

¹³C-Stoffflussanalyse an HepG2-Zellen zur
Untersuchung des Einflusses von lebertoxischen
Arzneimitteln auf den primären Stoffwechsel

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Frau Susanne Lieselotte Franke (geb. Junghanns)

geb. am 18.12.1990 in Aschersleben

verteidigt am 15.10.2021

Erstgutachter: Prof. Dr. Björn Junker
Zweitgutachter: Prof. Dr. Sonja Keßler
Drittgutachter: Prof. Dr. Karsten Hiller

I Inhaltsverzeichnis

<i>I Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>II Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>III Abbildungsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
<i>IV Tabellenverzeichnis</i>	<i>X</i>
1. Einleitung	1
1.1 Hintergrund der Arbeit	1
1.2 Arzneimittelinduzierte Leberschäden (DILI)	2
1.2.1 Einteilung	2
1.2.2 Risikofaktoren	3
1.2.3 Pathophysiologische Mechanismen	3
1.2.4 Untersuchungsmethoden	5
1.2.5 Mit DILI assoziierte Medikamente	6
1.2.5.1 Paracetamol	6
1.2.5.2 Tacrin	7
1.2.5.3 Diclofenac	7
1.2.5.4 Troglitazon	8
1.2.5.5 Weitere Medikamente	9
1.3 Stoffflussanalyse an HepG2-Zellen	10
1.3.1 Stoffwechsel von Krebszellen.....	11
1.3.2 Der Nutzen von Markierungssubstanzen zur Analyse des menschlichen Stoffwechsels.....	14
1.3.2.1 Definition von Massen- und Positionsisotopomeren	15
1.3.2.2 Messung von Massenisotopomeren.....	15
1.3.2.3 Theoretische Markierungsmuster in der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg	18
1.3.2.4 Theoretische Markierungsmuster im Citratzyklus.....	20
1.3.2.5 Theoretische Aussagen durch Markierungsmuster in der Serinbiosynthese	21
1.3.3 Stoffflussanalysen	22
1.3.3.1 Methoden der Stoffflussanalyse.....	22
1.3.3.2 Existierende Stoffflussanalysen mit Leberzellen	26
1.4 Zielstellung der Arbeit	29
2. Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.2 Methoden	37
2.2.1 Allgemeine Zellkultur	37
2.2.1.1 Medien zur Kultivierung und Markierung der HepG2-Zellen	37
2.2.1.2 Auftauen von Zellen.....	38
2.2.1.3 Mediumwechsel	38
2.2.1.4 Subkultivierung.....	38
2.2.1.5 Kryokonservierung von Zellen	38
2.2.1.6 Zellzahlbestimmung.....	39

2.2.1.7 Bestimmung der Wachstumsrate und des Biomassezuwachses	39
2.2.1.8 Bestimmung der Viabilität der Zellen.....	40
2.2.1.9 Extraktion der Proteine, RNA und Stoffwechselintermediate aus den Zellen	41
2.2.2 Aufbau der Zellkulturversuche	43
2.2.2.1 Vorversuche zur Glukose- und Serumkonzentration	43
2.2.2.2 Metabolisches Gleichgewicht	43
2.2.2.3 Isotopisches Gleichgewicht	44
2.2.2.4 Markierungsexperiment.....	44
2.2.3 Analytische Methoden	46
2.2.3.1 Einstellungen GC/MS-Messungen	46
2.2.3.2 Austauschraten	46
2.2.3.3 Bestimmung der Massenisotopomerverteilung	48
2.2.3.4 Messung des metabolischen Fließgleichgewichts.....	49
2.2.3.5 Bestimmung der Redoxäquivalente per LC/MS	50
2.2.4 Stoffflussanalyse.....	52
2.2.4.1 Datenkorrektur.....	52
2.2.4.2 Erstellung des Grundmodells	54
2.2.4.3 Isotopenmarkierte Stoffflussanalyse (¹³ C-MFA).....	56
3. Ergebnisse.....	58
3.1. Etablierung der Grundlagen einer ¹³C-MFA.....	58
3.1.1 Zusammensetzung des Mediums	58
3.1.1.1 Glukosekonzentration im Medium	58
3.1.1.2 Serumkonzentration im Medium	60
3.1.2 Wachstumskurve	62
3.1.3 Austauschraten.....	64
3.1.4 Isotopisches Gleichgewicht (ISS)	64
3.1.5 Metabolisches Gleichgewicht (MSS)	66
3.1.6 Erstes Markierungsexperiment	68
3.2 Validierung der etablierten ¹³C-MFA Methodik.....	70
3.2.1 Konzentrationsabhängige Wirkung der Inhibitoren auf die Zellviabilität	70
3.2.2 Die Stoffflussanalyse des Validierungsexperiments	71
3.2.2.1 Wachstums- und Austauschraten	71
3.2.2.2 Traceranalyse der mit UK-5099 behandelten Zellen.....	72
3.2.2.3 ¹³ C-MFA von UK-5099	75
3.2.2.4 Traceranalyse und ¹³ C-MFA von L-Don und 3-Bromopyruvat.....	77
3.3 Ergebnisse des Screenings von Medikamenten per ¹³C-MFA	79
3.3.1 Konzentrationsabhängige Wirkung der Stoffe des Screenings auf die Zellviabilität	79
3.3.2 Wachstums- und Austauschraten	80
3.3.3 Stoffflussanalyse des Screenings	82
3.3.3.1 Traceranalysen	83
3.3.3.2 ¹³ C-MFA	84
3.4 Ergebnisse Hauptexperiment.....	88
3.4.1 Konzentrationsabhängige Wirkung der Medikamente auf die Zellviabilität.....	88
3.4.2 Wachstums- und Austauschraten	89
3.4.3 ¹³ C-MFA Ergebnisse	90
3.4.3.1 Traceranalyse Paracetamol.....	90

3.4.3.2 ¹³ C-MFA Paracetamol	94
3.4.3.3 Traceranalyse Diclofenac	96
3.4.3.4 ¹³ C-MFA Diclofenac	96
3.4.3.5 Traceranalyse Tacrin	99
3.4.3.6 ¹³ C-MFA Tacrin	99
3.4.3.7 Traceranalyse Troglitazon	102
3.4.3.8 ¹³ C-MFA Troglitazon	102
3.4.4 Messung der Redoxäquivalente	105
3.5 Zusammenfassung der Pipeline	107
4. Diskussion	109
4.1 Grundbedingungen für eine ¹³C-MFA	109
4.1.1 Etablierung der Methodik	109
4.1.2 Die Flusskarte der Etablierung	109
4.2 Diskussion der Validierungsergebnisse	110
4.2.1 Konzentrationsabhängige Wirkung der Inhibitoren und Medikamente auf die Zellviabilität	111
4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Validierung der ¹³ C-MFA	112
4.2.2.1 UK-5099	112
4.2.2.2 3-Bromopyruvat	113
4.2.2.3 L-Don	114
4.2.3 Schlussfolgerung Validierungsexperiment	115
4.3 Screening von lebertoxischen Medikamenten per ¹³C-MFA	116
4.4 Hauptexperiment	118
4.4.1 Paracetamol	118
4.4.2 Diclofenac	119
4.4.3 Tacrin	120
4.4.4 Troglitazon	122
4.5 Schlussfolgerungen	123
5. Fazit und Ausblick	126
6. Zusammenfassung	128
7. Literaturverzeichnis	130
8. Anhang	149
8.1 Inhaltsverzeichnis Anhang	149
8.2 Abbildungsverzeichnis Anhang	150
8.3 Tabellenverzeichnis Anhang	154
Lebenslauf	158
Danksagung	161
Eidesstattliche Erklärung	163

II Abkürzungsverzeichnis

¹³ C-DMFA	¹³ C-dynamic metabolic flux analysis , ¹³ C-dynamische Stoffflussanalyse
¹³ C-INST-MFA	¹³ C-instationary metabolic flux analysis, ¹³ C-instationäre Stoffflussanalyse
¹³ C-MFA	¹³ C-metabolic flux analysis, ¹³ C-Stoffflussanalyse
2PG	2-Phosphoglycerat
3,10-M-THF	5,10-Methyltetrahydrofolat
3PG	3-Phosphoglycerat
AA oder AS	Aminosäure
AAS	Antibiotic antimycotic solution, Antibiotikalösung
AcCoA	Acetyl-CoA
ACL	ATP-Citrat-Lyase
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
ALD	Aldehyd-Dehydrogenasen
ALT	Alaninaminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
AP	alkalischen Phosphatase
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BSTFA	Bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamid
Cit	Citrat
COS	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P Enzym
Cys	Cystein
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DILI	drug induced liver injury, Arzneimittelinduzierte Leberschäden
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMFA	dynamic metabolic flux analysis, Dynamische Stoffflussanalyse
DMSO	Dimethylsulfoxid
E3P	Erythrose-3-phosphat
EC2	C2-Körper

EC3	C3-Körper
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
ENO	Enolase
F6P	Fruktose-6-phosphat
FBA	<i>flux balance analysis</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , Fetales Kälberserum
Fum	Fumarat
G6P	Glukose-6-phosphat
GAP	Glyzerinaldehyd-3-phosphat
GAPDH PGK	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Phosphoglyceratkinase
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GC/MS-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
GC-qTOF	Gaschromatographie gekoppelt mit einem Quatrupol-Time-of-Flight
Glc	Glukose
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
HGF	<i>hepatocyte growth/scatter factor</i> , Hepatozyten Wachstumsfaktor
Ile	Isoleucin
ISDH	Isocitratdehydrogenase
ISS	<i>isotopic steady state</i> , isotopisches Gleichgewicht
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium-Lösung
Lac	Laktat
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
LDH	Laktatdehydrogenase
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m/z	Masse/Ladung
M+n	Masse+n
MBDSTFA	N-methyl-N-tert-butyl dimethylsilyl-trifluoroacetamid

MDH	Malatdehydrogenase
ME	<i>Malic enzyme</i>
MeOx	Methoxyamin
Met	Methionin
MFA	<i>metabolic flux analysis</i> ; Stoffflussanalyse
MIV	Massenisotopomerverteilung
MS	Massenspektrometrie
MS-MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSS	<i>metabolic steady state</i> , metabolisches Gleichgewicht
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NIST-Datenbank	<i>National Institute of Standards and Technology</i> - Datenbank
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
noxPPP	nicht-oxidativer Pentosephosphatweg
NSAIDs	<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i> , nichtsteroidale Antiphlogistika
OA	Organische Säure
OAA	Oxalacetat
OGA	α -Ketoglutarat
OGDH	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase
oxPPP	oxidativen Pentosephosphatweg
PC	Pyruvatcarboxylase
PCA	<i>principal component analysis</i> , Hauptkomponentenanalyse
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGAM	Phosphoglyceratmutase
PGI	Phosphoglukose-Isomerase
Phe	Phenylalanin
PHGDH	Phosphoglyzerat-Dehydrogenase
PK	Pyruvatkinase
PKM	Pyruvat Kinase M-Isoform
PPARY	<i>peroxisomal proliferator activated receptor</i> , Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren
PPP1-7	<i>pentosephosphate pathway 1-7</i>
PPP	Pentosephosphatweg
Pro	Prolin
Pyr	Pyruvat

R5P	Ribose-5-phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
Ru5P	Ribulose-5-phosphat
S7P	Sedoheptulose-7-phosphat
SDH	Succinatdehydrogenase
Ser	Serin
SHMT1	Serinydroxymethyltransferase
SIM	<i>Single ion monitoring</i>
SSR	<i>sum of squared residuals</i> , Quadratsumme der Abweichungen
SD	Standardabweichung
STE	Standardfehler
Suc	Succinat
TBDMS-Derivate	Tributyldimethylsilyl-Derivate
Thr	Threonin
TMS-Derivate	Trimethylsilyl-Derivate
Tyr	Tyrosin
ULN	<i>upper limit of normal</i> , obere Normgrenze
Val	Valin
vgl.	Vergleich
X5P	Xylulose-5-phosphat

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Strukturen von Paracetamol (A), Tacrin (B), Diclofenac (C) und Troglitazon (D).....	8
Abbildung 2: HepG2-Zellen in DME-Medium.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung des primären Stoffwechsels einer HepG2-Zelle.....	12
Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer GC/MS.....	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fragmentierung von Alanin-2TBDMS.....	17
Abbildung 6: Der theoretische Weg von 1- ¹³ C-Glukose (A+C) bzw. 1,2- ¹³ C ₂ -Glukose (B+D) durch den oxPPW und den noxPPW bis zur Ribose.....	18
Abbildung 7: Darstellung der theoretischen Markierungsverteilung in der ersten Citratzyklusrunde ausgehend von U- ¹³ C-Glukose bis zum Citrat.....	19
Abbildung 8: Darstellung der theoretischen Markierungsverteilung in der ersten Citratzyklusrunde ausgehend von U- ¹³ C-Glutamin bis zum Citrat.....	20
Abbildung 9: Übersicht über eine Auswahl von Stoffflussanalysemethoden.....	23
Abbildung 10: Abbildung einer Neubauer Zählkammer.....	39
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Ablaufs der Extraktion der Zellen in einer 6-Well-Platte.....	42
Abbildung 12: Schema zum Ausplattieren der Zellen für den Markierungsversuch.....	45
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Ablaufs einer ¹³ C-MFA.....	52
Abbildung 14: Ablauf der Datenextraktion, -korrektur und -verarbeitung für die ¹³ C-MFA mit Hilfe von MassHunter und Perl-Skripten.....	53
Abbildung 15: Glukosekonzentration im Mediumüberstand über eine Versuchszeit von 240 h und einer Ausgangskonzentration von 2 g/l Glukose im Medium.....	59
Abbildung 16: Glukosekonzentration im Mediumüberstand über einen Versuchszeitraum von 240 h und einer Ausgangskonzentration von 5 g/l Glukose im Medium.....	59
Abbildung 17: Wachstumskurve unter verschiedenen Serumbedingungen im Medium.....	61
Abbildung 18: Wachstumskurve von HepG2-Zellen in Medium mit 5 g/l Glukose, 1 % FBS und ITS-Zusatz.....	62
Abbildung 19: Visuelle Darstellung der Konfluenz der Zellen in einem Well über den Ablauf der Wachstumskurve.....	63
Abbildung 20: Halblogarithmische Darstellung der Wachstumskurve (vgl. Abbildung 18) bis 144 h.....	63
Abbildung 21: Massenisotopomerverteilung des Massenfragments 260 von Alanin (C1-C2-C3) nach 120-144 h Kultivierung mit 100 % U- ¹³ C-Glukose.....	66
Abbildung 22: Komponentendiagramm der PCA für das MSS, Reduktion auf zwei Komponenten (Gesamtvarianz = 88%).....	67
Abbildung 23: Flusskarte von HepG2-Zellen basierend auf den Etablierungsdaten.....	69
Abbildung 24: Ergebnisse des LDH-Assays der mit den verschiedenen Inhibitoren behandelten Zellen (n=3 ± SD).....	70
Abbildung 25: MIV des Massenfragments 160 von Ribose (C1-C2) der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen.....	73
Abbildung 26: MIV des Massenfragments 459 von Citrat (C1-C2-C3-C4-C5-C6) der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen.....	73

Abbildung 27: MIV des Massenfragments 260 von Alanin (C1-C2-C3) der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen	74
Abbildung 28: MIV des Massenfragments 390 von Serin (C1-C2-C3) der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen	74
Abbildung 29: Vergleichende Flusskarte von mit UK-5099 behandelten Zellen.....	76
Abbildung 30: Ergebnisse des LDH-Assays von Paracetamol (A), Diclofenac (B), Tacrin (C) und Troglitazon (D) ($n=3 \pm SD$).....	80
Abbildung 31: MIV des Massenfragments 261 von Laktat (C1-C2-C3)	83
Abbildung 32: MIV des Massenfragments 459 von Citrat (C1-C2-C3-C4-C5-C6).....	84
Abbildung 33: Heatmap der Unterschiede ausgewählter normierter Flusswerte der mit den Medikamenten des Screenings behandelten Zellen.....	86
Abbildung 34: Ergebnisse des zweiten LDH-Assays von den mit Paracetamol (A), Diclofenac (B), Tacrin (C) und Troglitazon (D) behandelten Zellen ($n=3 \pm SD$).....	88
Abbildung 35: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 307 von Ribose (C1-C2) ...	91
Abbildung 36: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 260 von Alanin (C1-C2-C3)	92
Abbildung 38: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 459 von Citrat (C1-C2-C3-C4-C5-C6).....	93
Abbildung 37: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 390 von Serin (C1-C2-C3)	93
Abbildung 39: Vergleichende Flusskarte von mit Paracetamol behandelten Zellen des Hauptexperiments.....	95
Abbildung 40: Vergleichende Flusskarte von mit Diclofenac behandelten Zellen des Hauptexperiments.....	98
Abbildung 41: Vergleichende Flusskarte von mit Tacrin behandelten Zellen des Hauptexperiments.....	101
Abbildung 42: Vergleichende Flusskarte von mit Troglitazon behandelten Zellen des Hauptexperiments.....	104
Abbildung 43: ATP (A), ADP (B), AMP (C) Konzentration in μM normalisiert auf 1 Mio. Zellen und die Energieladung (D).....	105
Abbildung 44: Konzentration von GSH (A), GSSG (B), das Verhältnis von GSSG/GSH (C) und das Verhältnis von ATP/ADP (D) normalisiert auf 1 Mio. Zellen.....	106
Abbildung 45: Übersicht über die einzelnen Phasen der experimentellen Pipeline der Etablierung einer ^{13}C -MFA	107

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über publizierte Stoffflussanalysen mit Leberzellen	28
Tabelle 2: Verwendete Geräte	30
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	32
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	35
Tabelle 5: Verwendete Software	36
Tabelle 6: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Medien	37
Tabelle 7: Mediumzusammensetzung für den Vorversuch Serumkonzentration	43
Tabelle 8: Methodenübersicht GC/MS Messungen an den drei verschiedenen Maschinen	46
Tabelle 9: Vergleichende Darstellung verschiedener publizierter Stoffflussanalysen mit Leberkrebszellen	60
Tabelle 10: Wachstumsrate und Dopplungszeit der Wachstumskurve	64
Tabelle 11: Vergleich von Austauschraten aus der Literatur mit den bei der Wachstumskurve gemessenen Raten.....	65
Tabelle 12: Die Wachstumsraten und Viabilität der mit den einzelnen Inhibitoren behandelten Zellen und der dazugehörigen Kontrollen.....	71
Tabelle 13: Übersicht über die experimentell bestimmten Austauschraten der Validierungsexperimente.....	72
Tabelle 14: Konzentrationen bei 75 %-iger Viabilität im LDH-Assay der einzelnen Medikamente	79
Tabelle 15: Wachstumsrate und errechnete Viabilität der mit den Medikamenten behandelten Zellen und der dazugehörigen Kontrolle des Screenings	80
Tabelle 16: Übersicht über die Austauschraten der Medikamente der Screenings; Teil 1.....	81
Tabelle 17: Konzentrationen bei 50 %-iger Viabilität im LDH-Assay von den einzelnen Medikamenten	89
Tabelle 18: Wachstumsraten und errechnete Viabilität von den mit Paracetamol, Diclofenac, Tacrin und Troglitazon behandelten Zellen und der Kontrolle	89
Tabelle 19: Übersicht über die Austauschraten der Medikamente des Hauptexperiments.....	90
Tabelle 20: Übersicht über die signifikant zur Kontrolle unterschiedlichen Flüsse des Hauptexperiments in Prozent	94

1. Einleitung

1.1 Hintergrund der Arbeit

Einer der Hauptgründe für den Abbruch von Zulassungsverfahren oder dem Marktrückzug von Medikamenten und den damit verbundenen hohen Kosten ist Toxizität. Die Mehrheit der verschiedenen Toxizitäten bilden dabei kardiovaskuläre und Hepatotoxizität (Mueller *et al.*, 2014). Arzneimittelinduzierte Leberschäden (engl. *drug induced liver injury*; DILI) werden oft erst nach der Markteinführung von Medikamenten erkannt. Dies ist dadurch bedingt, dass sie in Tierversuchen nur etwa 50 % Korrelation mit der Toxizität am Menschen aufweisen (Boelsterli, 2003; O'Brien *et al.*, 2006; Noor *et al.*, 2009).

Um dies zu umgehen, werden fortwährend alternative Prüfungsmethoden für präklinische Studien im Bereich der *in vitro* Tests gesucht. Die Untersuchung an primären humanen Hepatozyten ist zur Zeit der Goldstandard für Untersuchungen der Hepatotoxizität (Gómez-Lechón *et al.*, 2017). Diese Zellen weisen sowohl die volle metabolische Funktionalität als auch die leberspezifischen Funktionen von Organzellen im Körper auf. Nachteilig ist jedoch, dass primäre humane Hepatozyten phänotypisch instabil sind, spenderabhängig variieren, eine kurze Lebensdauer haben und die Verfügbarkeit von extrahierbarem Gewebe begrenzt ist. Humane Hepatomazellen hingegen sind leicht verfügbar, einfach zu kultivieren, haben einen stabilen Phänotyp und eine unbegrenzte Lebensdauer. Daher werden solche Zellen, wie z.B. die Zelllinie HepG2, als alternative Testmatrix genutzt (Noor *et al.*, 2009).

Ein mögliches Testsystem für Lebertoxizität kommt aus dem Bereich der Fluxomics. Viele Medikamente interagieren mit dem zellulären Kohlenstoffmetabolismus direkt oder durch Beeinflussung des Transkriptionslevels (Fan *et al.*, 2012). Die Stoffflussanalyse (engl. *Metabolic Flux Analysis*; MFA) ist eine Methode um den primären Stoffwechsel von Zellen quantitativ darzustellen (M. Antoniewicz, 2015). Frühere Studien beweisen bereits, dass ein Vergleich dieser Flüsse in An- und Abwesenheit von Medikamenten sowohl geeignet ist Unterschiede in den Flüssen darzustellen, als auch Hinweise auf die *Targets* der unerwünschten Arzneimittelwirkungen gibt (Niklas *et al.*, 2009; Strigun *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2012; Bruntz *et al.*, 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurden bekannt hepatotoxische Medikamente eingesetzt, um Veränderungen in den metabolischen Flüssen von HepG2-Zellen per ¹³C-MFA zu bestimmen. Ziel der Arbeit war zum einen der Beweis der Eignung dieser Methode zur Identifizierung von signifikanten Veränderungen der metabolischen Flüsse des Primärstoffwechsels durch

Medikamentenzugabe. Zum anderen sollte untersucht werden, ob diese Veränderungen im Primärstoffwechsel Hinweise auf die Toxizitätsmechanismen geben. Dies soll zu einem besseren Verständnis der Effekte der Wirkstoffe führen. Prospektiv können so bessere und weniger toxische Medikamente entwickelt werden.

Nachfolgend werden die Themen der vorliegenden Arbeit theoretisch aufgearbeitet.

1.2 Arzneimittelinduzierte Leberschäden (DILI)

Arzneimittelinduzierte Leberschäden sind für ca. 10 % aller unerwünschten Arzneimittelwirkungen verantwortlich (Shapiro *et al.*, 2007). Sie sind zudem eine der Hauptursachen für akutes Leberversagen in Industrienationen (Ostapowicz *et al.*, 2002). Ihre späte Entdeckung, oft erst nach der Zulassung, ist einer der häufigsten Gründen für einen Marktrückzug eines Medikaments (Watkins *et al.*, 2006).

Zu den Ursachen, weshalb DILI in klinischen Studien selten entdeckt werden, zählt u.a. die Probandenanzahl. So ist diese selten ausreichend, um aussagekräftige Stichprobengrößen zur Evaluierung dieses Risikos zu gewährleisten. In der Regel werden 3000 Probanden in einer Phase 3 Studie getestet, DILI tritt hingegen nur einmal aller 10.000 Probanden auf (Lee, 2003; Ortega-Alonso *et al.*, 2016). Hepatotoxizität kann außerdem durch die Kombination mit anderen, teilweise freiverkäuflichen, Medikamenten verstärkt werden. Eine weitere Ursache für fehlende Nachweisbarkeit von Hepatotoxizität in klinischen Studien ist, dass oft Tierversuche genutzt werden, welche nur eine 50 % Korrelation mit der Lebertoxizität am Menschen zeigen (Boelsterli, 2003; O'Brien *et al.*, 2006; Noor *et al.*, 2009).

1.2.1 Einteilung

Es werden zwei Arten von DILI unterschieden, die intrinsischen und die idiosynkratischen DILI. Intrinsische DILI sind vorhersehbare, von der Dosis des Medikaments abhängige Schädigungen, die bei jeder Person in einem ähnlichen Muster verlaufen. Ein prominentes Beispiel hierfür ist Paracetamol. Idiosynkratische Leberschäden treten hingegen nur bei einzelnen Individuen auf, sind weniger dosisabhängig und entwickeln sich über einen längeren Zeitraum. Wirkstoffbeispiele hierfür sind Isoniazid und nichtsteroidale Antiphlogistika (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drug*; NSAIDs). (Tujios *et al.*, 2011; Leise *et al.*, 2014; Höner zu Siederdisen *et al.*, 2016)

Klinisch können DILI anhand des Musters der Leberschädigungen als hepatozellulär, cholestatisch oder gemischt auftretend kategorisiert werden. Hepatozelluläre Schäden beschreiben einen direkten Effekt des Medikaments oder seiner Abbauprodukte auf die Zelle

(Lee, 2003). Cholestatische Schäden hingegen sind Schädigungen im Gallegewebe, vorrangig an der kanalikulären Membran oder den umliegenden Transportern (Lee, 2003). Zur klinischen Einteilung dieser Schäden erfolgt die Messung der Serumleberenzyme Alaninaminotransferase (ALT), welches vorrangig in den Hepatozyten exprimiert wird, und der alkalischen Phosphatase (AP), welches vorrangig in Gallezellen exprimiert wird. Anhand des Quotient von ALT und AP kann die Art der Schädigung genauer klassifiziert werden (Leise *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2016; Höner zu Siederdisen *et al.*, 2016).

1.2.2 Risikofaktoren

Das Patientenalter, das Geschlecht und der BMI haben Auswirkungen auf den Metabolismus eines Medikaments und somit auch auf arzneimittelinduzierte Leberschäden (Lee, 2003). Bei hohem Alter treten beispielsweise vermehrt Leberschäden bei der Einnahme von Isoniazid auf. Bei jungen Patienten ist dies bei der Einnahme von Aspirin der Fall (Leise *et al.*, 2014). Weitere beeinflussende Faktoren sind die gleichzeitige Nahrungs- und Medikamentenaufnahme sowie physiologische Veränderungen wie Schwangerschaft, Nieren- oder Lebererkrankungen (Lee, 2003; Leise *et al.*, 2014). Auch Enzyminduktoren haben einen Einfluss auf die Stärke der DILI, wie z.B. der Einfluss von Ethanol auf die Wirkung von Paracetamol. Durch die Präsenz von Ethanol wird die Verstoffwechslung von Paracetamol verlangsamt. Nach dem Entzug von Alkohol kommt es jedoch zu einem verstärkten Abbau von Paracetamol über Cytochrom 2E1 zum toxischen Abbauprodukt N-Acetylchinonimin (Lee, 2003).

1.2.3 Pathophysiologische Mechanismen

Die durch Medikamente verursachten Leberschäden können sich auf verschiedene Arten äußern, jedoch sind nicht alle Mechanismen oder Ausprägungen im ¹³C-MFA Modell abbildbar. Im Folgenden soll auf die bekannten Mechanismen von DILI und deren Abbildbarkeit in einem Modell des primären Stoffwechsels eingegangen werden.

Intrinsische Leberschäden treten zeitnah nach Medikamenteneinnahme auf, meist interagieren toxische Abbauprodukte direkt mit der Funktion von Zellorganellen, wie dem Mitochondrium oder der Gallensekretion, und rufen so toxische Effekte hervor (Hamilton *et al.*, 2016). Dies ist oft auch speziesübergreifend reproduzierbar (McGill *et al.*, 2019). Intrinsische Leberschäden werden direkt über das Medikament oder ein reaktives Abbauprodukt hervorgerufen. Bei normaler Leberfunktion werden diese mit verschiedenen Stoffen konjugiert, um sie je nach Löslichkeit über die Niere oder Galle auszuscheiden (Geisslinger *et al.*, 2020). Sind diese Konjugationswege gesättigt oder gestört, können reaktive Abbauprodukte akkumulieren. Sie

reagieren dann mit allen verfügbaren Strukturen, bilden Proteinaddukte oder binden an die mitochondriale DNA (Lancaster *et al.*, 2015). Dadurch wird die normale Mitochondrienfunktion gestört, was für die Zelle toxisch ist. Diese gestörte Mitochondrienfunktion ist prinzipiell in einem primären Stoffwechselmodell durch veränderte Stoffflüsse im Mitochondrium und den zuleitenden Flüssen abbildbar. Weiterreichende Folgen, wie Störungen im Gallefluss, Störungen von Transporterproteinen, Apoptose einleitende Kaskaden oder Auswirkungen auf andere Zellarten sind im Modell nicht abbildbar. Jedoch kann, bei einem Hinweis auf eine mitochondriale Dysfunktion im Modell in der Toxizitätsprüfung von Medikamentenkandidaten, an diesem Punkt mit anderen Methoden tiefer geforscht werden.

Idiosynkratische Leberschäden können eine große Bandbreite von histologischen Veränderungen hervorrufen, welche erst einige Zeit nach der Medikamentenaufnahme auftreten und in verschiedenen Spezies schwer zu reproduzieren sind (Hamilton *et al.*, 2016; McGill *et al.*, 2019). IDILI Medikamente können z.B. durch verschiedene Mechanismen zu mitochondrialer Dysfunktion führen (Utrecht, 2019). Manche Medikamente inhibieren hierbei die Atmung oder die β -Oxidation von Fettsäuren direkt (Kuna *et al.*, 2018). Andere reagieren mit der mtDNA, mitochondrialen Transkripten oder mit Proteinen des Mitochondriums, was sekundär die zelluläre Atmung durch Reduzierung der Produktion von Polypeptiden der oxidativen Phosphorylierung inhibiert (Tujios *et al.*, 2011). Auch können verschiedene Medikamente die mitochondriale Membran stören. Am häufigsten kommt es zu Leberschäden über die Entstehung von reaktiven Abbauprodukten der Medikamente (Pessayre *et al.*, 2012). Wenn diese Zwischenprodukte nicht mit Hilfe von Glutathion (GSH) reduziert werden oder dieser Weg gesättigt ist, können sie an Makromoleküle der Leber angreifen und durch toxisch oder immunvermittelte Ereignisse eine Hepatitis hervorrufen, welche wiederum eine Schädigung der Mitochondrienmembran bedingen und darauf hin zum Zelltod führen (Kuna *et al.*, 2018). Mitochondriale Dysfunktion lässt sich, wie bereits erwähnt, im Modell abbilden. Im Gegensatz dazu lassen sich immunvermittelte Ereignisse nicht abbilden, jedoch kann eine mitochondriale Dysfunktion einen Hinweis darauf geben.

Ein weiterer Mechanismus für IDILI ist das Entkoppeln der oxidativen Phosphorylierung (Hamilton *et al.*, 2016). Dabei dient ein elektrophiles Medikament anstatt des Komplex V (F-ATPase) als Protonentransporter, wodurch der Protonentransport und die Phosphorylierung von ADP entkoppelt werden (Berg *et al.*, 2012). Durch den gestörten Protonengradienten wird kein ATP zum Speichern von Energie erzeugt, sondern die überschüssige Energie stattdessen als Wärme abgegeben (Berson *et al.*, 1996). Der ATP-Mangel kann zu Dysfunktion der Zelle bis hin zur Nekrose führen und sekundär auch die β -Oxidation der Fettsäuren inhibieren, was wiederum

eine Stenose verursacht (Pessayre *et al.*, 2012). Dies äußert sich im primären Stoffwechsel mit einem erhöhten Fluss im Mitochondrium, da die Zelle versucht den ATP-Mangel auszugleichen. Außerdem folgt eine Erhöhung des Glykolyseflusses (Berson *et al.*, 1996).

Sowohl DILI als auch IDILI (engl. *idiosyncratic drug induced liver injury*) hervorrufende Medikamente können oxidativen Stress verursachen (McGill *et al.*, 2019). Oxidativer Stress definiert sich als oxidative Schäden an Zellen und Zellorganellen (Sies *et al.*, 2017; Schittenhelm *et al.*, 2019). Reaktive Substanzen können hierbei Proteine, Fette oder Kohlenhydrate in der Zelle oxidieren, was Funktionsverlust zur Folge hat (Tujios *et al.*, 2011). Dies kann bis zur Apoptose oder Nekrose der Zellen führen. Oxidativer Stress kann die Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach sich ziehen, was wiederum den Elektronentransport stören kann (Kim *et al.*, 2017). ROS können außerdem an mitochondriale DNA binden, was die Funktion des Mitochondriums stört und damit oxidativen Stress auslöst. Daraus resultiert eine gestörte Fettsäuresynthese und eine aerobe Glykolyse, was folglich zu Laktatazidosen und Mikrogefäßstenosen führen kann (Tujios *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2017). Gegen diese Schäden nutzt die Zelle GSH als Antioxidans. GSH reduziert die reaktiven Abbauprodukte und wird dabei zu GSSG oxidiert. Dieses Dimer wird mit Hilfe von NADPH aus dem Pentosephosphatweg, dem *Malic Enzyme* (engl., ME), der Isocitratdehydrogenase (ISDH) oder aus dem Folatstoffwechsel zu GSH regeneriert (Sies *et al.*, 2017). Unter Stress erhöht sich der Pentosephosphatweg (PPP) von der Zelle und der untere Teil der Glykolyse wird deaktiviert, um mehr NADPH herzustellen (Schittenhelm *et al.*, 2019). Im Modell müsste daher anhand des PPP und der Glykolyse Aussagen über die Anwesenheit von oxidativem Stress getroffen werden können.

Lebertoxische Mechanismen, die mit der Stoffflussanalyse nicht abgebildet werden können, sind Veränderungen an den Transporterproteinen die den Gallefluss steuern und Auswirkungen auf andere Zellenarten, wie z.B. Kupferzellen, welche wiederum weitere Kaskaden aktivieren. Außerdem sind immunbasierte Auswirkungen oder genetische Polymorphismen nicht darstellbar. Jedoch kann, wie oben erwähnt, bei einem Anzeichen von mitochondrialer Dysfunktion, die einer der ersten Schritte vieler toxischer Mechanismen von DILI ist, mit tiefergreifenden Untersuchungen angesetzt werden.

1.2.4 Untersuchungsmethoden

Da aus ethnischen Gründen keine Versuche an Patienten durchgeführt werden können, ist es bis heute nicht möglich per *in vivo*-Modellen alle Facetten von Leberversagen in Menschen abzubilden (Maes *et al.*, 2016). Es muss auf Tiermodelle zurückgegriffen werden. Durch die unzureichende Bezugsfähigkeit der Daten aus Tiermodellen zum Menschen, müssen diese mit

in vitro-Methoden kombiniert werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Primäre humane Zellkulturen können *in vitro* genutzt werden. Da sie oft durch die Kultivierung *in vivo* Leberfunktionen einbüßen, sind primäre humane Hepatozyten jedoch nur eine ergänzende Möglichkeit (Maes *et al.*, 2016). HepG2-Zellen bilden in dieser Hinsicht eine gute Alternative. Sie haben viele der Funktionen von primären Leberzellen behalten und verlieren sie nicht rapide während der Kultivierung (Niklas *et al.*, 2009).

1.2.5 Mit DILI assoziierte Medikamente

Mehrere auf dem Markt befindliche Arzneimittel können mit DILI assoziiert werden. Im Folgenden wird eine Auswahl dargestellt.

1.2.5.1 Paracetamol

In den USA ist Paracetamol für 46 % der DILI verantwortlich (Tujios *et al.*, 2011; Ortega-Alonso *et al.*, 2016). Damit ist es die häufigste Ursache für akutes Leberversagen. Davon sind 50 % auf ungewollte chronische Überdosierung zurückzuführen (Lancaster *et al.*, 2015). Da das Anilin-Derivat (vgl. Abbildung 1A) Paracetamol ein freiverkäufliches Schmerzmittel ist, kann es schnell zu dieser Überdosierung kommen. Oft wird unwissentlich überdosiert, zum Teil durch Kombination mit anderen Arzneimitteln oder Alkohol. Paracetamol wirkt antipyretisch und analgetisch, jedoch, im Gegensatz zu den NSAIDs, nur gering antiphlogistisch (Geisslinger *et al.*, 2020). Zur Toxizität kommt es unter anderem durch die Bildung des reaktiven Abbauprodukts N-Acetylchinonimin (engl. *N-acetyl-p-benzoquinon*; NAPQI). Paracetamol wird zu 80 - 90 % glukoronidiert, sulfatisiert und über den Urin ausgeschieden. 10 % allerdings werden über die CYP-Enzyme CYP2E1 und CYP1A2 verstoffwechselt (David *et al.*, 2010; Ramachandran *et al.*, 2017). Durch diese Verstoffwechslung entsteht NAPQI, welches von Glutathion gebunden und über die Galle ausgeschieden wird. Bei einer Überdosierung von Paracetamol kann es zu einer Sättigung dieses Konjugationsweges kommen, wodurch NAPQI in der Leber kumuliert. Dort reagiert es mit den Schwefelwasserstoffgruppen von Proteinen, führt zu mitochondrialer Dysfunktion und damit zur Apoptose der Hepatozyten. Tritt eine solchen Vergiftung ein wird Acetylcystein, ein Vorläufer der Glutathionsynthese und Antioxidanz, als Antidot verabreicht (Höner zu Siederdisen *et al.*, 2016). Die Vergiftung mit Paracetamol ist ein Beispiel für intrinsische, dosisabhängige Lebertoxizität. Bei gleichzeitiger Einnahme mit Alkohol können vermehrt zu Leberschäden auftreten. Alkohol wirkt als CYP2E1 Induktor und regt damit die vermehrte Produktion von NAPQI an.

1.2.5.2 Tacrin

Tacrin (vgl. Abbildung 1B) war das erste Antidementivum aus der Klasse der Acetylcholinesterase-Hemmer. Es wurde jedoch wegen Lebertoxizität vom Markt entfernt (Geisslinger *et al.*, 2020). Acetylcholinesterase-Hemmer werden bei der Therapie von Morbus Alzheimer genutzt, da die Krankheit mit einer gestörten cholinergen Erregungsübertragung einhergeht. Die Gabe von Tacrin führte bei 50 % der Patienten zu leichten Leberfunktionsstörungen (Berson *et al.*, 1996). Andere Organe sind aufgrund des First-Pass-Effekts in der Leber dem Arzneistoff weniger ausgesetzt. Deshalb schädigt er vorrangig die Leber (Pessayre *et al.*, 2012). Tacrin wird von den Zellen aufgenommen und im Mitochondrium gesammelt (Berson *et al.*, 1996), wodurch es selektiv die mtDNA schädigt. Dies führt zur Verminderung der mtDNA, was seinerseits zum Tod der Zelle führen kann (Pessayre *et al.*, 2012). Ein weiterer Hauptmechanismus der DILI ist die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (Berson *et al.*, 1996). Des Weiteren sind für die Hepatotoxizität von Tacrin das Enzym CYP1A2, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und das GSH-Level von Bedeutung.

1.2.5.3 Diclofenac

Nichtsteroidale Antiphlogistika sind eine große Gruppe von meist freiverkäuflichen Schmerzmitteln. Mehrere Vertreter dieser Gruppe, z.B. Bromfenac, Ibuprofen und Benoxaprofen, wurden wegen ihrer leberschädigenden Wirkung vom Markt genommen (Schmeltzer *et al.*, 2016). NSAIDs hemmen die Cyclooxygenasen (COX). COX überführen Arachidonsäure in cyclische Endoperoxide, die Vorstufen von Prostaglandinen. Somit inhibieren NSAIDs die Prostaglandinsynthese. Diclofenac, ein Essigsäurederivat (vgl. Abbildung 1C), hemmt zwei Isoformen der COX, COX-1 und COX-2. Es hat dabei eine geringe Präferenz zu COX-2 als zu COX-1 (Geisslinger *et al.*, 2020). In seltenen Fällen, 6 - 18 Fälle pro 100.000 Personenjahre (Walker, 1997), kann Diclofenac zu schweren Leberschäden führen. Da sehr viele Menschen weltweit mit Diclofenac behandelt werden, ist die absolute Zahl der gemeldeten Fälle im Vergleich zu anderen Medikamenten jedoch verhältnismäßig hoch (Boelsterli, 2003). Diclofenac ist ein typischer Auslöser für idiosynkratische Leberschäden, wobei der Toxizitätsmechanismus weitgehend unbekannt ist. Es wird vermutet, dass über die Verstoffwechslung von Diclofenac über die CYP-Enzyme reaktive Abbauprodukte entstehen können (David *et al.*, 2010) oder die elektrophile Struktur des Arzneistoffes direkt zu Interaktionen mit Proteinen führt (Schmeltzer *et al.*, 2016).

Eine Interaktion von Diclofenac mit dem Mitochondrium ist nachgewiesen (Beckers *et al.*, 2010). Sie geschieht über die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Dabei wird die Kopplung zwischen Elektronentransport und Phosphorylierung an der Mitochondrienmembran aufgehoben. Aufgrund dessen wird die überschüssige Energie des mitochondrialen Membranpotentials als Wärme abgegeben (Berg *et al.*, 2012).

1.2.5.4 Troglitazon

Glitazone sind eine Gruppe der insulinunabhängigen Antidiabetika. Die antihyperglykämische Wirkung entsteht durch die Stimulation des γ -Subtypes der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (engl. *peroxisomal proliferator activated receptor*; PPAR γ). Diese Rezeptoren steigern die Bildung von Proteinen, welche die Glukoseverwertung erhöhen. Dadurch sinkt die Plasmakonzentration von Glukose, wodurch der HbA1c-Wert reduziert und die Insulinsensitivität gesteigert wird. (Geisslinger *et al.*, 2020)

Alle Glitazone haben starke Nebenwirkungen, zu denen auch Leberfunktionsstörungen gehören. Bei manchen Patienten führte die Behandlung mit Troglitazon zu idiosynkratischen Leberschäden. Troglitazon (vgl. Abbildung 1D) wurde daher schon im Jahr 2000 vom Markt genommen. Bei idiosynkratischen DILI wird vermutet, dass physiochemische Eigenschaften von Medikamentenklassen die Wahrscheinlichkeit für Leberschäden erhöhen. Bei den Glitazonen scheint dies nicht der Fall zu sein, da Rosiglitazon und Pioglitazon, die zweite Generation der Glitazone, weniger hepatotoxisch sind als ihr Vorgänger. (Tujios *et al.*, 2011)

Troglitazon verursacht Störungen der Mitochondrienfunktion, wie die Inhibierung der β -Oxidation (Beckers *et al.*, 2010), direkte Schäden an den Gallengängen (Lee, 2003) oder eine

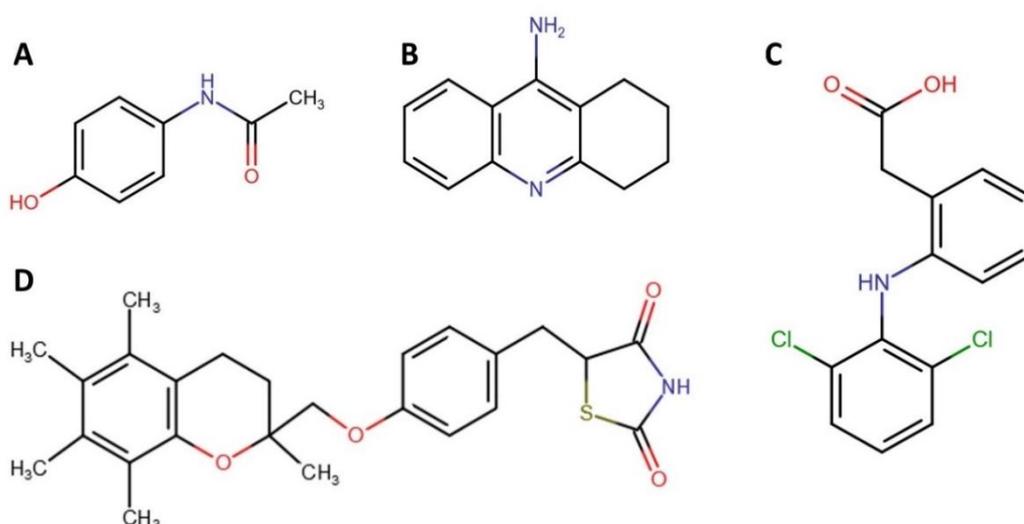


Abbildung 1: Chemische Strukturen von Paracetamol (A), Tacrin (B), Diclofenac (C) und Troglitazon (D)

proinflammatorische Immunantwort durch die Produktion von Zytokinen (Kim *et al.*, 2017). Diese Störungen können einzeln und in Summe zu Leberschäden führen.

1.2.5.5 Weitere Medikamente

Es existieren noch weitere Medikamente die mit Lebertoxizität in Verbindung gebracht werden. Ein weiteres Medikament, für das intrinsische DILI nachgewiesen wurden, ist Cisplatin, ein Alkylanz welches zur Chemotherapie genutzt wird. Cisplatin blockiert die Glykolyse, den Citratzyklus, die Glutathionsynthese, den C1-Metabolismus und die Nukleotidsynthese (Fan *et al.*, 2012).

Medikamente, für welche idiosynkratische Leberschäden nachgewiesen wurden, sind Verapamil, Tetracyclin, Chlorpromazin, Isoniazid und Amiodaron. Verapamil ist ein Calciumkanalblocker und wird bei Hypertonie, symptomatischer koronarer Herzkrankheit, supraventrikulärer Tachykardie und bei Vorhofflimmern eingesetzt (Geisslinger *et al.*, 2020). Die durch Verapamil hervorgerufenen DILI äußern sich durch erhöhten oxidativen Stress, Störungen in der mitochondrialen Funktion, Cholestasis und Hepatitis (Mennecozzi *et al.*, 2015). Chlorpromazin, ein Neuroleptikum, verursacht ebenfalls Cholestasis (Lee, 2003). Diese wird vermutlich durch einen gestörten Kationentransport hervorgerufen (Kaplowitz, 2004). Tetracyclin, ein Antibiotikum, und Amiodaron, ein Antiarrhythmikum, werden mit mikrovaskulärer Fettleber assoziiert (Lee, 2003; Tujios *et al.*, 2011; Leise *et al.*, 2014). Isoniazid, ein Antituberkulotikum, bildet ein hepatotoxisches Abbauprodukt, das letztendlich zu einer hepatischen Nekrose führen kann (Lee, 2003).

1.3 Stoffflussanalyse an HepG2-Zellen

In den vergangenen Jahren wurden auf humanen Zellen basierende Lebermodelle genutzt, um Tierversuche in Toxizitätsstudien in der Medikamentenentwicklung zu ersetzen (Gómez-Lechón *et al.*, 2017). Dies ermöglicht zum Ausschluss von toxischen Stoffen in der Medikamentenentwicklung ein schnelleres, kosteneffizienteres Feedback.

Zu den führenden *in vitro* Toxizitätsmodellen zählen Modelle mit Lebergewebe, Zelllinien und primären Hepatozyten (Soldatow *et al.*, 2013). Der Vorteil von Lebergewebe ist, dass sich darin alle Zelltypen der Leber finden und Leberstrukturen erhalten bleiben. Nachteilig ist jedoch, dass die Nekrose schon nach 20 h einsetzen kann (Toutain *et al.*, 1998). Primäre Zellkulturen sind die am meisten genutzte *in vivo* Matrix zur Vorhersage von xenobiotischen Metabolismus, CYP450-Hemmung, Transporterstörung und Medikamententoxizität (Parmentier *et al.*, 2013). Die Zellen dedifferenzieren jedoch unter Standardkultivierungsbedingungen schnell, wodurch sie sich nicht für Langzeitstudien eignen (Mueller *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu besitzen humane Hepatoma-Zelllinien stabile Phänotypen und eine unbegrenzte Lebensdauer.

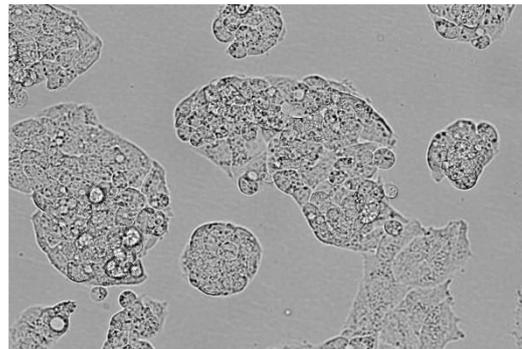


Abbildung 2: HepG2-Zellen in DME-Medium

HepG2 ist eine Zelllinie aus Leberkrebszellen, die 1979 aus einem Tumor eines 15-jährigen kaukasischen Jungen isoliert wurde (Knowles *et al.*, 1983) (vgl. Abbildung 2). Diese Zelllinie hat viele Eigenschaften primärer Hepatozyten beibehalten, darunter die Expressierung von Rezeptoren und die Synthese von Plasmaproteinen und die CYP450-Funktion (Roe *et al.*, 1993; Gómez-Lechón *et al.*, 2014). Da die HepG2-Zellen umfangreich charakterisiert sind, basieren viele Lebertoxizitäts-Modelle auf dieser Zelllinie (Gómez-Lechón *et al.*, 2014, 2017). Damit existieren viele Studien, in denen toxische Stoffe an HepG2-Zellen getestet wurden (Roe *et al.*, 1993; Aoki *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2006; Niklas *et al.*, 2009; Noor *et al.*, 2009; Pereira Da Silva *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2010; Haas *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit wird das Potential einer ^{13}C -Stoffflussanalyse (^{13}C -MFA) zur Detektion von Toxizitätsmechanismen untersucht. Viele Medikamente interagieren mit dem zellulären

Kohlenstoffmetabolismus, sei es direkt oder durch Beeinflussung des Transkriptionslevels. Durch die Bestimmung von Austauschraten und der Umsetzungsrate von Kohlenstoff ist es möglich, diese Auswirkungen von Medikamenten auf den primären Stoffwechsel zu beobachten (Niklas *et al.*, 2009; Strigun *et al.*, 2011). Um ^{13}C -MFA richtig auswerten zu können, wird ein grundlegendes Verständnis zum Stoffwechsel der HepG2-Zellen benötigt. Alle in dieser Arbeit untersuchten Stoffwechselwege sind in Abbildung 3 dargestellt.

1.3.1 Stoffwechsel von Krebszellen

Krebszellen sind immortalisierte Zellen, in denen die Apoptose deaktiviert ist. Genetisch unterscheiden sie sich von primären Zellen durch den Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene und der erhöhten Transkription der Onkogene (Hanahan *et al.*, 2011). Durch diese genetischen Modifikationen zeigen Krebszellen, unabhängig von äußerer Stimulation oder Suppression, eine starke Proliferation. Dies erfordert eine hohe Syntheserate für Zellbausteine wie DNA, Fettsäuren und Aminosäuren. Krebszellen haben daher Mechanismen entwickelt, um diese Bedürfnisse zu decken (Dong *et al.*, 2017). Dieser veränderte Metabolismus von Krebszellen wurde erstmals von Otto Warburg in den 1920er Jahren beobachtet (Liberti *et al.*, 2016). Er beschrieb, dass Krebszellen, anders als primäre Zellen, Pyruvat unter aeroben Bedingungen bevorzugt zu Laktat konvertieren (Heiden *et al.*, 2009; Berg *et al.*, 2013a; Liberti *et al.*, 2016). Diese aerobe Glykolyse führt zu einem verstärkten Wachstum der Zelle und einer erhöhten Proliferation (Chiaradonna *et al.*, 2012). In den letzten 100 Jahren wurden die Aspekte des Warburg Effekts extensiv untersucht und stetig erweitert, was zu einem besseren Verständnis des Krebszellmetabolismus führte (Hsu *et al.*, 2008; Heiden *et al.*, 2009; Altman *et al.*, 2016; Liberti *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2017).

Es gibt verschiedene Theorien inwiefern diese Veränderungen im Stoffwechsel den Krebszellen nutzen. Eine mögliche Erklärung des Warburg Effekts besagt, dass die Herstellung der Citratzyklus-Enzyme energetisch aufwändiger ist als der Gewinn von ATP aus einer erhöhten Atmung. Die gesteigerte Glykolyse gestattet den Zellen anstelle dieser eine höhere Energiegewinnung (Sharma *et al.*, 2013; Basan *et al.*, 2015). Eine weitere Theorie besagt, dass der Warburg Effekt die Anpassungsfähigkeit der Zellen unterstützt. Da die Krebszellen einem stetigen Wandel der physiologischen Bedingungen unterliegen, könnte die aerobe Glykolyse eine robustere Stoffwechselvariante darstellen (Hsu *et al.*, 2008). Des Weiteren wird vermutet, dass der Warburg Effekt den Krebszellen bei der Verhinderung der Apoptose hilft. Obwohl der Citratzyklus und der damit verbundene Elektronentransport vermindert sind, kommt es zu keiner Depolarisation des Membranpotentials, was die Freigabe von Cytochrom C und somit die

Apoptoseeinleitung verhindert (Bonnet et al., 2007). Die erhöhte Glykolyserate begünstigt auch Reaktionen in der Serin Biosynthese, dem Pentosephosphatweg, der Fettsäuresynthese und dem C1-Metabolismus (Liberti et al., 2016).

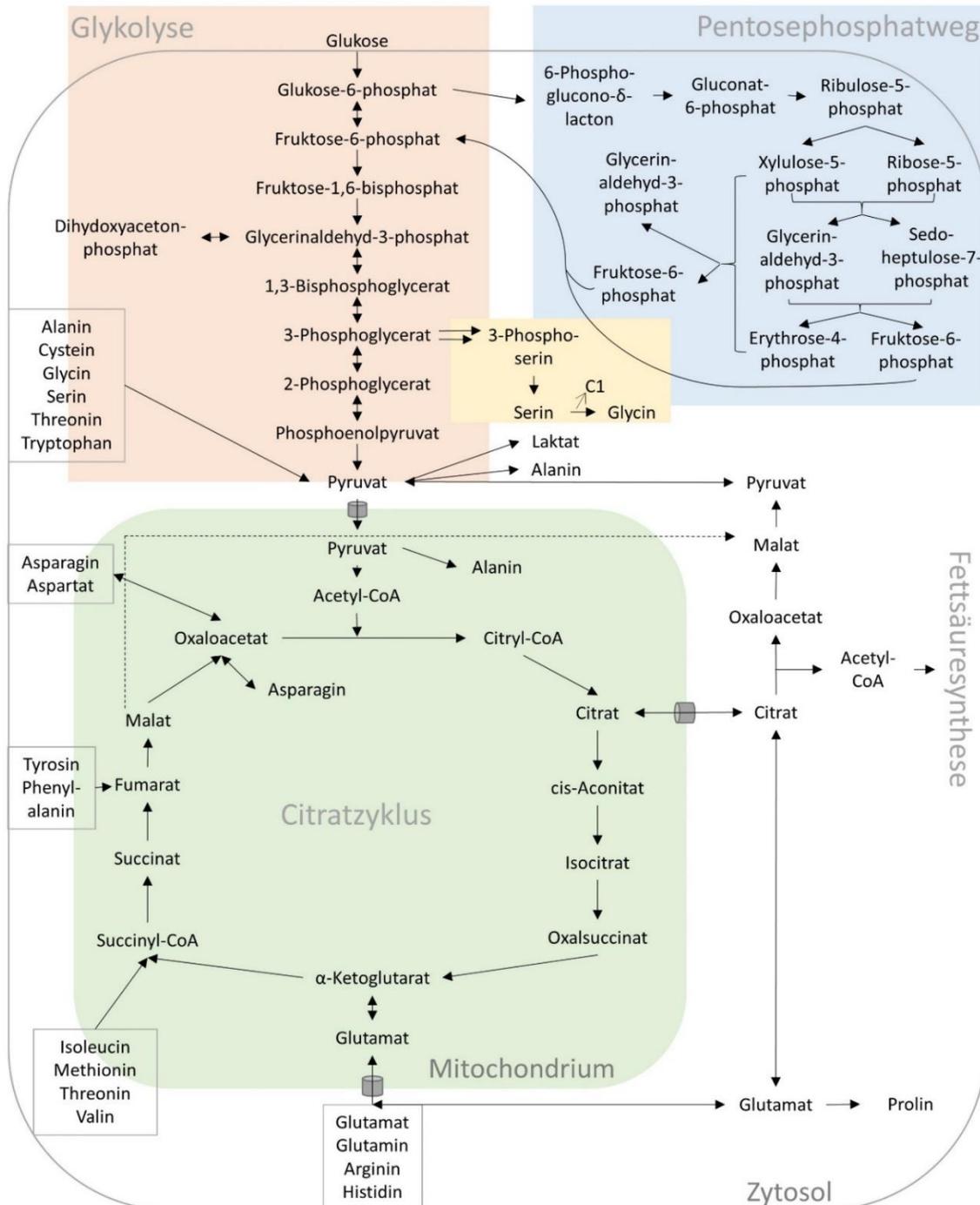


Abbildung 3: Schematische Darstellung des primären Stoffwechsels einer HepG2-Zelle

Es sind die in dieser Arbeit untersuchten Stoffwechselwege aufgeführt: die Glykolyse (orange), der Pentosephosphatweg (blau), die Serinbiosynthese (gelb), der Citratzyklus (grün) und die anaplerotischen Reaktionen (weiß). Mehrere Pfeile nebeneinander zeigen mehrere Reaktionen an. Die Erklärung zu den abgekürzten Metabolitennamen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

Die Glykolyse wird zum Hauptlieferant der Energie in Krebszellen. Die Aktivität der meisten Enzyme der Glykolyse, wie z.B. der Hexokinasen und der Laktatdehydrogenase, ist erhöht (Chiaradonna *et al.*, 2012). Des Weiteren wird die M2 Isoform der Pyruvat-Kinase (PKM2) stärker als in primären Zellen exprimiert. Dadurch erfolgt eine erhöhte Verwertung von Glukose und eine Produktionssteigerung von Laktat (Christofk *et al.*, 2008). Jedoch zeigt PKM2 eine geringere katalytische Aktivität im Vergleich zu PKM1. Die dennoch erhöhte Glykolyse wird auf einen Rückkopplungseffekt zurückgeführt (Chiaradonna *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2017). ATP, welches in der herkömmlichen Glykolyse durch PKM1 generiert wird, inhibiert als Rückkopplung die Phosphofruktokinase und senkt somit die Glykolyseaktivität. PKM2 dagegen produziert weniger ATP und regt einen alternativen Stoffwechselweg in der Glykolyse an. Phosphoenolpyruvat (PEP) transferiert ein Phosphat zur Aktivierung zur Phosphoglyzeratmutase (PGAM). Die PGAM kann nun unabhängig vom ATP Pyruvat produzieren, was die Glykolyse erhöht (Vander Heiden *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2017).

Für eine schnelle Proliferation ist des Weiteren eine Erhöhung der *de-novo*-Synthese der Nukleotide notwendig. In Relation zur Glykolyse wird der oxidative Pentosephosphatweg (oxPPP) in Krebszellen weniger verstärkt. Um dies auszugleichen und trotzdem ausreichend Ribose-5-phosphat (R5P) für die Nukleotidsynthese bereit zu stellen, wird der nicht-oxidative Pentosephosphatweg (noxPPP) erhöht (Ahn *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2017).

Da Krebszellen durch den Warburg Effekt weniger Ausgangsstoffe für andere Stoffwechselwege über die Glykolyse herstellen können, haben sie metabolische Ausweichmöglichkeiten entwickelt. Glutamin ist nach Glukose die wichtigste Kohlenstoffquelle für Zellen (Smith, 1990). Es wurde nachgewiesen, dass Krebszellen in der Lage sind, die reduktive Glutaminolyse zu nutzen, um die fehlenden Bausteine aus der Glykolyse zu ersetzen (Metallo *et al.*, 2012). Glutamin wird in die Zelle aufgenommen, über die Glutaminase in Glutamat umgewandelt und zu α -Ketoglutarat, welches wiederum zu Isocitrat umgewandelt wird, transaminiert. Alle diese Substrate können durch Transporterproteine in das Mitochondrium überführt werden und so, zusammen mit den anaplerotischen Reaktionen, den durch die aerobe Glykolyse verursachten Substratmangel ausgleichen. Glutamin dient außerdem in Reaktionen, wie der Purin- und Pyrimidinsynthese, als Stickstoffdonor und ist eine Vorstufe von GSH (Chiaradonna *et al.*, 2012). Die Fettsäuresynthese in Krebszellen ist ebenfalls verändert. Im Unterschied zu primären Zellen werden die Fettsäuren im Verhältnis eher synthetisiert, als von extern aufgenommen (Chiaradonna *et al.*, 2012). Die Aktivität des Mitochondriums in Krebszellen ist gegenüber unveränderten Zellen reduziert, da Substrate aus der Glykolyse fehlen (Ahn *et al.*, 2012).

