

Utvikling og optimalisering av protokoll for massespektrometrisk metabolsk profilering av adherente humane celler

Ane Sofie Viset Fremstedal

Biologi

Innlevert: Juni 2012

Hovedveileder: Geir Johnsen, IBI

Medveileder: Per Bruheim, IBT

Håvard Sletta, SINTEF Materialer og Kjemi, avdeling for bioteknologi

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Institutt for biologi

Fremsidebilde: Cellelinjen HeLa S3 i cellekultur. Foto: Ane Sofie Viset Fremstedal.

FORORD

Denne avhandlingen ble skrevet som en del av toårig master i celle- og molekylærbiologi ved institutt for biologi ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), og er etter beste evne skrevet i henhold til «Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses» (Lindon et al. 2005). Det praktiske laboratoriearbeidet har blitt gjennomført ved institutt for bioteknologi og mye av det praktiske arbeidet har blitt gjennomført i samarbeid med masterstudent i bioteknologi Marita Eliassen.

Først vil jeg takke veilederen min Førsteamanuensis Per Bruheim for konstruktive forslag og tilbakemeldinger under det praktiske arbeidet og under skrivearbeidet. Jeg vil også takke Ph.D student Hans Fredrik Nyvold Kvitvang for hjelp med GC-MS/MS analysen og laboratoriearbeidet generelt.

En spesiell takk til Førsteamanuensis Mette Langaas for å ha vist så stor interesse for prosjektet mitt og for å ha tatt deg tid til lange diskusjoner om statistiske modeller for datasettene mine. Jeg vil også takke professor Jarle Tufto og Førsteamanuensis II Ola Håvard Diserud for nyttige statistikkdiskusjoner.

Det er mange som har tatt seg tid til å hjelpe, diskutere eller lese korrektur. Takk til Ph. D student Stina Katrine Lien, overingeniør Kåre Andre Kristiansen, avdelingsingeniør Siri Bachke, Ph. D student Jostein Malmo, Professor Jens Rohloff, senioringeniør Lars Hagen og Kristine Farstad.

Ellers vil jeg takke familie og venner for å ha støttet meg og gitt meg pusterom. Spesielt vil jeg takk Henrik Fliflet og Kaja Cecilie Hellstrøm for hyggelige pauser og oppmuntring.

Sist men ikke minst, vil jeg takke Erik Fredheim Tvedt for å ha vært uendelig tålmodig, kjærlig, hjelpsom og forståelsesfull under arbeidet med denne avhandlingen. Takk for at du har så stor tro på meg og for at du minner meg på at jeg kan vist jeg vil. Nå er et kapittel over, og jeg gleder meg på å ta fatt på neste sammen med deg.

Ane Fremstedal

SAMMENDRAG

I metabolomikk er målet å kvantifisere alle metabolitter i et biologisk system i en definert tilstand, på et bestemt tidspunkt. For å oppnå dette er en god protokoll for prøveopparbeidelse og analyse essensielt. Flere kritiske trinn (vasketrinn før metabolittekstraksjon, metabolittekstraksjon, oppkonsentrering av metabolittekstrakt og metode for normalisering av ulikt celleantall) i opparbeidelsen av metabolittekstrakt fra humane adherente celler har blitt evaluert og en protokoll for metabolsk profilering av det intracelleulære metabolomet i humane adherente celler har blitt utarbeidet.

Flere vaskeløsninger ved ulik temperatur har blitt evaluert, og to vasketrinn med kald (0°C) fosfatbufret saltvann (PBS) før metabolittekstraksjon ble ansett som den mest egnede vaskeløsningen. Et vasketrinn med vann etter PBS-vask førte derimot til et signifikant tap av metabolitter.

To ekstraksjonsmidler ble sammenlignet, og ekstraksjon med kokende etanol ble ansett som det mest effektive ekstraksjonsmiddelet i metabolittekstraksjon fra humane adherente celler. Etanolekstraktene inneholdt en signifikant høyere gjennomsnittlig metabolittkonsentrasjon av MCF-derivatiserte metabolitter enn metanolekstraktene samt at antallet uidentifiserte metabolitter klart var større i etanolekstraktene enn i metanolekstraktene. I tillegg førte ekstraksjon med kokende etanol til svært effektiv ekstraksjon av lipider.

Væske-væske ekstraksjon med kloroform førte til et signifikant tap av metabolitter og ble derfor ikke ansett som en egnet metode for å fjerne lipidfraksjonen i metabolittekstraktene. Væske-væske ekstraksjon med heksan førte ikke til en betydelig fjerning av lipidfraksjonen i metabolittekstraktene og ble derfor ikke ansett som en egnet metode. Videre arbeid vil derfor være nødvendig, og solid-fase ekstraksjon anses som en lovende kandidat for videre arbeid.

«SpeedVaccing» av metabolittekstrakter ekstrahert med 75 % vandig etanol medførte langvarig inndamping ved hevet temperatur, noe som økte sjansen for tap av varmelabile metabolitter. Under frysetørking ble metabolittekstraktet holdt nedkjølt under hele prosessen og denne metoden ble derfor ansett som en mer egnet metode for oppkonsentrering av vannholdige metabolittekstrakter.

Da adherente celler ikke kan telles før metabolittekstraksjon ble ulike normaliseringsmetoder undersøkt, blant disse var BCA proteinassay klart den mest egnede metoden og bruk av BCA mikroassay anbefales.

Den optimaliserte protokollen ble brukt til å undersøke effekten av eksponering med 5 μ M 5-Fluoruracil i 5 minutter, 2 timer og 8 timer på HeLa S3 celler. Den metabolske profilen til de eksponerte cellene viste en relativt liten endring i konsentrasjon av aminosyrer og organiske syrer.

ABSTRACT

Metabolomics aims to quantify all metabolites in a biological system in a defined state, at a particular time. A good protocol for sample preparation and analysis is essential to achieve this goal. Several critical steps (washing step prior to extraction of metabolites, extraction of metabolites, solvent evaporation of metabolite extract and method for normalization of differences in cell numbers) in preparation of metabolite extract from human adherent cells has been evaluated and a protocol for metabolic profiling of the intracellular metabolite composition in human adherent cells has been developed.

Several washing solutions at different temperatures have been evaluated, and two washing steps with cold (0 °C) phosphate buffered saline (PBS) before metabolite extraction, was considered most suitable. However, a washing step with water after PBS wash led to a significant loss of metabolites.

Two extraction methods were compared, and extraction with boiling ethanol was considered the most efficient method for extracting metabolites from human adherent cells. The mean metabolite concentrations of the 31 identified MCF-derived metabolites was significantly higher when extracting with boiling ethanol, and the number of unidentified metabolites was clearly greater in the ethanol extracts than in the methanol extracts. In addition, extraction with boiling ethanol led to highly efficient extraction of lipids.

Liquid-liquid extraction with chloroform led to a significant loss of metabolites and was therefore not considered a suitable method for removal of the lipid fraction in the metabolite extracts. Liquid-liquid extraction with hexane did not result in a significant removal of lipid fraction in the metabolite extract and was therefore not considered a suitable method. Further work will be required, and solid-phase extraction of metabolite extracts is regarded as a promising candidate for further analysis.

"SpeedVaccing" of metabolites extracted with 75% ethanol resulted in prolonged evaporation at elevated temperatures, which increased the chance of loss of heat labile metabolites. During freeze-drying on the other hand, the metabolite extract was kept refrigerated during the entire process and this method was therefore considered a more suitable method for concentration of aqueous metabolite extracts.

