



**IDENTIFIZIERUNG VON BIOMARKERN
MITTELS LC-MS-BASIERTEM METABONOMICS**

**MERKAPTURSÄUREN ALS INDIKATOREN
FÜR DIE BILDUNG TOXISCHER INTERMEDIATE**

DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
SILVIA WAGNER, geb. Kern
aus Obernburg

Würzburg, 2008

eingereicht am: 23.12.2008

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: PD Dr. Wolfgang Völkel

2. Gutachter: Prof. Peter Schreier

der Dissertation

1. Prüfer: PD Dr. Wolfgang Völkel

2. Prüfer: Prof. Peter Schreier

3. Prüfer: Prof. Wolfgang Dekant

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: 24.04.2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

MEINER FAMILIE

BEMERKUNG

Die vorliegende Arbeit umfasst fünf Projekte, die im Laufe der Doktorarbeit in der angegebenen Reihenfolge bearbeitet wurden. Ausgehend von der Methodenentwicklung und zwei *proof-of-concept*-Studien wurde die Metabonomicstechnik zunächst im tierexperimentellen Modell getestet und anschließend auf Fragestellungen übertragen, die den Menschen im Fokus haben. Jedes der Projekte ist als solches abgeschlossen und kann unabhängig von den anderen Projekten gelesen werden. Eine gewisse Redundanz konnte aufgrund dieses modularen Aufbaus daher nicht vermieden werden.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	VI
EINLEITUNG UND KENNTNISSTAND	1
1 Metabonomics, <i>metabolite profiling</i> und <i>metabolic fingerprinting</i>	1
1.1 Metabonomics – Definitionen, Geschichte und Anwendungen	1
1.2 Frühe Vorhersage von Toxizität in der Arzneistoffentwicklung	3
1.3 Metabonomics im Fokus der Medizin	5
1.4 Weitere Anwendungen des Metabonomicskonzepts	7
1.5 Vergleich der analytischen Verfahren im Bereich Metabonomics	8
2 Mercaptursäuren als Indikatoren für die Bildung toxischer Intermediate	11
2.1 Bildung toxischer Intermediate	11
2.2 Detoxifizierungsreaktionen	14
2.3 Mercaptursäuren als Biomarker zur Abschätzung einer Belastung mit elektrophilen Species	15
2.4 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Mercaptursäuren	16
3 Chemometrische Verfahren im Kontext Metabonomics	17
AUFGABENSTELLUNG: IDENTIFIZIERUNG VON BIOMARKERN MITTELS LC-MS- BASIERTEM METABONOMICS – MERKAPTURSÄUREN ALS INDIKATOREN FÜR DIE BILDUNG TOXISCHER INTERMEDIATE	21
ERGEBNISSE	23
PROJEKT 1: Entwicklung einer generischen merkaptursäurespezifischen LC-MS-Methode	23
1 Einleitung	23
1.1 Elektrosprayionisierung	23
1.2 Triple Quadrupol gekoppelte lineare Ionenfalle	24
1.3 Ausgangspunkt der Methodenentwicklung	26
1.4 Extraktion und Prozessierung der Rohdaten	27
2 Material und Methoden	30
2.1 Chemikalien	30
2.2 Mercaptursäurestandardmix	30
2.3 Probenvorbereitung für die Methodvalidierung	31
2.4 Chromatographische Parameter	31
2.5 Massenspektrometrische Parameter	32
2.6 <i>Constant neutral loss</i> -Screeningmethode	32
2.7 Datenverarbeitung und statistische Datenanalyse	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Entwicklung und Optimierung der LC-MS/MS-Analytik	33
3.2 Optimierung der softwaregestützten Datenerfassung	36
3.3 Methodvalidierung: Bestimmung der <i>intra</i> - und <i>inter-day</i> -Präzision	38
4 Diskussion	40
PROJEKT 2: Humanstudie mit Acetaminophen-Exposition als <i>proof-of-concept</i>	45
1 Einleitung	45
2 Material und Methoden	47
2.1 Chemikalien	47
2.2 Humanstudie mit Acetaminophen-Exposition im Hoch- und Niedrigdosisbereich	48

2.3	Klinische Chemie	48
2.4	Vorbereitung der Urinproben	48
2.5	Chromatographische Parameter	49
2.6	Massenspektrometrische Parameter	49
2.7	<i>Constant neutral loss</i> - und <i>full scan</i> -Methode	50
2.8	Datenverarbeitung und chemometrische Datenanalyse	50
2.8.1	Generieren der Datenmatrices	50
2.8.2	Allgemeine Vorgehensweise bei der multivariaten Datenanalyse	51
2.8.3	<i>Principal component analysis</i> (PCA)	51
2.8.3.1	Vorbereitende Datenprozessierung: Zentrieren und Skalieren	51
2.8.3.2	<i>PCA score plot</i>	52
2.8.3.3	<i>PCA loading plot</i>	53
2.8.4	<i>Partial least squares</i> -Analyse	54
2.8.4.1	<i>PLS-DA score plot</i>	55
2.8.4.2	<i>PLS-DA weight plot</i>	55
2.8.5	Validierung	56
2.8.5.1	Modelldiagnostik	56
2.8.5.2	Cross-Validierung	56
2.8.5.3	Signifikante Hauptkomponenten	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Merkaptursäurescreening im <i>constant neutral loss</i> - und <i>full scan</i> -Modus	57
3.2	Datendekonvolution und Datenprozessierung	58
3.3	Acetaminophen-Hochdosisstudie (500 mg Exposition)	59
3.3.1	PCA des CNL- und <i>full scan</i> /TOF-Datensatzes	59
3.3.2	Gegenüberstellung der Ansätze mittels PLS-DA	61
3.3.3	Selektion potentieller „Biomarker“	61
3.3.4	<i>Time series plots</i> der potentiellen Marker	63
3.3.5	Identifizierung der selektierten Marker	65
3.4	Acetaminophen-Niedrigdosisstudie (50 mg Exposition) als <i>proof-of-concept</i>	65
3.4.1	PLS-DA des CNL-Datensatzes	65
3.4.2	Validierung des PLS-DA Niedrigdosismodells	67
3.4.3	Anwendung des <i>orthogonal signal correction</i> -Datenfilters	69
4	Diskussion	70
PROJEKT 3: Integrativer Metabonomicsansatz zur Evaluierung von Confoundern		74
1	Einleitung	74
2	Material und Methoden	76
2.1	Chemikalien	76
2.2	Interner Standardmix	77
2.3	Design der humanen Kontrollstudie	77
2.4	Klinische Chemie der Urinproben	77
2.5	Vorbereitung der Urinproben	77
2.6	Chromatographische Parameter	78
2.7	Massenspektrometrische Parameter	80
2.8	Theoretisches <i>multiple reaction monitoring</i> -Screeningmethode	80
2.9	Analyseprotokoll	81
2.10	Datenverarbeitung und statistische Datenanalyse	81
2.10.1	Generieren der Datenmatrices	81
2.10.2	Multivariate Datenanalyse	82
2.10.2.1	Allgemeine Vorgehensweise	82
2.10.2.2	Orthogonale <i>partial least squares</i> -Diskriminanzanalyse	82

3	Ergebnisse und Diskussion.....	83
3.1	Theoretisches <i>multiple reaction monitoring</i>	83
3.2	LC-MS/MS-Analyse mittels Säulenschaltung	84
3.3	Studien- und Analysedesign.....	86
3.4	Optimierung der Datendekonvolution und Datenfilter	87
3.5	Optimierung der Alignment-, Skalierungs- und Normalisierungstechniken.....	88
3.6	Biologische Variation der humanen Urinprofile	90
3.7	Fusion von <i>different-batch</i> -Daten zu einem <i>one-batch</i> -Datensatz.....	94
3.8	PCA des originalen und des neu generierten <i>one-batch</i> -Datensatzes	97
4	Diskussion	98
PROJEKT 4: Tierexperimentelle Modellstudie zur Untersuchung von oxidativem Stress		
	<i>in vivo</i>	104
1	Einleitung	104
2	Material und Methoden	105
2.1	Chemikalien	105
2.2	Interner Standardmix.....	106
2.3	Standardlösung für die Markeridentifizierung	106
2.4	Design der tierexperimentellen Studie mit Tetrachlorkohlenstoff-Exposition	106
2.5	Klinische Chemie	108
2.6	Vorbereitung der Urinproben für die erste Messung (Versuchstage 1 – 17, Verdünnungsfaktor 5)	108
2.7	Vorbereitung der Urinproben für die zweite Messung (Versuchstage 6 und 7, Verdünnung auf einheitliche spezifische Dichte)	108
2.8	Vorbereitung der Urinproben für die Markeridentifizierung	109
2.9	Chromatographische Parameter	109
2.10	Massenspektrometrische Parameter	110
2.11	Theoretisches <i>multiple reaction monitoring</i> -Screeningmethode	110
2.12	ThMRM-IDA-EPI-Methode zur Identifizierung der selektierten Marker	111
2.13	Analyseprotokoll der ersten Messung	111
2.14	Analyseprotokoll der zweiten Messung	111
2.15	Datenverarbeitung und chemometrische Datenanalyse	112
3	Ergebnisse und Diskussion.....	112
3.1	Parameter der Versuchstiere.....	112
3.1.1	Gewichtsverlauf	113
3.1.2	Verlauf der klinischen Parameter im Urin	114
3.1.3	Organgewichte	115
3.2	Erste Messung: Merkaptursäurescreening mit einheitlich verdünnten Urinproben.....	116
3.2.1	Theoretisches <i>multiple reaction monitoring</i> mit Säulenschaltungskopplung.....	116
3.2.2	Datenerfassung und Datenfilter.....	118
3.2.3	Analyse der generierten Datenmatrices	118
3.2.4	Evaluierung der Quality Control Proben.....	120
3.2.5	Überprüfung der Datenintegrität	122
3.2.6	Metabolische Trajektorien: Kinetik und Dosisabhängigkeit der Merkaptursäureprofile	124
3.2.6.1	PCA über alle 360 Proben.....	124
3.2.6.2	OPLS-DA Modelle für die Kontroll- und Hochdosisgruppe	125
3.2.6.2.1	OPLS-DA Modell der Versuchstage 6 – 17.....	125
3.2.6.2.2	OPLS-DA Modell der Versuchstage 6 und 7.....	127
3.2.6.2.3	Alternative Strategie für OPLS-DA Modelle.....	128
3.2.6.2.4	OPLS-DA Modelle der Versuchstage 8 – 10 und 16 – 17	133

3.2.6.2.5	Vergleichende Gegenüberstellung der zeitabhängigen OPLS-DA Trajektorien für die Kontroll- und Hochdosisgruppe.....	134
3.2.6.3	OPLS-DA Modelle für die Kontroll- und Niedrigdosisgruppe.....	136
3.2.7	Selektion potentieller Marker.....	137
3.3	Zweite Messung: Mercaptursäurescreening mit auf einheitliche spezifische Dichte verdünnten Proben.....	143
3.3.1	Datenerfassung und Datenfilter.....	143
3.3.2	Analyse der generierten Datenmatrices	144
3.3.3	Evaluierung der Quality Control Proben.....	145
3.3.4	Überprüfung der Datenintegrität	145
3.3.5	PCA über alle 60 Proben.....	146
3.3.6	Modelle für eine CCl ₄ -Exposition im Hochdosisbereich.....	147
3.3.6.1	PCA Modell der Kontroll- und Hochdosisgruppe	147
3.3.6.2	OPLS-DA Modell der Kontroll- und Hochdosisgruppe	148
3.3.7	Modelle für eine CCl ₄ -Exposition im Niedrigdosisbereich	149
3.3.7.1	PCA Modell der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe.....	149
3.3.7.2	OPLS-DA Modell der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe.....	150
3.3.8	Selektion potentieller Marker.....	151
3.4	Strukturaufklärung der selektierten Marker	155
3.5	Klassische Evaluierung der identifizierten Marker	159
3.6	Dosisabhängigkeit der Mercaptursäurelevel.....	164
PROJEKT 5:	Metabonomicsstudie mit Rauchern und Nichtrauchern.....	167
1	Einleitung	167
2	Material und Methoden	168
2.1	Chemikalien	168
2.2	Interner Standardmix.....	168
2.3	Standardlösung für die Markeridentifizierung	168
2.4	Studiendesign	169
2.5	Klinische Chemie der Urinproben.....	169
2.6	Vorbereitung der Urinproben.....	169
2.7	Vorbereitung der Urinproben für die Markeridentifizierung	170
2.8	Chromatographische Parameter	170
2.9	Massenspektrometrische Parameter	171
2.10	Theoretisches <i>multiple reaction monitoring</i> -Screeningmethode	171
2.11	ThMRM-IDA-EPI-Methode zur Identifizierung selektierter Marker	172
2.12	Analyseprotokoll	172
2.13	Datenverarbeitung und statistische Datenanalyse.....	172
3	Ergebnisse und Diskussion.....	173
3.1	Klinische Parameter der Probanden	173
3.2	Theoretisches <i>multiple reaction monitoring</i> mit Säulenschaltungskopplung.....	173
3.3	Datenerfassung und Datenfilter.....	175
3.4	Evaluierung der Quality Control Proben.....	175
3.5	Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Skalierung und Normalisierung	175
3.6	Überprüfung der Datenintegrität	177
3.7	PCA über alle Proben.....	178
3.8	Diskriminierung von Nichtrauchern, schwachen und starken Rauchern mittels OPLS-DA	179
3.8.1	OPLS-DA Modell: starke Raucher vs. Nichtraucher.....	180
3.8.2	OPLS-DA Modell: schwache Raucher vs. Nichtraucher.....	181
3.9	Selektion potentieller Marker.....	182
3.10	Strukturaufklärung der selektierten Marker	186

3.11	Klassische Evaluierung der identifizierten Marker.....	189
3.12	Gesamtmenge ausgeschiedener Merkaptursäuren.....	193
4	Zusammenfassende Diskussion.....	195
DISKUSSION UND AUSBLICK		198
1	PROJEKT 1: Entwicklung einer generischen merkaptursäurespezifischen LC-MS-Methode	199
2	Strategien zur softwaregesteuerten Datenprozessierung.....	201
3	Multivariate Datenanalysen.....	203
4	PROJEKT 2: Humanstudie mit Acetaminophen-Exposition als <i>proof-of-concept</i>	205
5	PROJEKT 3: Integrativer Metabonomicsansatz zur Evaluierung von Confoundern.....	206
6	PROJEKT 4: Tierexperimentelle Modellstudie zur Untersuchung von oxidativem Stress <i>in vivo</i>	208
7	PROJEKT 5: Metabonomicsstudie mit Rauchern und Nichtrauchern.....	210
8	Ausblick.....	212
ZUSAMMENFASSUNG.....		213
SUMMARY		219
LITERATURVERZEICHNIS		224
DANKSAGUNG.....		243
PUBLIKATIONEN.....		244
POSTERBEITRÄGE.....		245

ABKÜRZUNGEN

#	Nummer
$\sum 0$	Summe der Nulleinträge
AA	Acrylamid
AAP	Acetaminophen
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
am	<i>ante meridiem</i> , am Vormittag
amu	<i>atomic mass unit</i> , atomare Masseneinheit
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i>
ArMet	<i>Architecture for Metabolomics</i>
BOSS	<i>Biomarkers of Oxidative Stress Study</i>
bw	<i>body weight</i> , Körpergewicht
bzw.	beziehungsweise
c	<i>weight (Y-Matrix)</i>
C	<i>control</i> , Kontrollgruppe
C	<i>predose</i>
° C	Grad Celcius
ca.	circa
CE	<i>collision energy</i>
CE	<i>capillary electrophoresis</i> , Kapillarelektrophorese
CE-	Cyanoethyl-
CID	<i>collision induced dissociation</i>
CME-	2-Carboxy-1-methylethyl-
CNL	<i>constant neutral loss</i> , Neutralverlust
COMET	<i>Consortium for Metabonomic Toxicology</i>
corr	Korrelation (= p(corr))
COST	<i>consider one separate variable at a time</i>
cov	Kovarianz (= p)
cps	<i>counts per second</i>
cum	kumulativ
CUR	<i>curtain gas</i>
CXP	<i>collision cell exit potential</i>
d	Tag
D	<i>postdose</i>
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DA	Diskriminanzanalyse
dCD	durchschnittliche <i>time-matched</i> -Kontrollgruppe
DHN	1,4-Dihydroxynonen
dL	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOPA	<i>L</i> -Dihydroxyphenylalanin
DP	<i>declustering potential</i>
DP	Cysteinylglycin-Dipeptidase
DP2	<i>declustering potential 2</i>
DRM	<i>drug related metabolites</i>
E	Elektrophil

ECD	<i>electron capture detector</i> , Elektroneneinfangdetektor
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EP	<i>entrance potential</i>
EPI	<i>enhanced product ion</i> , <i>enhanced</i> Produktionen
ESI	Elektrosprayionisierung
et al.	und andere (Mitarbeiter)
etc.	<i>et cetera</i>
FA	Ameisensäure
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Flächeneinheiten
FID	Flammenionisationsdetektor
Forts.	Fortsetzung
FP	<i>focusing potential</i>
g	Gramm
g	Fallbeschleunigung, Ortsfaktor ($g = 9.81 \text{ m/s}^2$)
GC	Gaschromatographie
GSH	Glutathion, reduziertes Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid, oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GST M1	Glutathion-S-Transferase M1
γ GT	γ -Glutamyltranspeptidase
h	<i>hour(s)</i> , Stunde(n)
H	<i>high-dose</i> , Hochdosisgruppe
HILIC	<i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>
HMP-	3-Hydroxy-1-methylpropyl-
HNA	4-Hydroxynonensäure
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
HP-	Hydroxypropyl-
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochdruckflüssigchromatographie
IDA	<i>information dependent acquisition</i>
InnoMed	<i>Innovative Medicines for Europe</i>
IST	interner Standard
k	Anzahl Variablen
KG	Körpergewicht
kHz	Kilohertz
kV	Kilovolt
L	Liter
L	<i>low-dose</i> , Niedrigdosisgruppe
LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigchromatographie
LIT	<i>linear ion trap</i> , lineare Ionenfalle
LOD	<i>limit of detection</i> , Nachweisgrenze
M	molare Masse
M, M[1]	Modell, Modell 1
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MA	<i>mercapturic acid</i> , Merkaptursäure
MA-SO	Merkaptursäure-Sulfoxid
mg	Milligramm
min	Minute
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
mL	Milliliter
mM	Millimol

mm	Millimeter
mosmol	Milliosmol
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie
ms	Millisekunde
MSI	<i>Metabolomics Standards Initiative</i>
MVDA	multivariate Datenanalyse
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µs	Mikrosekunde
n	Anzahl, Beobachtungen
NADH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzoquinoneimine, <i>N</i> -Acetyl- <i>p</i> -Benzochinonimin
NAT	<i>N</i> -Acetyl-Tansferase
ng	Nanogramm
NIPALS	<i>non-linear interative partial least squares</i>
NL	<i>neutral loss</i> , Neutralverlust
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernresonanz
NPD	Stickstoff-Phosphor-Detektor
o. c.	<i>on column</i>
ONE	4-Oxo-2-nonenal
oPC	orthogonale <i>principal component</i> , orthogonale Hauptkomponente
OPLS-DA	orthogonale <i>partial least squares</i> -Diskriminanzanalyse
OSC	<i>orthogonal signal correction</i>
OVAT	<i>one variable at a time</i>
p	<i>loading</i>
p	Kovarianz (= cov)
p(corr)	Korrelation (= corr)
PC	<i>principal component</i> , Hauptkomponente
PCA	<i>principal component analysis</i> , Hauptkomponentenanalyse
PI	<i>product ion</i> , Produktion(en)
PLS	<i>partial least squares (projection to latent structures)</i>
PLS-DA	<i>partial least squares</i> -Diskriminanzanalyse
pm	<i>post meridiem</i> , am Nachmittag
pmol	Pikomol
ppm	<i>parts per million</i>
PredTox	<i>Predictive Toxicology</i>
PrI	<i>precursor ion</i> , Prekursorion(en)
psi	<i>pound per square inch</i> , Pfund pro Quadratzoll
Q1, Q2, Q3	Quadrupol 1, Quadrupol 2, Quadrupol 3
Q ²	<i>goodness of prediction</i> der entsprechenden Komponente
Q ² (cum)	<i>goodness of prediction</i> aller signifikanten Komponenten
QC	Quality Control
R ²	<i>goodness of fit</i>
R ²	Bestimmtheitsmaß für eine Trendlinie
R ² X	<i>goodness of fit</i> der entsprechenden Komponente der X -Matrix
R ² X(cum)	<i>goodness of fit</i> aller signifikanten Komponenten der X -Matrix
R ² X _p	<i>goodness of fit</i> der prädiktiven, ersten Hauptkomponente der X -Matrix
R ² Y	<i>goodness of fit</i> der entsprechenden Komponente der Y -Matrix

R ² Y(cum)	<i>goodness of fit</i> aller signifikanten Komponenten der Y-Matrix
RSD	<i>relative standard deviation</i> , relative Standardabweichung
RT	Retentionszeit
s	Sekunde
S/N	<i>signal-to-noise ratio</i> , Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SMRS	<i>Standard Metabolic Reporting Structure</i>
SS	<i>sum of squares</i> , Quadratsummen
SUS	<i>shared and unique structure</i>
t	<i>score</i>
t[1]	erste Hauptkomponente (= PC1)
t[1]P	prädiktive, erste Hauptkomponente (= PC1)
t[2]O	erste orthogonale Hauptkomponente (= oPC1)
t[3]O	zweite orthogonale Hauptkomponente (= oPC2)
Tab.	Tabelle
thMRM	theoretisches <i>multiple reaction monitoring</i>
TIC	Totalionenstromchromatogramm
TLC	<i>thin layer chromatography</i> , Dünnschichtchromatographie
TOF	<i>time-of-flight</i> , Flugzeit-
™	<i>Trademark</i> , Warenzeichen
u. a.	unter anderem
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
UV	<i>unit variance</i> , Einheitsvarianz
V	Volt
var	Variable
vgl.	vergleiche
vol	Volumen
vs.	<i>versus</i>
w*	<i>weight</i> (X-Matrix)
X	Prozess-, Inputvariablen
x ₁ , x ₂ , x ₃	Koordinatenachse x ₁ , x ₂ , x ₃
Y	Ergebnis-, Outputvariablen
z. B.	zum Beispiel

EINLEITUNG UND KENNTNISSTAND

1 Metabonomics, *metabolite profiling* und *metabolic fingerprinting*

1.1 Metabonomics – Definitionen, Geschichte und Anwendungen

Ratte oder Maus? Mann oder Frau? Alt oder jung? Normal oder anders? Gesund oder krank? Raucher oder Nichtraucher? Was haben diese Fragestellungen gemeinsam oder anders: wie beeinflussen diese Faktoren unseren Stoffwechsel? Das Schlagwort heißt „Metabonomics“. Der Begriff Metabonomics wurde 1999 von NICHOLSON *ET AL.* als „*the quantitative measurement of the dynamic multiparametric metabolic response of living systems to pathophysiological stimuli or genetic modification*“ eingeführt [1] und basiert auf Konzepten, die bereits Anfang der 1970er parallel von mehreren Gruppen vorgeschlagenen wurden [2-4]. Metabonomics leitet sich aus dem Griechischen von *meta* (Änderung, Wechsel) und *nomos* (Gesetz, Regel) ab, in Anlehnung an chemometrische Modelle, die metabolische Änderungen charakterisieren können [5]. Die Technik umfasst das Screening biologischer Proben im Hinblick auf die simultane Erfassung komplexer Muster bekannter und unbekannter Metaboliten. Der Fokus liegt hierbei auf dem intakten biologischen System und der Untersuchung von Effekten auf den ganzheitlichen Organismus. Für das Metabolitenscreening werden hauptsächlich Urin- und Blutproben herangezogen, da sie nicht-invasiv bzw. minimal-invasiv zu gewinnen sind.

Im Gegensatz dazu leitet sich der Begriff „Metabolomics“ in Anlehnung an das Transcriptom bzw. Proteom einer Zelle von dem Metabolom, d. h. der Gesamtheit niedermolekularer Verbindungen (< 1500 Da) in einem Zell- bzw. Organsystem ab [1, 6]. In der Literatur wird die Unterscheidung intakter Organismus – Zellsystem allerdings selten vorgenommen. Parallel dazu existieren alternative Definitionen [7-9], so dass im Allgemeinen die Begriffe Metabonomics und Metabolomics synonym verwendet werden. FIEHN *ET AL.* [10] führte darüber hinaus die Begriffe *metabolite profiling* (auch *metabolic profiling*) und *metabolic fingerprinting* ein. *Metabolite profiling* konzentriert sich demnach auf die (semi)quantitative Erfassung einer begrenzten Anzahl an Metaboliten und findet meist in Zusammenhang mit dem Screening von Metabolitenklassen Anwendung. Die Klassen können sowohl strukturell (z. B. Aminosäuren, Lipide, Kohlenhydrate, organische Säuren, Phase-II-Metaboliten etc.) als auch mechanistisch (z. B. unterschiedliche biochemische Stoffwechselwege) in Zusammenhang stehen. Für die Analyse von Lipiden und Phospholipiden wurde in diesem Kontext der Begriff „Lipidomics“ geprägt [11]. Lipidomics wird insbesondere zur Erforschung von Krankheiten wie Arteriosklerose, Diabetes, Fettleibigkeit und Alzheimer eingesetzt, welche nachweislich auf einen gestörten Fettstoffwechsel zurückzuführen

sind [12]. Eine Hochdurchsatzvariante der angeführten Techniken wird auch als *metabolic fingerprinting* definiert. Die entsprechenden analytischen Methoden sind auf das schnelle Screening von Proben, ohne vorhergehende chromatographische Trennverfahren, ausgerichtet und dienen in der Hauptsache dazu, einen ersten Eindruck über die Messreihe zu bekommen [13]. Wie in der Literatur üblich, wird im Folgenden der Begriff Metabonomics als Überbegriff für alle vorgenannten Ansätze verwendet. Wie in den verwandten *Omics*-Techniken (Genomics, Transcriptomics, Proteomics) wird auch bei Metabonomics Bekanntes aus den Bereichen Analytik und Biostatistik zusammengeführt (**Abb. 1**). Die Grundlage bildet ein geeignetes ungezieltes Screeningverfahren, mit dessen Hilfe eine Vielzahl, vorerst meist unbekannter Analyten, gleichzeitig analysiert werden kann.

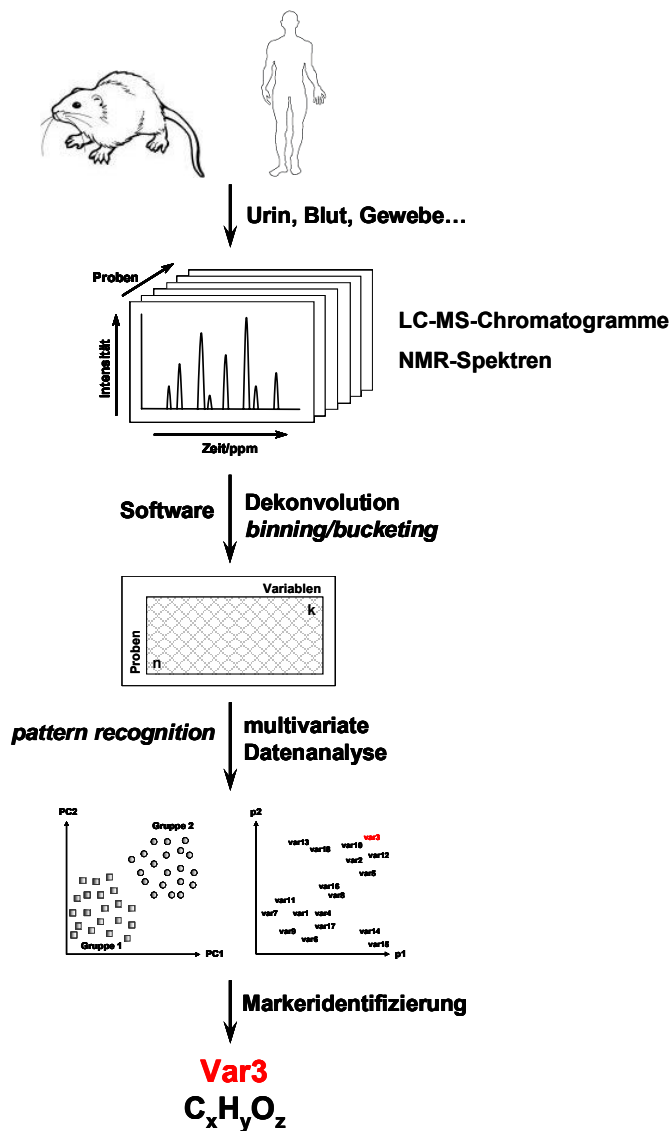


Abb. 1: Typisches Flussdiagramm einer Metabonomicsstudie: Ausgehend von einem ungezieltem Screening biologischer Proben werden die Daten softwaregestützt prozessiert und mittels einer auf Mustererkennung (*pattern recognition*) basierenden multivariaten Datenanalyse ausgewertet. Ziel ist es insbesondere, gruppenspezifische Marker (Biomarker) zu identifizieren.

Nach automatischer, softwaregesteuerter Signalerfassung kommen dann Mustererkennungs-techniken, das sogenannte *pattern recognition*, zum Einsatz. Auf der Grundlage multivariater Datenanalysen werden die analysierten Variablen zunächst in ihrer Dimensionalität reduziert, nach Relevanz gefiltert und schließlich gruppenspezifische Muster bzw. Marker selektiert. Die Identifizierung der potentiellen Biomarker stellt den letzten und schwierigsten Schritt dar und erfordert sowohl den Einsatz geeigneter analytischer Verfahren als auch den Zugang zu umfangreichen Datenbanken [8].

Im Jahre 2005 erhob das *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) Metabolomics zu den „10 Emerging Technologies“, d. h. zu den aufstrebenden Gebieten mit großem Potential für die Zukunft [14]. Übertragen auf biologische Fragestellungen soll Metabolomics vor allem im Kontext der prädiktiven Toxikologie, in der präklinischen und klinischen Arzneistoffentwicklung sowie einer personalisierten Medizin und Ernährung Anwendung finden.

1.2 Frühe Vorhersage von Toxizität in der Arzneistoffentwicklung

Vor dem Hintergrund der Kosteneffizienz ist die Pharmaindustrie stetig bestrebt, bei der Entwicklung von Arzneistoffkandidaten neue Wege zu gehen. Mit dem Aufkommen der kombinatorischen Chemie in den 1980er Jahren standen der Forschung erstmals mehrere tausend bis hunderttausend potentielle Wirkstoffe pro Jahr zur Verfügung. Um in späten Stadien des Entwicklungsprozesses die Ausfallquoten (*attrition rates*) zu minimieren, sind die Unternehmen auf effektive tierexperimentelle *in vivo* Modelle und Screeningverfahren angewiesen. Große Hoffnung auf dem Gebiet der toxikologischen Beurteilung von Arzneistoffen wird in die *Omics*-Techniken und hierbei insbesondere in Metabolomics gesetzt. Genomics hat neben dem erheblichen Kostenfaktor den Nachteil, dass eine veränderte Genexpression nicht zwangsläufig mit einem toxischen Effekt einhergeht und umgekehrt sich ein adverser Effekt nicht unbedingt auf die Genexpression auswirken muss. Gerne wird in diesem Zusammenhang das Beispiel einer Ethanolexposition genannt, die *in vivo* zwar zu einer erhöhten Genexpression führt, diese jedoch das Phänomen der Trunkenheit, den adversen Effekt, nicht erklären kann [15]. Diese Diskrepanz trug zur Entwicklung des Proteomics bei. Man hoffte, auf der Ebene der Proteine eine bessere Korrelation mit den untersuchten Effekten zu bekommen. Allerdings ist hierbei das Problem, dass diese Technik sehr arbeitsintensiv ist und meist keinen hohen Probendurchsatz erlaubt. Darüber hinaus gestaltet sich die Korrelation von klassischen toxikologischen Endpunkten (Histopathologie, klinische Chemie, Abnormalitäten, Mortalität etc.) mit Veränderungen im Transcriptom bzw. Proteom bisher schwierig [15]. Dagegen spiegelt das Metabolom direkte Änderungen im

Metabolismus, beispielsweise als Reaktion auf exogene oder endogene Stimuli, wider. Das Profil, d. h. die Konzentrationen und Verhältnisse dieser Metaboliten, stehen damit in direktem Zusammenhang mit Dosiswirkungen von toxischen Substanzen. Eine Hauptanwendung des Metabonomics stellt daher die Prädiktion von Toxizitäten in präklinischen Phasen der Arzneistoffentwicklung dar.

Grundidee ist hierbei, möglichst frühzeitig adverse Effekte, beispielsweise auf Organe wie Leber oder Niere, zu erkennen. Die zu untersuchende Substanz wird hierzu Labortieren verabreicht. Urin- und Plasmaproben werden meist mittels $^1\text{H-NMR}$ einem Screening unterzogen und das Metabolitenmuster von Kontrollgruppe und exponierten Tieren anschließend auf der Grundlage geeigneter *pattern recognition*-Ansätze verglichen. Unterschiede können sich hierbei sowohl in der Qualität, als auch in der Quantität der ausgeschiedenen Metaboliten ergeben. Das auf $^1\text{H-NMR}$ basierte Screening zeichnet sich dabei vor allem durch einen hohen Probendurchsatz bei gleichzeitig hoher Reproduzierbarkeit der Messungen aus. So können mit *flow*-Injektion an einem Tag über 300 Proben vermessen werden [15]. Allerdings werden, durch die Sensitivität der NMR-Geräte bedingt, vorwiegend unspezifische Katabolite aus dem Fett-, Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel detektiert. Da es sich bei den regulierten Metaboliten, unabhängig von der untersuchten Substanz, dem Wirkmechanismus und dem Zielorgan meist um Glucose, Lactat, Citrat, 2-Oxoglutarat, Kreatin, Kreatinin, Hippurat, Succinat, Taurin, Trimethylamin(oxid) und Acetat handelt, werden diese Metaboliten in der Literatur häufig auch als *usual suspects* bezeichnet [16]. Des Weiteren liefert das semiquantitative Metabolitenmuster Hinweise auf die durch die Substanz beeinflussten Stoffwechselwege. Metabonomics kann somit dazu beitragen, toxische Wirkungsmechanismen aufzuklären [17, 18].

Zur Etablierung einer Datenbank für spezifische Toxizitätssignaturen in biologischen Proben von Versuchstieren haben sich im Jahr 2001 sechs Pharmafirmen und das *Imperial College of Science* in London zu einem Konsortium (*COMET – Consortium for METabonomic Toxicology*) zusammengeschlossen [19]. Das Vorhaben basierte auf der Annahme, dass adverse Effekte Änderungen im metabolischen Profil verursachen, und dass ferner Substanzen mit einem ähnlichen toxischen Wirkmechanismus analoge Signaturen hervorrufen. SHOCKCOR *ET AL.* liefert eine umfangreiche Übersicht über charakteristische toxin- bzw. organspezifische Muster [20]. Zum Aufbau der Datenbank wurden fast 150 vorwiegend hepato- und nephrotoxische Modellsubstanzen nach einem Standardprotokoll an Ratten und Mäuse verabreicht und Metabolitenmuster in Urin-, Blut- und Gewebeproben mittels $^1\text{H-NMR}$ und $^1\text{H-Magic Angle Spinning-NMR}$ analysiert. Mit dem entwickelten Expertensystem „CLOUDS“ konnte bei einer Fehlerquote von nur 8 % eine Vorhersage über das Zielorgan getroffen werden [21]. Auf der Basis dieser

Referenzdatenbank soll es in Zukunft möglich sein, potentielle toxische Wirkungen neuer Wirkstoffkandidaten anhand typischer Urinmuster exponierter Versuchstiere vorherzusagen. Dieser Metabonomicsansatz könnte dazu dienen, den zeitaufwändigen und vor allem recht kostspieligen Prozess der *in vivo* Toxizitätstestung während der Arzneistoffentwicklung zu beschleunigen.

Daneben wurde in zahlreichen Einzelstudien die Wirkung von Toxinen und Arzneistoffen mittels NMR-basiertem Metabonomics untersucht, darunter Acetaminophen [22], Cadmiumchlorid [23], α -Naphthylisothiocyanat [24], Brombenzol [25] und *N*-Phenylanthranilsäure [26]. Der Großteil der Arbeiten basierte dabei auf Mustererkennungsansätzen, die durch die Interpretation der *usual suspects* in dem analysierten biologischen Probenmaterial gekennzeichnet waren. Die Umsetzung des erweiterten Metabonomicsansatzes mit der Intention, Gruppen potentieller spezifischer Biomarker zu identifizieren, gelang nur vereinzelt und wird für Nephrotoxizität [27, 28], arzneistoffinduzierte Phospholipidose [29] und hydrazininduzierte Neurotoxizität [30] berichtet. Inwieweit diese Marker als Expositions- bzw. Effektmarker Einzug in die Forschung und klinische Praxis finden werden, muss sich in Zukunft aber erst noch herausstellen.

1.3 Metabonomics im Fokus der Medizin

Parallel zur prädiktiven Toxikologie im Tiermodell gibt es Bestrebungen, die Metabonomics-technik auf den Menschen zu übertragen. Schlagworte sind hier: Erkennung von persönlichen Risikofaktoren, nicht-invasive Biomarker zur Frühdiagnose bestimmter Krankheiten, krankheitsspezifische Signaturen, Therapiemonitoring sowie eine personalisierte Medizin und individuelle Ernährung. Das Konzept der personalisierten Medizin umfasst die Idee, dass ein Großteil der unter Arzneimittelbehandlungen auftretenden Nebenwirkungen vermieden werden könnten, wäre der individuelle Phänotyp des Patienten vor der Behandlung bekannt. Wünschenswert wäre eine maximale Wirksamkeit der verabreichten Substanz bei gleichzeitig minimalem Risiko für das Auftreten klinisch manifester Toxizität. Risikopotential bergen vor allem Polymorphismen in fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, insbesondere in den für die Umsetzung eines Großteils der gängigen Arzneistoffe relevanten Cytochrom P 450 Klassen 2 und 3. Allerdings hat sich in diesem Zusammenhang Pharmacogenomics, d. h. Genexpressionsanalysen zur Bestimmung des individuellen Genotyps, aufgrund zahlreicher Einflussfaktoren wie Alter, Ernährungszustand, aktuelle und zurückliegende Erkrankungen, Darmflora, Co- und Prämedikationen, denen der Genotyp unterliegt, für die Vorhersage des Phänotyps meist als ungeeignet erwiesen [31]. Das Prinzip „*start low, go slow*“ bei der Wahl der Arzneimitteldosis ist daher meist gängige klinische Praxis [32].

CLAYTON *ET AL.* schlug 2006 das Konzept des Pharmaco-Metabonomics vor. Im Tiermodell gelang es, anhand des metabolischen Profils des jeweiligen Kontrollurins, das Ausmaß der Reaktion auf toxische Dosen verschiedener Modellsubstanzen (Acetaminophen, Galactosaminhydrochlorid, Allylalkohol) vorherzusagen [33]. Der Ansatz könnte gerade vor dem Hintergrund der noch immer nicht ausreichend verstandenen idiosynkratischen Toxizität dazu dienen, eine individuelle Prädisposition des behandelten Patienten abzuleiten. Idiosynkratische Reaktionen treten mit einer Prävalenz von unter 1:5000 auf. Als Ursache werden eine Reihe von Faktoren diskutiert, darunter genetische Komponenten, die Bildung von reaktiven Metaboliten bzw. Haptenen sowie pharmakologische Interaktionen [34]. Darüber hinaus könnte das kürzlich von MADDOX *ET AL.* entwickelte und auf Metabonomics basierende Lipopolysaccharidmodell für idiosynkratische Toxizität einen Beitrag in diese Richtung leisten [35].

Weitere Anwendungen von Metabonomics in der präklinischen und klinischen Praxis umfassen den Nachweis von krankheitsspezifischen Signaturen sowie die Therapieüberwachung. So konnten mittels $^1\text{H-NMR}$ eine Reihe von angeborenen Metabolismusstörungen bei Neugeborenen diagnostiziert werden [36, 37]. Mit der gleichen Technik wurden in Serumproben charakteristische Metabolitenprofile von Patienten mit Bluthochdruck [38], Eierstockkrebs [39] sowie unterschiedlich ausgeprägten Herzleiden [40] bestimmt. Darüber hinaus lieferte das Screening von Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit Signaturen für eine Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen, darunter Chorea Huntington, Muskeldystrophie, Multiple Sklerose, Schizophrenie, Alzheimer und Parkinson [41-43]. Für Meningitis wurde neben der erfolgreichen Unterscheidung des Krankheitsursprungs (bakteriell, fungal, viral) von einer erfolgreichen Therapieüberwachung berichtet [44]. Zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen werden nach Transplantationen in der Regel Immunsuppressiva wie Cyclosporin A verabreicht. Problem hierbei ist, dass der Arzneistoff eine sehr enge therapeutische Breite besitzt, und die Cyclosporintoxizität nach einer Überdosierung zu verschiedenen unerwünschten Nebenwirkungen führt, die sich allerdings in ihrer klinischen Manifestation nur schwer von einer Abstoßungsreaktion unterscheiden lassen. Hier gelang mittels Metabolitenscreening und anschließender Mustererkennung eine Abgrenzung der beiden Effekte bei Patienten nach einer Nierentransplantation [45].

Anwendungen im Bereich der Ernährung und Nahrungsergänzung setzen noch eine Stufe früher an und verfolgen mit dem Metabonomicsansatz die Strategie „Prävention statt Diagnostik“. Neben dem Ziel, Mangelernährung möglichst frühzeitig zu erkennen, liegt der Fokus auf dem Einfluss individueller, gesundheitsfördernder Ernährung. Der erste Schritt umfasst den Aufbau von Datenbanken. Auf diese Weise können die individuellen metabolischen Profile einer repräsentativen Population mit phänotypischen Endpunkten wie Arteriosklerose, Diabetes,

Bluthochdruck oder Osteoporose korreliert werden. Besonderes Augenmerk gilt hierbei dem Lipidomicsansatz, der auf dem Screening der Klasse der Lipide und Phospholipide basiert. Damit soll es in Zukunft möglich sein, persönliche Risikofaktoren zu erkennen und mit einem individuell abgestimmten Ernährungsplan dem Ausbruch einer Krankheit entgegenzuwirken [46, 47]. Arbeiten auf diesem Gebiet untersuchten bisher den Einfluss von grünem und schwarzem Tee [48, 49], Epicatechin [50], Isoflavonen [51, 52], Kamillentee [53] und mehrfach ungesättigten Fettsäuren [54] auf das metabolische Profil. Darüber hinaus wurden mit Metabonomics Effekte einer reduzierten Kalorienaufnahme [55], einer vegetarischen, fleischarmen und fleischreichen Diät [56], einer standardisierten Diät [57, 58], einer von dem Kulturkreis abhängigen Diät [59] sowie einer mit Milch- bzw. Fleischprotein supplementierten Diät [60] charakterisiert. Ferner konnte in einem Tiermodell für das Reizdarmsyndrom der positive Einfluss einer probiotischen Ernährung gezeigt werden [61].

Die Untersuchungen zu präklinischen, klinischen und pharmazeutischen Anwendungen klingen im Ansatz vielversprechend, lieferten aber bisher noch keine neuen Erkenntnisse bezüglich früher krankheits- bzw. toxizitätsspezifischer Biomarker [62]. Dies ist wohl auch darauf zurückzuführen, dass für die Analyse der Urin- und Blutproben in der Hauptsache die klassische NMR-Technik mit ihrem, auf den *usual suspects* basierenden, Mustererkennungsansatz zur Anwendung kam. Bei den *usual suspects* handelt es sich um Katabolite des Intermediärstoffwechsels, wie Glucose, Kreatinin oder Lactat, die in relativ großen Mengen mit dem Urin ausgeschieden werden. Da diese Metaboliten in gleichem Maße durch physiologische, krankheitsbezogene sowie toxikologische Faktoren beeinflusst werden, können sie einzeln nicht als spezifische Biomarker dienen.

1.4 Weitere Anwendungen des Metabonomicskonzepts

Weitere Metabonomicsanwendungen umfassen unter anderem die Bereiche Botanik, Umwelt und *in vitro* Testsysteme. Arbeiten auf dem Gebiet der Botanik befassen sich vor allem mit den Modellsystemen *Arabidopsis thaliana* und *Solanum tuberosum*. Mittels Metabonomics wurden genetische Modifikationen sowie verschiedene Einflussfaktoren auf das Wachstum einer Reihe weiterer Pflanzen charakterisiert [63-66]. Anwendungen im Umweltsektor umfassten die Untersuchung diverser Stressoren auf Modellorganismen [67-69]. Einen vielversprechenden Ansatz stellt ferner das Screening von Extrakten aus *in vitro* Zellsystemen nach Behandlung mit unterschiedlichen toxischen bzw. pharmakologisch wirksamen Substanzen dar. So lieferte beispielsweise das Screening von Extrakten aus Krebsgewebe Einblicke in Ursache und

Mechanismus der Krebsentstehung [70, 71]. Darüber hinaus wurde Metabonomics erfolgreich in der Mikrobiologie zur Optimierung diverser Mikrobenstämme und Kulturmedien sowie zur Erkennung von Mutationen eingesetzt [72-74]. Potential zeigt die Technik auch im Hinblick auf Herkunftsbestimmung und Qualitätskontrolle von Lebensmitteln [75, 76]. Zu den genannten Bereichen existiert eine Vielzahl an Übersichtsartikeln, auf die an dieser Stelle verwiesen werden soll [16, 65, 77, 78].

1.5 Vergleich der analytischen Verfahren im Bereich Metabonomics

Es stellte sich schnell heraus, dass für die Übertragung des Metabonomicsansatzes auf den Menschen neue Screeningtechniken benötigt werden, da sich die mit $^1\text{H-NMR}$ erfassbaren Metabolitenmuster zu anfällig gegenüber Einflussfaktoren (Confoundern) wie genetischer Prädisposition, Alter, Geschlecht, Lebensstil, Ernährungsgewohnheiten etc. erwiesen haben, so dass die regulierten Metaboliten nicht als Biomarker dienen konnten. So wurden nach dem Konsum von Fleisch bzw. Geflügel die Metaboliten Carnosin und Anserin, nach dem Verzehr von Fisch bzw. Schalentieren Betain und Trimethylamin und nach dem Verzehr von Kirschen vermehrt Fructose ausgeschieden [15]. In mehreren Studien wurde darüber hinaus ein Einfluss der Darmflora [79, 80], der Tageszeit und des weiblichen Zyklus [81] auf das Metabolitenprofil gezeigt. Des Weiteren wurde von einer altersabhängigen Ausscheidung von Taurin und Citrat berichtet, zwei Metaboliten, die in einer Reihe von Studien als Expositionsmarker identifiziert wurden [82].

In gleichem Maße kann eine vermehrte Glucoseausscheidung mit dem Urin, wie sie häufig in tierexperimentellen Studien beobachtet wird, vielfältige Ursachen haben und muss nicht zwangsläufig auf einen nierentoxischen Effekt hindeuten. Im Gegensatz zur klassischen Mustererkennung zielt humanes Metabonomics daher vor allem auf die Identifizierung spezifischer und robuster Biomarker aus dem metabolischen Profil. Idealerweise besteht ein direkter mechanistischer Zusammenhang zwischen dem Markermetaboliten und der untersuchten Ursache. Der identifizierte Biomarker könnte dann nach einer sorgfältigen Validierung in Form einfacher und minimal-invasiver Urin- bzw. Bluttests zur Vorhersage individueller Risikofaktoren in Bezug auf Überempfindlichkeitsreaktionen, bestimmte Krankheiten oder Toxizitäten eingesetzt werden.

Mit der Massenspektrometrie steht eine sensitive und selektive Technik für das Screening biologischer Proben sowie die anschließende Identifizierung der Metaboliten zur Verfügung. Die höhere Sensitivität der Massenspektrometrie im Vergleich zur NMR-Technik ermöglicht es, auch sehr geringe Analytkonzentrationen zu bestimmen, wodurch das Spektrum der zugänglichen Metaboliten erheblich erweitert wird. Dabei hat sich für die Analyse biologischer Proben wie

Urin oder Plasma die Kopplung mit der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC-MS bzw. LC-MS) bewährt. Die Kopplung der Massenspektrometrie mit der Gaschromatographie (GC-MS) hat sich vor allem für das Screening von Pflanzen- und Zellextrakten durchgesetzt [66]. Daneben wurde von einigen Anwendungen der Kapillarelektrophorese (CE-MS) für das Screening von Metaboliten berichtet [83-86].

Auf dem Gebiet des auf der Massenspektrometrie basierten, humanen Metabonomics überwiegen LC-MS-Methoden. Im Gegensatz zur GC-MS-Technik muss für LC-MS-Analysen keine aufwändige Probenvorbereitung in Form von Extraktion und Derivatisierung erfolgen; die für biologisches Probenmaterial relevanten Substanzklassen (Aminosäuren, Lipide, kurzkettige Saccharide, organische Säuren und Basen, Steroide, Nucleotide, Glycoside, Phase-II-Metaboliten wie Sulfate, Glucuronide etc.) können direkt mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden. Einzige Voraussetzung ist die Ionisierbarkeit der Moleküle. Die Chromatographie erfolgt zumeist im *full scan*-Modus in Verbindung mit einer Gradientenelution auf *reversed phase*-Säulen und Elektrosprayionisierung im positiven bzw. negativen Modus. Die exakte Masse der Analyten wird meist mit einem Flugzeitdetektor (*time-of-flight*-Detektor – TOF-Detektor) erfasst. Das resultierende dreidimensionale Massenspektrum, bestehend aus Retentionszeit, Masse-zu-Ladungs-Verhältnis und Signalfläche, kann nach geeigneter Prozessierung als multivariater Datensatz dienen. Bedingt durch co-eluierende Substanzen und Matrixbestandteile (Salze) unterliegen konzentrierte biologische Proben mitunter dem Phänomen der Ionensuppression, d. h. für die Analyten kommt es zu einer vorübergehenden Unterdrückung der Ionisierung und folglich zu einer verminderten Signalintensität [87]. Diesem Effekt wird in klassischen quantitativen Analysen mit Hilfe von internen Standards Rechnung getragen. Eine Übertragung auf das ungerichtete Metabolitenscreening ist allerdings schwierig. Zur Strukturaufklärung der endogenen Metaboliten sowie der selektierten potentiellen Biomarker können zum einen die exakte Masse, Produktionenspektren und/oder MS-MS-Experimente herangezogen werden. Mit der neuesten Generation Massenspektrometer (Hybrid Quadrupol Ionenfalle/TOF, Hybrid Ionenfalle/Orbitrap) ist sowohl für das Mutterion als auch für die Fragmentionen die Bestimmung der exakten Masse möglich [88, 89]. Ein bisher noch bestehender Nachteil der LC-MS-Technik ist das Fehlen umfangreicher Metabolitendatenbanken. Während für GC-MS und NMR einige Spektraldatenbanken wie *NIST* [90] bzw. *Chenomx* [91] verfügbar sind, befinden sich entsprechende LC-MS-Register noch im Aufbau und stehen für Strukturvorschläge zu den selektierten Massen nur bedingt zur Verfügung [6, 92].

In Analogie zum klassischen Metabonomicsansatz via $^1\text{H-NMR}$ wurden mit LC-MS die Metabolitenprofile biologischer Proben von Nagetieren nach Verabreichung verschiedener toxischer

Substanzen, darunter Quecksilberchlorid [93], Cyclosporin A [94], Gentamicin [95], D-Serin [96] sowie einiger Schwermetalle [90, 97], untersucht. Für die drei erstgenannten Studien wurden zu Vergleichszwecken zusätzlich ^1H -NMR-Spektren aufgenommen. Beide Techniken zeigten eine gute Korrelation und beschrieben einen ähnlichen Zeitverlauf der Toxizität. Bedingt durch die jeweilige Sensitivität der Applikation basierten die Trajektorien (zeitliche Musterverläufe) jedoch auf qualitativ unterschiedlichen Metaboliten. Der Metabolismus von Xenobiotica wurde anhand mechanistischer Untersuchungen bezüglich Cytochrom P 450 1A2 mit Wildtyp, *knock-out* und transgenen Mäusen untersucht [18]. Darüber hinaus wurden mit LC-MS diverse physiologische Faktoren und genetische Veränderungen bei Mensch und Versuchstier untersucht [98, 99]. Ein Bindeglied zwischen Tier und Mensch stellen Krankheitsmodelle im Versuchstier dar. So werden Zuckerratten vielfach als Modell für Fettsucht, Insulinresistenz bzw. Typ-II-Diabetes eingesetzt. Im Probenmaterial dieser Tiere konnten mittels LC-MS-Metabonomics eine Reihe von Expositionsmarkern identifiziert werden, darunter Taurocholsäure im Plasma sowie 2-Ethylimidazol, Carnithin und Pyrimidinnucleosid im Urin [100, 101].

Neben diesen Modellstudien zeigten erste Humanstudien zu Nierenkrebs [102], myokardialer Ischämie [103], Typ II Diabetes [104], Cystitis [105], intestinalen Fisteln [106], Leberkrebs und Leberzirrhose [107, 108] sowie chronischer Hepatitis B [109] erfolgreich umgesetzte Metabonomicsansätze und lieferten neue Hinweise auf krankheitsspezifische Signaturen. Die Studie zu Typ-II-Diabetes fokussierte sich hierbei auf das Screening der Plasmalipide, die beiden Studien zu Leberkrebs und Leberzirrhose auf die Klasse der *cis*-Dirole (v. a. Nucleoside) und stellten folglich *metabolic profiling*-Ansätze dar. Potential zeigte der Ansatz auch im Hinblick auf die Phänotypisierung fremdstoffmetabolisierender Enzyme. So konnten nach Einnahme einer Testsubstanz in den Urinproben der Probanden Enzym polymorphismen identifiziert werden, die eine eindeutige Zuordnung zum entsprechenden metabolischen Phänotyp (schneller oder langsamer Metabolisierer) zuließen [7, 110].

In den aufgeführten Studien konnten mittels LC-MS-basiertem Metabonomics zahlreiche Metaboliten identifiziert werden, die mit der traditionellen NMR-Technik nicht erfasst worden wären. Allerdings steht eine klassische Evaluierung und Validierung der potentiellen Marker noch aus. Dieser Schritt ist unerlässlich im Hinblick auf einen routinemäßigen Einsatz als diagnostische Marker in der klinischen Praxis.

2 Merkaptursäuren als Indikatoren für die Bildung toxischer Intermediate

Aufgrund exogener und endogener Faktoren wird im menschlichen Organismus stets eine Vielzahl an chemisch reaktiven Substanzen gebildet. Um Schäden an der Erbsubstanz, an Proteinen und Membranlipiden zu vermeiden, werden potentiell gesundheitsgefährdende Stoffe einem hocheffizienten Fremdstoffmetabolismus zugeführt. Diese Biotransformation gliedert sich in zwei Phasen und hat die Detoxifizierung (Inaktivierung) und Ausscheidung lipophiler Substanzen in Form von wasserlöslichen Derivaten zum Ziel. In einem ersten Schritt, der sogenannten Funktionalisierung oder Phase-I-Reaktion, erfolgt eine chemische Modifizierung des Moleküls, beispielsweise in Form von Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse. Die Reaktionen werden meist durch die Klasse der Cytochrom P 450 abhängigen Monooxygenasen katalysiert. Die Enzyme sind hauptsächlich im Bereich des glatten Endoplasmatischen Retikulums der Leber lokalisiert. Die neu eingeführten bzw. modifizierten Gruppen dienen dazu, sie mit endogenen Substraten wie aktivierter Glucuronsäure, aktiviertem Sulfat oder Glutathion zu konjugieren (Phase-II-Reaktion). Die Konjugate dieser Biotransformation sind in den meisten Fällen inaktiv, d. h. sie können nicht mehr mit zellulären Bestandteilen reagieren. Die Phase-II-Reaktionen erhöhen die Wasserlöslichkeit der lipophilen Ausgangssubstanzen, so dass die Konjugate mit dem Urin ausgeschieden werden können.

2.1 Bildung toxischer Intermediate

In einigen Fällen können Phase-I-Reaktionen allerdings auch zur Bildung reaktiver Spezies beitragen (Giftung). Charakteristische Strukturen reaktiver Intermediate umfassen eine Vielfalt gesättigter und ungesättigter chemischer Strukturen wie beispielsweise Alkylhalide, Lactone, Epoxide, α,β -ungesättigte Verbindungen, Chinone, Chinonimine, Ester, Arylhalide, Arylnitroverbindungen und Nitreniumionen [111, 112]. Aufgrund ihrer Reaktionsbereitschaft gegenüber elektronenreichen Verbindungen werden diese reaktiven Metaboliten auch als Elektrophile bezeichnet. Dabei ist die elektrophile Reaktivität durch das Prinzip der „harten und weichen Säuren und Basen“ charakterisiert [113]. Demnach reagieren harte Elektrophile bevorzugt mit harten Nucleophilen wie den Nucleinbasen bzw. mit freiem und proteingebundenem Lysin, weiche Elektrophile dagegen mit weichen Nucleophilen wie Thiolgruppen von Proteinen und Peptiden. Die wichtigste Rolle bei der Entgiftung reaktiver Verbindungen spielt das Tripeptid Glutathion, das hauptsächlich in der Leber lokalisiert ist und hier eine Konzentration von 5 – 10 mM aufweist.

Die metabolische Bildung reaktiver Metaboliten ist ein generell akzeptierter Mechanismus bei der Entstehung diverser toxischer Effekte [114]. Insbesondere die idiosynkratische Toxizität steht in einem engen Zusammenhang mit der Bildung reaktiver Intermediate [34]. Darüber hinaus wird die oxidative Schädigung des Organismus mit einer Reihe von Krankheitsbildern in Verbindung gebracht, darunter Parkinson, Alzheimer, AIDS und Krebs. Volkskrankheiten wie Arteriosklerose, Diabetes und koronare Herzerkrankungen stehen ebenfalls als Folge von oxidativem Stress in der Diskussion [115].

Es gibt aus dem Bereich der Arzneistoffe, Industriechemikalien und organischen Lösungsmittel zahlreiche Beispiele für Substanzen, die reaktive Intermediate bilden bzw. *per se* reaktiv sind. So können die Arzneistoffe Acetaminophen, Diclofenac und Troglitazon zu chinoiden Strukturen aktiviert werden. Im Menschen führt im Fall des Acetaminophens eine orale Dosis von über 15 g zu einer vermehrten Bildung des elektrophilen *N*-Acetyl-*p*-Benzochinonimins (NAPQI) und geht mit einer massiven Leberschädigung einher [116]. Die Carboxylsäure Diclofenac kann sowohl oxidativ aktiviert als auch zu einem Acylglucuronid konjugiert werden. Dieses ist, im Gegensatz zu anderen Phase-II-Metaboliten, labil und kann unter anderem in einer Transacylierungsreaktion an Proteine der Leber binden [117]. Das Antidiabetikum Troglitazon ist ein Beispiel für einen Arzneistoff, der wegen idiosynkratischer Toxizität vom Markt genommen wurde. Das klinische Bild der Hepatotoxizität ist heterogen, es gibt aber zahlreiche Hinweise, dass sowohl die Bioaktivierung des Chroman- als auch die des Thiazolidindion-Rings Einfluss auf die Pathogenese nimmt [114]. Wiederholte Halothan-Narkosen sind in seltenen Fällen mit dem idiosynkratischen Phänomen der Halothan-Hepatitis assoziiert. Bioaktivierung von Halothan durch Cytochrom P 450 2E1 führt zur Bildung von Trifluoracetyl-Radikalen in der Leber, welche mit hepatischen Proteinen reagieren und bei einem Zweitkontakt eine Immunantwort provozieren können [114]. Die Industriechemikalien Styrol, Vinylchlorid und Bisphenol A werden vielfach als Monomere in der Kunststoffherstellung eingesetzt. Styrol und Vinylchlorid zählen zu den bedeutendsten Grundstoffen der chemischen Industrie und tragen zusammen mit organischen Lösungsmitteln wie Benzol, Toluol, *n*-Hexan, Perchlorethen und Trichlorethen bei exponierten Personen zur exogenen Belastung mit Elektrophilen bei [118]. Dabei resultiert das elektrophile Potential aus der metabolischen Aktivierung zu einem Epoxid [119]. Bisphenol A ist schwach östrogenwirksam und wird daher den *endocrine disruptors* zugeordnet. Im menschlichen Organismus unterliegt Bisphenol A einer effektiven Glucuronidierung, kann aber *in vitro* zu einem geringen Prozentsatz auch bioaktiviert werden [120, 121]. Benzol gilt als ubiquitär vorhandenes Umwelttoxin. Chronische Exposition führt unter anderem zu Leukämie, Lungenkrebs und Anämie. Die Hauptquellen sind Fahrzeugkraftstoffe, die noch bis zu 1 % Benzol enthalten dürfen, sowie

Tabakrauch. Der Metabolismus von Benzol ist komplex und umfasst unter anderem die Bildung eines Epoxids als reaktives Intermediat [122]. Halogenierte Alkene wie Per- und Trichlorethen sind Beispiele für Verbindungen, die durch eine Phase-II-Reaktion aktiviert werden können. So kann aus dem jeweiligen Glutathion-Addukt durch eine β -Lyase-abhängige Reaktion in der Niere ein reaktives Thioketen entstehen, das eine hohe Affinität zu Proteinen aufweist und für die nephrotoxische Wirkung verantwortlich gemacht wird [123, 124].

Zudem können Nahrungsbestandteile durch Phase-I-Enzyme aktiviert werden und zu Schädigungen körpereigener Strukturen beitragen. Quellen stellen hier Erhitzungsprodukte wie Acrylamid, Furan sowie heterocyclische aromatische Amine dar. Acrylamid wird in kohlenhydratreichen Nahrungsmitteln durch Maillard-Reaktion gebildet und ist *per se* reaktiv. Zusätzlich wird es mittels Cytochrom P 450 2E1 in das ebenfalls aktive Reaktionsprodukt Glycidamid, ein Epoxid, umgewandelt. Beide Verbindungen werden mit der Entstehung von Tumoren in Brustdrüsen, Testes und Schilddrüse in Verbindung gebracht [125]. Analog entsteht durch Erhitzung von Lebensmitteln der zweifach ungesättigte Heterocyclus Furan, der im Tierversuch ein ausgeprägt kanzerogenes Potential aufweist. Der elektrophile Dialdehyd 2-Buten-1,4-dial stellt das Produkt der Phase-I-Reaktion dar [126]. Heterocyclische aromatische Amine (z. B. PhIP, IQ, MeIQ, MeIQx)) entstehen beim Kochen von Fleischprodukten und werden in gleicher Weise wie die in Haarfärbemitteln und Textilfarbstoffen enthaltenen aromatischen Amine (z. B. 4-Aminobiphenyl, 2-Naphthylamin, Anilin) via Cytochrom P 450 abhängiger Monooxygenasen zu Nitreniumionen bioaktiviert [127, 128]. Diese zeigen eine hohe Affinität gegenüber Hämoglobin sowie DNA-Basen und sind für die kanzerogenen und mutagenen Eigenschaften der Verbindungsklasse verantwortlich. Eine dauerhafte berufliche Exposition mit aromatischen Aminen ist mit der Entstehung von Blasenkrebs assoziiert. Darüber hinaus bergen Isothiocyanate wie das in zahlreichen Kohlarten enthaltene Sulforaphan oder Safrol in Pfeffer, Muskat und Fenchel [129] ebenso wie ubiquitär verbreitete Mykotoxine (Aflatoxine, Ochratoxin A) [130] das Potential, zelluläre Makromoleküle nachhaltig schädigen zu können. Im Fall des Aflatoxins erfolgt die Aktivierung zum Epoxid, im Fall des Ochratoxins zum Chinon.

Von besonderem Interesse sind zudem Tabakrauchbestandteile wie beispielsweise polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, 1,3-Butadien, Acrolein, Crotonaldehyd, Ethylenoxid, Phenole, Kresole, Nitrosamine etc., die in großer Anzahl bioaktiviert werden können und erheblich zur exogenen Belastung von Rauchern, aber auch von Passivrauchern, mit Elektrophilen beitragen. Die Klasse der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (typische Vertreter der Klasse sind z. B. Anthracen, Benzo[a]pyren, Benzo[a]fluoren und Phenanthren) gehört zu den potentesten Karzinogenen in Tabakrauch. Durch Epoxidierungs- und Hydrolysereaktionen ent-

stehen eine Reihe hochreaktiver Metaboliten, darunter das Diolepoxid des Benzo[a]pyrens, das auch als ultimales Kanzerogen bezeichnet wird [131]. Daneben entfalten die zu Nitreniumionen aktivierten tabakspezifischen Nitrosamine ein ähnliches kanzerogenes Potential [132].

Endogen entstehen unter anderem durch reaktive Sauerstoffspezies (oxidativer Stress) im Kontext der Lipidperoxidation Derivate wie das 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE), das als Elektrophil zu Modifikationen an Proteinen bzw. der DNA führen kann [133]. Der Metabolismus von HNE ist äußerst komplex. Sowohl oxidative als auch reduktive Stoffwechselwege liefern zahlreiche Zwischenprodukte, von denen beispielsweise die 4-Hydroxynonensäure (HNA) wiederum ein reaktives Intermediat darstellt. HNE geht ebenso wie das Oxidationsprodukt 4-Oxo-2-nonenal (ONE) auf das 4-Hydroperoxy-2-nonenal zurück [134]. Auch unterliegt das Grundgerüst der Steroide (Östrogene, Cholesterol) metabolischen Aktivierungsschritten in Form von Epoxidierungsreaktionen. Des Weiteren können Vertreter der Eicosanoide (Prostaglandine, Isoprostane, Thromboxane) und Catecholamine (*L*-Dihydroxyphenylalanin – DOPA, Dopamin) bioaktiviert werden [134]. Alle vorgenannten Metaboliten stellen Elektrophile dar und können zu einer Hintergrundbelastung mit reaktiven Spezies beitragen.

2.2 Detoxifizierungsreaktionen

Mit dem Glutathionsystem verfügt der Körper über einen wirksamen Detoxifizierungsmechanismus, um elektrophile Spezies möglichst am Ort der Entstehung abfangen zu können. Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin aufgebaut, wobei die Verknüpfung der Glutaminsäure über die γ -ständige Säuregruppe erfolgt. Die Thiolgruppe des Cysteins kann als weiches Nukleophil mit den exogen und endogen gebildeten elektrophilen Verbindungen reagieren. Die Konjugation erfolgt zum einen spontan, zum anderen enzymatisch mittels Glutathion-*S*-Transferase (GST). Die Klasse der GSTs bildet eine Superfamilie cytosolischer Enzyme, für die acht humane Polymorphismen (α , κ , μ , π , σ , θ , ζ und ω) beschrieben sind [135]. Hauptorte der Entgiftung sind in erster Linie die Leber und die Niere. Um die GSH-Konjugate in eine wasserlösliche Form zu überführen, werden sie metabolisch modifiziert (**Abb. 2**). Der erste Schritt umfasst die enzymatische Abspaltung der Glutaminsäure mittels γ -Glutamyltranspeptidase, auch γ -Glutamyltransferase genannt, und führt zur Bildung von Cysteinylglycin-*S*-Konjugaten. In einem zweiten Schritt erfolgt der Abbau zum Cystein-*S*-Konjugat durch Cysteinylglycin-Dipeptidase. Durch *N*-Acetylierung werden die Cystein-Addukte in einem dritten Schritt in die jeweiligen *N*-Acetyl-*L*-Cystein-Konjugate überführt. Die Reaktion wird durch das microsomale Enzym Cystein-*S*-Konjugat *N*-Acetyltransferase katalysiert. Endprodukt der Kaskade sind Mercaptursäuren (MAs), *N*-Acetyl-*L*-Cystein-Addukte,

die gut wasserlöslich sind und in der Regel über die Niere ausgeschieden werden [136]. Gegebenenfalls kann anschließend eine Oxidation zum Mercaptursäure-Sulfoxid (MA-SO) erfolgen [137, 138].

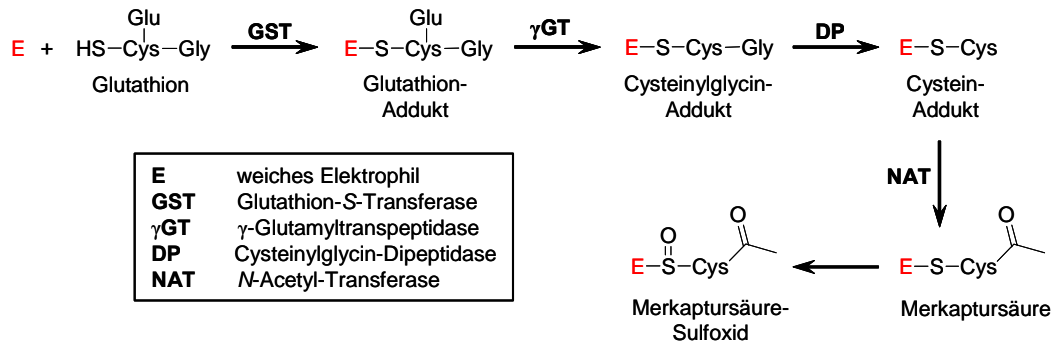


Abb. 2: Reaktionen, die ausgehend von einem weichen Elektrophil zur Bildung einer Mercaptursäure bzw. eines Mercaptursäure-Sulfoxids führen.

PERBELLINI *ET AL.* konstatierten, dass auf diesem Weg eine theoretisch unbegrenzte Anzahl an Mercaptursäuren gebildet werden kann [118]. Folglich besteht zwischen der elektrophilen Belastung eines Organismus und den entsprechenden Mercaptursäurederivaten im Urin ein direkter Zusammenhang. Dies ist auch der Grund dafür, dass Mercaptursäuren vielfach als Ansatz für ein humanes Biomonitoring in der Diskussion standen.

2.3 Mercaptursäuren als Biomarker zur Abschätzung einer Belastung mit elektrophilen Species

Allgemein sollte ein Biomarker für ein humanes Biomonitoring die folgenden Anforderungen erfüllen: er sollte bezüglich des untersuchten Effekts (Suszeptibilität, Belastung, Krankheit, Toxizität etc.) spezifisch sein, eine ausreichende biologische Halbwertszeit besitzen, mit einem analytischen Verfahren spezifisch, empfindlich, quantitativ, relativ einfach, schnell und kostengünstig messbar sein sowie direkt mit dem zugrunde liegenden biochemischen Mechanismus verknüpft sein. Des Weiteren sollte die biologische Probe nicht-invasiv entnommen werden können [139].

Reaktive Intermediate können *in vivo* mit nucleophilen Zentren von Makromolekülen wie Proteinen, der DNA sowie Glutathion reagieren. Folglich können die resultierenden Addukte als potentielle Biomarker im Rahmen eines Biomonitorings dienen. Mercaptursäuren bilden im Gegensatz zu anderen Biomarkerklassen einen guten Kompromiss zwischen den angeführten Anforderungen. So leiten sich Mercaptursäuren meist aus einer, selten auch mehreren, Ausgangsverbindungen ab. Sie werden mit dem Urin ausgeschieden, können folglich nicht-invasiv

gewonnen werden und sind insbesondere mit Verfahren, die auf Flüssigchromatographie basieren, spezifisch und sensitiv analysierbar [118, 140].

Im Gegensatz dazu erfordert das Monitoring von Protein-Addukten aufwändige Isolierungs- und Fraktionierungsschritte. Dabei kann in der Regel nur wenig Probenmaterial gewonnen werden. Reparaturmechanismen und ein relativ hoher Hintergrund an modifizierten Basen in Kontrollgruppen sind limitierende Faktoren für einen auf DNA-Addukten basierenden Biomonitoringansatz. Verglichen mit Mercaptursäuren haben Protein- bzw. DNA-Addukte längere Halbwertszeiten, was die Interpretation einer Ursache-Wirkungs-Beziehung erschwert. Gallenflüssigkeit zur Bestimmung von GSH-Addukten kann nur invasiv gewonnen werden, entsprechende Analysen sind dadurch meist auf das Versuchstier beschränkt [141]. Vor diesem Hintergrund erscheinen Mercaptursäuren als eine ideale Verbindungsklasse, um in humanem Probenmaterial eine Belastung mit elektrophilen Spezies abzuschätzen.

2.4 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Mercaptursäuren

Mercaptursäuren bestehen aus der *N*-Acetyl-L-Cystein-Einheit und einer variablen Gruppe, die von dem konjugierten Elektrophil stammt (**Abb. 2**). Die *N*-Acetyl-L-Cystein-Einheit ist relativ hydrophil, wohingegen die über das S-Atom des Cysteins gebundene Gruppe in der Regel eher lipophile Eigenschaften aufweist.

Für die Analyse von Mercaptursäuren sind in der Literatur zahlreiche Verfahren beschrieben, die sich allerdings hinsichtlich ihrer Selektivität und Sensitivität unterscheiden. Eine detaillierte Übersicht über die analytischen Methoden mit zahlreichen Applikationen und Nachweisgrenzen für Einzelsubstanzen geben PERBELLINI ET AL. [118] und DE ROOIJ ET AL. [136]. Demnach stellen der Thioether-Assay [142] sowie HPLC gekoppelt mit UV- [143], Fluoreszenz- [144] bzw. elektrochemischer Detektion [145] recht unspezifische Methoden dar, die ferner limitiert sind, was die Sensitivität der Messung angeht. Daneben sind vereinzelt selektive ELISA- sowie TLC/*post-labelling*-Methoden beschrieben [146-148]. Die meisten analytischen Methoden basieren jedoch auf chromatographischen Verfahren wie der Gas- bzw. Flüssigchromatographie, oft in Kombination mit der (Tandem-)Massenspektrometrie (GC-MS bzw. GC-MS/MS, LC-MS bzw. LC-MS/MS) [149-151]. Die Methoden zeichnen sich durch eine hohe Selektivität bei gleichzeitig guter Sensitivität aus. Darüber hinaus sind für die Gaschromatographie weitere Detektoren, wie beispielsweise der Flammenionisationsdetektor [152], der Stickstoff-Phosphor-Detektor [153], der Elektroneneinfangdetektor [154] sowie der Schwefeldetektor [155], beschrieben. Da Mercaptursäuren nicht flüchtig sind und in wässriger Matrix (v. a. Urin und Blut) vorliegen, erfordern GC-Methoden sowohl einen Extraktions- als auch einen Derivatisierungs-

schritt. Neuere Applikationen basieren daher vorwiegend auf MS-gekoppelten LC-Verfahren. Selektive LC-MS/MS-Methoden sind beschrieben für exogene Mercaptursäuren wie *S*-Phenyl-MA [122], Monohydroxybutenyl-MA und Dihydroxybutyl-MA [156], Sulforaphan-MA [157] sowie für Mercaptursäuren, die sich von der Valproinsäure ableiten [150], für Diastereoisomere des Styrol-Metaboliten Phenylhydroxyethyl-MA [119] und für Dimethylbenzyl-MAs [158]. Aufgrund der hohen Sensitivität können mit der Technik auch endogene Mercaptursäuren, wie die auf die Lipidperoxidationsprodukte 4-Hydroxy-2-nonenal und 1,4-Dihydroxynonen zurückgehenden Mercaptursäuren, detektiert werden [159, 160].

Eine Weiterentwicklung der klassischen LC-Methoden stellt die Anreicherung von Analyten mittels Säulenschaltung dar. Mit der Anordnung ist es möglich, Festphasenextraktionen *on-line* durchzuführen und auf diese Weise die Probenvorbereitung zu automatisieren. Um die Sensitivität der LC-MS/MS-Methode mit Säulenschaltung zu demonstrieren, wurde der Benzol-Metabolit *S*-Phenyl-MA in Urinproben von Neugeborenen und Nichtrauchern bestimmt, die nur durch die Umwelt mit Benzol exponiert waren [161].

3 Chemometrische Verfahren im Kontext Metabonomics

Jahrzehntelang basierten medizinische Diagnosen auf einzelnen klinischen Parametern. Auch heute erfolgt die Diagnose von Diabetes immer noch anhand des Glucosewertes im Blut. Ein weiteres Beispiel sind erhöhte Blutfettwerte, insbesondere erhöhtes Cholesterin, das allgemein mit einem Risiko für Arteriosklerose korreliert wird. Eine solche Vorgehensweise wird als COST- (*consider one separate variable at a time*), OVAT- (*one variable at a time*) bzw. *eyeballing*-Ansatz bezeichnet [162].

Im Gegensatz zu früher ist es heute aber möglich, mittels geeigneter Screeningverfahren in einer biologischen Probe (v. a. Urin und Blut) hunderte bis tausende Parameter gleichzeitig zu erfassen. Einen relativ neuen Ansatz, den Informationsgehalt dieser Proben statistisch zu untersuchen, stellen Projektionsmethoden dar, die auf multivariater Datenanalyse basieren. Gemeinsames Grundprinzip der chemometrischen Verfahren ist die Reduktion der Dimensionalität unter weitgehendem Erhalt der originalen Information.

Mit den für Metabonomicsstudien typischen Analyseplattformen NMR, GC-MS, CE-MS und LC-MS werden in der Regel komplexe Datenmatrices der Form „*short and fat*“ generiert, d. h. die Anzahl der Variablen (Parameter) übersteigt die Anzahl der Beobachtungen (Proben) um ein Vielfaches. Erschwerend kommt hinzu, dass diese Tabellen häufig unvollständig sind (fehlende Proben bzw. Detektionsprobleme), die Variablen einen gewissen Anteil Rauschen beinhalten

bzw. die Parameter durch ein hohes Maß an Kollinearität geprägt sind [162]. Derartige Datenstrukturen können beispielsweise mit der Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis* – PCA) analysiert werden [163]. Die PCA geht auf CAUCHY UND PEARSON zurück und ist eine multivariate Projektionsmethode, die auf die Identifizierung systematischer Variation, d. h. maximaler Varianz in einer Datenmatrix abzielt [164, 165]. In einem PCA Modell werden die vielen, zum Teil korrelierten Variablen auf wenige unkorrelierte, latente Variablen, die sogenannten Hauptkomponenten (*principal components* – PCs) reduziert. Dabei stellt jede PC eine Linearkombination aus den ursprünglichen Datenparametern, den Signalflächen der mit dem Screeningverfahren erfassten Metaboliten für einen bestimmten Massenbereich, dar. Aufeinanderfolgende PCs stehen orthogonal zueinander und sind deshalb voneinander unabhängig. Jede Probe kann so in einem *score plot* als Punkt in einem meist zwei- bis dreidimensionalen Koordinatensystem latenter Variablen dargestellt werden, beinhaltet aber weiterhin nahezu die gesamte chromatographische bzw. spektrale Information (**Abb. 3**). Die Lokalisation der *scores* ist dabei allein von der Varianz der Probe in Relation zu den restlichen Beobachtungen abhängig.

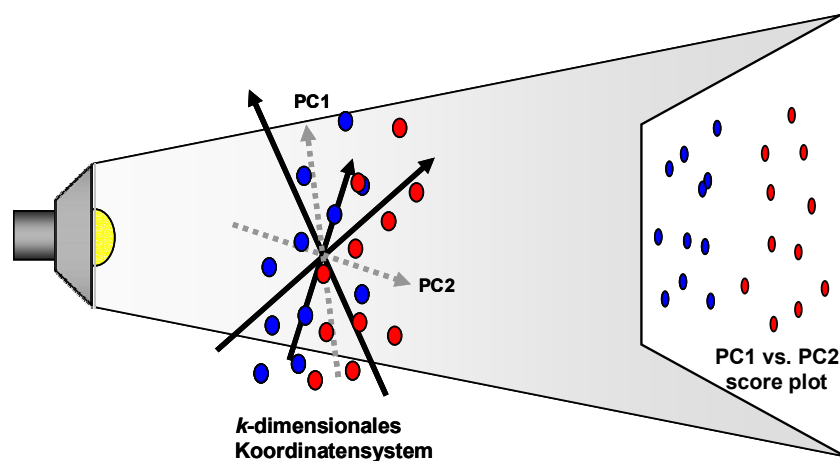


Abb. 3: Prinzip der Hauptkomponentenanalyse (PCA): Jede Beobachtung (Probe) wird als Punkt in ein k -dimensionales Koordinatensystem eingeordnet, wobei k für die Anzahl gemessener Variablen steht. Die Hauptkomponenten (PCs) verlaufen entlang der größten Varianz im Punkteschwarm. Aus der Projektion des Punkteschwarms auf eine zweidimensionale Ebene resultiert der PC1 vs. PC2 *score plot*.

Da keine Information bezüglich einer Gruppenzugehörigkeit der Proben in die Berechnung der Modelle eingeht, wird die PCA daher auch als *unsupervised*-Verfahren bezeichnet. Der PCA *score plot* dient meist dazu, einen ersten Überblick über den Datensatz zu gewinnen. Eine Clusterbildung kann beispielsweise Aufschluss über die Korrelationsstruktur der Beobachtungen geben [166]. Häufig bilden Kontroll- und Dosisgruppe in Tierstudien [167] bzw. gesunde und erkrankte Probanden in Humanstudien [37, 39] distinkte Cluster. Des Weiteren können Dosis-

[22, 26, 168] und Zeitabhängigkeiten [29, 167] beobachtet sowie Ausreißer [21, 53] identifiziert werden. KEUN *ET AL.* nutzten die Hauptkomponentenanalyse, um die analytische Reproduzierbarkeit ihres NMR-basierten Metabonomicsansatzes zu überprüfen [169]. Aus den entsprechenden *loading plots* können schließlich diejenigen Variablen extrahiert werden, die im Hinblick auf die Diskriminierung bzw. Trends im *score plot* das größte Gewicht (*weight*) auf sich vereinigen. Ein Nachteil der auf Varianzanalyse basierenden PCA ist die hohe Sensitivität gegenüber Einflussgrößen, welche nicht mit den untersuchten systematischen Trends korreliert sind. Hierzu zählen unter anderem analytische Schwankungen, wie eine unpräzise bzw. gesättigte Detektion, hohes Hintergrundrauschen, Artefaktbildungen, experimentelle Variation durch Probenaufarbeitung und -lagerung sowie physiologische Einflussfaktoren (Genotyp, Geschlecht, Alter, Tageszeit, Ernährung etc.). Häufig werden diese Störfaktoren erst anhand von PCA *score plots* identifiziert [170-172]. Ein Problem stellen ferner Vektoren bei der Verabreichung von Substanzen im Tiermodell dar. Neben dem unerwünschten physiologischen Einfluss können beispielsweise Polyethylenglycol, Polypropylenglycol oder Ethanol bzw. Metaboliten dieser Substanzen die nachfolgende PCA in erheblichem Maße stören [173]. Ein Beispiel für einen unerwarteten Störfaktor beschreibt ROBERTSON *ET AL.* [16]. Er stellte fest, dass in Urin- und Plasmaproben von Versuchstieren, die zur Euthanasie mit Barbituraten behandelt wurden, vielfach Störsignale in den NMR-Spektren auftauchten. Nach eingehender Untersuchung stellte sich heraus, dass die Formulierung des verwendeten Barbiturats Propylenglycol enthielt. Obwohl zwischen der Behandlung der Tiere mit Barbiturat und der Tötung nur wenige Minuten lagen, konnten im NMR-Spektrum Propylenglycol-Metaboliten im mM-Maßstab detektiert werden.

Daher kommen neben der PCA für konkrete Fragestellungen, insbesondere für Zwei-Klassen-Probleme, chemometrische Verfahren wie die *partial least squares*-Analyse (PLS) bzw. Modifikationen der PLS wie die PLS-Diskriminanzanalyse (PLS-DA) [174] oder die orthogonale PLS-DA (OPLS-DA) [175] zur Anwendung. Die PLS kann dabei als Regressionserweiterung der PCA aufgefasst werden. So ist es mit den unterschiedlichen PLS-Verfahren möglich, zwei Variablenblocks (**X** und **Y**) miteinander in Relation zu bringen. Im Fall der PLS umfasst der **X**-Block – wie auch bei der PCA – die in ein *k*-dimensionales Koordinatensystem eingeordneten Beobachtungen. Der **Y**-Block besteht aus einer bis mehreren kontinuierlichen Variablen, im Fall der PLS-DA aus einer *dummy*-Matrix, die mit diskreten Deskriptoren (0, 1) den Proben eine Klasse zuweist. In entsprechenden *score* und *weight plots* kann die Korrelationsstruktur der Beobachtungen sowie der **X**- und **Y**-Variablen untersucht werden. Da sich die PLS-DA auf die Diskriminierung vorher festgelegter Gruppen fokussiert, zählt sie zu den *supervised*-Verfahren. Mit PLS wurde unter anderem versucht, die **X**-Matrix mit einer aus klinischen Parametern be-

stehenden **Y**-Matrix zu korrelieren [176]. Ferner basierte der Pharmaco-Metabonomicsansatz von NICHOLSON *ET AL.* auf der Korrelation der Kontrollurinprofile von Versuchstieren (**X**-Matrix) mit einem *metabolic ratio*, das nach Verabreichung einer Modellsubstanz bestimmt wurde [33]. PLS-DA Modelle finden insbesondere im humanen Metabonomics Anwendung, da reine Varianzanalysen wie die PCA aufgrund der großen inter-individuellen Variabilität der menschlichen Population häufig keine interpretierbaren Trends liefern [37, 106, 177]. Eine Erweiterung der PLS-DA stellt wiederum die OPLS-DA dar. Sie basiert auf der Annahme, dass der **X**-Block einen gewissen Anteil an Varianz beinhaltet, der nicht mit dem **Y**-Block (z. B. der Gruppenzugehörigkeit) korreliert ist und daher auch als orthogonale Varianz bezeichnet wird. Bei der Erstellung der OPLS-DA Modelle wird der unkorrelierte, orthogonale Teil der Varianz herausgefiltert, so dass sich die Diskriminierung der Gruppen deutlich verbessert. So wurden mittels OPLS-DA und verwandter Techniken Confounder wie die Reproduzierbarkeit des analytischen Verfahrens, die Messreihenfolge der Proben, genetische Unterschiede, Tageszeiteffekte sowie physiologische Variation erkannt und die Varianzanalyse im Hinblick auf die Trennung der definierten Gruppen optimiert [56, 172, 178]. Daneben kamen vereinzelt *unsupervised*- und *supervised*-Verfahren wie *non-linear mapping*, *hierarchical cluster analysis*, *linear discriminant analysis*, *k-nearest neighbour analysis*, *neural networks*, *rule induction*, *Bayesian modelling*, *genetic algorithms*, *machine learning*, *hidden Markov models*, *Canonical correlation* und *correspondence analysis* für diverse Metabonomics- und *metabolic profiling*- Fragestellungen zur Anwendung [166, 179].

Abschließend ist anzumerken, dass für NMR- und LC-MS-basierte Metabonomicsansätze die multivariaten Modelle auf jeweils unterschiedlichen Variablen basieren. So repräsentieren die latenten Hauptkomponenten für NMR-Datensätze den spektralen Informationsgehalt der biologischen Proben, für LC-MS-Datensätze dagegen chromatographische und massenspektrometrische Information. Trotzdem zeigen die entsprechenden *score plots* vielfach ähnliche Cluster und Trends [93, 94], was die komplementäre Natur der beiden Analysetechniken untermauert.

AUFGABENSTELLUNG: IDENTIFIZIERUNG VON BIOMARKERN MITTELS LC-MS-BASIERTEM METABONOMICS – MERKAPTURSÄUREN ALS INDIKATOREN FÜR DIE BILDUNG TOXISCHER INTERMEDIATE

Ziel der Arbeit sollte die Entwicklung einer integrativen Strategie für einen nicht-invasiven, humanen Metabonomicsansatz sein. Durch Fokussierung des Metabolitenscreenings auf die Substanzklasse der Merkaptursäuren sollten die Erfolgsaussichten im Hinblick auf die Identifizierung potentieller Biomarker für toxikologische sowie medizinische Endpunkte erhöht werden.

Auf dem Gebiet des Metabonomics werden etablierte Methoden aus den Bereichen Bioanalytik und Biostatistik zusammengeführt. Der klassische Metabonomicsansatz basiert hierbei auf dem Screening endogener Metaboliten mittels $^1\text{H-NMR}$. Bedingt durch die Sensitivität der analytischen Technik sind die gewonnenen Profile allerdings auf die sogenannten *usual suspects* – Kataboliten, die in relativ hohen Konzentrationen in biologischen Proben vorliegen – beschränkt. Die Korrelation der Signaturen mit toxischen Endpunkten bzw. medizinischen Fragestellungen konzentriert sich daher vorwiegend auf Mustererkennungstechniken (*pattern recognition*). Mit dem Ziel, das Potential der Methodik zu nutzen und auf den Menschen zu übertragen sollte daher zunächst ein neues Konzept für das Metabolitenscreening sowie eine entsprechende bioanalytische Strategie entwickelt werden.

Aufgrund exogener (z. B. Medikamente, Umweltchemikalien, Nahrungsbestandteile) und endogener (z. B. oxidativer Stress) Faktoren wird im menschlichen Organismus stets eine Vielzahl an chemisch reaktiven Intermediaten (Elektrophile) gebildet. Elektrophile Verbindungen werden im Zusammenhang mit der Entstehung zahlreicher Krankheiten sowie toxikologischer Effekte diskutiert. Die Konjugation mit Glutathion, der Abbau zu den entsprechenden Merkaptursäuren und die Ausscheidung mit dem Urin stellen einen Hauptweg bei der Detoxifizierung von reaktiven Spezies dar. Der Zusammenhang zwischen der elektrophilen Belastung eines Organismus und dem Profil der ausgeschiedenen Merkaptursäuren sollte die konzeptionelle Grundlage des Metabonomicsansatzes bilden. Der Nachweis von Elektrophilen via Merkaptursäuren sollte hierbei als Indikator für die metabolische Bildung toxischer Intermediate dienen und Hinweise auf zugrunde liegende Mechanismen geben. Des Weiteren sollte durch die Fokussierung auf eine Klasse von Belastungsmarkern die Aussicht im Hinblick auf die Identifizierung effektassoziiertes Biomarker erhöht werden.

Erster Schritt sollte daher die Entwicklung einer generischen Methode für das Screening von Merkaptursäuren in Humanurin darstellen. Mit der HPLC-gekoppelten Massenspektrometrie (LC-MS) steht eine sensitive Technik für die Analyse biologischer Proben zur Verfügung.

Scantechniken wie der *constant neutral loss*-Scan erlauben den selektiven und spezifischen Nachweis von Substanzklassen mit charakteristischen Struktureinheiten und sollten sich auf das Screening von Merkaptursäuren anwenden lassen, da diese mit der *N*-Acetyl-L-Cystein-Einheit über ein solches gemeinsames Strukturelement verfügen. Sowohl exogene als auch endogene Merkaptursäuren sollten sich auf diese Weise mit *untargeted*-Methoden, d. h. nicht Ziel gerichtet, erfassen lassen. Anhand von Standardgemischen sollte zunächst die LC-MS-Analytik etabliert, optimiert und evaluiert werden. Für das Merkaptursäurescreening sollten dabei ähnliche Standards gesetzt werden, wie sie allgemein auch für quantitative Analysen gelten. Mittels *proof-of-concept*-Studien sollte in einem nächsten Schritt das neue Konzept getestet und in diesem Zusammenhang die biostatistischen Verfahren inklusive der entsprechenden Softwarelösungen zur Prozessierung der chromatographischen und massenspektrometrischen Rohdaten optimiert werden. Dabei sollte im Gegensatz zu konventionellen Metabonomicsansätzen der Mensch im Mittelpunkt stehen. Da im Menschen aufgrund unterschiedlicher Lebensmodelle und Suszeptibilitätsfaktoren (z. B. Polymorphismen der Enzymsysteme) komplexe Zusammenhänge und große inter-individuelle Unterschiede in den metabolischen Signaturen zu erwarten waren, sollte das Vorhaben zunächst auf die Charakterisierung des gesunden, nicht spezifisch exponierten „Kontrollmenschen“ abzielen. Der Einfluss sogenannter Confounder wie Alter, Geschlecht, Gewicht, Tageszeit und Stress auf das Merkaptursäureprofil sollten in gleichem Maße untersucht werden wie mögliche Dosisabhängigkeiten der Signaturen. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf Mustern liegen, die sich mit der Ausprägung von oxidativem Stress *in vivo* assoziieren lassen. Dies sollte zunächst im Tiermodell anhand geeigneter Modellsubstanzen getestet werden. Ziel sollte die Identifizierung eines bzw. weniger Merkaptursäuremarker sein, die frühzeitige Aussagen über den Zustand eines Individuums zulassen. Eine wichtige Fragestellung im Zusammenhang mit oxidativem Stress sollte weiterhin der Vergleich von Rauchern mit Nichtrauchern darstellen. Auch hier sollten Dosisabhängigkeiten ermittelt und charakteristische Merkaptursäureprofile bzw. entsprechende Marker identifiziert werden.

Zur Verarbeitung der Metabolitenspektren sollten multivariate statistische Methoden wie die Hauptkomponentenanalyse (PCA) oder die *partial least squares*-Diskriminanzanalyse (PLS-DA) herangezogen werden. Diese Verfahren erlauben es, durch Datenreduktion große Informationsmengen zu verarbeiten und Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede von Proben visuell darzustellen. Die Auswertung von multivariaten Datensätzen, wie sie auf dem Gebiet des Metabonomics generiert werden, erfordert in der Regel eine ausgeprägt iterative Vorgehensweise. Ziel sollte es daher weiterhin sein, biostatistische Modelle und Strategien gegenüberzustellen und so zu validieren, dass eine möglichst hohe Prädiktivität der Modelle erzielt werden kann.

ERGEBNISSE

PROJEKT 1: Entwicklung einer generischen merkaptursäurespezifischen LC-MS-Methode

1 Einleitung

Auf dem Gebiet des Metabonomics haben sich LC-MS-basierte Screeningmethoden zunehmend etabliert. Ergab die Schlagwortsuche in einschlägigen Literaturdatenbanken wie *SciFinder* [180] bis 1/2003 erst zwei Einträge für „Metabonomics bzw. Metabolomics“ in Kombination mit „LC-MS“, waren es bis 1/2008 bereits 140 Einträge. Im Vergleich dazu lieferte die erweiterte Schlagwortsuche „NMR“ 42 bzw. 577 Einträge. Dies veranschaulicht die wachsende Bedeutung von LC-MS-Techniken als Grundlage von Metabonomicsansätzen.

1.1 Elektrosprayionisierung

Insbesondere für die Analytik polarer, nicht flüchtiger Biomoleküle hat sich die Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie (HPLC-MS bzw. LC-MS) bewährt. Sie bietet die Möglichkeit der strukturellen Differenzierung und Charakterisierung von Analyten der unterschiedlichsten Art bei gleichzeitiger Selektivität und Sensitivität. Aber erst die Entwicklung „weicher“, nicht destruktiver Ionisierungstechniken wie der Elektrosprayionisierung (ESI) machte den Weg frei für einen routinemäßigen Einsatz dieser Kopplungstechnik. Der entscheidende Vorteil ist hierbei die Abtrennung des Lösungsmittels sowie die Ionisierung der Moleküle außerhalb des Hochvakuums unter Atmosphärendruck, was die massenspektrometrische Detektion von „Quasi-Molekülonen“ möglich macht.

Im ESI-Interface werden die aus der Chromatographiesäule austretenden Probenmoleküle durch elektrostatische Zerstäubung in ein Aerosol überführt und zum Massenspektrometer transferiert. Zwischen der Probenkapillare und dem Eingang des Massenspektrometers (entspricht der Gegenelektrode) liegt Hochspannung (2 – 5 kV) an. Aufgrund des starken elektrischen Felds kommt es zur elektrophoretischen Ladungstrennung der austretenden Probenlösung. Als Folge dessen bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Taylor-Konus, was zur Emission eines feinen Jets geladener Tröpfchen führt. Durch Verdampfen des Lösungsmittels steigt die Ladungsdichte auf der Oberfläche dieser Primärtröpfchen allmählich so stark an, dass diese durch Coulomb-Explosion in kleinere Sekundärtröpfchen zerfallen. Dieser Prozess – Verdampfung des Lösungsmittels und Aufspaltung der Tröpfchen – wiederholt sich mehrmals, bis schließlich kleine,

hochgeladene Mikrotröpfchen generiert werden, für deren Entstehungsprozess zwei unterschiedliche Modelle zur Diskussion stehen. Dem älteren *charged residue model* von Dole [181], steht das *ion evaporation model* von IRIBARNE UND THOMSON [182, 183] gegenüber (**Abb. 4**). Da die ESI-Technik keine aktive Ionisierung bewirkt, müssen die Analyten bereits vor Eintritt ins Interface als Ionen vorliegen. Dieser Prozess kann durch geeignete Zusätze (Säuren, flüchtige Puffer) zum Lösungsmittel gefördert werden.

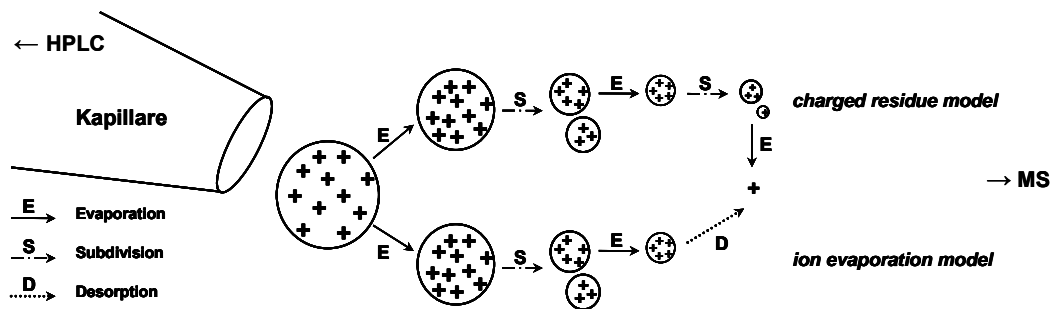


Abb. 4: Modelle, die die Bildung von Ionen aus einem Jet (positiv) geladener Tröpfchen beschreiben (nach NGUYEN UND FENN 2007 [184]): (oben) *charged residue model* von DOLE ET AL. 1968 [181], (unten) *ion evaporation model* von IRIBARNE UND THOMSON 1976 [182].

Im Jahr 2002 erhielt Fenn für seine Arbeiten zur ESI-Technik den Nobelpreis für Chemie [185]. In ihrer Erklärung hob die *Schwedische Akademie* die Massenspektrometrie von Biomolekülen als Meilenstein hervor und betonte ihren Nutzen im Zusammenhang mit den *Omics*-Techniken.

1.2 Triple Quadrupol gekoppelte lineare Ionenfalle

Hybridinstrumente wie die Triple Quadrupol gekoppelte lineare Ionenfalle (QTRAP) stellen die neueste Generation Massenspektrometer dar. Die Kombination eines Triple Quadrupol Tandemmassenspektrometers mit einer linearen Ionenfalle (LIT) bietet den Vorteil, dass klassische *survey scans* wie das *multiple reaction monitoring* (MRM), der Produktionen-Scan (*product ion-Scan* – PI-Scan), der Neutralverlust-Scan (*constant neutral loss-Scan* – CNL-Scan) sowie der Prekursorionen-Scan (*precursor ion-Scan* – PrI-Scan) mit den Funktionen der LIT gekoppelt werden können. Auf diesem Weg sind sowohl qualitative als auch quantitative Analysen auf demselben Gerät möglich, was die Technik insbesondere für das Screening biologischer Proben interessant macht [186, 187].

Wie herkömmliche Massenspektrometer besteht auch das Hybridgerät aus drei Quadrupolen (Q1, Q2 und Q3): Q1 und Q3 dienen jeweils als Massenfilter, Q2 dagegen als Kollisionszelle, in der die Analyten durch Reaktion mit Inertgasmolekülen, dem sogenannten *collision induced dissociation* (CID), fragmentiert werden. Das Ausmaß der Fragmentierung wird durch Variation

des Stoßdrucks und der Stoßenergie kontrolliert. Die in Q1 selektierten und in Q2 dissoziierten Ionen der Form m/z (Masse-zu-Ladungs-Verhältnis) können zum einen vollständig in Q3 gescannt werden (PI-Scan) oder durch Fokussierung des Q3 Filters auf ein ausgewähltes spezifisches Fragment als Ionenpaar – bestehend aus Mutter- und Produktion – detektiert werden (MRM-Scan). Werden die Produktionen im PI-Scan mit Hilfe der LIT angereichert, spricht man von einem *enhanced* Produktionen-Scan (EPI-Scan). Aus der paarweisen Auswahl der zu analysierenden Massen im MRM-Modus resultieren im Allgemeinen geringe Rauschschwellen und folglich niedrige Nachweisgrenzen. Dies gilt vor allem für komplexe Matrices wie Urin oder Plasma und ermöglicht die Reduzierung von Probenaufarbeitungsschritten.

Der PrI-Scan sowie der CNL-Scan dienen dem analytischen Screening von Substanzklassen mit einem gemeinsamen Strukturelement. Der PrI-Scan erfasst in Q1 alle Ionen, die nach Stoßaktivierung ein charakteristisches Fragment abspalten. Q3 wird hierzu auf ein bestimmtes m/z -Verhältnis eingestellt und in Q1 alle Massen gescannt, die das gewünschte Fragmentation in Q2 liefern. Im negativen Ionisationsmodus wird für Glucuronide von einem charakteristischen Produktion mit $m/z = 113$, für Sulfate von Fragmenten mit $m/z = 80$ und 97 berichtet [188, 189]. Beim CNL-Scan werden Prekursorionen detektiert, die ein bestimmtes ungeladenes Molekülfragment (*neutral loss* – NL) abspalten. Dazu werden Q1 und Q3 derart aufeinander abgestimmt, dass sie parallel eine konstante Massendifferenz scannen. Charakteristische Neutralverluste im positiven Ionisationsmodus sind unter anderem für Glucuronide (NL 176 Da) [190], 2'-Desoxyribonucleoside (NL 116 Da) [191] und Gluthation-Addukte (NL 129 Da) [192] beschrieben. Im negativen Modus spalten Glucoside ein spezifisches Neutralteilchen mit 162 Da [193], Sulfate ein ungeladenes Fragment mit 80 Da [189] ab. Kürzlich wurde für *N*-Acetyl-L-Lysin-Addukte ein NL von 171 Da beschrieben [194]. Für Mercaptursäuren wird in der Literatur in diversen LC-MS-Applikationen von einem Neutralverlust von 129 Da im negativen Ionisationsmodus berichtet [119, 161, 195]. JONES *ET AL.* [196] sowie SCHOLZ *ET AL.* [197] leiteten daraus einen vielversprechenden Screeningansatz zur Detektion bekannter und unbekannter Mercaptursäuren in unterschiedlichen Matrices ab.

Die Hybridtechnik, d. h. die Kombination aus Triple Quadrupol Massenspektrometer und linearer Ionenfalle, ermöglicht es, in einem analytischen Lauf mehrere Scanmodi sehr effektiv miteinander zu kombinieren. So können mit *information dependent acquisition* (IDA) beispielsweise CNL, MRM bzw. PrI *survey scans* mit EPI-Scans verknüpft werden (**Abb. 5**). Durch die Anreicherung der Fragmente in der linearen Ionenfalle (Q3) können für Produktionenspektren sehr hohe Empfindlichkeiten erreicht werden. Die zusätzlich gewonnene Spektralinformation kann der strukturellen Charakterisierung der im analytischen Screening

detektierten unbekanntem Analyte bzw. der Bestätigung bekannter Verbindungen durch Vergleich mit Referenzsubstanzen dienen. Verglichen mit klassischen *full scan*-Screeningverfahren bietet die Technik bezüglich der erzielbaren Sensitivität und Spezifität einen klaren Vorteil.

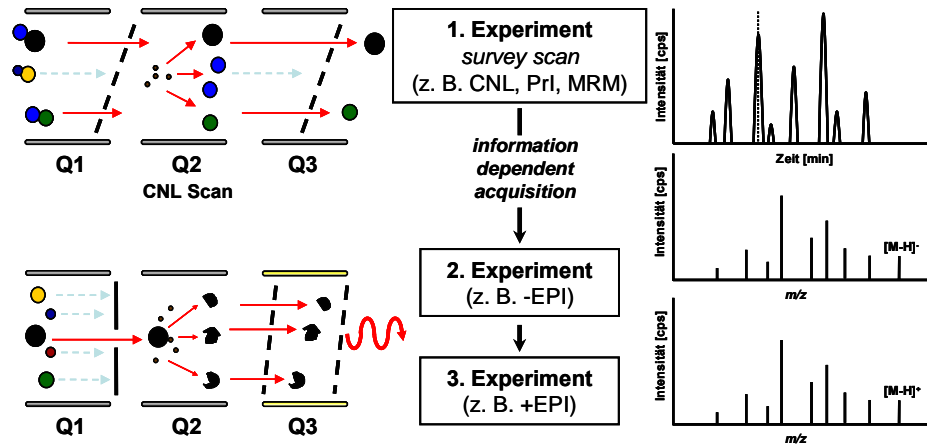


Abb. 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Hybrid Triple Quadrupol gekoppelten linearen Ionenfalle. Der *survey scan* (hier CNL-Scan) kann mittels *information dependent acquisition* mit weiteren Experimenten (hier +EPI- und -EPI-Scans) gekoppelt werden (Bildquelle z. T. Applied Biosystems).

