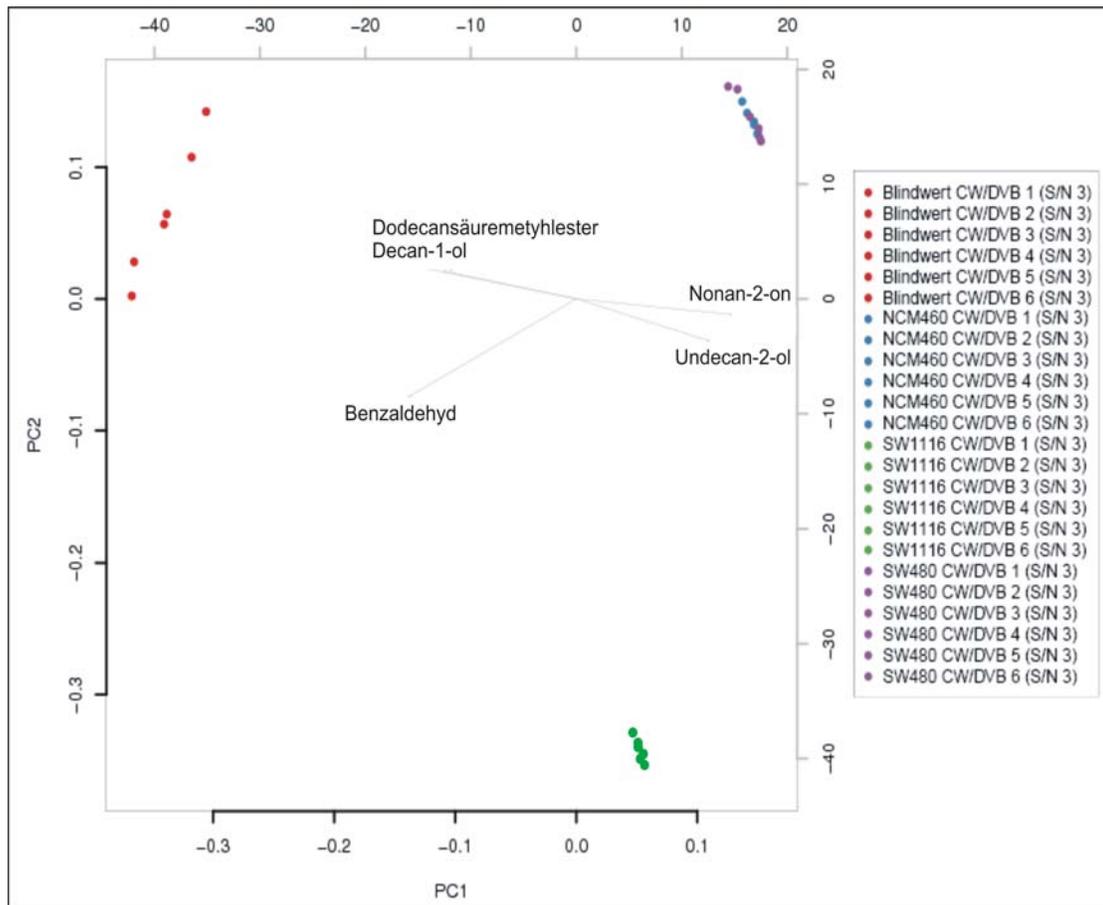


Abb. 22: Hauptkomponentenanalyse der Gemeinsamkeiten im Metabolismus der Zelllinien, die mit GC/MS als Detektionsmethode ermittelt wurden.

Die Clusteranalyse (Abb. 23) verdeutlicht ebenfalls diesen Zusammenhang. Während die sechs Proben der Zelllinie SW-1116 untereinander größte Ähnlichkeit aufweisen und sich von den anderen separieren, können die Datensätze der anderen Zellproben nicht voneinander unterschieden werden.

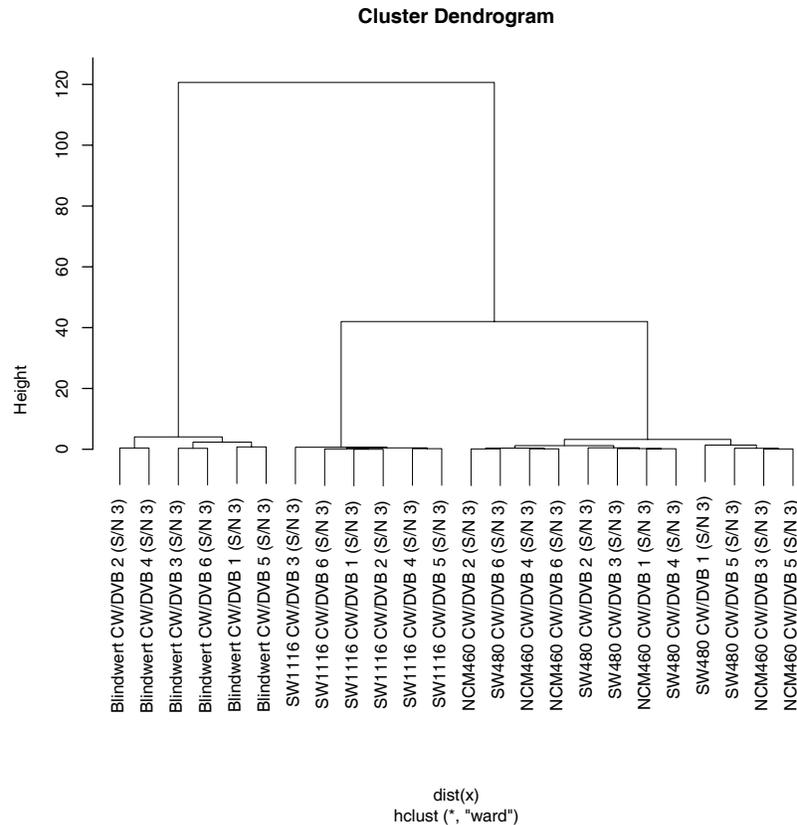


Abb. 23: Clusteranalyse der Gemeinsamkeiten im Metabolismus der Zelllinien, die mit der Detektionsmethode GC/MS ermittelt wurden.

Obwohl SW-480 als Broders Grad 4 eingestuft und laut Klassifizierung im Vergleich zu gesundem Gewebe stark entartet ist, besitzt diese Zelllinie mehr gemeinsame Stoffwechselmerkmale mit den gesunden Darmzellen von NCM460. Außerdem ist auffällig, dass die SW-1116-Zellen (Broders Grad 2) stärkere Veränderungen in ihrem Metabolismus als die anderen Zelllinien aufweisen. Der Grad der Entartung der Krebszelllinien scheint nicht im direkten Zusammenhang mit dem Grad der Veränderung des Stoffwechsels der flüchtigen Metabolite zu stehen.

6.3.1.2 Anreicherung der extrazellulären, flüchtigen Metabolite an einer PDMS-Faser

Zur Erfassung der unpolaren Metabolite wurden die flüchtigen Stoffwechselprodukte der drei Zelllinien mit einer PDMS beschichtete Faser untersucht.

6.3.1.2.1 Manuelle Auswertung der generierten Daten (PDMS-Faser)

Obwohl die Chromatogramme der Zellen auch auf unterschiedlich auftretende Peaks geprüft wurden, konnten unter den vorliegenden Bedingungen lediglich zwei Substanzen gefunden werden, die von allen drei Zelllinien gemeinsam metabolisiert wurden. Dabei handelt es sich um Dodecanal und 5-Methyl-2-phenyl-hex-2-enal aus der Gruppe der Aldehyde. Trotz der leichten Polarität dieser Stoffe, adsorbierten sie dennoch an der PDMS-Faser, die eigentlich vornehmlich für unpolare Analyte geeignet ist. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 24 bzw. Tabelle 27 dargestellt.

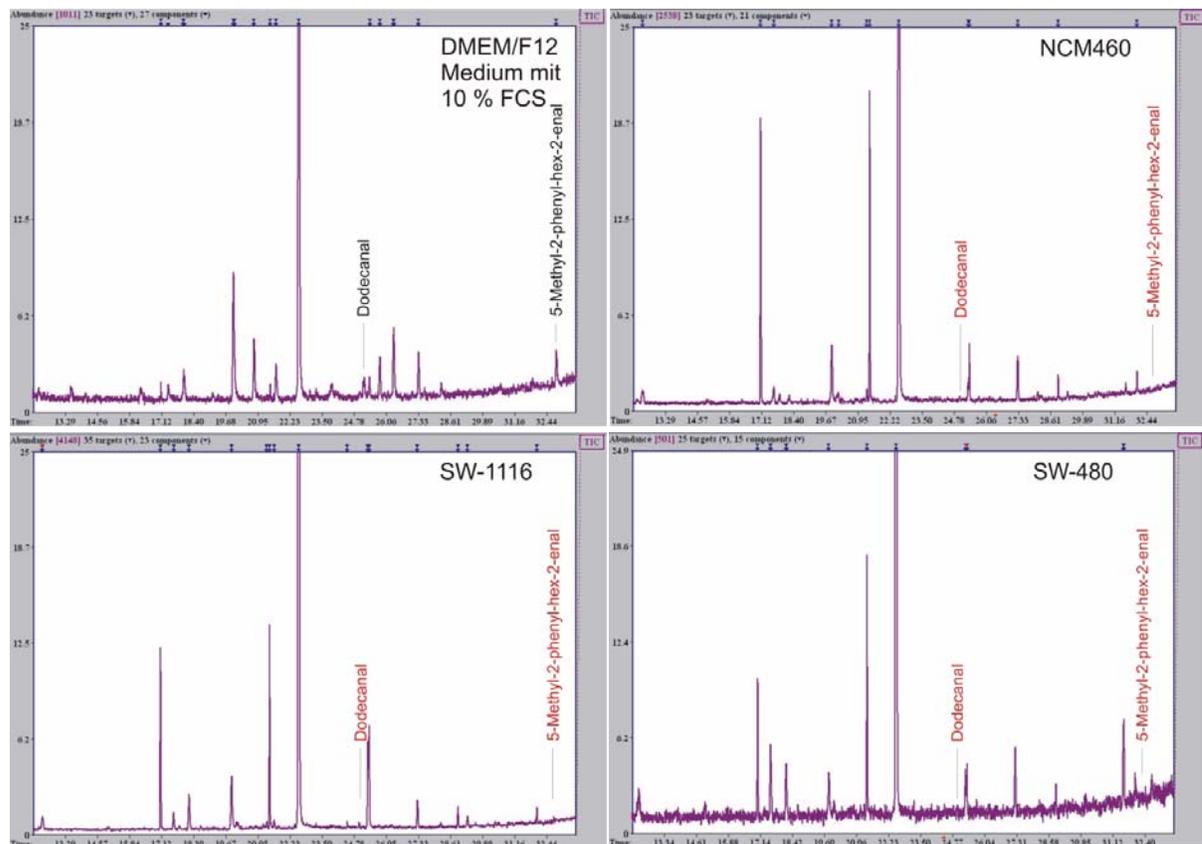


Abb. 24: Vergleich der TIC-Chromatogramme des Mediums und der Zelllinien. Aufgeführt sind die Substanzen, die die Gemeinsamkeiten im Metabolismus der Zelllinien darstellen. Die Probenahme erfolgte mit einer PDMS-Faser.

schwarze Schrift: Substanzen im Medium detektiert
rote Schrift: Substanzen von den Zellen metabolisiert

Tab. 27: Mit GC/MS detektierte Gemeinsamkeiten im Bereich der metabolisierten Substanzen der Zelllinien (PDMS-Faser). Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=6).

Substanzname	Retentionszeit [min]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
Dodecanal	25,24 ± 0,16	5	-	-	-
5-Methyl-2-phenyl-hex-2-enal	32,84 ± 0,21	5	-	-	-

Dodecanal ist laut Literatur ein im Menschen auftretendes Substrat, das in der Leber umgesetzt wird [141]. Ein Zusammenhang von Dodecanal und dem Metabolismus von Darmzellen wurde bisher in keiner anderen Arbeit hergestellt.

Die Substanz 5-Methyl-2-phenyl-hex-2-enal konnte zum ersten Mal im menschlichen Metabolismus nachgewiesen werden.

6.3.1.2.2 Softwaregestützte Auswertung der generierten Daten (PDMS-Faser)

Die softwarebasierte Methode erbringt exakt das gleiche Ergebnis wie die manuelle Auswertemethode. Die Substanzen Dodecanal und 5-Methyl-2-phenyl-hex-2-enal wurden ausschließlich im Blindwert aufgezeichnet.

Tab. 28: Softwaregestützte Auswertung der mit GC/MS detektierten Gemeinsamkeiten der Substanzen der Zelllinien (PDMS - Faser). Die Punktgröße repräsentiert die relative Peakintensität.

Chromatogramm	Dodecanal 5-Methyl-2-phenyl-hex-2-enal	
	25:07	32:41
Blindwert PDMS 1 (S/N 3)	•	•
Blindwert PDMS 2 (S/N 3)	•	•
Blindwert PDMS 3 (S/N 3)	•	•
Blindwert PDMS 4 (S/N 3)	•	•
Blindwert PDMS 5 (S/N 3)	•	•
NCM460 PDMS 1 (S/N 3)		
NCM460 PDMS 2 (S/N 3)		
NCM460 PDMS 3 (S/N 3)		
NCM460 PDMS 4 (S/N 3)		
NCM460 PDMS 5 (S/N 3)		
SW1116 PDMS 1 (S/N 3)		
SW1116 PDMS 2 (S/N 3)		
SW1116 PDMS 3 (S/N 3)		
SW1116 PDMS 4 (S/N 3)		
SW1116 PDMS 5 (S/N 3)		
SW480 PDMS 1 (S/N 3)		
SW480 PDMS 2 (S/N 3)		
SW480 PDMS 3 (S/N 3)		
SW480 PDMS 4 (S/N 3)		
SW480 PDMS 5 (S/N 3)		

Tab. 29: Gegenüberstellung der Ergebnisse der softwarebasierten und manuellen Auswertemethode. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=6). Die Anzahl der Detektionen durch die manuelle Methode steht in Klammern.

Substanzname	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
Decanal	5 (5)	- (-)	- (-)	- (-)
5-Methyl-2-phenylhex-2-enal	5 (5)	- (-)	- (-)	- (-)

Statistische Auswertungen wie die Clusteranalyse oder Hauptkomponentenanalyse waren bei diesen Daten aufgrund der geringen Metabolitebene (n=2) nicht möglich.

6.3.2 Analyse schwerflüchtiger Metabolite nach Derivatisierung mittels GC/MS

Um die schwerflüchtigen, extrazellulären Metabolite zu untersuchen, wurde die am Medium erfolgreich entwickelte Methode (siehe 6.2.2) durch methanolische TMSH - Lösung an den Zellproben angewendet. Je Zelllinie bzw. Blindwert wurden drei biologische Replikate, die aus je zwei Glaskolben (Wachstumsfläche A = 85 cm²) bestanden, analysiert. Die Geräteparameter sind in der Tabelle 8 zusammengefasst (siehe 5.4).

6.3.2.1 Manuelle Auswertung der generierten Daten

Obwohl die Methode bereits am Medium erfolgreich zum Nachweis derivatisierter Substanzen eingesetzt wurde, zeigte der Vergleich der GC/MS-Chromatogramme der Zellproben keine Unterschiede. Selbst der Einsatz größerer TMSH - Mengen (600 µl) führte zu keinem anderen Ergebnis. Diesem negativen Ergebnis können zwei mögliche Ursachen zu Grunde liegen: Entweder wurden die schwerflüchtigen Substanzen des Mediums durch die Zellen aufgenommen, metabolisiert und keine mit TMSH derivatisierbaren Stoffwechselprodukte wieder ausgeschleust oder die Anzahl schwerflüchtiger Metabolite hat sich um ein Vielfaches erhöht, so dass die Menge an zugegebenem TMSH (obwohl ungewöhnlich hoch) nicht ausreichend war, um alle Substanzen in ausreichender Quantität für die Detektion mit GC/MS zu derivatisieren. Eine Bestätigung der zweiten Hypothese war nicht möglich, da innerhalb des Injektors eine vollständige Zersetzung des TMSH zu MeOH und Disulfid erfolgt [142], wodurch ein Überschuss an TMSH nicht nachgewiesen werden kann.

Die Chromatogramme der drei Zelllinien und des Mediums zeigen dennoch Unterschiede. Da die Peaks unabhängig von der Derivatisierung auftraten, muss es sich dabei um schwerflüchtige Analyte handeln, die eine ausreichende Thermostabilität aufwiesen und sich erst im Injektor bei 250 °C verflüchtigten. Diese Peaks konnten nicht bereits bei der Analyse der flüchtigen Metabolite detektiert werden, da zum einen die Probenahme an der SPME-Faser bei 37 °C stattfand (also die meisten Metabolite mit einem Siedepunkt bis ca. 37 °C in die Gasphase übergangen) und zum anderen eine Injektortemperatur von 200 °C eingesetzt wurde. Die Häufigkeit des Auftretens dieser Substanzen innerhalb der drei Proben ist in Tabelle 30 vermerkt (max. n=3).

Tab. 30: Mit GC/MS detektierte Unterschiede im Bereich der extrazellulären, schwerflüchtigen Substanzen der Zelllinien. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=3).

Retentionszeit [min]	Massen [u]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
11,87	82/39/54	-	-	3	-
32,44	146/147	2	1	3	3
36,40	100/101	-	-	2	3

Die Unterschiede zeigen sich in Form von drei Peaks, die jeweils für die Darmkrebszelllinie SW-1116 ($t_R = 11,87$ min), die normal epitheliale Zelllinie NCM460 ($t_R = 32,44$ min) und für beide Krebszelllinien ($t_R = 36,40$ min) charakteristisch sind (siehe Tab. 30).

Der Peak der Darmkrebszelllinie SW-1116 und jenem, der für beide Darmkrebszelllinien spezifisch ist, stehen für produzierte Substanzen (siehe grüne Zellen). Die kennzeichnende Substanz der NCM460-Zellen konnte in lediglich einer der drei Proben in Spuren nachgewiesen werden (siehe Tab. 30, rote Zelle), wodurch sie als metabolisierte Substanz klassifiziert wurde. Bereits bei den extrazellulären, flüchtigen Metaboliten (siehe 6.3.1.1) konnte ein Metabolit nachgewiesen werden, der ausschließlich durch NCM460 metabolisiert wurde. Neben den Unterschieden konnten außerdem zwei von allen Zelllinien produzierte Substanzen nachgewiesen werden (siehe Tab. 31, grüne Zellen).

Tab. 31: Mit GC/MS detektierte Gemeinsamkeiten im Bereich der extrazellulären, schwerflüchtigen Substanzen der Zelllinien. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen der Peak detektiert wurde (max. n=3).

Retentionszeit [min]	Massen [u]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
4,52	45	-	2	2	2
4,56	45	-	3	2	3

Die Software AMDIS 2.62, Nist 2.0 wurde eingesetzt, Identitätsvorschläge der auffälligen Substanzen zu treffen, die dann als reine Testsubstanzen in das GC/MS-System injiziert wurden. Allerdings stimmten die Retentionszeiten dieser Substanzen nicht mit denen der Proben überein und mussten ausgeschlossen werden. Das Problem der Identifizierung lag in der Komplexität der Proben, die bis zu 700 Komponenten enthielten und sich gegenseitig überlagerten. Die Abbildung 25 verdeutlicht dieses Problem. In dem ausgewählten Retentionszeitbereich von $t_R = 35,85 - 36,63$ min konnten allein bis zu sechs sich überlagernde Peaks nachgewiesen werden.