Adherent cells cannot be counted before metabolite extraction, therefore different normalization methods were examined, and BCA protein assay was clearly the most suitable method and use of BCA micro assay is recommended.

The optimized protocol was used to examine the effect of exposure to 5 μ M 5-Fluorouracil for 5 minutes, 2 hours and 8 hours on Hela S3 cells. The metabolic profile of the exposed cells showed a slight change in the concentration of amino acids and organic acids.

FORKORTELSER

Acetyl-CoA	Acetyl coenzym A
ANOVA	Analysis of variance
ASVF	Ane Sofie Viset Fremstedal
ATP	Adenosin-5'-trifosfat
ADP	Adenosin-5'-difosfat
AMP	Adenosin-5'-monofosfat
BCA	Bicinchoninic acid
CID	Kollisjonsindusert dissosiering
DHD	Dihydropyrimidin dehydrogenase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
D-PBSA	Dulbecco's phosphate buffered saline solution A
ESI	Elektrospray ionisering
FBS	Fetal bovine serum
5-FU	5-Fluoruracil
f.	Følgende side
MRM	Multiple reaction monitoring
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PCA	Principal component analysis
SRM	Selected reaction monitoring
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
TS	Tymidylat syntase
WR	Working reagent

INNHALDSFORTEGNELSE

1 INTRODUKSJON	1
1.1 Metabolismen i kreftceller	1
1.2 Metabolomikk og metabolomanalyse.....	2
1.3 Eksperimentell design i metabolomikk	3
1.4 Prøveopparbeidelse.....	4
1.4.1 Fjerning av kultiveringsmediet.....	4
1.4.2 Vasketrinn før metabolittekstraksjon	4
1.4.3 Metabolittekstraksjon.....	4
1.4.4 Teknikker for å løse adherente celler	7
1.4.5 Oppkonsentrering av metabolittekstrakt	7
1.5 Analytiske plattformer i metabolomikk.....	7
1.5.1 Gasskromatografi – massespektroskopi (GC-MS)	8
1.6 Dekonvolusjon, identifisering og kvantitativ analyse	12
1.7 5-Fluoruracil.....	13
1.8 Mål for oppgaven	13
2 MATERIALE OG METODE	14
2.1 Cellelinjer	14
2.2. Cellekultivering	15
2.3 Sammenligning av kald metanol og varm etanol som ekstraksjonsmiddel.....	16
2.3.1 Metabolittekstraksjon etterfulgt av TMS derivatisering	16
2.3.2 Metabolittekstraksjon etterfulgt av MCF derivatisering	18
2.4 Optimalisering av vasketrinn før metabolittekstraksjon.....	18
2.5 Valg av avdampingsmetode	19
2.6 Fjerning av lipidfraksjon.....	20
2.7 Eksponeringsstudie med 5-Fluoruracil.....	21
2.8 Korrigering for ulik cellevekst.....	23
2.8.1 Tørrvekt av cellepellet.....	23
2.8.2 Proteininnhold i supernatant.....	23
2.8.3 Deteksjon av proteininnhold i cellepellet.....	23
2.9 Derivatisering av tørket celleekstrakt.....	26

2.9. 1 Metylklorformat derivatisering	26
2.9. 2 Trimetylklorsilyl derivatisering	27
2.10 Gasskromatografi - massespektroskopi instrumentering	28
2.10.1 Gasskromatografi - massespektroskopi singel kvadrupol (GC-MS SQ)	28
2.10.2 Gasskromatografi-massespektroskopi trippel kvadrupol (GC-MS QhQ).....	29
2.11 Identifikasjon og kvantitativ analyse	30
2.12 Statistisk analyse og databearbeidelse	31
3 RESULTAT OG DISKUSJON	34
3.1 Valg av ekstraksjonsmiddel	34
3.1.1 Metabolittekstraksjon etterfulgt av TMS derivatisering	34
3.1.2 Metabolittekstraksjon etterfulgt av MCF derivatisering	37
3.2 Fjerning av lipidfraksjon fra metabolittekstrakter.....	41
3.3 Optimalisering av vasketrinn før metabolittekstraksjon	45
3.4 Sammenligning av «SpeedVac» og frysetørking til oppkonsentrering av metabolittekstrakt.....	50
3.5 Korrigering for forskjell i cellevekst.....	53
3.5.1 Tørrvekt av cellepellet	54
3.5.2 Proteininnhold i metabolittekstraktets supernatant.....	54
3.5.3. Proteininnhold i cellepellet	54
3.6 Eksponeringsstudie med 5-Fluoruracil.....	58
3.6.1. 5 minutters eksponering med 5 – Fluoruracil	58
3.6.2 2 timers eksponering med 5 – Fluoruracil.....	58
3.6.3 8 timers eksponering med 5 – Fluoruracil.....	58
3. 7 Generelt	59
3.7.1 Mangel på celledelleprøver	59
3.7.2 Normalisering mot intern standard	59
3.7.3 Svakheter ved den statistiske analysen.....	59
4 KONKLUSJON	60

1 INTRODUKSJON

1.1 Metabolismen i kreftceller

I kontrast til normale differensierte celler, som i hovedsak bryter ned glukose gjennom mitokondriell oksidativ fosforylering, bryter de aller fleste kreftceller ned glukose gjennom glykolyesen til laktat, uavhengig av om oksygen er til stede eller ikke; de driver aerob glykoslyse. Denne formen for glukosemetabolisme kalles Warburg-effekten og ble observert allerede i 1924 av Otto Warburg (Vander Heiden et al. 2009).

Når glukose brytes ned gjennom glykolyse, sitronsyresyklus og oksidativ fosforylering, maksimeres produksjonen av ATP, med en minimal produksjon av laktat. Så hvorfor driver kreftceller en mindre effektiv metabolisme, i hvert fall i form av ATP produksjon? Ueffektiv ATP produksjon er kun en hindring når næringstilgangen er redusert, dette er ikke tilfelle for prolifererende mammalske celler som er utsatt for en kontinuerlig tilgang på glukose og andre næringsstoffer i sirkulerende blod. Tilgangen på ATP vil derfor aldri være begrensende i disse cellene. Under cellevekst benyttes glukose til å generere biomasse i tillegg til å produsere ATP. Selv om ATP-hydrolyse fører til fri energi til opparbeidelsen av biomasse, har disse reaksjonene krav utover behovet for ATP. Syntese av aminosyrer og nukleinsyrer krever flere ekvivalenter med karbonatomer og NADPH enn ekvivalenter med ATP. I en raskt prolifererende celle kan dermed ikke flertallet av glukosemolekylene brytes fullstendig ned til karbondioksid (Vander Heiden et al. 2009).

For mammalske celler i kultur er det bare to molekyler som kataboliseres i betydelige mengder, glukose og glutamin. Glukose og glutamin forsyner cellen med hovedmengden av karbon, nitrogen, fri energi og reduserende ekvivalenter som er nødvendig for å opprettholde cellevekst og deling. Noen glukosemolekyler må også omdannes til prekursorer som acetyl-CoA til fettsyresyntese, glykolytiske intermediater til ikke-essensielle aminosyrer og ribose til nukleotidsyntese (Vander Heiden et al. 2009). I enkelte krefttyper omdannes opp til 90 % av glukosen og 60 % av glutaminen til laktat eller alanin. Det meste skilles ut som avfallsstoffer, men produksjonen av disse stoffene gir en robust produksjon av NADPH. Glutamin er en viktig kilde til nitrogen til nukleotider og ikke-essensielle aminosyrer. Katabolisering av glutamin til laktat produserer NADPH i omdannelsen av malat til pyruvat. Omdannelsen av glukose og glutamin til laktat krever enzymet laktat dehydrogenase som reduserer pyruvat til laktat. Inhibering av laktat dehydrogenase hindrer celleproliferasjon, mest trolig ved å hindre cellen i å skille ut overflødig karbon. Utskillelsen av overflødig karbon kan være nødvendig for å generere nok NADPH til å drive celleproliferasjon. Utskillelsen av overflødig karbon i form av laktat er også effektivt for kreftcellen fordi det gir cellen anledning til å inkorporere karbon inn i biomasse raskere, som igjen gjør at cellene kan dele seg oftere. Det er de cellene som greier å omdanne glukose og glutamin til biomasse mest effektivt som vil kunne proliferere raskest (Vander Heiden et al. 2009). Flere

studier har også vist at laktatproduksjonen til en kreftsvulst før kreftbehandling, er negativt korrelert til pasientens overlevelse i enkelte former for kreft (Hirschhaeuser et al. 2011).