Die Kopplung von MRM *survey scans* in Verbindung mit drei IDA-abhängigen EPI-Scans bei unterschiedlichen Kollisionsenergien wurde unter anderem im Bereich der Forensik für das Drogenscreening erfolgreich eingesetzt [198].

1.3 Ausgangspunkt der Methodenentwicklung

Die Entwicklung eines Screeningverfahrens stellt den Analytiker vor eine große Herausforderung. Denn unselektive LC-MS-Methoden wie der *full scan*-Modus können zwar universell eingesetzt werden, die Universalität der Detektion geht aber vielfach mit einer relativ geringen Sensitivität einher. Dagegen können mit hochsensitiven LC-MS/MS-Methoden wie dem *multiple reaction monitoring* in der Regel nur wenige Analyte detektiert werden. Für das Screening von Substanzklassen kann indessen meist ein guter Kompromiss aus Selektivität und Sensitivität gefunden werden.

Ausgangspunkt der Methodenentwicklung für das merkaptursäurebasierte Metabonomics stellten die in SCHOLZ *ET AL.* beschriebenen Techniken zum Screening von Substanzklassen mittels LC-MS/MS dar [197]. Die beschriebenen Methoden wurden zur schnellen Detektion und Identifizierung unbekannter Metaboliten aus dem Fremdstoffmetabolismus entwickelt und anhand von strukturell unterschiedlichen Merkaptursäure- und Merkaptursäure-Sulfoxid Standards optimiert

und validiert. Der Screeningansatz basierte auf dem gemeinsamen Strukturelement der Mercaptursäuren, der *N*-Acetyl-L-Cystein-Einheit, die im negativen Ionisationsmodus nach Kollision mit Inertgas (N_2) als Neutralteilchen mit 129 Da abgespalten wird (**Abb. 6**). Hieraus wurde ein merkaptursäure- und merkaptursäure-sulfoxid-spezifischer CNL-Scan entwickelt, der primär der Evaluierung reaktiver Intermediate bei der Arzneistoffentwicklung diene. Die Nachweisgrenze (*limit of detection* – LOD) der Standards, definiert als ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis (*S/N*-Ratio) von größer 3, wurde in Urinmatrix (Ratten- und Humanurin) mit 0.3 – 15.5 pmol *on column* (o. c.) angegeben. Darüber hinaus konnten mit dem beschriebenen Verfahren in Urinproben zahlreiche endogene Mercaptursäuren unbekannter Herkunft detektiert werden. Dies gelang ohne aufwändige Probenvorbereitung, ein entscheidender Punkt bei einem auf hohen Durchsatz abzielenden Metabonomicsansatz.

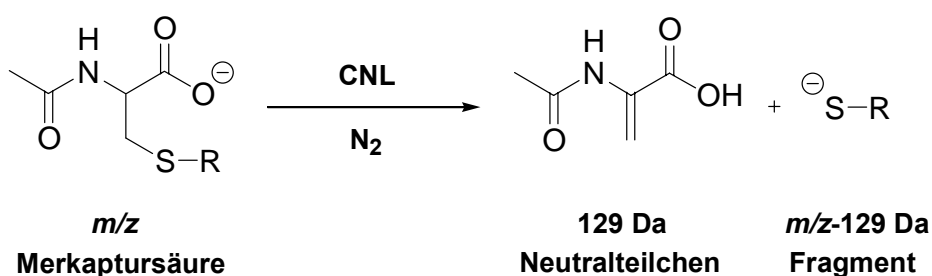


Abb. 6: Reaktionsschema des *constant neutral loss*-Scans basierend auf dem für Mercaptursäuren und Mercaptursäure-Sulfoxide charakteristischen Neutralverlust von 129 Da im negativen Ionisationsmodus (nach SCHOLZ ET AL. 2005 [197]).

Kernstück der Methode von SCHOLZ ET AL. [197] bildete ferner die Verknüpfung des merkaptursäurespezifischen CNL *survey scans* mit zwei Produktions-Scans. Unter Verwendung einer Hybrid Triple Quadrupol gekoppelten linearen Ionenfalle in Verbindung mit optimierten IDA-Kriterien konnten so in einem analytischen Lauf zusätzlich Spektraldaten erhalten werden, welche zur Identifizierung unbekannter Metaboliten herangezogen wurden. Durch Variation der Kollisionsenergie in den unabhängigen EPI-Experimenten konnten Spektren mit einer unterschiedlichen Anzahl an Fragmenten gewonnen werden. Die hocheffiziente Verknüpfung von verschiedenen Experimenten zusammen mit der hohen Sensitivität, mit der die synthetischen Standards in komplexer Matrix nachgewiesen werden konnten, ließen die Methode als Grundlage für einen auf Mercaptursäuren basierenden Metabonomicsansatz als geeignet erscheinen.

1.4 Extraktion und Prozessierung der Rohdaten

Zur Mustererkennung und Biomarkeridentifizierung finden multivariate statistische Methoden wie die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis* – PCA) oder die *partial least*

squares-Diskriminanzanalyse (PLS-DA) Anwendung. Grundlage dieser Methoden ist die Verarbeitung von Datensätzen, die aus einer Vielzahl an Proben mit jeweils hunderten bis tausenden von Variablen bestehen. Ziel ist die Reduzierung der Daten(dimensionalität) unter weitestgehendem Erhalt der ursprünglichen Information. Die Visualisierung erfolgt sodann in zwei- oder dreidimensionalen Modellen.

Voraussetzung für die multivariate Datenanalyse (MVDA) ist eine definierte Datenstruktur, die sogenannte Datenmatrix. Diese beinhaltet für LC-MS-Daten die Proben(bezeichnung), die gemessenen Variablen (chromatographische Peaks) und die dazugehörigen Peakflächen [7].

Abb. 7 zeigt einen schematischen Ausschnitt aus einer solchen Datenmatrix.

	Variable x_1	Variable x_2	Variable x_3	Variable x_4	Variable x_5	Variable x_{\dots}	Variable x_k
	$m/z_1_RT_1$	$m/z_2_RT_2$	$m/z_3_RT_3$	$m/z_4_RT_4$	$m/z_5_RT_5$	$m/z_{\dots}RT_{\dots}$	$m/z_k_RT_k$
Probe y_1		Fläche $_{x_2}$ in y_1					
Probe y_2		Fläche $_{x_2}$ in y_2					
Probe y_3		Fläche $_{x_2}$ in y_3					
Probe y_4		Fläche $_{x_2}$ in y_4					
Probe y_5	Fläche $_{x_1}$ in y_5	Fläche $_{x_2}$ in y_5	Fläche $_{x_3}$ in y_5	Fläche $_{x_4}$ in y_5	Fläche $_{x_5}$ in y_5	Fläche $_{x_{\dots}}$ in y_5	Fläche $_{x_k}$ in y_5
Probe y_6		Fläche $_{x_2}$ in y_6					
Probe y_7		Fläche $_{x_2}$ in y_7					
Probe y_8		Fläche $_{x_2}$ in y_8					
Probe y_{\dots}		Fläche $_{x_2}$ in y_{\dots}					
Probe y_n		Fläche $_{x_2}$ in y_n					

Abb. 7: Schematischer Ausschnitt aus einer auf LC-MS-Analysen basierenden Datenmatrix. Die Spalten entsprechen den Proben, die Zeilen den unterschiedlichen Variablen (m/z_RT), die durch ihr Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) und die entsprechende Retentionszeit (RT) definiert sind. In der dazugehörigen Zelle ist die detektierte Signalfläche enthalten.

Eine wichtige Voraussetzung für das Gelingen der anschließenden MVDA ist die Spezifität und Präzision der Matrix. Es muss sichergestellt werden, dass identische Analyten im Chromatogramm durch dieselbe Variable in der Datenmatrix repräsentiert werden. In NMR-Ansätzen stellt dies kein Problem dar, da die Reproduzierbarkeit der Spektren in der Regel sehr gut ist. Variablen werden daher meist durch sogenannte *binning*- oder *bucketing*-Techniken generiert. Dazu wird das komplette NMR-Spektrum in Fenster von jeweils 0.02 – 0.04 ppm unterteilt. Jedes Segment wird anschließend integriert und bildet eine Pseudovariablen. Für NMR-Spektren sind Softwarelösungen zur automatischen Generierung der *bins* seit den Anfängen des Metabonomics verfügbar [179, 199]. Da HPLC-Chromatogramme im Vergleich zu NMR-Spektren eine geringere Reproduzierbarkeit aufweisen, ist die *binning*-Technik für LC-MS-Ansätze nicht geeignet. Im Falle von Retentionszeit- und Massenverschiebungen, wie sie in der Flüssigchromatographie mitunter auftreten, wäre eine Variable mit dieser Methode nicht mehr exakt definiert. Erschwerend kommt hinzu, dass Substanzen häufig koeluiieren und die entsprechenden Peaks

übereinander liegen. Dem könnte mit *binning* nicht Rechnung getragen werden, ein Großteil der Peaks würde folglich nicht erfasst werden. Dies gilt insbesondere für den in Metabonomics-Ansätzen standardmäßig als *survey scan* eingesetzten *full scan*-Modus.

Für LC-MS wurde daher ein alternatives Verfahren entwickelt, das auf softwaregestützter Peakerkennung und -extraktion basiert. Durch Dekonvolution wird jedes Chromatogramm in seine drei Dimensionen, bestehend aus dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z), der Retentionszeit (RT) und der Peakfläche, zerlegt. Demnach wird einem Peak ein definiertes m/z und die entsprechende RT zugeordnet. Alle Signale, die in mindestens einer der gemessenen Proben vorkommen, werden auf diese Weise erfasst und in der Form m/z_RT als unterschiedliche Variablen (Analyten, Metaboliten) registriert. In einem zweiten Schritt werden alle in einer Probe detektierten Signale in diese Matrix einsortiert, d. h. ist der Peak in der betreffenden Probe enthalten, wird die dazugehörige Peakfläche in die entsprechende Zelle geschrieben, fehlt der Peak ganz oder ist unter dem Detektionslimit, fügt die Software automatisch eine Null in die Zelle ein (**Abb. 7**). Für dieses als Alignment bezeichnete Einsortieren der detektierten Signale müssen u. a. Massen- und Retentionszeittoleranzen sowie verschiedene Datenfilter definiert werden. Auf der Basis dieser Datenmatrix ist sowohl ein qualitativer als auch quantitativer Vergleich der Signale bzw. Metaboliten in den analysierten Proben möglich. Allerdings ist anzumerken, dass nicht alle Variablen, die in der Datenmatrix enthalten sind, unterschiedliche Metaboliten darstellen. Durch Fragmentierung in der Ionenquelle bzw. Adduktbildung mit diversen Metallionen kann es mitunter dazu kommen, dass ein Metabolit aufgrund des veränderten m/z mehrfach registriert wird [200]. Die Kollinearität der Variablen kann in der nachfolgenden MVDA erkannt und weiter untersucht werden.

Einen klaren Vorteil bietet die Dekonvolution der LC-MS-Daten im Hinblick auf Metaboliten, die zwar mit der Screeningmethode erfasst wurden, aber nicht in die Modelle eingehen sollen. Dies ist vor allem für Metaboliten relevant, die auf die verabreichte Substanz bzw. auf Darreichungsvektoren zurückzuführen sind. Auch muss bei der Verwendung von internen Standards darauf geachtet werden, dass diese nicht in die MVDA einfließen. Die entsprechenden Variablen können im Gegensatz zur *binning*-Technik ohne negativen Einfluss aus der Datenmatrix gelöscht werden. Im Vergleich dazu weisen die aus NMR-Messungen resultierenden Variablen eine extrem hohe Korrelationsstruktur auf. Metaboliten wie Glucose führen zu einer Vielzahl an spektralen Signalen, die folglich in mehreren *bins* vertreten sind und diese beeinflussen. Um Metaboliten wie den in großen Mengen im Urin enthaltenen Harnstoff ausschließen zu können, müssen mehrere *bins* aus der Matrix entfernt werden. Da die *bins*

Signale weiterer Metaboliten enthalten können, kommt es durch diese Vorgehensweise mitunter zu einem Informationsverlust.

Bisher sind nur wenige Lösungen zur Dekonvolution von LS-MS-Daten auf dem Markt. Problem hierbei ist, dass die Programme auf die Datenstruktur der Analysesoftware des Massenspektrometers abgestimmt sein müssen. In der Praxis bedeutet dies, dass jeder Gerätehersteller eigene Strategien bezüglich Extraktionsalgorithmen und Datenfilter verfolgt [201]. Erschwerend kommt hinzu, dass die Entwicklung derlei Programme vielfach noch am Anfang steht. Der kommerziellen Software stehen die frei zugänglichen Programme wie XCMS [202], MZmine [203], MSFacts [204], MET-IDEA [205], MathDAMP [206], COMSPARI [207] gegenüber, die teilweise in Plattformen wie R-Projekt, Java, Mathematica oder C integriert sind. Nicht selten werden zwei oder mehrere dieser Programme, z. T. auch in Kombination mit manuellen Methoden, eingesetzt [208].

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders beschrieben, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Alle verwendeten Lösungsmittel entsprachen HPLC-Qualität und stammten von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland), die Merkaptursäurestandards (MA-Standards) *S*-Phenyl-MA und 2,4-Dinitrophenyl-MA von Toronto Research Chemicals (North York, Kanada). Acrylamid-MA wurde gemäß der kürzlich in der Literatur beschriebenen Vorschrift synthetisiert und charakterisiert [209]. Die Synthese von 2-, 3- und 4-Brombenzyl-MA, 4-*tert*-Butylbenzyl-MA, 2- und 4-Chlorbenzyl-MA, 2-Chlor-1,1,2-trifluorethyl-MA, 1,1-Dichlor-2,2-difluorethyl-MA, 1,2- und 2,2-Dichlorvinyl-MA, 2- und 3-Fluorbenzyl-MA, 2- und 4-Methoxybenzyl-MA sowie *S*-Purinyl-MA erfolgte nach dem in DEKANT *ET AL.* publizierten Protokoll [210].

2.2 Merkaptursäurestandardmix

Aus den 18 oben genannten Merkaptursäurestandards wurde zunächst eine Stammlösung mit 1000.0 mg/L Methanol/Wasser (50:50 vol/vol) für jede einzelne Merkaptursäure hergestellt. Durch wiederholte 1:10-Verdünnungen (mit Methanol/Wasser, Ratten- bzw. Humanurin) wurden zusätzlich folgende Konzentrationen erhalten: 100.0 mg/L, 10.0 mg/L, 1.0 mg/L, 100.0 µg/L, 10.0 µg/L und 1.0 µg/L. Bei dem Ratten- bzw. Humanurin handelte es sich um einen nicht genauer spezifizierten Kontrollurin, der als Matrix für die Methodenentwicklung diente.

2.3 Probenvorbereitung für die Methodvalidierung

Aus gleichen Teilen zehn verschiedener Humanurine (Spontanurin) wurde zunächst ein Poolurin hergestellt. In fünf unabhängigen Ansätzen (Validierungsproben I – V) wurden jeweils 650 μL Poolurin mit 650 μL eiskaltem Methanol versetzt und bei 14000 g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 1.0 mL in ein Eppendorf Cap überführt und im Vakuum zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wurde anschließend in 100 μL Wasser aufgenommen. Um eine vollständige Lösung zu gewährleisten, wurden die Proben bei Raumtemperatur für 15 min in ein Ultraschallbad gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (14000 g, 4 °C, 20 min) wurde der Überstand in ein Autosamplervial überführt und per LC-MS/MS vermessen. Die Validierungsprobe III wurde innerhalb eines 14-Tage-Zeitraums an vier weiteren Tagen vermessen. Zwischen den Messungen wurde die Probe bei -20 °C gelagert und vor der LC-MS-Messung erneut zentrifugiert (14000 g, 4 °C, 20 min).

2.4 Chromatographische Parameter

HPLC-Anlage:	Quaternäre Pumpe Serie 1100 mit Autosampler Serie 1100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Software:	Analyst 1.4 (Applied Biosystem/MDS Sciex, Concord, ON, Kanada)
Vorsäule:	C ₁₈ ODS, 4 x 3 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Analytische Säule:	ReproSil-Pur C ₁₈ -AQ, 5.0 μm , 150 x 2 mm (Dr. Maisch, Ammerbuch, Deutschland)
Fließmittel A:	0.1 % Ameisensäure (0.1 % FA)
Fließmittel B:	Acetonitril (ACN)
Fluss:	0.250 mL/min
Injektion:	10 μL (Merkaptursäurestandardmix) 5 μL (Methodenvalidierung)

Gradient analytische Säule:	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	0.1 % FA	ACN
	0.00	0.250	95	5
	2.00	0.250	95	5
	25.00	0.250	50	50
	27.00	0.250	10	90
	29.00	0.250	10	90
	31.00	0.250	95	5
	40.00	0.250	95	5

2.5 Massenspektrometrische Parameter

Als Massendetektor kam eine mit einer TurboIonSpray[®]-Quelle ausgestattete Triple Quadrupol gekoppelte lineare Ionenfalle (QTRAP[®] 2000, Applied Biosystem/MDS Sciex) zum Einsatz. Allgemeine Quellen- und Gaseinstellungen, sowie die Parameter für die lineare Ionenfalle waren im Einzelnen: *ionspray voltage* -4.2 kV, *vaporizer temperature* 400 °C, *nebulizer gas* (N₂) 45 psi, *turbo gas* (N₂) 50 psi, *curtain gas* (N₂) 30 psi, *collision gas* (N₂) medium (CNL)/high (EPI), *declustering potential* (DP) -50 V, *entrance potential* (EP) -10 V, *collision energy* (CE) -20 V und *collision cell exit potential* (CXP) -2 V. Bei DP, EP, CE und CXP handelte es sich jeweils um *offset*-Spannungen.

2.6 Constant neutral loss-Screeningmethode

Um den Massenbereich der erwarteten Metaboliten abzudecken wurde der CNL-Scan im negativen Ionisationsmodus im Bereich von $m/z = 200 - 450$ durchgeführt. Neben dem CNL *survey scan* umfasste die Methode zwei *enhanced* Produktions-Scans (EPI-Scans) mit jeweils unterschiedlichen Kollisionsenergien. Die Kopplung der Experimente erfolgte mittels eines *information dependent acquisition*-Kriteriums (IDA-Kriteriums). Der *survey scan* wurde im *profile*-Modus bei einem *step size* von 0.1 amu durchgeführt. Des Weiteren betrug die *dwell time* 3.0 s mit einer *mass range pause* von 5.0 ms. Die Auflösung des ersten Quadrupols (Q1) wurde auf *unit* gesetzt, die des dritten Quadrupols (Q3) auf *low*. Da die substanzspezifischen Parameter wie DP, EP, CXP und CE für CNL- und EPI-Scans identisch waren, konnte auf eine *settling time* verzichtet werden. Das IDA-Kriterium wurde in der Form definiert, dass alle Signale, die im CNL-Scan die Schwelle von 3000 counts/s überstiegen, ein EPI provozierten. Überschritten mehrere m/z gleichzeitig den Grenzwert, wurde automatisch der intensivste Peak ausgewählt. Alle Ionen, von denen bereits ein EPI aufgenommen wurde, wurden anschließend für mindestens 40 s von der Detektion ausgeschlossen. Die Massentoleranz betrug 250 mmu.

Zur Strukturaufklärung wurden zwei EPI-Spektren aufgenommen, das erste bei einer Kollisionsenergie von -20 V, das zweite bei -60 V (*collision energy spread* -2 V). Gebildete Fragmente wurden bei einer *scan rate* von 4000 amu/s, sowie einer Q3 *entry barrier* von 8 V für 50 ms in der Ionenfalle gesammelt (*fixed fill time*) und im Bereich von $m/z = 50 - 500$ detektiert.

2.7 Datenverarbeitung und statistische Datenanalyse

Detektion und Alignment der Peaks erfolgte softwaregestützt mittels *Metabolomics Export Script*[™] Version 1.1.1.0 (Applied Biosystems/MDS Sciex). Um die CNL-Daten einzulesen wurden die folgenden Einstellungen vorgenommen: *minimum retention time* 2.0 min, *maximum*

retention time 35 min, *noise threshold* 1000 counts/s, *minimum spectral peak width* 0.2 amu, *minimum retention time peak width* 3 scans, *maximum retention time peak width* 50 scans, *retention time tolerance* 1.0 min, *mass tolerance* 0.4 amu und *maximum number of peaks* 100.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung und Optimierung der LC-MS/MS-Analytik

Inwieweit die CNL-IDA-EPI/EPI-Methode als Basis für einen merkaptursäurebasierten *metabolic profiling*-Ansatz dienen kann, wurde zunächst anhand von 18 Merkaptursäurestandards (**Tab. 1**) überprüft. Hierzu wurden die Verbindungen in Methanol/Wasser (CH₃OH/H₂O) bzw. Matrix (Ratten- bzw. Humanurin) gelöst und analog der in der Literatur beschriebenen Methode [197] vermessen. Es stellte sich heraus, dass die chromatographische Trennung den Erfordernissen der softwaregestützten Datenerfassung – Basislinientrennung möglichst vieler Signale – angepasst werden musste. Die modifizierte Gradientenelution ermöglichte nach Optimierung die chromatographische Trennung sehr polarer Merkaptursäuren, wie sie durch den Acrylamid-MA Standard repräsentiert wurden, sowie einer mittelpolaren (unterschiedlich substituierte Benzyl-MAs) und einer eher unpolaren Fraktion (4-*tert*-Butylbenzyl-MA). Alle 18 getesteten Merkaptursäuren zeigten durch Spaltung der Schwefel-Kohlenstoff-Bindung den charakteristischen CNL von 129 Da und konnten folglich mit der Screeningmethode erfasst werden. Dies gelang sowohl in Lösungsmittel als auch in Urinmatrix (**Abb. 8 A – C**). In Matrix konnten neben den Standards auch zahlreiche unbekannte Merkaptursäuren erfasst werden, wobei sich Human- und Rattenurin bezüglich ihres Merkaptursäureprofils unterschieden.

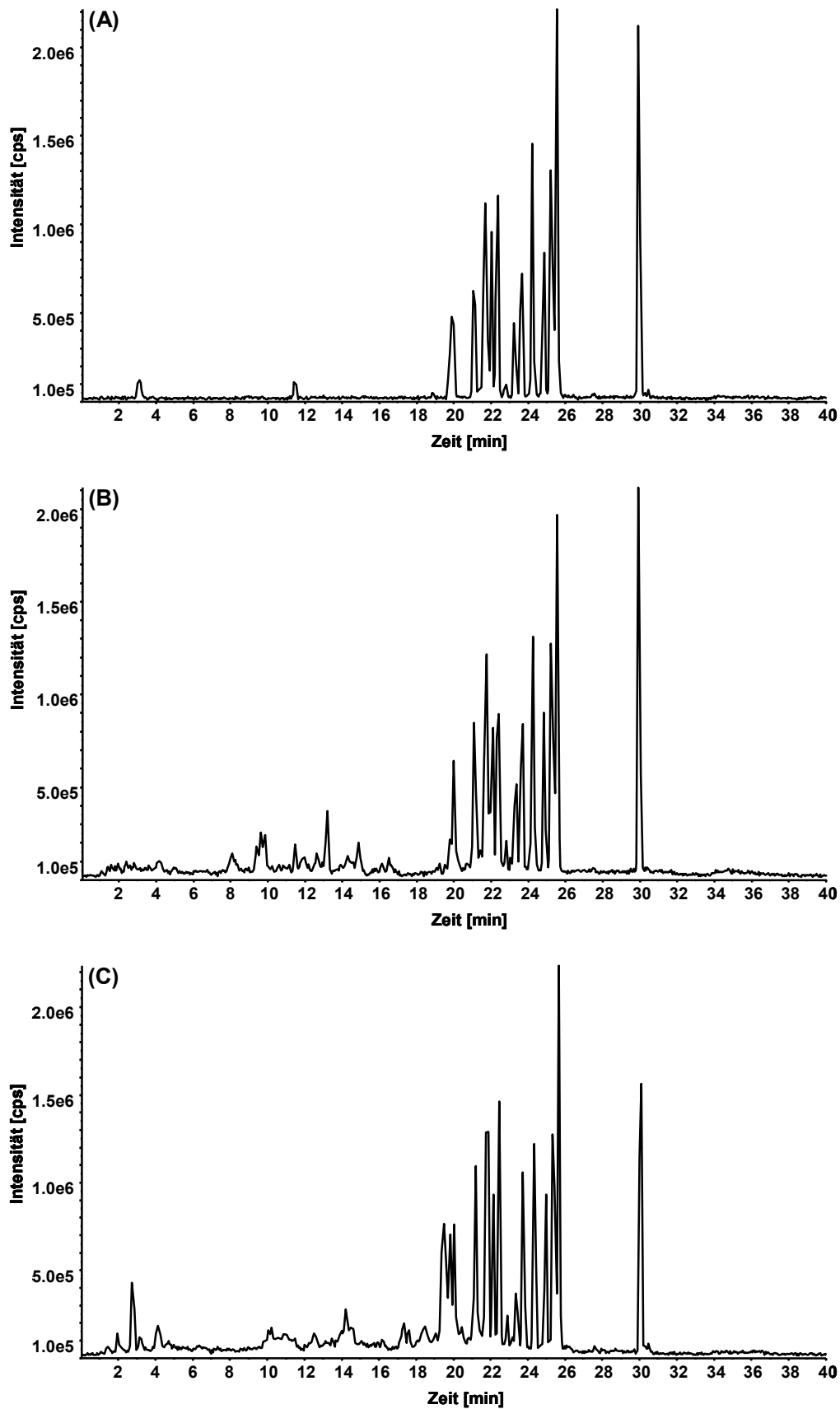


Abb. 8: *Constant neutral loss*-Totalionenstromchromatogramme der 18 Mercaptursäurestandards (je 1.0 mg/L) im negativen Ionisationsmodus in Abhängigkeit von der Matrix: (A) CH₃OH/H₂O, (B) Humanurin, (C) Rattenurin.

Die beschriebenen Geräte- und Gaseinstellungen erwiesen sich als optimal und wurden beibehalten. Bei der Ionisierung zeigte sich eine leichte Abhängigkeit von der gewählten Matrix. Bei Messungen in Urin unterlagen insbesondere die Signale in der ersten Hälfte des analytischen Laufs Effekten der Ionensuppression. So lagen die Nachweisgrenzen (*limit of detection* – LOD) in Urinmatrix verglichen mit den Messungen in Lösungsmittel vereinzelt um den Faktor 10 höher. Die LODs, definiert als ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von größer drei ($S/N > 3$), für die 18 MA-Standards ergaben sich für das CH₃OH/H₂O-Gemisch zu 0.3 – 4.3 pmol o. c., die Humanurinmatrix zu 0.3 – 4.2 pmol o. c. und für die Rattenurinmatrix zu 0.3 – 35.6 pmol o. c. Dabei zeigten, unabhängig von der Matrix, weniger als ein Drittel der Mercaptursäuren ein LOD über 0.4 pmol o. c. Die Nachweisgrenze für den Acrylamid-MA Standard wurde nur in Lösungsmittel bestimmt, da es sich bei dem Metaboliten um ein Produkt des Fremdstoffmetabolismus handelt, das ubiquitär in Urin nachweisbar ist [211]. Eine Übersicht über die matrixabhängigen LODs zeigt **Tab. 1**.

Tab. 1: Nachweisgrenzen [pmol] *on column* (o. c.) der 18 Mercaptursäurestandards in Abhängigkeit von der Matrix, definiert durch ein $S/N > 3$ und bestimmt mit der CNL-IDA-EPI/EPI-Methode im negativen Ionisationsmodus; * das LOD der Acrylamid-MA wurde aufgrund des ubiquitären Vorkommens in Urin nur in CH₃OH/H₂O bestimmt.

Mercaptursäurestandard	[M-H] ⁻	RT [min]	LOD [pmol] o. c.		
			CH ₃ OH/H ₂ O	Humanurin	Rattenurin
Acrylamid-MA	233	3.1	4.3	—*	—*
S-Phenyl-MA	238	20.0	0.4	4.2	0.4
2,2-Dichlorvinyl-MA	256	21.1	0.4	3.9	0.4
2-Fluorbenzyl-MA	270	21.7	0.4	0.4	0.4
3-Fluorbenzyl-MA	270	22.3	0.4	0.4	0.4
2-Chlor-1,1,2-trifluorethyl-MA	278	19.8	0.4	3.6	3.6
S-Purinyll-MA	280	11.5	3.6	3.6	35.6
2-Methoxybenzyl-MA	282	21.6	0.4	0.4	0.4
4-Methoxybenzyl-MA	282	22.0	0.4	0.4	0.4
2-Chlorbenzyl-MA	286	23.6	0.3	0.3	0.3
4-Chlorbenzyl-MA	286	24.8	0.3	0.3	0.3
1,2,2-Trichlorvinyl-MA	292	22.8	3.4	3.4	3.4
1,1-Dichlor-2,2-difluorethyl-MA	294	21.6	3.4	3.4	3.4
4- <i>tert</i> -Butylbenzyl-MA	308	30.0	0.3	0.3	0.3
2,4-Dinitrophenyl-MA	328	23.3	0.3	0.3	3.3
2-Brombenzyl-MA	330	24.2	0.3	0.3	0.3
3-Brombenzyl-MA	330	25.2	0.3	0.3	0.3
4-Brombenzyl-MA	330	25.6	0.3	0.3	0.3

In den IDA-getriggerten Produktionenspektren dominierte bei einer Kollisionsenergie (CE) von -20 V meist der Verlust des Neutralteilchens ([M-H]⁻-129) das Spektrum (**Abb. 9 A**), wohingegen bei einer CE von -60 V zusätzliche Fragmente und folglich komplementäre Information

bezüglich der chemischen Struktur erhalten wurden (**Abb. 9 B**). Meist fehlte bei der hohen CE der Molekülpeak im EPI-Spektrum.

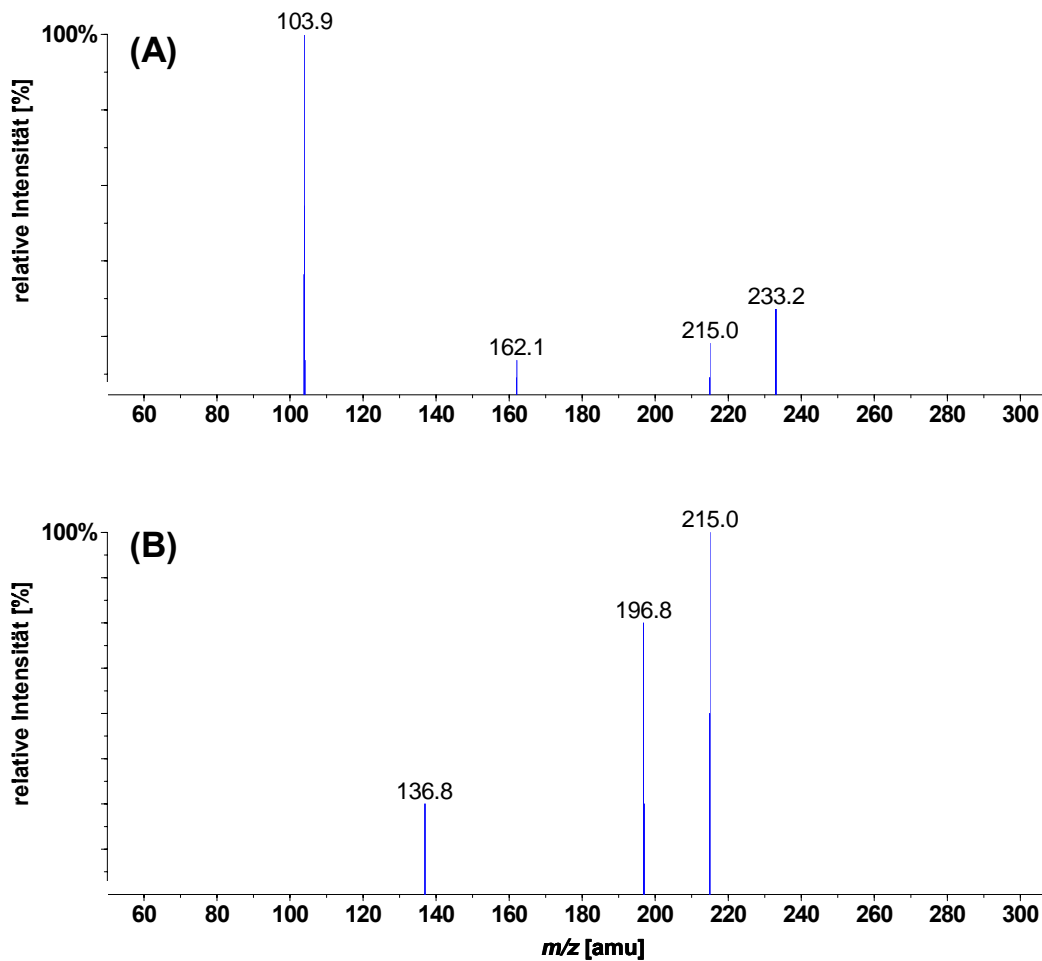


Abb. 9: Aus dem CNL-Scan durch *information dependent acquisition* generierte EPI-Spektren des Acrylamid-MA Standards (1.0 mg/L in CH₃OH/H₂O) im negativen Ionisationsmodus bei einer Kollisionsenergie von: (A) -20 V, (B) -60 V.

3.2 Optimierung der softwaregestützten Datenerfassung

Die Datenprozessierung und das Alignment in die sogenannte Datenmatrix erfolgte softwaregestützt mittels *Metabolomics Export Script*. Es handelte sich hierbei um ein auf die *Analyst* Software des Massenspektrometers abgestimmtes Programm zur Datenprozessierung. Um die Selektivität der Datenextraktion zu gewährleisten, mussten vorab eine Vielzahl an Parametern definiert werden. Durch eingehende Untersuchung mehrerer Referenzchromatogramme (unterschiedliche Konzentrationen der Mercaptursäurestandardlösung in Humanurin) konnten die meisten der Parameter intuitiv gewählt werden.

Minimale und maximale Retentionszeit: Die Totzeit der verwendeten analytischen Säule betrug circa 1.9 min, daher wurde eine minimale Retentionszeit von 2.0 min definiert. Es wurde

eine obere Retentionszeitgrenze von 35 min gesetzt, da vereinzelt noch unbekannte Metaboliten nach dem Signal des unpolarsten Standards, 4-*tert*-Butylbenzyl-MA (RT ~ 30 min), detektiert wurden.

Rauschschwelle: Extraktion zahlreicher zufällig ausgewählter unbekannter Signale ergab Rauschschwellen von meist unter 2000 counts/s. Die Rauschschwelle wurde mit 1000 counts/s bewusst niedrig gewählt, um zu gewährleisten, dass auch Metaboliten niedriger Intensität erfasst werden.

Minimale spektrale Peakbreite: Um zu verhindern, dass sogenannte Spikes (elektronische Störsignale) mit in die Datenmatrix aufgenommen werden, wurde die minimale spektrale Peakbreite auf 0.2 amu gesetzt.

Minimale und maximale Retentionszeitpeakbreite: Die gesamte *cycle time* aller drei Experimente betrug rund 4.3 s. Als Retentionszeitpeakbreite wurden daher 3 – 50 Scans gewählt, was 12.9 – 215 s entsprach. Die mit der CNL-IDA-EPI/EPI-Methode detektierten Signale wiesen im Mittel eine Peakbreite von unter 30 s auf. Dennoch wurde die obere Grenze sehr groß gewählt, um die korrekte Integration von Peakclustern zu gewährleisten.

Massentoleranz: Die Einheitsauflösung des Massenspektrometers bedingte die gewählte Massentoleranz von 0.4 amu.

Retentionszeittoleranz: Obwohl Retentionszeitschwankungen zwischen einzelnen Läufen sich im Bereich von deutlich unter 0.5 min bewegten, wurde die chromatographische Information erst bei einer Retentionszeittoleranz von 1.0 min adäquat wiedergegeben. Der optimale Wert von 1.0 min wurde durch wiederholtes Einlesen der Daten unter Variation der Retentionszeittoleranz (0.2 min Schritte) ermittelt.

Maximale Peakanzahl: Zur Optimierung der maximalen Peakanzahl wurde dieser Parameter auf 100, 250, 500, 750, 1000, 2500 und 5000 gesetzt und die Datenmatrices anschließend miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Rohdaten bei einer maximalen Peakanzahl von 100 am besten wiedergegeben wurden. Als Matrix für die Messung der Merkaptursäurestandards wurde Ratten- bzw. Humanurin verwendet. Folglich beinhaltete die Datenmatrix neben den 18 MA-Standards auch unbekannte Merkaptursäuren. Allerdings ließen sich trotz zum Teil hoher Intensitäten in den Chromatogrammen nur einige wenige zusätzliche Signale mit der Software extrahieren. Wurde der Parameter zu groß gewählt, bestand die Matrix fast ausschließlich aus Nullen.

Die Signale der Merkaptursäurestandards wurden mit diesen Einstellungen bis zu einer Konzentration von ungefähr 10 x LOD durch den Algorithmus des *Metabolomics Export Scripts* erfasst und in die Datenmatrix aufgenommen. Jedoch stellte sich bei genauerer Betrachtung der Rohdaten und der prozessierten Daten heraus, dass die Software einige Schwächen aufwies. So wurden in Chromatogrammen vorhandene Peaks mehrfach nicht erkannt und fehlten demzufolge in der generierten Datenmatrix (sogenanntes Missalignment). Dies wurde vor allem für unbekannte Signale mit niedrigen Intensitäten beobachtet. Umgekehrt wurden Bereiche mit leicht erhöhtem Hintergrundrauschen als Variablen registriert. Abhängig von der Peakform wurden Cluster (nicht vollständig basisliniengetrennte Signale) häufig fehlerhaft oder gar nicht prozessiert. Durch Variation und Optimierung der Parameter konnte das Problem zwar nicht vollständig behoben, die Missalignments aber deutlich reduziert werden.

3.3 Methodvalidierung: Bestimmung der *intra*- und *inter-day*-Präzision

Die entwickelte Methode zielte auf das Screening vorwiegend unbekannter exogener und endogener Merkaptursäuren in Humanurin ab. Die chromatographischen Rohdaten sollten anschließend mit einer Dekonvolutionssoftware prozessiert und in Form einer Datenmatrix ausgegeben werden können. Aus diesem Grund wurde auf eine klassische Validierung anhand der vorwiegend halogenierten bzw. aromatischen Merkaptursäurestandards verzichtet, da anzunehmen war, dass sich diese sowohl chromatographisch (Retentionszeiten von mehr als 20 min) als auch hinsichtlich ihrer Detektion (ausgeprägte Isotopenmuster) anders verhielten als endogene Merkaptursäuren. Merkaptursäuren treten häufig als Isomere auf und liefern daher potentiell mehrere Signale. In den Chromatogrammen konnten vielfach Peakcluster beobachtet werden, die wahrscheinlich auf eine unvollständige Basislinientrennung von Struktur- bzw. Stereoisomeren zurückzuführen waren.

Um die Leistungsfähigkeit der Methode zu testen, wurden daher unbekannte Signale in humanem Poolurin evaluiert. Da sich trotz teilweise hoher Signal-zu-Rausch-Verhältnisse mit der Software aus nativem Humanurin nur wenige Signale extrahieren ließen, wurde der Poolurin fünffach aufkonzentriert. Die *intra-day*-Präzision der Methode wurde anhand von fünf Validierungsproben (I–V) bestimmt, die in unabhängigen Ansätzen aus einem Poolurin hergestellt und innerhalb eines Tages mit der Screeningmethode vermessen wurden. Die Proben wurden bewusst unabhängig voneinander hergestellt, um die Gesamtheit der experimentellen und analytischen Variabilität abschätzen zu können. Zur Bestimmung der *inter-day*-Präzision wurde die Validierungsprobe III an vier weiteren Tagen analog analysiert. Die Chromatogramme wurden im Anschluss mittels *Metabolomics Export Script* prozessiert. Von den registrierten Variablen

wurden nur diejenigen Variablen für die Validierung ausgewählt, für die in allen Proben eine Signalfäche in der generierten Datenmatrix enthalten war. Dies traf auf 27 der 100 Variablen zu. Für die restlichen Variablen enthielt die Matrix mindestens eine Probe, deren Zelleninhalt Null betrug. Die Peakflächen dienten als Grundlage zur Berechnung der relativen Standardabweichungen. Die **Abb. 10 A – D** fasst die Ergebnisse zusammen.

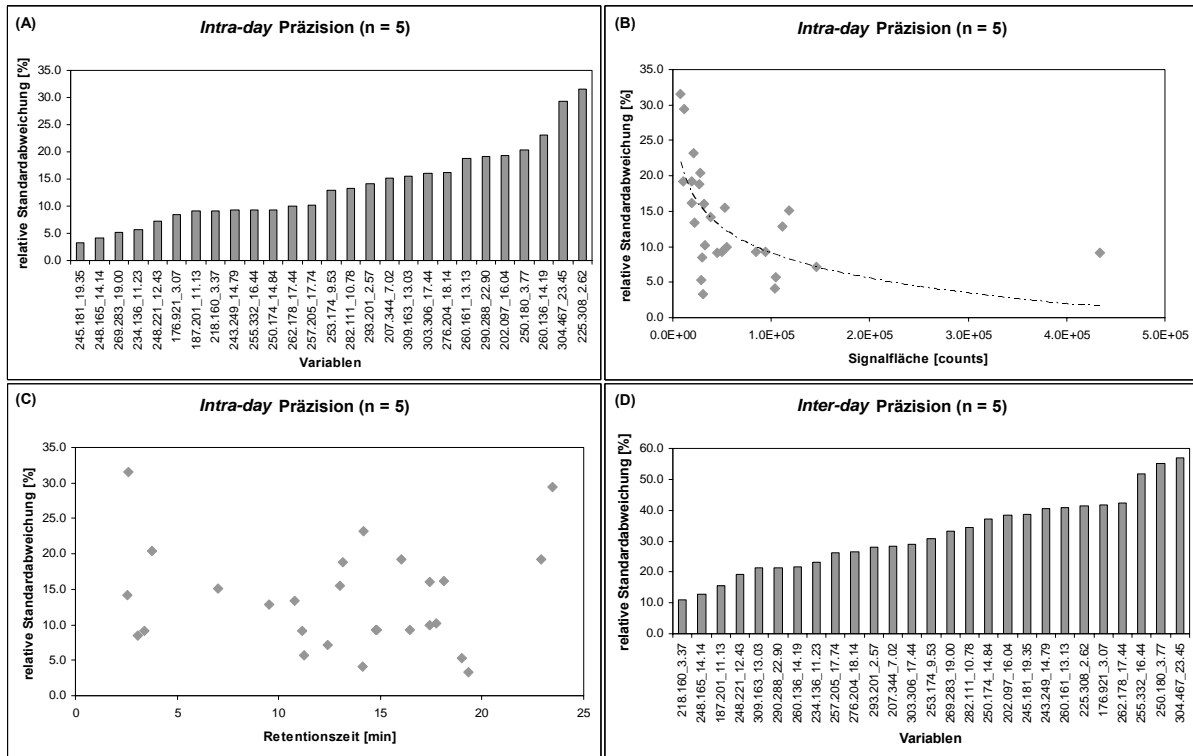


Abb. 10: *Intra-* und *inter-day*-Präzision der CNL-Screeningmethode. Die Chromatogramme wurden mittels *Metabolomics Export Script* prozessiert (Parameter siehe Material und Methoden) und in eine Datenmatrix konvertiert. Von den 100 registrierten Variablen waren 27 in allen analysierten Proben vertreten und dienten als Grundlage zur Berechnung der relativen Standardabweichungen; (A) *intra-day*-Präzision für fünf unabhängige Validierungsproben (I – V) eines humanen Poolurins, (B) *intra-day*-Präzision in Abhängigkeit von der mittleren Signalfäche der 27 Variablen, (C) *intra-day*-Präzision in Abhängigkeit von der Retentionszeit der 27 Variablen, (D) *inter-day*-Präzision für n = 5 Messungen der Validierungsprobe III.

Was die *intra-day*-Präzision betrifft, so wiesen 12 der 27 endogenen Merkmalsstoffe eine relative Standardabweichung (RSD) von kleiner 10 %, weitere 11 Signale von 10.2 – 19.3 % auf. Ferner lieferten drei Variablen eine RSD zwischen 20 und 30 %, die Variable 225.308_2.62 von 31.6 % (**Abb. 10 A**). Dabei zeigte sich tendenziell eine Abhängigkeit der RSD von der Signalfäche, d. h. je größer die Signalfäche der registrierten Variablen, desto besser die Präzision (**Abb. 10 B**). Dagegen hing die Präzision nicht von der Retentionszeit des Analyten ab (**Abb. 10 C**). Die *inter-day*-Präzision der Screeningmethode lag deutlich höher und reichte für die

27 unbekanntes Mercaptursäuren von 10.9 – 57.0 %. Dabei verzeichnete die Hälfte der Variablen RSDs von kleiner 30 % (**Abb. 10 D**).

Für die Mehrzahl der Variablen wurden für die vierte und fünfte Messung deutlich geringere Signalflächen registriert als für die vorangegangenen drei Analysen. Dies bedingt die relativ schlechte *inter-day*-Präzision und lässt auf eine lagerungsbedingte Veränderung der Urinproben schließen

4 Diskussion

Mercaptursäuren stellen eine Klasse von Expositionsmarkern dar, die als gemeinsames Strukturelement die *N*-Acetyl-L-Cystein-Gruppe aufweisen. Auf der Grundlage dieser gruppenspezifischen Einheit, kann mit dem Neutralverlust- bzw. Prekursorionen-Scan ein analytisches Screening entwickelt werden. Beispielsweise wird für Glucuronide [190], Glycoside [193], Sulfate [189] und Glutathion-Addukte [192] solch ein *constant neutral loss* (CNL) beschrieben. Für Mercaptursäuren und Mercaptursäure-Sulfoxide resultiert im negativen Ionisationsmodus ein charakteristischer CNL von 129 Da. Basierend auf dieser Beobachtung und ausgehend von beschriebenen Screeningverfahren [196, 197] gelang es anhand von authentischen Mercaptursäurestandards, eine spezifische und sensitive LC-ESI-MS-Methode zur Detektion von exogenen und endogenen Mercaptursäuren zu entwickeln. Die Methode eignete sich sowohl für sehr polare als auch für tendenziell unpolare Mercaptursäuren (Acrylamid-MA bzw. 4-*tert*-Butylbenzyl-MA) in unterschiedlicher Matrix (CH₃OH/H₂O, Human- und Rattenurin). Durch die sauren Fließmitteleigenschaften konnte aufgrund der Protonierung der Carboxylgruppe und der damit einhergehenden verminderten Polarität der Analyten eine gute Retention auf der analytischen Säule bei gleichzeitig hoher Nachweisempfindlichkeit erzielt werden.

Mercaptursäuren wurden vielfach als potentielle Expositionsmarker für die Arbeitsmedizin diskutiert, allerdings in der Praxis wenig genutzt [141]. PERBELLINI *ET AL.* führte als Grund für die geringe Beachtung die allgemein aufwändige Probenvorbereitung der biologischen Proben an [118]. In der Tat setzen die meisten Methoden umfassende Aufarbeitungs- und Anreicherungsschritte (Flüssig-Flüssig-, Festphasenextraktion, Derivatisierung) voraus [122, 149]. Die entwickelte Screeningmethode kommt ohne Probenvorbereitung aus und bietet damit einen entscheidenden Vorteil im Hinblick auf Wiederfindungsraten, Reproduzierbarkeit und Artefaktbildung.

Die Nachweisgrenze für die 18 Standards lag entsprechend einem Konzentrationsbereich von 10.0 – 100.0 µg/L bei 0.3 – 4.3 pmol o. c. für CH₃OH/H₂O bzw. bei 0.3 – 4.2 pmol o. c. für

Humanurin. In Rattenurin wurden mit der Methode LODs von 0.3 – 35.6 pmol o. c. (Konzentrationsbereich 10.0 µg/L – 1.0 mg/L) erzielt. Die hohe Empfindlichkeit im negativen verglichen mit dem positiven Ionisationsmodus ist aus der Literatur bekannt. So konnten für diverse Styrol-Merkaptursäuren mit negativer Elektrosprayionisierung doppelt so hohe Intensitäten erzielt werden wie mit positiver Elektrosprayionisierung. Zudem zeigte sich, dass unter sonst gleichen Bedingungen die Detektion mit einer APCI-Quelle 50-fach unempfindlicher war, als mit einer ESI-Quelle [119].

Der Einsatz eines Hybridmassenspektrometers machte es ferner möglich, durch *information dependent acquisition* in einem analytischen Lauf mehrere Experimente zu kombinieren. Unter Verwendung der linearen Ionenfalle konnte der für den Merktursäurescreeningansatz interessante CNL *survey scan* sehr effektiv mit zwei *enhanced* Produktionenspektren gekoppelt werden. Variation der Kollisionsenergie in den einzelnen Experimenten führte zu unterschiedlichen Fragmentierungsmustern und diente im Folgenden der Identifizierung bzw. Bestätigung der chemischen Struktur. Da endogene Merktursäuren anfangs nicht zur Verfügung standen, erfolgte die Methodenentwicklung und -optimierung überwiegend mit halogenierten bzw. aromatischen exogenen Verbindungen. Diese lassen sich auf *reversed phase*-Säulen in der Regel gut chromatographieren und mit der ESI-Technik sensitiv detektieren. Von den 18 MA-Standards eluierten 16 erst in der zweiten Hälfte des Chromatogramms und repräsentierten folglich mittel- bis tendenziell unpolare Merktursäuren. Trotz dieser Einschränkungen bei der Methodenentwicklung konnte die sehr polare Acrylamid-MA sowie zahlreiche unbekannte Merktursäuren erfasst werden. Ferner zeigte sich die Methode bezüglich ihrer Spezifität und Sensitivität konsistent mit der als Ausgangspunkt für die Methodenentwicklung herangezogenen Screeningmethode [197] und LC-MS/MS-Methoden für einzelne Analyten wie Merktursäuren, die sich von Acrylamid [195, 211], Benzol [122, 161], Styrol [119] und 1,3-Butadien [156] ableiten. Die genannten Substanzen zeigten in entsprechenden Produktionenspektren den für Merktursäuren charakteristischen CNL von 129 Da. Insbesondere bedingt durch Anreicherungs-schritte wie der Festphasenextraktion oder der *on-line*-Extraktion der Metaboliten mittels Säulenschaltung lag die Sensitivität der selektiven und optimierten Methoden im Durchschnitt um den Faktor 10 – 100 höher als mit dem entwickelten Screeningverfahren. Der Vergleich mit traditionellen Analyseverfahren für Merktursäuren wie der Hochdruckflüssigchromatographie mit UV- oder Fluoreszenzdetektion, der Gaschromatographie mit FID, ECD, NPD, MS- bzw. S-Detektor, ELISA oder TLC/*post-labelling* ergab für einzelne Analyten LODs in derselben Größenordnung, wie sie auch mit dem Screeningansatz erzielt werden konnten [118, 136]. Die angeführten Methoden eignen sich aufgrund der fehlenden Selektivität nicht zum Screening von unbekanntem Merktursäuren

in biologischen Proben. Zwar konnten mit ELISA definierte Merkaptursäuren sehr selektiv und empfindlich (Nachweisgrenzen von 1 – 2 ng/mL) nachgewiesen werden [146], dagegen zeigte die Technik eine nur geringe Selektivität gegenüber einer Gruppe strukturverwandter Merkaptursäuren [147].

Das Hauptaugenmerk der Methodenentwicklung lag auf der Universalität und Selektivität, d. h. auf der gleichzeitigen Erfassung eines breiten Spektrums an Merkaptursäuren. Reaktive Intermediate können aus den verschiedensten Substanzen entstehen, folglich resultieren Merkaptursäuren mit den unterschiedlichsten Strukturen und analytischen Eigenschaften. Die Sensitivität der Methode spielte vor diesem Hintergrund eine wichtige, aber der Universalität untergeordnete Rolle. Durch Optimierung des gruppenspezifischen CNL-Scans konnte ein guter Kompromiss zwischen den beiden Merkmalen Selektivität und Sensitivität gefunden werden.

Um LC-MS-Daten einer multivariaten Analyse zuführen zu können, müssen diese erst in eine definierte Form, die sogenannte Datenmatrix, konvertiert werden. Durch Dekonvolutionsprogramme wie das verwendete *Metabolomics Export Script* kann die dreidimensionale Struktur der chromatographischen Rohdaten erfasst und durch diverse Filter- und Reduzierungsschritte prozessiert werden. Dekonvolution bietet den Vorteil, dass unter optimalen Bedingungen jeder im Chromatogramm detektierte Peak einem Metaboliten entspricht, der als exakt definierte Variable der Form m/z_RT in der Datenmatrix vertreten ist. Unerwünschte Variablen wie substanz- oder vektorbezogene Signale können so einfach aus der Matrix entfernt werden. Darüber hinaus ergeben sich Korrelationen zwischen Variablen nur für Addukte und Fragmente, die in der Ionenquelle entstehen.

Die Software wurde durch Variation der Parameter dahingehend optimiert, dass die resultierende Datenmatrix die Rohdaten bestmöglich wiedergab. Die meisten Einstellungen wurden durch Betrachtung charakteristischer Chromatogramme abgeleitet. Allerdings arbeitete die Software mitunter fehlerhaft. Auf entsprechende Literaturdaten bezüglich der Parametereinstellungen konnte nicht zurückgegriffen werden, da die Software bei Projektbeginn erst für kurze Zeit als Beta-Version verfügbar war und sich noch in der Entwicklung befand. Da der Algorithmus für die Peakdetektion, -integration und das Alignment nicht zugänglich war, blieb die Suche nach der Ursache der Missalignments ergebnislos. Jedoch konnte die Häufigkeit der Missalignments durch eine sorgfältige Optimierung der Parameter minimiert werden. Da nicht zu erwarten war, dass die softwarebedingten Fehler gruppenspezifisch (beispielsweise nur in der Dosisgruppe) oder anderweitig systematisch auftreten, stellte das automatische Alignment mit optimierten Parametern einen guten Kompromiss dar. Eine manuelle Methode schied aufgrund der komplexen Datenstruktur der CNL-Scans und der zu erwartenden großen Probenzahlen aus. Alternative

Dekonvolutionsprogramme kamen ebenfalls nicht in Frage, da sie nicht mit der Datenstruktur des Massenspektrometers harmonierten. *Open-source* Software wie XCMS [202], MZmine [203], MathDAMP [206] oder MET-IDEA [205] hat erst im Laufe des Jahres 2006 Einzug in die Metabonomicsliteratur gefunden, so dass zu Projektbeginn auf das *Metabolomics Export Script* zurückgegriffen werden musste. Die Extraktionssoftware wurde im Laufe der Arbeit mehrfach durch den Hersteller optimiert und durch weitere Funktionen und Filter ergänzt. Für die nachfolgenden Projekte wurde jeweils mit der aktuell verfügbaren Version gearbeitet.

Um die Leistungsfähigkeit der entwickelten Screeningmethode im Hinblick auf reale Fragestellungen des Metabonomics zu testen, erfolgte die Validierung anhand von 27 unbekanntem Merkaptursäuren. Die Signalflächen wurden nicht wie sonst für Analysen einzelner Metaboliten üblich mit einer spezifischen Quantifizierungsmethode, sondern automatisiert mittels *Metabolomics Export Script* erfasst. Die *intra-day*-Präzision für $n = 5$ Messungen ergab sich zu $3.3 - 31.6\%$ ($13.5 \pm 7.2\%$), wobei die relativen Standardabweichungen (RSDs) von 24 der 27 Variablen unter dem von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) für quantitative Analysen geforderten Wert von maximal 20% [212] lagen. Dabei zeigte sich tendenziell eine Abhängigkeit der RSD von der absoluten Signalintensität. In der Regel verbesserte sich die Präzision mit steigender Intensität.

Diese Beobachtungen sind konsistent mit zahlreichen Literaturdaten. So wird für Doppelbestimmungen von Pflanzenextrakten mit einer LC-MS-Screeningmethode im *full scan*-Modus die durchschnittliche RSD für zwei unterschiedliche Subsets an Peaks mit $16.1 \pm 7.4\%$ (28 Duplikate, 1175 Peaks) bzw. $18.9 \pm 10.1\%$ (22 Duplikate, 1840 Peaks) angegeben [213]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen SHURUBOR *ET AL.*, die mittels LC-ECD für insgesamt 80 Metaboliten in einem Rattenserumpool die *intra-day*-Präzision für $n = 20$ Messungen bestimmt haben. Demnach wiesen 64% der Metaboliten RSDs von unter 20% bzw. 80% der Metaboliten von unter 30% auf. Für die restlichen 20% der Analyten wurde die Präzision mit $40 - 60\%$ angegeben [214]. LC-MS-Messungen humaner Poolurine ($n = 7$) im *full scan*-Modus lieferten bezüglich der *intra-day*-Präzision vergleichbare Verteilungen [215]. Von den 4288 im positiven Ionisationsmodus registrierten Signalen lagen 73.0% innerhalb des von der FDA geforderten 20% -Limits. Wurde das Limit auf 30% bzw. 50% erweitert, erhöhte sich der jeweilige Anteil der Signale auf 83.9% bzw. 92.1% . Für den negativen Ionisationsmodus mit 3565 registrierten Peaks lagen 64.1% der Signale unterhalb des 20% -Limits, 75.5% innerhalb des 30% -Limits und 86.8% innerhalb des 50% -Limits. Aus beiden Datensätzen ließ sich eine ausgeprägte Abhängigkeit der Präzision von der absoluten Signalhöhe ableiten [215].

Neben der Probenvorbereitung und analytischen Variation charakterisierte die *inter-day*-Präzision von 10.9 – 57.0 % (32.1 ± 12.2 %) für 27 Metaboliten und $n = 5$ Messungen zusätzlich Effekte, die auf die Lagerung sowie auf das mehrfache Bereitstellen (Auftauen) der Proben zurückzuführen waren. Auf dem Gebiet des Metabonomics kommen verschiedene Studien zur Reproduzierbarkeit von LC-basierten Screeningverfahren zu analogen Verteilungen für die *inter-day*-Präzision von diversen Metaboliten in biologischem Probenmaterial [214]. Vor dem Hintergrund der hohen *inter-day* Variabilitäten scheint es daher angebracht, Proben einer Studie in einer Messreihe (*batch*) zu analysieren.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass bezüglich der analytischen Screeningverfahren im Kontext des Metabonomics und *metabolic profiling* in der Literatur ein allgemeiner Konsens darüber besteht, dass in der Regel die biologische Variation der Proben über die analytische Variation dominiert [214, 216, 217]. Aus den erzielten Nachweisgrenzen in Urinmatrix sowie den Validierungsparametern lässt sich ableiten, dass die entwickelte Screeningmethode als Grundlage für einen semiquantitativen Vergleich von Merkaptursäuren und damit als Ausgangspunkt für einen merkaptursäurebasierten Metabonomicsansatz dienen kann.

PROJEKT 2: Humanstudie mit Acetaminophen-Exposition als *proof-of-concept*

1 Einleitung

In der Vergangenheit fand das Metabonomicskonzept seine Anwendung meist in Tiermodellen zur Vorhersage von Toxizitäten während der Arzneistoffentwicklung [218]. Insbesondere ¹H-NMR diente in diesem Zusammenhang als Screeningplattform. Für Fragestellungen, die den Menschen im Fokus haben, bietet die LC-MS-Technik, im Gegensatz zur NMR-Technik mit ihrem limitierten *usual suspects*- bzw. *pattern recognition*-Ansatz, einen klaren Vorteil. Neben dem entscheidenden Faktor Sensitivität ermöglichen LC-MS-Applikationen durch die Wahl von Scanmodi wie dem *constant neutral loss*- oder dem *precursor ion*-Scan den Zugang zu *metabolic profiling*-Strategien. Dabei stellt *metabolic profiling*, das ungerichtete Screening von Substanzklassen, einen möglichen Ansatz dar, der im Hinblick auf die Übertragung des Metabonomics vom Versuchstier auf den Menschen verfolgt wird [219]. Die Fokussierung auf eine Substanzklasse bietet dabei mehrere Vorteile: Die Metaboliten weisen verwandte chemische Strukturen bzw. Substrukturen auf und vereinigen demzufolge ähnliche chromatographische Eigenschaften auf sich. Eine Optimierung der Screeningmethode ist demnach vielfach möglich. Darüber hinaus kann durch die Wahl einer geeigneten Metabolitenklasse die Erfolgsaussicht auf die Identifizierung eines belastbaren Biomarkers deutlich gesteigert werden. So zielt das Screening von Plasmalipiden (Lipidomics) hauptsächlich auf die Identifizierung neuer Biomarker für Typ-II-Diabetes [11, 104]. Zur Diagnose von Leberkrebs fokussierten sich YANG *ET AL.* auf das *metabolic profiling* von *cis*-Diolen (d. h. Nucleosiden), einer Substanzklasse, die möglicherweise als Tumormarker dienen kann. Ein Subset an identifizierten Metaboliten lieferte dabei eine bessere Krebsdiagnose als der traditionelle Tumormarker alpha-Fetoprotein [107]. In beiden Fällen wurde die potentielle Markerklasse vor der LC-MS-Analyse aus dem biologischen Material (Plasma bzw. Urin) extrahiert. Für das Screening der Analyten kam dann der klassische *full scan*-Modus zum Einsatz. Kürzlich wurde ein dem Konzept des merkaptursäurebasierten Metabonomics ganz analoger Adductomics-Ansatz für die Detektion von DNA-Schäden in humanem Lungengewebe beschrieben. Die LC-MS-Methode basierte auf dem gemeinsamen 2'-Desoxyribose-Strukturelement der 2'-Desoxynucleosid-Addukte, das im positiven Ionisationsmodus als Neutralteilchen mit 116 Da abgespalten werden kann [191].

In gleichem Maße wie zwischen modifizierten Nucleinbasen und der Entstehung von Krebs wahrscheinlich ein enger Zusammenhang besteht, wurde für die Klasse der Merkaptursäuren konstatiert, dass das Ausscheidungsprofil mit der elektrophilen Belastung eines Organismus

korreliert. Mercaptursäuren weisen mit der *N*-Acetyl-L-Cystein-Einheit ein gemeinsames Strukturelement auf, das als Basis für ein analytisches Screening dienen kann. Die entwickelte Methode nutzt den mercaptursäurespezifischen Neutralverlust von 129 Da für einen *constant neutral loss*-Scan (CNL-Scan).

Inwieweit sich das gewählte *metabolic profiling* von Mercaptursäuren auf reale Fragestellungen anwenden lässt, wurde zunächst anhand einer Modellstudie mit Acetaminophen untersucht. Da die Substanz via Cytochrom P 450 Enzyme zu dem elektrophilen *N*-Acetyl-*p*-Benzochinonimin (NAPQI) aktiviert wird, gilt Acetaminophen im Zusammenhang mit der Bildung von Mercaptursäuren als klassische Modellsubstanz. In therapeutischen Dosen spielt die Giftung (Reaktion mit Makromolekülen, z. B. mit Proteinen der Leber) allerdings eine untergeordnete Rolle, hier überwiegen Eliminationsmechanismen wie die Glucuronidierung und die Sulfatierung [220]. Ab einer oralen Dosis von ca. 15 g manifestiert sich akute Lebertoxizität, die auf eine vermehrte Bildung des reaktiven Intermediats NAPQI bei parallel verlaufender Glutathion-Depletion beruht [116]. **Abb. 11** stellt den Metabolismus von Acetaminophen schematisch dar.

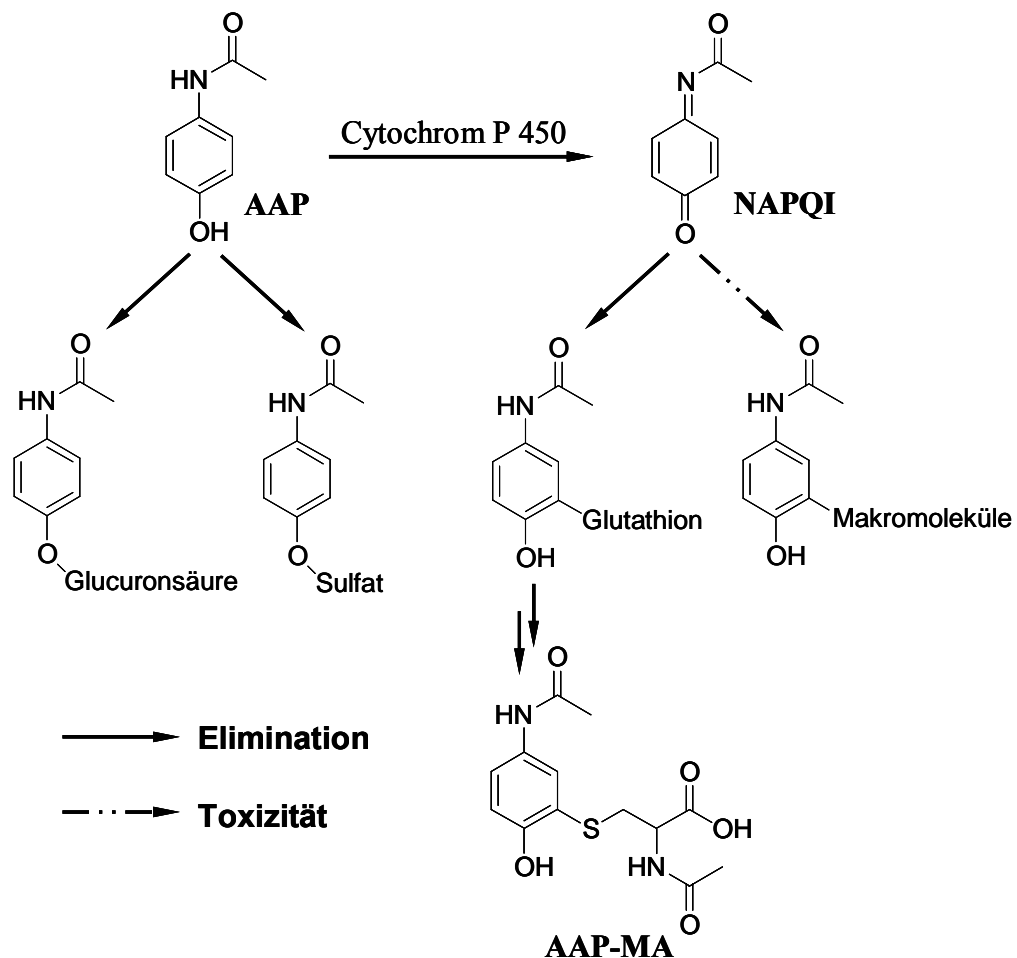


Abb. 11: Schematische Übersicht über den Acetaminophen-Metabolismus (nach JAMES ET AL. 2003 [220]); Schlüssel: AAP, Acetaminophen; AAP-MA, Acetaminophen-Mercaptursäure; NAPQI, *N*-Acetyl-*p*-Benzochinonimin.

Eine Studie mit zehn Probanden, die Acetaminophen in einer therapeutischen Dosis von 500 mg einnahmen, sollte dabei zunächst der Evaluierung (i) der entwickelten Screeningmethode, (ii) der verbesserten softwaregesteuerten Peakextraktion sowie (iii) der multivariaten Datenanalyse dienen. Zum Vergleich wurde die in Projekt 1 entwickelte CNL-EPI/EPI-Methode zunächst einer konventionellen *full scan*/TOF-Methode gegenübergestellt. Ziel sollte es sein, mit dem jeweiligen Ansatz den „Expositionsmarker“, d. h. die Acetaminophen-Merkaptursäure, als „Biomarker“ für eine elektrophile Belastung zu identifizieren. In klassischen Metabonomicsansätzen, die ausschließlich die Interpretation endogener Metabolitenprofile anstreben, werden Variablen, die auf die verabreichte Ausgangsverbindung zurückzuführen sind (*drug related metabolites* – DRM), häufig vor Erstellung der Modelle ausgeschlossen, um diese nicht durch einen Bias zu beeinflussen [169, 221]. Aus der Literatur sind nur wenige Studien bekannt, die die Metabonomics-technik zu Identifizierung von DRM nutzten [18, 222-224]. Um die Spezifität und Sensitivität des *metabolic profiling* von Merkaptursäure zu testen, wurde eine weitere Studie mit 25 Probanden und einer zehnfach geringeren Acetaminophendosis angelegt.

Obwohl die Datenprozessierung (Peakdekonvolution, Filteroptionen und Alignment) und die Validierung der Modelle die kritischsten Schritte bei der auf *pattern recognition* basierenden multivariaten Datenanalyse sind und der Erfolg, d. h. die biologische Aussagekraft bzw. Relevanz des ganzen Metabonomicsprojekts, entscheidend von diesen beiden Faktoren abhängt, fand diese Problematik in der Literatur bisher wenig Beachtung. Mit der *MarkerView* Software stand eine Weiterentwicklung des *Metabolomics Export Scripts* zur Verfügung, die erstmals einen visuellen Zugang zur Funktionsweise der Dekonvolution ermöglichte. Hauptaugenmerk der beiden Modellstudien mit Acetaminophen lag daher auf der Optimierung der Datenprozessierung sowie der Evaluierung der chemometrischen Modelle.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Lösungsmittel entsprachen HPLC-Qualität und wurden von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Der Acetaminophen-Merkaptursäurestandard wurde von der Firma Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Das Acetaminophen-Merkaptursäure-Sulfoxid wurde gemäß der kürzlich beschriebenen Vorschrift synthetisiert [121].

2.2 Humanstudie mit Acetaminophen-Exposition im Hoch- und Niedrigdosisbereich

Den zehn Teilnehmern (5 männliche und 5 weibliche, Alter 24 – 39 Jahre) der Studie wurde eine therapeutische Dosis von 500 mg Acetaminophen (Paracetamol, Ratiopharm[®], Ulm, Deutschland) pro Person verabreicht (Hochdosisstudie). In einer zweiten Expositionstudie nahmen die 25 Probanden (10 männliche und 15 weibliche, Alter 20 – 60 Jahre) eine zehnfach geringere Acetaminophendosis zu sich (Niedrigdosisstudie). Alle Studienteilnehmer waren Nichtraucher oder lediglich Gelegenheitsraucher und hatten an den beiden Tagen vor Studienbeginn sowie während der Studie keinen Alkohol und keine Medikamente zu sich genommen. Weitere Einschränkungen bezüglich Diät oder Aktivitäten wurden nicht gemacht. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt und gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Probanden haben vor der Teilnahme an der jeweiligen Studie ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Beide Studien umfassten eine Urinabgabe am Morgen (7 Uhr) zweier aufeinanderfolgender Tage. Unmittelbar vor Studienbeginn (jeweils 23 Uhr am Vorabend) wurden die Teilnehmer aufgefordert ihre Blase vollständig zu entleeren. Von da an sollte der Urin über 8 h in einem Behälter aufgesammelt werden. Der erste Tag diente der Gewinnung des Kontrollurins. Am zweiten Abend nahmen die Probanden vor Beginn der 8 h-Sammelperiode 500 mg bzw. 50 mg Acetaminophen ein. Nach Bestimmung des gesamten Urinvolumens wurden entsprechende Aliquots bei -20 °C tiefgefroren.

2.3 Klinische Chemie

Die Kreatininanalyse wurde mittels einer hausinternen LC-ESI-MS/MS-Methode unter Verwendung eines internen d_3 -Kreatinin Standards durchgeführt.

2.4 Vorbereitung der Urinproben

Die tiefgefrorenen Proben wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und bei 14000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Für die Hochdosisstudie (Exposition mit 500 mg Acetaminophen) wurden zu 650 µL Urin 650 µL Acetonitril gegeben, um die in der Probe vorhandenen Proteine auszufällen. Nach dem Zentrifugieren (14000 g, 4 °C, 10 min) wurden 1.0 mL des Überstands im Vakuum zur Trockene einrotiert und der Rückstand anschließend mit 100 µL Wasser wieder aufgenommen. Nach 15 min im Ultraschallbad (20 °C) wurden die Proben erneut abzentrifugiert. Für die LC-MS-Analyse wurden 20 µL dieser fünffach aufkonzentrierten Probe eingesetzt.

Die Urinproben aus der Niedrigdosisstudie (Exposition mit 50 mg Acetaminophen) wurden nach dem Auftauen zentrifugiert (14000 g, 4 °C, 10 min) und 5 µL direkt für die LC-MS-Analyse verwendet.

2.5 Chromatographische Parameter

HPLC-Anlage:	Quaternäre Pumpe Serie 1100 mit Autosampler Serie 1100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Software:	Analyst 1.4 für CNL- bzw. Analyst QS 1.1 für <i>full scan</i> -Experimente (Applied Biosystem/MDS Sciex, Concord, ON, Kanada)
Vorsäule:	C ₁₈ ODS, 4 x 3 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Analytische Säule:	ReproSil-Pur C ₁₈ -AQ, 5.0 µm, 150 x 2 mm (Dr. Maisch, Ammerbuch, Deutschland)
Fließmittel A:	0.1 % Ameisensäure (0.1 % FA)
Fließmittel B:	Acetonitril (ACN)
Injektion:	20 µL (Hochdosisstudie) 5 µL (Niedrigdosisstudie)

Gradient analytische Säule:	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	0.1 % FA	ACN
	0.00	0.250	95	5
	2.00	0.250	95	5
	25.00	0.250	50	50
	27.00	0.250	10	90
	29.00	0.250	10	90
	31.00	0.250	95	5
	40.00	0.250	95	5

2.6 Massenspektrometrische Parameter

Als Detektor kamen zwei verschiedene Massenspektrometer zum Einsatz, eine Triple Quadrupol gekoppelte lineare Ionenfalle (QTRAP[®] 2000, Applied Biosystem/MDS Sciex) für CNL-Experimente sowie ein hochauflösendes Hybrid Quadrupol Flugzeitmassenspektrometer (QSTAR[®] XL, Applied Biosystem/MDS Sciex) für *full scan*-Experimente. Beide Geräte waren mit einer TurboIonSpray[®]-Quelle ausgestattet. Allgemeine Quellen- und Gaseinstellungen für die CNL- und *full scan*-Experimente sowie die Parameter für die lineare Ionenfalle waren im Einzelnen: *ionspray voltage* -4.2 kV, *vaporizer temperature* 400 °C, *turbo gas* (N₂) 50 psi, *nebulizer gas* (N₂) 45 psi, *curtain gas* (N₂) 30 psi, *collision gas* (N₂) medium (CNL)/high (EPI), *declustering potential* (DP) -50 V, *entrance potential* (EP) -10 V, *collision energy* (CE) -20 V, *collision cell exit potential* (CXP) -2 V, *focusing potential* (FP) -230 V, *declustering potential 2* (DP2) -10 V,

ion release delay 6.0 ms und *ion release width* 5.0 ms. Bei DP, EP, CE, CXP, FP und DP2 handelte es sich jeweils um *offset*-Spannungen.

2.7 *Constant neutral loss*- und *full scan*-Methode

Um den Massenbereich der erwarteten exogenen und endogenen Metaboliten abzudecken, wurden im negativen Ionisationsmodus CNL- und *full scan*-Experimente im Bereich $m/z = 200 - 450$ durchgeführt. Die CNL-Methode bestand aus drei einzelnen Experimenten: dem CNL-Scan und zwei *enhanced* Produktionen-Scans (EPI-Scans) mit jeweils unterschiedlichen Kollisionsenergien. Gekoppelt wurden die Experimente mittels eines *information dependent acquisition*-Kriteriums (IDA-Kriteriums). Der *survey scan* wurde im *profile*-Modus bei einem *step size* von 0.1 amu durchgeführt. Des Weiteren betrug die *dwell time* 3.0 s mit einer *mass range pause* von 5.0 ms. Die Auflösung des ersten Quadrupols (Q1) wurde auf *unit* gesetzt, die des dritten Quadrupols (Q3) auf *low*. Das IDA-Kriterium wurde in der Form definiert, dass alle Signale, die im CNL-Scan die Schwelle von 3000 counts/s (Hochdosisstudie) bzw. 1000 counts/s (Niedrigdosisstudie) überstiegen, die Aufzeichnung eines EPIs provozierten. Überschritten mehrere m/z gleichzeitig den Grenzwert, wurde automatisch der intensivste Peak ausgewählt. Alle Ionen, von denen bereits ein EPI aufgenommen wurde, wurden anschließend für mindestens 40 s ausgefiltert. Die Massentoleranz betrug 250 mmu. Zur Strukturaufklärung wurden zwei EPIs aufgenommen, das erste bei einer Kollisionsenergie von -20 V, das zweite bei -60 V. Der *collision energy spread* betrug jeweils -2 V. Gebildete Fragmente wurden bei einer *scan rate* von 4000 amu/s, sowie einer Q3 *entry barrier* von 8 V für 50 ms in der Ionenfalle gesammelt (*fixed fill time*) und im Bereich von $m/z = 50 - 500$ detektiert.

Für die *full scan*-Experimente wurden die folgenden Parameter definiert: *mass range pause* 5.0 ms, *intensity threshold* 1.0 cps, *accumulation time* 1.0 sec, *pulser frequency* 12.945 kHz, *pulse 1 duration* 7 μ s und *time bins to sum* 4.

2.8 Datenverarbeitung und chemometrische Datenanalyse

2.8.1 Generieren der Datenmatrices

Detektion und Alignment der Peaks erfolgte softwaregestützt mittels *MarkerView*TM Software 1.0 (Applied Biosystems/MDS Sciex). Sowohl CNL- als auch *full scan*-Daten können mit diesem Programm eingelesen und in eine Datenmatrix umgewandelt werden. Die folgenden Einstellungen wurden vorgenommen: *minimum retention time* 2.0 min, *maximum retention time* 35 min, *noise threshold* 500 counts/s, *minimum spectral peak width* 0.1 amu, *minimum retention time*

peak width 3 scans, *maximum retention time peak width* 100 scans, *retention time tolerance* 1.0 min, *mass tolerance* 0.1 amu (*full scan*/TOF-Daten) bzw. 0.4 amu (CNL-Daten) und *maximum number of peaks* 500. Um die Peakflächen auf den Kreatiningehalt der Urinproben zu normalisieren wurde die Datenmatrix anschließend nach *Excel 2002* (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) exportiert.

2.8.2 Allgemeine Vorgehensweise bei der multivariaten Datenanalyse

Die multivariate statistische Datenauswertung (PCA, PLS-DA Modelle) wurde mit *SIMCA-P* Software Version 10.5 (Umetrics, Umeå, Schweden) durchgeführt. Vor Erstellung der Modelle wurden die Daten zentriert und mittels *unit variance* bzw. *pareto scaling* skaliert. Im Folgenden werden die grundlegenden Prinzipien der multivariaten Projektionsverfahren, wie sie in der Arbeit zur Anwendung kamen, mit dem Verweis auf weiterführende Literatur kurz erläutert.

2.8.3 Principal component analysis (PCA)

Die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis* – PCA) stellt eine multivariate Projektionsmethode dar, die auf die Identifizierung systematischer Variation, d. h. maximaler Varianz, in einer Datenmatrix abzielt [163]. Grundprinzip ist die Reduktion der Datendimensionalität unter weitestgehendem Erhalt der ursprünglichen Information. In *score* und *loading plots* ist die Korrelationsstruktur der einzelnen Beobachtungen (Proben) bzw. der Variablen (massenspektrometrische Signale) visuell zugänglich. So können anhand der unterschiedlichen Plots Relationen zwischen den Beobachtungen (Gemeinsamkeiten, Unterschiede, Ausreißer), allgemeine (dosis- bzw. zeitabhängige) Trends und zugrunde liegende Variablen identifiziert werden. Der *PCA score plot* dient daher meist einem ersten zusammenfassenden Überblick über die Datenstruktur. Da in die Modelle keine Information bezüglich einer Gruppenzugehörigkeit der Proben einfließt, wird die PCA auch als *unsupervised*-Verfahren bezeichnet.

2.8.3.1 Vorbereitende Datenprozessierung: Zentrieren und Skalieren

Eine Voraussetzung für die PCA ist das Vorliegen einer definierten Datenstruktur, der sogenannten Datenmatrix (vgl. **Abb. 7**) bestehend aus n Beobachtungen und k Variablen. Für die graphische Darstellung in *score* und *loading plots* müssen die Variablen weiteren Prozessierungsschritten unterzogen werden:

Skalieren (*scaling*): Da sich die Variablen in ihrem numerischen Wert meist über einen weiten Bereich unterscheiden, dient das Skalieren der Variablen dem Zweck der Standardisierung. Zwei Techniken kommen allgemein zur Anwendung: *unit variance (UV) scaling* und *pareto scaling*. Hierbei wird jede Variable mit einem von der Varianz bzw. der Standardabweichung (SD) der jeweiligen Variablen abhängigen Skalierungsfaktor multipliziert. Dieser beträgt $1/SD$ für das *UV scaling* und $1/\sqrt{SD}$ für das *pareto scaling*. Jede Variable erhält so Einheitsvarianz bzw. *pareto*-Varianz. Im Fall der Einheitsvarianz bedeutet dies, dass alle Koordinatenachsen dieselbe Länge aufweisen (vgl. x_{1-3} in **Abb. 12**), im Fall der *pareto*-Varianz bestimmt sich die Länge nach einem zusätzlichen Faktor, der von der Standardabweichung der Variablen abhängt.

Zentrieren (*mean-centering*): In einem zweiten Schritt werden die Daten zentriert, d. h. für jede Variable wird ein durchschnittlicher Wert berechnet, der anschließend von den Daten subtrahiert wird. Auf diese Weise erhalten alle Variablen einen festen Bezugspunkt (roter Punkt in **Abb. 12**). *Unit variance scaling* und *pareto scaling* wurden nachfolgend immer in Zusammenhang mit *mean-centering* verwendet. Die Kombination aus *UV scaling* und *mean-centering* wird auch als *autoscaling* bezeichnet und die Bezeichnung im Text so übernommen.

2.8.3.2 PCA score plot

Score plots dienen der Visualisierung der Beobachtungen in zwei- bzw. dreidimensionalen Koordinatensystemen sogenannter latenter Variablen oder Hauptkomponenten (*principal components* – PCs). Die latenten Variablen leiten sich dabei aus dem k -dimensionalen Raum der aus n Beobachtungen und k Variablen bestehenden Datenmatrix ab. Die Datenmatrix, die als Ausgangspunkt für die Berechnung der latenten Variablen dient, wird im Folgenden mit einem \mathbf{X} bezeichnet. Jede der n Beobachtungen der \mathbf{X} -Matrix wird in ein k -dimensionales Koordinatensystem eingeordnet, wobei jede Variable einer Koordinatenachse entspricht. Die Länge der Achsen ist durch den jeweiligen Skalierungsprozess festgelegt. Beispielsweise resultiert aus dem Skalieren der Variablen auf Einheitsvarianz (*UV scaling*) für jede Koordinatenachse eine relative Länge von 1. Die n Beobachtungen bilden einen Punkteschwarm im k -dimensionalen Raum, dessen Schwerpunkt sich, bedingt durch den *mean-centering* Prozess, im Koordinatenursprung befindet.

Die erste Hauptkomponente (PC1) wird nun so berechnet, dass sie entlang der maximalen Varianz der n Beobachtungen verläuft und das Profil der Punkte nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate am besten wiedergibt. Die zweite Hauptkomponente (PC2) steht orthogonal zu PC1 und vereint die zweitgrößte Variation im Punkteschwarm auf sich. Die Hauptkomponenten werden

aufgrund ihres zusammenfassenden Charakters auch als latente Variablen bezeichnet. Beide Komponenten verlaufen durch den Koordinatenursprung und spannen eine Ebene im multidimensionalen Raum auf. Durch Projektion der Beobachtungen auf dieses, durch PC1 und PC2 aufgespannte neue Koordinatensystem, resultieren die *scores* (Abkürzung: t). Der entsprechende Plot wird als *score plot* (PC1 vs. PC2 oder analog t_1 vs. t_2) bezeichnet und kann visualisiert werden. Die **Abb. 12 A** zeigt in einem geometrischen Ansatz das Prinzip der PCA für $k = 3$ Variablen und zwei Hauptkomponenten. Durch Hinzufügen weiterer Komponenten kann das deskriptive Potential des PCA Modells sukzessive verbessert werden. Varianz, die nicht durch die PCs beschrieben werden kann, wird auch als *residuals* bezeichnet.

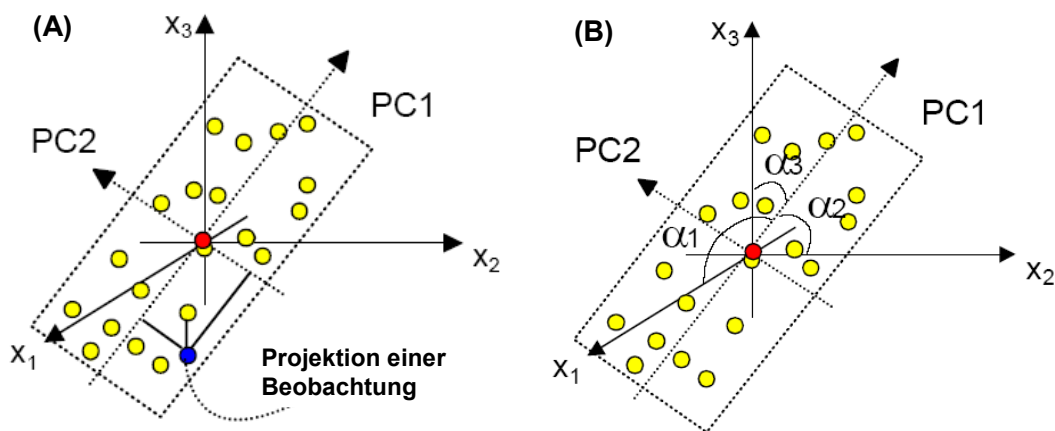


Abb. 12: (A) Prinzip der Hauptkomponentenanalyse (PCA), geometrisch dargestellt für $k = 3$ Variablen. Jede der n Beobachtung wird in das dreidimensionale Koordinatensystem eingeordnet. Die aus den Originalvariablen abgeleiteten latenten Variablen PC1 und PC2 verlaufen entlang der maximalen Varianz im Punkteschwarm und spannen eine Ebene im Raum auf. Die *scores* resultieren aus der Projektion der Beobachtungen auf diese Ebene, (B) geometrische Darstellung der *loadings*. Die Richtung der PCs relativ zu den ursprünglichen Koordinatenachsen ist durch den Kosinus der Winkel α_k gegeben (Bildquelle: Umetrics [162]).

2.8.3.3 PCA loading plot

Aus dem *loading plot* können diejenigen Variablen extrahiert werden, die für die Cluster bzw. Trends im *score plot* verantwortlich sind. Die *loadings* (Abkürzung: p) definieren dabei die Korrelation der ursprünglichen Variablen mit den PCs, stellen folglich Koeffizienten von Linearkombinationen der Variablen dar und werden daher auch als *weights* bezeichnet. Geometrisch betrachtet legen die *loadings* die Orientierung der Hauptkomponentenebene im k -dimensionalen Raum fest. Dabei ist die Richtung von PC1 relativ zu den ursprünglichen Koordinatenachsen durch den Kosinus der jeweiligen Winkel α_k gegeben (**Abb. 12 B** für $k = 3$ Variablen). Weitere *loading*-Koeffizienten definieren die Orientierung von PC2. Aus dem *loading plot* lässt sich nicht nur entnehmen, ob eine Variable mit einem im *score plot*

beobachteten Trend korreliert, sondern auch die Art und Weise (positiv oder negativ) und das Ausmaß (gut bzw. schlecht) der Korrelation. Eine schematische Darstellung eines *score* und *loading plots* zeigt **Abb. 13**.

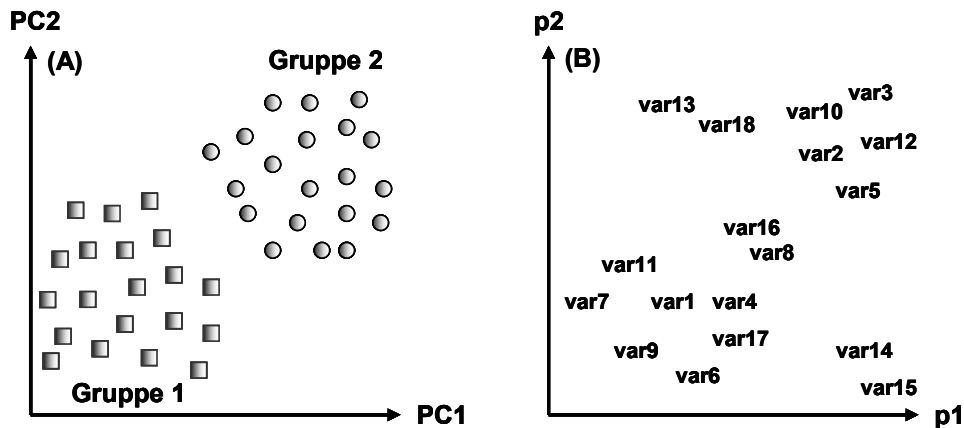


Abb. 13: Schematische Darstellung einer PCA: (A) PC1 vs. PC2 *score plot*, (B) p1 vs. p2 *loading plot*.

2.8.4 *Partial least squares*-Analyse

Die *partial least squares*- oder auch *projection to latent structures*-Analyse (PLS) basiert auf dem *non-linear iterative partial least squares*-Algorithmus (NIPALS-Algorithmus) und stellt eine Regressionserweiterung der PCA dar. Mittels PLS ist es möglich, zwei Variablenblocks (\mathbf{X} und \mathbf{Y}) miteinander in Relation zu bringen [225, 226]. Die latenten Variablen (Hauptkomponenten) im \mathbf{X} -Block werden so ausgerichtet, dass sich eine gute Korrelation mit den Komponenten des \mathbf{Y} -Blocks ergibt, wobei die Kovarianz zwischen \mathbf{X} und \mathbf{Y} maximiert wird. Der Regressionskoeffizient gibt Aufschluss über die Beziehung zwischen den beiden Blocks und kann für die Prädiktion von \mathbf{Y} aufgrund von \mathbf{X} bzw. für quantitative Analysen genutzt werden.

Die PLS-Diskriminanzanalyse (PLS-DA) ist eine Sonderform der PLS, die sich auf die Separierung (Diskriminierung) von Klassen fokussiert [174]. Die Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit der Proben ist daher Voraussetzung. Die PLS-DA wird im Gegensatz zur PCA auch als *supervised*-Methode bezeichnet. Die \mathbf{X} -Matrix ($n \times k$) wird wie bei der PCA durch die Beobachtungen (n) und Variablen (k) charakterisiert. Die \mathbf{Y} -Matrix kodiert die Klasse und besteht im Fall der PLS-DA aus einem Set von *dummy*-Variablen. Beispielsweise resultieren bei drei Gruppen drei dieser künstlichen Variablen, bestehend aus den diskreten numerischen Werten 0 und 1, die die Gruppenzugehörigkeit exakt definieren (**Abb. 14**).

X-Matrix		dummy-Y-Matrix		
Klasse 1: Kontrollgruppe	Beobachtungen: Ratte 1	1	0	0
	Ratte 2	1	0	0
	Ratte 3	1	0	0
	Ratte 4	1	0	0
	Ratte 5	1	0	0
Klasse 2: Niedrigdosisgruppe	Beobachtungen: Ratte 1	0	1	0
	Ratte 2	0	1	0
	Ratte 3	0	1	0
	Ratte 4	0	1	0
	Ratte 5	0	1	0
Klasse 3: Hochdosisgruppe	Beobachtungen: Ratte 1	0	0	1
	Ratte 2	0	0	1
	Ratte 3	0	0	1
	Ratte 4	0	0	1
	Ratte 5	0	0	1

Abb. 14: Schema einer *dummy*-Matrix. Die **X**-Matrix umfasst beispielhaft drei Klassen (hier: Kontroll-, Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe) mit jeweils fünf Beobachtungen (hier: Ratte 1 – 5). Die drei *dummy*-Variablen der **Y**-Matrix bestehen aus 0 und 1 und legen die Klassenzugehörigkeit eindeutig fest.

2.8.4.1 PLS-DA *score plot*

Der PLS-DA *score plot* resultiert zunächst analog dem PCA *score plot* aus der Projektion der Beobachtungen auf die latenten Variablen. Es folgt eine Rotation der Hauptkomponentenebene hinsichtlich einer Maximierung der Korrelation zwischen dem **X**- und dem **Y**-Block (den Metabolitenprofilen mit der Gruppenzugehörigkeit). PCA und PLS-DA *score plots* können in derselben Weise interpretiert werden, d. h. es können unter anderem Beziehungen zwischen einzelnen Proben (Gruppen- bzw. Clusterbildung, Ausreißer) und/oder Trends (abhängig von der Dosis bzw. Zeit) beobachtet werden.

2.8.4.2 PLS-DA *weight plot*

Wie die PCA *loadings* kombinieren auch die PLS *weights* die ursprünglichen **X**- und **Y**-Variablen mit den latenten Variablen, den Hauptkomponenten. Dies erfolgt in der Form, dass sich eine maximale Korrelation zwischen den *scores* der **X**- und der **Y**-Matrix ergibt. Die **X**-*weights* werden dabei mit w^* , die **Y**-*weights* mit c bezeichnet. Der Plot w^*c_1 vs. w^*c_2 wird folglich als *weight plot* bezeichnet. Für PLS-DA Modelle können daraus diejenigen Variablen extrahiert werden, die für die Diskriminierung der Gruppen im *score plot* verantwortlich sind. Analog dem PCA *loading plot* kann zusätzlich eine Aussage über die Korrelationsstruktur der Variablen (positiv/negativ bzw. gut/schlecht) gemacht werden.

2.8.5 Validierung

2.8.5.1 Modelldiagnostik

Die Qualität eines Modells kann in *SIMCA-P* mittels des Faktors R^2 (*goodness of fit*) bestimmt werden. Er ist ein quantitatives Maß für die durch ein Modell erklärbare Variation, die Quadratsummen (*sum of squares* – SS), und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei 1 für ein perfektes und 0 für kein Modell steht. Die Varianz steht in direktem Zusammenhang mit den Quadratsummen und meint die um die Freiheitsgrade korrigierten SS. Für PCA Modelle bezieht sich der Wert auf die **X**-Matrix (R^2X), für PLS und PLS-DA Modelle auf den Responseblock, die **Y**-Matrix (R^2Y). R^2 kann sowohl für einzelne, als auch kumulativ (cum) für mehrere Komponenten berechnet werden. Das Problem bei der alleinigen Betrachtung dieses Faktors ist die Tatsache, dass er mit steigender Anzahl Hauptkomponenten ansteigt und sich dem Wert 1 nähert [162].

2.8.5.2 Cross-Validierung

Interne Cross-Validierungsfaktoren (*goodness of prediction* – Q^2) werden in *SIMCA-P* automatisch für jedes Modell berechnet. Hierzu wird der Datensatz zufällig in sieben Gruppen unterteilt. Eine Gruppe wird jeweils ausgeklammert und mit den verbleibenden 6/7 der Proben ein Modell erstellt. Dieses Modell dient in einem zweiten Schritt dazu, die Gruppenzugehörigkeit der 1/7 zunächst unberücksichtigten Proben zu ermitteln. Dieser Vorgang wird mit allen sieben Gruppen wiederholt und die Prädiktion mit dem Originalmodell verglichen. Für den kompletten Datensatz wird anschließend die Summe der Fehlerquadrate berechnet und in den Faktor Q^2 (das cross-validierte R^2 oder die vorhersagbare Variation) konvertiert. Im Gegensatz zu R^2 ist Q^2 nicht manipulierbar, d. h. der Faktor steigt nicht mit zunehmender Komplexität (Anzahl Hauptkomponenten) des Modells an, sondern fällt nach Erreichen eines Plateaus wieder ab. Für PCA Modelle bezieht sich Q^2 auf R^2X , für PLS und PLS-DA Modelle auf R^2Y . Allgemein gilt: Je größer Q^2 , desto besser die Prädiktivität des jeweiligen Modells. Modelle mit $Q^2 > 0.5$ gelten im Allgemeinen als gut, Modelle mit $Q^2 > 0.9$ als exzellent. Der Betrag $R^2 - Q^2$ ($|R^2 - Q^2|$) sollte dabei kleiner sein als 0.2 – 0.3 [162].

2.8.5.3 Signifikante Hauptkomponenten

Die optimale Anzahl Hauptkomponenten wird in *SIMCA-P* insbesondere durch zwei Cross-Validierungsregeln festgelegt. Eine Komponente ist demnach signifikant, wenn Q^2 einen bestimmten Wert (Limit) übersteigt. Für PLS-DA Modelle ist dies 0.05, für PCA Modelle hängt

das Limit von der Anzahl PCs ab, da mit steigender Anzahl Hauptkomponenten parallel ein Verlust an Freiheitsgraden einhergeht (Regel 1). Gemäß Regel 2 muss eine Komponente in einem PCA Modell mindestens \sqrt{k} \mathbf{X} -Variablen (k = Anzahl \mathbf{X} -Variablen) mit $Q^2 > \text{Limit}$ aufweisen, um als signifikant zu gelten. Für die Modelle wurden die Faktoren R^2 und Q^2 jeweils nur für signifikante Hauptkomponenten angegeben. Dies gilt auch für den Fall, dass zur besseren Veranschaulichung in den Plots nicht signifikante Komponenten hinzugenommen wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Merkaptursäurescreening im *constant neutral loss*- und *full scan*-Modus

Um das Konzept des Merkaptursäurescreenings zu evaluieren wurde zunächst ein Vergleich mit der konventionellen *full scan*/TOF-Technik gezogen. Hierzu wurde Humanurin nach Exposition mit 500 mg Acetaminophen bzw. Kontrollurin vermessen. *Constant neutral loss*-Experimente wurden mittels einer Quadrupol gekoppelten linearen Ionenfalle durchgeführt, *full scan*/TOF-Experimente mittels eines hochauflösenden Hybrid Quadrupol Flugzeitmassenspektrometers. Für die Gegenüberstellung der beiden Screeningansätze wurden die HPLC- und MS-Parameter, soweit möglich, identisch gewählt. Da sich der merkaptursäurespezifische Neutralverlust von 129 Da nur im negativen Ionisationsmodus zeigt, wurden alle Experimente mit dieser Einstellung durchgeführt. Mit den optimierten HPLC-Bedingungen konnten sowohl polare als auch tendenziell unpolare Substanzen detektiert werden, d. h. hydrophile und lipophile Merkaptursäuren und Merkaptursäure-Sulfoxide im Fall der CNL *survey scans* und unbekannte endogene und exogene Metaboliten im *full scan*-Modus. **Abb. 15 A** zeigt das im negativen Ionisationsmodus aufgenommene CNL-Totalionenstromchromatogramm eines Kontrollurins. Eine Vielzahl unbekannter Metaboliten, die alle einen CNL von 129 Da zeigen und daher mögliche Merkaptursäuren und Merkaptursäure-Sulfoxide darstellen, ist erkennbar. Weit mehr Analyten konnten im *full scan*-Modus detektiert werden (**Abb. 15 B**). Bedingt durch Coelution verschiedener Metaboliten lagen die Signale hier vermehrt übereinander oder bildeten Peakcluster.

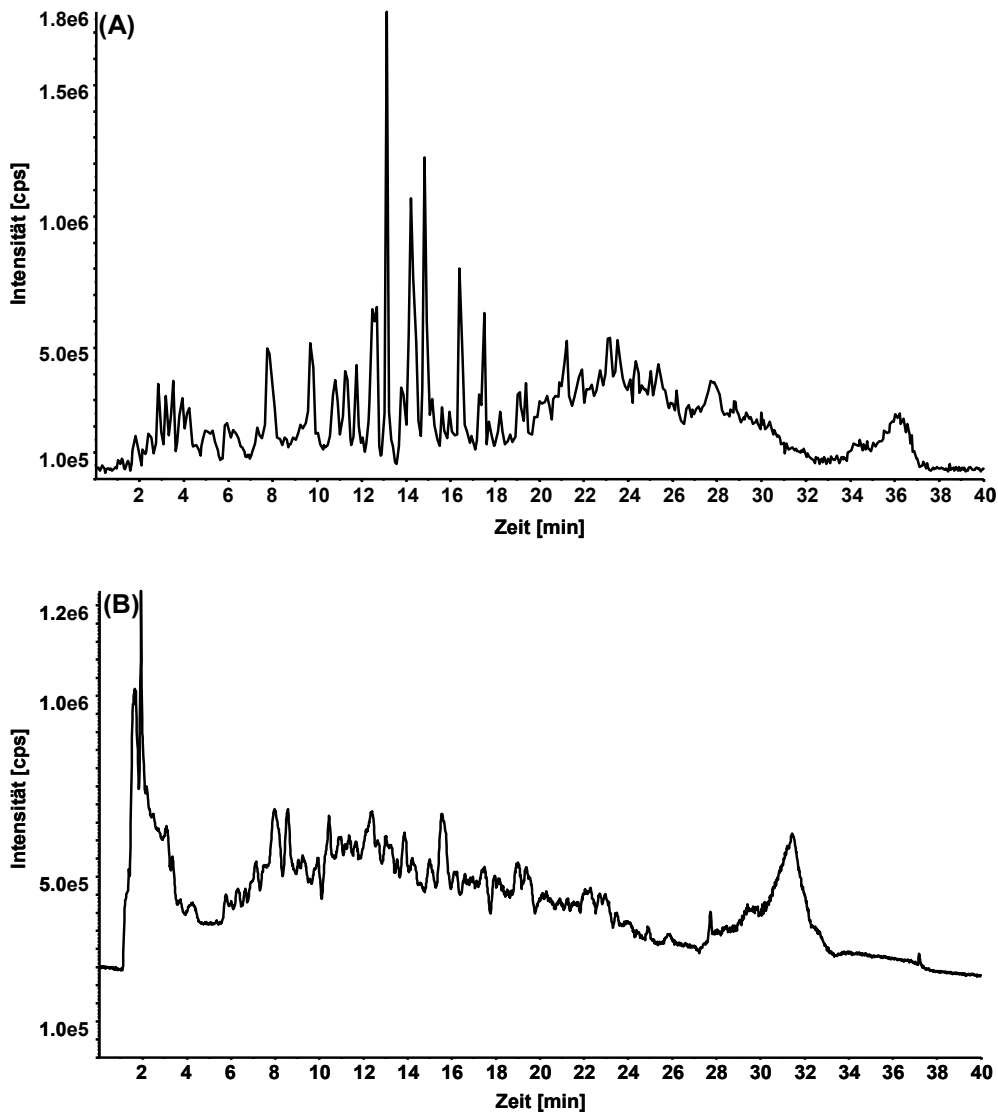


Abb. 15: Totalionenstromchromatogramme eines Kontrollurins (Probandin 4) im Bereich $m/z = 200 - 450$: (A) merkaptursäurespezifischer CNL *survey scan* (CNL 129 Da), aufgenommen mit einer Hybrid Quadrupol gekoppelten linearen Ionenfalle, (B) *full scan*/TOF-Experiment, aufgenommen mit einem Hybrid Quadrupol Flugzeitmassenspektrometer.

3.2 Datendekonstruktion und Datenprozessierung

Die multivariate Datenanalyse (MVDA) stellt ein modernes Hilfsmittel bei der chemometrischen Auswertung großer Datenmengen, wie sie bei der Analyse von Metabolitenprofilen in Urin- oder Plasmamatrix entstehen, dar. Dieses Tool kam daher bei der Prozessierung der chromatographischen Daten aus den beiden Acetaminophen-Studien zum Einsatz. MVDA setzt voraus, dass die chromatographische Information der einzelnen Proben zunächst extrahiert und einem als Alignment bezeichneten, softwaregestützten Prozess unterworfen wird. Die resultierende Datenmatrix ist dreidimensional und beinhaltet die Probenbezeichnung, die Variablen (chromatographische Peaks) und die entsprechenden Peakflächen. Peakdetektion und Alignment der CNL-

und *full scan*-Daten erfolgte mittels *MarkerView* Software. Das Programm basiert auf den Algorithmen des *Metabolomics Export Scripts* und wurde dahingehend weiterentwickelt, dass zahlreiche Schritte der Peakdetektion, der Datenfilter und des Alignments nun auch visuell nachvollziehbar sind. Daher wurden die in der Software zu definierenden Parameter erneut Schritt für Schritt optimiert, bis sich eine bestmögliche Übereinstimmung zwischen chromatographischen Rohdaten und prozessierter Peakliste (Datenmatrix) ergab. Die CNL-Messungen der Hochdosisstudie mit 500 mg Acetaminophen-Exposition dienten als Datensatz für die Optimierung.