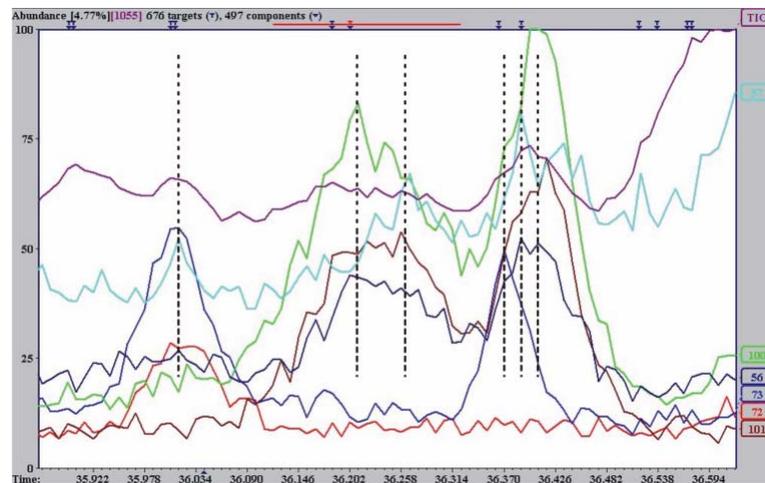


Abb. 25: Trennschwierigkeiten der extrazellulär schwerflüchtigen Metabolite. Die gestrichelten Linien zeigen jeweils das Maximum eines Peaks.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die am Medium erfolgreich entwickelte Methode nicht am Zellkulturmodell angewendet werden konnte, die Gründe bleiben jedoch offen. Allerdings wurden dennoch schwerflüchtige Metabolite nachgewiesen, die auch ohne Derivatisierung mit GC/MS analysiert wurden.

Anhand drei unterschiedlicher Peaks (siehe Tab. 30) kann wie auch bei den flüchtigen Metaboliten belegt werden, dass sich der Metabolismus von Krebszellen und gesunden Darmzellen unterscheidet. Es wurden sogar zwei Metabolite ermittelt, die lediglich von den Krebszellen gebildet werden können und demzufolge als Biomarker eingesetzt werden könnten.

6.3.2.2 Softwarebasierte Auswertung der generierten Daten (nach Derivatisierung)

Beide Auswertemethoden ergaben für den Peak mit den Massen 82/39/54 [u] dasselbe Ergebnis (exakt gleiche Anzahl an Detektionen der Peaks) und für den Peak der Massen 146/147 [u] dieselbe Aussage (von NCM460 metabolisiert), auch wenn er unterschiedlich häufig nachgewiesen wurde (siehe Tab. 33). Im Gegensatz dazu führten die Auswertemethoden bei dem Peak mit den Massen 100/101 [u] zu unterschiedlichen Aussagen. Nach der manuellen Methode wird diese Substanz von beiden Krebszellen gebildet, nach der softwaregestützten Methode ausschließlich von SW-1116.

Tab. 32: Softwaregestützte Auswertung der mittels GC/MS detektierten Unterschiede der Zelllinien (nach Derivatisierung). Die Punktgröße repräsentiert die relative Peakintensität.

Chromatogramm	11:58	32:35	36:24
Blindwert Derivat. 1 (S/N 3)		•	
Blindwert Derivat. 2 (S/N 3)		•	
Blindwert Derivat. 3 (S/N 3)			
NCM460 Derivat. 1 (S/N 3)			
NCM460 Derivat. 2 (S/N 3)			
NCM460 Derivat. 3 (S/N 3)			
SW1116 Derivat. 1 (S/N 3)	●	•	●
SW1116 Derivat. 2 (S/N 3)	•	●	●
SW1116 Derivat. 3 (S/N 3)	•	•	
SW480 Derivat. 1 (S/N 3)		●	
SW480 Derivat. 2 (S/N 3)		•	
SW480 Derivat. 3 (S/N 3)			

Tab. 33: Gegenüberstellung der Ergebnisse der softwarebasierten und manuellen Auswertemethode. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=3). Die Anzahl der Detektionen durch die manuelle Methode steht in Klammern.

Substanzname	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
82/39/54 [u]	- (-)	- (-)	3 (3)	- (-)
146/147 [u]	2 (2)	- (1)	3 (3)	2 (3)
100/101 [u]	- (-)	- (-)	2 (2)	- (3)

6.3.3 Analyse flüchtiger Metabolite mittels MCC-Ionenmobilitätsspektrometrie

Die Metabolitzusammensetzung des Gasraumes über dem Kulturmedium der Zellen wurde direkt nacheinander mit GC/MS und IMS an sechs biologischen Replikaten durchgeführt. Da die Probe bei der SPME nur anteilig an der Faser adsorbiert, konnte die Gasphase im Anschluss der GC/MS-Analysen in der Originalzusammensetzung ebenfalls mit IMS vermessen werden.

Die Datenauswertung erfolgte mit der Software BB_IMS-Analyse (ISAS Dortmund), die u.a. der Peakerkennung dient. MeltDB konnte aufgrund des Datenformats nicht eingesetzt werden.

Anhand des Vergleichs der Chromatogramme des Mediums mit denen der Zelllinien und der Zelllinien untereinander, konnten wie bereits bei den GC/MS-Analysen, Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Zelllinien ermittelt werden.

Die Unterschiede der drei Zelllinien zeigten sich in Form von drei metabolisierten Substanzen der Zelllinien NCM460 und SW-480 (siehe Tab. 34, rote Zellen).

Tab. 34: Mit IMS detektierte Unterschiede im Bereich der flüchtigen Metabolite der Zelllinien. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=6).

RT [s]	$1/K_0$ [Vs/cm ²]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-480	SW-1116
7 ± 2	0,582 ± 0,004	4	6	2	6
21 ± 1	0,663 ± 0,003	4	-	6	3
268 ± 4	0,575 ± 0,001	4	6	1	3

Neben den Unterschieden wiesen die Chromatogramme ebenfalls Gemeinsamkeiten in Bezug auf produzierte und metabolisierte Substanzen auf.

Es wurden zwei Peaks detektiert, die im Gegensatz zu den Mediumproben in den Chromatogrammen aller drei Zelllinien aufzufinden waren und somit produzierten Substanzen zugeordnet werden konnten (siehe Tab. 35, grüne Zellen). Weiterhin wurden fünf Peaks, die zuvor in den Medienproben vorhanden waren, in Anwesenheit der Zellen nicht mehr nachgewiesen, so dass sie metabolisierten Substanzen zugeordnet wurden (siehe Tab. 35, rote Zellen).

Tab. 35: Mit IMS detektierte Gemeinsamkeiten im Bereich der flüchtigen Metabolite der Zelllinien. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=6).

RT [s]	1/K ₀ [Vs/cm ²]	Substanz	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-480	SW-1116
20 ± 2	0,782 ± 0,005		-	2	6	5
23 ± 4	0,530 ± 0,002		5	1	3	2
28 ± 3	0,683 ± 0,002		4	1	-	-
30 ± 3	0,779 ± 0,004		4	-	-	-
31 ± 2	0,711 ± 0,003	Benzaldehyd	6	-	-	-
37 ± 4	0,536 ± 0,003		4	2	2	1
67 ± 2	0,616 ± 0,004		6	1	2	2
113 ± 4	0,687 ± 0,001	Nonan-2-on	-	6	6	4

Da eine Substanz nur als metabolisiert gilt, wenn sie in weniger als der Hälfte der Zellproben im Vergleich zu der zuvor detektierten Anzahl der Mediumproben auftrat, wurde im Fall des Peaks ($t_R = 23 \text{ s} / 1/K_0 = 0,530 \text{ Vs/cm}^2$) der Zelllinie SW-480 keine Aussage in Bezug auf die Verstoffwechslung getroffen (siehe Tab. 35, weiße Zelle). Von der Substanz wurde eine alleinige Metabolisierung durch die Zelllinien NCM460 und SW-1116 angenommen. Eine Identifizierung über die Retentionszeit bzw. das charakteristische $1/K_0$ der in Tabelle 34 und 35 aufgeführten Peaks war aufgrund der rudimentären Datenbanken nicht möglich.

Um dennoch den Peaks nach Möglichkeit Substanzen zuordnen zu können, erfolgte die Injektion der identifizierten Substanzen der GC/MS Messungen in das IMS. Zwei der Signale, Benzaldehyd und Nonan-2-on, wiesen eine Übereinstimmung auf (siehe Tab. 35), die in Abb. 26 bzw. 27 exemplarisch an der reinen Testsubstanz, des Mediums und einer der drei Zelllinien (NCM460) gezeigt wird. Die Chromatogramme der anderen zwei Zelllinien befinden sich im Anhang (siehe Abb. 43 bzw. Abb. 44). Die reine Testsubstanz Benzaldehyd wurde dem Medium mit einer Konzentration von 5 ppb_v zugegeben und nach dreitägiger Inkubation im Brutschrank vermessen. Benzaldehyd eluierte nach ca. 30 Sekunden und wies für das Monomer ein $1/K_0$ von 0,561 Vs/cm² bzw. für das Dimer ein $1/K_0$ von 0,712 Vs/cm² auf (siehe Tab. 36).

Tab. 36: Auftreten der Substanz Benzaldehyd in den IMS-Chromatogrammen.

Probe	RT [s]	1/K ₀ (Monomer) [Vs/cm ²]	1/K ₀ (Dimer) [Vs/cm ²]
reine Testsubstanz Benzaldehyd	33 ± 3	0,561	0,713
DMEM/F12 Medium	32 ± 3	0,561 ± 0,001	0,711 ± 0,003
NCM460	33 ± 4	0,561 ± 0,005	
SW-480	32 ± 1	0,559 ± 0,001	
SW-1116	28 ± 3	0,560 ± 0,002	

Der Vergleich des Zellchromatogramms mit dem des Mediums zeigt einen starken Rückgang der Intensität des Monomerpeaks ($t_R = 32 \text{ s} / 1/K_0 = 0,561 \text{ Vs/cm}^2$) von Benzaldehyd, während der Dimerpeak ($t_R = 32 \text{ s} / 1/K_0 = 0,711 \text{ Vs/cm}^2$) in Anwesenheit der Zellen gar nicht mehr detektiert werden konnte (siehe Tab. 36 / Abb. 26). Aus diesem Grund ist von ihrer Metabolisierung auszugehen, da das Vorhandensein eines Dimerpeaks generell auf eine höhere Konzentration schließen lässt. Dieses Ergebnis stimmt mit den GC/MS Ergebnissen überein, bei denen Benzaldehyd ebenfalls als eine durch die Zellen metabolisierte Substanz ermittelt werden konnte.

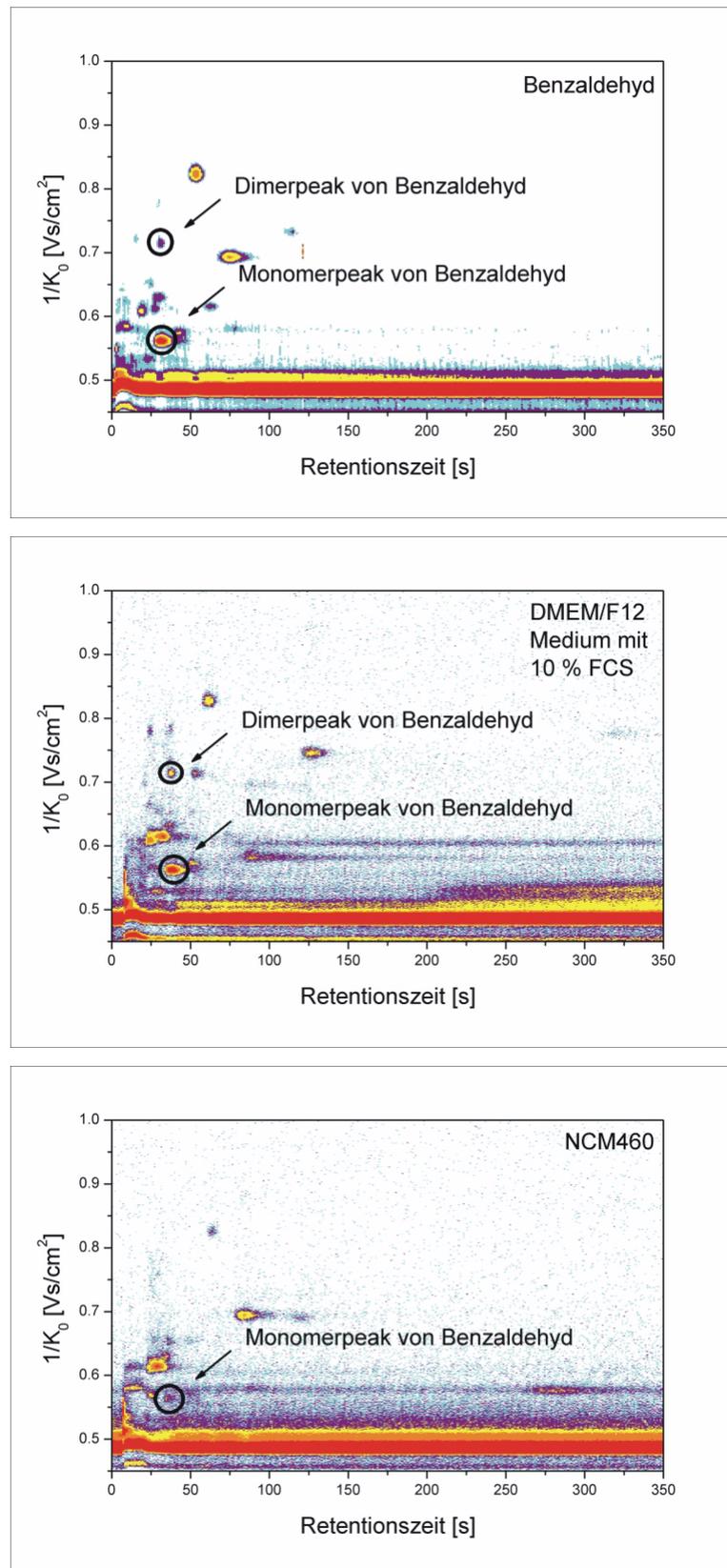


Abb. 26: Auftreten des Monomer- und Dimerpeaks von Benzaldehyd in Proben der reinen Testsubstanz, des Mediums DMEM/F12 und der Zelllinie NCM460.

Das IMS-Chromatogramm von Nonan-2-on ($c = 2,5 \text{ ppb}_V$) zeigte aufgrund der niedrigen Konzentration nur den Monomerpeak dieser Substanz (siehe Abb. 27), die nach $t_R = 106 \text{ s}$ eluierte und ein $1/K_0$ von $0,688 \text{ Vs/cm}^2$ aufwies. Dieser Peak war ebenfalls in allen Chromatogrammen der Zelllinien nachzuweisen ($1/K_0$: max. Abweichung: $-0,002 \text{ Vs/cm}^2$ / Retentionszeit: max. Abweichung: $+12 \text{ s}$), im Medium hingegen nicht (siehe Tab. 37).

Tab. 37: Auftreten der Substanz Nonan-2-on in den IMS-Chromatogrammen.

Probe	RT [s]	$1/K_0$ [Vs/cm ²]
reine Testsubstanz Nonan-2-on	105 ± 2	0,688
DMEM/F12 Medium	-	-
NCM460	113 ± 3	$0,687 \pm 0,001$
SW-480	117 ± 3	$0,688 \pm 0,001$
SW-1116	110 ± 6	$0,686 \pm 0,002$

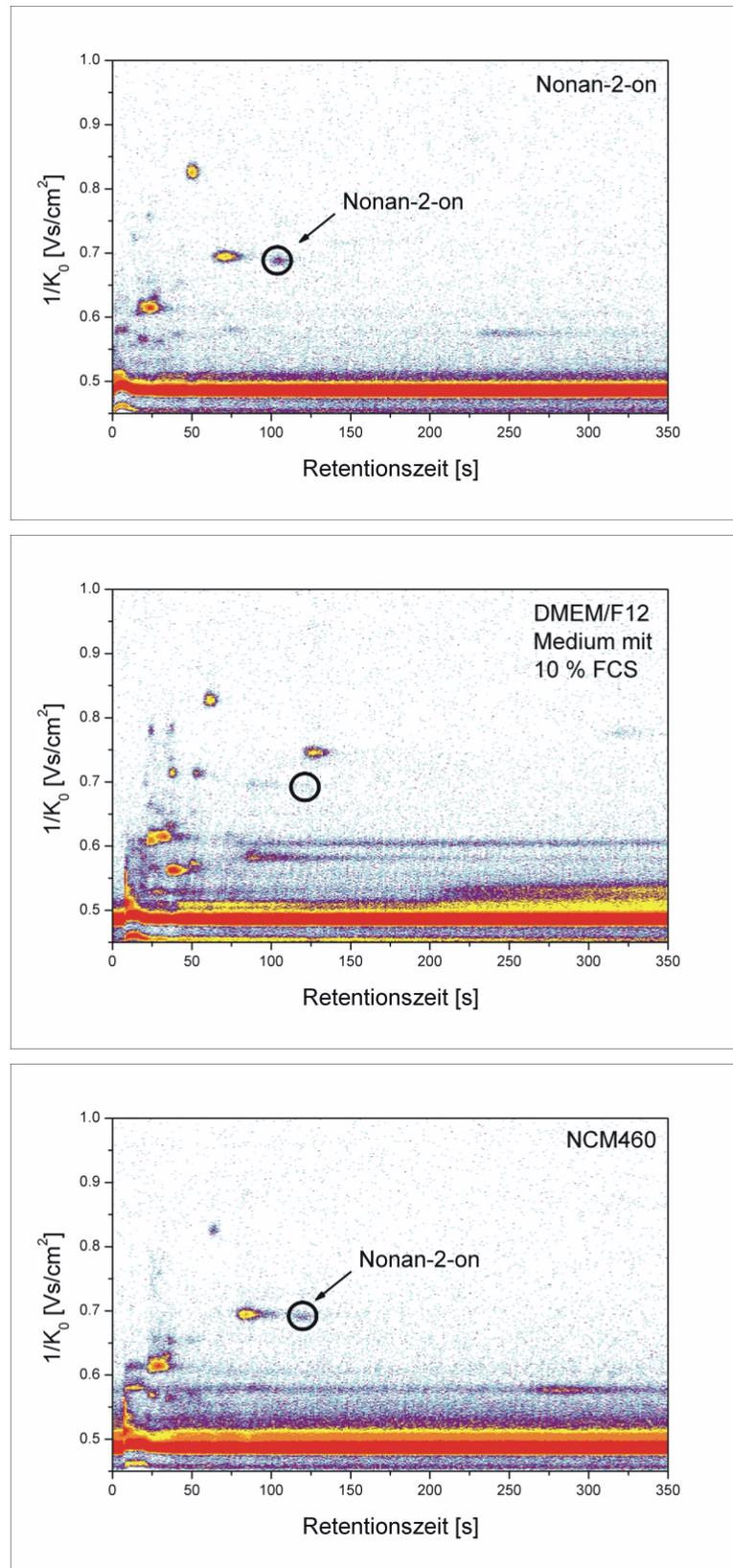


Abb. 27: Auftreten des Monomerpeaks von Nonan-2-on in Proben der reinen Testsubstanz, des Mediums und der Zelllinie NCM460.

Analog zu GC/MS konnte mit IMS Nonan-2-on als eine von allen drei Zelllinien produzierte Substanz ermittelt werden. Das zeigt, dass die Ergebnisse beider Methoden wie im Fall von Benzaldehyd konform sind.

In Bezug auf die gemittelten Retentionszeiten zeigten sich bei beiden Substanzen leichte Abweichungen. Im Vergleich mit der Testsubstanz eluierte der Analyt Benzaldehyd 5 Sekunden früher (siehe Tab. 36), Nonan-2-on bis zu 12 Sekunden später (siehe Tab. 37).

Retentionszeitverschiebungen können im Allgemeinen auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden, wie z.B. Schwankungen der Säulentemperatur/ Trägerflussrate [143] oder manuelles Öffnen der Probenschleife. Der letztere Fehler betrug max. 2 Sekunden, wodurch die Substanzen entsprechend 2 Sekunden später eluiert wären. Da allerdings Benzaldehyd früher eluierte und Nonan-2-on später, konnte der Fehler durch das manuelle Öffnen der Probenschleife ausgeschlossen werden.

Sowohl eine Temperaturminderung der Säule bei konstanter Trägerflussrate als auch eine Minderung der Trägerflussrate bei konstanter Säulentemperatur bewirkt eine spätere Elution der Substanz. Ein Messfehler durch die Säulentemperatur konnte ausgeschlossen werden, da diese während der Messung an einem Display überprüft wurde. Obwohl sie zwischenzeitlich eine Schwankung von $\pm 0,1$ °C aufwies, ist dieser Fehler zu gering, als dass er sich in einer Retentionszeitverschiebung bemerkbar gemacht hätte.