De fleste karbonatomene som går til fettsyresyntese kommer fra glukose. Glukose omdannes til acetyl-CoA og brukes til å produsere sitronsyre i sitronsyresyklus. Når konsentrasjonen av ATP/ADP og NADH/NAD⁺ er høy, slik den vanligvis er i prolifererende celler, så flyttes sitronsyre ut i cytosol hvor fettsyresyntesen finner sted. Først omdannes sitronsyre til acetyl-CoA igjen og acetyl-CoA benyttes som byggestein til den voksende acylkjeden. Syntese av acetyl-CoA fra sitronsyre krever enzymet ATP citrat lyase. Inhibering av dette enzymet har vist å gi svekket vekst av kreftsvulster fordi cellene har problemer med å produsere fettsyrer (Vander Heiden et al. 2009). Enkelte krefttyper visert økt opptak av acetat. Acetat kan omdannes til acetyl-CoA et opptak av acetat kan dermed redde lipidsyntesen når produksjonen av lipider er blokkert ved at citrat lyase er inhibert. Cellen kan dermed fortsette lipidbiosyntese og cellevekst (DeVita et al. 2011 s. 94). Behovet for intermediater for andre syntetiske spor til nukleinsyre- og aminosyresyntese må også balanseres på samme måte (Vander Heiden et al. 2009).

På tross av betydelige endringer i den cellulære metabolismen i mange former for kreft finnes det i dag bare et fåtall behandlingsformer som utnytter disse forskjellene (DeVita et al. 2011 s. 91). Økt kunnskap om kreftcellemetabolismen og mekanismene for regulering gir mulighet til å finne spesifikke biomarkører som kan brukes til å detektere kreft, utarbeide prognoser og utvikle nye mål for cellegiftbehandling (DeVita et al. 2011 s. 99; Spratlin et al. 2009).

1.2 Metabolomikk og metabolomanalyse

Metabolomet består av den komplette samlingen av metabolitter, kjemiske forbindelser som er substrat, intermediat eller produkt i metabolske spor med en masse på under 1000 Dalton, i en celle (Khoo & Al-Rubeai 2007; Lawrence 2005 s. 393; Nielsen & Jewett 2007 s. 1; Villas-Bôas et al. 2005b). Metabolittkonsentrasjonen i cellen avhenger av konsentrasjonen og egenskapene til en rekke enzymer, og metabolittkonsentrasjonen er derfor en kompleks funksjon av mange forskjellige regulatoriske prosesser, for eksempel regulering av transkripsjon og translasjon, regulering av protein – proteininteraksjoner, og allosterisk regulering av enzymene gjennom interaksjon med metabolittene. Metabolittkonsentrasjonen sier mye om cellens tilstand og reflekterer cellens eller vevets fenotype i respons til endringer i miljøet. Mange intracellulære metabolitter deltar i en rekke forskjellige biokjemiske reaksjoner og knytter dermed mange ulike deler av cellens metabolisme sammen til et nøye kontrollert metabolsk nettverk (Villas-Bôas et al. 2005b). For å kunne studere hvordan metabolittkonsentrasjonen fluktuerte ettersom miljøet endrer seg, må konsentrasjonen av metabolittene måles, dette kalles metabolomikk, og kan defineres som kvantifiseringen av alle metabolitter i et biologisk system i en definert tilstand, på et bestemt tidspunkt (Schaub et al. 2006).

Metabolomikk kan igjen deles opp i metabolsk profilering og metabolsk «fingerprinting». I metabolsk profilering måles alle individuelle metabolitter i en gitt biologisk prøve, mens i metabolsk «fingerprinting» måles bare en bestemt del av metabolittene i systemet, for eksempel metabolittene knyttet til et bestemt metabolsk spor. Med denne fremgangsmåten kvantifiseres bare et bestemt antall metabolitter. Det er derimot stor overlapp mellom disse definisjonene og hvordan de brukes i litteraturen (Griffin & Shockcor 2004).

Metabolomet består av en rekke forbindelser med stor kjemisk variasjon, kort «turn-over»-tid og svært varierende konsentrasjon (Dietmair et al. 2010; Villas-Bôas et al. 2005b). Denne enorme spredningen gjør det så og si umulig å detektere og identifisere hele metabolomet samtidig (Villas-Bôas et al. 2005b). For å få størst mulig innsikt i hvordan metabolomet endres, er det essensielt å benytte en effektiv og robust protokoll for prøveopparbeidelse samt en kombinasjon av flere analytiske plattformer (Villas-Bôas et al. 2005b).

1.3 Eksperimentell design i metabolomikk

I en ideell metabolsk analyse ønsker en;

- Et momentant øyeblikksbilde av alle metabolitter i et system,
- Momentan og helst permanent inaktivering av all enzymatisk aktivitet, kalt «quenching» med påfølgende eller kombinert ekstraksjon (Sellick et al. 2008),
- Høyest og mest fullstendig ekstraksjon av flest mulig metabolitter (Gonzalez et al. 1997), der den ekstraherte metabolittblandingen korresponderer til den *in vivo* fysiologiske tilstanden til det biologiske systemet da prøven ble tatt (Buchholz et al. 2002),
- Optimale forhold for prøven frem til, og under kvantitativ analyse for å unngå degradering eller endring i metabolittekstraktet (Canelas et al. 2009; Schaub et al. 2006),
- At prøvematriksen er kompatibel med den analytiske metoden og ikke inneholder elementer som virker forstyrrende eller hindrer bestemmelsen av metabolitter (Gonzalez et al. 1997; Mashego et al. 2007),
- Å benytte en analytisk metode som har høy eksperimentell robusthet, reproduserbarhet, oppløsningsevne, høy sensitivitet og kort analysetid for å øke antallet prøver som kan analyseres (De la Luz-Hdez 2012 s. 7; Khoo & Al-Rubeai 2007),
- En analyse som gir entydig kvantifisering og identifikasjon av metabolitter (De la Luz-Hdez 2012 s. 5).

1.4 Prøveopparbeidelse

1.4.1 Fjerning av kultiveringsmediet

Dersom en studerer metabolitter som er til stede både i kultiveringsmediet og intracellulært, må kultiveringsmediet fjernes da metabolittkonsentrasjonen i mange tilfeller er langt høyere i mediet enn intracellulært (Schaub et al. 2006; Sellick et al. 2008).