Für das Retentionszeitfenster, die Rauschschwelle, die minimale spektrale Peakbreite, die Retentionszeitpeakbreite sowie die Retentionszeittoleranz ergaben sich mit *MarkerView* Software Werte, die mit denen des *Metabolomics Export Scripts* vergleichbar waren. Die Massentoleranz wurde, bedingt durch die unterschiedliche Auflösung der Massenspektrometer, für CNL-Experimente auf 0.4 Da, für *full scan*/TOF-Experimente auf 0.1 Da gesetzt. Da in den nachfolgenden MVDA bei steigender Anzahl an Variablen keine weitere Information hinzu gewonnen werden konnte, wurde die Peakanzahl auf maximal 500 beschränkt. Jedes Datenset wurde fortan mit diesen optimierten Parametern prozessiert. Um inter-individuellen Unterschieden in den Urinvolumina Rechnung zu tragen, wurden die Peakflächen der resultierenden Datenmatrices auf Kreatinin normalisiert. Kreatinin wird relativ konstant über den Tag verteilt mit dem Urin ausgeschieden und kann daher als Bezugsgröße dienen, wenn Urinproben unterschiedlicher Konzentrationen miteinander verglichen werden sollen [227].

3.3 Acetaminophen-Hochdosisstudie (500 mg Exposition)

3.3.1 PCA des CNL- und *full scan*/TOF-Datensatzes

Für die Proben aus der Acetaminophen-Hochdosisstudie wurde mittels PCA der CNL-Datensatz zunächst mit dem *full scan*/TOF-Datensatz verglichen. Die PCA stellt eine sogenannte *unsupervised*-Technik dar, d. h. es fließt keine Information bezüglich der Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Proben in die statistische Auswertung mit ein. Alle Variablen wurden zuvor einem *autoscaling*-Prozess unterworfen. Das Skalieren der Variablen auf Einheitsvarianz hatte zum Ziel, dass alle Variablen, unabhängig von ihrer absoluten Intensität, gleich gewichtet wurden. Da sich die Variablen (Metaboliten) im CNL- und *full scan*-Modus qualitativ und quantitativ unterscheiden, ist auf diese Weise ein objektiver Vergleich der beiden Methoden möglich. **Abb. 16** zeigt die PCA *score plots* der Acetaminophen-Hochdosisstudie (500 mg Exposition). Die Ellipse markiert die *Hotelling's T² (0.95) control chart*, die als multivariates Konfidenzintervall

aufgefasst werden kann [228]. Statistisch gesehen liegt bei $n = 20$ Proben eine Probe (20×0.05) außerhalb dieser Linie und stellt einen starken Ausreißer dar.

Im CNL PCA *score plot* (**Abb. 16 A**) zeichnete sich eine klare Trennung der Kontrollgruppe von der exponierten Gruppe entlang der ersten Hauptkomponente (*principal component 1* – PC1) ab. Die zweite Hauptkomponente (*principal component 2* – PC2) charakterisierte hingegen interindividuelle Unterschiede der Urinmuster. Durch unterschiedliches Urinvolumen bedingte Schwankungen endogener Metaboliten konnten durch Normalisierung aller Peakflächen auf Kreatinin ausgeschlossen werden. PC1 deckte 11.4 %, PC2 9.7 % der totalen Variation ab. Beide Hauptkomponenten waren signifikant. Ein starker Ausreißer, ein Kontrollurin, war erkennbar. Den entsprechenden *full scan* PCA *score plot* zeigt **Abb. 16 B**. Hier führte PC2 zur Klassifizierung der beiden Gruppen und umfasste 13.8 % der totalen Varianz, wohingegen PC1 interindividuelle Unterschiede kennzeichnete. Die Profile der Kontroll- und Dosisgruppe überlappten deutlich. Der große Bereich, den PC1 mit 26.2 % der totalen Varianz abdeckte, ließ sich auf einen der beiden starken Ausreißer zurückführen.

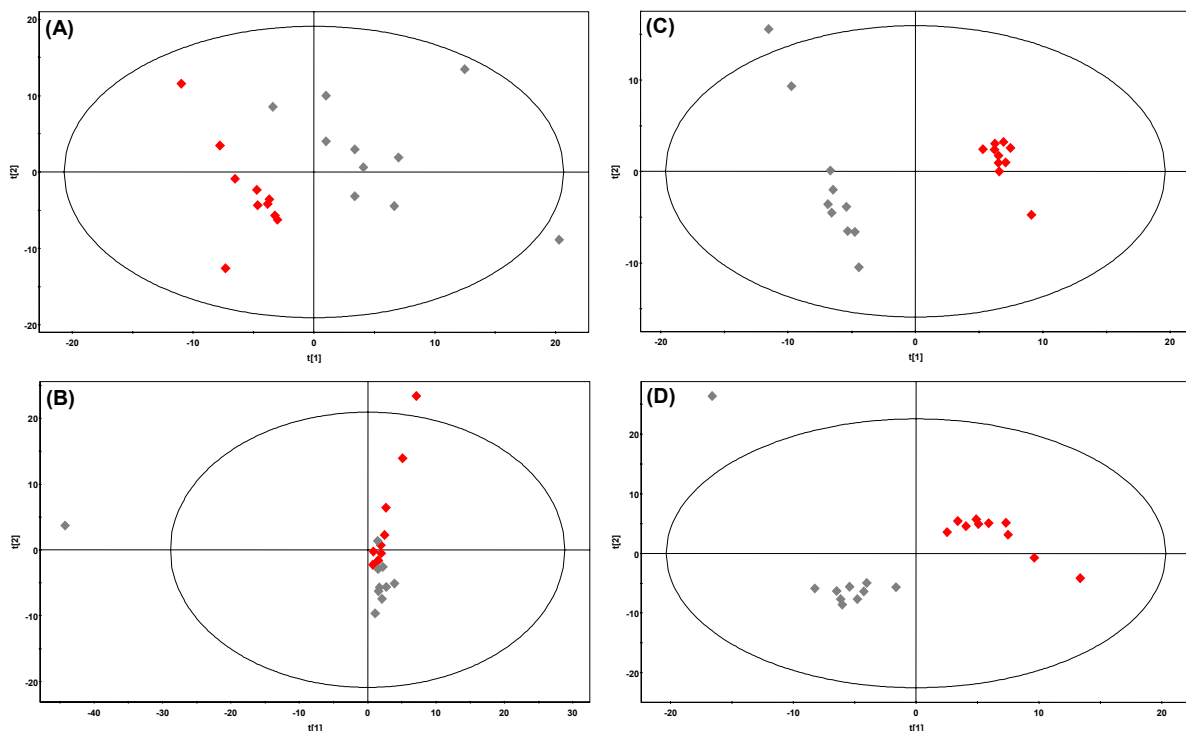


Abb. 16: *Score plots* (PC1 vs. PC2) der 20 auf Kreatinin normalisierten Proben aus der Acetaminophen-Hochdosisstudie (500 mg Acetaminophen) nach *autoscaling*: (A) PCA der CNL-Daten, (B) PCA der *full scan*/TOF-Daten, (C) PLS-DA der CNL-Daten, (D) PLS-DA der *full scan*/TOF-Daten; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe, \blacklozenge exponierte Gruppe.

Die Gegenüberstellung der beiden *score plots* hob klar die Stärken des Merkaptursäurescreenings hervor. Sogar mit dem *unsupervised* PCA Modell konnte die Kontrollgruppe eindeutig, d. h. ohne

Überlappung, von der Dosisgruppe getrennt werden. Obwohl für die CNL- und *full scan*-Daten die diskriminierende Komponente mit 0.114 und 0.138 in der gleichen Größenordnung lag, zeigte der PCA *score plot* der CNL-Daten verglichen mit den *full scan*/TOF-Daten die bessere Klassifizierung und keine Überlappung der beiden Gruppen. Beide Plots identifizierten denselben Kontrollurin als starken Ausreißer. Daher konnte angenommen werden, dass das biochemische Profil dieser Urinprobe und nicht statistische Effekte die Trennung vom Hauptcluster bewirkten.

3.3.2 Gegenüberstellung der Ansätze mittels PLS-DA

Zur weiteren Evaluierung des klassischen und des alternativen Screeningansatzes wurden der CNL- sowie der *full scan*/TOF-Datensatz mit der *partial least squares*-Diskriminanzanalyse (PLS-DA) untersucht. Bei der PLS-DA handelt es sich um ein chemometrisches Verfahren, das die Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Proben berücksichtigt. Um die Vergleichbarkeit der beiden Ansätze sicherzustellen, wurden die in der PCA detektierten Ausreißer zuvor nicht ausgeschlossen. Beide PLS-DA *score plots* zeigten nach *autoscaling* zwei sich nicht überlappende Cluster (**Abb. 16 C und D**) und beinhalteten jeweils einen Ausreißer. Es handelte sich hierbei um dieselbe Probe wie in den PCA Plots.

Im Gegensatz zur PCA stellt bei der PLS-DA die Varianz der **Y**-Matrix ein Qualitätsmerkmal für das generierte Modell dar. R^2Y der ersten Hauptkomponente (diejenige Komponente, die zur Klassifizierung führte) deckt für den CNL Plot 94.5 % der Varianz ab, wohingegen R^2Y für die *full scan*-Daten nur zu 77.2 % Varianzabdeckung in PC1 beitrug. Insgesamt waren im CNL-Modell zwei, im *full scan*-Modell vier Komponenten signifikant. Für das CNL-Modell wurde für PC1 ein Q^2 von 0.644, für das *full scan*-Modell entsprechend ein Wert von 0.582 berechnet.

3.3.3 Selektion potentieller „Biomarker“

Der *loading plot* kennzeichnet diejenigen Variablen, die am stärksten zur Klassifizierung der Proben im *score plot* beitragen und daher potentielle Biomarker darstellen. Je weiter eine Variable hierbei vom Koordinatenursprung entfernt ist, desto größer ist ihr diskriminierender Einfluss im zugrunde liegenden Modell.

Da die Daten in den zuvor beschriebenen Analysen einem *autoscaling*-Prozess unterworfen worden waren, stellte sich die Detektion potentieller Biomarker als schwierig heraus. *Loading plots* derart prozessierter Daten sind in der Regel äußerst unübersichtlich und demzufolge nicht das Mittel der Wahl bei der Identifizierung von Markern [229]. Daher wurde für die CNL-Daten

ein neues PLS-DA Modell erstellt. Alternativ wurden die Variablen mittels *pareto scaling* vorbereitet. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren, das nicht auf Einheitsvarianz ($1/SD$ mit $SD =$ Standardabweichung), sondern auf $1/\sqrt{SD}$ skaliert. Damit stellt *pareto scaling* eine geeignete Technik für massenspektrometrische Daten dar, da sie im Gegensatz zu nicht skalierten Daten in gewissem Maße den Einfluss der absoluten Signalintensität auf das Gewicht einer Variablen kompensiert.

Analog den PLS-DA Modellen nach *autoscaling*, wurde die Dosisgruppe nach *pareto scaling* sowohl für die CNL- als auch für die *full scan*-Daten durch positive PC1 *scores* gekennzeichnet. Variablen, die diese Gruppe charakterisierten, zeigten daher im *loading plot* positive Werte in PC1 und negative oder positive Werte in PC2. Der PLS-DA *loading plot* der CNL-Daten markierte eindeutig die Variablen $m/z = 311.2, 312.2, 313.1$ und 327.1 als potentielle Biomarker (**Abb. 17 A**). Die Variablen entlang $w \cdot c_2$ waren für inter-individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden verantwortlich. Variablen, die dicht um den Ursprung streuten, lieferten hinsichtlich der Diskriminierung von Kontroll- und Dosisgruppe keinen Beitrag. Die Level dieser Variablen waren in beiden Gruppen ungefähr gleich.

Der *loading plot* der *full scan*-Daten erwies sich als relativ komplex. Obwohl die Peakflächen wie bei den CNL-Daten auf Kreatinin normalisiert und *pareto*-skaliert wurden, streuten die Variablen über den ganzen Plot (**Abb. 17 B**). Zudem zeigten sich *tailing*-Effekte, die durch die Korrelation verschiedener Variablen, wahrscheinlich durch eine Adduktbildung mit Gegenionen bzw. Fragmentierungen in der Ionenquelle, bedingt waren. Aufgrund der Komplexität des *loading plots* konnte die AAP-MA nicht eindeutig als Marker identifiziert werden. Eine Vielzahl an Metaboliten hatte einen stärkeren Einfluss auf das Modell und war entsprechend weiter vom Koordinatenursprung lokalisiert als die gesuchte Merkaptursäure. Folglich würde mit dem *full scan*/TOF-Ansatz das Signal der AAP-MA wahrscheinlich übersehen werden und der Mechanismus, der der potentiell toxischen Wirkung von Acetaminophen zugrunde liegt, unerkant bleiben.

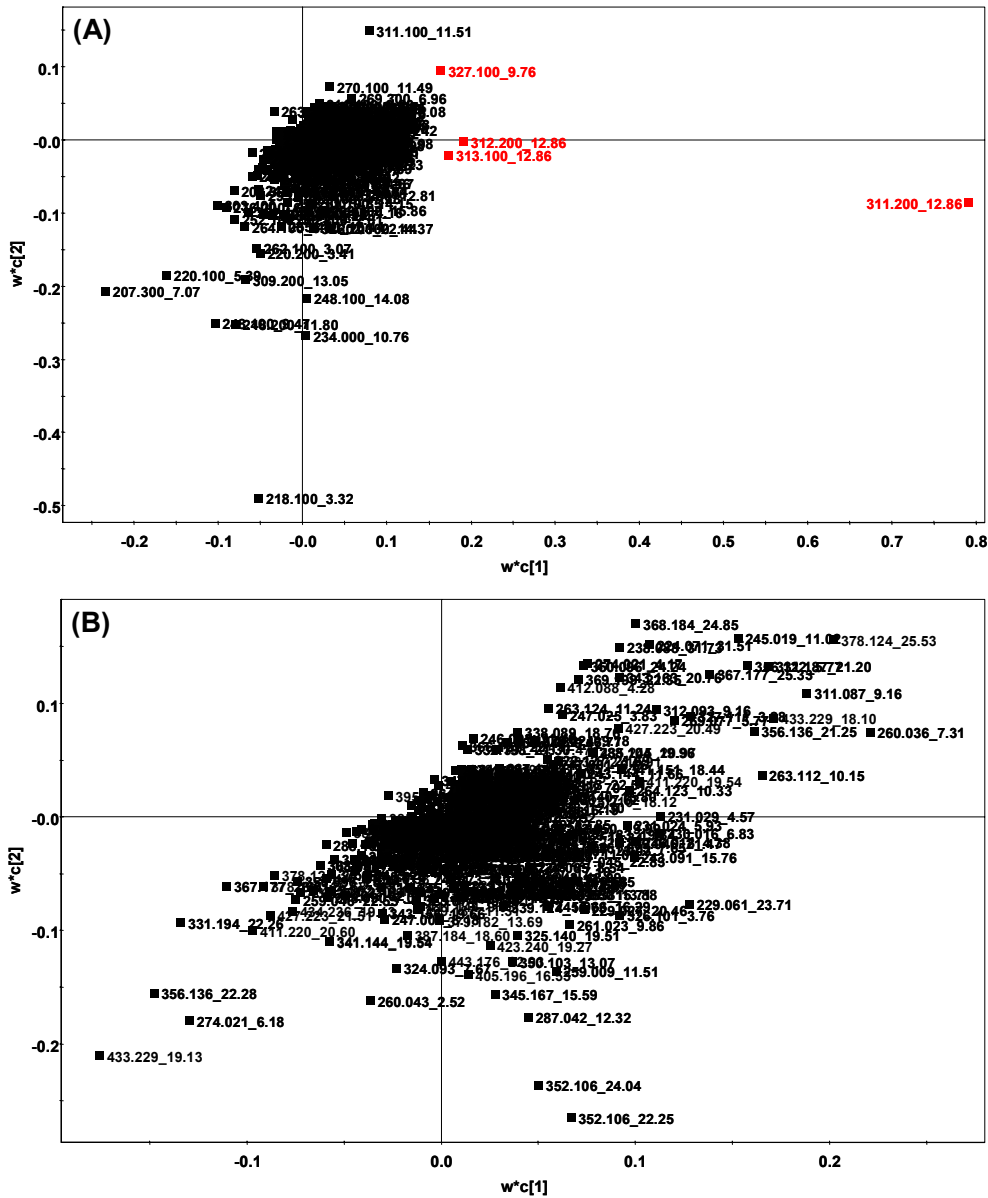


Abb. 17: PLS-DA *weight plots* (w^*c1 vs. w^*c2) der 20 auf Kreatinin normalisierten Proben aus der Acetaminophen-Hochdosisstudie (Exposition mit 500 mg Acetaminophen) nach *pareto scaling*: (A) CNL-Daten, Marker für die exponierte Gruppe sind rot hervorgehoben; (B) *full scan*/TOF-Daten.

3.3.4 Time series plots der potentiellen Marker

Die *loading plots* der PCA und PLS-DA Modelle identifizierte Variablen (z. B. $m/z = 311.2$ und 327.1), die sich für die Klassifizierung der Kontroll- und Dosisgruppe in den entsprechenden *score plots* als charakteristisch erwiesen. *Time series plots* bieten darüber hinaus die Möglichkeit, Zeit- oder Dosisabhängigkeiten der Variablen graphisch darzustellen und dadurch die Plausibilität einer Variablen als Biomarker zu testen. Die „Stufe“ in **Abb. 18 A** und **B** (CNL-Daten) verdeutlichte, dass die AAP-MA ($311.2_{12.86}$) bzw. das AAP-MA-Sulfoxid ($327.1_{9.76}$) nur in der

exponierten Gruppe detektiert wurde. Die Fluktuation der Linie kennzeichnete inter-individuelle Unterschiede des Acetaminophen-Metabolismus.

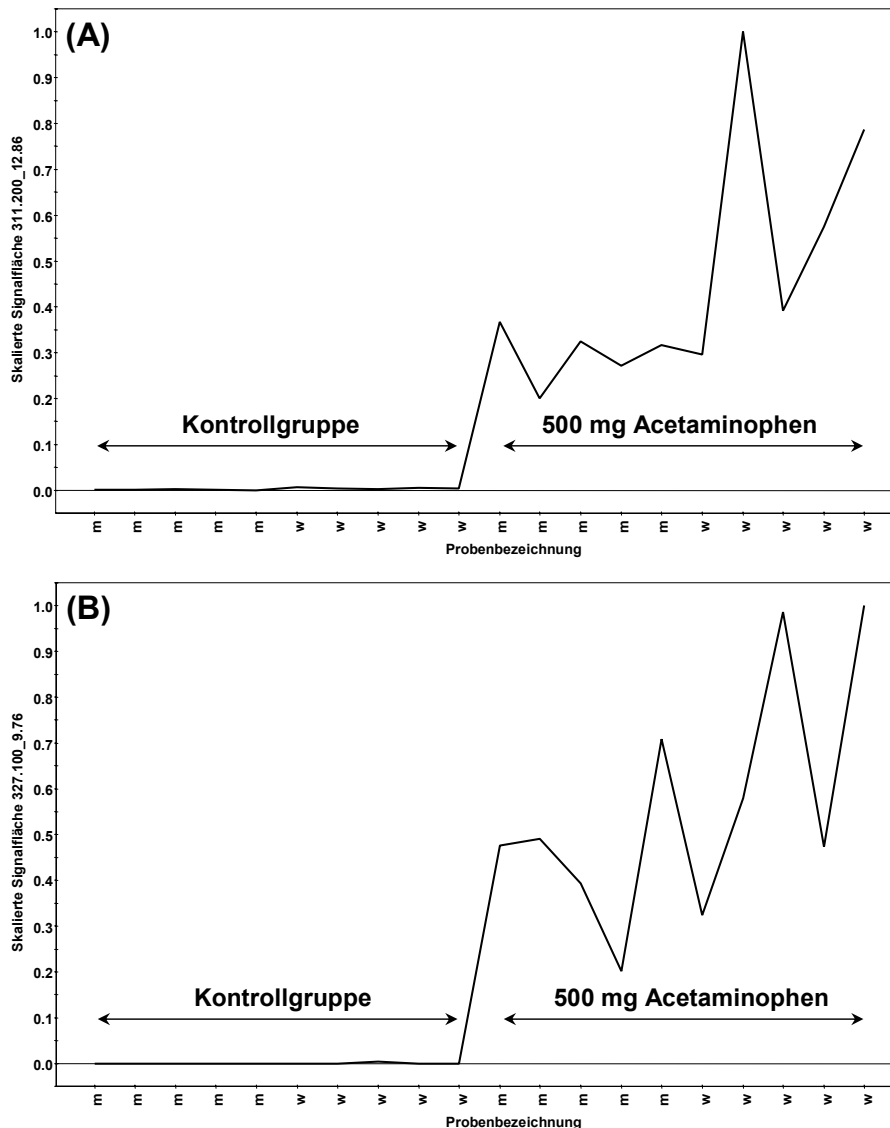


Abb. 18: *Time series plots* (y-Achse skaliert) der 20 Proben aus der Acetaminophen-Hochdosisstudie (Exposition mit 500 mg Acetaminophen): (A) Acetaminophen-Merkaptursäure (311.2_12.86), (B) Acetaminophen-Merkaptursäure-Sulfoxid (327.1_9.76); Schlüssel: m, männlicher Proband; w, weiblicher Proband.

Bei genauerer Betrachtung zeichnete sich eine gewisse Tendenz bezüglich eines geschlechtspezifischen Unterschieds bei der Metabolisierung und Ausscheidung von AAP-MA ab. So wiesen drei der fünf weiblichen Probanden deutlich höhere AAP-MA Konzentrationen im Urin auf als die fünf männlichen Probanden. Allerdings konnte dieser Trend für das AAP-MA-Sulfoxid nicht beobachtet werden.

3.3.5 Identifizierung der selektierten Marker

Das $[M - H]^-$ -Ion mit $m/z = 311.2$ und einer Retentionszeit von 12.9 min korrespondierte mit der erwarteten Merkaptursäure des Elektrophils *N*-Acetyl-*p*-Benzochinonimin, dem reaktiven Metaboliten von Acetaminophen. Bei den Signalen $m/z = 312.2$ und 313.1 handelte es sich um Isotope der Acetaminophen-Merkaptursäure (AAP-MA), wie durch Vergleich der EPIs mit einem authentischen Standard bestätigt werden konnte. Der potentielle Marker mit $m/z = 327.1$ zeigte ein der AAP-MA ähnliches EPI-Spektrum. Die Massendifferenz zwischen den beiden Signalen betrug 16 Da und deutete auf ein zusätzliches Sauerstoffatom hin. Der Metabolit wurde anhand eines authentischen Standards als Acetaminophen-Merkaptursäure-Sulfoxid identifiziert. Die Formeln der beiden identifizierten „Biomarker“ sind in **Abb. 19** dargestellt.

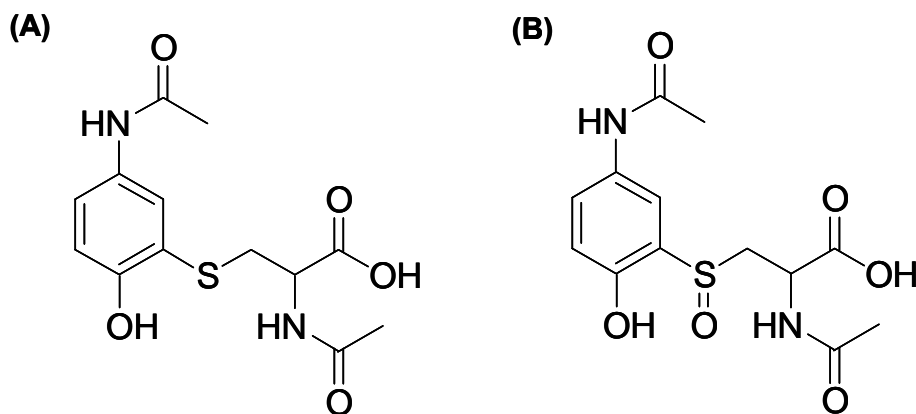


Abb. 19: Formeln der identifizierten „Biomarker“ (m/z _RT): (A) Acetaminophen-Merkaptursäure (311.2_12.86), (B) Acetaminophen-Merkaptursäure-Sulfoxid (327.1_9.76).

3.4 Acetaminophen-Niedrigdosisstudie (50 mg Exposition) als *proof-of-concept*

3.4.1 PLS-DA des CNL-Datensatzes

Zur weiteren Evaluierung des Merkaptursäurescreenings, wurde eine zweite Expositionsstudie (Niedrigdosisstudie) durchgeführt. Verglichen mit der ersten Studie (Hochdosisstudie) wurde die Acetaminophendosis um den Faktor 10 reduziert, so dass die 25 Studienteilnehmer (10 männliche und 15 weibliche) nur noch 50 mg des Arzneistoffs (entsprechend einem Zehntel der therapeutischen Dosis) einnahmen. Um die Sensitivität der Methode zu testen, wurde der Urin vor der Messung nicht aufkonzentriert sowie das Injektionsvolumen um den Faktor 4 reduziert. **Abb. 20 A** zeigt den PLS-DA *score plot* (CNL-Methode) nach *pareto scaling*. Die Ausreißer einer zuvor durchgeführten PCA wurden nicht ausgeschlossen, da die Robustheit des PLS-DA Modells getestet werden sollte.

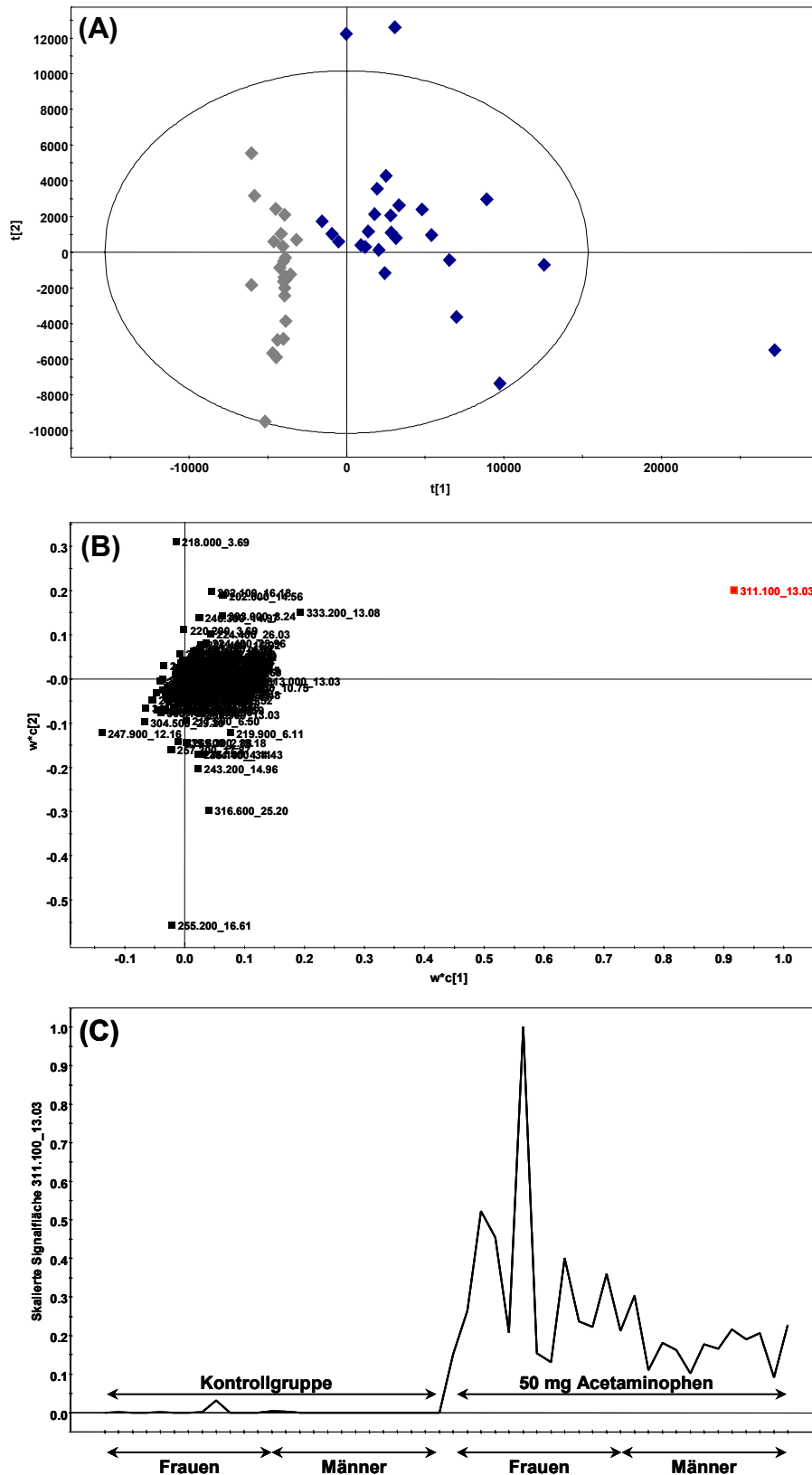


Abb. 20: (A) PLS-DA *score plot* (PC1 vs. PC2) der 25 *pre-* und 25 *postdose*-Proben aus der Acetaminophen-Niedrigdosisstudie (50 mg Acetaminophen) nach *pareto scaling*, (B) PLS-DA *weight plot* ($w*c1$ vs. $w*c2$), der Marker für die Dosisgruppe (Acetaminophen-Merkaptursäure 311.100_13.03) ist rot markiert, (C) *time series plot* (y-Achse skaliert) der Variablen 311.100_13.03; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe, \blacklozenge exponierte Gruppe.

PC1 ($R^2X = 0.178$) trennte die beiden Cluster ohne Überlappung. Die zweite Hauptkomponente war nicht signifikant, wurde aber zur besseren Veranschaulichung in das Modell mit aufgenommen. R^2Y_{PC1} und Q^2_{PC1} deckten jeweils 52.9 % und 26.5 % der Gesamtvarianz ab. Wie in der PCA der Hochdosisstudie streuten die Proben der Dosisgruppe auch hier weiter als die Proben der Kontrollgruppe. Dem zugehörigen *loading plot* (**Abb. 20 B**) konnte die AAP-MA eindeutig als potentieller Marker entnommen werden. Das AAP-MA-Sulfoxid wurde nur in ungefähr der Hälfte der Proben detektiert, wobei die Signale zum Teil Intensitäten an der Nachweisgrenze aufwiesen. Die entsprechende Variable war demzufolge nicht in der Peripherie des *loadings plots* lokalisiert und stellte keinen potentiellen Marker für das Niedrigdosismodell dar. Wie die Proben der Hochdosisstudie zeigten auch die Proben der Niedrigdosisstudie im *time series plot* (**Abb. 20 C**) die charakteristische Treppenform für die Variable der AAP-MA. Darüber hinaus zeichnete sich erneut ein geschlechtsspezifischer Trend ab. So wiesen die Urinproben der weiblichen Probanden, verglichen mit den männlichen Probanden, deutlich höhere Gehalte an AAP-MA auf.

3.4.2 Validierung des PLS-DA Niedrigdosismodells

Da bei PLS-DA Modellen generell die Gefahr des *overfitting* besteht [230], wurde neben der standardmäßig in *SIMCA-P* durchgeführten Cross-Validierung (Berechnung von Q^2) mit der *validate model*-Funktion das Interzept der Parameter R^2 und Q^2 untersucht. Dieses ist ein Maß für die statistische Signifikanz des prädiktiven Potentials eines Modells. Für den Faktor R^2 sollte der Wert kleiner als 0.4, für Q^2 kleiner als 0.05 sein [162, 231]. Die PLS-DA der Acetaminophen-Niedrigdosisstudie lieferte für 200 Permutationen für R^2 und Q^2 ein Interzept von 0.396 bzw. -0.159. Die Werte deuteten nicht auf ein *overfitting* des PLS-DA Modells hin. Dennoch wurde das Modell zusätzlich durch ein manuelles Verfahren validiert. Hierzu wurde zufällig ein Drittel der Daten ausgewählt und von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Testset, $n = 16$). Mit den verbleibenden zwei Dritteln der Daten (Trainingsset, $n = 34$) wurde ein *pareto*-skaliertes PLS-DA Modell erstellt. Die Prädiktion des Testsets erfolgte sodann auf der Grundlage des Trainingssets. Die Gruppenzugehörigkeit wurde graphisch in einem *scatter plot* (Probenbezeichnung vs. berechneter Y -Wert) bestimmt. Hierzu wurde ein *cut-off* von 0 und ein Skalierungsfaktor von 1 definiert. Jedem Modell wurden drei Komponenten zugrunde gelegt. Eine Probe aus dem Testset wurde demnach als „Kontrolle“ oder Klasse 1 definiert, wenn ihr berechneter Y -Wert zwischen -1 und 0 lag und als „exponiert“ oder Klasse 2 bei einem Y -Wert zwischen 0 und 1 (**Abb. 21**). Vereinzelt können Proben außerhalb dieser Limits liegen. Entscheidend für die Klassenzu-

ordnung ist dann das Vorzeichen des berechneten Y -Wertes (negativ = Kontrollgruppe, positiv = Dosisgruppe). Auf diese Weise wurden nacheinander fünf unabhängige Trainings- und Testsets generiert. Die Gruppenzugehörigkeit des Testsets wurde jeweils auf der Grundlage des entsprechenden Trainingssets berechnet.

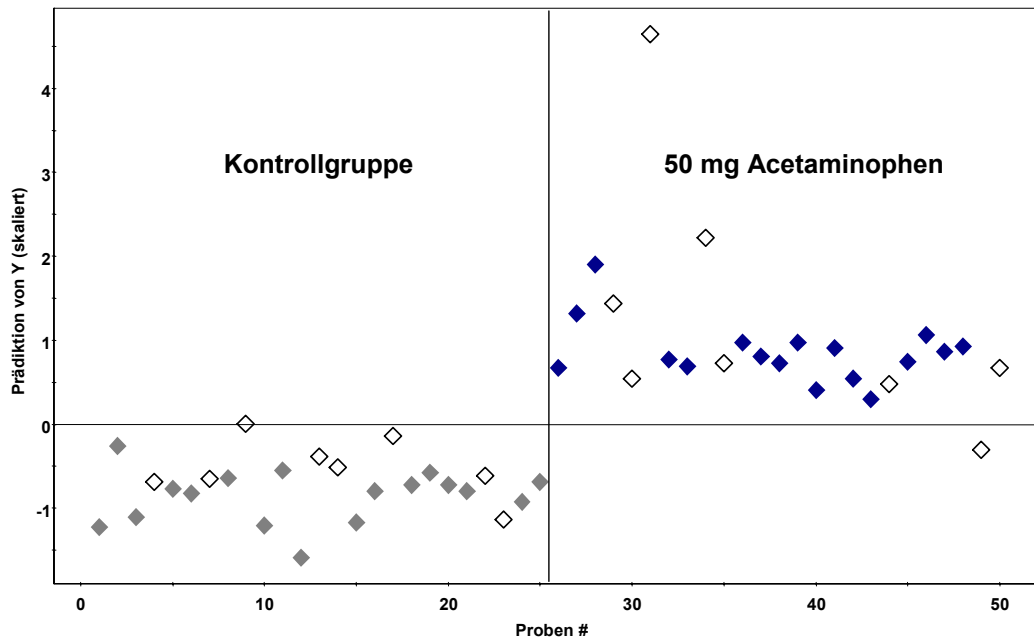


Abb. 21: *Scatter plot* (Probennummer vs. Prädiktion von Y) zur Identifizierung der Gruppenzugehörigkeit von Trainings- und Testsetproben (Validierungsset mit $n = 34$ bzw. $n = 16$, PLS-DA Modell #3). Aus dem *cut-off* von 0 und dem Skalierungsfaktor von 1 resultiert die Zuordnung zu Klasse 1 (Kontrollgruppe) für $Y < 0$ und entsprechend zu Klasse 2 (50 mg Acetaminophen Exposition) für $Y > 0$. Für dieses Modell ergab sich eine Prädiktionsrate von 93.8 % (15 von 16 korrekte Testset Klassifizierungen) mit insgesamt 98.0 % korrekten Klassifizierungen (49 von 50 korrekte Zuordnungen zu Kontroll- und Dosisgruppe); Schlüssel: \blacklozenge Trainingsset Kontrollgruppe, \diamond Testset Kontrollgruppe, \blacklozenge Trainingsset 50 mg Acetaminophen-Exposition, \diamond Testset 50 mg Acetaminophen-Exposition.

Die fünf generierten PLS-DA Modelle zeigten Prädiktionsraten (korrekte Klassifizierung der Testsetproben \pm SD) von 75.0 – 100 % (0.91 ± 0.11). Wurde für jedes der fünf PLS-DA Modelle die Gesamtheit aller Proben betrachtet, so ergaben sich 92.0 – 100 % (0.97 ± 0.03) korrekte Klassifizierungen, d. h. korrekte Zuordnungen zur Kontroll- bzw. Dosisgruppe. Zur weiteren Evaluierung wurden die Test- und Trainingssets jeweils vertauscht (Cross-Validierung). Analog konnten so Prädiktionsraten von 82.4 – 91.2 % (0.87 ± 0.05) und eine korrekte Klassifizierung aller Proben von 88.0 – 94.0 % (0.91 ± 0.03) ermittelt werden.

3.4.3 Anwendung des *orthogonal signal correction*-Datenfilters

Orthogonal signal correction (OSC) stellt eine chemometrische Technik zur Datenfiltration dar und eignet sich besonders für Datensätze, wie sie in Metabonomics-, *metabolite profiling*- und *metabolic fingerprinting*-Ansätzen generiert werden. OSC filtert orthogonale und damit unkorrelierte Information aus der **X**-Matrix der ursprünglichen PCA bzw. PLS-DA Modelle. Variabilität, die auf allgemeine Störfaktoren (Confounder) wie Geschlecht, Alter, Körpergewicht, genetische Defekte, Gesundheitszustand, Lebenswandel, Umweltfaktoren usw. zurückgeht und die unabhängig von der Klassifizierung (Kontrolle vs. exponierte Gruppe) im *score plot* ist, bleibt dann bei der Erstellung des jeweiligen Modells unberücksichtigt. Aus der Entfernung irrelevanter Varianz, die für die Diskriminierung nicht von Belang ist, resultiert im Allgemeinen eine bessere Trennung der Gruppen in den *score plots*, folglich steigt die Aussicht auf die Identifizierung potentieller Biomarker. OSC hat einen interessanten Nebeneffekt. Der Filter unterteilt den Datensatz in zwei Subsets: die filtrierte **X**-Matrix und die orthogonale, unkorrelierte Information, die anschließend jeweils separat analysiert werden können. Anhand der orthogonalen Datenmatrix wurde der weitere Informationsgehalt der Urinprofile untersucht. Hierzu wurden aus der **X**-Matrix zwei orthogonale Komponenten (Winkel 89.99° und 90.00°) entfernt. Die verbleibenden Quadratsummen (*sum of squares*) betragen 79.4 % und 67.9 %, d. h. 20.6 % (oPC1) und 11.5 % (oPC2) der gesamten Varianz entfielen auf Hintergrundinformation. Tatsächlich verbesserte sich die Klassifizierung der Proben aus der Niedrigdosisstudie nach OSC im *pareto*-skalierten PLS-DA *score plot* erheblich (**Abb. 22 A**). Dies spiegelte sich auch in den Kennzahlen R^2Y und Q^2 für die erste Hauptkomponente wider, die mit OSC im Vergleich zum ursprünglichen Modell von jeweils 52.9 % auf 89.8 % und von 26.5 % auf 64.7 % stiegen. In einem Plot der ersten gegen die zweite orthogonale Komponente (oPC1 vs. oPC2), konnte man darüber hinaus entlang oPC2 eine Trennung der Proben aufgrund des Geschlechts (**Abb. 22 B**) beobachten. Trotz einer gewissen Überlappung der beiden Gruppen im *score plot* zeichnete sich dennoch ein deutlicher Trend ab.

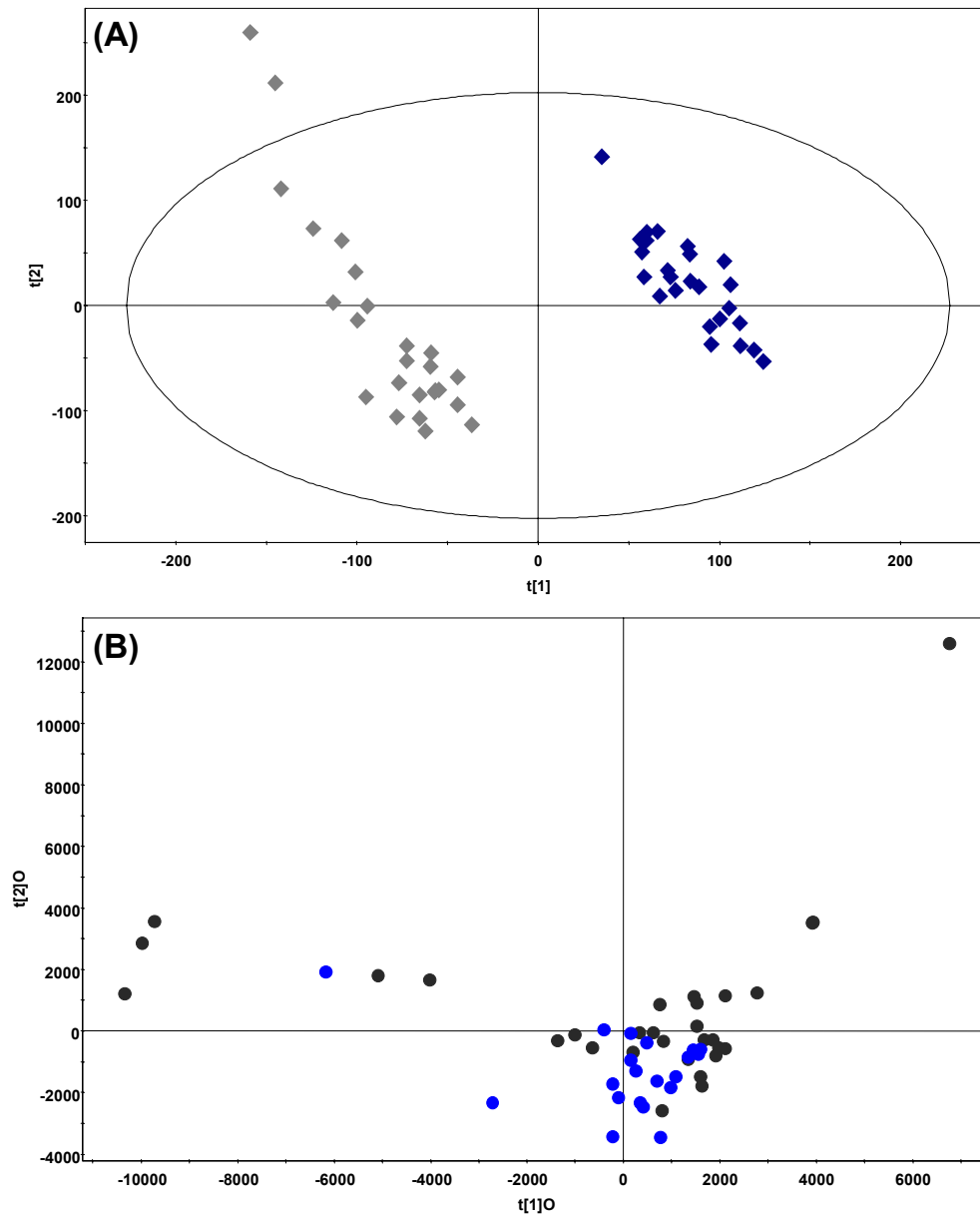


Abb. 22: (A) PLS-DA *score plot* (PC1 vs. PC2 bzw. $t[1]_O$ vs. $t[2]_O$) der 50 Proben aus der Acetaminophen-Niedrigdosisstudie (Exposition mit 50 mg Acetaminophen) nach *orthogonal signal correction* und *pareto scaling*, (B) *score plot* der aus der X -Matrix via OSC gefilterten und mit der Klassifizierung (Kontroll-/Dosisgruppe) unkorrelierten, orthogonalen Komponenten (oPC1 vs. oPC2) nach *pareto scaling*; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe, \blacklozenge 50 mg Acetaminophen-Exposition, \bullet Frauen, \bullet Männer.

4 Diskussion

Die Übertragung des Metabonomicskonzepts auf den Menschen stellt aufgrund großer interindividueller Variabilität und vergleichbar niedriger Metabolitenkonzentrationen eine Herausforderung dar und erfordert neue Strategien im Hinblick auf das Screening biologischer Proben und die anschließende multivariate Datenanalyse. Urin ist ein komplexes Gemisch aus endogenen

und exogenen Metaboliten. Daher ist es unmöglich, für alle Analyten mittels HPLC eine adäquate Basislinientrennung zu erzielen, d. h. Peaks können übereinander liegen oder clustern, ein Effekt, der hauptsächlich in *full scan*-Spektren auftritt. Das Problem der Trennleistung bei *full scan*/TOF-Ansätzen versuchte man beispielsweise durch den Einsatz neuer Säulenmaterialien bzw. Chromatographietechniken wie der *hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) zu kompensieren [232, 233]. Denn obwohl die Mehrzahl der mit dem Urin ausgeschiedenen Metaboliten polare bis hochpolare Eigenschaften aufweist, erfolgt das analytische Screening meist mit *reversed phase*-Säulen und geht folglich mit einem Verlust der polaren Metabolitenfraktion einher. Multiple Analysen mit verschiedenen Säulen stehen zwar einem hohen Probendurchsatz entgegen, liefern dafür aber einen realistischen metabolischen Fingerabdruck, wie in der Arbeit zu myokardialer Ischämie von SABATINE *ET AL.* gezeigt werden konnte. Die Analytik basierte auf drei komplementären chromatographischen Systemen, einer Phenyl-Hexyl-Säule für Aminosäuren und Amine, einer Amino-Säule für Zucker und Ribonucleotide sowie einer polaren *reversed phase*-Säule für organische Säuren [103]. Darüber hinaus konnte durch *ultra performance liquid chromatography* (UPLC), d. h. dem Einsatz von 1.7 µm-Säulenmaterial verbunden mit hohen Drücken, die chromatographische Trennung von Metaboliten wesentlich verbessert werden [234]. Coelution hat vermehrte Ionensuppression zur Folge, die sich wiederum auf die Empfindlichkeit, mit der ein Signal detektiert werden kann, auswirkt. Indem man sich mit Techniken wie dem CNL-Scan auf eine Substanzklasse wie die Mercaptursäuren fokussiert, kann dieser Effekt minimiert werden. Für das Mercaptursäurescreening konnten aufgrund der gemeinsamen *N*-Acetyl-L-Cystein-Einheit und den daraus resultierenden ähnlichen chemischen Eigenschaften, die chromatographischen und massenspektrometrischen Parameter optimiert werden. Dies ist bei *full scan*-Ansätzen nicht möglich, da die analysierten Metaboliten sich chemisch zu inhomogen verhalten. Es müssen daher Kompromisse bezüglich Empfindlichkeit und chromatographischer Trennleistung gemacht werden. In Übereinstimmung damit resultierte aus der PCA der Proben aus der Hochdosisstudie für den *full scan*/TOF-Ansatz verglichen mit der mercaptursäurespezifischen CNL-Methode eine deutlich schlechtere Diskriminierung von Kontroll- und Dosisgruppe.

Die Identifizierung von substanzbezogenen Metaboliten gelingt am besten anhand von *pareto*-skalierten *weight plots* [235]. Aber nur für die CNL-Methode konnte die Acetaminophen-Mercaptursäure (AAP-MA) eindeutig als „Biomarker“ aus dem PLS-DA *weight plot* extrahiert werden. Darüber hinaus demonstrierte die Identifizierung des Acetaminophen-Mercaptursäure-Sulfoxids (AAP-MA-SO) die Leistungsfähigkeit des gewählten Metabonomicsansatzes. Dies ist insofern hervorzuheben, als das Sulfoxid der AAP-MA erst kürzlich als Acetaminophen-

Metabolit in der Literatur beschrieben wurde [121]. Eine Metabonomicsstudie an Mäusen, die auf die Identifizierung neuer, mit Acetaminophen-Toxizität assoziierter Marker abzielte, konnte mit einer UPLC *full scan*/TOF-Methode zwar die Acetaminophen-Merkaptursäure identifizieren, nicht aber das entsprechende Merkaptursäure-Sulfoxid. Dabei lag die verabreichte Acetaminophendosis mit 400 mg/kg Körpergewicht (KG) sogar deutlich höher als in der durchgeführten Humanstudie mit einer ca. 5 – 10 mg/kg KG entsprechenden Dosis von 500 mg/Person [235]. Es ist allerdings ebenfalls denkbar, dass die Metabolisierung der Acetaminophen-Merkaptursäure zum Sulfoxid bei Mäusen nicht stattfindet.

Des Weiteren konnten die mit der merkaptursäurespezifischen CNL-Methode analysierten Proben der Niedrigdosisstudie trotz der geringen Dosis von 50 mg Acetaminophen/Person (ca. 0.5 – 1 mg/kg KG) im *score plot* des PLS-DA Modells ohne Überlappung getrennt werden. Der entsprechende *weight plot* identifizierte ebenfalls eindeutig die AAP-MA als Marker für die exponierte Gruppe. Dieses *proof-of-concept* ist insofern wichtig, als PLS-DA Modelle durch ihren *supervised*-Charakter leicht zu einem *overfitting* neigen. WESTERHUIS *ET AL.* gingen sogar soweit und behaupteten, dass es nahezu mit jedem beliebigen Metabonomicsdatensatz gelingen mag, via PLS-DA zwei zufällig ausgewählte Gruppen zu diskriminieren [236]. Vor diesem Hintergrund ist es umso wichtiger, PLS-DA Modelle einer sorgfältigen Evaluierung zu unterziehen. Die Validierung und Cross-Validierung erfolgte jeweils anhand von fünf unabhängigen Trainings- und Testsets. Die erzielten Prädiktionsraten (korrekte Zuordnung des Testsets) von 0.91 ± 0.11 bzw. 0.87 ± 0.05 untermauerten die hohe Sensitivität und Robustheit des PLS-DA Niedrigdosismodells und insbesondere der zugrunde liegenden CNL-Screeninganalytik.

Der *time series plot* der AAP-MA-Variablen lieferte darüber hinaus sowohl für die Hochdosis- als auch für die Niedrigdosisstudie einen Hinweis auf einen geschlechtsspezifischen Metabolismus von Acetaminophen. Dieser Effekt ist aus der Literatur bekannt und beruht wahrscheinlich auf einer vom Geschlecht abhängigen Verschiebung der Konjugations- und Oxidationsreaktionen [237]. Des Weiteren wurde ein Einfluss von oralen Kontrazeptiva auf den Acetaminophen-Metabolismus beschrieben [237].

Orthogonal signal correction ist ein Verfahren, mit dem Information, die nicht mit dem untersuchten Effekt korreliert ist (Tageszeiteinflüsse, analytische Verschiebungen, physiologische und inter-individuelle Variation), aus der **X**-Matrix gefiltert werden kann. Ziel ist es, die zugrunde liegenden Modelle hinsichtlich des untersuchten Effekts zu optimieren, um so die Aussichten auf die Identifizierung charakteristischer Marker zu erhöhen. In separaten Plots kann die herausgefilterte Hintergrundinformation sodann untersucht werden. Unabhängig von der AAP-Exposition konnte in einem OSC-gefilterten Modell der Einfluss des Geschlechts auf das

Metabolitenprofil gezeigt werden. Für klassische NMR- und *full scan*/TOF-Metabonomics-ansätze wurde diese Klassifizierung bereits beschrieben [177, 216, 238]. Die Screeningtechniken basierten auf der Erfassung aller im Urin bzw. Plasma detektierbaren Verbindungen, also vorwiegend Zuckern, organischen Säuren, Aminosäuren, Kreatin/Kreatinin und Lipiden. Eine Publikation stützte die Vorhersage des Geschlechts ferner auf die metabolische Glucuronid-signatur der Probanden [188]. Eine geschlechtsspezifische Klassifizierung von Urinproben auf der Grundlage von Merkaptursäureprofilen ist der Literatur bisher nicht bekannt und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. Eine Interpretation und Validierung des Modells hinsichtlich potentieller Marker erschien allerdings nicht sinnvoll, da es sich nicht um ein primäres (PCA bzw. PLS-DA), sondern um ein sekundäres Modell „Männer vs. Frauen“ handelte, das durch „OSC-Manipulation“ des Niedrigdosismodells erstellt wurde. Hinzu kam die Überlappung der beiden Gruppen im *score plot*, der aber dennoch eine deutliche Tendenz erkennen ließ. Da die geschlechtsspezifischen Unterschiede als durchaus komplex erachtet wurden, wurde dieser Confounder nachfolgend in einer extra dafür angelegten Studie untersucht.

PROJEKT 3: Integrativer Metabonomicsansatz zur Evaluierung von Confoundern

1 Einleitung

Humane Metabonomicsstudien erweisen sich aufgrund der großen Variabilität und Flexibilität des menschlichen Organismus sowohl in der Durchführung als auch in der Interpretation als äußerst komplex. Confounder wie Geschlecht, Alter, Hormonhaushalt, Tageszeit, Gesundheitsstatus, Lebenswandel, Diät etc. erschweren im Vergleich zu Tierstudien die Definition von „Kontrollgruppen“ sowie die Charakterisierung von „normalen“ bzw. „abnormalen“ metabolischen Profilen [56, 238, 239]. Allerdings kann das Ziel des humanen Metabonomics – die Detektion von Risikofaktoren und damit die frühe Vorhersage von Krankheiten ebenso wie eine personalisierte Ernährung und Medizin – erst erreicht werden, wenn die Grenzen normaler biologischer Variation definiert sind [240]. Denn erst wenn feststeht, welchen Schwankungen ein „normales“ biologisches Metabolitenprofil unterliegt, kann dazu übergegangen werden, nach individuellen Suszeptibilitätsfaktoren zu suchen. Erschwerend kommt hinzu, dass anders als in Tierstudien, Probanden in Humanstudien in der Regel nicht als ihre eigene Kontrolle dienen können. Daher sind generell größere Gruppen erforderlich [42]. Kürzlich wurde gezeigt, dass das Verhältnis aus Beobachtungen (Studienteilnehmer) zu Variablen (Metaboliten) einen entscheidenden Faktor bei der Validierung der multivariaten Modelle darstellt, und dass die Fehlerquote für die Prädiktion von unabhängigen Testsetproben in gleichem Maße steigt, wie die Anzahl Beobachtungen im zugrunde liegenden PLS-DA Modell sinkt [230].

Im Gegensatz zu Plasma, das unter normalen physiologischen Bedingungen wenig Variabilität aufweist, erfordert der Vergleich von Spontanurinen einen Normalisierungsschritt, da Verdünnungsfaktoren durchaus in der Größenordnung von 10 – 50, in Einzelfällen sogar darüber liegen können [58]. Eine Standardmethode für ¹H-NMR-Ansätze ist die Normalisierung der einzelnen ppm-Fenster auf die Gesamtsumme aller Signale im Spektrum [40, 52]. Neben dem gänzlichen Verzicht auf eine Normalisierung wird diese Strategie zunehmend auch für LC-MS-Datensätze verfolgt [232, 241], ist aber mit einer Reihe von Problemen verbunden. So versagt diese Normalisierungstechnik häufig bei Anwesenheit von prominenten Metabolitensignalen, die auf die verabreichte Ausgangssubstanz zurückzuführen sind [242]. In konventionellen quantitativen Applikationen ist die Normalisierung auf Kreatinin bzw. Gesamturinvolumen gängige Praxis. Für Metabonomicsansätze ist sie dagegen nicht etabliert und wurde nur vereinzelt beschrieben [188]. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von Urin gestaltet sich das Metabolitenscreening mitunter als schwierig. Für die im Vergleich zu NMR-Analysen schlechtere Reproduzierbarkeit

von LC-MS-Applikationen sind in der Hauptsache Matrixeffekte verantwortlich, die zu Ionensuppression führen. Dies gilt insbesondere für *full scan*-Methoden in Kombination mit der Elektrosprayionisierung. Um dem Problem der Matrixeffekte Rechnung zu tragen, können Metaboliten zum einen extrahiert [104, 107] oder es kann alternativ auf neue Säulenmaterialien bzw. Chromatographietechniken wie die *hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) [232, 233] oder die *ultra performance liquid chromatography* (UPLC) [241] zurückgegriffen werden. Für das Screening der Urinproben der vorliegenden Studie wurde eine alternative Strategie verfolgt. Diese bestand aus einer *on-line*-Festphasenextraktion der Mercaptursäuren unter Verwendung einer Säulenschaltung. Da Analyten zugleich angereichert und Matrixbestandteile abgetrennt werden, resultiert eine verminderte Ionensuppression, die wiederum zu höheren Signal-zu-Rausch-Verhältnissen und folglich zu einer größeren Anzahl an Signalen pro Probe führt. Da die Probenaufarbeitung *on-line* erfolgt, arbeitet das System sehr rationell und ist deshalb für einen hohen Probendurchsatz geeignet. Methoden mit Säulenschaltung werden in der Regel zielgerichtet, d. h. für quantitative Analysen einzelner Analyten, wie Arzneistoffe oder deren Phase-I und Phase-II-Metaboliten, entwickelt [243]. Solche Methoden werden als *targeted* bezeichnet im Gegensatz zu den *untargeted* Metabonomics- und *metabolic profiling*-Ansätzen, für die diese Technik allerdings noch nicht angewendet wurde.

Zusätzlich kann der pH-Wert der Urinproben die Analyse negativ beeinflussen, da die Struktur einer Verbindung und damit die Affinität zu den aktiven Gruppen der analytischen Säule stark vom Milieu einer Probe abhängt. Als Konsequenz dessen kann es wiederum zu Schwankungen der Signalintensitäten und insbesondere zu Retentionszeitverschiebungen kommen. Interne Standards können derlei Matrixeffekte kompensieren, aber im Gegensatz zu klassischen quantitativen Analysen ist im Bereich des Metabonomics der Bezug der mit dem Screeningverfahren erfassten Analyten auf geeignete interne Standards keine gängige Praxis.

Ein wichtiger, wenn nicht sogar der entscheidende Schritt bei der Prozessierung von LC-MS-Daten ist die Dekonvolution der Chromatogramme. Obwohl die verfügbaren Programme auf unterschiedlichen Algorithmen basieren, ist das Grundprinzip der Datenextraktion gleich. Es muss eine Vielzahl an Parametern festgelegt werden, die definieren, ob ein Signal als Variable in die resultierende Datenmatrix aufgenommen wird. Aber trotz zahlreicher Initiativen wie die *Metabolomics Standards Initiative* (MSI) [244], das *Architecture for Metabolomics* (ArMet) Projekt [245, 246] oder die *Standard Metabolic Reporting Structures Group* (SMRS) [247], die sich für die Etablierung einheitlicher Standards bei der Auswertung von Metabonomicsdaten einsetzen, bleiben die Schritte, die zur Generierung der Datenmatrices führen, häufig undurchsichtig. Eine Optimierung der Softwareparameter wurde bisher nur vereinzelt beschrieben.

Ein weiteres Problem, das es im Zusammenhang mit großangelegten (epidemiologischen) Metabonomicsstudien zu lösen gilt, ist die sogenannte *batch-to-batch*-Problematik [208, 230, 248]. Aufgrund der Tatsache, dass jedes einzelne Signal einer Probe in die multivariate Datenanalyse eingeht, ist die Fusion von unterschiedlichen Messreihen (*different-batch*-Daten) bzw. von Daten, die unter abweichenden Bedingungen (unterschiedliche Laboratorien, Geräte, Zeitpunkte, Säulen, Probengefäße, Lagerbedingungen etc.) generiert wurden, zu einem integrativen Datensatz mit großen Schwierigkeiten verbunden [217, 249]. Dies gilt insbesondere für die LC-MS-Screeningplattform mit ihrer vergleichbar schlechteren Reproduzierbarkeit. Um Unterschiede und Verschiebungen (Shifts) zwischen einzelnen Messungen zu evaluieren, können Validierungsproben (Quality Control Proben) unter die eigentlichen Proben eingestreut werden. Inwieweit dieser Ansatz auf unabhängige Metabonomicsmessreihen übertragen werden kann, wurde bisher noch nicht untersucht [248].

Vor diesem Hintergrund wurde eine humane Kontrollstudie angelegt, die in erster Linie der weiteren Optimierung und Validierung der analytischen und statistischen Verfahren sowie der Datenextraktion dienen sollte. Neben geeigneten Skalierungs- und Normalisierungsverfahren sollte darüber hinaus mittels Merkaptursäurescreening die normale biologische Variabilität gesunder, nicht exponierter Probanden untersucht werden. Hierzu wurde der merkaptursäurespezifische CNL-Scan in einen *multiple reaction monitoring*-Scan transformiert und mit einer Säulenschaltung kombiniert. Die Dekonvolution erfolgte mittels *MarkerView* Software 1.1, in die ein neuer Algorithmus für diskrete Datenstrukturen integriert wurde. Neben den konventionellen PCA und PLS-DA Modellen kam mit der orthogonalen *partial least squares*-Diskriminanzanalyse (OPLS-DA) ein neues multivariates Verfahren zur Anwendung, das ähnlich dem OSC-Filter konfundierende Faktoren aus einer Datenmatrix filtern kann. Ferner wurde getestet, inwieweit der erweiterte und optimierte Ansatz dazu dienen kann, *different-batch*-Daten zu einem integrativen Datensatz zu kombinieren. Die Studie sollte zunächst als weiteres *proof-of-concept*-Projekt und weniger der Identifizierung neuer Biomarker dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders beschrieben, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben. Alle verwendeten Lösungsmittel entsprachen HPLC-Qualität und wurden von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Ameisensäure (98 – 100 %) und Salzsäure (25 %) in analytischer Qualität stammten von Merck (Darmstadt, Deutschland), der

interne Merkaptursäurestandard (MA-Standard) *S*-Phenyl-MA von Toronto Research Chemicals (North York, Kanada). *D*₃-Acrylamid-MA wurde gemäß der kürzlich in der Literatur beschriebenen Vorschrift synthetisiert und charakterisiert [209]. Die Synthese von 4-*tert*-Butylbenzyl-MA erfolgte nach dem in DEKANT *ET AL.* publizierten Protokoll aus 4-*tert*-Butylbenzylbromid und *N*-Acetyl-L-Cystein [210].

2.2 Interner Standardmix

Es wurde eine wässrige Lösung aus den folgenden drei Merkaptursäurestandards hergestellt: *d*₃-Acrylamid-MA (100.0 mg/L), *S*-Phenyl-MA (10.0 mg/L) sowie 4-*tert*-Butylbenzyl-MA (1.0 mg/L).

2.3 Design der humanen Kontrollstudie

30 Probanden (10 männliche und 20 weibliche, Alter 21 – 62) nahmen an der dreitägigen Studie teil. Das Protokoll sah für jeden der drei aufeinanderfolgenden Versuchstage zwei achtstündige Urinsammelperioden vor („über Nacht“ bzw. „am“ 23 – 7 Uhr und „tagsüber“ bzw. „pm“ 7 – 15 Uhr). Daraus resultierte ein Datensatz von $3 \times 60 = 180$ Urinproben. Das Gesamturinvolumen wurde für jede Sammelperiode bestimmt und entsprechende Aliquots bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt. In einem Fragebogen vermerkten die Studienteilnehmer Diät (einschließlich eventueller Arzneimittelleinnahmen) und Freizeitaktivitäten. Diesbezügliche Einschränkungen wurden nicht gemacht. Alle Probanden waren entweder Nichtraucher oder lediglich Gelegenheitsraucher und hatten ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie gegeben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt und gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

2.4 Klinische Chemie der Urinproben

Der Kreatiningehalt der Urinproben wurde im Labor des Universitätskrankenhauses Würzburg mittels einer enzymatischen Routinemethode bestimmt.

2.5 Vorbereitung der Urinproben

Die tiefgefrorenen Proben wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach dem Zentrifugieren (14000 g, 4 °C, 10 min) wurden 1.0 mL Urin in ein Autosamplervial transferiert, mit 5 µL Salzsäure (25 %) und 10 µL interner Standardlösung versetzt und nach dem Vortexen direkt zur LC-MS/MS-Analyse eingesetzt. Zur Herstellung der Quality Control Probe (QC-Probe),

wurde eine beliebige Urinprobe herausgegriffen und 22-mal in einem unabhängigen Ansatz aufgearbeitet.

2.6 Chromatographische Parameter

Zur chromatographischen Trennung der Urinmetaboliten kam eine Säulenschaltung (**Abb. 23**) zur Anwendung. Diese umfasste eine binäre (Pumpe 1) und eine quaternäre (Pumpe 2), einen Autosampler mit einer 900 µL Probenschleife, sowie ein softwaregesteuertes elektrisches Valve. Die Funktionsweise lässt sich wie folgt beschreiben: In einem ersten Schritt wird die Probe auf die Trap-Säule geladen, die Analyten werden retiniert und angereichert. Es folgt ein Aufreinigungsschritt, bei dem die Trap-Säule mehrmals gespült wird, um unerwünschte Matrixkomponenten wie Salze zu entfernen (Laden, Position 1 in **Abb. 23**). Nach dem softwaregesteuerten Drehen des Ventils ändert sich die Flussrichtung und die angereicherten Analyten werden zurück auf die analytische Säule gespült, von der sie durch einen linearen Gradienten eluiert werden (Elution, Position 2 in **Abb. 23**). Mit dieser Anordnung können bis zu 900 µL einer Probe aufgegeben werden.

HPLC-Anlage:	Binäre und quaternäre Pumpe Serie 1100 mit Autosampler Serie 1100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Software:	Analyst 1.4.1 (Applied Biosystem/MDS Sciex, Concord, ON, Kanada)
Trap-Säule:	ReproSil-Pur C ₁₈ -AQ, 5.0 µm, 33 x 3 mm (Dr. Maisch, Ammerbuch, Deutschland)
Analytische Säule:	ReproSil-Pur C ₁₈ -AQ, 3.0 µm, 150 x 2 mm (Dr. Maisch)
Fließmittel A:	0.1 % Ameisensäure (0.1 % FA)
Fließmittel B:	Acetonitril (ACN)
Fluss:	0.200 mL/min (analytische Säule) 0.750 mL/min (Trap-Säule)
Injektion:	400 µL
Elektrisches Valve:	2.00 min Position 1 (Laden) 15.00 min Position 2 (Elution)

Gradient analytische Säule:

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	0.1 % FA	ACN
0.00	0.200	95	5
2.00	0.200	95	5
25.00	0.200	50	50
27.00	0.200	10	90
29.00	0.200	10	90
31.00	0.200	95	5
40.00	0.200	95	5

Gradient Trap-Säule:

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	0.1 % FA	ACN
0.00	0.750	100	0
2.00	0.750	100	0
2.10	0.000	100	0
14.90	0.000	100	0
15.00	0.750	100	0
17.00	0.750	10	90
25.00	0.750	10	90
27.00	0.750	100	0
40.00	0.750	100	0

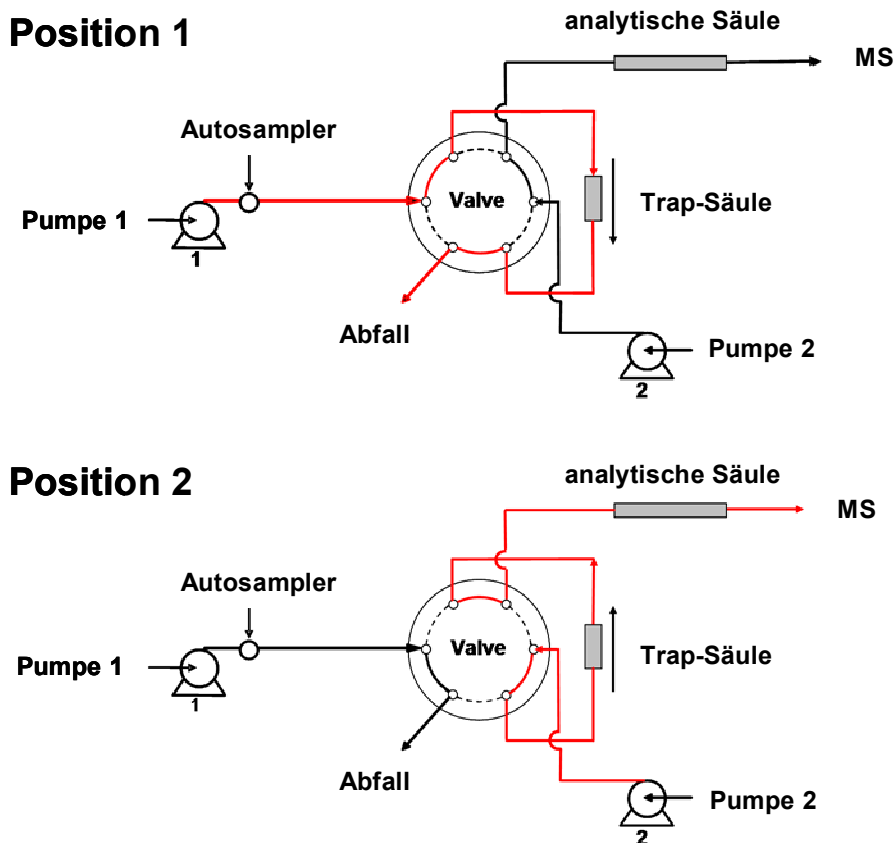


Abb. 23: Schematische Darstellung einer Säulenschaltung zur *on-line*-Festphasenextraktion von Analyten in komplexer Matrix. In Position 1 werden die Analyten auf die Trap-Säule geladen und diese mehrmals gespült, um Matrixbestandteile zu entfernen. In Position 2 werden die angereicherten Analyten rückwärts von der Trap-Säule auf die analytische Säule gespült, auf der schließlich die Gradientenelution stattfindet.

2.7 Massenspektrometrische Parameter

Als Massendetektor kam eine mit einer TurboIonSpray[®]-Quelle ausgestattete Triple Quadrupol gekoppelte lineare Ionenfalle (QTRAP[®] 2000, Applied Biosystem/MDS Sciex) zum Einsatz. Das Gerät operierte im negativen Ionisationsmodus. Allgemeine Quellen- und Gaseinstellungen, sowie die Parameter für die lineare Ionenfalle waren im Einzelnen: *ionspray voltage* -4.2 kV, *vaporizer temperature* 400 °C, *nebulizer gas* (N₂) 45 psi, *turbo gas* (N₂) 50 psi, *curtain gas* (N₂) 30 psi und *collision gas* (N₂) medium, *declustering potential* (DP) -50 V, *entrance potential* (EP) -10 V, *collision energy* (CE) -20 V und *collision cell exit potential* (CXP) -2 V. Bei DP, EP, CE und CXP handelte es sich jeweils um *offset*-Spannungen.

2.8 Theoretisches *multiple reaction monitoring*-Screeningmethode

Als *survey scan* diente ein dem *constant neutral loss*-Scan (CNL-Scan) ähnliches *multiple reaction monitoring* (MRM), hier theoretisches MRM (thMRM) genannt (**Abb. 24**). Für den merkaptursäurespezifischen CNL von 129 Da wurden im Bereich von $m/z = 200 - 450$ insgesamt 251 theoretische Übergänge der Form $m/z \rightarrow m/z - 129$ Da (200.1 \rightarrow 71.1, 201.1 \rightarrow 72.1, 202.1 \rightarrow 73.1, ..., 449.3 \rightarrow 320.2, 450.3 \rightarrow 321.2) berechnet. Theoretischer Übergang bedeutet hierbei, dass es sich nicht um Übergänge handelt, die mittels authentischer Verbindungen im *tuning*-Modus erhalten wurden. Für den *d*₃-Acrylamid-MA Standard wurde der Übergang 236.1 \rightarrow 104.1 aufgezeichnet, da das Molekül die Isotopenmarkierung an der *N*-Acetyl-Gruppe trägt und folglich einen CNL von 132 Da aufweist. Die *dwell time* für jeden Übergang betrug 5.0 ms bei einer *mass range pause* von 5.0 ms. Das Gerät operierte im *profile*-Modus bei *unit*-Auflösung für den ersten Quadrupol (Q1) und niedriger (*low*) Auflösung für den dritten Quadrupol (Q3).

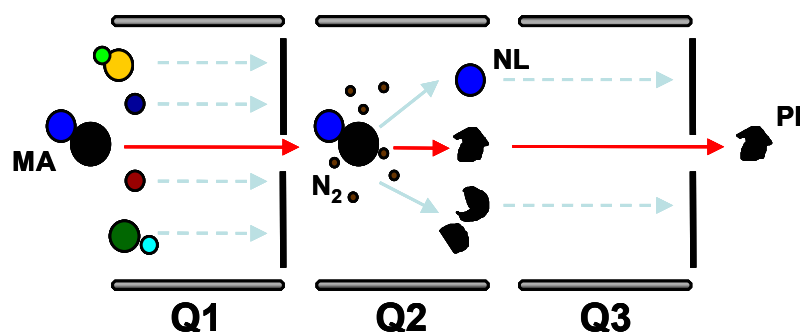


Abb. 24: Schema des aus dem merkaptursäurespezifischen *constant neutral loss*-Scan (CNL 129 Da) abgeleiteten theoretischen *multiple reaction monitoring*. Die Merkaptursäure (MA) wird durch Stickstoff (N₂) vermitteltes *collision induced dissociation* in ein Neutralteilchen (NL) von 129 Da und mehrere Produktionen (PI) gespalten. Q1 und Q3 werden so aufeinander abgestimmt, dass im Q3 nur das zu einem bestimmten m/z gehörende Fragment $m/z - 129$ Da detektiert wird. Auf diese Weise können theoretische Übergänge der Form $m/z \rightarrow m/z - 129$ Da berechnet werden.

2.9 Analyseprotokoll

Aus einem Vial wurden jeweils zwei 400 μ L Injektionen vorgenommen: die erste für die *one-batch*-Messung, die zweite für die *different-batches*-Messung (siehe **Abb. 27**). Für die *one-batch*-Messung wurden die 3 x 60 Proben aus der Studie in einer einzigen *batch* (*3d one-batch*-Datensatz) gemessen. Die *different-batches*-Messung sah die Analyse der 180 Proben in drei einzelnen *batches* zu je 60 Proben vor, wobei eine *batch* jeweils einem Studientag entsprach (*3d different-batches*-Datensatz). Die drei *batches* wurden unabhängig voneinander über einem Zeitraum von 14 Tagen analysiert.

Jeder *batch* wurden zwei QC-Proben vorangestellt. Die Analyse der Proben erfolgte in randomisierter Reihenfolge, wobei jede zehnte Probe eine QC-Probe darstellte. Zwischen den beiden Messungen wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt. Vor der zweiten Analyse wurden alle Proben zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend abzentrifugiert (14000 g, 4 °C, 10 min). Vor und zwischen den jeweiligen Messungen wurde das Gerät routinemäßig gereinigt.

2.10 Datenverarbeitung und statistische Datenanalyse

2.10.1 Generieren der Datenmatrices

Peakdetektion, Datenfiltration und Alignment der thMRM-Daten sowie Skalierungen (auf interne Standards) und Normalisierungen (auf Kreatinin oder Gesamturinvolumen) wurden mit *MarkerView*TM Software Version 1.2.0.0 (Applied Biosystems/MDS Sciex) durchgeführt. Folgende Einstellungen wurden in dem Programm vorgenommen: *smoothing half-width* 1 point, *baseline subtraction window* 1.0 min, *noise percentage* 50 %, *peak-splitting factor* 4, *minimum required intensity* 500, *minimum peak width* 3 points, *minimum signal-to-noise* 5.0, *maximum number of peaks* 500, *retention time (RT) tolerance* 1.0 min. Die lineare Retentionszeitkorrektur und das Skalieren der Proben wurde mit Hilfe von drei internen Merkaptursäurestandardvariablen (*m/z_m/z-129_RT* bzw. *m/z_m/z-132_RT*) durchgeführt. Die Multiplikation von Skalierungs- und Normalisierungsfaktoren erfolgte mittels *Excel 2002* (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland).

2.10.2 Multivariate Datenanalyse

2.10.2.1 Allgemeine Vorgehensweise

Chemometrische Analysen – PCA, PLS-DA und OPLS-DA – wurden mit *SIMCA-P* Software Version 11.0 (Umetrics, Umeå, Schweden) durchgeführt. Die Daten wurden zuvor zentriert und auf Einheitsvarianz skaliert (*autoscaling*). Signifikante Komponenten wurden mittels siebenfacher Cross-Validierung (Standardeinstellung in *SIMCA-P*) bestimmt. Die Qualität und Prädiktivität der Modelle wurde durch die Faktoren R^2X , R^2Y und Q^2 charakterisiert.

2.10.2.2 Orthogonale *partial least squares*-Diskriminanzanalyse

Die orthogonale *partial least squares* bzw. *projection to latent structures*-Diskriminanzanalyse (OPLS-DA) stellt eine erst kürzlich neu entwickelte Modifikation der konventionellen, auf dem *non-linear interactive partial least squares*-Algorithmus (NIPALS-Algorithmus) basierenden, PLS-DA dar [175]. Die OPLS-DA gründet auf der Idee, dass sich die systematische Variation der \mathbf{X} -Matrix (n Beobachtungen \times k Variablen) aus zwei Teilen zusammensetzt. Der eine Teil ist direkt mit der \mathbf{Y} -Matrix (den Gruppen bzw. der Response) korreliert, der andere Teil steht nicht in Relation zur \mathbf{Y} -Matrix, ist folglich orthogonal zu \mathbf{Y} . Der orthogonale Part der (bekannten und unbekannt) systematischen Variation wird auch als strukturiertes Rauschen bezeichnet. Die Partitionierung der \mathbf{X} -Matrix eröffnet die Möglichkeit, die mit den definierten Gruppen korrelierte und unkorrelierte Information jeweils getrennt voneinander zu untersuchen.

SIMCA-P berechnet für jedes OPLS-DA Modell eine mit \mathbf{Y} korrelierte, prädiktive Komponente (PC1 bzw. t1P) und eine (oPC1 bzw. t1O) oder mehrere unkorrelierte, orthogonale Komponenten. Die Anzahl signifikanter PCs wird dabei durch siebenfache Cross-Validierung bestimmt. Analog der PLS-DA sind *score* und *loading plots* verfügbar. Die Besonderheit des OPLS-DA *score plot* ist, dass durch Rotation des *score*-Vektors der ersten Komponente die Trennung der (beiden) Gruppen immer entlang PC1 erfolgt, was die Interpretation der Modelle im Vergleich zur konventionellen PLS-DA erleichtert (**Abb. 25**). Die allgemeinen Modellcharakteristika R^2X , R^2Y und Q^2 werden für OPLS-DA Modelle um den Faktor R^2X_p ergänzt. R^2X_p kennzeichnet die auf die prädiktive Komponente (PC1) entfallende Variation in der \mathbf{X} -Matrix und ist ein Maß für Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

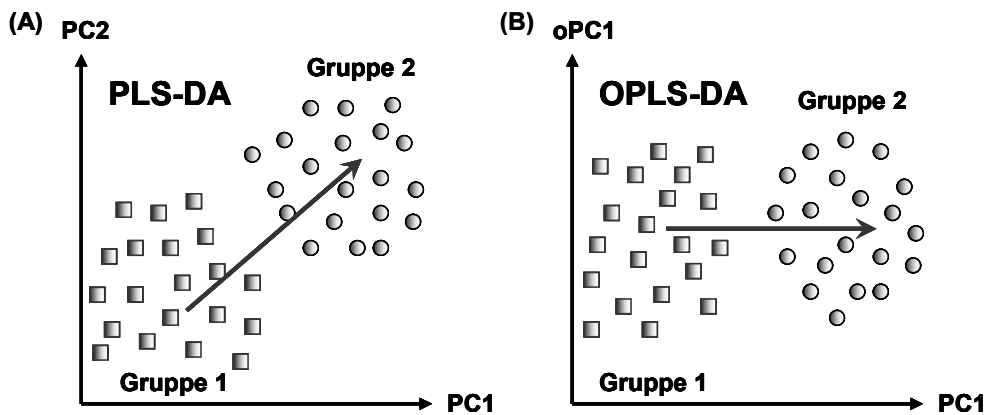


Abb. 25: Schematische Klassifizierung zweier Gruppen im *score plot* mittels: (A) PLS-DA, für die Diskriminierung der Gruppen sind zwei Hauptkomponenten (PC1, PC2) notwendig, (B) OPLS-DA, durch Rotation des *score*-Vektors erfolgt die Diskriminierung entlang PC1, der prädiktiven Hauptkomponente. Die orthogonale Komponente (oPC1) charakterisiert lediglich inter-individuelle Unterschiede.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Theoretisches *multiple reaction monitoring*

In der initialen Modellstudie mit Acetaminophen-Exposition hat sich das Merkaptursäure-screening mittels CNL-Scans als erfolgversprechend erwiesen. Als problematisch stellte sich hierbei allerdings die kontinuierliche Datenstruktur, die die relativ hohe Rauschschwelle in CNL- und *full scan*-Datensätzen bedingt, heraus. Die softwaregestützte Peakextraktion gestaltete sich daher oft als schwierig und nicht immer konnten die Extraktionsparameter so gewählt werden, dass die resultierende Datenmatrix die chromatographische Information korrekt wiedergab. Mit der Integration eines neuen Algorithmus in die bestehende *MarkerView* Software war es nun erstmals möglich, auch diskrete Datenstrukturen zu prozessieren. Ziel war es daher, den kontinuierlichen CNL-Scan durch eine diskrete (rauschärmere) Methode zu ersetzen.

Neben der für Merkaptursäuren spezifischen CNL-Methode wurde in SCHOLZ *ET AL.* [197] eine alternative Scantechnik beschrieben. Diese basiert auf dem sogenannten theoretischen *multiple reaction monitoring* (thMRM). Jeder konstante Neutralverlust wird dabei durch einen definierten Massenübergang beschrieben, d. h. der CNL von 129 Da wird in einen MRM-Übergang der Form $m/z \rightarrow m/z - 129$ Da überführt. Für den Bereich von $m/z = 200 - 450$ können so 251 thMRMs berechnet werden.

In Vorversuchen erwies sich der thMRM-Scan bei sonst gleichen Bedingungen als ebenso leistungsfähig wie die CNL-Methode. In nativem Humanurin konnten eine Vielzahl exogener und endogener Merkaptursäuren detektiert werden. Im thMRM-Modus wiesen die Signale im Ver-

gleich zur CNL-Methode im Mittel eine geringere absolute Intensität auf. Allerdings konnte das Hintergrundrauschen circa um den Faktor 4 reduziert werden, so dass sich für beide Methoden ähnliche Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (S/N -Ratios) ergaben. Bei der softwaregestützten Peakextraktion zeigte sich die Reduzierung des Rauschens indes als klarer Vorteil: in identischen Proben konnten mit der thMRM-Methode bis zu viermal mehr Signale detektiert werden als mit der CNL-Methode. Für den d_3 -Acrylamid-MA Standard wurde analog der Übergang 236.1 \rightarrow 104.1 aufgezeichnet, da das Molekül die Isotopenmarkierung an der N -Acetyl-Gruppe trägt und folglich einen CNL von 132 Da aufweist.

3.2 LC-MS/MS-Analyse mittels Säulenschaltung

Grundlage jeder Metabonomicsstudie bildet ein geeignetes Screeningverfahren, mit dessen Hilfe ein Maximum an, vorerst meist noch unbekanntem Metaboliten, gleichzeitig erfasst werden kann. Mit der Übertragung des CNL *survey scans* auf thMRM konnte die Zahl der durch die Software erfassbaren Analyte bereits vervierfacht werden. Angesichts der geringen Konzentrationen, mit denen bei endogenen Mercaptursäuren zu rechnen war, erschien jedoch ein weiterer Anreicherungsschritt sinnvoll.

Mit neuen analytischen Kopplungstechniken wie der Säulenschaltung steht ein leistungsfähiges Verfahren zur Verfügung, das es erlaubt, Analyten mittels *on-line*-Festphasenextraktion selbst aus komplexen Matrices (Urin, Plasma, Faeces...) sehr spezifisch und effektiv anzureichern. Die optimierte thMRM-Methode wurde daher mit einer Säulenschaltung gekoppelt. Mit dieser Anordnung können bis zu 900 μL einer Probe aufgegeben werden. Verglichen mit Injektionsvolumina von 5 – 50 μL für konventionelle Screeningmethoden bedeutete dies theoretisch eine 18- bis 180-fache Steigerung bei gleichzeitiger Reduktion von Matrixeffekten.

In Vorversuchen mit und ohne Säulenschaltung (250 μL und 20 μL Injektionsvolumen bei sonst gleichen Bedingungen) konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung der säulenschaltunggekoppelten thMRM-Methode signifikant höhere S/N -Ratios erzielt werden konnten. Dies spiegelte sich auch in der Anzahl der durch die *MarkerView* Software detektierten Peaks wider: aus Messungen mit *on-line*-Anreicherung wurden fast doppelt so viele Signale extrahiert wie aus den konventionellen thMRM-Chromatogrammen. Die Methode wurde anhand der internen Standards optimiert. Hierzu wurden die Schaltzeitpunkte für das elektrische Ventil und die Injektionsvolumina jeweils variiert. Eine maximale Peakanzahl sowie maximale Signalintensitäten ergaben sich, wenn nach 2.0 min von der Lade- auf die Elutionsposition umgeschaltet und mit einem Injektionsvolumen von 400 μL gearbeitet wurde. Zudem wurde dazu übergegangen, eine analytische Säule mit kleinerem Packungsmaterial (3 μm statt 5 μm) und folglich

höherer Trennleistung zu verwenden. Dies hatte bei gleichem Säulenmaterial für eine Vielzahl von Signalen schärfere Peaks sowie eine verbesserte Basislinientrennung zur Folge, so dass vor allem Peakcluster besser aufgelöst und von der Software zuverlässiger erkannt wurden.

Ein charakteristisches LC-ESI-MS/MS-Totalionenstromchromatogramm (TIC der 252 thMRMs) zeigt **Abb. 26 A**. Es ist ersichtlich, dass mit der beschriebenen Versuchsanordnung ein breites Spektrum an Mercaptursäuren angereichert und detektiert werden konnte. In **Abb. 26 B** sind die Übergänge der drei internen Standards (d_3 -Acrylamid-MA 236.1 \rightarrow 104.1, RT 7.5 min, *S*-Phenyl-MA 238.1 \rightarrow 109.1, RT 20.7 min und 4-*tert*-Butylbenzyl-MA 308.2 \rightarrow 179.1, RT 30.1 min) extrahiert. Die Konzentrationen der internen Standards wurden so gewählt, dass sie die durchschnittliche Intensität der unbekannteten Mercaptursäuren in der entsprechenden Region des Chromatogramms repräsentierten.

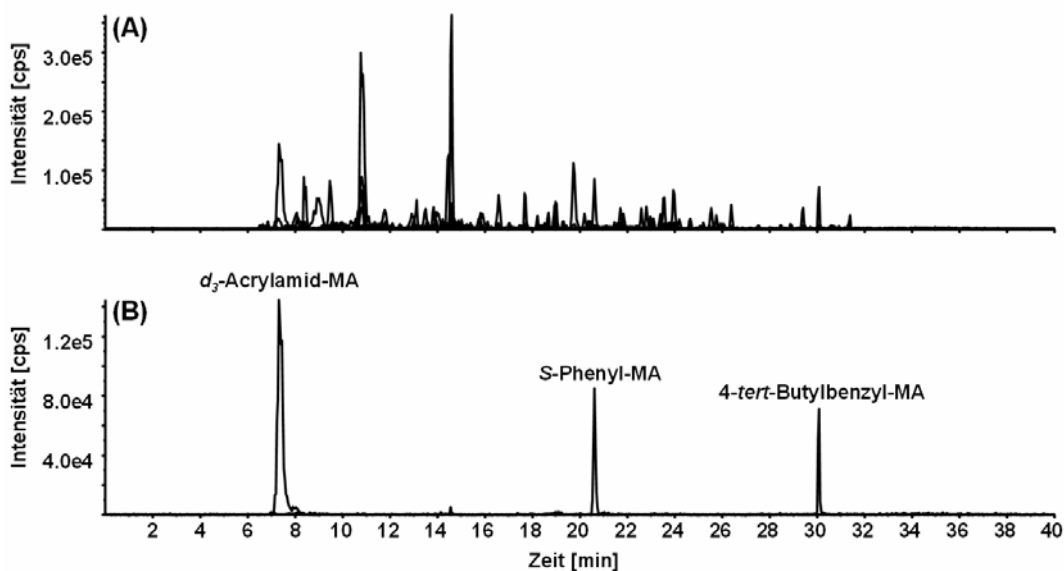


Abb. 26: (A) LC-ESI-MS/MS-Totalionenstromchromatogramm der 252 merkaptursäurespezifischen thMRM-Übergänge, (B) extrahierte Übergänge der drei internen MA-Standards d_3 -Acrylamid-MA (236.1 \rightarrow 104.1, RT 7.5 min), *S*-Phenyl-MA (238.1 \rightarrow 109.1, RT 20.7 min) und 4-*tert*-Butylbenzyl-MA (308.2 \rightarrow 179.1, RT 30.1 min).

Acrylamid-MA ist ein bekannter Metabolit des Acrylamids, das im Back- und Röstprozess stärkehaltiger Lebensmittel wie Knäckebröt, Pommes Frites, Lebkuchen oder Kaffeebohnen entsteht [250]. Die isotopenmarkierte Acrylamid-MA wurde aus zwei Gründen als interner Standard ausgewählt: ausschlaggebend war zum einen das ubiquitäre Vorkommen von Acrylamid und zum anderen die hohe Polarität der entsprechenden Mercaptursäure, die den Anfang des chromatographischen Laufs markierte. *S*-Phenyl-MA entsteht durch Bioaktivierung von Benzol, einem toxischen organischen Lösungsmittel, das u. a. auch in Tabakrauch enthalten ist [122, 161]. An der hier vorgestellten Studie nahmen nur Nichtraucher bzw. Gelegenheitsraucher teil.

Da selbst in den Urinen der Gelegenheitsraucher kein Signal für *S*-Phenyl-MA nachgewiesen werden konnte, wurde die Merkaptursäure als interner Standard für den mittelpolaren Bereich der Chromatogramme gewählt. Für 4-*tert*-Butylbenzyl-MA wurde bisher keine natürliche Quelle nachgewiesen. Sie wurde mit dem Ziel synthetisiert, als interner Standard die eher unpolare Region am Ende der Chromatogramme zu charakterisieren.

3.3 Studien- und Analysedesign

Die Humanstudie wurde als Kontrollstudie ohne Interventionen angelegt, demzufolge unterlagen die Probanden während der drei Studientage (*3d*) keinen Einschränkungen bezüglich Diät oder Freizeitaktivitäten. Urinproben der 10 männlichen und 20 weiblichen Teilnehmer wurden zweimal täglich über einen Zeitraum von jeweils 8 h gesammelt, wobei die erste Sammelperiode (über Nacht) als „*am*“, die zweite (tagsüber) als „*pm*“ bezeichnet wurde. Die 180 Proben der Studie wurden zusammen mit 22 QC-Proben nach zwei unterschiedlichen Protokollen analysiert: gemäß dem ersten Analyseprotokoll wurden die 202 Proben in einer einzigen *batch* (*3d one-batch*-Datensatz) gemessen. Das zweite Protokoll sah die Analyse der Proben in drei einzelnen *batches* vor, wobei eine *batch* einem Studientag entsprach (*3d different-batches*-Datensatz). Das Studien- bzw. Analysedesign ist in **Abb. 27** skizziert und sollte der Evaluierung folgender Punkte dienen:

- (i) Test des merkaptursäurespezifischen thMRM *survey scans*
- (ii) Integration der Säulenschaltung in die Screeningmethode
- (iii) Optimierung der *MarkerView* 1.1 Software
- (iv) Einsatz interner Standards zur Optimierung der Skalierung und des Alignments
- (v) Vergleich geeigneter Normalisierungstechniken
- (vi) Einsatz von QC-Proben zur Überprüfung der analytischen Reproduzierbarkeit
- (vii) Abschätzung der normalen biologischen Variation in den Merkaptursäureprofilen von Männern und Frauen
- (viii) Tageszeitabhängigkeit der Merkaptursäureprofile
- (ix) Kinetik der Merkaptursäureprofile über den Studienverlauf
- (x) Leistungsfähigkeit neuer Verfahren zur multivariaten Datenanalyse
- (xi) Strategie zur Fusion von unabhängigen Datensätzen (*different-batch*-Daten)

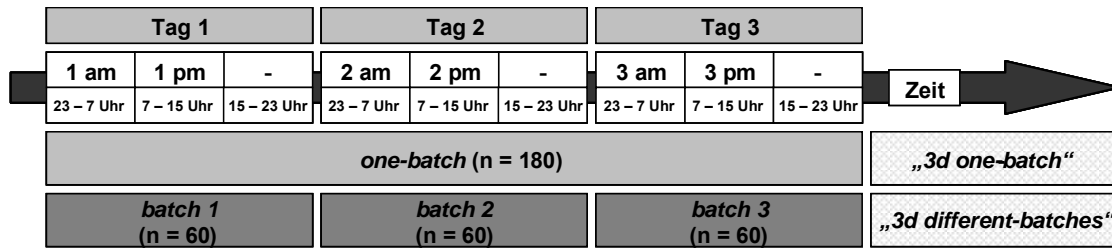


Abb. 27: Schematische Übersicht über das Studien- und Analysedesign der dreitägigen Humanstudie ohne Intervention.

3.4 Optimierung der Datendekonstruktion und Datenfilter

Um den Optimierungsprozess der Datenextraktion (Dekonstruktion) zu vereinfachen, wurden nur QC-Proben aus der *one-batch*-Messung herangezogen. Die der *batch* vorangestellte QC-Probe wurde aufgrund des untypischen chromatographischen Verhaltens von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Dieser Effekt wird häufig beobachtet und ist auf eine Konditionierung der analytischen Säule mit Matrixkomponenten zurückzuführen. Die Urinmatrix tritt in Wechselwirkung mit den polaren Gruppen des Säulenmaterials und kann diese zum Teil belegen, wodurch sich die Trennleistung der Säule verändert [248]. Die Optimierung erfolgte anhand der verbleibenden 21 QC-Proben.

Die meisten der *MarkerView* Softwareparameter wurden intuitiv nach eingehender Untersuchung typischer thMRM-Chromatogramme gewählt. Die durchschnittliche Basispeakbreite lag bei 0.3 – 0.8 min, das *baseline subtraction window* wurde daher auf 1.0 min gesetzt. Innerhalb dieses Fensters wird für jedes Signal eine individuelle Basislinie berechnet. Hierzu wird das Minimum (das Rauschen) auf der linken und rechten Seite eines Peaks bestimmt, die Punkte miteinander verbunden und diese Basislinie von dem entsprechenden Signal subtrahiert. Der *peak splitting factor* definiert, ob ein Peakcluster in einzelne Peaks aufgeteilt wird oder nicht. Ein Faktor von beispielsweise 4 bedeutet, dass in einem Cluster von einem lokalen Minimum zum nächsten Maximum mindestens 4 Datenpunkte vorhanden sein müssen. Nach Untersuchung unterschiedlicher Cluster erwies sich dieser Wert als praktikabel. Die minimale Intensität wurde nach Abzug des Rauschens auf 500 cps gesetzt, das minimale Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf 5.0, da dies Mindestanforderungen sind, die allgemein an quantitative Analysen gestellt werden. Da es sich bei dem Signal des 4-*tert*-Butylbenzyl-MA Standards um einen sehr schmalen Peak handelte, wurde die minimale Basispeakbreite auf 3 Punkte festgelegt. Für die Parameter *smoothing half width* und *noise percentage* wurden die voreingestellten Standardwerte von einem Punkt (leichtes Glätten) und 50 % übernommen. Diese beiden Werte bilden laut Softwarespezifikation die LC-MS/MS-Datenstruktur am zuverlässigsten ab.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Datenmatrices durch Variation der oben beschriebenen Parameter (einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen) im Allgemeinen wenig beeinflusst wurden. Dagegen erwiesen sich die Wahl der Retentionszeittoleranz und der maximal zulässigen Anzahl an Peaks als entscheidend für die Qualität der generierten Matrices. Obwohl die Retentionszeiten (RTs) über die 201 Proben sowohl für interne Standards als auch für unbekannte Metaboliten um weniger als 0.5 min variierten, zeigte sich, dass eine RT-Toleranz von 0.5 min wiederholt zu inkorrektem Peakalignment führte. Bei der manuellen Inspektion der Datenmatrices wurde festgestellt, dass vor allem der d_3 -Acrylamid-MA Standard mehrmals mit jeweils leicht unterschiedlichen RT erfasst wurde, d. h. derselbe interne Standardpeak wurde von der Software als mehrere verschiedene Variablen registriert. Die Spezifität der Matrix war somit nicht mehr gewährleistet. Erst bei einer RT-Toleranz von 1.0 min resultierte eine korrekte Peakliste. Derartige Missalignments müssen so weit wie möglich eliminiert werden, anderenfalls sinken die Aussichten auf valide Modelle und damit auf die Identifizierung neuer Biomarker drastisch. Da die dreidimensionale Struktur massenspektrometrischer Daten sehr komplex ist, muss allerdings ein gewisser Fehler bei der automatisierten Datenextraktion in Kauf genommen werden. Vorrangigstes Ziel war daher die Minimierung und sorgfältige Evaluierung derartiger Effekte. Dies gelang mit Hilfe der internen Standards sowie einem wiederholten Abgleich von Rohdaten und prozessierten Daten. Die Erhöhung der RT-Toleranz von 0.5 min auf 1.0 min hatte einen weiteren positiven Effekt: bei 500 zulässigen Peaks sank die Anzahl der Nullen in der Matrix von 29 % auf 24 %. Aus der schrittweisen Reduzierung der maximal zulässigen Peakanzahl von 10.000 auf 250 resultierte parallel eine Abnahme der Anzahl an Nullen von 63 % auf 11 %. Es erschien erstrebenswert, das Ausmaß an Nullen in den Zellen zu minimieren. Datensätze, in denen gehäuft Nullen auftreten, beinhalten häufig zufällige Variation (Varianz) und generieren in der Folge mitunter fehlerhafte Modelle bzw. Klassifizierungen (vgl. Projekt 4). Die maximale Peakanzahl wurde daher auf 500 Peaks (24 % Nullen) oder zwei Peaks pro Übergang beschränkt. Diese Einschränkung hat den Nachteil, dass kleine Signale mitunter nicht registriert werden. Jedoch stellte sich durch manuelle Inspektion der Variablen der internen Standards bzw. der gesamten Matrix heraus, dass dies der beste Weg war, die Rohdaten abzubilden. Um sicher zu stellen, dass die gewählten Einstellungen nicht nur auf die QC-Proben anwendbar sind, wurden die optimierten Parameter anschließend auf den *3d one-batch*-Datensatz übertragen.

3.5 Optimierung der Alignment-, Skalierungs- und Normalisierungstechniken

Um RT- und Detektorschwankungen zu evaluieren wurden jeder Probe drei interne Standards (3IST) zugesetzt. Derartige Schwankungen sind meist auf Matrixeffekte bzw. Ionensuppression

zurückzuführen und werden häufig bei der Analyse von Urinproben beobachtet, die einen unterschiedlichen Salzgehalt oder pH-Wert aufweisen. Zur Minimierung der Effekte wurden alle Proben auf einen einheitlichen pH-Wert eingestellt und einer *on-line*-Festphasenextraktion in Form einer Säulenschaltung zugeführt. Die folgenden Alignment- und Skalierungstechniken wurden getestet:

- (i) keine RT-Korrektur/kein Skalieren auf interne Standards
- (ii) RT-Korrektur
- (iii) Skalieren auf interne Standards
- (iv) RT-Korrektur in Kombination mit der Skalierung auf interne Standards

Die RT-Korrektur wurde auf der Basis einer linearen Regression vorgenommen, indem für jede Probe ein Korrekturvektor aus den RT-Abweichungen der drei internen Standards berechnet wurde. Für die *3d one-batch*-Messung betragen die relativen Standardabweichungen für die Retentionszeiten der internen Standards *d*₃-Acrylamid-MA, *S*-Phenyl-MA und 4-*tert*-Butylbenzyl-MA in den 21 QC-Proben jeweils 0.6 %, 0.2 % und 0.0 %, in den 180 Proben der Studie entsprechend 0.8 %, 0.2 % und 0.0 %. Zur Skalierung der Variablen auf 3IST wurde ein mittlerer globaler Skalierungsfaktor aus den Flächen der einzelnen Standards in jeder Probe berechnet, mit dem jede Zelle der Datenmatrix anschließend multipliziert wurde.

Im Vergleich zu Plasmaproben haben Urinproben den Nachteil, dass das Volumen über einen weiten Bereich variieren kann. Dies gilt insbesondere für humanen Spontanurin. So betrug in der Studie der Range des Gesamtvolumens der 180 Proben 150 – 3400 mL/8 h (725 ± 440 mL/8 h). Die Kreatiningehalte der 180 Urinproben ergaben sich entsprechend zu 90.8 ± 58.1 mg/dL (Range 18.4 – 358.9 mg/dL). Daher ist ein Normalisierungsschritt erforderlich, wenn Metabolitenspiegel in derart unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden sollen. Es wurden die folgenden Normalisierungstechniken getestet und gegenübergestellt:

- (i) keine Normalisierung
- (ii) Normalisierung auf den Kreatiningehalt der Probe
- (iii) Normalisierung auf das Gesamturinvolumen der Probe

Bei Kreatinin handelt es sich um ein Stoffwechselprodukt aus dem Muskelgewebe, das relativ konstant mit dem Urin ausgeschieden wird. Bei gesunden Erwachsenen wird von einer Ausscheidung von 1 g pro Tag ausgegangen. Der Kreatiningehalt einer Probe kann daher als Bezugswert herangezogen werden, wenn Proben unterschiedlicher Konzentrationen miteinander verglichen werden sollen [251].

Zur Optimierung der Alignment-, Skalierungs- und Normalisierungstechniken wurde nur Tag 2 (*batch 2*) des *3d different-batches*-Datensatzes herangezogen (jeweils 30 *am* und 30 *pm* Proben, $n = 60$). Die chromatographischen Rohdaten wurden wie oben beschrieben prozessiert. Um in den Modellen jeder Variablen das gleiche Gewicht einzuräumen, wurde mit *autoscaling* gearbeitet. Nach Ausschluss der Variablen der internen Standards (inklusive ihrer Isotopen) aus den Datenmatrices wurden in *SIMCA-P* verschiedene Hauptkomponentenanalysen (PCA) und *partial least squares*-Diskriminanzanalysen (PLS-DA) durchgeführt. Zur Evaluierung der optimalen Datenprozessierung wurden zwei endogene Effekte untersucht: das Geschlecht (männlich/weiblich – *m_w*) und die jeweilige Periode, in der die Urinproben gesammelt wurden (über Nacht/tagsüber – *am_pm*). Während in den PCA Plots im Allgemeinen nur leichte Trends erkennbar waren, konnten mittels PLS-DA die beiden Gruppen jeweils gut getrennt werden.

Indem jede Alignment- (keine RT-Korrektur, RT-Korrektur), Skalierungs- (keine Skalierung, Skalierung auf 3IST) und Normalisierungstechnik (keine Normalisierung, Normalisierung auf Kreatinin, Normalisierung auf Gesamturinvolumen) kombiniert wurde, wurden je zwölf *m_w* und *am_pm* PLS-DA Modelle generiert. Signifikante Komponenten und die Prädiktivität der Modelle (Q^2 -Faktoren der siebenfachen Cross-Validierung) bildeten die Bewertungsgrundlage für die Leistungsfähigkeit des jeweiligen PLS-DA Modells. Die besten Kennzahlen wurden sowohl für *m_w*, als auch für *am_pm* Modelle bei einer Kombination aus RT-Korrektur und 3IST-Skalierung der auf Kreatinin normalisierten Daten erhalten. Diese Kombination wurde daher auf alle folgenden Datensätze angewendet. Für die Signalflächen der internen Standards in den QC-Proben des derart prozessierten *3d one-batch*-Datensatzes ergaben sich so relative Standardabweichungen von 9.5 % (*d*₃-Acrylamid-MA), 6.7 % (*S*-Phenyl-MA) und 6.0 % (4-*tert*-Butylbenzyl-MA).

3.6 Biologische Variation der humanen Urinprofile

Geschlechts- (*m_w*) und Tageszeitunterschiede (*am_pm*) über die drei aufeinanderfolgenden Versuchstage wurden anhand des *3d one-batch*-Datensatzes untersucht. Hierzu wurden PLS-DA und OPLS-DA Modelle generiert. Für einen ersten Überblick über den Datensatz wurden die 180 Proben inklusive der 21 QC-Proben zunächst mittels PCA untersucht. Die QC-Proben bildeten im Plot ein eng umrissenes Cluster, es konnte daher auf stabile Chromatographie- und Detektorbedingungen sowie auf ein korrektes Peakalignment geschlossen werden (**Abb. 28**).