Der Serin- und Glycinmetabolismus verbindet den C1-Metabolismus mit dem Primärstoffwechsel. Serin kann sowohl aus dem Medium aufgenommen als auch aus 3-Phosphoglycerat (3PG) synthetisiert werden. Durch den erhöhten Glykolysefluss in Krebszellen wird folglich auch mehr Serin synthetisiert. Dieses dient der Synthese von Glycin, welches weiterhin Methylgruppen für die DNA-Methylierung und die Nukleotidsynthese zur Verfügung stellt. Außerdem ist Glycin eine Vorstufe von Glutathion, einem Antioxidans, welches von ROS verursachte Zellschäden verhindert. Die Serinsynthese unterstützt zusätzlich den anaplerotischen Fluss von Glutamin zu α -Ketoglutarat. Daher wird in Zellen, bei denen erhöhte Phosphoglyzerat-Dehydrogenase (PHGDH) vorliegt, die Hälfte des produktiven Stoffwechsels der Serinsynthese zugeordnet (Possemato *et al.*, 2011). Im Zytoplasma kann das Glycin mit 5,10-Methyltetrahydrofolat (5,10-M-THF) zu Serin reagieren. Jedoch ist 5,10-M-THF ein essentieller Bestandteil der Nukleotidsynthese. Deshalb ist die Serinsynthese für die Inhibition von Serinhydroxymethyltransferase (SHMT1) verantwortlich, um so das Reaktionsgleichgewicht in Richtung Nukleotidsynthese zu verschieben. (Chiaradonna *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2017)

1.3.2 Der Nutzen von Markierungssubstanzen zur Analyse des menschlichen Stoffwechsels

Zum Erforschen des menschlichen Stoffwechselnetzwerks werden Markierungssubstanzen genutzt. Das menschliche Metabolom ist ein komplexes Netzwerk auf Stoffwechselwegen in denen einzelne Stoffe in vielen Reaktionen gebraucht werden. Dafür ist Glutamin, welches in 55 Stoffwechselwegen und in ca. 200 Reaktionen involviert ist, ein gutes Beispiel (Fan *et al.*, 2012). Diese Komplexität macht es mathematisch unmöglich den Beitrag von Glutamin für einzelne Stoffwechselwege nur anhand der Metabolitenkonzentrationen und Austauschraten zu errechnen (Niedenführ *et al.*, 2015a; Antoniewicz, 2018). Auch wird die Nachvollziehbarkeit einzelner Stoffwechselwege durch zelluläre Kompartimentierung und den Austausch zwischen einzelnen Kompartimenten noch erschwert (Fan *et al.*, 2012). Ein Beispiel hierfür ist der Austausch von Citrat, Oxalacetat und Malat zwischen dem Mitochondrium und dem Zytoplasma. Zur Verbesserung der Nachvollziehbarkeit können Markierungssubstanzen in einem Tracerexperiment verwendet werden. Die markierte Substanz wird in die Zelle aufgenommen und metabolisiert. Enzymatische Reaktionen reorganisieren die markierten Kohlenstoffatome, was zu einem spezifischen Markierungsmuster in messbaren Metaboliten führt (Antoniewicz, 2018). Dieses Muster ermöglicht unter anderem genauere Aufschlüsse über parallele Stoffwechselwege und Kompartimentierung (Fan *et al.*, 2012). Daher sind zum gründlichen Erforschen des menschlichen Stoffwechselnetzwerks Markierungssubstanzen unabdingbar.

1.3.2.1 Definition von Massen- und Positionsisotopomeren

Die Markierungsdaten der ^{13}C -MFA basieren auf der Massenisotopomerverteilung (MIV) der Kohlenstoffgrundgerüste der zu analysierenden Substanzen (Crown *et al.*, 2012). Unter Massenisotopomer ($M+n$) werden Isotope verstanden, die sich nur anhand der Anzahl der Markierungen im Molekül unterscheiden (Fernandez *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 1999; Ratcliffe *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2011). Positionsisotopomere hingegen besitzen die gleiche Anzahl an markierten Kohlenstoffisotopen mit unterschiedlicher Position der ^{13}C -Atome im Molekül (Christensen *et al.*, 1999). In der ^{13}C -MFA wird die MIV benötigt. Diese entspricht der prozentualen Verteilung von allen Massenisotopomeren von einem Kohlenstoffgrundgerüst (Christensen *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2011).

1.3.2.2 Messung von Massenisotopomeren

In der ^{13}C -MFA führt der Einbau von ^{13}C -Atomen zu unterschiedlichen Markierungsmustern in den Metaboliten und Intermediaten (Niklas *et al.*, 2012). Dies kann mit Hilfe von analytischen Methoden wie MS oder Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) gemessen werden (Sauer, 2006; Maciek R Antoniewicz *et al.*, 2007; Niklas *et al.*, 2010). NMR gibt zwar genaue Informationen über Positionsisotopomere, allerdings sind dafür große Probenmengen und teure Messgeräte nötig (Bruntz *et al.*, 2017). MS ist eine günstigere und schnellere Alternative (Fan *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit werden Massenisotopomere per Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC/MS) gemessen (vgl. Abbildung 4). Die Probenauftrennung mit einer Gaschromatographie ist nur mit verdampfbaren Proben möglich, daher wurden nichtverdampfbare derivatisiert. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Moleküle zu derivatisieren. Dazu gehören Alkylierung, Silylierung und Acylierung (Orata, 2012). Silylierung ist für polare Substanzen geeignet und basiert darauf, dass der aktive Wasserstoff einer OH-, NH- oder SH-Gruppe mit einer Silylgruppe substituiert wird. Dadurch werden Substanzen weniger polar, leichter verdampfbare und sind somit für GC/MS geeignet (Halket *et al.*, 2003). Es gibt unterschiedliche Silylierungsmittel. Hier wurden Bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (BSTFA) und N-methyl-N-tert-butyl-dimethylsilyl-trifluoroacetamid (MBDSTFA) eingesetzt. Aus MBDSTFA resultierende TBDMS-Derivate sind stabiler als aus BSTFA resultierende TMS-Derivate, da die Tertbutyl-Gruppe größer ist (Halket *et al.*, 2003; Sobolevsky *et al.*, 2003). Durch die Größe der Derivate ist MBDSTFA nicht für eng beieinanderliegende substituierbare Gruppen, wie beispielsweise die OH-Gruppen in Zuckern geeignet. Die Silylierung von Proben, z.B. von Aminosäuren, kann direkt mit getrockneten, wasserfreien Proben erfolgen (vgl. Abbildung A 1). In dem Fall, dass Zucker oder Strukturen mit Keto- oder

Aldehydgruppen vorkommen, müssen die Proben mit Methoxyamin (MeOx) vorbehandelt werden. Dabei dient das MeOx als Stabilisator von Keton- und Aldehydgruppen, wodurch instabile Strukturen wie beispielsweise Pyruvat erhalten bleiben. Auch werden Zucker von MeOx in ihrer offenkettigen Form gehalten (Abate *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2014).

Die derivatisierten Proben werden in der GC aufgetrennt und die austretenden Substanzen in der Ionisationskammer des MS durch einen Elektronenstoß ionisiert. Es folgt die Bildung von Fragmenten, welche per Detektor aufgrund ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z) aufgezeichnet werden können. Die Identifizierung der Substanzen ist möglich, da z.B. Aminosäuren oder Zucker unter Elektronenstoßionisation immer in charakteristischen Mustern fragmentieren, welche empirisch bestimmt und in zahlreichen Publikationen beschrieben wurden (vgl. u.a. Laine und Sweeley, 1971; Leimer, Rice und Gehrke, 1977; Molnár-Perl und Katona, 2006; Füzai, Boldizsár und Molnár-Perl, 2008). Abbildung 5 zeigt ein Beispiel für die Fragmentierung von mit MBDSTFA derivatisiertem Alanin. Im linken Teil ist ein Alanin-2TBDMS Mutterfragment vor der Ionisierung und rechts die möglichen resultierenden Fragmente abgebildet. Im unteren Teil der Abbildung sind die Muster tabellarisch zusammengefasst. Dabei beschreibt „M“ die Masse des Mutterfragments und „-n“ die Masse, die vom Mutterfragment abgespalten wurde. Solche Fragmentierungsmuster werden in Spektren aufgezeichnet. Da die Massenauflösung einer GC/MS unterhalb eines Dalton liegt, ist auch die Differenzierung zwischen ^{12}C und ^{13}C - Atomen in diesen Fragmenten möglich.

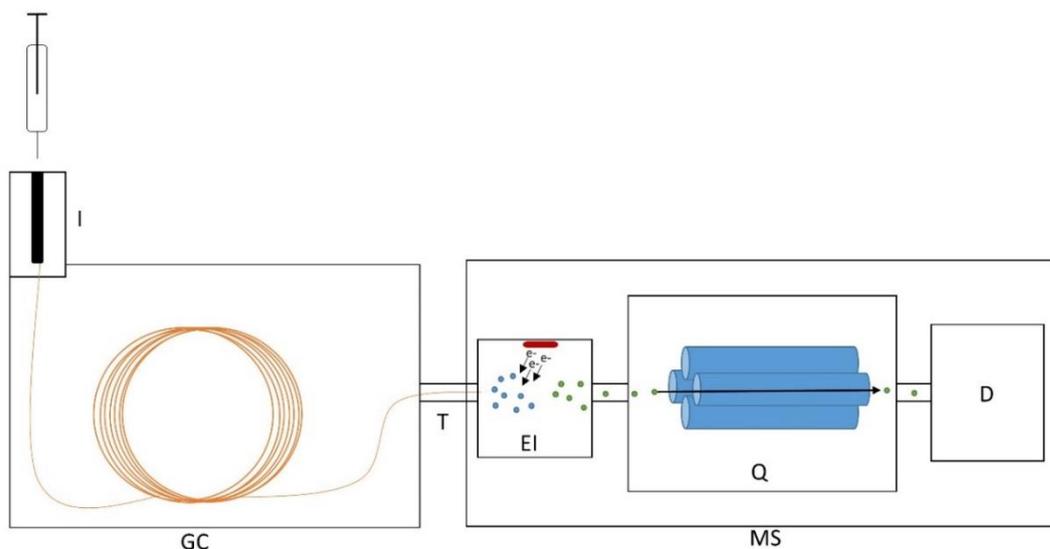
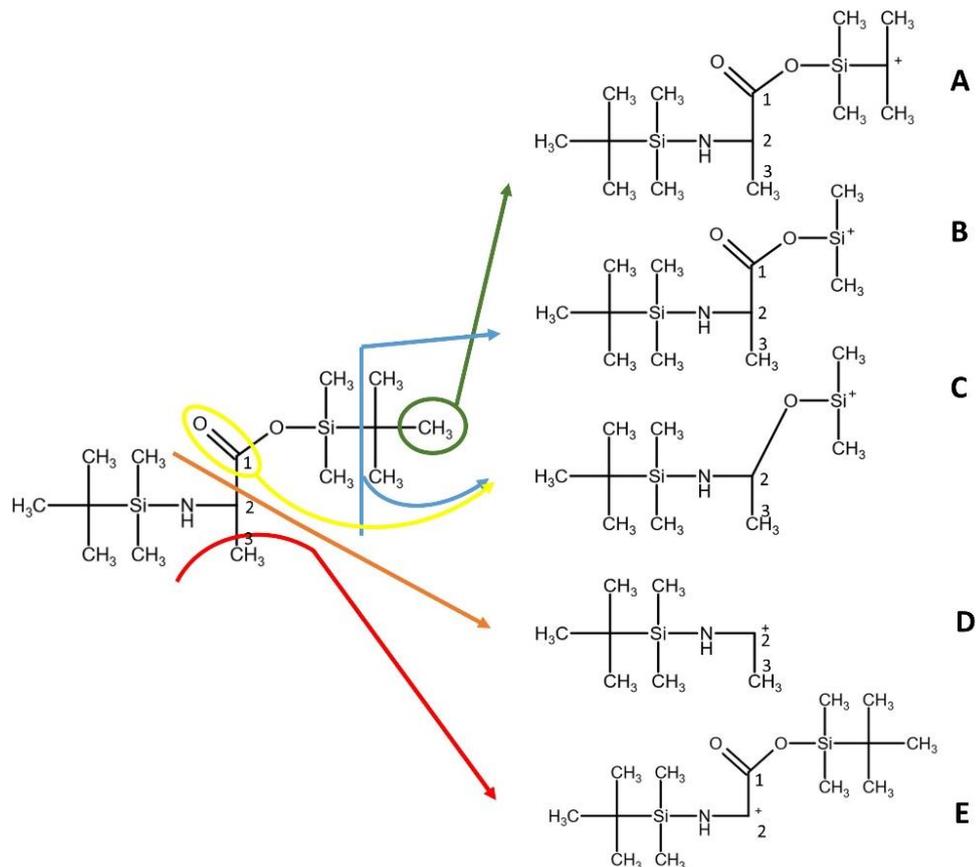


Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer GC/MS

GC = Gaschromatographie, MS = Massenspektrometrie, I = Injektorblock mit Verdampfer, T = Verbindungsstück, EI = Ionisationskammer, Q = Quadrupol, D = Detektor, e- = Elektronen, blaue Kreise = Moleküle, grüne Kreise = Fragmente.

Gemessene Markierungsdaten müssen nachfolgend hinsichtlich der natürlichen MIV korrigiert werden, da stabile Isotope in verschiedenen Häufigkeiten auch natürlich vorkommen (Fernandez *et al.*, 1996; Niklas *et al.*, 2012). Folgend ist eine Interpretation oder weitere Bearbeitung in *in-silico* Modellen möglich.



Fragment (M-n)	Abgespaltene Ionen	Beispiel Alanin Strukturformel	Verbliebenes Kohlenstoffrückgrad
M-15	-CH ₃	A	1-2-3
M-57	-C ₄ H ₉	B	1-2-3
M-85	-C ₅ H ₉ O	C	2-3
M-159	-C ₇ O ₂ H ₁₅ Si	D	2-3
F302	Seitenkette	E	1-2

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fragmentierung von Alanin-2TBDMS

Im oberen Teil der Abbildung sind die möglichen Fragmentierungsmuster am Beispiel von Alanin-2TBDMS abgebildet. Die Fragmentierungsmuster finden sich im Spektrum einer GC/MS-Messung. Im unteren Teil der Abbildung sind die bildlichen Daten tabellarisch zusammengefasst.

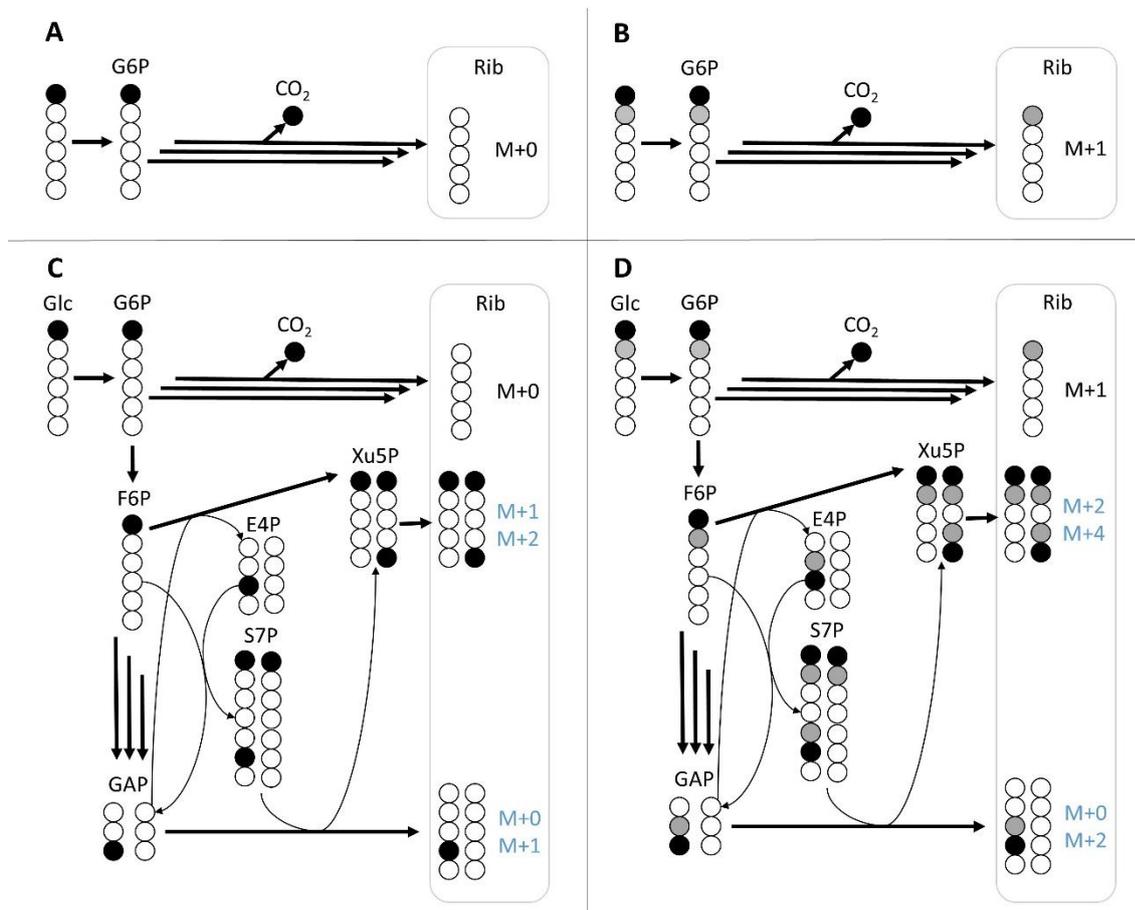


Abbildung 6: Der theoretische Weg von $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose (A+C) bzw. $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose (B+D) durch den oxPPW und den noxPPW bis zur Ribose

A zeigt die Herstellung von M+0 Ribose aus $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose über den oxPPW. **B** zeigt die Herstellung von M+1 Ribose aus $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose über den oxPPW. **C** zeigt die Herstellung von M+0, M+1 und M+2 Ribose aus $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose über den noxPPW. **D** zeigt die Herstellung von M+0, M+2 und M+4 Ribose aus $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose über den noxPPW. Ungefüllte Kreise entsprechen ^{12}C -Atomen, schwarz gefüllte Kreise entsprechen ^{13}C -Atomen aus der Position 1 und grau gefüllte Kreise entsprechen ^{13}C -Atomen aus der Position 2. Mehrere Pfeile nebeneinander zeigen mehrere Reaktionen an. Die Erklärung zu den abgekürzten Metabolitennamen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

1.3.2.3 Theoretische Markierungsmuster in der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg

Die Ergebnisse eines Tracerexperiments einer ^{13}C -Stoffflussanalyse können direkt interpretiert werden. Um das Verhältnis zwischen oxidativen und nicht oxidativen Pentosephosphatweg zu bestimmen, kann $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose und $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose genutzt werden (vgl. Abbildung 6) (Dong *et al.*, 2017). Über den oxidativen Zweig des PPP geht das C-Atom in Position 1 bei der Herstellung von Ribose verloren. Dies führt bei der $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose zu unmarkierter Ribose (M+0) und bei $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose zu einfach markierter Ribose (M+1) (vgl. Abbildung 6C). In Krebszellen ist der noxPPP im Vergleich zu primären Zellen erhöht (Chiaradonna *et al.*, 2012). Bei der Gabe von $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose führt der noxPPP zu M+0, M+1 und M+2 Ribose und bei der Gabe von $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose führt es zu M+0, M+2 und M+4 Ribose (vgl. Abbildung 6D). Existieren also M+1

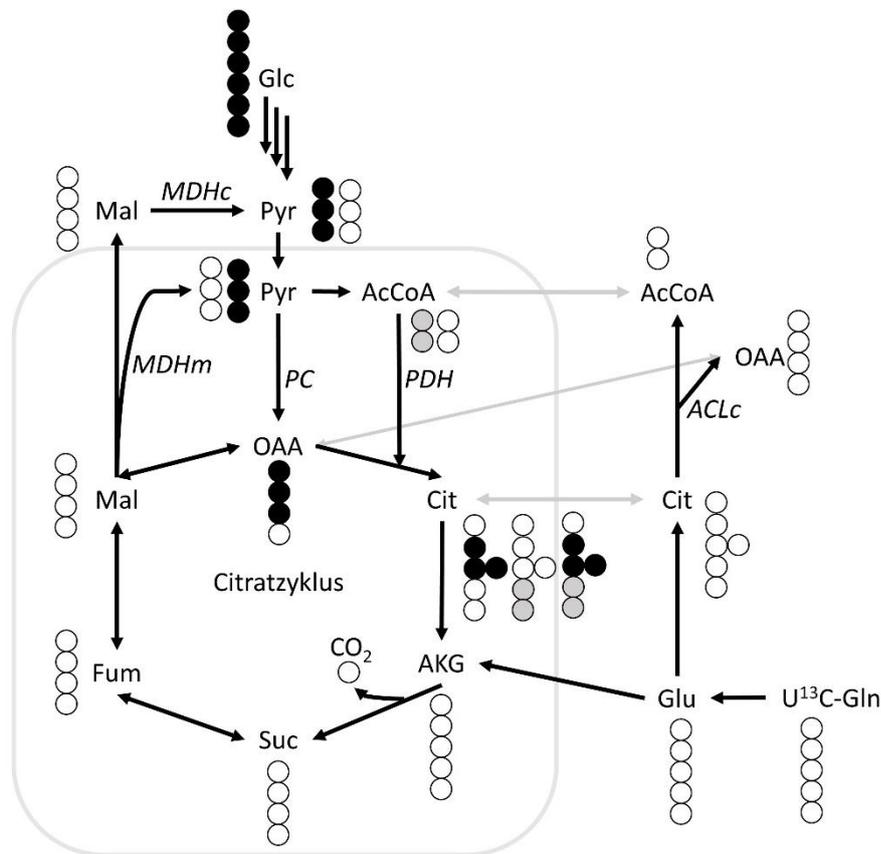


Abbildung 7: Darstellung der theoretischen Markierungsverteilung in der ersten Citratzyklusrunde ausgehend von U-¹³C-Glukose bis zum Citrat

Ungefüllte Kreise entsprechen ¹²C-Atomen, schwarz gefüllte Kreise entsprechen ¹³C-Atomen aus Reaktionen zum OAA und grau gefüllte Kreise entsprechen ¹³C-Atomen aus Reaktionen mit AcCoA. Mehrere Pfeile nebeneinander zeigen mehrere Reaktionen an. Die Erklärung zu den abgekürzten Metabolitennamen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

und M+2 Ribose bzw. M+2 und M+4 Ribose in den Markierungsdaten, ist der nichtoxidative Pentosephosphatweg aktiv und umgekehrt. Je aktiver einer der beiden Pentosephosphatwege ist, desto mehr der respektiven Massenisotopomere treten auf. Anhand des Verhältnisses zwischen den jeweiligen Massenisotopomeren der Ribose, lassen sich daher Rückschlüsse über die Aktivität der beiden Pentosephosphatwege im Vergleich zueinander ziehen (Dong *et al.*, 2017).

Das Verhältnis zwischen den Triosephosphaten nach Gabe von 1,2-¹³C₂-Glukose gibt Aufschluss über das Verhältnis von Glykolyse und PPP-Aktivität. Der Zucker verliert im PPP seinen ersten Kohlenstoff. Das ergibt sowohl M+0, M+1 und M+2 Triosephosphate, während über die Glykolyse nur M+0 und M+2 Triosephosphate entstehen (Antoniewicz, 2018).

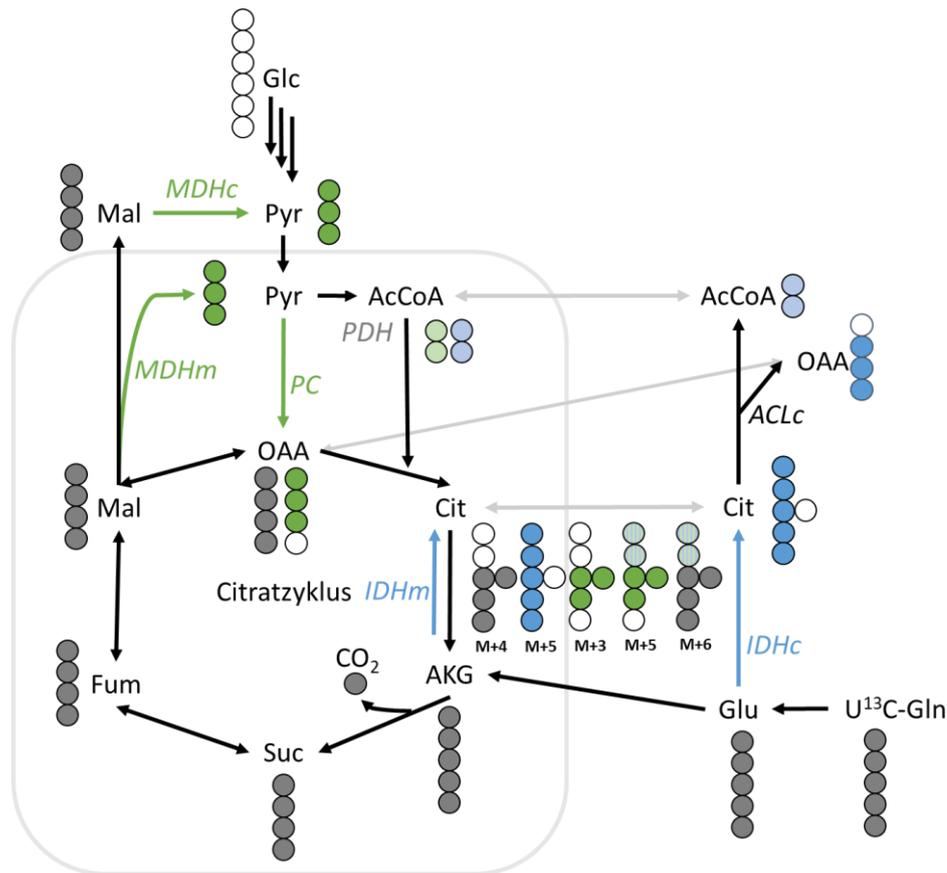


Abbildung 8: Darstellung der theoretischen Markierungsverteilung in der ersten Citratzyklusrunde ausgehend von U-¹³C-Glutamin bis zum Citrat

Ungefüllte Kreise entsprechen ¹²C-Atomen, grau gefüllte Kreise entsprechen ¹³C-Atomen, welche durch die Glutaminolyse entstehen. Blau gefüllte Kreise entsprechen ¹³C-Atomen, welche durch die reduktive Carboxylierung von Glutamin entstehen. Grün gefüllte Kreise entsprechen ¹³C-Atomen, welche durch die MDH und PC entstehen. Blau-grün-gestreifte Kreise kommen durch das AcCoA in das Citrat. Mehrere Pfeile nebeneinander zeigen mehrere Reaktionen an. Die Erklärung zu den abgekürzten Metabolitennamen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

1.3.2.4 Theoretische Markierungsmuster im Citratzyklus

Sowohl U-¹³C-Glukose als auch U-¹³C-Glutamin werden genutzt, um den Citratzyklus ausreichend genau erforschen zu können (Buescher *et al.*, 2015). In Abbildung 7 ist die theoretische Markierungsverteilung in Citrat nach dem ersten Durchlauf des Citratzyklus zu sehen, wenn U-¹³C-Glukose als Tracer genutzt wurde. Es bilden sich M+3 Citrat aus Oxalacetat (OAA), welches von Pyruvatcarboxylase (PC) produziert wird, und Acetyl-CoA (AcCoA), welches u.a. aus der reduktiven Carboxylierung von Glutamin stammen kann. Das M+2 Citrat setzt sich genau gegenläufig zusammen. Das AcCoA stammt hier von der Phosphatdehydrogenase-Enzymkomplex (PDH) und das OAA aus anderen Quellen. M+5 Citrat entsteht, wenn das OAA durch die PC und das AcCoA durch den Stoffwechselweg der PDH generiert wurden. Dies

ermöglicht Aussagen über die Frequentierung der einzelnen Stoffwechselwege im Verhältnis zueinander. (Dong *et al.*, 2017; Antoniewicz, 2018)

Ein weiterer Tracer zur Auflösung des Citratzyklus, ist U-¹³C-Glutamin. In Abbildung 8 ist die resultierende theoretische Markierungsverteilung nach dem ersten Durchlauf des Citratzyklus zu sehen. Es ist erkennbar, dass Glutamin zwar vollständig markiert ist, einzelne Kohlenstoffatome jedoch durch die oxidativen Reaktionen des Citratzyklus als CO₂ verloren gehen. Daher ist das Citrat-Massenisotopomer, welches über die Glutaminolyse produziert wird, vierfach markiert. Wenn Citrat über die reduktive Carboxylierung entsteht, bleiben alle fünf markierten Kohlenstoffe des Glutamins erhalten (Dong *et al.*, 2017). Daher ermöglicht der Quotient zwischen M+4 und M+5 Citrat Aussagen zum Verhältnis der oxidativen Carboxylierung zur reduktiven Carboxylierung. Über dreifach markiertes OAA entsteht dreifach und, im Zusammenspiel mit markierten AcCoA, fünffach markiertes Citrat.

In den darauffolgenden Runden des Citratzyklus ist es möglich, dass alle verschiedenen Massenisotopomere des Citrats entstehen. Wird ein starker Influx von Glutamin und Glukose vorausgesetzt, ist es dennoch möglich, die oben genannten Rückschlüsse zu ziehen (Dong *et al.*, 2017; Antoniewicz, 2018).

1.3.2.5 Theoretische Aussagen durch Markierungsmuster in der Serinbiosynthese

Serin kann von der Zelle sowohl aufgenommen als auch produziert werden. Daher lässt sich anhand der Menge der Markierung in Serin oder Glycin nach Zugabe von U-¹³C-Glukose eine Aussage über die produzierte Menge im Vergleich zur von der Zelle aufgenommenen Menge treffen (Dong *et al.*, 2017).

Markierungsdaten sind aufgrund der komplexen Umlagerungen der Markierungen von Tracern durch verschiedene Reaktionen im Stoffwechsel oft schwer direkt zu interpretieren (Buescher *et al.*, 2015). Eine Methode zur Auswertung der Markierungsdaten im Kontext des Stoffwechsels ist die isotoopenmarkierte Stoffflussanalyse (¹³C-MFA).

1.3.3 Stoffflussanalysen

Die Stoffflussanalyse ist eine Methode, um den quantitativen Stofffluss, z.B. Stickstoff- oder Kohlenstofffluss, von Stoffwechselreaktionen mit Hilfe eines Stoffwechselnetzwerkmodells zu ermitteln (Wiechert, 2001a). Diese metabolischen Flüsse sind das Ergebnis von Transkriptions-, Translations- und allosterischen Regulationsprozessen und somit ein integratives Maß für den zellulären Phänotyp (Nöh *et al.*, 2011; Toya *et al.*, 2011; Niedenführ *et al.*, 2015a). In dieser Arbeit bezieht sich der Begriff Stofffluss auf den quantitativen Kohlenstofffluss einer enzymatischen Reaktion.

Es existieren verschiedene Methoden der Stoffflussanalyse. Diese wiederum werden auf die unterschiedlichsten biologischen Systeme wie auf *E. coli* (Schaub *et al.*, 2008; Nöh *et al.*, 2011) und andere eukaryotische Mikroorganismen (Zhao *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2010; Boyle *et al.*, 2017), Säugetierzellen (Niklas *et al.*, 2010; Quek *et al.*, 2010), bis hin zu Pflanzenkulturen und ganzen Pflanzen (Huege *et al.*, 2012; Kruger *et al.*, 2012, 2014) angewendet.

1.3.3.1 Methoden der Stoffflussanalyse

Die Wahl der Methode der Stoffflussanalyse für ein Experiment oder eine Studie hängt u.a. von den Anwendungsbedingungen, den notwendigen experimentellen Daten, der Größe des Modells und dem mathematischen Ansatz ab. In Abbildung 9 ist eine Übersicht über eine Auswahl von Stoffflussanalysemethoden und deren Anwendungsbedingungen dargestellt. Dazu zählen u.a. das metabolische Gleichgewicht (engl. *metabolic steady state*, MSS) und das isotopische Fließgleichgewicht (engl. *isotopic steady state*, ISS). Ein System befindet sich im MSS, wenn alle Austauschraten und deren Quotienten über den Versuchszeitraum stabil bleiben, die Produktion demzufolge dem Verbrauch entspricht (Nöh *et al.*, 2006). Sind die ¹³C-Markierungsmuster der Metaboliten im Equilibrium liegt ein ISS vor (M. Antoniewicz, 2015). Die Zeitdauer bis dies durch die Zellen erreicht wird, richtet sich nach der Umsatzrate der Metaboliten und der Markierungsdynamik der vorangehenden Metabolite (Antoniewicz, 2018). Des Weiteren ist die Auswahl der Methode u.a. von der gewünschten Größe des Modells und den zur Verfügung stehenden experimentellen Daten abhängig, welche in Kombination die Aussagekraft des Modells ausmachen.

In den nächsten Abschnitten werden die einzelnen Methoden hin zur höheren Komplexität kurz vorgestellt und deren Nutzen im Zusammenhang mit dieser Arbeit eruiert. Tiefgehende Ausführungen zu den Methoden würden den Rahmen dieser Arbeit sprengen, weshalb am Ende jeder Methodenbeschreibung auf weiterführende Literatur verwiesen wird.

		MFA	FBA	¹³ C-MFA	¹³ C-INST-MFA	¹³ C-DMFA
Bedingungen	MSS					
	Markierung					
	ISS					
Modell	Komplexität des Modells					
	bestimmt/ überbestimmt	unterbestimmt	unterbestimmt	unterbestimmt	unterbestimmt	unterbestimmt
Experimentelle Daten						
Beispiele an Säugerzellen	Mediumoptimierung (Meadows et al. 2007; Sidorenko et al. 2008) Produktoptimierung (Altamirano et al. 2001; Munger et al. 2008; Martinez et al. 2010)	Maximierung von Produkten (Martínez et al. 2013) Verbesserung Kultivierung (Ouattara et al. 2012)	Einfluss von Substanzen auf den Stoffwechsel (Strigun et al. 2012; Strigun et al. 2011; DeWaal et al. 2018)	Einfluss von Substanzen auf den Stoffwechsel (Maier et al. 2008; Maier et al. 2009)	Auflösen eines Zellmetabolismus (Ahn et al. 2017; Noguchi et al. 2009)	

Abbildung 9: Übersicht über eine Auswahl von Stoffflussanalysemethoden

Die einzelnen Methoden werden anhand ihrer Bedingungen und experimentellen Daten unterteilt und mit Beispielen belegt. Eine Rotfärbung eines Feldes bedeutet ‚nicht vorhanden‘, eine Grünfärbung bedeutet ‚vorhanden‘.

Stöchiometrische MFA

Die stöchiometrische Stoffflussanalyse (engl. *Metabolic Flux Analysis*, MFA) basiert auf der Annahme, dass sich das modellierte System in MSS befindet. Durch die Annahme, dass die Produktion dem Verbrauch der Metaboliten entspricht lässt sich der Stofffluss eines Metaboliten mathematisch als lineare Gleichung darstellen (Wiechert, 2001a). Da die Metabolitenanzahl in einem modellierten Stoffwechselsystem in der Regel geringer ist als die Anzahl der Stoffwechselreaktionen, ist das lineare Gleichungssystem unterbestimmt (Rios-Esteva *et al.*, 2007). Dies führt dazu, dass eine große Anzahl an möglichen Lösungen bzw. Flussverteilungen für das Gleichungssystem existiert. Um diese zu reduzieren, können beispielsweise experimentelle Daten in das Modell integriert werden (Bonarius *et al.*, 1996). Im Fall der stöchiometrischen MFA beschränkt sich dies auf Austausch- und Wachstumsraten, durch die die bisher unbekannt Flüsse bestimmbar werden (Antoniewicz, 2015). Die MFA ist durch die einfache Algebra und leicht zu bestimmende, experimentelle Daten schnell und einfach anwendbar. Der Nachteil der Methode ist, dass die aufzulösenden Stoffwechselnetzwerke klein sind. Auch können parallele, bidirektionale oder zyklische Stoffwechselreaktionen nicht aufgelöst werden.

Weiterführende Literatur zu diesem mathematischen Ansatz findet sich bei Varma *et al.* (1994) und Bonarius *et al.* (1996). Reviews, die sich mit dem Thema tiefer auseinandersetzen, sind beispielsweise Wiechert (2001), Toya *et al.* (2011) und Antoniewicz (2015).

Flux Balance Analysis

Eine weitere Möglichkeit unterbestimmte Systeme zu analysieren bieten optimierungsbasierter Methoden, wie die *Flux Balance Analysis* (engl., FBA). Unter Vorgabe einer zu optimierenden Zielfunktion wird dabei eine optimale Flussverteilung ermittelt (Orth *et al.*, 2010; M. Antoniewicz, 2015). Die FBA bietet dabei den Vorteil, dass sie einfach anzuwenden ist und genom-skalierte Modellgrößen analysierbar werden. Jedoch ist auch hier die Auflösung von parallelen, bidirektionalen oder zyklischen Stoffwechselreaktionen nicht möglich. Außerdem ist das Ergebnis stark vom ausgewählten Optimierungskriterium abhängig, welches daher mit großer Sorgfalt gewählt werden muss. Dies führt dazu, dass mit FBA nicht der von den Messwerten abhängige, real metabolische Zustand einer Zelle abgebildet werden kann, sondern den Stoffwechsel einer Optimierung abgebildet wird.

Die mathematischen Grundlagen der FBA werden ebenfalls von Varma *et al.* (1994) beschrieben und tiefergehender u.a. von Wiechert (2001), Price *et al.* (2004) und Orth *et al.* (2010) diskutiert. Ein experimentelles Protokoll findet sich bei Becker *et al.* (2007).

¹³C-MFA

Bei der ¹³C-MFA werden zur Lösung des unterbestimmten Gleichungssystems neben den experimentell bestimmten Austauschraten auch Markierungsdaten genutzt (Wiechert, 2001a). Dabei wird zusätzlich zum MSS ein ISS benötigt. Bei der ¹³C-MFA werden Stoffflüsse mit Hilfe der nichtlinearen Methode der kleinsten Quadrate (engl. *non-linear least square regression*) bestimmt. Dies passiert durch die Minimierung der resultierenden Quadratsumme der Abweichungen (engl. *sum of squared residuals*, SSR) zwischen den experimentellen und den modellierten Daten (Wiechert, 2001a; M. Antoniewicz, 2015).

Die Methode eignet sich im Gegensatz zur MFA und FBA zur Auflösung von parallelen, bidirektionalen oder zyklischen Stoffwechselreaktionen und liefert sowohl eine hohe Genauigkeit als auch sehr detaillierte Informationen über das System. Jedoch ist dies mit einem höheren experimentellen Aufwand und einer Beschränkung auf ~50-100 Reaktionen im Modell verbunden.

Eine Erklärung der Methode und des mathematischen Ansatzes ist u.a. von Stephanopoulos *et al.* (1998) und Wiechert *et al.* (2001) beschrieben. Gute Auseinandersetzungen mit der Methode

finden sich bei Wiechert (2001) oder Antoniewicz (2015). Antoniewicz (2018), Zamboni *et al.* (2009) und Long und Antoniewicz (2019) beschreiben die praktische Umsetzung.

INST-¹³C-MFA

Bei der INST-¹³C-MFA wird der gleiche mathematische Ansatz wie bei der ¹³C-MFA verwendet (Jazmin *et al.*, 2017). Der Unterschied ist, dass sich das System nicht im ISS befindet und als zusätzliche experimentelle Daten Metabolitenkonzentrationen benötigt werden (Nöh *et al.*, 2007). Dies ermöglicht die Analyse von komplexeren, langsam wachsenden, nicht gut im MSS haltbaren, photoautotrophen oder methylo-trophen Systemen (Young *et al.*, 2008). Außerdem sind die Kosten der Methode durch eine verringerte experimentelle Zeit reduziert. Nachteilig ist der stark erhöhte experimentelle und computerseitige Aufwand im Vergleich zur ¹³C-MFA. Die Modelle umfassen nur ~50-100 Reaktionen. Auch sind die Methoden- und die Softwareentwicklung im Vergleich zur ¹³C-MFA noch in den Anfängen.

Der mathematische Ansatz für die INST-¹³C-MFA wird u.a. in Wiechert und Nöh (2005), Nöh *et al.* (2007) und Zhao *et al.* (2008) beschrieben. Eine Übersicht über die Methode bieten u.a. Jazmin *et al.* (2017), Young *et al.* (2008) oder Wiechert und Nöh (2013).

¹³C-DMFA

Auf Systeme, die sich weder im ISS noch im MSS befinden, kann die ¹³C-DMFA angewendet werden. Auch hier wird das Gleichungssystem anhand der nichtlinearen Methode der kleinsten Quadrate gelöst. Außerdem werden zu Auflösung zusätzlich zu den isotopischen Daten noch Enzymkinetiken benötigt (Wahl *et al.*, 2008; Antoniewicz, 2015). Experimentell sind zu den Austauschraten und Metabolitenkonzentrationen noch zeitabhängige, isotopisch instationäre Markierungsdaten notwendig (Antoniewicz *et al.*, 2007).

Dies ermöglicht eine sehr schnelle und genaue Analyse eines Stoffwechsels, ohne dass ein MSS vorausgesetzt sein muss. Auch gibt die ¹³C-DMFA, im Vergleich zu den anderen Methoden der Stoffflussanalyse, durch die Analyse der zeitabhängigen Markierung Aufschluss über Stoffwechselprozesse und zeigt keine Momentaufnahme des Stoffwechsels (Niedenführ *et al.*, 2015a).

Gleichzeitig erhöht sich der experimentelle und computerseitige Aufwand im Vergleich zur ¹³C-MFA enorm. Des Weiteren ist die Anwendbarkeit der Methode momentan auf ~10-50 Reaktionen beschränkt. Die Literatur zu ¹³C-DMFA ist bisher auf wenige Anwendungsbeispiele beschränkt (vgl. Baxter *et al.*, 2007; Maciek R. Antoniewicz *et al.*, 2007; Wahl *et al.*, 2008).

Entscheidungsfindung der richtigen Methode

Werden nun die Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden betrachtet wird klar, dass die ^{13}C -MFA sich am besten zur Anwendung in der vorliegenden Arbeit eignet. Die Fragestellung dieser umfasst die Testung von Medikamenteneinflüssen auf den Primärstoffwechsel, weshalb ein mittelgroßes Modell, welches 50-100 Reaktionen umfasst, ausreichend ist. Da zudem detaillierte Aussagen über die einzelnen Reaktionen notwendig sind, ist ein isotopisches Modell am effektivsten. Daher entfielen sowohl die stöchiometrische MFA als auch die FBA. Von den verbleibenden isotopischen Modellierungsmethoden eignen sich die instationären Methoden aufgrund mangelnd etablierter Methodik und der Komplexität der noch nicht ausgereiften Softwarepakete nicht. Daher ist die ^{13}C -MFA zur Bearbeitung der Fragestellung am Günstigsten. In den letzten 20 Jahren hat sich vor allem die ^{13}C -MFA zu einer primären Methode zur Untersuchung des Stoffwechsels mit Hilfe von Markierungsdaten entwickelt (Antoniewicz, 2018). Außerdem ist sie eine der bevorzugten Methoden zur Quantifizierung von Stoffwechselflüssen in Säugetierzellen (Maier *et al.*, 2009; Strigun *et al.*, 2011; Templeton *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2017; Ahn *et al.*, 2018).

1.3.3.2 Existierende Stoffflussanalysen mit Leberzellen

Stoffflussanalyse mit Säugetierzellen wird vorwiegend in zwei Bereichen angewandt, in der Pharmaindustrie sowie in der Toxikologie und Medizin (Niklas *et al.*, 2010).

In der pharmazeutischen Industrie werden hauptsächlich Stoffflussanalysen mit CHO-Zellen verwendet, um die Produktion von monoklonalen Antikörpern (Templeton *et al.*, 2013) oder anderen pharmazeutisch verwendeten Proteinen (Xing *et al.*, 2011) oder die Mediumzusammensetzung für Kultivierungen (Altamirano *et al.*, 2001) zu optimieren. Im medizinisch-toxikologischen Anwendungsbereich wird MFA verwendet um Medikamenteneinflüsse auf den Stoffwechsel zu untersuchen (Strigun *et al.*, 2011, 2012). Des Weiteren werden mit dieser Methode neue Angriffspunkte für Medikamente im Körper ermittelt (Egnatchik, Leamy, Jacobson, *et al.*, 2014; Egnatchik, Leamy, Noguchi, *et al.*, 2014).

Diverse Studien beschäftigen sich daher auch mit dem Leberstoffwechsel (vgl. Tabelle 1). Eine Stoffflussanalyse an HepG2-Zellen zielte darauf ab, Veränderungen im Stoffwechsel nach einer Behandlung mit lebertoxischen Medikamenten zu erforschen (Niklas *et al.*, 2009). Niklas *et al.* (2009) beweisen, dass es möglich ist, MFA als Vorhersagemethode für toxische Prozesse in Zellen zu nutzen. Da es sich um eine MFA handelt, sind die Daten jedoch nicht hinreichend genau. Fast zur gleichen Zeit etablierten Maier *et al.* (2009) eine ^{13}C -INST-MFA mit HepG2-Zellen, an der sie die Auswirkungen von Statinen auf die Cholesterinsynthese untersuchten. Da

Medikamenttoxizität sich teilweise langsam ausprägt, ist diese Methode aufgrund der zu kurzen Studiendauer weniger für die Darstellung von toxischen Effekten von Medikamenten geeignet.

Eine Untersuchung des Leberstoffwechsels ist aufgrund der Bedeutung der Leber in der Metabolisierung von Medikamenten ein wichtiges Forschungsfeld. Die bisher erfolgten Untersuchungen des Leberstoffwechsels mit Hilfe von Stoffflussanalysen sind noch nicht optimal. Zum einen ist die stöchiometrische MFA in ihren Aussagen nicht spezifisch genug, zu anderen ist die INST-¹³C-MFA noch sehr komplex, was sie für eine breite Anwendung unbrauchbar macht. Um dies auszugleichen, bietet die ¹³C-MFA eine adäquate Alternative.

Daher ist es ein Ziel dieser Arbeit die bislang existierende Lücke bei der Untersuchung von lebertoxischen Effekten durch Medikamenteneinfluss durch ¹³C-MFA an HepG2-Zellen zu schließen. Somit soll der Weg zu einer breiten Anwendung mit ausreichender Genauigkeit geebnet werden.

Tabelle 1: Übersicht über publizierte Stoffflussanalysen mit Leberzellen

Hierbei wird besonders auf die Art der Zellen und Art der MFA eingegangen.

Publikation	Zelllinie	Art der MFA	Anwendung
Lee et al. (2000)	Isolierte Rattenleber	¹⁴ C-MFA	Beobachtungen von Veränderungen im Stoffwechsel nach einer Brandverletzung
Arai et al. (2001)	Isolierte Rattenleber	MFA	Untersuchung der Stoffwechseleränderungen in Rattenleber unter D-Glukosaminanwendung
Chan et al. (2003)	Ratten Hepatozyten	¹⁴ C-MFA	Stoffwechsel unter verschiedenen Plasmazusammensetzungen
Srivastava und Chan (2008)	HepG2/C3A	MFA	Toxizitätsuntersuchungen von verschiedenen Fettsäuren, um den Mechanismus aufzuklären
Maier et al. (2008)	HepG2	¹³ C-INST-MFA	Etablierung von ¹³ C-INST-MFA an HepG2-Zellen
Maier et al. (2009)	HepG2	¹³ C-INST-MFA	Auswirkungen von Statinen auf die Cholesterolsynthese
Niklas et al. (2009)	HepG2	MFA	Untersuchung von subtoxischen Konzentrationen von Tacrin, Amiodaron und Diclofenac auf den Leberstoffwechsel
Noguchi et al. (2009)	H4IIEC3	¹³ C-MFA	Die Rolle von anaplerotischen Flüssen und Aminosäurenverfügbarkeit bei Lipoapoptosis
Egnatchik et al. (2014)	H4IIEC3	¹³ C-MFA	Wirkung von Palmitat auf den Stoffwechsel, insbesondere auf die Mitochondrien
Egnatchik et al. (2014)	H4IIEC3	¹³ C-MFA	Stoffwechselreaktion auf Palmitatvergiftung, insbesondere die Kalziumabgabe vom Endoplasmatischen Retikulum
Yarmush et al. (2016)	HepG2	MFA	Stoffwechseleränderungen in Zellen unter Fettentzug
DeWaal et al. (2018)	Huh7	¹³ C-MFA	Untersuchung von verschiedenen Hexokinaseisoformen auf den Stoffwechsel

1.4 Zielstellung der Arbeit

Wird die im vorangegangenen Abschnitt diskutierte Literatur zu Stoffflussanalysen an HepG2-Zellen betrachtet wird ersichtlich, dass bisher keine ^{13}C -MFA an HepG2-Zellen durchgeführt wurde. Die einzige Studie, die bisher zu Lebertoxizitätstestung per Stoffflussanalysen existiert, ist eine stöchiometrische MFA (Niklas *et al.*, 2009). ^{13}C -MFA-Studien an HL-1 Zellen bewiesen, dass sich durch Medikamente beeinflusste Stoffwechseländerungen durch diese Methode genauer darstellen lassen (Strigun *et al.*, 2011, 2012).

Die vorliegende Arbeit setzte sich aufgrund dessen folgende Ziele.

1. Die Etablierung der experimentellen Methoden einer ^{13}C -MFA an HepG2-Zellen und deren zusammengefasste Darstellung in Form einer Pipeline.
2. Die Validierung der ^{13}C -MFA unter Zuhilfenahme von Inhibitoren einzelner Stoffwechselwege.
3. Das Screening von mehreren DILI verursachenden Medikamenten, um mögliche Muster in den Stoffwechselveränderungen zu detektieren.
4. Eine tiefere Analyse von auffälligen Substanzen des Screenings mit zusätzlichen Tracern.

Es sollte erstmals eine ^{13}C -MFA an HepG2-Zellen etabliert werden. Zudem sollte damit bewiesen werden, dass diese sich als Screeningmethode für arzneimittelinduzierte Leberschäden eignet. Außerdem sollten die Ergebnisse der tiefgehenden Analyse einzelner Medikamente neue Hinweise auf deren Lebertoxizitätsmechanismen geben.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
BioTek microplate reader ELx 808	BioTek Germany (Bad Friedrichshall)
Dell EMC PowerEdge R640 Server	Dell GmbH (Frankfurt am Main)
Eppendorf ThermoMixer C	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf Centrifuge 5418R	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf Centrifuge 5430R	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorfpipetten	Eppendorf AG (Hamburg)
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg)
GC 7890A gekoppelt mit 5975c inert XI MSD mit PAL Autosampler	Agilent Technologies (Waldbronn) CTC Analytics AG (Zwingen - Schweiz)
GC 7890B gekoppelt mit 5977B MSD mit 7693 Autosampler	Agilent Technologies (Waldbronn)
GC 7890B gekoppelt mit 7200 Accurate-Mass Q-TOF GC/MS mit MultiPurpose-Sampler	Agilent Technologies (Waldbronn) GERSTEL GmbH & Co. KG (Mülheim an der Ruhr)
Hei-Tec Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG
INCO 2 153 CO₂ Inkubator	Memmert GmbH (Schwabach)
LC/MS/MS Shimadzu Nexera X2 / AB Sciex QTRAP 5500	Shimadzu (Duisburg)/ AB SCIEX (Darmstadt)
Lyophilisator Christ Alpha 1-4 LSCbasic	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz)
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham - USA)
Neubauer- Blutzählkammer	BRANDT GmbH & CO KG
Niko TMS-F Mikroskop	Nikon Corporation (Tokio - Japan)

Nikon Diaphot 300 Fotomikroskop	Nikon Corporation (Tokio - Japan)
pH-Meter -MU6100L	VWR International GmbH (Darmstadt)
RAININ Mehrfachpipette 300 µl	Mettler Toledo (Gießen)
RF 3000[®]Pipette controller	HATHROW SCIENTIFIC (Vernon Hills - USA)
Sterilbank Mars 1500	LaboGene (Allerød - Dänemark)
Tecan	Tecan Tradin AG (Männedorf -Schweiz)
Vakuumevaporator	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz)
Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH+Co.KG (Wertheim)
Vortexer Vortex genie 2	Scientific Industries Inc. (USA)
Waage	Sartorius Weighing Technology GmbH (Göttingen)
Wasserbad Julabo SW20	Julabo Labortechnik GmbH Seelbach

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1,2-¹³C₂-Glukose (≥99%)	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
1-¹³C-Glukose (≥99%)	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
¹²C-Glukose	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
¹³C-Sorbitol (≥99%)	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
3-Bromopyruvat	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
α-Ketoglutarat	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
AAS (Antibiotic Antimycotic Solution)	Biochrom GmbH (Berlin)
Acetonitril	VWR International GmbH (Darmstadt)
ACN	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
ADP	ROCHE Diagnostics GmbH (Mannheim)
Alanin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Amiodaron	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Asparagin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Aspartet	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
ATP	ROCHE Diagnostics GmbH (Mannheim)
Bacillol	BODE Chemie GmbH (Hamburg)
BSTFA	MACHERY NAGEL GmbH & Co. KG (Düren)
Chloroform	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Chlorpromazin	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Cisplatin	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Citrat	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Cystein	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Diclofenac	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
DMSO	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)

Dulbecco´s MEM F 0405	Biochrom GmbH (Berlin)
Dulbecco´s MEM FG 0415	Biochrom GmbH (Berlin)
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Essigsäure	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Fetale Bovine Serum (FBS)	Biochrom GmbH (Berlin)
Fumarat	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (1000u/ml) NAD-abhängig <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ROCHE Diagnostics GmbH (Mannheim)
Glutamat	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Glutamin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
GSH	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
GSSG	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
HCl	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Hexan	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Hexokinase (1500u/ml) aus Hefe	ROCHE Diagnostics GmbH (Mannheim)
Histidin	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Imidazol	ROCHE Diagnostics GmbH (Mannheim)
Isoleucin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Isoniazid	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
ITS (Insulin-Transferrin-Selenium)	Gibco by life technology (Grand island NY)
Laktat	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
LDH-Kit	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham - USA)
L-Don	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Leucin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)

L-Glutamin 200mM	Biochrom GmbH (Berlin)
Lysin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Malat	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Methoxyamin	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Methanol	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Methionin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
MgCl₂	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
MTBSTFA	MACHERY NAGEL GmbH & Co. KG (Düren)
NAD⁺	ROCHE Diagnostics GmbH (Mannheim)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Paracetamol	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Phenylalanin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham - USA)
Prolin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Pyridin	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Pyruvat	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Ribose	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Serin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Succinat	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Tacrin	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Tetracylin	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Threonin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Tributylamin	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Troglitazon	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Tryptanblau	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)

Tyrosin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
U-¹³C-Glukose (≥99%)	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
U-¹³C-Glutamin (≥99%)	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
UK-5099	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)
Valin	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Verapamil	Sigma-Aldrich (Merk KGaA) (Darmstadt)

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Cellstar[®] 6-Well-Platten	SARSTEDT AG &Co. (Nümbrecht)
Cellstar[®] 96-Well-Platten	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster - Österreich)
Einwegpipetten 5, 10, 50 ml	SARSTEDT AG &Co. (Nümbrecht)
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 & 2ml	Eppendorf AG (Hamburg)
GC Vialverschlüsse, magnetisch, unmagnetisch	LABSOLUTE Th. Geyer GmbH &Co.KG (Renningen)
GC-Glasvial (1,5ml-15µl)	Phenomenex Ltd. Deutschland (Aschaffenburg)
Kryoröhrchen	SARSTEDT AG &Co. (Nümbrecht)
Nunc[™] Zellschaber	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham - USA)
Pasteurpipetten	BRAND GMBH + CO KG (Wertheim)
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Röhren 15ml, 50ml	SARSTEDT AG &Co. (Nümbrecht)
Spritzen 5,10,20ml	BD Plastipak [™]
Sterilfilter 22µm PTFE	Carl Roth GmbH Co. KG (Karlsruhe)
Zellkulturflaschen T25 +T75	SARSTEDT AG &Co. (Nümbrecht)

Tabelle 5: Verwendete Software

Software	Hersteller
Graph Pad	https://www.graphpad.com/ Version 5.0
iMS2Flux	Poskar <i>et al.</i> (2012)
INCA (Isotopomer Network Compartmental Analysis)	Young (2014) Version 1.9
Inkscape	http://www.inkscape.org Version 0.92.4
MassHunter Software Qualitative Analysis	Agilent Technologies (Waldbronn) Version B.08.00
MassHunter Software Quantitative Analysis	Agilent Technologies (Waldbronn) Version B.08.00
MATLABR2017a	Natick, USA https://de.mathworks.com/products/matlab.html Version R2017a
MultiQuant 3.0.2	AB SCIEX (Darmstadt) Version 3.0.2
Strawberry Perl (64bit)	http://strawberryperl.com/ Version 5.24.0.1; May 2016
SPSS	IBM Deutschland GmbH (Ehningen) https://www.ibm.com/de-de/analytics/spss-statistics-software Version 25
Vanted	Universität von Konstanz https://www.cls.uni-konstanz.de/software/vanted/ Version 2.6.3

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkultur

Alle Arbeiten in Zellkultur wurden, soweit nicht anders erwähnt, steril in einer Laminar-Air-Flow-Sterilwerkbank (LaboGene) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen fand in einem CO₂-Inkubator (Memmert) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte statt. Es handelt sich bei den HepG2-Zellen um eine adhärenzte Zellart, welche in T75 Zellkulturflaschen kultiviert wurden.

2.2.1.1 Medien zur Kultivierung und Markierung der HepG2-Zellen

Generell wurden die Zellen in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (engl., DMEM) kultiviert. Die Zusammensetzung der in den verschiedenen Versuchen verwendeten Medien sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Zur allgemeinen Kultivierung der Zellen wurde ein Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) genutzt, während in den Versuchen ein Medium mit auf 1 % reduziertem FBS verwendet wurde. Das Medium zur Kryokonservierung enthielt zusätzlich zu 20 % FBS auch 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO).

Tabelle 6: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Medien

Bezeichnung des Mediums	Mediumgrundlage	Zusätze
Kultiviermedium (KM)	Dulbecco's MEM (DMEM) mit 1 g/l Glukose, 200 mM Glutamin und 3,7 g/l NaHCO ₃	+ 10 % FBS + 1 % antibiotische und antimykotische Lösung (engl. <i>antibiotic and antimycotic solution</i> , AAS)
Versuchsmedium (VM)	DMEM ohne Glukose und Glutamin, mit 3,7 g/l NaHCO ₃	+ 1 % FBS + 1 % AAS + 1 % Glutamin + 0,5 % Insulin-Transferrin- Selenium-Lösung (ITS) + 5 g/l Glukose (markiert oder unmarkiert)
Einfriermedium (EM)	DMEM mit 1 g/l Glukose, 200 nM Glutamin und 3,7 g/l NaHCO ₃	+ 20 % FBS + 1 % AAS +10 % DMSO

2.2.1.2 Auftauen von Zellen

Es wurde eine T75-Zellkulturflasche mit KM befüllt, beschriftet und inkubiert. Nach 15 min Inkubation der Zellkulturflasche wurde das aufzutauende Kryoröhrchen aus dem Stickstofflager entnommen und unmittelbar im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Die Suspension wurde umgehend in die vorher inkubierte Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.1.3 Mediumwechsel

Alle 48 h bis 72 h musste das verwendete Kultiviermedium in der Zellkulturflasche gewechselt werden, da die Nährstoffe verbraucht waren. Dazu wurde das alte Kultiviermedium mit dem Vakuumsauger (Vacuubrand) abgesaugt und durch 12 ml auf 37 °C vorgewärmtes KM ersetzt.

2.2.1.4 Subkultivierung

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90 % passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und der Zellteppich mit 6 ml Phosphatpuffer gewaschen. Auf diese Zellen wurden 3 ml 0,25 %-ige Trypsin/EDTA-Lösung gegeben und die Zellkulturflasche für 5 min im Zellkulturschrank inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Befüllung, Beschriftung und Inkubation einer neuen Zellkulturflasche mit KM. Durch leichtes Klopfen wurden die noch nicht gelösten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und mit 5 ml Medium resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden in ein vorbereitetes Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 40 µl Kultiviermedium gegeben. Die restliche Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 95 xg und 22 °C für 10 min zentrifugiert. In dieser Zeit erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe von Trypanblau (vgl. *2.2.1.6 Zellzahlbestimmung*). Der Überstand im Zentrifugenröhrchen wurde vorsichtig abgesaugt, um das Zellpellet nicht zu beschädigen. Das Pellet wurde mit 3 ml Medium resuspendiert. Die gewünschte Anzahl von Zellen wurde in die vorbereitete Zellkulturflasche gegeben und weiterkultiviert.