1.4.2 Vasketrinn før metabolittekstraksjon

Selv om kultiveringsmediet fjernes vil det fremdeles være igjen rester og disse vil kontaminere metabolittekstraktet (Dietmair et al. 2010). For å unngå dette kan cellelaget vaskes med en vaskeløsning. Dersom et slikt vasketrinn skal være hensiktsmessig er det viktig at det ikke fører til metabolittlekkasje eller endringer i metabolomet (Schaub et al. 2006; Sellick et al. 2008). Hvorvidt et eller flere vasketrinn er nødvendig eller hensiktsmessig avhenger av metabolittene som studeres. Dersom aminosyrer studeres vil kanskje flere vasketrinn være nødvendig for å oppnå en nøyaktig kvantifisering av det intracellulære metabolomet (Dietmair et al. 2010).

Flere har rapportert bruk av iskald fosfat-bufret saltvann (PBS, pH = 7,4) for å fjerne rester av kultiveringsmediet (Danielsson et al. 2010; Dettmer et al. 2011; Sheikh et al. 2011; Teng et al. 2009). Enkelte har også brukt ionefritt vann til å rense celleoverflaten før «quenching» og ekstraksjon (Lorenz et al. 2011). Lorenz et al. (2011) observerte en tydelig økning i detektert «peak area¹» fra metabolittekstrakter fra cellekulturer vasket med vann (37 °C) i to sekunder før «quenching» og ekstraksjon. Denne endringen ble i hovedsak forklart med at salter som påvirker elektropray ionisering (ESI), ble fjernet. Lorenz et al. (2011) konkluderte med at en vannvask forbedrer signalet uten å endre metabolomet signifikant.

1.4.3 Metabolittekstraksjon

Flere forskjellige ekstraksjonsmidler og ekstraksjonsprosedyrer har blitt rapportert i litteraturen, inkludert organiske ekstraksjonsmidler, syrer, baser, alkoholer og vann, både ved høy og lav temperatur (Danielsson et al. 2010; Dietmair et al. 2010; Schaub et al. 2006; Sellick et al. 2008). Valg av ekstraksjonsmiddel vil alltid være et kompromiss mellom ekstraksjonseffektivitet til polar og ikke-polare forbindelser (Jiye et al. 2005). Derfor kombineres ofte to eller flere ekstraksjonsmidler, et polart organisk løsemiddel og et upolart ekstraksjonsmiddel (Dunn et al. 2005; Duportet et al. 2011; Khoo & Al-Rubeai 2007; Villas-Bôas et al. 2005b). Et slikt tofasesystem gir mulighet for en separat analyse av de to fasene, men det er også en fare for utfelling mellom fasene (Danielsson et al. 2010; Dettmer et al. 2007).

Noen aspekter av ekstraksjonseffektiviteten til et ekstraksjonsmiddel kan avhenge av organismen som studeres. Hvor fullstendig ekstraksjonen er, vil for eksempel variere ettersom hvor lett cellen lyserer (Canelas et al. 2009). Selv om det finnes mye

¹ Området under den kromatografiske toppen.

informasjon om metabolittekstraksjon i mikroorganismer, finnes det i dag bare et fåtall metabolittekstraksjonsmetodologier som omfatter flere metabolittklasser i humane adherente cellekulturer (Danielsson et al. 2010; Dietmair et al. 2010; Lorenz et al. 2011; Sheikh et al. 2011).

Valg av ekstraksjonsmiddel er kanskje det viktigste trinnet i hele ekstraksjon- og analyseprotokollen da både Duportet et al. (2011) og Canelas et al. (2009) viste at metabolittekstraksjon med forskjellige ekstraksjonsmiddel kan gi signifikant forskjellige metabolske profiler, som igjen drastisk påvirker hvordan dataene tolkes biologisk.

Kokende vann

Canelas et al. rapporterte i (2009) at ekstraksjon med vann (100 °C, 6 min. inkubasjon) potensielt førte til delvis proteinhydrolyse og ble derfor ikke ansett som egnet for metabolittekstraksjon.

Syre eller base

Ekstraksjon med syre eller base er en klassisk metode for ekstraksjon av intracellulære metabolitter, men ikke alle metabolitter er stabile ved veldig lav eller høy pH. Dette ble bekreftet av Hajjaj et al. (1998) som observerte nukleotiddegradering under ekstraksjon med perklorsyre. Disse funnene ble bekreftet av Prasad Maharjan & Ferenci i (2003). Bruk av syrer krever nøytralisering, noe som fører til høye saltkonsentrasjoner, hindrer den videre derivatiseringsprosessen og den kromatografiske analysen (Schaub et al. 2006). Ekstraksjon med syre kan også føre til oksidasjon av metabolitter og proteiner i løsningen og anses derfor ikke som et egnet (Griffin & Kauppinen 2006).

Kokende etanol

Ekstraksjon med kokende etanol er et mye brukt ekstraksjonsmiddel, spesielt på mikroorganismer (Gonzalez et al. 1997; Hajjaj et al. 1998; Lange et al. 2001). Fordelen med metoden er at metabolismen stoppes momentant, proteiner denatureres og felles ut, og det er ikke nødvendig å tilsette salter for nøytralisering samtidig som at metabolittene ikke utsettes for ekstreme pH-verdier (Gonzalez et al. 1997; Prasad Maharjan & Ferenci 2003). Flere har derimot uttrykt bekymring for om hvorvidt den høye temperaturen fører til metabolittdegradering eller omdannelse (Prasad Maharjan & Ferenci 2003). Schaub et al. (2006) studerte derfor stabiliteten til flere metabolske standarder² ved 95 °C etter 0,1, 1, 3 og 5 minutter og fant at oppvarmingen ikke førte til en signifikant degradering av metabolittene, med unntak av dihydroksyacetonfosfat og glyseraldehyd-3-fosfat. Dietmair et al. (2010) rapporterte derimot at ekstraksjon med varm etanol førte til degradering av UDP-glukose og UDP-Glukoronsyre til UDP. Degraderingen var ikke like omfattende i ekstrakter ekstrahert med kald etanol, noe som tydet på at degraderingen til en viss grad var temperaturavhengig (Dietmair et al. 2010). Funnene til Gonzalez et al. (1997) tydet derimot på at glukose-6-fosfat, ATP,

² 3-Fosfoglyserat, 6-Fosfoglukonat, AMP, ADP, Citrat, Dihydroksyacetonfosfat, Fruktose-6-fosfat, Fruktose-1,6-bifosfat, Glukose-6-fosfat, Glyseraldehyd-3-fosfat, Fosfoenolpyruvat, Pyruvat og Ribose-5-fosfat.

puruvat, NAD og NADH var veldig stabil og hadde en utmerket gjenfinning («recovery») i kokende etanolløsning bufret med HEPES. De konkluderte med at metoden er rask, nøyaktig, pålitelig og at ekstraksjon med 75 % etanol bufret med HEPES, etterfulgt av 3 minutters inkubasjon var optimalt for metabolittekstraksjon i *Saccharomyces cerevisiae* (Gonzalez et al. 1997). Lange et al. (2001) bekreftet senere at 3 minutters inkubasjon ved 80 – 90 °C førte til mest fullstendig ekstraksjon, samtidig som sjansen for degradering var redusert. Dietmair et al. (2010) observerte senere at tilsetning av HEPES til kokende etanol ikke økte gjenfinningen av metabolitter i ekstrakter fra CHO³ celler.

Kald metanol

Et svært mye brukt kombinert quenche- og ekstraksjonsmiddel, spesielt på mikroorganismer, er kald løsning av ren metanol eller vandig metanol (Faijes et al. 2007; Jiye et al. 2005; Prasad Maharjan & Ferenci 2003; Villas-Bôas et al. 2005a; Winder et al. 2008). Fordelen med denne metoden er at prøvene ikke utsettes for ekstreme temperaturer eller pH verdier, samtidig som metabolittanalysen ikke hemmes av tilsetning av salt. Ulempen med denne ekstraksjonsmetoden er at den enzymatiske aktiviteten mest trolig ikke er fullstendig eliminert (Faijes et al. 2007; Lorenz et al. 2011; Sellick et al. 2008).