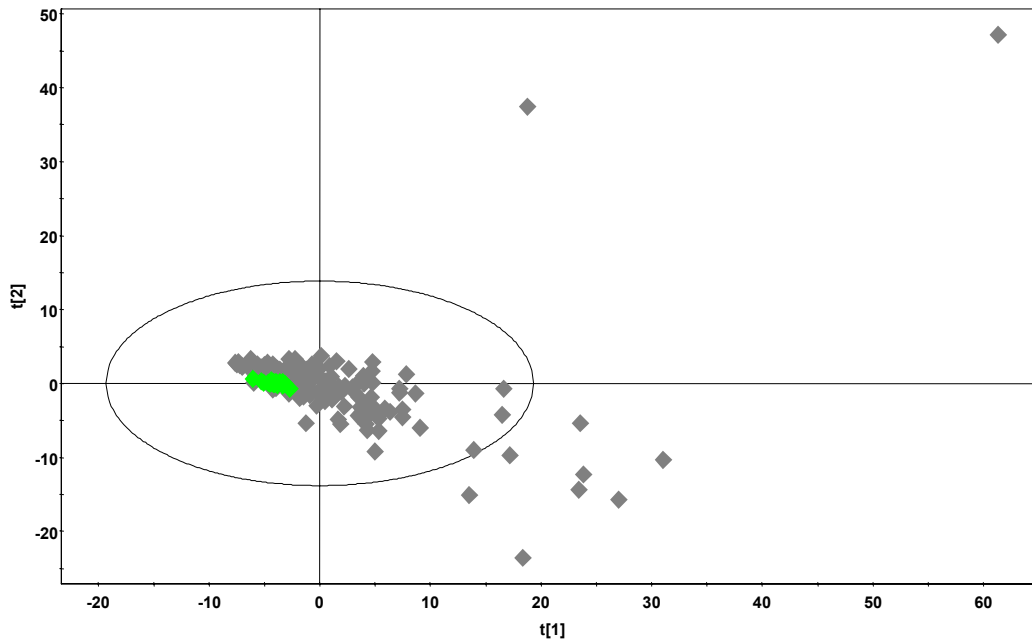


Abb. 28: PCA score plot (PC1 vs. PC2) der 180 Proben aus der dreitägigen Humanstudie inklusive der 21 QC-Proben nach *autoscaling*. Die Proben wurden in einer *batch* gemessen, einer RT-Korrektur unterzogen, auf die drei internen Standards skaliert sowie auf den jeweiligen Kreatiningehalt normalisiert (*3d one-batch*-Datensatz); Schlüssel: ◆ Proben aus der Humanstudie ($n = 180$), ◆ QC-Proben ($n = 21$).

Um jeglichen Einfluss der QC-Proben auf die folgenden Modelle zu verhindern, wurde eine neue Datenmatrix generiert, die nur noch die Proben der Studie enthielt. **Abb. 29 A** zeigt das *am_pm* PLS-DA Modell (Tag 1 – 3) nach *autoscaling*. Für die Diskriminierung der beiden Klassen bedurfte es zweier Hauptkomponenten (PC1 vs. PC2). PC1 – 3 waren signifikant und deckten jeweils eine kumulative Varianz von $R^2X = 0.198$ und $R^2Y = 0.687$ ab. Der Prädiktivitätsfaktor Q^2 für die drei Hauptkomponenten betrug 0.444. Die *scores* der *am*-Proben streuen weiter als die der *pm*-Proben. Auch lagen im *am*-Cluster deutlich mehr Ausreißer außerhalb der *Hotelling's T²* (0.95) Ellipse als im *pm*-Cluster (8 vs. 3). Die Untersuchung der zugehörigen analytischen Läufe zeigte jedoch keine Auffälligkeiten. In der Datenmatrix waren ebenfalls keine Unstimmigkeiten bzw. Missalignments erkennbar. Daraus ließ sich ableiten, dass biologische Gründe die Ursache für die Position der Ausreißer waren, da analytische Probleme und inkorrektes Alignment durch visuelle Inspektion ausgeschlossen werden konnten. Im PLS-DA Modell in **Abb. 29 B** zeichnete sich eine Klassifizierung von Männern und Frauen ab. $R^2X(\text{cum})$ und $R^2Y(\text{cum})$ nach sechs signifikanten Komponenten betragen 0.292 und 0.903 bei einem $Q^2(\text{cum})$ von 0.645. Verglichen mit dem *am_pm*-Modell lieferte das *m_w*-Modell weniger Ausreißer (8 *am*/3 *pm* vs. 4 *m*/4 *w*). Bei genauerer Untersuchung der Probe in der linken oberen Ecke des *am_pm*-Modells (**Abb. 29 A**) fiel auf, dass die Person in der 3 *am*-Sammelperiode ein Acetaminophen-haltiges Schmerzmittel eingenommen hatte. Acetaminophen führt *in vivo* zur Bildung einer Mercaptur-

säure (vgl. Projekt 2). Wie aus den zugehörigen *loading plots* ersichtlich wurde, hatten die Variablen des Metaboliten einen starken Einfluss auf das Modell und klassifizierten die Probe als biologischen Ausreißer. Da es sich bei Acetaminophen um einen frei verkäuflichen Arzneistoff handelt, der somit in die Kategorie Confounder fällt, wurde die besagte Probe von den nachfolgenden Analysen nicht ausgeschlossen. Dieselbe Probe wurde auch im *m_w score plot* als Ausreißer identifiziert (**Abb. 29 B** rechte untere Ecke).

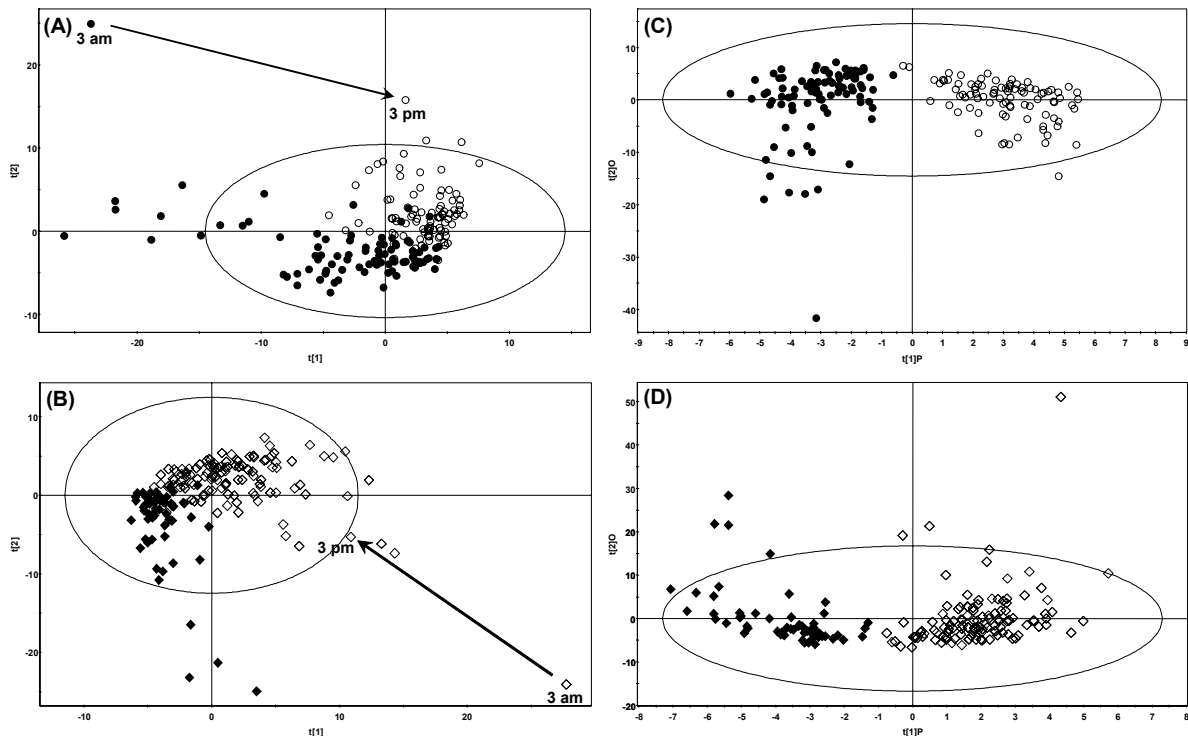


Abb. 29: PLS-DA (PC1 vs. PC2) und OPLS-DA (t[1]P vs. t[2]O) *score plots* der 180 Proben aus der dreitägigen Humanstudie nach *autoscaling*. Die Proben wurden in einer *batch* gemessen, einer RT-Korrektur unterzogen, auf die drei internen Standards skaliert sowie auf den Kreatiningehalt normalisiert (*3d one-batch*-Datensatz), (A) *am_pm* PLS-DA, (B) *m_w* PLS-DA, (C) *am_pm* OPLS-DA, (D) *m_w* OPLS-DA; Schlüssel: ● *am*-Sammelintervall, ○ *pm*-Sammelintervall, ◆ Männer, ◇ Frauen; der Pfeil markiert jeweils die Kinetik der Acetaminophen-MA-Ausscheidung.

Mit dem Ziel, mögliche Veränderungen im metabolischen Profil über die drei Studientage zu verfolgen, wurde mit denselben Daten eine OPLS-DA durchgeführt. OPLS-DA ist eine Projektionsmethode, die vor der Generierung der Modelle orthogonale, nicht diskriminierende Information aus der **X**-Matrix filtert und somit die Korrelation zwischen der **X**- und der **Y**-Matrix erhöht. Die *am_pm* und *m_w* OPLS-DA Modelle wurden analog den PLS-DA Modellen erstellt. Der Datenfilter bewirkt, dass in OPLS-DA Modellen die Gruppendiskriminierung entlang der ersten Hauptkomponente erfolgt, was die Klassifizierung, wie in **Abb. 29 C** und **D** dargestellt, sichtlich erleichterte.

Eine Besonderheit der OPLS-DA Modelle ist die Teilung der Varianz in einen mit der Trennung korrelierten und einen unkorrelierten Part. Der gefilterte, unkorrelierte Anteil an der \mathbf{X} -Matrix wird orthogonale Varianz genannt und kann in einem separaten Modell dargestellt werden. Auf diese Weise kann der Datensatz auf „Hintergrundinformation“ hin untersucht werden [175]. Dies können je nach Studiendesign endogene Confounder wie Geschlecht, Alter, Tageszeit, Gewicht, Ernährung etc. der Probanden bzw. Versuchstiere sein. Aber auch unerwünschte Effekte wie analytische Verschiebungen, *batch-to-batch*- bzw. Detektorschwankungen können mit dieser Technik charakterisiert werden.

Für die Probanden der Studie wurden die metabolischen Schwankungen der Merkaptursäuremuster über die drei Studientage genauer untersucht. Hierzu wurde jeweils die erste gegen die zweite orthogonale Komponente (t[2]O vs. t[3]O) des *am_pm* und des *m_w* OPLS-DA Modells aufgetragen. Wie aus **Abb. 30 A** und **B** ersichtlich ist, sind die Symbole in den *score plots* normalverteilt. Das bedeutet, dass kein Trend bezüglich der drei Studientage ausgemacht werden konnte. Ein Tagestrend konnte auch mit keiner anderen Kombination aus orthogonalen Komponenten beobachtet werden (für das *am_pm*-Modell ergaben sich fünf, für das *m_w*-Modell drei signifikante orthogonale Komponenten).

Darüber hinaus wurde versucht, PLS-DA Modelle zu erstellen, mit denen sich die drei verschiedenen Studientage diskriminieren lassen. Doch weder mit *autoscaling* noch mit *pareto scaling* resultierten Modelle mit signifikanten Komponenten. In biologischem Kontext bedeutet dies, dass sich die metabolischen Urinprofile der Probanden an den drei Studientagen nur gering unterscheiden.

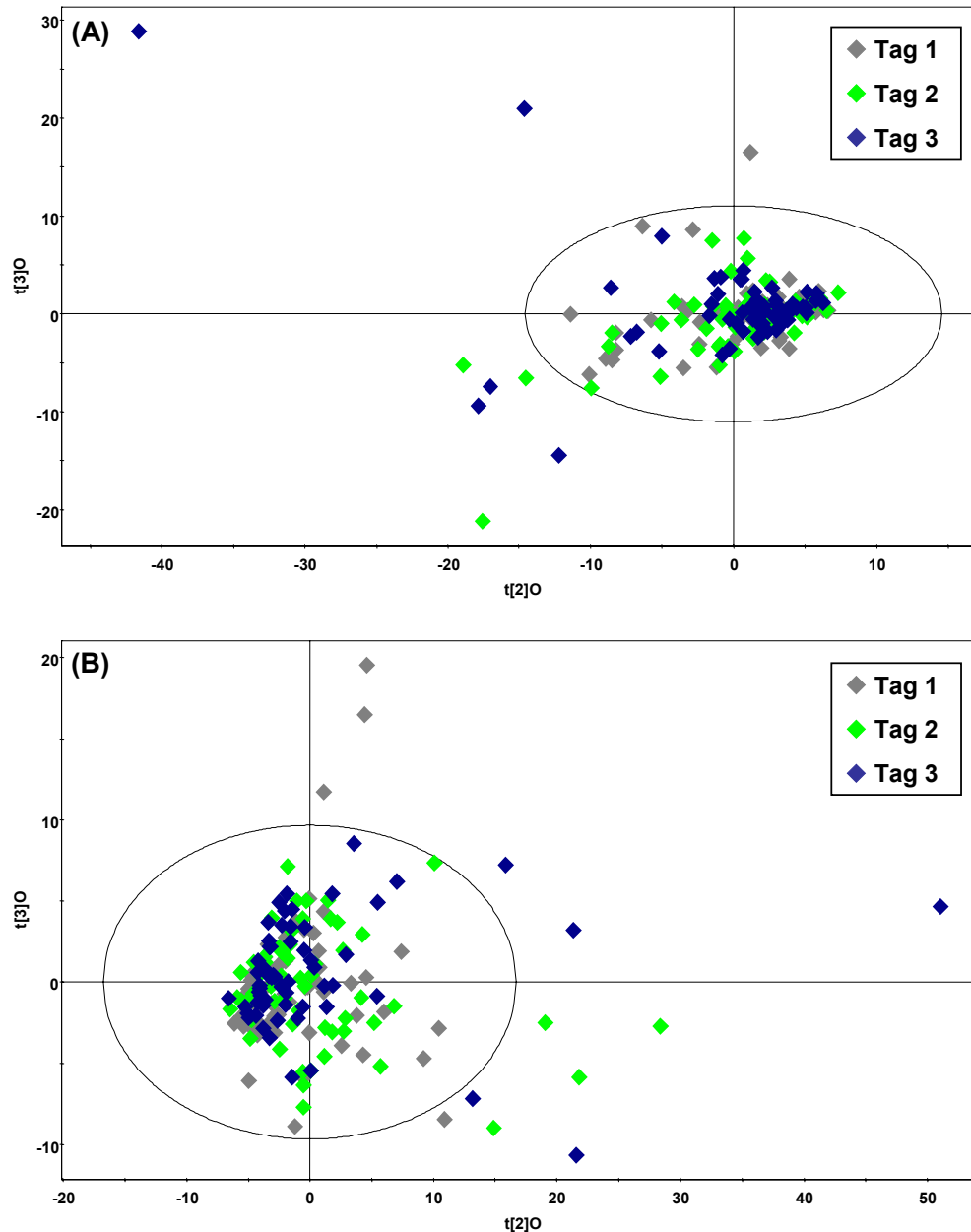


Abb. 30: OPLS-DA *score plots* der ersten und zweiten orthogonalen Komponente (t[2]O vs. t[3]O) aus dem: (A) *am_pm*-Modell, (B) *m_w*-Modell; Schlüssel: \blacklozenge Studientag 1, \blacklozenge Studientag 2, \blacklozenge Studientag 3.

3.7 Fusion von *different-batch*-Daten zu einem *one-batch*-Datensatz

Bis heute stellt die Fusion von LC-MS-Metabonomicsdatensätzen eine große Herausforderung dar [208, 230]. Der Grund hierfür sind Schwankungen in der chromatographischen Trennung sowie in der massenspektrometrischen Detektion der Signale, die allesamt zu einer verminderten Reproduzierbarkeit führen. Bedingt durch die multivariate Datenstruktur zeigen sich die auf Varianzanalyse basierenden Modelle, insbesondere die PCA, als sehr störanfällig gegenüber derartigen Einflussgrößen [172]. Es wurde daher ein neuer Ansatz zur Kombination von *different-batch*-Daten zu einem einzigen *one-batch*-Datensatz getestet. Als Datengrundlage

diente die Fusion der *3d different-batches*-Daten (Messung der 180 Proben in drei *batches*, wobei eine *batch* jeweils einen Studientag umfasste) zu einem neuen *3d one-batch*-Datensatz. Ein anschließender Vergleich des ursprünglichen *3d one-batch*-Datensatzes (Messung der 180 Proben in einer *batch*) mit dem durch Datenfusion neu generierten *3d one-batch*-Set sollte den Erfolg der Strategie demonstrieren.

In einem ersten Schritt wurden die 21 QC-Proben aus der *3d different-batches*-Messung untersucht. Trotz RT-Korrektur und Skalierung auf die drei internen Merkaptoäurestandards, war im PCA *score plot* nach *autoscaling* ein klarer Trend (QC-Proben Tag 1 → QC-Proben Tag 2 → QC-Proben Tag 3) erkennbar (**Abb. 31 A**). Die entsprechende PLS-DA mit drei *dummy*-Variablen für die einzelnen Studientage lieferte drei klar voneinander getrennte Cluster (**Abb. 31 B**). Bei den QC-Proben handelte es sich jeweils um dieselbe Urinprobe. Demzufolge konnten anhand der QC-Proben messtechnische Schwankungen evaluiert werden.

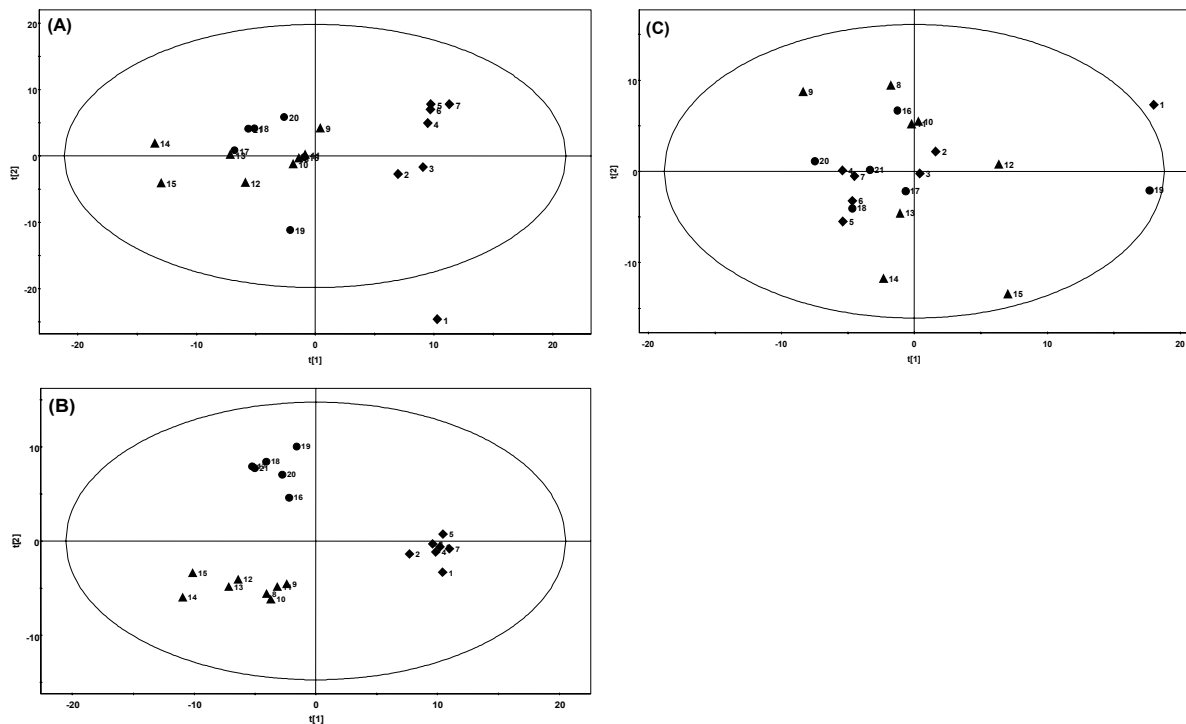


Abb. 31: Score plots der 21 QC-Proben der *3d different-batches*-Messung: (A) PCA nach globalem *autoscaling*, (B) PLS-DA nach globalem *autoscaling*, jedem der drei Studientage wurde eine Klasse in der *dummy*-Matrix zugeordnet, (C) PCA nach *batch*-weise *autoscaling*; Schlüssel: ◆ Studientag 1, ▲ Studientag 2, ● Studientag 3.

Zur Elimination derlei Trends wurde ein Ansatz gewählt, bei dem jede *batch* (jeder Tag) gesondert einem *autoscaling*-Prozess unterworfen wurde. Dies hatte zur Folge, dass für jede *batch* separat Mittelwert und Standardabweichung für jede Variable berechnet wurden. Detektorschwankungen und Fluktuationen exogener und endogener Metaboliten an den einzelnen

Studientagen gingen somit nur noch relativ und nicht wie zuvor absolut in die Modelle ein. Nach diesem *batch*-weise Skalierungsprozess nivellierte sich der tagesspezifische Trend in der PCA und die QC-Proben entsprachen augenscheinlich einer Normalverteilung (**Abb. 31 C**). Des Weiteren lieferte eine entsprechende PLS-DA mit drei Klassen keine signifikanten Komponenten. Folglich waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Studientagen so gering, dass sich keine Korrelation mit der *dummy*-Matrix ergab.

Auf der Basis dieser Vorversuche wurden die *3d different-batches*-Daten einem analogen Prozess unterworfen. Um den Erfolg des Ansatzes zu demonstrieren, wurde wie folgt vorgegangen. Es wurden insgesamt vier Datensätze generiert:

- i) *3d one-batch*: globales *autoscaling* der drei Studientage
- ii) *3d one-batch*: tageweise *autoscaling* der drei Studientage
- iii) *3d different-batches*: globales *autoscaling* der drei Studientage
- iv) *3d different-batches*: tageweise *autoscaling* der drei Studientage

Das Set ii) wurde integriert, um einen Vergleich mit iv) ziehen zu können. Für jeden der vier aufgeführten Ansätze wurden anschließend PLS-DA Trainings- und Testsets erstellt. Für die Klassifizierung von *am_pm*- und *m_w*-Proben bestand das Trainingsset aus jeweils zwei Studientagen. Das resultierende Modell diente als Basis für die Prädiktion des jeweils verbleibenden dritten Studientages, der das Testset darstellte. Die Qualität der drei Trainings- und Testsets wurde durch Mittelwert und Standardabweichung korrekter *am_pm*- bzw. *m_w*-Klassifizierungen ausgedrückt. Für die Modelle wurden nur signifikante Komponenten zugelassen. **Tab. 2** fasst die Ergebnisse zusammen. Bei der Betrachtung der *3d one-batch*-Resultate fiel zunächst auf, dass die tageweise Skalierung mit 97.5 % (*am_pm*) und 97.2 % (*m_w*) korrekter Klassifizierungen für das Trainingsset und 88.9 % (*am_pm*) und 83.9 % (*m_w*) korrekter Vorhersagen für das Testset die besten Modelle hervorbrachte. Entsprechende Klassifizierungs- bzw. Prädiktionsraten ergaben sich mit 95.8 % (*am_pm*) und 95.3 % (*m_w*) für das Trainingsset sowie mit 83.9 % (*am_pm*) und 81.1 % (*m_w*) für das Testset bei globaler Skalierung aller drei Studientage. Die *3d different-batches*-Daten folgten einem sehr ähnlichen Trend. Die Klassifikationsraten der *am_pm*-Trainingssets unterschieden sich mit 95.0 % (globales Skalieren) und 94.2 % (tageweise Skalieren) kaum. Für das *m_w*-Modell ergaben sich die Klassifikationsraten mit 96.7 % (globales Skalieren) und 96.9 % (tageweise Skalieren) entsprechend. Allerdings verbesserten sich die Prädiktionsraten bei der tageweise Skalierung im Vergleich zur globalen Skalierung deutlich. So stieg die Prädiktionsrate für das *am_pm*-Testset von 73.5 % auf 83.4 % und für das *m_w*-Testset

von 81.1 % auf 84.4 %. Betrachtete man die Standardabweichungen der Klassifizierungs- und Prädiktionsraten, so fielen bei ähnlichen Werten für die jeweiligen Trainingssets die niedrigeren Werte für die Vorhersage des Geschlechts im Vergleich zur Vorhersage der Tageszeit auf.

Tab. 2: Korrekte Klassifizierungen (Trainingsset, bestehend aus jeweils zwei Studientagen) und Prädiktionsraten (Testset, bestehend aus dem verbleibenden dritten Studientag) der *am_pm* und *m_w* PLS-DA Modelle in Abhängigkeit vom Analyseprotokoll (*one-batch*- bzw. *different-batches*-Messung) und der Skalierungstechnik (globales bzw. tageweise *autoscaling*). Die Werte sind als Mittelwert und Standardabweichung dreier Klassifikationen bzw. Prädiktionsmodelle angegeben.

<i>3d one-batch</i>	PLS-DA Trainingsset (2 Tage)		PLS-DA Testset (1 Tag)	
	<i>am_pm</i>	<i>m_w</i>	<i>am_pm</i>	<i>m_w</i>
globale Skalierung der 3 Studientage	95.8 ± 2.2	95.3 ± 2.9	83.9 ± 6.3	81.1 ± 2.6
tageweise Skalierung der 3 Studientage	97.5 ± 0.8	97.2 ± 2.5	88.9 ± 7.5	83.9 ± 3.5

<i>3d different-batches</i>	PLS-DA Trainingsset (2 Tage)		PLS-DA Testset (1 Tag)	
	<i>am_pm</i>	<i>m_w</i>	<i>am_pm</i>	<i>m_w</i>
globale Skalierung der 3 Studientage	95.0 ± 2.2	96.7 ± 2.5	73.5 ± 12.8	81.1 ± 2.6
tageweise Skalierung der 3 Studientage	94.2 ± 3.6	96.9 ± 1.7	83.4 ± 7.6	84.4 ± 4.2

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit der Technik des *batch*-weise Skalierens aus den *3d different-batches*-Daten ein Datensatz generiert werden konnte, der hinsichtlich korrekter Klassifizierungen und Vorhersagen mit dem originalen *3d one-batch*-Datensatz vergleichbar war.

3.8 PCA des originalen und des neu generierten *one-batch*-Datensatzes

Als *proof-of-concept* wurde die Belastbarkeit des neu generierten *3d one-batch*-Datensatzes (in drei *batches* analysiert, anschließend fusioniert) im Vergleich zu dem originalen *3d one-batch*-Datensatz (alle drei Studientage in einer *batch* gemessen) getestet. Für beide Sets wurde jeder Versuchstag einem separaten *autoscaling*-Prozess unterworfen und anschließend eine PCA durchgeführt. Wie aus **Abb. 32** ersichtlich ist, lagen dieselben Proben im *score plot* dicht beisammen. Die geringen Differenzen verdeutlichten, dass die untersuchten Unterschiede zwischen dem originalen und dem neu generierten Datensatz sehr klein ausfielen.

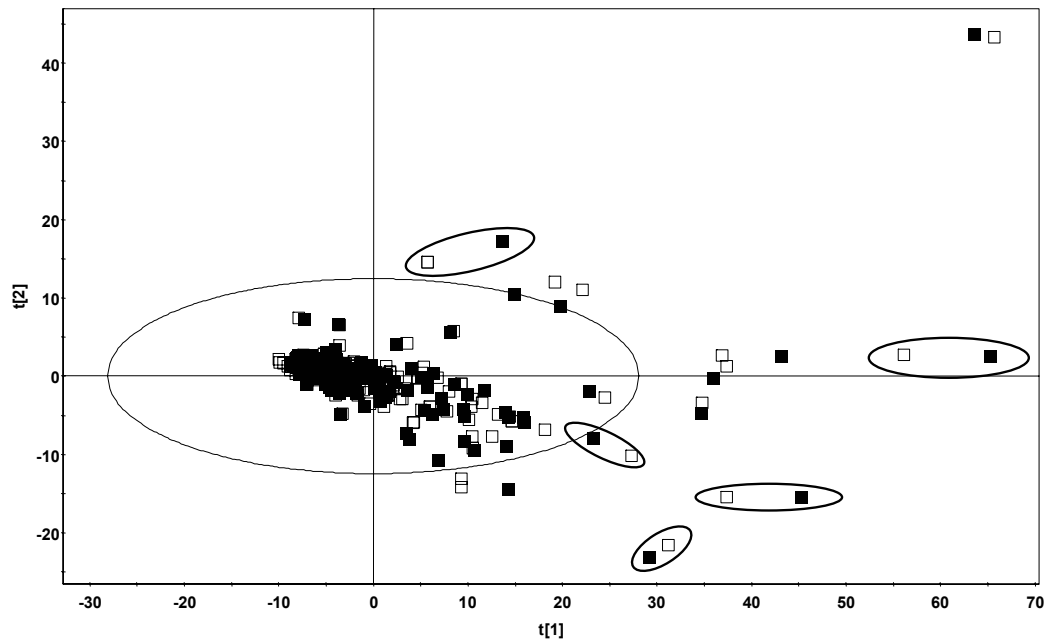


Abb. 32: PCA score plot des originalen und des aus dem *3d different-batches*-Set generierten *3d one-batch*-Datensatzes. Die Ellipsen markieren jeweils dieselbe Probe; Schlüssel: □ originaler *3d one-batch*-Datensatz, ■ durch Fusion aus dem *3d different-batches*-Datensatz generierter neuer *3d one-batch*-Datensatz.

Ferner gelang weder mit PLS-DA noch mit OPLS-DA die Diskriminierung der beiden *one-batch*-Sets. Aufgrund einer Korrelation zwischen **X** (Variablenmatrix) und **Y** (originaler bzw. neuer Datensatz) von fast null, konnten keine signifikanten Komponenten generiert und Modelle erstellt werden.

4 Diskussion

Durch Transformation des merkaptursäurespezifischen *constant neutral loss*-Scans (CNL-Scan) in einen diskreten theoretischen *multiple reaction monitoring*-Scan (thMRM-Scan) und Kopplung der Methode mit einer Säulenschaltung konnte das Spektrum an detektierbaren Merkaptursäuren in Humanurin stark erweitert werden. Bei der Analyse der Proben wurde versucht, für das Screening ähnliche Standards zu setzen wie für klassische quantitative analytische Fragestellungen. Eingestreute Quality Control Proben sowie die Verwendung von drei internen Standards für die polare, mittelpolare und tendenziell unpolare Region der Chromatogramme ermöglichten die Optimierung der Methode. Somit konnte sichergestellt werden, dass mit dem Screening auch unbekannte exogene und endogene Metaboliten mit ähnlichen Eigenschaften erfasst werden können. Zwei Prinzipien konnten mit der neuen Technik kombiniert werden: eine spezifische und effektive Extraktion der gewünschten Metaboliten bei gleichzeitiger Reduzierung

von Matrixeffekten. Die Säulenschaltung ermöglichte dabei einen hohen Probendurchsatz bei geringem Material- und Zeitaufwand. Sowohl die Verminderung der Ionensuppression durch *on-line*-Festphasenextraktion (Säulenschaltung) als auch die Übertragung des CNL- auf den thMRM-Scan führten zu mehr detektierten Signalen sowie zu signifikant höheren Signal-zu-Rausch-Verhältnissen. Folglich bestand eine bessere Ausgangsbasis für die anschließende softwaregesteuerte Dekonvolution der chromatographischen und massenspektrometrischen Information. Ähnliche Beobachtungen wurden für die *ultra performance liquid chromatography* (UPLC) gemacht, für die im Vergleich zu einer konventionellen stationären Phase bei zehnfacher Geschwindigkeit der Analyse für einige Signale eine drei- bis fünffache Sensitivitätssteigerung erzielt werden konnte. Gleichzeitig konnten durch Dekonvolution der UPLC-Chromatogramme 20 % mehr Variablen extrahiert werden als aus vergleichbaren HPLC-Chromatogrammen derselben Probe [241, 252].

Bedingt durch die modifizierten chromatographischen Bedingungen sowie durch die Optimierung der Dekonvolutionsparameter konnte das Peakalignment verbessert und eine deutliche Reduzierung der Anzahl Nullen in der Datenmatrix erreicht werden. Das gehäufte systematische Auftreten von Nullen in einer Datenmatrix geht vielfach mit zufälligen Korrelationen in den nachfolgenden multivariaten Modellen einher und ist vor diesem Hintergrund auf ein Minimum zu begrenzen [230]. Eine in der Literatur beschriebene Strategie, die Anzahl *missing values* in einer Datenmatrix zu reduzieren umfasste die Analyse von duplikaten Proben. Aber trotz zahlreicher manueller Korrekturen und Ausschlusskriterien resultierten für die in BIJLSMA *ET AL.* beschriebene Lipidomicsdatenmatrix 11 % Nullen [208]. Ein Wert von 11 % Nullen konnte für die Proben der dreitägigen Humanstudie zwar mit der Beschränkung auf maximal 250 Peaks erreicht werden, es erschien aber dennoch erstrebenswert, einen Wert von 24 % Nullen in Kauf zu nehmen und dafür zwei statt einem Peak pro theoretischem Massenübergang zuzulassen. Denn im Gegensatz zu Lipidomics, das sich vornehmlich auf den quantitativen Vergleich von Plasmalipiden stützt, wurde für das Merkaptursäurescreening erwartet, dass vermehrt qualitative Unterschiede in den inter-individuellen Metabolitenprofilen auftreten. Eine Null in der entsprechenden Zelle bedeutet dann vielmehr, dass die jeweilige Merkaptursäure in der analysierten Probe nicht vorhanden war, als dass es zu einem Versagen des softwaregestützten Alignments kam. Darüber hinaus sind duplikate Messungen sowie manuelle Alignmentverfahren mit dem automatisierten Hochdurchsatzgedanken des Metabonomics nicht vereinbar.

In Vorversuchen zur Optimierung der Alignment-, Skalierungs- und Normalisierungsstrategie stellte sich heraus, dass die Rohdaten bei einer Kombination aus linearer Retentionszeitkorrektur (RT-Korrektur), Skalierung auf die mittlere Response der drei internen Standards sowie

Normalisierung auf den Kreatiningehalt der Proben am besten erfasst wurden. In der Literatur wird sowohl von linearen Retentionszeitinterpolationen [208] als auch von Softwarelösungen berichtet, die differenziertere Korrekturalgorithmen beinhalten [202, 214]. Die verwendete *MarkerView* Software sah allerdings nur die lineare RT-Korrektur vor. Da die Peaks in den 201 Proben nur leichten RT-Schwankungen ($RSD < 1\%$) unterlagen und sich die Matrices mit und ohne RT-Korrektur kaum unterschieden, stellte diese Vorgehensweise einen guten Kompromiss dar.

Für *full scan*/TOF-Ansätze gestaltet sich aufgrund des breiten Analytenspektrums die Wahl geeigneter interner Standards mitunter als schwierig. Hingegen stehen für das *metabolic profiling* von Substanzklassen in der Regel mehrere (isotopenmarkierte) Standards zur Verfügung, die zur Überprüfung der Analytik eingesetzt werden können. Neben der RT-Korrektur können interne Standards als Bezugsgrößen herangezogen werden, um Unzulänglichkeiten in der Probenvorbereitung und Analytik zu kompensieren. Eine Skalierung der Variablen auf die mittlere Response der drei internen Merkaptursäurestandards in jeder Probe ist nicht optimal. Theoretisch ist es denkbar, dass die drei internen Standards gegenläufigen Trends (Signalunterdrückung bzw. Signalverstärkung) unterliegen [190]. Eine Unterteilung der Chromatogramme in mehrere RT-Fenster mit einem repräsentativen Standard pro Abschnitt bietet dagegen den Vorteil, dass den Eigenschaften der unbekannt Analyten in einem Fenster besser Rechnung getragen werden kann als mit einem globalen Skalierungsfaktor [208]. Die Möglichkeit zur Skalierung von Variablen nach RT-Fenstern war in der verwendeten *MarkerView* Software nicht gegeben. Ein manuelles Verfahren wäre denkbar gewesen, erschien allerdings vor dem Hintergrund des Metabonomicsgedanken – hoher Probendurchsatz und automatisierte, softwaregesteuerte Datenprozessierung – wenig sinnvoll und die Skalierung der Signale mittels eines durchschnittlichen Faktors als guter Mittelweg.

In der Literatur wird häufig eine Normalisierung auf die Summe aller detektierbaren Signale beschrieben. Sie wird vorwiegend auf NMR-Daten [40, 52], neuerdings aber auch in Kombination mit *full scan* LC-MS-Daten angewendet [232, 241]. Bei dieser Vorgehensweise geht man davon aus, dass die Summe aller detektierbaren Metaboliten Aufschluss über die Konzentration bzw. Verdünnung einer Probe gibt. Da sich die entwickelte Screeningmethode auf die Substanzklasse der Merkaptursäuren konzentrierte, deren Summe eher von der elektrophilen Belastung einer Person als von der Konzentration bzw. Verdünnung der entsprechenden Urinprobe abhängt, wurde dieses Verfahren nicht getestet. Stattdessen wurde auf zwei Normalisierungsverfahren zurückgegriffen, wie sie in der klinischen Praxis Anwendung finden. Die Normalisierung der

Proben auf den Kreatiningehalt erwies sich hierbei als optimal und ihr wurde im Vergleich zur Normalisierung auf das Gesamturinvolumen den Vorzug gegeben.

Für Tierstudien, die unter streng definierten Standardbedingungen durchgeführt werden, ist eine relativ geringe inter-individuelle Variabilität zu erwarten. Für Metabonomicsstudien sind Gruppengrößen von fünf bis zehn Tieren daher in der Regel ausreichend. Dagegen wurden in der Humanstudie keine Einschränkungen bezüglich Nahrungsaufnahme oder Freizeitaktivitäten gemacht. Da nicht nur eine große biologische Variabilität erwartet wurde, sondern auch ein *overfitting* der multivariaten Modelle durch ein zu kleines Verhältnis aus Beobachtungen zu Variablen verhindert werden sollte [230], wurden die Probandengruppen entsprechend groß gewählt. Im Optimierungsprozess wurde bereits erkennbar, dass *unsupervised*-Techniken wie die PCA für die Untersuchung der humanen Merkaptursäureprofile im Urin wenig geeignet sind, da sie aufgrund der großen biologischen Variabilität zu unzureichenden Klassifizierungen in den *score plots* führten. Aus der Literatur ist dieses Phänomen sowohl für NMR- als auch für *full scan*/TOF-Screeningansätze bekannt [177, 253]. Die tageszeit- und geschlechtsspezifischen Einflüsse wurden daher anhand von *supervised* PLS-DA und OPLS-DA Modellen untersucht. Beide Methoden lieferten signifikante Modelle und konnten sowohl die Tageszeit als auch das Geschlecht eindeutig klassifizieren. Die relevanten Modellcharakteristika des *am_pm* PLS-DA Modells betragen $R^2Y = 0.687$ und $Q^2 = 0.444$, die des *m_w* Modells $R^2Y = 0.903$ und $Q^2 = 0.645$ und lagen damit deutlich besser, als die für einen NMR-Ansatz beschriebenen Kennzahlen für ein analoges PLS-DA Tageszeitmodell ($R^2Y = 0.25$, $Q^2 = 0.16$) bzw. für ein PLS-DA Modell zur Klassifizierung des Geschlechts ($R^2Y = 0.53$, $Q^2 = 0.49$) [216]. Trotz der unterschiedlichen Screeningplattformen wurde mit beiden Verfahren übereinstimmend beobachtet, dass das Geschlecht einen größeren Einfluss auf das Ausscheidungsprofil hat, als die jeweilige Tageszeit, zu der die Probe gesammelt wurde.

Darüber hinaus konnte sowohl für das *am_pm*- als auch für das *m_w*-Modell anhand einer Probe, die Acetaminophen-Merkaptursäure enthielt, gezeigt werden, dass es mit der beschriebenen Technik möglich war, Proben herauszufiltern, die sich biologisch gesehen von der ausgewählten Kontrollgruppe unterschieden. Neben der Detektion von solchen Ausreißern können in den *score plots* Eliminationskinetiken beobachtet werden, d. h. es kann verfolgt werden, ab wann sich eine „auffällige“ Probe wieder „normal“ verhält und durch das Kontrollmodell beschrieben wird.

Die Diskriminierung der beiden Gruppen gelang mit OPLS-DA Modellen deutlich besser als mit den entsprechenden PLS-DA Modellen. Da sich der modifizierte NIPALS-Algorithmus bei der OPLS-DA noch stärker als bei der PLS-DA auf die Diskriminierung von Klassen fokussiert, eignen sich entsprechende Modelle insbesondere für humane Metabonomicsdaten, die eine hohe

biologische Hintergrundvarianz aufweisen [254]. Verglichen mit der OSC-Methode unterliegen OPLS-DA Modelle weniger dem Phänomen des *overfitting* und weisen daher höhere Prädiktivitäten auf [175]. Auch kann der unkorrelierte, orthogonale Anteil der **X**-Matrix leichter untersucht werden als mit dem OSC-Filter. Für die Proben der Humanstudie wurde mittels OPLS-DA evaluiert, inwieweit sich die Merkaptursäuresignaturen über die drei Studientage unterschieden. Hierzu wurde der mit der *am_pm*- bzw. *m_w*-Klassifizierung unkorrelierte Part der **X**-Matrix näher betrachtet. Die *score plots* orthogonaler Komponenten lieferten keinen Hinweis auf einen Trend bezüglich der einzelnen Studientage. Die Ergebnisse zeigten, dass die endogenen Merkaptursäureprofile nur geringen Schwankungen unterlagen, die sich mit multivariaten Verfahren nicht abbilden ließen. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Umsetzung zukünftiger Metabonomicsprojekte. Denn nur bei einem relativ stabilen Hintergrund – einer biologisch gut charakterisierten, homogenen Kontrollgruppe – kann die Identifizierung abnormer Signaturen und im weiteren Verlauf spezifischer Marker gelingen.

Zum Aufbau von charakteristischen Profildatenbanken ist es unerlässlich, eine Vielzahl an biologischen Proben zu analysieren und entsprechende Signaturen zu katalogisieren. Dies ist in der Praxis mit gewissen Schwierigkeiten verbunden. Aufgrund der großen Probenzahlen können Proben vielfach nicht in einer *batch* analysiert werden, sondern müssen auf unterschiedliche Messreihen aufgeteilt werden [208, 230]. Für die NMR-Plattform stellt dies weiter kein Problem dar. Studien zur Evaluierung der NMR-Technik ergaben eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der Messungen verbunden mit nur kleinen analytischen Abweichungen ($RSD < 10\%$) für einzelne Signale [255]. So ergab sich für einen Datensatz an Proben, für den die Proben jeweils hälftig in zwei unterschiedlichen Labors gemessen wurden, nach Kombination eine lediglich 3 %ige Differenz in den PCA *scores*. Eine PLS-DA vermochte die Proben zwar zu trennen, die Varianz der diskriminierenden Komponente belief sich aber auf nur 4 % [169]. Darüber hinaus konnte für die QC-Proben einer großangelegten epidemiologischen Studie mittels PLS keine Korrelation mit dem Zeitpunkt der Analyse festgestellt werden [255].

Die QC-Proben des *3d one-batch*-Datensatzes bildeten in einer initialen PCA ein eng umrissenes Cluster. Die Messung erfüllte damit die Voraussetzungen, die SANGSTER *ET AL.* in der kürzlich vorgeschlagenen Strategie an die *intra-day*-Präzision von Metabonomicsanalysen stellte [248]. Dagegen verzeichneten die QC-Proben des *3d different-batches*-Datensatzes trotz stabiler analytischer Verhältnisse in der PCA einen deutlichen Trend. Aufgrund der randomisierten Messreihenfolge konnte angenommen werden, dass die Proben der Humanstudie keinem, durch die Analytik bedingten, systematischen Trend folgten. Der beobachtete Trend konnte durch ein *batch*-weise (tageweise) Skalierungsverfahren der Variablen eliminiert werden. Mit einer

analogen Strategie konnte aus dem *3d different-batches*-Daten ein Datensatz generiert werden, der hinsichtlich korrekter Klassifizierung und Prädiktivität mit dem originalen *3d one-batch*-Datensatz vergleichbar war. Ähnlich wie für den Datensatz geteilter NMR-Proben ergaben sich so für die beiden Datensätze nur geringe Differenzen in den PCA *scores*. Die Technik des *batch*-weise Skalierens wurde zuvor schon in ähnlichem Kontext von SHURUBOR ET AL. [214] beschrieben: Da ein Austausch der analytischen Säule sich negativ auf die folgende multivariate Datenanalyse auswirkte, wurde sowohl der Datensatz vor, als auch nach dem Wechsel, einem separaten Skalierungsprozess unterworfen. Durch diese Strategie lösten sich die beiden distinkten Cluster im PCA *score plot* auf und eine anschließend durchgeführte PLS-DA vermochte die beiden Datensätze nicht mehr zu trennen [214]. Analog ermöglichte ein Verfahren, das alle Variablen eines Probanden einem *autoscaling*-Prozess unterwarf, die inter-individuelle Variation in dem Probandenkollektiv zu reduzieren, so dass metabolische Zeitprofile erstellt werden konnten [208].

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Strategie zur Datenfusion ist ein wichtiger Schritt hin zu einer Routineanwendung der Metabonomicstechnik, beispielsweise in der klinischen Praxis. Zukünftig sollte es möglich sein, Patientenproben zu einem beliebigen Zeitpunkt zu sammeln und sie dann mit Urinprofilen einer zuvor etablierten Datenbank zu vergleichen.

PROJEKT 4: Tierexperimentelle Modellstudie zur Untersuchung von oxidativem Stress *in vivo*

1 Einleitung

Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und adversen Effekten auf die Gesundheit ist seit langem bekannt und wird insbesondere für Herz-Kreislauf-, Atemwegs- und neurologische Erkrankungen diskutiert [256, 257]. Daneben wird die Schädigung körpereigener Strukturen wie Lipiden, Proteinen oder der DNA durch freie Radikale allgemein mit dem Alterungsprozess in Zusammenhang gebracht [258, 259]. Die Aktivität freier Radikale kann *in vivo* mit Elektronenspinresonanz bestimmt werden. Allerdings ist diese Technik aufgrund der erforderlichen Verabreichung sogenannter *spin traps* auf Studien im Versuchstier beschränkt [260]. Die Abschätzung einer oxidativen Schädigung des Menschen durch Radikale muss daher indirekt anhand von Reaktionsprodukten erfolgen. Für das Biomonitoring müssen spezifische und sensitive Biomarker identifiziert werden, die selektiv und nicht-invasiv in biologischen Proben wie Urin oder Blut gemessen werden können. Dieses Ziel wird unter anderem in der *Biomarkers of Oxidative Stress Study* (BOSS) verfolgt [261].

Eine Modellsubstanz, die in Zusammenhang mit oxidativem Stress vielfach Anwendung findet, ist Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4). Dieses wird in der Leber reduktiv via Cytochrom P 450 2E1 zu Radikalen ($\bullet\text{CCl}_3$, $\bullet\text{OOCCL}_3$, $\bullet\text{CO}_2$, $\bullet\text{CCl}_2$, $\bullet\text{Cl}$) dehalogeniert [262, 263]. Die metabolisch gebildeten radikalischen Intermediate sind extrem kurzlebig und provozieren sekundäre Reaktionskaskaden wie die Lipidperoxidation. Der Mechanismus, bei dem initial Wasserstoffatome aus polyungesättigten Membranlipiden abstrahiert werden, ist äußerst komplex und führt zu Brüchen oxidierter Lipidketten. Auf diesem Weg kann eine breite Palette reaktiver 4-Hydroxyaldehyde sowie zahlreicher Folgeprodukte entstehen [263]. Elektrophile Intermediate wie das 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) können in der Leber durch Konjugation mit Glutathion entgiftet werden bzw. durch enzymatische Reduktion in weniger reaktive Spezies wie das 1,4-Dihydroxynonen (DHN) überführt werden. Der oxidative Weg führt zur 4-Hydroxy-2-nonensäure, die über die β -Oxidation abgebaut werden kann. Daneben wurden *in vivo* die Metaboliten CO_2 , CHCl_3 (Chloroform), CCl_3CCl_3 und $\text{O}=\text{CCl}_2$ (Phosgen) nachgewiesen [262]. Effekte nach CCl_4 -Exposition werden hauptsächlich in der Leber beobachtet. Toxische Dosen führen zur Akkumulation von Lipiden (Fettleber), zu centrilobulären Nekrosen, Fibrosen und Zirrhosen. Der LD_{50} -Wert in der Ratte wird bei oraler Verabreichung mit 6.4 mL/kg KG (10 g/kg KG) angegeben [264].

Der Zusammenhang zwischen radikalischen Metaboliten und der Bildung von Glutathion-Addukten, sekundär durch Lipidperoxidation entstandener reaktiver Intermediate, bildete den

Hintergrund für eine weitere *proof-of-concept*-Studie. Mit dem Ziel, Biomarker für oxidativen Stress zu identifizieren, wurden in einer Modellstudie männliche F344 Ratten mit zwei nicht-letalen CCl₄-Dosen exponiert. Neben der Dosisabhängigkeit sollte die Kinetik der Urinprofile untersucht werden. Um das Ausmaß der biologischen Variabilität und den Einfluss von äußeren Stressfaktoren zu charakterisieren, wurden die Tiere bereits fünf Tage vor Dosierung beobachtet. Sowohl klassische Metabolismusstudien als auch NMR-basierte Metabonomicsstudien weisen darauf hin, dass Effekte in Folge von CCl₄ in den ersten 48 h nach Dosierung auftreten [167, 221, 260, 261]. Um den Stand der Regeneration zu überprüfen, wurden für fünf Tage *postdose* und für weitere zwei Tage (Tag 10 und 11 *postdose*) Urinproben gesammelt. In einem iterativen Verfahren sollten hierbei unterschiedliche multivariate Strategien gegenübergestellt und dahingehend optimiert werden, aussichtsreiche Merkmalsprofile bzw. -muster für oxidativen Stress zu identifizieren. Eine kürzlich publizierte Metabonomicsstudie konnte zeigen, dass unterschiedliche Stressoren eine ähnliche systemische Antwort provozieren und dies anhand der Metabolitenprofile im Plasma von Ratten nachweisbar ist [54]. Eine Übertragung des Ansatzes auf den Menschen könnte in Zukunft dazu dienen, ein Biomonitoring für Krankheiten zu entwickeln, die im Verdacht stehen, durch oxidativen Stress ausgelöst zu werden bzw. diesen sekundär auszulösen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben. Alle verwendeten Lösungsmittel entsprachen HPLC-Qualität und wurden von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Ameisensäure (98 – 100 %) und Salzsäure (25 %) in analytischer Qualität stammten von Merck (Darmstadt, Deutschland). *D*₃-Acrylamid-MA wurde gemäß der kürzlich in der Literatur beschriebenen Vorschrift synthetisiert und charakterisiert [209]. Die Synthese des Hydrochinon-Cysteinkonjugates erfolgte nach CALLEMAN *ET AL.* [265] aus Benzochinon und *L*-Cystein. Abweichend von dieser Vorschrift wurde die wässrige Lösung mehrmals mit Dichlormethan (mit HCl 25 % auf pH = 2 eingestellt) extrahiert und die H₂O-Phase gefriergetrocknet. Das isolierte Hydrochinon-Cysteinkonjugat wurde nach KELLERT *ET AL.* [209] mit *d*₆-Acetanhydrid versetzt und die *d*₃-Hydrochinon-MA mit Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter Vakuum abgezogen. Aus den Edukten *S*-Benzyl-*L*-Cystein und *d*₆-Acetanhydrid wurde analog der interne Standard *d*₃-Benzyl-MA synthetisiert. Die Synthese und Charakterisierung von 4-*tert*-Butylbenzyl-MA

erfolgte nach dem in DEKANT *ET AL.* [210] publizierten Protokoll aus 4-*tert*-Butylbenzylbromid und *N*-Acetyl-L-Cystein. Die Mercaptursäuren von 4-Hydroxy-2-nonenal und 1,4-Dihydroxynonen, HNE-MA und DHN-MA, wurden von der Firma Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz) synthetisiert, vollständig charakterisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2 Interner Standardmix

Es wurde eine wässrige Lösung aus den folgenden vier Mercaptursäurestandards hergestellt: *d*₃-Acrylamid-MA (50.0 mg/L), *d*₃-Hydrochinon-MA (100.0 mg/L), *d*₃-Benzyl-MA (5.0 mg/L) und 4-*tert*-Butylbenzyl-MA (1.0 mg/L).

2.3 Standardlösung für die Markeridentifizierung

Für den HNE-MA Standard wurde eine 0.1 µM, für den DHN-MA Standard eine 1.0 µM wässrige Lösung hergestellt. Es wurde jeweils 1.0 mL der Standardlösung mit 10 µL HCl (25 %) versetzt und analog den Urinproben vermessen.

2.4 Design der tierexperimentellen Studie mit Tetrachlorkohlenstoff-Exposition

Männliche F344 Ratten (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland, Gewicht 200–220 g bei der Ankunft) wurden zufällig in drei Gruppen (Kontrollgruppe, Niedrigdosisgruppe, Hochdosisgruppe) zu je fünf Tieren aufgeteilt und bis Versuchsbeginn in Makrolon-Käfigen bei einem 12 h Licht-/Dunkelzyklus (7–19 Uhr hell, 19–7 Uhr dunkel) gehalten. Standardfutter (ssniff[®] R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und autoklaviertes Wasser standen zu jeder Zeit *ad libitum* zur Verfügung. Die durchschnittliche Temperatur im Tierhaus betrug 22 ± 2 °C bei 50–60 % relativer Luftfeuchte. Nach drei Tagen Akklimatisierung wurden die Tiere in Metabolismuskäfige umgesetzt. Den Versuchsablauf zeigt **Abb. 33**: Ohne Exposition wurden zunächst für fünf Tage (-120–0 h *predose*) 12 h-Urine in eisgekühlte Vorlagen gesammelt (*predose*-Phase, Tag 1–5). Am Morgen des sechsten Versuchstages erhielt die Hochdosisgruppe 1.0 mL/kg KG (1600 mg/kg KG), die Niedrigdosisgruppe 0.1 mL/kg KG (160 mg/kg KG) Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) in Maiskeimöl peroral via Schlundsonde. Die dritte Gruppe diente als Kontrollgruppe, ihr wurde nur der Ölvektor (4 mL/kg KG) verabreicht. Es wurden für weitere fünf Tage (0–120 h *postdose*) 12 h-Urine gesammelt (*postdose*-Phase I, Tag 6–10) und die Tiere im Anschluss gruppenweise in Makrolon-Käfige zurückgesetzt. Am Studientag 16 wurden die Ratten erneut in Metabolismuskäfige überführt und für weitere zwei Tage (240–288 h *postdose*) 12 h-Urine gesammelt (*postdose*-Phase II, Tag 16–17). Der Versuch wurde nach Maßgabe des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.5 Klinische Chemie

Der Kreatiningehalt und die Osmolalität der Urinproben wurden routinemäßig im Labor des Universitätskrankenhauses Würzburg bestimmt. Die spezifische Dichte der Urinproben wurde mittels eines Handrefraktometers (DRC-200, PCE Group, Meschede, Deutschland) ermittelt.

2.6 Vorbereitung der Urinproben für die erste Messung (Versuchstage 1 – 17, Verdünnungsfaktor 5)

Die Urinproben wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach dem Zentrifugieren (14000 g, 4 °C, 10 min) wurden 200 µL Urin in ein Eppendorf Cap transferiert, mit 800 µL H₂O, 10 µL HCl (25 %) sowie 10 µL interner Standardlösung versetzt und nach dem Vortexen bei -20 °C eingefroren. Vor der LC-MS/MS-Analyse wurden die vorbereiteten Proben aufgetaut, erneut zentrifugiert (14000 g, 4 °C, 10 min) und in Autosamplervials überführt. Die Probenvorbereitung erfolgte randomisiert.

Aus 50 beliebig herausgegriffenen Urinproben wurde ein Poolurin hergestellt. Zur Herstellung der Quality Control Probe (QC-Probe) wurden anschließend 10 mL Poolurin mit 40 mL H₂O, 500 µL HCl (25 %) sowie 500 µL internem Standardmix versetzt, in 48 Eppendorf Caps aufgeteilt und fortan wie die restlichen Proben behandelt.

2.7 Vorbereitung der Urinproben für die zweite Messung (Versuchstage 6 und 7, Verdünnung auf einheitliche spezifische Dichte)

Für die zweite Messung wurde ein frisches Aliquot der Versuchstage 6 und 7 (n = 20 für jede Gruppe) verwendet. Die Urinproben wurden randomisiert, bei Raumtemperatur aufgetaut und bei 14000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die mittels des Handrefraktometers ermittelte spezifische Dichte der Proben wurde als Ausgangspunkt für die Verdünnung herangezogen. Alle Proben wurden im Eppendorf Cap mit H₂O auf den niedrigsten Messwert der Serie (spezifische Dichte 1.008, Urinprobe: HD 6/2_R4) verdünnt. Dabei wurde die Menge an Urin und H₂O so berechnet, dass sich ein Gesamtvolumen von 800 µL ergab. Nach Zugabe von 8 µL HCl (25 %) und 8 µL interner Standardlösung wurden die Proben gevortext und zur Zwischenlagerung bei -20 °C eingefroren. Vor der Messung wurden die vorbereiteten Proben aufgetaut, erneut zentrifugiert (14000 g, 10 min, 4 °C) und in Autosamplervials überführt.

Für Validierungszwecke wurden zusätzlich QC-Proben benötigt. Hierzu wurde aus den 60 Proben ein Poolurin hergestellt, das zunächst ebenfalls auf eine spezifische Dichte von 1.008 verdünnt wurde. Durch Zugabe der entsprechenden Mengen an HCl (25 %) und Standardlösung wurden

daraus elf QC-Proben hergestellt, die bis zur eigentlichen Messung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischengefroren wurden.

2.8 Vorbereitung der Urinproben für die Markeridentifizierung

Für die Markeridentifizierung wurden für die Sammelperioden HD 6/1, HD 6/2, HD 7/1 und HD 7/2 die Urinproben der fünf Versuchstiere jeweils gepoolt. Es wurden zwei Serien hergestellt: Für das erste Set an Poolurinen wurden aus den Autosamplervials der 1:5-verdünnten Proben jeweils $100\text{ }\mu\text{L}$ in ein neues Vial überführt. Entsprechend wurde für die zweite Serie mit den auf einheitliche spezifische Dichte verdünnten Proben verfahren.

2.9 Chromatographische Parameter

Zur chromatographischen Trennung der Urinmetaboliten kam eine Säulenschaltung zur Anwendung (siehe **Abb. 23**). Diese umfasste eine binäre und eine quaternäre Pumpe, einen Autosampler mit einer $900\text{ }\mu\text{L}$ Probenschleife, sowie ein softwaregesteuertes elektrisches Valve.

HPLC-Anlage:	Binäre und quaternäre Pumpe Serie 1100 mit Autosampler Serie 1100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Software:	Analyst 1.4.1 (Applied Biosystem/MDS Sciex, Concord, ON, Kanada)
Vorsäule:	C_{18} ODS, $4 \times 3\text{ mm}$ (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Trap-Säule:	ReproSil-Pur C_{18} -AQ, $5.0\text{ }\mu\text{m}$, $33 \times 3\text{ mm}$ (Dr. Maisch, Ammerbuch, Deutschland)
Analytische Säule:	ReproSil-Pur C_{18} -AQ, $3.0\text{ }\mu\text{m}$, $150 \times 2\text{ mm}$ (Dr. Maisch)
Fließmittel A:	0.1 % Ameisensäure (0.1 % FA)
Fließmittel B:	Acetonitril (ACN)
Fluss:	0.200 mL/min (analytische Säule) 1.000 mL/min (Trap-Säule)
Injektion:	$300\text{ }\mu\text{L}$
Elektrisches Valve:	1.1 min Position 1 (Laden) 10.0 min Position 2 (Elution)

Gradient analytische Säule:	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	0.1 % FA	ACN
	0.00	0.200	95	5
	2.00	0.200	95	5
	25.00	0.200	50	50
	27.00	0.200	10	90
	29.00	0.200	10	90
	31.00	0.200	95	5
	40.00	0.200	95	5

Gradient Trap-Säule:	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	0.1 % FA	ACN
	0.00	1.000	100	0
	1.10	1.000	100	0
	1.20	0.000	100	0
	28.00	0.000	100	0
	28.10	1.000	100	0
	29.00	1.000	10	90
	30.00	1.000	10	90
	31.00	1.000	100	0
	40.00	1.000	100	0

2.10 Massenspektrometrische Parameter

Als Massendetektor kam eine mit einer TurboIonSpray[®]-Quelle ausgestattete Triple Quadrupol gekoppelte lineare Ionenfalle (QTRAP[®] 2000, Applied Biosystem/MDS Sciex) zum Einsatz. Das Gerät operierte im negativen Ionisationsmodus. Allgemeine Quellen- und Gaseinstellungen, sowie die Parameter für die lineare Ionenfalle waren im Einzelnen: *ionspray voltage* -4.2 kV, *vaporizer temperature* 400 °C, *nebulizer gas* (N₂) 45 psi, *turbo gas* (N₂) 50 psi, *curtain gas* (N₂) 30 psi, *collision gas* (N₂) medium (thMRM)/high (EPI), *declustering potential* (DP) -50 V, *entrance potential* (EP) -10 V, *collision energy* (CE) -20 V (thMRM) bzw. -30 V (EPI) und *collision cell exit potential* (CXP) -2 V. Bei DP, EP, CE und CXP handelte es sich jeweils um *offset*-Spannungen.

2.11 Theoretisches *multiple reaction monitoring*-Screeningmethode

Im *profile*-Modus wurde der theoretische *multiple reaction monitoring* (thMRM) *survey scan* ($m/z \rightarrow m/z-129$ Da) im Bereich von $m/z = 170 - 450$ durchgeführt. Der erste Quadrupol (Q1) operierte mit *unit*, der dritte Quadrupol (Q3) mit niedriger Auflösung (*low*). Die internen Mercaptursäurestandards *d*₃-Acrylamid-MA, *d*₃-Hydrochinon-MA und *d*₃-Benzyl-MA wiesen jeweils eine isotopenmarkierte *N*-Acetyl-L-Cystein-Einheit auf, daher wurden die einem CNL von 132 Da entsprechenden theoretischen Übergänge 236.1 \rightarrow 104.1, 273.1 \rightarrow 141.1 und 255.1 \rightarrow 123.1 berechnet. Insgesamt ergaben sich somit 284 mercaptursäurespezifische

Massenübergänge (284 thMRMs). Die *dwell time* pro Übergang betrug je 5.0 ms bei einer *mass range pause* von 5.0 ms.

2.12 ThMRM-IDA-EPI-Methode zur Identifizierung der selektierten Marker

Für die Identifizierung der Marker kam eine selektive thMRM-IDA-EPI-Methode (vgl. Projekt 3, Abschnitt 2.8) zur Anwendung. Hierzu wurden die Übergänge $318.2 \rightarrow 189.1$ und $320.2 \rightarrow 191.1$ für den HNE-MA und DHN-MA Standard (*dwell time* pro Übergang 50.0 ms, *mass range pause* 5.0 ms) mit den folgenden IDA-Kriterien gekoppelt: für alle Signale, die im thMRM-Scan den Schwellenwert von 2000 counts/s überschritten, wurde ein EPI aufgezeichnet. Überschritten mehrere *m/z* gleichzeitig den Grenzwert, wurde automatisch der intensivste Peak ausgewählt. Alle Ionen, von denen bereits ein EPI aufgenommen wurde, wurden anschließend für mindestens 15 s von der Detektion ausgeschlossen. Die Massentoleranz betrug 250 mmu.

Die EPIs wurden im negativen Ionisationsmodus bei einer Kollisionsenergie von -30 V (*collision energy spread* -2 V) aufgenommen. Dabei wurden jeweils zwei Scans aufsummiert. Gebildete Fragmente wurden bei einer *scan rate* von 4000 amu/s, sowie einer Q3 *entry barrier* von 8 V für 20 ms in der Ionenfalle gesammelt (*fixed fill time*) und im Bereich von *m/z* = 50 – 350 detektiert.

2.13 Analyseprotokoll der ersten Messung

Die Proben (n = 360) wurden randomisiert und in vier *batches* mit ungefähr gleicher Probenanzahl aufgeteilt. Um die Verweildauer der Proben im Autosampler möglichst gering zu halten, wurden die Proben einer *batch* nochmals geteilt und die zweite Hälfte erst unmittelbar vor der Messung aufgearbeitet. Einer *batch* wurden jeweils zwei Leerläufe (H₂O) sowie zwei QC-Proben vorangestellt. Jede zehnte Probe stellte eine QC-Probe dar. Vor Beginn einer neuen *batch* wurde die Messung gestoppt, die *curtain plate* gründlich gereinigt und die analytische Säule für 20 min gespült (Acetonitril/0.1 % Ameisensäure 50/50 vol/vol). Im Anschluss wurde die Säule auf Ausgangsbedingungen zurückgespült und für mindestens 20 min äquilibriert. Zudem wurde nach ungefähr der Hälfte der Proben die Vorsäule gewechselt, nach etwa zwei Dritteln der Proben wurde die Trap-Säule ersetzt.

2.14 Analyseprotokoll der zweiten Messung

Die randomisierten Proben wurden in einer *batch* vermessen. Zunächst wurde nur die Hälfte der Proben aufgearbeitet, um die Verweildauer im Autosampler möglichst gering zu halten. Die Vorbereitung der restlichen Proben erfolgte erst unmittelbar vor Beendigung der ersten Hälfte der

batch. Der Messung wurden zwei Leerläufe (H₂O) sowie fünf QC-Proben vorangestellt. Nach jeder zehnten Probe wurde eine QC-Probe vermessen.

2.15 Datenverarbeitung und chemometrische Datenanalyse

Peakdetektion, Datenfilterung und Alignment der thMRM-Daten sowie Skalierungen (auf interne Standards) und Normalisierungen (auf Gesamturinvolumen, Kreatiningehalt, Osmolalität bzw. spezifische Dichte) wurden mit *MarkerView*TM Software Version 1.2.0.1 (Applied Biosystems/MDS Sciex) durchgeführt. Folgende Softwareparameter wurden gewählt: *smoothing half-width* 1 point, *baseline subtraction window* 1.0 min, *noise percentage* 50 %, *peak-splitting factor* 4, *minimum required intensity* 500, *minimum peak width* 2 points, *minimum signal-to-noise* 3.0, *maximum number of peaks* 500, *retention time (RT) tolerance* 1.0 min. Die Proben wurden anhand eines globalen Faktors skaliert, der aus der Response der vier internen Merkaptursäurestandardvariablen (*m/z_m/z-129_RT* bzw. *m/z_m/z-132_RT*) berechnet wurde. Chemometrische Analysen – PCA, PLS-DA und OPLS-DA – wurden mit *SIMCA-P+* Software Version 11.5 (Umetrics, Umeå, Schweden) durchgeführt. Die Variablen wurden vor Erstellung der Modelle zentriert und skaliert (*autoscaling* bzw. *pareto scaling*). Signifikante Komponenten wurden mittels siebenfacher Cross-Validierung (Standardeinstellung in *SIMCA-P+*) bestimmt. Die Qualität (Prädiktivität) der Modelle wurde durch den Faktor Q^2 (vgl. Projekt 2 Abschnitt 2.8.5.2) charakterisiert. Die klassische Evaluierung der identifizierten Marker erfolgte mit *Excel 2002* (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Parameter der Versuchstiere

Da Metabonomicsstudien gegenüber Confoundern sehr störanfällig sind, wurden die Gewichtszunahme der Tiere sowie die klinischen Parameter der Urinproben über den Studienverlauf beobachtet. Zudem wurden das Gewicht der linken und rechten Niere sowie der Leber *post mortem* untersucht. Das Ziel der Studie stellte die Untersuchung von oxidativem Stress *in vivo* dar. Der Fokus lag dabei auf der Ausscheidung von stressbedingten Merkaptursäuren mit dem Urin. Da der mit einer Blutentnahme für die Tiere einhergehende Stress vermieden werden sollte, wurde auf eine klinische Chemie des Blutes verzichtet. Da nur Trends und Störfaktoren identifiziert werden sollten, wurde zur besseren Übersicht in den Diagrammen lediglich der Mittelwert der fünf Versuchstiere ohne Angabe von Standardabweichungen dargestellt. Bei signifikanten Unterschieden wurden die p-Werte des entsprechenden t-Tests angegeben. Dabei

erfolgte die Gegenüberstellung der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe sowie der Kontroll- und Hochdosisgruppe jeweils unabhängig voneinander.

3.1.1 Gewichtsverlauf

Die Tiere wurden insgesamt sechsmal gewogen; bei ihrer Ankunft im Labor (Versuchstag -3), vor Versuchsbeginn (Beginn der Sammelperiode 1/1, Versuchstag 1), unmittelbar vor der Sondierung (Beginn der Sammelperiode 6/1, Versuchstag 6), nach *postdose*-Phase I (Ende der Sammelperiode 10/2, Versuchstag 11), vor *postdose*-Phase II (Beginn der Sammelperiode 16/1, Versuchstag 16) sowie nach *postdose*-Phase II (Ende der Sammelperiode 17/2, Versuchstag 18). Der mittlere Gewichtsverlauf der fünf Versuchstiere ist in **Abb. 34** für jede Gruppe dargestellt.

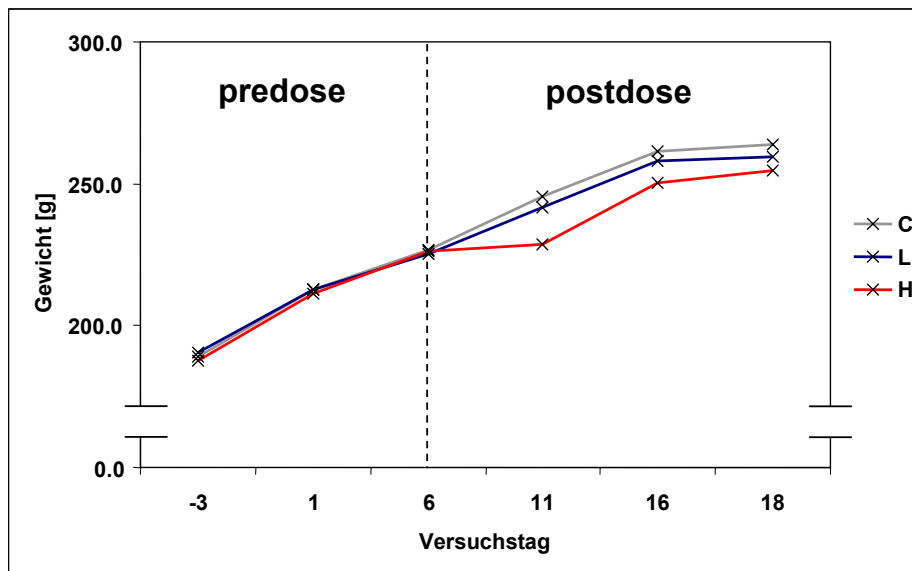


Abb. 34: Mittlerer Gewichtsverlauf der fünf F344 Ratten in den drei Gruppen während der Studie. Die Dosierung mit 4.0 mL Ölvektor/kg KG (C, Kontrollgruppe), 0.1 mL CCl₄/kg KG (L, Niedrigdosisgruppe) bzw. 1.0 mL CCl₄/kg KG (H, Hochdosisgruppe) erfolgte am Morgen des sechsten Versuchstages.

Bis zur Dosierung mit Tetrachlorkohlenstoff (Versuchstag 6) verliefen die Gewichtskurven der drei Gruppen parallel. Fünf Tage nach Exposition (Versuchstag 11) waren die größten Unterschiede zu verzeichnen. Während die Niedrigdosisgruppe eine ähnliche Gewichtszunahme wie die Kontrollgruppe zeigte, stagnierte das Gewicht der Hochdosisgruppe (t-Test CD 10/2_HD 10/2: $p < 0.05$). Ab Versuchstag 16 verliefen die Kurven wieder nahezu parallel, wobei sowohl die Gewichtszunahme der Niedrigdosisgruppe als auch die der Hochdosisgruppe leicht unter der der Kontrollgruppe lag. Gewichtsabnahmen in Folge der Verabreichung toxischer Substanzen wurden vielfach in der Literatur beschrieben, so auch für CCl₄ [212] und können nur

durch aufwändige, paarweise Fütterungsversuche kompensiert werden. Derlei Effekte müssen jedoch vor dem Hintergrund multivariater Datenanalysen kritisch gesehen werden. Es ist allerdings anzunehmen, dass das gewählte Monitoring durch die Fokussierung auf die Expositionsmarkerklasse der Merkaptursäuren in geringerem Maße als klassische *full scan*/TOF-Ansätze durch Confounder beeinflusst werden, die auf eine unterschiedliche Nahrungsaufnahme der Tiere zurückzuführen sind.

3.1.2 Verlauf der klinischen Parameter im Urin

Der Verlauf der klinischen Parameter Gesamturinvolumen, spezifische Dichte, Kreatiningehalt sowie Osmolalität ist in **Abb. 35 A – D** dargestellt. Es zeichnete sich in allen vier Zeitverläufen ein ähnlicher Trend ab. An den Versuchstagen 6 und 7 zeigten die Tiere der Hochdosisgruppe im Vergleich zur Kontroll- bzw. Niedrigdosisgruppe eine deutlich erhöhte Urinausscheidung. Dementsprechend lagen die Werte für die spezifische Dichte, den Kreatiningehalt und die Osmolalität der Proben niedriger.

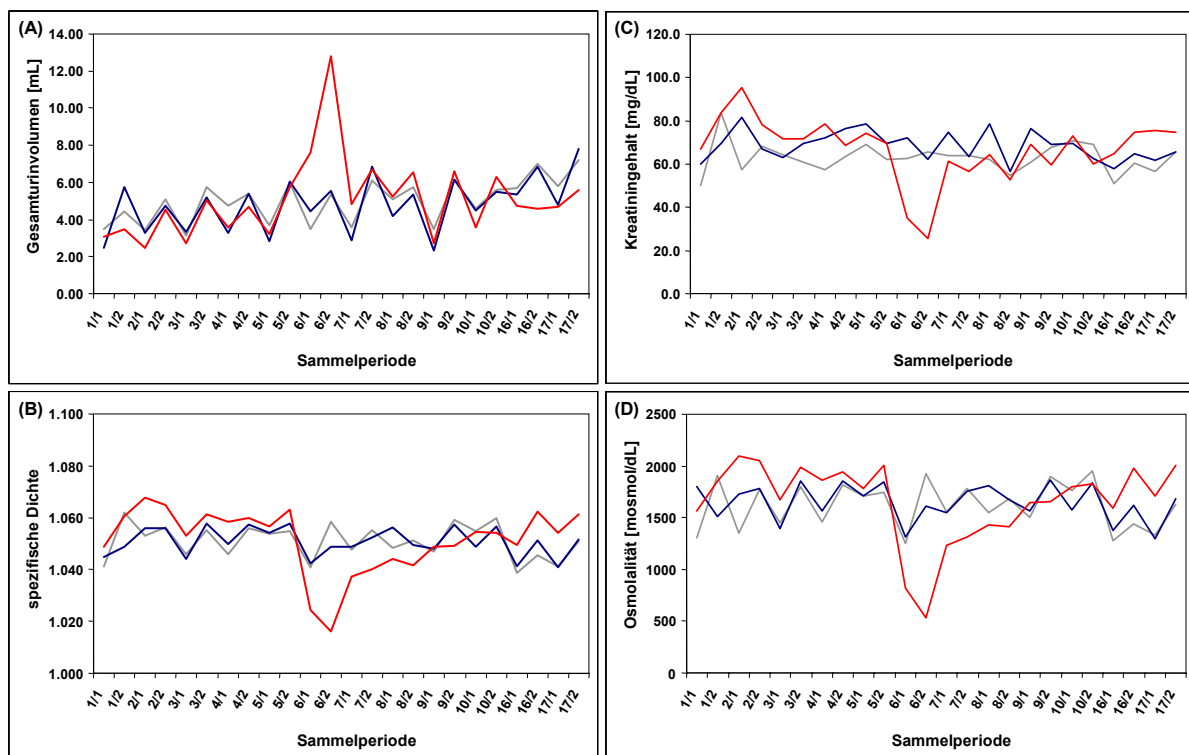


Abb. 35: Mittlerer Verlauf (Mittelwerte der fünf Versuchstiere) der klinischen Parameter der Urinproben: (A) Gesamturinvolumen, (B) spezifische Dichte, (C) Kreatiningehalt und (D) Osmolalität über den Zeitraum der 17 Studientage in Abhängigkeit von der Dosisgruppe; Schlüssel: — Kontrollgruppe, — Niedrigdosisgruppe, — Hochdosisgruppe.

Der t-Test CD_{HD} lieferte für die Sammelperioden 6/1 und 6/2 (0–24 h *postdose*) für alle Parameter jeweils signifikante ($p < 0.05$) bis hochsignifikante ($p < 0.01$) Unterschiede. Durch die große Streuung der klinischen Parameter an Versuchstag 7 waren die augenscheinlichen Unterschiede nicht signifikant. Kontroll- und Niedrigdosisgruppe unterschieden sich nur in Sammelperiode 6/2 bezüglich der spezifischen Dichte und der Osmolalität.

Toxizitäten sind in den seltensten Fällen auf ein Organ beschränkt, meist treten Effekte an mehreren Zielorganen auf oder es werden systemische Veränderungen festgestellt. Neben der Leber können nach CCl₄-Exposition in der Niere adverse Effekte (Oligurie, Anurie, Proteinurie, Nekrosen im proximalen Tubulus) auftreten. Allerdings sind die histologischen und funktionalen Veränderungen selbst bei Dosen von 4000 mg CCl₄/kg KG reversibel. Für eine Dosis von 160 mg CCl₄/kg KG, wie sie den Tieren der Niedrigdosisgruppe verabreicht wurde, wurden für die Ratte keine adversen Effekte beschrieben [212]. In beiden Sammelperioden des sechsten Versuchstages wurde für die Tiere der Hochdosisgruppe eine signifikant erhöhte Harnausscheidung registriert. Ob es sich bei der Polyurie um eine vorübergehende physiologische Veränderung (Diurese) oder um eine reversible Schädigung der Niere handelte, konnte an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden.

3.1.3 Organgewichte

Niere links/rechts: Bei Versuchsende war das auf das Körpergewicht der Ratten bezogene relative Organgewicht der linken Niere in der Hochdosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (t-Test: $p < 0.05$). Für das relative Gewicht der rechten Niere konnten dagegen keine Unterschiede ermittelt werden. Ein Vergleich der entsprechenden relativen Organgewichte der Kontroll- und der Niedrigdosisgruppe ergab sowohl für die linke als auch für die rechte Niere keine signifikanten Unterschiede. Des Weiteren konnten hinsichtlich der mittleren absoluten Organgewichte der linken und rechten Niere im t-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden.

Leber: Sowohl das absolute als auch das relative durchschnittliche Gewicht der Leber lag bei Versuchsende in der Hochdosisgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (t-Test: $p < 0.01$). So wiesen die Tiere der Hochdosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe fast dreifach höhere relative Organgewichte auf. Dieser Unterschied konnte bei einem Vergleich der Niedrigdosisgruppe mit der Kontrollgruppe nicht festgestellt werden. Eine zusammenfassende Übersicht über die Organgewichte gibt **Tab. 3**.

Tab. 3: Mittlere absolute und relative (bezogen auf das Körpergewicht) Organgewichte der fünf F344 Ratten in der Kontroll-, Niedrigdosis- und Hochdosisgruppe bei Versuchsende. Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Gegenüberstellung der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe sowie der Kontroll- und Hochdosisgruppe erfolgte jeweils unabhängig voneinander mittels t-Test. (* $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$).

	absolute Organgewichte [g]			relative Organgewichte [%]		
	Leber	Niere links	Niere rechts	Leber	Niere links	Niere rechts
Kontrollgruppe	14.7 \pm 2.2	0.96 \pm 0.07	0.98 \pm 0.09	5.57 \pm 0.78	0.36 \pm 0.03	0.37 \pm 0.03
Niedrigdosisgruppe	14.5 \pm 2.5	0.92 \pm 0.06	0.93 \pm 0.07	5.61 \pm 1.05	0.35 \pm 0.02	0.36 \pm 0.03
Hochdosisgruppe	18.4 \pm 0.7**	1.01 \pm 0.05	1.00 \pm 0.05	16.09 \pm 5.12**	0.40 \pm 0.01*	0.39 \pm 0.01

Die Zunahme des absoluten und relativen Gewichts der Leber in den Tieren der Hochdosisgruppe stimmte mit dem toxischen Mechanismus von CCl_4 überein und deutete auf massive Schädigungen des Organs hin. Die hohe Übereinstimmung der Werte für die Kontroll- und Niedrigdosisgruppe lieferte hierbei einen ersten Hinweis bezüglich der Dosisabhängigkeit der verabreichten Substanz.

3.2 Erste Messung: Merkaptursäurescreening mit einheitlich verdünnten Urinproben

3.2.1 Theoretisches *multiple reaction monitoring* mit Säulenschaltungskopplung

Aufgrund der bereits diskutierten Vorteile wurden die Proben mittels theoretischem *multiple reaction monitoring* (thMRM) analysiert. Der Massenbereich des *survey scans* wurde nach unten hin erweitert, um auch Metaboliten wie Methyl-MA oder Ethyl-MA, endogene Merkaptursäuren, erfassen zu können. Der *S*-Phenyl-MA Standard, der bisher die mittelpolare Region der Chromatogramme charakterisierte, wurde durch zwei isotope markierte Merkaptursäurestandards, d_3 -Hydrochinon-MA (RT 15.3 min) und d_3 -Benzyl-MA (RT 24.3 min), ersetzt. Der d_3 -Acrylamid-MA (RT 7.3 Min) sowie der 4-*tert*-Butylbenzyl-MA (RT 32.2 min) Standard wurden beibehalten. Für die deuterierten Standards wurden die Übergänge $m/z \rightarrow m/z-132$ Da berechnet und in den *survey scan* mit aufgenommen. Aus den vormals zwei wurden so drei Retentionszeitfenster mit einer Breite von jeweils 8 – 9 Minuten generiert (**Abb. 36**). Die internen Standards wurden zum einen zur Evaluierung der Messung, zum anderen zur Skalierung der unbekannt Signale verwendet. herangezogen. In Vorversuchen unter alleiniger Verwendung der Trap-Säule zeigte sich, dass ein im Vergleich zur Methode für Humanurin erhöhter Fluss und ein effizienterer Gradient zur Anreicherung der Rattenurinproben besser geeignet waren.

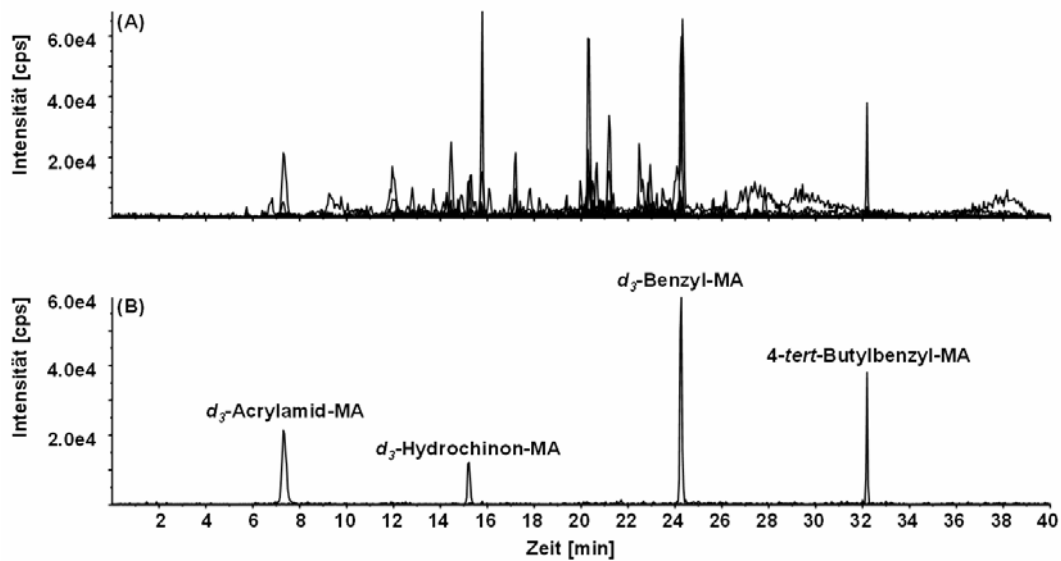


Abb. 36: (A) Charakteristisches Totalionenstromchromatogramm der 284 thMRM-Übergänge der Form $m/z \rightarrow m/z-129$ Da (bzw. $m/z \rightarrow m/z-132$ Da für die deuterierten Merkaptoarsäurestandards), (B) extrahierte Übergänge der vier internen Merkaptoarsäurestandards d_3 -Acrylamid-MA (236.1 \rightarrow 104.1), d_3 -Hydrochinon-MA (273.1 \rightarrow 141.1), d_3 -Benzyl-MA (255.1 \rightarrow 123.1) und 4-*tert*-Butylbenzyl-MA (308.2 \rightarrow 179.1).

Da sich die Zusammensetzung von Human- und Rattenurin deutlich unterscheidet, wurde in Vorversuchen erneut das optimale Injektionsvolumen sowie ein geeigneter Verdünnungsfaktor für die Proben ermittelt. Hierzu wurden Urinproben mit unterschiedlichen Gesamturinvolumina herangezogen. In der Literatur wird in Metabonomics- und *metabolic profiling*-Ansätzen für Urinproben von Versuchstieren häufig mit Verdünnungsfaktoren von vier oder fünf gearbeitet [241, 266]. Es wurden daher unverdünnte Proben, 1:5- sowie 1:10-verdünnte Proben vermessen. Des Weiteren wurden drei unterschiedliche Injektionsvolumina getestet (200 μ L, 300 μ L und 400 μ L). Die besten Resultate bezüglich der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse wurden bei fünf-facher Verdünnung und 300 μ L Injektionsvolumen erzielt. Unter Zuhilfenahme der Schaltzeit für das elektrische Ventil, des Totvolumens der Trap-Säule, des Trap-Säulen-Flusses sowie des optimalen Injektionsvolumens konnte berechnet werden, dass mit der optimierten Anordnung ein circa 3.5-facher Spüleffekt erzielt werden kann, d. h. nach dem Laden der Trap-Säule wurde diese 3.5-mal vollständig mit dem Fließmittelgemisch gespült und auf diese Weise Salze und andere störende Substanzen entfernt.

Alternative Strategien zur Reduktion von Matrixeffekten für Screeningmethoden auf dem Gebiet des Metabonomics umfassen unter anderem den Einsatz der *ultra performance liquid chromatography* (UPLC) Technik [234, 241], der zweidimensionalen Flüssigchromatographie [267], von Microbore-Säulen [268] und die *a priori* Extraktion von Metaboliten [104, 107].

Der limitierende Faktor bei der Prozessierung von Metabonomicsdatensätzen ist die softwaregestützte Konvertierung der chromatographischen und massenspektrometrischen Information in eine Datenmatrix. Um den Prozess des Alignments zeitlich zu beschleunigen erschien es sinnvoll, die erwartete Datenmenge für die 400 Proben zu reduzieren. Es wurde daher in der thMRM-Methode auf die Integration der beiden *enhanced* Produktionen-Scans verzichtet.

3.2.2 Datenerfassung und Datenfilter

Die Generierung der Datenmatrices wurde mit den im Rahmen der dreitägigen Humanstudie optimierten Parametern durchgeführt. Abweichend hiervon wurde aufgrund der Verdünnung der Rattenurinproben das minimale Signal-zu-Rausch-Verhältnis von fünf auf drei reduziert ($S/N < 3$). Die ersten beiden QC-Proben einer *batch* wurden nicht prozessiert und von allen weiteren Analysen ausgeschlossen, da sie ausschließlich zum Zweck der Konditionierung der Säulen mit Urinmatrix [248] vermessen wurden. Die generierte Datenmatrix umfasste daher nur 400 Zeilen (360 Proben und 40 QC-Proben). Aufgrund der minimalen Retentionszeitschwankungen (relative Standardabweichungen in den 40 QC-Proben von 3.9 % für den d_3 -Acrylamid-MA Standard und von unter 0.4 % für die restlichen drei internen Standards) wurde auf eine Retentionszeitkorrektur verzichtet.

3.2.3 Analyse der generierten Datenmatrices

Zur Evaluierung der Messung und der Datenextraktion wurden die 360 Proben zunächst zusammen mit den 40 QC-Proben eingelesen. Trotz sorgfältiger Optimierung der LC-MS/MS-Analytik und der softwaregestützten Peakextraktion mit Hilfe der internen Merkaptursäurestandards fiel bei genauerer Betrachtung der Datenmatrix (400 Proben x 489 Variablen nach Ausschluss der internen Standardvariablen) auf, dass die Zellen einiger Proben gehäuft Nullen beinhalteten. Ein Nulleintrag in einer Zelle tritt immer dann auf, wenn die Software das Signal in der entsprechenden Probe nicht lokalisieren kann. Ebenso können bei einem nicht optimalen Peakalignment die Zellen gehäuft Nullen beinhalten. Ein Missalignment konnte nach eingehender Untersuchung der Datenmatrix ausgeschlossen werden. Bei den Proben, für die vermehrt Nulleinträge resultierten, handelte es sich vielmehr um Urine, die in der entsprechenden 12 h-Sammelperiode ein hohes Gesamturinvolumen aufwiesen. Aufgrund des zusätzlichen Verdünnungseffekts konnten in diesen Proben mit der Screeningmethode einige Metaboliten nicht detektiert werden, folglich ordnete die Software der Zelle eine Null zu. Dies traf vor allem auf die vier

Zeitintervalle 0 – 48 h *postdose* der Hochdosisgruppe (HD 6/1 – 7/2) zu. Daher wurde für jede Probe in diesem Zeitintervall ($n = 20$ für jede Gruppe) die Summe der Nulleinträge ($\sum 0$) bestimmt. Im Anschluss wurden die Mittelwerte, Mediane und (relativen) Standardabweichungen der Summen zusammen mit der minimalen und maximalen Anzahl Nullen berechnet und gruppenweise gegenübergestellt. Zum Vergleich wurde mit den 40 QC-Proben analog verfahren. **Tab. 4** fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 4: Übersicht über die Summe der Nulleinträge ($\sum 0$) in der generierten Datenmatrix für die Kontroll-, Niedrig- und Hochdosisgruppe im Behandlungszeitraum 6/1 – 7/2 (jeweils $n = 20$). Die Proben wurden vor der Messung alle 1:5 verdünnt. Zum Vergleich wurden die 40 QC-Proben herangezogen. Die Gegenüberstellung der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe sowie der Kontroll- und Hochdosisgruppe erfolgte jeweils unabhängig voneinander mittels t-Test. (** $p < 0.01$ für t-Test gegen CD und gegen QC).

$\sum 0$ in der Matrix	CD 6/1 – 7/2	LD 6/1 – 7/2	HD 6/1 – 7/2	QC
489 Variablen	n = 20	n = 20	n = 20	n = 40
Mittelwert	63 (12.9 %)	61 (12.5 %)	92 (18.8 %)**	56 (11.5 %)
Standardabweichung	17	19	31	17
relative Standardabweichung [%]	27.1	31.0	33.3	30.9
Median	65 (13.3 %)	68 (13.9 %)	91 (18.6 %)	61 (12.5 %)
Minimum	30 (6.1 %)	29 (5.9 %)	39 (8.0 %)	25 (10.2 %)
Maximum	93 (19.0 %)	98 (20.0 %)	155 (31.7 %)	87 (17.8 %)

Bei der Betrachtung der Mittelwerte bzw. Mediane der Gruppen bestätigte sich der visuelle Eindruck. Die Zellen der Hochdosisgruppe enthielten bei ähnlicher relativer Standardabweichung im Mittel eine höhere Anzahl Nullen als die Kontroll- bzw. Niedrigdosisgruppe (18.8 % gegen 12.9 % bzw. 12.5 %). Die t-Tests CD_HD und HD_QC lieferten jeweils $p < 0.01$. Dagegen konnten für die Kontroll- und Niedrigdosisgruppe (CD_LD) keine signifikanten Unterschiede berechnet werden. Ebenso verhielt es sich für den Vergleich CD_QC und LD_QC.

Bei Missalignments muss generell zwischen Hypo- und Hyperalignmenteffekten unterschieden werden. Im Fall des Hypoalignments wird derselbe Metabolit in zwei Proben in verschiedene Variablen aufgesplittet, was mit vermehrten Nulleinträgen einhergeht. Hyperalignmenteffekte resultieren aus der Kombination unterschiedlicher Metaboliten zu einer Variablen, was die Dichte der Matrix im Allgemeinen erhöht. Beide Effekte führen zu einer verminderten Spezifität der Datenmatrix und sind daher zu minimieren. Eine Strategie zur Abschätzung von softwarebedingten Hypo- und Hyperalignmenteffekten und zur Reduktion von Nulleinträgen beschrieben VORST *ET AL.* [213]. Die Vorgehensweise wurde für homogene Datenmatrices entwickelt, die bezüglich der Nulleinträge keinem systematischen Trend unterlagen und konnte folglich auf die bestehende Problematik nicht angewendet werden.

Bestrebungen, durch Variation der Extraktionsparameter (maximale Peakanzahl, Intensitätsschwellenwert, Mindestanzahl an Proben, in denen eine Variable vorkommen muss) die Null-einträge in den Proben der Hochdosisgruppe zu minimieren, schlugen fehl. Dies untermauerte die These, dass die Datenstruktur auf den Verdünnungseffekt der Urinproben und nicht auf eine fehlerhafte Datenextraktion zurückzuführen war. Da Varianzanalysen die Grundlage aller multivariaten Datenanalysen bilden, bedürfen Modelle, die auf Matrices dieser Art basieren, einer sorgfältigen und kritischen Prüfung. Denn bei *unsupervised*-Techniken wie der *principal component analysis* kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Klassifizierungen in den *score plots* nicht ausschließlich auf die Inhomogenität der Datenmatrices zurückzuführen sind. Bei reinem *pattern recognition* kann dies zu gravierenden Missinterpretationen führen. Vor diesem Hintergrund erscheinen Ansätze, die die Identifizierung gruppenspezifischer Variablen zum Ziel haben, als erfolgversprechender, da die Belastbarkeit der potentiellen Marker anschließend mit univariaten Verfahren getestet werden kann. Im Folgenden wurde daher auf *supervised*-Techniken wie der (orthogonalen) *partial least squares*-Diskriminanzanalyse mit dem Ziel der Identifizierung klassenspezifischer Merkaptursäuren gesetzt.

3.2.4 Evaluierung der Quality Control Proben

Um die Datengrundlage weiter zu evaluieren, wurden in einem nächsten Schritt die QC-Proben näher untersucht. Die relativen Standardabweichungen (RSDs) der Retentionszeiten für die vier internen MA-Standards in den 40 QC-Proben betragen 3.9 % für d_3 -Acrylamid-MA, 0.1 % für d_3 -Hydrochinon-MA, 0.4 % für d_3 -Benzyl-MA und 0.1 % für 4-*tert*-Butylbenzyl-MA. Daraus folgte, dass trotz kleiner Veränderungen am System (Reinigung der *curtain plate*, Wechsel der Vorsäule und der Trap-Säule) eine Retentionszeitstabilität über alle 400 Messungen gegeben war. Die Untersuchung der entsprechenden Peakflächen lieferte RSDs von 52.0 % für d_3 -Acrylamid-MA, 18.0 % für d_3 -Hydrochinon-MA, 31.5 % für d_3 -Benzyl-MA sowie von 22.2 % für 4-*tert*-Butylbenzyl-MA. In diesen Werten spiegeln sich mehrere Schwachstellen von Metabonomicsansätzen wider: bei der entwickelten LC-MS/MS-Analytik handelte es sich um eine semi-quantitative Screeningmethode, auf die die üblichen Qualitätsstandards für quantitative Analysen aufgrund des breiten Analytenspektrums nicht angewendet werden konnten. So zeigte der knapp nach der Totzeit der Säulen eluierende d_3 -Acrylamid-MA Standard eine besonders hohe relative Abweichung. In diesem Bereich ist trotz Säulenschaltung mit gewissen Matrixeffekten zu rechnen, die die Präzision der Messung negativ beeinflussen. In der Ionensuppression liegt wohl auch der Grund für die Schwankungen des d_3 -Benzyl-MA Standards. In einer Vielzahl an Proben

wurde im selben Bereich des Chromatogramms ein prominentes endogenes Signal mit $m/z = 208$ detektiert. Dieses überragte den Standard in der Regel mindestens um den Faktor 10 und führte wahrscheinlich zu einer vorübergehenden Sättigung des Detektors. Ein weiterer Grund kann in der Effizienz der Chromatographie, insbesondere in der Kapazität der Trap-Säule, liegen. Ist die Ionenfracht auf der Chromatographiesäule zu hoch, können die Analyten nicht vollständig retiniert und folglich nicht quantitativ registriert werden. Dieses Phänomen tritt vor allem bei stark konzentrierten Urinproben auf. Derartige Effekte würden bei quantitativen Analysen bereits bei der Methodenentwicklung eliminiert werden, müssen bei ungerichteten Screeningverfahren aber in Kauf genommen werden. Die relativen Standardabweichungen für d_3 -Hydrochinon-MA bzw. 4-*tert*-Butylbenzyl-MA lagen im Rahmen des für quantitative Analysen tolerierbaren Bereichs [212].

Des Weiteren müssen bei der Bewertung der Standardabweichungen „Manipulationen“ wie Gerätereinigung oder Säulenwechsel berücksichtigt werden. So konnte nach dem Wechsel der Trap-Säule für den d_3 -Acrylamid-MA Standard ein deutlicher Gewinn an Empfindlichkeit verzeichnet werden. Für 4-*tert*-Butylbenzyl-MA war dieser Effekt nur schwach ausgeprägt. Dies spiegelte sich auch in den RSDs wider: zog man zum Vergleich nur die Messungen vor dem Austausch heran, ergaben sich die entsprechenden Werte zu 39.3 % (d_3 -Acrylamid-MA), 19.2 % (d_3 -Hydrochinon-MA), 22.2 % (d_3 -Benzyl-MA) und 16.7 % (4-*tert*-Butylbenzyl-MA) und entsprachen mit Ausnahme des ersten Standards nahezu den Richtlinien der *Food and Drug Administration* [212].

Um den beschriebenen Matrixeffekten zumindest teilweise Rechnung zu tragen, wurden die Datenmatrices im Folgenden global auf die durchschnittliche Response der vier internen Standardvariablen skaliert. Wie aus den Kurven in **Abb. 35** zu entnehmen ist, unterlagen die klinischen Parameter der Urinproben zeit- und dosisabhängigen Schwankungen, die einen Normalisierungsschritt notwendig machten. In Vorversuchen wurden die folgenden Normalisierungstechniken getestet: Normalisierung auf Gesamturinvolumen, spezifische Dichte, Kreatinengehalt und Osmolalität der Urinproben. Das Gesamturinvolumen war als Bezugsgröße am wenigsten geeignet, da in den Metabolismuskäfigen der Urin mitunter nur unvollständig in die Vorlagen abfließt, die Messwerte folglich eine hohe Unsicherheit aufweisen. Kreatinin wird in Mensch und Tier relativ konstant über den Tag hinweg mit dem Urin ausgeschieden [251]. Daher findet für quantitative Analysen einzelner Metaboliten die Normalisierung auf Kreatinin standardmäßig Anwendung [227]. Allerdings werden infolge einer Exposition im Rahmen eines Tierversuchs vielfach Änderungen in der Kreatininausscheidung beobachtet, die gegen eine Verwendung von Kreatinin als Bezugsgröße in Expositionsstudien sprechen [30, 50]. Die

Osmolalität gibt die Teilchenzahl osmotisch aktiver Substanzen pro Kilogramm Lösungsmittel an. Die spezifische Dichte wird auch relative Dichte genannt und bezeichnet die Dichte eines Stoffes bezogen auf einen Bezugsstoff, meist Wasser. Damit sind beide Größen von der Menge der in der Probe gelösten Ionen abhängig und eignen sich daher als Bezugsgröße, um unterschiedlich verdünnte Urine vergleichbar zu machen. Die Kurven von Osmolalität und spezifischer Dichte verlaufen nahezu parallel (siehe **Abb. 35**). Da die Bestimmung der spezifischen Dichte sehr einfach mit einem Handrefraktometer erfolgen kann, wurde die Normalisierung auf diesen Parameter vorgenommen. Diese kombinierte Vorgehensweise aus Skalierung (auf interne Standards) und Normalisierung (auf spezifische Dichte) sollte die Vergleichbarkeit der Proben – eine unbedingte Voraussetzung der multivariaten Datenanalysen – gewährleisten.

3.2.5 Überprüfung der Datenintegrität

Um einen Einfluss der QC-Proben auf die Auswertung zu verhindern, wurde eine neue Datenmatrix erstellt, die nur die 360 Proben der Studie beinhaltet. In einem ersten Schritt wurden die Variablen der internen Standards inklusive ihrer Isotopen aus der Datenmatrix und damit von allen folgenden Modellen ausgeschlossen. Einen ersten Überblick über die Datenintegrität lieferte ein PCA Modell nach *pareto scaling* über alle 360 Proben. Im *score plot* (PC1 vs. PC2) zeichneten sich zwei Gruppen ab, die aber weder mit den Dosisgruppen (C, L, H), den einzelnen Versuchstieren (Ratte 1 – 5), der Tageszeit (erste bzw. zweite Urinsammelperiode) und den klinischen Parametern noch mit der Messreihenfolge der Proben korreliert werden konnten (**Abb. 37 A**). Die Untersuchung des entsprechenden *loading plots* lieferte zwei für die Diskriminierung der Gruppen verantwortliche Variablen (*m/z_m/z-129_RT*): 208.1_79.1_22.00 und 208.1_79.1_24.85 (**Abb. 37 B**). Im *line plot* (Variablen # vs. p1) wurde der Zusammenhang zwischen den Gruppen und den beiden Variablen noch deutlicher. Die Variable 208.1_79.1_22.00 korrelierte mit der ersten Gruppe positiv, wohingegen 208.1_79.1_24.85 mit derselben Gruppe negativ korrelierte (**Abb. 37 C**). Umgekehrt ergab sich für 208.1_79.1_24.85 eine positive Korrelation sowie für 208.1_79.1_22.00 eine negative Korrelation mit der zweiten Gruppe.

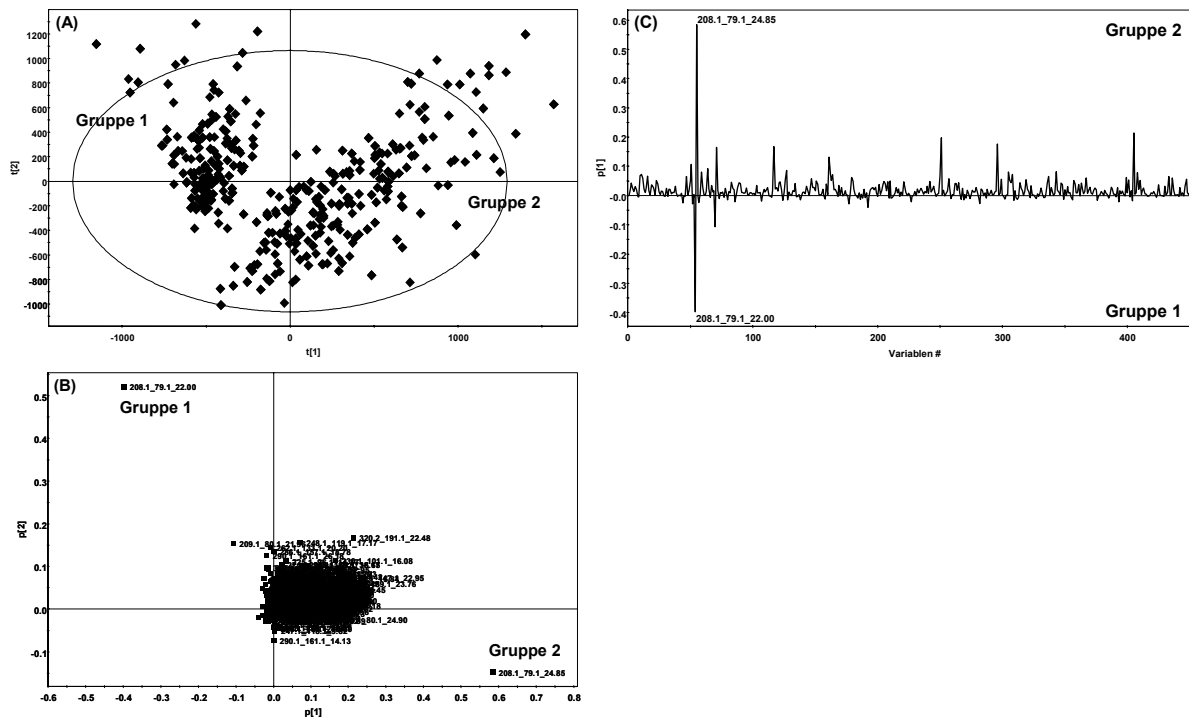


Abb. 37: Plots zur Überprüfung der Datenintegrität: (A) initialer PCA *score plot* (PC1 vs. PC2) der 360 Proben nach *pareto scaling*, (B) korrespondierender *loading plot*, (C) *line plot* (Variablen # vs. p1) zu (A).