2.2.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Um die Zellen zu kryokonservieren, wurden sie zuerst wie unter *2.2.1.4 Subkultivierung* beschrieben trypsinisiert. Während der Inkubationszeit erfolgten das Erwärmen des Einfriermediums und die Beschriftung der Kryoröhrchen. Die trypsinisierten Zellen wurden mit Medium aufgenommen, resuspendiert und zentrifugiert. In der Zeit der Zentrifugation wurden die Zellen wie im Kapitel *2.2.1.6 Zellzahlbestimmung* beschrieben gezählt. Das Zellpellet wurde in EM abhängig von der gewünschten Zelldichte resuspendiert und je 1 ml in die Kryoröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden in den Gefrierbehälter Mr. Frosty™ überführt und im -80 °C

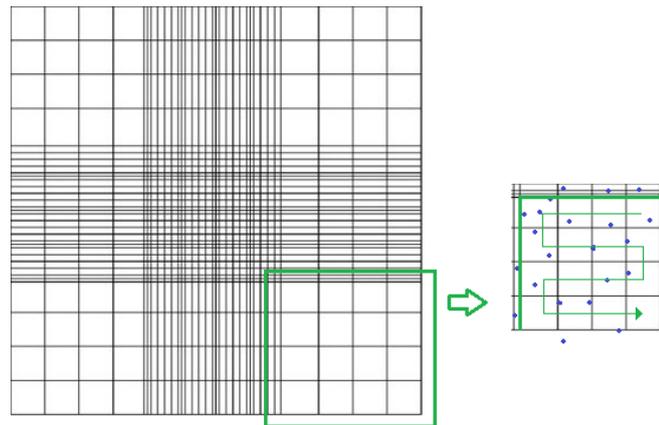


Abbildung 10: Abbildung einer Neubauer Zählkammer

Mit schematischer Darstellung des Zählprinzips in einem der vier Zählquadrate der Neubauer Zählkammer (modifiziert nach: <http://www.zaehlkammer.de/gfx/neubauer.jpg>).

Gefrierschrank 1 °C/min heruntergekühlt. Nach 24 Stunden konnten die Röhrchen zur längerfristigen Lagerung in den Kryotank mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

2.2.1.6 Zellzahlbestimmung

Die während der verschiedenen Versuche entnommene Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl 1:5 mit Trypanblau verdünnt. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Zuerst wurde das Deckgläschen so auf der Kammer platziert, dass die Newtonschen Ringe sichtbar wurden. Dann wurden je 10 µl Zell-Trypanblau-Suspension von beiden Seiten unter das Deckgläschen pipettiert. Die Auszählung fand unter einem Niko TMS-F Mikroskop statt. Wie in Abbildung 10 zu sehen, wurden alle vier äußeren Quadrate, welche wiederum aus 16 kleinen Quadraten bestehen, in der Zählrichtung des grünen Pfeils gezählt. Dabei wurden die Zellen, die auf den Innenkanten lagen, mit einbezogen. Die Zellen auf den Außenkanten blieben ungezählt. Des Weiteren wurden alle blau gefärbten Zellen von der Zählung ausgeschlossen, da diese nicht mehr lebensfähig waren. Die Zellzahl wurde mit nachfolgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Zellzahl} &= \frac{\sum(\text{Zellen in den Quadraten})}{4} * 5 \text{ (Verdünnung mit Trypanblau)} \\ &* 5 \text{ (Verdünnung mit Medium)} * x \text{ (ml der Zellsuspension)} \\ &* 10000 \text{ (Kammerfaktor)} \end{aligned}$$

2.2.1.7 Bestimmung der Wachstumsrate und des Biomassezuwachses

Zwei Tage vor dem Versuch wurden die Zellen auf das VM gesetzt, um eine Variation innerhalb der Zellen durch den hohen FBS-Gehalt zu verhindern.

Zu Beginn des Versuches wurden 6-Well-Platten mit 2 ml Versuchsmedium pro Well vorbereitet. Die Zellen wurden trypsinisiert und gezählt (vgl. 2.2.1.6 *Zellzahlbestimmung*). 0,25 Millionen Zellen wurden in fünf Wells der 6-Well-Platten gegeben, das sechste Well diente als Kontrolle. Die Platten wurden über Nacht inkubiert.

Alle 24h wurde je eine 6-Well-Platte wie nachfolgend beschrieben behandelt. Beim Rest der Platten wurde das Medium gewechselt.

Das Versuchsmedium wurde per Vakuumsauger (Vacuubrand) abgesaugt und die Wells mit 1 ml Phosphat-Puffer gewaschen. 1 ml 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung wurde in jeden Well gegeben und 3-5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden unter leichtem Klopfen abgelöst. Auf die Trypsin-Zell-Suspension wurde je 1 ml Medium gegeben, um das Trypsin abzustoppen. Die Zellsuspension wurde mehrfach mit einer 1 ml Eppendorfpipette resuspendiert und pro Well in ein vorgewogenes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Davon wurden 10 µl entnommen und in Eppendorfreaktionsgefäße überführt, in denen 40 µl Trypanblau vorgelegt waren. Je nach Zelldichte wurde eine weitere Verdünnungsstufe mit Medium zwischengeschaltet. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Während des Versuchs wurde jeden Tag nach 0 h und 24 h je 1 ml Medium in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese Proben wurden zur Bestimmung der Austauschraten wie in 2.2.3.2 *Austauschraten* beschrieben gemessen und ausgewertet.

Zur gravimetrischen Bestimmung des Biomassezuwachses wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß mit der übrigen Zellsuspension von der Zellzahlbestimmung 10 min bei 16.900 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C zwischengelagert. Am Ende des Versuchs wurden alle Zellpellets 48 h lyophilisiert. Das Gewicht des getrockneten Zellpellets wurde mit Hilfe einer Waage bestimmt und davon dann das Leergewicht der Eppendorf-Reaktionsgefäße abgezogen.

Die Zellzahl bzw. Biomasse wurde am Ende jeweils gegen die Zeit aufgetragen und die Wachstumsrate mit folgender Formel berechnet:

$$\mu = \frac{\ln_{Zellzahl\ 2} - \ln_{Zellzahl\ 1}}{Zeit\ 2 - Zeit\ 1}$$

2.2.1.8 *Bestimmung der Viabilität der Zellen*

Für die Bestimmung der Viabilität wurde das Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit von ThermoScientific verwendet.

Zellzahlbestimmung

In einer 96-Well-Platte wurden verschiedene Zellkonzentrationen, 0 - 20.000 Zellen, in Triplikaten in 100 µl Versuchsmedium ausplattiert und 6 Tage inkubiert. Das Medium wurde täglich gewechselt.

Am Tag 6 wurden in alle Triplets 10 µl Lysispuffer gegeben und 45 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde vom Überstand 50 µl in eine neue 96-Well-Platte überführt. Diese wurde mit je 50 µl Reaktionsmix versetzt und wiederum eine halbe Stunde in Dunkelheit bei RT inkubiert. Danach wurden je 50 µl Stopplösung zugegeben. Die Absorptionsmessung fand bei 490 nm und 680 nm im Tecan statt. Zur Auswertung wurde die Absorption gegen die Zellzahl aufgetragen. Die optimale Anzahl von Zellen befindet sich im linearen Bereich der Kurve.

Substanzabhängiger Viabilitätstest

Die im oberen Abschnitt bestimmte Zellzahl wurde in eine 96-Well-Platte in 100 µl Versuchsmedium ausplattiert und 24 h inkubiert. Alle 24 h wurde das Medium gewechselt und in drei biologischen Replikaten je eine Konzentration der zu testenden Substanz zugegeben. Ein Triplikat diente als Positivkontrolle. Um das Vesikel zu ersetzen, wurden 10 µl Wasser zugegeben. Nach 6 Tagen Inkubation wurden 10 µl Lysispuffer in jedes Well gegeben und diese 45 min inkubiert. Vom Überstand wurden 50 µl in eine neue 96-Wellplatte überführt und mit 50 µl Reaktionsmix gemischt. Nach 30 min Inkubation in Dunkelheit bei RT wurden 50 µl Stopplösung in das Well gegeben und die Absorption bei 490 nm und 680 nm gemessen. Für die Auswertung entsprach die Viabilität der Positivkontrolle 100% und alle anderen Proben wurden demensprechend normalisiert. Dies wurde in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen.

2.2.1.9 Extraktion der Proteine, RNA und Stoffwechselintermediate aus den Zellen

Die Extraktion der Zellen erfolgte in fast konfluent bewachsenen 6-Well-Platten. Jede 6-Well-Platte wurde aus dem Inkubator genommen und das Medium mit der Vakuumpumpe abgesaugt. Der Zellteppich wurde mit 1 ml isotonischer Kochsalzlösung gewaschen, mit 600 µl auf -20 °C vorgekühltem Methanol gequench und 15 min auf Eis inkubiert (vgl. Abbildung 11). Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Zu den lysierenden Zellen wurden 10 µl ¹³C-Sorbitol-Lösung als interner Standard gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellkratzer von der Oberfläche des Wells gelöst. Der Zellkratzer wurde mit 600 µl bidestilliertem Wasser über dem Well gewaschen. Somit entstand eine Methanol-Wasser-Mischung. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl auf -20 °C vorgekühltem Chloroform versetzt. Diese Mischung wurde 15 min gevortext und 20 min bei

16.900 X g in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Daraufhin konnten die einzelnen Phasen je in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterbehandlung bei -80 °C gelagert werden.

Die organische Phase konnte ohne Vorbehandlung weiter analysiert werden. Die Interphase hingegen musste hydrolysiert werden, um die Aminosäuren, die Ribose und die Glukose aus den Proteinen, der RNA und dem Glykogen freizusetzen.

Die Interphase der Aminosäuren wurde zwei Mal mit Methanol gewaschen, in einem Vakuumevaporator getrocknet, mit 800 µl 6N HCl versetzt und bei 99 °C für 16 h bei 350 rpm geschüttelt. Das Hydrolysat musste zur Weiterverwendung auf Raumtemperatur abgekühlt sein. Die Interphase der RNA/Glykogen-Platte wurde ebenfalls zwei Mal mit 1 ml Methanol gewaschen und im Vakuumevaporator getrocknet. Es wurden 50 µl 6N HCl zugegeben und 30 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden 250 µl Wasser hinzugegeben und 1 h bei 99 °C im Thermoschüttler inkubiert. Nachdem das Hydrolysat auf Raumtemperatur abgekühlt war, konnte es weiterverwendet werden. Anschließend wurden die hydrolysierten Aminosäuren bzw. die Zucker per GC/MS gemessen oder bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

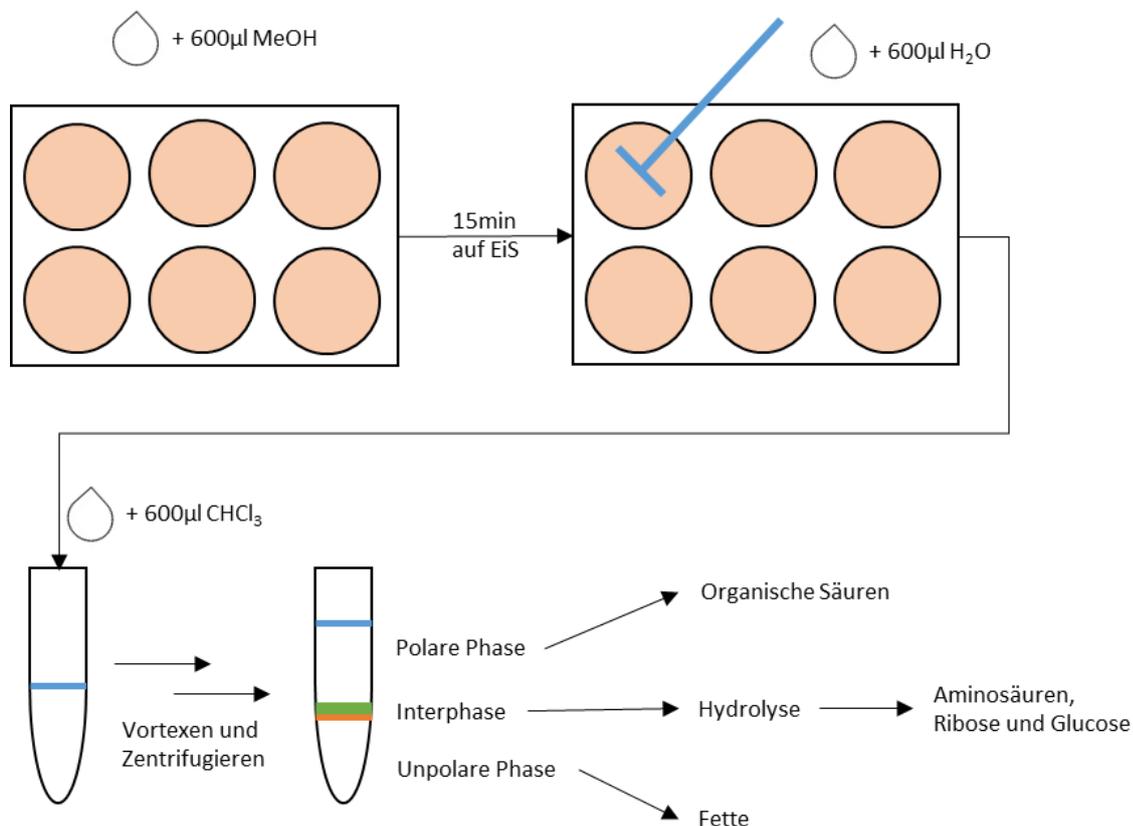


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Ablaufs der Extraktion der Zellen in einer 6-Well-Platte

2.2.2 Aufbau der Zellkulturversuche

2.2.2.1 Vorversuche zur Glukose- und Serumkonzentration

Der Versuch wurde identisch zu 2.2.1.6 *Bestimmung der Wachstumsrate und des Biomassezuwachses* unter Verwendung verschiedener Serum- und Glukosekonzentrationen durchgeführt.

Vorversuch zur Glukosekonzentration

Für den Glukosevorversuch erfolgte ein Zusatz von einmal 2 g/l Glukose und einmal 5 g/l Glukose zum Kultiviermedium. Der Versuch wurde in beiden Fällen mit 10 6-Well-Platten wie in 2.2.1.7 beschrieben durchgeführt. Die gesammelten Mediumproben wurden wie in *Bestimmung der Glukoseaufnahme* weiter behandelt.

Vorversuch Serumkonzentration

Für den Vorversuch zur Serumkonzentration wurden verschiedene Medien mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen und anderen Zusätzen hergestellt (vgl. Tabelle 7). Der Versuch erfolgte mit jedem Medium wie in 2.2.1.7 beschrieben. Die erhaltenen Wachstumskurven wurden gegeneinander aufgetragen.

Tabelle 7: Mediumzusammensetzung für den Vorversuch Serumkonzentration

Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4	Medium 5
DMEM ohne Glukose und Glutamin mit 3,7 g/l NaHCO ₃	DMEM ohne Glukose und Glutamin mit 3,7 g/l NaHCO ₃	DMEM ohne Glukose und Glutamin mit 3,7 g/l NaHCO ₃	DMEM ohne Glukose und Glutamin mit 3,7 g/l NaHCO ₃	DMEM ohne Glukose und Glutamin mit 3,7 g/l NaHCO ₃
+ 10 % FBS + 1 % AAS + 1 % Glutamin + 0,5 % ITS + 5 g/l Glukose	+ 1 % FBS + 1 % AAS + 1 % Glutamin + 5 g/l Glukose	+ 1 % FBS + 1 % AAS + 1 % Glutamin + 0,5 % ITS + 5 g/l Glukose	+ 0 % FBS + 1 % AAS + 1 % Glutamin + 0,5 % ITS + 5 g/l Glukose	+ 0 % FBS + 1 % AAS + 1 % Glutamin + 80 µl EGF und 160 µl HGF + 5 g/l Glukose

2.2.2.2 Metabolisches Gleichgewicht

Sechs 6-Well-Platten mit je 0,25 Millionen Zellen wurden identisch zu 2.2.1.7 *Bestimmung der Wachstumsrate und des Biomassezuwachses* ausplattiert. Gleichzeitig erfolgte das Aussäen von sechs mal drei Wells zum Zellzählen aus. Das Versuchsmedium wurde täglich gewechselt und je eine Platte wie folgt behandelt:

Die Zellschälplatte wurde wie in Kapitel 2.2.1.6 *Zellschälbestimmung* beschrieben genutzt, um die Zellschäl im Triplikät zu bestimmen. Des Weiteren wurde von der Platte vor und nach jedem Mediumwechsel jeweils 1 ml Mediumprobe entnommen, um später die Austauschraten zu bestimmen. Die andere 6-Well-Platte wurde wie in 2.2.1.9 *Extraktion der Proteine, RNA und Stoffwechselintermediate aus den Zellen* beschrieben, weiterbehandelt. Dabei wurden zusätzlich zu jedem Well 20 µl ¹³C-Sorbitol-Lösung als interner Standard hinzugegeben. Die Extrakte wurden wie in *Bestimmung über metabolic profiling* beschrieben analysiert.

2.2.2.3 *Isotopisches Gleichgewicht*

Ein Zeitverlaufsexperiment sollte sicherstellen, dass sich die Zellen unter Versuchsbedingungen in einem isotopischen Equilibrium befinden. Es wurden, wie in 2.2.1.7 beschrieben, 6-Well-Platten mit 0,25 Millionen Zellen pro Well ausplattiert. Das Versuchsmedium beinhaltete in diesem Versuch 100 % U-¹³C-Glukose und wurde jeden Tag gewechselt. Jeden Tag wurde eine Platte analog zu 2.2.1.9 extrahiert. Die Extrakte wurden wie in *Messung des isotopischen Equilibrium* weiter analysiert.

2.2.2.4 *Markierungsexperiment*

Zwei Tage vor dem Versuchsbeginn wurden die Zellen auf das Versuchsmedium mit ¹²C-Glukose gesetzt. An Tag 0 wurden, pro Substanz und unbehandelter Kontrolle, je sechs 6-Well-Platten mit 0,25 Millionen Zellen pro Well nach dem Schema in Abbildung 12 ausplattiert. Je nach Versuch enthielt das Versuchsmedium entweder 100 % ¹²C-Glukose, 100 % 1-¹³C-Glukose, 100 % 1,2-¹³C₂-Glukose, 100 % U-¹³C-Glutamin oder eine Mischung von 80 % U-¹³C-Glukose und 20 % ¹²C-Glukose. Es wurde alle 24 h gewechselt. Nach dem Mediumwechsel wurden je 10 µl der Substanzen in die einzelnen Wells gegeben. Bei der Kontrolle erfolgte dies mit 10 µl Wasser. Ein Tag nach dem Ausplattieren der Zellen wurden von der Platte zum Zellschählen drei Wells wie in 2.2.1.6 *Zellschälbestimmung* beschrieben gezählt und die Zellschäl notiert. Am Tag 4 wurden erneut drei Wells gezählt und Mediumproben für die Messung der Austauschraten direkt nach dem Mediumwechsel entnommen. An Tag 5 wurden sowohl vor als auch nach dem Mediumwechsel Mediumproben genommen und drei weitere Wells gezählt. Am Tag 6 wurden die letzten Mediumproben genommen und die letzten drei Wells gezählt. Die Platten für die Aminosäuren und RNA und Glykogen wurden extrahiert und die einzelnen Phasen getrennt.

Die Mediumproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und wie die polare Phase und die unpolare Phase bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Interphasen wurden wie in 2.2.1.9 *Extraktion der Proteine, RNA und Stoffwechselintermediate aus den Zellen* beschrieben weiterbehandelt.

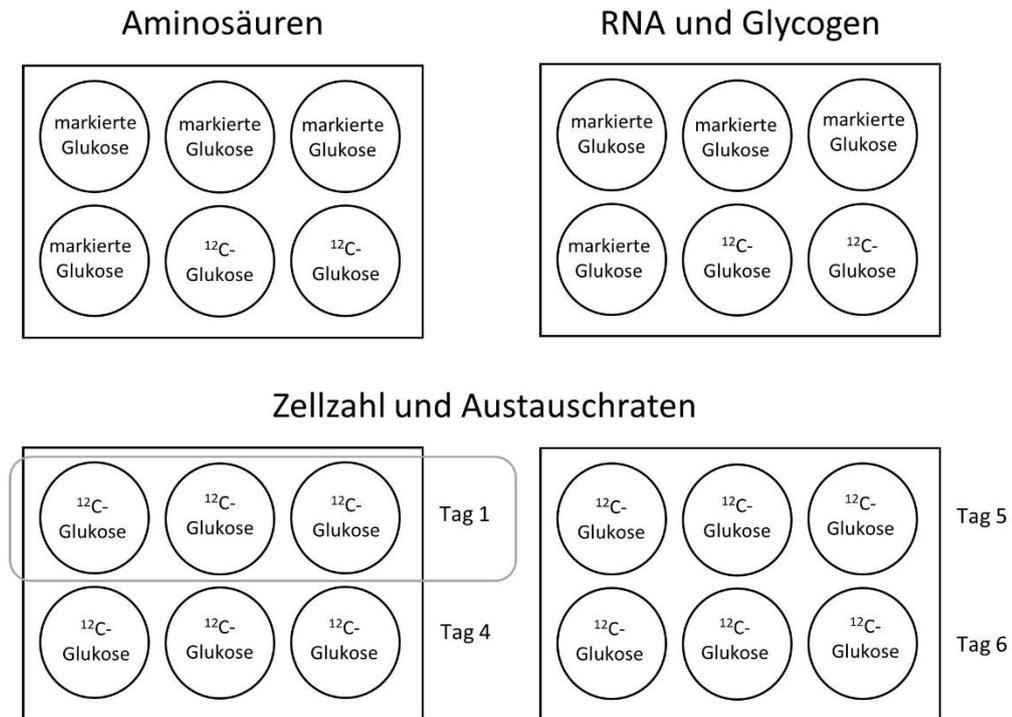


Abbildung 12: Schema zum Ausplattieren der Zellen für den Markierungsversuch

Abgebildet ist die Anzahl an Platten je Inhibitor und Kontrolle und die Belegung der einzelnen Wells mit den verschiedenen Medienzusammensetzungen.

2.2.3 Analytische Methoden

2.2.3.1 Einstellungen GC/MS-Messungen

Falls nicht anders spezifiziert, ist die benutzte Säule in allen Maschinen eine HP-5 MS UI von Agilent, der Heliumfluss 1 ml/min, die Inlettemperatur 250 °C und die Temperatur der Transferline 250 °C. Die Ionenquelle war eine EI bei 70 eV. Die verwendeten GC/MS-Methoden sind in der Tabelle 8 ersichtlich.

Tabelle 8: Methodenübersicht GC/MS Messungen an den drei verschiedenen Maschinen

Methode	Maschine	Ofentemp. Beginn	Heizrate	Ofentemp. Ende	Solvent delay
Amio_Acids_SCAN	GC/MS/MS Agilent 7890A / 5975C / Chromtech Evolution 3	60 °C für 2 min	20 °C/min	280 °C für 5 min	8 min
Aminoacid_SIM	GC/MS Agilent 7890B / 5977B Inert Plus	60 °C für 2 min	20 °C/min	280 °C für 5 min	8 min
OA_SIM	GC/MS Agilent 7890B / 5977B Inert Plus	60 °C für 1 min	10 °C/min	300 °C für 2 min	7,8 min
RNA_SIM	GC/MS Agilent 7890B / 5977B Inert Plus	60 °C für 1 min	10 °C/min	325 °C für 10 min	7,8 min
Mprofiling_Fiehn_2Ghz	GC/Q-TOF Agilent 7890B / 7200	60 °C für 1 min	10 °C/min	325 °C für 10 min	4,7 min

2.2.3.2 Austauschraten

Bestimmung der Glukoseaufnahme

Die Glukoseaufnahme der Zellen wurde anhand der Abnahme der Glukosekonzentration im Medium bestimmt. Die Glukosekonzentration wurde enzymatisch mittels Hexokinase und Glukose-6-phosphat-dehydrogenase über die Bildung von NADH photometrisch gemessen.

Zur Vorbereitung wurden die Enzyme Hexokinase und Glukose-6-phosphat-dehydrogenase mit Puffer 1:20 verdünnt und auf Eis bis zum weiteren Gebrauch gekühlt. Die Probenlösungen wurden 1:4 mit Wasser verdünnt, da die Konzentration für die Messung zu hoch gewesen wäre. In eine 96-Well-Platte wurden 270 µl Messpuffer vorgelegt. 10 µl Glukose-6-phosphat-dehydrogenase-Lösung und 10 µl der verdünnten Probenlösung wurden ebenfalls in jedes Well gegeben. Nun wurde der Hintergrund im Plattenleser 15 min bei 590 nm vermessen. Nachfolgend wurden 10 µl Hexokinase-Lösung in jedes Well gegeben, um die Reaktion zu

starten. Die Absorption bei 590 nm wurde 45 min lang gemessen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass der Endpunkt der enzymatischen Reaktion erreicht wurde.

Die Berechnung der Glukosekonzentration erfolgte modifiziert nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$C_{Glukose} \left[\frac{mmol}{l} \right] = \frac{(Absorption\ Probe - Absorption\ Hintergrund)}{1\ [cm] * 6,2 \left[\frac{l}{mmol * cm} \right]} * 4(Verdünnung)$$

Aus der Glukosekonzentration zweier aufeinanderfolgender Zeitpunkte ließ sich die Aufnahme­rate nach folgender Formel berechnen:

$$\begin{aligned} \text{Aufnahmerate}_{Glucose} \left[\frac{mmol}{h * 1Mio\ Zellen} \right] \\ = \frac{\left(C_{Glucose\ t0} \left[\frac{mmol}{l} \right] - C_{Glucose\ t1} \left[\frac{mmol}{l} \right] \right) * 0,002\ [l]}{\text{Zeit}\ [h] * \text{mittlere\ Zellzahl}\ t0 - t1\ [1MioZellen]} \end{aligned}$$

Dieser Formel entsprechend wurde auch die Rate pro mg Biomasse errechnet.

Folgend ist die Zusammensetzung der in diesem Versuch verwendeten Puffer dargelegt.

Puffer: 1.3616 g Imidazol
 203.03 mg MgCl₂ * 6 H₂O

Das wurde mit Wasser auf 150 ml aufgefüllt. Per PH-meter wurde der pH-Wert auf 6,9 eingestellt und bis 200 ml aufgefüllt.

Messpuffer: 75 mg NAD⁺
 30 mg ATP

Dies wurde mit Puffer auf 50 ml aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Bestimmung der Austauschraten von Aminosäuren und Laktat per GC/MS

Mit der GCMSD5975c wurden die Austauschraten der Aminosäuren und von Laktat bestimmt. Die Proben wurden 1:100 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und 80 µl davon per

Vakuumtrockner eingetrocknet. Zeitgleich wurde ein Standardgemisch in verschiedenen Konzentrationen eingetrocknet. Die trockenen Proben wurden automatisch derivatisiert. Zuerst wurde die Probe mit 30 µl MeOx versetzt, dann eine Stunde bei 70 °C in einem Thermoschüttler inkubiert, um wiederum mit 40 µl MBDSTFA Zusatz eine Stunde bei 70 °C schüttel-inkubiert zu werden. Danach wurden die Proben in die GC injiziert und mit der Methode Amino_Acid_SCAN gemessen.

Zur Auswertung fand die MassHunter Workstation Version B.08.00 (Agilent Technologies, Inc.) Anwendung. Die Bereiche unter der Kurve (engl. *area under the curve*, AUC) wurden ermittelt und die Konzentration per Kalibriergerade errechnet. Die erhaltenen Konzentrationen wurden nach folgender Gleichung ausgewertet:

$$\text{Aufnahmerate}_{AA} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{h} * 1\text{Mio Zellen}} \right] = \frac{\left(C_{AA\ t0} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] - C_{AA\ t1} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] \right) * 0,002 \text{ [l]}}{\text{Zeit [h]} * \text{mittlere Zellzahl } t0 - t1 \text{ [1MioZellen]}}$$

Dieser Formel entsprechend wurde auch die Rate pro ein mg Biomasse errechnet.

2.2.3.3 Bestimmung der Massenisotopomerverteilung

Die in den Markierungsversuchen hergestellten und vorbereiteten polaren, unpolaren und intermediären Phasen wurden wie folgt gemessen und ausgewertet.

MIV-Bestimmung von Aminosäuren

Vom Hydrolysat der Interphase wurden je 6 µl in ein 1,5 ml vasenförmiges Glasvial überführt und mit dem N₂-Verdampfer abgedampft. Zu den trockenen Proben wurden 30 µl Acetonitril und 40 µl MBDSTFA gegeben und das Gemisch im Thermoschüttler 1 h bei 60 °C inkubiert. Die fertigen Proben wurden mit der GC/MS und der Methode Aminoacid_SIM gemessen. Dabei wurden von den unmarkierten Proben immer drei technische Replikate gemessen. Mit diesen Replikaten konnten sowohl die Messgenauigkeit und die Übereinstimmung mit den theoretischen Daten überprüft werden.

Die Daten wurden mit Hilfe der MassHunter Workstation Version B.08.00 (Agilent Technologies, Inc.) integriert und die Spektren extrahiert. Davon wurden die AUC der einzelnen Massen nach Abzug des Hintergrundes summiert und dann in Prozentteile der Summe umgerechnet. Davon konnte von den einzelnen Replikaten die Standardabweichung bestimmt werden. Dies entspricht der Messgenauigkeit der Maschine und sollte 0,3 % für diesen Nutzen nicht überschreiten. Mit diesen Daten wurde zusätzlich die Übereinstimmung mit den natürlichen MIV der einzelnen

Fragmente geprüft. Dazu wurde die Differenz aus dem Mittelwert der gemessenen Replikate mit den theoretischen Daten gebildet. Alle Abweichungen über 1 % führten zum Ausschluss der Daten. Anhand dieser beiden Faktoren wurden die Messungen bewertet. Alle Daten wurden mit Hilfe von Excel zusammengefasst.

MIV-Bestimmung von organischen Säuren

Von der polaren Phase der Extraktion wurden 400 µl in ein vasenförmiges Glasvial überführt und per Vakuumtrockner eingetrocknet. Die trockenen Proben wurden mit 30 µl MeOx versetzt und 1 h bei 60 °C im Thermoschüttler inkubiert. Nach dieser ersten Inkubation wurden 40 µl MBDSTFA zugesetzt und wiederum 1 h bei 60 °C im Thermoschüttler inkubiert. Die derivatisierten Proben wurden per GC/MS und der Methode OA_SIM gemessen. Die Auswertung erfolgte analog zu den Aminosäuren.

MIV-Bestimmung von Ribose und Glukose

Von den hydrolysierten Pellets wurden 400 µl in ein 1,5 ml Glasvial überführt, per N₂-Verdampfer eingetrocknet und analog zu den Proben der organischen Säuren derivatisiert. Allerdings unterschied sich die Derivatisierung durch die Nutzung von BSTFA anstatt MBDSTFA. Die derivatisierten Proben wurden per GC/MS und Methode RNA_SIM gemessen. Die Auswertung erfolgte erneut analog zu den Aminosäuren.

2.2.3.4 Messung des metabolischen Fließgleichgewichts

Bestimmung anhand des exponentiellen Wachstums

Die im Markierungsexperiment bestimmten Zellzahlen wurden halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Es folgte das Einschränken der Zeitpunkte bis eine Gerade entstand. Dieser Zeitraum entsprach der exponentiellen Wachstumsphase (Kruger *et al.*, 2014).

Bestimmung über *metabolic profiling*

Zur Bestimmung des MSS über *metabolic profiling* wurden die polaren Metabolite, wie z.B. die freien Aminosäuren oder Zucker, der Zelle in einem Zeitverlauf vermessen und miteinander korreliert.

Die Proben aus dem Markierungsexperiment wurden per GC-qTOF gemessen. Dazu wurden vom polaren Extrakt 400 µl in ein 1,5 ml Glasvial überführt und per Vakuumtrockner eingetrocknet. Die eingetrockneten Proben wurden verschlossen und in der Maschine derivatisiert. Daraufhin wurden sie mit 30 µl MeOX versetzt und 1 h bei 60 °C im Schüttler inkubiert. Dann wurden 40 µl

BSFTA pro Probe zugesetzt und diese 1 h bei 60 °C im Schüttler inkubiert. Die derivatisierten Proben wurden mit der Methode Mprofiling_Fiehn_2Ghz gemessen.

Zur Auswertung wurde MassHunter Workstation Version B.08.00 (Agilent Technologies, Inc.) genutzt. Dafür wurden zuerst mit der qualitativen Analysesoftware unter Zuhilfenahme der NIST-Datenbank alle Peaks im Chromatogramm identifiziert und den identifizierten Metaboliten je eine Retentionszeit zugeordnet. Mit der quantitativen Analysesoftware wurden die Peakflächen der einzelnen Metabolite auf den internen Standard normalisiert und die Daten in Excel exportiert. Dort wurden sie auf die Biomasse normiert. Mit diesen Daten wurde eine PCA mittels SPSS-Software durchgeführt.

Messung des isotopischen Equilibrium

Die beiden Hydrolysate und die polare Phase aus dem ISS-Experiment wurden wie unter 2.2.3.3.1 behandelt.

Ausgewertet wurde mit Hilfe der MassHunter Workstation Version B.08.00 (Agilent Technologies, Inc). Dazu wurden die MIDs von allen Proben und Fragmenten ermittelt. Die einzelnen Massen eines jeden Fragments wurden mittels zweiseitiger ANOVA über alle Proben statistisch ausgewertet. Zur Auswertung wurden nur essentielle Aminosäuren hinzugezogen.

2.2.3.5 Bestimmung der Redoxäquivalente per LC/MS

Die polare Phase des Markierungsexperiments wurde zusätzlich zur Bestimmung der ATP, ADP, AMP, GSH und GSSG Konzentrationen genutzt. Dazu wurden 100 µl der organischen Phase der unmarkierten Proben in ein konischen Glasvial überführt und per LC/MS gemessen.

Puffer A	500ml bidestilliertes Wasser
	1,192 ml Tributylamin
	287µl Essigsäure
	auf pH 6,2 eingestellt
Puffer B	100 % Acetonitril

Diese Puffer wurden in einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min in folgendem Gradienten bei 40 °C im Ofen durch die Säule geschickt: 2 min A 98 % und B 2%, 16 min A 64 % und B 36 %, 4,5 min A 5 % und B 95 %. Die Detektion der Stoffe erfolgte massenspezifisch mittels eines Massenspektrometers.

Es wurden die Proben (n=8) wie auch eine Standardreihe pro Substanz vermessen. Die resultierenden Spektren wurden per MultiQuant 3.0.2 Software ausgewertet. Dazu wurden Standardkurven erstellt und anhand dieser die Konzentration der Proben errechnet. Diese wurden in Balkendiagrammen dargestellt und per einseitiger ANOVA die Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle bestimmt.

Außerdem wurde die Energieladung berechnet:

$$\text{Energieladung} = \frac{ATP + 0,5ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

2.2.4 Stoffflussanalyse

^{13}C -MFA kann in zwei Teile gegliedert werden, den experimentellen Teil (vgl. Abbildung 13A) und die computergestützte Datenanalyse (vgl. Abbildung 13B). Nach der ausführlichen Beschreibung des Markierungsexperiments und der Datenextraktion soll im folgendem genauer auf die Datenkorrektur, die Erstellung des Grundmodells, die statistische Analyse und die Erstellung einer Flusskarte eingegangen werden.

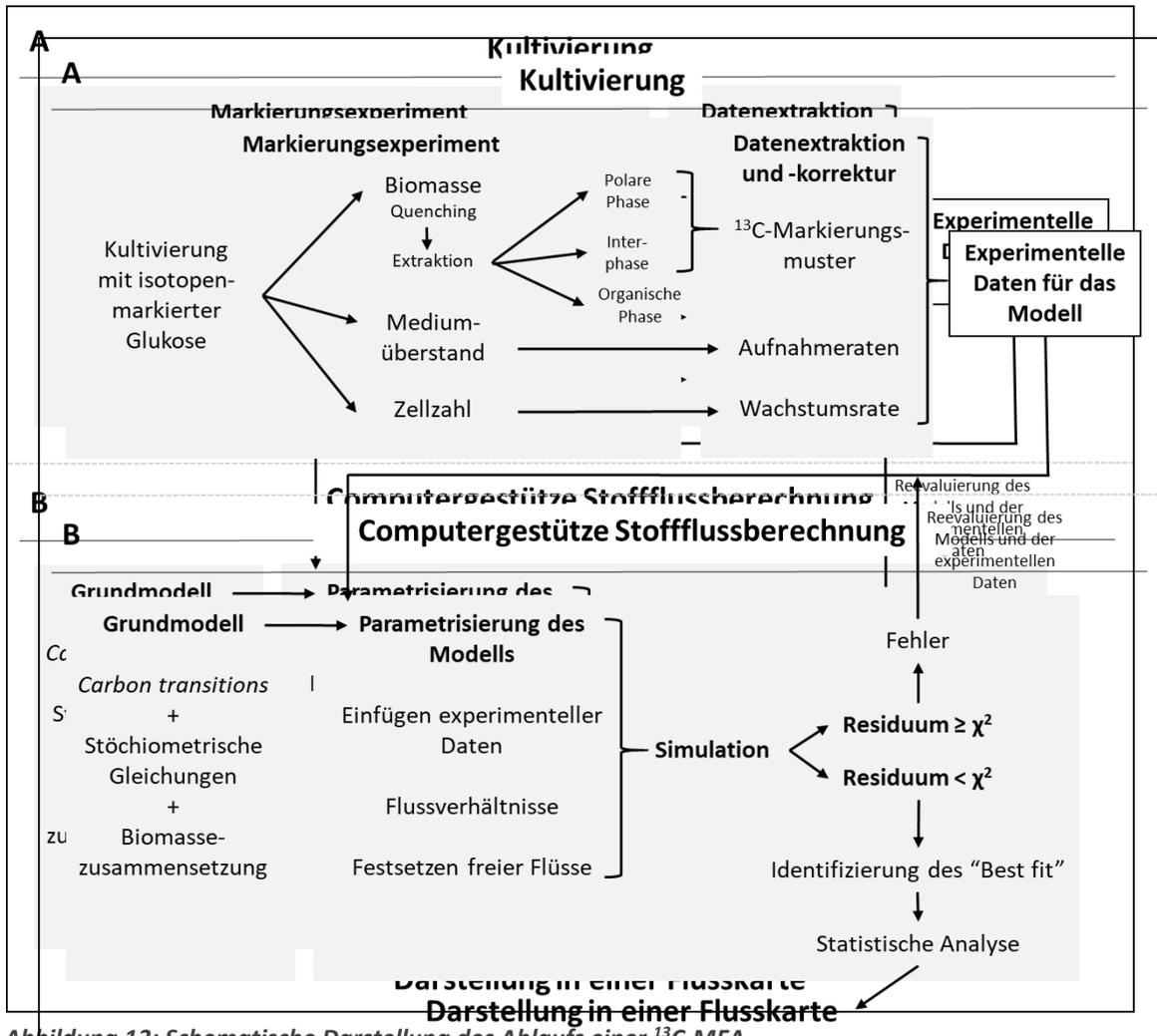


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Ablaufs einer ^{13}C -MFA

In Teil A ist der experimentelle Teil der ^{13}C -MFA dargestellt. Weiter kann er in das Markierungsexperiment und die Datenextraktion und -korrektur unterschieden werden. Teil B ist die computergestützte Stoffflussberechnung dargestellt, welche sich wiederum in das Grundmodell und die Parametrisierung und Simulation des Modelles einteilen lässt.

2.2.4.1 Datenkorrektur

Die Vorauswertung und Korrektur der Daten fand mit Hilfe von Perl-Skripten, geschrieben bzw. überarbeitet von Dr. Grafahrend-Belau, statt. Die experimentell generierten MIV wurden dabei in mehreren Schritten kontrolliert, korrigiert und in eine für das Modell lesbare Form übertragen

(vgl. Abbildung 14). Die gemessenen MIV aus dem Markierungsexperiment wurden per MassHunter in Excel exportiert. Die einzelnen Fragmente wurden den einzelnen AS zugeordnet und benannt. Per Perl-Skript Tof2iMS2Flux sind die Daten eines Inhibitors und einer Glukoseart jeweils in eine Textdatei übersetzt worden. Auf Grundlage dieser Textdateien konnte nun die Datenkorrektur erfolgen. Per Perl-Skript iMS2Flux wurden zunächst Fragmente mit zu hoher durchschnittlicher Kohlenstoffmarkierung in den ^{12}C -Kontrollen und schlechter Übereinstimmung der ^{12}C -MIV mit den theoretischen MIV aus den Daten ausgeschlossen. Die ^{13}C -Daten wurden daraufhin mit dem Skript auf schlechte Peakqualität überprüft. Mit Hilfe von Excel wurden die Daten außerdem auf schlechte Messgenauigkeit und zu hohe Standardabweichung untersucht. Daten, die über den Grenzwerten lagen wurden für die weitere Verwendung exkludiert. Die verbleibenden ^{13}C -Daten wurden per iMS2Flux auf die natürlich vorkommende Markierungsverteilung und die ursprüngliche, unmarkierte Biomasse korrigiert. Von den korrigierten Daten wurden per Skript zusätzlich noch der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und alle Daten je Glukose und Inhibitor in je einer Textdatei zusammengefasst. Die zusammengefassten Daten wurden mit iMS2INCA in das INCA-Eingabeformat umgewandelt und waren somit zur Eingabe in das Modell bereit.

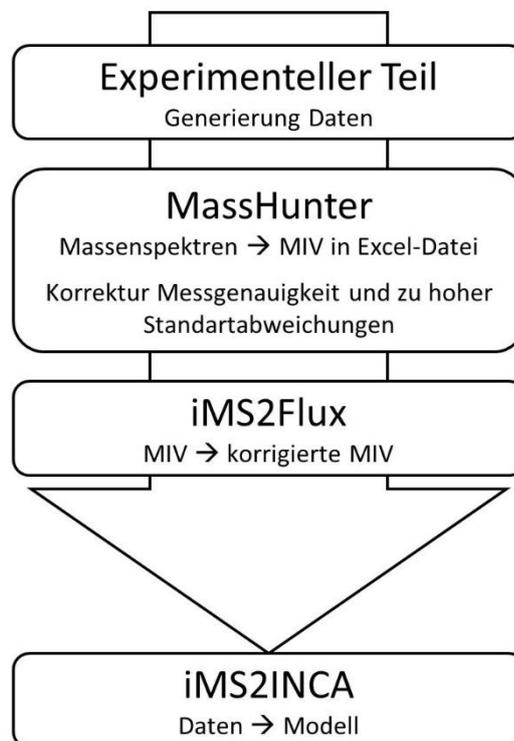


Abbildung 14: Ablauf der Datenextraktion, -korrektur und -verarbeitung für die ^{13}C -MFA mit Hilfe von MassHunter und Perl-Skripten

2.2.4.2 Erstellung des Grundmodells

Die Erstellung des Grundmodells und alle ^{13}C -MFAs der Arbeit wurden per *INCA*-Software von Dr. Eva Grafahrend-Belau durchgeführt.

Das Modell des Primärstoffwechsels von HepG2-Zellen im Sättigungszustand wurde auf Grundlage einer ausführlichen Literatur- (u.a. Horn *et al.*, 2005; Voet *et al.*, 2010; Berg *et al.*, 2013b; Rui, 2014; Petersen *et al.*, 2017) und Datenbankrecherche (u.a. Brenda (Placzek *et al.*, 2017), HumanCyc (Romero *et al.*, 2005), KEGG (Kanehisa, 1999), MetaCyc (Caspi *et al.*, 2016)) erstellt. In einem iterativen Prozess wurden dabei zunächst die wesentlichen Stoffwechselwege modelliert und diese schrittweise durch relevante Zusatzreaktionen ergänzt. Durch den Vergleich mit bereits bestehenden ^{13}C -MFA Modellen (Large *et al.*, 1997; Maier *et al.*, 2008, 2009; Noguchi *et al.*, 2009; Egnatchik, Leamy, Jacobson, *et al.*, 2014; Egnatchik, Leamy, Noguchi, *et al.*, 2014; DeWaal *et al.*, 2018) wurde das initiale Modell im nächsten Schritt verifiziert und ergänzt. In dem nachfolgenden Prozess der Modellanalyse wurden unterschiedliche Modellvarianten ausgetestet und das optimale, finale Modell durch den Vergleich der SSR ermittelt.

Das finale ^{13}C -MFA-Modell umfasst 39 biochemische und 19 Transport-Reaktionen in drei verschiedenen Kompartimenten, dem Cytosol, dem Mitochondrium und dem extrazellulären Medium (vgl. Tabelle A 16). Das anabole Stoffwechselmodell beinhaltet die Glykolyse, den Citratzyklus, den Pentosephosphatweg, anaplerotische Reaktionen, sowie den Aminosäure- und Lipidstoffwechsel.

Mit dem Ziel, die Komplexität des Modells zu reduzieren, wurden lineare Reaktionsfolgen der Glykolyse zusammengefasst und damit einhergehend die Triosephosphate Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glyzerinaldehyd-3-phosphat (GAP) sowie 2-Phosphoglycerat (2PG) und 3-Phosphoglycerat (3PG) zu einem gemeinsamen GAP- bzw. PG-pool vereint (Schmidt *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 1999; Van Winden *et al.*, 2005). Metabolite, die sowohl im Cytosol als auch im Mitochondrium verstoffwechselt werden, beispielsweise Pyruvat, Citrat oder Alanin, wurden als separate, kompartimentspezifische Pools modelliert. Im Verlauf der Extraktion werden intrazelluläre Metabolitpools homogenisiert, so dass die gemessenen Markierungsmuster dieser Metabolite eine Mischung kompartimentspezifischer Metabolitpools widerspiegeln. Um diese Vermischung cytosolischer und mitochondrialer Pools zu berücksichtigen, wurden für die entsprechenden Metabolite so genannte *Mixing-Reactions* in das Modell integriert (Noguchi *et al.*, 2009).

Auf der Grundlage vorangehender Modellanalysen konnte gezeigt werden, dass die Stoffflüsse der Isoenzyme der ersten Reaktionsschritte der Glutaminolyse, z.B. der

Glutamatdehydrogenase, mit den zur Verfügung stehenden Markierungsdaten nicht ausreichend aufgelöst werden können. Aus diesem Grund wurden die genannten Enzyme und die damit verbundenen Metabolite, Glutamat und α -Ketoglutarat, nicht kompartment-spezifisch modelliert. Um Aussagen über energie- und redox-abhängige Prozesse des Zentralstoffwechsels von HepG2-Zellen treffen zu können, wurden die Bildung und der Verbrauch der Energie- und Reduktionsäquivalente Adenosintriphosphat (ATP), reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) im Modell berücksichtigt. Die oxidative Phosphorylierung wurde dabei auf Grundlage der Stöchiometrie von 2,5 ATP pro NADPH-Molekül definiert (Hinkle, 2005).

Mit dem Ziel der Komplexitätsreduktion wurde die Aufnahme und der Abbau der essentiellen Aminosäuren als Aufnahme der entsprechenden Abbauprodukte, Acetyl-CoA, Malat und Glutamat, modelliert (Nicolae *et al.*, 2014) (vgl. Tabellen A 1-4). Die Biomassesynthese wurde auf Grundlage der in Niklas, Noor und Heinzle (2009) aufgeführten Biomassezusammensetzung von HepG2-Zellen berechnet und in das Modell integriert. Dabei wurden Aminosäuren mit Markierung, wie Alanin oder Serin, direkt in die Biomassegleichung integriert. Aminosäuren ohne Markierungsdaten wurden in Form der Grundbausteine oder Vorläufer im Modell berücksichtigt. Dies waren z.B. Vorläufer wie Acetyl-CoA, Phosphoenolpyruvat oder Pyruvat. Die genaue Berechnungsgrundlage befindet sich im Anhang (vgl. Tabellen A 5-15). Entsprechend diesem Vorgehen wurden auch die verbleibenden Biomassekomponenten, z.B. Lipide, Glykogen oder RNA, in Form ihrer Grundbausteine, u.a. Glukose-6-phosphat oder Ribose-5-phosphat, integriert.

Transportprozesse zwischen den Kompartimenten Cytosol und Mitochondrium wurden als einfacher passiver Transport modelliert, shuttle- oder carriervermittelte Transportsysteme wurden nicht in das Modell integriert. So wurde beispielsweise der Citrat-Malat-shuttle vereinfacht als zwei passive bidirektionale Transportprozesse modelliert. Um den Einfluss von unmarkiertem Kohlenstoff aus atmosphärischem Kohlendioxid zu berücksichtigen, wurde eine CO₂-Austauschreaktion in das Modell integriert (Masakapalli *et al.*, 2013).

Das für die vergleichende Stoffflussanalyse angewandte finale Modell ist im Anhang aufgeführt (vgl. Tabelle A 16). Je getesteter Substanz wurde eine ¹³C-MFA berechnet. Die substanzspezifischen experimentell bestimmten Austauschraten, die daraus resultierenden Aufnahmeraten der essentiellen Aminosäuren sowie die substanzspezifische Biomassegleichung, die in die Stoffflussanalyse einbezogen wurden, sind in Tabelle A 1-15 aufgelistet.

2.2.4.3 Isotopenmarkierte Stoffflussanalyse (¹³C-MFA)

Durchführung der ¹³C-MFA Berechnung

Die ¹³C-MFA-Berechnung wurde mit Hilfe der Software *INCA* (Young, 2014) ausgeführt. Unter Anwendung der SSR wurden hierbei die Stoffflüsse durch Minimierung der varianz-gewichteten SSR zwischen experimentell bestimmten und vorhergesagten Markierungsdaten bzw. Austauschraten bestimmt (Antoniewicz *et al.*, 2006). Die vergleichende Stoffflussanalyse wurde auf Grundlage einer parallelen ¹³C-MFA durchgeführt, indem die Datensätze der verschiedenen Markierungsexperimente kombiniert auf ein Flussmodell gefittet wurden. Für jede getestete Substanz wurde eine optimale Flussverteilung ermittelt. Unter Anwendung zufällig gewählter Ausgangswerte wurde dabei eine optimale Flussverteilung auf der Grundlage von mindestens 300 parallelen Berechnungen ermittelt. Im nächsten Schritt wurden die berechneten optimalen Flüsse als Ausgangspunkt für eine nachfolgende Stoffflussanalyse eingesetzt. Dieser Prozess wurde so lange wiederholt bis keine weitere Verbesserung des SSR-Werts zu verzeichnen war. Um das Auffinden eines globalen Optimums zu ermöglichen, wurden die oben aufgeführten Schritte, jeweils beginnend von zufällig gewählten Ausgangswerten, mindestens 10 Mal wiederholt. Aus der resultierenden Menge optimaler Flussverteilungen wurde die Lösung mit geringstem SSR-Wert als globales Optimum bestimmt. Die Anpassungsgüte (engl. *goodness-of-fit*) der erzielten Ergebnisse wurde mittels eines χ^2 -Anpassungstests ermittelt. Die 95 % Konfidenzintervalle der Flüsse wurden auf Grundlage des von Antoniewicz *et al.* (2006) publizierten *Grid-Search*-Verfahrens berechnet. Der Standardfehler der Flüsse wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Flusspräzision (Standardfehler)} = \frac{(\text{FlussObergrenze 95 \%}) - (\text{FlussUntergrenze 95 \%})}{3,92}$$

Sämtliche Flussberechnungen wurden auf einem 40-Kern Dell EMC PowerEdge R640 Server unter Ubuntu LTS 16.04.4 und MATLABR2017a durchgeführt.

Statistische Auswertung der Flusswerte

Um die Flusswerte zwischen zwei Substanzen vergleichen zu können, wurden sie auf die Glukoseaufnahme (GAR) normalisiert:

$$Flusswert_{normalisiert} = \frac{Flusswert_{absolut} * 100}{GAR \text{ der Substanz}}$$

Es wurde auf diesen Fluss normiert, da es sich bei der Glukose um die Hauptkohlenstoffquelle für die Zellen handelt. Unter Kontrollbedingungen entspricht dies außerdem dem größten Fluss. Folgende Formel fand zur Bestimmung der signifikanten Veränderungen zwei Flüssen Anwendung:

$$Wert = (Mittelwert1 - Mittelwert2) \pm (1.92 * \sqrt{Standardfehler1^2 * Standardfehler2^2})$$

Die zwei Werte durften sich nicht überschneiden. Wenn dies der Fall war, konnte sicher davon ausgegangen werden, dass dieser Fluss signifikant unterschiedlich war.

Erstellung der Flusskarten

Die Flusskarten wurden mit Hilfe des Fluxmap Add-ons (Rohn *et al.*, 2012) der Visualisierungssoftware VANTED (Junker *et al.*, 2006) erstellt und in einem zweiten Schritt manuell mit der Software INKSCAPE nachbearbeitet.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei verschiedene Darstellungen von Flusskarten genutzt. Das ist zum einen eine Darstellung der absoluten Flusswerte des Kohlenstoffflusses einer Zelle (vgl. Abbildung 22) und zum anderen eine vergleichende Art der Darstellung (vgl. Abbildung 28). Dazu wurden die Unterschiede zwischen zwei Substanzen in einer Flusskarte und anhand relativer Flusswerte dargestellt.

Nicht signifikant verschiedene Flüsse wurden mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. Die signifikanten Abweichungen wurden mit Hilfe einer Farbskala gekennzeichnet. Diese bezog sich zur vereinfachten Darstellung auf das *log ratio* der Flusswerte. Das *log ratio* wurde wie folgt berechnet:

$$\log \text{ ratio} = \ln_{|Fluss1|/|Fluss2|}$$

Positive *log ratio* Werte wurden mit einem roten Farbverlauf und negative Werte mittels einem blauen Farbverlauf dargestellt.

3. Ergebnisse

Die Durchführung der Experimente, die Auswertung der Daten, die Datenkorrektur für die Modellierung, sowie die Erstellung der Flusskarten der vorliegenden Arbeit wurden von mir durchgeführt. Das Erstellen des Grundmodells, die Erstellung der Perl-Skripte und die Durchführung der Modellierungen wurden von Dr. Eva Grafahrend-Belau für die vorliegende Arbeit gemacht. Dies entsprach rund 10 % des Projektes.

3.1. Etablierung der Grundlagen einer ^{13}C -MFA

Der erste, praktische Teil dieser Arbeit war die Etablierung der experimentellen Grundlagen der ^{13}C -MFA. Dazu zählten die Bestimmung der richtigen Zusammensetzung des Versuchsmediums, die Identifizierung des metabolischen und isotopischen Gleichgewichts und eine erschöpfende Extraktion der Zellen.

3.1.1 Zusammensetzung des Mediums

Um eine ^{13}C -MFA durchzuführen, mussten die Zellen in einem möglichst kurzen Zeitraum unter möglichst durchgängig gleichen Bedingungen bis zur Probenahme ausreichend wachsen. Daher war es nötig, eine optimale Zusammensetzung des Mediums zu finden.

3.1.1.1 Glukosekonzentration im Medium

Glukose ist ein Hauptnährstoff für Tumorzellen. Daher ist der Glukosegehalt im Medium für das Wachstum der Zellen limitierend. In der Literatur werden verschiedene Glukosekonzentrationen für MFA mit unterschiedlichen Zelllinien angewendet (vgl. Tabelle 9). Die Spanne reicht von 2 g/l (Maier *et al.*, 2008; Woo Suk *et al.*, 2013), 7 g/l (Goudar *et al.*, 2010) bis zu 10 g/l (Templeton *et al.*, 2013) Glukose im Medium. Werden ausschließlich HepG2-Zellen betrachtet, so schwanken die von den einzelnen Arbeitsgruppen angewendeten Glukosekonzentrationen ebenfalls (Maier *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2008; Niklas *et al.*, 2009; Yarmush *et al.*, 2016). Srivastava *et al.* (2008) und Yarmush *et al.* (2016) nutzten 4,5 g/l Glukose in Ihrer Stoffflussanalyse. Niklas *et al.* (2009) verwendeten für MFA 2 g/l Glukose und Maier *et al.* (2008, 2009, 2010) setzten 2 g/l Glukose in ihrer ^{13}C -INST-MFA ein. Zudem wurde das Medium in manchen Arbeiten über den Versuchszeitraum hinweg in Intervallen erneuert (Strigun *et al.*, 2011). In anderen Arbeiten wurde Glukose als Injektion in regelmäßigen Abständen hinzugegeben (Ahn *et al.*, 2013) oder das Medium während des Versuchs unverändert belassen (Maier *et al.*, 2008).

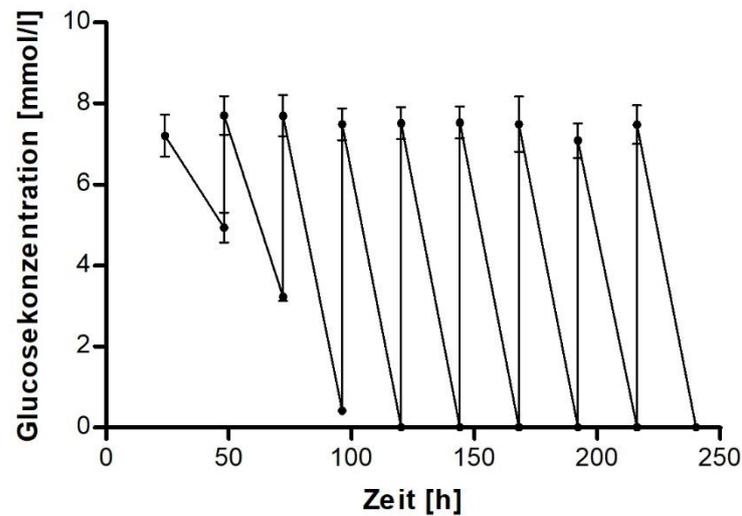


Abbildung 15: Glukosekonzentration im Mediumüberstand über eine Versuchszeit von 240 h und einer Ausgangskonzentration von 2 g/l Glukose im Medium

Dargestellt sind Mittelwerte ($n=5$) \pm SD. Das Medium wurde über 10 Tage alle 24 h erneuert, es wurden jeweils Proben entnommen, welche per Plattenleser gemessen wurden. Es ist erkennbar, dass ab 120 h die Glukose im Medium vollständig verbraucht wurde.

Die Standardkultivierung von HepG2-Zellen findet bei 2 g/l Glukose im Medium statt. Daher war dies der Wert, mit dem in den Glukosekonzentrationsexperimenten der vorliegenden Arbeit begonnen wurde (vgl. Abbildung 15). Abbildung 15 zeigt, dass nach 120 h die Glukose innerhalb von 24 h im Medium verbraucht war. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das die Zellen spätestens ab diesem Zeitpunkt in ihrem Wachstum gestört waren, was wiederum das

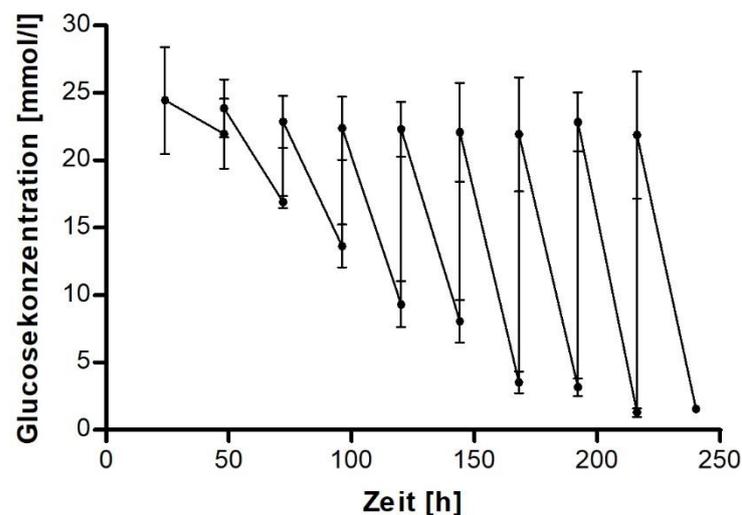


Abbildung 16: Glukosekonzentration im Mediumüberstand über einen Versuchszeitraum von 240 h und einer Ausgangskonzentration von 5 g/l Glukose im Medium

Dargestellt sind Mittelwerte ($n=5$) \pm SD. Das Medium wurde über 10 Tage alle 24 h erneuert, es wurden jeweils Proben entnommen und per Plattenleser gemessen.

metabolische Gleichgewicht beeinträchtigt. Außerdem bedeutet ein zur Neige gehender Nährstoff im Medium, dass das metabolische Gleichgewicht nicht mehr gewährleistet ist. Aus diesen Gründen wurde die maximale Zellzahl in einer Monolayer in einer 6-Well-Platte aus den Daten berechnet. Daraus wiederum resultierte eine maximal benötigte Glukosekonzentration von 5,8 g/l. Die geplante Konfluenz der Zellen im Versuch lag bei 80-90 %, wodurch sich für den anschließenden Versuch für 5 g/l Glukose im Medium entschieden wurde (vgl. Abbildung 16). Wie in Abbildung 19 zu sehen, waren die Zellen ab 168 h konfluent. Zu diesem Zeitpunkt war noch mehr als 30 % der ursprünglichen Glukose im Medium vorhanden, womit ein Überschuss über den Versuchszeitraum garantiert werden konnte. Diese Konzentration wurde zusätzlich in Hinsicht auf die K_m -Werte der in der Leber vorkommenden Glukosetransporter überprüft. In der menschlichen Leber werden verschiedene Glukosetransporter exprimiert. Die wichtigsten sind Glut1 (Takata *et al.*, 1992), Glut2 (Mueckler, 1992; Zhao *et al.*, 2007), und Glut9 (Zhao *et al.*, 2007; Augustin, 2010). Glut1 wird auch als HepG2-artiger Glukosetransporter bezeichnet und besitzt einen K_m -Wert von 1-2 mmol/l (Zhao *et al.*, 2007; Karim *et al.*, 2012). Da dieser Wert weit unter der nach dem Versuchszeitraum im Medium noch vorhandenen Glukosekonzentration lag, konnte davon ausgegangen werden, dass die Glukoseversorgung der Zellen zum Zeitpunkt der Probenahme vollständig gewährleistet war.