Metanol-kloroform

Flere mener også at en kombinasjon av metanol og kloroform er det mest effektive ekstraksjonsmiddelet (Lorenz et al. 2011), mens Prasad Maharjan & Ferenci rapporterte i (2003) at ekstraksjon med kald metanol eller varm etanol klart var et mer effektivt ekstraksjonsmiddel enn metanol-kloroform på *Escherichia coli* celler.

Canelas et al. (2009) sammenlignet metabolittekstraksjon med varmt vann (100 °C, 6 minutter inkubasjon), 75 % etanol (95 °C, inkubasjon i 3 minutter), kald kloroform – metanol (50 % vandig metanol etterfulgt av kloroform), fryse-tining med metanol og acetonitril-metanol i *Saccharomyces cerevisiae*. Både ekstraksjon med kokende etanol og metanol–kloroform gav tilfredsstillende resultater og god reproducerbarhet med en gjenfinning av metabolitter på nesten 100 % for de 44 studerte metabolittene⁴. Ekstraksjon med kokende etanol hadde svært høy reproducerbarhet og ga nesten ingen spesifikke metabolittap. Canelas et al. (2009) observerte også at fryse-tining med metanol ikke forhindret metabolittomdannelse, mest trolig fordi enzymaktiviteten ikke ble fullstendig inaktivert. Denne ekstraksjonsmåten ble derfor ikke ansett som en egnet.

Målrettet ekstraksjon av enkelte metabolittklasser

Stadig flere mener det er nødvendig å utvikle spesifikke, individualiserte ekstraksjonsprotokoller rettet mot bestemte metabolittklasser i stedet for å prøve å finne en protokoll som passer alle metabolitter, og at dette er en mer realistisk

³ «Chinese hamster ovary».

⁴ Fosforylerte intermediater, aminosyrer, organiske syrer og nukleotider.

fremgangsmåte for å kunne detektere alle metabolitter i en gitt organisme (Faijes et al. 2007; Mashego et al. 2007; Prasad Maharjan & Ferenci 2003; Sellick et al. 2008; Villas-Bôas et al. 2005b; Winder et al. 2008).

1.4.4 Teknikker for å løsne adherente celler

En rekke cellelinjer vokser adherent og må løsnes fra bunnen av kultiveringsbeholderen før ekstraksjon. Et ekstraksjonsmiddel kan tilsettes direkte til kultiveringsbeholderen og lysere og ekstrahere cellemetabolittene i et trinn. Dette forhindrer derimot telling av celleantallet, som er det parameteret som er vanlig å bruke til normalisering av data i cellekultursystemer (Dettmer et al. 2011). Det er vanlig å benytte en celleskrape for å løsne cellene etter at ekstraksjonsløsningen er tilsatt, da både Teng et al. (2009) og Dettmer et al. (2011) fant at trypsinering av cellene førte til endringer i metabolomet.

Celleekstraktet inneholder en blanding av celledbris, proteiner og metabolitter. Disse må separeres, vanligvis ved hjelp av sentrifugering eller filtrering (Khoo & Al-Rubeai 2007).

1.4.5 Oppkonsentrering av metabolittekstrakt

Ekstraksjonsmiddelet kan fjernes på flere måter, men inndamping ved redusert trykk (Canelas et al. 2009; Danielsson et al. 2010; Dettmer et al. 2011; Dietmair et al. 2010; Duportet et al. 2011; Jiye et al. 2005; Kanani et al. 2008; Lange et al. 2001; Mashego et al. 2007; Prasad Maharjan & Ferenci 2003; Schaub et al. 2006; Teng et al. 2009; Villas-Bôas et al. 2011) eller frysetørking (Čuperlović-Culf et al. 2010; Dietmair et al. 2010; Duportet et al. 2011; Grob et al. 2003; Hajjaj et al. 1998; Schaub et al. 2006; Wojtowicz et al. 2012 s. 35) er de mest brukte. Frysetørking er vanlig å bruke på vandige prøver for å konsentrere ekstraktet samtidig som en unngår termisk degradering. Metoden kombinerer dypfrysing og dehydrering i en og samme metode (Villas-Bôas et al. 2005b). Ikke-vandige ekstrakter konsentreres vanligvis ved å dampe inn prøven under redusert trykk (Villas-Bôas et al. 2005a). Villas-Bôas et al. (2005a) sammenlignet bruk av SpeedVac (uten oppvarming, 3,5 time) og frysetørking til oppkonsentrering av metabolittekstrakt. Villas-Bôas et al. (2005a) fant at bruk av SpeedVac bare egner seg for ekstraksjonsmetoder basert på organiske løsemiddel med en kort oppkonsentrering av ekstraktet. Vandige ekstrakter tar langt lengre tid å oppkonsentrere og det vil være nødvendig med oppvarming (Villas-Bôas et al. 2005a).

1.5 Analytiske plattformer i metabolomikk

Mange analytiske instrumenter og metoder kan brukes til dette formålet. Flertallet av metabolske målinger benytter kjernemagnetisk resonans (NMR) og massespektroskopi (MS), med et vidt spekter av eksperimentelle og teknologiske variasjoner, alt etter som hva som er fokusområde for eksperimentet (Čuperlović-Culf et al. 2010).

I metabolsk analyse ønsker en et instrument som;

- Har høy oppløsning og sensitivitet,
- Takler stor spredning i konsentrasjon (fra pM til mM),

- Kan identifisere og kvantifisere ulike molekyler,
- Har kort analysetid slik at flere prøver kan analyseres,
- Kan foreta måling av mange prøver uten at prøvene degraderes før eller under analyse,
- Reproduserbare målinger (Čuperlović-Culf et al. 2010; De la Luz-Hdez 2012 s. 7).

Alle analytiske plattformer har sine fordeler og ulemper og til per dags dato finnes ikke en analytisk plattform eller metode som kan analysere hele metabolomet til en celle alene, på grunn av den enorme spredningen i kjemiske egenskaper mellom forskjellige metabolitter (Baker 2011; Büscher et al. 2009; Danielsson et al. 2012; Desbrosses et al. 2005 ss. 165f ; Dettmer et al. 2007; Dettmer et al. 2011; Duportet et al. 2011; Griffin 2006; Kopka 2006; Winder et al. 2008). Det er derfor viktig å kombinere flere analytiske plattformer for å få et mest mulig fullstendig bilde av den fysiologiske tilstanden cellen (Kopka 2006).

GC-MS er en av de mest brukte MS-baserte analysemetodene innenfor metabolomikk og metabolsk profilering av kreftceller (Griffin & Kauppinen 2006), og anses som gullstandarden innenfor metabolsk deteksjon og kvantifisering (Dunn & Ellis 2005; Kanani & Klapa 2007; Khoo & Al-Rubeai 2007; Sellick et al. 2008; Villas-Bôas et al. 2005b; Winder et al. 2008). GC-MS er en svært sensitiv metode som reduserer mengden biologisk materiale som er nødvendig for å oppnå nøyaktige målinger, høy reproduserbarhet, oppløsning og godt utbygde databaser for metabolittidentifikasjon og eksperimentelle protokoller. GC-MS er også den metoden med lavest innkjøp, bruk og reparasjonskostnader i forhold til andre tilgjengelige teknologier, og er i forhold til mange andre teknologier lite plaget med matrikseffekter (Kanani et al. 2008; Kopka 2006; Winder et al. 2008).