Da sich beide Variablen nur in der Retentionszeit unterschieden, lag der Schluss nahe, dass es sich bei den Variablen um nur einen Metaboliten handelte, dessen korrektes Alignment aufgrund von Retentionszeitschwankungen fehlschlug. Die Extraktion des Übergangs 208.1 → 79.1 aus verschiedenen Chromatogrammen und der Vergleich der Retentionszeiten mit der des internen *d*₃-Benzly-MA Standards (RT 24.3 min) ergab allerdings, dass es sich bei den bisher noch nicht identifizierten Signalen um verschiedene Metaboliten handelte. Die ähnlichen Retentionszeiten der Variablen und die anscheinend zufällige Gruppenbildung im *score plot* deuteten auf Isomere desselben Metaboliten hin, bezüglich derer es inter-individuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren zu geben scheint. Vermeintlich zufällige Unterschiede in den Metabolitenmustern von nicht exponierten Sprague Dawley Ratten wurden bereits in der Vergangenheit in Metabonomicsstudien beobachtet. Die mit ¹H-NMR gescreenten Urinproben ließen sich via PCA in zwei Subpopulationen unterteilen. Der entsprechende *loading plot* wies der ersten Gruppe hohe Hippursäure-Level zu, wohingegen die zweite Gruppe durch hohe Gehalte an Chlorogensäure-Metaboliten gekennzeichnet war. Als Ursache für die Bildung dieser Subpopulationen wurden inter-individuelle Unterschiede in der Darmflora diskutiert [79, 98]. Ziel der durchgeführten CCl₄-Studie war die Identifizierung von Markern für oxidativen Stress. Dies bedarf robuster, d. h. prädiktiver Modelle, weshalb die beiden konfundierenden Variablen (inklusive ihrer Isotopen) von den weiteren Analysen ausgeschlossen wurden.

3.2.6 Metabolische Trajektorien: Kinetik und Dosisabhängigkeit der Merkaptursäureprofile

3.2.6.1 PCA über alle 360 Proben

Nach Ausschluss der internen Standardvariablen und der beiden konfundierenden Variablen 208.1_79.1_22.00 und 208.1_79.1_24.85 wurde erneut ein *pareto*-skaliertes PCA Modell über alle 360 Proben generiert. Die *score plots* PC1 vs. PC2 (**Abb. 38 A**) und PC2 vs. PC3 (**Abb. 38 B**) zeigten einen ersten Trend bezüglich eines Dosiseffekts: Die *postdose*-Proben 0 – 12 h, 12 – 24 h, 24 – 36 h und 36 – 48 h der Hochdosisgruppe (HD 6/1 – 7/2) setzten sich klar vom Hauptcluster ab. Dagegen waren die restlichen Zeitpunkte (*pre*- und *postdose*) sowie alle Proben der Niedrigdosisgruppe nicht von der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Ein „Tagestrend“, d. h. eine Anordnung der Proben in der Reihenfolge der Versuchstage, war nicht ersichtlich. Dies gab einen ersten Hinweis auf eine mögliche Kinetik der Merkaptursäuremuster im Urin der Versuchstiere als Folge einer CCl₄-Exposition.

Die Beobachtungen waren konsistent mit Metabonomicsstudien, in denen CCl₄ in ähnlichen Dosierungen an Wistar bzw. Sprague Dawley Ratten appliziert wurde. Sowohl die mit NMR [167, 269] als auch die mit *full scan* LC-MS [221] erfassbaren Metabolitenprofile im Urin der Versuchstiere deuteten jeweils darauf hin, dass in der Hochdosisgruppe (0.5 mL CCl₄/kg KG) die größten Veränderungen innerhalb der ersten 48 h *postdose* auftreten. In der Studie, in der eine entsprechende Niedrigdosisgruppe (Exposition ebenfalls mit 0.1 mL CCl₄/kg KG) mitgeführt wurde, konnten in der PCA keine Unterschiede zu einer *time-matched*-Kontrollgruppe festgestellt werden [167].

Aufgrund der zahlreichen Nullen in der Datenmatrix und der damit verbundenen, bereits diskutierten Problematik um Nulleinträge in der Datenmatrix bedurften die mit dem Merkaptursäurescreening identifizierten Trajektorien jedoch einer weiteren und umfangreicheren Überprüfung.

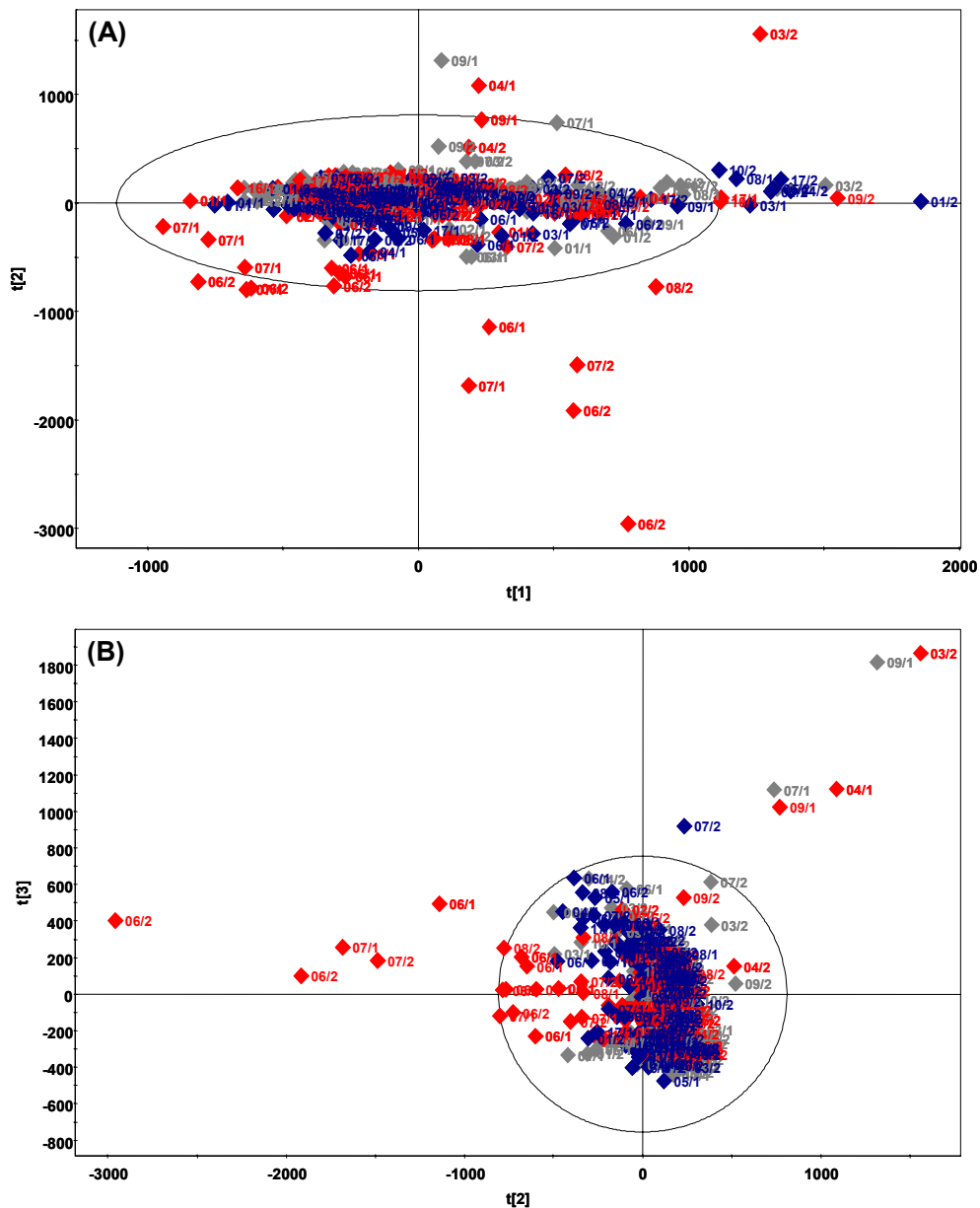


Abb. 38: PCA score plots nach *pareto scaling* und nach Ausschluss der konfundierenden Variablen 208.1_79.1_22.00 und 208.1_79.1_24.85: (A) PC1 vs. PC2, (B) PC2 vs. PC3; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe, \blacklozenge Niedrigdosisgruppe, \blacklozenge Hochdosisgruppe, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (1 – 17, Exposition an Tag 6) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

3.2.6.2 OPLS-DA Modelle für die Kontroll- und Hochdosisgruppe

3.2.6.2.1 OPLS-DA Modell der Versuchstage 6 – 17

Da die Trajektorien in der PCA am deutlichsten in der Hochdosisgruppe hervortraten, wurde zunächst mit dieser Gruppe weiter verfahren. **Abb. 39** zeigt ein CD_{HD} OPLS-DA Modell der *postdose*-Proben (Versuchstage 6 – 17) nach *pareto scaling* (CD: Y = 0, HD: Y = 1).

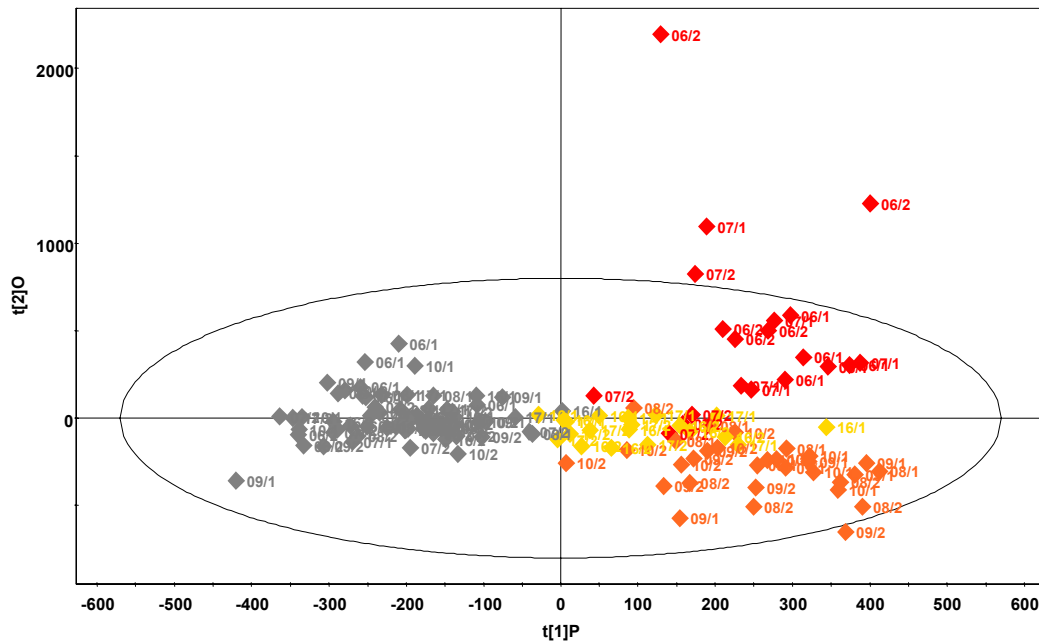


Abb. 39: OPLS-DA *score plot* (t1P vs. t2O) der Kontroll- und Hochdosisgruppe nach *pareto scaling*. Den Proben der Kontrollgruppe wurde in der *dummy*-Matrix $Y = 0$, der Hochdosisgruppe $Y = 1$ zugeordnet; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe 6/1 – 17/2, $\color{red}\blacklozenge$ Hochdosisgruppe 6/1 – 7/2, $\color{orange}\blacklozenge$ Hochdosisgruppe 8/1 – 10/2, $\color{yellow}\blacklozenge$ Hochdosisgruppe 16/1 – 17/2, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (1 – 17, Exposition an Tag 6) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

Neben der diskriminierenden Komponente (PC1 bzw. t1P) waren weitere vier orthogonale Komponenten signifikant und lieferten kumulative Varianzen von $R^2X = 0.437$, $R^2Y = 0.801$ und $Q^2 = 0.591$. Die Varianz für die diskriminierende, prädiktive Komponente ergab sich zu $R^2X_p = 0.045$. Während in der Kontrollgruppe alle Zeitpunkte ungefähr einer Normalverteilung entsprachen, zeichneten sich innerhalb der Hochdosisgruppe drei Cluster ab: entlang PC1 hoben sich die Versuchstage 16 und 17 von den Tagen 6 – 10 ab. Des Weiteren streuten die Tage 6 und 7 entlang PC2 und setzten sich deutlich von den Tagen 8 – 10 ab. Dabei fiel auf, dass die HD-Proben der Tage 16 und 17 teilweise mit CD-Proben überlappten. Daraus konnte geschlossen werden, dass sich die Mercaptursäureprofile der Ratten bis zu fünf Tage *postdose* von den Signaturen der Kontrollgruppe unterschieden, dass aber bereits zehn Tage nach Gabe von 1.0 mL CCl_4/kg KG eine Regeneration stattgefunden hatte, die zu einer Angleichung der Mercaptursäuremuster von Kontroll- und Hochdosisgruppe führte. Diese Beobachtungen deckten sich wiederum mit den bereits diskutierten Metabonomicsstudien. Mittels PCA und PLS-DA Modellen ließen sich hier bis zu 72 h (drei Tage) *postdose* Unterschiede zur Kontrollgruppe feststellen [269], wohingegen nach zehn Tagen *postdose* die Trajektorie der Hochdosisgruppe (0.5 mL CCl_4/kg KG) vollständig zum Cluster der Kontrollgruppe zurückkehrt war [167].

Ganz anders verhielt es sich mit den Tagen 6 und 7, deren *scores* sich in der ersten orthogonalen Komponente befanden, d. h. die Urine der Versuchstiere wiesen deutliche Unterschiede zu der

entsprechenden Kontrollgruppe und zu den restlichen Sammelperioden der Hochdosisgruppe auf. Diese galt es in weiteren Schritten zu untersuchen. Allerdings waren auch hier vier von fünf Proben der zweiten Sammelperiode des siebten Versuchstages (HD 7/2) schon wieder mehr in der Mitte des *score plot* angesiedelt und entsprachen in ihren Eigenschaften eher den Versuchstagen 16 und 17. Es schien auch hier bereits zu einer gewissen Regeneration des Stoffwechsels und damit zu einer Angleichung der Metabolitenmuster an die Kontrollgruppe gekommen zu sein.

3.2.6.2.2 OPLS-DA Modell der Versuchstage 6 und 7

Innerhalb der Hochdosisgruppe wurden zunächst die Versuchstage 6 und 7 (0 – 24 h *postdose*) weiter untersucht, da sich hier in den vorausgegangenen Modellen die größten Unterschiede zur Kontrollgruppe gezeigt hatten. Da die OPLS-DA zu einem *overfitting* neigt und daher mindestens fünf, besser noch zehn Beobachtungen pro Gruppe erfordert, wurden die Zeitpunkte 6/1 – 7/2 gemeinsam ausgewertet. Darüber hinaus wurde durch diese Vorgehensweise ein stabiles Verhältnis aus Beobachtungen zu Variablen (ca. 1:25) erzielt, das sich wiederum positiv auf die Prädiktivität der Modelle auswirkte [236].

Eine OPLS-DA (*pareto scaling*) mit CD 6/1 – 7/2 als Gruppe 1 ($Y = 0$) und HD 6/1 – 7/2 als Gruppe 2 ($Y = 1$) ergab ein Modell mit zwei signifikanten Komponenten (kumulative Varianzen: $R^2X = 0.338$, $R^2Y = 0.898$ und $Q^2 = 0.863$), welches die beiden Gruppen ohne Überlappung diskriminieren konnte (**Abb. 40**). Für die erste, prädiktive Hauptkomponente ergab sich eine Varianz von $R^2X_p = 0.197$. Eine Kinetik innerhalb dieser vier Zeitintervalle zeichnete sich nicht ab. Dennoch strebten auch in diesem Plot vier der fünf HD 7/2 *scores* tendenziell näher an die Kontrollgruppe heran. Dieses Modell entsprach den allgemeinen Anforderungen an prädiktive Metabonomicsmodelle ($|R^2Y - Q^2| < 0.2 - 0.3$, $Q^2 > 0.5$ [162]) und diente im Folgenden als Grundlage für die Identifizierung potentieller Marker.

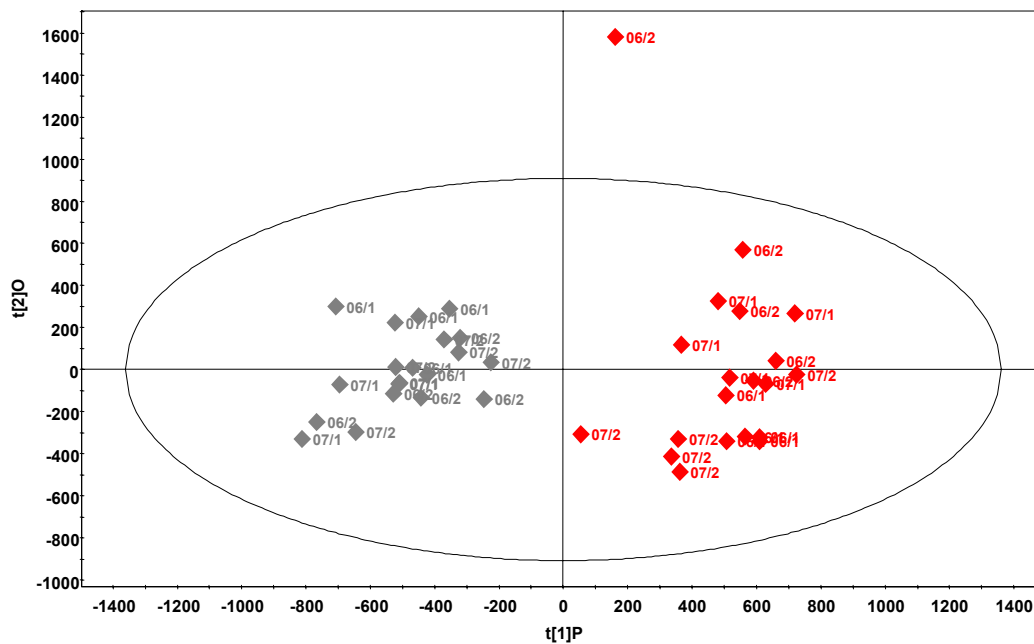


Abb. 40: OPLS-DA *score plot* (t1P vs. t2O) der Kontroll- und Hochdosisgruppe an Tag 6 und 7 nach *pareto scaling*; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe 6/1 – 7/2, \blacklozenge Hochdosisgruppe 6/1 – 7/2, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (6 bzw. 7, Exposition an Tag 6) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

3.2.6.2.3 Alternative Strategie für OPLS-DA Modelle

Mit dem Ziel der Identifizierung potentieller Marker für CCl_4 -induzierten oxidativen Stress wurde eine alternative Strategie zur Erstellung von OPLS-DA Modellen verfolgt. Hintergrund bildete die Tatsache, dass die Erfolgsaussichten bei der Markersuche mit der Qualität der multivariaten Datengrundlage ansteigen. In der Regel kann dies durch große Gruppengrößen bzw. ein standardisiertes Studiendesign erreicht werden. Beide Ansätze haben die Reduktion von intra- und inter-individueller Variabilität zum Ziel und erleichtern die Detektion von gruppenspezifischen Effekten. Im Tierversuch lassen sich einheitliche Versuchsbedingungen relativ gut herstellen, eine Schwachstelle bildet hier meist die limitierte Anzahl an Labortieren. In der Studie wurde, wie auch in den meisten Metabonomicsstudien, mit Gruppengrößen von fünf Tieren gearbeitet. Dies stellte einen Kompromiss aus statistischer Verwertbarkeit der Ergebnisse und dem Tierschutzgedanken dar. Vor dem Hintergrund des daraus resultierenden kritischen Verhältnisses aus Beobachtungen zu Variablen mussten bei der Auswertung Zeitpunkte zusammengefasst werden. Dieses Studiendesign hatte jedoch den Nachteil, dass bei einer Fokussierung auf einzelne Studientage die Datengrundlage stark eingeschränkt wurde. In diesem Zusammenhang sollte daher getestet werden, ob die Bildung einer robusteren Kontrollgruppe dazu beitragen kann, die Klassifizierung von Kontrolltieren und exponierten Tieren zu verbessern.

Initiale PCA Analysen der *predose*-Proben (CC 1/1 – 5/2, LC 1/1 – 5/2, HC 1/1 – 5/2) zeigten, dass selbst bei unbehandelten Kontrolltieren mit einer großen konfundierenden Variation gerechnet werden muss. So lieferte das Modell nach *pareto scaling* (**Abb. 41 A**) bei zehn signifikanten Komponenten eine kumulative Varianz von $R^2X = 0.711$, das Modell nach *autoscaling* (**Abb. 41 B**) für 13 signifikante Komponenten $R^2X = 0.632$.

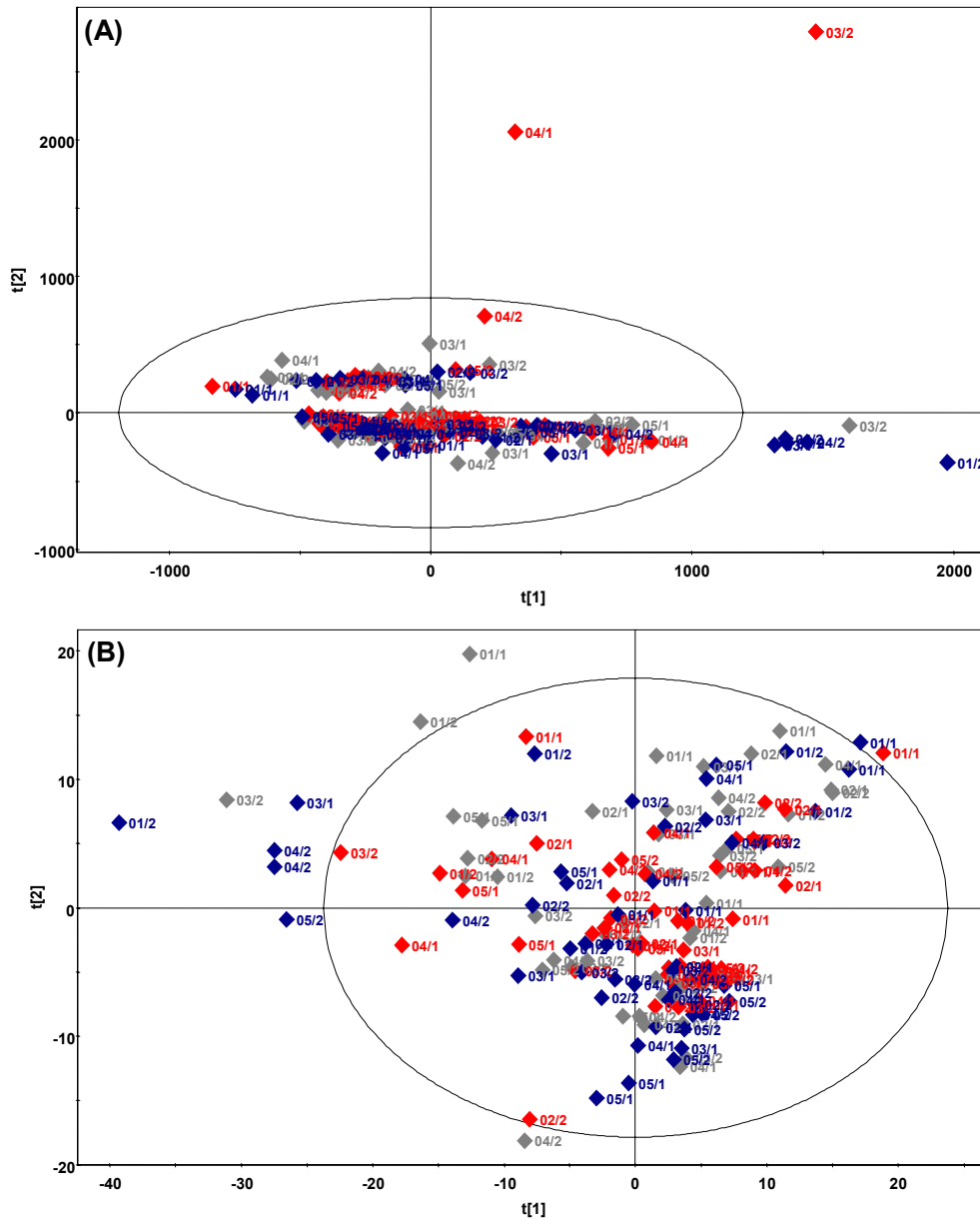


Abb. 41: PCA (PC1 vs. PC2) *score plots* der *predose*-Proben (CC, LC, HC, jeweils 1/1 – 5/2) nach: (A) *pareto scaling*, (B) *autoscaling*; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe, \blacklozenge Niedrigdosisgruppe, \blacklozenge Hochdosisgruppe, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (1 – 5) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

Bei genauerer Betrachtung der *score plots* fiel auf, dass ein Großteil der Varianz auf die außerhalb der *Hotelling's T²* (0.95) Ellipse liegenden Ausreißer zurückzuführen war. Ferner war

kein „Tages- bzw. Tageszeittrend“ zu beobachten, die Sammelzeitpunkte entsprachen augenscheinlich einer Normalverteilung. Ebenso verhielt es sich mit den unterschiedlichen Versuchstieren. Auch hier konnte keine Klassifizierung aufgrund der einzelnen Individuen festgestellt werden. Derartige inter-individuelle Unterschiede wirken sich in der Regel nachteilig auf anschließende Modelle der Form Kontroll- vs. Dosisgruppe aus, da sie die Validität und Prädiktivität der Analysen negativ beeinflussen. Es wurde daher versucht, die Varianz der *time-matched*-Kontrollgruppe (CD 6/1 – 17/2) zu minimieren, um so eine bessere Basis für den nachfolgenden Vergleich mit den beiden Dosisgruppen zu schaffen. Hierzu wurde zunächst eine PCA (*pareto scaling*) über alle *postdose*-Kontrollproben (CD 6 – 17, $n = 70$) erstellt. Drei Proben lagen außerhalb der *Hotelling's T²* (0.95) Ellipse (**Abb. 42 A**). Nach Ausschluss der Ausreißer wurde die PCA wiederholt. Diesmal lagen alle Proben innerhalb der Ellipse (**Abb. 42 B**). Wie auch in den initialen PCA Modellen, konnte im *score plot* kein „Tagestrend“ beobachtet werden, die *scores* waren bezüglich der Studientage offensichtlich normalverteilt. Dies bildete die Grundlage für die weitere Vorgehensweise. Da die verbleibenden 67 Kontrollproben sich nicht voneinander unterscheiden ließen, war es das Ziel, aus ihrer Gesamtheit in mehreren Schritten eine „durchschnittliche Kontrollgruppe“ zu generieren, die schließlich den 20 Hochdosisproben (HD 6/1 – 7/2) gegenübergestellt werden sollte. Eine derart konstruierte durchschnittliche Kontrollgruppe hat gegenüber der *time-matched*-Kontrollgruppe (CD 6/1 – 7/2) den Vorteil, dass sie auf einer größeren Anzahl Tiere bzw. Sammlerperioden basiert und folglich robuster ist. Da OPLS-DA Analysen ungefähr gleich starke Gruppengrößen voraussetzen, musste die Anzahl der Proben, die später die durchschnittliche Kontrollgruppe bilden sollten, sukzessive von 67 auf circa 20 reduziert werden. Hierzu wurden zunächst die Versuchstage 16 und 17 ausgeschlossen ($n = 20$), da die Tiere vor der erneuten Überführung in Metabolismuskäfige fünf Tage in normalen Käfigen verbracht hatten, was unter Umständen zu Veränderungen in den Urinprofilen und damit zu mehr Varianz führen kann. Tatsächlich unterschieden sich die beiden PCA Modelle bezüglich ihrer Kennzahlen kaum. Die PCA CD 6/1 – 17/2 ($n = 67$) lieferte nach neun Komponenten $R^2X = 0.689$ und $Q^2 = 0.268$ (**Abb. 42 B**), das CD 6/1 – 10/2 Modell ($n = 47$) bei drei signifikanten Komponenten entsprechend $R^2X = 0.459$ und $Q^2 = 0.292$ (**Abb. 42 C**). Aus den 47 *scores* des CD 6/1 – 10/2 Plots wurden nun rein zufällig 23 herausgegriffen. Diese Proben bildeten den ersten Teil der durchschnittlichen Kontrollgruppe (dCD_Teil 1), die verbleibenden 24 Proben entsprechend den zweiten Teil (dCD_Teil 2). Eine Reduktion von Kontrolltieren mit dem Ziel, annähernd gleich große Gruppengrößen zu erhalten, ist auf dem Gebiet des Metabonomics gängige Praxis und wurde unter anderem in der Studie von BECKONERT *ET AL.* beschrieben [269].

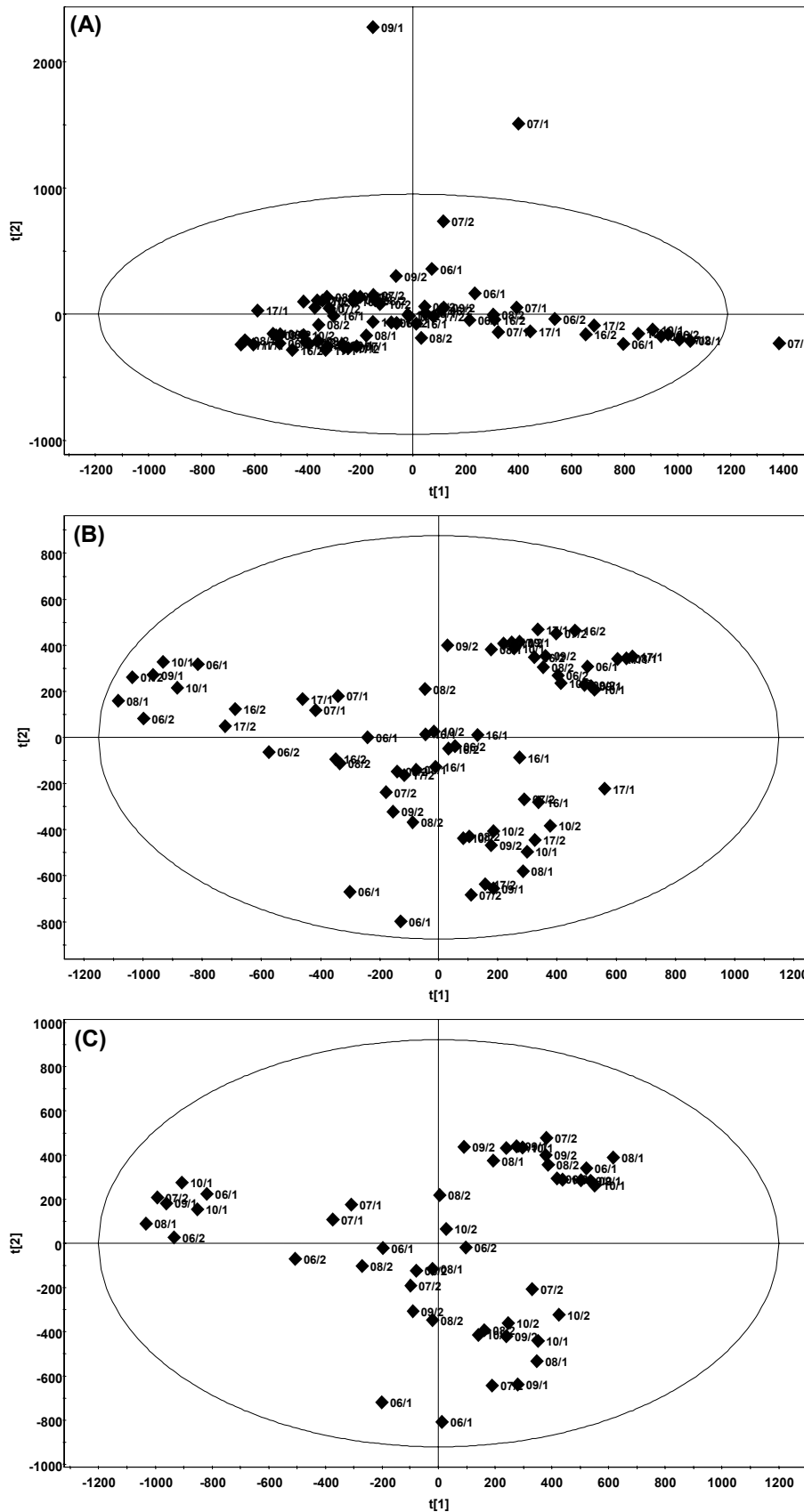


Abb. 42: PCA score plot (PC1 vs. PC2) der *time-matched*-Kontrollproben nach *pareto scaling*: (A) CD 6/1 – 17/2, (B) CD 6/1 – 17/2 nach Ausschluss der drei starken Ausreißer aus (A), (C) CD 6/1 – 10/2 nach Ausschluss der drei starken Ausreißer aus (A); Schlüssel: die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (6 – 17) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

Sowohl Teil 1 als auch Teil 2 der durchschnittlichen Kontrollgruppe (dCD) wurden anschließend in zwei separaten OPLS-DA Analysen den 20 Hochdosisproben (HD 6/1 – 7/2) gegenübergestellt, wobei der dCD-Gruppe jeweils $Y = 0$ und der HD-Gruppe entsprechend $Y = 1$ zugewiesen wurde (**Abb. 43 A und B**).

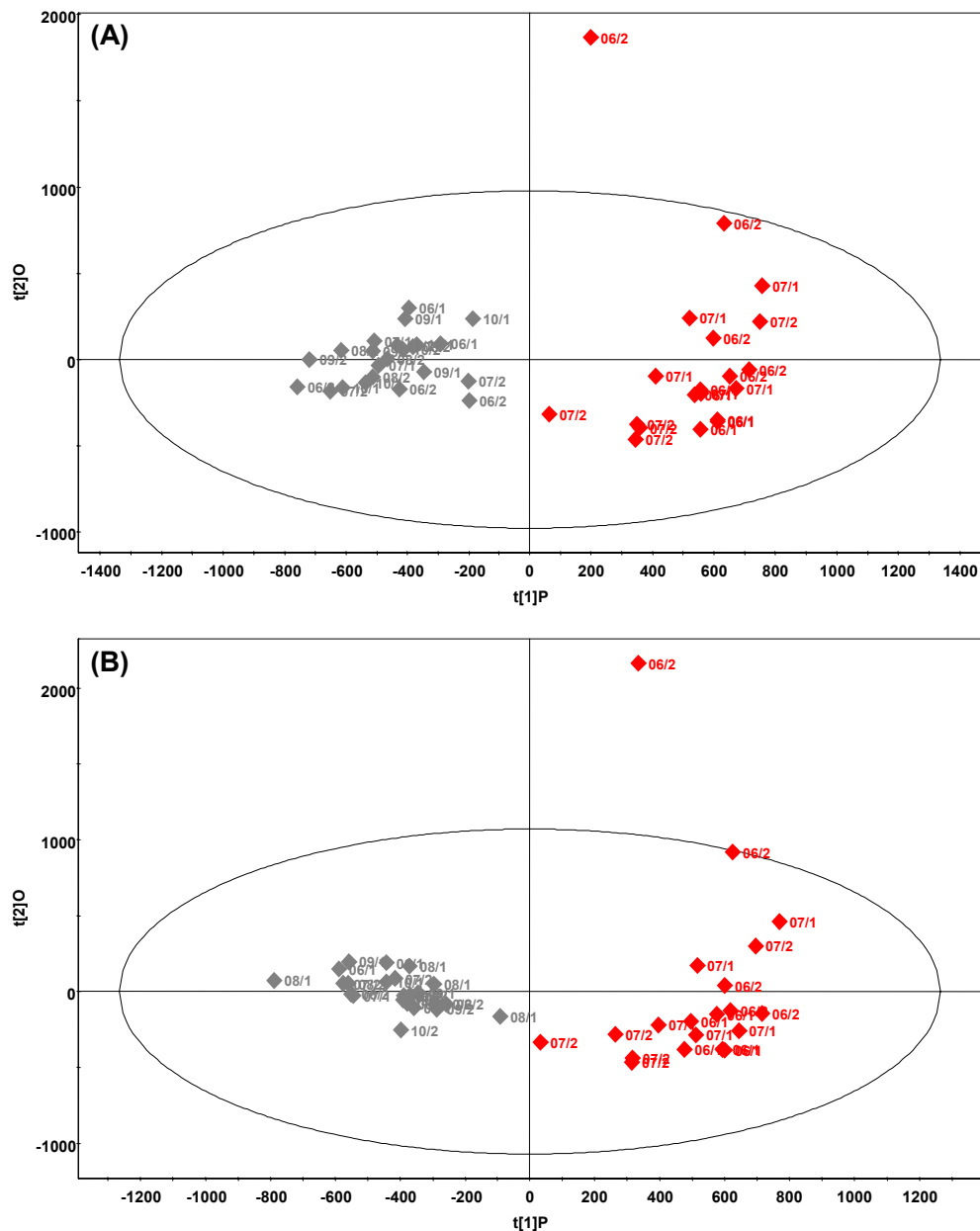


Abb. 43: OPLS-DA *score plots* ($t1P$ vs. $t2O$) der Proben der durchschnittlichen Kontrollgruppe gegen die Proben der Hochdosisgruppe von Versuchstag 6 und 7 nach *pareto scaling*: (A) (dCD_Teil 1 vs. HD 6/1 – 7/2), (B) (dCD_Teil 2 vs. HD 6/1 – 7/2); Schlüssel: \blacklozenge durchschnittliche Kontrollgruppe Teil 1 bzw. Teil 2, \blacklozenge Hochdosisgruppe 6/1 – 7/2, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (6 – 10, Exposition an Tag 6) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

Es resultierten jeweils zwei signifikante Komponenten. Bei zwei nicht überlappenden Gruppen ergaben sich die kumulativen Kennzahlen der OPLS-DA zu $R^2X = 0.374$, $R^2Y = 0.898$ und

$Q^2 = 0.863$ für das erste Modell (dCD_Teil 1 vs. HD 6/1 – 7/2) und zu $R^2X = 0.364$, $R^2Y = 0.896$ und $Q^2 = 0.860$ für das zweite Modell (dCD_Teil 2 vs. HD 6/1 – 7/2). Die Varianzen der diskriminierenden Hauptkomponente ergaben sich entsprechend zu $R^2X_p = 0.207$ und zu $R^2X_p = 0.184$.

Eine vergleichbare Strategie zur Generierung eines Kontrollkollektivs wurde im Rahmen des COMET-Projekts verfolgt. Aus der Datenbank, die über 6000 NMR-Spektren von *predose*-Tieren umfasste, wurde in einem iterativen Verfahren ein durchschnittliches PCA Modell generiert, das als Referenz diente, um abnorme Profile (beispielsweise als Folge der Verabreichung toxischer Substanzen) zu erkennen. Für ein robustes Kontrollmodell mussten im Optimierungsprozess allerdings circa ein Drittel aller Beobachtungen ausgeschlossen werden [21].

Sowohl das OPLS-DA Standardmodell (CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2) als auch die auf einer größeren Anzahl von Kontrolltieren basierenden OPLS-DA Modelle dCD_Teil 1 vs. HD 6/1 – 7/2 und dCD_Teil 2 vs. HD 6/1 – 7/2 lieferten in den jeweiligen *score plots* zwei distinkte Cluster ohne Überschneidung. Bezüglich ihrer statistischen Kennziffern ergaben sich bei jeweils zwei signifikanten Komponenten keine relevanten Unterschiede zwischen dem ursprünglichen und den zwei neuen Modellen. Als Zwischenergebnis kann folglich festgehalten werden, dass der alternative OPLS-DA Ansatz bei der Diskriminierung der beiden Gruppen (Kontroll- vs. Hochdosisgruppe) und der Prädiktivität der Modelle keinen entscheidenden Vorteil gegenüber der klassischen Vorgehensweise bot. Für die Untersuchung der verbleibenden Trajektorien (Versuchstage 8 – 10 und 16 – 17) wurde daher das OPLS-DA Standardverfahren beibehalten.

3.2.6.2.4 OPLS-DA Modelle der Versuchstage 8 – 10 und 16 – 17

Für die beiden verbleibenden Trajektorien – die Versuchstage 8 – 10 sowie 16 – 17 – wurden analog der für die Versuchstage 6 – 7 beschriebenen Strategie OPLS-DA Standardmodelle (Kontroll- vs. Hochdosisgruppe) generiert. Bei drei signifikanten Komponenten ergaben sich die statistischen Kenngrößen für das CD 8/1 – 10/2 vs. HD 8/1 – 10/2 Modell zu $R^2X = 0.345$, $R^2Y = 0.911$ und $Q^2 = 0.805$. Wie aus **Abb. 44 A** ersichtlich ist, trennten sich die beiden Gruppen ohne Überlappung entlang der ersten Hauptkomponente ($R^2X_p = 0.075$).

Das CD 16/1 – 17/2 vs. HD 16/1 – 17/2 Modell lieferte bei vier signifikanten Komponenten zwei distinkte Cluster bei Modellcharakteristika von $R^2X = 0.540$, $R^2Y = 0.893$ und $Q^2 = 0.607$ (**Abb. 44 B**). R^2X_p ergab sich zu 0.047. Die beiden OPLS-DA Modelle erfüllten die Anforderungen an prädiktive Modelle ($|R^2Y - Q^2| < 0.2 - 0.3$, $Q^2 > 0.5$) und dienten wie auch das entsprechende CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 Modell als Grundlage für die anschließende Markeridentifizierung.

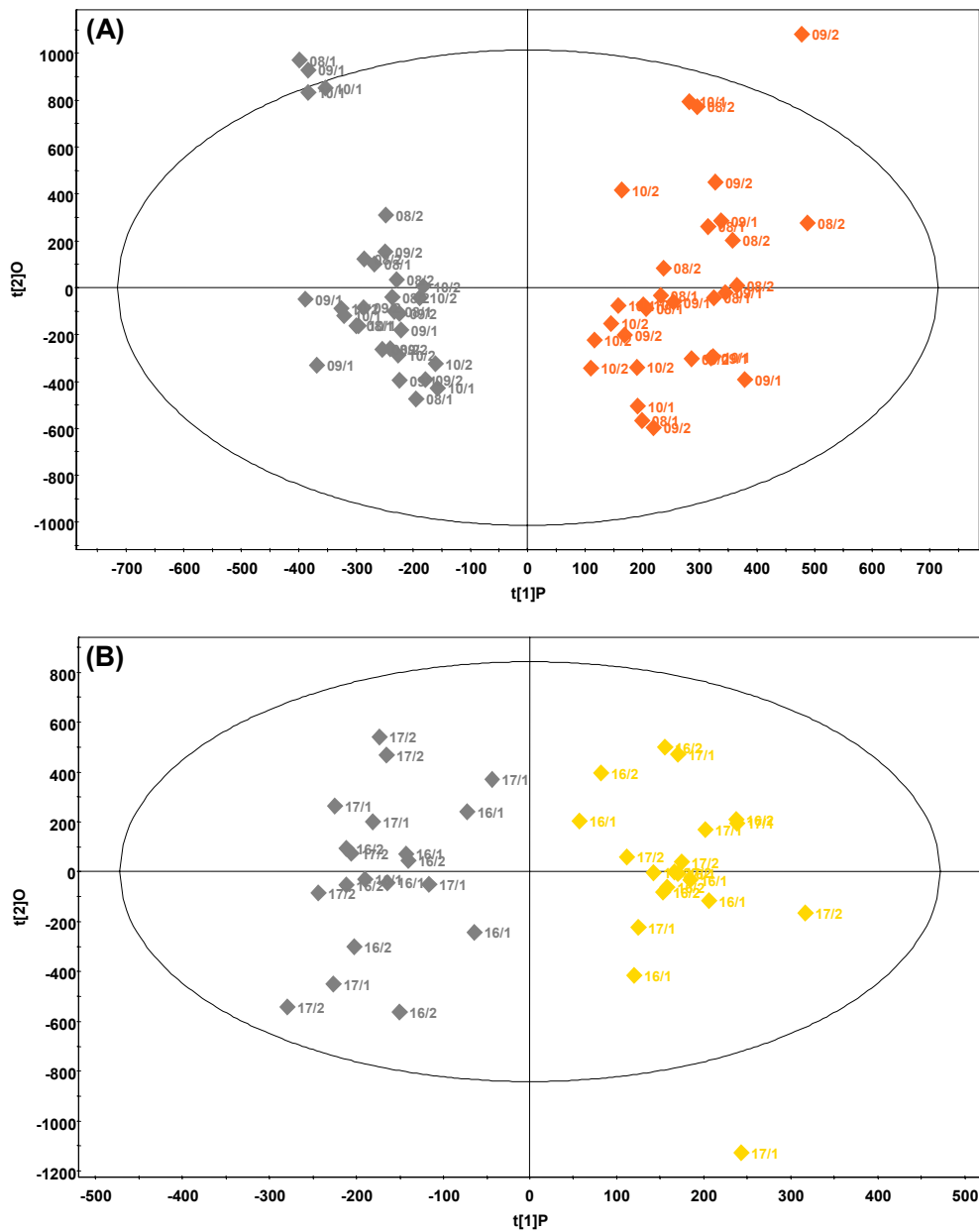


Abb. 44: OPLS-DA *score plots* (PC1 vs. PC2) der Kontroll- und Hochdosisgruppe nach *pareto scaling*: (A) Versuchstage 8 – 10, (B) Versuchstage 16 – 17; Schlüssel: \blacklozenge *time-matched*-Kontrollgruppe 8/1 – 10/2 bzw. 16/1 – 17/2, \blacklozenge Hochdosisgruppe 8/1 – 10/2, \blacklozenge Hochdosisgruppe 16/1 – 17/2, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (8 – 17, Exposition an Tag 6) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

3.2.6.2.5 Vergleichende Gegenüberstellung der zeitabhängigen OPLS-DA Trajektorien für die Kontroll- und Hochdosisgruppe

Bei der Interpretation der Modelle darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei der OPLS-DA um ein sogenanntes *supervised*-Verfahren handelt, d. h. die Information über die Gruppenzugehörigkeiten geht in die Analyse mit ein und die Modelle werden im Hinblick auf eine Diskriminierung optimiert. Insofern ist eine rein visuelle Auswertung der drei OPLS-DA *score plots* CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2, CD 8/1 – 10/2 vs. HD 8/1 – 10/2 und CD 16/1 –

17/2 vs. HD 16/1 – 17/2 mitunter ungeeignet, Verläufe in den Metabolitenprofilen zu interpretieren, da Klassifizierungen in der Regel auch bei sehr kleinen Varianzen erzielt werden können. Aussagekräftiger ist hier eine Gegenüberstellung der statistischen Modellkriterien.

Bezüglich der prädiktiven Komponente R^2X_P für die OPLS-DA Modelle der drei Trajektorien wurde ein negativer Trend beobachtet, d. h. die Diskriminierung der beiden Gruppen beruhte auf zunehmend kleineren Varianzen der \mathbf{X} -Matrix. Betrug R^2X_P für die 6/1 – 7/2 Periode noch 19.7 %, so fiel der Wert für die 8/1 – 10/2 Periode auf 7.5 % ab. Für die 16/1 – 17/2 Sammelperiode verzeichnete R^2X_P nur noch 4.7 %, die Varianz der prädiktiven Komponente war damit circa um den Faktor 5 niedriger als für das 6/1 – 7/2 Modell. Dies spiegelte sich auch in Q^2 wider, das mit einer Prädiktivität von 60.7 % deutlich unter den Werten der beiden anderen Modelle lag (86.3 % bzw. 80.5 %). Die beiden OPLS-DA Modelle, die mit Hilfe der durchschnittlichen Kontrollgruppe generiert wurden, entsprachen hinsichtlich ihrer Werte für R^2X_P , R^2Y und Q^2 nahezu dem klassischen CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 Modell, das unter Verwendung der *time-matched*-Kontrollgruppe erstellt wurde. Eine Zusammenfassung der statistischen Kennzahlen der drei zeitabhängigen Trajektorien zeigt **Tab. 5**.

Tab. 5: Zusammenfassung der statistischen Kennzahlen der Kontroll- vs. Hochdosisgruppe OPLS-DA Modelle (*pareto scaling*) der drei zeitabhängigen Trajektorien.

zeitabhängige Trajektorien	R^2X	R^2X_P	R^2Y	Q^2	signifikante PCs
CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2	0.338	0.197	0.898	0.863	1 + 1
CD 8/1 – 10/2 vs. HD 8/1 – 10/2	0.345	0.075	0.911	0.805	1 + 2
CD 16/1 – 17/2 vs. HD 16/1 – 17/2	0.540	0.047	0.893	0.607	1 + 3
dCD_Teil 1 vs. HD 6/1 – 7/2	0.374	0.207	0.898	0.863	1 + 1
dCD_Teil 2 vs. HD 6/1 – 7/2	0.364	0.184	0.896	0.860	1 + 1

Aus der Gegenüberstellung der Modellcharakteristika konnte gefolgert werden, dass die Effekte 0 – 48 h nach Gabe von 1.0 mL CCl_4 /kg KG am deutlichsten ausgeprägt waren und sich mit fortschreitender Studiendauer zunehmend abschwächten. Nach einem anfänglichen Ungleichgewicht, ausgelöst durch radikalvermittelten oxidativen Stress, schien sich das Merkaptursäureprofil nach einiger Zeit zu nivellieren und sukzessive dem Normalzustand anzunähern. Diese Beobachtungen, die für die drei separaten OPLS-DA Modelle gemacht wurden, deckten sich zudem mit dem integrativen OPLS-DA Modell der Versuchstage 6 – 17 (vgl. **Abb. 39**). Auch hier zeichneten sich eine zeitabhängige Regenerierung der Signaturen und eine Angleichung an die Kontrollgruppe ab.

3.2.6.3 OPLS-DA Modelle für die Kontroll- und Niedrigdosisgruppe

Mit den Proben der Niedrigdosisgruppe wurde entsprechend der Hochdosisgruppe verfahren. Für das integrative OPLS-DA Modell der Versuchstage 6 – 17 (CD 6/1 – 17/2 als $Y = 0$ vs. LD 6/1 – 17/2 als $Y = 1$) ergaben sich nach *pareto scaling* acht signifikante Komponenten sowie die Kenngrößen $R^2X = 0.558$, $R^2Y = 0.912$ und $Q^2 = 0.600$. Die prädiktive erste Hauptkomponente lieferte $R^2X_p = 0.022$. Aus **Abb. 45** ist die vollständige Trennung der beiden Gruppen entlang PC1 ersichtlich. Im Gegensatz zur Hochdosisgruppe formierten sich für die Niedrigdosisgruppe weder in PC1 noch in PC2 vergleichbare zeitabhängige Trajektorien, die Verteilung der *scores* von Kontroll- und Dosisgruppe folgten einer zufälligen statistischen Verteilung.

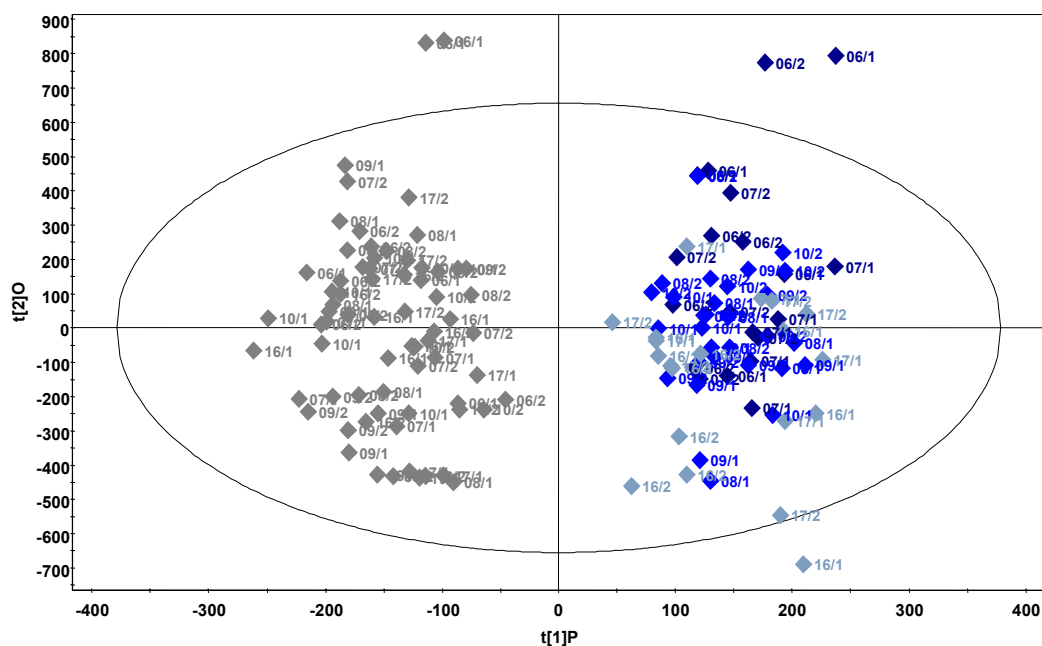


Abb. 45: OPLS-DA *score plot* ($t1P$ vs. $t2O$) der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe für die Versuchstage 6 – 17 nach *pareto scaling*; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe 6/1 – 17/2, \blacklozenge Niedrigdosisgruppe 6/1 – 7/2, \blacklozenge Niedrigdosisgruppe 8/1 – 10/2, \blacklozenge Niedrigdosisgruppe 16/1 – 17/2, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (1 – 17, Exposition an Tag 6) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

Die Varianz von PC1 war mit 2.2 % sehr gering und stand für kleine Veränderungen der *postdose-X*-Matrix im Vergleich zur Kontrollmatrix. Der Wert lag circa um den Faktor 2 niedriger als der Wert, der für das entsprechende Hochdosismodell (CD 16/1 – 17/2 vs. HD 16/1 – 17/2) ermittelt wurde.

Übertragen auf die Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffs im Niedrigdosisbereich wies dies auf einen sehr geringen Effekt auf die metabolischen Profile der Versuchstiere hin. Der Metabolismus der Ratten schien in der Lage zu sein, den Fremdstoff gut umsetzen und entgiften zu können, so dass es kaum zu einer messbaren Änderung des Mercaptursäureprofils kam. Ein derartiges

Ungleichgewicht hätte beispielsweise durch einen Anstieg an Mercaptursäuren hervorgerufen werden können, die in Folge von oxidativem Stress aus Lipidbruchstücken entstanden sind.

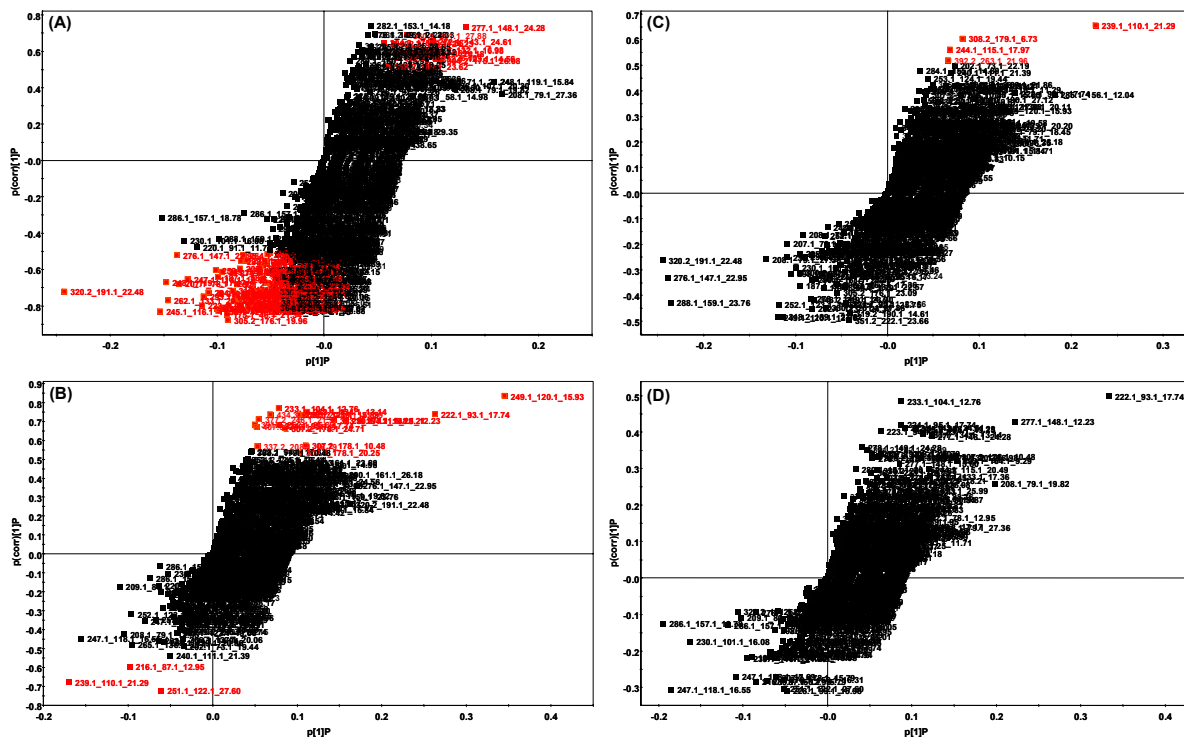
Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Studie, in der für die Niedrigdosisgruppe (0.1 mL CCl₄/kg KG) mittels NMR-basiertem Metabonomics keine Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt werden konnten [167], war dies mit dem Mercaptursäureansatz möglich. Allerdings fiel trotz nicht überlappender Trennung der beiden Gruppen im OPLS-DA *score plot* die Varianz der klassifizierenden Komponente sehr gering aus. Das Modell erfüllte dennoch die Prädiktivitätskriterien von $|R^2Y - Q^2| < 0.2 - 0.3$ und $Q^2 > 0.5$ [162]. Aufgrund der fehlenden Kinetik des Dosiseffekts im *score plot* (keine zeitabhängigen Trajektorien) wurde für die Identifizierung potentieller Marker eine kollektive Auswertung aller *postdose*-Versuchstage (Tag 6 – 17) vorgenommen und auf die Unterteilung in separate OPLS-DA Modelle verzichtet.

3.2.7 Selektion potentieller Marker

Potentielle Marker wurden anhand von *S-plots* selektiert. In einem *scatter plot* wird die Kovarianz (cov oder p) gegen die Korrelation (corr oder p(corr)) der zugrunde liegenden OPLS-DA Modellvariablen aufgetragen, wodurch sich die typische S-Form ergibt. Die Kovarianz gibt dabei an, wie groß der absolute Beitrag (Betrag) einer Variablen im Hinblick auf die Klassifizierung im *score plot* ausfällt, wohingegen die Korrelation den Effekt (Unterschiede zwischen den Gruppen) und die Belastbarkeit einer Variablen (Konfidenz) charakterisiert. Je höher dabei die Kovarianz und die Korrelation einer Variablen ausfallen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um einen realen Marker handelt, der für die Diskriminierung der Gruppen im *score plot* verantwortlich ist. Potentielle Marker sind demzufolge an den äußeren Enden der S-Kurve lokalisiert.

Bei Ansätzen, die sich bei der Markerselektion auf die Kovarianz als alleiniges Entscheidungskriterium beschränken, besteht das Risiko eines Trends in Richtung Variablen mit hohen Signalintensitäten. In diesem Zusammenhang wird auf die bereits diskutierte Problematik hinsichtlich der *usual suspects* verwiesen. Wird bei der Selektion potentieller Marker alleinig die Korrelation zugrunde gelegt, steigt das Risiko für falsch positive Ergebnisse (Fehler erster Art), da die Metaboliten zum Teil in nur sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen. Als eine Folge dessen können zufällige, durch Hintergrundrauschen bedingte Korrelationen resultieren [254]. Die Strategie bestand daher aus einer Kombination aus Kovarianz und Korrelation als Entscheidungskriterium, d. h. es wurden die am stärksten regulierten Variablen selektiert, die gleichzeitig die höchste Konfidenz zeigten.

Für die drei zeitabhängigen Trajektorien der Kontroll- vs. Hochdosisgruppe OPLS-DA Modelle (CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2, CD 8/1 – 10/2 vs. HD 8/1 – 10/2, CD 16/1 – 17/2 vs. HD 16/1 – 17/2) wurden jeweils separate *S-plots* erstellt. Potentielle Marker aus dem Vergleich von Kontroll- und Niedrigdosisgruppe wurden aufgrund der fehlenden Kinetik aus einem *S-plot* (CD 6/1 – 17/2 vs. LD 6/1 – 17/2) extrahiert. Die **Abb. 46 A – D** zeigen die zu den vier OPLS-DA Modellen gehörenden *S-plots*.



Konfidenzintervallen herangezogen [254]. Einen Ausschnitt für das CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 OPLS-DA Modell zeigt **Abb. 47**. Es wurde nach einem konservativen Verfahren vorgegangen, d. h. alle Variablen, deren Konfidenzintervall die Hälfte der absoluten Kovarianz überstieg (Konfidenzintervall $> p/2$), wurden ausgeschlossen. Isotopen von Variablen wurden ebenfalls eliminiert.

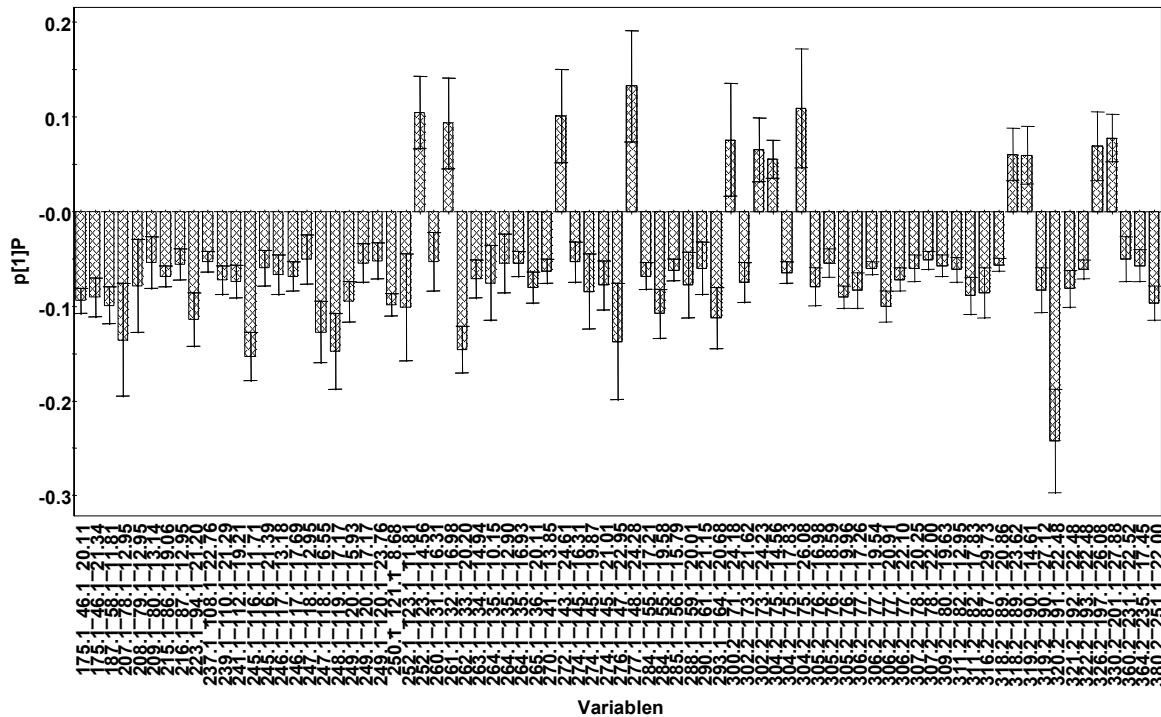


Abb. 47: Loading column plot (Variablen vs. p_1) mit *jack-knifed* Konfidenzintervallen für die 77 mittels *S-plot* selektierten Variablen (m/z m/z -129_RT) des OPLS-DA Kontroll- vs. Hochdosismodells 6/1 – 7/2 nach *pareto scaling*. Variablen mit Konfidenzintervallen $> p/2$ wurden nachfolgend ausgeschlossen.

Da die Datenextraktion softwaregestützt erfolgte und Fehler bei der Prozessierung nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten, wurde die Existenz der verbleibenden potentiellen Marker anschließend anhand der Rohdaten überprüft. Hierzu wurden aus Chromatogrammen der jeweiligen Gruppen die einzelnen Übergänge extrahiert und kontrolliert, inwieweit es sich bei der selektierten Variablen (m/z m/z -129_RT) um ein reales Signal handelte. Als Auswahlkriterium wurde hierbei ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von größer drei ($S/N > 3$) zugrunde gelegt. Die **Tab. 6** fasst die Ergebnisse der sukzessiven Markerreduzierung zusammen.

Tab. 6: Zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse der sukzessiven Markerselektion. Angegeben ist jeweils die Anzahl hoch- bzw. herunterregulierter Variablen ($m/z_{m/z-129_RT}$), die die Kovarianz- und Korrelationsauswahlkriterien ($|p| > 0.05$ und $|p(\text{corr})| > 0.5$) erfüllten, signifikante *jack-knifed* Konfidenzintervalle (Konfidenzintervall $\leq p/2$) aufwiesen, kein Isotop einer Variablen darstellten und durch die Rohdaten ($S/N > 3$) bestätigt werden konnten. Die Variablen einer Spalte erfüllten dabei auch alle Kriterien vorangegangener Spalten.

Anzahl potentieller Marker	mit $ p > 0.05$ und $ p(\text{corr}) > 0.5$		mit signifikantem Konfidenzintervall		nach Ausschluss der Isotopen		bestätigt durch Rohdaten	
	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow
CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2	12	65	8	56	8	52	8	48
CD 8/1 – 10/2 vs. HD 8/1 – 10/2	18	3	18	2	16	2	12	2
CD 16/1 – 17/2 vs. HD 16/1 – 17/2	4	0	3	0	3	0	3	0
CD 6/1 – 17/2 vs. LD 6/1 – 17/2	0	0	0	0	0	0	0	0

Der zu dem CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 OPLS-DA Modell gehörende *S-plot* lieferte 77 potentielle Marker, wovon im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Hochdosisgruppe 12 nach oben (\uparrow) und 65 nach unten (\downarrow) reguliert wurden. Bei der Selektion der Variablen wurde konservativ verfahren und nur signifikante Konfidenzintervalle (Konfidenzintervall $\leq p/2$) zugelassen. Nach Ausschluss der Isotopen und Sichtung der originalen Chromatogramme ($S/N > 3$) verringerten sich die mit der Hochdosisgruppe negativ bzw. positiv korrelierten Marker auf 48 bzw. 8. Das entsprechende CD 8/1 – 10/2 vs. HD 8/1 – 10/2 Modell lieferte zunächst 21 mögliche Marker (18 hochregulierte/3 herunterregulierte), von denen 14 alle folgenden Auswahlkriterien erfüllten. Für das CD 16/1 – 17/2 vs. HD 16/1 – 17/2 ergaben sich 5 initiale Variablen. Diese reduzierten sich im Verlauf des Verfahrens auf 3 und waren positiv mit dem Dosisseffekt korreliert. Aus dem *S-plot* für das CD 6/1 – 17/2 vs. LD 6/1 – 17/2 OPLS-DA Modell ergaben sich Variablen mit Werten für p und $p(\text{corr})$ unterhalb des *cut-offs*. Da es sich bei den vorab definierten Grenzen für die Kovarianz und die Korrelation um statistische Mindestanforderungen handelte, wurden aus diesem Modell keine potentiellen Marker extrahiert.

Beim Vergleich der Anzahl regulierter Variablen für die einzelnen Modelle fiel auf, dass sich ein bis zwei Tage *postdose* (Versuchstage 6 und 7) die Urinprofile am deutlichsten veränderten. Dabei überstieg die Anzahl der Merkaptsäuren, die infolge Tetrachlorkohlenstoffs nach unten reguliert wurden, die Anzahl derer, die nach oben reguliert wurden, um den Faktor 6. Ein ähnliches, aber umgekehrtes Verhältnis ergab sich für die Versuchstage 8 bis 10. Allerdings lag hier die Gesamtzahl der regulierten Metaboliten vierfach niedriger als für die Tage 6 und 7. Für die Versuchstage 16 und 17 fielen die Unterschiede zwischen Kontroll- und Hochdosisgruppe schließlich so gering aus, dass aus dem *S-plot* nur 3 signifikante Variablen ermittelt werden konnten. Diese Tendenzen deckten sich mit den in den OPLS-DA Modellen gemachten Beobachtungen, wonach die Varianz der prädiktiven Hauptkomponente (R^2X_p) und damit die

Unterschiede zwischen den Gruppen mit zunehmender Studiendauer abnahmen. Die **Tab. 7** beinhaltet die aus den *S-plots* der jeweiligen OPLS-DA Modelle extrahierten Variablen, die alle definierten Auswahlkriterien erfüllten.

Für das CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 Modell wiesen 64.3 % der Variablen, für das CD 8/1 – 10/2 vs. HD 8/1 – 10/2 Modell entsprechend 71.4 % der Variablen ein $p(\text{corr}) \geq 0.7$ auf und damit eine ausgezeichnete Korrelation mit dem Dosiseffekt. Dagegen waren die Werte für die Korrelation der Variablen des CD 16/1 – 17/2 vs. HD 16/1 – 17/2 Modells sehr niedrig und bewegte sich zwischen 0.56 und 0.65.

Aus statistischer Sicht handelte es sich bei den selektierten Variablen um aussichtsreiche Dosismarker für eine Exposition gegenüber Tetrachlorkohlenstoff. Allerdings dienten die auf *pattern recognition* basierenden Modelle der multivariaten Datenanalysen dabei nur als Zwischenschritt, denn auf dem Weg hin zu belastbaren Biomarkern sollte sich eine Strukturaufklärung der Marker anschließen [219, 270]. Da statistische Signifikanz nicht zwingend mit biologischer Relevanz einhergeht, muss diese nachfolgend separat untersucht und evaluiert werden.

Tab. 7: Zusammenfassende Aufstellung der potentiellen Marker (m/z , m/z -129_RT), die aus den *S-plots* der OPLS-DA Modelle CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2, CD 8/1 – 10/2 vs. HD 8/1 – 10/2, CD 16/1 – 17/2 vs. HD 16/1 – 17/2 und CD 6/1 – 17/2 vs. LD 6/1 – 17/2 (erste Messung, 1:5-Verdünnung der Proben) extrahiert wurden und alle definierten Auswahlkriterien ($|p| > 0.05$, $|p(\text{corr})| > 0.5$, Konfidenzintervall $\leq p/2$, Variable ist kein Isotop, $S/N > 3$) erfüllten.

Variable		Kovarianz		Korrelation	
m/z	m/z -129_RT	p		p(corr)	
in HD 6/1 – 7/2 hochregulierte Marker					
252.1	123.1_14.56	0.10		0.56	
261.1	132.1_16.98	0.09		0.61	
272.1	143.1_24.61	0.10		0.66	
277.1	148.1_24.28	0.13		0.73	
304.2	175.1_14.56	0.06		0.65	
318.2	189.1_23.62	0.06		0.52	
319.2	190.1_14.61	0.06		0.60	
330.2	201.1_27.88	0.08		0.69	
in HD 6/1 – 7/2 herunterregulierte Marker					
175.1	46.1_20.11	-0.09		-0.81	
175.1	46.1_21.34	-0.09		-0.85	
187.1	58.1_11.81	-0.10		-0.64	
207.1	78.1_12.95	-0.14		-0.68	
215.1	86.1_19.06	-0.07		-0.73	
216.1	87.1_12.95	-0.06		-0.57	
223.1	94.1_21.20	-0.11		-0.80	
237.1	108.1_22.76	-0.05		-0.68	
239.1	110.1_21.29	-0.07		-0.55	
245.1	116.1_11.71	-0.15		-0.83	
245.1	116.1_21.39	-0.06		-0.74	
246.1	117.1_13.18	-0.07		-0.71	
246.1	117.1_17.69	-0.07		-0.78	
247.1	118.1_16.55	-0.13		-0.65	
248.1	119.1_17.17	-0.15		-0.67	
249.1	120.1_15.93	-0.10		-0.61	
249.1	120.1_23.76	-0.05		-0.74	
250.1	121.1_8.68	-0.10		-0.83	
262.1	133.1_20.20	-0.15		-0.77	
in HD 6/1 – 7/2 herunterregulierte Marker (Forts.)					
263.1	134.1_14.94	-0.07		-0.80	
264.1	135.1_16.93	-0.06		-0.71	
265.1	136.1_20.11	-0.08		-0.76	
270.1	141.1_13.85	-0.06		-0.76	
274.1	145.1_16.31	-0.05		-0.61	
274.1	145.1_21.01	-0.08		-0.80	
276.1	147.1_22.95	-0.14		-0.52	
284.1	155.1_19.58	-0.11		-0.73	
288.1	159.1_20.01	-0.08		-0.55	
290.1	161.1_21.15	-0.06		-0.62	
302.2	173.1_21.62	-0.07		-0.75	
304.2	175.1_17.83	-0.06		-0.80	
305.2	176.1_16.98	-0.08		-0.82	
305.2	176.1_18.59	-0.05		-0.81	
305.2	176.1_19.96	-0.09		-0.88	
306.2	177.1_17.26	-0.08		-0.76	
306.2	177.1_19.54	-0.06		-0.74	
306.2	177.1_20.91	-0.10		-0.82	
306.2	177.1_22.10	-0.07		-0.74	
307.2	178.1_20.25	-0.06		-0.59	
309.2	180.1_19.63	-0.06		-0.79	
311.2	182.1_12.95	-0.06		-0.82	
311.2	182.1_17.83	-0.09		-0.80	
316.2	187.1_29.73	-0.09		-0.72	
318.2	189.1_20.86	-0.06		-0.72	
319.2	190.1_27.12	-0.08		-0.73	
320.2	191.1_22.48	-0.24		-0.72	
364.2	235.1_17.45	-0.06		-0.65	
380.2	251.1_22.00	-0.10		-0.73	
in HD 8/1 – 10/2 hochregulierte Marker					
222.1	93.1_17.74	0.26		0.74	
249.1	120.1_15.93	0.35		0.83	
250.1	121.1_18.21	0.16		0.71	
263.1	134.1_13.14	0.11		0.75	
277.1	148.1_12.23	0.18		0.70	
307.2	178.1_20.25	0.10		0.53	
307.2	178.1_24.71	0.09		0.66	
323.2	194.1_19.25	0.14		0.71	
365.2	236.1_21.29	0.11		0.73	
377.2	248.1_21.91	0.05		0.71	
407.3	278.1_31.49	0.05		0.67	
434.3	305.2_20.49	0.07		0.73	
in HD 8/1 – 10/2 herunterregulierte Marker					
239.1	110.1_21.29	-0.17		-0.68	
251.1	122.1_27.60	-0.06		-0.72	
in HD 16/1 – 17/2 hochregulierte Marker					
239.1	110.1_21.29	0.23		0.65	
244.1	115.1_17.97	0.07		0.56	
308.2	179.1_6.73	0.08		0.60	

3.3 Zweite Messung: Merkaptursäurescreening mit auf einheitliche spezifische Dichte verdünnten Proben

Da aufgrund der bereits diskutierten Problematik um Nulleinträge in der Datenmatrix ein gewisses Risiko für einen systematischen Fehler bei der Erstellung der multivariaten Modelle bestand, wurden die Proben der Versuchstage 6 und 7 ($n = 60$) zusammen mit elf QC-Proben einer erneuten Messung unterzogen. Durch individuelle Verdünnung der Urine auf die niedrigste spezifische Dichte der Probenserie (spezifische Dichte 1.008) sollte gewährleistet werden, dass alle Proben bei der Detektion im Massenspektrometer annähernd derselben Ionensuppression unterlagen. Probleme bei der softwaregestützten Datenextraktion und damit einhergehende systematische Verzerrungen der Datenmatrices sollten so vermieden werden.

Auf dem Gebiet des Metabonomics wurden analoge Strategien bisher erst in einzelnen Arbeiten beschrieben. Um Konzentrationsunterschiede zwischen den Urinproben der CCl_4 -Studie auszugleichen, umfasste die Probenvorbereitung in LA *ET AL.* eine Verdünnung der Urinproben auf einen einheitlichen Kreatiningehalt von 1 mM [221]. Diese Vorgehensweise gab, obwohl nicht näher begründet, einen Hinweis auf diuretische bzw. nephrotoxische Effekte in Folge einer Exposition gegenüber CCl_4 , wie sie auch in der vorliegenden Studie beobachtet wurden (vgl. **Abb. 35**). Neben der Verminderung der Ionensuppression und der Normalisierung der Urinproben beschrieben LUTZ *ET AL.* einen stabilisierenden Effekt auf die Retentionszeit von Metaboliten, wenn die Proben zuvor auf einen einheitlichen Kreatiningehalt verdünnt wurden [190]. Die einfache Möglichkeit zur Bestimmung der spezifischen Dichte im Vergleich zu Parametern wie dem Kreatiningehalt oder der Osmolalität von Urin diente auch in KELLERT *ET AL.* als Entscheidungsgrundlage bei der Wahl eines geeigneten Bezugswertes für eine einheitliche Verdünnung der Proben [126].

An der LC-MS/MS-Methode wurden im Vergleich zur ersten Messung mit einheitlich verdünnten Proben keine Änderungen vorgenommen. Zum Zwecke der Validierung wurde jeweils nach zehn Proben eine QC-Probe vermessen. Zur Konditionierung der Säule mit Urinmatrix wurden der ersten Messung zunächst fünf QC-Proben vorangestellt.

3.3.1 Datenerfassung und Datenfilter

Mittels *MarkerView* Software wurden die Chromatogramme der 60 Proben sowie der elf QC-Proben erfasst und die Signale in eine Datenmatrix überführt. Stichproben für zufällig ausgewählte, unbekannte Variablen ergaben eine gute Übereinstimmung mit den Rohdaten und keine

Missalignments, was zusätzlich durch das korrekte Alignment der internen Standards in allen Proben bestätigt wurde.

3.3.2 Analyse der generierten Datenmatrices

Die Datenmatrix wurde anschließend auf ihren Gehalt an Zellen mit Nulleinträgen untersucht. Hierzu wurde für jede einzelne Probe die Anzahl der Variablen mit einer Null in der entsprechenden Zelle ($\sum 0$) bestimmt. Die ersten beiden QC-Proben wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen, da die Messungen lediglich dem Zwecke der Säulenconditionierung dienten. Die Ergebnisse sind in **Tab. 8** zusammengefasst.

Tab. 8: Übersicht über die Summe der Nulleinträge ($\sum 0$) in der generierten Datenmatrix für die Kontroll-, Niedrig- und Hochdosisgruppe im Behandlungszeitraum 6/1 – 7/2 (jeweils $n = 20$). Die Urinproben wurden vor der Messung alle auf die niedrigste spezifische Dichte der Probenserie (spezifische Dichte 1.008) verdünnt. Zum Vergleich wurden die neun QC-Proben herangezogen. Im t-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Niedrig- bzw. Hochdosisgruppe.

$\sum 0$ in der Matrix	CD 6/1 – 7/2	LD 6/1 – 7/2	HD 6/1 – 7/2	QC 3 – 11
492 Variablen	n = 20	n = 20	n = 20	n = 9
Mittelwert	57 (11.6 %)	52 (10.6 %)	56 (11.4 %)	52 (10.6 %)
Standardabweichung	10	10	13	14
relative Standardabweichung [%]	17.3	18.9	22.8	27.8
Median	58 (11.8 %)	49 (10.0 %)	57 (11.6 %)	47 (9.6 %)
Minimum	30 (6.1 %)	39 (7.9 %)	29 (5.9 %)	36 (7.3 %)
Maximum	73 (14.8 %)	71 (14.4 %)	77 (15.7 %)	70 (14.2 %)

Für die Kontrollgruppe, die beiden Dosisgruppen (Niedrig- und Hochdosisgruppe) sowie die neun QC-Proben ergaben sich bei vergleichbaren Standardabweichungen mit 57 (58), 52 (49), 56 (57) und 52 (47) Nullen sehr ähnliche Mittelwerte (Mediane) für die absolute Summe der Nulleinträge. Mit relativen Werten von 10.6 – 11.6 % konnte die Datenmatrix als sehr dicht bezeichnet werden. Die t-Tests $\sum 0$ CD 6/1 – 7/2 vs. $\sum 0$ HD 6/1 – 7/2 und $\sum 0$ CD 6/1 – 7/2 vs. $\sum 0$ LD 6/1 – 7/2 lieferten im Gegensatz zur ersten Messung (Verdünnung 1:5) keinen signifikanten Wert für p und folglich ein nur geringes Risiko für einen systematischen Fehler bezüglich gruppenspezifischer Verzerrungen in der Datenmatrix. Mit der zweiten Messung der auf einheitliche spezifische Dichte verdünnten Proben war damit eine optimale Datengrundlage für die Auswertung der auf Varianzanalyse basierenden multivariaten Techniken geschaffen.

3.3.3 Evaluierung der Quality Control Proben

Die Analyse der Flächen der internen Standardvariablen in den neun QC-Proben lieferte relative Standardabweichungen von 25.3 % für d_3 -Acrylamid-MA, 12.6 % für d_3 -Hydrochinon-MA, 12.8 % für d_3 -Benzyl-MA und 23.9 % für 4-*tert*-Butylbenzyl-MA. Die RSDs lagen damit nur knapp über dem von der *Food and Drug Administration* für quantitative Analysen geforderten Wert von maximal 20 % RSD [212]. Ionensuppression und eine Überladung der Chromatographiesäule treten bevorzugt bei konzentrierten Urinproben auf. Diese enthalten eine Vielzahl an Ionen (v. a. Salze), die bei der Übertragung der Ladung in der Quelle des Massenspektrometers mit den Analyten konkurrieren. Ferner muss, wie bereits in Zusammenhang mit der ersten Messung diskutiert, mit einer Beeinträchtigung der Chromatographieeffizienz gerechnet werden. Durch eine einheitliche Verdünnung der Urine auf die niedrigste spezifische Dichte der Messreihe wurde in allen Proben eine vergleichbare Ionenkonzentration erreicht, Matrixeffekte bei der Detektion wurden folglich minimiert. Dies spiegelte sich auch in den RSDs der internen Standards wider. Verglichen mit den Werten der ersten Messung konnten in den nivellierten Proben die entsprechenden RSDs um 51.4 % (d_3 -Acrylamid-MA), 30.0 % (d_3 -Hydrochinon-MA) und 59.4 % (d_3 -Benzyl-MA) reduziert werden. Der 4-*tert*-Butylbenzyl-MA Standard wies eine Retentionszeit von über 30 min auf und unterlag folglich kaum den Effekten der Ionensuppression. In Übereinstimmung damit blieb der Wert für beide Messungen nahezu unverändert.

3.3.4 Überprüfung der Datenintegrität

Mehrfachbestimmungen derselben Probe können in multivariaten Modellen mitunter zu Verzerrungen (Bias) und folglich zu inkorrekten Prädiktionsraten führen. Daher wurde eine neue Datenmatrix erstellt, die ausschließlich Proben der Studie enthielt. Diese diente nach Ausschluss aller auf interne Standards zurückzuführenden Variablen als Grundlage für die folgenden Modelle.

Die Analyse des *line plots* (Variablen # vs. p1) einer initialen PCA über alle Proben (**Abb. 48**) ergab nach *pareto scaling* ein der ersten Messung vergleichbares Bild: Bezüglich der Variablen (m/z _ m/z -129_RT) 208.1_79.1_21.91 und 208.1_79.1_23.24 sowie 248.1_119.1_14.04 und 248.1_119.1_15.32 wurden große inter-individuelle Unterschiede festgestellt. Die Variablen, inklusive ihrer Isotopen 209.1_80.1_21.81, 209.1_80.1_23.24, 249.1_120.1_14.13, 249.1_120.1_15.32 und 250.1_121.1_14.04, wurden daher von allen weiteren Modellen ausgeschlossen. Die finale Datenmatrix beinhaltete 60 Proben und 483 Variablen.

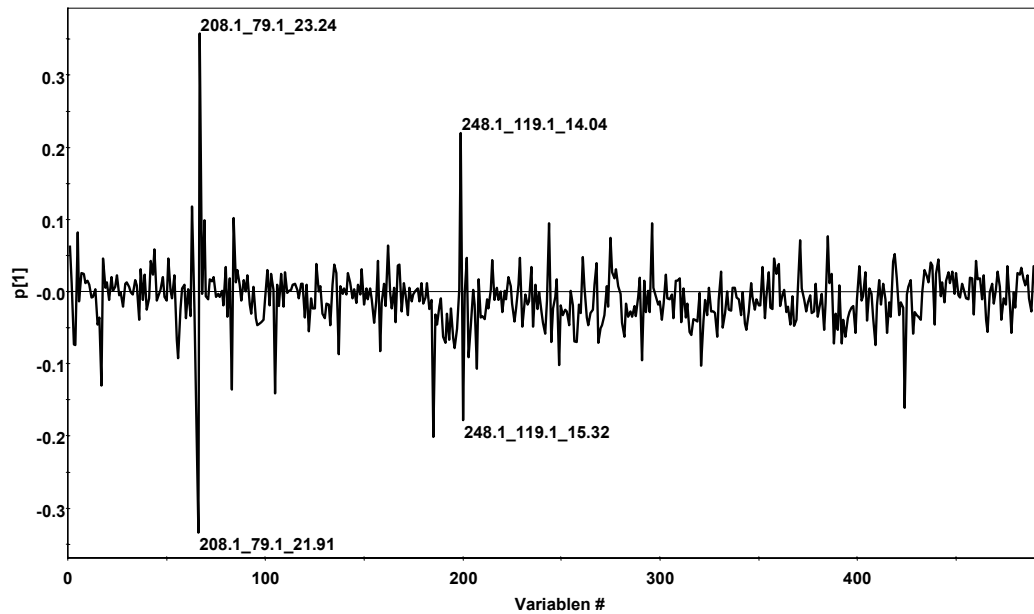


Abb. 48: Überprüfung der Datenintegrität: *line plot* (Variablen # vs. p1) einer initialen PCA über die 60 zuvor auf eine einheitliche spezifische Dichte von 1.008 verdünnten Proben nach *pareto scaling*.

3.3.5 PCA über alle 60 Proben

Die PCA über alle Gruppen nach Ausschluss der oben genannten konfundierenden Variablen lieferte nach *pareto scaling* ein Modell mit $R^2X = 0.332$ und $Q^2 = 0.187$. Die Hochdosisgruppe bildete im *score plot* (**Abb. 49**) ein eigenes Cluster, während Kontroll- und Niedrigdosisgruppe nicht klar voneinander abgegrenzt waren. Allerdings ließ sich ein Trend erkennen: die Proben der Niedrigdosisgruppe waren tendenziell zwischen der Kontroll- und der Hochdosisgruppe angeordnet. Insbesondere überschneiden sich die *scores* der HD 7/2 mit den *scores* der LD 6/1 Sammelperiode. Eine Gerade durch diese Punkte bildete quasi die Trennlinie zwischen dem HD-Cluster und den restlichen Proben.

Diese Beobachtung stand im Einklang mit dem zuvor beschriebenen PCA *score plot* der ersten Messung (vgl. **Abb. 38**). Auch hier trennte sich die Hochdosisgruppe ab, während Kontroll- und Niedrigdosisgruppe nicht unterscheidbar waren. Im Folgenden wurden beide Dosisgruppen unabhängig voneinander untersucht.

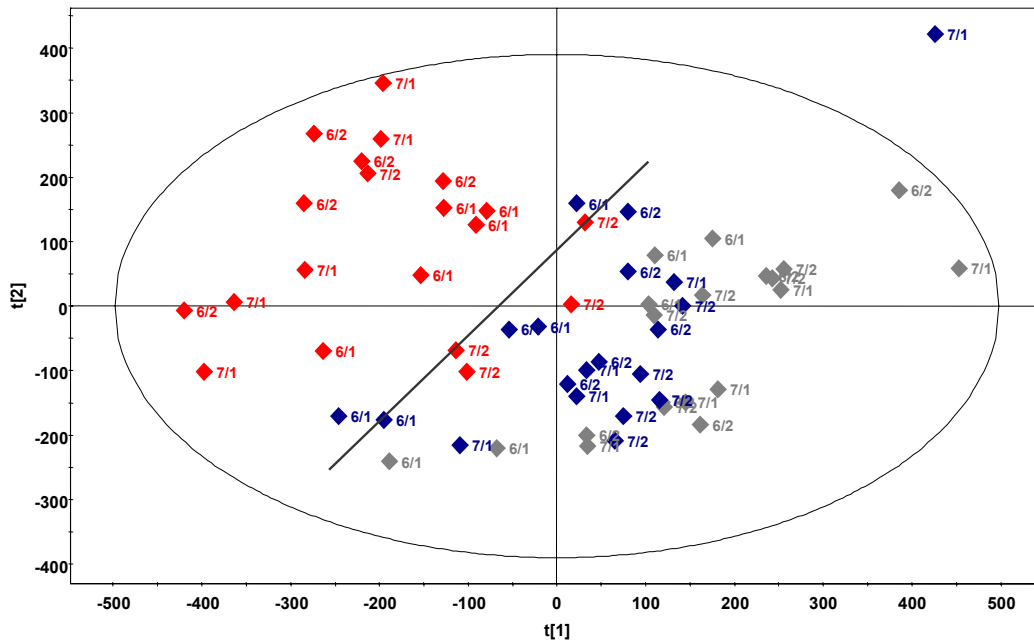


Abb. 49: PCA *score plot* (PC1 vs. PC2) der Kontroll-, Niedrig- und Hochdosisgruppe für die Versuchstage 6 und 7 nach *pareto scaling*. Entlang der eingezeichneten Linie gruppierten sich die Sammelzeitpunkte HD 7/2 und LD 6/1; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe, \blacklozenge Niedrigdosisgruppe, \blacklozenge Hochdosisgruppe, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (6 bzw. 7, Exposition an Tag 6) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

3.3.6 Modelle für eine CCl_4 -Exposition im Hochdosisbereich

3.3.6.1 PCA Modell der Kontroll- und Hochdosisgruppe

Die Proben der Kontroll- und Hochdosisgruppe wurden in einer separaten PCA (*pareto scaling*) weiter untersucht. **Abb. 50** zeigt den PC1 vs. PC2 *score plot*. Die Modellcharakteristika ergaben sich bei zwei signifikanten Komponenten zu $R^2X = 0.372$ und $Q^2 = 0.212$. Die Gruppentrennung erfolgte hauptsächlich entlang PC1 ($R^2X = 0.249$). Bezüglich der einzelnen Versuchstage fiel auf, dass in der Hochdosisgruppe die Sammelperioden 6/1 und 7/2 sowie 6/2 und 7/1 jeweils clusterten, wohingegen sich in der Kontrollgruppe dieser Trend nicht abzeichnete. Die HD 7/2 *scores* rückten dicht an die CD *scores* heran.

Übertragen auf die Metabolitenprofile bedeutete dies, dass nach einer gewissen Anlaufphase von circa 12 h (HD 6/1) die größten Veränderungen 12–36 h nach Dosierung der Versuchstiere (HD 6/2 und HD 7/1) auftraten, wobei 48 h nach Dosierung (HD 7/2) fast wieder der metabolische Normalzustand der Kontrolltiere erreicht wurde. Dieser Trend konnte bereits im OPLS-DA Modell CD 6/1–17/2 vs. HD 6/1–17/2 der ersten Messung beobachtet werden (vgl. **Abb. 39**). Auch hier bewegten sich die Proben HD 6/1, HD 6/2 und HD 7/1 vom Hauptcluster weg, während die HD 7/2 *scores* von diesem nicht zu unterscheiden waren. In gleichem

Maße strebten die HD 7/2 Proben in der OPLS-DA CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 der ersten Messung der Kontrollgruppe entgegen.

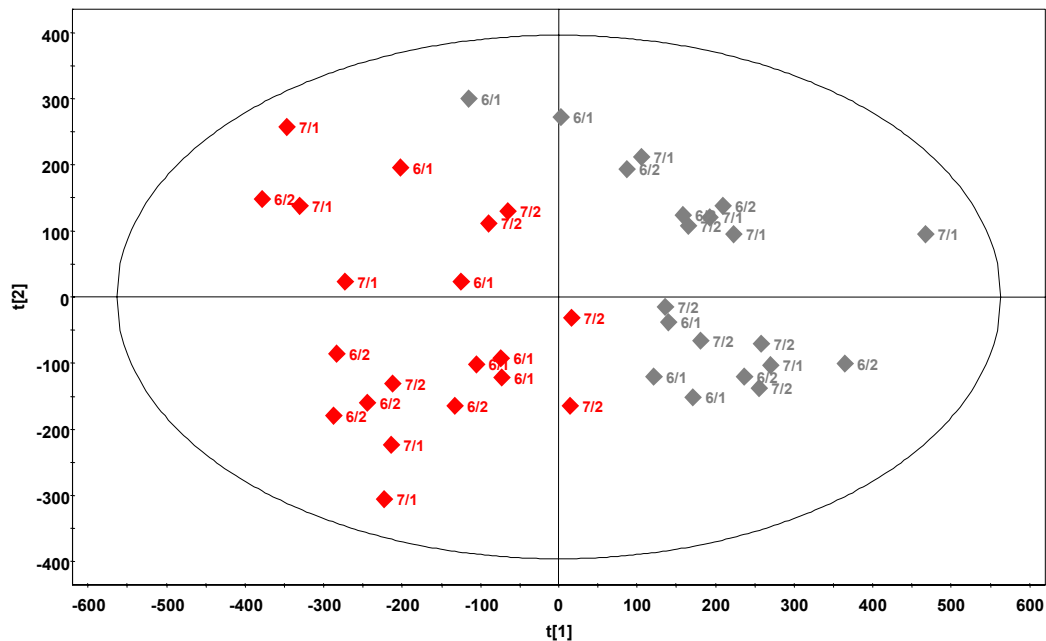


Abb. 50: PCA score plot (PC1 vs. PC2) der Kontroll- und Hochdosisgruppe für die Versuchstage 6 und 7 nach *pareto scaling*; Schlüssel: ◆ Kontrollgruppe, ◆ Hochdosisgruppe, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (6 bzw. 7, Exposition an Tag 6) und die Urin-sammelperiode (1 bzw. 2).

3.3.6.2 OPLS-DA Modell der Kontroll- und Hochdosisgruppe

Zum Zwecke der Markeridentifizierung wurde analog zur ersten Messung ein CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 OPLS-DA Modell erstellt, welches die beiden Gruppen ohne Überlappung diskriminieren konnte (**Abb. 51**). Die drei signifikanten Komponenten lieferten $R^2X = 0.407$, $R^2Y = 0.979$ und $Q^2 = 0.936$, wobei die erste, prädiktive Hauptkomponente mit $R^2X_p = 0.199$ nahezu die Hälfte der kumulativen Varianz auf sich vereinigte.

Die bereits in der PCA beobachtete Kinetik zeichnete sich in der ersten orthogonalen Komponente (t2O) ab. Das Modell erfüllte die Voraussetzungen für prädiktive OPLS-DA Modelle und diente als Grundlage für die anschließende Identifizierung potentieller Marker.

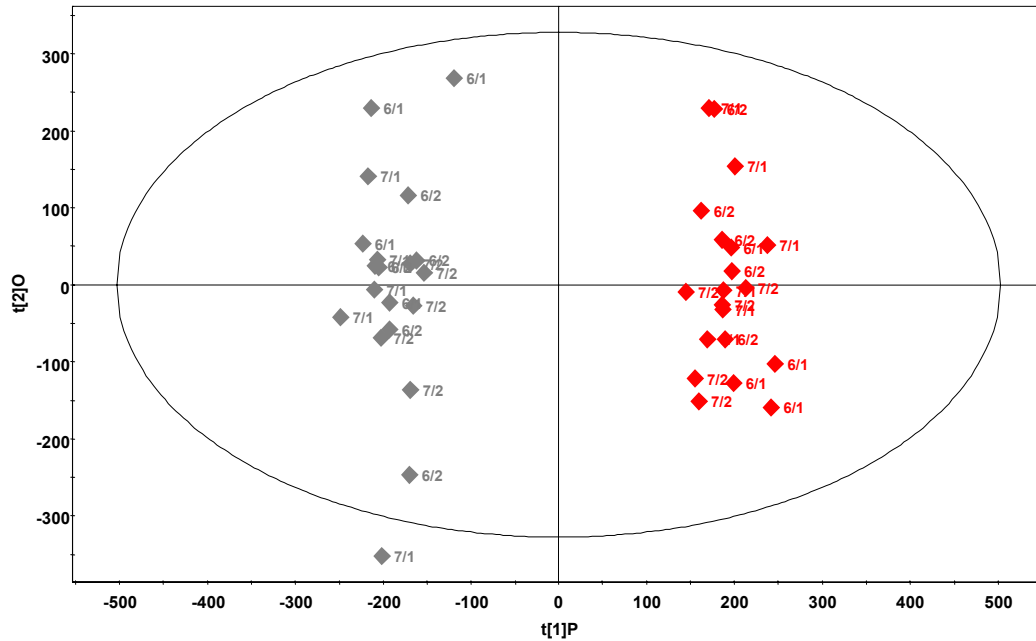


Abb. 51: OPLS-DA *score plot* (t1P vs. t2O) der Kontroll- und Hochdosisgruppe für die Versuchstage 6 und 7 nach *pareto scaling*; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe, \blacklozenge Hochdosisgruppe, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (6 bzw. 7, Exposition an Tag 6) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

3.3.7 Modelle für eine CCl_4 -Exposition im Niedrigdosisbereich

3.3.7.1 PCA Modell der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe

Die Klassifizierung der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe erfolgt im PCA *score plot* (PC1 vs. PC3) erst entlang PC3 (**Abb. 52**). Aus den fünf signifikanten Komponenten resultierten $R^2X = 0.578$ und $Q^2 = 0.138$. Im Vergleich zum entsprechenden CD_HD-Modell ($R^2X = 0.249$) lieferte die diskriminierende Komponente mit $R^2X = 0.103$ somit nur knapp die Hälfte der Varianz. Aus den Modellkennzahlen ließ sich folglich eine Dosisabhängigkeit der CCl_4 -Wirkung ableiten. Eine Kinetik der Urinprofile zeichnete sich in dem CD_LD PCA Modell allerdings nur schwach ab. Dennoch strebten die LD 7/2 Proben zum Cluster der Kontrollgruppe und folgten damit dem gleichen Trend wie die Proben der Hochdosisgruppe.

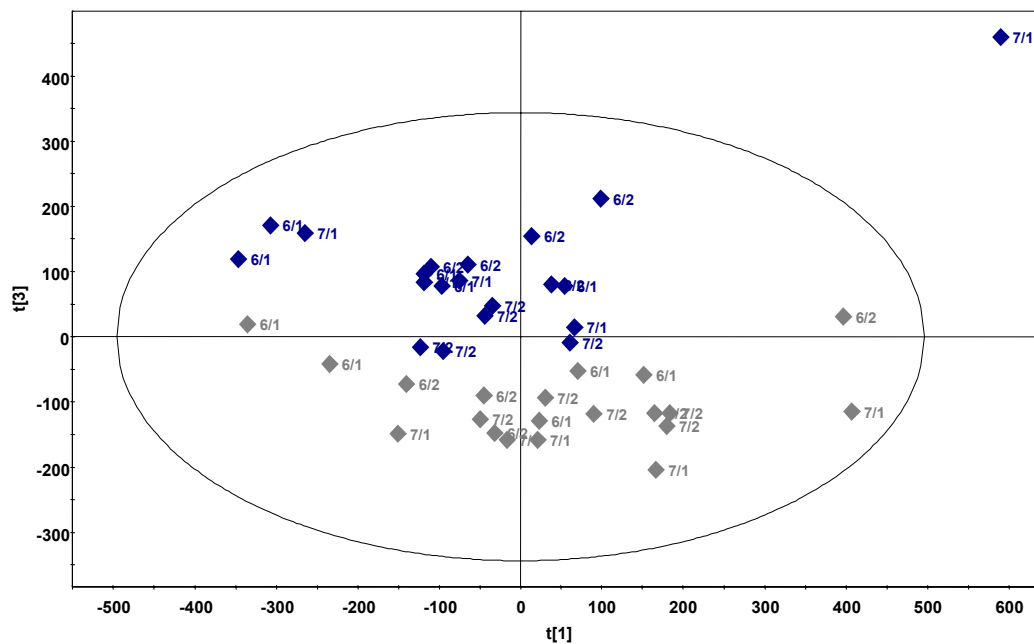


Abb. 52: PCA score plot (PC1 vs. PC3) der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe für die Versuchstage 6 und 7 nach *pareto scaling*; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe, \blacklozenge Niedrigdosisgruppe, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (6 bzw. 7, Exposition an Tag 6) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

3.3.7.2 OPLS-DA Modell der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe

Die **Abb. 53** zeigt das OPLS-DA Modell der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe (CD 6/1 – 7/2 vs. LD 6/1 – 7/2, zwei signifikante Komponenten, $R^2X = 0.303$, $R^2Y = 0.902$ und $Q^2 = 0.835$). Die erste Hauptkomponente war mit $R^2X_p = 0.101$ in der Lage, die beiden Gruppen vollständig zu diskriminieren, deckte im Vergleich zum entsprechenden CD_HD-Modell ($R^2X_p = 0.199$) aber nur halb so viel kumulative Varianz ab. Wie in dem vorangegangenen PCA Modell war eine Kinetik der Merkaptursäureprofile nicht erkennbar. Die OPLS-DA erfüllte die Voraussetzungen, die allgemein an prädiktive Modelle gestellt werden und diente im Folgenden als Grundlage für die Selektion potentieller Marker.

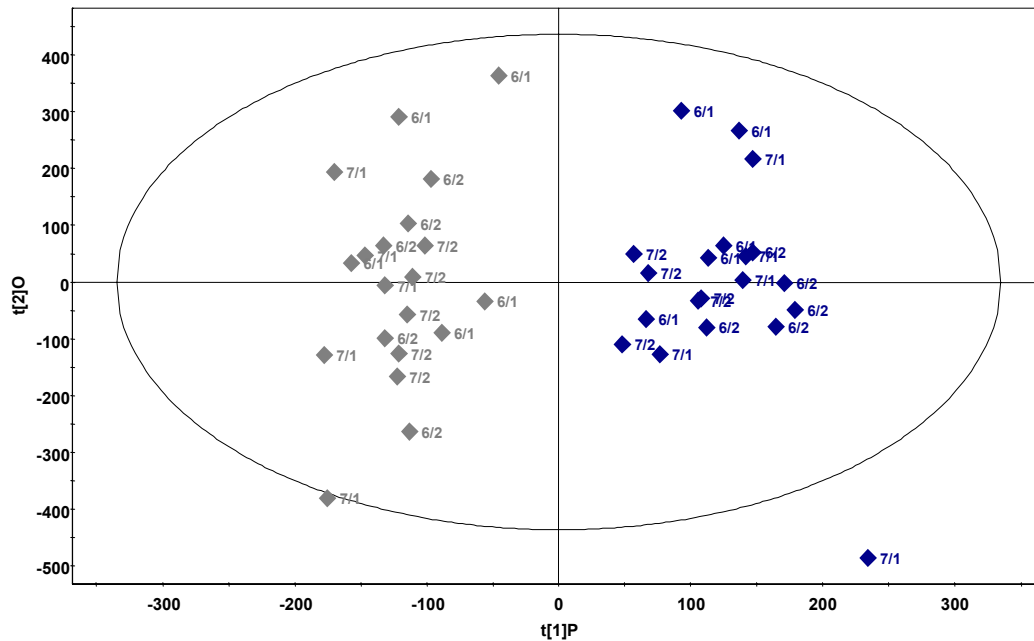


Abb. 53: OPLS-DA *score plot* (t1P vs. t2O) der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe für die Versuchstage 6 und 7 nach *pareto scaling*; Schlüssel: \blacklozenge Kontrollgruppe, \blacklozenge Niedrigdosisgruppe, die Ziffern neben dem Symbol markieren den Versuchstag (6 bzw. 7, Exposition an Tag 6) und die Urinsammelperiode (1 bzw. 2).