Die Trägerflussrate wurde lediglich vor jeder Messreihe eingestellt, und nicht vor jeder Einzelmessung neu bestimmt. Schwankungen innerhalb einer Messreihe konnten somit nicht erfasst werden. Da die Trägerflussrate einen erheblichen Einfluss auf die Retentionszeit der Analyte ausübt, könnte sie hauptsächlich für die beobachtete Verschiebung verantwortlich sein. Die bis zu 5 Sekunden frühere Elution von Benzaldehyd spräche für eine Trägerflussrate über 150 mL/min, wohingegen sie bei Nonan-2-on unter 150 mL/min gelegen haben müsste, um zu einer bis zu 12 s späteren Elution zu führen.

In zukünftigen Messungen sollte demnach die Trägerflussrate vor jeder einzelnen Messung bzw. innerhalb der Messungen überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

Das jeweils charakteristische $1/K_0$ beider Substanzen in den Proben wies eine sehr geringe Abweichung zu dem der reinen Testsubstanz von max. $-0,002 \text{ Vs/cm}^2$ auf, die darauf zurückzuführen ist, dass das $1/K_0$ zum einen von der Temperatur und dem Druck unabhängig und zum anderen eine Linearität auch bei späteren Retentionszeiten mit der Driftzeit gegeben ist.

Im Folgenden wird auf die neun durch GC/MS identifizierte Metabolite, die nicht in den IMS-Chromatogrammen zu finden waren, näher eingegangen. Von den vier auffälligen Substanzen, die Unterschiede im Metabolismus der Zelllinien anzeigten, hätten 3-Methylbutan-1-ol, Heptan-1-ol und Octan-1-ol ebenfalls in den IMS-Chromatogrammen nachzuweisen sein müssen, da die Testsubstanzen Retentionszeiten zwischen 16 und 110 Sekunden aufwiesen (siehe Tab. 38). Lediglich Pentadecan-2-on konnte nicht detektiert werden, da es erst nach 809 Sekunden eluierte und so die Aufnahmezeit der Messungen überstieg.

Tab. 38: IMS-Analysen der reinen Testsubstanzen der mit GC/MS detektierten Unterschiede der Zelllinien.

Substanzname	Retentionszeit der reinen Testsubstanz [s]	$1/K_0$ Monomer/Dimer der reinen Testsubstanz [Vs/cm^2]
3-Methylbutan-1-ol	16	0,612 / 0,743
Heptan-1-ol	52	0,683 / 0,867
Octan-1-ol	110	0,718 / 0,925
Pentadecan-2-on	809	0,795 / 1,034

Dass die drei Analyte nicht detektiert werden konnten, obwohl sie innerhalb der aufgetragenen Retentionszeit lagen, kann verschiedene Ursachen haben:

Es wäre möglich, dass die Konzentration der Analyte insgesamt zu gering war. Dagegen sprechen allerdings die Ergebnisse der bereits zuvor diskutierten Substanz Benzaldehyd, die in fast allen Zellproben sowohl durch GC/MS als auch durch IMS mit nur geringen Intensitäten zu detektieren war und dadurch ein ähnlich sensibler Nachweis zur Verfügung stand.

Eventuell verringerte sich die Konzentration der Analyte durch Kondensationseffekte der $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen, feuchten Probe. Ursachen könnten hierfür sein, dass die Probenschleife und die Zuleitungen des 6-Wegeventils zum Zeitpunkt der Messungen nicht beheizbar waren, und dass Edelstahl immer eine molekulare Schicht Wasser auf seiner Oberfläche trägt. Durch die Wasserschicht und den Kondensationseffekt kann es zur Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen der Gasphase der Probe und dem

Wasser gekommen sein, wodurch die mittelpolaren bis polaren Metabolite 3-Methylbutan-1-ol, Heptan-1-ol und Octan-1-ol in der Probenschleife stark zurückgehalten wurden. Die verbleibende, geringere Konzentration war anscheinend zu gering, um durch IMS nachgewiesen zu werden. Es wäre sinnvoll, für zukünftige Experimente ein anderes Material für die Probenschleife, z.B. Teflon zu wählen und sie während der Messungen zu beheizen.

Tab. 39: IMS-Analyse der reinen Testsubstanzen der mit GC/MS detektierten Gemeinsamkeiten der Zelllinien.

Substanzname	Retentionszeit der reinen Testsubstanz [s]	1/K ₀ Monomer/Dimer der reinen Testsubstanz [Vs/cm ²]
Decan-1-ol	745	0,784
Undecan-2-ol	809	0,795 / 1,034
Dodecanal	2160	0,821
5-Methyl-2-phenylhex-2-enal	3137	0,703
Dodecansäuremethylester	6235	0,824 / 1,132

Die fünf auffälligen Substanzen der GC/MS-Analysen, die auf Gemeinsamkeiten im Metabolismus der Zelllinien hinwiesen, konnten in den IMS-Chromatogrammen nicht detektiert werden, da sie bei den Messungen der Testsubstanzen Retentionszeiten von 745 s - 6235 s aufwiesen (siehe Tab. 39). Es wäre für zukünftige Messungen angebracht, entweder die Messdauer oder die Temperatur der Säule zu erhöhen. Die Temperaturerhöhung würde allerdings zu einer schnelleren Elution der Analyte führen, was wiederum zu einer Überlagerung von Peaks führen könnte. Aus diesem Grund sollte bei einer unbekanntem, komplexen Probe die Messdauer auf zwei Stunden erhöht werden, um alle Probesignale aufzeichnen zu können (Dodecansäuremethylester: T_R=104 min) und eine Überlagerung zu vermeiden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass unter Einsatz von IMS elf Substanzen detektiert wurden, von denen zwei durch die Direktinjektion identifiziert werden konnten. Die Ergebnisse von GC/MS und IMS waren in Bezug auf die Substanzen Benzaldehyd (metabolisiert) und Nonan-2-on (gebildet) konform (siehe Abb. 28, Mitte), allerdings wiesen beide Methoden spezifische Unterschiede auf, so dass durch den Einsatz von zwei Detektionsmethoden eine größere Anzahl flüchtiger Metabolite als durch eine allein nachgewiesen werden konnten.

Durch IMS wurden ausschließlich sechs Peaks als Gemeinsamkeiten (1 x gebildet/ 5 x metabolisiert) und drei Peaks als Unterschiede der drei Zelllinien (3 x metabolisiert) nachgewiesen (siehe Abb. 28, links). Im Fall von GC/MS konnten sechs Substanzen als Gemeinsamkeiten (1 x gebildet / 5 x metabolisiert) und vier Substanzen als Unterschiede der drei Zelllinien (3 x gebildet / 1 x metabolisiert) ermittelt werden (siehe Abb. 28, rechts). Wegen dieser abweichenden Ergebnisse sollten weiterhin beide Methoden eingesetzt werden, um ein möglichst breites Spektrum gasförmiger Proben von Zellen aufzeichnen zu können.

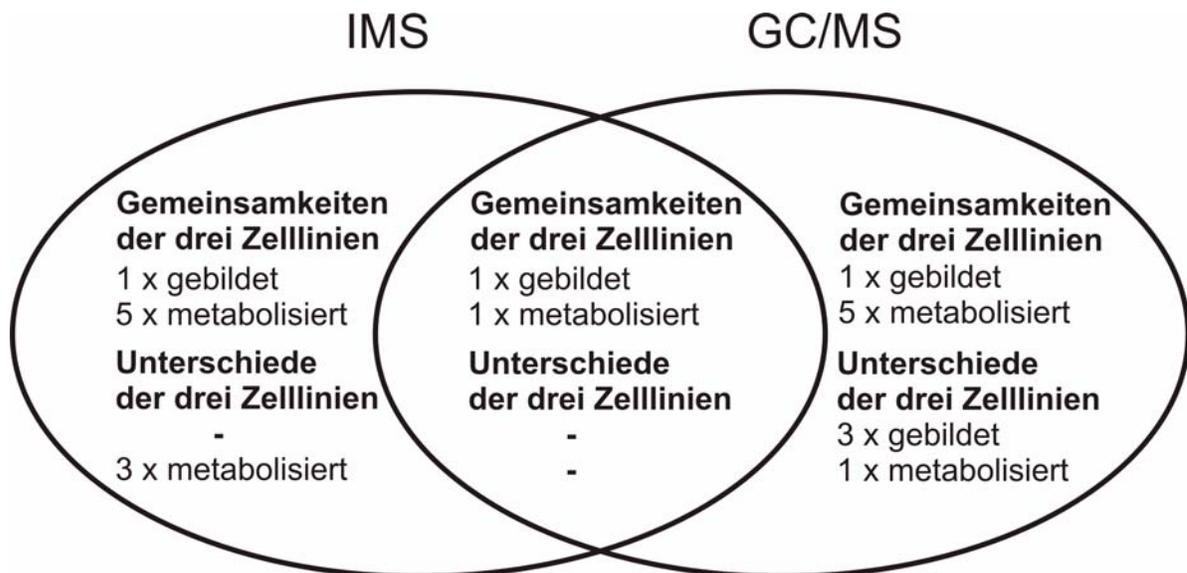


Abb. 28: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Detektionsmethoden IMS und GC/MS.

6.3.4 Analyse nichtflüchtiger Metabolite mittels HPLC/MS

Im Unterschied zur Gaschromatographie und Ionenmobilitätsspektrometrie, die lediglich für verdampfbare Stoffe einsetzbar sind, können durch HPLC/MS auch nichtflüchtige Substanzen analysiert werden. Sie stellt die dritte Detektionsmethode dar, die eingesetzt wurde, um das Spektrum der Metabolitanalysen zu erweitern. Nachdem der optimale Probenaufschluss (Verwendung eines Glasschabers) und die richtige Aufkonzentrierung für die optimale Wiederfindungsrate von Substanzen in Form der Vakuumtrocknung ermittelt werden konnte, kam HPLC/MS an zwei Darmkrebszelllinien und einer normal epithelialen Darmzelllinie zum Einsatz.

Um eine Vermischung der intrazellulären mit den extrazellulären Metaboliten zu verhindern, wurde das Medium nach der Inkubationszeit abgesaugt und die Zellen mit 5 mL sterilem Wasser ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) gewaschen. Nach zehnmütigem Quenchen des

Metabolismus durch 20 mL eiskaltes MeOH mit 0,24 mM Formiatpuffer (1:20 Verdünnung des 4,7 mM Formiatpuffers) (60/40 v/v) folgte der Aufschluss der Zellen mit Hilfe des Glasschabers. Zur Entfernung der Zellbestandteile bzw. um Proteinverunreinigungen der Proben vorzubeugen, wurde bei 8000 x g für 15 Minuten zentrifugiert ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), der Überstand entnommen und anschließend mit 3 kDa Zentrifugationseinheiten (Millipor, Schwalbach) bei 3000 x g ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) über Nacht erneut zentrifugiert. Die Aufkonzentrierung der Probe erfolgte durch Vakuumtrocknung über Nacht ($p = 0,009\text{ mbar}$; $T = -65\text{ }^{\circ}\text{C}$) und anschließender Resuspendierung in 700 μL ACN/Wasser (80/20 v/v). Für die Messungen am LTQ FT Massenspektrometer wurden die Proben mit 10 μM Gerätestandard (D-a-Phenylglycin) versetzt und im positiven und negativen Ionisationsmodus vermessen. Zur Auftrennung der Substanzen kam eine ZIC/HILIC-Säule (Sequant) zum Einsatz. Die Geräteparameter sind der Tabelle 10 in Abschnitt 5.4 zu entnehmen. Das Massenspektrometer LTQ-FT bietet gegenüber dem Finnigan LCQ™ Deca, an dem die Standardmessungen durchgeführt wurden, eine bessere Auflösung. Neben den Full Scans, die eine Massengenauigkeit von $\leq 20\text{ ppm}$ aufweisen, können SIM-Scans mit einer Massengenauigkeit $\leq 1\text{ ppm}$ aufgenommen werden, die für die Identifizierung von unbekanntem Substanzen eingesetzt werden können.

Bei der manuellen Kontrolle der ersten Ergebnisse fiel in den TIC-Chromatogrammen ein sehr intensiver Peak auf, der über fünf Minuten eluierte. Das entsprechende Massenspektrum (siehe Abb. 29) wies eine Polymerverteilung mit diskreten Massenunterschieden auf. Da dieser Peak aufgrund seiner hohen Intensität und damit Konzentration die Ionisierung gleichzeitig eluierender Peaks stark vermindern würde, wurde versucht, ihn zu identifizieren und nach Möglichkeit zu eliminieren.

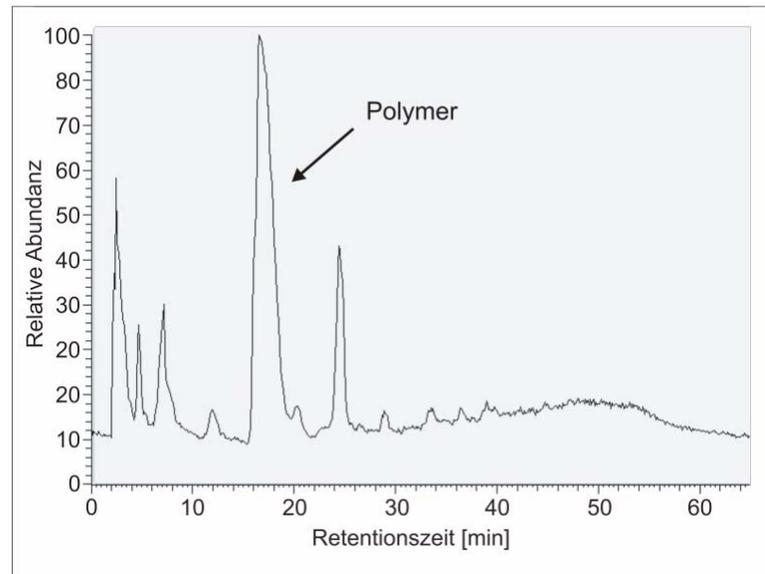


Abb. 29: Auftreten des Polymerpeaks im TIC-Chromatogramm der Zelllinie SW-480.

Der charakteristische Massenunterschied von 82,004 m/z legte den Verdacht nahe, dass es sich um Natriumacetat-Clusterionen handelte. In Abbildung 31 wurde das Addukt aus drei Molekülen Natriumacetat, gebunden an ein Natrium, simuliert und mit der Probe verglichen. Aufgrund der sehr guten Übereinstimmung der gemessenen und der simulierten Masse konnte dieser Peak als Natriumacetatcluster mit einem zusätzlichen Natrium identifiziert werden.

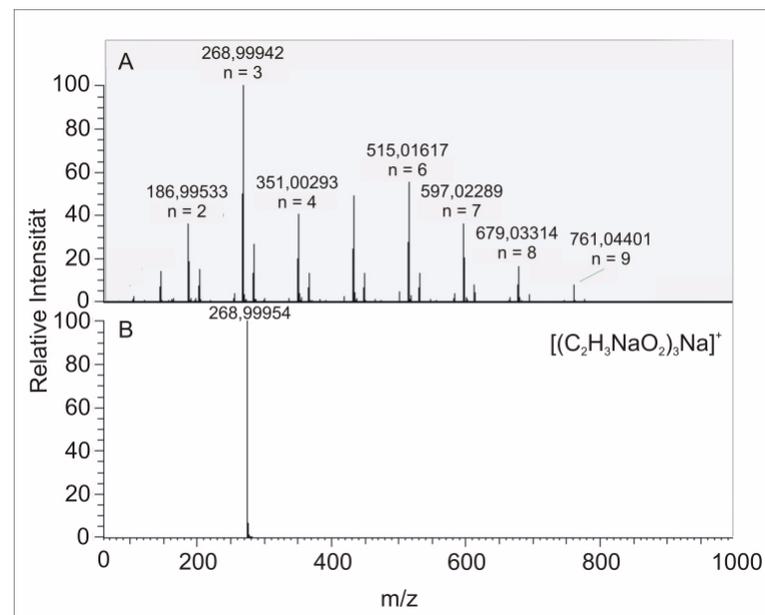


Abb. 30: Vergleich der simulierten und gemessenen Masse von $[(C_2H_3NaO_2)_3Na]^+$ im positiven Modus.

A: Einzelspektrum der Zelllinie SW-480 mit $[(C_2H_3NaO_2)_nNa]^+$ (n: Anzahl der Natriumacetatmoleküle)

B: Simulation von $[(C_2H_3NaO_2)_3Na]^+$

Da als Laufmittel der Messungen ACN und Acetatpuffer verwendet wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass das Störsignal auf den Puffer zurückzuführen war. Um es zu eliminieren, erfolgte der Austausch des Acetatpuffers gegen Formiatpuffer. Unter diesen Bedingungen zeigte sich allerdings ebenfalls ein stark ausgeprägter Peak. Der Massenunterschied betrug 67,987 m/z, der der Masse von Natriumformiat entspricht. Anhand der Gegenüberstellung der gemessenen zur simulierten Masse konnte der Peak als Natriumformiat mit einem zusätzlichen Natrium identifiziert werden (siehe Abb. 31).

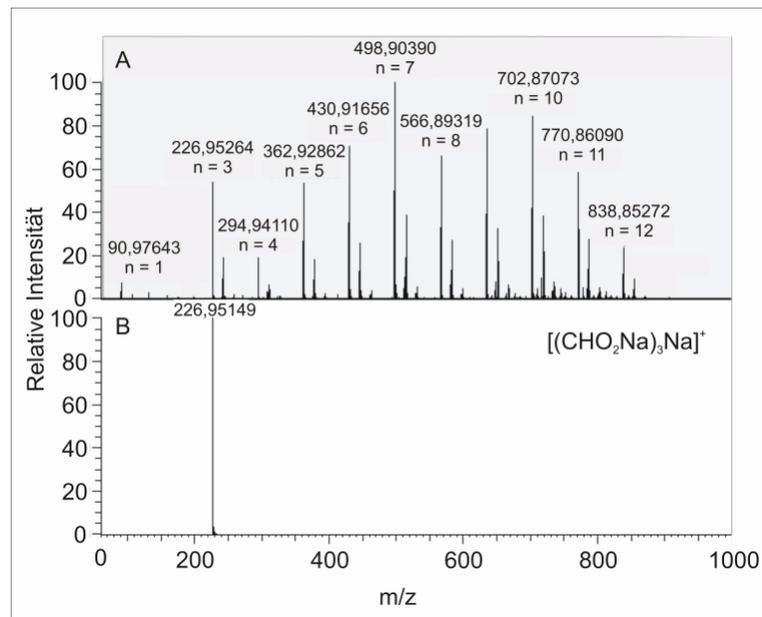


Abb. 31: Vergleich der simulierten und gemessenen Masse von $[(\text{CHO}_2\text{Na})_3\text{Na}]^+$ im positiven Modus.

A: Einzelspektrum der Zelllinie SW-480 mit $[(\text{CHO}_2\text{Na})_3\text{Na}]^+$ (n: Anzahl der Natriumformiatmoleküle)

B: Simulation von $[(\text{CHO}_2\text{Na})_3\text{Na}]^+$

Die Entstehung dieses Peaks kann durch das Natrium der Probe in Kombination mit der verwendeten ZIC/HILIC-Säule erklärt werden. Da die Aufkonzentrierung durch Vakuumtrocknung keinen Entsalzungsschritt beinhaltete, wurde das Natrium auf der ZIC/HILIC-Säule (schwacher Anionen- und Kationenaustauscher) gebunden und eluierte in diesem Fall nach ca. 16 Minuten (siehe Abb. 29). Eine Abtrennung des Natriums aus der Probe wäre zwar durch SPE möglich gewesen, wurde allerdings aufgrund der nachgewiesenen substanzabhängigen Diskriminierung (siehe 6.2.3.2) nicht in Betracht gezogen und der Störpeak akzeptiert.

Aufgrund der großen Datenmenge erfolgte die Auswertung der generierten Daten der HPLC/MS-Experimente nicht manuell sondern direkt softwaregestützt (MZmine und MeltD)

6.3.4.1 Softwaregestützte Auswertung der generierten Daten (MZmine)

Mit MZmine konnten insgesamt acht Peaks aufgezeichnet werden, die ausschließlich in den Chromatogrammen einer Zelllinie vorkamen und demnach Unterschiede im Metabolismus dieser Zelllinien repräsentieren (siehe Tab. 40). Dabei handelte es sich in allen Fällen um produzierte Substanzen, da sie in den Chromatogrammen des Blindwertes (Medium DMEM/F12) nicht detektiert werden konnten.

Tab. 40: Durch HPLC/MS (positiver Modus) detektierte Unterschiede im Bereich der intrazellulären Substanzen der Zelllinien. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=3).