1.5.1 Gasskromatografi – massespektroskopi (GC-MS)

Gasskromatografi

Kromatografi separerer komponentene i en blanding i henhold til deres retensjonstider, det vil si det tidspunktet hvor de eluerer fra den kromatografiske kolonna (Gross 2011 s. 652). Når en gass benyttes som mobilfase i et kromatografisk system kalles teknikken gasskromatografi (GC). Stoffer som skal analyseres ved hjelp av gasskromatografi må være flyktige og stabile ved temperaturen som benyttes. I gasskromatografi kalles den mobile fasen bæregassen. Prøven introduseres i den oppvarmede injektoren, her fordamper prøven og bringes til kolonnen med bæregassen. Stoffene i prøven separeres i kolonnen på bakgrunn av flyktighet, løselighet i stasjonærfasen og temperatur. Stoffene passerer deretter detektoren hvor det genereres et elektrisk signal som forsterkes og skrives ut i form av et kromatogram. En termostatstyrt ovn styrer temperaturen til injektoren, kolonnen og i detektoren (Greibrokk et al. 2005 ss. 109f).

Derivatisering

Mange stoffer er lite flyktige og har polare funksjonelle grupper som gjør de lite egnet for gasskromatografisk analyse, de må derfor derivatiseres. Hensikten med derivatisering er å danne flyktige termisk stabile derivater av stoffene slik at de blir velegnet for gasskromatografi. Valg av derivatiseringsreagens er basert på de funksjonelle gruppene som skal derivatiseres, andre funksjonelle grupper som er til stede i molekylet og molekylets struktur og egenskaper ellers (Greibrokk et al. 2005 s. 149; Gross 2011 ss. 664f; Sigma-Aldrich 1997). Effektiviteten til derivatiseringen avhenger av prøvematriksen og kan være mer effektiv med et lavere antall forbindelser i prøven. Dette betyr at metoder som ekstraherer lavere mengder av metabolitter kan gi høyere kromatografiske topper på grunn av mer effektiv derivatisering (Dietmair et al. 2010). Dette er svært uheldig da en ønsker et proporsjonalt forhold mellom konsentrasjon av en metabolitt i den originale prøven, konsentrasjonen av metabolittens derivater i den derivatiserte prøven og det detekterte «peak area» for metabolittens derivat (Kanani et al. 2008; Kanani & Klapa 2007).

Silylering og metylklorformat derivatisering

Silylering er den mest brukte derivatiseringsmetoden for GC-MS, men metoden har blitt revaluert i flere artikler de siste årene (Kanani et al. 2008; Lien et al. 2012; Villas-Bôas et al. 2011). Villas-Bôas et al. (2011) sammenlignet silylering (TMS) med en annen derivatiseringsteknikk basert på alkylering (MCF) av amino- og ikke-amino organiske syrer og nukleotider fra mikrobielle ekstrakter. De rapporterte at TMS derivatiseringen var lite reproducerbar og at derivatene var lite stabile i løpet av den kromatografiske kjøringen, MCF derivatisering krevde derimot verken oppvarming eller fjerning av vann, reagensene er billigere og derivatene var lett å separere fra den resterende reaksjonsblandingen, noe som fører til mindre skade på GC-kapillærkolonna. De rapporterte også at begge derivatiseringsteknikkene ble påvirket av prøvematriksen, men at noen av TMS-derivatene så ut til å bli mer påvirket enn MCF-derivatene. Derfor ble alkylering med metylklorformater ansett som den mest egnede metoden for analyse av polyfunksjonelle aminer, nukleotider og organiske syrer.

Massespektrometri

En gasskromatograf kan kobles til et massespektrometer. Massespektrometeret kan benyttes som detektor og gir strukturinformasjon om analyttene i tillegg til kvantifisering. Et massespektrometer består av tre hovedkomponenter; en ionekilde, masseanalysator og en detektor. Molekylene ioniseres i ionekilden og de ioniserte molekylene kan fragmenteres i mindre deler. Fragmenteringsgraden avhenger av molekylets struktur og hvor mye energi som tilføres ved ionisering. Massen til de ioniserte molekylene og eventuelle fragmenter kan bestemmes ved at disse separeres i en analysator etter masse/ladning forholdet (m/z) og detekteres av en detektor. Disse prosessene må skje ved veldig lavt trykk for at ionene skal nå frem til detektoren uten å bli stoppet av at de kolliderer med gassmolekyler. Detektoren er vanligvis en elektronmultiplikator. Detektoren detekterer hver enkelt masse (m/z verdi)

etter som analysatoren separerer ut massene en etter en. Den relative intensiteten av ioner som en funksjon av m/z verdier plottes deretter som et histogram kalt et massespektrum (Greibrokk et al. 2005 ss. 255f). Dersom et massespektrometer benyttes som en kromatografisk detektor så produseres et kromatogram som består av en rekke massespektra. Fordi MS-kromatogrammer representerer ionemengden som en funksjon av retensjonstiden så kalles dette et ionekromatogram (Gross 2011 s. 652). Når kromatogrammet baserer seg på den totale ionestrømmen⁵ som en funksjon av tid så kalles det et TIC⁶-kromatogram (Greibrokk et al. 2005 s. 256)

Masseanalysatoren

Det finnes flere forskjellige typer massespektrometre, de er i hovedsak forskjellig i hvordan m/z verdiene separeres (Greibrokk et al. 2005 s. 260). I denne oppgaven har både et singel kvadrupol- og et trippel kvadrupol instrument blitt brukt.

Kvadrupolinstrument

Analysatordelen i dette instrumentet består av fire parallelle hyperbolske eller sylinderformede staver. Disse stavene pålegges en fast likespenning (U) pluss en vekselspanning ($V = V_0 \cos \omega t^7$) i radiofrekvensområdet. Ved å variere spenningene U og V_0 slik at forholdet U/V_0 holdes konstant og med konstant frekvens (ω) vil ioner med forskjellig m/z verdier slippes gjennom en etter en til detektoren (Greibrokk et al. 2005 s. 261). Alle ioner med et annet m/z forhold vil kollidere med stavene eller gå utenfor kvadrupolen og suges opp av vakuumpumpen. Kvadrupol-masseanalysatoren kan dermed ses på som et massefilter som kan stilles inn til en spesifikk m/z verdi; bare de ionene med denne verdien vil kunne vandre gjennom kvadrupolen og detekteres (Silverstein et al. 2005 s. 10).

Tandem massespektroskopi

I MS-MS velges ett av ionene i massespektrumet ut og dette ionet fragmenteres videre og gir opphav til datterioner. I komplekse blandinger er disse datterionene et entydig bevis på at en gitt forbindelse er til stede i blandingen. En måte å gjennomføre MS-MS på, er å sette sammen to eller flere masseanalyser i en serie. Dette instrumentet kan selektere ett ion og undersøke hvordan ionet fragmenterer videre. Tre kvadrupoler (kalt trippel-kvadrupol) kan for eksempel settes sammen og danne et tandem massespektrometer. Den første kvadrupolen selekterer et spesifikt ion for videre analyse (prekursorion) (Silverstein et al. 2005 ss. 12f). Den andre kvadrupolen virker som en kollisjonscelle hvor ionene fra den første kvadrupolen kolliderer med en inert gass og dette fører til kollisjonsindusert dissosiering (CID). I den andre kvadrupolen er vanligvis U og V satt til null slik at alle ioner kan passere (Gross 2011 ss. 416, 420; Silverstein et al. 2005 ss. 12f). I nyere instrumenter er ofte kollisjonscellen eller den andre kvadrupolen ikke bare en kvadrupol, men en heksapol (h) eller en okstapol (o).