3.3.8 Selektion potentieller Marker

Wie zuvor für die erste Messung, wurden auch für die zweite Messung *S-plots* der entsprechenden *pareto*-skalierten OPLS-DA Modelle erstellt (**Abb. 54 A** und **B**). Für die Kovarianz und die Korrelation wurden analog *cut-offs* von 0.05 und -0.05 bzw. 0.5 und -0.5 gesetzt und Listen potentieller Marker generiert. Dabei wurden nur Variablen mit signifikantem Konfidenzintervall (konservatives Verfahren, Konfidenzintervall $\leq p/2$) zugelassen, Isotopen wurden ausgeschlossen.

Zusammenfassung der sukzessiven Markerselektion, **Tab. 10** die Liste der potentiellen Marker inklusive der Werte für p und $p(\text{corr})$.

Tab. 9: Zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse der sukzessiven Markerselektion. Angegeben ist jeweils die Anzahl hoch- bzw. herunterregulierter Variablen (m/z m/z -129_RT), die die Kovarianz- und Korrelationsauswahlkriterien ($|p| > 0.05$ und $|p(\text{corr})| > 0.5$) erfüllten, signifikante *jack-knifed* Konfidenzintervalle (Konfidenzintervall $\leq p/2$) aufwiesen, kein Isotop einer Variablen darstellten und durch die Rohdaten ($S/N > 3$) bestätigt werden konnten. Die Variablen einer Spalte erfüllten hierbei auch alle Kriterien vorangegangener Spalten.

Anzahl potentieller Marker	mit $ p > 0.05$ und mit signifikantem		mit signifikantem		nach Ausschluss		bestätigt durch	
	$ p(\text{corr}) > 0.5$		Konfidenzintervall		der Isotopen		Rohdaten	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2	22	62	19	59	19	55	18	48
CD 6/1 – 7/2 vs. LD 6/1 – 7/2	16	27	14	24	11	20	11	18

Verglichen mit der ersten Messung ergab sich für das CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 Modell der zweiten Messung ein ähnliches Bild. Es wurden jeweils deutlich mehr Merkaptursäuren nach unten reguliert als nach oben. Allerdings verringerte sich das Verhältnis aus hoch- zu herunterregulierten Markern ungefähr um den Faktor 2. Des Weiteren wiesen nur noch 53.0 % der Variablen ein $p(\text{corr})$ von größer 0.7 auf (64.3 % bei der ersten Messung). Dies deutete darauf hin, dass die OPLS-DA im Fall der ersten Messung zu einem gewissen Teil durch einen systematischen Trend beeinflusst wurde, der aus der ungleichen Verteilung der Zellen mit Nulleinträgen in der Datenmatrix resultierte.

Konnten aus dem *S-plot* des CD 6/1 – 17/2 vs. LD 6/1 – 17/2 Modells der ersten Messung keine Variablen extrahiert werden, die die vorgegebenen Kriterien erfüllten, lieferte das CD 6/1 – 7/2 vs. LD 6/1 – 7/2 Modell der auf einheitliche spezifische Dichte verdünnten Proben 29 potentielle Expositionsmarker. Davon lieferten 44.8 % ein $p(\text{corr})$ von größer 0.7. Beim Vergleich der potentiellen LD- und HD-Marker fiel auf, dass 5 der 11 in dem CD 6/1 – 7/2 vs. LD 6/1 – 7/2 OPLS-DA Modell nach oben regulierten Marker auch in dem CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 OPLS-DA Modell hochreguliert waren. Ferner wurden in dem OPLS-DA Niedrigdosismodell 12 der 18 aus den *S-plots* selektierten und herunterregulierten Marker auch in dem entsprechenden Hochdosismodell nach unten reguliert. Die sowohl in dem HD- als auch in dem LD-Modell regulierten Marker sind in **Tab. 10** kursiv gedruckt. Biologisch gesehen handelt es sich hierbei wahrscheinlich um Metaboliten, die dosisabhängig ausgeschieden werden.

Tab. 10: Zusammenfassende Aufstellung der potentiellen Marker (m/z _ m/z -129_RT), die aus den S -plots der OPLS-DA Modelle CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 und CD 6/1 – 7/2 vs. LD 6/1 – 7/2 (zweite Messung, Verdünnung der Proben auf einheitliche spezifische Dichte) extrahiert wurden und alle definierten Auswahlkriterien ($|p| > 0.05$, $|p(\text{corr})| > 0.5$, Konfidenzintervall $\leq p/2$, Variable ist kein Isotop, $S/N > 3$) erfüllten. Marker, die sowohl für das OPLS-DA Hoch- als auch für das Niedrigdosismodell selektiert wurden, sind kursiv markiert.

Variable	Kovarianz	Korrelation	Variable	Kovarianz	Korrelation
m/z _ m/z -129_RT	p	p(corr)	m/z _ m/z -129_RT	p	p(corr)
in HD 6/1 – 7/2 hochregulierte Marker			in LD 6/1 – 7/2 hochregulierte Marker		
171.1_42.1_6.12	0.09	0.82	<i>284.1_155.1_15.60</i>	-0.10	-0.84
197.1_68.1_19.68	0.05	0.64	<i>284.1_155.1_17.59</i>	-0.11	-0.79
<i>222.1_93.1_15.79</i>	0.10	0.56	285.1_156.1_11.14	-0.05	-0.57
238.1_109.1_6.54	0.06	0.58	288.1_159.1_21.67	-0.08	-0.52
249.1_120.1_12.00	0.07	0.74	290.1_161.1_7.73	-0.06	-0.70
<i>259.1_130.1_6.54</i>	0.05	0.66	292.1_163.1_6.92	-0.05	-0.63
<i>261.1_132.1_15.08</i>	0.17	0.80	304.2_175.1_15.89	-0.06	-0.66
264.1_135.1_17.26	0.05	0.63	<i>305.2_176.1_15.03</i>	-0.10	-0.86
272.1_143.1_22.52	0.08	0.72	305.2_176.1_18.02	-0.07	-0.82
<i>277.1_148.1_10.76</i>	0.05	0.53	<i>306.2_177.1_15.36</i>	-0.09	-0.83
277.1_148.1_22.19	0.11	0.77	306.2_177.1_18.92	-0.07	-0.72
295.1_166.1_18.59	0.06	0.59	311.2_182.1_15.93	-0.09	-0.85
300.2_171.1_22.19	0.08	0.77	316.2_187.1_27.55	-0.07	-0.65
304.2_175.1_23.99	0.09	0.65	320.2_191.1_20.44	-0.19	-0.82
<i>307.2_178.1_9.86</i>	0.06	0.68	349.2_220.1_15.41	-0.05	-0.82
319.2_190.1_12.99	0.06	0.68	<i>350.2_221.1_12.80</i>	-0.07	-0.85
330.2_201.1_25.70	0.07	0.69	<i>364.2_235.1_15.60</i>	-0.09	-0.81
346.2_217.1_18.92	0.06	0.58	380.2_251.1_20.11	-0.06	-0.70
in HD 6/1 – 7/2 herunterregulierte Marker			in LD 6/1 – 7/2 herunterregulierte Marker		
175.1_46.1_18.07	-0.08	-0.72	<i>222.1_93.1_15.79</i>	0.21	0.64
175.1_46.1_19.30	-0.08	-0.73	233.1_104.1_12.47	0.06	0.69
187.1_58.1_10.43	-0.16	-0.68	244.1_115.1_18.45	0.10	0.74
206.1_77.1_7.16	-0.09	-0.80	<i>259.1_130.1_6.54</i>	0.06	0.70
207.1_78.1_11.67	-0.11	-0.83	<i>261.1_132.1_15.08</i>	0.12	0.53
215.1_86.1_17.07	-0.07	-0.68	<i>277.1_148.1_10.76</i>	0.18	0.83
<i>216.1_87.1_11.52</i>	-0.07	-0.66	302.2_173.1_23.90	0.07	0.56
223.1_94.1_19.11	-0.05	-0.78	<i>307.2_178.1_9.86</i>	0.20	0.84
229.1_100.1_12.38	-0.05	-0.57	321.2_192.1_11.33	0.05	0.69
<i>230.1_101.1_14.27</i>	-0.19	-0.68	337.2_208.1_15.74	0.07	0.63
239.1_110.1_19.39	-0.08	-0.59	365.2_236.1_19.21	0.06	0.66
245.1_116.1_10.48	-0.23	-0.71	in LD 6/1 – 7/2 herunterregulierte Marker		
245.1_116.1_19.35	-0.06	-0.76	<i>216.1_87.1_11.52</i>	-0.07	-0.52
246.1_117.1_12.00	-0.08	-0.74	<i>230.1_101.1_14.27</i>	-0.33	-0.76
246.1_117.1_15.84	-0.08	-0.73	247.1_118.1_14.94	-0.18	-0.76
247.1_118.1_17.26	-0.08	-0.74	<i>251.1_122.1_17.07</i>	-0.05	-0.51
250.1_121.1_8.01	-0.12	-0.70	<i>259.1_130.1_12.23</i>	-0.09	-0.67
<i>251.1_122.1_17.07</i>	-0.05	-0.67	<i>260.1_131.1_14.46</i>	-0.10	-0.61
<i>259.1_130.1_12.23</i>	-0.07	-0.73	264.1_135.1_15.03	-0.07	-0.71
260.1_131.1_12.90	-0.05	-0.62	270.1_141.1_14.94	-0.15	-0.85
<i>260.1_131.1_14.46</i>	-0.08	-0.70	<i>278.1_149.1_13.04</i>	-0.08	-0.55
262.1_133.1_7.26	-0.07	-0.58	<i>284.1_155.1_15.60</i>	-0.14	-0.84
262.1_133.1_18.45	-0.11	-0.75	<i>284.1_155.1_17.59</i>	-0.13	-0.69
264.1_135.1_11.48	-0.08	-0.69	285.1_156.1_14.18	-0.11	-0.87
270.1_141.1_12.80	-0.09	-0.79	290.1_161.1_14.46	-0.07	-0.62
271.1_142.1_11.90	-0.06	-0.72	<i>305.2_176.1_15.03</i>	-0.12	-0.72
274.1_145.1_12.85	-0.05	-0.62	306.2_177.1_14.13	-0.10	-0.83
274.1_145.1_14.51	-0.07	-0.68	<i>306.2_177.1_15.36</i>	-0.07	-0.57
276.1_147.1_20.86	-0.10	-0.57	<i>350.2_221.1_12.80</i>	-0.05	-0.52
<i>278.1_149.1_13.04</i>	-0.05	-0.55	<i>364.2_235.1_15.60</i>	-0.14	-0.85

Bei den verbleibenden LD-Markern, die ausschließlich in dem CD 6/1 – 7/2 vs. LD 6/1 – 7/2 OPLS-DA Modell nach oben bzw. unten reguliert wurden, besteht zum einen die Möglichkeit, dass diese ebenfalls eine Dosisabhängigkeit zeigen, die Variablen im entsprechenden CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 OPLS-DA Modell jedoch aufgrund der definierten *cut-off*-Kriterien nicht selektiert wurden. Zum anderen ist es denkbar, dass es sich hierbei um Marker handelt, die für einen toxischen Effekt im Niedrigdosisbereich charakteristisch sind.

Es ist anzumerken, dass die Variablen der ersten und zweiten Messung nicht direkt miteinander verglichen werden können. Bedingt durch Wartungsarbeiten an den HPLC-Pumpen kam es zwischen den beiden Messungen zu Retentionszeitverschiebungen von circa zwei Minuten, wie anhand der internen Standards beobachtet werden konnte. Dies stellte für die Interpretation der Daten kein Problem dar, da beide Datensätze unabhängig voneinander prozessiert und ausgewertet wurden. Allerdings war ein qualitativer Vergleich der ersten und zweiten Messung bezüglich der selektierten Marker aufgrund der Verschiebungen schwer durchführbar, da nicht sichergestellt werden konnte, dass es sich bei einer Variablen um denselben Metaboliten handelte. Auf eine Gegenüberstellung der Markerlisten wird daher an dieser Stelle verzichtet.

3.4 Strukturaufklärung der selektierten Marker

Datenbanken für die Identifizierung von Metaboliten stehen bedingt für Intermediate des Stoffwechsels (*usual suspects*) zur Verfügung. So enthält die *KEGG* Datenbank [271] ebenso wie die *METLIN* Datenbank [92] eine Vielzahl an Anaboliten und Kataboliten aus dem Primärstoffwechsel, die *NIST Mass Spectral Library* [90] für GC-MS-Analysen darüber hinaus sogar Fragmentierungsmuster für derivatisierte Metaboliten. Für Phase-II-Metaboliten aus dem Fremdstoffmetabolismus stehen solche Datenbanken dagegen nicht bzw. nur sehr eingeschränkt zur Verfügung. Gleiches gilt für LC-ESI-MS-Fragmentierungsmuster. Für die Identifizierung der selektierten Mercaptursäuren musste daher auf Literaturdaten sowie auf hausinterne Datenbanken und *enhanced* Produktionenspektren zurückgegriffen werden.

Die Listen der potentiellen Marker (vgl. **Tab. 7 und 10**) enthalten sowohl für die erste als auch für die zweite Messung für das CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2 OPLS-DA Modell eine Variable mit einem Prekursorion von $m/z = 320$ (erste Messung 320.2_191.1_22.48, zweite Messung 320.2_191.1_20.44). Diese übt mit Werten von $p = -0.24$ und $p(\text{corr}) = -0.72$ (erste Messung) bzw. $p = -0.19$ und $p(\text{corr}) = -0.82$ (zweite Messung) für die Kovarianz bzw. die Korrelation einen sehr starken Einfluss auf die Diskriminierung der Kontroll- und Hochdosisgruppe im *score plot* bei gleichzeitig hoher Konfidenz der Variablen aus. Die negativen Vorzeichen indizierten

hierbei, dass die Merkaptursäure infolge der CCl_4 -Exposition nach unten reguliert wurde. Der Metabolit konnte durch Vergleich des EPI-Spektrums mit dem eines authentischen Standards als Merkaptursäure des 1,4-Dihydroxynonens (DHN-MA) identifiziert werden. Standard und Metabolit wiesen identische Retentionszeiten auf und das Massenspektrum im negativen Ionisationsmodus lieferte in beiden Fällen Fragmente von $m/z = 191$, 173 und 143 (**Abb. 55**). Dabei resultierte die Produktion $m/z = 191$ aus dem charakteristischen *constant neutral loss* von 129 Da. Das Fragment $m/z = 173$ entstand ausgehend von $m/z = 191$ durch einen Verlust an H_2O , $m/z = 143$ vermutlich durch anschließende Abspaltung von C_2H_6 aus der C-Kette des DHN.

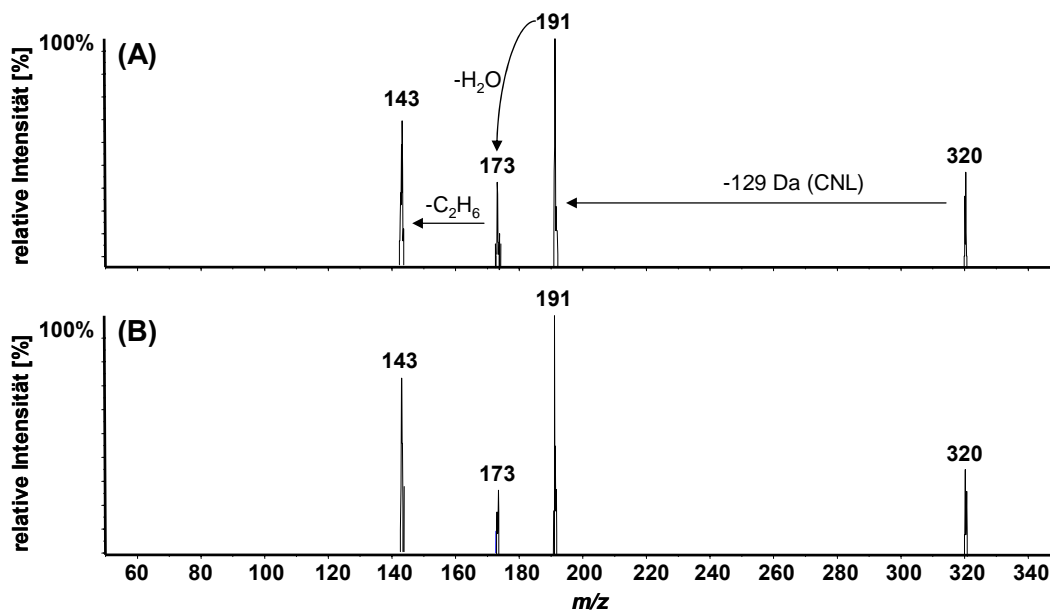


Abb. 55: Enhanced Produktionenspektren der DHN-MA ($m/z = 320$) nach negativer *collision induced dissociation*: (A) authentischer Standard (1 μM), (B) auf eine spezifische Dichte von 1.008 verdünnter Poolurin (HD 7/1 Ratte 1 – 5, jeweils gleiche Teile).

Bei 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) handelt es sich um ein endogenes Stoffwechselprodukt, das aus der Lipidperoxidation von polyungesättigten Fettsäuren aus Zellmembranen und von Phospholipiden aus Lipoproteinen resultiert. DHN-MA entsteht dabei aus dem GSH-Addukt des HNE durch enzymatische Reduktion mittels NADPH-abhängiger Aldo-Keto-Reduktase und anschließendem Abbau zur Merkaptursäure (**Abb. 56**) [133].

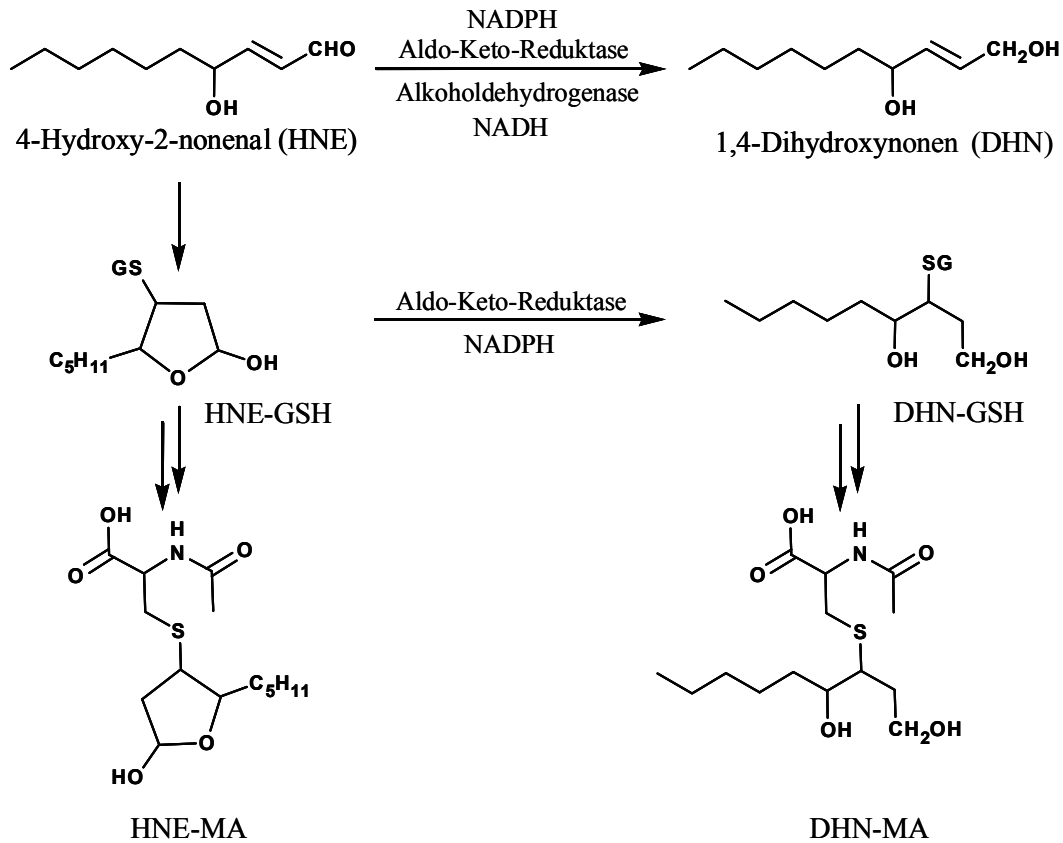


Abb. 56: Reaktionsschema des HNE-Metabolismus *in vivo* (nach ALARY ET AL. 2003 [133]).

Des Weiteren konnte der Metabolit 318.2_189.1_23.62 (erste Messung) bzw. 318.2_189.1_21.58 (zweite Messung) als HNE-MA identifiziert werden. Die Entstehung wurde bereits im Kontext mit DHN-MA erläutert. Das Prekursorion $m/z = 318$ lieferte nach negativer *collision induced dissociation* die Fragmente $m/z = 189$ [M-129], 171 [M-129-H₂O] und 143 [M-129-H₂O-C₂H₄] und somit ein der DHN-MA vergleichbares Produktionenspektrum. Ferner zeigten der Metabolit und ein authentischer Standard ein übereinstimmendes EPI-Spektrum sowie identische Retentionszeiten. Die erste Messung lieferte eine Kovarianz von $p = 0.06$ und eine Korrelation von $p(\text{corr}) = 0.52$, die zweite Messung entsprechend $p = 0.04$ und $p(\text{corr}) = 0.53$. Die positiven Vorzeichen ließen die positive Korrelation mit dem Dosiseffekt erkennen. Durch den gewählten *cut-off* von 0.05 für die Kovarianz war die Variable in der Liste der potentiellen Marker für die zweite Messung nicht enthalten (vgl. **Tab. 10**). Hier wurde die Problematik erkennbar, die ein *cut-off* bei der Selektion potentieller Marker mit sich bringt. Bedingt durch die Normalisierung auf interne Standards in der ersten Messung wies die Variable $m/z = 318$ verglichen mit der zweiten Messung größere Peakflächen auf. Da die Kovarianz zu einem großen Teil durch den absoluten Wert einer Variablen beeinflusst wird, folgt, dass bei gleicher Korrelation (Fähigkeit zur Diskriminierung der Gruppen) die Variable nur bei der ersten Messung als potentieller Marker gelistet wurde.

Sowohl DHN-MA als auch HNE-MA waren in der Markerliste für das Niedrigdosismodell (CD 6/1 – 7/2 vs. LD 6/1 – 7/2) nicht enthalten. Eine Regulierung beider Metaboliten in Folge einer Exposition mit CCl₄ im Niedrigdosisbereich fand folglich nicht oder nur bedingt statt. Vor dem Hintergrund der geringen Effekte auf das Mercaptursäureprofil der Niedrigdosisgruppe war diese Beobachtung stimmig. Weitere Marker konnten aufgrund fehlender Datenbanken und geeigneter authentischer Standards nicht identifiziert werden. Es ist anzunehmen, dass sich unter den regulierten Metaboliten weitere Mercaptursäuren von Lipidperoxidationsprodukten befinden. So wurden allein für den *in vivo* Metabolismus von HNE in der Ratte zahlreiche weitere Mercaptursäuremetaboliten wie die 4-Hydroxynonansäure-MA (M = 335 g/mol), die 4,9-Dihydroxynonansäure-MA (M = 351 g/mol), die 4-Hydroxynonan-Lacton-MA bzw. 9-Hydroxynonan-Lacton-MA (M = 317 bzw. 333 g/mol), die 9-Carboxynonan-Lacton-MA (M = 347 g/mol) bzw. die 1,4,9-Trihydroxynonan-MA (M = 337 g/mol) beschrieben [133]. Das 4-Hydroxyhexenal (HHE) stellt ein weiteres Abbauprodukt oxidierter Fettsäuren dar und entsteht analog dem HNE durch β -Spaltung von Lipidperoxiden [272]. Die entsprechende Mercaptursäure des HHE weist eine molare Masse von 277 g/mol und damit $m/z = 276$ im negativen Ionisationsmodus auf. In der Liste der regulierten Marker (vgl. **Tab. 10**) sind die Variablen $m/z_m/z-129_RT$ (p, p(corr)) 276.1_147.1_20.86 (-0.10, -0.57), 316.2_187.1_27.55 (-0.07, -0.65), 346.2_217.1_18.92 (0.06, 0.58) sowie 350.2_221.1_12.80 (-0.07, -0.85) enthalten. Diese Metaboliten könnten aufgrund ihrer Masse und Retentionszeit mögliche Mercaptursäuren von Lipidperoxidationsprodukten darstellen. Insbesondere der Metabolit 350.2_221.1_12.80 ist hierbei interessant, da er mit -0.85 eine hohe negative Korrelation mit der Hochdosisgruppe aufwies.

Im Vergleich dazu wurden in der Literatur mit einem *full scan*/TOF-Ansatz die folgenden Marker für eine CCl₄-Exposition identifiziert: Hippursäure (300 % \uparrow), Benzoldiol-Sulfat (60 % \downarrow), Ferulasäure-Sulfat (70 % \uparrow) und 3-Hydroxyphenylpropionsäure-Sulfat (60 % \downarrow) [221]. Auch hier konnte der Hauptmarker, der im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 2000 % (\uparrow) am stärksten reguliert wurde ($m/z = 339$, im negativen Ionisationsmodus) nicht identifiziert werden. In einer ¹H-NMR-Studie wurde ferner eine Regulation (\downarrow) von diversen Krebs-Zyklus-Intermediaten und Hippursäure beobachtet [167]. In einer weiteren Metabonomicsstudie, in der 48 h nach einer einmaligen Dosis von 1.5 mL CCl₄/kg KG das Plasma der Versuchstiere mittels ¹H-NMR untersucht wurde, wurden darüber hinaus eine Reihe von negativ mit der Exposition korrelierten *usual suspects* (Acetat, Glycoprotein, Aceton, 3-D-Hydroxybutyrat, Acetoacetat, Kreatinin, Citrat) identifiziert [273]. Für alle drei Studien konnte aufgrund des Metabolitenprofils kein Hinweis auf den toxischen Mechanismus von CCl₄ gefunden werden. Vielmehr wiesen zumindest zwei der identifizierten Marker (Hippursäure, Ferulasäure) einen engen Bezug zur Darmflora auf.

Tetrachlorkohlenstoff induziert in der Leber nach metabolischer Aktivierung Radikale, die anschließend in Reaktionsketten mit Lipiden der Zellmembranen reagieren und diese spalten können. Die Identifizierung von Markern mit Bezug zu oxidativem Stress in der durchgeführten Studie ist folglich konsistent und untermauert die Leistungsfähigkeit des gewählten Metabonomicsansatzes.

3.5 Klassische Evaluierung der identifizierten Marker

Multivariate Datenanalysen setzen eine umfassende Datenprozessierung voraus. So wurden die in der ersten Messung detektierten Peaks nach dem Alignment zunächst auf die vier internen Standards skaliert und auf die spezifische Dichte der Proben normalisiert. Auf diese Zwischenschritte konnte bei der zweiten Messung durch Verdünnung der Proben auf eine einheitliche spezifische Dichte verzichtet werden. Da in beiden Fällen mit *pareto scaling* gearbeitet wurde, wurden alle Variablen zentriert und mit dem Faktor $1/\sqrt{SD}$ ($SD = \text{Standardabweichung}$) multipliziert. Da Datenmanipulationen dieser Art mit einem gewissen Risiko für zufällige Korrelationen einhergehen, wurden die identifizierten und in engem biologischen Zusammenhang stehenden Marker DHN-MA und HNE-MA nachfolgend nach einem klassischen Verfahren evaluiert.

Klassische Quantifizierungen, beispielsweise für Phase-II-Metaboliten von Arzneistoffen, laufen in der Regel nach folgendem Schema ab: den Proben wird ein isopenmarkierter Standard des Analyten zugegeben, die Peakflächen des Analyten und des internen Standards werden mit der Analysesoftware des Massenspektrometers integriert und ins Verhältnis gesetzt. Das Verhältnis wird mit einer Kalibriergeraden verglichen und die entsprechende Konzentration des Analyten bestimmt. Gegebenenfalls wird das Ergebnis auf das Urinvolumen bzw. auf den Kreatiningehalt der Proben normalisiert [159]. Zahlreiche Autoren weisen auf die Notwendigkeit hin, die durch multivariate Datenanalyse selektierten und identifizierten Marker im Anschluss mit zielgerichteten Verfahren zu evaluieren (siehe u. a. [219]). Im Idealfall sollte die Analyse mit einer spezifischen und sensitiven Methode unter Verwendung geeigneter interner Standards erfolgen. Eine entsprechende Strategie wurde unter anderem von BIJLSMA *ET AL.* umgesetzt [208].

Im Folgenden wurde versucht, diese standardmäßige Vorgehensweise auf den Screeningansatz zu übertragen. Die Peakfläche jedes identifizierten Markers wurde hierzu auf den bezüglich der Retentionszeit am nächsten gelegenen internen Standard bezogen. Univariate t-Tests sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die Gruppen im Hinblick auf den identifizierten Metaboliten unterschieden. Die Peakflächen wurden aus den mit *MarkerView* Software erstellten Datenmatrices entnommen, da sich die Handhabung bei größeren Probenzahlen einfacher gestaltet als mit der *Analyst* Analysesoftware. Beide Integrationsalgorithmen lieferten in Vorver-

suchen vergleichbare Peakflächen. Aufgrund der besseren analytischen Reproduzierbarkeit der auf einheitliche spezifische Dichte verdünnten Proben im Vergleich zu den mit einem einheitlichen Faktor verdünnten Proben wurde die Evaluierung der beiden identifizierten Marker DHN-MA und HNE-MA anhand der Proben der zweiten Messung vorgenommen.

Die Retentionszeiten von HNE-MA und DHN-MA betragen 21.6 und 20.4 min. Die Signale wurden daher auf den d_3 -Benzyl-MA Standard ($m/z = 255$, RT 22.2 min) bezogen. Für das Verhältnis 320.2_191.1_20.44/255.1_123.1_22.19 lieferte der Vergleich Kontroll-/Hochdosisgruppe im t-Test für die erste Sammelperiode an Versuchstag 6 eine signifikante ($p < 0.05$), für die Sammelperioden 6/2, 7/1 und 7/2 eine jeweils hochsignifikante Abnahme ($p < 0.01$) des DHN-MA Metaboliten. Dabei erreichte die Ausscheidung 24 – 36 h *postdose* (Sammelperiode 7/1) ein Minimum. Stellte man die Kontroll- und die Niedrigdosisgruppe gegenüber, so ergab sich für die DHN-MA Exkretion nur für die Sammelperiode 7/2 ein signifikanter Anstieg (**Abb. 57 A**). Dagegen konnte für das Verhältnis aus HNE-MA (318.2_189.1_21.58) und dem internen d_3 -Benzyl-MA Standard (255.1_123.1_22.19) nur für die Hochdosisgruppe 36 – 48 h *postdose* ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Hier zeigte sich ein Anstieg der HNE-MA Ausscheidung im Urin der Versuchstiere (**Abb. 57 B**). Die Ergebnisse der klassischen Markerevaluierung waren konsistent mit der Beobachtung, dass nur für das OPLS-DA Hochdosismodell (CD 6/1 – 7/2 vs. HD 6/1 – 7/2) die Variable 320.2_191.1_20.44 als potentieller Marker gelistet wurde. Für die Niedrigdosisgruppe ergab sich zwar für die Sammelperiode 7/1 ein signifikanter Anstieg der DHN-Merkaptursäure, dieser fiel aber mit einem Faktor von 1.2 in Bezug auf die Kontrollgruppe sehr gering aus. Der Anstieg des Metaboliten übte nur einen geringen Einfluss auf das OPLS-DA Modell LD 6/1 – 7/2 vs. LD 6/1 – 7/2 aus, so dass die Variable im entsprechenden *S-plot* nicht als potentieller Marker erkannt wurde. Die aus statistischen Gründen (Erhöhung des Verhältnisses aus Beobachtungen und Variablen) gewählte Strategie, die Sammelperioden 6/1 – 7/2 zusammenzufassen, erwies sich hierbei als nachteilig und war mit einem Verlust an biologisch relevanter Information verbunden.

Die der Merkaptursäure des HNE entsprechende Variable 318.2_189.1_21.58 wurde aufgrund ihres biologischen Zusammenhanges mit DHN-MA untersucht. HNE-MA erfüllte bei der Selektion potentieller Marker aus den *S-plots* der CD_LD und CD_HD OPLS-DA Modelle für die zweite Messung der Versuchstage 6 und 7 (6/1 – 7/2) zwar das Korrelations-, nicht aber das Kovarianzkriterium. Analog hierzu ergab die klassische Evaluierung des Metaboliten in der Kontroll- und den beiden Dosisgruppen über die vier untersuchten Sammelperioden nur eine signifikante Abweichung. Diese fiel mit einem Faktor von 1.6 (Hochdosisgruppe gegenüber der Kontrollgruppe) zwar recht deutlich aus, bedarf aber einer weiteren Überprüfung.

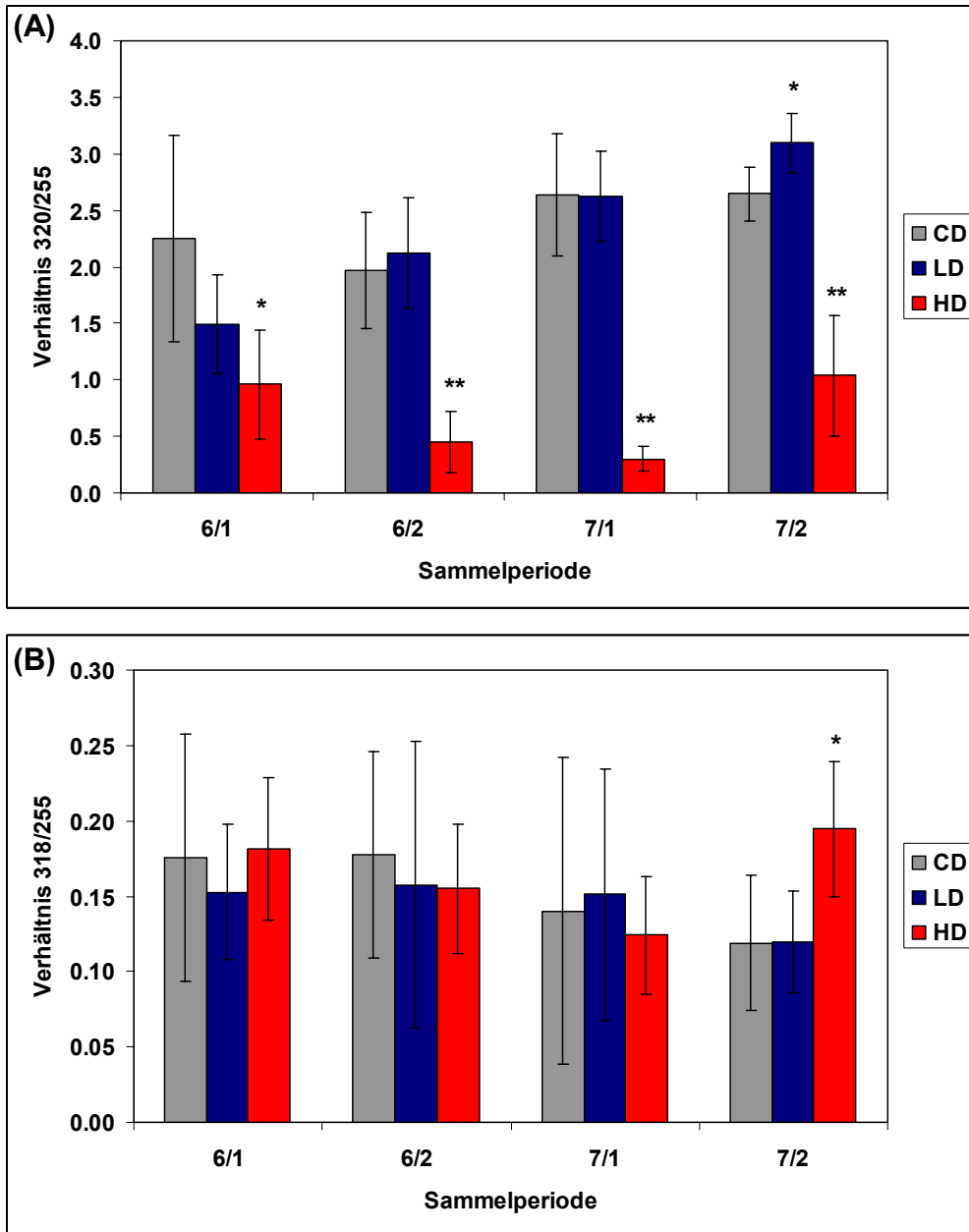


Abb. 57: Relative Level der identifizierten Merkaptursäuremarker DHN-MA und HNE-MA in Abhängigkeit von der CCl₄-Dosis und der Sammelperiode (6/1 – 7/2). Die Proben entstammten der zweiten Messung und wurden jeweils auf die geringste spezifische Dichte der Messreihe verdünnt, (A) DHN-MA (320.2_191.1_20.44) bezogen auf den *d*₃-Benzyl-MA Standard (255.1_123.1_22.19), (B) HNE-MA (318.2_189.1_21.58) bezogen auf den *d*₃-Benzyl-MA Standard (255.1_123.1_22.19), Schlüssel: **p* < 0.05, ***p* < 0.01 (jeweils t-Test gegen die *time-matched*-Kontrollgruppe CD).

Ein Vergleich der Standardabweichungen zeigte, dass das Verhatnis 318/255 deutlich höhere Werte für die RSD aufwies als das Verhatnis 320/255. Dies war wahrscheinlich auf die unterschiedliche Signalintensität (Faktor 5 – 10) bzw. die Peakform der beiden Analyten zurufuhren. Während DHN-MA in allen Proben gut detektiert werden konnte, lag das Signal der HNE-MA zum Teil in der Nähe der Nachweisgrenze, was im Allgemeinen mit einer erhöheten

Messunsicherheit einhergeht. Darüber hinaus liegen sowohl HNE-MA als auch DHN-MA als Diastereomere vor [274]. Mit der Screeningmethode konnte für die beiden HNE-MA Peaks nahezu eine Basislinientrennung erreicht werden, die Isomere der DHN-MA bildeten dagegen ein nicht aufgelöstes Cluster. Da die softwaregestützte Peakerfassung nur bedingt nachvollziehbar war, musste vor allem im Bereich der Nachweisgrenze mit einer unter Umständen fehlerhaften Datenerfassung gerechnet werden.

Die biologische Interpretation der Ergebnisse gestaltete sich indes als sehr komplex. Der signifikante Abfall der DHN-MA im Urin der Hochdosistiere würde auf eine GSH-Depletion in Folge der metabolischen Radikalbildung in der Leber hindeuten. Dem widerspricht die Beobachtung, dass die HNE-MA Ausscheidung in allen Gruppen mit Ausnahme der Hochdosisgruppe an Tag 7 unverändert erfolgte. Da allgemein angenommen wird, dass das HNE-GSH-Addukt sowohl den Vorläufer für die DHN-MA als auch für die HNE-MA darstellt (vgl. **Abb. 56** und [133]), war diese Beobachtung zunächst unstimmg.

Ein Vergleich mit Substanzen wie Kaliumbromat, Eisennitritotriacetat, Bromtrichlormethan oder Acetaminophen, die *in vivo* wie CCl_4 zu oxidativem Stress führen, wies auf komplexe Zusammenhänge zwischen HNE-MA- und DHN-MA-Spiegeln hin und lieferte kein einheitliches Bild. So konnte nach Verabreichung von Kaliumbromat (100 und 500 ppm für zwei Wochen) sowohl histopathologisch als auch mit NMR-Metabonomics ein eindeutiger Effekt auf die Versuchstiere beobachtet werden. Dies spiegelte sich allerdings nicht in den HNE-MA bzw. DHN-MA Konzentrationen wider, die in der Niere, im Plasma sowie im Urin beider Dosisgruppen konstant blieben [159]. Dagegen stiegen im Plasma nach einer einmaligen Dosis von 15 mg Eisen/kg KG HNE-MA nach 5 h und DHN-MA nach 24 h signifikant an [159, 275]. Bei einer Dosierung von 5 mg Eisen/kg KG konnte für die 24 h-Urinproben zwar eine Trennung im PCA *score plot* erzielt werden, die Plasmalevel der Mercaptursäuren nach 24 h blieben aber unverändert. In der Leber konnte nach 24 h nur ein Anstieg an DHN-MA, nicht aber von HNE-MA beobachtet werden [275]. In einer weiteren Modellstudie zu oxidativem Stress wurde Bromtrichlormethan (0.1 mL $\text{BrCCl}_3/\text{kg KG}$) einmalig oral an Ratten appliziert. Es zeigte sich ein zeitabhängiger Anstieg der DHN-MA im Urin, der auch nach vier Tagen *postdose* noch signifikant ausfiel [160]. Acetaminophen (AAP) kann in zweierlei Hinsicht als Modellsubstanz zur Untersuchung von oxidativem Stress dienen. In toxischen Dosen provoziert AAP sowohl Radikale als auch große Mengen des elektrophilen Intermediats *N*-Acetyl-*p*-Benzochinonimin [220], wobei beide Reaktionen eine GSH-Depletion zur Folge haben. In Ratten, die mit 640 mg AAP/kg KG exponiert wurden, wurde ebenso wie in der durchgeführten Studie mit CCl_4 ein signifikanter Abfall des DHN-MA Metaboliten im Urin beobachtet. Für HNE-MA wurden in

den exponierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren tendenziell niedrigere Level registriert. Allerdings lag auch hier das Signal nahe an der Bestimmungsgrenze [121].

Die Literaturdaten erschwerten die Interpretation der erzielten Ergebnisse zusätzlich, lieferten sie doch ein unerwartet inhomogenes Bild. Der Versuch, die unveränderten HNE-MA-Level sowie die signifikant niedrigeren DHN-MA-Level in den Proben der Hochdosisgruppe in einen biologische Zusammenhang zu bringen, soll dennoch an dieser Stelle unternommen werden. Eine Überlegung basiert dabei auf der in der Literatur beschriebenen Beobachtung, dass selbst nach einer hochtoxischen CCl₄-Dosis (2.5 mL/kg KG) in der Leber relativ konstante GSH-Konzentrationen vorlagen. Darüber hinaus wurden fast unveränderte Enzymaktivitäten für die Glutathion-S-Transferase und die Glutathion-Peroxidase registriert [276]. So könnte theoretisch trotz Gewebeschäden eine Konjugation von HNE mit GSH zum HNE-GSH-Addukt stattfinden. Als Folge der gesteigerten Entgiftung von Radikalen könnte es allerdings zu einer Depletion von Reduktionsäquivalenten kommen. Da in diesem Fall NADPH nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stehen würde, wäre es möglich, dass die NADPH-abhängige Reduktion von HNE-GSH zum DHN-GSH via Aldo-Keto-Reduktase nur noch eingeschränkt ablaufen kann. Für HNE-GSH ist neben der Reduktion zum DHN-GSH ein komplexer oxidativer Metabolismus beschrieben [277]. Dieser könnte unter den oxidativen Bedingungen, wie sie nach Exposition mit CCl₄ vorliegen, bevorzugt ablaufen und so zu reduzierten DHN-MA-Levels bei gleichzeitig konstant niedrigen HNE-MA-Levels führen.

Eine weitere Überlegung gründet auf der Annahme, dass es in Folge von CCl₄ zu einer GSH-Depletion bzw. zu einer Verschiebung des GSH/GSSG-Redox-Gleichgewichts kommt. GSH ist direkt in die Entgiftung von freien Radikalen wie Hydroxyl- und Lipidperoxyradikalen sowie von Peroxiden involviert [115]. Aufgrund dessen könnte es zeitabhängig zu einer relativen Reduktion der GSH- und zu einer Erhöhung der GSSG-Konzentration in der Leber kommen. Unter diesen Bedingungen würden GSH-Konjugate wahrscheinlich bevorzugt für solche reaktiven Intermediate entstehen, die eine hohe Affinität zu GSH bzw. zu entsprechenden Glutathion-S-Transferasen aufweisen. Da für den α,β -ungesättigten Aldehyden HNE spezielle Isoformen der GST existieren, ist eine schnelle Umsetzung zum GSH-Addukt wahrscheinlich [133]. Es gibt zwar mehrere Hinweise darauf, dass Ratten GSH und DHN nicht direkt konjugieren können, der direkte Beweis wurde allerdings noch nicht erbracht. Unter der Annahme, dass DHN unter physiologischen Bedingungen eine gewisse, wenn auch im Vergleich zu HNE viel geringere, Affinität zu GSH aufweist, könnte diese Reaktion durch sinkende GSH-Level zum Erliegen kommen. Die Hypothese, dass unter CCl₄-bedingter GSH-Depletion weniger GSH-Addukte für mittel- bis schwachreaktive Intermediate entstehen wird durch die Beobacht-

ung untermauert, dass die Liste der potentiellen Marker für die Hochdosisgruppe 2.5-mal mehr Einträge für herunterregulierte als für hochregulierte Metaboliten enthält.

Wahrscheinlich ist weiterhin, dass die Detoxifizierung reaktiver Substanzen wie Radikalen oder elektrophilen Aldehyden gegenläufigen und konkurrierenden biologischen Prozessen unterliegt, die wiederum stark von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass drei Studien mit Substanzen, die *in vivo* oxidativen Stress auslösen bezüglich der *postdose* DHN-MA-Level im Urin der Versuchstiere (Ratten) zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Obwohl der hepatotoxische Effekt in allen Fällen durch histopathologische Untersuchungen sichergestellt war, wurde DHN-MA nach Exposition mit Kaliumbromat überhaupt nicht reguliert. Für Bromtrichlormethan wurde von einem DHN-MA Anstieg, für Acetaminophen dagegen von einem Abfall des Metaboliten berichtet. Vor diesem Hintergrund erscheint eine kritische Betrachtung der beiden Metaboliten im Hinblick auf eine mögliche Verwendung als Biomarker für oxidativen Stress angebracht.

3.6 Dosisabhängigkeit der Merkaptursäurelevel

Für DHN-MA wurde die Beobachtung gemacht, dass die Versuchstiere der Hochdosisgruppe 0 – 48 h *postdose* im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedrigere Level des Metaboliten im Urin aufwiesen. Ferner erfüllten in den *S-plots* der CD_HD und CD_LD OPLS-DA Modelle deutlich mehr Variablen im linken unteren Quadranten des Koordinatensystems (negative Korrelation mit Dosiseffekt) die vorgegebenen Auswahlkriterien für potentielle Marker als im rechten oberen Quadranten (positive Korrelation mit Dosiseffekt). Dies gab Anlass zu einer genaueren Betrachtung der Gesamtmenge ausgeschiedener Merkaptursäuren in einer Urinprobe. Aufgrund des Trends bezüglich Zellen mit Nulleinträgen in der Datenmatrix der ersten Messung wurde die Evaluierung der gesamten MA-Level nur mit Proben der zweiten Messung durchgeführt. Für jede Probe der Versuchstage 6 und 7 wurden die Peakflächen aller mit der Screeningmethode detektierten Variablen (492 nach Ausschluss der internen Standards) addiert und anschließend die Summen gruppenweise gegenübergestellt. Als Referenz wurden zusätzlich die neun QC-Proben herangezogen. Aus dem *dot plot* (**Abb. 58**) mit allen Einzelwerten (n = 20 für jede Gruppe) wurde ersichtlich, dass bei annähernd gleicher Streuung sich die Signalsummen der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe kaum unterschieden, die Hochdosisgruppe dagegen deutlich niedrigere MA-Level aufwies.

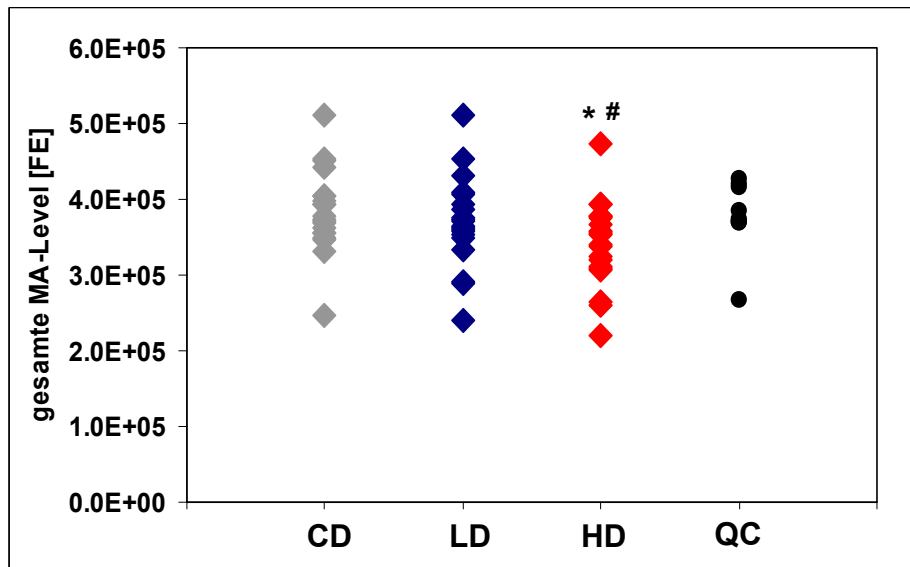


Abb. 58: *Dot plot* zur Gegenüberstellung der Gesamtmenge an ausgeschiedenen Merkaptursäuren in den Sammelperioden 6/1 – 7/2 in Abhängigkeit von der CCl₄-Dosis; Schlüssel: ◆ Kontrollgruppe (CD), ◆ Niedrigdosisgruppe (LD), ◆ Hochdosisgruppe (HD), ● Quality Control Proben (QC), FE Flächeneinheiten, * $p < 0.05$ (t-Test gegen CD), # $p < 0.05$ (t-Test gegen QC).

Der t-Test lieferte für den Vergleich CD 6/1 – 7/2_HD 6/1 – 7/2 bzw. HD 6/1 – 7/2_QC ein $p < 0.05$ und damit signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Hochdosisgruppe bzw. zwischen Hochdosisgruppe und QC-Proben bezüglich der Gesamtmenge an ausgeschiedenen Merkaptursäuren.

Niedrigere Gesamtmerkaptursäurelevel in den Urinen der Hochdosistiere sind konsistent mit der Beobachtung, dass in der Studie zahlreiche Marker identifiziert wurden, die mit dem Effekt von CCl₄ negativ korreliert waren. Für die konstant bleibenden HNE-MA- bzw. die sinkenden DHN-MA-Level in den Urinproben der Versuchstiere wurden bereits zwei potentielle Mechanismen diskutiert. Der erste beruhte auf einer Depletion von Reduktionsäquivalenten, der zweite auf einer GSH-Depletion durch metabolisch gebildete Radikale in Folge der CCl₄-Exposition. Literaturdaten zum Metabolismus des HNE ließen dabei die erste Hypothese als wahrscheinlicher erscheinen. Betrachtete man allerdings die gesamte Merkaptursäureausscheidung (Summe über alle 492 registrierten Variablen) über den Zeitraum von 0 – 48 h *postdose*, war für die Tiere der Hochdosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der MA-Spiegel zu beobachten. Dies deutete auf eine CCl₄-induzierte GSH-Depletion hin und untermauerte die zweite Hypothese.

Dass GSH bei der Ausprägung des toxischen Effekts eine Rolle spielt, zeigten Studien, die einen protektiven Einfluss von *N*-Acetyl-L-Cystein auf eine akute CCl₄-induzierte Hepatotoxizität nachweisen konnten [276, 278]. *N*-Acetyl-L-Cystein kann ebenso wie GSH mit reaktiven

Intermediaten reagieren und diese entgiften und verhindert hierdurch eine GSH-Depletion. Vor diesem Hintergrund wäre es interessant, eine weitere CCl₄-Studie zu initiieren, die zusätzlich Gruppen mit *N*-Acetyl-L-Cystein-Supplementierung umfasst. Mittels Merkaptursäurescreening könnte dann die Wirkung des protektiven Agens *N*-Acetyl-L-Cystein charakterisiert werden.

PROJEKT 5: Metabonomicsstudie mit Rauchern und Nichtrauchern

1 Einleitung

Tabakrauch ist ein hochkomplexes Gemisch aus schätzungsweise mehreren Tausend bis Zehntausend verschiedenen Komponenten [279]. Viele der Verbindungen gelten als toxisch bzw. zeigen ein ausgeprägtes mutagenes Potential [280, 281]. Die statistischen Zahlen zum Thema Rauchen sprechen dabei für sich. Nach den Ergebnissen des Mikrozensus lag in Deutschland die Raucherprävalenz im Jahr 2005 bei Männern bei 32 % und bei Frauen bei 23 %. Rund 85 % der Raucher gaben dabei an, regelmäßig zu Rauchen [282]. Die Schätzungen zu Todesfällen, die auf eine für Raucher symptomatische Erkrankung zurückzuführen sind, belaufen sich in der Bundesrepublik Deutschland auf 110.000 bis 140.000 Sterbefälle pro Jahr [283]. Lungenkrebs stellt hierbei die häufigste Todesursache dar, gefolgt von Kehlkopf- und Luftröhrenkrebs. Bei starken Rauchern kann im Vergleich zu Nichtrauchern das Krebsrisiko bis auf das Vierfache ansteigen. Die anhaltende Schadstoffbelastung durch das Rauchen ist weiterhin ein Hauptrisikofaktor für arteriosklerotische bzw. pulmonale Erkrankungen. Gefahren für die Gesundheit gehen in erheblichem Maße auch von Passivrauch aus. Sowohl der Haupt- als auch der Nebenstromrauch enthalten eine große Anzahl an elektrophilen Verbindungen, die beispielsweise aus der Bioaktivierung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, 1,3-Butadien, Acrolein, Crotonaldehyd, Ethylenoxid, Phenolen, Kresolen, Nitrosaminen etc. resultieren können. Sekundär kann durch die Bildung von freien Radikalen, sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies, oxidativer Stress ausgelöst werden. So ist eine indirekte Tabakrauchbelastung von Ungeborenen im Allgemeinen mit einem verminderten Geburtsgewicht verbunden [284]. Darüber hinaus leiden Kinder, die regelmäßig gegenüber Passivrauch exponiert sind, häufiger an Atemwegserkrankungen, Mittelohrentzündungen und allergischen Reaktionen. Im Gesundheitssurvey 2006 gaben 43 % der Männer und 34 % der Frauen an, sich häufig in Rauch belasteten Räumen aufzuhalten [285]. Sie sind damit regelmäßig einer potentiellen Gefährdung durch Tabakrauchbestandteile ausgesetzt.

Obwohl ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der direkten und indirekten Belastung mit Tabakrauch und der Manifestation bestimmter Krankheiten wie Lungenkrebs besteht, beobachtet man häufig inter-individuelle Suszeptibilitäten. Versuche, diese auf einen bestimmten Genotyp zurückzuführen, gelangen vereinzelt (Zusammenhang zwischen Polymorphismus in Glutathion-S-Transferasen und Kehlkopfkrebs) [286], schlugen mitunter aber auch fehl [287]. Die Diskrepanz zwischen dem Geno- und dem Phänotyp ist hierbei vielfach auf die Induktion von

Enzymsystemen des Fremdstoffmetabolismus zurückzuführen [288]. Für das Biomonitoring bzw. die Identifizierung persönlicher Risikofaktoren erscheinen folglich Ansätze zur Phänotypisierung erfolgversprechender.

Zur Abschätzung der elektrophilen Belastung durch Tabakrauch und hierdurch bedingtem oxidativen Stress *in vivo* wurde eine Studie mit einem Raucher- und Nichtraucherkollektiv durchgeführt. Ziel sollte es sein, raucherspezifische Mercaptursäureprofile sowie entsprechende Dosisabhängigkeiten zu identifizieren. Darüber hinaus sollte das Metabolitenmuster hinsichtlich potentieller Marker für eine Tabakrauchexposition bzw. für oxidativen Stress untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Lösungsmittel entsprachen HPLC-Qualität und wurden von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Ameisensäure (98 – 100 %) und Salzsäure (25 %) in analytischer Qualität stammten von Merck (Darmstadt, Deutschland). Die Mercaptursäurestandards 2-Cyanoethyl-MA, 3-Hydroxypropyl-MA, 3-Hydroxy-1-methylpropyl-MA (Dicyclohexylammoniumsalz), 2-Carboxy-1-methylethyl-MA (Dinatriumsalz), Monohydroxybutenyl-MA (Isomerengemisch aus 1-Hydroxymethyl-2-propenyl-MA und 2-Hydroxy-3-butenyl-MA) und 3,4-Dihydroxybutyl-MA sowie die internen Standards d_3 -3-Hydroxypropyl-MA (Dicyclohexylammoniumsalz) und d_5 -S-Phenyl-MA stammten von Toronto Research Chemicals (North York, Kanada). Acrylamid-MA und d_3 -Acrylamid-MA wurden gemäß der kürzlich in der Literatur beschriebenen Vorschrift synthetisiert [209]. Synthese und Charakterisierung von 4-*tert*-Butylbenzyl-MA erfolgte nach dem in DEKANT *ET AL.* publizierten Protokoll aus 4-*tert*-Butylbenzylbromid und *N*-Acetyl-L-Cystein [210].

2.2 Interner Standardmix

Es wurde eine wässrige Lösung aus den folgenden vier Mercaptursäurestandards hergestellt: d_3 -Acrylamid-MA (50.0 mg/L), d_3 -3-Hydroxypropyl-MA (Dicyclohexylammoniumsalz, 20.0 mg/L), d_5 -S-Phenyl-MA (5.0 mg/L) und 4-*tert*-Butylbenzyl-MA (0.5 mg/L).

2.3 Standardlösung für die Markeridentifizierung

Aus den folgenden fünf Mercaptursäurestandards wurden zwei wässrige Lösungen (5.0 bzw. 10.0 mg/L für jeden Standard) hergestellt: 2-Cyanoethyl-MA, 3-Hydroxypropyl-MA, Acryl-

amid-MA, 3-Hydroxy-1-methylpropyl-MA (Dicyclohexylammoniumsalz) und 2-Carboxy-1-methylethyl-MA (Dinatriumsalz).

2.4 Studiendesign

An der Studie nahmen 26 starke Raucher (> 10 Zigaretten/Tag), 56 schwache Raucher (≤ 10 Zigaretten/Tag) sowie 40 Nichtraucher teil. Von den 122 Probanden waren 79 weiblich und 43 männlich. Das Studienprotokoll umfasste die Abgabe eines Spoturins im Zeitraum 9 – 14 Uhr. Angaben zur Person sowie zum Rauchverhalten wurden mittels eines Fragebogens erhoben. Bezüglich Diät (einschließlich Alkoholkonsum und Medikamenteneinnahme) und Freizeitaktivitäten wurden keine Einschränkungen gemacht. Nach Bestimmung des Gesamturinvolumens wurden entsprechende Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt und gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Probanden gaben vor ihrer Teilnahme an der Studie ihr schriftliches Einverständnis.

In den Plots und Diagrammen wurde die Gruppe der Nichtraucher immer in grau, die Gruppe der schwachen Raucher in dunkelblau und die Gruppe der starken Raucher in rot gehalten.

2.5 Klinische Chemie der Urinproben

Der Kreatiningehalt und die Osmolalität der Urinproben wurden im Labor des Universitätskrankenhauses Würzburg mittels Routinemethoden bestimmt. Die spezifische Dichte wurde mittels eines Handrefraktometers (DRC-200, PCE Group, Meschede, Deutschland) ermittelt.

2.6 Vorbereitung der Urinproben

Die tiefgefrorenen Proben wurden zunächst randomisiert, bei Raumtemperatur aufgetaut und 10 min bei 14000 g und 4 °C abzentrifugiert. In ein Eppendorf Cap wurden nacheinander 1.0 mL Urin, 10 μL Salzsäure (25 %) und 10 μL interne Standardlösung pipettiert und die Proben nach dem Vortexen bei -20 °C eingefroren. Für die LC-MS/MS-Analyse wurden die derart vorbereiteten Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, erneut zentrifugiert (14000 g, 4 °C , 10 min) und in Autosamplervials überführt.

Für Validierungszwecke wurde aus 50 beliebigen Urinproben ein Poolurin hergestellt. Von diesem Poolurin wurden nach dem Zentrifugieren (14000 g, 4 °C , 10 min) 20 mL mit 200 μL Salzsäure (25 %) sowie 200 μL interner Standardlösung versetzt, in 18 Eppendorf Caps aufgeteilt

und anschließend bei -20 °C eingefroren. Die 18 Proben dienten als Quality Control Proben (QC-Proben) und wurden analog den Proben aus der Studie behandelt.

2.7 Vorbereitung der Urinproben für die Markeridentifizierung

Für die Markeridentifizierung wurden zehn Urine von starken Rauchern ausgewählt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und abzentrifugiert (14000 g, 4 °C, 10 min). In einem Autosamplervial wurde jeweils 1.0 mL Urin mit 10 µL Salzsäure (25 %) und 10 µL H₂O versetzt, gevortext und direkt zur LC-MS/MS-Messung eingesetzt.

Mit den ausgewählten Proben wurden zusätzlich Aufsatzversuche durchgeführt. Hierzu wurde jeweils 1.0 mL Urin mit 10 µL Salzsäure (25 %) und 10 µL Standardlösung (5.0 mg/L bzw. 10.0 mg/L für jeden Standard) versetzt und analog vermessen.

2.8 Chromatographische Parameter

Die chromatographische Trennung und *on-line*-Extraktion der Mercaptursäuren erfolgte mit Hilfe einer Säulenschaltung, bestehend aus einer binären und einer quaternären Pumpe, einem Autosampler mit einer 900 µL Probenschleife, sowie einem softwaregesteuerten elektrischen Valve.

HPLC-Anlage:	Binäre und quaternäre Pumpe Serie 1100 mit Autosampler Serie 1100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Software:	Analyst 1.4.1 (Applied Biosystem/MDS Sciex, Concord, ON, Kanada)
Vorsäule:	C ₁₈ ODS, 4 x 3 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Trap-Säule:	ReproSil-Pur C ₁₈ -AQ, 5.0 µm, 33 x 3 mm (Dr. Maisch, Ammerbuch, Deutschland)
Analytische Säule:	ReproSil-Pur C ₁₈ -AQ, 3.0 µm, 150 x 2 mm (Dr. Maisch)
Fließmittel A:	0.1 % Ameisensäure (0.1 % FA)
Fließmittel B:	Acetonitril (ACN)
Fluss:	0.200 mL/min (analytische Säule) 1.000 mL/min (Trap-Säule)
Injektion:	300 µL
Elektrisches Valve:	1.10 min Position 1 (Laden) 10.00 min Position 2 (Elution)

Gradient analytische Säule:	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	0.1 % FA	ACN
	0.00	0.200	95	5
	2.00	0.200	95	5
	25.00	0.200	50	50
	27.00	0.200	10	90
	29.00	0.200	10	90
	31.00	0.200	95	5
	40.00	0.200	95	5

Gradient Trap-Säule:	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	0.1 % FA	ACN
	0.00	1.000	100	0
	1.10	1.000	100	0
	1.20	0.000	100	0
	28.00	0.000	100	0
	28.10	1.000	100	0
	29.00	1.000	10	90
	30.00	1.000	10	90
	31.00	1.000	100	0
	40.00	1.000	100	0

2.9 Massenspektrometrische Parameter

Als Massendetektor kam eine mit einer TurboIonSpray[®]-Quelle ausgestattete Triple Quadrupol gekoppelte lineare Ionenfalle (QTRAP[®] 2000, Applied Biosystem/MDS Sciex) zum Einsatz. Das Gerät wurde im negativen Ionisationsmodus betrieben. Allgemeine Quellen- und Gaseinstellungen, sowie die Parameter für die lineare Ionenfalle waren im Einzelnen: *ionspray voltage* -4.2 kV, *vaporizer temperature* 400 °C, *nebulizer gas* (N₂) 45 psi, *turbo gas* (N₂) 50 psi, *curtain gas* (N₂) 30 psi, *collision gas* (N₂) medium (thMRM)/high (EPI), *declustering potential* (DP) -50 V, *entrance potential* (EP) -10 V, *collision energy* (CE) -20 V (thMRM) bzw. -30 V (EPI) und *collision cell exit potential* (CXP) -2 V. Bei DP, EP, CE und CXP handelte es sich jeweils um *offset*-Spannungen.

2.10 Theoretisches *multiple reaction monitoring*-Screeningmethode

Der theoretische *multiple reaction monitoring* (thMRM) *survey scan* ($m/z \rightarrow m/z-129$ Da) wurde im *profile*-Modus im Bereich von $m/z = 170 - 450$ durchgeführt. Die Auflösung des ersten Quadrupols (Q1) wurde auf *unit* gesetzt, die des dritten Quadrupols (Q3) auf *low*. Die internen Merkaptursäurestandards *d*₃-Acrylamid-MA und *d*₃-3-Hydroxypropyl-MA wiesen jeweils eine isotopenmarkierte *N*-Acetyl-L-Cystein-Gruppe auf, daher wurden die einem CNL von 132 Da entsprechenden theoretischen Übergänge $236.1 \rightarrow 104.1$ bzw. $223.1 \rightarrow 91.1$ berechnet.

Insgesamt ergaben sich somit 283 merkaptursäurespezifische Massenübergänge (283 thMRMs). Die *dwell time* pro Übergang betrug dabei je 5.0 ms bei einer *mass range pause* von 5.0 ms.

2.11 ThMRM-IDA-EPI-Methode zur Identifizierung selektierter Marker

Für die Identifizierung der selektierten Marker kam eine thMRM-IDA-EPI-Methode (vgl. Projekt 3, Abschnitt 2.8) zur Anwendung. Der *survey scan* beinhaltete die theoretischen Übergänge für die folgenden Merkaptursäurestandards: 2-Cyanoethyl-MA (215.1 → 86.1), 3-Hydroxypropyl-MA (220.1 → 91.1), 3-Hydroxy-1-methylpropyl-MA (234.1 → 105.1) und 2-Carboxy-1-methylethyl-MA (248.1 → 119.1). Bei einer *mass range pause* von 5.0 ms betrug die *dwell time* pro Übergang 50.0 ms. Im negativen Ionisationsmodus wurden parallel, durch IDA-Kriterien gesteuert, EPI-Spektren aufgezeichnet. Die IDA-Parameter wurden in der Form definiert, dass alle Signale, die im thMRM-Scan den Schwellenwert von 3000 counts/s überstiegen, ein EPI provozierten. Überschritten mehrere *m/z* gleichzeitig den Grenzwert, wurde automatisch der intensivste Peak ausgewählt. Alle Ionen, von denen bereits ein EPI aufgenommen wurde, wurden anschließend für mindestens 15 s von der Detektion ausgeschlossen. Die Massentoleranz betrug 250 mmu.

Zur Strukturaufklärung wurden EPIs bei einer Kollisionsenergie von -30 V (*collision energy spread* -2 V) aufgenommen. Dabei wurden jeweils zwei Scans aufsummiert. Fragmente wurden bei einer *scan rate* von 4000 amu/s, sowie einer Q3 *entry barrier* von 8 V für 20 ms in der Ionenfalle gesammelt (*fixed fill time*) und im Bereich von *m/z* = 50 – 350 detektiert.

2.12 Analyseprotokoll

Die Analyse der Proben inklusive der QC-Proben erfolgte randomisiert in einer *batch*. Um die Verweildauer im Autosampler möglichst gering zu halten, wurde zunächst nur die Hälfte der Proben aufgearbeitet. Die Vorbereitung der verbleibenden Proben erfolgte erst unmittelbar vor Beendigung der Messung der ersten Hälfte der *batch*. Der *batch* wurde ein Leerlauf (H₂O) sowie fünf QC-Proben vorangestellt. Nach jeder zehnten Probe wurde eine QC-Probe vermessen.

2.13 Datenverarbeitung und statistische Datenanalyse

Datenmatrices wurden mittels *MarkerView*TM Software 1.2.0.1 (Applied Biosystems/MDS Sciex) unter Verwendung optimierter Parameter generiert (vgl. Projekt 3 und 4): *smoothing half-width* 1 point, *baseline subtraction window* 1.0 min, *noise percentage* 50 %, *peak-splitting factor* 4, *minimum required intensity* 500, *minimum peak width* 2 points, *minimum signal-to-noise* 3.0, *maximum number of peaks* 500, *retention time tolerance* 1.0 min. Anschließend wurden die

Flächen der Variablen anhand der vier internen Merkaptursäurestandards ($m/z_{m/z-129_RT}$ bzw. $m/z_{m/z-132_RT}$) skaliert und gegebenenfalls normalisiert. Die Normalisierung erfolgte entweder auf die spezifische Dichte, die Osmolalität oder den Kreatiningehalt der Proben. Chemometrische Analysen – PCA, PLS-DA und OPLS-DA Modelle – wurden mittels *SIMCA-P+* Software Version 11.5 (Umetrics, Umeå, Schweden) durchgeführt. Die Variablen wurden vor Erstellung der Modelle zentriert (*centering*) und skaliert (*autoscaling* bzw. *pareto scaling*). Signifikante Komponenten wurden mittels siebenfacher Cross-Validierung (Standardeinstellung in *SIMCA-P+*) bestimmt. Die Qualität (Prädiktivität) der Modelle wurde durch den Faktor Q^2 (vgl. Projekt 2 Abschnitt 2.8.5.2) charakterisiert. Die klassische Evaluierung der identifizierten Marker erfolgte mit Excel 2002 (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Klinische Parameter der Probanden

Bei den Urinproben handelte es sich um Spontanurin, der im Zeitraum 9 – 14 Uhr abgegeben wurde. Um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden für Normalisierungszwecke der Kreatiningehalt, die Osmolalität und die spezifische Dichte bestimmt. Bezüglich dieser klinischen Parameter wurde eine große inter-individuelle Variabilität festgestellt. So unterschieden sich die Kreatiningehalte (6.7 – 395.4 mg/dL) zum Teil um den Faktor 60, die Osmolalität (63 – 1086 mosmol/kg) und die spezifische Dichte (1.002 – 1.035) jeweils um den Faktor 17. Im Mittel betrug der Kreatiningehalt der Raucher 136.6 ± 90.7 mg/dL, die Osmolalität 648.9 ± 279.1 mosmol/kg und die spezifische Dichte 1.019 ± 0.009 , die entsprechenden Werte der Nichtraucher ergaben sich zu 121.7 ± 90.9 mg/dL, 596.6 ± 335.1 mosmol/kg und 1.017 ± 0.010 . Bezüglich der klinischen Parameter wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Nichtrauchern und Rauchern festgestellt (t-Test: $p > 0.05$). Das Alter der Gruppe der Raucher betrug im Mittel 26.5 ± 7.7 Jahre, das der Nichtraucher 22.7 ± 1.3 Jahre.

3.2 Theoretisches *multiple reaction monitoring* mit Säulenschaltungskopplung

Die Anreicherung der Merkaptursäuren erfolgte *on-line* mittels einer Säulenschaltungsanordnung. Als *survey scan* diente theoretisches *multiple reaction monitoring*, das auf dem für Merkaptursäuren charakteristischen CNL von 129 Da basierte (**Abb. 59 A**). Die Stabilität der Messung wurde mittels vier interner Merkaptursäurestandards (d_3 -Acrylamid-MA, d_3 -3-Hydroxypropyl-MA, d_5 -S-Phenyl-MA und 4-*tert*-Butylbenzyl-MA) sichergestellt. Für die an der *N*-Acetyl-L-Cystein-Gruppe markierten internen Standards d_3 -Acrylamid-MA und d_3 -3-Hydroxy-

propyl-MA wurden die analogen Übergänge $m/z \rightarrow m/z-132$ Da berechnet und in den *survey scan* aufgenommen.

Bei Acrylamid-MA [209], 3-Hydroxypropyl-MA [289] und *S*-Phenyl-MA [122] handelt es sich um potentielle Expositionsmarker. In der Literatur wird von erhöhten Spiegeln dieser Metaboliten im Urin von Rauchern berichtet. Die *N*-Acetyl-L-Cystein-Konjugate gehen auf die im Tabakrauch enthaltenen elektrophilen Verbindungen Acrylamid, Acrolein und Benzol zurück. Die isotopenmarkierten Mercaptursäuremetaboliten wurden daher als geeignete interne Standards erachtet. Zusammen mit dem synthetischen 4-*tert*-Butylbenzyl-MA Standard teilten die deuterierten Verbindungen d_3 -Acrylamid-MA, d_3 -3-Hydroxypropyl-MA und d_5 -*S*-Phenyl-MA das Chromatogramm in drei Retentionszeitfenster – eine polare, mittelpolare und tendenziell eher unpolare Region – auf (**Abb. 59 B**). Ferner dienten die Variablen der internen Standards der Skalierung der unbekannt Mercaptursäuren. Um den Messeigenschaften der unbekannt Metaboliten zumindest teilweise Rechnung zu tragen, wurde für jede Probe die durchschnittliche Fläche der vier internen Standards berechnet und anschließend alle Variablen der Probe anhand dieses Faktors skaliert.

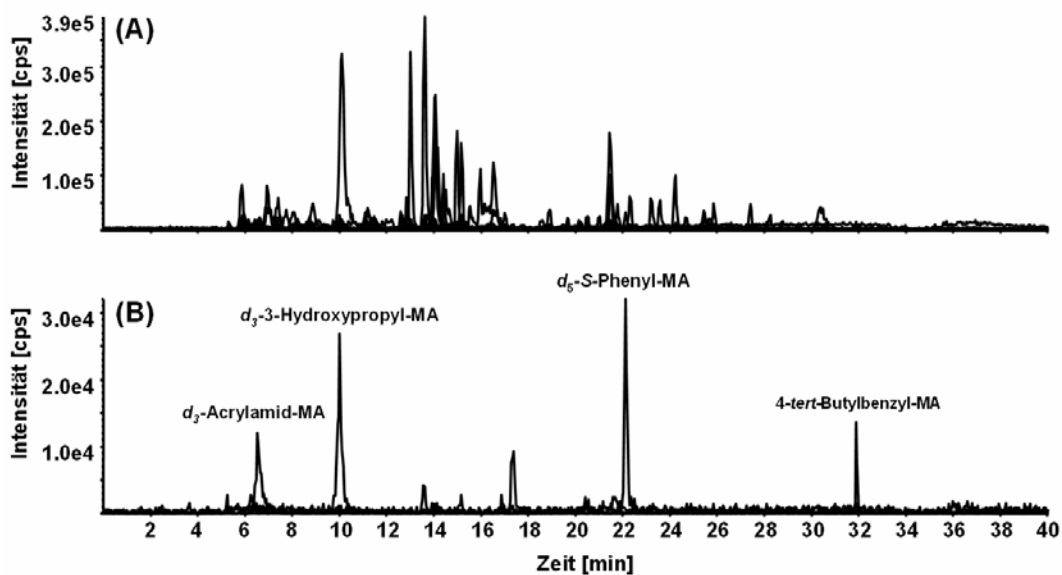


Abb. 59: (A) Totalionenstromchromatogramm der 283 thMRM-Übergänge der Form $m/z \rightarrow m/z-129$ Da (bzw. $m/z \rightarrow m/z-132$ Da für die an der *N*-Acetyl-L-Cystein-Gruppe markierten internen Standards d_3 -Acrylamid-MA und d_3 -3-Hydroxypropyl-MA) im Bereich $m/z = 170 - 450$, (B) extrahierte Übergänge der internen Standards d_3 -Acrylamid-MA (236.1 \rightarrow 104.1, RT 6.5 min), d_3 -3-Hydroxypropyl-MA (223.1 \rightarrow 91.1, RT 10.0 min), d_5 -*S*-Phenyl-MA (243.1 \rightarrow 114.1, RT 22.1 min) und 4-*tert*-Butylbenzyl-MA (308.2 \rightarrow 179.1, RT 31.9 min).

3.3 Datenerfassung und Datenfilter

Zur Erfassung der Daten und zur Generierung der Datenmatrices wurden die bereits zuvor optimierten Softwareeinstellungen gewählt (vgl. Projekt 3 und 4). Für Vorversuche wurden die 122 Proben zunächst zusammen mit den 18 QC-Proben eingelesen. Insgesamt wurden durch Kombination von Skalierung (auf die vier internen Standards bzw. keine Skalierung) und Normalisierung (Kreatiningehalt, Osmolalität, spezifische Dichte bzw. keine Normalisierung) acht separate Matrices der Form 140 Proben x 500 Variablen generiert. Für die weiteren Analysen wurden nur Proben der Studie prozessiert (122 Proben x 500 Variablen). Manuelle Inspektion der einzelnen Datenmatrices, insbesondere der internen Standards, ergab keine offensichtlichen Missalignments. Zudem konnte in keiner Matrix ein gruppenspezifischer Trend bezüglich leerer Zellen (Zellen mit Nulleinträgen) beobachtet werden (vgl. Projekt 4). Dies stand im Einklang mit den Parametern der klinischen Chemie (Kreatiningehalt, Osmolalität, spezifische Dichte), für die ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (t-Test: $p > 0.05$) zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden konnten.

3.4 Evaluierung der Quality Control Proben

Zur Evaluierung der Analytik und der Datenprozessierung wurden zunächst nur die QC-Proben herangezogen. Da sie lediglich dem Zweck der Säulenconditionierung dienten, wurden die ersten beiden Proben von der weiteren Analyse ausgeschlossen [248]. In den verbleibenden 16 QC-Proben wurden die Flächen der internen Standards näher untersucht. Ohne Skalierung auf die vier internen Standardvariablen ergaben sich relative Standardabweichungen (RSDs) von 25.6 % für d_3 -Acrylamid-MA, 21.2 % für d_3 -3-Hydroxypropyl-MA, 12.9 % für d_5 -S-Phenyl-MA und 23.3 % für 4-*tert*-Butylbenzyl-MA. Dabei wies die Summe der vier Standardvariablen über alle Proben eine RSD von 15.0 % auf. Nach Skalierung der Datenmatrix auf die durchschnittliche Response der vier internen Standards resultierten RSDs von 17.5 % für d_3 -Acrylamid-MA, 16.6 % für d_3 -3-Hydroxypropyl-MA, 14.8 % für d_5 -S-Phenyl-MA, 26.0 % für 4-*tert*-Butylbenzyl-MA und 7.2 % für die Summe der vier Standardvariablen. Mit Ausnahme des letzten Standards lagen die relativen Standardabweichungen somit im für quantitative Analysen von der *Food and Drug Administration* akzeptierten Toleranzbereich [212].

3.5 Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Skalierung und Normalisierung

Da es sich bei den Proben um Spontanurin handelte, wurde zunächst die optimale Prozessierung ermittelt. Vor- und Nachteile der einzelnen Techniken wurden bereits zuvor diskutiert (vgl. Projekt 4). Die acht generierten Datenmatrices, die je einer Kombination aus Skalierungs- und

Normalisierungstechnik unterworfen wurden, wurden einer OPLS-DA (*pareto scaling*) unterzogen. Als Qualitätsmerkmal und Entscheidungskriterium wurden die Modellcharakteristika (R^2X , R^2Y , Q^2 , signifikante Komponenten) der Diskriminierung von starken Rauchern und Nichtrauchern herangezogen. Zwei Proben (ein Nichtraucher und ein starker Raucher) wurden aufgrund untypischen chromatographischen Verhaltens von allen weiteren Analysen ausgeschlossen. **Tab. 11** fasst die Kennzahlen der acht OPLS-DA Modelle zusammen.

Tab. 11: OPLS-DA Modellcharakteristika (*pareto scaling*) der acht initialen starke Raucher vs. Nichtraucher Modelle zur Ermittlung der optimalen Skalierungs- (auf die vier internen Standards bzw. keine Skalierung) und Normalisierungstechnik (Kreatiningehalt, Osmolalität, spezifische Dichte bzw. keine Normalisierung). R^2X , R^2Y und Q^2 beziehen sich jeweils auf die durch siebenfache Cross-Validierung ermittelten signifikanten Komponenten.

Normalisierung	Skalierung auf interne Standards			
	R^2X	R^2Y	Q^2	signifikante Komponenten
---	0.39	0.58	0.37	1 + 1
Kreatinin	0.30	0.67	0.59	1 + 1
Osmolalität	0.35	0.82	0.49	1 + 2
spezifische Dichte	0.33	0.83	0.61	1 + 2

Normalisierung	keine Skalierung auf interne Standards			
	R^2X	R^2Y	Q^2	signifikante Komponenten
---	0.43	0.75	0.49	1 + 2
Kreatinin	0.35	0.59	0.54	1 + 1
Osmolalität	0.30	0.66	0.49	1 + 1
spezifische Dichte	0.28	0.68	0.58	1 + 1

Der Vergleich der Modellkennzahlen ließ verschiedene Trends erkennen. Bei ähnlichem R^2X zeigten die Modelle mit den auf die vier internen Standards skalierten Variablen, mit Ausnahme des nicht normalisierten Modells, die höheren Werte für R^2Y und Q^2 . Unabhängig von der Skalierungstechnik stieg durch Normalisierung der Faktor R^2Y , bei vergleichbarem Q^2 , in der Reihenfolge Kreatinin → Osmolalität → spezifische Dichte an. Daraus folgte, dass durch Skalierung und Normalisierung der Variablen in der Datenmatrix die Prädiktivität der Modelle steigt, d. h. die OPLS-DA robuster wird. Für die Kombination „Skalieren auf die vier internen Standards und Normalisierung auf die spezifische Dichte der Proben“ konnten bei drei signifikanten Komponenten (1 + 2) mit $R^2Y = 0.83$ und $Q^2 = 0.61$ die höchsten Werte für das Nichtraucher vs. starke Raucher OPLS-DA Modell erzielt werden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden bei der weiteren Vorgehensweise alle Datenmatrices nach diesem Schema prozessiert.

3.6 Überprüfung der Datenintegrität

Zur Überprüfung der Datenintegrität und für die weitere Vorgehensweise wurde eine Datenmatrix erstellt, die nur Proben der Studie (122 x 500) enthielt. Die Variablen wurden auf die durchschnittliche Response der vier internen Standardvariablen skaliert und anschließend auf die spezifische Dichte der Proben normalisiert. Die Variablen der internen Standards wurden vor Erstellung der Modelle aus der entsprechenden Matrix gelöscht.

Ein initiales PCA Modell nach *pareto scaling* über alle Proben zeigte zwei starke Ausreißer (ein Nichtraucher und ein starker Raucher) außerhalb der *Hotelling's T²* (0.95) Ellipse (**Abb. 60 A**). Es handelte sich hierbei um dieselben Proben, die schon in den Vorversuchen wegen untypischen chromatographischen Verhaltens aufgefallen waren. Die Proben wurden daher von den weiteren Analysen ausgeschlossen und die PCA wiederholt. Die neue PCA nach *pareto scaling* lieferte einen *score plot*, der nun wiederum, bedingt durch zwei starke Ausreißer, verzerrt wurde (**Abb. 60 B**). Inspektion des entsprechenden *loading plots* (**Abb. 60 C**) und des Fragebogens ergab, dass die Probanden (beide schwache Raucher) vor Abgabe der Urinprobe ein acetaminophenhaltiges Schmerzmittel eingenommen hatten. Wie bereits gezeigt wurde, bildet Acetaminophen eine Merkaptursäure und ein Merkaptursäure-Sulfoxid (vgl. Projekt 2). Beide Metaboliten übten aufgrund der hohen Signalintensitäten in den *pareto*-skalierten PCA Modellen einen starken Einfluss auf die Positionierung der *scores* aus. Der entsprechende *line plot* (Variablen # vs. p1, *pareto scaling*, **Abb. 60 D**) verdeutlichte den Einfluss der Acetaminophen-Metaboliten auf das Modell, ließ insgesamt aber kein Missalignment der Modellvariablen erkennen.

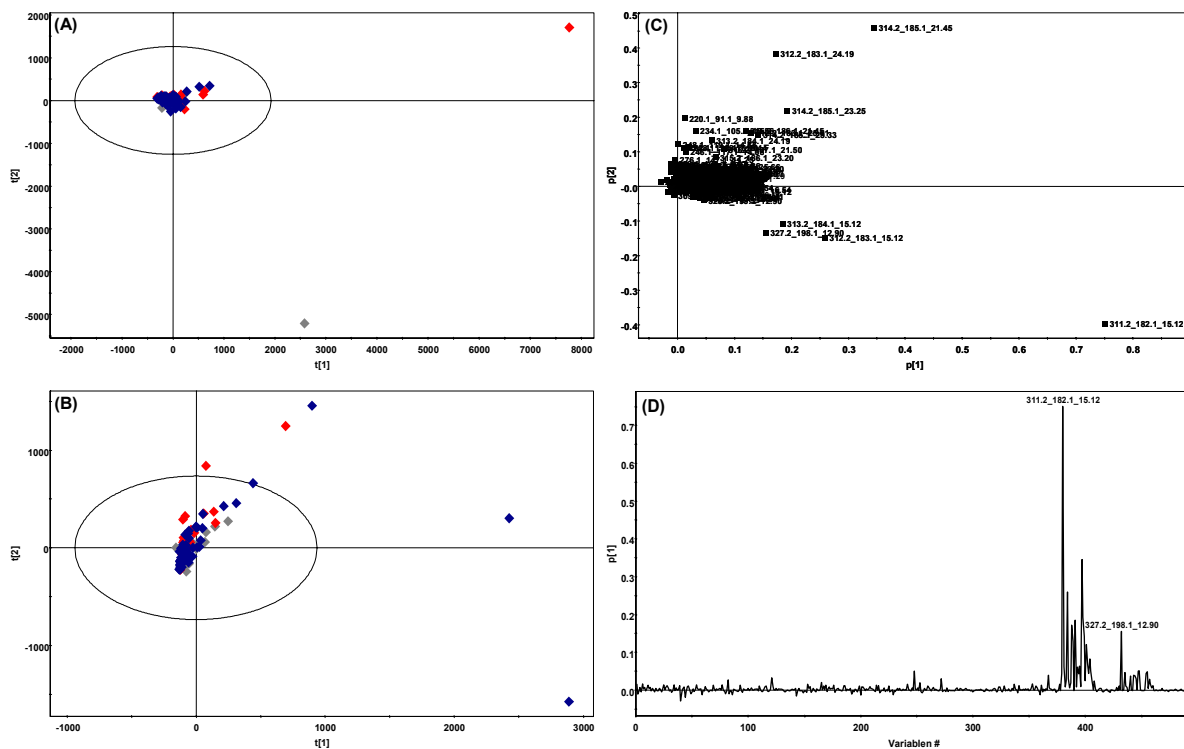


Abb. 60: Plots zur Überprüfung der Datenintegrität. Die Variablen wurden zuvor auf die vier internen Standards bezogen, auf die spezifische Dichte der Proben normalisiert und anschließend *pareto*-skaliert: (A) initialer PCA *score plot* (PC1 vs. PC2) der 122 Proben aus der Raucherstudie (40 Nichtraucher, 56 schwache Raucher und 26 starke Raucher), (B) PCA *score plot* (PC1 vs. PC2) nach Ausschluss der beiden starken Ausreißer (ein Nichtraucher und ein starker Raucher) aus (A), (C) PCA *loading plot* zu (B), (D) *line plot* zu (B); Schlüssel: ◆ Nichtraucher, ◆ schwache Raucher ◆ starke Raucher.

3.7 PCA über alle Proben

Gruppenspezifische Cluster können mitunter durch prominente Signale maskiert werden. Für einen ersten Überblick über den Datensatz wurden die Daten daher statt des *pareto scaling* einem *autoscaling* Prozess unterzogen und ein neues PCA Modell erstellt. Durch *autoscaling* erhält jede Variable dasselbe, von der absoluten Signalintensität unabhängige Gewicht. Der Einfluss der konfundierenden Acetaminophen-Metaboliten konnte auf diese Weise minimiert werden, ohne die entsprechenden Variablen ausschließen zu müssen. Die Einnahme von Arzneistoffen wurde durch das Studienprotokoll nicht geregelt. Da es sich bei exogen bedingten Merkaptursäuren wie der AAP-MA um allgemeine Confounder handelt, die in der Regel nicht gruppenspezifisch, d. h. systematisch auftreten, wurde auf ein Ausschluss der entsprechenden Variablen verzichtet.

Der resultierende *score plot* (**Abb. 61**) nach *autoscaling* ließ zwei deutliche Cluster erkennen. Trotz Überlappungen, setzten sich die *scores* der starken Raucher von der Gruppe der Nichtraucher ab. Die Gruppe der schwachen Raucher streute stark und verteilte sich gleichmäßig zwischen den Nichtrauchern und den starken Rauchern. Das Modell lieferte somit einen ersten

Hinweis auf Unterschiede in den Mercaptursäureprofilen von Nichtrauchern, schwachen und starken Rauchern.

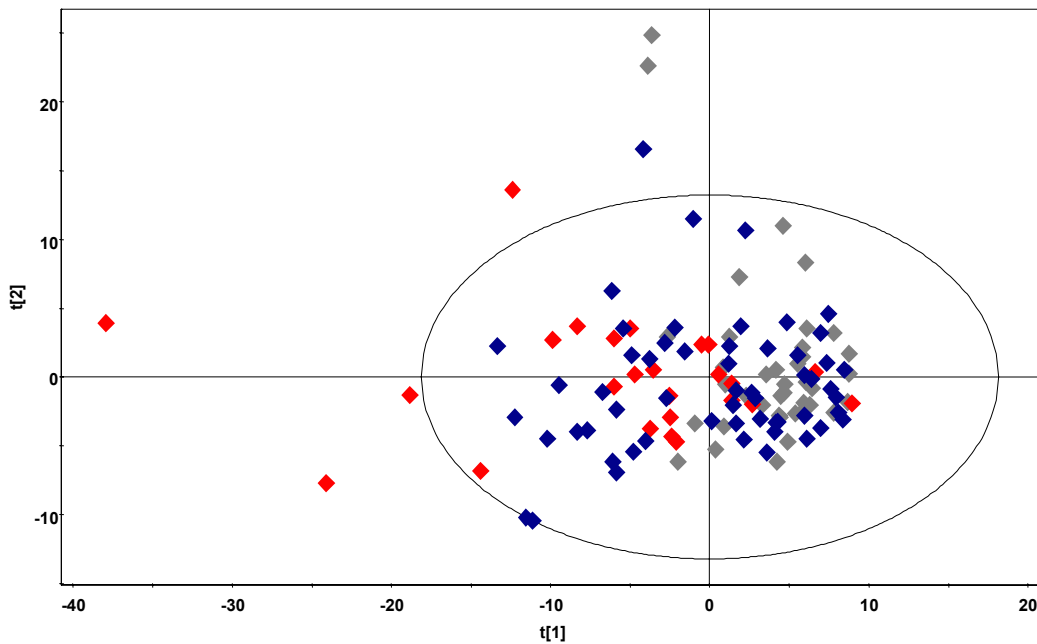


Abb. 61: PCA score plot (PC1 vs. PC2) über alle 120 Proben (39 Nichtraucher, 56 schwache Raucher und 25 starke Raucher) nach *autoscaling*. Die Variablen wurden zuvor auf vier interne Standards bezogen und auf die spezifische Dichte der Proben normalisiert; Schlüssel: \blacklozenge Nichtraucher, \blacklozenge schwache Raucher, \blacklozenge starke Raucher.

3.8 Diskriminierung von Nichtrauchern, schwachen und starken Rauchern mittels OPLS-DA

Die Gruppenbildung in der PCA nach *autoscaling* bildete die Grundlage für die weitere Vorgehensweise. Mittels *pareto*-skalierter OPLS-DA wurde die Gruppe der Nichtraucher (Gruppe 1, $Y = 0$) sowie die Gruppe der schwachen (Gruppe 2, $Y = 1$) und starken Raucher (Gruppe 2, $Y = 1$) weiter untersucht. Das Modell lieferte bei einer signifikanten Komponente Varianzen von $R^2X_p = 0.126$, $R^2Y = 0.248$ und $Q^2 = 0.193$. Zur besseren Veranschaulichung wurde im *score plot* die zweite nicht signifikante Komponente mit herangezogen. Der bereits in der PCA beobachtete Trend zeichnete sich in der OPLS-DA noch deutlicher ab (**Abb. 62**). Bei der Untersuchung des *score plots* fiel auf, dass die Gruppe der Raucher deutlich mehr Varianz auf sich vereinigte als die Gruppe der Nichtraucher. Die Gruppe der schwachen Raucher streute trotz Zuordnung zu Gruppe 2 ($Y = 1$) zwischen dem Raucher- und dem Nichtrauchercluster. Der *score* eines starken Rauchers fiel mit der Kontrollgruppe der Nichtraucher zusammen.

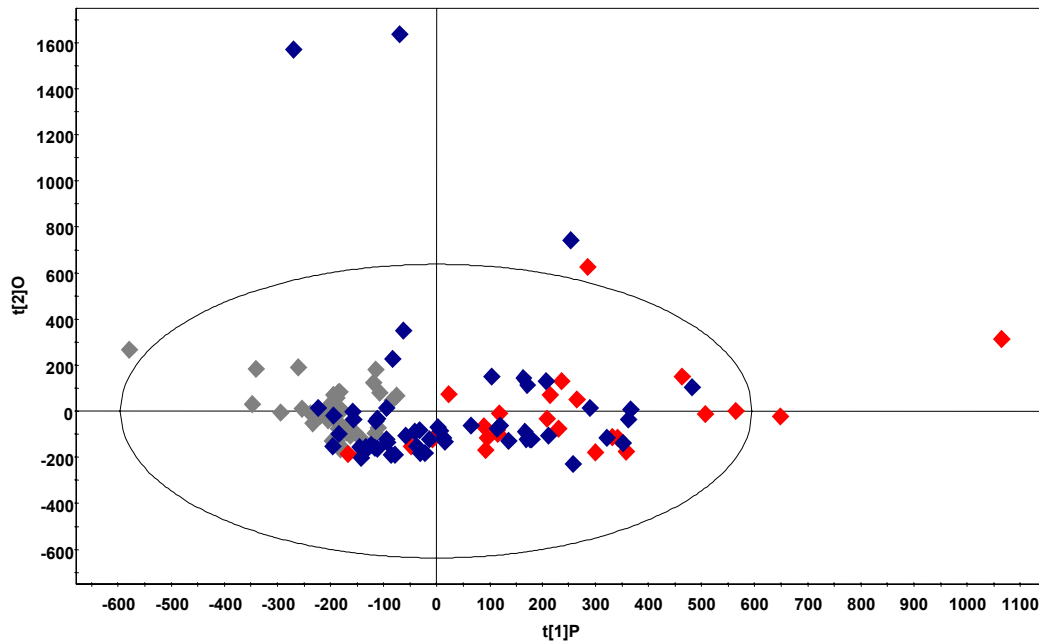


Abb. 62: OPLS-DA *score plot* (t1P vs. t2O) nach *pareto scaling*. Die Variablen wurden zuvor auf vier interne Standards bezogen und auf die spezifische Dichte der Proben normalisiert. Der Gruppe der Nichtraucher wurde in der *dummy*-Matrix $Y = 0$, der Gruppe der schwachen und starken Raucher jeweils $Y = 1$ zugeordnet; Schlüssel: \blacklozenge Nichtraucher, \blacklozenge schwache Raucher, \blacklozenge starke Raucher.

Anhand der *score plots* wurde die Problematik einer genauen Dosisabschätzung (gerauchte Zigaretten pro Tag) deutlich. Bei Tabakkonsum handelt es sich um ein kontinuierliches Maß, das nur schwer durch Fragebögen zu erfassen ist. Neben der subjektiven Einschätzung der Probanden über die tägliche Menge gerauchter Zigaretten hängt das Muster der ausgeschiedenen Merkaptsäuren unter anderem wohl auch von Faktoren wie dem Rauchverhalten, den Zeiträumen zwischen zwei Zigaretten, der Tabakmarke sowie einer zusätzlichen Exposition gegenüber Passivrauch ab. Aus diesem Grund waren in den Modellen keine distinkten Cluster, sondern vielmehr fließende Übergänge zwischen den Gruppen zu erwarten. Dieser Sachverhalt wurde durch die große Streuung der schwachen Raucher (1 – 10 Zigaretten/Tag) in dem PCA und dem OPLS-DA Modell unterstrichen. Eine Voraussetzung für prädiktive Modelle sind annähernd gleiche Gruppenstärken. Daher wurde im Folgenden die Gruppe der starken und der schwachen Raucher getrennt voneinander untersucht.

3.8.1 OPLS-DA Modell: starke Raucher vs. Nichtraucher

Die OPLS-DA starke Raucher ($Y = 1$) vs. Nichtraucher ($Y = 0$) lieferte nach *pareto scaling* 1 + 2 signifikante Komponenten mit Modellcharakteristika von $R^2X = 0.329$, $R^2X_P = 0.115$ und $R^2Y = 0.834$ (**Abb. 63**). Verglichen mit dem integrativen OPLS-DA Modell schwache/starke

Raucher vs. Nichtraucher war damit bei nahezu gleicher Varianz in der ersten, prädiktiven Komponente (R^2X_p) ein mehr als dreifacher Gewinn an Varianz in der Y -Matrix (Zusammenhang zwischen der X -Matrix und der Gruppenzugehörigkeit) zu verzeichnen. In gleichem Maße stieg die Prädiktivität der OPLS-DA bei ausschließlicher Betrachtung der starken Raucher auf $Q^2 = 0.616$. Das Hochdosismodell erfüllte die Voraussetzungen, die allgemein an prädiktive Modelle gestellt werden ($|R^2Y - Q^2| < 0.2 - 0.3$, $Q^2 > 0.5$ [162]) und diente im Folgenden als Grundlage für die Selektion potentieller Marker.

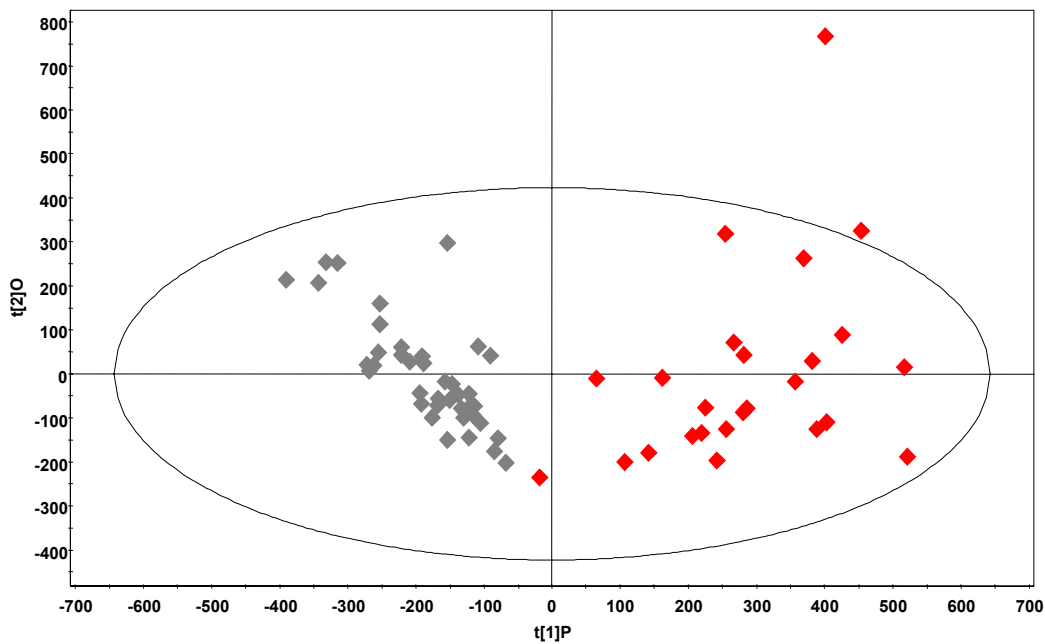


Abb. 63: OPLS-DA *score plot* (t1P vs. t2O) starke Raucher vs. Nichtraucher nach *pareto scaling*. Die Variablen wurden zuvor auf vier interne Standards bezogen und auf die spezifische Dichte der Proben normalisiert; Schlüssel: \blacklozenge Nichtraucher, \blacklozenge starke Raucher.

3.8.2 OPLS-DA Modell: schwache Raucher vs. Nichtraucher

Erwartungsgemäß fielen die Kennzahlen des OPLS-DA Modells schwache Raucher vs. Nichtraucher (Niedrigdosismodell) mit nur einer signifikanten Komponente und $R^2X_p = 0.152$, $R^2Y = 0.220$ und $Q^2 = 0.141$ im Vergleich zum Hochdosismodell deutlich schlechter aus. Dies spiegelte sich auch im *score plot* wider, der, durch die starke Streuung der schwachen Raucher bedingt, eine deutliche Überlappung der beiden Gruppen zeigte (**Abb. 64**). Aufgrund der schlechten Trennung war anzunehmen, dass ein Raucher erst ab einer gewissen „Dosis“ ein verändertes Urinmuster aufweist, anhand dessen er als solcher erkannt werden kann. In der Tat ergab die Auswertung des Plots hinsichtlich der angegebenen gerauchten Zigaretten pro Tag eine gewisse Dosisabhängigkeit. So clusterten Proben von Probanden mit weniger als fünf Zigaretten pro Tag vermehrt mit der Gruppe der Nichtraucher, wohingegen Proben von Probanden mit

einem Konsum von sechs bis Zigaretten pro Tag tendenziell ein eigenes Cluster in den beiden rechten Quadranten des *score plot* bildeten. Trotz der geringen Prädiktivität wurden für Vergleichszwecke auf der Basis des vorstehenden Modells potentielle Marker selektiert.

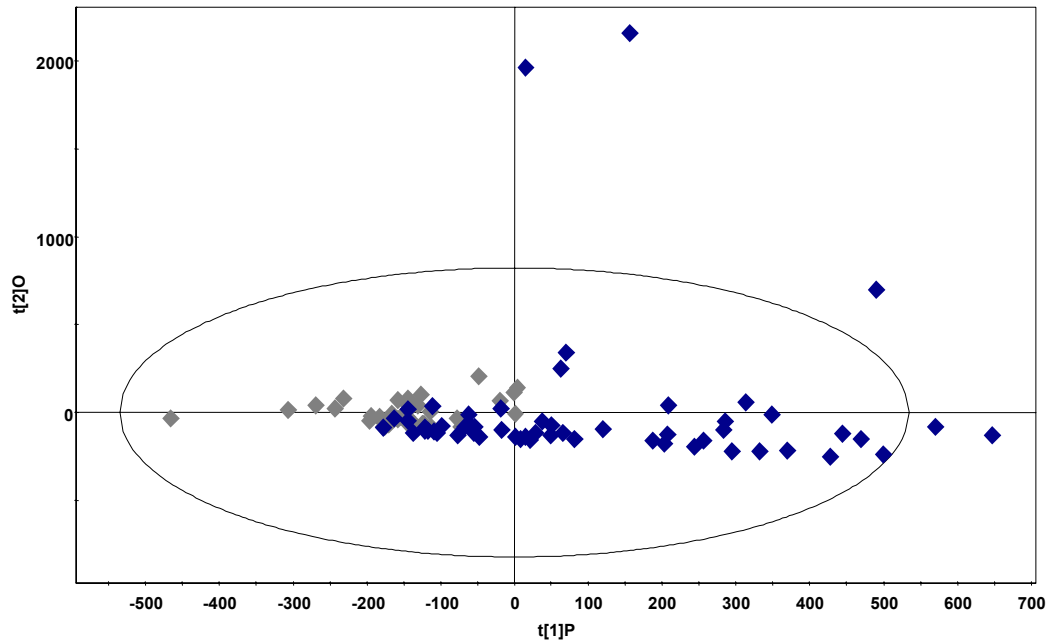


Abb. 64: OPLS-DA *score plot* (t1P vs. t2O) schwache Raucher vs. Nichtraucher nach *pareto scaling*. Die Variablen wurden zuvor auf vier interne Standards bezogen und auf die spezifische Dichte der Proben normalisiert; Schlüssel: ◆ Nichtraucher, ◆ schwache Raucher.

3.9 Selektion potentieller Marker

Potentielle tabakrauchspezifische Merkaptursäuremarker wurden aus *S-plots* (Kovarianz vs. Korrelation bzw. p vs. $p(\text{corr})$) der zugrunde liegenden OPLS-DA Modelle extrahiert. Es wurden nur Variablen selektiert, die eine Kovarianz von kleiner -0.05 bzw. von größer 0.05 ($|p| > 0.05$) und zugleich eine Korrelation von weniger als -0.5 bzw. mehr als 0.5 ($|p(\text{corr})| > 0.5$) aufwiesen. Durch Wahl der *cut-offs* sollte gewährleistet werden, dass die entsprechende Variable einen wesentlichen Beitrag zur Klassifizierung der Gruppen (ausgedrückt durch die Kovarianz) im jeweiligen *score plot* leistete und gleichzeitig gute Konfidenzeigenschaften (ausgedrückt durch die Korrelation) aufwies. **Abb. 65 A** zeigt den *S-plot* des OPLS-DA Hochdosismodells (starke Raucher vs. Nichtraucher), **Abb. 65 B** entsprechend den *S-plot* des Niedrigdosismodells (schwache Raucher vs. Nichtraucher).