Tabelle 9: Vergleichende Darstellung verschiedener publizierter Stoffflussanalysen mit Leberkrebszellen

Literatur	Methode	Versuchszeit	Glukosegehalt [g/l]	Serumgehalt [% FBS]
Srivastava und Chan, 2008	MFA	24 h	4,5	10
Niklas <i>et al.</i>, 2009	MFA	6 Tage	2,0	3
Yarmush <i>et al.</i>, 2016	MFA	7 Tage	4,5	10
Maier <i>et al.</i>, 2008, 2009	¹³ C-INST-MFA	3 h	2,0	serumfrei
Klein <i>et al.</i>, 2014	MFA	30 Tage	2,0	serumfrei
Egnatchik <i>et al.</i>, 2014; Egnatchik <i>et al.</i>, 2014	¹³ C-MFA	9 h	5,0 (markiertes Glutamin)	10
Noguchi <i>et al.</i>, 2009	¹³ C-DMFA	9 h	5,0 (markiertes Glutamin)	10

3.1.1.2 Serumkonzentration im Medium

Weiterhin war der Serumgehalt für die Zusammensetzung des Mediums von Bedeutung. Das fetale Kälberserum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) ist ein wichtiger Bestandteil von Nährmedien, da es u.a. Wachstumsfaktoren enthält. Diese beeinflussen das Wachstumsverhalten der Zellen maßgeblich. Andererseits stellt das Serum eine zusätzliche Kohlenstoffquelle dar, welche die

Markierungen verdünnen könnte (Sinacore *et al.*, 2000; Deshpande *et al.*, 2009). Dies ist für die Stoffflussanalyse hinderlich, weshalb das Serum möglichst reduziert werden sollte. Da die vollständige Elimination des Serums jedoch zu negativen Folgen für das Wachstum führen kann (Sinacore *et al.*, 2000), musste ein Kompromiss gefunden werden. Zum Serumgehalt im Medium finden sich in der Literatur verschiedenste Angaben (vgl. Tabelle 9). Allein bei den Versuchen mit HepG2-Zellen wechselte der Serumgehalt je nach Forschungsgruppe von 0 % (Maier *et al.*, 2008, 2009; Niklas *et al.*, 2009) zu 10 % (Srivastava *et al.*, 2008; Yarmush *et al.*, 2016). In der Standardkultivierung von Zelllinien wird FBS mit einem Gehalt von 10 % zugegeben. Um folgend das Wachstumsverhalten der HepG2-Zellen in der vorliegenden Arbeit zu testen, wurden verschiedene Serumkonzentrationen mit und ohne Zusätze untersucht (vgl. Abbildung 17). Diese Zusätze waren zum einen 0,5 % Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) und zum anderen 2 ng/ml des epidermalen Wachstumsfaktors (engl. *epidermal growth factor*, EGF) und 10 ng/ml des Hepatozyten Wachstumsfaktors (engl. *hepatocyte growth/scatter factor*, HGF). Sie dienten der potentiellen Unterstützung des Zellwachstums bei Serumreduktion.

Wie in Abbildung 17 ersichtlich ist, korreliert das Wachstum der Zellen mit dem Serumgehalt. Besonders deutlich wird dies, wenn die Kurven von 10 % FBS mit 1 % FBS verglichen werden. Des Weiteren zeigt sich, dass der Zusatz von EGF und HGF oder ITS zum serumfreien Medium kein vergleichbares Wachstum hervorruft. Wird hingegen die Kombination von 1 % FBS und ITS

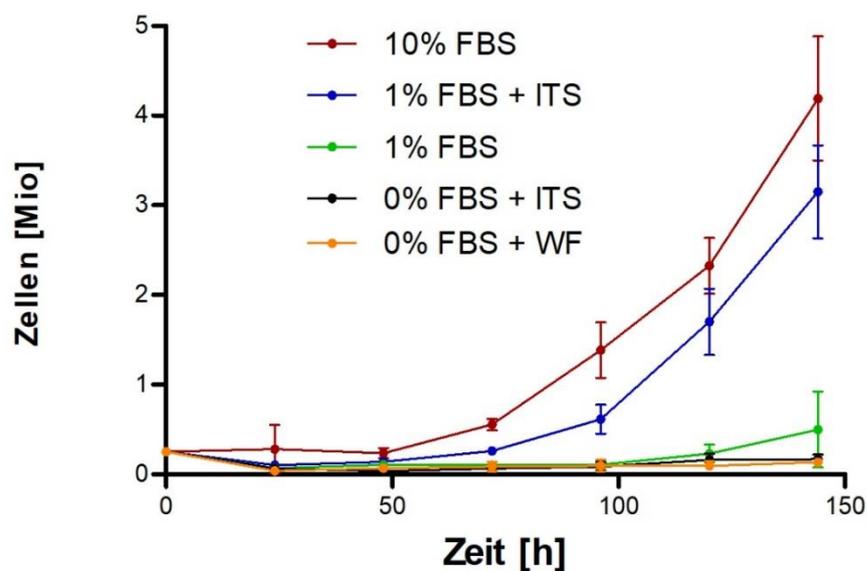


Abbildung 17: Wachstumskurve unter verschiedenen Serumbedingungen im Medium

Die Serumbedingungen waren: 10 % FBS, 1 % FBS mit dem Zusatz vom Insulin-Transferrin-Selenium (ITS), 1 % FBS, 0 % FBS mit dem Zusatz von ITS und 0 % FBS mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren (WT). Die Zellzahl wurde alle 24 h über einen Zeitraum von 144 h bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=5$) \pm SD. Die Erklärung zu den Abkürzungen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

betrachtet, ist ein ähnliches Wachstum wie mit 10 % FBS zu sehen. Wie in der Literatur beschrieben (Sinacore *et al.*, 2000; van der Valk *et al.*, 2010; Biaggio *et al.*, 2015), wird damit bewiesen, dass kein ähnliches Wachstum der Zellen zur Kontrolle ohne eine zeitaufwändige Adaption oder einen Zusatz von wachstumsunterstützenden Supplementen gewährleistet werden kann. Daher eignete sich für die weiteren Versuche in der vorliegenden Arbeit die Kombination von 1 % FBS und ITS am besten.

3.1.2 Wachstumskurve

Aufgrund der Ergebnisse der Glukose- und Serumkonzentrationsversuche wurde ein Versuchsmedium konzipiert. Mit diesem wurde eine Bestimmung der Wachstumskurve durchgeführt (vgl. Abbildung 18). In der Abbildung 18 ist zwischen 0-144 h ein exponentielles Wachstum zu beobachten. Zwischen 144 h und 168 h befinden sich die Zellen in einem Übergangszustand zur Plateauphase, welche ab 168 h einsetzt. Anhand der Wachstumskurve konnten der exponentielle Wachstumsbereich, das metabolische Gleichgewicht und die Austauschraten für die Etablierung der ^{13}C -MFA bestimmt werden.

Das exponentielle Wachstum konnte per halblogarithmischer Darstellung der Wachstumskurve ermittelt werden (vgl. Abbildung 20). Ersichtlich war, dass solange die gegen die Zeit

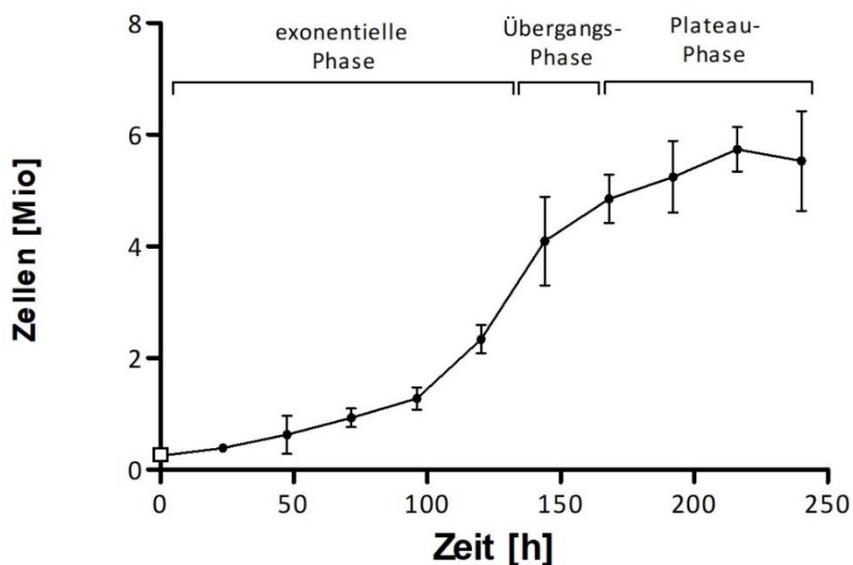


Abbildung 18: Wachstumskurve von HepG2-Zellen in Medium mit 5 g/l Glukose, 1 % FBS und ITS-Zusatz
Von 24 h bis 144 h ist eine exponentielle Phase erkennbar, ab 168 h zeigt die Kurve eine Übergangsphase zur Plateau-Phase. □ = ausplattierte Zellzahl, nicht gezählt. Die Zellzahl wurde regelmäßig alle 24 h über 240 h bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ($n=5$) \pm SD.

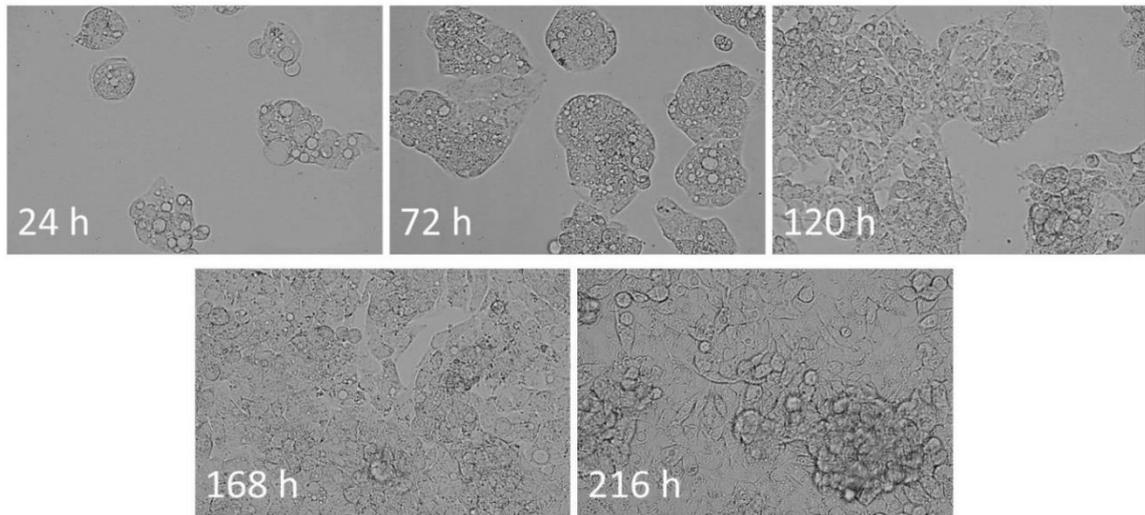


Abbildung 19: Visuelle Darstellung der Konfluenz der Zellen in einem Well über den Ablauf der Wachstumskurve

Erkennbar ist ein deutliches Wachstum, ab 168 h haben die Zellen fast 100 % Konfluenz erreicht. Ab 216 h kann mehrschichtiges Wachstum beobachtet werden.

aufgetragene Zellzahl eine Gerade bildet, die exponentielle Wachstumsphase besteht. In dieser Wachstumskurve war der beste R^2 -Wert nach 144 h erkennbar. Abbildungen mit Vergleichswerten befinden sich im Anhang (vgl. Abbildung A 2).

Eine weitere Bedingung für die ^{13}C -MFA ist, dass die Zellen nicht zu 100 % konfluent sind. Dies würde zu einer Kontaktinhibition zwischen den Zellen und somit zu verändertem Wachstum und

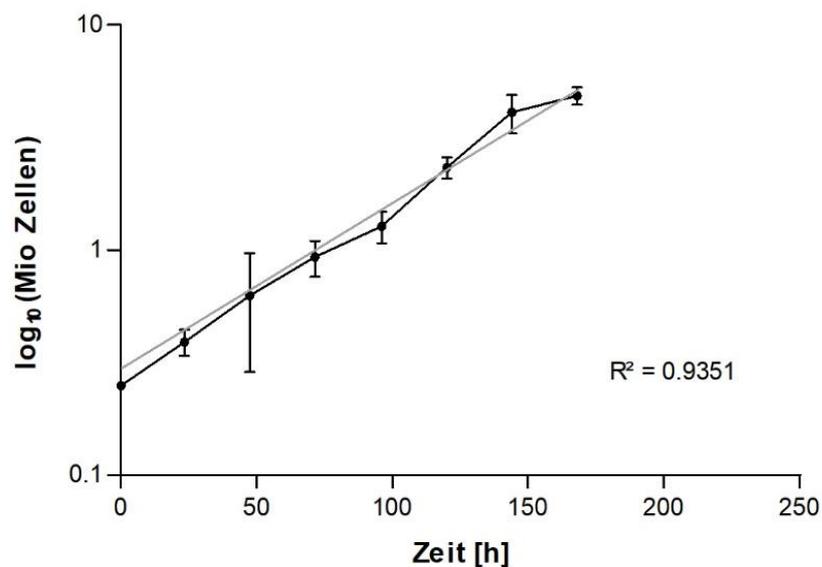


Abbildung 20: Halblogarithmische Darstellung der Wachstumskurve (vgl. Abbildung 18) bis 144 h

Dadurch, dass der R^2 -Wert gegen 1 geht, zeigt sich dieser Wachstumskurveanteil halblogarithmisch als eine Gerade. Die Zellzahl wurde alle 24 h über 240 h bestimmt, dargestellt sind Mittelwerte ($n=5$) \pm SD von 24-144 h.

Metabolismus führen. In Abbildung 19 ist ersichtlich, dass die Zellen ab 168 h fast zu 100 % konfluent waren. Aus diesem Grund hatte die Probenentnahme vorher zu erfolgen.

Aus der Wachstumskurve ließen sich zusätzlich die Wachstumsrate und die Dopplungszeit bestimmen (vgl. Tabelle 10). Dabei dient die Wachstumsrate als Modellparameter für die ^{13}C -MFA.

Tabelle 10: Wachstumsrate und Dopplungszeit der Wachstumskurve

Wachstumsrate μ	0,0196 ± 0,0049 [1/h]
Dopplungszeit	35,38 [h]

3.1.3 Austauschraten

Aus dem Mediumüberstand des Wachstumskurvenversuches konnten des Weiteren die Austauschraten von Aminosäuren, Laktat und Glukose bestimmt werden (vgl. Tabelle 11). Diese wurden dazu genutzt, die Nährstoffversorgung der Zelle zu überprüfen und das metabolische Fließgleichgewicht zu ermitteln (vgl. 3.1.5). Für die Austauschraten von Säugerzellen hat Antoniewicz (2018) die in der Tabelle 11 dargestellten Vergleichswerte entwickelt, welche die Grundlage für den Vergleich der in der vorliegenden Arbeit erreichten Messwerte bilden. Da es zu ^{13}C -MFA-Studien mit HepG2-Zellen keine Literatur gibt, wurden zudem andere Zellarten als Referenz herangezogen. Die Austauschraten nach Ahn *et al.* (2011) liegen im von Antoniewicz (2018) vorgegebenem Bereich. Hierbei handelt es sich allerdings um die gleiche Arbeitsgruppe. Raten aus anderen Gruppen weichen teilweise von den Vergleichswerten von Antoniewicz (2018) ab. Da dies ein durchgehendes Problem ist, wurden andere zu erfüllende Kriterien für die Raten definiert. Die Laktatabgabe sollte in unbehandelten Krebszellen größer als die Glukoseaufnahme sein. Dabei sollte der Wert nicht über das Doppelte der Glukoseaufnahme hinausgehen, da die Umwandlung von Glukose zu Laktat maximal $2 \text{ mol}_{\text{Laktat}} / 1 \text{ mol}_{\text{Glukose}}$ beträgt. Außerdem war entscheidend, dass die Glutaminaufnahme im Verhältnis zur Glukoseaufnahme zwischen 10-30 % liegt. Alle essentiellen Aminosäuren sollten zudem aufgenommen, d.h. niemals in das Medium abgegeben werden.

3.1.4 Isotopisches Gleichgewicht (ISS)

Eine weitere Komponente, die für die Etablierung der ^{13}C -MFA notwendig ist, ist das Erreichen des ISS. Das ist notwendig, da bei der ^{13}C -MFA von einem festen Markierungsmuster ausgegangen wird. Veränderte Markierungsmuster geben Hinweise auf Einflüsse im Stoffwechsel. Daher führen Informationen, die von einem sich noch wandelnden Markierungsmusters herrühren, zu falschen Rückschlüssen in den Flusskarten (Deshpande *et al.*,

2009). Die in der Literatur am häufigsten beschriebene Bestimmungsmethode ist die Messung des Markierungsmusters bis zum Erreichen des Equilibrium über einen längeren Zeitraum (Deshpande *et al.*, 2009; Noguchi *et al.*, 2009; Goudar *et al.*, 2010; Sengupta *et al.*, 2011; Strigun *et al.*, 2011; Sheikholeslami *et al.*, 2013; Kruger *et al.*, 2014; DeWaal *et al.*, 2018). Dies erfordert bei Säugerzellen im Vergleich zu Mikroorganismen einen längeren Zeitraum. Die Markierungsmuster im Citratzyklus von Säugerzellen können nach Tagen noch nicht im Gleichgewicht sein, während es sich bei Mikroorganismen innerhalb von Stunden einstellt (Bennett *et al.*, 2008; Kruger *et al.*, 2012).

Tabelle 11: Vergleich von Austauschraten aus der Literatur mit den bei der Wachstumskurve gemessenen Raten

Negative Werte sind Abgaberaten, positive Werte kennzeichnen Aufnahmeraten. Dargestellt ist der Mittelwert ($n=3$) \pm SD; * = essentielle Aminosäuren

Raten [nmol/10 ⁶ Zellen*h]	Metabolit	Antoniewicz (2018) Säugerzellen	Gemessene Raten	Ahn <i>et al.</i> (2011) CHO-Zellen	Altamirano <i>et al.</i> (2006) CHO-Zellen	DeWaal <i>et al.</i> (2018) Huh-Zellen
Aufnahme	Glc	100 bis 400	407,20 \pm 18,0	201,1	129,0	418,0
	Gln	30 bis 100	49,28 \pm 9,49	36,1	22,5	120,0
	Ser	2 bis 10	13,23 \pm 1,41	7,5	16,4	4,0
	Val*	2 bis 10	53,83 \pm 8,44	5,3	-	6,0
	Leu*	2 bis 10	108,60 \pm 7,49	6,9	-	13,0
	Ile*	2 bis 10	78,49 \pm 1,77	6,4	-	10,0
	Met*	2 bis 10	4,52 \pm 1,54	1,7	-	-
	Thr*	2 bis 10	2,32 \pm 7,08	4,3	-	-
	Phe *	2 bis 10	16,65 \pm 3,76	2,9	-	-
	Lys*	2 bis 10	3,84 \pm 0,47	-	-	-
	Tyr	2 bis 10	18,76 \pm 8,19	-	-	-
Cys	2 bis 10	0,44 \pm 0,15	-	-	-	
Abgabe	Lac	200 bis 700	477,11 \pm 7,42	299,5	245,0	737,0
	Ala	2 bis 10	75,63 \pm 1,69	2,1	7,4	26,0
	Gly	2 bis 10	5,69 \pm 1,34	2,9	7,3	-
	Pro	2 bis 10	61,06 \pm 4,82	0,3	-	-
	Asp	2 bis 10	0,44 \pm 0,12	0,4	-9,7	-
	Glu	2 bis 10	17,79 \pm 8,56	5,2	-	9,0

Zusätzlich muss eine Verdünnung der Markierung durch Aminosäuren im Medium beachtet werden, weshalb das ISS länger benötigt (Bennett *et al.*, 2008; Deshpande *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zeitversuch über einen Zeitraum von sieben Tagen durchgeführt, um das isotopische Gleichgewicht in Aminosäuren nachzuweisen. Es wurde sich für proteingebundene Aminosäuren entschieden, da die Markierung dort am längsten braucht um

eingebaut zu werden. Stellt sich ein Equilibrium in den Aminosäuren ein, dann befinden sich auch die anderen gemessenen Metabolite im ISS.

In Abbildung 21 ist ersichtlich, dass die Massenisotopomerverteilung ab 120 h bis 168 h stabil ist und somit für das Fragment von Alanin mit der Masse 260 ein isotopisches Gleichgewicht erreicht wurde. Die Daten der restlichen Fragmente der anderen Aminosäuren befinden sich im Anhang (vgl. Abbildungen A 3-8 und Tabelle A 21). In allen Aminosäuren konnte ein Equilibrium nach 120 h festgestellt werden, was die Länge des Markierungsexperiments auf mindestens 120 h festlegt.

3.1.5 Metabolisches Gleichgewicht (MSS)

Da das ISS erst ab 120 h gewährleistet ist, muss das metabolische Gleichgewicht über mindestens 120 h garantiert werden. Die Grundprämisse für ein MSS ist, dass die Austauschraten über den experimentellen Zeitraum stabil bleiben (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Dies wird in kontinuierlichen Reaktorkulturen oder im exponentiellen Wachstumsbereich in Batch-Kulturen angenommen (Ahn *et al.*, 2012). Um die Austauschraten stabil zu halten, sollten alle Nährstoffe im Überfluss vorhanden sein und Neben- und Abfallprodukte der Zellen regelmäßig entfernt werden, damit es zu keiner Inhibierung des Wachstums kommt (Ahn *et al.*, 2012). Das ist in Batch-Kulturen sehr schwierig und muss deshalb konstant überprüft werden. Wenn alle oben genannten Punkte zum Versuchszeitraum zutreffen, wird aus diesem Grund von einem Pseudogleichgewicht gesprochen (Chan *et al.*, 2003). Dies legt zugrunde, dass kurzzeitige

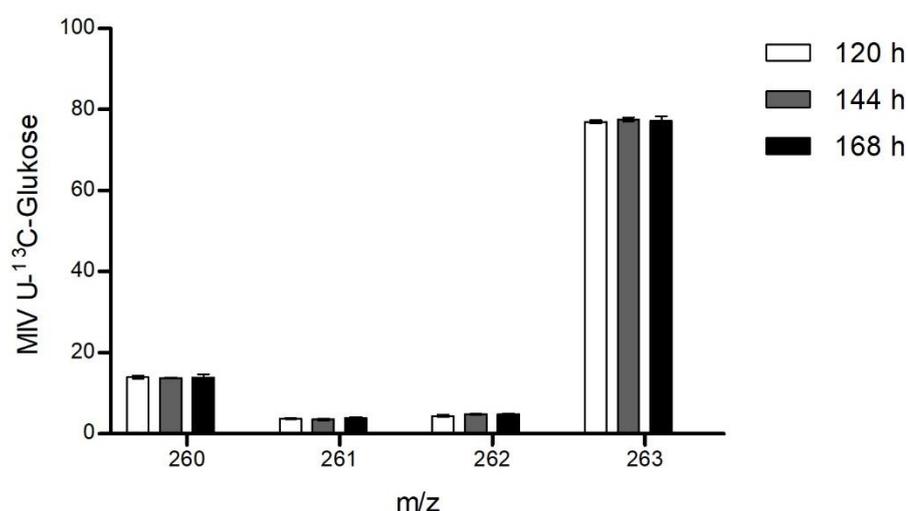


Abbildung 21: Massenisotopomerverteilung des Massenfragments 260 von Alanin (C1-C2-C3) nach 120-144 h Kultivierung mit 100 % U-¹³C-Glukose

Es ist kein signifikanter Unterschied mit einer zweiseitigen ANOVA ($p=0,05$) erkennbar. Die Zellen wurden nach 120-168 h extrahiert, die Interphase hydrolysiert und per GC/MS gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=3$) der Massenisotopomerverteilung \pm SD.

Vergrößerungen von intrazellulären Pools für die Gleichgewichtsbetrachtung außer Acht gelassen werden können (Hua *et al.*, 2001).

Die exponentielle Wachstumsphase der Zellen dauerte von 24 h - 168 h (vgl. Abbildung 20). Zur Überprüfung des metabolischen Gleichgewichts wurde eine PCA durchgeführt. Dazu wurde der Zellextrakt mit dem internen Standard ^{13}C -Sorbitol versetzt und die Metaboliten per GC-qTOF gemessen. Es wurde eine relative Quantifizierung der Peaks auf ^{13}C -Sorbitol vorgenommen und die Konzentration auf die Biomasse normiert. Dies erwies sich für die Proben von Tag 1 und 2 als unmöglich, da die Zellmasse nicht ausreichend war und somit nur Hintergrundrauschen gemessen wurde. Die restlichen Daten wurden per PCA auf zwei Komponenten reduziert. In einem metabolischen Gleichgewicht werden gleiche Austauschraten erwartet und somit ein gleichbleibendes Niveau der Metabolite in den Zellen. Das ist erreicht, wenn im Komponentendiagramm der PCA keine klare Trennung der einzelnen Tage sichtbar ist. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse für die Tage 3 bis 6. Es ist keine klare Trennung der einzelnen Tage erkennbar. Das führt zur Annahme, dass das metabolische Gleichgewicht in den ersten sechs Tagen des Versuchs vorhanden ist.

Deshalb und aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurde die optimale Versuchszeit für die folgenden Markierungsexperimente auf 6 Tage bzw. 144 h festgelegt.

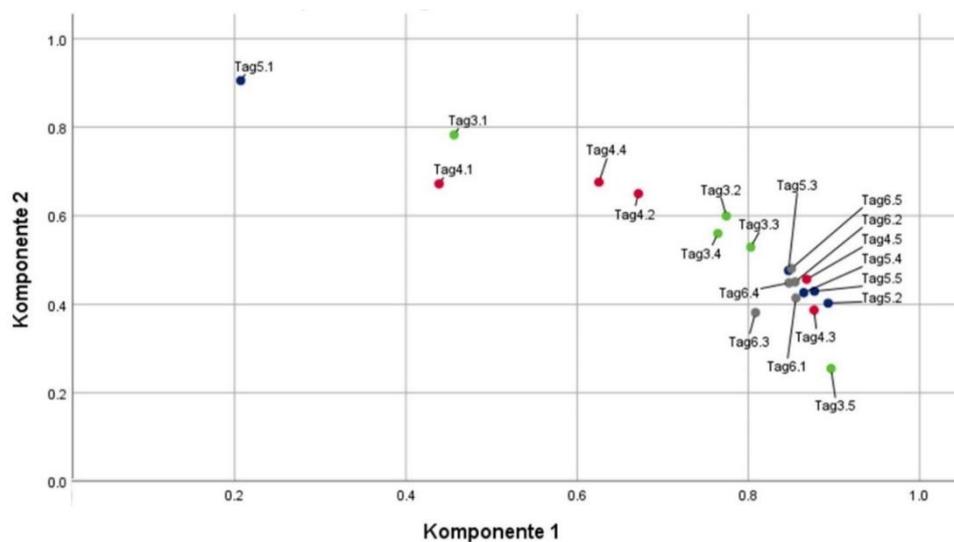


Abbildung 22: Komponentendiagramm der PCA für das MSS, Reduktion auf zwei Komponenten (Gesamtvarianz = 88%)

Dargestellt sind relative Metabolitenkonzentrationen pro Tag (3-7) und biologisches Replikate ($n=5$). ● = biologische Replikate Tag 3; ● = biologische Replikate Tag 4; ● = biologische Replikate Tag 5; ● = biologische Replikate Tag 6

3.1.6 Erstes Markierungsexperiment

Anhand der Ergebnisse der Vorexperimente wurde das erste Markierungsexperiment durchgeführt. Mit der Ermittlung der statistischen Anpassungsgüte des Modells durch einen χ^2 -Test konnte überprüft werden, ob ausreichend experimentelle Daten in ausreichender Genauigkeit vorliegen, um eine ^{13}C -MFA adäquat durchzuführen.

Es wurde ein paralleler Ansatz mit 100 % $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter Glukose und einer Mischung aus 20 % unmarkierter und 80 % $\text{U-}^{13}\text{C}$ -markierter Glukose genutzt. Da jeder Stoffwechselweg eigene Kohlenstofftransportwege besitzt, eignen sich die an verschiedenen Stellen markierten Glukosen oft nur, um einzelne Stoffwechselwege genauer zu charakterisieren (Walther *et al.*, 2012). $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glukose eignet sich laut Metallo *et al.* (2009) für die Auflösung der Glykolyse und des Citratzyklus, $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose dagegen eignet sich besser für den Pentosephosphatweg und Teile des Citratzyklus (Metallo *et al.*, 2009; Walther *et al.*, 2012). Der parallele Ansatz ermöglicht daher eine genauere Auflösung der Flusskarte als einzelne Markierungssubstanzen (Crown *et al.*, 2012).

Die Zellen wurden nach 144 h extrahiert, die Extrakte per GC/MS gemessen, die Daten extrahiert, korrigiert und in das passende Dateiformat für INCA formatiert. Es konnten insgesamt 31 Fragmente der Aminosäuren Alanin, Glycin, Prolin, Serin, Aspartat und Glutamin für das Modell genutzt werden. Zudem wurden die Austauschraten (vgl. Tabelle 11) und die Wachstumsrate (vgl. Tabelle 10) für das Modell benötigt. Genauere Angaben zu den im Modell verwendeten Daten sind in Tabelle A 25 im Anhang aufgelistet. Mittels χ^2 -Test konnte eine statistisch valide Anpassungsgüte des Modells bestätigt werden, wobei das Residuum bei 80,9 und somit unter dem Wert des χ^2 -Test von 90,3 lag (Residuum: 80,9 [χ^2 95%: 90,3]). Die ermittelten Flusswerte finden sich im Anhang in Tabelle A 26.

Aus den Flusswerten wurde die Flusskarte in Abbildung 23 erstellt. Es handelt sich um eine Abbildung des quantitativen Kohlestofftransports der einzelnen Stoffwechselwege, wobei die Dicke der Pfeile mit der Stärke der Flüsse korrelieren. Die Flusskarte sollte erwartungsgemäß einem typischen Krebszellstoffwechsel, welcher in 1.3.2 Stoffwechsel von Krebszellen genauer erläutert wurde, entsprechen. In der Abbildung ist eine starke Glykolyse, welche mit einem aeroben Laktatausstoß einhergeht, zu erkennen. Außerdem zeigt sich eine hohe Glutaminaufnahme in die Zelle und das Mitochondrium. Die Citratzyklusflüsse sind im Vergleich zu den Flüssen der Glykolyse deutlich geringer. In der Summe entspricht diese Flussverteilung den Erwartungen. Aufgrund der Übereinstimmung der Ergebnisse der Flusskarte mit den

Erwartungen wurde die Etablierung der Grundlagenexperimente der ¹³C-MFA als erfolgreich betrachtet.

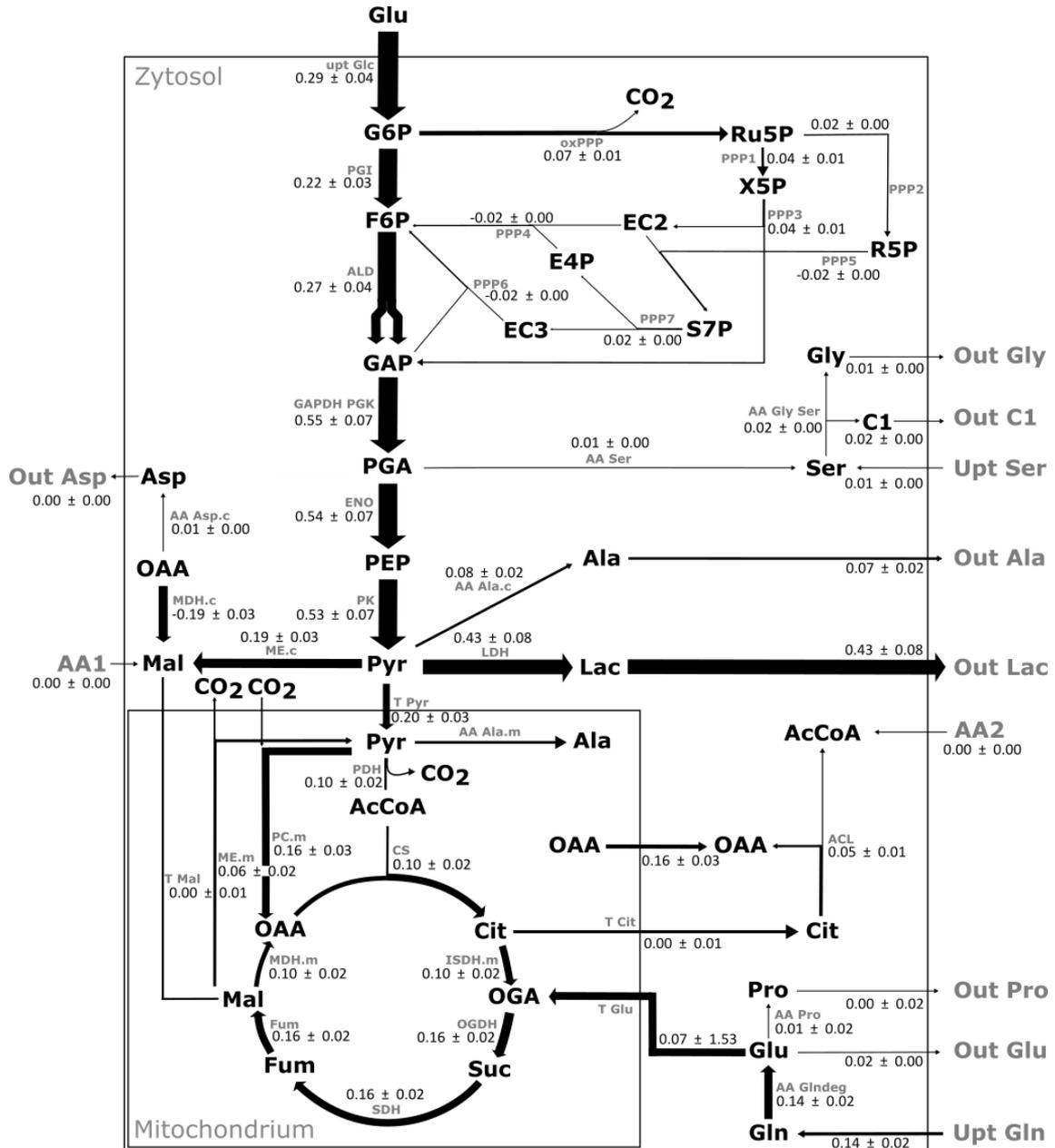


Abbildung 23: Flusskarte von HepG2-Zellen basierend auf den Etablierungsdaten

Abgebildet sind die Kohlenstoffflüsse des Zentralstoffwechsels: die Glykolyse, der Pentosephosphatweg, der Citratzyklus und die anaplerotischen Reaktionen. Die Richtung der Pfeile ist der Nettofluss der enzymatischen Reaktion, die Dicke der Pfeile symbolisiert die Stärke des Kohlenstoffflusses der Reaktion. Die Zahl an den Pfeilen ist der jeweilige absolute Flusswert \pm STE [$\mu\text{mol}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{h})$]. In Grau sind die Enzyme der jeweiligen Reaktionen ausgezeichnet (vgl. Tabelle A 16). Die Erklärung zu den Abkürzungen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

3.2 Validierung der etablierten ^{13}C -MFA Methodik

Der Etablierung der Methodik folgte deren Validierung. Dafür wurden drei Stoffe mit bekannten Auswirkungen auf den Stoffwechsel getestet. 3-Bromopyruvat inhibiert die Hexokinase II, weshalb Veränderungen in den glykolytischen Flüssen erwartet wurden. L-Don (6-Diazo-5-oxo-L-norleucin) agiert als Glutamin-Antagonist und UK-5099 (α -Cyano- β -(1-phenylindol-3-yl)-acrylat) hemmt den Pyruvat-Carrier für den Pyruvattransport ins Mitochondrium. Die ^{13}C -MFA wurde mit den mit den einzelnen Inhibitoren behandelten Zellen durchgeführt und die Ergebnisse mit den jeweiligen Erwartungen verglichen, um die Aussagekraft der Methode zu überprüfen.

3.2.1 Konzentrationsabhängige Wirkung der Inhibitoren auf die Zellviabilität

Begonnen wurde mit einem angepassten LDH-Assay mit L-Don, 3-Bromopyruvat und UK-5099 zur Bestimmung der subtoxischen Konzentrationen. Dabei wurde der LDH-Assay in der vorliegenden Arbeit als Proliferationsassay abgewandelt verwendet. Subtoxische

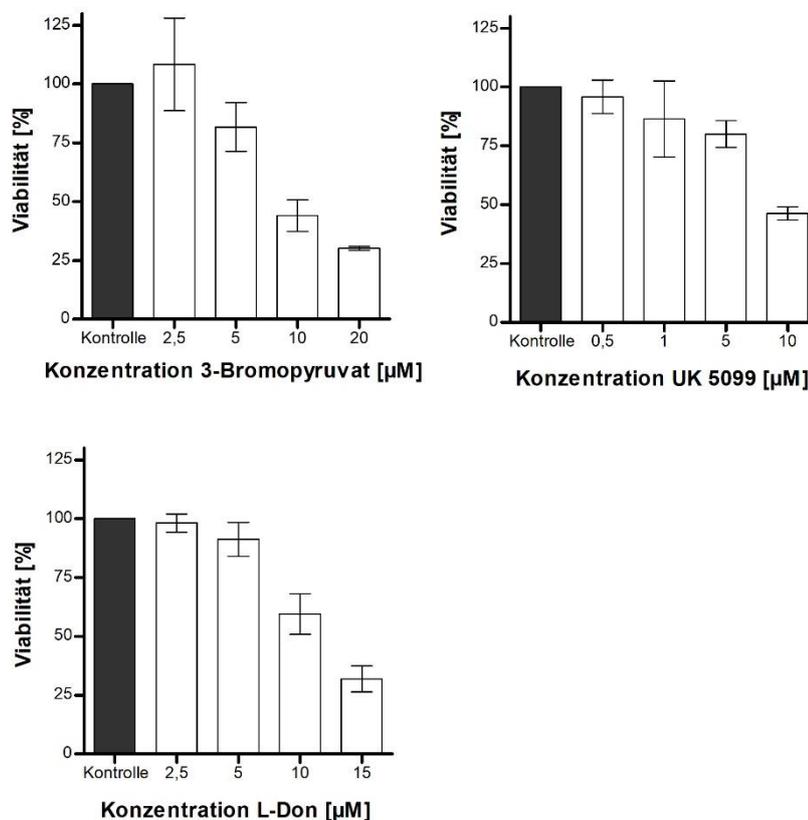


Abbildung 24: Ergebnisse des LDH-Assays der mit den verschiedenen Inhibitoren behandelten Zellen ($n=3 \pm \text{SD}$)

Die Werte sind in Prozent auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen) bezogen. Dabei entspricht die Kontrolle 100 % Viabilität.

Konzentrationen waren dadurch zu definieren, dass kein signifikanter Unterschied der LDH-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle bestand. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse des Assays aufgelistet. Bei allen drei Substanzen ist eine Verringerung in der LDH-Aktivität und somit der Viabilität erkennbar. Für die ^{13}C -MFA wurden 2,5 μM bzw. 108,4 % Viabilität für 3-Bromopyruvat, 0,5 μM bzw. 86,4 % Viabilität für UK-5099 und 2 μM bzw. 91,1 % Viabilität für L-Don als subtoxische Konzentrationen bestimmt. Die Abweichungen in der Viabilität von der Kontrolle erwiesen sich in keiner der gewählten Konzentrationen als signifikant.

3.2.2 Die Stoffflussanalyse des Validierungsexperiments

3.2.2.1 Wachstums- und Austauschraten

Die HepG2-Zellen wurden jeweils mit diesen experimentell bestimmten Konzentrationen behandelt und eine ^{13}C -MFA durchgeführt. In Tabelle 12 sind die jeweiligen Wachstumsraten und die auf die Kontrolle bezogenen Viabilitäten der Zellen aufgelistet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die erwartete Viabilität von LDH-Assay bei L-Don und UK-5099 nicht der Viabilität der Zellen im Markierungsexperiment entspricht. Dies führte zu stärkeren Viabilitätsunterschieden zwischen UK-5099 und L-Don und den respektiven Kontrollen als erwartet. Die Ursache der starken Abweichungen liegt wahrscheinlich in der experimentellen Durchführung.

Tabelle 12: Die Wachstumsraten und Viabilität der mit den einzelnen Inhibitoren behandelten Zellen und der dazugehörigen Kontrollen

	Kontrolle 1	L-Don	Kontrolle 2	UK-5099	3-Bromopyruvat
Wachstumsrate [1/h]	0,0174	0,0074	0,0195	0,0119	0,0185
Dopplungszeit [h]	39,75	93,32	35,52	58,08	37,51
Viabilität [%]	100,00	23,67	100,00	61,15	94,68

Durch die starken Viabilitätsunterschiede wurden in den per GC/MS und Photometer bestimmten Austauschraten bei UK-5099 und L-Don im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle signifikante Unterschiede erwartet. Die experimentell ermittelten Austauschraten sind in Tabelle 13 aufgelistet. L-Don hat die meisten signifikanten Unterschiede zur Kontrolle, UK-5099 zeigt weniger und 3-Bromopyruvat hat nur drei signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die Viabilitäten der Zellen mit der Anzahl der signifikanten Unterschiede zu einem gewissen Grad korreliert.

Tabelle 13: Übersicht über die experimentell bestimmten Austauschraten der Validierungsexperimente
 Dargestellt sind Mittelwerte ($n=6$) aus drei biologischen Replikaten zu je zwei Zeitpunkten \pm SD. Essentielle Aminosäuren sind kursiv geschrieben. Ein signifikanter Unterschied wurde mit einem * markiert. Als Signifikanztest diente eine zweiseitige ANOVA ($p \leq 0,05$). Die Erklärung zu den abgekürzten Metabolitennamen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

Raten [nmol/ 10 ⁶ Zellen *h]	Stoff	Kontrolle 1	L-Don	Kontrolle 2	UK-5099	3-Bromo- pyruvat
Aufnahme	Glc	532,2 \pm 55,3	406,2 \pm 44,6*	204,4 \pm 31,6	400,4 \pm 36,3*	191,8 \pm 11,5
	Gln	75,3 \pm 36,2	28,4 \pm 14,9*	37,2 \pm 22,0	94,0 \pm 19,9*	52,2 \pm 5,7
	Ser	1,1 \pm 0,9	0,3 \pm 0,1	1,2 \pm 0,7	2,7 \pm 5,5	2,3 \pm 1,4
	Val	5,8 \pm 0,9	0,7 \pm 2,8*	6,0 \pm 3,3	10,8 \pm 16,5	5,2 \pm 4,5
	Leu	22,5 \pm 4,0	4,7 \pm 4,7*	13,5 \pm 13,5	22,2 \pm 5,4	14,9 \pm 3,8
	Ile	16,9 \pm 7,1	3,5 \pm 4,1*	11,2 \pm 4,6	18,8 \pm 25,7	12,2 \pm 1,2
	Met	2,1 \pm 0,2	0,5 \pm 0,7*	1,5 \pm 0,6	3,1 \pm 2,5	1,7 \pm 0,04
	Thr	4,8 \pm 9,2	6,2 \pm 0,9	1,9 \pm 5,8	18,1 \pm 16,9	3,7 \pm 7,1
	Phe	4,9 \pm 0,5	1,4 \pm 1,3*	3,2 \pm 1,4	6,8 \pm 2,9	13,4 \pm 0,3*
	Lys	0,4 \pm 3,5	2,3 \pm 7,0	3,0 \pm 3,9	15,6 \pm 14,9	6,4 \pm 10,4
	Tyr	3,6 \pm 0,4	-0,2 \pm 1,5*	-0,8 \pm 1,0	3,0 \pm 0,8*	-0,7 \pm 3,4
Cys	7,7 \pm 1,8	1,8 \pm 0,8*	3,9 \pm 1,4	6,4 \pm 1,2	6,2 \pm 0,2*	
Abgabe	Lac	1272,5 \pm 351,4	291,6 \pm 20,5*	537,4 \pm 181,2	775,5 \pm 93,5	693,0 \pm 39,0
	Ala	32,5 \pm 18,3	2,9 \pm 0,5*	13,8 \pm 8,6	7,9 \pm 21,5	24,9 \pm 17,4
	Gly	7,6 \pm 3,3	0,07 \pm 1,3*	2,6 \pm 0,9	-2,0 \pm 2,1*	1,2 \pm 2,7
	Pro	6,1 \pm 0,5	0,8 \pm 0,06*	2,5 \pm 0,4	2,3 \pm 2,5	3,1 \pm 2,6
	Asp	0,4 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,02	2,3 \pm 0,2*
	Glu	28,4 \pm 8,0	8,7 \pm 1,3*	12,0 \pm 4,2	23,7 \pm 9,7	13,6 \pm 3,5

3.2.2.2 Traceranalyse der mit UK-5099 behandelten Zellen

Im Folgenden wird die Analyse der Ergebnisse der ¹³C-MFA der Validierungsexperimente am Beispiel der Ergebnisse der mit UK-5099 behandelten Zellen dargestellt. Die Ergebnisse der anderen Substanzen befinden sich, soweit nicht anders vermerkt, im Anhang (vgl. Tabellen A 28-47 und Abbildungen A 9-49).

Die Zellextrakte des ¹³C-Experiments wurden gewaschen, teilweise hydrolysiert und derivatisiert und die MIV per GC/MS gemessen. Die MIV-Daten wurden bezüglich dem natürlichen Vorkommen von ¹³C-Markierung und der originalen Biomasse korrigiert. Die Traceranalyse der korrigierten MIV geben erste Aufschlüsse über den Stoffwechsel der behandelten Zellen. In der Betrachtung der MIV der Ribosefragments der Traceranalyse mit 1-¹³C-Glukose (vgl. Abbildung 25 B), können erste Annahmen zu der Aktivität des PPP gemacht werden. In Abbildung 25B im

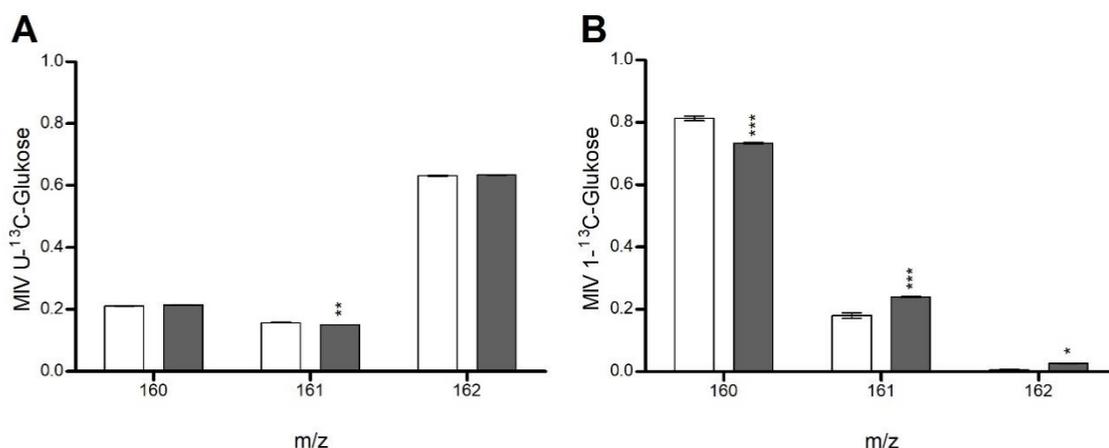


Abbildung 25: MIV des Massenfragments 160 von Ribose (C1-C2) der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen

Aufgetragen ist die MIV der einzelnen Massen ($n=4$). **A** zeigt die MIV von Ribose mit dem Tracer $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose, **B** mit dem Tracer $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose. Die Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle wurde mit einer zweiseitigen ANOVA bestimmt (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,001$; *** = $p \leq 0,0001$).

Massefragment 160 der markierten Ribose ist in der MIV der behandelten Zellen weniger M+0 und mehr M+1 und M+2 im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich. Dies lässt den Rückschluss zu, dass der noxPPP in Bezug auf die Ribosesynthese im Verhältnis zum oxPPP in den behandelten Zellen aktiver als in der Kontrolle ist.

Die MIV von Citrat und anderen Citratzyklusmetaboliten lassen weitere Rückschlüsse auf den Metabolismus zu. In Abbildung 26 wird deutlich, dass die mit UK-5099 behandelten Zellen erheblich weniger Markierung als in der Kontrolle aufweisen. Dies ist auch für die anderen

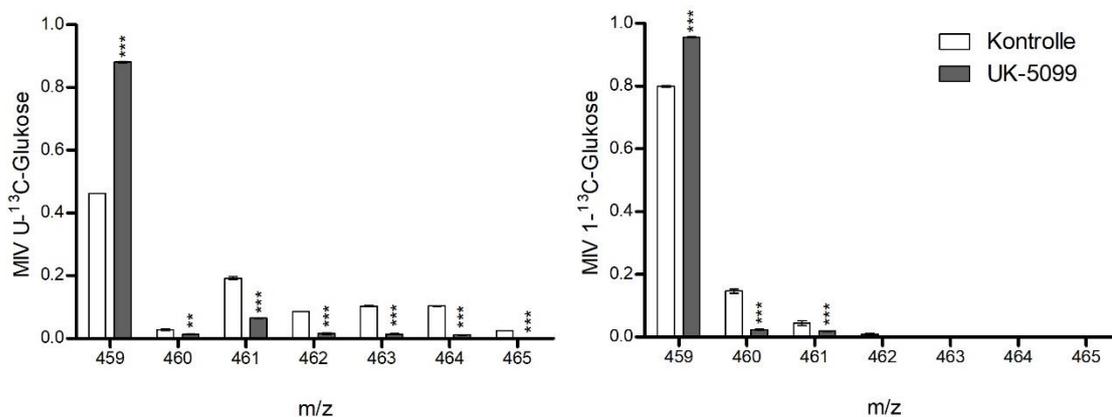


Abbildung 26: MIV des Massenfragments 459 von Citrat (C1-C2-C3-C4-C5-C6) der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen

Aufgetragen ist die MIV der einzelnen Massen ($n=4$). **A** zeigt die MIV von Citrat mit dem Tracer $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose, **B** mit dem Tracer $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose. Die Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle wurde mit einer zweiseitigen ANOVA bestimmt (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,001$; *** = $p \leq 0,0001$).

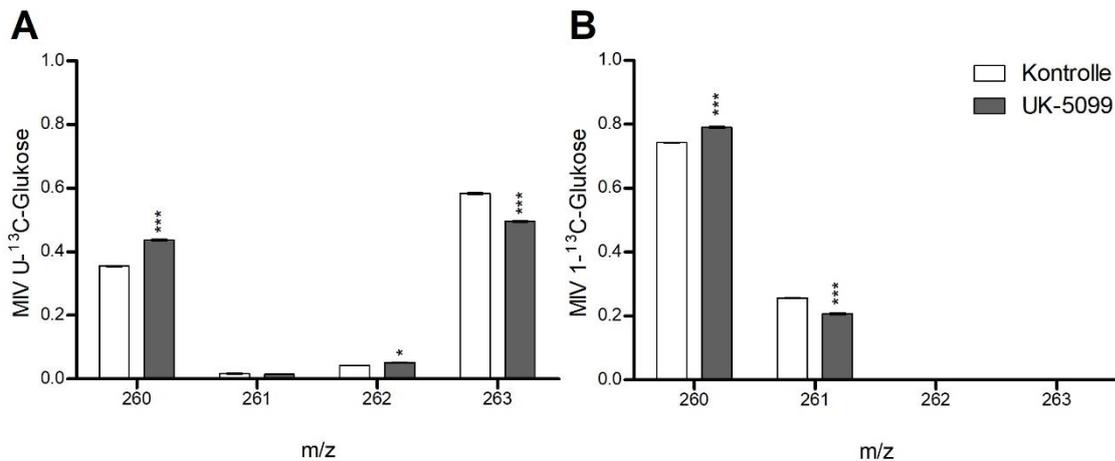


Abbildung 27: MIV des Massenfragments 260 von Alanin (C1-C2-C3) der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen

Aufgetragen ist die MIV der einzelnen Massen ($n=4$). **A** zeigt die MIV von Alanin mit dem Tracer $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose, **B** mit dem Tracer $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose. Die Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle wurde mit einer zweiseitigen ANOVA bestimmt (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,001$; *** = $p \leq 0,0001$).

Citratzyklusmetabolite der Fall (vgl. Abbildung A 42 und 44). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass deutlich weniger Markierung über die Glykolyse in den Citratzyklus aufgenommen wird. Daraus lässt sich schließen, dass zum einen eine verringerte Aufnahme von Pyruvat in das Mitochondrium oder zum anderen eine generelle Reduzierung der Flüsse im Mitochondrium vorliegt. Ersteres erscheint in diesem Zusammenhang wahrscheinlicher, da UK-5099 den Pyruvat-Carrier in das Mitochondrium inhibieren soll.

Dies bestätigt sich anhand der Markierungsdaten von Alanin, dargestellt in Abbildung 27. In den mit UK-5099 behandelten Zellen ist eine geringere Markierung als in der Kontrolle erkennbar.

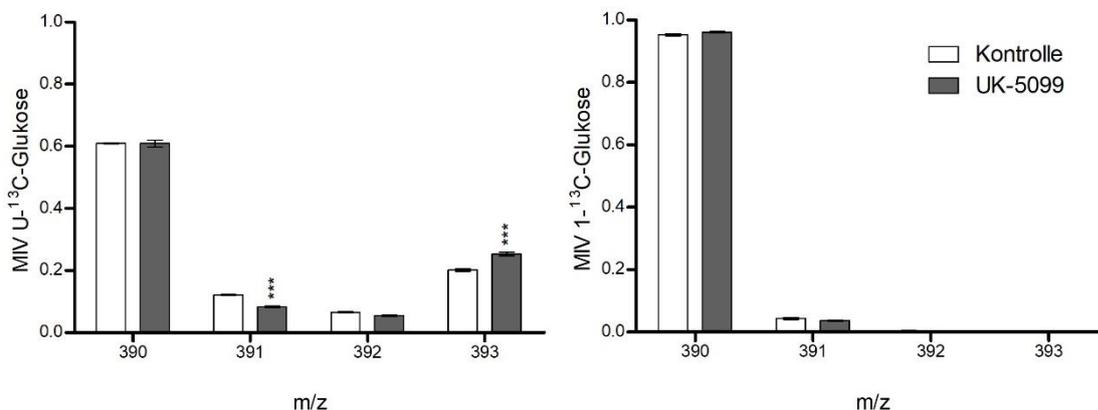


Abbildung 28: MIV des Massenfragments 390 von Serin (C1-C2-C3) der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen

Aufgetragen ist die MIV der einzelnen Massen ($n=4$). **A** zeigt die MIV von Serin mit dem Tracer $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose, **B** mit dem Tracer $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose. Die Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle wurde mit einer zweiseitigen ANOVA bestimmt (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,001$; *** = $p \leq 0,0001$).

Ursache dafür ist das geringere Markierungsaufkommen, welches die mitochondriale Alaninaminotransferase erreicht. Dadurch wird im Mitochondrium mehr unmarkiertes Alanin hergestellt, was zu einer Verdünnung der Gesamtmarkierung führt. Dies ist nur möglich, wenn das Mitochondrium in seiner Aktivität nicht eingeschränkt ist. Somit bestätigt dieses Ergebnis die oben genannte Vermutung. Des Weiteren kann in der MIV von Serin (vgl. Abbildung 28) bei der Traceranalyse mit U-¹³C-Glukose eine erhöhte Markierung festgestellt werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine zur Serinaufnahme relativ erhöhte Serinproduktion sein.

3.2.2.3 ¹³C-MFA von UK-5099

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der ¹³C-MFA der mit UK-5099 behandelten Zellen vorgestellt. Nachfolgend erhalten die behandelten Zellen zur Vereinfachung den Namen der Inhibitoren bzw. verwendeten Medikamente.

Abbildung 29 stellt die vergleichende Flusskarte von mit UK-5099 behandelten Zellen graphisch dar. Die tabellarische Auflistung der numerischen Flusswerte, relativ und normiert, ist in Tabelle A 40 dargestellt. In Tabelle A 25 sind die experimentellen Daten, die für die Stoffflussanalyse notwendig waren, zusammengefasst. Die statistische Anpassungsgüte des UK-5099-Modells konnte bestätigt werden (Residuum: 52,4 [χ^2 95 %: 61,8]). Im Vergleich der Konfidenzintervalle der normierten Flüsse waren 65 % der Flüsse von UK-5099 signifikant unterschiedlich zu denen der dazugehörigen Kontrolle.

In Abbildung 29 ist die vergleichende Flusskarte von UK-5099 und der dazugehörigen Kontrolle zu sehen. Wird der obere Teil der Flusskarte betrachtet, können folgende Abweichungen zur Kontrolle beobachtet werden. Im Unterschied zur Kontrolle weisen die mit UK-5099 behandelten Zellen einen signifikanten Anstieg des oxidativen Pentosephosphatweges auf. Der nichtoxidative PPP ist zudem nicht signifikant gestiegen. Das erhöhte Vorkommen von M+1 in der Traceranalyse mit 1-¹³C-Glukose weist auf eine Erhöhung des nichtoxidativen PPP hin (vgl. Abbildung 25). Der in der Flusskarte abgebildete Fluss stellt die Nettoreaktion zwischen dem reversen und dem nichtreversen nichtoxidativen PPP dar. Die Glykolyseflüsse sind im Gegenzug zum PPP signifikant reduziert. Dies könnte von einer negativen Rückkopplung durch einen verringerten Aufnahmefluss von Pyruvat in das Mitochondrium (*T Pyr*) herrühren. Die Serinaufnahme in die Zelle (*upt Ser*) ist erhöht, was wiederum zu erhöhten Biosynthesen von Glycin und Folat (C1) führt. Der Fluss von 3-Phosphoglycerat, einem Metabolit der Glykolyse, zu Serin (*AA Ser*) zeigt eine nicht signifikante Steigerung. Wie die Glykolyse ist die Fermentation (*LDH*) leicht verringert. Dagegen ist die zytosolische Produktion von Alanin (*AA Ala.c*) deutlich gestiegen. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da eine Korrelation zwischen den Glykolyseflüssen

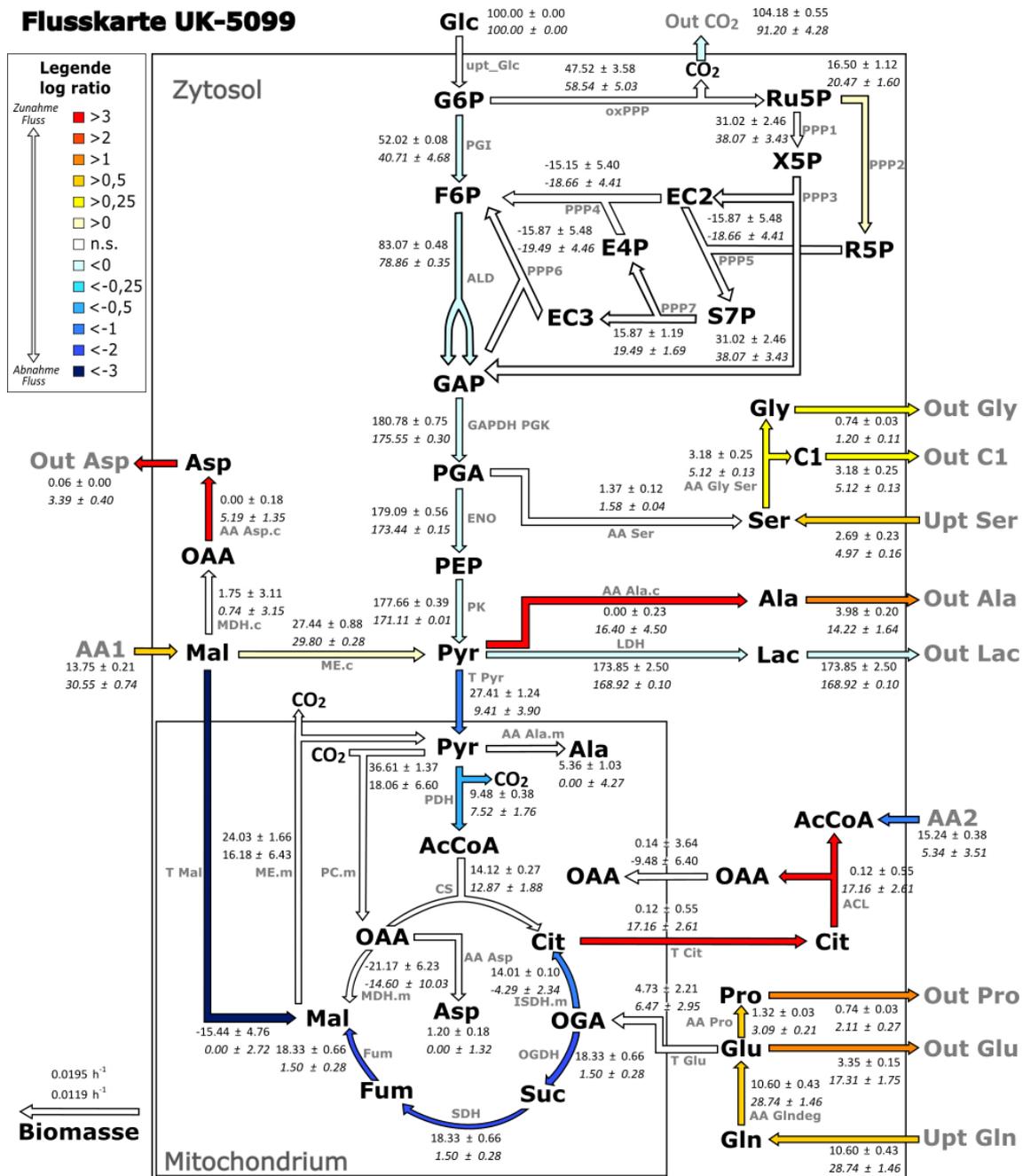


Abbildung 29: Vergleichende Flusskarte von mit UK-5099 behandelten Zellen

Die Flussrichtung wird durch die Pfeile verdeutlicht, wobei die Richtung dem Nettofluss der behandelten Zellen entspricht. Die auf die Glukoseaufnahme rate normierte Flussstärke in % ist den Zahlen neben den Flüssen zu entnehmen. Dabei ist der obere Wert die Kontrolle \pm STE und der untere, kursive Wert der der behandelten Zellen \pm STE. Farbige Pfeile sind signifikant unterschiedliche Flüsse im Vergleich zur Kontrolle. Eine rote Färbung weist auf eine Steigerung des Flusses hin, eine Blaufärbung weist auf eine Abnahme des Flusses hin. Nicht signifikant verschiedene Flüsse sind Weiß gekennzeichnet. Der Signifikanz wurde durch einen Vergleich der 95 % Konfidenzintervalle bestimmt. Die Bezeichnung der Flüsse steht in Grau an der Seite. Die Erklärung zu den Abkürzungen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

und AA Ala.c angenommen wurde. Vermutlich wird die signifikante Erhöhung der AA Ala.c durch den erhöhten Fluss des zytosolischen Malic Enzyme (ME) und die Hemmung von T Pyr Fluss

ermöglicht.