[M + H] ⁺ im Full Scan [m/z]	[M + H] ⁺ im SIM Scan [m/z]	Retentionszeit [min]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-480	SW-1116
482,53363	482,52927	2,2	-	2	-	-
87,04382	-	3,9	-	-	3	-
203,05374 (Myo-Inositol, Scyllo-Inositol)	203,05257	8,2	-	-	-	2
320,96918	-	8,3	-	-	-	2
305,96283	305,96060	10,2	-	-	-	2
476,02835	-	20,2	-	-	-	2
351,21399	351,21249	33,8	-	-	-	2
457,20441	457,20255	35,5	-	-	-	2

Bei den Zelllinien NCM460 und SW-480 wurden jeweils ein, bei der Zelllinie SW-1116 insgesamt sechs zusätzliche Peaks nachgewiesen (siehe Tab. 40, grüne Zellen).

Neben den chromatographischen Signalen, die charakteristisch bei einer Zelllinie auftraten, konnten ebenfalls insgesamt 18 Peaks ermittelt werden, die Gemeinsamkeiten von jeweils zwei Zelllinien darstellten, die sowohl für metabolisierte (siehe Tab. 41, rote Zellen) als auch produzierte Substanzen standen (siehe Tab. 41, grüne Zellen).

Tab. 41: Mit HPLC/MS (positiver Modus) detektierte Gemeinsamkeiten von je zwei Zelllinien im Bereich der intrazellulären Substanzen. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=3).

[M + H] ⁺ im Full Scan [m/z]	[M + H] ⁺ im SIM Scan [m/z]	Retentionszeit [min]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-480	SW-1116
451,17233	-	1,7	3	-	3	-
318,30365	-	2,7	-	3	-	1
488,27512	488,27115	4,0	2	1	3	-
270,19427	270,19235	4,4	2	1	3	-
304,17783	304,17670	4,9	2	1	3	-
256,17834	256,17673	5,2	2	1	3	-
254,16228	254,16107	5,5	2	1	3	-
195,11400	195,11278	5,5	2	1	3	-
209,12866	209,12842	5,9	2	1	3	-
320,17178	320,17163	6,3	2	1	3	-
228,14552	228,14545	6,5	2	1	3	-
351,17511	351,17606	7,4	2	1	3	-
306,08771	306,08524	9,9	-	1	3	-
445,06677	-	22,1	-	1	-	2
260,19800	260,19678	28,2	2	1	3	-
409,13937	409,13858	32,6	-	1	3	-
304,16663	304,16150	33,0	2	1	3	-
302,24512	302,24371	37,8	2	1	3	-

In den Chromatogrammen der Zelllinien NCM460 und SW-480 wurden zwei Signale ermittelt, die lediglich in diesen Proben auftraten und produzierten Substanzen zugeordnet wurden (siehe Tab. 41, grüne Zellen, schwarz umrandet). Auch die Zelllinien NCM460 und SW-1116 zeigten Gemeinsamkeiten in Form von zwei zusätzlichen und 14 nicht mehr detektierbaren Peaks (siehe Tab. 41). Im Retentionszeitbereich des Injektionspeaks eluierten gleichzeitig so viele Substanzen, dass nicht alle Metabolite vollständig ionisiert werden konnten und dies u.U. der alleinige Grund dafür ist, dass der Peak ($t_R=1,7$ min) nicht bei den Zelllinien NCM460 und SW-1116 auftrat.

Im Gegensatz zum positiven wurden im negativen Ionisationsmodus keine Unterschiede der drei Zelllinien nachgewiesen. Allerdings konnten Übereinstimmungen in den Chromatogrammen der Zelllinien aufgedeckt werden.

Die Signale zeigten sich in einer Probe der Zelllinie NCM460, in drei der SW-480-Zellen und in allen Mediumchromatogrammen. Da sie bei SW-1116 gar nicht und bei NCM460 nur in einer Probe auftraten, wurden die Peaks metabolisierten Substanzen zugeordnet (siehe Tab. 42, rote Zellen).

Tab. 42: Mittels HPLC/MS (negativer Modus) detektierte Gemeinsamkeiten von je zwei Zelllinien im Bereich der intrazellulären Substanzen der Zelllinien. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=3).

[M - H] ⁻ im Full Scan [m/z]	[M - H] ⁻ im SIM Scan [m/z]	Retentionszeit [min]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-480	SW-1116
256,09488	256,09387	8,5	2	1	3	-
312,16025	312,15646	2,7	2	1	3	-
332,12854	332,12509	2,8	2	1	3	-
338,17517	338,17212	2,8	2	1	3	-
355,16451	355,16248	4,1	2	1	3	-
388,19388	388,18774	2,3	2	1	3	-
403,17136	403,16876	3,0	2	1	3	-
404,19196	404,18259	2,2	2	1	3	-
441,24371	441,23547	2,2	2	1	3	-
453,28076	-	1,9	2	1	3	-
467,21806	-	5,5	2	1	3	-

Zur Substanzbestimmung wurde mit den exakten Massen der 37 Peaks, soweit vorhanden, in den Datenbanken KEGG, TSCA und Human Metabolome Database nach Substanzen gleicher Masse gesucht. Zu 15 konnten Identitätsvorschläge gefunden werden. Mit Hilfe der Software MassFrontier (Thermo Scientific) wurden die theoretischen Spaltungsmuster dieser Substanzen mit den tatsächlich gemessenen MS²- und MS³-Experimenten abgeglichen. Während vierzehn chromatographische Signale aufgrund ihrer abweichenden Fragmentmuster nicht identifiziert werden konnten, zeigte der Peak (203,05374 [m/z]) Übereinstimmung mit dem Spaltungsmuster von Myo-Inositol und Scyllo-Inositol. Bereits Moreno *et al.* fand in einer Studie Belege dafür, dass diese Substanzen in den Darmtumorproben im Vergleich zu den gesunden Gewebeproben in geringerer Konzentration auftraten [87].

Abbildung 32 veranschaulicht die tatsächlich gemessenen Fragmentspektren des Peaks mit der Masse 203,05374 [m/z], die Abbildung 33 die errechneten Fragmente durch die Software MassFrontier. Alle gemessenen und errechneten Fragmentmassen konnten in Übereinstimmung gebracht werden.

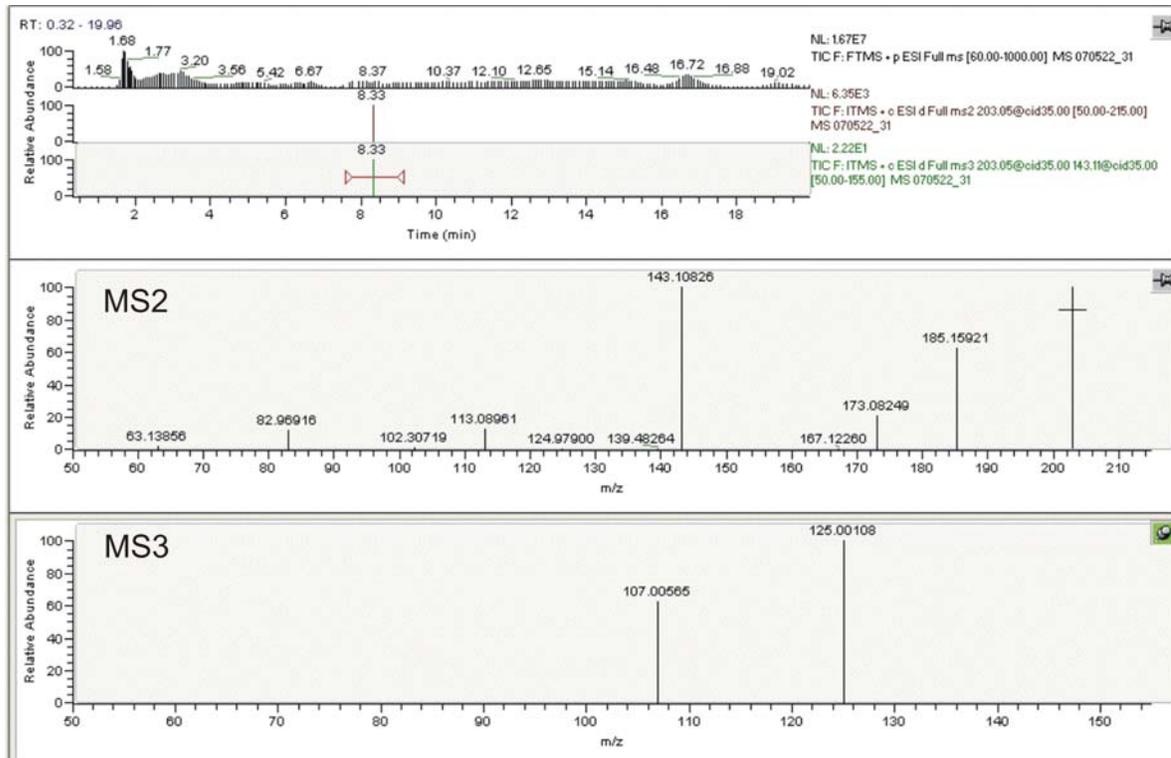


Abb. 32: Mit HPLC/MS gemessene Fragmentspektren der MS²- und MS³-Experimente der Substanz mit der Masse 203,05374 [m/z].

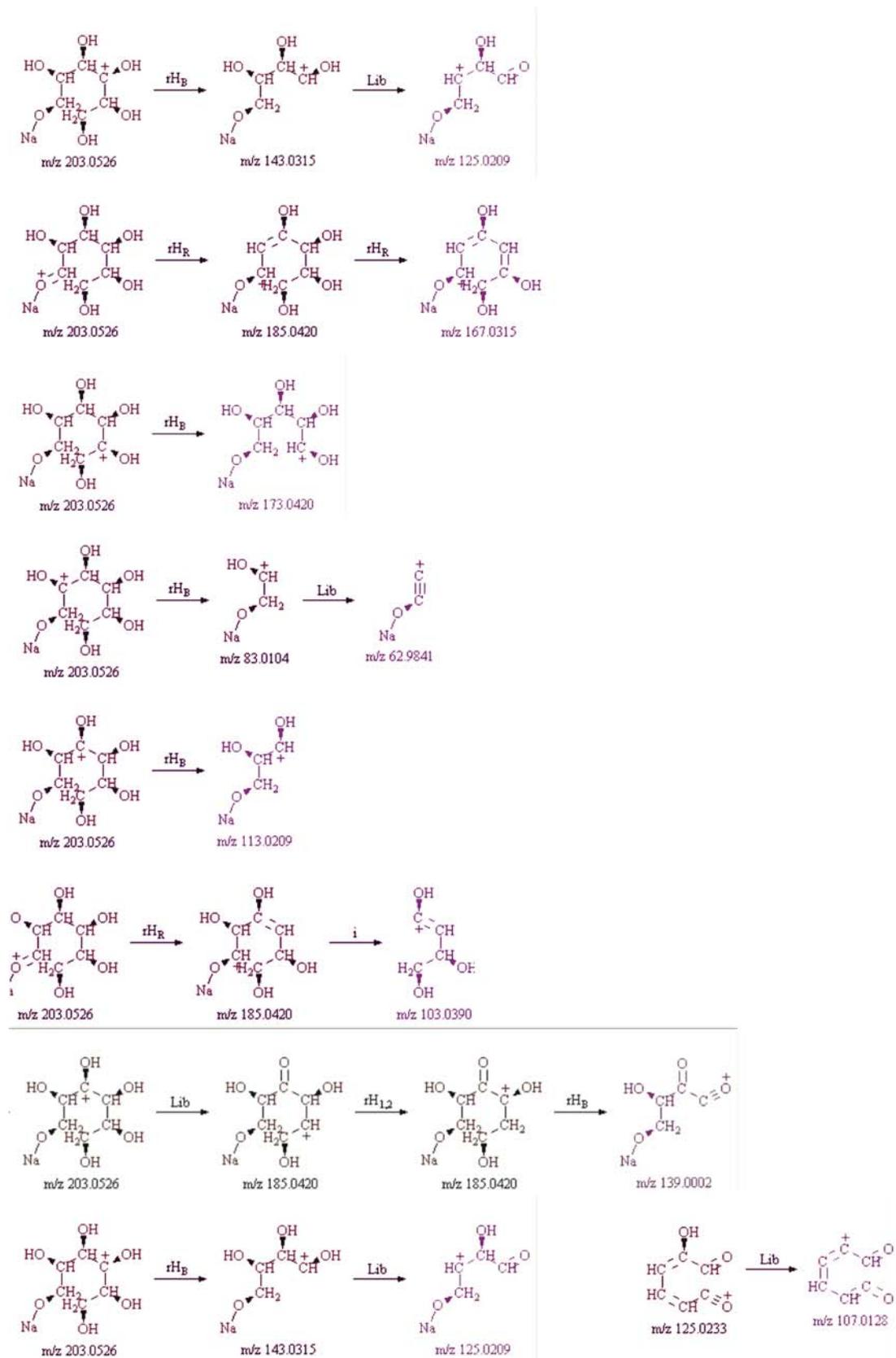


Abb. 33: Mittels MassFrontier errechnete Fragmente der Substanz mit der Masse 203,05374 [m/z].

Metabolomics ist im Vergleich zu den anderen Plattformen ein relativ neues Forschungsfeld. Aus diesem Grund sind bisher noch nicht alle in der Natur vorkommenden Metabolite nachgewiesen bzw. identifiziert. Obwohl die 37 Peaks keinen Substanzen zugeordnet werden konnten, zeigen sie dennoch die Unterschiede und Ähnlichkeiten der drei Zelllinien. Das Auftreten der nichtflüchtigen Metabolite, die im positiven und negativen Ionisationsmodus mittels HPLC/MS ermittelt werden konnten, zeigen, dass die Zelllinien NCM460 und SW-1116 (Broders Grad 2 / Duke-Stadium A) mehr Gemeinsamkeiten im Metabolismus aufweisen als die beiden Krebszelllinien untereinander. Außerdem konnten anhand von sieben Unterschieden (SW-1116: 6 Peaks, SW-480: 1 Peak) sowohl die Krebs- von den gesunden Zellen als auch die Krebsstadien voneinander unterschieden werden.

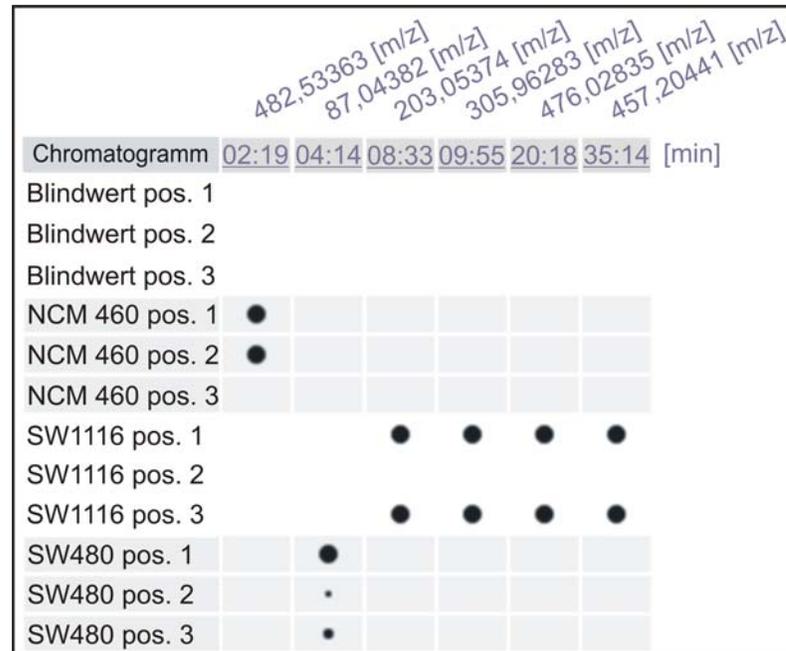
6.3.4.2 Softwaregestützte Auswertung der generierten Daten (MeltDB)

Die Daten wurden zusätzlich zur Software MZmine mit MeltDB ausgewertet, da mit dieser Software weitere statistische Berechnungen möglich waren.

Lediglich zwei der acht mit MZmine nachgewiesenen Peaks fehlen in der MeltDB-Auswertung (siehe Tab. 43). Im Gegensatz zu dem Peak der Masse 351,21399 [m/z] konnte der mit der Masse 320,96918 [m/z] zwar durch MeltDB detektiert, allerdings nicht annotiert werden, da ein anderer (203,05374 [m/z]) zur selben Retentionszeit eluierte und annotiert wurde.

Folglich führen beide Softwareprodukte nahezu zu demselben Ergebnis bei der Ermittlung der Unterschiede in den Chromatogrammen der HPLC/MS-Daten.

Tab. 43: Softwaregestützte Auswertung (MeltDB) der mit HPLC/MS im positiven Modus detektierten Unterschiede der Zelllinien. Die Punktgröße repräsentiert die relative Peakintensität.



Tab. 44: Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden softwarebasierten Auswertemethoden der mit HPLC/MS (pos. Modus) detektierten Unterschiede. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=3). Die Anzahl der Detektionen durch die Software MZmine steht in Klammern.

[M + H] ⁺ im Full Scan [m/z]	[M + H] ⁺ im SIM Scan [m/z]	Retentionszeit [min]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
482,53363	482,52927	2,2	- (-)	2 (2)	- (-)	- (-)
87,04382	-	3,9	- (-)	- (-)	- (-)	3 (3)
203,05374 (Myo-Inositol oder Scyllo-Inositol)	203,05257	8,2	- (-)	- (-)	2 (2)	- (-)
320,96918	-	8,29	- (-)	- (-)	- (2)	- (-)
305,96283	305,96060	10,2	- (-)	- (-)	2 (2)	- (-)
476,02835	-	20,2	- (-)	- (-)	2 (2)	- (-)
351,21399	351,21249	33,8	- (-)	- (-)	- (2)	- (-)
457,20441	457,20255	35,5	- (-)	- (-)	2 (2)	- (-)

Die Hauptkomponentenanalyse (siehe Abb. 34) zeigt sehr deutlich, wie die Zelllinien durch die sechs Substanzen voneinander differenziert werden können. Über die Substanz mit der Masse 482,53363 [m/z] kann die gesunde Darmzelllinie NCM460

eindeutig von den anderen Zelllinien und dem Blindwert unterschieden werden. Gleiches gilt für die Substanz mit der Masse 87,04382 [m/z], durch die die Zelllinie SW-480 von den anderen Zelllinien separierbar ist. Die zwei Proben der Zelllinie SW-1116 zeigen sogar noch deutlichere Unterscheidungsmerkmale anhand der vier produzierten Substanzen.

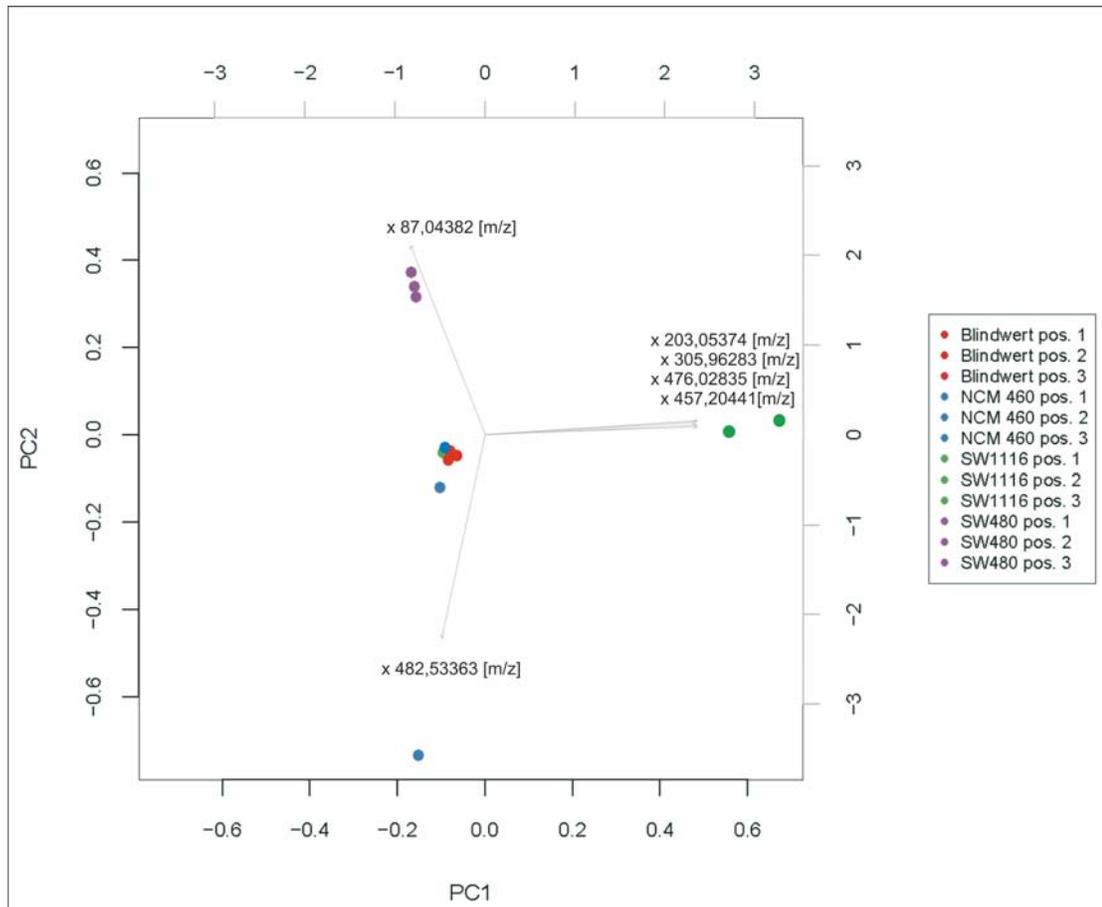


Abb. 34: Hauptkomponentenanalyse der mittels HPLC/MS im positiven Modus vermessenen Substanzen, die die Unterschiede der Zelllinien darstellen.