⁵ Summen av intensiteten av alle ioner som treffer detektoren i et sveip.

⁶ «Total ion current».

⁷ t = tid.

Disse har en økt evne til å holde ionene samlet i en tynn stråle i forhold til en vanlig kvadrupol (Gross 2011 ss. 152, 437; Henderson & McIndoe 2005 ss. 28f). I dag er de fleste «trippel kvadrupol» instrumenter egentlig QhQ eller QoQ instrumenter, en mer korrekt beskrivelse vil være tandem kvadrupol massespektrometer (Gross 2011 s. 437; Sparkman et al. 2011 s. 142f). Etter fragmentering av prekursorionene i kollisjonscellen dannes produksjoner med forskjellig m/z verdier, disse separeres og det produseres et spektrum av datterioner (Silverstein et al. 2005 s. 13; Sparkman et al. 2011 s. 142).

«Selected reaction monitoring»

Når flere masseanalytatorer settes sammen i en serie kan instrumentet foreta et «scan» eller et sveip på flere måter. En måte å foreta et «scan» på kalles «selected reaction monitoring» (SRM). I SRM modus fokuserer både den første og den andre masseanalytatoren på utvalgte masser, moduset er dermed ikke et virkelig «scan». Dersom en søker etter to eller flere ionefragmenter i samme syklus så kalles metoden «multiple reaction monitoring» (MRM). Denne metoden er analog til «selected ion monitoring» (SIM) i konvensjonell massespektroskopi. I SRM modus vil ionet som selekteres i den første masseanalytatoren bare detekteres dersom et bestemt ionefragment produseres. Denne metoden gjør at en kan fokusere lengre på prekursorionet og datterionet, dette gir økt sensitivitet kombinert med en stor økning i selektivitet (Gross 2011 s. 656, 658; Hoffmann & Stroobant 2007 s. 192f; Sparkman et al. 2011 s. 145)

Matrikseffekter og ionesuppresjon

Matrikseffekter er en samlebetegnelse for alle effekter som forstyrrer kvantifiseringen av en gitt forbindelse, som kommer av de andre forbindelsene som er til stede i prøven. Matrikseffekter er et av de største problemene i kvantifisering av metabolitter. De kan være vanskelig å detektere og dersom de ikke oppdages kan de påvirke kvantifiseringen mye (Büscher et al. 2009). Årsaken til og mekanismene bak matrikseffekter er fremdeles delvis ukjent, men forbindelser som er til stede ved høy konsentrasjon, som har samme masse og som eluerer innenfor det samme retensjonsvinduet som analytten av interesse har stor sjanse for å bidra til ionesuppresjon. Ionesuppresjon er en spesifikk form for matrikseffekt som påvirker analyttioniseringen og observeres vanligvis i form av redusert respons, men kan i enkelte tilfeller føre til økt respons av analytten. Ionesuppresjon er dessverre et gjennomgående problem i MS (Jessome & Volmer 2006; Khoo & Al-Rubeai 2007). En måte å redusere ionesuppresjon på er å fortynne prøven eller å redusere det injiserte volumet. For at en intern standard skal kunne kompensere for matrikseffekter må den interne standarden ha svært like ioniseringsegenskaper som analytten. Stabile isotopmerkede analoger er svært godt egnet (Büscher et al. 2009; Jessome & Volmer 2006). Skal en intern standard kunne kompensere for eventuelle matrikseffekter må nøyaktig samme mengde intern standard tilsettes hver prøve (Büscher et al. 2009).

Intern standard

En intern standard er et stoff som tilsettes prøveløsningen i en kjent mengde for å korrigere for tap under prøveopparbeidelse, korrigere for endringer i det injiserte volumet og for å korrigere for forandringer under den kromatografiske analyse. For at den interne standarden skal virke etter formålet så må den tilsettes før prøveopparbeidelsen starter. En intern standard må ha en kromatografisk retensjonstid som er nær stoffet som skal bestemmes, oppføre seg på samme måte som stoffet som skal bestemmes, den må ikke være til stede i prøven fra før av, være stabil og ikke reagere med stoffer i prøven, stasjonær- eller mobilfase. Intern standarden bør tilsettes i en konsentrasjon som gir ganske lik kromatografisk topphøyde eller areal under toppen som analytten (Greibrokk et al. 2005 s. 291; Lavagnini et al. 2006 s. 48f). Innenfor metabolomikk er det vanligst å benytte enten syntetiske forbindelser, isotopisk merkede metabolitter eller metabolitter som en ikke forventer å finne i prøven som intern standard (Villas-Bôas et al. 2005b). I litteraturen er det varierende hvorvidt dataene normaliseres mot intern standard (Danielsson et al. 2010; Duportet et al. 2011; Jiye et al. 2005; Sheikh et al. 2011), data bør derimot bare normaliseres mot intern standard dersom intern standarden ikke påvirkes av for eksempel de forskjellige ekstraksjonsmidlene som sammenlignes, ellers vil mye av variasjonen mellom forskjellige eksperimenter forsvinne, og vil kunne føre til feilaktige konklusjoner (Danielsson et al. 2010; Jiye et al. 2005).

1.6 Dekonvolusjon, identifisering og kvantitativ analyse

Dekonvolusjon

I dekonvolusjon benyttes en matematisk algoritme som separerer massespektra til forbindelser som kromatografisk koeluerer. Det er utarbeidet programvarer som dekonvolerer massespektraene samtidig som de lager et estimat på arealet under hver kromatografisk topp (Wojtowicz et al. 2012 s. 36f). Et eksempel på en slik programvare er AMDIS («Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification Software») fra NIST (National Institute of Standards and Technology) (Stein 1999).

Identifisering

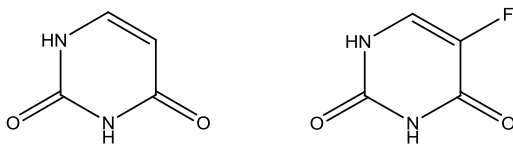
En forbindelse kan identifiseres ved å sammenligne forbindelsens massespektrum med et massespektra-bibliotek. Kongruens mellom massespekteret og et massespekter i biblioteket er bevis på forbindelsens identitet, men den kromatografiske retensjonstiden kan også bidra til sikrere identifikasjon (Kopka 2006; Silverstein et al. 2005). Dette er ikke nødvendig å gjøre manuelt, da det finns programvarer som identifiserer toppene i kromatogrammet basert på massespektrometrisk profil og retensjonstiden til analytten (Khoo & Al-Rubeai 2007). Et eksempel på slik programvare er Agilent ChemStation (Agilent Technologies 2008a).

Kvantitativ analyse

Kvantitativ analyse baserer seg på sammenhengen mellom mengden stoff som passerer detektoren og detektorens respons på denne stoffmengden. Stoffe som passerer detektoren registreres som topper i kromatogrammet, og det er arealet av toppen som benyttes som uttrykk for detektorens respons. Arealet under hver kromatografisk topp kan integreres ved hjelp av programvarer (Greibrokk et al. 2005 s. 288).

1.7 5-Fluoruracil

Fluorpyrimidinet 5-Fluoruracil (5-FU) ble syntetisert på midten av 1950-tallet og er fremdeles en av de mest brukte formene for cellegiftbehandling. 5-FU benyttes blant annet i behandling av endetarmskreft, brystkreft, analkreft, kreft i hode og nakke og en rekke andre kreftformer, ofte i kombinasjon med andre cellegifter (DeVita et al. 2011 s. 396; Longley et al. 2003). 5-FU er en strukturanalog til uracil og strukturen til disse er vist i figur 1.7.