Im unteren Teil der Flusskarte ist zu erkennen, dass der Pyruvat/H⁺-Symporter, dargestellt durch den Fluss *T Pyr*, in den mit UK-5099 behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle reduziert ist. Dies entspricht dem erwarteten Effekt des Inhibitors und bestätigt die durch die, im vorherigen Kapitel schon diskutierten Markierungsdaten von Citrat erhaltenen Vermutungen. Die verringerte Aufnahme von Pyruvat in das Mitochondrium verringert als Folge den Fluss der Pyruvatdehydrogenase zu Acetyl-CoA (*PDH*). Der Citrat-Synthase Fluss (*CS*) hingegen zeigt eine nicht signifikante Verringerung. Dieser wird wahrscheinlich über den nicht signifikant erhöhten Fluss der mitochondrialen Pyruvatcarboxylase (*PC.m*) gespeist, sodass vermehrt OAA für die Reaktion zur Verfügung steht. Im Vergleich zur Kontrolle ist der Fluss der Isocitratdehydrogenase (*ISDH*) invertiert, sodass Citrat nicht verbraucht, sondern produziert wird. Das aus beiden Flüssen entstandene Citrat wird hauptsächlich in das Zytosol transportiert und über die ATP-Citrat-Lyase (*ACL*) in Acetyl-CoA und OAA umgewandelt. Die Glutamataufnahme in das Mitochondrium, *T Glu*, ist im Unterschied zur Kontrolle nicht signifikant erhöht. Die restlichen Flüsse der Glutaminverwertung sind signifikant gestiegen. Dennoch können sie den durch den reversen *ISDH* Fluss entstandenen Substratmangel nicht ausgleichen. Das hat eine signifikante Reduzierung der nachfolgenden Citratzyklusflüsse, *OGDH*, *SDH* und *Fum*, zur Konsequenz.

3.2.2.4 Traceranalyse und ¹³C-MFA von L-Don und 3-Bromopyruvat

Die Ergebnisse der Stoffflussanalyse von L-Don und 3-Bromopyruvat wurden analog zu den Ergebnissen von UK-5099 ausgewertet. Die dazugehörigen Tabellen und Abbildungen befinden sich im Anhang (vgl. Abbildung A 47-49, Tabellen A 37-47).

Alle Ergebnisse von L-Don zeigen starke Unterschiede zur Kontrolle, jedoch entsprechen diese nicht den Erwartungen. In den Markierungsdaten ist kaum ein Einbau der Tracer zu beobachten. Die Flusswerte zeigen 55,3 % signifikant unterschiedliche Flüsse im Vergleich zur Kontrolle. Da die Viabilität der mit L-Don behandelten Zellen sehr gering war, wurde davon ausgegangen, dass der abgebildete Stoffwechsel einer nicht proliferierenden Zelle entspricht.

Die Flusswerte von 3-Bromopyruvat zeigten 33,3 % signifikant unterschiedliche Flüsse im Vergleich zur Kontrolle. Diese entsprechen in ihren Abweichungen den Erwartungen. Auch die Abweichungen der nicht signifikant unterschiedlichen Flusswerte zeigen die angenommenen Ergebnisse. Die Viabilität der mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen war der der Kontrolle sehr ähnlich.

Die Ergebnisse der Validierung führten zu der Annahme, dass die Anzahl der signifikant veränderten Flusswerte in diesem Fall mit der Viabilität der Zellen korrelieren. Jedoch muss eine

ausreichende Zellviabilität gewährleistet sein, um den Stoffwechsel nicht komplett zu inhibieren. Dies führte dazu, dass im darauffolgenden Screening die konzentrationsabhängige Wirkung der Medikamente auf eine 75 %-ige Inhibition im LDH-Assay festgelegt wurde. Es wurde angenommen, dass sich so entsprechende Unterschiede in den Flusswerten ergeben.

3.3 Ergebnisse des Screenings von Medikamenten per ^{13}C -MFA

Auf die Validierung der Methode folgte ein Screening von ausgewählten Medikamenten. Hierbei wurde sich auf Medikamente beschränkt, über die es zahlreiche Nachweise bezüglich Lebertoxizität gibt. Ausgewählt wurden daher Paracetamol, Diclofenac, Tacrin, Troglitazon, Isoniazid, Chlorpromazin, Cisplatin, Amiodaron, Tetracyclin und Verapamil. Diese Stoffe wurden mit Hilfe der etablierten ^{13}C -MFA auf Veränderungen im primären Stoffwechsel gescreent. Das Ziel war, im Vergleich zwischen den verschiedenen Substanzen potentielle Muster in den Veränderungen zu finden. Daher wurden vorerst nur mit $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glukose und $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose Traceranalysen durchgeführt, um den experimentellen und finanziellen Aufwand im Rahmen zu halten. Auffälligkeiten sollten im nächsten Schritt an ausgewählten Medikamenten mit zusätzlichen Tracern genauer charakterisiert werden.

3.3.1 Konzentrationsabhängige Wirkung der Stoffe des Screenings auf die Zellviabilität

Zuerst wurde die Konzentration der Medikamente bestimmt, bei der eine 75 %-ige Viabilität der behandelten Zellen im LDH-Assay zu sehen war. Dazu wurde der LDH-Assay mit verschiedenen Medikamentenkonzentrationen durchgeführt. In Abbildung 30 sind beispielhaft die Ergebnisse des Assays für Paracetamol, Diclofenac, Tacrin und Troglitazon ersichtlich. Die Daten zu den restlichen Medikamenten befinden sich im Anhang (vgl. Abbildung A 50, Tabellen A 48 und A 49). Anhand dieser Daten konnte die Konzentration der einzelnen Medikamente berechnet werden, bei der eine 25 %-ige substanzspezifische Inhibition des Wachstums vorlag. Die Werte sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Konzentrationen bei 75 %-iger Viabilität im LDH-Assay der einzelnen Medikamente

Medikament	Konzentration [μM]
Paracetamol	29,86
Diclofenac	46,48
Tacrin	8,95
Troglitazon	5,13
Amiodaron	3,23
Chlorpromazin	0,20
Isoniazid	0,50
Cisplatin	1,67
Verapamil	2,55
Tetracyclin	119,40

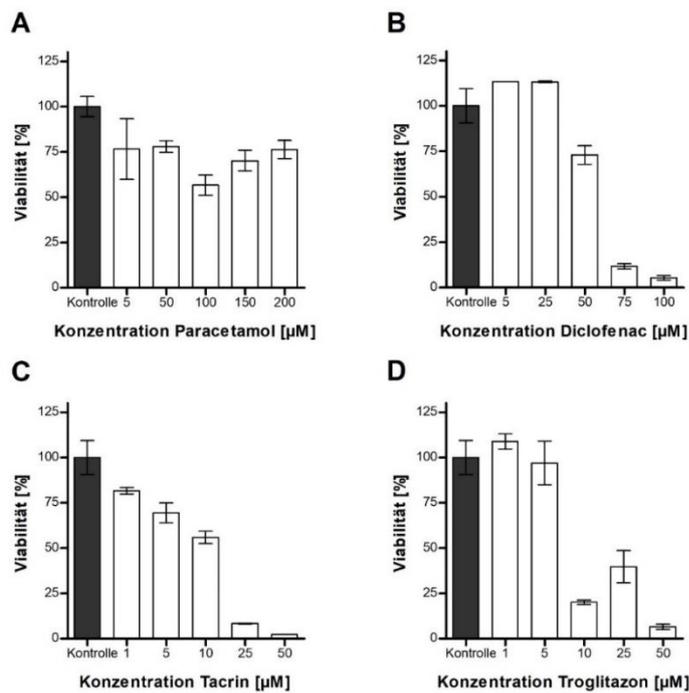


Abbildung 30: Ergebnisse des LDH-Assays von Paracetamol (A), Diclofenac (B), Tacrin (C) und Troglitazon (D) ($n=3 \pm \text{SD}$)

Die Werte sind in Prozent auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen) bezogen. Dabei entspricht die Positivkontrolle 100 % Viabilität.

3.3.2 Wachstums- und Austauschraten

Die Tabelle 15 stellt die Wachstumsraten, die Dopplungszeit und die errechnete Viabilität bezogen auf die Kontrolle des Screenings dar. Es ist ersichtlich, dass die WR der Medikamente kaum von den Raten der Kontrolle abweichen. Auch liegt die Viabilität bezogen auf die Kontrolle bei 100 % oder darüber. Dies lässt darauf schließen, dass die Medikamente kaum oder keine proliferationshemmenden Wirkungen in den verwendeten Konzentrationen aufzeigen.

Tabelle 15: Wachstumsrate und errechnete Viabilität der mit den Medikamenten behandelten Zellen und der dazugehörigen Kontrolle des Screenings

Medikament	Wachstumsrate [1/h]	Dopplungszeit [h]	Viabilität [%]
Kontrolle	0,0165	42,05	100
Diclofenac	0,0160	43,35	97,01
Isoniazid	0,0162	42,79	98,28
Chlorpromazin	0,0171	40,62	103,53
Cisplatin	0,0156	44,35	94,83
Paracetamol	0,0160	43,30	97,12
Amiodaron	0,0199	34,82	120,60
Tacrin	0,0190	36,50	115,15
Troglitazon	0,0192	36,07	116,36
Tetracyclin	0,0175	39,67	106,06
Verapamil	0,0186	37,34	112,73

Die experimentell bestimmten Austauschraten sind in Tabelle 16 zu sehen. Bis auf die Laktatabgabe bei sechs Medikamenten konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle beobachtet werden. Die Werte der Kontrolle ähneln denen der Etablierung und Validierung, sowohl in den Übereinstimmungen als auch in den Abweichungen im Vergleich zur Literatur (vgl. Tabelle 11). Dies zeigt, dass die Datenkontinuität innerhalb der Arbeit gewährleistet ist.

Tabelle 16: Übersicht über die Austauschraten der Medikamente der Screenings; Teil 1

Dargestellt sind Mittelwerte ($n=6$) aus drei biologischen Replikaten zu je zwei Zeitpunkten \pm SD. Essentielle Aminosäuren sind kursiv geschrieben. Ein signifikanter Unterschied wurde mit einem * markiert. Als Signifikanztest diente eine zweiseitige ANOVA ($p \leq 0,05$). Die Erklärung zu den abgekürzten Metabolitennamen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

Raten [nmol/ 10^6 Zellen*h]	Stoff	Kontrolle	Diclo- fenac	Isoniazid	Chlor- promazin	Cisplatin	Para- cetamol
Aufnahme	Glc	208,6 \pm 23,1	216,4 \pm 40,4	226,1 \pm 36,6	241,1 \pm 34,3	224,9 \pm 50,4	216,7 \pm 42,2
	Gln	65,4 \pm 26,8	65,9 \pm 26,1	66,5 \pm 27,2	77,9 \pm 38,5	67,7 \pm 26,1	65,7 \pm 26,5
	Ser	-1,7 \pm 1,0	-0,5 \pm 1,1	-2,1 \pm 0,7	-2,0 \pm 0,9	-0,7 \pm 0,8	-1,7 \pm 1,5
	Val	2,1 \pm 2,4	3,3 \pm 1,8	0,9 \pm 1,2	2,3 \pm 1,2	3,8 \pm 1,9	1,0 \pm 3,3
	Leu	8,9 \pm 2,2	9,9 \pm 1,8	7,7 \pm 1,7	9,9 \pm 1,8	10,9 \pm 1,9	8,1 \pm 2,9
	Ile	6,7 \pm 2,1	7,7 \pm 1,6	5,5 \pm 1,3	7,4 \pm 1,6	8,7 \pm 1,7	5,7 \pm 2,9
	Met	1,0 \pm 0,5	1,3 \pm 0,5	0,5 \pm 0,4	1,3 \pm 0,4	1,5 \pm 0,5	0,8 \pm 0,8
	Thr	-2,6 \pm 2,1	-0,9 \pm 1,6	-3,8 \pm 3,9	-3,1 \pm 1,8	-1,1 \pm 2,1	-2,1 \pm 2,2
	Phe	2,2 \pm 0,5	2,5 \pm 0,5	1,5 \pm 0,5	2,8 \pm 0,4	2,7 \pm 0,6	2,1 \pm 0,9
	Lys	-3,9 \pm 4,6	-0,8 \pm 3,4	-3,1 \pm 1,6	-4,6 \pm 3,9	-0,9 \pm 3,2	-3,6 \pm 5,0
	Tyr	-1,2 \pm 1,3	-0,4 \pm 1,2	-1,7 \pm 1,1	-1,4 \pm 1,1	-0,2 \pm 1,6	-1,6 \pm 2,1
Cys	1,7 \pm 0,8	2,0 \pm 0,8	1,7 \pm 0,6	2,1 \pm 0,6	2,2 \pm 0,7	1,8 \pm 0,9	
Abgabe	Lac	385,8 \pm 31,5	394,6 \pm 32,7	414,6 \pm 25,8	563,9 \pm 61,8*	416,2 \pm 50,2	409,8 \pm 37,1
	Ala	6,1 \pm 2,9	5,8 \pm 3,2	5,8 \pm 2,4	8,0 \pm 3,7	6,5 \pm 3,9	7,2 \pm 5,2
	Gly	1,4 \pm 0,6	1,7 \pm 0,8	1,5 \pm 0,5	2,1 \pm 0,5	1,2 \pm 0,6	1,5 \pm 0,7
	Pro	1,9 \pm 1,34	1,3 \pm 0,8	2,4 \pm 0,8	2,1 \pm 0,8	1,6 \pm 0,9	2,4 \pm 1,2
	Asp	-0,03 \pm 0,2	-0,09 \pm 0,1	-0,10 \pm 0,2	-0,09 \pm 0,2	-0,10 \pm 0,2	-0,08 \pm 0,2
	Glu	5,5 \pm 1,8	4,1 \pm 1,2	5,2 \pm 1,1*	6,1 \pm 1,2	3,8 \pm 1,7	5,8 \pm 1,5

Tabelle 16: Übersicht über die Austauschraten der Medikamente der Screenings; Teil 2

Dargestellt sind Mittelwerte ($n=6$) aus drei biologischen Replikaten zu je zwei Zeitpunkten \pm SD. Essentielle Aminosäuren sind kursiv geschrieben. Ein signifikanter Unterschied wurde mit einem * markiert. Als Signifikanztest diente eine zweiseitige ANOVA ($p \leq 0,05$). Die Erklärung zu den abgekürzten Metabolitenamen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

Raten [nmol/ 10 ⁶ Zellen*h]	Stoff	Kontrolle	Amio- daron	Tacrin	Tro- glitazon	Tetra- cyclin	Vera- pamil
Aufnahme	Glc	208,6 \pm 23,1	253,4 \pm 97,5	206,2 \pm 13,7	195,4 \pm 21,6	279,5 \pm 37,3*	247,5 \pm 55,5
	Gln	65,4 \pm 26,8	68,2 \pm 28,4	67,8 \pm 24,6	58,0 \pm 20,6	66,5 \pm 17,4	67,8 \pm 26,8
	Ser	-1,7 \pm 1,0	-0,9 \pm 2,9	-0,3 \pm 3,4	-0,4 \pm 2,8	-0,7 \pm 8,1	-0,3 \pm 2,6
	Val	2,1 \pm 2,4	1,9 \pm 3,5	3,0 \pm 3,4	1,9 \pm 1,6	2,6 \pm 5,5	3,0 \pm 1,5
	Leu	8,9 \pm 2,2	10,0 \pm 8,5	10,9 \pm 4,6	8,6 \pm 2,9	10,9 \pm 2,3	10,9 \pm 1,3
	Ile	6,8 \pm 2,1	8,9 \pm 6,3	8,6 \pm 4,1	6,7 \pm 3,3	8,5 \pm 7,7	8,6 \pm 3,0
	Met	1,0 \pm 0,5	1,1 \pm 5,0	1,5 \pm 3,9	1,1 \pm 3,2	1,4 \pm 4,5	1,5 \pm 3,8
	Thr	-2,6 \pm 2,1	-1,3 \pm 1,8	0,1 \pm 1,8	-0,4 \pm 0,6	-0,6 \pm 0,9	0,1 \pm 1,9
	Phe	2,3 \pm 0,5	1,9 \pm 3,5	2,3 \pm 2,3	1,9 \pm 1,7	2,3 \pm 3,9	2,3 \pm 2,2
	Lys	-3,9 \pm 4,7	-3,0 \pm 1,4	-0,6 \pm 1,1	-1,2 \pm 6,4	-2,0 \pm 0,5	-0,56 \pm 0,3
	Tyr	-1,2 \pm 1,3	-1,6 \pm 1,8	-0,6 \pm 1,5	-0,9 \pm 0,9	-1,5 \pm 1,0	-0,6 \pm 0,6
Cys	1,7 \pm 0,8	2,9 \pm 0,9	2,9 \pm 4,2	2,2 \pm 0,3	2,8 \pm 0,6	2,9 \pm 0,7	
Abgabe	Lac	385,8 \pm 31,5	628,5 \pm 22,9*	527,8 \pm 13,9*	527,8 \pm 15,8*	629,5 \pm 44,7*	577,2 \pm 27,3*
	Ala	6,1 \pm 2,9	8,5 \pm 1,1	8,7 \pm 5,7	8,7 \pm 5,7	6,5 \pm 2,0	9,0 \pm 1,2
	Gly	1,4 \pm 0,6	2,1 \pm 4,1	1,7 \pm 6,8	1,7 \pm 5,9	2,7 \pm 4,7	1,5 \pm 2,3
	Pro	1,9 \pm 1,4	2,7 \pm 9,2	2,1 \pm 4,2	3,1 \pm 4,6	3,1 \pm 2,8	2,6 \pm 2,9
	Asp	0,2 \pm 3,4	0,1 \pm 4,7	0,2 \pm 3,6	0,1 \pm 3,7	0,2 \pm 4,5	0,2 \pm 0,9
	Glu	7,2 \pm 1,8	10,2 \pm 2,6	7,6 \pm 1,9	7,6 \pm 1,9	10,3 \pm 8,1	7,7 \pm 2,2

3.3.3 Stoffflussanalyse des Screenings

Das Ziel des Screenings der Medikamente war, Muster in den Auffälligkeiten im Stoffwechsel der behandelten Zellen zu finden, um ausgewählte Substanzen daraufhin genauer zu betrachten. Daher wurde im Screening nur mit zwei Glukosetracern, U¹³C-Glukose und 1-¹³C-Glukose, gearbeitet. Dies minimierte den praktischen und finanziellen Aufwand und ergab doch genug Informationen um eine Auswahl der Medikamente zu ermöglichen.

3.3.3.1 Traceranalysen

Zunächst wurden die gemessenen Markierungsdaten statistisch mit der Kontrolle verglichen und erste Rückschlüsse aus den signifikanten Unterschieden gezogen. Dies an dieser Stelle für alle zehn Medikamente darzustellen, würde den Rahmen der Arbeit überschreiten. Diclofenac zeigte im Screening zusammen mit Amiodaron die meisten signifikanten Unterschiede in den Markierungsverteilungen. Daher soll im Folgenden die Interpretation der Markierungsdaten beispielhaft an Diclofenac beschrieben werden. Alle hier nicht dargestellten Diagramme befinden sich im Anhang (vgl. Abbildungen A 51-61).

Diclofenac zeigt in der MIV von Laktat signifikant erhöhte Markierung (vgl. Abbildung 31). Dies bestätigt sich in der MIV von Pyruvat (vgl. Abbildung A 60). Die erhöhte Markierung weist auf gesteigerte Glykolyseflüsse in den mit Diclofenac behandelten Zellen hin.

Die MIV von Citrat (vgl. Abbildung 32) zeigt ebenfalls eine gesteigerte Markierung, was in Malat und α -Ketoglutarat bestätigt werden kann (vgl. Abbildungen A 57 und A 58). Dies kann auf eine gesteigerte Kohlenstoffaufnahme in den Citratzyklus aus der Glykolyse bzw. auf eine gesteigerte Citratzyklusaktivität hindeuten. Das gesteigerte Markierungsaufkommen in Glutamin (vgl. Abbildung A 54) unterstützt diese Schlussfolgerung.

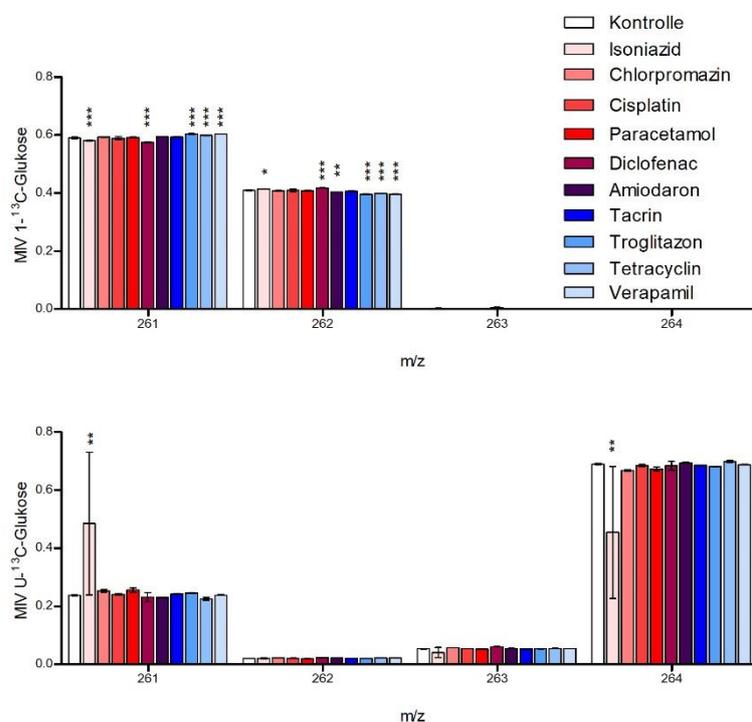


Abbildung 31: MIV des Massenfragments 261 von Laktat (C1-C2-C3)

Aufgetragen ist die MIV der einzelnen Massen ($n=4$) \pm SD. **A** zeigt die MIV der Medikamente des Screenings mit dem Tracer $U-^{13}C$ -Glukose, **B** mit dem Tracer $1-^{13}C$ -Glukose. Die Signifikanz wurde mit einer zweiseitigen ANOVA bestimmt (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,001$; *** = $p \leq 0,0001$).

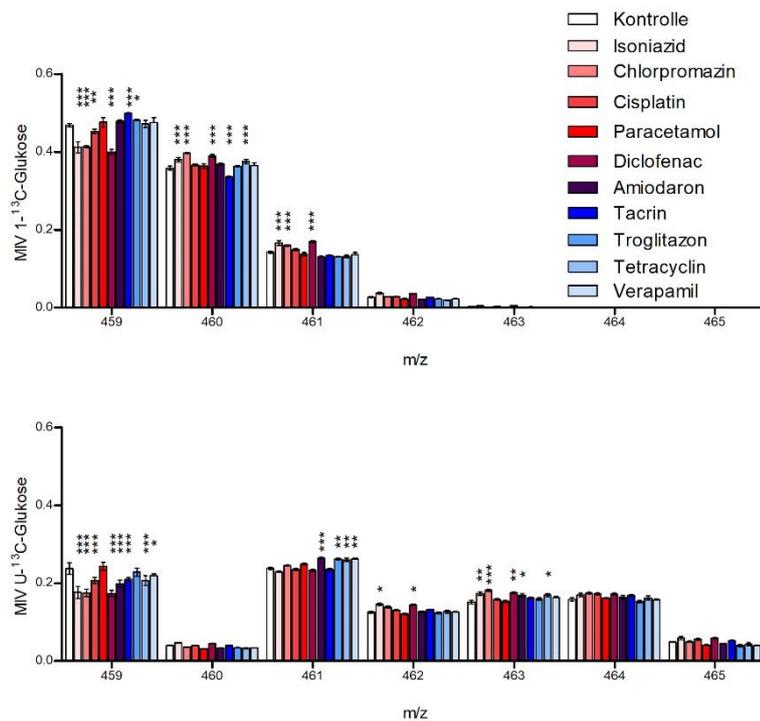


Abbildung 32: MIV des Massenfragments 459 von Citrat (C1-C2-C3-C4-C5-C6)

Aufgetragen ist die MIV der einzelnen Massen ($n=4$) \pm SD. **A** zeigt die MIV der Medikamente des Screenings mit dem Tracer $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose, **B** mit dem Tracer $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose. Die Signifikanz wurde mit einer zweiseitigen ANOVA bestimmt (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,001$; *** = $p \leq 0,0001$).

Die Markierung von Serin, Glycin und Aspartat (vgl. Abbildungen A 61, A 55 und A 52) zeigen keine signifikanten Veränderungen in der MIV im Vergleich zu den Zellen der Kontrolle auf.

3.3.3.2 ^{13}C -MFA

Ziel des Screenings war die Erkennung von Mustern in den Stoffwechseländerungen, die durch die Medikamente in den Zellen hervorgerufen wurden. Um diese besser darstellen zu können, wurden die Flusswerte in einer *Heatmap* zusammengefasst. Daher finden sich die einzelnen Ergebnisse in Form der errechneten Flusswerte, der normierten Flusswerte und Flusskarten für die einzelnen Medikamente im Anhang (vgl. Tabellen A 50-87, Abbildungen A 62-71). Außerdem sind die für die jeweiligen Modelle verwendeten Daten und Parameter im Anhang in Tabelle A 25 aufgelistet. Für alle getesteten Medikamente konnte die statistische Anpassungsgüte der verwendeten Stoffflussmodelle bestätigt werden. Die entsprechenden Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle A 24 aufgeführt.

Die wichtigsten Ergebnisse der vergleichenden Stoffflussanalyse wurden in Abbildung 33 in Form einer *Heatmap* zusammengefasst. Eine rötliche Färbung entspricht hierbei einer Steigerung der normierten Flusswerte und eine Blaufärbung einer Verringerung im Vergleich zur Kontrolle. Wie schon in den Flusskarten wurde für die Farbgebung das *log ratio* genutzt. Zur besseren

Übersichtlichkeit wurden einzelne Flüsse als Beispiel für ganze Stoffwechselwege dargestellt. Anhand der Flusswerte wurden die untersuchten Medikamente in Gruppen eingeteilt.

Diclofenac, Cisplatin, Tetracyclin und Chlorpromazin zeigen ein ähnliches Muster in ihren Stoffwechseleränderungen (vgl. Abbildung 33 und Abbildungen A 63-65, A 69). Am deutlichsten ist die signifikante Verringerung des ATP-Citrat-Lyase Flusses (*ACL*). Diese zeigt, dass weniger Acetyl-CoA und OAA aus dem zytosolischen Citrat hergestellt werden. In allen vier Medikamenten ist das mit einer verminderten Transportreaktion von Citrat aus dem Mitochondrium in das Zytosol (*T Cit*) verbunden. Zudem haben die Medikamente eine Steigerung des mitochondrialen *Malic Enzyme (ME.m)* gemein, was mit einer Steigerung der Pyruvatcarboxylase (*PC*) und einem invertierten Fluss der mitochondrialen Malatdehydrogenase (*MDH.m*) einhergeht. Diese drei Flüsse formen einen Kreislauf bzw. *futile cycle*, welcher ein durch die Modellierung hervorgerufenes Artefakt sein könnte. Das kann auftreten, wenn die experimentellen Daten nicht ausreichen, um den Stoffwechselweg eindeutig aufzulösen. Vor diesem Hintergrund lässt sich so eine spezifische Flussänderung nicht interpretieren. Um dies im Hauptexperiment zu verhindern, ist es mit mehr Tracern geplant. Die Medikamentengruppe zeigt außerdem eine Steigerung des unteren Citratzyklus (*ODGH*) und eine Verringerung des oberen Citratzyklus (*CS*). Die Verringerung kann aus der verringerten Aufnahme von Pyruvat in das Mitochondrium (*T Pyr*) resultieren. Des Weiteren kann eine gesteigerte Fermentation (*LDH*) beobachtet werden, welche teilweise von einer gesteigerten Glykolyse (*PGI*) herrührt. Auch kann in allen vier Medikamenten eine verringerte Serinsynthese aus dem Glykolyseintermediat PGA (*AA Ser*) beobachtet werden.

Aus dieser Gruppe wurde Diclofenac für die weiterführenden Untersuchungen ausgewählt. Zum einen zeigt Diclofenac die meisten signifikanten Veränderungen in den Markierungsdaten und zum anderen sind zu Diclofenac im Vergleich zu den anderen drei Medikamenten die meisten Forschungsergebnisse publiziert.

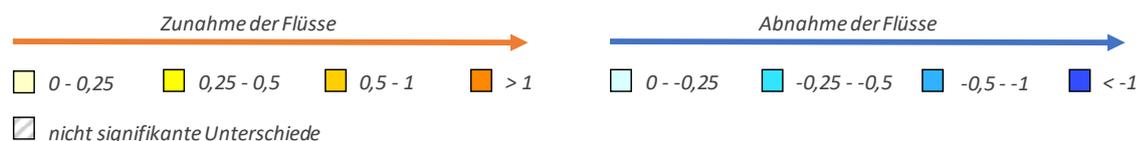
Paracetamol und Isoniazid bilden die zweite Gruppe (vgl. Abbildung 33 und Abbildungen A 66-67). Beide Medikamente zeigen eine signifikante Steigerung des zytosolischen *Malic Enzyme* Flusses (*ME.c*), welcher aus einer erhöhten Aufnahme von Vorläufern von Malat aus dem Medium (*AA1*) resultiert. Dies führt mit der gesteigerten Glykolyse (*PGI*) zusätzlich zu einer erhöhten Fermentation (*LDH*). Bei beiden Medikamenten ist trotz der gesteigerten Glykolyse die Serinsynthese aus PGA (*AA Ser*) gesunken. Dies bedingt zusammen mit einer verringerten Aufnahme von Serin aus dem Medium einen geringeren *AA Ser Gly* Fluss, welcher wiederum zur Herstellung von Glycin und C1 benötigt wird. Außerdem zeigen beide Medikamente einen nicht signifikant verringerten oxidativen Pentosephosphatweg. Des Weiteren folgt aus der

	Gruppe 1				Gruppe 2		Gruppe 3		Gruppe 4	
Flüsse	Diclofenac	Cisplatin	Tetracyclin	Chlorpromazin	Isoniazid	Paracetamol	Tacrin	Verapamil	Troglitazon	Amiodaron
Glykolyse (PGI)	0-0,25	0,25-0,5	-0,25--0,5	0-0,25	0,25-0,5	0,25-0,5	0,25-0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5	0-0,25
Fermentation (LDH)	0,25-0,5	0-0,25	0-0,25	0-0,25	0-0,25	0-0,25	0-0,25	0-0,25	0,25-0,5	0,25-0,5
Oxidativer PPW (oxPPP)	-0,25--0,5	-0,25--0,5	0,25-0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5	0,25-0,5	0,25-0,5	0-0,25
Serinsynthese (AA Ser)	-0,25--0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5	0-0,25	-0,25--0,5	-0,25--0,5	<-1	-0,25--0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5
Pyruvatcarrier (T Pyr)	0,25-0,5	0-0,25	0-0,25	-0,25--0,5	0-0,25	0-0,25	-0,25--0,5	-0,25--0,5	0-0,25	0-0,25
Oberer Citratzyklus (CS)	0,25-0,5	0-0,25	-0,25--0,5	0-0,25	0-0,25	0,25-0,5	0-0,25	0-0,25	0-0,25	0-0,25
Unterer Citratzyklus (ODGH)	0,25-0,5	0,25-0,5	0-0,25	0-0,25	0,25-0,5	0,25-0,5	0-0,25	-0,25--0,5	0,25-0,5	0-0,25
Glutaminverwertung (T Glu)	0,25-0,5	0,25-0,5	-0,25--0,5	0,25-0,5	0,25-0,5	0,25-0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5
Zytosolische anaplerotische Reakt. (ME.c)	0,25-0,5	0-0,25	-0,25--0,5	0-0,25	0,25-0,5	0,25-0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5
Mitochondriale anaplerotische Reakt. (ME.m)	>1	>1	0,25-0,5	0,25-0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5	0,25-0,5	0,25-0,5	0,25-0,5	0,25-0,5
Citratverwertung (ACL)	<-1	<-1	<-1	<-1	-0,25--0,5	-0,25--0,5	-0,25--0,5	<-1	-0,25--0,5	<-1

Abbildung 33: Heatmap der Unterschiede ausgewählter normierter Flusswerte der mit den Medikamenten des Screenings behandelten Zellen

Die Heatmap orientiert sich in der Farbgebung an dem in den Flusskarten verwendeten log ratio. Dabei entspricht eine Blaufärbung verringerten Flusswerten und eine rötliche Färbung gesteigerten Flusswerten im Vergleich zur Kontrolle.

Legende zum log ratio:



gesteigerten Glykolyse ein gesteigerter *T Pyr*, welcher wiederum zu gesteigerten Flüssen des Citratzyklus führt. Trotzdem sind die *T Cit* und *ACL* Flüsse verringert. Das *ME.m* ist im Gegensatz zur vorangegangenen Gruppe stark vermindert.

Zu DILI, welche durch Paracetamol oder Isoniazid ausgelöst werden, existiert jeweils ausführliche Literatur. Paracetamol ist jedoch, abgesehen von Cisplatin, der einzige Vertreter der intrinsischen DILI. Daher wurde als Vertreter dieser Gruppe Paracetamol für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Die dritte Gruppe ähnlicher Muster bilden Tacrin und Verapamil (vgl. Abbildung 33 und Abbildungen A 68, A 71). Beide Medikamente zeigen eine teilweise erhöhte Glykolyse, welche zu einer erhöhten Fermentation (*LDH*) führt. Bei diesen Medikamenten ist die Serinsynthese (*AA Ser*) ebenfalls signifikant gesunken, was auch hier im Zusammenhang mit einer verminderten Serinaufnahme aus dem Medium zu verringerten nachfolgenden Flüssen der Serinverwertung führt. Trotz der erhöhten Glykolyse ist der *T Pyr* Fluss gesunken. Dies bedingt im Zusammenhang mit einer verringerten Glutamataufnahme in das Mitochondrium (*T Glu*) und trotz eines erhöhten *ME.m* Flusses, verringerte Flüsse im Citratzyklus. Diese resultieren wiederum in reduzierten *T Cit* und *ACL* Flüssen.

Zu den durch Tacrin verursachten DILI existiert eine kontroverse Datenlage, was Tacrin für weitere Untersuchungen zur interessantesten Substanz dieser Gruppe machte.

Die letzte Gruppe bilden Troglitazon und Amiodaron (vgl. Abbildung 33 und Abbildungen A 62, A 70). Beide Substanzen zeigen eine verringerte Glykolyse und einen gesteigerten oxidativen Pentosephosphatweg. Im Zusammenhang mit der verringerten Glykolyse ist zudem die Serinsynthese aus Glykolyseintermediaten (*AA Ser*) reduziert. Durch die zusätzliche Reduktion der Serinaufnahme aus dem Medium sind alle Flüsse der Serinverwertung verringert. Auf die reduzierte Glykolyse folgt ein reduzierter *T Pyr* Fluss. Das fehlende mitochondriale Pyruvat wird durch einen gesteigerten *ME.m* Fluss ausgeglichen, wodurch die nachfolgenden Citratzyklusflüsse gestiegen sind. Die Glutamin- und Citratverwertung ist in beiden Medikamenten trotz der erhöhten Citratzyklusaktivität vermindert.

Troglitazon wurde aufgrund starker Hepatotoxizität vom Markt entfernt. Des Weiteren hat es aufgrund der Arzneimittelwirkung direkte Auswirkungen auf den primären Stoffwechsel (Abboud *et al.*, 2007; Kuna *et al.*, 2018). Daher wurde Troglitazon und nicht Amiodaron für das Hauptexperiment ausgewählt.

Mit den vier ausgewählten Medikamenten konnte nun die tiefergehende Analyse mit Hilfe einer erhöhten Tracerzahl durchgeführt werden. Zudem wurde im Screening ersichtlich, dass wenig signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Daten der Medikamente und der Kontrolle existieren. Daher wurde die untersuchte Konzentration der Medikamente im Hauptexperiment erhöht.

3.4 Ergebnisse Hauptexperiment

Mit den im Screening ausgesuchten Medikamente, Diclofenac, Paracetamol, Tacrin und Troglitazon, wurde erneut je eine ^{13}C -MFA durchgeführt. Hierbei wurden aufgrund der im vorangegangenen Kapitel erläuterten Gründe sowohl höhere Wirkstoffkonzentrationen getestet, wie auch zusätzlich die Tracer U^{13}C -Glutamin und $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose genutzt.

3.4.1 Konzentrationsabhängige Wirkung der Medikamente auf die Zellviabilität

Die erhöhte Wirkstoffkonzentration für den nachfolgenden Versuch wurde ebenfalls per abgewandelten LDH-Assay bestimmt. Die erhaltenen konzentrationsabhängigen Reduktionen der Zellviabilitäten sind in Abbildung 34 dargestellt. Aus diesen Daten wurden die LD50-Konzentrationen der einzelnen Medikamente berechnet. Diese sind in Tabelle 17 aufgelistet.

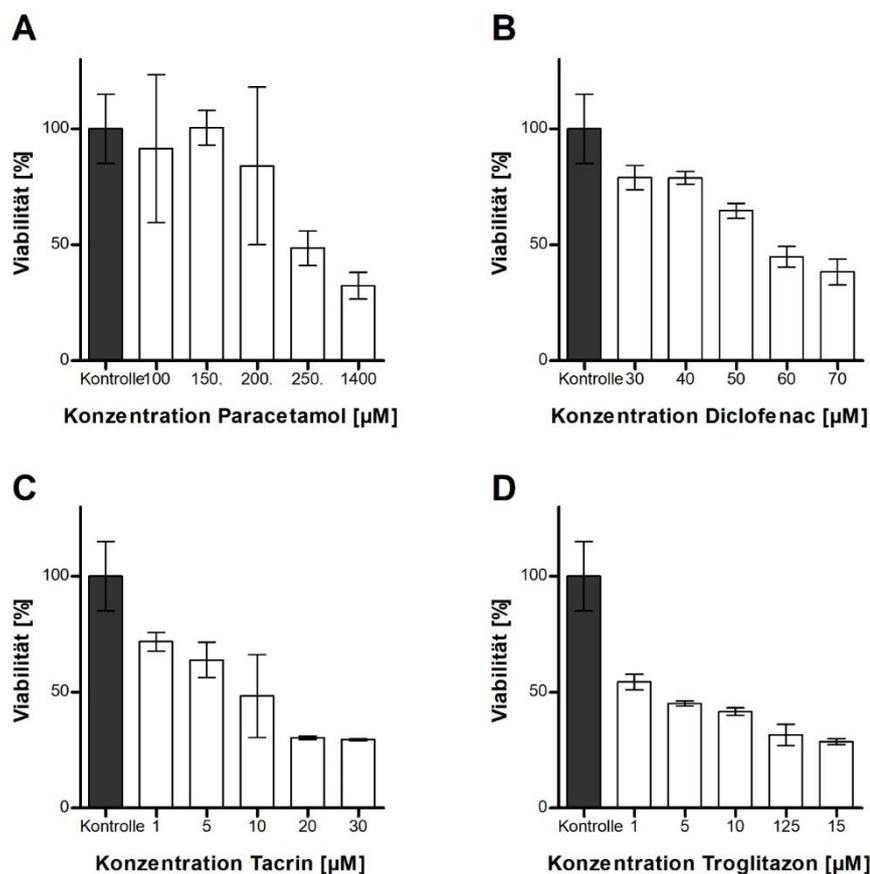


Abbildung 34: Ergebnisse des zweiten LDH-Assays von den mit Paracetamol (A), Diclofenac (B), Tacrin (C) und Troglitazon (D) behandelten Zellen ($n=3 \pm \text{SD}$)

Die Werte sind in Prozent auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen) bezogen. Dabei entspricht die Positivkontrolle 100 % Viabilität.

Tabelle 17: Konzentrationen bei 50 %-iger Viabilität im LDH-Assay von den einzelnen Medikamenten

Medikament	Konzentration [μM]
Paracetamol	231,40
Diclofenac	5,28
Tacrin	9,95
Troglitazon	10,81

3.4.2 Wachstums- und Austauschraten

Die Wachstumsraten und Viabilitäten (vgl. Tabelle 18) zeigen im zweiten Versuch eine höhere Hemmung der Proliferation als im Screening. Die Viabilität liegt zwischen 62,0 % bei Troglitazon bis 87,6 % bei Diclofenac. Das widerspricht wie im Screening den Ergebnissen des LDH-Assays.

Tabelle 18: Wachstumsraten und errechnete Viabilität von den mit Paracetamol, Diclofenac, Tacrin und Troglitazon behandelten Zellen und der Kontrolle

	Kontrolle	Paracetamol	Diclofenac	Tacrin	Troglitazon
Wachstumsrate [1/h]	0,0142	0,0106	0,0125	0,0095	0,0088
Dopplungszeit [h]	48,8	65,7	55,8	73,3	79,1
Viabilität [%]	100,0	74,3	87,6	66,8	62,0

Die mit GC/MS und Photometer bestimmten Austauschraten sind in Tabelle 19 aufgelistet. Es sind signifikante Unterschiede zwischen den Medikamenten und der Kontrolle ersichtlich. Das ist eine Folge der erhöhten Wirkstoffkonzentration im Vergleich zum Screening. Troglitazon zeigt sowohl einen signifikanten Anstieg in der Glukose- und Glutaminaufnahme als auch in der Laktatabgabe. Diese Ergebnisse entsprechen der beschriebenen Arzneimittelwirkung von Troglitazon. Diclofenac und Tacrin zeigen ebenfalls eine signifikante Steigerung der Glutaminaufnahme in die Zelle. Alle weiteren Veränderungen in den Austauschraten sind nicht signifikant.

Tabelle 19: Übersicht über die Austauschraten der Medikamente des Hauptexperiments

Dargestellt sind Mittelwerte ($n=6$) aus drei biologischen Replikaten zu je zwei Zeitpunkten \pm SD. Essentielle Aminosäuren sind kursiv geschrieben. Ein signifikanter Unterschied wurde mit einem * markiert. Als Signifikanztest diente eine zweiseitige ANOVA ($p < 0,05$).

Raten [nmol/ 10 ⁶ Zellen *h]	Stoff	Kontrolle	Paracetamol	Diclofenac	Tacrin	Troglitazon
Aufnahme	Glc	447,4 \pm 68,4	428,1 \pm 46,2	373,8 \pm 96,3	479,4 \pm 105,1	726,8 \pm 100,4*
	Gln	71,1 \pm 13,1	65,9 \pm 19,6	124,7 \pm 20,9*	94,0 \pm 3,6*	182,7 \pm 92,7*
	Ser	-0,9 \pm 0,7	-0,8 \pm 1,2	0,4 \pm 1,6	-2,5 \pm 1,6	-2,5 \pm 1,4
	Val	-0,1 \pm 0,5	-0,9 \pm 0,2	5,5 \pm 4,1	1,4 \pm 0,2	12,3 \pm 9,9*
	Leu	10,2 \pm 2,9	11,8 \pm 0,2	11,5 \pm 4,1	3,5 \pm 0,2*	9,5 \pm 9,9
	Ile	9,9 \pm 3,7	10,2 \pm 4,1	13,5 \pm 5,9	2,4 \pm 10,7	17,6 \pm 21,9
	Met	-0,0 \pm 0,2	-0,3 \pm 0,7	2,4 \pm 0,3*	0,7 \pm 0,9	4,2 \pm 3,3*
	Thr	-5,2 \pm 1,6	-5,5 \pm 1,2	-1,7 \pm 1,3*	-8,9 \pm 8,3	-1,2 \pm 3,9
	Phe	-2,1 \pm 0,8	-2,6 \pm 0,5	-0,1 \pm 2,2	-6,6 \pm 6,9	-6,14 \pm 6,1
	Lys	-3,7 \pm 0,5	-6,3 \pm 2,7	3,2 \pm 1,7	-6,9 \pm 8,6	-1,4 \pm 2,2
	Tyr	-11,0 \pm 3,2	-10,1 \pm 2,0	-115 \pm 3,8	-12,9 \pm 5,7	-23,8 \pm 10,4
Cys	1,2 \pm 1,8	-0,8 \pm 0,8	3,1 \pm 0,8	0,3 \pm 0,6	4,4 \pm 3,5	
Abgabe	Lac	459,9 \pm 19,4	462,5 \pm 29,3	403,8 \pm 20,6	606,7 \pm 230,2	723,4 \pm 116,3*
	Ala	15,9 \pm 1,2	17,3 \pm 2,5	10,7 \pm 0,5*	20,6 \pm 13,7	18,76 \pm 6,0
	Gly	16,1 \pm 7,2	23,2 \pm 2,3	12,0 \pm 1,7	30,2 \pm 16,1	14,0 \pm 0,3
	Pro	7,7 \pm 0,3	8,1 \pm 1,4	5,6 \pm 2,6	9,8 \pm 3,8	5,9 \pm 1,4
	Asp	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,0	0,5 \pm 0,3	0,5 \pm 0,3	0,6 \pm 0,2
	Glu	14,6 \pm 0,7	14,3 \pm 3,2	16,3 \pm 8,9	23,6 \pm 15,6	21,9 \pm 7,9

3.4.3 ¹³C-MFA Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der ¹³C-MFA des Hauptexperiments gezeigt. Die zusätzlichen Markierungsdaten, die absoluten und normierten Flusswerte, die Zusammenfassung der verwendeten Modellparameter bzw. experimentellen Daten und die statistische Anpassungsgüte, sind in den Tabellen A 24, A 25, A 88-106 und den Abbildungen A 72-80 aufgeführt.

3.4.3.1 Traceranalyse Paracetamol

Abbildung 35 zeigt die MIV des Ribosefragments 160. Die mit Paracetamol behandelten Zellen wiesen mehr Markierung in den Ribosefragmenten aller Traceranalysen auf. Das Verhältnis zwischen M+1 und M+2 bei der 1,2-¹³C₂-Glukose (Teil C) lässt Rückschlüsse auf die Aktivität der oxidativen bzw. nichtoxidativen PPP in Bezug auf die Ribosynthese zu. In diesem Fall ist mehr

Markierung in M+1 zu sehen als in der Kontrolle. Dies führt zu der Vermutung, dass der nichtoxidative PPP weniger zur Produktion von Ribose-5-phosphat beiträgt, als das in der Kontrolle der Fall war. Dies bestätigt sich im Teil B der Abbildung, bei der $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose. M+0 ist erhöht, während M+1 niedriger ist als in der Kontrolle. Dies unterstützt die Vermutung, dass im Vergleich zu den Kontrollzellen der oxidative PPP im Verhältnis zum nichtoxidativen PPP aktiver an der Produktion von Ribose beteiligt ist.

In Abbildung 36 sind die MIV von Alanin dargestellt. Die Traceranalysen mit den Glukosetracern zeigen bei Paracetamol eine erhöhte Markierung, was auf eine erhöhte Glykolyse hindeutet. Keine Markierung in der Traceranalyse mit $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glutamin in Alanin (vgl. Teil D) zeigt, dass kein Rückfluss von Markierung aus dem Mitochondrium zum Pyruvat oder Alanin stattfindet.

Die MIV von Serin ist in Abbildung 37 zu sehen. Paracetamol zeigt bei allen Traceranalysen mit Glukose eine leichte Erhöhung der Markierung. Dies führt zu der Vermutung, dass die Serinsynthese über PGA (AA Ser) im Vergleich zur Kontrolle erhöht ist. Zudem deutet es auf eine geringere oder gleichbleibende Serinaufnahme in die Zelle hin. Die Traceranalyse mit $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glutamin zeigt keine signifikanten Unterschiede.

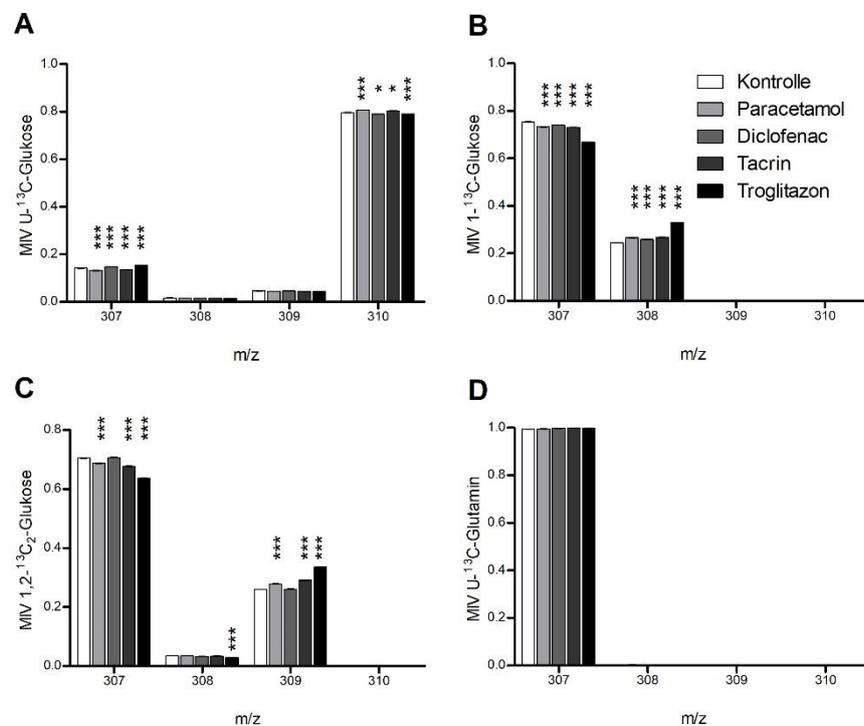


Abbildung 35: Massen isotopomere Verteilung vom Massenfragment 307 von Ribose (C1-C2)

Aufgetragen ist die MIV der einzelnen Massen ($n=4$). **A** zeigt die MIV bei der Nutzung von $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glukose, **B** bei der Nutzung von $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose, **C** bei $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose und **D** bei $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glutamin. Die Signifikanz wurde mit einer zweiseitigen ANOVA bestimmt (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,001$; *** = $p \leq 0,0001$).

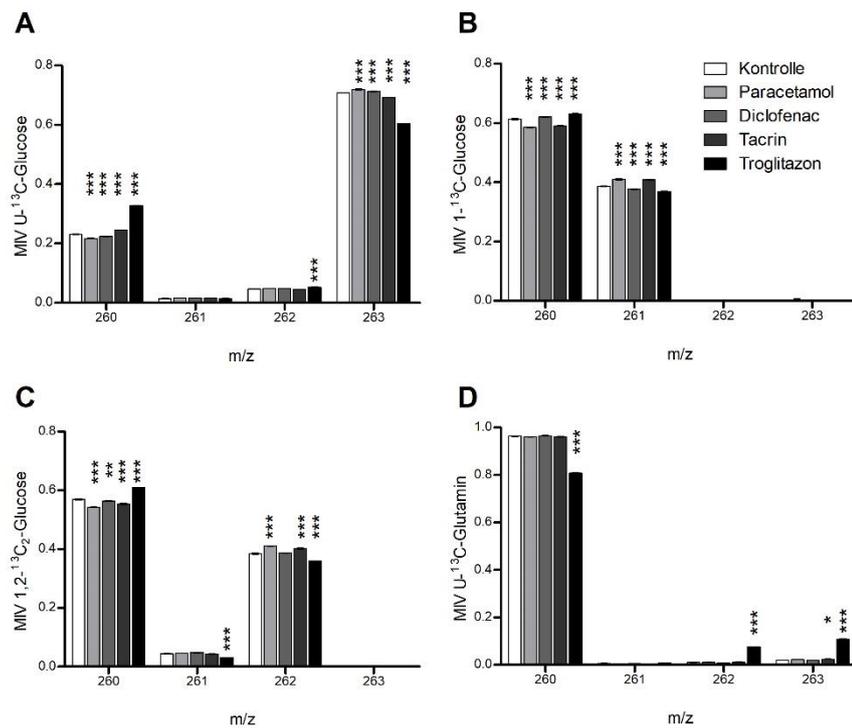


Abbildung 36: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 260 von Alanin (C1-C2-C3)

Aufgetragen ist die MIV der einzelnen Massen ($n=4$). **A** zeigt die MIV bei der Nutzung von $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose, **B** bei der Nutzung von $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose, **C** bei $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose und **D** bei $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Glutamin. Die Signifikanz wurde mit einer zweiseitigen ANOVA bestimmt (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,001$; *** = $p \leq 0,0001$).

Die Citratfragmente der Glukosetracer (vgl. Abbildung 38 A-C) zeigen erhöhte Markierung im Vergleich zur Kontrolle. Dies deutet auf eine gesteigerte Aufnahme der Markierung über die Glykolyse in das Mitochondrium hin. Wird Teil D der Abbildung 38 betrachtet, kann eine starke Zunahme der Markierung im Citrat erkannt werden. Das ist auch in den anderen Citratzyklusintermediaten beobachtbar (vgl. Abbildungen A 72, A 77, A 78). Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass es zu einer erhöhten Aufnahme von markiertem Glutamat in das Mitochondrium kommt. Die erhöhte M+2 und M+3 weisen auf eine höhere PDH bzw. PC Aktivität hin, während erhöhte M+5 zum einen auf eine stärkere Aktivität von sowohl der PC als auch der PDH und zum anderen einen reversen ISDH Fluss hindeuten kann.

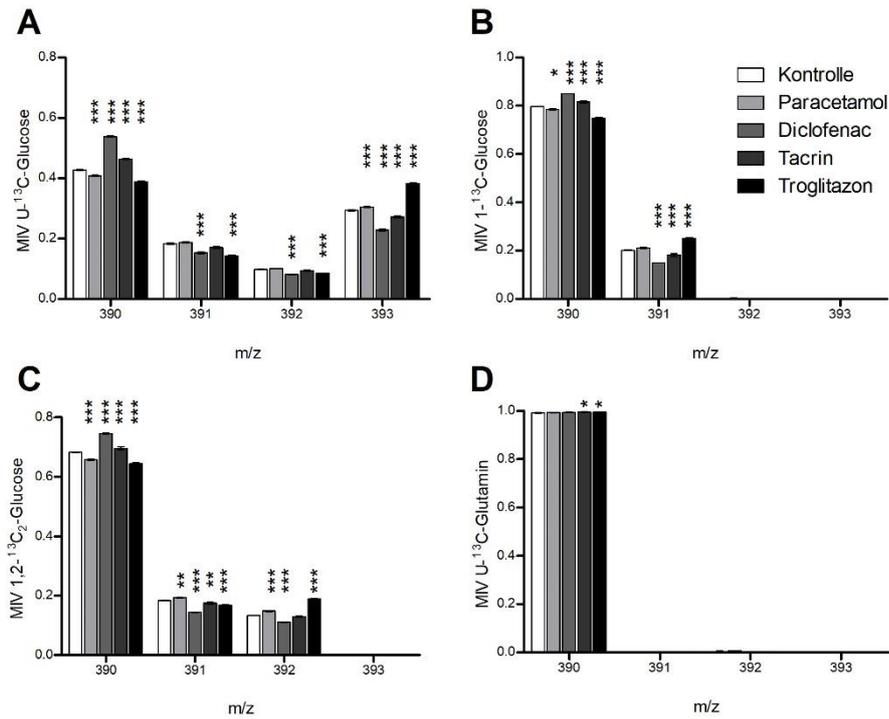


Abbildung 38: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 390 von Serin (C1-C2-C3)
 Aufgetragen ist die MIV der einzelnen Massen (n=4). **A** zeigt die MIV bei der Nutzung von U-¹³C-Glukose, **B** bei der Nutzung von 1-¹³C-Glukose, **C** bei 1,2-¹³C₂-Glukose und **D** bei U-¹³C-Glutamin. Die Signifikanz wurde mit einer zweiseitigen ANOVA bestimmt (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,001; *** = p ≤ 0,0001).

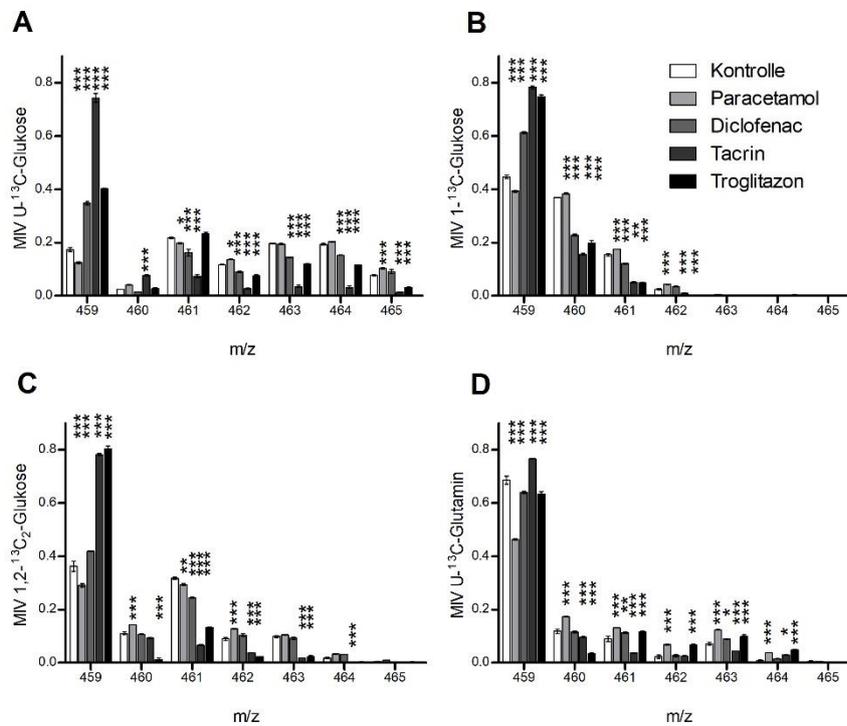


Abbildung 37: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 459 von Citrat (C1-C2-C3-C4-C5-C6)
 Aufgetragen ist die MIV der einzelnen Massen (n=4). **A** zeigt die MIV bei der Nutzung von U-¹³C-Glukose, **B** bei der Nutzung von 1-¹³C-Glukose, **C** bei 1,2-¹³C₂-Glukose und **D** bei U-¹³C-Glutamin. Die Signifikanz wurde mit einer zweiseitigen ANOVA bestimmt (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,001; *** = p ≤ 0,0001).

3.4.3.2 ¹³C-MFA Paracetamol

Die mit Paracetamol behandelten Zellen zeigen 25,5 % signifikant unterschiedliche normierte Flüsse im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Tabelle 20).