Anhand der Clusteranalyse der Abbildung 35 ist veranschaulicht, dass sich die Datensätze der zwei Proben von NCM460 sowie SW-1116 und drei Proben der Zelllinie SW-480 jeweils untereinander ähnlich sind und sich klar von den anderen Gruppen unterscheiden. Die restlichen zwei Proben weisen die größte Nähe zum Blindwert auf, da ihnen die entsprechenden Peaks, durch die sich die Zelllinien voneinander unterscheiden, fehlen. Außerdem zeigt die Abbildung, dass sich die Zelllinie SW-1116 am stärksten von den anderen unterscheidet.

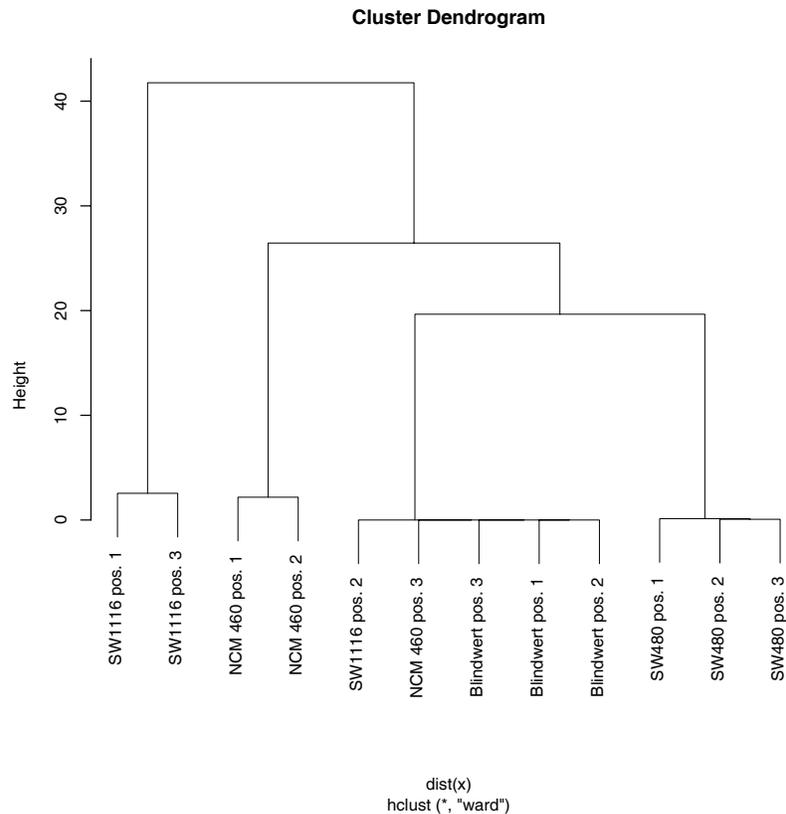


Abb. 35: Clusteranalyse der mittels HPLC/MS im positiven Modus vermessenen Substanzen, die die Unterschiede der Zelllinien darstellen.

Die Gemeinsamkeiten der Zellen wurden auch unter Zuhilfenahme der Software MeltDB untersucht.

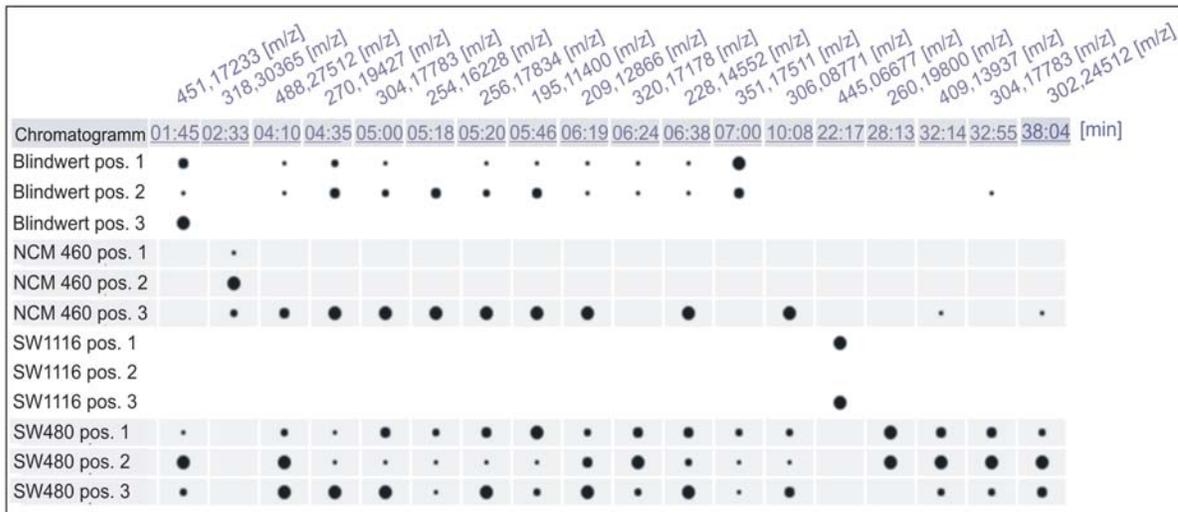
Alle Peaks konnten durch beide Softwareprodukte gleichermaßen festgestellt werden (siehe Tab. 45). Die Annotierung unterschiedlicher chromatographischer Signale zur gleichen oder sehr ähnlichen Retentionszeit wurde hier durch den gleichzeitigen Einsatz unterschiedlicher Peakdetektionsparameter realisiert (Halbwertsbreite [FWHM]: 5 / S/N: 3, FWHM: 10 / S/N: 3 und FWHM: 5 / S/N: 5). Lediglich bei dem Peak der Masse 254,16228 [m/z] konnte in einer Probe des Blindwertes nicht auf diese Art verfahren werden, da zu viele Substanzen gleichzeitig eluierten.

Bei sieben Peaks konnte nicht die gleiche Anzahl im Vergleich zur Detektion durch MZmine aufgezeigt werden, das in 4 Fällen (318,30365 [m/z], 445,06677 [m/z], 260,19800 [m/z] und 302,24512 [m/z]) zu einer veränderten Aussage führte (siehe Tab.46, fett gedruckte Zahlen). Laut MeltDB würde die Substanz der Masse 318,30365 [m/z] ausschließlich von der Zelllinie NCM460 gebildet werden und nicht, wie mit MZmine aufgezeigt, von zwei Zelllinien (NCM460 und SW-1116). Gleiches gilt analog für den Peak 445,06677 [m/z], der nun von SW-1116 anstatt von den Zelllinien

NCM460 und SW-1116 als gebildete Substanz detektiert werden konnte.

Bei dem Peak 260,19800 [m/z] verändert sich die Aussage sogar ins Gegensätzliche. Durch die Auswertung der Daten mittels MZmine galt der Peak als Substanz, die von den Zelllinien metabolisiert wurde. Da er allerdings in den Mediumproben und der Probe der Zelllinie NCM460 mit MeltDB nicht mehr detektiert wurde, würde dies zu der Aussage führen, dass diese Substanz lediglich von der Zelllinie SW-480 produziert wurde. Dies gilt ebenfalls für den Peak der Masse 302,24512, wobei hier allerdings davon auszugehen wäre, dass diese Substanz von den Zelllinien NCM460 und SW-480 produziert werden würde. Diese Ergebnisse zeigen, dass softwaregestützte Auswertungen zeitsparend sind, dennoch die Ergebnisse hinterfragt werden sollten bevor eine Aussage getroffen wird.

Tab. 45: Softwaregestützte Auswertung (MeltDB) der mit HPLC/MS (pos. Modus) detektierten Gemeinsamkeiten der Zelllinien. Die Punktgröße repräsentiert die relative Peakintensität.



Tab. 46: Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden softwarebasierten Auswertemethoden der mittels HPLC/MS (pos. Modus) detektierten Gemeinsamkeiten. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=3). Die Anzahl der Detektionen durch die Software MZmine steht in Klammern.

[M + H] ⁺ im Full Scan [m/z]	[M + H] ⁺ im SIM Scan [m/z]	Retentionszeit [min]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
451,17233	-	1,7	3 (3)	- (-)	- (-)	3 (3)
318,30365	-	2,7	- (-)	3 (3)	- (1)	- (-)
488,27512	488,27115	4,0	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
270,19427	270,19235	4,4	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
304,17783	304,17670	4,9	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
256,17834	256,17673	5,2	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
254,16228	254,16107	5,5	1 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
195,11400	195,11278	5,5	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
209,12866	209,12842	5,9	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
320,17178	320,17163	6,3	2 (2)	- (1)	- (-)	3 (3)
228,14552	228,14545	6,5	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
351,17511	351,17606	7,4	2 (2)	- (1)	- (-)	3 (3)
306,08771	306,08524	9,9	- (-)	1 (1)	- (-)	3 (3)
445,06677	-	22,1	- (-)	- (1)	2 (2)	- (-)
260,19800	260,19678	28,2	- (2)	- (1)	- (-)	2 (3)
409,13937	409,13858	32,6	- (-)	1 (1)	- (-)	3 (3)
304,16663	304,16150	33,0	1 (2)	- (1)	- (-)	3 (3)
302,24512	302,24371	37,8	- (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)

Durch die räumliche Nähe der Proben mit wenig (BW Probe 3, NCM Probe 1 und 2 bzw. SW-1116 Probe 1, 2 und 3) und die mit vielen Peaks werden die Gemeinsamkeiten der Zelllinien in den Abb. 36 und 37 verdeutlicht.

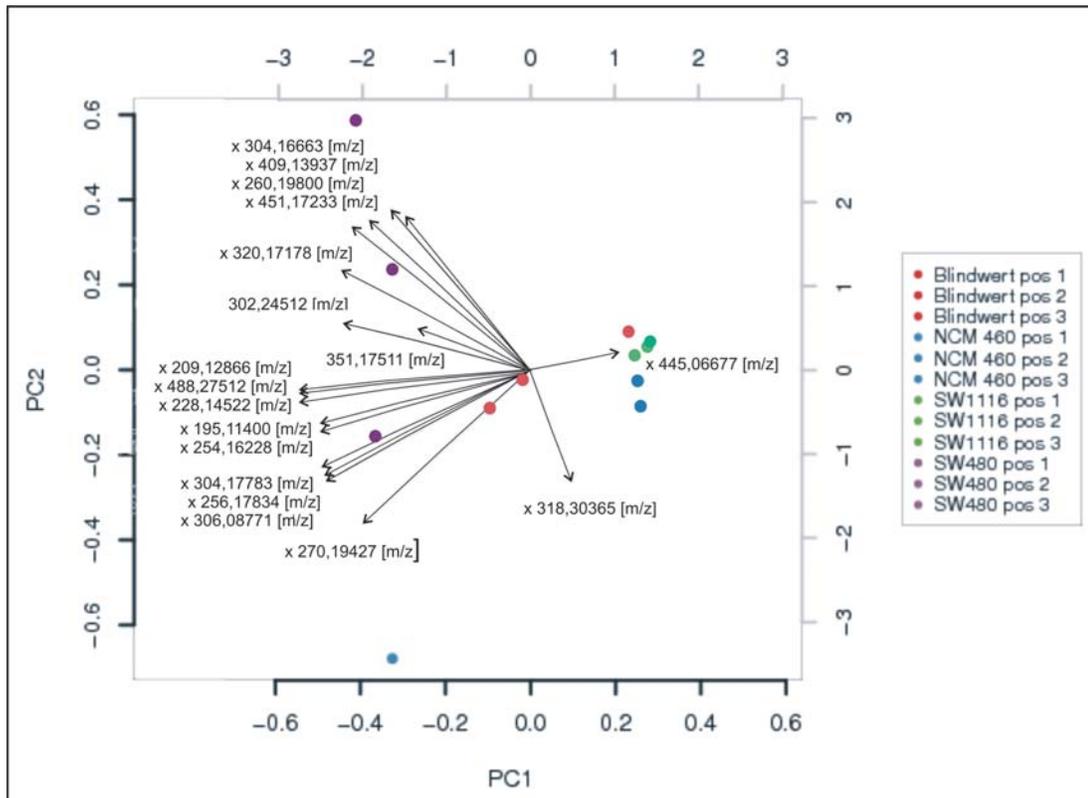


Abb. 36: Hauptkomponentenanalyse der mittels HPLC/MS im positiven Modus vermessenen Substanzen, die die Gemeinsamkeiten der Zelllinien darstellen.

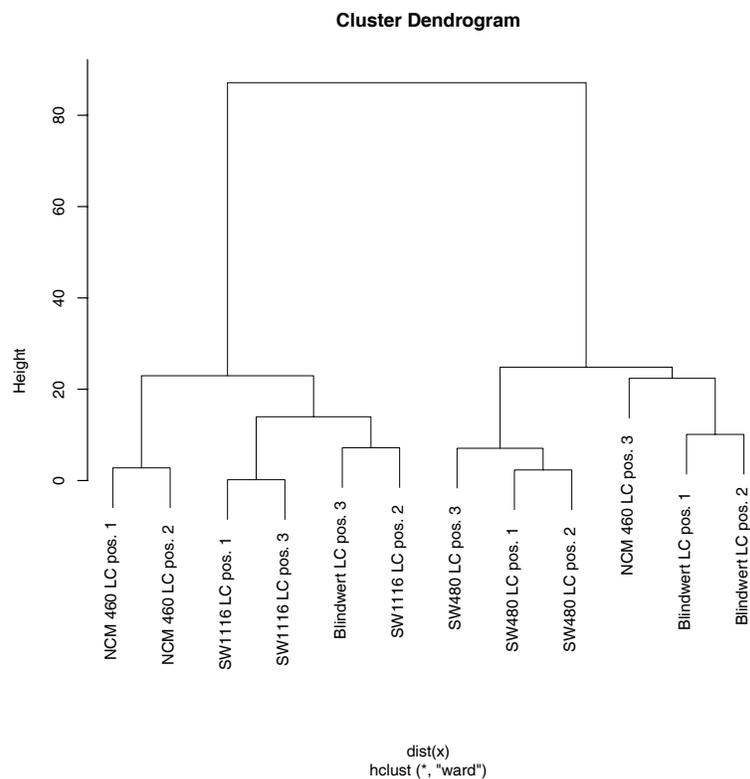
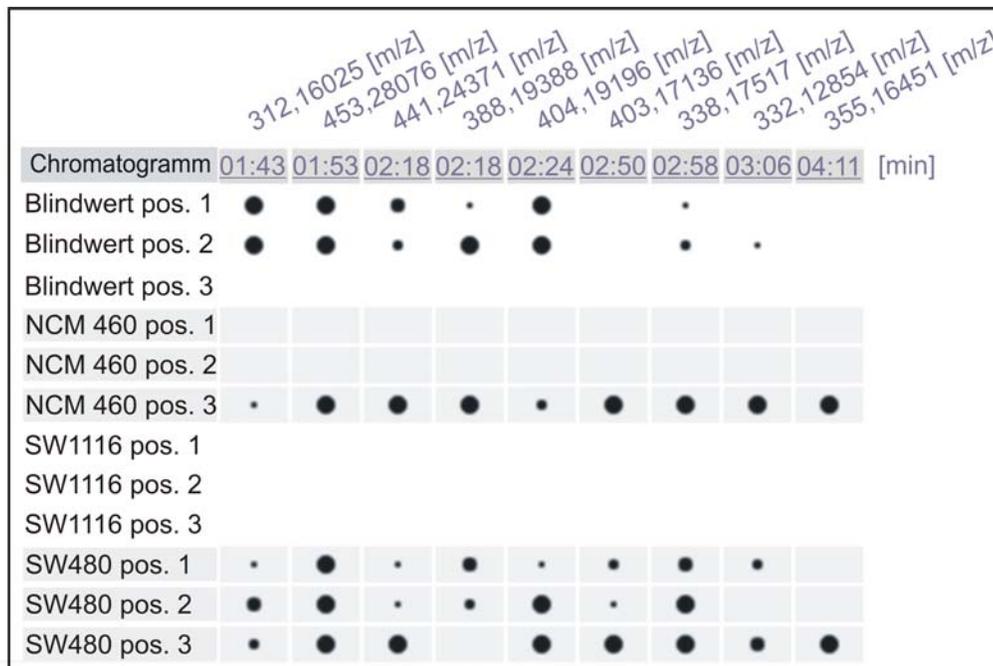


Abb. 37: Clusteranalyse der mittels HPLC/MS im positiven Modus vermessenen Substanzen, die die Gemeinsamkeiten der Zelllinien darstellen.

Als letzten Punkt soll auf die Ergebnisse der MeltDB-Software im negativen Modus eingegangen und mit den Ergebnissen der MZmine-Software verglichen werden. Unterschiede der Zelllinien konnten im negativen Modus nicht festgestellt werden. In Bezug auf die Gemeinsamkeiten der Zelllinien kamen die beiden Auswertemethoden zu abweichenden Ergebnissen. Während durch MZmine 11 Peaks detektiert wurden, konnten mit MeltDB nur neun von ihnen nachgewiesen werden (siehe Tab. 48), von denen acht exakt das gleiche Detektionsmuster zeigten. Aufgrund vieler gleichzeitig eluierender Substanzen konnten nicht alle annotiert werden, obwohl sie nachzuweisen waren (Peaks mit * markiert). Nur der Peak der Masse 355,16451 wurde in den Blindwertproben und in zwei der SW-480 Proben tatsächlich nicht ermittelt, wodurch es zu einer geänderten Aussage kam. Anhand der Ergebnisse der MeltDB Software würde nun davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Peak fälschlicherweise um eine von den Zelllinien NCM460 und SW-480 produzierte Substanz handelt.

Tab. 47: Softwaregestützte Auswertung (MeltDB) der mit HPLC/MS (neg. Modus) detektierten Gemeinsamkeiten der Zelllinien. Die Punktgröße repräsentiert die relative Peakintensität.



Tab. 48: Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden softwarebasierten Auswertemethoden der mit HPLC/MS (neg. Modus) detektierten Gemeinsamkeiten. Die in den Zellen aufgeführte Zahl gibt die Anzahl der Proben an, in denen die Substanz detektiert wurde (max. n=3). Die Anzahl der Detektionen durch die Software MZmine steht in Klammern. * = Mit MeltDB zwar detektierte Peaks, aber durch zeitgleiche Elution mit anderen Peaks keine Annotationsmöglichkeit.

[M - H] ⁻ im Full Scan [m/z]	[M - H] ⁻ im SIM Scan [m/z]	Retentionszeit [min]	DMEM/F12 Medium	NCM460	SW-1116	SW-480
312,16025	312,15646	1,4	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
453,28076	-	1,9	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
441,24371	441,23547	2,2	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
388,19388	388,18774	2,3	2 (2)	1 (1)	- (-)	2+1* (3)
404,19196	404,18259	2,2	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
403,17136	403,16876	3,0	2* (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
338,17517	338,17212	2,8	2 (2)	1 (1)	- (-)	3 (3)
332,12854	332,12509	3,1	1+1* (2)	1 (1)	- (-)	2+1* (3)
355,16451	355,16248	4,1	- (2)	1 (1)	- (-)	1 (3)
467,21806	-	5,5	- (2)	- (1)	- (-)	- (3)
256,09488	256,09387	8,5	- (2)	- (1)	- (-)	- (3)

Durch die Hauptkomponentenanalyse und die Clusteranalyse (siehe Abb. 38 und 39) werden die Gemeinsamkeiten der Zelllinien verdeutlicht: Die Proben mit und ohne Peakdetektionen können jeweils aufgrund der großen Ähnlichkeit ihrer Daten nicht voneinander separiert werden.