Konfidenzintervall [254]. Die weitere Selektion der potentiellen Marker erfolgte nach einem konservativen Verfahren, d. h. es wurden nur Variablen weiterverfolgt, deren Konfidenzintervall maximal die Hälfte der absoluten Kovarianz (Konfidenzintervall $\leq p/2$) betrug. Einen Ausschnitt aus dem *loading column plot* des zugrunde liegenden starke Raucher vs. Nichtraucher OPLS-DA Modells zeigt **Abb. 66**.

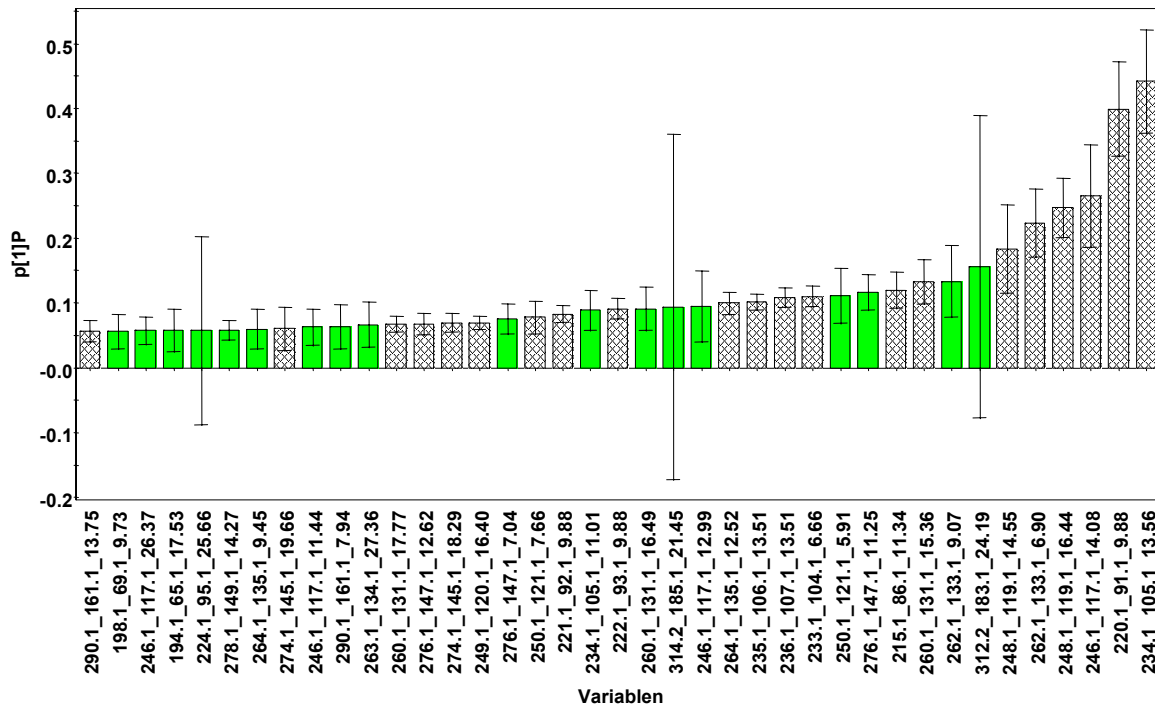


Abb. 66: Ausschnitt aus dem *loading column plot* (Variablen vs. p) des starke Raucher vs. Nichtraucher OPLS-DA Modells mit *jack-knifed* Konfidenzintervallen. Variablen, die die vorgegebenen Kovarianz- und Korrelationskriterien von $|p| > 0.05$ und $|p(\text{corr})| > 0.5$ erfüllten sind schraffiert dargestellt. Im Folgenden wurden nur Variablen mit Konfidenzintervallen $\leq p/2$ selektiert.

In einem nächsten Schritt wurden alle Isotopen ausgeschlossen. Da die Datenextraktion softwaregestützt erfolgte und Fehler bei der Prozessierung nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten, wurde die Existenz der verbleibenden potentiellen Marker anschließend anhand der Rohdaten überprüft. Hierzu wurden aus den Chromatogrammen der jeweiligen Gruppen die einzelnen thMRM-Übergänge extrahiert und kontrolliert, inwieweit es sich bei der selektierten Variablen (m/z _ m/z -129_RT) um ein reales Signal handelte. Hierzu wurde ein minimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis von drei definiert ($S/N > 3$). Die anfangs 35 Variablen des starke Raucher vs. Nichtraucher OPLS-DA Modells reduzierten sich durch Ausschluss der Isotopen auf 28, die 24 Variablen des schwache Raucher vs. Nichtraucher OPLS-DA Modells auf 17 potentielle Marker. Im Gegensatz zum Hochdosismodell, in dem nur eine Variable das Konfidenzkriterium nicht erfüllte, waren es im Niedrigdosismodell 13 Variablen, deren Konfidenzintervall die Hälfte des absoluten Wertes für p überstieg und damit verworfen wurden. Allerdings beinhaltet das

Konfidenzintervall in keinem der Fälle den Nullpunkt. Von den verbleibenden 27 bzw. 4 potentiellen Markern konnten alle Signale durch die Rohdaten bestätigt werden. In **Tab. 12** sind die finalen Variablen zusammen mit ihren Werten für p und $p(\text{corr})$ aufgelistet.

Von den 4 Markern des schwache Raucher vs. Nichtraucher OPLS-DA Modells stellten 3 auch Marker für das starke Raucher vs. Nichtraucher OPLS-DA Modell dar. Für diese Merkaptursäuren kann eine Dosisabhängigkeit angenommen werden. Die Variablen, die sowohl aus dem schwache Raucher vs. Nichtraucher als auch aus dem starke Raucher vs. Nichtraucher OPLS-DA Modell als potentielle Marker extrahiert wurden sind in **Tab. 12** kursiv gedruckt.

Tab. 12: Variablen der *pareto*-skalierten OPLS-DA Modelle starke Raucher vs. Nichtraucher und schwache Raucher vs. Nichtraucher, die die Selektionskriterien von $|p| > 0.05$ und $|p(\text{corr})| > 0.5$ erfüllten, ein *jack-knifed* Konfidenzintervall von $\leq p/2$ aufwiesen, kein Isotop einer Variablen darstellten und durch die Rohdaten bestätigt werden konnten ($S/N > 3$). Die kursiv gedruckten Variablen wurden sowohl aus dem schwache Raucher vs. Nichtraucher als auch aus dem starke Raucher vs. Nichtraucher OPLS-DA Modell als potentielle Marker extrahiert.

Variable	Kovarianz	Korrelation
<i>m/z_m/z-129_RT</i>	<i>p</i>	<i>p(corr)</i>
OPLS-DA starke Raucher vs. Nichtraucher		
215.1_86.1_11.34	0.12	0.67
220.1_91.1_9.88	0.40	0.66
222.1_93.1_11.72	0.05	0.66
232.1_103.1_13.14	0.06	0.53
233.1_104.1_6.66	0.11	0.66
234.1_105.1_11.01	0.09	0.66
234.1_105.1_13.56	0.44	0.81
242.1_113.1_19.75	0.05	0.62
246.1_117.1_14.08	0.27	0.78
246.1_117.1_26.37	0.06	0.66
248.1_119.1_14.55	0.05	0.52
248.1_119.1_16.44	0.25	0.68
250.1_121.1_5.91	0.11	0.69
256.1_127.1_15.12	0.06	0.67
260.1_131.1_15.36	0.13	0.69
260.1_131.1_16.49	0.09	0.58
260.1_131.1_17.77	0.07	0.77
262.1_133.1_6.90	0.22	0.73
262.1_133.1_9.07	0.13	0.67
264.1_135.1_12.52	0.10	0.71
274.1_145.1_18.29	0.07	0.76
274.1_145.1_19.66	0.06	0.66
276.1_147.1_7.04	0.08	0.67
276.1_147.1_11.25	0.12	0.61
276.1_147.1_12.62	0.07	0.55
278.1_149.1_14.27	0.06	0.63
290.1_161.1_13.75	0.06	0.61
OPLS-DA schwache Raucher vs. Nichtraucher		
233.1_104.1_6.66	0.11	0.63
262.1_133.1_6.90	0.18	0.58
264.1_135.1_6.57	0.06	0.53
274.1_145.1_18.29	0.06	0.67

3.10 Strukturaufklärung der selektierten Marker

Durch die Wahl geeigneter statistischer Kriterien konnten aus dem Merkaptursäureprofil der Gruppe der starken bzw. schwachen Raucher insgesamt 28 verschiedene Variablen extrahiert werden, die das Potential zu tabakrauchspezifischen Markern haben bzw. potentielle Marker für oxidativen Stress darstellen. Im Folgenden konnten durch Vergleich der Retentionszeit und des jeweiligen Produktionenspektrums mit authentischen Standards fünf der selektierten Metaboliten identifiziert werden. Darüber hinaus wurden zur weiteren Absicherung Aufsatzversuche mit zwei unterschiedlichen Standardkonzentrationen durchgeführt. **Tab. 13** beinhaltet die Hauptfragmente der identifizierten Merkaptursäuremetaboliten nach negativer *collision induced dissociation*.

Tab. 13: Hauptfragmente der identifizierten und für die Gruppe der Raucher spezifischen Merkaptursäuremarker im *enhanced* Produktionenspektrum nach negativer *collision induced dissociation*.

Variable <i>m/z</i> <i>m/z</i> -129 RT	Fragmente im -EPI Spektrum							Identifizierung		
	<i>m/z</i>	<i>m/z</i> -129	weitere Produktionen							
215.1_86.1_11.34	215	86	84	135	143	153	154	187	197	2-Cyanoethyl-MA (CE-MA)
220.1_91.1_9.88	220	91	81	89						3-Hydroxypropyl-MA (HP-MA)
233.1_104.1_6.66	233	104	84	162						Acrylamid-MA (AA-MA)
234.1_105.1_13.56	234	105	81	83	96	190				3-Hydroxy-1-methylpropyl-MA (HMP-MA)
248.1_119.1_14.55	248	119	84	128	162					2-Carboxy-1-methylethyl-MA (CME-MA)

Demnach konnte die Variable 215.1_86.1_11.34 als 2-Cyanoethyl-MA (CE-MA) identifiziert werden. Die Merkaptursäure leitet sich von Acrylnitril ab, einer elektrophilen Verbindung, die in zahlreichen industriellen Prozessen entsteht. Im Rauch einer Zigarette sind bis zu 20 µg Acrylnitril enthalten. Weitere Metaboliten des Acrylnitrils sind Carboxymethylcystein, Thiodigylcolsäure und Hydroxyethyl-Merkaptursäure [290]. Verglichen mit dem Versuchstier Ratte metabolisiert der Mensch die Verbindung allerdings in geringerem Maße, was mit sehr niedrigen Spiegeln von Carboxymethylcystein, Thiodigylcolsäure und Hydroxyethyl-Merkaptursäure im Urin von exponierten Personen einhergeht [291, 292].

Bei der Variablen 220.1_91.1_9.88 handelte es sich um 3-Hydroxypropyl-MA (HP-MA), einer Merkaptursäure, die nach Exposition mit Acrolein (2-Propenal) metabolisch entsteht. Acrolein stellt ein Intermediat für chemische Synthesen, einen ubiquitär vorkommenden Nahrungsbestandteil und Inhaltsstoff von Tabakrauch dar. Der Rauch einer Zigarette enthält circa 60 µg Acrolein. Daneben existieren zahlreiche endogene Stoffwechselwege mit dem Zwischenprodukt Acrolein. Reaktionen, die sowohl exogen als auch endogen zur Bildung von Acrolein führen, umfassen die Dehydratation von Glycerol, die Retro-Aldol-Spaltung von Kohlenhydraten, die Lipidperoxidation und den Strecker-Abbau der Aminosäuren Methionin und Threonin [293].

HP-MA stellt den Hauptmetaboliten von Acrolein dar und entsteht wie auch das 3-Oxo-propyl-MA-Sulfoxid, die Carboxyethyl-MA sowie die Propionsäuremethylester-MA aus dem Vorläufer 3-Oxopropyl-MA. Noch vor der Konjugation mit Glutathion kann Acrolein zum Glycidaldehyd epoxidiert werden. Das Reaktionsprodukt kann ebenfalls mit GSH konjugieren und zur 2-Carboxy-2-hydroxyethyl-MA abgebaut werden [294-296]. Die Liste der potentiellen Marker (**Tab. 12**) enthält mit 234.1_105.1_11.01, 248.1_119.1_16.44 und 250.1_121.1_5.91 drei Variablen, die Nebenmetaboliten von Acrolein (Carboxyethyl-MA (M = 235 g/mol), Propionsäuremethylester-MA (M = 249 g/mol) bzw. 2-Carboxy-2-hydroxyethyl-MA (M = 251 g/mol)) entsprechen könnten. Bei der Variablen 234.1_105.1_11.01 könnte es sich aufgrund der Masse und der Retentionszeit theoretisch auch um das Sulfoxid der 3-Oxopropyl-MA (M = 235 g/mol) handeln. Da zur Identifizierung der Variablen keine authentischen Standards zur Verfügung standen, konnte der Hypothese, dass weitere Acrolein-Metaboliten tabakrauchspezifische Biomarker darstellen, nicht weiter nachgegangen werden.

Der Metabolit 233.1_104.1_6.66 entspricht der Merkaptursäure des Acrylamids (Acrylamid-MA, AA-MA) wie durch einen authentischen Standard und Referenzspektren aus der Literatur [211] bestätigt werden konnte. Das Vorkommen und die Entstehung von Acrylamid in Back- und Röstprozessen durch Maillard-Reaktion wurden bereits zuvor diskutiert (vgl. Projekt 3). Neben der Aufnahme mit der Nahrung spielt die Exposition durch Tabakrauch eine entscheidende Rolle. So wurden im Urin von Rauchern deutlich höhere Acrylamid-MA Spiegel nachgewiesen als in Nichtraucherproben [195, 209, 250].

Die beiden Variablen 234.1_105.1_13.56 und 248.1_119.1_14.55 wurden als 3-Hydroxy-1-methylpropyl-MA (HMP-MA) und 2-Carboxy-1-methylethyl-MA (CME-MA) identifiziert und stellen Merkaptursäuren des Crotonaldehyds dar. Mit einem p von 0.44 und einem p(corr) von 0.81 hatte die Variable 234.1_105.1_13.56 (HMP-MA) den größten Einfluss auf das OPLS-DA Modell der starken Raucher und Nichtraucher. Wohingegen die Variable 248.1_119.1_14.55 (CME-MA) mit einem p(corr) von 0.52 einen deutlichen, wenn auch im Vergleich zu HMP-MA geringeren Einfluss, auf das Modell hatte. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen eines Tiermodells, wonach HMP-MA als Haupt- und CME-MA als Nebenmetabolit des Crotonaldehyds identifiziert wurde [297]. Crotonaldehyd ist ein α,β -ungesättigter Aldehyd, der natürlicherweise in Nahrungsmitteln wie Fleisch, Fisch, Früchten, Gemüse sowie in alkoholischen Getränken vorkommt. Als Hauptquelle gilt aber der Haupt- und Nebenstromrauch von Tabakprodukten [298]. Für den Hauptstromrauch von Zigaretten werden durchschnittliche Level von 15 $\mu\text{g}/\text{Zigarette}$ angegeben [280]. Daneben kann Crotonaldehyd endogen durch Reaktionen der Lipidperoxidation entstehen [299, 300]. Interessanterweise konnten HMP-MA und CME-MA in

dem Niedrigdosismodell nicht als potentielle Marker identifiziert werden. Die **Abb. 67** zeigt die Strukturformeln der potentiellen Marker.

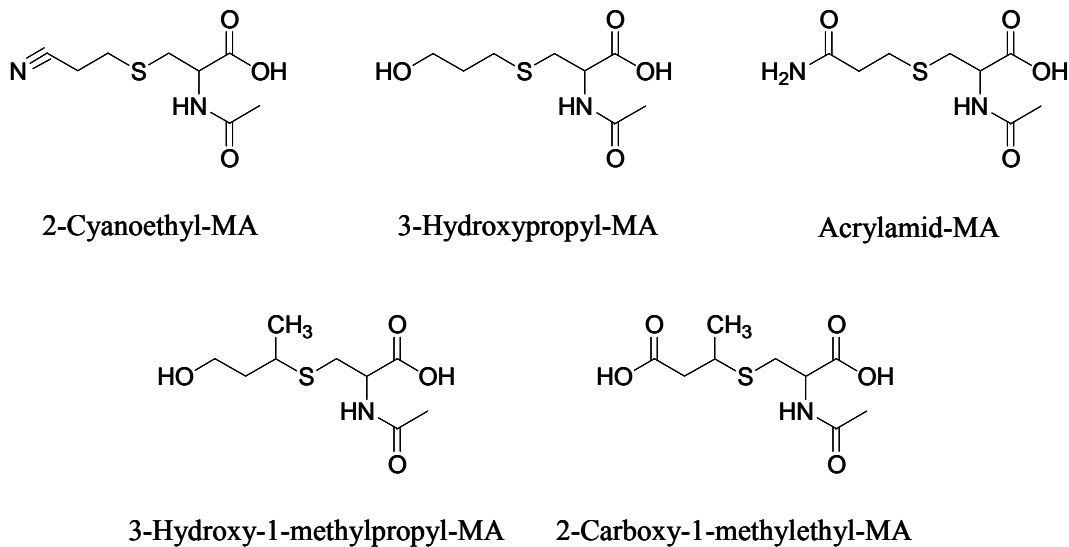


Abb. 67: Strukturformeln der identifizierten tabakrauchspezifischen Merkaptursäuren 2-Cyanoethyl-MA (CE-MA), 3-Hydroxypropyl-MA (HP-MA), Acrylamid-MA (AA-MA), 3-Hydroxy-1-methylpropyl-MA (HMP-MA) und 2-Carboxy-1-methylethyl-MA (CME-MA).

Überraschenderweise wurden Metaboliten wie die *S*-Phenyl-MA [122, 301] oder Merkaptursäuren, die sich von 1,3-Butadien [156] ableiten und allgemein als klassische Expositionsmarker für Tabakrauch gelten, nicht als Marker identifiziert. Wie anhand des internen *d*₅-*S*-Phenyl-MA Standards und authentischer Monohydroxybutenyl-MA (1-Hydroxymethyl-2-propenyl-MA und 2-Hydroxy-3-butenyl-MA) und 3,4-Dihydroxybutyl-MA Standards gezeigt werden konnte, war dies weniger in der Screeningmethode als vielmehr in der geringen Konzentration der Merkaptursäuren in den Urinproben begründet. Selektive Methoden zur Quantifizierung der Metaboliten von Benzol und 1,3-Butadien erfordern in der Regel umfangreiche und spezifische Extraktionsschritte, die zu einer sieben- bis zehnfachen Anreicherung der Merkaptursäuren führen [122, 156]. Durch die Säulenschaltung konnte zwar eine Anreicherung der Merkaptursäuren aus den Urinproben erzielt werden, allerdings wurde die Screeningmethode nicht auf einzelne Metaboliten, sondern auf die Erfassung eines breiten Merkaptursäurespektrums hin optimiert. Eine geringere Sensitivität für einzelne Analyten musste vor dem Hintergrund der Universalität der Methode daher in Kauf genommen werden.

Ähnlich verhielt es sich mit der Merkaptursäure des als Marker für oxidativen Stress diskutierten 4-Hydroxy-2-nonenals (HNE-MA). Diese konnte aufgrund des Detektionslimits in den Proben der Raucher ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Das Reduktionsprodukt, die Merkaptursäure des 1,4-Dihydroxynonens (DHN-MA), konnte dagegen in allen Proben detektiert werden.

Allerdings fielen die Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern sehr gering aus. Tendenziell wurde eine dosisabhängige Abnahme der DHN-MA Exkretion beobachtet, die allerdings nicht signifikant ausfiel. Die fehlende Signifikanz war wohl auch auf die große inter-individuelle Variabilität zurückzuführen. So wurden in der Gruppe der Nichtraucher und schwachen Raucher DHN-MA Konzentrationen gemessen, die sich um den Faktor 30 unterschieden. Für die Gruppe der Raucher wurden 17-fache Unterschiede ermittelt. Die Beobachtungen lassen die Rolle von HNE-MA und DHN-MA als potentielle Marker für oxidativen Stress *in vivo* weiterhin als fraglich erscheinen. Selbst in einem Kollektiv, das nachweislich in erheblichem Maße mit Elektrophilen belastet war, konnten bezüglich HNE-MA und DHN-MA keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe ermittelt werden. Die tendenziell geringeren DHN-MA-Level in den Proben der Raucher untermauerten aber wiederum die bereits mit der Modellsubstanz Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) erzielten Ergebnisse, wonach durch CCl₄ ausgelöster oxidativer Stress mit einer verminderten DHN-MA Exkretion einherging. Sinkende DHN-MA-Level in Folge oxidativen Stresses scheinen dabei unabhängig von der gesamten Merkaptursäureausscheidung zu sein, da sie sowohl aus der Exposition gegenüber CCl₄ (reduzierte MA-Ausscheidung) als auch aus der Exposition gegenüber Tabakrauch (erhöhte MA-Ausscheidung) resultierten. Der Mechanismus, der sich hinter dieser Beobachtung verbirgt, bleibt allerdings weiterhin unklar.

3.11 Klassische Evaluierung der identifizierten Marker

Die identifizierten Metaboliten wurden nachfolgend einer klassischen Evaluierung unterzogen. Hierzu wurde die Fläche des Analyten auf die Fläche des im Chromatogramm am nächsten gelegenen internen Standards bezogen und das Verhältnis anschließend auf die spezifische Dichte der Probe normalisiert. Demgemäß wurden die normalisierten Verhältnisse AA-MA/*d*₃-AA-MA, CE-MA/*d*₃-HP-MA, HP-MA/*d*₃-HP-MA, HMP-MA/*d*₃-HP-MA sowie CME-MA/*d*₃-HP-MA gebildet und gruppenweise gegenübergestellt. Diese, aus der quantitativen Routineanalytik abgeleitete Vorgehensweise sollte sicherstellen, dass es sich bei den beobachteten Effekten tatsächlich um regulierte Marker handelte und nicht um zufällige Korrelationen. Falsch positiven Resultaten, die durch die multivariate Datenstruktur bedingt sind, kann teilweise durch nachgeschaltete univariate Verfahren Rechnung getragen werden. Voraussetzung hierfür ist eine begrenzte Anzahl an Variablen. Aufgrund des semiquantitativen Charakters konnten mit dem gewählten Verfahren allerdings nur relative Tendenzen erfasst werden. **Abb. 68** stellt die Ergebnisse dar. Sowohl schwache als auch starke Raucher unterschieden sich bezüglich der Metaboliten AA-MA, CE-MA, HP-MA und HMP-MA im t-Test hochsignifikant ($p < 0.01$) von der Gruppe der Nichtraucher. Im Hinblick auf die CME-Merkaptursäure existierten zwischen starken Rauchern und

Nichtrauchern hochsignifikante, zwischen schwachen Rauchern und Nichtraucher signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) in der Ausscheidung. Alle identifizierten Marker konnten auch in der Gruppe der Nichtraucher nachgewiesen werden. Hierbei ließen die auf die spezifische Dichte der Proben normalisierten Verhältnisse der identifizierten Variablen eine deutliche Dosisabhängigkeit erkennen. So lagen die relativen Level von AA-MA, HP-MA, HMP-MA und CME-MA in den Urinen der schwachen Raucher 1.5- bis 2.5-fach, in den Urinen der starken Raucher sogar 2- bis 7-fach höher als in der Gruppe der Nichtraucher. Im Einzelnen wurden für AA-MA 2- bzw. 3.5-fache, für HP-MA 2.5- bzw. 7-fache, für HMP-MA 2- bzw. 5-fache und für CME-MA 1.5- bzw. 2-fache Unterschiede zwischen den relativen MA-Leveln der Gruppe der schwachen bzw. starken Raucher und der Gruppe der Nichtraucher beobachtet. Am stärksten unterschieden sich die Gruppen bezüglich der CE-MA Exkretion. Zwischen der Kontrollgruppe der Nichtraucher und der Gruppe der schwachen Raucher lag hier ein Faktor von 7.5, zwischen Nichtrauchern und starken Rauchern sogar ein Faktor von 22.

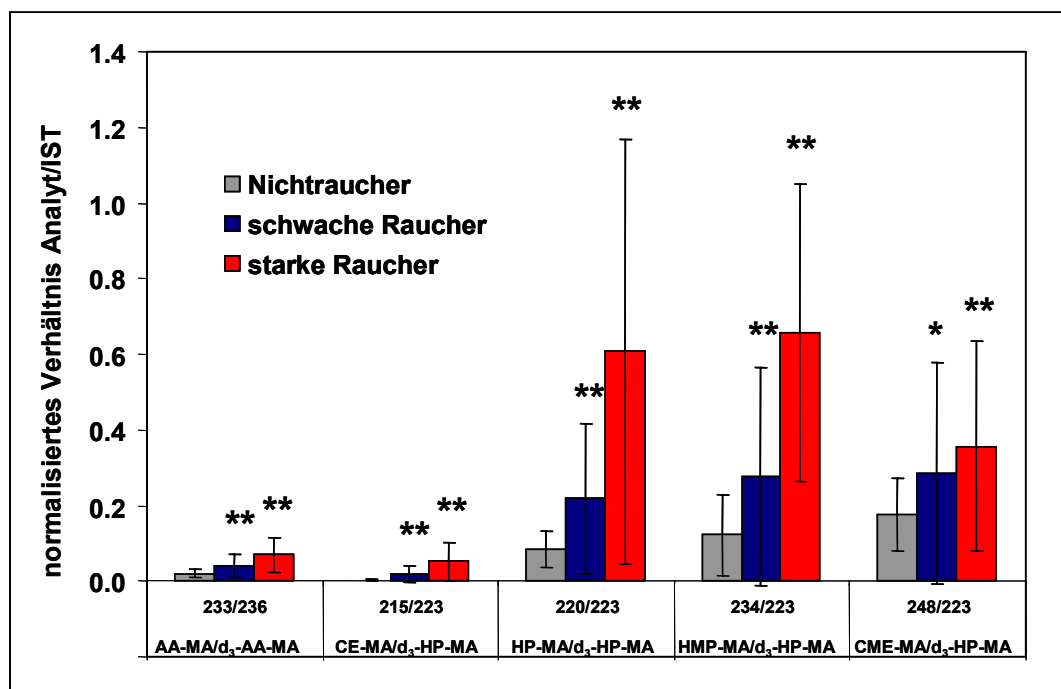


Abb. 68: Normalisierte Verhältnisse der identifizierten Merkaptursäuremarker. Die Fläche der jeweiligen Variablen wurde auf den am nächsten gelegenen internen Standard bezogen (AA-MA/d₃-AA-MA, CE-MA/d₃-HP-MA, HP-MA/d₃-HP-MA, HMP-MA/d₃-HP-MA sowie CME-MA/d₃-HP-MA) und anschließend auf die spezifische Dichte der Probe normalisiert; Schlüssel: (d₃-)AA-MA, (d₃-)Acrylamid-MA; CE-MA, 2-Cyanoethyl-MA; (d₃-)HP-MA, (d₃-)3-Hydroxypropyl-MA; HMP-MA, 3-Hydroxy-1-methylpropyl-MA; CME-MA, 2-Carboxy-1-methylethyl-MA; **p < 0.01 und *p < 0.05 (t-Test gegen die Gruppe der Nichtraucher).

Die Ergebnisse sind konsistent mit Literaturdaten, in denen für die Merkaptursäure des Acrylamids in Urin Level von $135 \pm 88 \mu\text{g/g}$ Kreatinin für Raucher und $76 \pm 30 \mu\text{g/g}$ Kreatinin

für Nichtraucher angegeben werden [195]. Zwei andere Studien kommen auf jeweils bis zu vierfach höhere AA-MA-Level im Urin von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern [250]. Allerdings wurde in einer der beiden Studien ein Raucher bereits ab fünf Zigaretten täglich der Gruppe der starken Raucher zugeordnet [209].

CE-MA ist der Hauptmetabolit von Acrylnitril. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Acrylnitril durch Konjugation mit Glutathion konzentrationsabhängig in den entsprechenden Mercaptursäuremetaboliten überführt wird. Die Ausscheidung erfolgt hierbei relativ schnell [290]. Ergebnisse aus Humanstudien zu CE-MA-Leveln in Urinen von Rauchern und Nichtrauchern existieren nicht. Aus den erzielten semiquantitativen Ergebnissen konnte jedoch geschlossen werden, dass eine gute Korrelation zwischen den CE-MA-Leveln und dem Rauchverhalten besteht. Der Nebenmetabolit 2-Hydroxyethyl-MA konnte weder aus dem Hochdosis- noch aus dem Niedrigdosismodell als potentieller Marker extrahiert werden. Diese Beobachtung ist konsistent mit Berichten, wonach sich 2-Hydroxyethyl-MA als Marker für ein Biomonitoring als ungeeignet erwies [290].

In den Urinproben der schwachen bzw. starken Rauchern wurde HP-MA im Vergleich zur Gruppe der Nichtraucher in 2.5- bzw. 7-fach höherer Konzentration nachgewiesen. In CARMELLA *ET AL.* werden die durchschnittlichen HP-MA-Level für Raucher (> 10 Zigaretten/Tag) mit 3950 ± 2950 pmol/mg Kreatinin, die Level für Nichtraucher mit 1900 ± 3000 pmol/mg Kreatinin angegeben. Die Standardabweichungen liegen somit in der gleichen Größenordnung wie in der durchgeführten Metabonomicsstudie. Die Medianen betragen 2900 bzw. 683 pmol/mg Kreatinin, die HP-MA Konzentration lag folglich in der Gruppe der Raucher um den Faktor 4 höher. Interessanterweise konnten die HP-MA-Level durchschnittlich um circa 78 % gesenkt werden, wenn die Probanden für vier Wochen nicht geraucht hatten [302]. Die Studien belegen, dass es sich bei HP-MA um einen Biomarker handelt, der in Zusammenhang mit Tabakrauch gebracht werden kann.

In der Metabonomicsstudie konnten durch semiquantitative Auswertung der Variablen 234.1_105.1_13.56 und 248.1_119.1_14.44 für HMP-MA 2- bzw. 5-fache, für CME-MA 1.5- bzw. 2-fache Unterschiede zwischen schwachen bzw. starken Rauchern und Nichtrauchern ermittelt werden. SCHERER *ET AL.* berichten von circa 3-fach höheren HMP-MA und 2-fach höheren CME-MA-Leveln in Urinproben von Rauchern im Vergleich zu einem Nichtraucherkollektiv. Für HMP-MA bestand sogar eine Korrelation zwischen der ausgeschiedenen Konzentration und der Anzahl gerauchter Zigaretten sowie mit dem Cotiningehalt im Speichel und den Nicotinäquivalenten in Urin [298]. Eine ähnliche Dosisabhängigkeit mit vergleichbaren

Standardabweichungen konnte mit der Mercaptursäuremethode sowohl für HMP-MA als auch für CME-MA ermittelt werden.

Die Dosisabhängigkeit der identifizierten Mercaptursäuremetaboliten konnte weiterhin durch eine Extension des *S-plots*, den sogenannten *shared and unique structure plot (SUS-plot)*, bestätigt werden. In diesem Plot werden die Korrelationen ($p(\text{corr})$) zweier unabhängiger OPLS-DA Modelle gegenübergestellt. Variablen, die in beiden Modellen eine hohe Korrelation mit dem untersuchten Effekt aufweisen, sind demzufolge entlang einer Diagonale durch den ersten und dritten Quadranten angeordnet. Hier wurde das OPLS-DA Modell starke Raucher vs. Nichtraucher dem OPLS-DA Modell schwache Raucher vs. Nichtraucher gegenübergestellt. Anhand der **Abb. 69** wird deutlich, dass die identifizierten Marker AA-MA, CE-MA, HP-MA, HMP-MA sowie CME-MA in beiden Modellen hohe $p(\text{corr})$ -Werte und damit eine gute Korrelation mit der Gruppe der starken und schwachen Raucher aufwiesen. Visuell konnte dies durch die Anordnung der besagten Variablen entlang der Diagonalen durch den ersten Quadranten nachvollzogen werden.

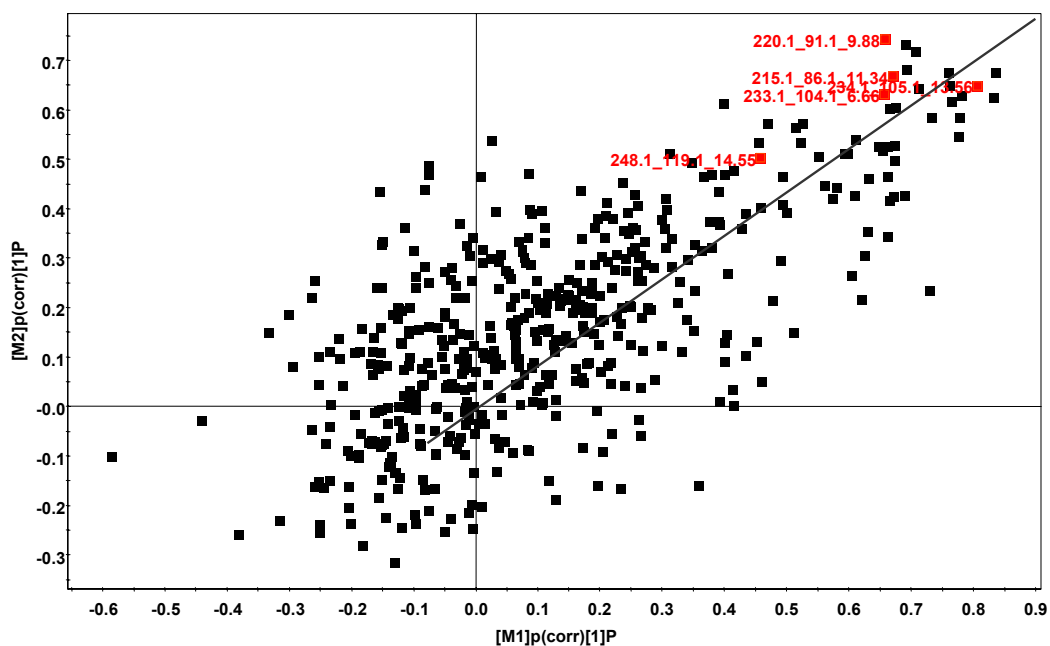


Abb. 69: *SUS-plot* ($p(\text{corr})M1$ vs. $p(\text{corr})M2$), der den Korrelationsparameter $p(\text{corr})$ des starke Raucher vs. Nichtraucher OPLS-DA Hochdosismodells ($M1$) dem Korrelationsparameter $p(\text{corr})$ des schwache Raucher vs. Nichtraucher OPLS-DA Niedrigdosismodells ($M2$) gegenüberstellt. Die identifizierten Metaboliten AA-MA (233.1_104.1_6.66), CE-MA (215.1_86.1_11.34), HP-MA (220.1_91.1_9.88), HMP-MA (234.1_105.1_13.56) sowie CME-MA (248.1_119.1_14.55) sind entlang einer Diagonalen durch den ersten Quadranten angeordnet und in roter Farbe hervorgehoben.

3.12 Gesamtmenge ausgeschiedener Merkaptursäuren

Die Tatsache, dass die Liste der potentiellen Biomarker nur Variablen mit positiven Werten für p und $p(\text{corr})$ enthielt (positive Korrelation der Marker mit dem Effekt einer Tabakrauchexposition), gab Anlass, die Gesamtmenge ausgeschiedener Merkaptursäuren genauer zu untersuchen. Hierzu wurde für jede einzelne Probe die Summe aller in der Datenmatrix vertretenen Variablen (Merkaptursäuren) gebildet und anschließend gruppenweise gegenübergestellt. Die beiden Proben (ein Nichtraucher und ein starker Raucher), die zuvor schon durch untypisches chromatographisches Verhalten aufgefallen waren, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Für die Gruppe der Nichtraucher ergab sich so eine mittlere Summe (Mittelwert \pm Standardabweichung) von 358930 ± 127243 Flächeneinheiten (FE), für die Gruppe der schwachen bzw. starken Raucher entsprechend 487114 ± 290354 FE und 551559 ± 236268 FE. Die Mediane ergaben sich zu 336506 FE, 429960 FE und 478012 FE. Der t-Test Nichtraucher vs. schwache Raucher lieferte ein $p < 0.05$, der t-Test Nichtraucher vs. starke Raucher ein $p < 0.01$. **Abb. 70 A** fasst die Einzelergebnisse in einem *dot plot* zusammen. Eine direkte Korrelation zwischen der Menge gerauchter Zigaretten und der Gesamtmenge ausgeschiedener Merkaptursäuren ließ sich allerdings nicht herstellen. So betrug das Bestimmtheitsmaß (R^2) für eine Ausgleichsgerade durch alle Punkte lediglich 0.077 (**Abb. 70 B**).

Zahlreiche Studien zeigen, dass Zigarettenrauch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer GSH-Depletion führt. Diese Beobachtung wird dabei weniger mit einer Oxidation von GSH zu GSSG als mit einer gesteigerten Bildung von GSH-Addukten in Zusammenhang gebracht [303-305]. Bei der gruppenweisen Betrachtung der gesamten MA-Level zeichnete sich ein ähnlicher Trend ab. So lag in der Gruppe der schwachen und starken Raucher die Gesamtmenge ausgeschiedener Merkaptursäuren deutlich höher als in dem Kontrollkollektiv der Nichtraucher. Allerdings ließ sich zwischen der Anzahl täglich gerauchter Zigaretten und den entsprechenden MA-Leveln kein direkter Zusammenhang herstellen. Diese Beobachtung erschien zunächst überraschend, ist aber konsistent mit Literaturdaten, die zwischen Rauchern und Nichtrauchern zweifache Unterschiede in der täglichen Ausscheidung von Thioethern, aber keine entsprechende Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Menge ausgeschiedener Thioether und der Exposition gegenüber Zigarettenrauch (Anzahl Zigaretten/Tag) feststellen konnten [301]. Dabei lag die inter-individuelle Streuung der Thioetherexkretion mit vier- bis sechzehnfachen Unterschieden für Raucher und Nichtraucher in derselben Größenordnung wie die Streuung der gesamten Merkaptursäureausscheidung (fünf- bis elffache individuelle Streuung in den drei Gruppen). Zu einem ganz ähnlichen Bild kommt SINUES ET AL. Für die Gruppe der moderaten Raucher (10–20 Zigaretten/Tag) lagen die Thioetherkonzentrationen um den Faktor 1.5, für die Gruppe der

starken Raucher (> 20 Zigaretten/Tag) um den Faktor 2.1 höher als in der entsprechenden Nichtrauchergruppe [287]. Via Merkaptursäurescreening wurden analog Werte von 1.4 und 1.5 erhalten. Allerdings erfolgte bei der durchgeführten Metabonomicsstudie bereits ab 10 Zigaretten täglich eine Zuordnung zur Gruppe der starken Raucher. Da nur zwei der starken Raucher einen Konsum von > 25 Zigaretten/Tag angaben, zeigten die Werte von 1.4 bzw. 1.5 eine exakte Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Thioetherkonzentrationen.

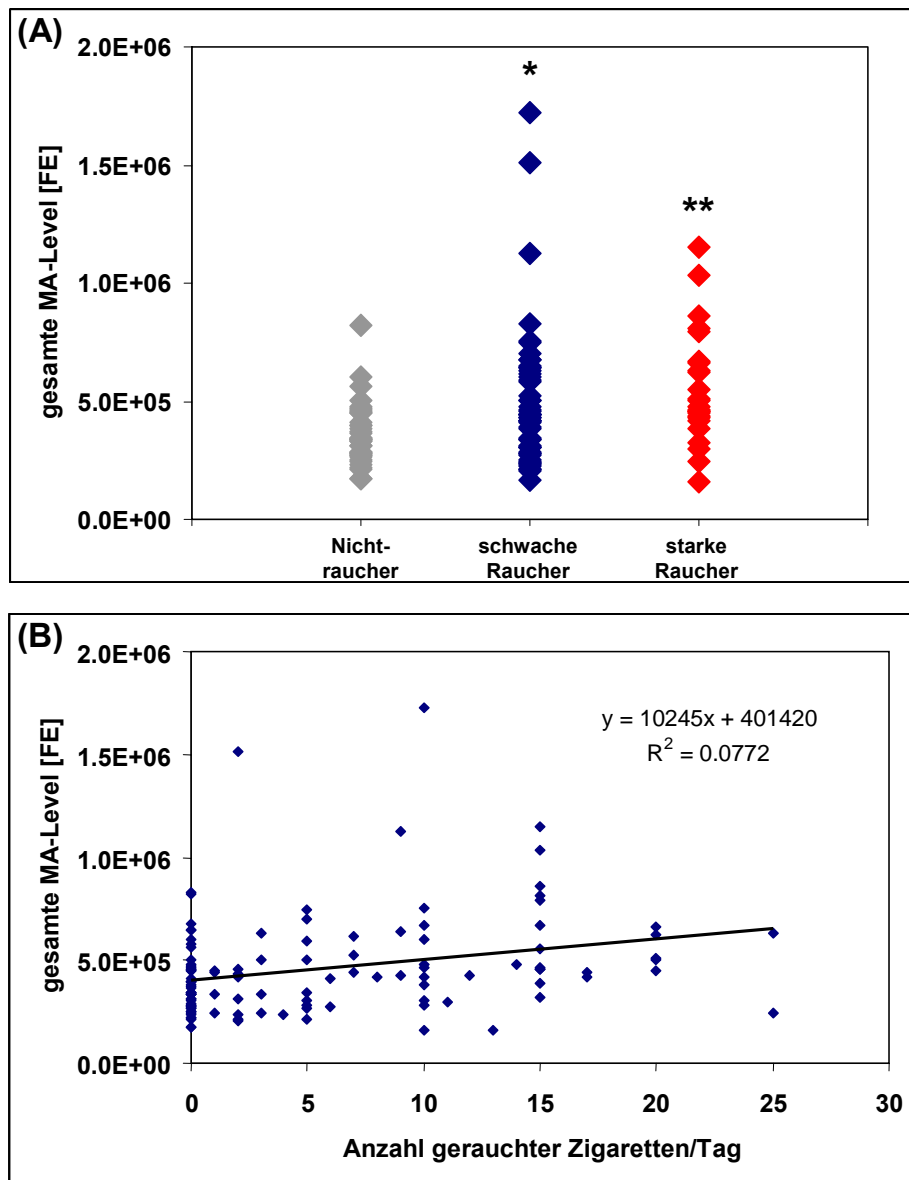


Abb. 70: Durchschnittliche Gesamtmenge ausgeschiedener Merkaptursäuren, berechnet aus der Summe aller mit der *MarkerView* Software erfassten Variablen einer Probe in Abhängigkeit vom Rauchverhalten: (A) gruppenabhängige Einzelwerte in Form eines *dot plots*, (B) Korrelation zwischen der Anzahl gerauchter Zigaretten/Tag und den MA-Leveln im Urin der Probanden; Schlüssel: * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$ im t-Test gegen die Gruppe der Nichtraucher; FE, mittels *MarkerView* Software registrierte Flächeneinheiten aus der 122 Proben x 491 Variablen umfassenden Datenmatrix.

Die vermehrte Ausscheidung von Mercaptursäuren mit dem Urin lieferte einen Hinweis darauf, dass Raucher einer erhöhten Belastung mit exogenen Elektrophilen ausgesetzt sind. Studien zeigten jedoch, dass die Detoxifizierung von elektrophilen und potentiell kanzerogenen Intermediaten wie dem Phenanthren-9,10-Epoxid vom Genotyp der polymorphen Glutathion-S-Transferase M1 (*GST M1*) abhängig ist. So wurde in Rauchern, die den Genotyp *GST M1 null* aufwiesen das Konjugationsprodukt Phenanthren-Mercaptursäure zum einen weniger häufig und zum anderen in geringeren Konzentrationen nachgewiesen [306]. Aus dieser phänotypischen Beobachtung leiteten die Autoren ein erhöhtes Krebsrisiko für *GST null* Individuen ab. Durch das entwickelte Mercaptursäurescreening lassen sich in einer Urinprobe gleichzeitig die Spiegel mehrerer hundert Mercaptursäuren bestimmen. Ein solcher Ansatz bietet ein viel komplexeres Bild als eine Phänotypisierung anhand lediglich einer Substanz. Durch Vergleich individueller Mercaptursäureprofile ließe sich so insbesondere für die Gruppe der Raucher ein potentielles Krebsrisiko ableiten. Allerdings erfordert dies eine sehr breite und fundierte Datengrundlage, die in der durchgeführten Studie aufgrund mehrerer im Anschluss ausführlich diskutierter Faktoren nicht gegeben war.

4 Zusammenfassende Diskussion

Mittels multivariater Datenanalyse konnten für Nichtraucher, schwache bzw. starke Raucher Unterschiede in den Mercaptursäuremustern ermittelt werden. Dabei zeichnete sich trotz großer inter-individueller Unterschiede in der Ausscheidung eine deutliche Dosisabhängigkeit der Signaturen ab. Auf der Grundlage von OPLS-DA Modellen und *S-plots* konnten insbesondere für die Gruppe der starken Raucher zahlreiche potentielle Marker selektiert werden, von denen im Anschluss fünf identifiziert werden konnten. Acrylamid-MA, 2-Cyanoethyl-MA, 3-Hydroxypropyl-MA, 3-Hydroxy-1-methylpropyl-MA sowie 2-Carboxy-1-methylethyl-MA sind bekannte Expositionsmarker für Tabakrauch. Die Identifizierung dieser Metaboliten als Biomarker für die Gruppe der Raucher kann als weiterer Beweis für die Leistungsfähigkeit des entwickelten mercaptursäurebasierten Metabonomicsansatzes angesehen werden. Durch klassische Evaluierung der identifizierten Marker konnten ferner Ergebnisse erhalten werden, die eine hohe Übereinstimmung mit Literaturdaten zeigten. Allerdings bestand durch den semiquantitativen Charakter der Auswertung eine gewisse Gefahr für eine Überinterpretation der Ergebnisse. So standen nur für AA-MA und HP-MA geeignete isotoopenmarkierte Standards zur Verfügung. CE-MA (RT 11.3 min), HMP-MA (RT 13.6 min) und CME-MA (RT 14.6 min) wiesen dagegen Retentionszeiten auf, die nicht unmittelbar durch den internen Standard HP-MA (RT 9.9 min)

erfasst wurden. Gegenläufige Effekte bezüglich der Ionensuppression wie in [190] beschrieben sowie Probleme bezüglich der Chromatographie- und Trappingeffizienz, wie in Projekt 4 diskutiert, konnten daher nicht ausgeschlossen werden.

Die fünf identifizierten Marker konnten sowohl in den beiden Rauchergruppen als auch in der Gruppe der Nichtraucher nachgewiesen werden. Folglich handelte es sich nicht um qualitative Biomarker (Exposition ja/nein), sondern um dosisabhängige Expositionsmarker. Die hohen Hintergrundlevel insbesondere von Acrylamid-MA und 3-Hydroxypropyl-MA erschweren allerdings die Etablierung als spezifische Expositionsmarker, könnten aber, am besten in Kombination, einen ersten Anhaltspunkt über das Ausmaß einer individuellen Belastung geben. Dies gilt ferner für die Gesamtmenge ausgeschiedener Mercaptursäuren, für die zwar gruppenspezifische Unterschiede, aber keine direkte Abhängigkeit von der Anzahl gerauchter Zigaretten ermittelt werden konnte. In jedem Fall muss sich an die Identifizierung der Marker eine umfassende Validierung der Analytik unter Einbeziehung von substanzbezogenen internen Standards anschließen. Eine Grundvoraussetzung für die Etablierung eines Biomonitorings ist hierbei, dass die Methoden die allgemein an quantitative Analysen gestellten Sensitivitäts- und Spezifitätskriterien erfüllen [139, 212].

Die auffällig hohen Standardabweichungen in allen drei Gruppen sowie die geringe Prädiktivität des OPLS-DA Niedrigdosismodells (schwache Raucher vs. Nichtraucher) waren wohl insbesondere auf die bereits diskutierte Problematik der Dosisabschätzung (tatsächlich gerauchte Zigaretten pro Tag, Zeiträume zwischen zwei Zigaretten, Tabakmarke, Rauchverhalten, Exposition gegenüber Passivrauch) zurückzuführen. Gerade für die Gruppe der schwachen Raucher wurde die Exposition wahrscheinlich vielfach falsch bewertet, denn Gelegenheitsraucher haben anders als starke Raucher häufig eine bevorzugte Zeit, in der sie rauchen. So kann ein Gelegenheitsraucher, der angibt fünf Zigaretten pro Tag zu rauchen, diese aber beispielsweise bevorzugt am Abend oder in der Mittagspause raucht, durchaus auf eine akute Exposition kommen, die der eines starken Rauchers entspricht. Darüber hinaus ist die Korrelation von Biomarkern mit Anamnesedaten aus Fragebögen oft mit einer sehr hohen Ungenauigkeit verbunden, die in erster Linie auf das fehlende Erinnerungsvermögen der Probanden zurückzuführen ist [307]. Es ist daher zu erwarten, dass durch Korrelation der Mercaptursäureprofile mit einem kontinuierlichen und objektiv messbaren Maß für eine Tabakrauchexposition zum einen die Qualität (Prädiktivität) der Modelle verbessert und zum anderen die Standardabweichungen der Markerlevel deutlich reduziert werden können. Mit Cotinin, einem Metaboliten des Nikotins, steht beispielsweise ein solcher dosisabhängiger Marker zur Verfügung. Die Messung kann dabei nicht-invasiv in Urin oder Speichel erfolgen. Die Korrelation von multivariaten Datensätzen wie

den Merkaptursäuremustern von Rauchern und Nichtrauchern (**X**-Matrix) mit einer kontinuierlichen Variablen wie dem Cotiningehalt oder entsprechenden Nicotinäquivalenten (**Y**-Matrix) kann beispielsweise mittels einer klassischen *partial least squares* Analyse (PLS) erfolgen. Ein valides Modell könnte darüber hinaus durch eine verbesserte Korrelation der **X**-Matrix mit dem Effekt (dosisabhängige Exposition gegenüber Tabakrauch) die Aussicht im Hinblick auf die Identifizierung spezifischer Biomarker erhöhen. Aus dem OPLS-DA Hochdosismodell mit seiner diskreten Klassenzuweisung (Nichtraucher = Klasse 1, starke Raucher = Klasse 2) wurden nur 27 potentielle Marker extrahiert, von denen lediglich 22.2 % ein $p(\text{corr}) > 0.7$ aufwiesen. Mit Ausnahme der HMP-MA wiesen alle Variablen der identifizierten Biomarker ein $p(\text{corr}) < 0.7$ auf. Es ist zu erwarten, dass der Anteil an potentiellen Markern durch eine PLS Analyse deutlich gesteigert werden kann. Ferner wurden auf der Grundlage des Niedrigdosismodells (Nichtraucher vs. schwache Raucher) nur vier potentielle Marker selektiert. Mit $p(\text{corr})$ -Werten von 0.53 – 0.67 zeigten sie eine eher geringe Korrelation mit dem untersuchten Effekt. Ziel sollte es daher sein, die Methode soweit zu optimieren, dass zukünftig auch eine Exposition gegenüber Passivrauch erfasst und mit den ausgeschiedenen Merkaptursäuren korreliert werden kann. Vor dem Hintergrund tabakrauchbedingter Erkrankungen könnten sich aus den Ergebnissen in Zukunft ein Risikokollektiv sowie persönliche Suszeptibilitätsfaktoren ableiten lassen. Des Weiteren könnte die potentielle Rolle von oxidativem Stress in der Ätiologie evaluiert werden. Interessant wird ferner die Schwelle sein, ab der ein Raucher bzw. ein Passivraucher eindeutig als solcher identifiziert werden kann. Dies könnte im Hinblick auf ein Biomonitoring im Kontext des Nichtraucherschutzes relevant werden. Auf der Messung spezifischer Marker basierend könnte dann insbesondere für Passivraucher ein Risikopotential abgeleitet werden.

DISKUSSION UND AUSBLICK

Wie so oft haben Unzulänglichkeiten einer Technik zur Entwicklung eines neuen Verfahrens geführt, das darauf abzielt, die Nachteile des Vorreiters zu kompensieren. Auf diesem Weg entstand auch die *Omics*-Kaskade *Genomics* → *Transcriptomics* → *Proteomics* → *Metabonomics*, an deren vorläufigem Ende der Metabonomicsansatz steht (**Abb. 71**). Im Rahmen der Untersuchung komplexer physiologischer sowie pathologischer Einflüsse auf einen Gesamtorganismus gelangte man sehr schnell zu der Erkenntnis, dass einer *top-down*-Strategie ausgehend vom Phänotyp hin zum Genotyp wohl die größten Erfolgsaussichten zugeschrieben werden können [16]. Dieses Konzept hat schließlich zur Definition des Metabotyps und parallel dazu zur Entwicklung von Metabonomics geführt [308]. Nach einer erfolgreichen Grundsteinlegung im Tiermodell gab es unmittelbare Bestrebungen, Metabonomics auch auf Fragestellungen zu übertragen, die den Menschen im Fokus haben. Erste Arbeiten auf diesem Gebiet haben allerdings gezeigt, dass hierzu sowohl methodisch als auch konzeptionell neue Wege beschritten werden müssen.

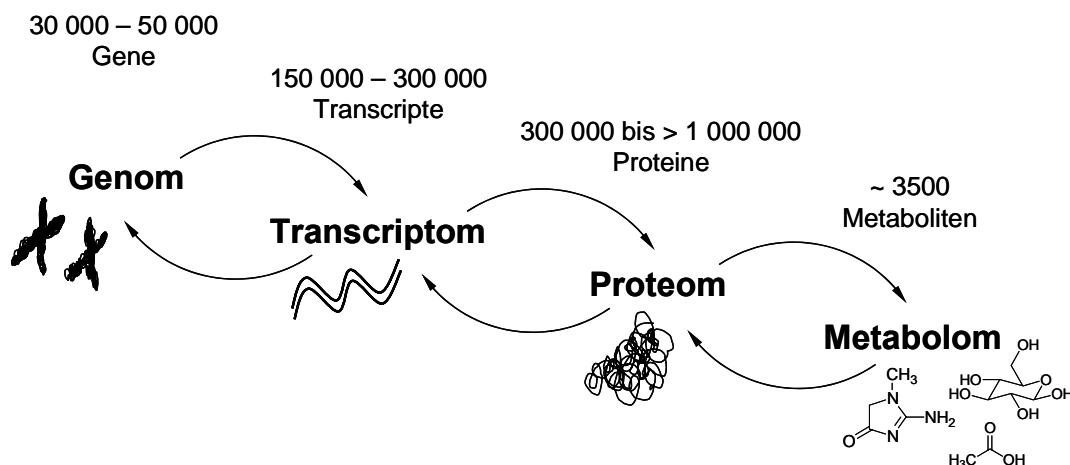


Abb. 71: Die *Omics*-Kaskade, die ausgehend von Genomics zur Entwicklung von Transcriptomics und Proteomics geführt hat. Metabonomics steht am vorläufigen Ende der Kette und basiert auf der simultanen Analyse von circa 3500 niedermolekularen Metaboliten in biologischen Proben wie Urin oder Blut (nach LAY ET AL. 2006 [170]).

Die LC-MS-Technik ist dem „Citratometer“ NMR [16] hinsichtlich der Sensitivität, mit der Metaboliten in biologischen Proben detektiert werden können, deutlich überlegen. Neben reiner Mustererkennung können mit LC-MS-basiertem Metabonomics zusätzlich Strategien zur Identifizierung spezifischer und sensitiver Biomarker für diverse biologische Effekte verfolgt werden. Von großem Vorteil ist hierbei, dass die mit Metabonomics identifizierten Biomarker im Gegensatz zu Protein- oder Transcriptmarkern mit hoher Wahrscheinlichkeit über Speziesgrenzen

hinaus angewendet werden können, da der Stoffwechsel unabhängig von der Spezies zum Großteil auf denselben biochemischen Reaktionen basiert [309].

Vor diesem Hintergrund war es die Intention der vorliegenden Arbeit, einen LC-MS-basierten, humanen Metabonomicsansatz zu entwickeln, mit dem es möglich sein sollte, durch ein neues Konzept für das Metabolitenscreening sowie eine entsprechende bioanalytische Strategie, potentielle Biomarker für diverse toxikologische und medizinische Endpunkte zu identifizieren.

1 PROJEKT 1: Entwicklung einer generischen merkaptursäure-spezifischen LC-MS-Methode

Trotz zahlreicher Bestrebungen, das Metabolitenscreening via LC-MS durch eine verbesserte Trennleistung der analytischen Säulen, eine verminderte Ionensuppression und/oder durch neue Säulenmaterialien (UPLC [241], Kapillarsäulen [310], HILIC [232, 233]) robuster und leistungsfähiger zu machen, hat die nicht zielgerichtete Analytik – die Basis jeder Metabonomicsstudie – noch immer den Ruf eines „*quick and dirty*“-Verfahrens [65]. Darüber hinaus besteht bei den klassischen *full scan*/TOF-Ansätzen häufig die Gefahr, am Ende, wenn es um die biologische Interpretation der Resultate und insbesondere um die Selektion der relevanten Marker geht, „den Wald vor lauter Bäumen“ nicht mehr zu sehen [311]. Durch Fokussierung auf die Substanzklasse der Merkaptursäuren konnte sowohl dem allgemeinen Problem einer unzulänglichen Screeninganalytik als auch der unüberschaubaren Komplexität biologischer Metabolitenprofile Rechnung getragen werden.

Merkaptursäuren zeigen aufgrund ihres gemeinsamen Strukturelements, der *N*-Acetyl-L-Cystein-Einheit, einen konstanten Neutralteilchenverlust, der zum selektiven, aber dennoch ungerichteten *metabolic profiling* der Substanzklasse herangezogen werden kann (CNL- und thMRM-Scan siehe Projekt 1 und 3) [196, 197]. Wie anhand von authentischen Standards gezeigt werden konnte, kann mit der entwickelten Screeningmethode ein breites Spektrum an exogenen und endogenen Merkaptursäuren analysiert werden. Ohne vorherige Probenvorbereitung gelang dies über einen weiten Konzentrationsbereich sowohl in nativem Ratten- als auch Humanurin. Im Hinblick auf Wiederfindungsraten, Reproduzierbarkeit und Artefaktbildung wird diese Vorgehensweise in der Literatur als Goldstandard angesehen [312]. Die Nachweisgrenze lag mit 0.3 – 4.2 pmol o. c. für die Humanurinmatrix und einer *intra-day*-Präzision von 13.5 ± 7.2 % für zufällig ausgewählte Metaboliten in einem für quantitative Analysen tolerierbaren Bereich [212] und untermauerte die Leistungsfähigkeit der prinzipiell semiquantitativen Screeningmethode. Somit waren optimale analytische Voraussetzungen für die Detektion von unbekanntem exogenen

und endogenen Mercaptursäuren in biologischen Proben geschaffen. Durch Kopplung mit einer Säulenschaltung konnte die Nachweisgrenze weiter gesenkt und hierdurch ein noch breiteres Spektrum potentieller Biomarker erfasst werden. LC-MS(-MS)-Methoden zur *on-line*-Festphasenextraktion von Metaboliten in komplexen Matrices wie Urin oder Plasma sind in der Regel auf wenige Analyten wie Arzneistoffe oder deren Phase-II-Metaboliten beschränkt [313]. Für die Analytik von Mercaptursäuren sind nur vereinzelt Applikationen mit *on-line*-Anreicherung beschrieben. Diese fokussieren sich aber ebenfalls auf einzelne bis wenige Analyten [195, 209]. Der Einsatz eines Hybridmassenspektrometers mit einer linearen Ionenfalle machte es ferner möglich, durch *information dependent acquisition* in einem einzigen analytischen Lauf mehrere Experimente zu kombinieren. So konnte der merkaptursäurespezifische *survey scan* sehr effektiv mit *enhanced* Produktionenspektren gekoppelt werden. Durch Variation der Kollisionsenergie wurden so unterschiedliche Fragmentierungsmuster erhalten, die im Folgenden der Identifizierung sowie der Bestätigung der chemischen Strukturen dienten. Mit der neuesten Generation Hybridmassenspektrometer ist es sogar möglich, für die durch *collision induced dissociation* generierten und in der linearen Ionenfalle gesammelten Molekülfragmente eine exakte Masse zu bestimmen [88, 314]. Für die Identifizierung unbekannter Metaboliten birgt diese Technik großes Potential, denn auf dem Weg hin zu neuen Biomarkern dient *pattern recognition* nur als Mittel zum Zweck. An die Selektion der potentiellen Marker via Metabonomics muss sich eine Strukturaufklärung anschließen, um die biologische Relevanz erfassen und zugrunde liegende Mechanismen ableiten zu können [219].

Eine Übertragung des Screeningansatzes auf analoge Fragestellungen und ähnliche Substanzklassen wie Glucuronide oder Sulfate, beispielsweise im Bereich der Toxikokinetik, ist leicht möglich. So wurde kürzlich eine *metabolic profiling*-Methode beschrieben, mit der es gelang, anhand der Spiegel von 23 endogenen Steroidglucuroniden im Urin der Probanden geschlechtsspezifische Unterschiede zu bestimmen [188]. Hierbei handelte es sich allerdings um eine zielgerichtete (*targeted*) Methode, bei der zuvor eine Metabolitenauswahl erfolgte. Der MRM *survey scan* basierte auf dem Glucuronsäure-Strukturelement, für das nach *collision induced dissociation* ein charakteristisches Fragment resultiert. Um DNA-Schäden (DNA-Addukte) in humanem Lungengewebe nachzuweisen berichtete die Literatur ferner von einer dem Mercaptursäurescreening analogen Strategie. Dem ungerichteten Adductomicsansatz lag ein CNL-Scan zugrunde, der auf der gemeinsamen 2'-Desoxyribose-Einheit (CNL 116 Da) der DNA-Addukte basierte [191].

Allerdings geht der unspezifische Charakter all dieser Screeningansätze häufig zu Lasten der Sensitivität. Ziel der Methodenentwicklung war indes die ungerichtete Erfassung eines breiten

Spektrums bekannter und unbekannter Merkaptursäuren als Endprodukte der Detoxifizierung exogener sowie endogener reaktiver Intermediate (Elektrophile). Die Sensitivität der Methode spielte vor diesem Hintergrund eine wichtige, wenn auch der Universalität untergeordnete Rolle und konnte insbesondere durch die *on-line*-Anreicherung der Merkaptursäuren mittels Säulenschaltung verbessert werden. Trotz dieses guten Kompromisses ist es erforderlich, die selektierten potentiellen Marker nachfolgend mit klassischen spezifischen sowie sensitiven Verfahren wie dem *multiple reaction monitoring* zu verifizieren und die entsprechenden Methoden sorgfältig zu validieren. Dieser letzte Schritt wird auch als „*slow lane*“ bezeichnet und schließt sich an die „*fast lane*“, d. h. an die Etablierung von Modellen zur Klassifizierung von Gruppen, die eine ja/nein-Entscheidung (z. B. gesund/krank) erlauben, an [102]. Nur auf diesem Weg kann es gelingen, neue Biomarker, beispielsweise für ein humanes Krankheits- bzw. Biomonitoring, zu etablieren.

2 Strategien zur softwaregesteuerten Datenprozessierung

LC-MS-Daten, wie sie durch das Merkaptursäurescreening generiert wurden, erfordern eine definierte Form, um sie einer multivariaten Datenanalyse zuführen zu können. Dekonvolutionsprogramme wie das verwendete *Metabolomics Export Script* bzw. *MarkerView* entfalten die dreidimensionale Struktur der chromatographischen und massenspektrometrischen Rohdaten und konvertieren diese unter Verwendung diverser Parameter und Filter (Alignment) in eine Datenmatrix. Diese Datenmatrix besteht aus den Beobachtungen (Proben), den Variablen (Peaks bzw. Metaboliten) sowie den entsprechenden Signalflächen bzw. -intensitäten und bildet die Grundlage für alle chemometrischen Verfahren. Folglich steht und fällt das gesamte Metabonomicsprojekt mit der Qualität dieser Datenmatrix. Denn nur wenn sichergestellt ist, dass derselbe Analyt in zwei unterschiedlichen Proben als solcher erkannt wird, ist ein Vergleich von Metabolitenprofilen möglich. Des Weiteren müssen zwei verschiedene Metaboliten auch durch zwei unterschiedliche Variablen in der Datenmatrix repräsentiert werden [213].

Da die Algorithmen zur Dekonvolution und Integration von massenspektrometrischen Daten fast ausnahmslos nicht zugänglich sind, gestaltete sich das korrekte Alignment anfänglich als schwierig. Programme wie XCMS [202], die Rohdaten unabhängig vom verwendeten Massenspektrometer transformieren können, befanden sich zum Zeitpunkt des Projektstarts noch in der Entwicklung, so dass die Prozessierung mit der vom Gerätehersteller angebotenen Software erfolgen musste. Es stellte sich heraus, dass einzelne Parameter wie die Retentionszeitkorrektur die Qualität der Datenmatrices entscheidend beeinflussten. Nach eingehender Optimierung aller

Parameter und Filter anhand der Merkmalsstandards konnten mittels *Metabolomics Export Script* die Rohdaten gut, wenn auch nicht fehlerfrei abgebildet werden. Trotz dieser Problematik wurde der Dekonvolution der Vorzug vor der *binning*-Technik gegeben. *Binning* findet insbesondere für NMR-Daten Anwendung. Die Spektren werden hierzu zunächst in Fenster (*bins* oder *buckets*) von wenigen ppm (meist 0.04 ppm) unterteilt und alle Signale eines *bin* anschließend integriert [179]. Für LC-MS-Daten resultiert aus diesem Verfahren allerdings eine wenig spezifische Datengrundlage, da Signale selbst nach einer vorausgegangenen chromatographischen Trennung vielfach übereinander liegen und folglich nicht als separate Metaboliten registriert werden. Durch die weiterentwickelte *MarkerView* Software und insbesondere durch Konversion des CNL- in einen thMRM-Scan konnten die Schwächen des *Metabolomics Export Scripts* großteils kompensiert werden. Um abzuschätzen, inwieweit die gewählten Extraktionsparameter die Rohdaten korrekt wiedergaben, dienten für die realen Proben aus den *in vivo* Studien interne Merkmalsstandards als Qualitätskontrolle. Fiel das Alignment der internen Standards zufriedenstellend aus, wurde daraus geschlossen, dass auch unbekannte exogene und endogene Merkmalsstandards korrekt prozessiert wurden. Auf diese Weise konnte die Datengrundlage sukzessive verbessert werden. Die Vorgehensweise bei der Datenprozessierung in den einzelnen Projekten entsprach hierbei den Vorgaben der *Metabolomics Standards Initiative* (MSI) [244]. Das Konsortium hat sich 2005 zum Ziel gesetzt, einheitliche Standards für die Durchführung und Auswertung von Metabolomicsstudien zu etablieren. Aufgrund der gängigen Praxis auf dem Gebiet des Metabolomics, wonach wesentliche Schritte der Datenprozessierung in Publikationen nicht oder nur unzureichend dokumentiert werden, richtete die MSI eine eigene Arbeitsgruppe ein, die sich ausschließlich mit Strategien zur optimalen Verarbeitung und Dokumentation von Metabolomicsdaten beschäftigt. Integrativer Bestandteil bilden hierbei die Themen Datentransformation (Dekonvolution) und Alignment massenspektrometrischer Daten [315]. Eine ähnliche Initiative, die *Standard Metabolic Reporting Structure* Gruppe [247], ging aus dem COMET-Projekt hervor und zielt ebenso wie das *Architecture for Metabolomics* Konsortium [245, 246] auf die Etablierung einheitlicher und umfassender Normen für Metabolomicsprojekte. Denn es herrscht ein allgemeiner Konsens darüber, dass eine biologische Interpretation der Ergebnisse sowie ein Wissens- und Methodenaustausch nur dann erfolgen kann, wenn bei der Planung, Durchführung und Auswertung von Metabolomicsstudien definierte Standards eingehalten werden. Die ausführliche Dokumentation bei der Beschreibung der durchgeführten Projekte sollte sowohl eine umfassende Evaluation der Ergebnisse als auch eine Wiederholung der Studien ermöglichen. Des Weiteren sollten die gewählten Strategien leicht auf verwandte Fragestellungen übertragen werden können.

3 Multivariate Datenanalysen

Klassische Strategien zur Datenanalyse umfassen beispielsweise den COST- (*consider one separate variable at a time*), OVAT- (*one variable at a time*) bzw. *eye-balling*-Ansatz [162]. Im Bereich der Diagnostik sind die bekanntesten Vertreter dieses Ansatzes der Cholesterin- bzw. Glucosewert im Blut [46, 47]. Eine Erweiterung stellen chemometrische Verfahren dar, die in einer Probe mehrere Variablen bestimmen, wobei die Anzahl der Proben die der Variablen deutlich übersteigt. Die resultierenden Datenmatrices werden aufgrund ihrer Struktur als „*long and lean*“ bezeichnet [162]. Demgegenüber stehen die multivariaten Datenanalysen (MVDA), die auf Matrices der Form „*short and fat*“ basieren, d. h. die Anzahl Variablen übersteigt die Anzahl der Proben um ein Vielfaches. Ein großer Vorteil dieser neuen Art der Datenanalyse ist die umfassende Charakterisierung einer biologischen Probe durch die Vielzahl der gemessenen Variablen. Gemeinsames Grundprinzip aller MVDA-Verfahren ist dabei die Reduktion der Dimensionalität unter Beibehaltung eines Großteils der ursprünglichen Information. Dies gelingt sogar bei unvollständigen bzw. fehlerbehafteten Daten sowie bei Daten, die ein hohes Hintergrundrauschen beinhalten [162]. Alternative Techniken wie der t-Test oder ANOVA wären für einen Vergleich der Variablen ebenfalls denkbar, sind aber gegenüber zufälligen Korrelationen sehr anfällig. Ein Satz exakt gleicher Proben würde bei 1000 Variablen und einem Signifikanzniveau von 0.95, allein 50 „statistische Biomarker“ (falsch positive Ergebnisse) liefern. Multiple Teststrategien sind zwar in der Literatur beschrieben, finden auf dem Gebiet des Metabonomics aber nur vereinzelt Anwendung [316, 317].

Die Verfahren zur MVDA lassen sich prinzipiell in zwei Kategorien – *unsupervised*- und *supervised*-Techniken – einteilen. Zu den *unsupervised*-Methoden zählt die Hauptkomponentenanalyse (PCA), zu den *supervised*-Methoden die *partial least squares*-Diskriminanzanalyse (PLS-DA) bzw. die orthogonale *partial least squares*-Diskriminanzanalyse (OPLS-DA). Da PCA *score* und *loading plots* das Erscheinungsbild zahlreicher Publikationen prägen, wurde die PCA auch als das „chemometrische Arbeitspferd“ des Metabonomics bezeichnet [166, 318]. Als *unsupervised*-Technik fließt keine Information bezüglich einer Gruppenzugehörigkeit in die PCA Modelle mit ein, sie dienen daher häufig dazu, einen ersten Überblick über den Datensatz zu bekommen. Zeit- und dosisabhängige Trends von Metabolitenprofilen können aber meist nur für sehr homogene Datensätze, beispielsweise aus Tierstudien, erhalten werden. Die große interindividuelle Variabilität humaner Profile erfordert vielfach die Anwendung von *supervised*-Verfahren wie der PLS-DA oder der OPLS-DA, die eine Diskriminierung der vorgegebenen Gruppen forcieren und es demzufolge ermöglichen, auch kleine Unterschiede zwischen Gruppen herauszuarbeiten. Denn insbesondere für die PCA gilt, dass Clusterbildungen im *score plot* nicht

zwangsläufig mit dem untersuchten Effekt assoziiert sein müssen. Diese vermeintliche Schwäche der PCA kann jedoch dazu ausgenutzt werden, Ausreißer oder systematische Verschiebungen (Bias) zu erkennen [172, 216]. So wurde im Laufe der Arbeit mittels PCA ein Überblick über die Datenstruktur gewonnen (vgl. Projekt 2, 4 und 5), Ausreißer detektiert (vgl. Projekt 3, 4 und 5) sowie systematische Trends identifiziert (Anordnung der QC-Proben nach der Messreihenfolge, Unterschiede zwischen zwei unterschiedlich skalierten Datensätzen, Identifizierung zweier Subpopulationen in einem Kontrollrattenkollektiv). PLS-DA Modelle dienten der Gegenüberstellung von Kontroll- und Dosisgruppen (vgl. Projekt 2) und von biologischen Einflussgrößen (Einfluss von Geschlecht und Tageszeit, vgl. Projekt 3). Der Einfluss der Confounder Geschlecht und Tageszeit wurde weiterhin mittels OPLS-DA untersucht. Ferner basierte die Identifizierung der potentiellen (dosisabhängigen) Biomarker auf OPLS-DA Modellen, mit denen die unterschiedlichen Dosisgruppen gegenübergestellt wurden (vgl. Projekt 4 und 5). Trends, die unabhängig vom untersuchten Effekt waren, wurden schließlich anhand von *score plots* orthogonaler Komponenten evaluiert. So wurde aus den Modellen Kontroll- vs. Dosisgruppe der Acetaminophen-Studie ein geschlechtsspezifischer Einfluss auf das Merkaptursäureprofil abgeleitet. Dagegen konnte in der dreitägigen Kontrollstudie in den orthogonalen Komponenten der *am_pm* und *m_w* OPLS-DA Modelle kein Tagestrend festgestellt werden. Unterschiedliche Validierungsstrategien bestätigten die Robustheit der erstellten Modelle. Da PLS-DA Modelle zu einem *overfitting* neigen [208, 230], wurden die Modelle mit Hilfe von unabhängigen Testsets validiert (vgl. Projekt 2 und 3). OPLS-DA Modelle sind demgegenüber weit weniger anfällig, so dass die Validierung der Modelle auf der Grundlage der Modellcharakteristika R^2 und Q^2 erfolgte (vgl. Projekt 4 und 5). Bis auf eine Ausnahme (Niedrigdosismodell der Raucherstudie) erfüllten alle OPLS-DA Modelle die Kriterien, die allgemein an prädiktive Modelle gestellt werden [162]. Insbesondere das Skalierungsverfahren hatte einen wesentlichen Einfluss auf die multivariaten Modelle und beeinflusste ihre Aussagekraft entscheidend. So konnte eine Gegenüberstellung von zwei Modellen nur auf der Grundlage von Daten erfolgen, die zuvor einem *autoscaling*-Prozess unterworfen wurden (Merkaptursäurescreening vs. *full scan*/TOF-Ansatz in der Acetaminophen-Studie, originaler und prozessierter *one-batch*-Datensatz in der dreitägigen Kontrollstudie). Die Extraktion von potentiellen Biomarkern erforderte insbesondere dann, wenn die Selektion anhand von *S-plots* erfolgen sollte, das Vorliegen von *pareto*-skalierten Daten. Die Datenintegrität wurde ferner anhand von *line* und *column plots* überprüft. Um die Korrelation, d. h. den Beitrag einer Variablen zum untersuchten Effekt abzuschätzen, dienten *jack-knifed* Konfidenzintervalle [254] als Entscheidungskriterium.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Auswertung eines Metabonomicsdatensatzes eine ausgeprägt interaktive Vorgehensweise erfordert. So müssen die Daten zunächst evaluiert, die Modelle optimiert und anschließend validiert werden, bevor auf der Grundlage dieser Modelle Aussagen zu biologischen Effekten getroffen werden können. Um die biologische Information aus den Merkaptursäureprofilen möglichst umfassend extrahieren und interpretieren zu können, wurde in den bearbeiteten Projekten mit einer Vielzahl an Plots und Verfahren gearbeitet. Die dabei gewonnenen Erfahrungen sollten sich auf analoge Fragestellungen im Zusammenhang mit der Identifizierung neuer substanzbezogener Metaboliten, von potentiellen Markern für biologische Effekte sowie der Kombination von *different-batch*-Daten zu *one-batch*-Datensätzen ausweiten lassen. Die methodischen Grundlagen und die entwickelten MVDA-Strategien können hierbei als Leitfaden dienen.

4 PROJEKT 2: Humanstudie mit Acetaminophen-Exposition als *proof-of-concept*

Neben der Optimierung der Analytik konnte durch die Fokussierung auf die Expositions-, Effekt- und Suszeptibilitätsmarkerklasse der Merkaptursäuren [118, 136, 141] ein enger Bezug zu physiologischen und toxikologischen Effekten hergestellt werden. Der gewählte Ansatz eines Merkaptursäuremonitorings hat sich hierbei als äußerst vielseitig erwiesen. So gelang für die Modellstudie mit Acetaminophen sowohl im Hochdosis- als auch im Niedrigdosisbereich via Merkaptursäurescreening ein *proof-of-concept*. Der Vergleich mit einer klassischen *full scan*/TOF-Methode ergab, dass zwar mit beiden analytischen Techniken eine Diskriminierung der Kontroll- und Dosisgruppe erzielt werden konnte, aber nur mit dem Merkaptursäureansatz der „Biomarker“ für eine Exposition gegenüber Acetaminophen (AAP), die AAP-Merkaptursäure, eindeutig als Expositionsmarker identifiziert werden konnte. Zusätzlich konnte aus dem komplexen Merkaptursäureprofil der exponierten Gruppe das Sulfoxid der AAP-MA als Marker herausgefiltert werden. Hierbei handelt es sich um einen AAP-Metaboliten, der erst kürzlich in der Literatur beschrieben wurde, und das obwohl Acetaminophen zu den am besten charakterisierten Substanzen gehört, deren Metabolismus über Jahrzehnte ausgiebig untersucht wurde [121, 220, 237, 319]. Die Identifizierung dieses Metaboliten unterstrich die Sensitivität der Metabonomicstechnik und insbesondere des gewählten Merkaptursäureansatzes. Für die Exkretion der AAP-MA konnten des Weiteren geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt werden. Neben der biologischen Relevanz des Ergebnisses kann aus den Beobachtungen abgeleitet werden, dass via Merkaptursäurescreening in Kombination mit multivariaten

chemometrischen Verfahren nicht nur *pattern recognition* Ansätze und Strategien zur Identifizierung spezifischer Biomarker verfolgt werden können, sondern darüber hinaus auch mechanistische Einblicke (Aktivierung von AAP zum Elektrophil, geschlechtsspezifischer Metabolismus) gewonnen werden können.

Die Untersuchung von Mechanismen, die einem pathologischen bzw. physiologischen Effekt zugrunde liegen ist ein zentraler Aspekt des Metabonomics [1, 320]. So wurde mit dem Ziel, gemeinsame Wirkmechanismen toxischer Substanzen zu untersuchen, das COMET-Projekt initiiert [218]. In einer Gemeinschaftsinitiative wurden 150 tierexperimentelle Metabonomicsstudien mit Substanzen durchgeführt, die vorwiegend zur Ausprägung von Hepato- und Nephrotoxizität führen. Die im Rahmen des Projekts etablierte Profildatenbank soll in Zukunft dazu dienen, für unbekannte Verbindungen wie Arzneistoffkandidaten potentielle hepato- bzw. nephrotoxische Effekte in einem möglichst frühen Stadium der pharmazeutischen Entwicklung zu erkennen [21, 321]. Der ursprünglich NMR-basierte Ansatz wird gegenwärtig in einem Folgeprojekt (COMET 2) weitergeführt, in das ferner die LC-MS-Technik integriert wurde, um eine komplementäre und umfassendere Datengrundlage für die mechanistischen Untersuchungen zu schaffen [322].

Der multivariate Charakter der chemometrischen Verfahren kann mitunter zu unerwarteten Ergebnissen führen. So traten in der Modellstudie mit Acetaminophen unabhängig von einer Exposition geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Mercaptursäureausscheidung zutage. Da das Geschlecht einen starken Confounder darstellt, der das Metabolitenmuster in erheblichem Ausmaß beeinflusst, wird in klassischen Metabonomicsstudien häufig die Beobachtung gemacht, dass Männer und Frauen in den PCA oder PLS-DA Plots distinkte Cluster bilden [177, 232, 238]. Dass eine Diskriminierung auch aufgrund des Mercaptursäureprofils erfolgen kann, untermauert zusammen mit Prädiktionsraten von ~ 90 % für ein unabhängiges Testset erneut die Sensitivität und Robustheit der Technik. Ausgehend von dieser Modellstudie sollte es daher möglich sein, den gewählten *metabolic profiling*-Ansatz auf unbekannte biologische Fragestellungen, beispielsweise im Kontext einer personalisierten Ernährung, zu übertragen.

5 PROJEKT 3: Integrativer Metabonomicsansatz zur Evaluierung von Confoundern

Die Übertragung der Metabonomicstechnik auf den Menschen ist aufgrund der Variabilität und Flexibilität des menschlichen Organismus mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Im Gegensatz

zum Tiermodell nimmt beim Menschen in der Gleichung $Phänotyp = Genotyp + Umwelt + (Genotyp \times Umwelt)$ [46] der Faktor Umwelt einen nicht zu unterschätzenden Stellenwert ein, der, soll Metabonomics auf reale Fragestellungen im Kontext der Medizin und Ernährung angewendet werden, ebenso wie der Genotyp gründlich evaluiert werden muss. Denn erst wenn die Grenzen normaler biologischer Variabilität abgesteckt sind, kann dazu übergegangen werden, nach individuellen Suszeptibilitätsfaktoren zu suchen [240]. Erschwerend kommt weiterhin hinzu, dass Probanden in der Regel nicht als ihre eigene Kontrolle dienen können, Gruppen daher entsprechend groß gewählt werden müssen, um Effekte vor einem hohen biologischen Hintergrund untersuchen zu können [230]. Ein nicht zu unterschätzender Faktor, den es in diesem Zusammenhang zu beachten gilt, ist die *batch-to-batch*-Problematik. Nach wie vor stellt aufgrund des multivariaten Charakters die Fusion von Metabonomicsdaten, die in unterschiedlichen Messreihen oder mit unterschiedlichen analytischen Plattformen vermessen wurden, eine Herausforderung dar [208, 230, 248]. Vor diesem Hintergrund wurde eine Humanstudie angelegt, die insbesondere die Faktoren Genotyp, Umwelt und *batch-to-batch*-Problematik charakterisieren sollte. Das Studien- und Analysedesign ist in **Abb. 27** zusammengestellt und umfasste eine zweimalige Urinabgabe an drei aufeinanderfolgenden Tagen sowie die Messung der Proben in einer einzigen und in drei unabhängigen Messreihen. Das Merkaptursäurescreening ergab, dass sowohl das Geschlecht als auch die Tageszeit einen Effekt auf das Metabolitenprofil der Probanden ausübte. Hierbei nahm der Genotyp (Geschlecht) mehr Einfluss als die Umwelt (Tageszeit), wobei die Merkaptursäureprofile über den Studienverlauf nur geringfügig schwankten. Ein stabiler Hintergrund stellt eine wichtige Voraussetzung für die Übertragung des Ansatzes auf klinische Fragestellungen und die Identifizierung abnormer Metabolitenmuster dar.

Nicht ganz nachvollziehbar erscheint jedoch die Tatsache, dass seit 2002 mit steigender Tendenz LC-MS-Applikationen im Bereich des Metabonomics publiziert werden [266], jedoch erst Mitte 2006 eine integrative Strategie zur Implementierung von Quality Control Proben (QC-Proben) vorgestellt wurde [248]. Die *Metabolomics Standards Initiative* empfahl 2007 interne Standards und QC-Proben für Validierungszwecke in die Analysen mit einzubeziehen [323]. In der durchgeführten Humanstudie wurden sowohl interne Standards als auch QC-Proben in das Analysedesign integriert. Diese dienten der Evaluierung (i) der Datendekonvolution und des korrekten Peakalignments, (ii) der optimalen Skalierungsstrategie, (iii) der analytischen Reproduzierbarkeit sowie (iv) der *batch-to-batch*-Problematik. Die anhand der QC-Proben entwickelte Strategie zur Fusion von Daten aus unterschiedlichen Messreihen ließ sich auf die Proben der Studie ausweiten. So war es möglich, Daten aus drei unabhängigen *batches* zu einem *one-batch*-Datensatz zu kombinieren, so dass dieser anschließend kaum noch Unterschiede zum

ursprünglichen Datensatz aufwies. Der Ansatz sollte sich ferner auf die Fusion von Daten ausweiten lassen, die (i) mit komplementären Screeningplattformen (NMR, GC-MS, CE-MS, LC-MS etc.) generiert wurden, (ii) aus der Messung unterschiedlicher biologischer Proben (Urin, Plasma, Faeces, Gewebe etc.) stammten sowie (iii) auf Daten verschiedener *Omics*-Level (Genomics, Transcriptomics, Proteomics, Metabonomics etc.).

6 PROJEKT 4: Tierexperimentelle Modellstudie zur Untersuchung von oxidativem Stress *in vivo*

Die oxidative Schädigung körpereigener Strukturen wie Lipiden, Proteinen oder der DNA ist ein allgemein akzeptierter Mechanismus bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-, Atemwegs- und neurologischen Erkrankungen [256, 257]. Des Weiteren besteht eine enge Korrelation mit dem Alterungsprozess [258, 259]. Mit dem Ziel, potentielle Biomarker auf den Menschen zu übertragen, wurden in der Vergangenheit zahlreiche tierexperimentelle Modellsysteme zur Untersuchung von oxidativem Stress entwickelt [159, 160, 275]. Eine Modellsubstanz, für die umfassende Studien zur Identifizierung von Markern für oxidativen Stress angestellt wurden, ist Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) [260, 261]. CCl_4 wird in der Leber reduktiv via Cytochrom P 450 2E1 zu Radikalen metabolisiert, die sekundäre Reaktionskaskaden wie die Lipidperoxidation initiieren können. Toxische Dosen der Substanz führen zur Ausprägung einer Fettleber sowie zu Nekrosen, Fibrosen und Zirrhosen der Leber [264]. Die metabolische Aktivierung zu Radikalen, sowie das bereits zur Verfügung stehende umfangreiche Datenmaterial, ließen Tetrachlorkohlenstoff als Modellsubstanz zur Untersuchung charakteristischer Merkaptursäureprofile für oxidativen Stress als geeignet erscheinen.

Das Studienprotokoll ist in **Abb. 33** dargestellt und umfasste eine fünftägige *predose*-Phase gefolgt von einer ebenfalls fünftägigen *postdose*-Phase. Nach zehn Tagen *postdose* schloss sich eine weitere zweitägige *postdose*-Phase an, um den Erholungszustand der Tiere zu überprüfen. Die Kinetik der Merkaptursäuremuster ergab für die Hochdosisgruppe drei zeitabhängige Trajektorien. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die größten Effekte in Folge der Verabreichung von CCl_4 nach 12 – 36 h *postdose* auftraten. Die Ergebnisse deckten sich mit Literaturdaten, gemäß derer sich 12 – 48 h nach Gabe von CCl_4 die größten Effekte zeigten [269]. Für die Niedrigdosisgruppe konnten bezüglich der Merkaptursäureausscheidung zwar Unterschiede, jedoch keine Kinetik festgestellt werden. Von den aus dem Hochdosismodell selektierten potentiellen Markern wiesen 53 % eine über 70 %ige Korrelation mit dem Dosiseffekt auf. Für die Niedrigdosisgruppe reduzierte sich der Wert entsprechend auf 45 %. Die Identifizierung der

Merkaptursäure des 1,4-Dihydroxynonans (DHN-MA) als Expositionsmarker für oxidativen Stress war dabei konsistent mit dem Wirkmechanismus von CCl_4 . Die niedrigeren DHN-MA-Level in den Urinproben der Hochdosisgruppe könnten sich sowohl mit einer Glutathion-Depletion als auch mit einer Depletion von Reduktionsäquivalenten erklären lassen. Überraschend war allerdings, dass sich die Konzentration der Merkaptursäure des 4-Hydroxy-2-nonenals (HNE-MA) weder in der Hochdosis- noch in der Niedrigdosisgruppe nach CCl_4 -Exposition signifikant veränderte. Der Vergleich mit Substanzen wie Acetaminophen, Bromtrichlormethan oder Kaliumbromat, die *in vivo* in gleichem Maße wie CCl_4 zu Radikalen aktiviert werden, lieferte jedoch ein uneinheitliches Bild. Hinsichtlich der DHN-MA-Spiegel im Urin konnte nach Verabreichung dieser Substanzen an Versuchstiere sowohl eine Reduktion (Acetaminophen) als auch ein Anstieg (Bromtrichlormethan) an DHN-MA beobachtet werden. In der Studie mit Kaliumbromat wurden in den Urinproben der behandelten Tiere, trotz massiver histopathologischer Veränderungen der Leber, keine Unterschiede in den DHN-MA-Leveln festgestellt [159, 160, 275]. Dies lässt die Rolle des DHN-MA als universellen Biomarker für oxidativen Stress als fraglich erscheinen, denn mit der fehlenden Spezifität ist eine entscheidende Voraussetzung für die Definition als Biomarker nicht gegeben [139].

Die groß angelegte BOSS-Studie (*Biomarkers of Oxidative Stress Study*), die es sich zum Ziel gesetzt hatte, nicht-invasive Biomarker für oxidativen Stress zu identifizieren, kam zu einem ähnlichen Schluss [261]. Die Untersuchung klassischer Marker für oxidativen Stress (α -Tocopherol, Coenzym Q, Ascorbinsäure, Glutathion, Harnsäure, totale antioxidative Kapazität) ergab für CCl_4 ebenfalls ein widersprüchliches Ergebnis. Während das GSH/GSSG-Verhältnis im Plasma der behandelten Ratten wie erwartet sank, blieben die Harnsäurekonzentration und die antioxidative Kapazität konstant, während die Ascorbinsäurelevel anstiegen. Die Konzentrationen von α -Tocopherol und Coenzym Q ließen sich aufgrund des massiv gestörten Lipidhaushalts nicht interpretieren. Insbesondere der Mechanismus, der zu der unveränderten totalen antioxidativen Kapazität und den erhöhten Ascorbinsäureleveln führte, blieb unklar. Hypothetisch sollten beide Parameter in Folge der radikalischen Schädigung absinken. Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen und den eigenen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es sich bei Tetrachlorkohlenstoff um eine Substanz zu handeln scheint, die in verschiedenste Stoffwechselwege eingreift und zahlreiche Sekundärreaktionen nach sich zieht. Zeit- und dosisabhängig scheint der Organismus aber in erheblichem Ausmaß in der Lage zu sein, die massiven Eingriffe in das Redox- bzw. antioxidative System zu kompensieren. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass es sich bei den beobachteten Effekten um eine Überlagerung diverser und wahrscheinlich auch gegenläufiger Reaktionen handelt. Weiterführende Untersuchungen in Zusammenhang mit BOSS

zeigten, dass Marker wie Isoprostane (8-Iso-PGF_{2α} und 8,12-Iso-iPF_{2α}-VI, Plasma und Urin), Malondialdehyd (Plasma) und 8-Hydroxy-2'-Desoxyguanosin (Urin) besser geeignet waren, *in vivo* zeit- und dosisabhängige Effekte nach Induktion von oxidativem Stress anzuzeigen und möglicherweise als sensitive Biomarker dienen können [260]. Trotz der mangelnden Spezifität des identifizierten DHN-MA Markers ergab die gruppenweise Gegenüberstellung der Gesamtmenge ausgeschiedener Mercaptursäuren in der Hochdosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedrigere Spiegel. Aus den hohen Prädiktionsraten der zugrunde liegenden Modelle ließ sich ableiten, dass im vorliegenden Fall das gesamte Mercaptursäureprofil den zeit- und dosisabhängigen Effekt einer Exposition gegenüber Tetrachlorkohlenstoff umfassend charakterisieren konnte. Möglicherweise wäre eine solche Spezifität für einen der in **Tab. 7** bzw. **10** aufgeführten potentiellen Mercaptursäuremarker gegeben, für die mangels verfügbarer Standards bzw. geeigneter Datenbanken bisher noch keine Identifizierung erfolgen konnte. Denkbar wäre weiterhin, dass eine Kombination aus einigen wenigen dieser Marker den Effekt einer oxidativen Schädigung *in vivo* sehr empfindlich charakterisieren könnte. Zu diesem Zweck müsste allerdings ebenfalls eine Strukturaufklärung erfolgen, da ein reiner Mustererkennungsansatz aus den bereits zuvor diskutierten Gründen zu störanfällig gegenüber Confoundern wäre.

7 PROJEKT 5: Metabonomicsstudie mit Rauchern und Nichtrauchern

In Deutschland beträgt die durchschnittliche Raucherprävalenz 27 %. Schätzungen gehen davon aus, dass 5 % aller Todesfälle in Zusammenhang mit für Raucher symptomatischen Erkrankungen stehen [282]. Vor dem Hintergrund geschätzter 3300 Todesfälle pro Jahr als Folge einer Exposition gegenüber Passivrauch [324] werden insbesondere im Zuge eines umfassenden Nichtraucherschutzes Rufe nach einem geeigneten Biomonitoring laut. In der angelegten Studie wurden daher mit dem Ziel, neue Biomarker für eine Tabakrauchexposition zu identifizieren, die Mercaptursäureprofile von Rauchern und Nichtrauchern untersucht. Tabakrauch enthält eine Vielzahl an elektrophilen Verbindungen, die teilweise ein ausgeprägtes toxisches bzw. mutagenes Potential aufweisen [280, 281]. Wie sich mit *pattern recognition* beobachten ließ, wiesen starke wie auch schwache Raucher Mercaptursäuremuster auf, die sich deutlich von denen der Nichtraucher unterscheiden ließen. Die Schwelle, ab derer man einen Raucher als solchen identifizieren konnte, lag bei circa fünf Zigaretten pro Tag. Allerdings stellte sich bei der Erstellung der multivariaten Modelle die Definition des Raucherbegriffs als problematisch heraus. Diskriminanzanalysen wie die PLS-DA oder die OPLS-DA, die sich besonders für Zwei-

Klassen-Fragestellungen eignen, erfordern die Zuweisung von Gruppen. Aufgrund dessen wurde eine Niedrigdosisgruppe (schwache Raucher) mit einer Exposition von zehn oder weniger Zigaretten pro Tag und eine Hochdosisgruppe (starke Raucher) mit mehr als zehn Zigaretten pro Tag definiert. Daten zum Rauchverhalten wurden dabei per Fragebogen erhoben. Die Einteilung wurde vorgenommen, um annähernd gleiche Gruppengrößen zu erhalten. Sie wich aber von den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation ab, wonach ein Raucher erst ab einem täglichen Konsum von mehr als 20 Zigaretten als starker Raucher zu bezeichnen ist [325]. Vor allem die Gruppe der schwachen Raucher verhielt sich in den Modellen inhomogen. Dies wurde auf das Rauchverhalten der Gelegenheitsraucher zurückgeführt, von dem angenommen wurde, dass es sich deutlich von dem der starken Raucher unterschied. Gibt ein Raucher an, täglich fünf Zigaretten zu rauchen, kann das bedeuten, dass er diese über den Tag verteilt raucht und somit einer kontinuierlichen Exposition ausgesetzt ist, es kann dagegen aber auch bedeuten, dass er die Zigaretten beispielsweise bevorzugt am Abend raucht. In letzterem Fall würde die Exposition am Abend, die sich vielleicht über einen Zeitraum von zwei bis vier Stunden erstreckt, durchaus mit der eines starken Rauchers vergleichbar sein, der in der Regel sein Zigarettenpensum kontinuierlich über den Tag verteilt raucht. Weiterhin würde ein Nichtraucher, der sich für mehrere Stunden in einem Raum aufhielt, in dem viel geraucht wurde, durch Passivrauch ähnlich einem schwachen Raucher exponiert werden.

Dem Problem der Dosisabschätzung könnte möglicherweise durch eine Korrelation der Merkaptursäuresignaturen mit etablierten Expositionsmarkern für Tabakrauch wie Cotinin oder Nicotinäquivalenten begegnet werden. Mit Verfahren wie der *partial least squares*-Analyse ließe sich die multivariate Datenmatrix mit dem Cotiningehalt der Proben korrelieren, der als kontinuierliches Maß zur Abschätzung einer aktiven sowie passiven Exposition gegenüber Tabakrauch dienen könnte. Auf diese Weise ließe sich eine Dosisabhängigkeit der Merkaptursäureausscheidung wahrscheinlich sehr genau abschätzen. Des Weiteren sollte die Prädiktivität der Modelle und folglich die Aussicht auf die Extraktion potentieller Biomarker steigen. Da entsprechende klassische Expositionsmarker für die Proben der Studie nicht zur Verfügung standen, musste die Einteilung in „Expositionsklassen“ (schwache bzw. starke Raucher gemäß den Angaben im Fragebogen) erfolgen. Dennoch konnten aus den Modellen potentielle Biomarker abgeleitet und die Merkaptursäuren Acrylamid-MA, 2-Cyanoethyl-MA, 3-Hydroxypropyl-MA, 3-Hydroxy-1-methylpropyl-MA und 2-Carboxy-1-methylethyl-MA nachfolgend strukturell identifiziert werden. In der Literatur werden diese Metaboliten als Expositionsmarker für eine Tabakrauchexposition diskutiert [250, 290, 293, 298]. Die Ausscheidung der identifizierten Marker erfolgte dabei dosisabhängig. In der Gruppe der schwachen Raucher lagen

die Spiegel 1.5- bis 7.5-fach, in der Gruppe der starken Raucher 2- bis 22-fach höher als in dem Kontrollkollektiv. Bezüglich der Gesamtmenge ausgeschiedener Merkaptursäuren zeigten sich ebenfalls dosisabhängige Unterschiede. So lag die Gesamtausscheidung in der Niedrigdosisgruppe signifikant, in der Hochdosisgruppe hochsignifikant höher als in der Gruppe der Nichtraucher. Allerdings konnte hierbei keine Abhängigkeit von der Zigarettenanzahl festgestellt werden. Sowohl die Ergebnisse des *pattern recognition* als auch die Level der identifizierten Biomarker stimmten dabei mit Literaturdaten überein, die mit herkömmlichen Methoden zu ähnlichen Ergebnissen gekommen waren. In Zukunft könnte, auf der Messung dieser Marker bzw. des gesamten Merkaptursäureprofils basierend, vor allem für Passivraucher das Ausmaß einer Exposition gegenüber Tabakrauch sowie in diesem Zusammenhang ein individuelles Risikopotential abgeleitet werden.

8 Ausblick

Von allen *Omics*-Plattformen stellt Metabonomics diejenige Technik dar, die den Phänotyp eines Organismus wahrscheinlich am umfassendsten charakterisieren kann [16]. Ausgehend vom Phänotyp kann dann versucht werden, in einer *top-down*-Strategie Rückschlüsse auf den jeweiligen Genotyp zu ziehen. Da die unterschiedlichen Ebenen, d. h. das Genom, Transcriptom, Proteom und Metabolom jeweils unterschiedlich schnell auf ein Ereignis reagieren, erscheinen im Kontext der Systembiologie integrative *Omics*-Ansätze (auch als „Multiomics“ [309], „Totalomics“ oder „Binomics“ [77] bezeichnet) am besten geeignet, genetische, toxikologische bzw. medizinische Endpunkte und Mechanismen zu identifizieren und zu evaluieren. Das entwickelte Merkaptursäurescreening könnte im Hinblick auf die Charakterisierung des Metaboloms einen wichtigen und komplementären Beitrag leisten.

Im Rahmen des 6th *European Framework Programme Innovative Medicines for Europe* (InnoMed) wurde 2005 das *Predictive Toxicology* (PredTox) Projekt initiiert [326]. Dessen Ziel war es, auf der Basis von 16 „gescheiterten“ Arzneistoffkandidaten, d. h. Substanzen, deren Entwicklung insbesondere wegen hepato- bzw. nephrotoxischer Effekte gestoppt wurde, einen integrativen Transcriptomics-, Proteomics- und Metabonomicsansatz zur Untersuchung toxischer Mechanismen *in vivo* zu entwickeln. Wenn die einzelnen *Omics*-Techniken auch noch nicht hinreichend ausgereift sind, um mit $n = 1$ klinischen Studien auszukommen [239], so können Projekte dieser Art dennoch entscheidend dazu beitragen, die Methodik voranzutreiben, die Datengrundlage zu verbessern und einen Schritt weiter auf dem Weg hin zu einer personalisierten Gesundheit und Medizin zu gelangen.

ZUSAMMENFASSUNG

Metabonomics bildet das Ende der *Omics*-Kaskade und stellt eine *top-down*-Strategie zur Erfassung und Interpretation des Metaboloms, d. h. der Gesamtheit aller niedermolekularen Metaboliten in einem intakten Organismus, dar [1]. Ziel der Technik ist es, mittels geeigneter ungerichteter Screeningverfahren in nicht-invasiv zu gewinnenden biologischen Proben wie Urin oder Blut charakteristische Metabolitenprofile zu bestimmen. Im Kontext des Metabonomics wurde in Anlehnung an den Geno- bzw. Phänotyp hierfür der Begriff „Metabotyp“ geprägt [308]. Durch biostatistische Methoden, die auf Mustererkennung (*pattern recognition*) basieren, können Signaturen gegenübergestellt und auf diesem Weg gruppenspezifische Metaboliten, d. h. Biomarker bzw. Metabolitenmuster, extrahiert werden. Metabonomics kann folglich als Fusion klassischer bioanalytischer und biostatistischer Verfahren aufgefasst werden. Seit der Einführung im Jahr 1999 hat sich das Konzept des Metabonomics in mehrere Richtungen weiterentwickelt. So gab es Bestrebungen, die Technik, die ursprünglich zur Prädiktion von toxischen Effekten bei der Arzneistoffentwicklung etabliert wurde [1, 218], auf Fragestellungen zu übertragen, die den Menschen im Mittelpunkt haben [62]. Neben präklinischen Anwendungen verfolgt man mit Metabonomics zunehmend das Ziel, einer personalisierten Medizin und Ernährung einen Schritt näher zu kommen [327, 328]. Da sich die ursprünglich eingesetzte NMR-Technik als zu unempfindlich und die resultierenden Metabolitenprofile als zu anfällig gegenüber biologischen und analytischen Einflussgrößen (Confoundern) erwiesen haben, wurde parallel auf sensitivere Verfahren wie die Massenspektrometrie gesetzt. Insbesondere die Kopplung mit der Hochdruckflüssigchromatographie erwies sich hierbei für das Metabolitenscreening als geeignet [266]. Schnell wurde allerdings klar, dass aus den klassischen *full scan*/TOF-Methoden Datensätze resultierten, die häufig zu komplex waren, um mit nachgeschalteten chemometrischen Verfahren die „Spreu vom Weizen trennen“ zu können [311]. Da sich Metabolitendatenbanken bisher noch im Aufbau befinden, ist die Identifizierung der Marker mit zusätzlichen Schwierigkeiten verbunden und bedarf aufwändiger analytischer Verfahren [89, 219]. Eine Strategie stellt daher die Beschränkung auf ein Metabolitensubset dar. Indem man sich auf Metabolitenklassen fokussiert, die einen Bezug zum untersuchten Mechanismus haben, können die Erfolgsaussichten bei der Identifizierung charakteristischer Biomarker deutlich erhöht werden [107, 329].

Aufgrund zahlreicher exogener und endogener Faktoren (Arzneistoffe, Industriechemikalien, Nahrungsbestandteile, Tabakrauchbestandteile, Produkte der Lipidperoxidation etc.) ist der menschliche Organismus stets einer Vielzahl an elektrophilen Verbindungen ausgesetzt. Oxidative Schädigungen an Strukturen wie der DNA, Proteinen und Lipiden werden mit einer Reihe

von Krankheitsbildern in Zusammenhang gebracht, darunter Parkinson, Alzheimer, Krebs und Volkskrankheiten wie Arteriosklerose, Allergien und koronare Herzerkrankungen [115, 256, 258]. Mit dem Glutathionsystem verfügt der Körper über einen wirksamen Detoxifizierungsmechanismus. Das Tripeptid Glutathion reagiert als Nukleophil mit den exogen oder endogen gebildeten elektrophilen Intermediaten. Endprodukte sind Mercaptursäuren (*N*-Acetyl-L-Cystein-Addukte) bzw. deren Sulfoxide, die in erster Linie mit dem Urin ausgeschieden werden. Folglich besteht zwischen diesen Mercaptursäurederivaten und der elektrophilen Belastung eines Organismus ein direkter Zusammenhang.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der Arbeit, einen nicht-invasiven Metabonomicsansatz zur Anwendung am Menschen zu entwickeln. Durch die Fokussierung des Metabolitenscreenings auf die Effekt-, Dosis- und Suszeptibilitätsmarkerklasse der Mercaptursäuren sollten hierbei die Erfolgsaussichten im Hinblick auf die Identifizierung potentieller Biomarker für diverse toxikologische sowie medizinische Endpunkte erhöht werden.