Tabelle 20: Übersicht über die signifikant zur Kontrolle unterschiedlichen Flüsse des Hauptexperiments in Prozent

Medikament	Paracetamol	Diclofenac	Tacrin	Troglitazon
Signifikante Unterschiede [%]	25,5	46,3	49,1	67,3

Abbildung 39 zeigt die vergleichende Flusskarte von Paracetamol (Residuum: 127,9 [χ^2 95 %: 134,1]). Im oberen Teil der Flusskarte ist eine Steigerung der Glykolyseflüsse und daraus folgend der Fermentation ersichtlich. Die Alaninsynthese ist unverändert. Im Gegensatz zur Glykolyse sinken die Flüsse des Pentosephosphatweges, vor allem die des oxidativen Pentosephosphatweges, signifikant. Auch die anderen Flüsse der PPP sind reduziert, allerdings nicht signifikant. In der Mitte der Flusskarte ist zudem eine nicht signifikante Steigerung sowohl der Serinsynthese aus PGA (AA Ser), als auch der Serinaufnahme aus dem Medium zu sehen. Dies führt zu einer nicht signifikant erhöhten Produktion von Glycin und C1 (AA Gly Ser). Der verstärkte AA Ser Fluss spiegelt die Ergebnisse der Traceranalyse von Serin wieder. Im Mitochondrium ist außer einem Anstieg der Aktivität des mitochondrialen Malic Enzyme, ME.m, kein Unterschied zu beobachten. Die Transportreaktion von Pyruvat in das Mitochondrium, T Pyr, ist im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verringert. Der erhöhte ME.m Fluss gleicht den Mangel an Pyruvat wieder aus. Somit zeigen die auf Pyruvat folgenden Flüsse des Mitochondriums keine signifikanten Veränderungen. Die Glutaminaufnahme und somit auch der Transport von Glutamat in das Mitochondrium, T Glu, ist nicht signifikant erhöht. Dies führt zu einem nicht signifikanten Anstieg der nachfolgenden Flüsse des Citratzyklus. Der erhöhte T Glu wird durch die Traceranalyse von Citrat bestätigt.

Zusammenfassend entspricht die Steigerung der Glykolyseflüsse, wie auch die Verringerung der Citratzyklusflüsse den Erwartungen. Die gesunkenen Pentosephosphatwegflüsse entsprechen ebenfalls den Erwartungen aus der Literaturanalyse.

3.4.3.3 Traceranalyse Diclofenac

Die MIV von Ribose 160 der mit Diclofenac behandelten Zellen zeigt bei $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose signifikant mehr M+1 (vgl. Abbildung 35 B). Dies weist auf einen weniger aktiven oxidativen Pentosephosphatweg und einen aktiveren nichtoxidativen PPP im Vergleich zur Kontrolle hin. Ebenfalls ist bei der MIV bei der Traceranalyse mit $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose mehr M+2 zu sehen während M+1 verringert war (vgl. Abbildung 35 C). Dies bestätigt die Annahme, dass der oxidative PPP im Vergleich zum nichtoxidativen PPP in Bezug auf die Ribosesynthese nicht so stark gestiegen ist. Die Markierung in Serin (vgl. Abbildung 37) ist bei Diclofenac im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesunken. Das gleiche Muster kann in den Markierungen von Glycin beobachtet werden (vgl. Abbildung A 75). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Serinsynthese aus PGA im Vergleich zur Serinaufnahme im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen abgenommen hat. Citrat hat bei den Glukosetracern (vgl. Abbildung 38 A-C) eine verringerte Markierung. Das Citrat der Traceranalyse mit $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glutamin zeigt verringertes M+0 und gesteigertes M+2 und M+4 (vgl. Abbildung 38 D). Dies deutet darauf hin, dass die Markierung vom Glutamin im Vergleich zur Kontrolle verstärkt direkt über den Citratzyklus verarbeitet wird. In Malat (vgl. Abbildung A 77) ist bei allen Tracern mehr Markierung als in der Kontrolle ersichtlich. Dieses Verhalten ist auch bei den Aminosäuren Aspartat und Prolin nachweisbar (vgl. Abbildungen A 72 und A 79).

3.4.3.4 ^{13}C -MFA Diclofenac

Die normierten Flusswerte von Diclofenac zeigen 46,3 % signifikant unterschiedliche Flüsse im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Tabelle 20).

Im Zytosol der Flusskarte von Diclofenac (vgl. Abbildung 40) (Residuum: 113,0 [χ^2 95 %: 115,8]) ist erkennbar, dass die oberen Glykolyseflüsse, die Flüsse *PGI*, *ALD* und *GAPDH* *PGK*, deutlich verringert sind. Vor allem die Flüsse des oxidativen Pentosephosphatweges sind dagegen signifikant erhöht. Aber auch alle anderen Flüsse des Pentosephosphatweges zeigen Steigerungen. Eine Erhöhung des nichtoxidativen PPP und des oxidativen PPP konnte in der Traceranalyse von Ribose bestätigt werden (vgl. Abbildung 35). Die signifikante Verringerung der Glykolyseflüsse reicht bis zum Glykolyseintermediat PGA. Die nachfolgende Serinsynthese (AA *Ser*) ist nicht signifikant verringert. Dies bestätigt die Rückschlüsse aus den Markierungsdaten von Serin (vgl. Abbildung 37). Die Serinaufnahme ist zum Ausgleich der geringen Synthese leicht gesteigert. Dennoch ergibt sich eine nicht signifikante Reduzierung der Glycin- und C1-Produktion (AA *Gly Ser*).

Der Transporterfluss von Pyruvat in das Mitochondrium, *T Pyr*, ist im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Dies resultiert u.a. aus einer signifikant erhöhten Aktivität des zytosolischen *Malic*

Enzyme (ME.c). Der erhöhte *T Pyr* Fluss führt zu verstärkten Flüssen des oberen Citratzyklus, Pyruvatdehydrogenase (*PDH*) und Citratsynthase (*CS*). Das vermehrt über die *CS* produzierte Citrat wird allerdings nicht vermehrt in das Zytosol transportiert, sondern verbleibt im Mitochondrium. Dadurch ist der Fluss der Isocitratdehydrogenase (*ISDH*) stark gesteigert. Zusätzlich kann im unteren Teil der Flusskarte eine nicht signifikant erhöhte Aufnahme von Glutamat in das Mitochondrium (*T Glu*) beobachtet werden. Die Markierungsdaten von Citrat (vgl. Abbildung 38) bestätigen diese leicht gestiegene Glutamataufnahme. Das resultiert aus einer signifikant gesteigerten Glutaminaufnahme in das Zytosol. Das aufgenommene Glutamin wird wiederum signifikant vermehrt als Glutamat aus der Zelle abgegeben. Die erhöhten *ISDH* und *T Glu* Flüsse führen vereint dazu, dass die Flüsse des unteren Teils des Citratzyklus, *OGDH*, *SDH* und *Fum*, deutlich gesteigert sind. Diese wiederum bedingen den nicht signifikant invertierten Transportfluss von Malat aus dem Zytosol (*T Mal*), den leicht gesteigerten *MDH.m* Fluss und die leichte Steigerung des mitochondrialen *Malic Enzyme (ME.m)*. Um trotzdem den deutlich erhöhten *CS* Fluss aufrecht zu erhalten, ist die Pyruvatcarboxylase (*PC*) in den behandelten Zellen signifikant aktiver als in den unbehandelten Zellen. Zusammengefasst zeigt die Flusskarte signifikant gesteigerte Flüsse des Mitochondriums, während die Transportflüsse in und aus dem Mitochondrium sich nicht signifikant verändert haben. Dies kann auf einen erhöhten Energiebedarf der Zelle oder auf eine gestörte Interaktion zwischen Mitochondrium und Zytosol hinweisen. Zusammengefasst stimmen die Ergebnisse der ¹³C-MFA mit den erwarteten Flussveränderungen durch Diclofenac aus der Literaturanalyse überein. Es wurden eine gestiegene Citratzyklusaktivität und im Gegensatz dazu eine gesunkene Glykolyseaktivität erwartet.

3.4.3.5 Traceranalyse Tacrin

Die MIV des Ribosefragments 160 der mit Tacrin behandelten Zellen zeigt sowohl bei $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose als auch bei $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose mehr M+1 im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abbildung 35). Diese Ergebnisse sind zueinander konträr. M+2 ist bei der Traceranalyse mit $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose nicht ebenfalls mit dem M+1 gestiegen, was darauf hinweist, dass nur der oxidative PPP nicht jedoch der nichtoxidative PPP in Bezug auf die Ribosynthese erhöht vorliegt. In Alanin sinkt die Markierung bei der Traceranalyse mit $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glukose. Bei den anderen Glukosetracern steigt die Markierung (vgl. Abbildung 36). In den Laktat- und Pyruvatfragmenten (vgl. Abbildungen A 76, A 80) kann das gleiche Verhalten der Markierung beobachtet werden. Die MIV in Serin sinkt in allen Traceranalysen mit Glukose unter Behandlung der Zellen mit Tacrin (vgl. Abbildung 37). Das weist auf eine verringerte Synthese von Serin aus Glykolyseintermediaten (AA Ser) bzw. auf eine vermehrte Aufnahme von unmarkierten Serin in die Zelle hin.

Die Markierungen in Citrat sinken im Vergleich zu den unbehandelten Zellen in allen Traceranalysen (vgl. Abbildung 38). In Malat hingegen (vgl. Abbildung A 77) zeigt sich dies nur bei den Traceranalysen mit Glukose. Beim Glutamintracer ist eine signifikante Steigerung der Markierung in Malat erkennbar. Die Markierungsmuster von Malat und Citrat widersprechen sich. Wird die MIV von Aspartat und Prolin (vgl. Abbildungen A 72, A 79) betrachtet, unterstützen sie die Ergebnisse der Traceranalyse von Malat und widerlegen die Ergebnisse von Citrat. Dies legt nahe, dass die Citratfragmente für die Modellierung nicht verwendet werden können.

3.4.3.6 ^{13}C -MFA Tacrin

Die mit Tacrin behandelten Zellen zeigen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen 49,1 % signifikante Unterschiede in den normierten Flusswerten (vgl. Tabelle 20).

Die daraus resultierende Flusskarte ist in Abbildung 41 dargestellt (Residuum: 126,1 [χ^2 95 %: 131,8]). Im oberen Teil ist ersichtlich, dass die Glykolyseflüsse signifikant erhöht sind. Daraus resultiert eine ebenfalls erhöhte Fermentation. Zusätzlich sind die Flüsse des Pentosephosphatweges teilweise signifikant verringert. Dies betrifft sowohl den oxidativen als auch den nichtoxidativen PPP.

Der Fluss der Serinsynthese aus dem Glykolyseintermediat PGA (AA Ser) ist leicht verringert. Die Serinaufnahme in die Zelle zeigt keine Veränderung. Das führt zu einer leicht verringerten Synthese von Glycin und C1. Die Traceranalysen von Serin bestätigen diese Ergebnisse (vgl. Abbildung 37).

Der Transporterfluss von Pyruvat in das Mitochondrium (*T Pyr*), ist trotz der gesteigerten Glykolyse leicht verringert. Das mitochondriale Pyruvat wird in den behandelten Zellen von dem signifikant erhöhten Fluss des mitochondrialen *Malic Enzyme (ME.m)* ergänzt. Das Pyruvat wird wiederum über einen deutlich gesteigerten Fluss der Pyruvatcarboxylase (*PC*) zu OAA umgewandelt. Die Flüsse der Pyruvatdehydrogenase (*PDH*) und der Citratsynthase (*CS*) sind leicht erhöht. Das entstehende Citrat wird signifikant verstärkt über den *ISDH* Fluss in OGA umgewandelt. Der Transport in das Zytosol hingegen ist signifikant verringert. Dies hat wiederum eine verringerte zytosolische Produktion von Acetyl-CoA zur Folge. Im unteren Teil der Flusskarte zeigt sich zudem eine signifikant gesteigerte Glutaminaufnahme in die Zelle. Diese führt zu einer gestiegenen Glutaminsynthese, einem leicht erhöhten Transportfluss von Glutamat in das Mitochondrium (*T Glu*) und einer signifikant erhöhten Glutamatabgabe in das Medium. Die gesteigerten Flüsse der *ISDH* und des *T Glu* resultieren in deutlich gesteigerten Flüssen des unteren Teils des Citratzyklus. Das produzierte Malat wird, wie bereits beschrieben, hauptsächlich über das *ME.m* in Pyruvat umgewandelt. Der invertierte Malattransportfluss (*T Mal*) ist nicht signifikant verändert. Die mitochondriale Malatdehydrogenase (*MDH.m*) ist leicht reduziert.

Die gesteigerte Aktivität des Citratzyklus und der Glykolyseflüsse, sowie der anaplerotischen Reaktionen stimmt zusammengefasst mit den Erwartungen aus der Literaturanalyse überein.

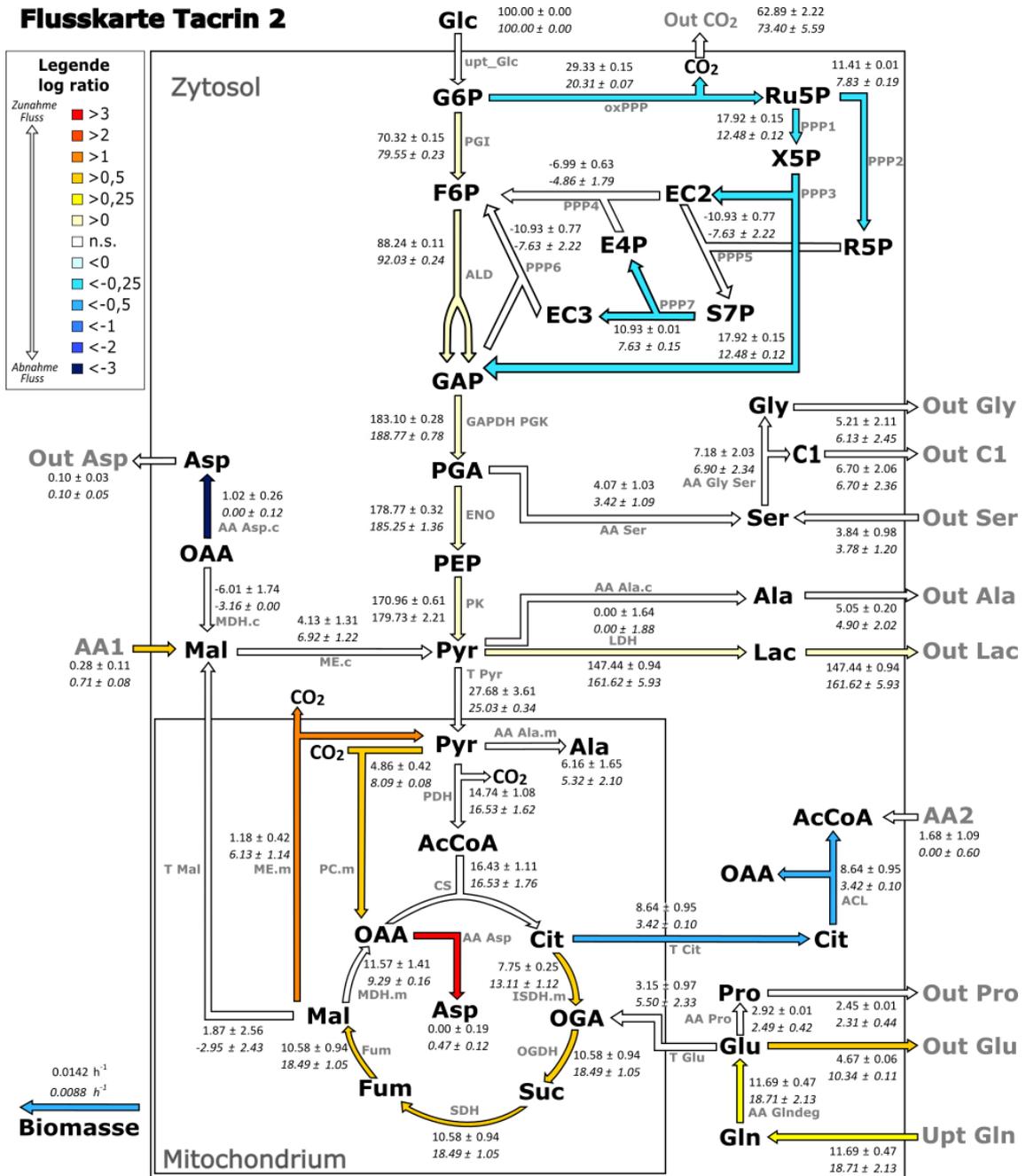


Abbildung 41: Vergleichende Flusskarte von mit Tacrin behandelten Zellen des Hauptexperiments

Die Flussrichtung wird durch die Pfeile verdeutlicht, wobei die Richtung dem Nettofluss der behandelten Zellen entspricht. Die auf die Glukoseaufnahme rate normierte Flussstärke in % ist den Zahlen neben den Flüssen zu entnehmen. Dabei ist der obere Wert die Kontrolle ± STE und der untere, kursive Wert der der behandelten Zellen ± STE. Farbige Pfeile sind signifikant unterschiedliche Flüsse im Vergleich zur Kontrolle. Eine rote Färbung weist auf eine Steigerung des Flusses hin, eine Blaufärbung weist auf eine Abnahme des Flusses hin. Nicht signifikant verschiedene Flüsse sind Weiß gekennzeichnet. Der Farbverlauf richtet sich nach dem log ratio der Flüsse. Die Signifikanz wurde durch einen Vergleich der 95 % Konfidenzintervalle bestimmt. Die Bezeichnung der Flüsse steht in Grau an der Seite. Die Erklärung zu den Abkürzungen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

3.4.3.7 Traceranalyse Troglitazon

Das Ribosefragment 160 der mit Troglitazon behandelten Zellen zeigt in der Traceranalyse mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose weniger M+0 und mehr M+1 (vgl. Abbildung 35). Dies weist auf eine verringerte Aktivität des oxidativen Pentosephosphatweges im Vergleich zum nichtoxidativen PPP zur Ribosesynthese hin. Das verringerte Aufkommen von M+2 bei der $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose deutet auf eine geringere Aktivität des nichtoxidativen PPP im Vergleich zur Kontrolle hin. Diese Daten sind somit zueinander konträr.

Die MIV von Alanin (vgl. Abbildung 36) zeigt eine Verringerung der Markierung in allen Traceranalysen mit Glukose. Alanin im Tracerexperiment mit $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glutamin verweist auf ein gesteigertes Markierungsaufkommen. Laktat und Pyruvat hingegen haben erhöhte Markierung durch die Glukosetracer und keine Markierung bei der Verwendung des Glutamintracers (vgl. Abbildung A 76, A 80). Diese Ergebnisse weisen auf eine im Verhältnis zueinander verringerte zytosolische Alaninsynthese und erhöhte mitochondriale Alaninsynthese hin. Jedoch scheint die Glykolyse anhand der MIV von Laktat und Pyruvat erhöht vorzuliegen. Serin (vgl. Abbildung 37) zeigt in den Glukosetraceranalysen ebenfalls mehr Markierung, was diese Vermutung unterstützt. Zudem weist es darauf hin, dass die Serinsynthese aus Glykolyseintermediaten im Vergleich zu der Aufnahme von Serin aus dem Medium überwiegt.

Die MIV von Citrat zeigt in Teil A-C der Abbildung 38 signifikant weniger und in Teil D signifikant mehr Markierung als in der Kontrolle. Malat, Prolin und Aspartat besitzen das gleiche Markierungsmuster (vgl. Abbildungen A 77, A 79, A 72). Dies weist auf eine stark inhibierte Aufnahme von Pyruvat in das Mitochondrium hin. Ebenfalls zeigt die erhöhte Markierung durch den Glutamintracer in Citrat einen erhöhten Einbau von Kohlenstoff aus Glutamin im Vergleich zum Kohlenstoff aus der Glykolyse.

3.4.3.8 ^{13}C -MFA Troglitazon

Die normierten Flusswerte von Troglitazon weisen im Vergleich zur Kontrolle 67,3 % signifikant unterschiedliche Flüsse auf (vgl. Tabelle 20).

In der Flusskarte von Troglitazon (Residuum: 133,4 [χ^2 95 %: 142,0]) sind signifikant erhöhte Glykolyseflüsse ersichtlich (vgl. Abbildung 42). Dies entsprach aufgrund der Arzneimittelwirkung von Troglitazon der Erwartung. Die gesteigerte Glykolyse führt zu einer ebenfalls signifikant gesteigerten Fermentation, die Alaninsynthese ist leicht verringert. Die Aktivität des oxidativen Pentosephosphatweges ist signifikant gesunken. Auch der nichtoxidative PPP ist stark reduziert. Die Serinsynthese aus PGA (AA Serin) ist im Vergleich zur Kontrolle trotz der erhöhten Glykolyseflüsse leicht gesunken. Die Aufnahme von Serin aus dem Medium ist zusätzlich deutlich

verringert, was in Kombination mit *AA Ser* zu leicht verringerter Synthese von Glycin und C1 (*AA Gly Ser*) führt. In Kombination mit der reduzierten Produktion von Ribose kann dies auf eine verminderte Herstellung von Nukleotiden bzw. verminderte Proliferation hinweisen.

Die Aufnahme von Pyruvat in das Mitochondrium (*T Pyr*) ist deutlich verringert. Der Fluss des mitochondrialen *Malic Enzyme (ME.m)* kann den Pyruvatmangel trotz der signifikanten Steigerung nicht mit der Produktion von Pyruvat aus Malat ausgleichen. Dies hat signifikant verringerte Flüsse der Pyruvatdehydrogenase (*PDH*) und der Citratsynthase (*CS*) und eine leicht verringerte Alaninsynthese zur Folge. Das aus der *CS* entstandene Citrat wird deutlich verringert über den Transportfluss *T Cit* in das Zytosol abgegeben. Dies verringert die zytosolische Produktion von OAA und Acetyl-CoA signifikant. Das im Mitochondrium verbleibende Citrat wird über die Isocitratdehydrogenase (*ISDH*) zum OGA umgewandelt. Die Glutaminaufnahme in die Zelle ist leicht verringert. Daraus folgt eine signifikant verringerte Prolinproduktion und eine leicht verringerte Glutamatabgabe in das Medium. Die Glutamataufnahme in das Mitochondrium und die Umwandlung in OGA ist leicht gestiegen. Daher sind die auf das OGA folgenden Citratzyklusflüsse deutlich verringert. Der Fluss der mitochondrialen Malatdehydrogenase (*MDH.m*) ist zudem revers, was wiederum die oben erwähnte Produktion von Pyruvat über das *ME.m* unterstützt.

Zusammengefasst stimmen die gesunkenen Citratzyklusflüsse sowie die gesteigerte Glykolyse und die gesteigerte Fermentation mit den Erwartungen aus der Literaturanalyse überein.

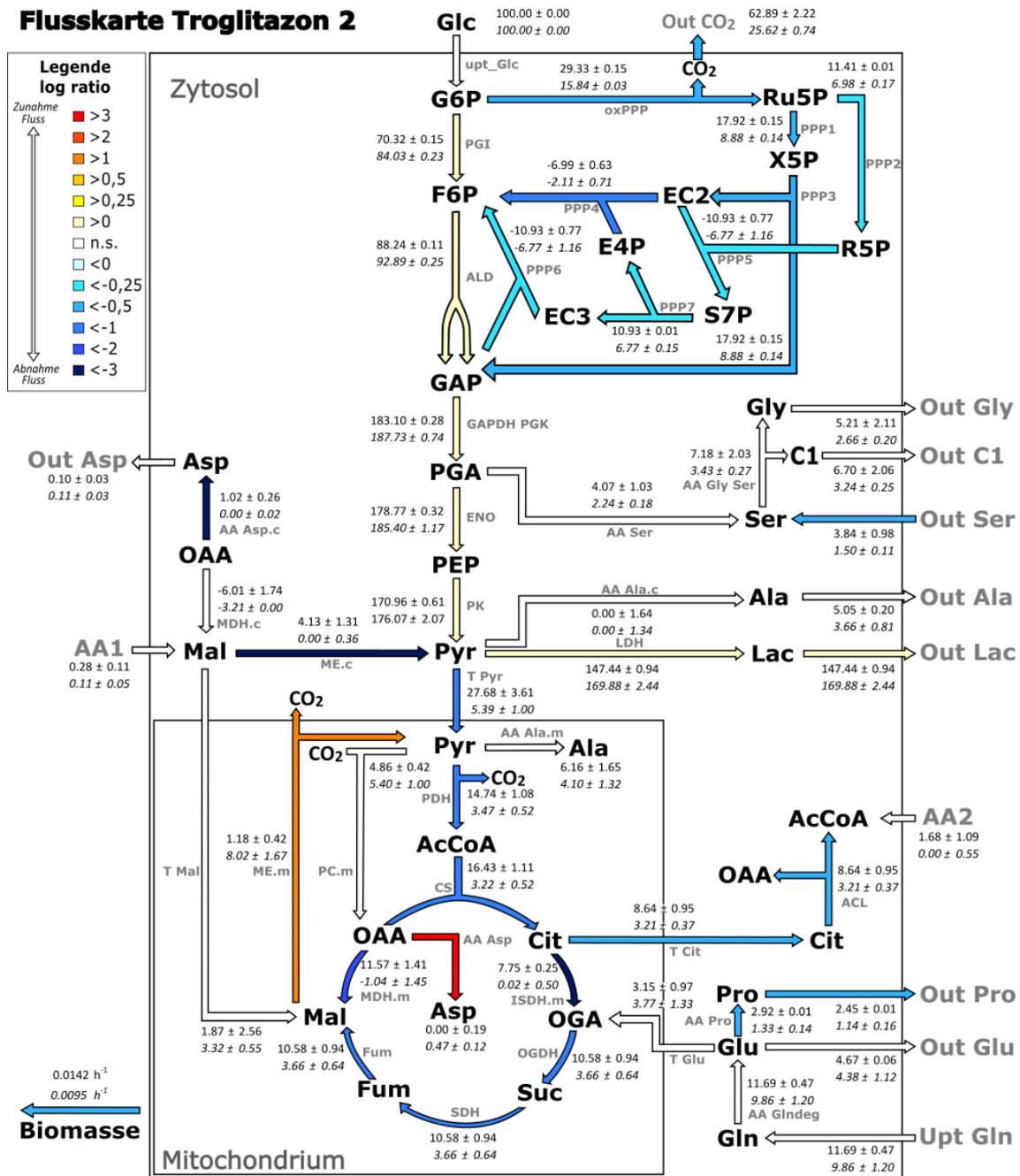


Abbildung 42: Vergleichende Flusskarte von mit Troglitazon behandelten Zellen des Hauptexperiments
 Die Flussrichtung wird durch die Pfeile verdeutlicht, wobei die Richtung dem Nettofluss der behandelten Zellen entspricht. Die auf die Glukoseaufnahme rate normierte Flussstärke in % ist den Zahlen neben den Flüssen zu entnehmen. Dabei ist der obere Wert die Kontrolle ± STE und der untere, kursive Wert der der behandelten Zellen ± STE. Farbige Pfeile sind signifikant unterschiedliche Flüsse im Vergleich zur Kontrolle. Eine rote Färbung weist auf eine Steigerung des Flusses hin, eine Blaufärbung weist auf eine Abnahme des Flusses hin. Nicht signifikant verschiedene Flüsse sind Weiß gekennzeichnet. Der Farbverlauf richtet sich nach dem log ratio der Flüsse. Die Signifikanz wurde durch einen Vergleich der 95 % Konfidenzintervalle bestimmt. Die Bezeichnung der Flüsse steht in Grau an der Seite. Die Erklärung zu den Abkürzungen findet sich im Abkürzungsverzeichnis.

3.4.4 Messung der Redoxäquivalente

Um die Ergebnisse der Flusskarten zu unterlegen, wurden die Konzentrationen von ATP, ADP, AMP, GSH und GSSG per LC/MS gemessen und auf die Zellzahl normalisiert. In Abbildung 43 sind die Konzentrationen von ATP (A), ADP (B) und AMP (C) in μM pro einer Millionen Zellen und die Energieladung (D) (engl. *energy charge*) ersichtlich. Die ATP Konzentration steigt unter der Behandlung der Zellen mit Paracetamol leicht, ist mit Diclofenac unverändert, bei Tacrin und Troglitazon nimmt sie signifikant ab. ADP und AMP steigen bei allen Substanzen im Vergleich zur Kontrolle. Die Energieladung, welche aus den Adenosin-Nukleotiden berechnet wird, ist zwischen Kontrolle, Paracetamol und Diclofenac nicht signifikant verschieden, jedoch ist eine deutliche Reduktion bei Tacrin und Troglitazon erkennbar. Die Kontrolle liegt im üblichen Bereich von 0,80-0,95.

Ein weiterer Index für den Energiehaushalt einer Zelle ist in Abbildung 44 D zu sehen. Hier ist das Verhältnis zwischen ATP und ADP dargestellt, welches Rückschlüsse auf das Phosphorylierungspotential ermöglicht. Es ist zu beobachten, dass dieses Potential bei allen Substanzen im Vergleich zur Kontrolle stark abnimmt. Es besteht ein direkter Zusammenhang zu

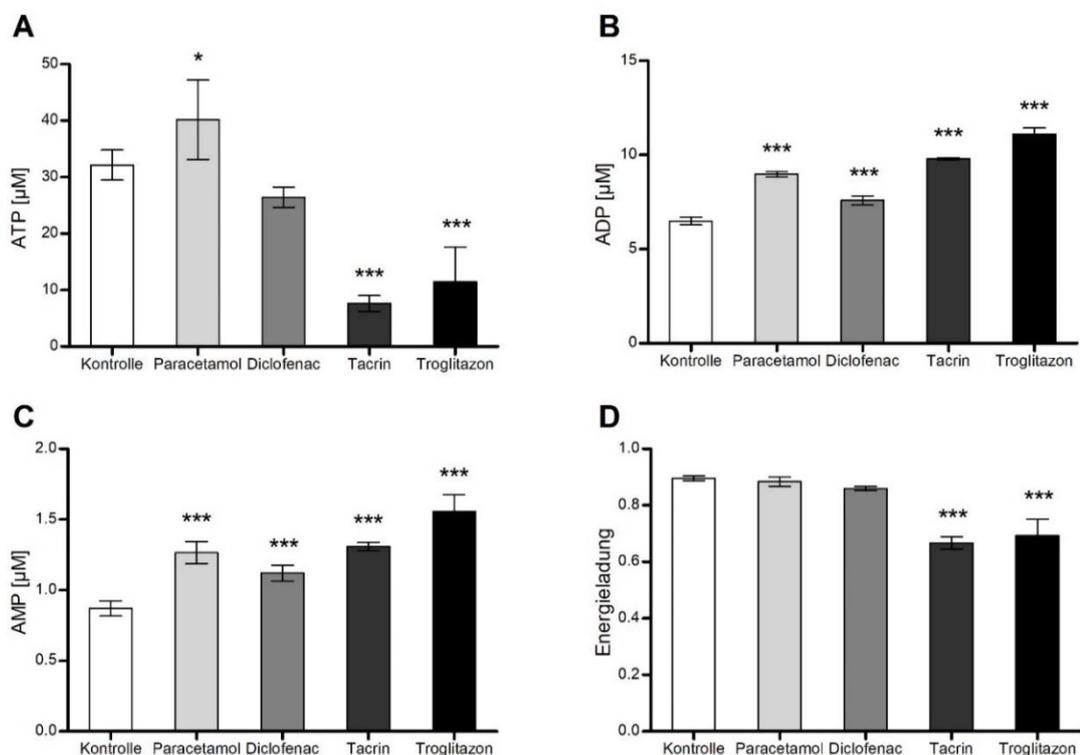


Abbildung 43: ATP (A), ADP (B), AMP (C) Konzentration in μM normalisiert auf 1 Mio. Zellen und die Energieladung (D)

Die Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle wurde mit einer einseitigen ANOVA bestimmt ($p \leq 0,05$).

der freien Enthalpie, die aus ATP generiert wird. Da das Mitochondrium der Hauptort der Regeneration von ATP aus ADP darstellt, kann hier eine Dysfunktion vermutet werden.

In Abbildung 44 sind außerdem die Konzentrationen von GSH, GSSG und deren Verhältnis zueinander dargestellt. Paracetamol zeigt nur im Verhältnis GSSG/GSH eine signifikante Reduktion zur Kontrolle, Diclofenac und Troglitazon zeigen in allen Konzentrationen und im Verhältnis eine signifikante Steigerung gegenüber der Kontrolle. Bei Tacrin hingegen ist das Gegenteil der Fall. Dies könnte einen Rückschluss auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber oxidativem Stress oder der Regenerierfähigkeit von GSSG und somit der Aktivität des oxidativen Pentosephosphatwegs geben.

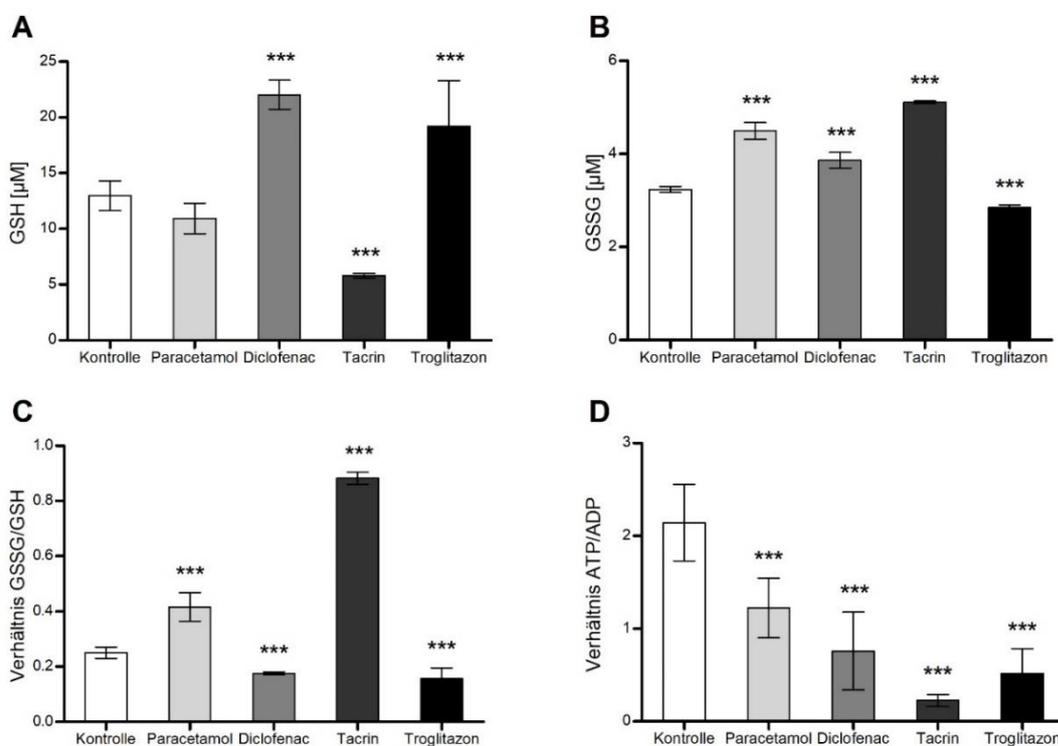


Abbildung 44: Konzentration von GSH (A), GSSG (B), das Verhältnis von GSSG/GSH (C) und das Verhältnis von ATP/ADP (D) normalisiert auf 1 Mio. Zellen

Die Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle wurde mit einer einseitigen ANOVA bestimmt ($p \leq 0,05$).

3.5 Zusammenfassung der Pipeline

Die Etablierung einer experimentellen ^{13}C -MFA Pipeline für Säugerzellen ist ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit.

In Abbildung 45 ist eine schematische Übersicht der etablierten Pipeline dargestellt. Die Pipeline besteht aus mehreren Phasen, welche in dieser Arbeit bereits genauer beschrieben wurden. Daher erfolgt hier nur eine nochmalige Übersicht über die einzelnen Phasen.

Phase 1 beinhaltet zunächst die Festlegung der Fragestellung. Anhand dieser kann, wie in 2.2.4.2 veranschaulicht, das Grundmodell mittels INCA erstellt werden. Passend zu den beobachteten Stoffwechselwegen müssen zudem die optimalen Tracer ausgewählt werden.

In Phase 2 werden die experimentellen Grundlagen wie die Medienzusammensetzung, das MSS und das ISS etabliert. Zudem muss eine geeignete Methode zur Extraktion der Zellen gefunden werden.



Abbildung 45: Übersicht über die einzelnen Phasen der experimentellen Pipeline der Etablierung einer ^{13}C -MFA

In der dritten Phase wurde die Analytik etabliert. Dazu wurde ein geeignetes analytisches Verfahren und die passende Derivatisierung gewählt. Die erhaltenen Daten wurden folgend extrahiert und korrigiert.

Die nun etablierte Methode wurde in Phase 4 validiert. Dazu wurde getestet, ob die Methode gezielte Veränderungen im Stoffwechsel durch Inhibitoren abbilden kann. Ist dies nicht der Fall, müssten die Phasen 1-3 wiederholt werden.

Das Screening mehrerer Stoffe, Phase 5, ist in Abhängigkeit von der Fragestellung der ^{13}C -MFA fakultativ. Es werden mehrere Stoffe mit wenigen Tracern getestet, um so die passenden Kandidaten für die letzte Phase der Pipeline, dem Hauptexperiment, zu finden.

Phase 6 beinhaltet die ausführliche Testung der gewünschten Konditionen mit ausreichend Tracern. Zudem eignen sich einfache, ergänzende Experimente zur Bestätigung der gewonnenen Erkenntnisse.

4. Diskussion

4.1 Grundbedingungen für eine ^{13}C -MFA

4.1.1 Etablierung der Methodik

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit umfasst die Etablierung der Grundbedingungen einer ^{13}C -MFA an HepG2-Zellen. Die experimentelle Etablierung beinhaltet die Optimierung der Zusammensetzung des Mediums, das Erreichen des metabolischen und isotopischen Gleichgewichts und eine erschöpfende Extraktionsmethode (vgl. 3.1. Etablierung der Grundlagen einer ^{13}C -MFA). Die Etablierung der Analytik umfasste die Wahl der Tracer, die Optimierung der Messmethode und die Datenextraktion und -korrektur (Crown *et al.*, 2013; M. R. Antoniewicz, 2015). Zeitgleich fand die Etablierung des Grundmodells statt (vgl. 2.2.4.2). Auf Grundlage der Etablierungsergebnisse wurde eine erste Flusskarte erstellt.

Die Etablierung der experimentellen Versuche (vgl. 3.1) und der Analytik (vgl. 2.2.3) werden zur besseren Nachvollziehbarkeit bereits ausführlich in den Ergebnissen bzw. Material und Methoden beschrieben.

4.1.2 Die Flusskarte der Etablierung

Die Etablierungsflusswerte wurden in einer Flusskarte visualisiert (vgl. Abbildung 23). Es wurde ein Abbild der charakteristischen Merkmale eines Krebsstoffwechsels erwartet, da der Metabolismus der Zellen in keiner Weise beeinträchtigt oder beeinflusst war. In der Flusskarte ist sowohl eine starke Glykolyse als auch eine starke Abgabe von Laktat in das Medium erkennbar. Dies wird als Warburg Effekt bezeichnet (DeBerardinis *et al.*, 2008; Strigun *et al.*, 2011; Lukey *et al.*, 2013; Murphy *et al.*, 2013; Altman *et al.*, 2016; Liberti *et al.*, 2016). In einer primären Zelle wird Glukose über die oxidative Phosphorylierung zu CO_2 verstoffwechselt und nur, wenn der für die Oxidation nötige Sauerstoff nicht verfügbar ist, wird Glukose zu Laktat umgewandelt. Im Unterschied dazu kommt es in Krebszellen zu einer aeroben Laktatproduktion. Dies ist in der Flusskarte eindeutig erkennbar.

Gleichzeitig weist die hohe Abgabe von Laktat in der Flusskarte darauf hin, dass nur eine begrenzte Menge Pyruvat durch den Pyruvat-Carrier in das Mitochondrium überführt werden kann. Das exzessiv produzierte Pyruvat wird somit in Laktat umgewandelt. Dies unterstützt die Aufrechterhaltung des Glykolyseflusses in Richtung Pyruvat (DeBerardinis *et al.*, 2008). Es entsteht eine saure Zellumgebung, welche sich positiv auf die Zellproliferation auswirkt (Liberti *et al.*, 2016).

Außerdem wird durch die erhöhte Glykolyse auch eine gesteigerte Synthese von Serin und Nukleotiden ermöglicht (Lunt *et al.*, 2011). Das fördert wiederum die Proliferation der Zellen. Es wird angenommen, dass trotz der schlechten Energiebilanz der Warburg Effekt den Vorteil hat, dass durch die hohe Glykolyse mehr Zwischenprodukte für die Biosynthese von Fettsäure, Nukleotiden und Aminosäuren zur Verfügung stehen und somit die Proliferation gefördert wird (Heiden *et al.*, 2009).

Die Flusskarte zeigt zusätzlich im Verhältnis zu den hohen Glykolyseflüssen geringe Citratzyklusflüsse. Dies gibt einen Hinweis auf die Verschiebung der Energieproduktion von der oxidativen Phosphorylierung zur Glykolyse. Die Glykolyse produziert theoretisch allerdings weniger ATP als die oxidative Phosphorylierung, 2 ATP statt 36 ATP (Heiden *et al.*, 2009). Da die Glykolyse durch den Warburg Effekt in Krebszellen in einer sehr hohen Geschwindigkeit abläuft, ist die generierte ATP Menge trotzdem mit einem primären Zellstoffwechsel vergleichbar (DeBerardinis *et al.*, 2008; Liberti *et al.*, 2016).

Des Weiteren zeigt die Flusskarte eine hohe Glutaminaufnahme in die Zelle. Auch der Transportfluss von Glutamat in das Mitochondrium (*T Glu*) ist stark erhöht. Dadurch, dass in Tumorzellen die Glykolyse der Hauptenergielieferant ist, wird im Citratzyklus die Produktion von wichtigen Zwischenprodukten eingeschränkt. Um dies zu kompensieren, steigen sowohl die Glutaminaufnahme als auch der Fluss der anaplerotischen Reaktionen (Wise *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014). Glutamin ist in Säugerzellkulturen die zweitwichtigste Energiequelle und zusätzlich der Hauptlieferant von Stickstoff (Heiden *et al.*, 2009; Chiaradonna *et al.*, 2012; Lukey *et al.*, 2013). Aus Glutamin bildet sich auch α -Ketoglutarat, welches den Citratzyklus speist. Das macht Glutamin zu einem Energielieferant für die Zellen macht (Chiaradonna *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der primäre Stoffwechsel der HepG2-Zellen erfolgreich mittels der etablierten ^{13}C -MFA abgebildet werden konnte.

4.2 Diskussion der Validierungsergebnisse

Der Etablierung folgte die Validierung der ^{13}C -MFA-Pipeline. Dazu wurden drei Substanzen ausgesucht, welche bestimmte Enzyme im Primärstoffwechsel inhibieren. Es wurden 3-Bromopyruvat als Inhibitor der Hexokinase, L-Don (6-Diazo-5-oxo-L-norleucin) als Inhibitor der Glutaminase und UK-5099 (α -Cyano- β -(1-phenylindol-3-yl)-acrylat) als Inhibitor des Pyruvat-Carriers genutzt. Die resultierenden Flusswerte wurden mit den Ergebnissen aus der Literaturrecherche verglichen, um die Eignung der ^{13}C -MFA zur Abbildung des primären Stoffwechsels zu beweisen.

4.2.1 Konzentrationsabhängige Wirkung der Inhibitoren und Medikamente auf die Zellviabilität

Um Medikamente bzw. Inhibitoren mittels ^{13}C -MFA zu testen, musste zunächst eine Konzentration festgelegt werden. Es wurde sich für subtoxische Konzentrationen entschieden, was auf folgenden Überlegungen basierte:

Um Markierungssubstanzen in die Biomasse aufzunehmen, müssen sich die Zellen im Wachstum befinden. Aus diesem Grund durften die Inhibitoren nicht so toxisch sein, dass die Zellen ihr Wachstum einstellen oder sterben. Zudem sollte die Zelle einen an das Medikament bzw. den Inhibitor angepassten Stoffwechsel zeigen. Dies wäre bei stark toxisch beeinträchtigten Zellen nicht möglich. Außerdem wurde zur Extraktion der Markierungsdaten, u.a. von organischen Säuren, genug Biomasse benötigt. Niklas *et al.* (2009) legten in ihrer stöchiometrischen MFA von Medikamenteneinflüssen auf den Stoffwechsel den EC_{50} -Wert als subtoxische Konzentration der getesteten Substanzen fest. In den beiden Publikationen von Strigun *et al.* (2011, 2012) wurde ein LDH-Assay bzw. ein Proliferationstest durchgeführt. Es wurden alle Konzentrationen als subtoxisch angesehen, welche keine LDH ausgesondert haben oder eine 95 %-ige Proliferation aufwiesen. Für die Validierungsexperimente der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Konzentration der Inhibitoren gewählt, bei der kein toxischer Effekt im LDH-Assay zu sehen war. Dies resultierte in sehr unterschiedlichen Viabilitäten der behandelten Zellen und, dadurch bedingt, zu unterschiedlicher Aussagekraft der Ergebnisse der ^{13}C -MFA (vgl. Abbildung 24). Die Flusswerte von 3-Bromopyruvat zeigen kaum signifikante Unterschiede zur Kontrolle und lassen sich nur im Trend interpretieren. Ursache dafür waren die geringen Unterschiede in der Wachstumsrate, den Austauschraten und den Markierungsdaten. Bei L-Don war die Viabilität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle sehr gering, was gehäuft zu signifikant abweichenden Austauschraten, Markierungsdaten und Flüssen führte. Auch hier war es jedoch schwierig, anhand der Flüsse Rückschlüsse zu ziehen. Es war nicht nur ein Stoffwechselweg, sondern der gesamte Zellstoffwechsel inhibiert. Bei einer Viabilität von rund 60 %, wie bei den mit UK-5099 behandelten Zellen, konnten ausreichend signifikante Veränderungen im Stoffwechsel beobachtet werden. Das ermöglicht aussagekräftige Interpretationen der Flussveränderungen. Daher wurde sich für das auf die Validierung folgende Screening mit Medikamenten für einen 25 %-igen toxischen Effekt im LDH-Assay entschieden. Im Versuch lag die Viabilität der Zellen zwischen 91 % und 104 %. Die Unterschiede zwischen den experimentellen Austauschraten und Markierungsdaten waren gering. Es waren Veränderungen in den Flusskarten ersichtlich, jedoch waren diese in Bezug auf die Toxizität der Medikamente nicht aussagekräftig genug. Aus diesem Grund wurde im Hauptexperiment ein 50 % toxischer Effekt im LDH-Assay als

Konzentrationsrichtwert genutzt. Dies führte zu Viabilitäten zwischen 62 % und 87 % und folglich zu gut interpretierbaren Flusswerten.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Validierung der ^{13}C -MFA

4.2.2.1 UK-5099

UK-5099 ist ein potenter Inhibitor des mitochondrialen Pyruvat Carriers (Patterson *et al.*, 2014). Der Stoff bindet an eine Thiolgruppe des Carriers, wodurch dieser in seiner Funktion eingeschränkt wird (Zhong *et al.*, 2015). Daher wurde weniger Markierung im Citratzyklus erwartet. In der Flusskarte der mit UK-5099 behandelten Zellen wurde zudem mit einer Erhöhung der anaplerotischen Flüsse zur Erhaltung der Aktivität des Citratzyklus gerechnet (Yang *et al.*, 2014).

Die Aufnahmeraten der mit UK-5099 behandelten Zellen sind im Vergleich zur Kontrolle nur punktuell signifikant verschieden (vgl. Tabelle 13). Vor allem fällt eine signifikant erhöhte Glutamatabgabe auf.

Die Markierungsdaten von Ribose weisen auf einen erhöhten nichtoxidativen Pentosephosphatweg in Bezug auf die Ribosese Synthese in den behandelten Zellen hin. Der gesteigerte nichtoxidative Pentosephosphatweg verweist mit dem ebenfalls gesteigerten Serinstoffwechsel auf eine erhöhte Herstellung von Nucleotiden in den mit UK-5099 behandelten Zellen hin. Citrat und Malat zeigen eine signifikante Reduzierung der Markierung bei beiden Tracern (vgl. Abbildung 26). Dies lässt vermuten, dass entweder die Glykolyse stark reduziert oder der Transport der Markierung in das Mitochondrium gestört ist. Die MIV von Alanin (vgl. Abbildung 27) zeigt eine Verringerung der Markierung, die MIV von Pyruvat (vgl. Abbildung A 43) hingegen hat signifikant mehr Markierung. Da Pyruvat vermehrt im Zytosol gebildet wird, kann dies als Hinweis für die Markierungsaufnahme in den einzelnen Kompartimenten der Zelle genutzt werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Pyruvattransport in das Mitochondrium gestört ist.

In der vergleichenden Flusskarte von UK-5099 (vgl. Abbildung 29) ist ein reduzierter Glykolysefluss abgebildet, welcher in eine stark verringerte Aufnahme von Pyruvat in das Mitochondrium (*T Pyr*) übergeht. Diese Ergebnisse wurden erwartet, da der Pyruvat-Carrier von UK-5099 gehemmt wird (Patterson *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2015). Der verringerte Transporterfluss kann über eine negative Rückkopplung auch für den verringerten Glykolysefluss verantwortlich sein (Dong *et al.*, 2017). Die reduzierte Aufnahme von Pyruvat in das Mitochondrium und der erhöhte Fluss des zytosolischen *Malic Enzyme (ME.c)* haben einen erhöhten Fluss der zytosolischen Alaninaminotransferase (*AA Ala.c*) zur Folge. Im Vergleich dazu

ist die mitochondriale Alaninaminotransferase (*AA Ala.m*) leicht gesunken. Dies ist u.a. auf die Blockade des Pyruvat-Carriers und somit den verringerten *T Pyr* Fluss zurückzuführen.

Wie schon in den Aufnahmeraten beobachtet, sind die Flüsse der Glutaminverwertung unter UK-5099 Behandlung stark gestiegen. Durch die signifikant erhöhte Glutaminaufnahme in die Zelle wird mehr Glutamat in das Mitochondrium aufgenommen. Dies dient trotz der gesunkenen Glykolyse zur Aufrechterhaltung des Citratzyklus (Yang *et al.*, 2014). Außerdem kann ein reverser Fluss der Isocitratdehydrogenase (*ISDH*) beobachtet werden, wodurch Citrat aus α -Ketoglutarat hergestellt wird. Es wird aus dem Mitochondrium signifikant vermehrt in das Zytosol abgegeben. Dieses Citrat wird durch die ATP-Citrat-Lyase in Acetyl-CoA und OAA umgewandelt. Das OAA wird wieder in das Mitochondrium aufgenommen. So hält die erhöhte Glutaminverwertung durch die anaplerotischen Flüsse die Funktion des Citratzyklus aufrecht. Bricker *et al.* (2012) hat ebenfalls beweisen können, dass Säugerzellen, die weniger oder kein Pyruvat aufnehmen können, eine normale Mitochondriumfunktion über Glutaminverwertung aufrechterhalten können. Die Favorisierung der reduktiven Carboxylierung von Glutamin anstatt der Pyruvatcarboxylase durch die Zelle ist auch in braunen Fettzellen, welche Glutamin als Energielieferant nutzen, beobachtet worden (Young *et al.*, 2008). Yang *et al.* (2014) hat dies mit aus Zellen isolierten Mitochondrien unter der Verwendung mit UK-5099 in einer Markierungsstudie getestet. Auch hier konnte eine verstärkte Glutaminverwertung die Funktion des Mitochondriums aufrechterhalten. Metallo *et al.* (2012) hat in seiner Arbeit bewiesen, dass eine reverse *ISDH*, also die reduktive Carboxylierung von Glutamin, als Hauptquelle für die Fettsäuresynthese unter Hypoxie dient.

In dieser Arbeit konnten übereinstimmend mit der Literatur weniger Markierung in der Traceranalyse mit Glukose unter Behandlung mit UK-5099, weniger *T Pyr* Fluss, mehr glutaminabhängige Produktion von Acetyl-CoA und eine Aufrechterhaltung der mitochondrialen Flüsse über Glutamin beobachtet werden (Yang *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu Yang *et al.* (2014) wurde experimentell in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Glutamatabgabe gemessen. Da alle anderen Ergebnisse der etablierten ^{13}C -MFA mit der Literaturanalyse übereinstimmen, kann die Pipeline als validiert betrachtet werden.

4.2.2.2 3-Bromopyruvat

3-Bromopyruvat inhibiert mehrere Enzyme, u.a. die Hexokinase Typ II und die Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), was zur Beeinträchtigung des glykolytischen Flusses führt (Pereira Da Silva *et al.*, 2009; Shoshan, 2012). In der Flusskarte der mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen wurde daher mit einem verringerten glykolytischen Fluss gerechnet. Auch

wurde als Ausgleich für den Mangel an Baustoffen für die Zelle aus der Glykolyse eine gestiegene Aktivität der anaplerotischen Reaktionen und des Citratzyklus erwartet.

In der Flusskarte von 3-Bromopyruvat (vgl. Abbildung A 47) sind wenig signifikante Unterschiede zu erkennen. Es sind signifikante Reduzierungen der Glykolyseflüsse, der Fermentierung und des Serinstoffwechsels zu sehen. Ein erhöhter Fluss über das zytosolische *Malic Enzyme (ME.c)* führt trotz dessen zu einem signifikant höheren Fluss über den Pyruvat-Carrier (*T Pyr*). Der Citratzyklus ist leicht gesteigert. Die Hemmung der Glykolyse liegt an der Inhibierung der Hexokinase II (Apfel *et al.*, 1984) und der GAPDH (Pereira Da Silva *et al.*, 2009). Bean *et al.* (2014) nutzte diese potente Inhibierung der Glykolyse durch 3-Bromopyruvat zur Verstärkung der Wirkung von Chemotherapeutika. Die Flusskarte bildet damit die erwarteten Ergebnisse ab, jedoch waren nicht alle Unterschiede signifikant. Daher sind die daraus abgeleiteten Interpretationen nicht vollständig mit signifikanten Ergebnissen belegt, sondern lediglich Trendanalysen. Dies wiederum erschwert eine tiefergehende Interpretation der Stoffwechseländerungen.

4.2.2.3 L-Don

L-Don ist ein Glutamin-Antagonist. Es inhibiert hauptsächlich die Glutaminase, indem es kovalent an das aktive Zentrum des Enzyms bindet (Huber *et al.*, 1988; Crosby, 2015). Da L-Don Glutamin strukturell sehr ähnlich ist, behindert es des Weiteren viele Reaktionen, in denen Glutamin als Stickstoffdonor agiert (Lemberg *et al.*, 2018). Da Glutamin in Krebszellen eine der Hauptkohlenstoffquellen ist (Chiaradonna *et al.*, 2012), wurden in der Flusskarte deutliche Einschnitte im Citratzyklus vermutet. Es wurden eine verringerte Umwandlung von Glutamin in Glutamat und somit eine verringerte Aufnahme von Glutamat in das Mitochondrium erwartet (Kisner *et al.*, 1980). Außerdem sollte durch die verringerte Verwertung von Glutamin und die dadurch entstehende Ansammlung im Zytosol eine geringere Aufnahme aus dem Medium erfolgen.

Die vergleichende Flusskarte von L-Don (vgl. Abbildung A 48) zeigt starke Unterschiede. Jedoch entsprechen diese nicht den Erwartungen. Die mit L-Don behandelten Zellen zeigten visuell schon während des Versuchs starke Unterschiede zu den Kontrollzellen. Das bestätigte sich in der im Vergleich sehr geringen Viabilität der Zellen, was der gewollten Subtoxizität widersprach. Durch das geringe Wachstum der Zellen war der für die ¹³C-MFA nötige Einbau der Markierung in die proteingebundenen Aminosäuren stark reduziert. Die MIV der Aminosäuren und Intermediate bildet dies deutlich ab. Die experimentellen Daten führten folgend in der Modellierung zu stark reduzierten absoluten Flüssen und einem nicht vollständig aufgelösten Stoffwechsel. In der vergleichenden Flusskarte sind im Mitochondrium u.a. leicht reduzierte

Flüsse des Citratzyklus und ein *futile cycle* zu sehen. Die absoluten Flüsse zeigen fast gar keinen Kohlenstofffluss durch die gesamte Zelle. Dadurch bildet die Flusskarte unerwartete Flussverteilungen ab, die schwer zu interpretieren sind. Wahrscheinlich ist der abgebildete Stoffwechsel nicht der von wachsenden, sondern von stark toxisch beeinträchtigten Zellen. L-Don wurde schon in den 1970er Jahren als potentielles Zytostatikum in Betracht gezogen (Catane *et al.*, 1979). Allerdings war es systemisch toxisch und ist bis heute nicht als Zytostatikum zugelassen, wobei noch immer an der Substanz geforscht wird (Lemberg *et al.*, 2018). Dieses Stadium der Systemtoxizität wurde vermutlich mit der untersuchten L-Don Konzentration erreicht, was zu den nicht interpretierbaren Ergebnissen führte.

4.2.3 Schlussfolgerung Validierungsexperiment

Aus den Ergebnissen des Validierungsexperiments ergab sich, dass die Flusskarten von UK-5099 und 3-Bromopyruvat mit der Literatur übereinstimmende Ergebnisse zeigen. Dies beweist, dass die etablierte ¹³C-MFA-Pipeline an HepG2-Zellen genutzt werden kann, um die Auswirkungen von gezielten Inhibitionen auf den primären Stoffwechsel abzubilden.

Die Ergebnisse der Inhibitoren 3-Bromopyruvat und L-Don geben außerdem für die weiteren Experimente einen Hinweis auf die benötigte Substanzkonzentration. Sie beweisen, dass in zu subtoxischen Konzentrationen wie bei 3-Bromopyruvat nur Hinweise über eine Trendanalyse der Ergebnisse der Flusswerte erlangt werden können. Um signifikante Aussagen über die Auswirkungen von Substanzen auf die Flüsse des primären Stoffwechsels treffen zu können, ist allerdings eine höhere Substanzkonzentration nötig. Gleichzeitig darf die Inhibierung der Zellviabilität nicht wie bei L-Don zu hoch sein, da sonst keine Anpassung des Stoffwechsels an spezifische Inhibitionen erfolgt, sondern für die Zelle tödliche Toxizitätsmechanismen einsetzen. Daher wurden die Substanzkonzentrationen, wie in 4.2.1 diskutiert, für die nachfolgenden Versuche angepasst.

4.3 Screening von lebertoxischen Medikamenten per ^{13}C -MFA

Ziel der Arbeit war zu überprüfen, dass sich die ^{13}C -MFA zur Erkennung von potentiell lebertoxischen Veränderungen im Stoffwechsel eignet.

Um dies zu testen, wurde zunächst ein Screening von mehreren Arzneistoffen durchgeführt. Dafür wurden verschiedene, bekannt lebertoxische Medikamente mit der ^{13}C -MFA getestet. Ziel des Screenings war es, Muster in den veränderten Stoffwechseln zu finden, um daraus auf lebertoxische Mechanismen im primären Stoffwechsel zu schließen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden interessante Substanzen aus dem Screening weitergehend untersucht. DILI liefern diverse klinische Symptome. Daher wurde versucht bei der Auswahl der Medikamente verschiedene Stoffklassen und DILI-Arten zu beachten. So verursachen Cisplatin und Paracetamol intrinsische DILI, Diclofenac, Verapamil, Tetracyclin, Chlorpromazin, Isoniazid, Amiodaron und Troglitazon idiosynkratische DILI (Lee, 2003; Watkins *et al.*, 2006; Hamilton *et al.*, 2016).

Das Screening ergab umfangreiche Ergebnisse, welche zur besseren Interpretierbarkeit in einer *Heatmap* zusammengefasst wurden (vgl. Abbildung 33). Die Ergebnisse wurden auf Gemeinsamkeiten zwischen den Medikamenten untersucht, um so Gruppen zu bilden. Aus den einzelnen Gruppen wurde je ein Vertreter für die nachfolgende, tiefergehende Analyse der DILI ausgewählt.

Diclofenac, Cisplatin, Tetracyclin und Chlorpromazin zeigen erhöhte Glykolyse- und Fermentationsflüsse, während die Flüsse des PPP und des Serinstoffwechsels reduziert sind. Da es von den Medikamenten am häufigsten DILI verursacht, wurde aus dieser Gruppe Diclofenac für weitere Untersuchungen ausgewählt (Leise *et al.*, 2014). Diclofenac ist ein freiverkäufliches Schmerzmittel aus der Gruppe der NSAIDs (Geisslinger *et al.*, 2020). Durch die freie Verfügbarkeit des Medikaments kommt es zu ungewollten Überdosierungen, nicht empfehlenswerten Langzeitanwendungen und Kombinationen mit anderen Arzneimitteln, welche zusammen mit Diclofenac die Häufigkeit von Leberschäden erhöhen. Zudem hat Diclofenac von allen Medikamenten der Gruppe der NSAIDs die größte Häufigkeit an DILI-Fällen (Schmeltzer *et al.*, 2016).