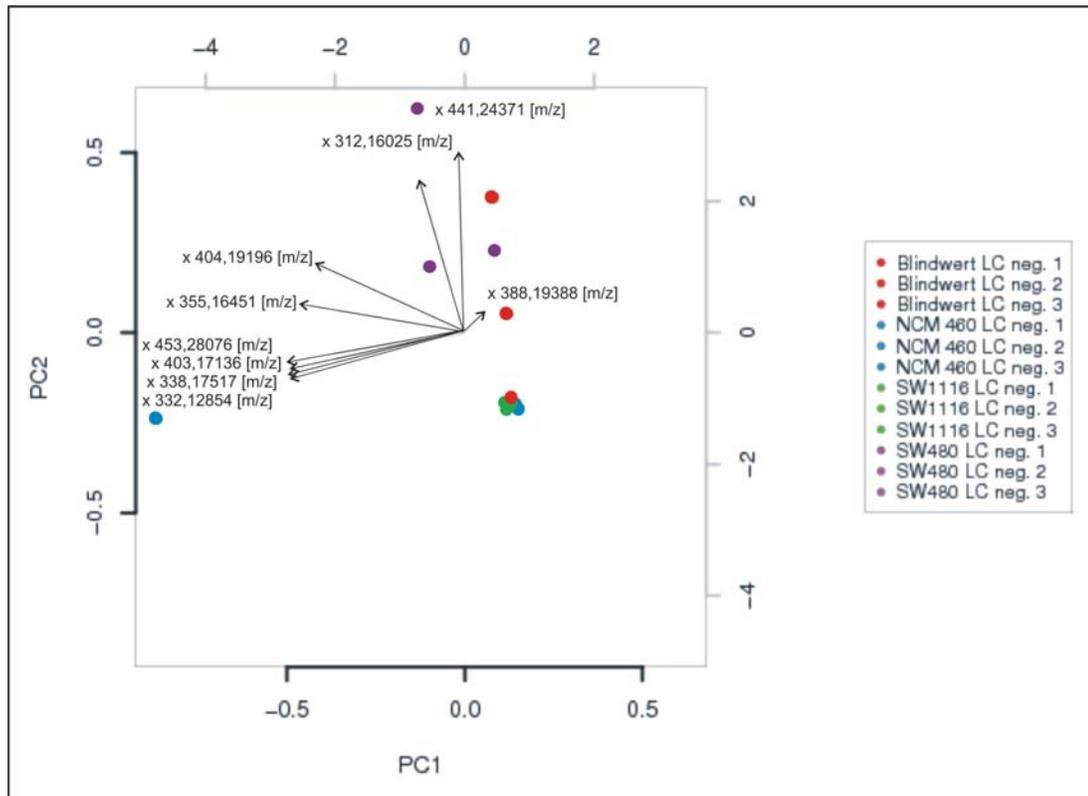


Abb. 38: Hauptkomponentenanalyse der mittels HPLC/MS im negativen Modus vermessenen Substanzen, die die Gemeinsamkeiten der Zelllinien darstellen.

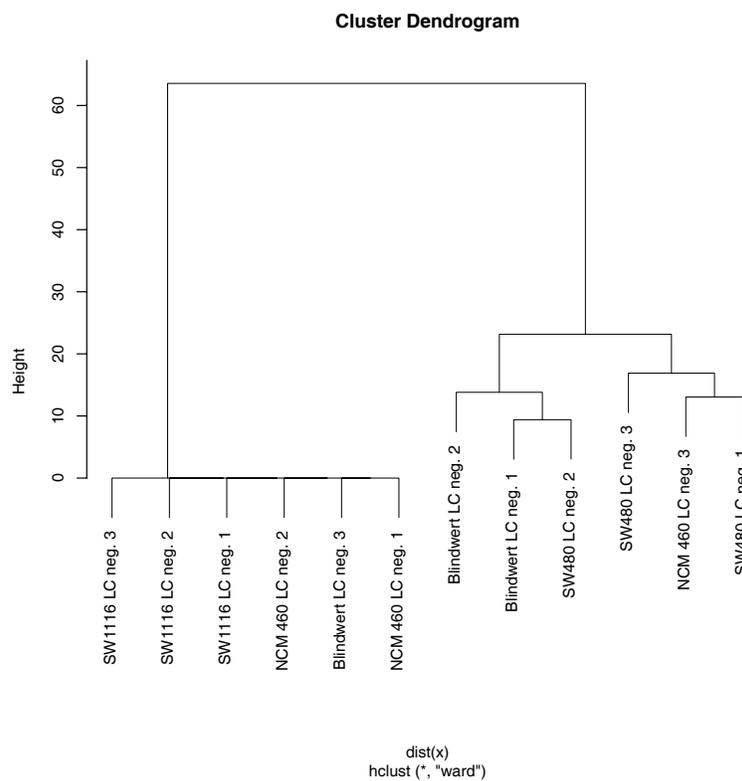


Abb. 39: Clusteranalyse der mittels HPLC/MS im negativen Modus vermessenen Substanzen, die die Gemeinsamkeiten der Zelllinien darstellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass unter Anwendung der entwickelten Methoden 8 Unterschiede und 29 Gemeinsamkeiten der nichtflüchtigen Metabolite ermittelt werden konnten. Die zwei unterschiedlichen Softwareprodukte führten nahezu zu denselben Resultaten. Die Ergebnisse hängen allerdings von den gesetzten Parametern ab, denn manch vorhandener Peak konnte nicht detektiert werden, so dass es zu geänderten Aussagen zum Bildung- bzw. Metabolisierungsverhalten der Zellen gekommen ist.

Dieser Ansatz deckt neben der Analysen von flüchtigen und schwerflüchtigen Stoffwechselprodukten einen weiteren Bereich der Metabolite von Zellkulturen ab.

7 Zusammenfassung

Den Kultivierungsbedingungen der Zellen, die für Metabolitanalysen eingesetzt werden sollen, wurde in mehrfacher Hinsicht bisher zu wenig Beachtung geschenkt. Anhand der veröffentlichten Arbeiten an Zelllinien wird deutlich, dass fast ausschließlich unter Antibiotika- und FCS-Zugabe kultiviert wird. Hierbei wird nicht berücksichtigt, dass Antibiotika Substanzen sind, die den Zellen in vivo im Regelfall nicht zur Verfügung stehen und den natürlichen Metabolismus verändern könnten. Die Kultivierung mit FCS birgt ebenfalls Risiken, da es in seiner Zusammensetzung schwankt und sich diese Schwankungen auf die Ergebnisse auswirken können. Auch die Bestimmung der Generationszeit wird oft vernachlässigt. Um gleiche Zellzahlen zum Zeitpunkt der Metabolitmessungen für vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten, muss die jeweilige Einsatzdichte der Zellen für die Experimente über die Verdopplungsrate bestimmt werden. Diese kann sich innerhalb weniger Subkulturstadien enorm beschleunigen. Aus den genannten Gründen wurde diesen drei Aspekten der Kultivierung in dieser Arbeit zunächst besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Die Vermutung, dass Antibiotika den Stoffwechsel verändern, konnte anhand von drei Substanzen, die nur in Gegenwart der Zellen metabolisiert wurden, bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde auf deren Zugabe verzichtet und die Darstellung eines möglichst unbeeinflussten Metabolismus durch exakt steriles Arbeiten erreicht.

Um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu erhöhen, wurde versucht, FCS als Standardadditiv der Medien abzulösen. Hierzu wurden drei verschiedene serumreduzierte bzw. -freie Medien im Vergleich zum Standard getestet. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Kultivierung der Zellen ohne jegliche Zugabe von FCS zur Zeit noch nicht möglich ist. Die besten Resultate wurden mit einem serumreduzierten Medium (1% FCS) erzielt. Im Gegensatz zu den serumfreien Medien waren weder eine Veränderung der Morphologie noch ein veränderter Metabolismus nachweisbar.

Da sich die Generationszeit über die Subkulturstadien beschleunigen kann, wurde sie für jede der drei Zelllinien, die in die Metabolitanalysen einbezogen wurden, bestimmt. Während sich die Verdopplungszeiten für die Zelllinien SW-1116 und NCM460 seit ihrer Etablierung kaum verändert hatten, halbierte sich die Generationszeit von SW-480 von 60 auf 30 Stunden. Die Einsatzdichte der Zellen für die anstehenden Experimente wurde entsprechend angepasst.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war die Methodenentwicklung eines breit gefächerten Ansatzes zum Nachweis von Stoffwechselprodukten unterschiedlicher Flüchtigkeit und Aggregatzustände aus *einer* Zellkulturprobe. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Probenahmestrategien getestet und mit geeigneten Detektionsmethoden kombiniert.

Im Allgemeinen erfolgt die Untersuchung flüchtiger Metabolite von Zelllinien, indem das Medium abgenommen, in ein Probegefäß überführt und erst anschließend vermessen wird. Durch die Überführung verliert man allerdings den Anteil der Metabolite, der sich bis dahin in der Gasphase über den Zellen angesammelt hat. Durch diese „indirekte“ Methode können schwach konzentrierte Substanzen, die zur Klassifizierung von Zellen relevant sein können, unter der Nachweisgrenze der eingesetzten Detektionsmethode liegen.

Um dem vorzubeugen, wurde eine direkte Probenahme flüchtiger Metabolite für GC/MS- und IMS-Analysen entwickelt. Hierdurch war es zum ersten Mal möglich, die Probe direkt aus dem Kultivierungsgefäß zu entnehmen, ohne einen Konzentrationsverlust der Analyte zu riskieren. Da nun das Kultivierungsgefäß gleichzeitig als Probenahmegefäß diente, musste dessen Eignung für die Metabolitanalysen in Bezug auf materialbedingte Hintergrundsignale überprüft werden. In der Literatur sind sowohl Plastikflaschen als auch Glasbehältnisse aufgeführt. Beide wurden in dieser Arbeit getestet. Der Glaskolben verursachte weniger Störsignale und wurde deshalb in den folgenden Experimenten eingesetzt, so dass einer Überlagerung schwach konzentrierter Substanzen vorgebeugt werden konnte.

Für die Analyse der schwerflüchtigen Metabolite wurde eine Methode am Medium unter Einsatz des Derivatisierungsmittels TMSH entwickelt, die zum Nachweis neun gebildeter Substanzen führte. Als Detektionsmethode wurde hier ausschließlich GC/MS angewendet, da IMS für flüssige Proben nicht geeignet ist.

Als Aufschlussverfahren für die Untersuchung nichtflüchtiger, intrazellulärer Metabolite erhielt der Glasschaber gegenüber dem schnellen Wechsel von Einfrieren / Auftauen den Vorzug, da durch diese Methode die Menge an aufgeschlossenen Zellen wesentlich höher ausfiel. Bei der Aufkonzentrierung schnitt die Vakuumtrocknung besser als die SPE ab, da sie eine bessere Wiederfindungsrate der Substanzen aufwies. HPLC/MS diente als Detektionsmethode.

Nach der Methodenentwicklung für die Analyse von flüchtigen, schwer- und nichtflüchtigen Metabolite wurde deren Funktionalität an zwei Darmkrebszelllinien (SW-1116 und SW-480) und einer normal epithelialen Darmzelllinie (NCM460) überprüft.

Die Analyse der flüchtigen Metabolite führte mit GC/MS zum Nachweis von vier Peaks in den Chromatogrammen, die Unterschiede und sieben, die Gemeinsamkeiten der drei Zelllinien darstellen. Alle elf Substanzen wurden identifiziert. Über IMS konnten drei Unterschiede und acht Gemeinsamkeiten der Zellen ermittelt werden. Um die Ergebnisse der Analyte beider Detektionsmethoden abzugleichen, wurden die elf durch GC/MS ermittelten Substanzen in das Ionenmobilitätsspektrometer eingeleitet. Eine Übereinstimmung zeigte sich lediglich bei zwei der elf Substanzen. Im Bereich der flüchtigen Metabolite konnten insgesamt drei Analyte ermittelt werden, die ausschließlich von den Krebszellen produziert wurden. Diese Substanzen könnten als Biomarker eingesetzt werden, wenn sie sich auf den menschlichen Körper übertragen ließen.

Obwohl die Methode für die Analyse der schwerflüchtigen Metabolite am Medium erfolgreich entwickelt wurde und derivatisierte Substanzen mit GC/MS nachgewiesen werden konnten, zeigten die Chromatogramme der Zelllinien unter gleichen Bedingungen keine Abweichungen voneinander. Zwar ließen sich unabhängig von der TMSH-Zugabe drei Unterschiede und zwei Gemeinsamkeiten in den Chromatogrammen erkennen, diese Signale schienen aber von schwerflüchtigen Analyten zu kommen, die auch ohne Derivatisierung eine ausreichende Thermostabilität aufwiesen. Eine Identifizierung dieser Peaks war aufgrund von Trennschwierigkeiten nicht möglich. Auch bei den schwerflüchtigen Metaboliten konnten zwei Peaks nachgewiesen werden, die ausschließlich in den Krebschromatogrammen vorkamen, wodurch sie ebenfalls Biomarkerpotential aufweisen.

Die entwickelte Methode zur Analyse der nichtflüchtigen Metabolite der drei Zelllinien führte mit HPLC/MS zu 8 Unterschieden und 29 Gemeinsamkeiten. Von diesen 37 Peaks konnte nur eine Substanz identifiziert werden, die Fragmentspektren der restlichen Peaks stimmten mit denen bekannter Metabolite aus Datenbanken nicht überein. Die hohe Anzahl gemeinsam auftretender Signale der normal epithelialen Darmzelllinie NCM460 und der weniger stark entarteten Darmkrebszelllinie SW-1116 offenbarte, dass deren Metabolismus mehr Ähnlichkeiten als der Metabolismus der beiden Krebszelllinien untereinander aufweist. Auch bei den nichtflüchtigen Stoffwechselprodukten wurden sieben Peaks detektiert, die für produzierte Substanzen stehen

und damit eindeutig Krebs nachweisen.

Mit allen drei Methoden konnten Gemeinsamkeiten im Stoffwechsel gezeigt werden, die einen weiteren Schritt zur Charakterisierung der Zellen bedeuten. Die Unterschiede differenzieren nicht nur die gesunden von den Krebszellen, sondern auch die verschiedenen Tumorgrade voneinander, so dass sie als Biomarker eingesetzt werden könnten.

8 Ausblick

Mit den neu entwickelten Methoden für Metabolituntersuchungen wurden Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Darmkrebs und gesunden Darmzellen aufgezeigt. Die Kombination verschiedener Detektionsmethoden und Probenahme-strategien führte zum Nachweis einer Vielzahl an Metaboliten, von denen einige zum ersten Mal mit dem Metabolismus von menschlichen Dickdarmkrebszellen in Verbindung gebracht werden konnten. Diese Methoden können in Zukunft verfeinert und eingesetzt werden, um zum einen in der Grundlagenforschung Zelllinien anderen organischen Ursprungs auf der Metabolitebene zu charakterisieren, so dass ein tieferes Verständnis für die Komplexität des Metabolismus erlangt wird.

Zum anderen sollten die entwickelten Methoden vom Zellkulturmodell auf den menschlichen Körper übertragen werden: Dies kann zunächst auf der Ebene von Biopsiematerial geschehen, um Tumore und gesundes Gewebe zu vergleichen. Die ausschließlich von den Krebszellen gebildeten Stoffe könnten dabei als Biomarker fungieren und in der Diagnose von Krebs eingesetzt werden. Es wäre sinnvoll, unterschiedliche Krebsarten zu untersuchen, um unterscheiden zu können, ob es sich allgemein um gebildete Substanzen von Krebsgewebe handelt oder sie charakteristisch von einer bestimmten Krebsform gebildet werden.

Unter der Voraussetzung, dass die Untersuchungen am Biopsiematerial Unterschiede erkennen lassen, könnte Serum im folgenden Schritt als Probenmatrix der Biomark-ersuche eingesetzt werden. Da es sich bei Tumoren um gut durchblutetes Gewebe handelt und die extrazellulären oder durch Nekrose freigesetzten intrazellulären Metabolite in den Blutkreislauf eintreten, müssten sie im Serum nachweisbar sein.

9 Referenzen

- [1] Urbanczyk-Wochniak, E., Luedemann, A., Kopka, J. *et al.* Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology. *EMBO reports* 4(10), 989-993 (2003).
- [2] Kell, DB. and Mendes, P. Snapshots of systems: metabolic control analysis and biotechnology in the post-genomic era. In Technological and Medical Implications of Metabolic Control Analysis. *Kluwer Academic Publishers* 3–25 (2000).
- [3] Fell, DA. Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. *Biochem J* 286(2), 313–330 (1992).
- [4] Raamsdonk, LM., Teusink, B., Broadhurst, D. *et al.* A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* 19(1), 45-50 (2001).
- [5] Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, WB. *et al.* Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* 22(5), 245-252 (2004).
- [6] Feist, AM., Henry, CS., Reed, JL., *et al.* A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol Syst Biol*, 3: 121 (2007).
- [7] Kell, DB. Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. *Drug Discov Today* 11(23-24), 1085–1092 (2006).
- [8] Hartmann, T., Kutchan, TM. and Strack, D. Evolution of metabolic diversity. *Phytochem* 66(11), 1198–1199 (2005).
- [9] Raniin, I., Wang, V., Sausville, E. *et al.* IAP-Family Protein Survivin Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas (CD95), Bax, Caspases, and Anticancer Drugs. *Cancer Res* 58, 5315-5320 (1998).
- [10] Viant, MR., Rosenblum, ES. and Tjeerdema, RS. NMR-Based Metabolomics: A Powerful Approach for Characterizing the Effects of Environmental Stressors on Organism Health. *Environ Sci Technol* 37, 4982-4989 (2003).
- [11] Gibney, MJ., Walsh, M., Brennan, L. *et al.* Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *Am J Clin Nutr* 82, 497-503 (2005).
- [12] German, JB., Hammock, BD. and Watkins, SM. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics* 1, 3-9 (2005).
- [13] Rashed, MS. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J Chrom B Biomed Sci Appl* 758(1), 27-48 (2001).

- [14] Matsumoto, I. and Kuhara, T. A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry - rapid, practical, and simultaneous urinary metabolites analysis. *Mass Spectrom Rev* 15(1), 43 - 57 (1998).
- [15] Bailey, JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252(5013), 1668-1675 (1991).
- [16] Madison, LL. and Huisman, GW. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(1), 21-53 (1999).
- [17] Deng, C., Zhang, X. and Li, N. Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 808(2), 269-277 (2004).
- [18] Singer, S., Souza, K. and Thilly, WG. Pyruvate Utilization, Phosphocholine and Adenosine Triphosphate (ATP) are Markers of Human Breast Tumor Progression: A ^{31}P - and ^{13}C -NuclearMagnetic Resonance (NMR) Spectroscopy Study. *Cancer Res* 55, 5140-5145 (1995).
- [19] Katz-Brull, R., Seger, D., Rivenson-Segal, D. *et al.* Metabolic Markers of Breast Cancer: Enhanced Choline Metabolism and Reduced Choline-Ether-Phospholipid Synthesis. *Cancer Res* 62, 1966-1970 (2002).
- [20] Yi, LZ., Yuan, DL., Che, ZH. *et al.* Plasma fatty acid metabolic profile coupled with uncorrelated linear discriminant analysis to diagnose and biomarker screening of type 2 diabetes and type 2 diabetic coronary heart diseases. *Metabolomics* 4, 30-38 (2008).
- [21] Villas-Bôas, SG., Mas, S., Akesson, M. *et al.* Mass Spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spec Rev* 24, 613-646 (2005).
- [22] Goodacre, R. Metabolomics – the way forward. *Metabolomics* 1(1), 1-2 (2005).
- [23] <http://www.biowest.net/eu/composition.php?reff=608>
- [24] <http://www.biowest.net/eu/composition.php?reff=291>
- [25] <http://www.biowest.net/eu/compsition.php?reff=082>
- [26] Jochems, CEA., van der Valk, JBF., Stafleu, FR. *et al.* The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim* 30, 219-227 (2002).
- [27] Falkner, E., Appl, H., Eder, C. *et al.* Serum free cell culture: The free access online database. *Toxicol In Vitro* 20, 395-400 (2006).
- [28] Maroly, A. Masterarbeit: The development of a sensitive method to study volatile organic compounds in gaseous emission of lung cancer cell lines. Texas A&M University (2005).
- [29] Tanaka, K., Hine, DG., West-Dull, A. *et al.* Gas-chromatographic method of analysis for urinary organic acids. I. Retention indices of 155 metabolically important compounds. *Clin Chem* 26(13), 1839-1846 (1980).