Im Rahmen des Projekts „Identifizierung von Biomarkern mittels LC-MS-basiertem Metabonomics – Mercaptursäuren als Indikatoren für die Bildung toxischer Intermediate“ wurden zunächst die methodischen Grundlagen erarbeitet. Hauptaugenmerk lag auf der Entwicklung und Optimierung einer LC-MS-Screeningmethode zum sensitiven Nachweis exogener und endogener Mercaptursäuren in unterschiedlichen biologischen Matrices. Die Analytik basierte auf einem *constant neutral loss*-Scan und erfolgte mittels Triple Quadrupol gekoppelter linearer Ionenfalle. Das Kernstück der Methode bildete die Verknüpfung des *survey scans* mit *enhanced* Produktionenspektren unter Verwendung zweier unterschiedlicher Kollisionsenergien. Die Experimente wurden durch ein *information dependent acquisition*-Kriterium gekoppelt. Die Screeningmethode wurde hinsichtlich der Parameter Nachweisgrenze sowie der *intra*- und *inter-day*-Präzision validiert. Darüber hinaus erfolgte anhand authentischer Mercaptursäurestandards eine Optimierung der softwaregesteuerten Datenextraktion. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die resultierenden Datenmatrices, die als Grundlage für die anschließenden multivariaten Datenanalysen dienen sollten, die erforderliche Spezifität und Präzision aufwiesen. Die Evaluierung der Screeningmethode und der Metabonomicstechnik *in vivo* erfolgte anhand von Acetaminophen (AAP), einer Substanz, die via Cytochrom P 450 abhängiger Enzyme nachweislich zu dem reaktiven Metaboliten *N*-Acetyl-*p*-Benzochinonimin (NAPQI) aktiviert wird. Bei niedriger Exposition erfolgen eine Konjugation mit Glutathion und die Ausscheidung als Mercaptursäure. Wird AAP allerdings in großem Maßstab eingenommen, kommt es zum Leberversagen, da NAPQI an Proteine der Leber bindet [116, 220]. Vor diesem Hintergrund stellte Acetaminophen eine geeignete Modellsubstanz für ein *proof-of-concept* dar. Im ersten Teil

der Studie nahmen die Probanden Acetaminophen in therapeutischer (500 mg) Dosierung ein. Der Urin wurde mit der entwickelten CNL-Methode auf Mercaptursäuren hin analysiert und die Ergebnisse einer für Metabonomics typischen *full scan*/TOF-Methode gegenübergestellt. In der *principal component analysis* (PCA) und der *partial least squares*-Diskriminanzanalyse (PLS-DA) zeigten beide Screeningansätze eine Trennung von Kontroll- und Dosisgruppe aufgrund des Mercaptursäureprofils im Urin. Aber nur für den Mercaptursäureansatz konnte aus dem entsprechenden *weight plot* der für den potentiell toxischen Effekt von Acetaminophen verantwortliche Marker, die Acetaminophen-Mercaptursäure (AAP-MA), eindeutig als „Biomarker“ identifiziert werden. Darüber hinaus wurde das AAP-MA-Sulfoxid als Marker aus dem Mercaptursäureprofil extrahiert. *Time series plots* wiesen ferner auf einen geschlechtsspezifischen Metabolismus von AAP hin, der sich in erhöhten AAP-MA Konzentrationen im Urin der weiblichen Probanden im Vergleich zu den männlichen Probanden widerspiegelte. Sowohl die Identifizierung des AAP-MA-Sulfoxids als auch die Beobachtung geschlechtsspezifischer Unterschiede bezüglich des AAP-Metabolismus gingen über ein *proof-of-concept* hinaus, zu dessen Zweck die Humanstudie angelegt worden war. Nach subtherapeutischer Einnahme von Acetaminophen (50 mg) ergaben sich im zweiten Teil der Studie analoge Ergebnisse. Allerdings wurde nur noch die AAP-MA als potentieller Marker identifiziert. Die Prädiktionsraten eines unabhängigen Testsets an Proben bestätigten ferner die Robustheit des Niedrigdosismodells, auf dessen Grundlage nach Anwendung des *orthogonal signal correction*-Filters erste Hinweise auf Unterschiede in den Mercaptursäureprofilen von Männern und Frauen gewonnen werden konnten.

Die multivariaten Auswerteverfahren werden vielfach durch unbekannte und verdeckte Größen beeinflusst. Hierin liegt sowohl eine Stärke als auch eine Schwäche des Metabonomics. In einer zweiten Humanstudie, die als Kontrollstudie ohne Exposition angelegt war, wurde daher mittels PCA, PLS-DA und OPLS-DA Modellen der Einfluss von biologischen Einflussvariablen auf das Mercaptursäuremuster untersucht. In diesem Zusammenhang wurden Tages- und Tageszeitabhängigkeiten der Urinmuster sowie Geschlechtsunterschiede evaluiert. Durch Konvertierung des CNL-Scans in einen thMRM-Scan, insbesondere in Kombination mit einer *on-line*-Festphasenextraktion, konnte die Nachweisempfindlichkeit der Screeningmethode gesteigert und die anschließende Datenextraktion erheblich verbessert werden. Anhand von internen Mercaptursäurestandards und Quality Control Proben wurden verschiedene Normierungs-, Skalierungs- und Validierungsansätze getestet und optimiert. Demnach ergaben sich die besten Modelle, wenn die Datenmatrix zuvor auf interne Standards und den Kreatiningehalt der Proben skaliert bzw. normalisiert wurde. Es zeigte sich, dass sowohl die Tageszeit als auch das Geschlecht einen

Einfluss auf die Mercaptursäureprofile ausübte, die Exkretion über die drei Studientage aber relativ konstant blieb. Wie aus den PLS-DA Modellen abgeleitet werden konnte, hatte das Geschlecht einen größeren Einfluss auf die Signaturen als die Tageszeit. Ferner konnte auf der Grundlage der Humanstudie eine Strategie zur Fusion von Daten entwickelt werden. Die Tatsache, dass jede einzelne Variable einen Betrag zu einem multivariaten Modell leistet, macht es vielfach schwierig, Daten zu kombinieren, die in unterschiedlichen Messreihen analysiert wurden. Mit der entwickelten Strategie gelang es, drei unabhängige *batches* zu einem integrativen Datensatz zu kombinieren, der schließlich nur noch minimale Unterschiede zu einer entsprechenden *one-batch*-Messung aufwies. Dieses Verfahren kann dann zum Einsatz kommen, wenn aufgrund eines großen Probenaufkommens die Analyse nicht in einer *batch* erfolgen kann.

Ein weiteres Projekt umfasste eine tierexperimentelle Studie, anhand derer die dosisabhängige Kinetik der Mercaptursäureprofile nach Verabreichung von Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) an männliche F344 Ratten in Dosen von 0.1 mL/kg KG und 1.0 mL/kg KG untersucht wurde. CCl_4 wird in der Leber reduktiv zu Radikalen metabolisiert und stellt daher eine Modellsubstanz dar, die zur Untersuchung von oxidativem Stress und der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies *in vivo* eingesetzt wird. Ziel ist hierbei, die im Tiermodell identifizierten Biomarker auf den Menschen zu übertragen und aus der Messung dieser Metaboliten ein individuelles Risikopotential abzuleiten. Die multivariaten PCA, PLS-DA und OPLS-DA Modelle zeigten eine deutliche Dosisabhängigkeit der Mercaptursäuremuster. Darüber hinaus wurden in Folge Tetrachlorkohlenstoffs in der Hochdosisgruppe drei zeitabhängige Trajektorien (Musterverläufe) beobachtet, wohingegen die Analyse des Niedrigdosismodells zwar geringe Unterschiede zwischen den Signaturen der Kontroll- und Niedrigdosisgruppe, jedoch keine charakteristischen Trajektorien ergab. Für die Hochdosisgruppe resultierten die größten Unterschiede 12 – 48 h *postdose*, wobei eine alternative Auswertestrategie, die auf einer durchschnittlichen Kontrollgruppe basierte, keine Vorteile gegenüber der standardmäßigen Vorgehensweise aufwies. Im Zuge der iterativen Auswertung wurde die überraschende Beobachtung gemacht, dass sich die Rattenpopulation bezüglich ihrer Mercaptursäureausscheidung in zwei Subpopulationen aufteilte. Die Unterschiede ließen sich dabei primär auf zwei Variablen zurückführen, die subgruppenspezifisch ausgeschieden wurden. Da für die erste Messung (einheitlicher Verdünnungsfaktor der Urinproben von 1:5) ein gewisses Risiko für einen konfundierenden Trend in der Datenmatrix bestand, wurde das Analyseprotokoll dahingehend geändert, dass für die zweite Messung alle Proben auf eine einheitliche spezifische Dichte verdünnt wurden. Auf der Grundlage der OPLS-DA Hoch- und Niedrigdosismodelle, die aus der zweiten Messung hervorgingen, wurden schließlich potentielle Biomarker für oxidativen Stress selektiert. Aus der Vielzahl möglicher

Expositionsmarker konnten die auf 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) und 1,4-Dihydroxynonen (DHN) zurückgehenden Mercaptursäuren HNE-MA und DHN-MA strukturell identifiziert werden. Sowohl HNE als auch DHN stellen Produkte der Lipidperoxidation dar und die entsprechenden Glutathion-Konjugate und daraus resultierenden Mercaptursäuren wurden in zahlreichen Studien als Biomarker für oxidativen Stress vorgeschlagen [159, 160, 275, 330]. Die identifizierten Marker wurden im Anschluss mit etablierten Verfahren evaluiert. Bezüglich des, auf einen internen Standard (IST) skalierten Verhältnisses DHN-MA/IST, wies die Hochdosisgruppe im Vergleich zur Kontroll- und Niedrigdosisgruppe 0–48 h *postdose* signifikant niedrigere Level auf. Für die Niedrigdosisgruppe konnte keine entsprechende Beobachtung gemacht werden. Weiterhin konnten für das HNE-MA/IST-Verhältnis keine dosis- oder zeitabhängigen Unterschiede festgestellt werden. Da authentische Standards bzw. Datenbanken für Phase-II-Metaboliten nicht zur Verfügung standen, konnte eine strukturelle Aufklärung weiterer Marker bisher nicht erfolgen. Die Analyse der Gesamtmenge ausgeschiedener Mercaptursäuren, die allgemein als Maß für eine Belastung mit Elektrophilen dienen kann, ergab in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für DHN-MA signifikant niedrigere MA-Level in den Proben der Hochdosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dagegen zeigten sich für die Kontroll- und Niedrigdosisgruppe keine Unterschiede bezüglich der gesamten MA-Level.

Die Identifizierung tabakrauchspezifischer Mercaptursäuren aus dem Urin von starken und schwachen Rauchern stellte das abschließende Projekt der Arbeit dar. Sowohl eine initiale PCA als auch anschließende OPLS-DA Modelle zeigten eine klare Diskriminierung von Nichtrauchern und starken Rauchern auf der Basis ihrer Mercaptursäuremuster. Die Gruppe der schwachen Raucher erwies sich indes als ziemlich inhomogen, was sich insbesondere in einer breiten Streuung und einem nicht-prädiktiven OPLS-DA Modell widerspiegelte. Das Verhalten der Niedrigdosisgruppe wurde auf das nicht kontinuierliche Rauchverhalten der schwachen Raucher zurückgeführt. Durch Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen konnten aus dem Muster der Raucher 28 potentielle Expositionsmarker selektiert werden. Die auf die Tabakrauchbestandteile Acrylamid, Acrolein, Acrylnitril und Crotonaldehyd zurückgehenden Metaboliten Acrylamid-MA, 2-Cyanoethyl-MA, 3-Hydroxypropyl-MA, 3-Hydroxy-1-methylpropyl-MA sowie 2-Carboxy-1-methylethyl-MA konnten anhand authentischer Standards und *enhanced* Produktienspektren identifiziert werden. Die Konzentrationen dieser Metaboliten wurden anschließend durch Bezug auf einen internen Standard klassisch evaluiert. Univariate Analysen ergaben für die fünf Mercaptursäuren eine deutliche Dosisabhängigkeit, wobei im Vergleich zur Gruppe der Nichtraucher signifikant höhere Spiegel im Urin von Rauchern resultierten. Die Gesamtmenge

ausgeschiedener Merkaptursäuren war ebenfalls von der Tabakrauchexposition abhängig. Verglichen mit den Nichtrauchern konnte für die Gruppe der schwachen Raucher ein signifikanter, für die Gruppe der starken Raucher sogar ein hochsignifikanter Anstieg der MA-Level ermittelt werden. Allerdings ergab sich keine direkte Korrelation zwischen der Anzahl gerauchter Zigaretten und der jeweiligen gesamten Merkaptursäureexkretion.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein alternativer Metabonomicsansatz zum Screening von Merkaptursäuren in Humanurin entwickelt. Die spezifische und sensitive LC-MS-basierte Analytik ermöglichte sowohl die Erfassung von exogenen als auch von endogenen Merkaptursäuren. Die Methode trug bei nur minimaler Probenvorbereitung einem hohen Probendurchsatz sowie einer automatischen, softwaregesteuerten Datenprozessierung Rechnung. In vier *in vivo* Studien konnten umfangreiche Einsatzmöglichkeiten des Metabonomicsansatzes aufgezeigt werden. Ausgehend von einem *proof-of-concept* wurden biologische Einflussfaktoren abgeschätzt sowie weitere Confounder diskutiert. Eine neue Strategie für die Fusion von Daten aus unabhängigen Messreihen wurde beispielhaft aufgezeigt. Zunächst für das Screening von Humanurin optimiert, ließ sich die Methodik einfach auf eine weitere Spezies übertragen. In einem tierexperimentellen Modellsystem für oxidativen Stress wurden sowohl Dosis- und Zeitabhängigkeiten untersucht als auch potentielle Biomarker identifiziert. Ferner wurde die Plausibilität dieser Merkaptursäuren als Biomarker für oxidativen Stress umfassend erörtert. In einem Projekt mit Rauchern und Nichtrauchern wurden auf der Grundlage multivariater Modelle Expositionsmarkergruppen für eine Exposition gegenüber Tabakrauch selektiert. Die identifizierten Metaboliten zeigten nach klassischer Evaluierung eine ausgesprochene Dosisabhängigkeit und könnten in Zukunft, insbesondere vor dem Hintergrund des Nichtraucherschutzes, als Belastungsmarker für eine Exposition gegenüber Tabakrauch dienen.

SUMMARY

Metabonomics forms the end of the omics-cascade and represents a top-down strategy for the interpretation of the metabolome, i. e. all the low molecular weight metabolites in an intact organism [1]. The aim of the approach is to analyse characteristic metabolite profiles by suitable untargeted screening methods in biological samples like urine or blood that can be obtained in a non-invasive manner. In the context of metabonomics, the term “metabotype” was defined according to the geno- and phenotype, respectively [308]. Biostatistical methods based on pattern recognition techniques allow comparing metabolic signatures and extracting group specific metabolites and biomarkers. Therefore, metabonomics can be regarded as the fusion of bioanalytical and biostatistical techniques. Since its introduction in 1999, the concept of metabonomics has permanently gained importance in many fields of scientific research. One aim was to transfer the methodology, which was originally established to predict toxic effects in drug development processes [1, 218], to human issues [62]. Apart from preclinical questions, metabonomics is increasingly applied in the area of personalised medicine and nutrition [327, 328]. As the NMR technique used by pioneers of the field was too insensitive and the resulting metabolite profiles were too susceptible to biological and analytical confounders, more sensitive techniques like mass spectrometry were more and more applied. Especially mass spectrometry in combination with high performance liquid chromatography showed great promise for the screening of metabolites [266]. However, after a very short time, it was clear that the data sets resulting from full scan/TOF-methods were too complex to “separate the wheat from the chaff” with chemometric procedures [311]. Metabolite databases are still under construction, and therefore marker identification is challenging and requires complex analytical techniques [89, 219]. Thus, one strategy is to concentrate on a certain metabolite subset. The focus on a metabolite class with a close relation to the mechanism under investigation can considerably increase the prospects of success in the biomarker identification process [107, 329].

Due to a variety of exogenous and endogenous factors (drugs, industrial chemicals, food ingredients, and tobacco smoke) the human organism is steadily confronted with a multitude of electrophilic compounds. Oxidative damage of the DNA, proteins, and lipids is associated with the development of diseases like Parkinson’s, Alzheimer’s, cancer and widespread diseases like arteriosclerosis, allergies and coronary heart diseases [115, 256, 258]. With the glutathione system the human organism is equipped with an efficient detoxification mechanism. The tripeptide glutathione reacts as nucleophile with exogenously and endogenously formed electrophilic intermediates. End products are mercapturic acids (*N*-acetyl-L-cysteine-adducts) and

respective sulfoxides that are predominantly excreted with urine. Therefore, there is a close relationship between these mercapturic acid patterns and the electrophilic burden of an organism. In this context, the aim of this thesis was to develop a non-invasive human metabonomics approach that focuses the metabolite screening on the effect, dose and susceptibility marker class of the mercapturic acids. Thus, the prospects of success regarding the identification of potential biomarkers for various toxicological and pathological endpoints should be increased.

The first objective of the project “Identification of biomarkers via LC-MS-based metabonomics – mercapturic acids as indicators for the formation of toxic intermediates” was establishment of the methodical background. Focus was on the development and optimisation of a LC-MS screening method for the sensitive detection of exogenous and endogenous mercapturic acids in different biological matrices. Analysis was based on a constant neutral loss (CNL) scan and was carried out on a hybrid triple quadrupole linear ion trap. The survey scan was connected with two enhanced product ion scans at different collision energies by means of information dependent acquisition criteria. Validation of the screening method was carried out with regard to the parameters detection limit and intra- and inter-day precision, respectively. Optimisation of the software-controlled data extraction was based on authentic mercapturic acid standards. This way, specificity and precision of the resulting data matrices, the basis of the subsequent multivariate data analyses, could be assured. Evaluation of the screening method and the metabonomics technique *in vivo* was performed by means of acetaminophen (AAP), a compound, which is activated to the reactive metabolite *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) via cytochrome P 450 dependent enzymes. At low doses, AAP is conjugated with glutathione and excreted as mercapturic acid, whereas at high doses the electrophile NAPQI binds to liver proteins leading to liver failure [116, 220]. Because of these characteristics, AAP was considered to be a suitable model compound for a proof-of-concept study. In the first part of the study, the human subjects took a therapeutical (500 mg) dose of acetaminophen. Urine samples were analysed for mercapturic acids with the developed CNL-method and the results were compared with a typical metabonomics full scan/TOF-method. For both screening approaches, principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) could discriminate the control and dose group. But only the respective weight plot of the mercapturic acid approach could definitely identify the marker for the potential toxic effect of acetaminophen, the acetaminophen mercapturic acid (AAP-MA), as characteristic biomarker. Moreover, a second marker, i. e. the AAP-MA sulfoxide, could be extracted from the mercapturic acid profile. Time series plots indicated a gender specific metabolism of AAP with higher AAP concentrations in the urine of female subjects compared with male subjects. Both, the identification of the

AAP-MA sulfoxide, and the observation of gender specific differences in AAP metabolism were beyond a proof-of-concept. Similar results were obtained in the second part of the study after exposure of a subtherapeutical (50 mg) dose of acetaminophen. Indeed, only AAP-MA, but not AAP-MA sulfoxide was identified as potential marker. The prediction rates of an independent test set of samples additionally confirmed the robustness of the low-dose model. On the basis of this model, a first evidence of the differences in the mercapturic acid profiles of male and female subjects could be obtained after application of the orthogonal signal correction filter.

Multivariate data analysis techniques are often influenced by unknown or hidden factors. This is both an advantage and a disadvantage of metabonomics. That is the reason why in a second human study, designed as control study without any exposure, the influence of biological confounders on the mercapturic acid patterns was investigated with PCA, PLS-DA and OPLS-DA, respectively. Diurnal and time of day dependencies of the urinary signatures were evaluated, as well as gender differences. The detection limit of the screening method could be improved by conversion of the constant neutral loss scan to a theoretical multiple reaction monitoring scan, and particularly by the introduction of an online solid phase extraction. Several normalisation, scaling and validation approaches were tested and optimised by means of internal mercapturic acid standards and quality control samples. Best models were obtained with data matrices scaled to internal standards and normalised to the creatinine content of the samples. It was shown, that both time of day and gender had an influence on the mercapturic acid profiles, but that the excretion remained relatively stable over the three study days. From the PLS-DA models it could be concluded that gender had a stronger influence on the signatures than time of day. In addition, a strategy for the fusion of data could be developed with the data sets resulting from the human study. Multivariate data analysis models are often dominated by offsets between multiple analytical runs. Since every single variable contributes to the model, the combination of data analysed in different analytical series is often difficult. With the developed strategy it was possible to overcome this problem and to combine three independent batches to an integrative data set. Eventually, this new data set showed only minimal differences to a respective one-batch measurement. This approach can always be applied in situations where one-batch measurements are not possible due to high sample numbers.

The next project was an animal study with carbon tetrachloride (CCl_4) administered to male F344 rats at doses of 0.1 mL/kg bw and 1.0 mL/kg bw in order to investigate the dose dependent kinetics of the mercapturic acid profiles. In the liver, CCl_4 is metabolised to radicals and therefore forms a model compound for the investigation of oxidative stress and the formation of reactive

oxygen species *in vivo*. The aim of such studies is to transfer the identified biomarkers to humans and to derive an individual risk potential. The multivariate PCA, PLS-DA and OPLS-DA models indicated a clear dose dependency of the mercapturic acid patterns. Moreover, three time dependent trajectories could be observed in the high-dose model, whereas in the low-dose model small differences in the signatures of the control and low-dose group were evident, but no characteristic trajectories could be monitored. The high-dose group showed the largest differences 12 – 48 h postdose. An alternative strategy based on an average control group showed no advantage compared with the default approach. Iterative analyses of the data sets led to the observation that the rat population split up in two subpopulations. For the discrimination of the subgroups primarily two variables were responsible. Since there existed a certain risk for a confounding trend in the data matrix of the first measurement (common dilution factor of 1:5 for the urine samples) the sample workup protocol was modified. Thus, for the second measurement all samples were diluted to a common specific gravity. Based on the OPLS-DA high- and low-dose models of the second measurement, potential biomarkers for oxidative stress were selected. Amongst a variety of candidate effect markers, the mercapturic acids of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) and 1,4-dihydroxynonene (DHN), HNE-MA and DHN-MA, could be identified. Both HNE and DHN form end products of lipidperoxidation processes and their related glutathione conjugates and resulting mercapturic acids have often been proposed to be biomarkers of oxidative stress [159, 160, 275, 330]. The identified markers were subsequently evaluated with established techniques. In the 0 – 48 h postdose period, the high-dose group showed lower DHN-MA/IST (IST, internal standard) ratios than the control and low-dose group, respectively. This effect could not be observed for the low-dose group. Furthermore, no dose and time dependent differences could be observed for the HNE-MA/IST ratio. Due to the fact that authentic standards and data bases for phase-II-metabolites are still not commonly available, identification of further markers could not be performed. Compared to the control and low-dose group, the high-dose group showed a lower total amount of excreted mercapturic acids. The total amount can be regarded as a measure of the electrophilic burden of an organism. In contrast, no differences in the total amount of excreted mercapturic acids could be observed for the control and low-dose group.

The objective of the last project was the identification of tobacco smoke specific mercapturic acids in urine samples of heavy and moderate smokers. Initial PCA and OPLS-DA models revealed a clear discrimination of non-smoker and heavy smoker mercapturic acid patterns. However, the group of the moderate smokers was fairly inhomogeneous. This was reflected in a large variation and a non-predictive OPLS-DA model. The behaviour of the low-dose group was

attributed to the non-continuous smoking habits of the moderate smokers. Comparison of the patterns of the three study groups resulted in 28 potential markers of exposure. On the basis of authentic standards and enhanced product ion scans, acrylamide-MA, 2-cyanoethyl-MA, 3-hydroxypropyl-MA, 3-hydroxy-1-methylpropyl-MA and 2-carboxy-1-methylethyl-MA resulting from the tobacco smoke components acrylamide, acrolein, acrylonitrile and crotonaldehyde, respectively, could be identified. Classical evaluation was carried out for these metabolites by referring them to an internal standard. Univariate analyses showed clear dose dependency for the five mercapturic acids and higher levels in the two smoker groups than in the non-smoker group. In addition, the total amount of excreted mercapturic acids was also dependent on tobacco smoke exposure. Compared with the non-smoker group, a significant and highly significant increase of total MA-levels could be observed for the moderate smokers and the heavy smokers, respectively. However, there was no evidence of a direct correlation between the amount of smoked cigarettes and the respective total mercapturic acid excretion.

In the present work, an alternative metabonomics approach for the screening of mercapturic acids in human urine was developed. The specific and sensitive LC-MS-based analysis enabled both the detection of exogenous and endogenous mercapturic acids. The method accommodated minimal sample preparation, high-throughput analyses and an automated software-controlled data processing. In four *in vivo* studies, the various fields of applications of the metabonomics approach could be demonstrated. First step was a proof-of-concept that served as evaluation tool for biological factors and common confounders. A new strategy for the fusion of data was exemplified. Initially optimised for the screening of human urine, the methodology could easily be transferred to another species. In a model animal study for oxidative stress, dose and time dependencies were investigated and potential biomarkers identified. In addition, the plausibility of these mercapturic acids as biomarkers for oxidative stress was comprehensively discussed. In a project with smokers and non-smokers, groups of effect markers for tobacco smoke exposure were selected on the basis of multivariate models. The identified markers were strongly dose dependent and could probably serve as markers for tobacco smoke related burden in future. These biomarkers could especially be relevant in the context of non-smoker protection.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. & HOLMES, E. (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, *Xenobiotica*, 29, 1181-1189.
- [2] PAULING, L.; ROBINSON, A. B.; TERANISHI, R. & CARY, P. (1971) Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 2374-2376.
- [3] HORNING, E. C. & HORNING, M. G. (1971) Human metabolic profiles obtained by GC and GC/MS *J. Chromatogr. Sci.*, 9, 129-140.
- [4] GATES, S. C. & SWEELEY, C. C. (1978) Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography, *Clin. Chem.*, 24, 1663-1673.
- [5] LINDON, J. C.; HOLMES, E.; BOLLARD, M. E.; STANLEY, E. G. & NICHOLSON, J. K. (2004) Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis, *Biomarkers*, 9, 1-31.
- [6] WISHART, D. S.; TZUR, D.; KNOX, C. et al. (2007) HMDB: the Human Metabolome Database, *Nucleic Acids Res.*, 35, D521-D526.
- [7] CHEN, C.; GONZALEZ, F. J. & IDLE, J. R. (2007) LC-MS-Based Metabolomics in Drug Metabolism, *Drug Metab. Rev.*, 39, 581-597.
- [8] DETTMER, K.; ARONOV, P. A. & HAMMOCK, B. D. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics, *Mass Spectrom. Rev.*, 26, 51-78.
- [9] RAAMSDONK, L. M.; TEUSINK, B.; BROADHURST, D. et al. (2001) A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations, *Nat. Biotechnol.*, 19, 45-50.
- [10] FIEHN, O. (2001) Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks, *Comp. Funct. Genomics*, 2, 155-168.
- [11] GERMAN, J. B.; GILLIES, L. A.; SMILOWITZ, J. T.; ZIVKOVIC, A. M. & WATKINS, S. M. (2007) Lipidomics and lipid profiling in metabolomics, *Curr. Opin. Lipidol.*, 18, 66-71.
- [12] WATSON, A. D. (2006) Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems, *J. Lipid Res.*, 47, 2101-2111.
- [13] KOULMAN, A.; TAPPER, B. A.; FRASER, K. et al. (2007) High-throughput direct-infusion ion trap mass spectrometry: a new method for metabolomics, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 421-428.
- [14] Technology Review (2005), 10 Emerging Technologies, http://www.technologyreview.com/read_article.aspx?ch=infotech&sc=&id=14407&pg=4.
- [15] LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. & EVERETT, J. R. (2000) Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids, *Con. Magn. Reson.*, 12, 289-320.
- [16] ROBERTSON, D. G. (2005) Metabonomics in toxicology: a review, *Toxicol. Sci.*, 85, 809-822.
- [17] LUTZ, N. W. (2006) Contributions of metabol(om)ic NMR spectroscopy to the investigation of apoptosis, *C. R. Chim.*, 9, 445-451.
- [18] CHEN, C.; MA, X.; MALFATTI, M. A. et al. (2007) A comprehensive investigation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) metabolism in the mouse using a multivariate data analysis approach, *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 531-542.
- [19] LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. et al. (2003) Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 187, 137-146.
- [20] SHOCKCOR, J. P. & HOLMES, E. (2002) Metabonomic applications in toxicity screening and disease diagnosis, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2, 35-51.

- [21] EBBELS, T. M. D.; KEUN, H. C.; BECKONERT, O. P. et al. (2007) Prediction and Classification of Drug Toxicity Using Probabilistic Modeling of Temporal Metabolic Data: The Consortium on Metabonomic Toxicology Screening Approach, *J. Proteome Res.*, 6, 4407-4422.
- [22] COEN, M.; LENZ, E. M.; NICHOLSON, J. K. et al. (2003) An integrated metabonomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy, *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 295-303.
- [23] GRIFFIN, J. L.; WALKER, L. A.; SHORE, R. F. & NICHOLSON, J. K. (2001) Metabolic profiling of chronic cadmium exposure in the rat, *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 1428-1434.
- [24] WATERS, N. J.; HOLMES, E.; WILLIAMS, A. et al. (2001) NMR and pattern recognition studies on the time-related metabolic effects of alpha-naphthylisothiocyanate on liver, urine, and plasma in the rat: an integrative metabonomic approach, *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 1401-1412.
- [25] WATERS, N. J.; WATERFIELD, C. J.; FARRANT, R. D.; HOLMES, E. & NICHOLSON, J. K. (2006) Integrated Metabonomic Analysis of Bromobenzene-Induced Hepatotoxicity: Novel Induction of 5-Oxoprolinosis, *J. Proteome Res.*, 5, 1448-1459.
- [26] WILLIAMS, R. E.; COTTRELL, L.; JACOBSEN, M. et al. (2003) ¹H-Nuclear magnetic resonance pattern recognition studies with N-phenylanthranilic acid in the rat: time- and dose-related metabolic effects, *Biomarkers*, 8, 472-490.
- [27] ANTHONY, M. L.; GARTLAND, K. P.; BEDDELL, C. R.; LINDON, J. C. & NICHOLSON, J. K. (1994) Studies of the biochemical toxicology of uranyl nitrate in the rat, *Arch. Toxicol.*, 68, 43-53.
- [28] GARTLAND, K. P.; BONNER, F. W. & NICHOLSON, J. K. (1989) Investigations into the biochemical effects of region-specific nephrotoxins, *Mol. Pharmacol.*, 35, 242-250.
- [29] NICHOLLS, A. W.; NICHOLSON, J. K.; HASELDEN, J. N. & WATERFIELD, C. J. (2000) A metabonomic approach to the investigation of drug-induced phospholipidosis: an NMR spectroscopy and pattern recognition study, *Biomarkers*, 5, 410-423.
- [30] NICHOLLS, A. W.; HOLMES, E.; LINDON, J. C. et al. (2001) Metabonomic investigations into hydrazine toxicity in the rat, *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 975-987.
- [31] ROBERTSON, D.; BEUSHAUSEN, S. & PENNIE, W. (2008) Toxicopanomics: applications of genomics, proteomics, and metabonomics in predictive and mechanistic toxicology, *Principles and Methods of Toxicology*, 293-324.
- [32] NEBERT, D. W. & VESELL, E. S. (2006) Can personalized drug therapy be achieved? A closer look at pharmaco-metabonomics, *Trends Pharmacol. Sci.*, 27, 580-586.
- [33] CLAYTON, T. A.; LINDON, J. C.; CLOAREC, O. et al. (2006) Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment, *Nature*, 440, 1073-1077.
- [34] UETRECHT, J. (2008) Idiosyncratic Drug Reactions: Past, Present, and Future, *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 84-92.
- [35] MADDOX, J. F.; LUYENDYK, J. P.; COSMA, G. N. et al. (2006) Metabonomic evaluation of idiosyncrasy-like liver injury in rats cotreated with ranitidine and lipopolysaccharide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 212, 35-44.
- [36] CONSTANTINO, M. A.; PAKONSTANTINO, E.; BENAKI, D. et al. (2004) Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with principal component analysis in detecting inborn errors of metabolism using blood spots: a metabonomic approach, *Anal. Chim. Acta*, 511, 303-312.
- [37] CONSTANTINO, M. A.; PAKONSTANTINO, E.; SPRAUL, M. et al. (2005) ¹H-NMR-based metabonomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in urine, *Anal. Chim. Acta*, 542, 169-177.
- [38] BRINDLE, J. T.; NICHOLSON, J. K.; SCHOFIELD, P. M.; GRAINGER, D. J. & HOLMES, E. (2003) Application of chemometrics to ¹H-NMR spectroscopic data to investigate a

- relationship between human serum metabolic profiles and hypertension, *Analyst*, 128, 32-36.
- [39] ODUNSI, K.; WOLLMAN, R. M.; AMBROSONE, C. B. et al. (2005) Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabonomics, *Int. J. Cancer*, 113, 782-788.
- [40] BRINDLE, J. T.; ANTTI, H.; HOLMES, E. et al. (2002) Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabonomics, *Nat. Med.*, 8, 1439-1444.
- [41] HOLMES, E.; TSANG, T. M. & TABRIZI, S. J. (2006) The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders, *NeuroRx*, 3, 358-372.
- [42] THART, B. A.; VOGELS, J. T. W. E.; SPIJKSMA, G. et al. (2003) ¹H-NMR spectroscopy combined with pattern recognition analysis reveals characteristic chemical patterns in urines of MS patients and non-human primates with MS-like disease, *J. Neurol. Sci.*, 212, 21-30.
- [43] HOLMES, E.; TSANG, T. M.; HUANG, J. T. J. et al. (2006) Metabolic profiling of CSF: evidence that early intervention may impact on disease progression and outcome in schizophrenia, *PLoS Medicine*, 3, 1420-1428.
- [44] COEN, M.; O'SULLIVAN, M.; BUBB WILLIAM, A.; KUCHEL PHILIP, W. & SORRELL, T. (2005) Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomics for rapid diagnosis of meningitis and ventriculitis, *Clin. Infect. Diseases*, 41, 1582-1590.
- [45] LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. & EVERETT, J. R. (1999) NMR spectroscopy of biofluids, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 38, 1-88.
- [46] GERMAN, J. B.; ROBERTS, M.-A. & WATKINS, S. M. (2003) Personal metabolomics as a next generation nutritional assessment, *J. Nutr.*, 133, 4260-4266.
- [47] GERMAN, J. B.; HAMMOCK, B. D. & WATKINS, S. M. (2005) Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health, *Metabolomics*, 1, 3-9.
- [48] VAN DORSTEN, F. A.; DAYKIN, C. A.; MULDER, T. P. J. & VAN DUYNHOVEN, J. P. M. (2006) Metabonomics approach to determine metabolic differences between green tea and black tea consumption, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6929-6938.
- [49] SOLANKY, K. S.; BAILEY, N. J. C.; HOLMES, E. et al. (2001) NMR and pattern recognition studies on the biochemistry of black tea-derived polyphenolic compounds in the rat, *Spec. Publ. - R. Soc. Chem.*, 269, 140-142.
- [50] SOLANKY, K. S.; BAILEY, N. J.; HOLMES, E. et al. (2003) NMR-based metabonomic studies on the biochemical effects of epicatechin in the rat, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4139-4145.
- [51] SOLANKY, K. S.; BAILEY, N. J. C.; BECKWITH-HALL, B. M. et al. (2003) Application of biofluid ¹H nuclear magnetic resonance-based metabonomic techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile, *Anal. Biochem.*, 323, 197-204.
- [52] SOLANKY, K. S.; BAILEY, N. J.; BECKWITH-HALL, B. M. et al. (2005) Biofluid ¹H-NMR-based metabonomic techniques in nutrition research - metabolic effects of dietary isoflavones in humans, *J. Nutr. Biochem.*, 16, 236-244.
- [53] WANG, Y.; TANG, H.; NICHOLSON, J. K. et al. (2005) A metabonomic strategy for the detection of the metabolic effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) ingestion, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 191-196.
- [54] WANG, Y.; HOLMES, E.; TANG, H. et al. (2006) Experimental metabonomic model of dietary variation and stress interactions, *J. Proteome Res.*, 5, 1535-1542.
- [55] WANG, Y.; LAWLER, D.; LARSON, B. et al. (2007) Metabonomic Investigations of Aging and Caloric Restriction in a Life-Long Dog Study, *J. Proteome Res.*, 6, 1846-1854.
- [56] STELLA, C.; BECKWITH-HALL, B.; CLOAREC, O. et al. (2006) Susceptibility of human metabolic phenotypes to dietary modulation, *J. Proteome Res.*, 5, 2780-2788.

- [57] WALSH, M. C.; BRENNAN, L.; MALTHOUSE, J. P. G.; ROCHE, H. M. & GIBNEY, M. J. (2006) Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, 84, 531-539.
- [58] LENZ, E. M.; BRIGHT, J.; WILSON, I. D.; MORGAN, S. R. & NASH, A. F. (2003) A ¹H-NMR-based metabolomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33, 1103-1115.
- [59] LENZ, E. M.; BRIGHT, J.; WILSON, I. D. et al. (2004) Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ¹H-NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36, 841-849.
- [60] BERTRAM, H. C.; HOPPE, C.; PETERSEN, B. O. et al. (2007) An NMR-based metabolomic investigation on effects of milk and meat protein diets given to 8-year-old boys, *Br. J. Nutr.*, 97, 758-763.
- [61] MARTIN, F.-P. J.; VERDU, E. F.; WANG, Y. et al. (2006) Transgenomic metabolic interactions in a mouse disease model: Interactions of *Trichinella spiralis* infection with dietary *Lactobacillus paracasei* supplementation, *J. Proteome Res.*, 5, 2185-2193.
- [62] ROBERTSON, D. G.; REILY, M. D. & BAKER, J. D. (2007) Metabonomics in Pharmaceutical Discovery and Development, *J. Proteome Res.*, 6, 526-539.
- [63] MANETTI, C.; BIANCHETTI, C.; BIZZARRI, M. et al. (2004) NMR-based metabolomic study of transgenic maize, *Phytochemistry*, 65, 3187-3198.
- [64] OTT, K.-H.; ARANIBAR, N.; SINGH, B. & STOCKTON GERALD, W. (2003) Metabonomics classifies pathways affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts, *Phytochemistry*, 62, 971-985.
- [65] FIEHN, O. (2002) Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes, *Plant Mol. Biol.*, 48, 155-171.
- [66] FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P. et al. (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics, *Nat. Biotechnol.*, 18, 1157-1161.
- [67] VIANT, M. R. (2008) Environmental metabolomics using ¹H-NMR spectroscopy, *Methods Mol. Biol.*, 410, 137-150.
- [68] VIANT, M. R. (2007) Metabolomics of aquatic organisms: the new 'omics' on the block, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 332, 301-306.
- [69] VIANT, M. R.; ROSENBLUM, E. S. & TJEERDEMA, R. S. (2003) NMR-Based Metabolomics: A Powerful Approach for Characterizing the Effects of Environmental Stressors on Organism Health, *Environ. Sci. Technol.*, 37, 4982-4989.
- [70] GRIFFIN, J. L. & SHOCKCOR, J. P. (2004) Metabolic profiles of cancer cells, *Nat. Rev. Cancer*, 4, 551-561.
- [71] IPPOLITO, J. E.; XU, J.; JAIN, S. et al. (2005) An integrated functional genomics and metabolomics approach for defining poor prognosis in human neuroendocrine cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 9901-9906.
- [72] VAN DER WERF, M. J.; OVERKAMP, K. M.; MUILWIJK, B.; COULIER, L. & HANKEMEIER, T. (2007) Microbial metabolomics: Toward a platform with full metabolome coverage, *Anal. Biochem.*, 370, 17-25.
- [73] VAN DER WERF, M. J.; JELLEMA, R. H. & HANKEMEIER, T. (2005) Microbial metabolomics: replacing trial-and-error by the unbiased selection and ranking of targets, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 234-252.
- [74] KOEK, M. M.; MUILWIJK, B.; VAN DER WERF, M. J. & HANKEMEIER, T. (2006) Microbial Metabolomics with Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 78, 1272-1281.
- [75] CHEN, H.; WORTMANN, A. & ZENOBI, R. (2007) Neutral desorption sampling coupled to extractive electrospray ionization mass spectrometry for rapid differentiation of biosamples by metabolomic fingerprinting, *J. Mass Spectrom.*, 42, 1123-1135.

- [76] TARACHIWIN, L.; UTE, K.; KOBAYASHI, A. & FUKUSAKI, E. (2007) ¹H-NMR Based Metabolic Profiling in the Evaluation of Japanese Green Tea Quality, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9330-9336.
- [77] ROCHFORD, S. (2005) Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research, *J. Nat. Prod.*, 68, 1813-1820.
- [78] KRISHNAN, P.; KRUGER, N. J. & RATCLIFFE, R. G. (2005) Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR, *J. Exp. Bot.*, 56, 255-265.
- [79] NICHOLLS, A. W.; MORTISHIRE-SMITH, R. J. & NICHOLSON, J. K. (2003) NMR Spectroscopic-Based Metabonomic Studies of Urinary Metabolite Variation in Acclimatizing Germ-Free Rats, *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 1395-1404.
- [80] WILLIAMS, R. E.; EYTON-JONES, H. W.; FARNWORTH, M. J.; GALLAGHER, R. & PROVAN, W. M. (2002) Effect of intestinal microflora on the urinary metabolic profile of rats: a ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy study, *Xenobiotica*, 32, 783-794.
- [81] BOLLARD, M. E.; HOLMES, E.; LINDON, J. C. et al. (2001) Investigations into biochemical changes due to diurnal variation and estrus cycle in female rats using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy of urine and pattern recognition, *Anal. Biochem.*, 295, 194-202.
- [82] NICHOLSON, J. K. & WILSON, I. D. (1989) High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 21, 449-501.
- [83] SONG, E. J.; BABAR, S. M. E.; OH, E. et al. (2008) CE at the omics level: towards systems biology - an update, *Electrophoresis*, 29, 129-142.
- [84] ULLSTEN, S.; DANIELSSON, R.; BAECKSTROEM, D.; SJOEBERG, P. & BERGQUIST, J. (2006) Urine profiling using capillary electrophoresis-mass spectrometry and multivariate data analysis, *J. Chromatogr. A*, 1117, 87-93.
- [85] SURESH, B. C. V.; SONG, E. J.; BABAR, S. M. E.; WI, M. H. & YOO, Y. S. (2006) Capillary electrophoresis at the omics level: towards systems biology, *Electrophoresis*, 27, 97-110.
- [86] RAMAUTAR, R.; DEMIRCI, A. & DE JONG, G. J. (2006) Capillary electrophoresis in metabolomics, *Trends Anal. Chem.*, 25, 455-466.
- [87] BOETTCHER, C.; ROEPENACK-LAHAYE, E. v.; WILLSCHER, E.; SCHEEL, D. & CLEMENS, S. (2007) Evaluation of Matrix Effects in Metabolite Profiling Based on Capillary Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 79, 1507-1513.
- [88] IIDA, T.; YAMAGUCHI, M.; MATSUI, M. & YAMAGUCHI, S. (2006) Application of LCMS-IT-TOF mass spectrometer for proteomics analysis, *Shimadzu Hyoron*, 63, 19-28.
- [89] MADALINSKI, G.; GODAT, E.; ALVES, S. et al. (2008) Direct Introduction of Biological Samples into a LTQ-Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer as a Tool for Fast Metabolome Analysis, *Anal. Chem.*, 80, 3291-3303.
- [90] LAFAYE, A.; JUNOT, C.; RAMOUNET-LE GALL, B. et al. (2003) Metabolite profiling in rat urine by liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry. Application to the study of heavy metal toxicity, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2541-2549.
- [91] STANLEY, E. G.; BAILEY, N. J. C.; BOLLARD, M. E. et al. (2005) Sexual dimorphism in urinary metabolite profiles of Han Wistar rats revealed by nuclear-magnetic-resonance-based metabonomics, *Anal. Biochem.*, 343, 195-202.
- [92] SMITH, C. A.; O'MAILLE, G.; WANT, E. J. et al. (2005) METLIN. A metabolite mass spectral database, *Ther. Drug Monit.*, 27, 747-751.
- [93] LENZ, E. M.; BRIGHT, J.; KNIGHT, R.; WILSON, I. D. & MAJOR, H. (2004) A metabonomic investigation of the biochemical effects of mercuric chloride in the rat using ¹H-NMR and HPLC-TOF/MS: time dependant changes in the urinary profile of endogenous metabolites as a result of nephrotoxicity, *Analyst*, 129, 535-541.
- [94] LENZ, E. M.; BRIGHT, J.; KNIGHT, R.; WILSON, I. D. & MAJOR, H. (2004) Cyclosporin A-induced changes in endogenous metabolites in rat urine: a metabonomic investigation

- using high field $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, HPLC-TOF/MS and chemometrics, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35, 599-608.
- [95] LENZ, E. M.; BRIGHT, J.; KNIGHT, R. et al. (2005) Metabonomics with $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry applied to the investigation of metabolic changes caused by gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat, *Biomarkers*, 10, 173-187.
- [96] WILLIAMS, R. E.; MAJOR, H.; LOCK, E. A.; LENZ, E. M. & WILSON, I. D. (2005) D-Serine-induced nephrotoxicity: a HPLC-TOF/MS-based metabonomics approach, *Toxicology*, 207, 179-190.
- [97] LAFAYE, A.; JUNOT, C.; RAMOUNET-LE GALL, B. et al. (2004) Profiling of sulfoconjugates in urine by using precursor ion and neutral loss scans in tandem mass spectrometry. Application to the investigation of heavy metal toxicity in rats, *J. Mass Spectrom.*, 39, 655-664.
- [98] GAVAGHAN, C. L.; NICHOLSON, J. K.; CONNOR, S. C. et al. (2001) Directly coupled high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopic with chemometric studies on metabolic variation in Sprague-Dawley rats, *Anal. Biochem.*, 291, 245-252.
- [99] PLUMB, R.; GRANGER, J.; STUMPF, C. et al. (2003) Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-TOFMS): detection of strain, diurnal and gender differences, *Analyst*, 128, 819-823.
- [100] WILLIAMS, R.; LENZ, E. M.; WILSON, A. J. et al. (2006) A multi-analytical platform approach to the metabonomic analysis of plasma from normal and zucker (fa/fa) obese rats, *Mol. BioSyst.*, 2, 174-183.
- [101] WILLIAMS, R. E.; LENZ, E. M.; RANTALAINEN, M. & WILSON, I. D. (2006) The comparative metabonomics of age-related changes in the urinary composition of male Wistar-derived and Zucker (fa/fa) obese rats, *Mol. BioSyst.*, 2, 193-202.
- [102] KIND, T.; TOLSTIKOV, V.; FIEHN, O. & WEISS, R. H. (2007) A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer, *Anal. Biochem.*, 363, 185-195.
- [103] SABATINE, M. S.; LIU, E.; MORROW, D. A. et al. (2005) Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia, *Circulation*, 112, 3868-3875.
- [104] WANG, C.; KONG, H.; GUAN, Y. et al. (2005) Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and multivariate statistical analysis, *Anal. Chem.*, 77, 4108-4116.
- [105] VAN, Q. N.; KLOSE, J. R.; LUCAS, D. A. et al. (2003) The use of urine proteomic and metabonomic patterns for the diagnosis of interstitial cystitis and bacterial cystitis, *Dis. Markers*, 19, 169-183.
- [106] YIN, P.; ZHAO, X.; LI, Q. et al. (2006) Metabonomics Study of Intestinal Fistulas Based on Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled to Q-TOF Mass Spectrometry (UPLC/Q-TOF MS), *J. Proteome Res.*, 5, 2135-2143.
- [107] YANG, J.; XU, G.; ZHENG, Y. et al. (2004) Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases, *J. Chromatogr. B*, 813, 59-65.
- [108] YANG, J.; XU, G.; ZHENG, Y. et al. (2005) Strategy for metabonomics research based on high-performance liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1084, 214-221.
- [109] YANG, J.; ZHAO, X.; LIU, X. et al. (2006) High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Metabonomics: Potential Biomarkers for Acute Deterioration of Liver Function in Chronic Hepatitis B, *J. Proteome Res.*, 5, 554-561.

- [110] LUTZ, U.; BITTNER, N.; LUTZ, R. W. & LUTZ, W. K. (2008) Metabolite profiling in human urine by LC-MS/MS: Method optimization and application for glucuronides from dextromethorphan metabolism, *J. Chromatogr. B*, 871, 349-356.
- [111] LUTZ, W. K. (1984) Structural characteristics of compounds that can be activated to chemically reactive metabolites: use for a prediction of a carcinogenic potential, *Arch. Toxicol. Suppl.*, 7, 194-207.
- [112] HINCHMAN, C. A. & BALLATORI, N. (1994) Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process, *J. Toxicol. Environ. Health*, 41, 387-409.
- [113] PEARSON, R. G. & SONGSTAD, J. (1967) Application of the principle of hard and soft acids and bases to organic chemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 1827-1836.
- [114] PARK, B. K.; KITTERINGHAM, N. R.; MAGGS, J. L.; PIRMOHAMED, M. & WILLIAMS, D. P. (2005) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 177-202.
- [115] WU, G.; FANG, Y.-Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R. & TURNER, N. D. (2004) Glutathione metabolism and its implications for health, *J. Nutr.*, 134, 489-492.
- [116] SAVIDES, M. C. & OEHME, F. W. (1983) Acetaminophen and its toxicity, *J. Appl. Toxicol.*, 3, 96-111.
- [117] BAILEY, M. J. & DICKINSON, R. G. (2003) Acyl glucuronide reactivity in perspective: biological consequences, *Chem. Biol. Interact.*, 145, 117-137.
- [118] PERBELLINI, L.; VERONESE, N. & PRINCIVALLE, A. (2002) Mercapturic acids in the biological monitoring of occupational exposure to chemicals, *J. Chromatogr. B*, 781, 269-290.
- [119] MANINI, P.; ANDREOLI, R.; BERGAMASCHI, E. et al. (2000) A new method for the analysis of styrene mercapturic acids by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14, 2055-2060.
- [120] VOLKEL, W.; COLNOT, T.; CSANADY, G. A.; FILSER, J. G. & DEKANT, W. (2002) Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration, *Chem. Res. Toxicol.*, 15, 1281-1287.
- [121] SCHOLZ, K. (2006) Development and Evaluation of a Generic HPLC-Tandem MS Screening Method for the Detection of Potential Biomarkers for Reactive Intermediates, *Dissertation*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- [122] MELIKIAN, A. A.; O'CONNOR, R.; PRAHALAD, A. K. et al. (1999) Determination of the urinary benzene metabolites S-phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Carcinogenesis*, 20, 719-726.
- [123] VOLKEL, W. & DEKANT, W. (1998) Chlorothioketene, the ultimate reactive intermediate formed by cysteine conjugate beta-lyase-mediated cleavage of the trichloroethene metabolite S-(1,2-Dichlorovinyl)-L-cysteine, forms cytosine adducts in organic solvents, but not in aqueous solution, *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 1082-1088.
- [124] VOLKEL, W.; FRIEDEWALD, M.; LEDERER, E. et al. (1998) Biotransformation of perchloroethene: dose-dependent excretion of trichloroacetic acid, dichloroacetic acid, and N-acetyl-S-(trichlorovinyl)-L-cysteine in rats and humans after inhalation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 20-27.
- [125] IMAI, T.; CHO, Y. M.; HASUMURA, M. & HIROSE, M. (2005) Enhancement by acrylamide of N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumor development-possible application for a model to detect co-modifiers of carcinogenesis, *Cancer Lett.*, 230, 25-32.
- [126] KELLERT, M.; WAGNER, S.; LUTZ, U. & LUTZ, W. K. (2008) Biomarkers of Furan Exposure by Metabolic Profiling of Rat Urine with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Principal Component Analysis, *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 761-768.

- [127] TURESKY, R. J.; CONSTABLE, A.; RICHOSZ, J. et al. (1998) Activation of Heterocyclic Aromatic Amines by Rat and Human Liver Microsomes and by Purified Rat and Human Cytochrome P450 1A2, *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 925-936.
- [128] WEIß, T.; EWERS, U.; FLIEGER, A. & ANGERER, J. (2000) Innere Belastung der Allgemeinbevölkerung mit Amino- und Nitroaromatischen Verbindungen, *Umweltmed. Forsch. Prax.*, 5, 101-106.
- [129] KASSAHUN, K.; DAVIS, M.; HU, P.; MARTIN, B. & BAILLIE, T. (1997) Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: identification of phase I metabolites and glutathione conjugates, *Chem. Res. Toxicol.*, 10, 1228-1233.
- [130] SCHOLL, P. F.; MUSSER, S. M. & GROOPMAN, J. D. (1997) Synthesis and characterization of aflatoxin B1 mercapturic acids and their identification in rat urine, *Chem. Res. Toxicol.*, 10, 1144-1151.
- [131] RUBIN, H. (2001) Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates, *Carcinogenesis*, 22, 1903-1930.
- [132] MORI, Y. (2005) The role of metabolic activation in modification of heterocyclic amine- or N-nitrosamine-induced carcinogenesis in rodents, *Carcinogenesis and Modification of Carcinogenesis*, 57-96.
- [133] ALARY, J.; GUERAUD, F. & CRAVEDI, J.-P. (2003) Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways, *Mol. Asp. Med.*, 24, 177-187.
- [134] BLAIR, I. A. (2006) Endogenous glutathione adducts, *Curr. Drug Metab.*, 7, 853-872.
- [135] STRANGE, R. C.; SPITERI, M. A.; RAMACHANDRAN, S. & FRYER, A. A. (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes, *Mutat. Res.*, 482, 21-26.
- [136] DE ROOIJ, B. M.; COMMANDEUR, J. N. M. & VERMEULEN, N. P. E. (1998) Mercapturic acids as biomarkers of exposure to electrophilic chemicals: applications to environmental and industrial chemicals, *Biomarkers*, 3, 239-303.
- [137] MILNE, G. L.; GAO, L.; PORTA, A. et al. (2005) Identification of the major urinary metabolite of the highly reactive cyclopentenone isoprostane 15-A2t-isoprostane in vivo, *J. Biol. Chem.*, 280, 25178-25184.
- [138] WERNER, M.; BIRNER, G. & DEKANT, W. (1996) Sulfoxidation of mercapturic acids derived from tri- and tetrachloroethene by cytochromes P450 3A: a bioactivation reaction in addition to deacetylation and cysteine conjugate beta-lyase mediated cleavage, *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 41-49.
- [139] TIMBRELL, J. A. (1998) Biomarkers in toxicology, *Toxicology*, 129, 1-12.
- [140] VAN WELIE, R. T.; VAN DIJCK, R. G.; VERMEULEN, N. P. & VAN SITTERT, N. J. (1992) Mercapturic acids, protein adducts, and DNA adducts as biomarkers of electrophilic chemicals, *Crit. Rev. Toxicol.*, 22, 271-306.
- [141] HAUFROID, V. & LISON, D. (2005) Mercapturic acids revisited as biomarkers of exposure to reactive chemicals in occupational toxicology: a minireview, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 78, 343-354.
- [142] SEUTTER-BERLAGE, F.; VAN DORP, H. L.; KOSSE, H. G. & HENDERSON, P. T. (1977) Urinary mercapturic acid excretion as a biological parameter of exposure to alkylating agents, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 39, 45-51.
- [143] JONGENELEN, F. J.; DIRVEN, H. A.; LEIJDEKKERS, C. M. et al. (1987) S-phenyl-N-acetylcysteine in urine of rats and workers after exposure to benzene, *J. Anal. Toxicol.*, 11, 100-104.
- [144] MAESTRI, L.; GHITTORI, S. & IMBRIANI, M. (1996) Determination of urinary mercapturic acids of styrene in man by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B*, 687, 387-394.

- [145] TOYOOKA, T.; SUZUKI, T.; SAITO, Y. & TAKAHASHI, A. (1989) Electrochemical detection of mercapturic acid derivatives after separation by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 475, 391-399.
- [146] MARCO, M. P.; NASIRI, M.; KURTH, M. J. & HAMMOCK, B. D. (1993) Enzyme-linked immunosorbent assay for the specific detection of the mercapturic acid metabolites of naphthalene, *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 284-293.
- [147] LOHSE, C.; JAEGER, L. L.; STAIMER, N. et al. (2000) Development of a Class-Selective Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Mercapturic Acids in Human Urine, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5913-5923.
- [148] HALLIER, E.; GOERGENS, H. W.; KARELS, H. & GOLKA, K. (1995) A note on individual differences in the urinary excretion of optical enantiomers of styrene metabolites and of styrene-derived mercapturic acids in humans, *Arch. Toxicol.*, 69, 300-305.
- [149] VOLKEL, W.; PAHLER, A. & DEKANT, W. (1999) Gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry as a powerful tool for the detection of mercapturic acids and DNA and protein adducts as biomarkers of exposure to halogenated olefins, *J. Chromatogr. A*, 847, 35-46.
- [150] GOPAUL, S. V.; FARRELL, K. & ABBOTT, F. S. (2000) Gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry quantitative profiling of N-acetylcysteine conjugates of valproic acid in urine: application in drug metabolism studies in humans, *J. Mass Spectrom.*, 35, 698-704.
- [151] MORIWAKI, H.; TSUJIMOTO, Y.; NODA, T.; SHIMIZU, M. & TANAKA, M. (2000) Determination of mercapturic acids in urine by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Analyst*, 125, 715-718.
- [152] LINHART, I.; WEIDENHOFFER, Z.; SEDMERA, P.; POLASEKJ, M. & SMEJKAL, J. (1996) Biotransformation of diethenylbenzenes, V. Identification of urinary metabolites of 1,2-diethenylbenzene in the rat, *Xenobiotica*, 26, 1263-1272.
- [153] MRAZ, J. & TURECEK, F. (1987) Identification of N-acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine, a human metabolite of N,N-dimethylformamide and N-methylformamide, *J. Chromatogr.*, 414, 399-404.
- [154] EINIG, T.; DUNEMANN, L. & DEHNEN, W. (1996) Sensitive gas chromatographic method for determination of mercapturic acids in human urine, *J. Chromatogr. B*, 687, 379-385.
- [155] VAN WELIE, R. T.; VAN DUYN, P. & VERMEULEN, N. P. (1989) Determination of two mercapturic acid metabolites of 1,3-dichloropropene in human urine with gas chromatography and sulphur-selective detection, *J. Chromatogr.*, 496, 463-471.
- [156] URBAN, M.; GILCH, G.; SCHEPERS, G.; VAN MIERT, E. & SCHERER, G. (2003) Determination of the major mercapturic acids of 1,3-butadiene in human and rat urine using liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 796, 131-140.
- [157] VERMEULEN, M.; VAN ROOIJEN, H. J. & VAES, W. H. (2003) Analysis of isothiocyanate mercapturic acids in urine: a biomarker for cruciferous vegetable intake, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3554-3559.
- [158] MORIWAKI, H.; WATANABE, A.; ARAKAWA, R. et al. (2002) Simultaneous determination of metabolites of trimethylbenzenes, dimethylbenzylmercapturic acid and dimethylhippuric acid, in human urine by solid-phase extraction followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 37, 1152-1157.
- [159] MALLY, A.; AMBERG, A.; HARD, G. C. & DEKANT, W. (2007) Are 4-hydroxy-2(E)-nonenal derived mercapturic acids and 1H-NMR metabonomics potential biomarkers of chemically induced oxidative stress in the kidney?, *Toxicology*, 230, 244-255.
- [160] RATHAHO, E.; PEIRO, G.; MARTINS, N. et al. (2005) Liquid chromatography-multistage tandem mass spectrometry for the quantification of dihydroxynonene mercapturic acid

- (DHN-MA), a urinary end-metabolite of 4-hydroxynonenal, *Anal. Bioanal. Chem.*, 381, 1532-1539.
- [161] LIAO, P. C.; LI, C. M.; LIN, L. C.; HUNG, C. W. & SHIH, T. S. (2002) An online automatic sample cleanup system for the quantitative detection of the benzene exposure biomarker S-phenylmercapturic acid in human urine by electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.*, 26, 205-210.
- [162] ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; KETTANEH-WOLD, N. & WOLD, S. (2001) Multi- and Megavariate Data Analysis - Principles and Applications, *Umetrics Academy, Umea, Schweden*, ISBN 91-973730-1-X.
- [163] WOLD, S.; ESBENSEN, K. & GELADI, P. (1987) Principal component analysis, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2, 37-52.
- [164] JACKSON, J. E. (1991) A User's Guide to Principal Components, *John Wiley, New York*, ISBN 0-471-62267-2.
- [165] PEARSON, K. (1901) Principal Components Analysis, *The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal*, 6, 566.
- [166] TRYGG, J.; HOLMES, E. & LUNDSTEDT, T. (2007) Chemometrics in Metabonomics, *J. Proteome Res.*, 6, 469-479.
- [167] ROBERTSON, D. G.; REILY, M. D.; SIGLER, R. E. et al. (2000) Metabonomics: evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid in vivo screening of liver and kidney toxicants, *Toxicol. Sci.*, 57, 326-337.
- [168] WILLIAMS, R. E.; JACOBSEN, M. & LOCK, E. A. (2003) ¹H-NMR pattern recognition and ³¹P-NMR studies with D-Serine in rat urine and kidney, time- and dose-related metabolic effects, *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 1207-1216.
- [169] KEUN, H. C.; EBBELS, T. M. D.; ANTTI, H. et al. (2002) Analytical Reproducibility in ¹H-NMR-Based Metabonomic Urine analysis, *Chem. Res. Toxicol.*, 15, 1380-1386.
- [170] LAY, J. O.; LIYANAGE, R.; BORGMANN, S. & WILKINS, C. L. (2006) Problems with the "omics", *Trends Anal. Chem.*, 25, 1046-1056.
- [171] GU, H.; PAN, Z.; DUDA, C. et al. (2007) ¹H-NMR study of the effects of sample contamination in the metabolomic analysis of mouse urine, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 45, 134-140.
- [172] BECKWITH-HALL, B. M.; BRINDLE JOANNE, T.; BARTON RICHARD, H. et al. (2002) Application of orthogonal signal correction to minimise the effects of physical and biological variation in high resolution ¹H-NMR spectra of biofluids, *Analyst*, 127, 1283-1288.
- [173] BECKWITH-HALL, B., M.; HOLMES, E.; LINDON JOHN, C. et al. (2002) NMR-based metabonomic studies on the biochemical effects of commonly used drug carrier vehicles in the rat, *Chem. Res. Toxicol.*, 15, 1136-1141.
- [174] STAHL, L. & WOLD, S. (1987) Partial least squares analysis with cross-validation for the two-class problem: a Monte Carlo study, *J. Chemom.*, 1, 185-196.
- [175] TRYGG, J. & WOLD, S. (2002) Orthogonal projections to latent structures (O-PLS), *J. Chemom.*, 16, 119-128.
- [176] ANTTI, H.; EBBELS, T. M. D.; KEUN, H. C. et al. (2004) Statistical experimental design and partial least squares regression analysis of biofluid metabonomic NMR and clinical chemistry data for screening of adverse drug effects, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 73, 139-149.
- [177] LU, G.; WANG, J.; ZHAO, X.; KONG, H. & XU, G. (2006) Study on gender difference based on metabolites in urine by ultra high performance liquid chromatography/time of flight mass spectrometry, *Chin. J. Chromatogr.*, 24, 109-113.
- [178] GAVAGHAN, C. L.; WILSON, I. D. & NICHOLSON, J. K. (2002) Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies: use of orthogonal signal correction and PLS-DA, *FEBS Lett.*, 530, 191-196.

- [179] LINDON, J. C.; HOLMES, E. & NICHOLSON, J. K. (2001) Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 39, 1-40.
- [180] SciFinder Scholar, American Chemical Society, Version 2006.
- [181] DOLE, M.; MACK, L. L.; HINES, R. L. et al. (1968) Molecular beams of macroions, *J. Chem. Physics*, 49, 2240-2249.
- [182] IRIBARNE, J. V. & THOMSON, B. A. (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets, *J. Chem. Phys.*, 64, 2287-2294.
- [183] THOMSON, B. A. & IRIBARNE, J. V. (1979) Field-induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure, *J. Chem. Phys.*, 71, 4451-4463.
- [184] NGUYEN, S. & FENN, J. B. (2007) Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 1111-1117.
- [185] FENN, J. B. (2003) Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 42, 3871-3894.
- [186] HOPFGARTNER, G.; VARESI, E.; TSCHAPPAT, V. et al. (2004) Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules, *J. Mass Spectrom.*, 39, 845-855.
- [187] HOPFGARTNER, G.; HUSSER, C. & ZELL, M. (2003) Rapid screening and characterization of drug metabolites using a new quadrupole-linear ion trap mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.*, 38, 138-150.
- [188] LUTZ, U.; LUTZ, R. W. & LUTZ, W. K. (2006) Metabolic Profiling of Glucuronides in Human Urine by LC-MS/MS and Partial Least-Squares Discriminant Analysis for Classification and Prediction of Gender, *Anal. Chem.*, 78, 4564-4571.
- [189] LAFAYE, A.; JUNOT, C.; RAMOUNET-LE GALL, B. et al. (2004) Profiling of sulfoconjugates in urine by using precursor ion and neutral loss scans in tandem mass spectrometry. Application to the investigation of heavy metal toxicity in rats, *J. Mass Spectrom.*, 39, 655-664.
- [190] LUTZ, U.; BITTNER, N.; LUTZ, R. W. & LUTZ, W. K. (2008) Metabolite profiling in human urine by LC-MS/MS: Method optimization and application for glucuronides from dextromethorphan metabolism, *J. Chromatogr. B.*, 871, 349-356
- [191] KANALY, R. A.; HANAOKA, T.; SUGIMURA, H. et al. (2006) Development of the Adductome Approach to Detect DNA Damage in Humans, *Antioxid. Redox Signaling*, 8, 993-1001.
- [192] CASTRO-PEREZ, J.; PLUMB, R.; LIANG, L. & YANG, E. (2005) A high-throughput liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for screening glutathione conjugates using exact mass neutral loss acquisition, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 798-804.
- [193] QU, J.; LIANG, Q.; LUO, G. & WANG, Y. (2004) Screening and identification of glycosides in biological samples using energy-gradient neutral loss scan and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 76, 2239-2247.
- [194] KELLERT, M.; WAGNER, S.; LUTZ, U. & LUTZ, W. K. (2008) Biomarkers of Furan Exposure by Metabolic Profiling of Rat Urine with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Principal Component Analysis, *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 761-768
- [195] BOLLARD, M. E.; STANLEY, E. G.; WANG, Y. et al. (2005) Physiological variation in laboratory animals and humans, *Metabonomics in Toxicity Assessment*, 397-451.
- [196] JONES, A. D.; WINTER, C. K.; BUONARATI, M. H. & SEGALL, H. J. (1993) Analysis of mercapturic acid conjugates of xenobiotic compounds using negative ionization and tandem mass spectrometry, *Biol. Mass Spectrom.*, 22, 68-76.
- [197] SCHOLZ, K.; DEKANT, W.; VÖLKE, W. & PÄHLER, A. (2005) Rapid Detection and Identification of *N*-Acetyl-*L*-cysteine Thioethers Using Constant Neutral Loss and Theoretical Multiple Reaction Monitoring Combined with Enhanced Product-Ion Scans on a linear Ion Trap Mass Spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16, 1976-1984.

- [198] MUELLER, C. A.; WEINMANN, W.; DRESEN, S.; SCHREIBER, A. & GERGOV, M. (2005) Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 1332-1338.
- [199] STOYANOVA, R.; NICHOLLS, A. W.; NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. & BROWN, T. R. (2004) Automatic alignment of individual peaks in large high-resolution spectral data sets, *J. Magn. Reson.*, 170, 329-335.
- [200] WILSON, I. D.; PLUMB, R.; GRANGER, J. et al. (2005) HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics, *J. Chromatogr. B*, 817, 67-76.
- [201] KATAJAMAA, M. & ORESIC, M. (2007) Data processing for mass spectrometry-based metabolomics, *J. Chromatogr. A*, 1158, 318-328.
- [202] SMITH, C. A.; WANT, E. J.; O'MAILLE, G.; ABAGYAN, R. & SIUZDAK, G. (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification, *Anal. Chem.*, 78, 779-787.
- [203] KATAJAMAA, M.; MIETTINEN, J. & ORESIC, M. (2006) MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data, *Bioinformatics*, 22, 634-636.
- [204] DURAN, A. L.; YANG, J.; WANG, L. & SUMNER, L. W. (2003) Metabolomics spectral formatting, alignment and conversion tools (MSFACTs), *Bioinformatics*, 19, 2283-2293.
- [205] BROECKLING, C. D.; REDDY, I. R.; DURAN, A. L.; ZHAO, X. & SUMNER, L. W. (2006) MET-IDEA: Data Extraction Tool for Mass Spectrometry-Based Metabolomics, *Anal. Chem.*, 78, 4334-4341.
- [206] BARAN, R.; KOCHI, H.; SAITO, N. et al. (2006) MathDAMP: a package for differential analysis of metabolite profiles, *BMC Bioinformatics*, 7, 530.
- [207] KATZ, J. E.; DURLAO, D. S.; CLARKE, S. & HAU, J. (2004) A new technique (COMSPARI) to facilitate the identification of minor compounds in complex mixtures by GC/MS and LC/MS: tools for the visualization of matched datasets, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 580-584.
- [208] BIJLSMA, S.; BOBELDIJK, I.; VERHEIJ, E. R. et al. (2006) Large-Scale Human Metabolomics Studies: A Strategy for Data (Pre-) Processing and Validation, *Anal. Chem.*, 78, 567-574.
- [209] KELLERT, M.; SCHOLZ, K.; WAGNER, S.; DEKANT, W. & VOLKEL, W. (2006) Quantitation of mercapturic acids from acrylamide and glycidamide in human urine using a column switching tool with two trap columns and electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1131, 58-66.
- [210] DEKANT, W.; METZLER, M. & HENSCHLER, D. (1986) Identification of S-1,2,2-trichlorovinyl-N-acetylcysteine as a urinary metabolite of tetrachloroethylene: bioactivation through glutathione conjugation as a possible explanation of its nephrocarcinogenicity, *J. Biochem. Toxicol.*, 1, 57-72.
- [211] BOETTCHER, M. I. & ANGERER, J. (2005) Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC-ESI-MS/MS, *J. Chromatogr. B*, 824, 283-294.
- [212] CLOAREC, O.; DUMAS, M. E.; TRYGG, J. et al. (2005) Evaluation of the Orthogonal Projection on Latent Structure Model Limitations Caused by Chemical Shift Variability and Improved Visualization of Biomarker Changes in ¹H-NMR Spectroscopic Metabonomic Studies, *Anal. Chem.*, 77, 517-526.
- [213] VORST, O.; DE VOS, C. H. R.; LOMMEN, A. et al. (2005) A non-directed approach to the differential analysis of multiple LC-MS-derived metabolic profiles, *Metabolomics*, 1, 169-180.

- [214] SHURUBOR, Y. I.; PAOLUCCI, U.; KRASNIKOV, B. F.; MATSON, W. R. & KRISTAL, B. S. (2005) Analytical precision, biological variation, and mathematical normalization in high data density metabolomics, *Metabolomics*, 1, 75-85.
- [215] GIKA, H. G.; THEODORIDIS, G. A.; WINGATE, J. E. & WILSON, I. D. (2007) Within-Day Reproducibility of an HPLC-MS-Based Method for Metabonomic Analysis: Application to Human Urine, *J. Proteome Res.*, 6, 3291-3303.
- [216] SLUPSKY, C. M.; RANKIN, K. N.; WAGNER, J. et al. (2007) Investigations of the Effects of Gender, Diurnal Variation, and Age in Human Urinary Metabolomic Profiles, *Anal. Chem.*, 79, 6995-7004.
- [217] TEAHAN, O.; GAMBLE, S.; HOLMES, E. et al. (2006) Impact of Analytical Bias in Metabonomic Studies of Human Blood Serum and Plasma, *Anal. Chem.*, 78, 4307-4318.
- [218] LINDON, J. C.; KEUN, H. C.; EBBELS, T. M. et al. (2005) The Consortium for Metabonomic Toxicology (COMET): aims, activities and achievements, *Pharmacogenomics*, 6, 691-699.
- [219] CHEN, J.; ZHAO, X.; FRITSCH, J. et al. (2008) Practical Approach for the Identification and Isomer Elucidation of Biomarkers Detected in a Metabonomic Study for the Discovery of Individuals at Risk for Diabetes by Integrating the Chromatographic and Mass Spectrometric Information, *Anal. Chem.*, 80, 1280-1289.
- [220] JAMES, L. P.; MAYEUX, P. R. & HINSON, J. A. (2003) Acetaminophen-induced hepatotoxicity, *Drug Metab. Dispos.*, 31, 1499-1506.
- [221] LA, S.; YOO, H. H. & KIM, D.-H. (2005) Liquid Chromatography-Mass Spectrometric Analysis of Urinary Metabolites and Their Pattern Recognition for the Prediction of Drug-Induced Hepatotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.*, 18, 1887-1896.
- [222] GIRI, S.; IDLE, J. R.; CHEN, C. et al. (2006) A Metabolomic Approach to the Metabolism of the Areca Nut Alkaloids Arecoline and Arecaidine in the Mouse, *Chem. Res. Toxicol.*, 19, 818-827.
- [223] GIRI, S.; KRAUSZ, K. W.; IDLE, J. R. & GONZALEZ, F. J. (2007) The metabolomics of (+)-arecoline 1-oxide in the mouse and its formation by human flavin-containing monooxygenases, *Biochem. Pharmacol.*, 73, 561-573.
- [224] PLUMB, R. S.; STUMPF, C. L.; GRANGER, J. H. et al. (2003) Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2632-2638.
- [225] HÖSKULDSSON, A. (1996) Prediction Methods in Science and Technology, *Thor Publishing, Copenhagen, Denmark*, ISBN 8798594109.
- [226] WOLD, S.; ALBANO, C.; DUMM, W. J. et al. (1984) Multivariate Data Analysis in Chemistry, in: B.R. Kowalski (ed.) *Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry*, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland.
- [227] BOENIGER, M. F.; LOWRY, L. K. & ROSENBERG, J. (1993) Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 54, 615-627.
- [228] HOTELLING, H. (1933) Analysis of a Complex of Statistical Variables with Principal Components, *J. Educ. Psychol.*, 24, 498-520.
- [229] KEUN, H. C.; EBBELS, T. M. D.; ANTTI, H. et al. (2003) Improved analysis of multivariate data by variable stability scaling: application to NMR-based metabolic profiling, *Anal. Chim. Acta*, 490, 265-276.
- [230] RUBINGH, C. M.; BIJLSMA, S.; DERKS, E. P. P. A. et al. (2006) Assessing the performance of statistical validation tools for megavariate metabolomics data, *Metabolomics*, 2, 53-61.
- [231] VAN DER VOET, H. (1994) Comparing the predictive accuracy of models using a simple randomization test, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 25, 313-323.

- [232] CUBBON, S.; BRADBURY, T.; WILSON, J. & THOMAS-OATES, J. (2007) Hydrophilic Interaction Chromatography for Mass Spectrometric Metabonomic Studies of Urine, *Anal. Chem.*, 79, 8911-8918.
- [233] IDBORG, H.; ZAMANI, L.; EDLUND, P. O.; SCHUPPE-KOISTINEN, I. & JACOBSSON, S. P. (2005) Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 828, 9-13.
- [234] PLUMB, R. S.; RAINVILLE, P.; SMITH, B. W. et al. (2006) Generation of Ultrahigh Peak Capacity LC Separations via Elevated Temperatures and High Linear Mobile-Phase Velocities, *Anal. Chem.*, 78, 7278-7283.
- [235] CHEN, C.; KRAUSZ, K. W.; IDLE, J. R. & GONZALEZ, F. J. (2008) Identification of Novel Toxicity-associated Metabolites by Metabolomics and Mass Isotopomer Analysis of Acetaminophen Metabolism in Wild-type and Cyp2e1-null Mice, *J. Biol. Chem.*, 283, 4543-4559.
- [236] WESTERHUIS, J. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; SMIT, S. et al. (2008) Assessment of PLSDA cross validation, *Metabolomics*, 4, 81-89.
- [237] MINERS, J. O.; ATTWOOD, J. & BIRKETT, D. J. (1983) Influence of sex and oral contraceptive steroids on paracetamol metabolism, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 16, 503-509.
- [238] KOCHHAR, S.; JACOBS, D. M.; RAMADAN, Z. et al. (2006) Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabolomics, *Anal. Biochem.*, 352, 274-281.
- [239] VAN DER GREEF, J.; HANKEMEIER, T. & MCBURNEY, R. N. (2006) Metabolomics-based systems biology and personalized medicine: moving towards n = 1 clinical trials?, *Pharmacogenomics*, 7, 1087-1094.
- [240] VAN DER GREEF, J. & SMILDE, A. K. (2006) Symbiosis of chemometrics and metabolomics: past, present, and future, *J. Chemom.*, 19, 376-386.
- [241] WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K.; CASTRO-PEREZ, J. et al. (2005) High Resolution "Ultra Performance" Liquid Chromatography Coupled to oa-TOF Mass Spectrometry as a Tool for Differential Metabolic Pathway Profiling in Functional Genomic Studies, *J. Proteome Res.*, 4, 591-598.
- [242] DIETERLE, F.; ROSS, A.; SCHLOTTERBECK, G. & SENN, H. (2006) Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in 1H-NMR Metabonomics, *Anal. Chem.*, 78, 4281-4290.
- [243] ZELL, M.; HUSSER, C.; ERDIN, R. & HOPFGARTNER, G. (1997) Simultaneous determination of a potassium channel opener and its metabolite in rat plasma with column-switching liquid chromatography using atmospheric pressure chemical ionization, *J. Chromatogr. B*, 694, 135-143.
- [244] FIEHN, O.; ROBERTSON, D.; GRIFFIN, J. et al. (2007) The metabolomics standards initiative (MSI), *Metabolomics*, 3, 175-178.
- [245] CASTLE, A. L.; FIEHN, O.; KADDURAH-DAOUK, R. & LINDON, J. C. (2006) Metabolomics standards workshop and the development of international standards for reporting metabolomics experimental results, *Brief. Bioinform.*, 7, 159-165.
- [246] JENKINS, H.; HARDY, N.; BECKMANN, M. et al. (2004) A proposed framework for the description of plant metabolomics experiments and their results, *Nat. Biotechnol.*, 22, 1601-1606.
- [247] LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. et al. (2005) Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses, *Nat. Biotechnol.*, 23, 833-838.
- [248] SANGSTER, T.; MAJOR, H.; PLUMB, R.; WILSON, A. J. & WILSON, I. D. (2006) A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabonomic analysis, *Analyst*, 131, 1075-1078.

- [249] TATE, A. R.; DAMMENT, S. J. & LINDON, J. C. (2001) Investigation of the metabolite variation in control rat urine using ¹H-NMR spectroscopy, *Anal. Biochem.*, 291, 17-26.
- [250] BOETTCHER, M. I.; SCHETTGEN, T.; KUTTING, B.; PISCHETSRIEDER, M. & ANGERER, J. (2005) Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population, *Mutat. Res.*, 580, 167-176.
- [251] JUNGE, W.; WILKE, B.; HALABI, A. & KLEIN, G. (2004) Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffe method, *Clin. Chim. Acta*, 344, 137-148.
- [252] NORDSTROEM, A.; O'MAILLE, G.; QIN, C. & SIUZDAK, G. (2006) Nonlinear Data Alignment for UPLC-MS and HPLC-MS Based Metabolomics: Quantitative Analysis of Endogenous and Exogenous Metabolites in Human Serum, *Anal. Chem.*, 78, 3289-3295.
- [253] RAMADAN, Z.; JACOBS, D.; GRIGOROV, M. & KOCHHAR, S. (2006) Metabolic profiling using principal component analysis, discriminant partial least squares, and genetic algorithms, *Talanta*, 68, 1683-1691.
- [254] WIKLUND, S.; JOHANSSON, E.; SJOESTROEM, L. et al. (2008) Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models, *Anal. Chem.*, 80, 115-122.
- [255] DUMAS, M.-E.; MAIBAUM, E. C.; TEAGUE, C. et al. (2006) Assessment of Analytical Reproducibility of ¹H-NMR Spectroscopy Based Metabonomics for Large-Scale Epidemiological Research: the INTERMAP Study, *Anal. Chem.*, 78, 2199-2208.
- [256] MARX, J. L. (1987) Oxygen free radicals linked to many diseases, *Science*, 235, 529-531.
- [257] FREEMAN, B. A. & CRAPO, J. D. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury, *Lab. Invest.*, 47, 412-426.
- [258] HALLIWELL, B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts, *FASEB J.*, 1, 358-364.
- [259] PRYOR, W. A. (1982) Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 393, 1-22.
- [260] KADIISKA, M. B.; GLADEN, B. C.; BAIRD, D. D. et al. (2005) Biomarkers of Oxidative Stress Study II: Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning?, *Free Radic. Biol. Med.*, 38, 698-710.
- [261] KADIISKA, M. B.; GLADEN, B. C.; BAIRD, D. D. et al. (2000) Biomarkers of oxidative stress study: are plasma antioxidants markers of CCl₄ poisoning?, *Free Radic. Biol. Med.*, 28, 838-845.
- [262] REYNOLDS, E. S.; TREINEN, R. J.; FARRISH, H. H. & MOSLEN, M. T. (1984) Metabolism of [¹⁴C]carbon tetrachloride to exhaled, excreted and bound metabolites. Dose-response, time-course and pharmacokinetics, *Biochem. Pharmacol.*, 33, 3363-3374.
- [263] RECKNAGEL, R. O.; GLENDE, E. A., JR.; DOLAK, J. A. & WALLER, R. L. (1989) Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity, *Pharmacol. Ther.*, 43, 139-154.
- [264] MCLEAN, A. E. & MCLEAN, E. K. (1966) The effect of diet and 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning, *Biochem. J.*, 100, 564-571.
- [265] CALLEMAN, C. J.; BERGMARK, E. & COSTA, L. G. (1990) Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation, *Chem. Res. Toxicol.*, 3, 406-412.
- [266] PLUMB, R. S.; STUMPF, C. L.; GORENSTEIN, M. V. et al. (2002) Metabonomics: the use of electrospray mass spectrometry coupled to reversed-phase liquid chromatography shows potential for the screening of rat urine in drug development, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16, 1991-1996.
- [267] STOLL, D. R.; WANG, X. & CARR, P. W. (2008) Comparison of the Practical Resolving Power of One- and Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Metabolomic Samples, *Anal. Chem.*, 80, 268-278.

- [268] LENZ, E. M. & WILSON, I. D. (2007) Analytical Strategies in Metabonomics, *J. Proteome Res.*, 6, 443-458.
- [269] BECKONERT, O.; BOLLARD, M. E.; EBBELS, T. M. D. et al. (2003) NMR-based metabonomic toxicity classification: hierarchical cluster analysis and k-nearest-neighbour approaches, *Anal. Chim. Acta*, 490, 3-15.
- [270] WIKOFF, W. R.; GANGOITI, J. A.; BARSHOP, B. A. & SIUZDAK, G. (2007) Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism, *Clin. Chem.*, 53, 2169-2176.
- [271] ZUPPI, C.; MESSANA, I.; FORNI, F. et al. (1998) Influence of feeding on metabolite excretion evidenced by urine ¹H-NMR spectral profiles: a comparison between subjects living in Rome and subjects living at arctic latitudes (Svaldbard), *Clin. Chim. Acta*, 278, 75-79.
- [272] WANG, W. & BALLATORI, N. (1998) Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions, *Pharmacol. Rev.*, 50, 335-356.
- [273] WU, H.; ZHANG, X.; LI, X. et al. (2005) Comparison of metabolic profiles from serum from hepatotoxin-treated rats by nuclear-magnetic-resonance-spectroscopy-based metabonomic analysis, *Anal. Biochem.*, 340, 99-105.
- [274] ALARY, J.; FERNANDEZ, Y.; DEBRAUWER, L.; PERDU, E. & GUERAUD, F. (2003) Identification of intermediate pathways of 4-hydroxynonenal metabolism in the rat, *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 320-327.
- [275] VOLKEL, W.; ALVAREZ-SANCHEZ, R.; WEICK, I. et al. (2005) Glutathione conjugates of 4-hydroxy-2(E)-nonenal as biomarkers of hepatic oxidative stress-induced lipid peroxidation in rats, *Free Radic. Biol. Med.*, 38, 1526-1536.
- [276] MAKSIMCHIK, Y. Z.; LAPSHINA, E. A.; SUDNIKOVICH, E. Y.; ZABRODSKAYA, S. V. & ZAVODNIK, I. B. (2008) Protective effects of N-acetyl-L-cysteine against acute carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats, *Cell Biochem. Funct.*, 26, 11-18.
- [277] ALARY, J.; DEBRAUWER, L.; FERNANDEZ, Y. et al. (1998) Identification of novel urinary metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in rats, *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 1368-1376.
- [278] SIMKO, V.; MICHAEL, S.; KATZ, J.; OBERSTEIN, E. & POPESCU, A. (1992) Protective effect of oral acetylcysteine against the hepatorenal toxicity of carbon tetrachloride potentiated by ethyl alcohol, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16, 795-799.
- [279] ADAM, T.; MITSCHKE, S.; STREIBEL, T.; BAKER, R. R. & ZIMMERMANN, R. (2006) Puff-by-puff resolved characterisation of cigarette mainstream smoke by single photon ionisation (SPI)-time-of-flight mass spectrometry (TOFMS): Comparison of the 2R4F research cigarette and pure Burley, Virginia, Oriental and Maryland tobacco cigarettes, *Anal. Chim. Acta*, 572, 219-229.
- [280] SMITH, C. J. & HANSCH, C. (2000) The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate, *Food Chem. Toxicol.*, 38, 637-646.
- [281] FLORIN, I.; RUTBERG, L.; CURVALL, M. & ENZELL, C. R. (1980) Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test, *Toxicology*, 15, 219-232.
- [282] GAMACHE, P. H.; MEYER, D. F.; GRANGER, M. C. & ACWORTH, I. N. (2004) Metabolomic applications of electrochemistry/mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 1717-1726.
- [283] NEUBAUER, S.; WELTE, R.; BEICHE, A. & AL., E. (2006) Mortality, morbidity and costs attributable to smoking in Germany: update and a 10-year comparison, *Tob. Control*, 15, 464-471.
- [284] KIM, Y. J.; HONG, Y. C.; LEE, K. H. et al. (2005) Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction, *Reprod. Toxicol.*, 19, 487-492.

- [285] SCHULZE, A., L. T. (2006) Bundes-Gesundheitssurvey: Soziale Unterschiede im Rauchverhalten und in der Passivrauchbelastung in Deutschland. Beiträge zur Berichterstattung des Bundes, *Robert Koch-Institut Berlin*.
- [286] JAHNKE, V.; STRANGE, R.; MATTHIAS, C. & FRYER, A. A. (1995) Initial results of glutathione-S-transferase GSTM1 and GSTT1 genotypes and genetic predisposition for laryngeal carcinoma, *Laryngorhinootologie* 74, 691-694.
- [287] SINUES, B.; RUEDA, P.; BENITEZ, J. et al. (1994) Thioether excretion, urinary mutagenicity, and metabolic phenotype in smokers, *J. Toxicol. Environ. Health*, 43, 327-338.
- [288] BARTSCH, H.; ROJAS, M.; ALEXANDROV, K. et al. (1995) Metabolic polymorphism affecting DNA binding and excretion of carcinogens in humans, *Pharmacogenetics*, 5, S84-S90.
- [289] STANEK, W.; KRENMAYR, P.; SCHERE, G. & SCHMID, E. R. (1993) Quantitative determination of N-acetyl-L-cysteine derivatives in human urine by tandem mass spectrometry, *Biol. Mass Spectrom.*, 22, 133-142.
- [290] MUELLER, G.; VERKOYEN, C.; SOTON, N. & NORPOTH, K. (1987) Urinary excretion of acrylonitrile and its metabolites in rats, *Arch. Toxicol.*, 60, 464-466.
- [291] MÜLLER, G.; HEGER, M. & NORPOTH, K. (1980) Bestimmung der Hydroxyethyl-Merkaptursäure im Harn Vinylchlorid-Exponierter. Methodische Erfahrungen und analytische Ergebnisse, Brenner W., Ruthenfranz J., Baumgartner E., Haider M. (Editor), *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin, 20. Jahrestagung in Innsbruck, Gentner Verlag, Stuttgart*.
- [292] MÜLLER, G.; WINTGENS, J. & T., T. (1983) Möglichkeiten der biologischen Überwachung bei Einwirken von Acrylonitril, Stalder K. (Editor), *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin, 23. Jahrestagung in Göttingen, Gentner Verlag, Stuttgart*.
- [293] STEVENS, J. F. & MAIER, C. S. (2008) Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease, *Mol. Nut. Food Res.*, 52, 7-25.
- [294] RAMU, K.; FRAISER, L. H.; MAMIYA, B.; AHMED, T. & KEHRER, J. P. (1995) Acrolein Mercapturates: Synthesis, Characterization, and Assessment of Their Role in the Bladder Toxicity of Cyclophosphamide, *Chem. Res. Toxicol.*, 8, 515-524.
- [295] DRAMINSKI, W.; EDER, E. & HENSCHLER, D. (1983) A new pathway of acrolein metabolism in rats, *Arch. Toxicol.*, 52, 243-247.
- [296] PARENT, R. A.; PAUST, D. E.; SCHRIMPF, M. K. et al. (1998) Metabolism and distribution of [2,3-14C]acrolein in Sprague-Dawley rats. II. Identification of urinary and fecal metabolites, *Toxicol. Sci.*, 43, 110-120.
- [297] GRAY, J. M. & BARNSLEY, E. A. (1971) The metabolism of crotyl phosphate, crotyl alcohol and crotonaldehyde, *Xenobiotica*, 1, 55-67.
- [298] SCHERER, G.; URBAN, M.; HAGEDORN, H. W. et al. (2007) Determination of two mercapturic acids related to crotonaldehyde in human urine: influence of smoking, *Hum. Exp. Toxicol.*, 26, 37-47.
- [299] CHUNG, F. L.; CHEN, H. J. & NATH, R. G. (1996) Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts, *Carcinogenesis*, 17, 2105-2111.
- [300] ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J. & ZOLLNER, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4 hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic. Biol. Med.*, 11, 81-128.
- [301] FENG, S.; ROETHIG, H. J.; LIANG, Q. et al. (2006) Evaluation of urinary 1-hydroxypyrene, S-phenylmercapturic acid, trans,trans-muconic acid, 3-methyladenine, 3-ethyladenine, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and thioethers as biomarkers of exposure to cigarette smoke, *Biomarkers*, 11, 28-52.

- [302] CARMELLA, S. G.; CHEN, M.; ZHANG, Y. et al. (2007) Quantitation of Acrolein-Derived (3-Hydroxypropyl)mercapturic Acid in Human Urine by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry: Effects of Cigarette Smoking, *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 986-990.
- [303] VAN DER TOORN, M.; SMIT-DE VRIES, M. P.; SLEBOS, D.-J. et al. (2007) Cigarette smoke irreversibly modifies glutathione in airway epithelial cells, *Am. J. Physiol.*, 293, L1156-L1162.
- [304] PARK, E. M.; PARK, Y. M. & GWAK, Y. S. (1998) Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke, *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 79-86.
- [305] RAHMAN, I. & MACNEE, W. (1999) Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease, *Am. J. Physiol.*, 277, L1067-1088.
- [306] UPADHYAYA, P.; RAO, P.; HOCHALTER, J. B. et al. (2006) Quantitation of N-Acetyl-S-(9,10-dihydro-9-hydroxy-10-phenanthryl)-L-cysteine in Human Urine: Comparison with Glutathione-S-transferase Genotypes in Smokers, *Chem. Res. Toxicol.*, 19, 1234-1240.
- [307] KUETTING, B.; SCHETTGEN, T.; BECKMANN, M. W.; ANGERER, J. & DREXLER, H. (2005) Influence of Diet on Exposure to Acrylamide - Reflections on the Validity of a Questionnaire, *Ann. Nutr. Metab.*, 49, 173-177.
- [308] GAVAGHAN, C. L.; HOLMES, E.; LENZ, E.; WILSON, I. D. & NICHOLSON, J. K. (2000) An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: application to the C57BL10J and Alpk:ApfCD mouse, *FEBS Lett.*, 484, 169-174.
- [309] LINDON, J. C.; HOLMES, E. & NICHOLSON, J. K. (2007) Metabonomics in pharmaceutical R & D, *FEBS J.*, 274, 1140-1151.
- [310] LENZ, E. M.; WILLIAMS, R. E.; SIDAWAY, J. et al. (2007) The application of microbore UPLC/oa-TOF-MS and 1H-NMR spectroscopy to the metabonomic analysis of rat urine following the intravenous administration of pravastatin, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44, 845-852.
- [311] LINDON, J. C.; HOLMES, E. & NICHOLSON, J. K. (2003) So what's the deal with metabonomics?, *Anal. Chem.*, 75, 384A-391A.
- [312] WAYBRIGHT, T. J.; VAN, Q. N.; MUSCHIK, G. M. et al. (2006) LC-MS in metabonomics: optimization of experimental conditions for the analysis of metabolites in human urine, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 29, 2475-2497.
- [313] HOPFGARTNER, G.; HUSSER, C. & ZELL, M. (2002) High-throughput quantification of drugs and their metabolites in biosamples by LC-MS/MS and CE-MS/MS: possibilities and limitations, *Ther. Drug Monit.*, 24, 134-143.
- [314] TANIGUCHI, J. & KAWATOH, E. (2008) Development of high-performance liquid chromatograph/IT-TOF mass spectrometer, *Bunseki Kagaku*, 57, 1-13.
- [315] GOODACRE, R.; BROADHURST, D.; SMILDE, A. K. et al. (2007) Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics, *Metabolomics*, 3, 231-241.
- [316] SMILDE, A. K.; JANSEN, J. J.; HOEFSLOOT, H. C. J. et al. (2005) ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): A new tool for analyzing designed metabolomics data, *Bioinformatics*, 21, 3043-3048.
- [317] VIS, D. J.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K. & VAN DER GREEF, J. (2007) Statistical validation of megavariate effects in ASCA, *BMC Bioinformatics*, 8, 322.
- [318] ERIKSSON, L.; ANTTI, H.; GOTTFRIES, J. et al. (2004) Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabonomics, *Anal. Bioanal. Chem.*, 380, 419-429.
- [319] HART, S. J.; CALDER, I. C. & TANGE, J. D. (1982) The metabolism and toxicity of paracetamol in Sprague-Dawley and Wistar rats, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 7, 203-222.

- [320] COEN, M.; HOLMES, E.; LINDON, J. C. & NICHOLSON, J. K. (2008) NMR-Based Metabolic Profiling and Metabonomic Approaches to Problems in Molecular Toxicology, *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 9-27.
- [321] EBBELS, T.; KEUN, H.; BECKONERT, O. et al. (2003) Toxicity classification from metabonomic data using a density superposition approach: 'CLOUDS', *Anal. Chim. Acta*, 490, 109-122.
- [322] COnsortium for METabonomic Toxicology, COMET II, <http://bc-comet.sk.med.ic.ac.uk>.
- [323] SUMNER, L. W.; AMBERG, A.; BARRETT, D. et al. (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI), *Metabolomics*, 3, 211-221.
- [324] PÖTSCHKE-LANGER, M. (2006) Positionspapier zur Gesundheitsgefährdung durch Passivrauchen, *Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft, Heidelberg*.
- [325] CLOAREC, O.; DUMAS, M.-E.; CRAIG, A. et al. (2005) Statistical Total Correlation Spectroscopy: An Exploratory Approach for Latent Biomarker Identification from Metabolic ¹H-NMR Data Sets, *Anal. Chem.*, 77, 1282-1289.
- [326] 6th European Framework Programme Innovative Medicines for Europe (InnoMed), Predictive Toxicology (PredTox), <http://www.innomed-predtox.com>.
- [327] GERMAN, J. B.; BAUMAN, D. E.; BURRIN, D. G. et al. (2004) Metabolomics in the opening decade of the 21st century: Building the roads to individualized health, *J. Nutr.*, 134, 2729-2732.
- [328] GERMAN, J. B.; ROBERTS, M. A.; FAY, L. & WATKINS, S. M. (2002) Metabolomics and individual metabolic assessment: the next great challenge for nutrition, *J. Nutr.*, 132, 2486-2487.
- [329] ZHAO, X.; WANG, W.; WANG, J.; YANG, J. & XU, G. (2006) Urinary profiling investigation of metabolites with cis-diol structure from cancer patients based on UPLC-MS and HPLC-MS as well as multivariate statistical analysis, *J. Sep. Sci.*, 29, 2444-2451.
- [330] VOLKEL, W.; SICILIA, T.; PAHLER, A. et al. (2006) Increased brain levels of 4-hydroxy-2-nonenal glutathione conjugates in severe Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.*, 48, 679-686.

VIELEN DANK...

- ... **PD Dr. W. Völkel** für die Möglichkeit, ein hochaktuelles, sehr vielseitiges und spannendes Thema bearbeiten zu dürfen, das stets offene Ohr und für die Motivation zu zahlreichen nationalen und internationalen Kongressbesuchen.
- ... **Prof. W. K. Lutz** für die Startfinanzierung des Projekts, die vielen statistischen Diskussionen sowie die Möglichkeit zur Teilnahme am Fachtoxikologenprogramm der DGPT.
- ... **Prof. P. Schreier**, dass Sie im Namen der Fakultät für Chemie und Pharmazie die Fachbetreuung der externen Arbeit übernommen haben.
- ... **Prof. W. Dekant** für die Abschlussfinanzierung der Arbeit und die stets offene Tür.
- ... der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** für die zweijährige Förderung des Projekts.
- ... **Max und Marco**, dass ihr mich so herzlich in euer Männerzimmer aufgenommen habt, für eure fachlichen und manchmal weniger fachlichen Diskussionen, die technische, mentale und freundschaftliche Unterstützung.
- ... **Karoline S.** für die solide methodische Vorarbeit und die schöne Zeit in Seattle während der *ASMS Conference on Mass Spectrometry 2006*.
- ... **Ursie** für die unzähligen inspirierenden wissenschaftlichen und insbesondere statistischen Diskussionen und die nette Gesellschaft bei den *Metabolic Profiling* Kongressen in London.
- ... **Nataly** für die tatkräftige labortechnische Unterstützung, v. a. bei der LC-MS-Analytik.
- ... **Marion, Theresa, Judith und Thomas** für eure unermüdliche Hilfe beim Sammeln, Etikettieren, Aliquotieren, Pipettieren und Vermessen der vielen hundert Urinproben.
- ... **Erik Johansson** und **Petter Mörée** von Umetrics für die kontinuierliche Unterstützung bei chemometrischen Fragen und insbesondere für das spontane Angebot eines SIMCA-P Workshops 2007 in Würzburg.
- ... **Lyle Burton, Julia Wingate** und **Michael Donegan** von Applied Biosystems/MDS Sciex für die Bereitstellung der *MarkerView™* Software, die Programmierung der zusätzlichen Funktionen, den kompetenten Support und die *full scan*/TOF-Analysen.
- ... **Caroline K.** für die kompetente Hilfe rund um den Tierversuch.
- ... allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des **AK Völkel, AK Lutz, AK Dekant, AK Mally, AK Stopper** und **AK Eder** für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung mit Rat und Tat, die kontinuierliche Versorgung mit Urin und die unvergessliche Zeit.
- ... allen anonymen **Student(inn)en** und **Praktikant(inn)en** für die zahlreichen Urinproben.
- ... **Daniel**, dass du so viel Interesse an meiner Arbeit gezeigt, mich nach allen Kräften motiviert und unterstützt hast und wir alle Höhen und Tiefen gemeinsam durchschritten haben.
- ... **Jonas**, dass du meine bunten Plots so interessant fandest und auch dann nicht gemeckert hast, wenn die Gute-Nacht-Geschichte ab und an mal aus einem Metabonomicspaper bestand.
- ... **meinen Eltern**, dass ihr mir mit eurer Unterstützung und eurem stetigen Zuspruch die Möglichkeit eröffnet habt, das Leben, die Ausbildung und damit die Zukunft frei zu gestalten.

PUBLIKATIONEN

- WAGNER, S.; SCHOLZ, K.; DONEGAN, M.; BURTON, L.; WINGATE, J., AND VOELKEL, W.
Metabonomics and Biomarker Discovery: LC-MS Metabolic Profiling and Constant Neutral Loss Scanning Combined with Multivariate Data Analysis for Mercapturic Acid Analysis,
Anal. Chem. (2006), 78, 1296 – 1305
- WAGNER, S.; SCHOLZ, K.; SIEBER, M.; KELLERT, M., AND VOELKEL, W.
Tools in Metabonomics: An Integrated Validation Approach for LC-MS Metabolic Profiling of Mercapturic Acids in Human Urine,
Anal. Chem. (2007), 79, 2918 – 2926
- KELLERT, M.; SCHOLZ, K.; WAGNER, S.; DEKANT, W., AND VOELKEL, W.
Quantitation of mercapturic acids from acrylamide and glycidamide in human urine using a column switching tool with two trap columns and electrospray tandem mass spectrometry,
J. Chromatogr. A (2006), 1131, 58 – 66
- KELLERT, M.; WAGNER, S.; LUTZ, U., AND LUTZ, W. K.
Biomarkers of Furan Exposure by Metabolic Profiling of Rat Urine with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Principal Component Analysis,
Chem. Res. Toxicol. (2008), 21, 761 – 768
- SIEBER, M.; WAGNER, S.; RACHED, E.; AMBERG, A.; MALLY, A, AND DEKANT, W.
Metabonomic study of ochratoxin A toxicity after repeated administration: Phenotypic anchoring enhances ability for biomarker discovery
eingereicht bei *Chem. Res. Toxicol.* (12/2008)

POSTERBEITRÄGE

S. WAGNER, K. SCHOLZ, M. DONEGAN, L. BURTON, J. WINGATE, AND W. VOELKEL
LC-MS Metabolic Profiling of Mercapturic Acids in Humans
Posterbeitrag auf der Advances in Metabolic Profiling Conference (2005), London, UK

S. WAGNER, K. SCHOLZ, M. DONEGAN, L. BURTON, J. WINGATE, AND W. VOELKEL
Metabonomics: LC-MS Based Metabolic Profiling of Mercapturic Acids in Humans
Posterbeitrag auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (2006), Mainz

S. WAGNER, K. SCHOLZ, L. BURTON, AND W. VOELKEL
New Tools in Metabonomics: Application of Sensitive MRM Scans Together with New Scaling Procedures to Detect Reactive Metabolites in Humans
Posterbeitrag auf der Konferenz der American Society of Mass Spectrometry (2006), Seattle, USA

S. WAGNER, K. SCHOLZ, AND W. VOELKEL
New Tools in Metabonomics: An integrated validation approach for LC-MS metabolic profiling of mercapturic acids in humans
Posterbeitrag auf der Advances in Metabolic Profiling Conference (2006), London, UK

M. KELLERT, S. WAGNER, J. SCHLATTER, AND W. K. LUTZ
Search of Biomarkers for Furan Exposure by Metabolite Profiling of Rat Urine with LC-MS/MS and Principal Component Analysis
Posterbeitrag auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (2007), Mainz

S. WAGNER, K. SIMON, M. SIEBER, M. KELLERT, AND W. VOELKEL
Metabolic profiling of mercapturic acids in human urine: a validation approach for LC/MS metabonomics
Posterbeitrag auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (2007), Mainz

M. SIEBER, S. WAGNER, A. AMBERG, A. MALLY, AND W. DEKANT
A combined GC-MS, LC-MS and ¹H-NMR metabonomics approach for early detection of ochratoxin A nephrotoxicity
Posterbeitrag auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (2008), Mainz

M. KELLERT, S. WAGNER, U. LUTZ, AND W. K. LUTZ
Biomarkers of Furan Exposure by Metabolite Profiling of Rat Urine with LC-Tandem Mass Spectrometry and Principal Component Analysis
Posterbeitrag auf der Konferenz der Society of Toxicology (2008), Seattle, USA

S. WAGNER, AND W. VOELKEL
A LC-MS/MS metabonomics investigation of mercapturic acid patterns in urine samples of smokers and non-smokers
Posterbeitrag auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (2008), Mainz (**Auszeichnung mit dem Sanofi-Aventis-Preis für den besten Posterbeitrag aus dem Bereich Toxikologie**)