Paracetamol und Isoniazid unterscheiden sich im Muster von der vorherigen Gruppe durch eine zusätzliche Steigerung des Pyruvat-Carrier Flusses (*T Pyr*). Paracetamol und Isoniazid rufen beide häufig DILI hervor, Paracetamol allerdings intrinsische und Isoniazid idiosynkratische, immunvermittelte DILI (Hamilton *et al.*, 2016). Aus diesen beiden Stoffen wurde Paracetamol ausgewählt, da es intrinsische DILI zeigt und somit im Primärstoffwechsel besser abbildbare

Effekte als Isoniazid liefern sollte. Auch zeigte Paracetamol in den Flusswerten eine starke nicht signifikante Reduzierung des oxidativen Pentosephosphatweges, welche keines der anderen Medikamente so deutlich abbildete. Zudem ist Paracetamol als freiverkäufliches Schmerzmittel die Ursache für die Hälfte aller DILI in den USA (Chalasan *et al.*, 2015). Außerdem gibt es extensive Forschung über die Toxizitätsmechanismen auf Leberzellen durch Paracetamol (Jaeschke *et al.*, 2012; Lancaster *et al.*, 2015; Maes *et al.*, 2016; Ramachandran *et al.*, 2017; McGill *et al.*, 2019). Daher eignet sich Paracetamol, um den Toxizitätsmechanismus per ^{13}C -MFA genauer zu analysieren.

Verapamil und Tacrin zeigen im Screening im Vergleich zu den anderen Gruppen eine Reduzierung der Aktivität des Citratzyklus. Diese Reduzierung zeigte sich in Tacrin im Vergleich zu Verapamil besonders stark. Auch ist die Reduzierung der Serinsynthese in Tacrin stärker als in Verapamil. Zu den Ursachen von DILI, welche durch Tacrin verursacht wurden, existiert kontroverse Literatur (Berson *et al.*, 1996; Lagadic-Gossmann *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2007; Niklas *et al.*, 2009). Auch wurde das Antidementivum wegen der Verursachung schwerer Leberschäden vom Markt genommen (Pessayre *et al.*, 2012). Mit diesem Hintergrund eignete sich aus dieser Gruppe Tacrin für eine weitergehende Analyse im nächsten Experiment am besten.

Amiodaron und Troglitazon zeigen in den Flusswerten eine verringerte Serinsynthese, eine verringerte Glutaminverwertung und eine verringerte Citratverwertung. Dies deutet auf eine geringere Aktivität des Citratzyklus und somit des Mitochondriums hin. Troglitazon zeigt im Vergleich zu Amiodaron aufgrund der Arzneimittelwirkung einen direkten Effekt auf den primären Stoffwechsel. Als Antidiabetikum erhöht es die Synthese von Glykolyseenzymen und hat somit eine Steigerung der Glykolyseaktivität zur Folge (Geisslinger *et al.*, 2020). Interessant war zu prüfen, ob dies auch der Fall bei der ohnehin schon gesteigerten Glykolyse von Krebszellen ist. Außerdem wurde dieses Medikament im Jahr 2000 aufgrund von Lebertoxizität vom Markt entfernt (Hamilton *et al.*, 2016). Daher wurde Troglitazon für das weiterführende Experiment ausgewählt.

Diese vier Medikamente wurden im nachfolgenden Experiment mit zwei zusätzlichen Tracern getestet, um aussagekräftigere Flussergebnisse zu bekommen. Crown *et al.* (2012) legen in ihrer Studie dar, dass die Tracerwahl stark von den aufzulösenden Stoffwechselwegen abhängt. Um die Flüsse im Mitochondrium besser aufzulösen, wurde zusätzlich $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glutamin verwendet (Metallo *et al.*, 2009; Walther *et al.*, 2012). Außerdem wurde postuliert, dass sich $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glukose besser als $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glukose zum Auflösen des oxidativen PPP eignet (Metallo *et al.*, 2009; Antoniewicz, 2018). Aus diesen Gründen wurde zusätzlich zu den im Screening

verwendeten Tracern noch 1,2-¹³C₂-Glukose und U-¹³C-Glutamin im nächsten Experiment genutzt.

Im Screening war des Weiteren die substanzspezifische Inhibition des Wachstums relativ gering. Aus den in Kapitel 4.2.1 diskutierten Gründen wurde für das nachfolgende Experiment die LD₅₀-Konzentration der Medikamente gewählt.

4.4 Hauptexperiment

Im Hauptexperiment wurden die vier im Screening ausgewählten Stoffe mit zusätzlichen Tracern und erhöhter Substanzkonzentration untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den aus der Literatur bekannten Toxizitätsmechanismen verglichen, um zu einer Aussage über die Eignung von ¹³C-MFA an HepG2-Zellen für Toxizitätsanalysen zu gelangen.

4.4.1 Paracetamol

Paracetamol ist zwar die Substanz, die am häufigsten DILI hervorruft, sie zeigt jedoch in allen Ergebnissen des Hauptexperiments die wenigsten Unterschiede zur Kontrolle. Es unterscheiden sich nur 25,45 % der Flüsse signifikant (vgl. Tabelle 21). Die Literatur zu Paracetamol Hepatotoxizität sieht viele mögliche Mechanismen der Toxizität, stimmt jedoch darin überein, dass die Bildung des reaktiven Abbauprodukts NAPQI eine Hauptursache dafür ist (Saito *et al.*, 2010; Tujjos *et al.*, 2011; Ramachandran *et al.*, 2017; Kuna *et al.*, 2018). NAPQI wird durch GSH entgiftet. Sobald dieser Konjugationsweg gesättigt ist, kann NAPQI mit Proteinen reagieren und sie somit in ihrer Funktion stören (Lancaster *et al.*, 2015). Dies führt zu einer mitochondrialen Dysfunktion und einer gestörten ATP Produktion. Dadurch wird die Redoxhomöostase gestört und es kommt zur Apoptose oder Nekrose (Kuna *et al.*, 2018). Im vorliegenden Modell ist der letztere Teil nicht abbildbar, da zur Durchführung einer stationären ¹³C-MFA ein Einbau von ¹³C in die Bausteine der Zelle und somit Zellwachstum nötig ist.

Sobald NAPQI entsteht und nicht mehr über GSH reduziert werden kann, kommt es zu mitochondrialem Stress (Du *et al.*, 2017). Dieser äußert sich in der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Tatsächlich wurde berichtet, dass die Produktion von ROS unter Paracetamoltoxizität initial im Mitochondrium stattfindet (Jaeschke *et al.*, 2012). Die Flusskarte von Paracetamol (vgl. Abbildung 39) bestätigt dies. Es ist ein leicht verringerter oberer Citratzyklus ersichtlich, welcher durch einen verringerten Citrattransport ins Zytosol (*T Cit*) einen erhöhten Transport von Glutamat in das Mitochondrium (*T Glu*) Fluss ausgeglichen wird. Der untere Teil des Citratzyklus ist daraufhin leicht gesteigert. Im Mitochondrium ist nur der mitochondriale *Malic Enzyme (ME.m)* Fluss signifikant erhöht. Der *ME.m* Fluss ist maßgeblich für

die Produktion von NADPH im Mitochondrium zuständig. NADPH wird benötigt, um aus GSSG wieder GSH herzustellen (Sies *et al.*, 2017). Die 394 %-ige Steigerung des *ME.m* Flusses könnte also zum Abfangen des reaktiven Abbauprodukts NAPQI dienen und somit die Funktion des Mitochondriums aufrechterhalten. Dies konnte durch das GSSG/GSH Verhältnis bestätigt werden, welches bei Paracetamol signifikant gestiegen ist (vgl. Abbildung 44). Die Flusskarte bildet somit den Zellstoffwechsel ab, bevor eine starke Toxizität durch Paracetamol eintritt. Eine leichte Toxizität ist jedoch zu erkennen, was auch anhand der verringerten Viabilität (vgl. Tabelle 19) und des verringerten GSH/GSSG Verhältnisses (vgl. Abbildung 44) sichtbar wird.

Zytosolisch wird NADPH hauptsächlich durch den oxidativen Pentosephosphatweg (*oxPPP*) Fluss produziert (Schittenhelm *et al.*, 2019). Die Flusskarte von Paracetamol zeigt erhöhte Glykolyseflüsse, eine erhöhte Fermentation, verringerte PPP Flüsse und daher zytosolisch eine verringerte NADPH Produktion. Wenn der oxidative Stress die ganze Zelle betreffen würde, könnte hier eine Steigerung der NADPH Produktion zugunsten der GSH Regenerierung erwartet werden. Da diese Steigerung nicht eingetreten ist, verweist es darauf, dass die ROS Produktion in diesem Fall auf das Mitochondrium beschränkt ist.

Zusammenfassend zeigt Paracetamol Ansätze für eine entstehende Toxizität im primären Stoffwechsel. Diese kann auf zwei Dinge hinweisen. Im primären Stoffwechsel ist die Depletion von GSH wahrscheinlich der Hauptgrund für die Toxizität und daher sind kaum Veränderungen in der Flusskarte beobachtbar. Da trotz unvermindertem GSH jedoch die Viabilität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle verändert war, kann dies bedeuten, dass es einen weiteren, im Modell nicht abbildbaren Toxizitätsmechanismus gibt, welcher parallel stattfindet.

4.4.2 Diclofenac

In der Flusskarte von Diclofenac (vgl. Abbildung 40) ist eine Steigerung des Citratzyklus erkennbar, welche durch einen leicht erhöhten Transport von Glutamat in das Mitochondrium (*T Glu*) und eine leicht gesteigerte Aktivität des Pyruvat-Carriers (*T Pyr*) verursacht wird. Im Durchschnitt sind die Flüsse im Vergleich zur Kontrolle um 62,02 % gestiegen. Die Produktion von ATP ist im Vergleich zur Kontrolle jedoch leicht gesunken (vgl. Abbildung 43). Normalerweise ist die Produktion von ATP mit der Aktivität des Mitochondriums gekoppelt, was die Daten im Falle der mit Diclofenac behandelten Zellen nicht unterstützen. Dies weist auf eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung hin. Niklas *et al.* (2009) konnten dies in einer stöchiometrischen MFA mit Diclofenac ebenfalls beobachten. Für Diclofenac finden sich in der Literatur mehrfach Verweise auf eine entkoppelnde Wirkung des Medikaments (Boelsterli, 2003; Syed *et al.*, 2016; Ramachandran *et al.*, 2018). Es wird vermutet, dass Diclofenac an sich und nicht ein

Abbauprodukt für die Entkopplung verantwortlich ist (Jaeschke *et al.*, 2012). Eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung hat in Zellen außerdem zur Folge, dass die Glykolyse auf aerob umgestellt wird, um den ATP-Mangel auszugleichen. Es folgt eine Laktatüberproduktion (Jiang *et al.*, 2019). Da in diesem Modell an Krebszellen gearbeitet wurde, deren Glykolyse von vornherein aerob abläuft, war es nicht sicher, wie sich diese Veränderung im Modell äußert. In der Flusskarte konnte im oberen Teil der Glykolyse eine signifikante Reduzierung der Flüsse beobachtet werden, welche zu leicht reduzierten Flüssen der Serinsynthese aus PGA (AA Ser) und signifikant erhöhten Flüssen im Pentosephosphatweg führt. In der Arbeit von Niklas *et al.* (2009) wurden ebenfalls verringerte glykolytische Flüsse beobachtet. Dieses konträre Ergebnis zu Jiang *et al.* (2019) könnte an einer zusätzlichen Wirkung von Diclofenac als PPAR γ -Antagonist liegen (Gan, 2010). Da PPAR γ auch für die Produktion der glykolytischen Enzyme zuständig ist, würde eine Inhibition der Transkriptionsfaktoren die leichte Reduzierung der Glykolyse trotz der Entkopplung erklären.

Des Weiteren wird durch die erhöhte Respiration im Mitochondrium mehr NADH/NADPH verbraucht. Dies verringert die Aktivität der NADP-Transhydrogenase, was wiederum die Regeneration von GSH aus GSSG vermindern kann (Berson *et al.*, 2006). Die GSSG Konzentration ist unter Behandlung der Zellen mit Diclofenac signifikant gestiegen, gleichzeitig stieg die GSH Konzentration fast um das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abbildung 44). Dies könnte an der Steigerung des *oxPPP* Flusses liegen. Über diesen Fluss wird NADPH hergestellt, welches wiederum zur Regeneration von GSH genutzt werden kann (Sies *et al.*, 2017). Das Verhältnis von GSSG zu GSH zeigt für Diclofenac eine Steigerung im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abbildung 44). Daher kann die Aussage getroffen werden, dass die Behandlung der Zellen mit Diclofenac in der getesteten Konzentration keinen nennenswerten oxidativen Stress verursacht.

In der Flusskarte von Diclofenac ist zudem eine erhöhte Abgabe von Glutamat in das Medium zu sehen. Dieser Fakt wird in der Diskussion zu Tacrin aufgegriffen und genauer diskutiert.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der ¹³C-MFA mit Diclofenac, wie in der Literatur beschrieben, eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Es scheint jedoch einen zusätzlichen Toxizitätsmechanismus zu geben, da die Glykolyse nicht wie erwartet gestiegen ist. Oxidativer Stress ist in der getesteten Substanzkonzentration nicht an der Toxizität beteiligt.

4.4.3 Tacrin

Unter Behandlung von Tacrin zeigen sich im Modell 49,09 % signifikant verschiedene Flüsse zur Kontrolle (vgl. Tabelle 21). Tacrin wird in der Literatur wie Diclofenac als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung beschrieben (Berson *et al.*, 1996; Niklas *et al.*, 2009).

Das ist deutlich in der Flusskarte von Tacrin erkennbar (vgl. Abbildung 41). Die Flüsse des Citratzyklus sind gestiegen, was hauptsächlich vom verringerten Transport von Citrat und Malat in das Zytosol (*T Cit* und *T Mal*) und einer gesteigerten Glutamataufnahme in das Mitochondrium (*T Glu*) herrührt. Gleichzeitig produzieren die Zellen signifikant weniger ATP als die Kontrolle (vgl. Abbildung 43). Dieses Bild weist, wie auch bei Diclofenac, auf die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung hin. Durch eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung wird der Protonentransport im Mitochondrium von der ATP-Synthase entkoppelt (Berson *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2019). Tacrin oder ein Abbauprodukt übernehmen hierbei den Protonentransport (Meng *et al.*, 2007). Dadurch wird weniger ATP hergestellt. Da weniger ATP verfügbar ist, reguliert die Zelle den Citratzyklus nach oben.

Die gestiegenen Glykolyseflüsse in der Flusskarte weisen ebenfalls auf eine Entkopplung hin. Die Glykolyse steigt, um den ATP Mangel der Zelle durch die Entkopplung auszugleichen (Jiang *et al.*, 2019). Tacrin zeigt im Vergleich zur Kontrolle auch eine verringerte Energieladung, welche auf einen gestörten Redoxhaushalt hindeutet (vgl. Abbildung 43). Dies ist bei Diclofenac, dem anderen Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung in der vorliegenden Arbeit, nicht der Fall. Dies deutet auf weitere Toxizitätsmechanismen außerhalb der Entkopplung hin.

Das GSSG/GSH Verhältnis ist bei Tacrin von allen Substanzen am stärksten gestiegen (vgl. Abbildung 44). Das bedeutet, dass der oxidative Stress in den mit Tacrin behandelten Zellen sehr hoch ist. Die Beteiligung von oxidativem Stress an der Hepatotoxizität von Tacrin wird in der Literatur kontrovers gesehen (Meng *et al.*, 2007). In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sind jedoch klare Anzeichen für oxidativen Stress durch Tacrin zu sehen. Der mitochondriale *Malic Enzyme (ME.m)* Fluss zur Produktion von NADPH ist gestiegen, während jedoch der Fluss des oxidativen Pentosephosphatweges (*oxPPP*) gesunken ist. Zur Regeneration von GSH ist NADPH notwendig, weshalb der *oxPPP* steigen müsste. Da dies nicht der Fall ist, verschlimmert es den zytosolischen oxidativen Stress.

Die Flusskarte zeigt eine erhöhte Aufnahme von Glutamin in die Zelle. Dieses wird zu Glutamat umgewandelt und leicht verstärkt in das Mitochondrium abgegeben. Des Weiteren steigt die Glutamatabgabe in das Medium stark. Dies ist auch in der Flusskarte von Diclofenac ersichtlich. Niklas *et al.* (2009) konnten das in ihrer MFA bei Diclofenac und Tacrin ebenfalls beobachten. Sie argumentieren, dass durch eine gesteigerte Apoptose der Zellen Glutaminase in das Medium abgegeben wird. Dadurch wird extrazellulär mehr Glutamat produziert, was irrtümlich als erhöhter intrazellulärer Fluss erscheint. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit widerlegt werden. Für eine stationäre ¹³C-MFA wird ein Zellwachstum über einen längeren Zeitraum benötigt, um die ¹³C-Atome adäquat in die Biomasse der Zelle einzubauen. Es findet *al.so* keine

Apoptose, sondern lediglich ein verringertes Wachstum statt. Für eine stöchiometrische MFA wie bei Niklas *et al.* (2009) ist kein Wachstum notwendig, so kam es zur falschen Annahme einer erhöhten Apoptose. Da diese nicht stattfindet, kann keine Glutaminase in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Auch würden sonst alle in der vorliegenden Arbeit getesteten Substanzen eine erhöhte Glutamatabgabe aufweisen, was nicht der Fall ist. Bisher ist ungeklärt, wodurch die erhöhte Glutamatabgabe hervorgerufen wird. Es kann jedoch ein Zusammenhang mit der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung vermutet werden, da nur bei diesen Substanzen eine erhöhte Abgabe zu beobachten war. Dieser Sachverhalt benötigt weitere Nachforschung, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Zusammengefasst zeigt Tacrin deutlich, dass sowohl oxidativer Stress als auch die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung an der Toxizität beteiligt sind. Hier gibt es keinen Hinweis auf weitere Stoffwechseleinflüsse.

4.4.4 Troglitazon

Troglitazon hat als PPAR γ -Agonist einen direkten Einfluss auf den primären Stoffwechsel (Geisslinger *et al.*, 2020). Durch die Stimulierung des Rezeptors wird u.a. die Bildung von Glykolyse Enzymen erhöht (Yokoi, 2010). Dadurch steigert die Zelle die Aufnahme von Glukose aus dem Medium.

Die experimentell bestimmte Glukoseaufnahmerate von Troglitazon ist im Vergleich zur Kontrolle um 62,4 % gestiegen. Auch in der Flusskarte ist eine signifikante Steigerung der Glykolyseflüsse zu erkennen (vgl. Abbildung 42). Im Verhältnis dazu sinken die Flüsse des Pentosephosphatweges bei Troglitazon von allen Substanzen am stärksten. Dies liegt jedoch an der Bildung des Verhältnisses zwischen den beiden Flüssen. Die absoluten Flüsse des oxidativen Pentosephosphatweg (*oxPPP*) steigen nicht signifikant. Da die Glykolyse jedoch so stark gesteigert ist, sinken im Verhältnis dazu alle Pentosephosphatwegflüsse.

Die deutlichste Veränderung in der Flusskarte von Troglitazon im Vergleich zur Kontrolle ist die starke Reduzierung der Citratzyklusflüsse. Es beginnt in einer verringerten Aktivität des Pyruvat-Carriers (*T Pyr*) und äußert sich durch einen stark reduzierten Transport von Citrat in das Zytosol (*T Cit*). Hierbei ist zu beachten, dass fast der gesamte Fluss der Citratsynthase (*CS*) in den *T Cit* Fluss zur Aufrechterhaltung der Acetyl-CoA Produktion geht. Die Flüsse im Citratzyklus werden durch einen leicht erhöhten Glutamattransport in das Mitochondrium (*T Glu*) aufrechterhalten. Die ATP Produktion in den mit Troglitazon behandelten Zellen ist ebenfalls reduziert (vgl. Abbildung 43). Diese mitochondriale Dysfunktion ist in der Literatur häufig beschrieben, und sie ist vermutlich die Haupttoxizität von Troglitazon (Nadanaciva *et al.*, 2007; Yokoi, 2010; Kim *et*

al., 2017). Rachek *et al.* (2009) postulieren, dass Troglitazon die mtDNA beschädigt und dadurch die Dysfunktion verursacht wird. Durch die Störung der Mitochondrienfunktion kommt es zu oxidativem Stress. Dies wird auch in weiteren Publikationen berichtet (Lauer *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2012; Segawa *et al.*, 2018). Die Ergebnisse der mit Troglitazon behandelten Zellen in der vorliegenden Arbeit weisen allerdings auf das Gegenteil hin. Das GSSG/GSH Verhältnis zeigt eine Verringerung im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abbildung 44). Der gesteigerte absolute Fluss des *oxPPP* weist auf eine erhöhte Produktion von NADPH und somit eine erhöhte zytosolische Reduzierung von GSSG. Der Fluss des mitochondrialen *Malic Enzyme (ME.m)* ist ebenfalls erhöht, was sowohl zur Aufrechterhaltung der Citratzyklusflüsse wie auch zur erhöhten NADPH Produktion beiträgt. Sie ermöglicht eine vermehrte Reduzierung von GSSG zu GSH im Mitochondrium. Es liegt also sowohl im Mitochondrium als auch im Zytosol mehr GSH vor. Dies macht ein gesteigertes Puffern von oxidativem Stress in den mit Troglitazon behandelten Zellen möglich. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der oxidative Stress unter Behandlung mit Troglitazon erst sehr spät auftritt.

Es wird vermutet, dass der Hauptmechanismus der Toxizität von Troglitazon entweder bei der GSH Depletion, bei oxidativem Stress, einer Mitochondriendysfunktion durch kovalent gebundene Makromoleküle oder an einer Kombination dieser Mechanismen liegt (Rachek *et al.*, 2009; Yokoi, 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass weder die Depletion von GSH noch oxidativer Stress die ursprüngliche Ursache sein können, sondern zuerst die starke Reduzierung der Mitochondrienfunktion eintritt.

Zusammengefasst entsprechen die Auswirkungen von Troglitazon auf den primären Stoffwechsel der HepG2-Zellen von allen getesteten Substanzen am ehesten der Literatur. Es sind klar eine erhöhte Glykolyse und ein stark verringerter Citratzyklus ersichtlich. Dies führt zu dem Rückschluss, dass die Haupttoxizität von Troglitazon im Primärstoffwechsel allein auf eine Hemmung der mitochondrialen Funktion zurückzuführen ist.

4.5 Schlussfolgerungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer ¹³C-MFA an HepG2-Zellen. Es sollte getestet werden, ob sich die etablierte Methode zum Erkennen von lebertoxischen Mechanismen im primären Stoffwechsel eignet.

Es konnte im Rahmen der Arbeit festgestellt werden, dass die Ergebnisse der ¹³C-MFA jeweils ein Stadium der Lebertoxizität abbilden. Arzneimittelabhängige Lebertoxizität umfasst viele lebertoxische Mechanismen, u.a. oxidativen Stress, Schäden an der DNA oder eine mitochondriale Dysfunktion (Abboud *et al.*, 2007; David *et al.*, 2010; Pessayre *et al.*, 2012;

Hamilton *et al.*, 2016). Diese Mechanismen können parallel oder nacheinander stattfinden. In der Literatur zu Paracetamol beispielsweise ist eine direkte Abfolge/Kausalität zwischen den einzelnen Stufen der bisher bekannten Toxizitätsmechanismen beschrieben (Reid *et al.*, 2005; McGill *et al.*, 2012; Lancaster *et al.*, 2015; Ramachandran *et al.*, 2017). Die ^{13}C -MFA erlaubt es, den metabolischen Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Extraktion abzubilden (Niedenführ *et al.*, 2015b). Daher ist der abgebildete Toxizitätsmechanismus der einzelnen Medikamente stark von der getesteten Konzentration und dem Extraktionszeitpunkt abhängig. In der vorliegenden Arbeit konnte u.a. ein anfängliches Stadium der Paracetamoltoxizität abgebildet werden. Dabei wurde bewiesen, dass, unabhängig zu den weitläufig beschriebenen Toxizitätsmechanismen in der Literatur, zusätzlich noch ein weiterer Mechanismus stattfinden muss. Dies wird erst durch die stark konzentrationsabhängige Abbildung der einzelnen Toxizitätsstadien möglich. Die Abbildung eines einzelnen metabolischen Zustands kann somit zur Untersuchung einzelner Toxizitätsmechanismen abhängig von der Fragestellung zu spezifischen Zeitpunkten genutzt werden. Die zeitunabhängige Darstellung von Toxizitätsmechanismen ist mit der etablierten Methode nicht möglich. Alternativen dazu wären u.a. die INST- ^{13}C -MFA oder Traceranalysen. Für HepG2-Zellen existiert zwar eine etablierte INST- ^{13}C -MFA-Pipeline (Hofmann *et al.*, 2008; Maier *et al.*, 2008), jedoch eignet sich diese Methode bisher nicht, um einen Zeitverlauf darzustellen. Ein anderer Ansatz zur Untersuchung von zeitabhängigen Mechanismen oder Enzymsätzen wären Traceranalysen (Schmidt *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 2012; Wilkinson, 2018). Jedoch sind diese Daten nicht so spezifisch oder aussagekräftig für Stoffwechselnetzwerke wie Stoffflussanalysen, da nur einzelne Enzyme bzw. Proteine untersucht werden können (Schmidt *et al.*, 1998; Bruntz *et al.*, 2017).

Wie schon in der Einleitung zur vorliegenden Arbeit erwähnt, zeigt sich, dass die etablierte ^{13}C -MFA-Pipeline nicht alle möglichen medikamentenabhängigen Toxizitätsmechanismen per ^{13}C -MFA an HepG2-Zellen abbildet. Es können weder immunvermittelte Lebertoxizität, Lebertoxizität im Zusammenhang mit mehreren Zelltypen, noch mehr Stoffwechselwege als der Primärstoffwechsel abgebildet werden. Für Isoniazid, welches hauptsächlich immunvermittelte DILI hervorruft (Ramachandran *et al.*, 2018), ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, im Screening der Medikamente Hinweise auf Toxizitätsmechanismen zu finden. Tatsächlich konnten für alle im Screening getesteten Medikamente Hinweise auf Toxizität gefunden werden. Im Hauptexperiment konnte zudem in Übereinstimmung mit der Literatur für alle vier getesteten Medikamente die Lebertoxizität nachgewiesen werden.

Dies bedeutet, dass, unabhängig von der Art der Toxizitätsmechanismen, die ^{13}C -MFA eine adäquate Methode zur frühzeitigen Erkennung möglicher arzneimittelbedingter Lebertoxizität

darstellt. Tritt eine für Lebertoxizität verdächtige Stoffwechselveränderung in der ^{13}C -MFA auf, so sollte diese mit Hilfe von weiteren Analysemethoden genauer untersucht werden. Damit könnte die ^{13}C -MFA zu einem hilfreichen Werkzeug zur Früherkennung von Lebertoxizität in Zellkulturen werden.

5. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte Folgendes erreicht werden:

1. Es wurde erfolgreich eine ^{13}C -MFA an HepG2 Zellen etabliert und validiert. Diese Arbeit ist unseres Wissens das erste Mal, dass eine stationäre ^{13}C -MFA an HepG2 Zellen durchgeführt wurde. Die wichtigsten Punkte, die bei der Etablierung zu beachten waren, konnten in einer Pipeline zusammengefasst werden.
2. Es konnte bewiesen werden, dass sich die ^{13}C -MFA an HepG2-Zellen als Screeningmethode für durch Medikamente verursachte Stoffwechselveränderungen eignet. Es wurde deutlich, dass mehrere Medikamente mit wenigen Tracern in einem mittleren Durchsatz getestet werden können und dabei Muster offensichtlich werden. Die Muster konnten mit Lebertoxizitätsmechanismen abgeglichen und somit ein Hinweis auf Toxizität erlangt werden. Daher ist dies prospektiv eine Methode, um in der Medikamentenentwicklung nach Lebertoxizität zu screenen. Die Medikamente ließen sich zudem anhand der Stoffwechselveränderungen in Gruppen einteilen, die im weiteren Verlauf der Arbeit anhand je eines Vertreters genauer untersucht werden konnten.
3. Mittels einer genaueren Untersuchung einzelner Medikamente konnte bewiesen werden, dass die ^{13}C -MFA eine Methode ist, die sich auch zu tiefgehenden Untersuchungen von Toxizitätsmechanismen und deren Wirkort in der Zelle eignet.

Damit wurden alle Ziele der vorliegenden Arbeit erfolgreich bearbeitet.

Es existieren zudem weiterführende Aspekte, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten. Bei der genaueren Untersuchung von Diclofenac ist aufgefallen, dass die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung nicht der alleinige Toxizitätsmechanismus in der gewählten Konzentration ist. Um den zusätzlichen Toxizitätsmechanismus zu klassifizieren, wären weitere Untersuchungen notwendig. Auch zeigte sich bei Diclofenac und Tacrin, den beiden Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung, eine erhöhte Glutamatabgabe aus den Zellen in das Medium. Dies scheint mit dem Mechanismus der Entkopplung zusammenzuhängen. Um dies zu beweisen, sind auch hier weiterführende Experimente notwendig.

Da die ^{13}C -MFA an HepG2-Zellen nun etabliert ist, wäre es für zukünftige Arbeiten interessant, verschiedene Medikamentenstoffklassen oder DILI-Klassen auf ähnliche Stoffwechsellmuster in ihrer Toxizität zu untersuchen. Falls sich Muster bilden, könnten sich die Toxizitätsmechanismen möglicherweise an bestimmten chemischen Strukturen oder Arzneistoffklassen festlegen

lassen. Dies könnte Hinweise für die zukünftige Entwicklung neuer Arzneistoffe der einzelnen Arzneistoffklassen liefern.

Eine weitere interessante Anwendung wäre eine zeit- bzw. konzentrationsabhängige Betrachtung eines Arzneistoffs mittels ^{13}C -MFA. Dies könnte die genauere Untersuchung der Reihenfolge und der Auswirkungen einzelner Toxizitätsmechanismen auf den primären Stoffwechsel ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Toxizität ist einer der Hauptgründe für den Marktrückzug von Medikamenten. Lebertoxizität bildet dabei die Mehrheit. Insbesondere Lebertoxizität wird oft erst nach der Zulassung von Medikamenten erkannt, da u.a. Tierstudien nur etwa 50 % Korrelation mit der Toxizität am Menschen aufweisen. Zellbasierte Methoden zur Toxizitätstestung sind eine Alternative dazu. Die ^{13}C -MFA (engl. ^{13}C -Metabolic Flux Analysis; ^{13}C -Stoffflussanalyse) ist eine Methode, um den primären Stoffwechsel von u.a. Säugerzellen quantitativ abzubilden. Diese Methode könnte zum Abbilden von Veränderungen im Stoffwechsel von Zellen unter Medikamenteneinfluss genutzt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Nutzung der ^{13}C -MFA zur Erkennung von durch Medikamente verursachten lebertoxischen Mechanismen im primären Stoffwechsel. Die Voraussetzung hierfür war die Etablierung der ^{13}C -MFA-Methodik an HepG2-Zellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine stationäre ^{13}C -MFA an HepG2-Zellen etabliert. Besondere Beachtung fand das experimentelle Design, u.a. die Medienzusammensetzung, das metabolische Fließgleichgewicht und das isotopische Gleichgewicht. Daraus resultierte die in der Arbeit entwickelte experimentelle Pipeline für die Durchführung einer ^{13}C -Stoffflussanalyse.

Darauf folgend konnte die etablierte Methodik mittels dreier Inhibitoren, L-Don, UK-5099 und 3-Bromopyruvat, validiert werden. Dabei wurden die stoffwechselspezifischen Inhibitionen von zwei der Inhibitoren nachgewiesen. Der dritte Inhibitor, L-Don, zeigte für eine verlässliche Interpretation der Ergebnisse eine zu starke Einschränkung der Viabilität. Die Übereinstimmung der Ergebnisse mit der Literatur zeigt, dass die auf der Grundlage der ermittelten Rahmenbedingungen durchgeführte ^{13}C -MFA ermöglicht den primären Stoffwechsel der HepG2-Zellen zu modellieren.

Im nächsten Teil der vorliegenden Arbeit, konnte die Eignung der ^{13}C -MFA als Screeningmethode für Stoffwechselveränderungen bewiesen werden. Die Testung von zehn DILI (engl. *drug induced liver injury*) verursachenden Medikamenten zeigte in den Flussveränderungen der Medikamente übergreifende Muster. Anhand dieser gemeinsamen Auffälligkeiten im Stoffwechsel wurden die Medikamente in Gruppen eingeteilt. Aus diesen Gruppen wurde je ein Vertreter im Hauptexperiment tiefergehend untersucht.

Im Hauptexperiment wurden Paracetamol, Diclofenac, Tacrin und Troglitazon getestet. Anhand der Flusswerte der mit Paracetamol behandelten Zellen konnte bewiesen werden, dass es zusätzlich zu dem vielfach in der Literatur beschriebenen Toxizitätsmechanismus über

Glutathion (GSH) -Depletion noch einen zeitgleich eintretenden, bisher noch nicht beschriebenen Toxizitätsmechanismus geben muss. Die gesteigerte Glykolyse der mit Diclofenac behandelten Zellen lässt darauf schließen, dass hier ebenfalls, zusätzlich zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, ein weiterer, bisher noch nicht beschriebener Toxizitätsmechanismus vorhanden sein könnte. Dabei kann oxidativer Stress aufgrund der unveränderten GSH-Konzentrationen ausgeschlossen werden. Entgegen der kontroversen Literaturlage beweisen die mit Tacrin behandelten Zellen eindeutig, dass oxidativer Stress und die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zeitgleich an der Toxizität des Medikaments beteiligt sind. Die Flusskarte der mit Troglitazon behandelten Zellen bildet mit der starken Steigerung der Glykolyseflüsse die Arzneimittelwirkung ab. Zudem konnte anhand der starken Reduzierung der Citratzyklusflüsse gezeigt werden, dass die Toxizität von Troglitazon hauptsächlich an der Hemmung der Funktion des Mitochondriums liegt und oxidativer Stress in der abgebildeten Toxizitätsphase primär keine Rolle spielt.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit die Eignung der ^{13}C -MFA an HepG2-Zellen zur Abbildung von Veränderungen im primären Stoffwechsel bewiesen werden. Zusätzlich konnte belegt werden, dass sich die ^{13}C -MFA als Screeningmethode für lebertoxische Stoffwechselveränderungen in HepG2-Zellen eignet. Zudem konnte gezeigt werden, dass mittels ^{13}C -MFA auch eine tiefgehende Untersuchung der konzentrationsabhängigen Toxizität einzelner Wirkstoffe möglich ist. Dies ermöglicht ein genaueres Verständnis der zugrundeliegenden Toxizitätsmechanismen, was wiederum zukünftig in der Arzneimittelentwicklung helfen kann. Auch eröffnet die etablierte Methode die Bearbeitung weiterer Fragestellungen, wie u.a. der Untersuchung von medikamentenbedingten Stoffwechseländerungen ganzer Stoffgruppen.

7. Literaturverzeichnis

- Abboud, Gebran and Kaplowitz, Neil (2007), Drug-Induced Liver Injury. *Drug Safety*, 30(4): 277–294.
- Ahn, Woo S., Dong, Wentao, Zhang, Zhe, Cantor, Jason R., Sabatini, David M., Iliopoulos, Othon and Stephanopoulos, Gregory (2018), Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Modulates Nonoxidative Pentose Phosphate Pathway to Provide Anabolic Precursors in Hypoxic Tumor Cells. *AIChE Journal*, 64(12): 4289–4296.
- Ahn, Woo Suk and Antoniewicz, Maciek R. (2011), Metabolic Flux Analysis of CHO Cells at Growth and Non-Growth Phases Using Isotopic Tracers and Mass Spectrometry. *Metabolic Engineering*, 13(5): 598–609. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2011.07.002>
- Ahn, Woo Suk and Antoniewicz, Maciek R (2012), Towards Dynamic Metabolic Flux Analysis in CHO Cell Cultures. *Biotechnology Journal*, 7: 61–74.
- Ahn, Woo Suk and Antoniewicz, Maciek R (2013), Parallel Labeling Experiments with [1 , 2- 13 C] Glucose and [U- 13 C] Glutamine Provide New Insights into CHO Cell Metabolism. *Metabolic Engineering*, 15: 34–47. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2012.10.001>
- Altamirano, C., Illanes, A., Casablancas, A., Gámez, X., Cairó, J. J. and Gòdia, C. (2001), Analysis of CHO Cells Metabolic Redistribution in a Glutamate-Based Defined Medium in Continuous Culture. *Biotechnology Progress*, 17: 1032–1041.
- Altamirano, Claudia, Illanes, Andres, Becerra, Silvana, Cairó, Jordi Joan and Gòdia, Francesc (2006), Considerations on the Lactate Consumption by CHO Cells in the Presence of Galactose. *Journal of Biotechnology*, 125(4): 547–556.
- Altman, Brian J, Stine, Zachary E and Dang, Chi V (2016), From Krebs to Clinic: Glutamine Metabolism to Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(10): 619–634. available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27492215><http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc.2016.71>
- Antoniewicz, M. (2015), Methods and Advances in Metabolic Flux Analysis: A Mini-Review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(3): 317–325.
- Antoniewicz, Maciek R. (2018), A Guide to 13 C Metabolic Flux Analysis for the Cancer Biologist. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(4): 1–13. available at <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0060-y>
- Antoniewicz, Maciek R., Kelleher, Joanne K. and Stephanopoulos, Gregory (2006), Determination of Confidence Intervals of Metabolic Fluxes Estimated from Stable Isotope Measurements. *Metabolic Engineering*, 8: 324–337.
- Antoniewicz, Maciek R., Kraynie, David F., Laffend, Lisa A., González-Lergier, Joanna, Kelleher, Joanne K. and Stephanopoulos, Gregory (2007), Metabolic Flux Analysis in a Nonstationary System: Fed-Batch Fermentation of a High Yielding Strain of E. Coli

Producing 1,3-Propanediol. *Metabolic Engineering*.

- Antoniewicz, Maciek R (2015), Parallel Labeling Experiments for Pathway Elucidation and 13 C Metabolic Flux Analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 36: 91–97. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.014>
- Antoniewicz, Maciek R, Kelleher, Joanne K and Stephanopoulos, Gregory (2007), Accurate Assessment of Amino Acid Mass Isotopomer Distributions for Metabolic Flux Analysis. *Analytical Chemistry*, 79(19): 7554–7559.
- Aoki, Dai, Ueno, Shinichi, Kubo, Fumitake, Oyama, Tohru, Sakuta, Tetsuya, Matsushita, Kenji, Maruyama, Ikuro and Aikou, Takashi (2005), Roxithromycin Inhibits Angiogenesis of Human Hepatoma Cells in Vivo by Suppressing VEGF Production. *Anticancer Research*, 25(1 A): 133–138.
- Apfel, M. A., Ikeda, B. H., Speckhardt, D. C. and Frey, P. A. (1984), Escherichia Coli Pyruvate Dehydrogenase Complex. Thiamin Pyrophosphate-Dependent Inactivation by 3-Bromopyruvate. *Journal of Biological Chemistry*, 259(5): 2905–2909.
- Arai, K., Lee, K., Berthiaume, F., Tompkins, R. G. and Yarmush, M. L. (2001), Intrahepatic Amino Acid and Glucose Metabolism in a D-Galactosamine-Induced Rat Liver Failure Model. *Hepatology*, 2: 360–371.
- Augustin, Robert (2010), The Protein Family of Glucose Transport Facilitators: It's Not Only about Glucose after All. *IUBMB Life*, 62(5): 315–333.
- Basan, Markus, Hui, Sheng, Okano, Hiroyuki, Zhang, Zhongge, Shen, Yang, Williamson, James R. and Hwa, Terence (2015), Overflow Metabolism in Escherichia Coli Results from Efficient Proteome Allocation. *Nature*, 528: 99–104.
- Baxter, C. J., Liu, J. L., Fernie, A. R. and Sweetlove, L. J. (2007), Determination of Metabolic Fluxes in a Non-Steady-State System. *Phytochemistry*.
- Bean, Jonathan F., Qiu, Yi Yong, Yu, Songtao, Clark, Sandra, Chu, Fei and Madonna, Mary Beth (2014), Glycolysis Inhibition and Its Effect in Doxorubicin Resistance in Neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery*, 49(6): 981–984. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2014.01.037>
- Becker, Scott A., Feist, Adam M., Mo, Monica L., Hannum, Gregory, Palsson, Bernhard and Herrgard, Markus J. (2007), Quantitative Prediction of Cellular Metabolism with Constraint-Based Models: The COBRA Toolbox. *Nature Protocols*.
- Beckers, Simone, Noor, Fozia, Müller-Vieira, Ursula, Mayer, Manuela, Strigun, Alexander and Heinzle, Elmar (2010), High Throughput, Non-Invasive and Dynamic Toxicity Screening on Adherent Cells Using Respiratory Measurements. *Toxicology in Vitro*, 24(2): 686–694. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.04.018>
- Bennett, Bryson D., Yuan, Jie, Kimball, Elizabeth H. and Rabinowitz, Joshua D. (2008), Absolute Quantitation of Intracellular Metabolite Concentrations by an Isotope Ratio-Based Approach. *Nature Protocols*, 3: 1299–1311.
- Berg, Jeremy M., Tymoczko, John L. and Stryer, Lubert (2012), Die Oxidative Phosphorylierung,

528–568, in: *Stryer Biochemie*. Heidelberg.

- Berg, Jeremy M., Tymoczko, John L. and Stryer, Lubert (2013a), Glykolyse Und Gluconeogenese, 456–500, in: *Stryer Biochemie*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Berg, Jeremy M., Tymoczko, John L. and Stryer, Lubert (2013b), *Stryer Biochemie*. Springer Spektrum.
- Berson, A., Renault, S., Letteron, P., Robin, M. A., Fromenty, B., Fau, D., Le Bot, M. A., Riche, C., Durand-Schneider, A. M., Feldmann, G. and Pessayre, D. (1996), Uncoupling of Rat and Human Mitochondria: A Possible Explanation for Tacrine-Induced Liver Dysfunction. *Gastroenterology*, 110: 1878–1890.
- Berson, Alain, Cazanave, Sophie, Descatoire, Véronique, Tinel, Marina, Grodet, Alain, Wolf, Claude, Feldmann, Gérard and Pessayre, Dominique (2006), The Anti-Inflammatory Drug, Nimesulide (4-Nitro-2-Phenoxymethane- Sulfoanilide), Uncouples Mitochondria and Induces Mitochondrial Permeability Transition in Human Hepatoma Cells: Protection by Albumin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318: 444–454.
- Biaggio, Rafael Tagé, Abreu-Neto, Mário Soares, Covas, Dimas Tadeu and Swiech, Kamilla (2015), Serum-Free Suspension Culturing of Human Cells: Adaptation, Growth, and Cryopreservation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*: 1495–1507. available at <http://link.springer.com/10.1007/s00449-015-1392-9>
- Boelsterli, Urs A. (2003), Diclofenac-Induced Liver Injury: A Paradigm of Idiosyncratic Drug Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192(3): 309–322.
- Bonarius, Hendrik P.J., Hatzimanikatis, Vassily, Meesters, Koen P.H., De Gooijer, Cornelis D., Schmid, Georg and Tramper, Johannes (1996), Metabolic Flux Analysis of Hybridoma Cells in Different Culture Media Using Mass Balances. *Biotechnology and Bioengineering*.
- Bonnet, Sébastien, Archer, Stephen L., Allalunis-Turner, Joan, Haromy, Alois, Beaulieu, Christian, Thompson, Richard, Lee, Christopher T., Lopaschuk, Gary D., Puttagunta, Lakshmi, Bonnet, Sandra, Harry, Gwyneth, Hashimoto, Kyoko, Porter, Christopher J., Andrade, Miguel A., Thebaud, Bernard and Michelakis, Evangelos D. (2007), A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell*, 11(1): 37–51.
- Boyle, Nanette R., Sengupta, Neelanjan and Morgan, John A. (2017), Metabolic Flux Analysis of Heterotrophic Growth in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *PLoS ONE*, 12(5): 1–23. available at <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0177292>
- Bricker, Daniel K., Taylor, Eric B., Schell, John C., Orsak, Thomas, Boutron, Audrey, Chen, Yu Chan, Cox, James E., Cardon, Caleb M., Van Vranken, Jonathan G., Dephoure, Noah, Redin, Claire, Boudina, Sihem, Gygi, Steven P., Brivet, Michèle, Thummel, Carl S. and Rutter, Jared (2012), A Mitochondrial Pyruvate Carrier Required for Pyruvate Uptake in Yeast, *Drosophila*, and Humans. *Science*, 337: 96–100.
- Bruntz, Ronald C., Lane, Andrew N., Higashi, Richard M. and Fan, Teresa W.M. (2017), Exploring Cancer Metabolism Using Stable Isotope-Resolved Metabolomics (SIRM). *Journal of Biological Chemistry*, 292(28): 11601–11609.

- Buescher, Joerg M., Antoniewicz, Maciek R., Boros, Laszlo G., Burgess, Shawn C., Brunengraber, Henri, Clish, Clary B., DeBerardinis, Ralph J., Feron, Olivier, Frezza, Christian, Ghesquiere, Bart, Gottlieb, Eyal, Hiller, Karsten, Jones, Russell G., Kamphorst, Jurre J., Kibbey, Richard G., Kimmelman, Alec C., Locasale, Jason W., Lunt, Sophia Y., Maddocks, Oliver D K, Malloy, Craig, Metallo, Christian M., Meuillet, Emmanuelle J., Munger, Joshua, Nöh, Katharina, Rabinowitz, Joshua D., Ralser, Markus, Sauer, Uwe, Stephanopoulos, Gregory, St-Pierre, Julie, Tennant, Daniel A., Wittmann, Christoph, Vander Heiden, Matthew G., Vazquez, Alexei, Vousden, Karen, Young, Jamey D., Zamboni, Nicola and Fendt, Sarah Maria (2015), A Roadmap for Interpreting 13C Metabolite Labeling Patterns from Cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 34: 189–201.
- Caspi, Ron, Billington, Richard, Ferrer, Luciana, Foerster, Hartmut, Fulcher, Carol A., Keseler, Ingrid M., Kothari, Anamika, Krummenacker, Markus, Latendresse, Mario, Mueller, Lukas A., Ong, Quang, Paley, Suzanne, Subhraveti, Pallavi, Weaver, Daniel S. and Karp, Peter D. (2016), The MetaCyc Database of Metabolic Pathways and Enzymes and the BioCyc Collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research*, 40(D1): D742–D753.
- Catane, R., Von Hoff, D. D., Glaubiger, D. L. and Muggia, F. M. (1979), Azaserine, DON, and Azotomycin: Three Diazo Analogs of L-Glutamine with Clinical Antitumor Activity. *Cancer Treatment Reports*, 63(6): 1033–8.
- Chalasanani, Naga, Bonkovsky, Herbert L., Fontana, Robert, Lee, William, Stolz, Andrew, Talwalkar, Jayant, Reddy, K. Rajendar, Watkins, Paul B., Navarro, Victor, Barnhart, Huiman, Gu, Jiezhun, Serrano, Jose, Ahmad, Jawad, Bach, Nancy, Bansal, Meena, Barnhart, Huiman X., Beavers, Kimberly, Calvo, Francisco O., Chang, Charissa, Conjeevaram, Hari, Conner, Gregory, Darling, Jama, De Boer, Ynto, Dieterich, Douglas, Dipaola, Frank, Durazo, Francisco A., Everhart, James E., Fontana, Robert J., Ghabril, Marwan S., Goldstein, David, Gopalreddy, Vani, Grewal, Priya, Hayashi, Paul H., Hoofnagle, Jay, Kaplowitz, Neil, Liangpunsakul, Suthat, Lichtman, Steven, Liu, Lawrence, Navarro, Victor J., Odin, Joseph, Rossi, Simona, Russo, Mark, Schiano, Thomas, Sherker, Averell H., Vuppalanchi, Raj, Zacks, Steven, Balasco, Amanda, Chesney, Kristin, Corne, Audrey, Cummings, Sherrie, Groseclose, Gale, Hammett, Alex, Hooker, Judy, Kesar, Varun, Mao, Sophana, Marks, Kenari, McFadden, Regina, Melgoza, Yolanda, Mikhail, Sherif, Milstein, Susan, Morlan, Wendy, Peacock, Val, Rosado, Nidia, Russell, Tracy, Vega, Maricruz, Verma, Manisha, Walker, Patricia, Yalamanchili, Rachana, McClanahan-Crowder, Michelle, Galan, Katherine, Chau, Tuan, Ragavan, Kowsalya, Rostami, Hoss, Puglisi-Scharenbroich, Carmel, Torrance, Rebecca J. and Van Raaphorst, Rebekah (2015), Features and Outcomes of 899 Patients with Drug-Induced Liver Injury: The DILIN Prospective Study. *Gastroenterology*, 148(7): 1340–1352.
- Chan, Christina, Berthiaume, François, Lee, Kyongbum and Yarmush, Martin L. (2003), Metabolic Flux Analysis of Cultured Hepatocytes Exposed to Plasma. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(1): 33–49.
- Chiaradonna, F., Moresco, R. M., Airoidi, C., Gaglio, D., Palorini, R., Nicotra, F., Messa, C. and Alberghina, L. (2012), From Cancer Metabolism to New Biomarkers and Drug Targets. *Biotechnology Advances*, 30(1): 30–51. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.006>
- Choi, Jungik and Antoniewicz, Maciek R (2011), Tandem Mass Spectrometry: A Novel Approach for Metabolic Flux Analysis. *Metabolic Engineering*, 13(2): 225–233. available at

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2010.11.006>

- Christensen, Bjarke and Nielsen, Jens (1999), Isotopomer Analysis Using GC-MS. *Metabolic Engineering*, 1(4): 282–290.
- Christofk, Heather R., Vander Heiden, Matthew G., Harris, Marian H., Ramanathan, Arvind, Gerszten, Robert E., Wei, Ru, Fleming, Mark D., Schreiber, Stuart L. and Cantley, Lewis C. (2008), The M2 Splice Isoform of Pyruvate Kinase Is Important for Cancer Metabolism and Tumour Growth. *Nature*, 452: 230–233.
- Crosby, Heith (2015), Evaluating the Toxicity of the Analgesic Glutaminase Inhibitor 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucine in Vitro and on Rat Dermal Skin Fibroblasts. *MOJ Toxicology*, 1(1): 30–38.
- Crown, Scott B., Ahn, Woo Suk and Antoniewicz, Maciek R. (2012), Rational Design of 13C-Labeling Experiments for Metabolic Flux Analysis in Mammalian Cells. *BMC Systems Biology*, 6(1): 1–14. available at <http://www.biomedcentral.com/1752-0509/6/43/abstract%5Cnhttp://www.biomedcentral.com/1752-0509/6/43%5Cnhttp://www.biomedcentral.com/content/pdf/1752-0509-6-43.pdf>
- Crown, Scott B and Antoniewicz, Maciek R (2013), Parallel Labeling Experiments and Metabolic Flux Analysis: Past, Present and Future Methodologies. *Metabolic Engineering*, 16: 21–32. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2012.11.010>
- David, Stefan and Hamilton, James (2010), Drug-Induced Liver Injury. *US Gastroenterol Hepatol Rev.*, (6): 73–80.
- DeBerardinis, Ralph J., Lum, Julian J., Hatzivassiliou, Georgia and Thompson, Craig B. (2008), The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*, 7(1): 11–20.
- Deshpande, Rahul, Yang, Tae Hoon and Heinzle, Elmar (2009), Towards a Metabolic and Isotopic Steady State in CHO Batch Cultures for Reliable Isotope-Based Metabolic Profiling. *Biotechnology Journal*, 4(2): 247–263.
- DeWaal, Dannielle, Nogueira, Veronique, Terry, Alexander R., Patra, Krushna C., Jeon, Sang Min, Guzman, Grace, Au, Jennifer, Long, Christopher P., Antoniewicz, Maciek R. and Hay, Nissim (2018), Hexokinase-2 Depletion Inhibits Glycolysis and Induces Oxidative Phosphorylation in Hepatocellular Carcinoma and Sensitizes to Metformin. *Nature Communications*, 9(1): 1–14. available at <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02733-4>
- Dong, Wentao, Keibler, Mark A. and Stephanopoulos, Gregory (2017), Review of Metabolic Pathways Activated in Cancer Cells as Determined through Isotopic Labeling and Network Analysis. *Metabolic Engineering*, 43: 113–124. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2017.02.002>
- Du, Kuo, Farhood, Anwar and Jaeschke, Hartmut (2017), Mitochondria-Targeted Antioxidant Mito-Tempo Protects against Acetaminophen Hepatotoxicity. *Archives of Toxicology*, 91: 761–773.
- Egnatchik, Robert A., Leamy, Alexandra K., Jacobson, David A., Shiota, Masakazu and Young, Jamey D. (2014), ER Calcium Release Promotes Mitochondrial Dysfunction and Hepatic

- Cell Lipotoxicity in Response to Palmitate Overload. *Molecular Metabolism*, 3(5): 544–553.
- Egnatchik, Robert A., Leamy, Alexandra K., Noguchi, Yasushi, Shiota, Masakazu and Young, Jamey D. (2014), Palmitate-Induced Activation of Hepatocytes Mitochondrial Metabolism Promotes Oxidative Stress and Apoptosis in H4IIEC3 Rat. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 63(2): 283–295.
- Fan, Teresa W M, Lorkiewicz, Pawel K., Sellers, Katherine, Moseley, Hunter N B, Higashi, Richard M. and Lane, Andrew N. (2012), Stable Isotope-Resolved Metabolomics and Applications for Drug Development. *Pharmacology and Therapeutics*, 133(3): 366–391. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.12.007>
- Fernandez, Charles A., Des Rosiers, Christine, Previs, Stephen F., David, France and Brunengraber, Henri (1996), Correction of ¹³C Mass Isotopomer Distributions for Natural Stable Isotope Abundance. *Journal of Mass Spectrometry*, 31(3): 255–262.
- Fonseca, Yris Maria, Catini, Carolina Dias, Vicentini, Fabiana T M C, Nomizo, Auro, Gerlach, Raquel Fernanda and Fonseca, Maria José Vieira (2010), Protective Effect of Calendula Officinalis Extract against UVB-Induced Oxidative Stress in Skin: Evaluation of Reduced Glutathione Levels and Matrix Metalloproteinase Secretion. *Journal of ethnopharmacology*, 127(3): 596–601. available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20026397> [8 January 2014].
- Füzfai, Zs, Boldizsár, I. and Molnár-Perl, I. (2008), Characteristic Fragmentation Patterns of the Trimethylsilyl and Trimethylsilyl-Oxime Derivatives of Various Saccharides as Obtained by Gas Chromatography Coupled to Ion-Trap Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1177(1): 183–189.
- Gan, Tong J. (2010), Diclofenac: An Update on Its Mechanism of Action and Safety Profile. *Current Medical Research and Opinion*, 26(7): 1715–31.
- Geisslinger, Menzel, Gundermann, Hinz and Ruth (2020), *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Gómez-Lechón, M. José, Tolosa, Laia, Conde, Isabel and Donato, M. Teresa (2014), Competency of Different Cell Models to Predict Human Hepatotoxic Drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 10(11): 1553–1568.
- Gómez-Lechón, M. José, Tolosa, Laia and Donato, M. Teresa (2017), Upgrading HepG2 Cells with Adenoviral Vectors That Encode Drug-Metabolizing Enzymes: Application for Drug Hepatotoxicity Testing. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 13(2): 137–148. available at <http://dx.doi.org/10.1080/17425255.2017.1238459>
- Goudar, Chetan, Biener, Richard, Boisart, C., Heidemann, Rüdiger, Pieret, James, De Graaf, Albert and Konstantinov, Konstantin (2010), Metabolic Flux Analysis of CHO Cells in Perfusion Culture by Metabolite Balancing and 2D [¹³C, ¹H] COSY NMR Spectroscopy. , 12: 138–149.
- Haas, Michael J, Alamir, Abdul-Razzak, Sultan, Senan, Chehade, Joe M, Wong, Norman C N and Mooradian, Arshag D (2011), Nicotinic Acid Induces Apolipoprotein A-I Gene Expression in HepG2 and Caco-2 Cell Lines. *Metabolism: clinical and experimental*, 60(12): 1790–6.

available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21664629>

- Halket, John M. and Zaikin, Vladimir G. (2003), Derivatization in Mass Spectrometry—1. Silylation. *European Journal of Mass Spectrometry*, 9(1): 1–21.
- Hamilton, Leslie A and Collins, Rachel E (2016), Drug-Induced Liver Injury. *AACN Advanced Critical Care*, 27(4): 430–440.
- Hanahan, Douglas and Weinberg, Robert A. (2011), Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell*, 144(5): 646–674.
- Vander Heiden, M. G., Plas, D. R., Rathmell, J. C., Fox, C. J., Harris, M. H. and Thompson, C. B. (2001), Growth Factors Can Influence Cell Growth and Survival through Effects on Glucose Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17): 5899–5912.
- Heiden, Matthew G Vander, Cantley, Lewis C. and Thompson, Craig B. (2009), Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930): 1029–1033.
- Hinkle, Peter C. (2005), P/O Ratios of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1706(1–2): 1–11.
- Hofmann, Ute, Maier, Klaus, Niebel, Anja, Vacun, Gabriele, Reuss, Matthias and Mauch, Klaus (2008), Identification of Metabolic Fluxes in Hepatic Cells from Transient ¹³C-Labeling Experiments: Part I. Experimental Observations. *Biotechnology and Bioengineering*.
- Höner zu Siederdisen, Christoph and Cornberg, Markus (2016), Arzneimittelinduzierte Leberschäden, 119–127, in: *Praxis der Hepatologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Horn, Florian, Moc, I, Schneider, N, Grillhösl, C, Berghold, S and Leindenmaier, G (2005), *Biochemie Des Menschen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Hsu, Peggy P. and Sabatini, David M. (2008), Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell*, 134(5): 703–707.
- Hua, Q., Araki, M., Koide, Y. and Shimizu, K. (2001), Effects of Glucose, Vitamins, and DO Concentrations on Pyruvate Fermentation Using *Torulopsis Glabrata* IFO 0005 with Metabolic Flux Analysis. *Biotechnology Progress*, 17(1): 62–68.
- Huber, Klaus, Rosenfeld, Henry and Roberts, Joseph (1988), Uptake of Glutamine Antimetabolites 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucine (DON) and Acivicin in Sensitive and Resistant Tumor Cell Lines. *Int. J. Cancer*, 41: 752–755.
- Huege, Jan, Poskar, C. Hart, Franke, Mathias and Junker, Björn H. (2012), Towards High Throughput Metabolic Flux Analysis in Plants. *Molecular BioSystems*, 8(10): 2466–2469.
- Jaeschke, Hartmut, McGill, Mitchell R. and Ramachandran, Anup (2012), Oxidant Stress, Mitochondria, and Cell Death Mechanisms in Drug-Induced Liver Injury: Lessons Learned from Acetaminophen Hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*, 44(1): 88–106.
- Jazmin, Lara J., Xu, Yao, Cheah, Yi Ern, Adebisi, Adeola O., Johnson, Carl Hirschie and Young, Jamey D. (2017), Isotopically Nonstationary ¹³C Flux Analysis of Cyanobacterial

- Isobutyraldehyde Production. *Metabolic Engineering*, 42: 9–18.
- Jiang, Haowen, Jin, Jia, Duan, Yanan, Xie, Zhifu, Li, Yufeng, Gao, Anhui, Gu, Min, Zhang, Xinwen, Peng, Chang, Xia, Chunmei, Dong, Tiancheng, Li, Hui, Yu, Lifang, Tang, Jie, Yang, Fan, Li, Jingya and Li, Jia (2019), Mitochondrial Uncoupling Coordinated with PDH Activation Safely Ameliorates Hyperglycemia via Promoting Glucose Oxidation. *Diabetes*, 68(12): 2197–2209.
- Junker, Björn H., Klukas, Christian and Schreiber, Falk (2006), Vanted: A System for Advanced Data Analysis and Visualization in the Context of Biological Networks. *BMC Bioinformatics*, 7(109): 1–13.
- Kanehisa, M. (1999), KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 71(1): 29–34.
- Kaplowitz, Neil (2004), Drug-Induced Liver Injury. *Clinical Infectious Diseases*, 38(Suppl 2): 44–48.
- Karim, Sumera, Adams, David H. and Lalor, Patricia F. (2012), Hepatic Expression and Cellular Distribution of the Glucose Transporter Family. *World Journal of Gastroenterology*, 18(46): 6771–6781.
- Kim, Dong Eon, Jang, Mi Jin, Kim, Young Ran, Lee, Joo Young, Cho, Eun Byul, Kim, Eunha, Kim, Yeji, Kim, Mi Young, Jeong, Won il, Kim, Seyun, Han, Yong Mahn and Lee, Seung Hyo (2017), Prediction of Drug-Induced Immune-Mediated Hepatotoxicity Using Hepatocyte-like Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Toxicology*, 387: 1–9.
- Kisner, D. L., Catane, R. and Muggia, F. M. (1980), The Rediscovery of DON (6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucine). *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*, 74: 258–63.
- Klein, Sebastian, Mueller, Daniel, Schevchenko, Valery and Noor, Fozia (2014), Long-Term Maintenance of HepaRG Cells in Serum-Free Conditions and Application in a Repeated Dose Study. *Journal of Applied Toxicology*, 34(10): 1078–1086.
- Knowles, Babara B and Aden, David P (1983), United States Patent - Human Hepatoma Derived Cell Line Process For Preparation Thereof, And Uses Therfor.
- Kruger, N. J., Masakapalli, S. K. and Ratcliffe, R. G. (2012), Strategies for Investigating the Plant Metabolic Network with Steady-State Metabolic Flux Analysis: Lessons from an Arabidopsis Cell Culture and Other Systems. *Journal of Experimental Botany*, 63(6): 2309–2323.
- Kruger, Nicolas, Masakapalli, Shyam K. and Ratcliffe, R. George (2014), Optimization of Steady-State ¹³C-Labeling Experiments for Metabolic Flux Analysis, 54–72, in: Dieuaide-Noubhani, M. and Alonso, A. P. (Eds.), *Plant Metabolic Flux Analysis- Methods and Protocols*. New York.
- Kuna, Lucija, Bozic, Ivana, Kizivat, Tomislav, Bojanic, Kristina, Mrso, Margareta, Kralj, Edgar, Smolic, Robert, Wu, George Y. and Smolic, Martina (2018), Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) – Current Issues and Future Perspectives. *Current Drug Metabolism*, 19(10): 830–838.