- [30] Ma, L. Doktorarbeit: Mercaptursäure und Nucleosidaddukt im Harn als Biomarker in 1-Hydroxymethylpyren-exponierten Ratten. Universität Potsdam (2001).
- [31] Matsumoto, I. and Kuhara, T. A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry—rapid, practical and simultaneous urinary metabolites analysis. *Mass Spectrom Rev* 15, 43–57 (1996).
- [32] Villas-Bôas, SG., Moxley, JF., Åkesson, M. *et al.* High-throughput metabolic state analysis: The missing link in integrated functional genomics of yeasts. *Biochem J* 388, 669–677 (2005).
- [33] Lowe, R., Go, EP., Tong, GC. *et al.* Monitoring EDTA and endogenous metabolite biomarkers from Serum with mass spectrometry. *Spectroscopy* 19, 137-146 (2005).
- [34] Belardi, RP. and Pawliszyn, J. The Application of Chemically Modified Fused Silica Fibers in the Extraction of Organics from Water Matrix Samples and their Rapid Transfer to Capillary Columns. *Water Pollut Res J Can* 24, 179-191 (1989).
- [35] Michel, F. HPLC – Moderne Phasen für eine effiziente Methodenentwicklung. Firmenprospekt Supelco (2004).
- [36] Eisert, R. and Levsen, K. Determination of organophosphorus, triazine and 2,6-dinitroaniline pesticides in aqueous samples via solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Anal Bioanal Chem* 351(6), 555-562 (1995).
- [37] Yang, SS., Huang, CB. and Smetena, I. Optimization of headspace sampling using solid-phase microextraction for volatile components in tobacco. *J Chromatogr A* 941(1-2), 33-39 (2002).
- [38] Lindsey, ME., Meyer, M. and Thurman, EM. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 73, 4640-4646 (2001).
- [39] Lackmann, GM., Schaller, KH. and Angerer, J. Lactational Transfer of Presumed Carcinogenic and Teratogenic Organochlorine Compounds within the First Six Months of Life. *Z Geburtshilfe Neonatol* 209, 186-191 (2005).
- [40] Moeller, MR., Fey, P. and Wennig, R. Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci Int* 63(1-3), 185-206 (1993).
- [41] Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., *et al.* Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* 18, 1157 - 1161 (2000).

- [42] D'Agostino, PA., Hancock, JR. and Provost, LR. Determination of sarin, soman and their hydrolysis products in soil by packed capillary liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 912(2), 291-299 (2001).
- [43] Freitas, LG., Götz, CW., Ruff, M. *et al.* Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1028(2), 277-286 (2004).
- [44] Jeannot, R. and Sauvard, E. High-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry applied to analyses of pesticides in water. Results obtained in HPLC/MS/APCI in positive mode. *Analisis* 27, 271-280 (1999).
- [45] Lytle, CA., Gan, YDM., Salone, K. *et al.* Sensitive characterization of microbial ubiquinones from biofilms by electrospray/mass spectrometry. *Environ Microbiol* 3(4), 265–272 (2001).
- [46] Ruangyuttikarn, W., Miksik, I., Pekkoh, J. *et al.* Reversed-phase liquid chromatographic–mass spectrometric determination of microcystin-LR in cyanobacteria blooms under alkaline conditions. *J Chromatogr B* 800(1-2), 315-319 (2004).
- [47] Tolstikov, VV., Lommen, A., Nakanishi, K. *et al.* Monolithic silica-based capillary reversed-phase liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for plant metabolomics. *Anal Chem* 75, 6737-6740 (2003).
- [48] Buchholz, A., Takors, R. and Wandrey, C. Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques. *Anal Biochem* 295(2), 129-137 (2001).
- [49] Viant, MR., Lyeth, BG., Miller, MG. *et al.* An NMR metabolomic investigation of early metabolic disturbances following traumatic brain injury in a mammalian model. *NMR Biomed* 18, 507–516 (2005).
- [50] Cerniglia, CE. and Gibson, DT. Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol* 43(4), 363-370 (1977).
- [51] McGann, WJ., Haigh, P. and Neves, JL. Expanding The Capability of IMS Explosive Trace Detection. *IJIMS* 5(3), 119-122 (2002).
- [52] Rearden, P. and Harrington, PB. Rapid screening of precursor and degradation products of chemical warfare agents in soil by solid-phase microextraction ion mobility spectrometry (SPME–IMS). *Anal Chim Acta* 545(1), 13-20 (2005).
- [53] Keller, T. Detection of designer drugs in human hair by ion mobility spectrometry (IMS). *Forensic Sci Int* 94(1-2), 55-63 (1998).
- [54] Moye, HA. Plasma chromatography of pesticides. *J Chromatogr Sci* 13(6), 285-290 (1975).

- [55] Vautz, W. and Baumbach, JI. Analysis of Bio-Processes using Ion Mobility Spectrometry. *Eng. Life Sci* 8(1), 19–25 (2008).
- [56] Ruzsanyi, V. Doktorarbeit: Analyse flüchtiger Metaboliten von der Ausatemluft mittels Ionenmobilitätsspektrometer. Universität Dortmund (2004).
- [57] Baumbach, JI. and Westhoff, M. Ion mobility spectrometry to detect lung cancer and airway infections. *Spectrosc Eur* 18(6), 22-27 (2005).
- [58] Lackmann, GM., Schaller, KH. and Angerer, J. Lactational Transfer of Presumed Carcinogenic and Teratogenic Organochlorine Compounds within the First Six Months of Life. *Z Geburtshilfe Neonatol* 209, 186-191 (2005).
- [59] Moeller, MR., Fey, P. and Wennig, R. Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci Int* 63(1-3), 185-206 (1993).
- [60] Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., *et al.* Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* 18, 1157 - 1161 (2000).
- [61] Van Bocxlaer, JF., Clauwaert, KM., Lambert, WE. *et al.* Liquid chromatography - mass spectrometry in forensic toxicology. *Mass Spectrom Rev* 19(4), 165-214 (2000).
- [62] D'Agostino, PA., Hancock, JR. and Provost, LR. Determination of sarin, soman and their hydrolysis products in soil by packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 912(2), 291-299 (2001).
- [63] Freitas, LG., Götz, CW., Ruff, M. *et al.* Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1028(2), 277-286 (2004).
- [64] Jeannot, R. and Sauvard, E. High-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry applied to analyses of pesticides in water. Results obtained in HPLC/MS/APCI in positive mode. *Analisis* 27, 271-280 (1999).
- [65] Lytle, CA., Gan, YDM., Salone, K. *et al.* Sensitive characterization of microbial ubiquinones from biofilms by electrospray/mass spectrometry. *Environ Microbiol* 3(4), 265–272 (2001).
- [66] Ruangyuttikarn, W., Miksik, I., Pekkoh, J. *et al.* Reversed-phase liquid chromatographic–mass spectrometric determination of microcystin-LR in cyanobacteria blooms under alkaline conditions. *J Chromatogr B* 800(1-2), 315-319 (2004).
- [67] Tolstikov, VV., Lommen, A., Nakanishi, K. *et al.* Monolithic silica-based capillary reversed-phase liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for plant metabolomics. *Anal Chem* 75, 6737-6740 (2003).

- [68] Niessen, WMA. State-of-the-art in liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 856(1-2), 179-197 (1999).
- [69] <http://www.oc.uni-koeln.de/ms-oc/esi-tc.gif>
Schäfer, M. Universität Köln, Inst. f. org. Chemie, Abt. Massenspektrometrie
- [70] Cohen, MJ. and Karasek, FW. Plasma chromatography – a new dimension for gaschromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 8, 330-337 (1970).
- [71] Ruzsanyi, V. Doktorarbeit: Analyse flüchtiger Metaboliten von der Ausatemluft mittels Ionenmobilitätsspektrometer. Universität Dortmund (2004).
- [72] Baumbach, JI. and Westhoff, M. Ion mobility spectrometry to detect lung cancer and airway infections. *Spectrosc Eur* 18(6), 22-27 (2005).
- [73] Sponring, A., Filipiak, W., Mikoviny, T. *et al.* Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 in vitro. *Anticancer Res* 29(1), 419-426 (2009).
- [74] Filipiak, W., Sponring, A., Mikoviny, T. *et al.* Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro. *Cancer Cell Int* 8(1), 17 (2008).
- [75] Bullinger, D., Neubauer, H., Fehm, F. *et al.* Metabolic signature of breast cancer cell line MCF-7: profiling of modified nucleosides via LC-IT MS coupling. *BMC Biochem* 8:25 (2007).
- [76] Katz-Brull, R., Seger, D., Rivenson-Segal, D. *et al.* Metabolic Markers of Breast Cancer: Enhanced Choline Metabolism and Reduced Choline-Ether-Phospholipid Synthesis. *Cancer Res* 62, 1966–1970 (2002).
- [77] Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Auflage (2012).
- [78] Broders, AC. The grading of carcinoma. *Minn Med* 8, 726-730 (1925).
- [79] <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov>
Winslow, T. Medical and Scientific Illustration 2005
- [80] <http://www.darmkrebs.de>
- [81] Moyer, MP., Manzano, LA., Merriman, RL. *et al.* NCM460, A normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32, 315-317 (1995).
- [82] Calonghi, N., Cappadone, C., Pagnotta, E. *et al.* Histone deacetylase 1: a target of 9-hydroxystearic acid in the inhibition of cell growth in human colon cancer. *J Lipid Res* 46(8), 1596-1603 (2005).
- [83] Calonghi, N., Cappadone, C., Pagnotta, E. *et al.* 9-Hydroxystearic acid upregulates p21(WAF1) in HT29 cancer cells. *Biochem Bioph Res Co* 314(1), 138-142 (2004).

- [84] Pagnotta, E., Calonghi, N., Boga, C. *et al.* N-methylformamide and 9-hydroxystearic acid: two anti-proliferative and differentiating agents with different modes of action in colon cancer cells. *Anti-cancer drug* 17(5), 521-526 (2006).
- [85] Babbar, N., Ignatenko, NA., Casero, RA. Jr. *et al.* Cyclooxygenase-independent induction of apoptosis by sulindac sulfone is mediated by polyamines in colon cancer. *J Biol Chem* 278(48), 47762-47775 (2003).
- [86] Babbar, N., Gerner, EW. and Casero, RA. Jr. Induction of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase (SSAT) by aspirin in Caco-2 colon cancer cells. *Biochem J.* 394, 317–324 (2006).
- [87] Moreno, A. and Arus, C. Quantitative and qualitative characterization of ¹H NMR spectra of colon tumors, normal mucosa and their perchloric acid extracts: Decreased levels of myo-inositol in tumours can be detected in intact biopsies. *NMR Biomed* 9(1), 33-45 (1996).
- [88] Denkert, C., Budczies, J., Weichert, W. *et al.* Metabolite profiling of human colon carcinoma – deregulation of TCA cycle and amino acid turnover. *Mol Cancer* 7:72 (2008).
- [89] Takahashi, S., Satomi, A., Yano, K. *et al.* Estimation of glycogen levels in human colorectal cancer tissue: relationship with cell cycle and tumor outgrowth. *J Gastroenterol* 34(4), 474-480 (1999).
- [90] Kasimos, JN., Merchant, TE., Gierke, LW. *et al.* ³¹P Magnetiv Resonance Spectroscopy in human colon cancer. *Cancer Res* 50, 527-532 (1990).
- [91] Aden, DP., Fogel, A. and Plotkin, S. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma cell line. *Nature* 282, 615-616 (1979).
- [92] Leibovitz, A., Stinson, JC., McCombs, WB., III, *et al.* Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Res* 36, 4562-4569 (1976).
- [93] Lindl, T. Zell- und Gewebekultur, 5. Auflage, Spektrum Verlag.
- [94] Altenburger, R., Kissel, L. Biotransformation of Estradiol in the Human Keratinocyte Cell Line HaCaT: Metabolism Kinetics and the Inhibitory Effect of Ethanol. *Pharm Res* 15(11), 1684-1689 (1998).
- [95] Sanduja, SK., Mehta, K., Xu, XM. *et al.* Differentiation-associated expression of prostaglandin H and thromboxane A synthases in monocytoid leukemia cell lines. *Blood* 78, 3178-3185 (1991).
- [96] Van der Valk, J., Mellor, D., Brands, R. *et al.* The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro* 18, 1–12 (2004).

- [97] Hartmann, M., Zimmermann, D. and Nolte, J. Changes of the metabolism of the colon cancer cell line SW-480 under serum-free and serum-reduced growth conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44, 458-463 (2008).
- [98] Acevedo, CA., Sánchez, EY., Reyes, JG. *et al.* Volatile Organic Compounds Produced by Human Skin Cells. *Biol Res* 40, 347-355 (2007).
- [99] Chen, X., Xu, F., Wang, Y. *et al.* A Study of the Volatile Organic Compounds Exhaled by Lung Cancer Cells In Vitro for Breath Diagnosis. *Cancer* 110(4), 835-844 (2007).
- [100] Vautz, W. and Baumbach, JI. Analysis of Bio-Processes using Ion Mobility Spectrometry. *Eng. Life Sci* 8(1), 19–25 (2008).
- [101] Van Bocxlaer, JF., Clauwaert, KM., Lambert, WE. *et al.* Liquid chromatography - mass spectrometry in forensic toxicology. *Mass Spectrom Rev* 19(4), 165-214 (2000).
- [102] Westhoff, M., Litterst, P., Freitag, L. *et al.* Ion mobility spectrometry in the diagnosis of sarcoidosis: Results of a feasibility study. *J Physiol Pharmacol* 58(5), 739-751 (2007).
- [103] Davies, AN. and Baumbach, JI. Early lung cancer diagnostics by ion mobility spectrometry data handling. *Spectrosc Europe* 20(5), 18-21 (2008).
- [104] Westhoff, M., Litterst, P., Freitag, L. *et al.* Ion mobility spectrometry: a new method for the detection of lung cancer and airway infections in exhaled air? First results of a pilot study. *Chest* 128(4), 155S (2005).
- [105] Ma, L. Doktorarbeit: Mercaptursäure und Nucleosidaddukt im Harn als Biomarker in 1-Hydroxymethylpyren-exponierten Ratten. Universität Potsdam (2001).
- [106] Matsumoto, I. and Kuhara, T. A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry—rapid, practical and simultaneous urinary metabolites analysis. *Mass Spectrom Rev* 15, 43–57 (1996).
- [107] Villas-Bôas, SG., Moxley, JF., Åkesson, M. *et al.* High-throughput metabolic state analysis: The missing link in integrated functional genomics of yeasts. *Biochem J* 388, 669–677 (2005).
- [108] Lowe, R., Go, EP., Tong, GC. *et al.* Monitoring EDTA and endogenous metabolite biomarkers from Serum with mass spectrometry. *Spectroscopy* 19, 137-146 (2005).
- [109] Müller, KD., Husmann, H., Nalik, HP. *et al.* Trans-esterification of fatty acids from microorganisms and human blood serum by trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) for GC analysis. *Chromatographia* 30 (5-6), 245-248 (1990).

- [110] Zapf, A. and Stan, HJ. GC Analysis of Organic Acids and Phenols Using On-Line Methylation with Trimethylsulfonium Hydroxide and PTV Solvent Split Large Volume Injection. *J High Res Chromatogr* 22 (2), 83-88 (1999).
- [111] Geissler, A. and Schoeler, HF. Gaschromatographic determination of phenol, methylphenols, chlorophenols, nitrophenols and nitroquinones in water at 0.1 $\mu\text{g/l}$. *Water Res* 28(10), 2047-2053 (1994).
- [112] Färber, H., Peldszus, S. and Schöler, HF. Gaschromatographische Bestimmung von aciden Pestiziden in Wasser nach Methylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid. *Vom Wasser* 76, 13-20 (1991).
- [113] Alfermann, K. Doktorarbeit: Untersuchungen zur Anpassung des Photosyntheseapparates Höherer Pflanzen bei Wachstum unter einem erhöhtem CO_2 -Partialdruck von 700 ppm. Universität Bielefeld (2001).
- [114] Marzok, MA. Doktorarbeit: Detection of Genetically Modified Soybeans and Maize in Egypt as well as Comparative Nutritional Safety Investigations of Isogenic and Transgenic (Bt) Maize in Broiler Nutrition: Broiler Performance, Degradation and Metabolic Fate of Maize DNA in some Tissues and Organs. Freie Universität Berlin (2004).
- [115] Ritter, JB., Genzel, Y. and Reichl, U. Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: Optimization using experimental design. *Anal Biochem* 373, 349–369 (2008).
- [116] Mukherji, E., Au, JL. and Mathes, LE. Differential antiviral activities and intracellular metabolism of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine in human cells. *Antimicrob Agents Chemother* 38(7), 1573–1579 (1994).
- [117] DeBerardinis, RJ., Mancuso, A., Daikhin, E. *et al.* Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *PNAS* 104(49), 19345-19350 (2007).
- [118] Brox, LW., LePage, GA., Hendler, SS. *et al.* Studies on the Growth Inhibition and Metabolism of 2'-Deoxy-2'-fluorocytidine in Cultured Human Lymphoblasts. *Cancer Res* 34, 1838-1842 (1974).
- [119] Angus, SP., Wheeler, LJ., Ranmal, SA. *et al.* Retinoblastoma Tumor Suppressor Targets dNTP Metabolism to Regulate DNA Replication. *JBC* 277(46) 44376-44384 (2002).
- [120] Silas, G., Villas-Bôas, SG., Mas, S. *et al.* Mass Spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spec Rev* 24, 613-646 (2005).
- [121] Dowell, BL., Segars, JH. and Metzgar, RS. Relationship between Adenosine Deaminase and a Human Thymus Leukemia Antigen Isolated from MOLT 4 Cells. *Cancer Res* 41, 343-345 (1981).

- [122] Dunn, WB. and Ellis, DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal Chem* 24, 285-294 (2005).
- [123] Mikko, K. and Orešič, M. Processing methods for differential analysis of LC MS profile data. *BMC Bioinformatics* 6: 179 (2005).
- [124] Neuweger, H., Albaum, SP., Dondrup, M. *et al.* MeltDB: a software platform for the analysis and integration of metabolomics experiment data. *Bioinformatics* 24(23), 2726–2732 (2008).
- [125] Larroy, C., Fernández, MR., González, E. *et al.* Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochem J* 361, 163–172 (2002).
- [126] Colby, J., Stirling, DI. and Dalton, H. The soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochem J* 165, 395–402 (1977).
- [127] Gilbertson, JR., Gelman, RA., Chiu, TH. *et al.* Effects of small amounts of pentadecan-2-one on the growth of *Clostridium butyricum*. *J Lipid Res* 19(6), 757–762 (1978).
- [128] Gilbertson, JR., Fletcher, RD., Kawalek, JC. *et al.* Effects of pentadecan-2-one on the growth of cells in culture. *Lipids* 11(3), 172-178 (1976).
- [129] Miller, A., Scanlan, RA., Lee, JS. *et al.* Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* and an *Achromobacter* species. *Appl. Microbiol* 26, 18-21 (1973).
- [130] Sunesson, AL., Vaes, WHJ., Nilsson, CA. *et al.* Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Appl Environ Microbiol* 61, 2911-2918 (1995).
- [131] Tressl, R., Drawert, F. Biogenesis of banana volatiles. *J Agric Food Chem* 21(4), 560–565 (1973).
- [132] Filipiak, W., Sponring, A., Filipiak, A. *et al.* TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells in-vitro. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19, 182–195 (2010).
- [133] Barrett, C. H., Dodgson, K. S., White, G. F. *et al.* Preliminary Observations on Alcohol Dehydrogenases in *Comamonas terrigena* that exhibit Stereospecificity towards Secondary Alcohols. *Biochem. J.* 187, 703–709 (1980).
- [134] Parés, X. and Vallee, BL. New human liver alcohol dehydrogenase forms with unique kinetic characteristics. *Biochem Biophys Res Commun* 98(1), 122-130 (1981).
- [135] Dafeldecker, WP. and Vallee, BL. Organ-specific human alcohol dehydrogenase: isolation and characterization of isozymes from testis. *Biochem Biophys Res Commun* 134, 1056-1063 (1986).