- Lagadic-Gossmann, D., Rissel, M., Le Bot, M. A. and Guillouzo, A. (1998), Toxic Effects of Tacrine on Primary Hepatocytes and Liver Epithelial Cells in Culture. *Cell Biology and Toxicology*.
- Laine, Roger A and Sweeley, Charles C (1971), Analysis of Trimethylsilyl O-Methyloximes of Carbohydrates by Combined Gas-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. , 43: 533–538.
- Lancaster, Elizabeth M., Hiatt, Jonathan R. and Zarrinpar, Ali (2015), Acetaminophen Hepatotoxicity: An Updated Review. *Archives of Toxicology*, 89(2): 193–199.
- Large, Valérie, Brunengraber, Henri, Odeon, Michèle and Beylot, Michel (1997), Use of Labeling Pattern of Liver Glutamate to Calculate Rates of Citric Acid Cycle and Gluconeogenesis. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 272(1): 51–58.
- Lauer, Birthe, Tuschl, Gregor, Kling, Margret and Mueller, Stefan O. (2009), Species-Specific Toxicity of Diclofenac and Troglitazone in Primary Human and Rat Hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 179(1): 17–24.
- Lee, Kyongbum, Berthiaume, François, Stephanopoulos, Gregory N., Yarmush, David M. and Yarmush, Martin L. (2000), Metabolic Flux Analysis of Postburn Hepatic Hypermetabolism. *Metabolic Engineering*, 2(4): 312–327.
- Lee, William M (2003), Drug-Induced Hepatotoxicity. *The new england journal of medicine*, 5(349): 474–485.
- Leimer, Kenneth, Rice, Roy and Gehrke, Charles (1977), Complete Mass Spectra Of N-Trifluoroacetyl-n-Butyl Esters Of Amino Acids. *Journal of Chromatography*, 141(17749): 121–144.
- Leise, Michaela, Poterucha, John and Talwalkar, Jayant (2014), Drug-Induced Liver Injury. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(1): 95–106. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.09.016>
- Lemberg, Kathryn M., Vornov, James J., Rais, Rana and Slusher, Barbara S. (2018), We're Not 'Don' yet: Optimal Dosing and Prodrug Delivery of 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucine. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(9): 1824–1832.
- Liberti, Maria V and Locasale, Jason W (2016), The Warburg Effect: How Does It Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences*, 41(3): 211–218.
- Long, Christopher P. and Antoniewicz, Maciek R. (2019), High-Resolution ¹³C Metabolic Flux Analysis. *Nature Protocols*, 14(10): 2856–2877.
- Lukey, Michael J, Wilson, Kristin F and Cerione, Richard A (2013), Therapeutic Strategies Impacting Cancer Cell Glutamine Metabolism. *Future medicinal chemistry*, 5(14): 1685–700. available at </pmc/articles/PMC4154374/?report=abstract>
- Lunt, Sophia Y. and Vander Heiden, Matthew G. (2011), Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27: 441–464.

- Maes, Michaël, Vinken, Mathieu and Jaeschke, Hartmut (2016), Experimental Models of Hepatotoxicity Related to Acute Liver Failure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 290: 86–97.
- Maier, Klaus, Hofmann, Ute, Bauer, Alexander, Niebel, Anja, Vacun, Gabriele, Reuss, Matthias and Mauch, Klaus (2009), Quantification of Statin Effects on Hepatic Cholesterol Synthesis by Transient ¹³C-Flux Analysis. *Metabolic Engineering*, 11(4–5): 292–309. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2009.06.001>
- Maier, Klaus, Hofmann, Ute, Reuss, Matthias and Mauch, Klaus (2008), Identification of Metabolic Fluxes in Hepatic Cells from Transient ¹³C-Labeling Experiments: Part II. Flux Estimation. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(2): 355–370.
- Maier, Klaus, Hofmann, Ute, Reuss, Matthias and Mauch, Klaus (2010), Dynamics and Control of the Central Carbon Metabolism in Hepatoma Cells. *BMC Systems Biology*, 4(54): 1–28.
- Masakapalli, Shyam K., Kruger, Nicholas J. and Ratcliffe, R. George (2013), The Metabolic Flux Phenotype of Heterotrophic Arabidopsis Cells Reveals a Complex Response to Changes in Nitrogen Supply. *Plant Journal*, 74(4): 569–582.
- McGill, Mitchell R. and Jaeschke, Hartmut (2019), Animal Models of Drug-Induced Liver Injury. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1865(5): 1031–1039.
- McGill, Mitchell R., Sharpe, Matthew R., Williams, C. David, Taha, Mohammad, Curry, Steven C. and Jaeschke, Hartmut (2012), The Mechanism Underlying Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Humans and Mice Involves Mitochondrial Damage and Nuclear DNA Fragmentation. *Journal of Clinical Investigation*.
- Meng, Qin, Ru, Jianghua, Zhang, Guoliang, Shen, Chong, Schmitmeier, Stephanie and Bader, Augustinus (2007), Re-Evaluation of Tacrine Hepatotoxicity Using Gel Entrapped Hepatocytes. *Toxicology Letters*, 168(2): 140–147.
- Mennecozzi, Milena, Landesmann, Brigitte, Palosaari, Taina, Harris, Georgina and Whelan, Maurice (2015), Sex Differences in Liver Toxicity-Do Female and Male Human Primary Hepatocytes React Differently to Toxicants in Vitro? *PLoS ONE*, 10(4): e0122786.
- Metallo, Christian M., Gameiro, Paulo A., Bell, Eric L., Mattaini, Katherine R., Yang, Juanjuan, Hiller, Karsten, Jewell, Christopher M., Johnson, Zachary R., Irvine, Darrell J., Guarente, Leonard, Kelleher, Joanne K., Vander Heiden, Matthew G., Iliopoulos, Othon and Stephanopoulos, Gregory (2012), Reductive Glutamine Metabolism by IDH1 Mediates Lipogenesis under Hypoxia. *Nature*, 481(7381): 380–384.
- Metallo, Christian M., Walther, Jason L. and Stephanopoulos, Gregory (2009), Evaluation of ¹³C Isotopic Tracers for Metabolic Flux Analysis in Mammalian Cells. *Journal of Biotechnology*, 144(3): 167–174.
- Molnár-Perl, I. and Katona, Zs. F. (2006), GC-MS of Amino Acids as Their Trimethylsilyl/t-Butyldimethylsilyl Derivatives: In Model Solutions III. *Chromatographia*, 51(1): S228–S236.
- Mueckler, M. M. (1992), The Molecular Biology of Mammalian Glucose Transporters. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 13(3): 198–208.

- Mueller, Daniel, Krämer, Lisa, Hoffmann, Esther, Klein, Sebastian and Noor, Fozia (2014), 3D Organotypic HepaRG Cultures as in Vitro Model for Acute and Repeated Dose Toxicity Studies. *Toxicology in Vitro*, 28(1): 104–112. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.024>
- Murphy, Taylor A., Dang, Chi V. and Young, Jamey D. (2013), Isotopically Nonstationary 13C Flux Analysis of Myc-Induced Metabolic Reprogramming in B-Cells. *Metabolic Engineering*, 15(1): 206–217. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2012.07.008>
- Nadanaciva, Sashi, Dykens, James A., Bernal, Autumn, Capaldi, Roderick A. and Will, Yvonne (2007), Mitochondrial Impairment by PPAR Agonists and Statins Identified via Immunocaptured OXPHOS Complex Activities and Respiration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 223(3): 277–287.
- Nicolae, Averina, Wahrheit, Judith, Bahnemann, Janina, Zeng, An-Ping and Heinzle, Elmar (2014), Non-Stationary 13 C Metabolic Flux Analysis of Chinese Hamster Ovary Cells in Batch Culture Using Extracellular Labeling Highlights Metabolic Reversibility and Compartmentation. *BMC systems biology*, 8(50): 1–15. available at <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4022241&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Niedenführ, Sebastian, Wiechert, Wolfgang, Nöh, Katharina, Biotechnology, Ibg- and Gmbh, Forschungszentrum Jülich (2015a), How to Measure Metabolic Fluxes : A Taxonomic Guide for 13 C Fluxomics Supplementary Table Supplementary. *Current opinion in biotechnology*, 34: 82–90.
- Niedenführ, Sebastian, Wiechert, Wolfgang, Nöh, Katharina, Biotechnology, Ibg- and Gmbh, Forschungszentrum Jülich (2015b), How to Measure Metabolic Fluxes: A Taxonomic Guide for 13C Fluxomics - Supplement. *Current opinion in biotechnology*, 34: 82–90.
- Niklas, Jens and Heinzle, Elmar (2012), Metabolic Flux Analysis in Systems Biology of Mammalian Cells. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 127: 109–132.
- Niklas, Jens, Noor, Fozia and Heinzle, Elmar (2009), Effects of Drugs in Subtoxic Concentrations on the Metabolic Fluxes in Human Hepatoma Cell Line Hep G2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(3): 327–336. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.005>
- Niklas, Jens, Schneider, Konstantin and Heinzle, Elmar (2010), Metabolic Flux Analysis in Eukaryotes. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(1): 63–69. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.011>
- Noguchi, Yasushi, Young, Jamey D, Aleman, Jose O, Hansen, Michael E, Kelleher, Joanne K and Stephanopoulos, Gregory (2009), Effect of Anaplerotic Fluxes and Amino Acid Availability on Hepatic Lipoaoptosis. , 284(48): 33425–33436.
- Nöh, Katharina, Grönke, Karsten, Luo, Bing, Takors, Ralf, Oldiges, Marco and Wiechert, Wolfgang (2007), Metabolic Flux Analysis at Ultra Short Time Scale: Isotopically Non-Stationary 13C Labeling Experiments. *Journal of Biotechnology*, 129(2): 249–267.
- Nöh, Katharina, Wahl, Aljoscha and Wiechert, Wolfgang (2006), Computational Tools for Isotopically Instationary 13C Labeling Experiments under Metabolic Steady State

- Conditions. *Metabolic Engineering*, 8(6): 554–577.
- Nöh, Katharina and Wiechert, Wolfgang (2011), The Benefits of Being Transient: Isotope-Based Metabolic Flux Analysis at the Short Time Scale. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(5): 1247–1265.
- Noor, Fozia, Niklas, Jens, Müller-Vieira, Ursula and Heinzle, Elmar (2009), An Integrated Approach to Improved Toxicity Prediction for the Safety Assessment during Preclinical Drug Development Using Hep G2 Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237(2): 221–231. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.011>
- O'Brien, P. J., Irwin, W., Diaz, D., Howard-Cofield, E., Krejsa, C. M., Slaughter, M. R., Gao, B., Kaludercic, N., Angeline, A., Bernardi, P., Brain, P. and Hougham, C. (2006), High Concordance of Drug-Induced Human Hepatotoxicity with in Vitro Cytotoxicity Measured in a Novel Cell-Based Model Using High Content Screening. *Archives of Toxicology*, 80(9): 580–604.
- Orata, Francis (2012), Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis, 83–108, in: Mohd, D. M. A. (Ed.), *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. InTech. available at <http://www.intechopen.com/books/advanced-gas-chromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-and-reagents-for-gas-chromatography-analysis>
- Ortega-Alonso, Aida, Stephens, Camilla, Lucena, M. Isabel and Andrade, Raúl J. (2016), Case Characterization, Clinical Features and Risk Factors in Drug-Induced Liver Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5): 714–736.
- Orth, Jeffrey D., Thiele, Ines and Palsson, Bernhard O. (2010), What Is Flux Balance Analysis? *Nature Biotechnology*, 28(3): 245–248. available at <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1614>
- Ostapowicz, George, Fontana, Robert J., Schiødt, Frank V., Larson, Anne, Davern, Timothy J., Han, Steven H.B., McCashland, Timothy M., Shakil, A. Obaid, Hay, J. Eileen, Hynan, Linda, Crippin, Jeffrey S., Blei, Andres T., Samuel, Grace, Reisch, Joan, Lee, William M., Santyanarayana, Raj, Caldwell, Cary, Shick, Lawton, Bass, Nathan, Rouillard, Smita, Atillasoy, Evren, Flamm, Steven, Benner, Kent G., Rosen, Hugo R., Martin, Paul, Stribling, Risë, Schiff, Eugene R., Torres, Maria B., Navarro, Victor, McGuire, Brendan, Chung, Raymond, Abraczinskas, Diane and Dienstag, Jules (2002), Results of a Prospective Study of Acute Liver Failure at 17 Tertiary Care Centers in the United States. *Annals of Internal Medicine*, 137(12): 947–954.
- Parmentier, Céline, Truisi, Germaine L., Moenks, Konrad, Stanzel, Sven, Lukas, Arno, Kopp-Schneider, Annette, Alexandre, Eliane, Hewitt, Philip G., Mueller, Stefan O. and Richert, Lysiane (2013), Transcriptomic Hepatotoxicity Signature of Chlorpromazine after Short-And Long-Term Exposure in Primary Human Sandwich Cultures. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(10): 1835–1842.
- Patterson, Jessica N., Cousteils, Katelyn, Lou, Jennifer W., Fox, Jocelyn E. Manning, MacDonald, Patrick E. and Joseph, Jamie W. (2014), Mitochondrial Metabolism of Pyruvate Is Essential for Regulating Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 289(19): 13335–46.

- Pereira Da Silva, Ana Paula, El-Bacha, Tatiana, Kyaw, Nattascha, Dos Santos, Reinaldo Sousa, Da-Silva, Wagner Seixas, Almeida, Fabio C. L., Da Poian, Andrea T. and Galina, Antonio (2009), Inhibition of Energy-Producing Pathways of HepG2 Cells by 3-Bromopyruvate. *Biochemical Journal*, 417(3): 717–726. available at <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20080805>
- Pessayre, Dominique, Fromenty, Bernard, Berson, Alain, Robin, Marie Anne, Lettéron, Philippe, Moreau, Richard and Mansouri, Abdellah (2012), Central Role of Mitochondria in Drug-Induced Liver Injury. *Drug Metabolism Reviews*, 44(1): 34–87.
- Petersen, Max C., Vatner, Daniel F. and Shulman, Gerald I. (2017), Regulation of Hepatic Glucose Metabolism in Health and Disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(10): 572–587.
- Placzek, Sandra, Schomburg, Ida, Chang, Antje, Jeske, Lisa, Ulbrich, Marcus, Tillack, Jana and Schomburg, Dietmar (2017), BRENDA in 2017: New Perspectives and New Tools in BRENDA. *Nucleic Acids Research*, 45(D1): D380-388.
- Poskar, C Hart, Huege, Jan, Krach, Christian, Franke, Mathias, Shachar-hill, Yair and Junker, Björn H (2012), IMS2Flux – a High – Throughput Processing Tool for Stable Isotope Labeled Mass Spectrometric Data Used for Metabolic Flux Analysis. *BMC Bioinformatics*, 13(295): 1471–2015. available at BMC Bioinformatics
- Possemato, Richard, Marks, Kevin M., Shaul, Yoav D., Pacold, Michael E., Kim, Dohoon, Birsoy, Kavana, Sethumadhavan, Shalini, Woo, Hin Koon, Jang, Hyun G., Jha, Abhishek K., Chen, Walter W., Barrett, Francesca G., Stransky, Nicolas, Tsun, Zhi Yang, Cowley, Glenn S., Barretina, Jordi, Kalaany, Nada Y., Hsu, Peggy P., Ottina, Kathleen, Chan, Albert M., Yuan, Bingbing, Garraway, Levi A., Root, David E., Mino-Kenudson, Mari, Brachtel, Elena F., Driggers, Edward M. and Sabatini, David M. (2011), Functional Genomics Reveal That the Serine Synthesis Pathway Is Essential in Breast Cancer. *Nature*, 476: 346–350.
- Price, Nathan D., Reed, Jennifer L. and Palsson, Bernhard (2004), Genome-Scale Models of Microbial Cells: Evaluating the Consequences of Constraints. *Nature Reviews Microbiology*.
- Quek, Lake-Ee, Dietmair, Stefanie, Krömer, Jens O. and Nielsen, Lars K. (2010), Metabolic Flux Analysis in Mammalian Cell Culture. *Metabolic Engineering*, 12(2): 161–171. available at <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717609000858>
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717609000858/pdf?md5=a0bbcdaf723722dd2d1c26e0e1c4751e&pid=1-s2.0-S1096717609000858-main.pdf>
- Rachek, Lyudmila I., Yuzefovych, Larysa V., LeDoux, Susan P., Julie, Neil L. and Wilson, Glenn L. (2009), Troglitazone, but Not Rosiglitazone, Damages Mitochondrial DNA and Induces Mitochondrial Dysfunction and Cell Death in Human Hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(3): 348–354.
- Ramachandran, A. and Jaeschke, H. (2017), Acetaminophen, 101–112, in: *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*.
- Ramachandran, Anup, Visschers, Ruben, Duan, Luqi, Akakpo, Jephthe and Jaeschke, Hartmut (2018), Mitochondrial Dysfunction as a Mechanism of Drug-Induced Hepatotoxicity: Current Understanding and Future Perspectives. *Journal of Clinical and Translational*

- Research*, 4(1): 75–100.
- Ratcliffe, R. G. and Shachar-Hill, Y. (2006), Measuring Multiple Fluxes through Plant Metabolic Networks. *Plant Journal*, 45(4): 490–511.
- Reid, Angela B., Kurten, Richard C., McCullough, Sandra S., Brock, Robert W. and Hinson, Jack A. (2005), Mechanisms of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Permeability Transition in Freshly Isolated Mouse Hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.
- Rios-Esteva, Rigoberto and Lange, Bernd Markus (2007), Experimental and Mathematical Approaches to Modeling Plant Metabolic Networks. *Phytochemistry*, 68(16–18): 2351–2374.
- Roe, Amy L., Snawder, John E., Benson, R. Wayne, Roberts, Dean W. and Casciano, Daniel A. (1993), HepG2 Cells: An In Vitro Model For P450-Dependent Metabolism Of Acetaminophen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 190(1): 15–19.
- Rohn, Hendrik, Hartmann, Anja, Junker, Astrid, Junker, Björn H. and Schreiber, Falk (2012), FluxMap: A VANTED Add-on for the Visual Exploration of Flux Distributions in Biological Networks. *BMC Systems Biology*, 6(33): 1–9.
- Romero, Pedro, Wagg, Jonathan, Green, Michelle L., Kaiser, Dale, Krummenacker, Markus and Karp, Peter D. (2005), Computational Prediction of Human Metabolic Pathways from the Complete Human Genome. *Genome biology*, 6(1): R2.
- Rui, Liangyou (2014), Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1): 177–197.
- Saito, Chieko, Zwingmann, Claudia and Jaeschke, Hartmut (2010), Novel Mechanisms of Protection against Acetaminophen Hepatotoxicity in Mice by Glutathione and N-Acetylcysteine. *Hepatology*, 51(1): 246–254.
- Salvatore Abate, Yun Gyong Ahn, Tobias Kind, Tommaso R. I. Cataldi and Fiehn, and Oliver (2010), Determination of Elemental Compositions by Gas Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry Using Chemical and Electron Ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24: 1172–1180.
- Sauer, Uwe (2006), Metabolic Networks in Motion: 13C-Based Flux Analysis. *Molecular systems biology*, 2: 62. available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17102807>
- Schaub, Jochen, Mauch, Klaus and Reuss, Matthias (2008), Metabolic Flux Analysis in Escherichia Coli by Integrating Isotopic Dynamic and Isotopic Stationary 13C Labeling Data. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(5): 1170–1185.
- Schittenhelm, Doris, Neuss-Radu, Maria, Verma, Nisha, Pink, Mario and Schmitz-Spanke, Simone (2019), ROS and Pentose Phosphate Pathway: Mathematical Modelling of the Metabolic Regulation in Response to Xenobiotic-Induced Oxidative Stress and the Proposed Impact of the Gluconate Shunt. *Free Radical Research*, 53(9–10).
- Schmeltzer, Paul A., Kosinski, Andrzej S., Kleiner, David E., Hoofnagle, Jay H., Stolz, Andrew, Fontana, Robert J. and Russo, Mark W. (2016), Liver Injury from Nonsteroidal Anti-

- Inflammatory Drugs in the United States. *Liver International*, 36(5): 603–309.
- Schmidt, Karsten, Marx, Achim, De Graaf, Albert A., Wiechert, Wolfgang, Sahm, Hermann, Nielsen, Jens and Villadsen, John (1998), 13C Tracer Experiments and Metabolite Balancing for Metabolic Flux Analysis: Comparing Two Approaches. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(2–3): 254–257.
- Segawa, Masahiro, Sekine, Shuichi, Sato, Tomoyuki and Ito, Kousei (2018), Increased Susceptibility to Troglitazone-Induced Mitochondrial Permeability Transition in Type 2 Diabetes Mellitus Model Rat. *Journal of Toxicological Sciences*, 43(5): 339–351.
- Sengupta, Neelanjan, Rose, Steven T. and Morgan, John A. (2011), Metabolic Flux Analysis of CHO Cell Metabolism in the Late Non-Growth Phase. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(1): 82–92.
- Shapiro, Max A. and Lewis, James H. (2007), Causality Assessment of Drug-Induced Hepatotoxicity: Promises and Pitfalls. *Clinics in Liver Disease*, 11(3): 477–505.
- Sharma, Ashwini Kumar and König, Rainer (2013), Metabolic Network Modeling Approaches for Investigating the ‘Hungry Cancer’. *Seminars in Cancer Biology*, 23(4): 227–234. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.05.001>
- Sheikholeslami, Zahra, Jolicoeur, Mario and Henry, Olivier (2013), Probing the Metabolism of an Inducible Mammalian Expression System Using Extracellular Isotopomer Analysis. *Journal of Biotechnology*, 164(4): 469–478. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.01.025>
- Shen, Chong, Meng, Qin and Zhang, Guoliang (2012), Species-Specific Toxicity of Troglitazone on Rats and Human by Gel Entrapped Hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(1): 19–25.
- Shoshan, Maria C. (2012), 3-Bromopyruvate: Targets and Outcomes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44(1): 7–15.
- Sies, Helmut, Berndt, Carsten and Jones, Dean P. (2017), Oxidative Stress. *Annual review biochemistry*, 86: 715–48. available at <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Sinacore, M S, Drapeau, D and Adamson, S R (2000), Adaptation of Mammalian Cells to Growth in Serum-Free Media. TL - 15. *Molecular biotechnology*, 15 VN-r(3): 249–257. available at [g:%5CDropbox%5CHG project%5Cproject HG++%5Cpapers%5Cpapers_tejal%5Ccell adaptation%5CAdaptation of Mammalian Cells to Growth in Serum-Free Media.pdf%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1385/MB:15:3:249](http://dx.doi.org/10.1385/MB:15:3:249)
- Smith, Robert J. (1990), Glutamine Metabolism and Its Physiologic Importance. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 14(4S): 40S-44S.
- Sobolevsky, Tim G., Revelsky, Alexander I., Miller, Barbara, Oriedo, Vincent, Chernetsova, Elena S. and Revelsky, Igor A. (2003), Comparison of Silylation and Esterification/Acylation Procedures in GC-MS Analysis of Amino Acids. *Journal of Separation Science*, 26(17): 1474–1478.

- Soldatow, Valerie Y., Lecluyse, Edward L., Griffith, Linda G. and Rusyn, Ivan (2013), In Vitro Models for Liver Toxicity Testing. *Toxicology Research*, 2(1): 23–39.
- Srivastava, Shireesh and Chan, Christina (2008), Application of Metabolic Flux Analysis to Identify the Mechanisms of Free Fatty Acid Toxicity to Human Hepatoma Cell Line. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(2): 399–410.
- Stephanopoulos, Gregory N, Aristidou, Aristos A and Nielsen, Jens (1998), *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. San Diego: Academic Press Inc.
- Strigun, Alexander, Noor, Fozia, Pironti, Alejandro, Niklas, Jens, Yang, Tae Hoon and Heinzle, Elmar (2011), Metabolic Flux Analysis Gives an Insight on Verapamil Induced Changes in Central Metabolism of HL-1 Cells. *Journal of Biotechnology*, 155(3): 299–307. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.028>
- Strigun, Alexander, Wahrheit, Judith, Niklas, Jens, Heinzle, Elmar and Noor, Fozia (2012), Doxorubicin Increases Oxidative Metabolism in HL-1 Cardiomyocytes as Shown by ¹³C Metabolic Flux Analysis. *Toxicological Sciences*, 125(2): 595–606.
- Syed, Muzeeb, Skonberg, Christian and Hansen, Steen Honoré (2016), Mitochondrial Toxicity of Diclofenac and Its Metabolites via Inhibition of Oxidative Phosphorylation (ATP Synthesis) in Rat Liver Mitochondria: Possible Role in Drug Induced Liver Injury (DILI). *Toxicology in Vitro*, 31: 93–102.
- Takata, Kuniaki, Kasahara, Toshiko, Kasahara, Michihiro, Ezaki, Osamu and Hirano, Hiroshi (1992), Localization of Erythrocyte/HepG2-Type Glucose Transporter (GLUT1) in Human Placental Villi. *Cell & Tissue Research*, 267: 407–412.
- Templeton, Neil, Dean, Jason, Reddy, Pranhitha and Young, Jamey D (2013), Peak Antibody Production Is Associated With Increased Oxidative Metabolism in an Industrially Relevant Fed-Batch CHO Cell Culture. , 110(7): 2013–2024.
- Toutain, H. J., Moronville-Halley, V., Sarsat, J. P., Chelin, C., Hoet, D. and Leroy, D. (1998), Morphological and Functional Integrity of Precision-Cut Rat Liver Slices in Rotating Organ Culture and Multiwell Plate Culture: Effects of Oxygen Tension. *Cell Biology and Toxicology*, 18: 73–85.
- Toya, Yoshihiro, Kono, Nobuaki, Arakawa, Kazuharu and Tomita, Masaru (2011), Metabolic Flux Analysis and Visualization. *Journal of Proteome Research*, 10(8): 3313–3323.
- Tujios, Shannan and Fontana, Robert J. (2011), Mechanisms of Drug-Induced Liver Injury: From Bedside to Bench. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 8(4): 202–211.
- Utrecht, Jack (2019), Mechanisms of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury, 133–163, in: *Advances in Pharmacology*. Elsevier Inc. available at <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apha.2018.12.001>
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Å, Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L. and Gstraunthaler, G. (2010), Optimization of Chemically Defined Cell Culture Media - Replacing Fetal Bovine Serum in Mammalian in Vitro Methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4): 1053–1063. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>

- Varma, Amit and Palsson, Bernhard O. (1994), Metabolic Flux Balancing: Basic Concepts, Scientific and Practical Use. *Bio/Technology*, 12: 994–998.
- Voet, Donald, Voet, Judith and Pratt, Charlotte (2010), *Lehrbuch Der Biochemie*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Wahl, Sebastian Aljoscha, Nöh, Katharina and Wiechert, Wolfgang (2008), 13C Labeling Experiments at Metabolic Nonstationary Conditions: An Exploratory Study. *BMC bioinformatics*, 9: 152.
- Walker, Alexander M. (1997), Quantitative Studies of the Risk of Serious Hepatic Injury in Persons Using Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *Arthritis and Rheumatism*, 40(2): 207–208.
- Walther, Jason L., Metallo, Christian M., Zhang, Jie and Stephanopoulos, Gregory (2012), Optimization of 13C Isotopic Tracers for Metabolic Flux Analysis in Mammalian Cells. *Metabolic Engineering*, 14(2): 162–171. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2011.12.004>
- Watkins, Paul B. and Seeff, Leonard B. (2006), Drug-Induced Liver Injury: Summary of a Single Topic Clinical Research Conference. *Hepatology*, 43(3): 618–631.
- Wiechert, Wolfgang (2001a), 13C Metabolic Flux Analysis. *Metabolic Engineering*, 3(3): 195–206.
- Wiechert, Wolfgang (2001b), < Sup> 13</sup> C Metabolic Flux Analysis. *Metabolic engineering*, 3(3): 195–206.
- Wiechert, Wolfgang, Möllney, Michael, Petersen, Sören and De Graaf, Albert A. (2001), A Universal Framework for 13C Metabolic Flux Analysis. *Metabolic Engineering*.
- Wiechert, Wolfgang and Nöh, Katharina (2005), From Stationary to Instationary Metabolic Flux Analysis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*.
- Wiechert, Wolfgang and Nöh, Katharina (2013), Isotopically Non-Stationary Metabolic Flux Analysis: Complex yet Highly Informative. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6): 979–986.
- Wilkinson, Daniel James (2018), Historical and Contemporary Stable Isotope Tracer Approaches to Studying Mammalian Protein Metabolism. *Mass Spectrometry Reviews*.
- Van Winden, Wouter A., Van Dam, Jan C., Ras, Cor, Kleijn, Roelco J., Vinke, Jacobus L., Van Gulik, Walter M. and Heijnen, Joseph J. (2005), Metabolic-Flux Analysis of *Saccharomyces Cerevisiae* CEN.PK113-7D Based on Mass Isotopomer Measurements of 13C-Labeled Primary Metabolites. *FEMS Yeast Research*, 5(6–7): 559–568.
- Wise, David R. and Thompson, Craig B. (2010), Glutamine Addiction: A New Therapeutic Target in Cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(8): 427–433. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.003>
- Woo Suk, Ahn and Antoniewicz, Maciek R. (2013), Parallel Labeling Experiments with [1,2-13C]Glucose and [U-13C]Glutamine Provide New Insights into CHO Cell Metabolism.

- Metabolic Engineering*, 15(1): 34–47. available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2012.10.001>
- Xing, Zizhuo, Kenty, Brian, Koyrakh, Inna, Borys, Michael, Pan, Shih Hsie and Li, Zheng Jian (2011), Optimizing Amino Acid Composition of CHO Cell Culture Media for a Fusion Protein Production. *Process Biochemistry*, 46(7): 1423–1429.
- Xiong, W., Liu, L., Wu, C., Yang, C. and Wu, Q. (2010), ¹³C-Tracer and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analyses Reveal Metabolic Flux Distribution in the Oleaginous Microalga *Chlorella Protothecoides*. *Plant Physiology*, 154(2): 1001–1011.
- Yang, Chendong, Ko, Bookyung, Hensley, Christopher T., Jiang, Lei, Wasti, Ajla T., Kim, Jiyeon, Sudderth, Jessica, Calvaruso, Maria Antonietta, Lumata, Lloyd, Mitsche, Matthew, Rutter, Jared, Merritt, Matthew E. and DeBerardinis, Ralph J. (2014), Glutamine Oxidation Maintains the TCA Cycle and Cell Survival during Impaired Mitochondrial Pyruvate Transport. *Molecular Cell*, 56(3): 414–424.
- Yarmush, Gabriel, Santos, Lucas, Yarmush, Joshua, Koundinyan, Srivathsan, Saleem, Mubasher, Nativ, Nir I., Schloss, Rene S., Yarmush, Martin L., Maguire, Timothy J. and Berthiaume, Francois (2016), Metabolic Flux Distribution during Defatting of Steatotic Human Hepatoma (HepG2) Cells. *Metabolites*, 6(1): 1–16.
- Yi, Lunzhao, Shi, Shuting, Yi, Zhibiao, He, Ruihua, Lu, Hongmei and Liang, Yizeng (2014), MeOx-TMS Derivatization for GC-MS Metabolic Profiling of Urine and Application in the Discrimination between Normal C57BL/6J and Type 2 Diabetic KK-Ay Mice. *Analytical Methods*, 6(12): 4380–4387.
- Yokoi, Tsuyoshi (2010), Troglitazone, 419–436, in: Uetrecht, J. (Ed.), *Adverse Drug Reactions*. Heidelberg: Springer International Publishing.
- Young, Jamey D. (2014), INCA: A Computational Platform for Isotopically Non-Stationary Metabolic Flux Analysis. *Bioinformatics*, 30(9): 1333–1335.
- Young, Jamey D., Walther, Jason L., Antoniewicz, Maciek R., Yoo, Hyuntae and Stephanopoulos, Gregory (2008), An Elementary Metabolite Unit (EMU) Based Method of Isotopically Nonstationary Flux Analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(3): 686–699. available at <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.21632>
- Zamboni, Nicola, Fendt, Sarah Maria, Rühl, Martin and Sauer, Uwe (2009), ¹³C-Based Metabolic Flux Analysis. *Nature Protocols*, 4(6): 878–892.
- Zhao, Feng-Qi and Keating, Aileen (2007), Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Current Genomics*, 8(2): 113–128. available at <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2029&volume=8&issue=2&spage=113>
- Zhao, Zheng, Kuijvenhoven, Karel, Ras, Cor, van Gulik, Walter M., Heijnen, Joseph J., Verheijen, Peter J.T. and van Winden, Wouter A. (2008), Isotopic Non-Stationary ¹³C Gluconate Tracer Method for Accurate Determination of the Pentose Phosphate Pathway Split-Ratio in *Penicillium Chrysogenum*. *Metabolic Engineering*, 10(3–4): 178–186.
- Zhong, Yali, Li, Xiaoran, Yu, Dandan, Li, Xiaoli, Li, Yaqing, Long, Yuan, Yuan, Yuan, Ji, Zhenyu,

Zhang, Mingzhi, Wen, Jian Guo, Nesland, Jahn M. and Suo, Zhenhe (2015), Application of Mitochondrial Pyruvate Carrier Blocker UK5099 Creates Metabolic Reprogram and Greater Stem-like Properties in LnCap Prostate Cancer Cells in Vitro. *Oncotarget*, 6(35): 37758–37769.

8. Anhang

Der Anhang zur vorliegenden Arbeit befindet sich auf CD, angebracht an der Innenseite des hinteren Einbands der Arbeit. Hier wird nur das Inhalts-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis des Anhangs aufgelistet.

8.1 Inhaltsverzeichnis Anhang

Abbildungsverzeichnis Anhang	A2
Tabellenverzeichnis Anhang	A6
A.1 Anhang zur Einleitung.....	A10
A.2 Anhang zu Material und Methoden	A11
A.2.1 Berechnung der Aufnahmezeiten der essentiellen Aminosäuren	A11
A.2.2 Biomassegleichung	A12
A.2.3 Finales Modell.....	A17
A.3 Anhang zu den Ergebnissen der Etablierung	A20
A.3.1 Werte von den Glukoseraten, den Serumversuchen und der Wachstumskurve	A20
A.3.2 Exponentielle Darstellungen der Wachstumskurve	A23
A.3.3 Abbildungen und Messwerte des isotopischen Gleichgewichts	A24
A.3.4 Messwerte zum metabolischen Gleichgewicht	A29
A.3.5 Statistische Anpassungsgüte und Modellparameter aller Modelle	A34
A.3.6 Flusswerte - Etablierungsexperiment	A37
A.4 Anhang zu den Ergebnissen des Validierungsexperiments	A41
A.4.1 LDH-Assay Messwerte	A41
A.4.2 Markierungsdaten und Markierungsdiagramme.....	A41
A.4.3 Flusswerte.....	A84
A.4.4 Flusskarten	A101
A.5 Anhang der Ergebnisse des Screenings	A104
A.5.1 Messwerte und Diagramme des LDH-Assays	A104
A.5.2 Markierungsdaten	A106
A.5.3 Flusswerte des Screenings	A145
A.5.4 Flusskarten des Screenings	A184
A.6 Anhang der Ergebnisse des Hauptexperiments.....	A194
A.6.1 Daten des LDH-Assays.....	A194
A.6.2 Markierungsdaten	A194
A.6.3 Flusswerte Hauptexperiment	A234

8.2 Abbildungsverzeichnis Anhang

Abbildung A 1: Darstellung der Derivatisierungsmittel (A), der Silylierungsreaktion mit BSTFA (B), MBDSTFA (C) und MeOx mit BSTFA (D); R entspricht einem chemischen Rest.....	A10
Abbildung A 2: Halblogarithmische Darstellung der der Wachstumskurve von Tag 5 (A) bis Tag 10 (F).....	A23
Abbildung A 3: Massenisotopomerverteilung der Massenfragmente 232 und 260 von Alanin nach 120-144 h Kultivierung mit 100 % U- ¹³ C-Glukose	A24
Abbildung A 4: Massenisotopomerverteilung der Massenfragmente 418, 390, 316 und 302 von Aspartat nach 120-144 h Kultivierung mit 100 % U- ¹³ C-Glukose	A24
Abbildung A 5: Massenisotopomerverteilung der Massenfragmente 432,404 und 330 von Glutamin nach 120-144 h Kultivierung mit 100 % U- ¹³ C-Glukose	A25
Abbildung A 6: Massenisotopomerverteilung der Massenfragmente 246 und 218 von Glycin nach 120-144 h Kultivierung mit 100 % U- ¹³ C-Glukose	A25
Abbildung A 7: Massenisotopomerverteilung der Massenfragmente 286, 258, 184 und 302 von Prolin nach 120-144 h Kultivierung mit 100 % U- ¹³ C-Glukose	A26
Abbildung A 8: Massenisotopomerverteilung der Massenfragmente 390, 362, 288 und 302 von Serin nach 120-144 h Kultivierung mit 100 % U- ¹³ C-Glukose	A26
Abbildung A 9: MIV vom Massenfragment 260 von Alanin der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen	A45
Abbildung A 10: MIV vom Massenfragment 459 von Citrat der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen	A45
Abbildung A 11: MIV vom Massenfragment 418 von Aspartat der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen	A46
Abbildung A 12: MIV vom Massenfragment 432 von Glutamin der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen	A46
Abbildung A 13: MIV der Massenfragmente von Glukose der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen	A47
Abbildung A 14: MIV vom Massenfragment 246 von Glycin der Kontrolle und mit L-Don behandelten Zellen	A48
Abbildung A 15: MIV vom Massenfragment 419 von Malat der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen	A48
Abbildung A 16: MIV vom Massenfragment 261 von Laktat der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen	A49
Abbildung A 17: MIV vom Massenfragment 258 von Prolin der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen	A49
Abbildung A 18: MIV vom Massenfragment 346 von α -Ketoglutarat der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen.....	A50
Abbildung A 19: MIV vom Massenfragment 174 von Pyruvat der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen	A50
Abbildung A 20: MIV der Massenfragmente von Ribose der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen	A51
Abbildung A 21: MIV vom Massenfragment 390 von Serin der Kontrolle und den mit L-Don behandelten Zellen	A52

Abbildung A 22: MIV vom Massenfragment 260 von Alanin der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen	A60
Abbildung A 23: MIV vom Massenfragment 459 von Citrat der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen.....	A60
Abbildung A 24: MIV vom Massenfragment 418 von Aspartat der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen	A61
Abbildung A 25: MIV vom Massenfragment 432 von Glutamin der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen.....	A61
Abbildung A 26: MIV vom Massenfragment 246 von Glycin der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen.....	A62
Abbildung A 27: MIV vom Massenfragment 261 von Laktat der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen.....	A62
Abbildung A 28: MIV der Massenfragmente von Glukose der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen.....	A63
Abbildung A 29: MIV vom Massenfragment 419 von Malat der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen.....	A64
Abbildung A 30: MIV vom Massenfragment 258 von Prolin der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen.....	A64
Abbildung A 31: MIV vom Massenfragment 346 von α -Ketoglutarat der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen	A65
Abbildung A 32: MIV vom Massenfragment 390 von Serin der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen.....	A65
Abbildung A 33: MIV der Massenfragmente von Ribose der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen.....	A66
Abbildung A 34: MIV vom Massenfragment 174 von Pyruvat der Kontrolle und den mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen.....	A67
Abbildung A 35: MIV vom Massenfragment 432 von Glutamin der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen	A76
Abbildung A 36: MIV vom Massenfragment 418 von Aspartat der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen	A76
Abbildung A 37: MIV vom Massenfragment 260 von Alanin der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen.....	A77
Abbildung A 38: MIV vom Massenfragment 261 von Laktat der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen.....	A77
Abbildung A 39: MIV der Massenfragmente von Glukose der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen.....	A78
Abbildung A 40: MIV vom Massenfragment 246 von Glycin der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen.....	A79
Abbildung A 41: MIV vom Massenfragment 346 von α -Ketoglutarat der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen	A79
Abbildung A 42: MIV vom Massenfragment 419 von Malat der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen.....	A80
Abbildung A 43: MIV vom Massenfragment 258 von Prolin der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen.....	A80

Abbildung A 44: MIV vom Massenfragment 174 von Pyruvat der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen	A81
Abbildung A 45: MIV der Massenfragmente von Ribose der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen	A81
Abbildung A 46: MIV vom Massenfragment 390 von Serin der Kontrolle und den mit UK-5099 behandelten Zellen	A82
Abbildung A 47: Vergleichende Flusskarte von mit 3-Bromopyruvat behandelten Zellen vom Validierungsexperiment.....	A101
Abbildung A 48: Vergleichende Flusskarte von mit L-Don behandelten Zellen vom Validierungsexperiment.....	A102
Abbildung A 49: Vergleichende Flusskarte von mit UK-5099 behandelten Zellen vom Validierungsexperiment.....	A103
Abbildung A 50: Graphische Darstellung der Ergebnisse des LDH-Assays der nicht in der Arbeit dargestellten Medikamente des Screenings.....	A104
Abbildung A 51: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 260 von Alanin der Medikamente des Screenings.....	A116
Abbildung A 52: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 418 von Aspartat der Medikamente des Screenings.....	A117
Abbildung A 53: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 459 von Citrat der Medikamente des Screenings.....	A118
Abbildung A 54: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 432 von Glutamin der Medikamente des Screenings.....	A119
Abbildung A 55: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 246 von Glycin der Medikamente des Screenings.....	A120
Abbildung A 56: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 261 von Laktat der Medikamente des Screenings.....	A121
Abbildung A 57: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 419 von Malat der Medikamente des Screenings.....	A122
Abbildung A 58: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 346 von α -Ketoglutarat der Medikamente des Screenings.....	A123
Abbildung A 59: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 286 von Prolin der Medikamente des Screenings.....	A124
Abbildung A 60: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 174 von Pyruvat der Medikamente des Screenings.....	A125
Abbildung A 61: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 390 von Serin der Medikamente des Screenings.....	A126
Abbildung A 62: Vergleichende Flusskarte von mit Amiodaron behandelten Zellen vom Screening	A184
Abbildung A 63: Vergleichende Flusskarte von mit Diclofenac behandelten Zellen vom Screening	A185
Abbildung A 64: Vergleichende Flusskarte von mit Chlorpromazin behandelten Zellen vom Screening	A186
Abbildung A 65: Vergleichende Flusskarte von mit Cisplatin behandelten Zellen vom Screening	A187

Abbildung A 66: Vergleichende Flusskarte von mit Paracetamol behandelten Zellen vom Screening.....	A188
Abbildung A 67: Vergleichende Flusskarte von mit Isoniazid behandelten Zellen vom Screening.....	A189
Abbildung A 68: Vergleichende Flusskarte von mit Tacrin behandelten Zellen vom Screening.....	A190
Abbildung A 69: Vergleichende Flusskarte von mit Tetracyclin behandelten Zellen vom Screening.....	A191
Abbildung A 70: Vergleichende Flusskarte von mit Troglitazon behandelten Zellen vom Screening.....	A192
Abbildung A 71: Vergleichende Flusskarte von mit Verapamil behandelten Zellen vom Screening.....	A193
Abbildung A 72: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 418 von Aspartat (C1-C2-C3-C4).....	A211
Abbildung A 73: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 474 von Glutamin (C1-C2-C3-C4-C5).....	A212
Abbildung A 74: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 319 von Glukose (C1-C2-C3-C4).....	A213
Abbildung A 75: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 246 von Glycin (C1-C2).....	A214
Abbildung A 76: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 261 von Laktat (C1-C2-C3).....	A215
Abbildung A 77: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 419 von Malat (C1-C2-C3-C4).....	A216
Abbildung A 78: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 389 von α -Ketoglutarat (C1-C2-C3-C4-C5).....	A217
Abbildung A 79: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 258 von Prolin (C1-C2-C3-C4).....	A218
Abbildung A 80: Massenisotopomerverteilung vom Massenfragment 174 von Pyruvat (C1-C2-C3).....	A219

8.3 Tabellenverzeichnis Anhang

Tabelle A 1: Berechnung der Aufnahme­rate von AcCoA (Reaktion AA1).....	A11
Tabelle A 2: Berechnung der Aufnahme­rate von Malat (Reaktion AA2)	A12
Tabelle A 3: Berechnung der Aufnahme­rate von Glu.....	A12
Tabelle A 5: Makromolekulare Zusammensetzung von HepG2-Zellen (Medium: Williams Medium E mit 3% FBS) in der späten Exponentiellen Phase.....	A13
Tabelle A 6: Biomassezusammensetzung von Hybridoma-Zellen	A13
Tabelle A 7: Biomassezusammensetzung von Hybridoma-Zellen.....	A13
Tabelle A 8: Grundbausteine der Kohlenhydrat-, Nukleotid- und Lipidanteile der Biomassezusammensetzung von HepG2-Zellen	A13
Tabelle A 9: Aminosäurezusammensetzung der gesamten zellulären Proteine von HepG2- Zellen	A14
Tabelle A 10: Umrechnung der Anteile der Proteine [%] in mmol/g _{Trockengewicht}	A14
Tabelle A 11: Auflistung Grundbausteine (precursor) der Aminosäuresynthese je unmarkierte Aminosäure.....	A15
Tabelle A 12: Summe der für die Biosynthese von 1 g Trockengewicht HepG2-Zellen notwendigen Grundbausteine in Bezug auf den Anteil unmarkierter Aminosäuren.....	A15
Tabelle A 13: Biomassegleichung des Grundmodells; Berechnung auf Grundlage der Tabellen A 5-12.....	A16
Tabelle A 14: Biomassezusammensetzung von Tyrosin	A16
Tabelle A 15: Umrechnung der Biomasse von Tyrosin in die Grundbausteine.....	A16
Tabelle A 16: Reaktionen des Grundmodells.....	A17
Tabelle A 17: Werte Glukosekonzentration der Wachstumskurve mit 5g/l Glukose	A20
Tabelle A 18: Werte Glukosekonzentration der Wachstumskurve mit 2g/l Glukose	A20
Tabelle A 19: Zellzahlen des Serumversuchs, kursive Werte sind theoretische Werte vom Aussäen der Zellen.....	A21
Tabelle A 20: Zellzahlen der ersten Wachstumskurve, kursive Werte sind theoretische Werte vom Aussäen der Zellen.....	A22
Tabelle A 21: Messwerte der Massen­isotopomerverteilung [%] der Aminosäuren des isotopischen Gleichgewichts.....	A27
Tabelle A 22: Messwerte des metabolischen Fliesgleichgewichts; relative Quantifizierung normalisiert auf die Biomasse; Teil 1.....	A29
Tabelle A 23: Messwerte des metabolischen Fliesgleichgewichts; relative Quantifizierung normalisiert auf die Biomasse; Teil 2.....	A31
Tabelle A 24: Ergebnisse des χ^2 -Tests zur Ermittlung der statistische Anpassungsgüte der im Rahmen der Arbeit erstellten Modelle. Abkürzungen: SSR: sum of squared residuals.	A34
Tabelle A 25: Modellparameter aller Modelle. Auflistung der für die modellspezifischen Stoffflussanalysen eingesetzten Auf-/Abgaberaten, Markierungsdaten und Modellierungsconstraints.....	A35
Tabelle A 26: Ergebnisse der Stoffflussanalyse des Etablierungsexperiments.....	A37
Tabelle A 27: Simulierte Austauschflüsse der Etablierungs-Flusswerte.....	A40
Tabelle A 28: LDH-Assay Messwerte der Inhibitoren der Validierung	A41

Tabelle A 29: Massenisotopomerverteilung des Validierungsexperiments; Kontrolle 1 und L-Don.....	A41
Tabelle A 30: Massenisotopomerverteilungen der Kontrolle 1 der Validierung; gemessene versus simulierte Daten.....	A52
Tabelle A 31: Massenisotopomerverteilungen von L-Don der Validierung; gemessene versus simulierte Daten.....	A54
Tabelle A 32: Massenisotopomerverteilung des Validierungsexperiments; Kontrolle 2 und 3-Bromopyruvat	A56
Tabelle A 33: Massenisotopomerverteilung von Kontrolle 2 der Validierung; gemessene versus simulierte Daten.....	A67
Tabelle A 34: Massenisotopomerverteilung von 3-Bromopyruvat der Validierung; gemessene versus simulierte Daten.....	A70
Tabelle A 35: Massenisotopomerverteilung des Validierungsexperiments; Kontrolle 2 und UK-5099	A72
Tabelle A 36: Massenisotopomerverteilungen von UK-5099 der Validierung; gemessene versus simulierte Daten.....	A82
Tabelle A 37: Flusswerte der Kontrolle 1 des Validierungsexperiments	A84
Tabelle A 38: Simulierte Austauschflüsse der Kontrolle 1 der Validierung	A86
Tabelle A 39: Flusswerte von L-Don des Validierungsexperiments.....	A87
Tabelle A 40: Simulierte Austauschflüsse von L-Don der Validierung.....	A89
Tabelle A 41: Flusswerte der Kontrolle 2 des Validierungsexperiments	A90
Tabelle A 42: Simulierte Austauschflüsse der Kontrolle 2 der Validierung	A93
Tabelle A 43: Flusswerte von UK-5099 des Validierungsexperiments	A94
Tabelle A 44: Simulierte Austauschflüsse von UK-5099 der Validierung	A96
Tabelle A 45: Flusswerte von 3-Bromopyruvat des Validierungsexperiments.....	A97
Tabelle A 46: Simulierte Austauschflüsse von 3-Bromopyruvat der Validierung.....	A99
Tabelle A 47: Signifikant unterschiedliche Flüsse des Validierungsexperiments	A100
Tabelle A 48: Messwerte zum LDH-Assay von Screening Teil 1.....	A105
Tabelle A 49: Messwerte zum LDH-Assay von Screening Teil 2.....	A105
Tabelle A 50: Massenisotopomerverteilung des Screenings; Kontrolle, Isoniazid und Chlorpromazin.....	A106
Tabelle A 51: Massenisotopomerverteilung des Screenings; Cisplatin, Paracetamol und Amiodaron.....	A108
Tabelle A 52: Massenisotopomerverteilung des Screenings; Tacrin, Troglitazon und Tetracyclin.....	A111
Tabelle A 53: Massenisotopomerverteilung des Screenings; Verapamil und Diclofenac	A113
Tabelle A 54: Massenisotopomerverteilungen der Kontrolle des Screenings; gemessene versus simulierte Daten.....	A127
Tabelle A 55: Massenisotopomerverteilungen von Paracetamol des Screenings; gemessene versus simulierte Daten.....	A128
Tabelle A 56: Massenisotopomerverteilungen von Tacrin des Screenings; gemessene versus simulierte Daten.....	A130
Tabelle A 57: Massenisotopomerverteilungen von Chlorpromazin des Screenings; gemessene versus simulierte Daten.....	A131

Tabelle A 58: Massenisotopomerverteilungen von Cisplatin des Screenings; gemessene versus simulierte Daten	A133
Tabelle A 59: Massenisotopomerverteilungen von Diclofenac des Screenings; gemessene versus simulierte Daten	A134
Tabelle A 60: Massenisotopomerverteilungen von Isoniazid des Screenings; gemessene versus simulierte Daten	A136
Tabelle A 61: Massenisotopomerverteilungen von Amiodaron des Screenings; gemessene versus simulierte Daten	A138
Tabelle A 62: Massenisotopomerverteilungen von Tetracyclin des Screenings; gemessene versus simulierte Daten	A140
Tabelle A 63: Massenisotopomerverteilungen von Troglitazon des Screenings; gemessene versus simulierte Daten	A142
Tabelle A 64: Massenisotopomerverteilungen von Verapamil des Screenings; gemessene versus simulierte Daten	A143
Tabelle A 65: Zusammenfassung der statistisch signifikant unterschiedlichen Flüsse [%] der einzelnen Modelle des Screenings im Vergleich zur Kontrolle.....	A145
Tabelle A 66: Flusswerte der Kontrolle des Screenings	A145
Tabelle A 67: Simulierte Austauschflüsse der Kontrolle des Screenings	A148
Tabelle A 68: Flusswerte von Cisplatin des Screenings	A149
Tabelle A 69: Simulierte Austauschflüsse von Cisplatin des Screenings.....	A151
Tabelle A 70: Flusswerte von Diclofenac des Screenings	A152
Tabelle A 71: Simulierte Austauschflüsse von Diclofenac des Screenings.....	A155
Tabelle A 72: Flusswerte von Chlorpromazin des Screenings	A156
Tabelle A 73: Simulierte Austauschflüsse von Chlorpromazin des Screenings.....	A158
Tabelle A 74: Flusswerte von Isoniazid des Screenings	A159
Tabelle A 75: Simulierte Austauschflüsse von Isoniazid des Screenings	A162
Tabelle A 76: Flusswerte von Paracetamol des Screenings.....	A163
Tabelle A 77: Simulierte Austauschflüsse von Paracetamol des Screenings.....	A165
Tabelle A 78: Flusswerte von Tetracyclin des Screenings.....	A166
Tabelle A 79: Simulierte Austauschflüsse von Tetracyclin des Screenings.....	A169
Tabelle A 80: Flusswerte von Tacrin des Screenings	A170
Tabelle A 81: Simulierte Austauschflüsse von Tacrin des Screenings	A172
Tabelle A 82: Flusswerte von Verapamil des Screenings	A173
Tabelle A 83: Simulierte Austauschflüsse von Verapamil des Screenings.....	A176
Tabelle A 84: Flusswerte von Troglitazon des Screenings.....	A177
Tabelle A 85: Simulierte Austauschflüsse von Troglitazon des Screenings	A179
Tabelle A 86: Flusswerte von Amiodaron des Screenings	A180
Tabelle A 87: Simulierte Austauschflüsse von Amiodaron des Screenings	A183
Tabelle A 88: Messwerte des LDH-Assays vom Hauptexperiment.....	A194
Tabelle A 89: Massenisotopomerverteilung vom Hauptexperiment; Kontrolle und Paracetamol	A194
Tabelle A 90: Massenisotopomerverteilung vom Hauptexperiment; Diclofenac und Tacrin..	A200
Tabelle A 91: Massenisotopomerverteilung vom Hauptexperiment; Troglitazon	A205

Tabelle A 92: Massenisotopomerverteilungen der Kontrolle des Hauptexperiments; gemessene versus simulierte Daten.....	A220
Tabelle A 93: Massenisotopomerverteilungen von Paracetamol des Hauptexperiments; gemessene versus simulierte Daten.....	A222
Tabelle A 94: Massenisotopomerverteilungen von Diclofenac des Hauptexperiments; gemessene versus simulierte Daten.....	A225
Tabelle A 95: Massenisotopomerverteilungen von Tacrin des Hauptexperiments; gemessene versus simulierte Daten.....	A228
Tabelle A 96: Massenisotopomerverteilungen von Troglitazon des Hauptexperiments; gemessene versus simulierte Daten.....	A231
Tabelle A 97: Flusswerte der Kontrolle des Hauptexperiments	A234
Tabelle A 98: Simulierte Austauschflüsse der Kontrolle des Hauptexperiments	A236
Tabelle A 99: Flusswerte von Paracetamol vom Hauptexperiment.....	A237
Tabelle A 100: Simulierte Austauschflüsse von Paracetamol des Hauptexperiments	A240
Tabelle A 101: Flusswerte von Diclofenac vom Hauptexperiment	A241
Tabelle A 102: Simulierte Austauschflüsse von Diclofenac des Hauptexperiments.....	A244
Tabelle A 103: Flusswerte von Tacrin vom Hauptexperiment	A245
Tabelle A 104: Simulierte Austauschflüsse von Tacrin des Hauptexperiments	A247
Tabelle A 105: Flusswerte von Troglitazon vom Hauptexperiment.....	A248
Tabelle A 106: Simulierte Austauschflüsse von Troglitazon des Hauptexperiments	A251

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Franke, Susanne (geb. Junghanns)
Geburtsdatum	18.12.1990
Geburtsort	Aschersleben

Schulische Ausbildung

1996-2000	Besuch der Grundschule in Giersleben
2001-2003	Sekundarschule „Wippertal“ in Giersleben
2003-2005	Europaschule Gymnasium Stephaneum in Aschersleben
2005-2009	Landesschule Pforta in Bad Kösen, naturwissenschaftlicher Spezialzweig
2009	Abitur

Studium

2009-2013	Pharmazie-Studium, Universität Halle, bis zum 2. Staatsexamen
11.2013-04.2014	Diplom, Universität Freiburg, Thema: „Untersuchungen zur wundheilenden Wirkung von <i>Calendula officinalis</i> L.“
05.2014-11.2014	Praktischer Teil der Ausbildung in der Hubertusapotheke Halle (Saale)
25.11.2014	Drittes Staatsexamen in Pharmazie (Approbation)

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Fließend in Wort und Schrift
Russisch	Grundkenntnisse
Latein	Grundkenntnisse

Berufliche Erfahrungen

10/2009-03/2020 Praktikantenstelle für wissenschaftliche Projekte in der Dr. Junghanns GmbH

01/2015 – 09/2015 Stelle als Apothekerin in der Breitwieser Apotheke am Stadtpark in Aschersleben

Seit 10/2015 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Praktika

09/2007 - 06/2008

Praktikum im Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie für eine besondere Lernleistung

(Thema: *in vitro* Vermehrung von Thymian)

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Björn Junker für die Möglichkeit diese Arbeit zu verfassen danken. Ohne die konstante Unterstützung von seiner Seite, ob in fachlichen oder auch in privaten Dingen, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein großer Dank geht an Dr. Eva Grafahrend-Belau. Eva hat alle Modellierungen durchgeführt und hat immer ein offenes Ohr für Fragen gehabt. Auch hat sie die ganze Arbeit nicht nur einmal gelesen und verbessert. Ich danke dir ganz herzlich dafür.

Ein lieber Dank gebührt Dr. Heiko Noack für seine Hilfe mit allen Zellproblemen, Messproblemen und dem Durchlesen meiner Arbeit. A special thanks to Dr. Manish Raorane for just being himself and helping the whole group in every aspect. Ein ganz lieber Dank an Chris Richter für seine Kameradschaft als Doktorand und Hilfe in allen Lebenslagen. Danke an Susann Aue für die berufliche und private Unterstützung seit dem Beginn meiner Arbeit in der Gruppe. Danke Angela Ernst, dass keine Frage zu dumm war, um damit zu dir zu kommen. Auch möchte ich allen Arbeitsgruppenmitgliedern, welche unsere Gruppe über die Zeit meiner Doktorarbeit nur zeitweise bereichert haben, für die interessanten Gespräche und Denkanstöße danken.

Ein lieber Dank gilt zudem den Arbeitsgruppenmitgliedern der AGs Degenhardt und Niedermeyer für offene Ohren bei Fragen und Problemen. Ein besonderer Dank an Dr. Bettina Rahfeld für die liebe Betreuung in und außerhalb des PB2 Praktikums.

Einen Riesen Dank an Sahra Pfeiffer für weinreiche Abende an denen alle Probleme der Arbeit als Doktorand oder des Schreibens einer Promotion besprochen werden konnten. Du hast mir das Gefühl gegeben, damit nicht allein zu sein.

Meiner Familie möchte ich besonders für die jahrelange Unterstützung trotz meiner Stimmungsschwankungen danken. Ohne die grammatikalische und sprachliche Hilfe meiner Mutti, wäre diese Arbeit schwerer zu lesen.

Und zuletzt möchte ich meinem Mann für seine unermüdliche Ermunterung zu Durchhalten danken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Es wurden ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet, die wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, dass ich mich zu keinem früheren Zeitpunkt um einen Doktorgrad beworben habe.

Halle (Saale, den 08.04.2021)

Susanne Lieselotte Franke (geb. Junghanns)