- [136] Sidhu, RS. and Blair, AH. Human liver aldehyde dehydrogenase. Kinetics of aldehyde oxidation. *J Biol Chem* 250(19), 7899-7904 (1975).
- [137] King, G. and Holmes, RS. Human corneal aldehyde dehydrogenase: purification, kinetic characterisation and phenotypic variation. *Biochem Mol Biol Int* 31(1), 49-63 (1993).
- [138] McEwen, CM. Human Plasma Monoamine Oxidase I. Purification and identification. *J Biol Chem* 240(5), 2003-2010 (1965).
- [139] Burke, DG., Halpern, B., Malegan, D. *et al.* Profiles of urinary volatiles from disorders characterized by unusual odors. *Clin Chem* 29(10), 1834-1838 (1983).
- [140] Cajka, T., Hajslova, J., Cochran, J. *et al.* Solid phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the analysis of honey volatiles. *J Sep Sci* 30(4), 534-546 (2007).
- [141] Kelson, TL., Secor McVoy, JR. and Rizzo, WB. Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta* 1335(1-2), 99-110 (1997).
- [142] Syhre, M., Hanschmann, G. und Heber, R. Derivatisierungstechniken in der Rückstandsanalytik. *GIT Fachz. Lab.* 11, 1121-1128 (1996).
- [143] Asfa, M. Diplomarbeit: Entwicklung einer Normalisierungsfunktion für die Charakterisierung der chromatografischen Säule eines Ionenmobilitätsspektrometers mittels Methoden der Regressionsanalyse. Universität Dortmund (2007).

10 Anhang

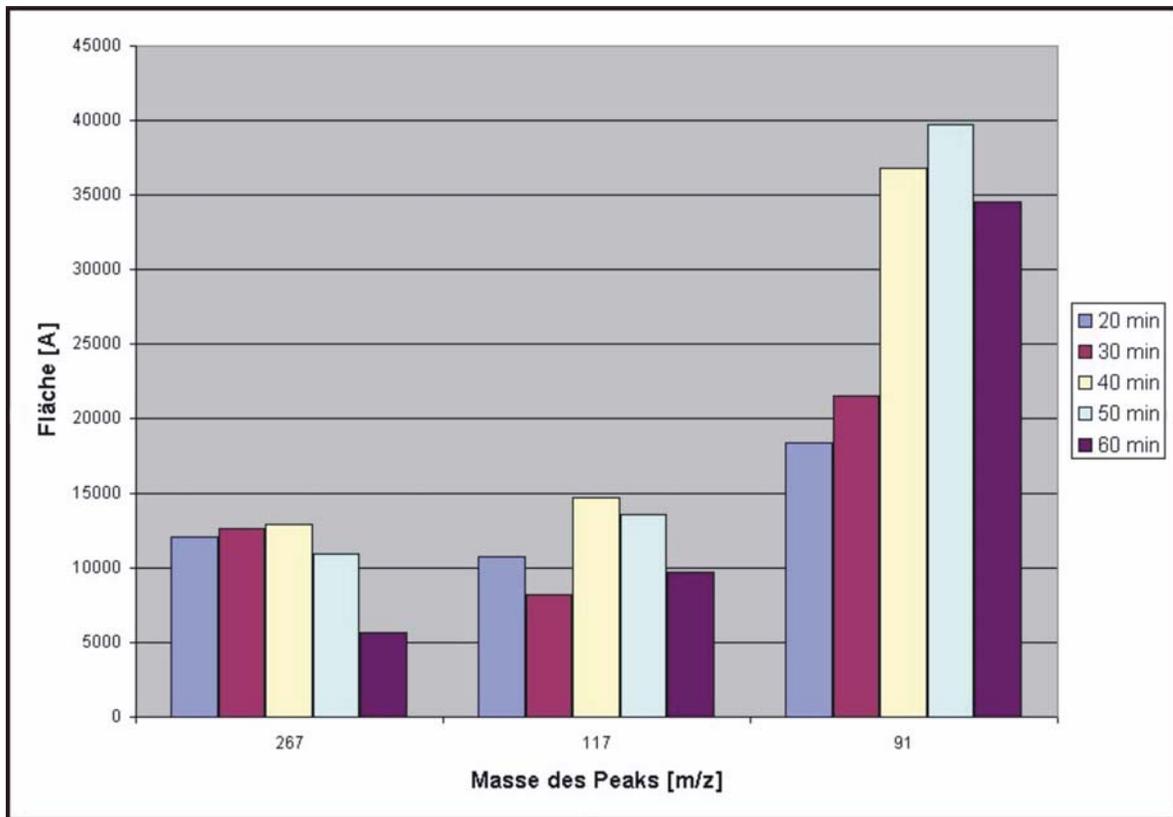


Abb. 40: Vergleich der Probenahmezeiten für die Analyse flüchtiger Analyte mittels GC/MS

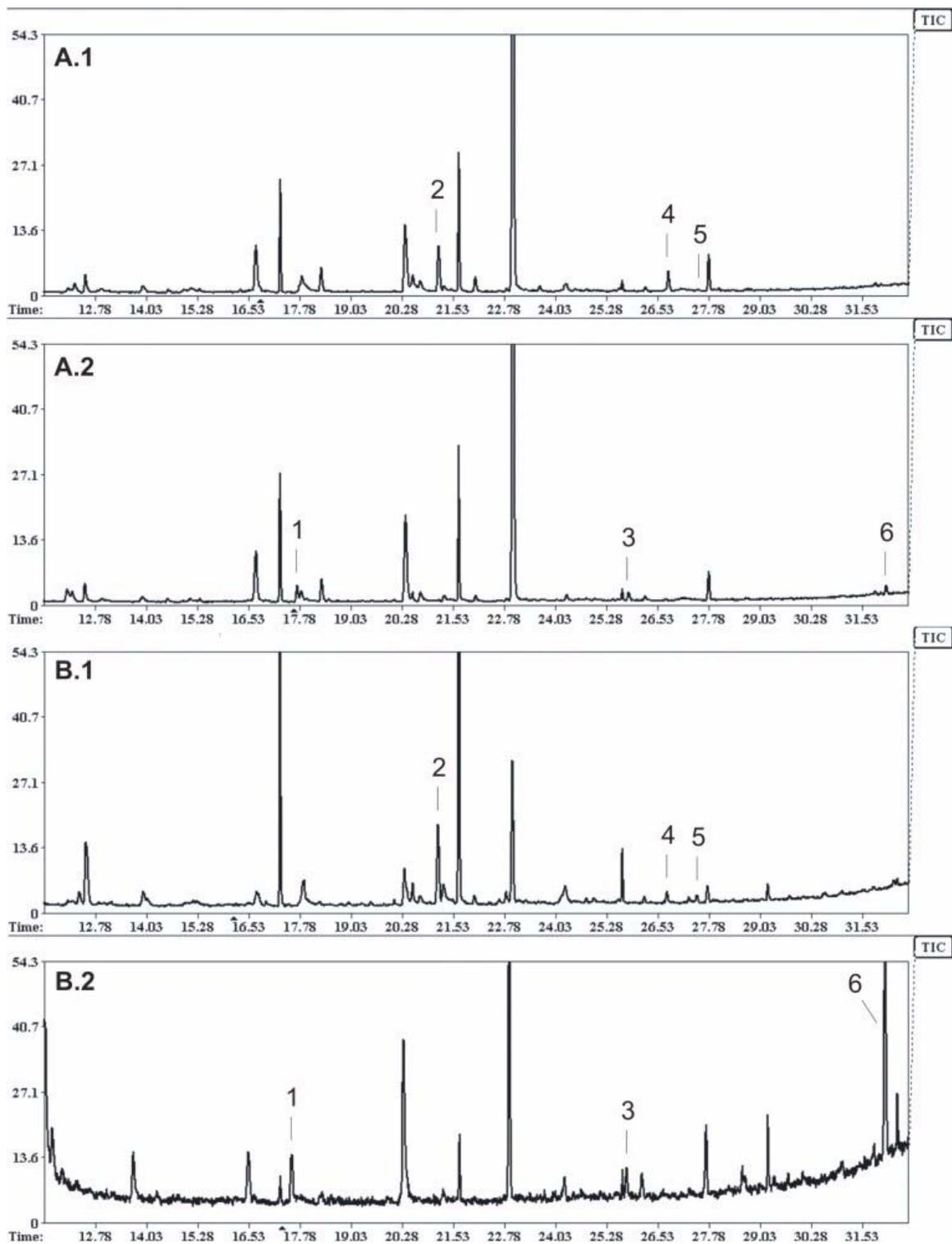


Abb. 41: TIC-Chromatogramme der Zelllinie SW-480 unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.

A.1: DMEM/F12 mit 10 % FCS (M1), A.2: SW-480 in M1

B.1: Advanced DMEM/F12 mit 1 % FCS (M2), B.2: SW-480 in M2

1: Nonan-2-on, 2: Benzaldehyd, 3: Undecan-2-ol, 4: Decan-1-ol,

5: Dodecansäuremethylester, 6: Pentadecan-2-on

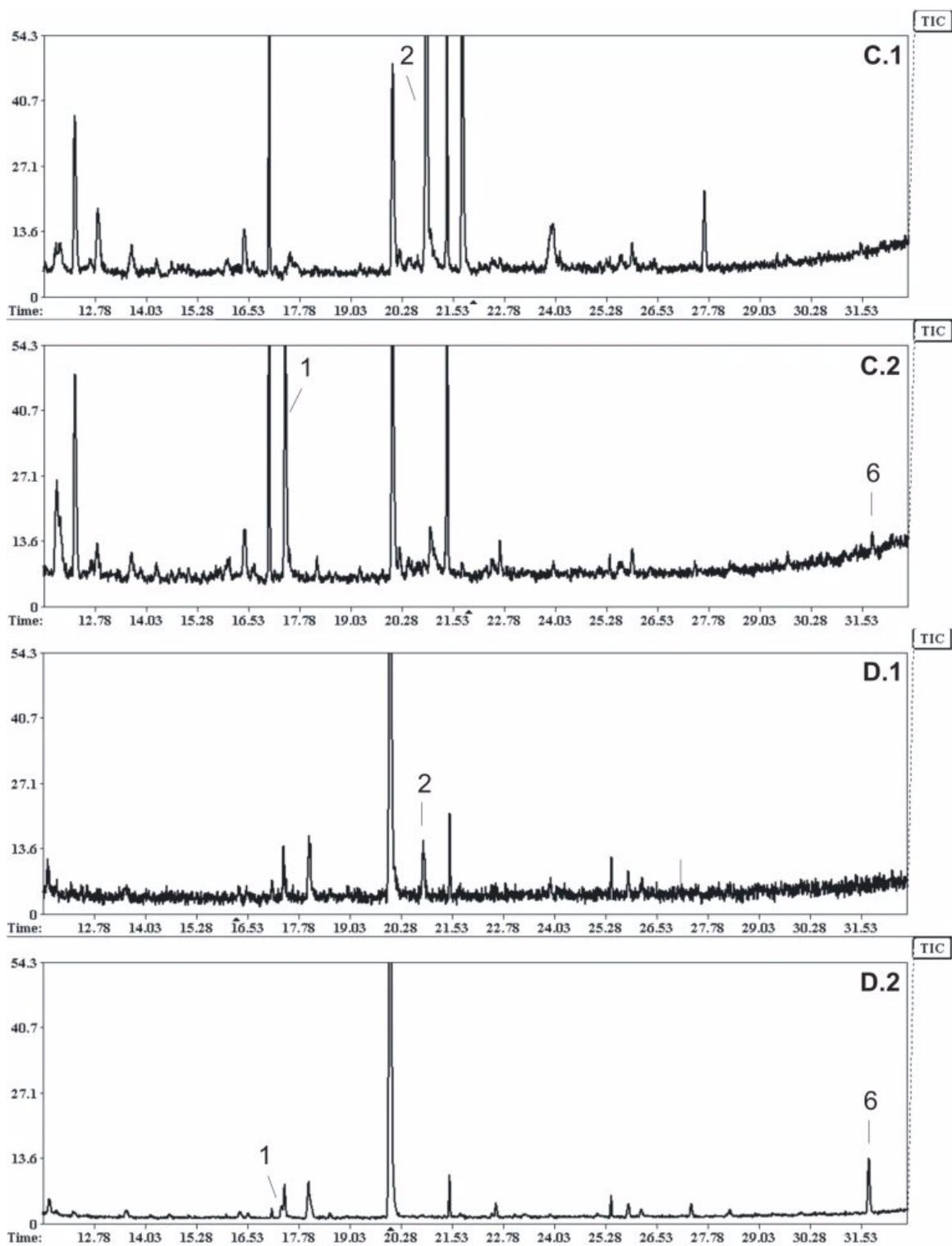


Abb. 42: TIC-Chromatogramme der Zelllinie SW-480 unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.

C.1: DMEM/F12 mit 10 % SerexTM (M3), C.2: SW-480 in M3

D.1: Quantum 286 (M4), D.2: SW-480 in M4

1: Nonan-2-on, 2: Benzaldehyd, 3: Undecan-2-ol, 4: Decan-1-ol,

5: Dodecansäuremethylester, 6: Pentadecan-2-on

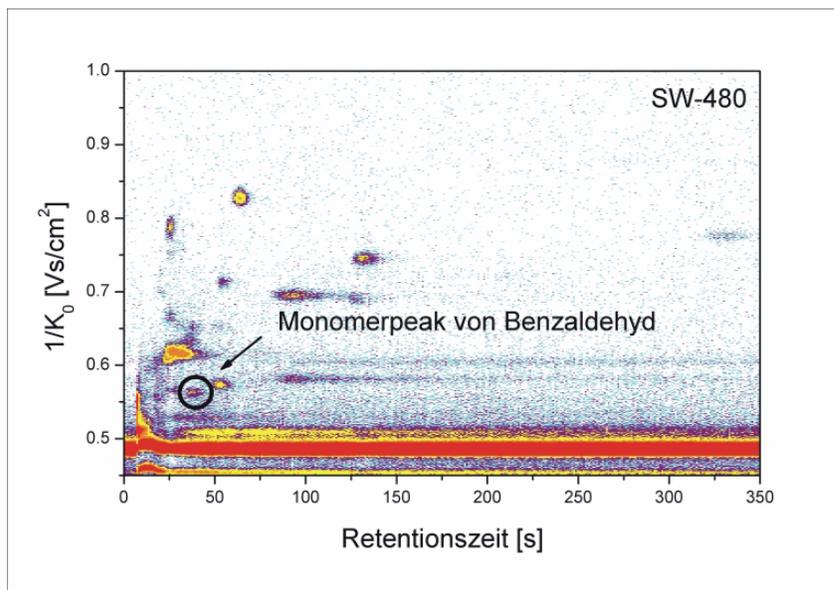
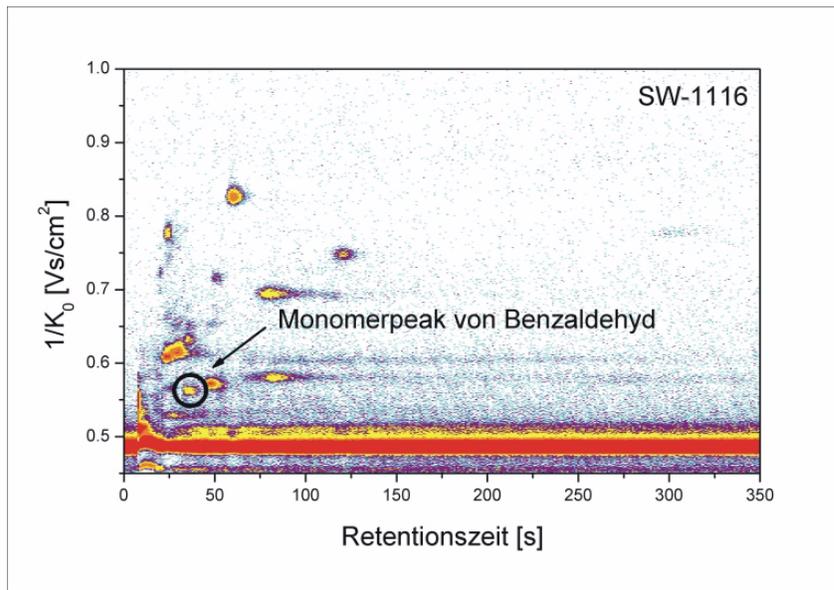


Abb. 43: Auftreten des Monomerpeaks von Benzaldehyd in den IMS-Chromatogrammen der Proben der Zelllinien SW-480 und SW-1116.

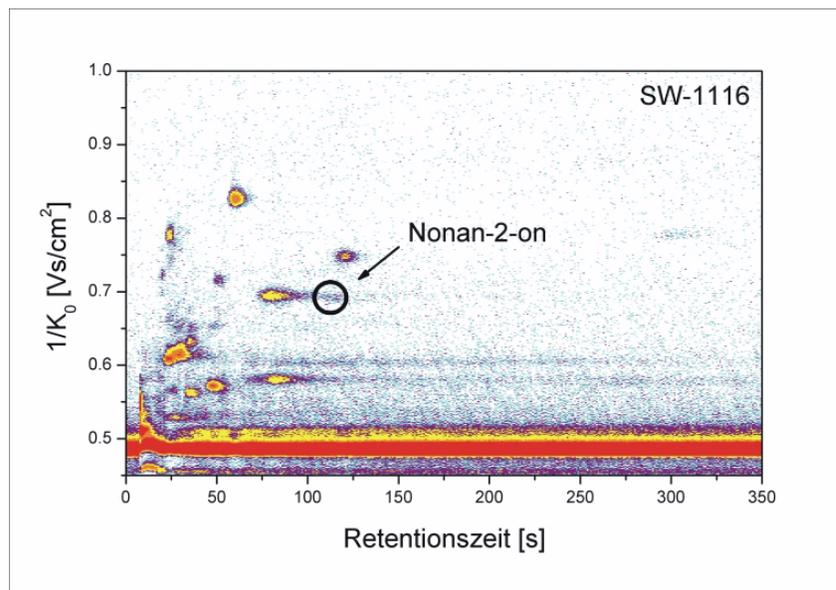
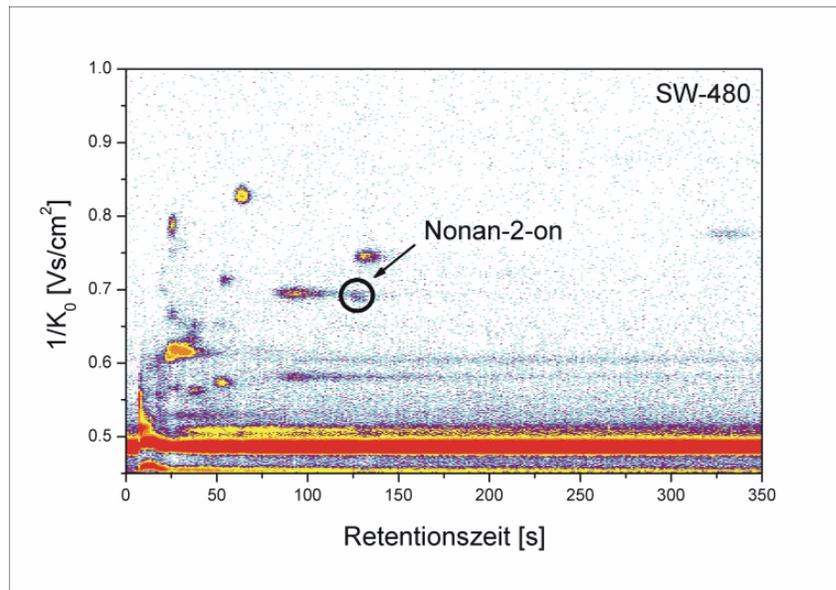


Abb. 44: Auftreten des Monomerpeaks von Nonan-2-on in den IMS-Chromatogrammen der Proben der Zelllinien SW-480 und SW-1116.