Figur 1.7: Kjemisk struktur til henholdsvis Uracil og 5-Fluoruracil. Struktur tegnet i ChemBioDraw 11.0.

5-FU tas opp av cellen gjennom aktiv transport og anaboliseres til en rekke cytotoxiske nukleotider gjennom flere biokjemiske spor. 5-FU virker cytotoxiske gjennom flere virkningsmekanismer, blant annet inhibering av enzymet tymidylat syntase (TS), inkorporering inn i DNA og RNA. I tillegg kan det genotoksiske stresset fra inhibering av TS føre til at cellen går inn i apoptose (DeVita et al. 2011 s. 396).

Når 5-FU administreres intravenøst har forbindelsen en halveringstid på mellom 8 til 14 minutter, og effekten av 5-FU avhenger sterkt av nivået av det katabolske enzymet dihydropyrimidin dehydrogenase (DHD).

1.8 Mål for oppgaven

Målet med denne oppgaven er å utarbeide og optimalisere alle trinnene i en protokoll for metabolsk profilering av humane kreftceller, for deretter å benytte den fullstendige analyseprotokollen i en ministudie av effekten av cellegiften 5-Fluoruracil på cellelinjen HeLa S3.

2 MATERIALE OG METODE

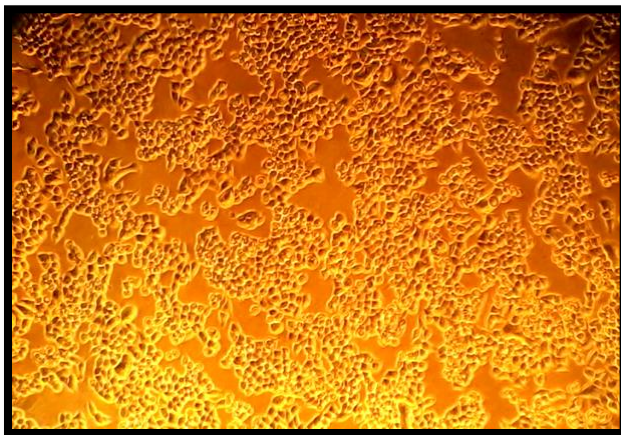
2.1 Cellelinjer

To kontinuerlige cellelinjer ble benyttet, HeLa S3 og T24. Begge cellelinjene ble hentet hos forskningsgruppen for DNA reparasjon og genomstabilitet ved Institutt for kreftforskning og molekylær medisin ved det medisinske fakultet, NTNU.

HeLa og HeLa S3

HeLa cellelinjen ble etablert av George Gey og var den første kontinuerlige cellelinjen fra humant vev som kunne gro i cellekultur. Cellelinjen ble isolert fra et adenokarsinom fra livmorhalsen til den 31 år gamle afroamerikanske kvinnen Henrietta Lacks i 1951 i Baltimore, USA. HeLa cellelinjen har revolusjonert forskningen og har bidratt til store utviklinger innenfor cellebiologi og medisin (Gey et al. 1952; Skloot 2010).

HeLa S3 cellelinjen er et klonalt derivat av HeLa cellelinjen. S3 ble klonet av T.T. Puck og P.I. Marcus i 1955. Cellelinjen vokser adherent i monolag, men kan tilpasses å vokse i suspensjon. Cellelinjen har en generasjonstid på ca. 24 timer (ATCC 2012a; Puck & Marcus 1955). Et foto av HeLa S3 cellenes morfologi er vist i figur 2.1.1.



Figur 2.1.1: HeLa S3 celler to dager etter subkulturering. Foto: ASVF.

T24

T24 cellelinjen ble isolert fra et humant urinblærekarsinom hos en 81 år gammel svensk kvinne i 1963. Cellelinjen vokser adherent, har et uorganisert vekstmønster og vokser i flere lag. Generasjonstiden til cellelinjen er 19 timer (ATCC 2012b; Bubeník et al. 1973). Et foto av T24 cellenes morfologi er vist i figur 2.1.2.



Figur 2.1.2: T24 celler to dager etter subkultivering. Foto: ASVF.

Cellelinjene HeLa S3 og T24 ble valgt fordi de er humane cellelinjer, de er kontinuerlige og relativt godt karakteriserte cellelinjer som kunne kultiveres under samme kultiveringsforhold.

Ingen forsøk ble gjort med celler subkultivert mer enn tretti ganger siden de ble tatt opp fra kryofryseren, eller holdt i kultur mer enn tre måneder sammenhengende. Dette ble gjort for å forhindre fenotypisk drift og for å forsikre reproducerbare resultater. Alle forsøk ble gjort med celler i logaritmisk vekstfase.

2.2. Cellekultivering

Cellene ble kultivert i 75 cm³ dyrkningsflasker fra Nunc (Kat#:156499) i Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Kat#: D6429) tilsatt 10 % Fetal bovine serum (FBS)(Sigma-Aldrich, Kat#: F7524, Lot.#:030M3398), 5 mL L-Glutamin (Sigma-Aldrich, Kat#: G7513), 5 ml Amphotericin B solution (Sigma-Aldrich, Kat#: A2942) og 5 ml Gentamicin (GIBCO/invitrogen, Ref#: 15710-049) i en SANYO MCO-18AIC-(UV) CO₂ inkubator ved 37 °C i en fuktet atmosfære bestående av 5 % CO₂.

Subkultivering

Det gamle mediumet ble fjernet og cellene ble vasket to ganger med 10 ml, 37 °C Dulbecco's phosphate buffered saline solution A (D-PBSA) (OXOID, Kat#: BR0014G). Det ble tilsatt ca. 1 ml, 37 °C 0,25 % Trypsin-etylendiamintetraeddiksyre (Trypsin-EDTA) solution (Sigma-Aldrich, Kat#: T4049), slik at bunnen av dyrkningsflasken ble dekt. Inkuberte cellene med Trypsin-EDTA ved 37 °C i ca. fem minutter, alt ettersom hvor stor celletettheten i dyrkningsflasken var. Når cellene ble rundere i formen ble dyrkningsflasken satt opp vertikalt for å løsne cellene og la de gli nedover. Når cellene hadde løsnet ble de resuspendert i ca. 8 ml, 37 °C nytt kultiveringsmedium (Se cellekultivering) til de aller fleste cellene var i en enkel celle suspensjon. Cellesuspensjonen ble deretter fortynnet til et passende splittingsforhold⁸ og tilsatt

⁸ Splitningsforholdet til de to cellelinjene var basert på generasjonstiden og lengden på lagfasen til hver av de to cellelinjene. HeLa S3 ble vanligvis splittet 1:8 tre ganger i uken, mens T24 ble splittet 1:12 tre ganger i uken.

forvarmet kultiveringsmedium. Det ble til slutt tatt ut en liten prøve fra dyrkningsflasken og antallet celler per ml ble estimert ved hjelp av et Bürkner tellekammer fra Marienfeld eller ORFLO Moxi^z automatisk celledetektor.

Viabilitetestimering

For å følge med på andelen døde og levende celler i en dyrkningsflaske ble en prøve tatt ut rett etter subkultivering eller utplating og tilsatt dobbelt volum med Trypan blue solution (0,4 %) (Sigma-Aldrich, Kat#: T8154) og blandet ved hjelp av pipettering. Etter 10 minutters inkubasjon ved romtemperatur ble en del av prøven overført til et Bürkner tellekammer og antallet fargede og ikke fargede celler telt ved å studere Bürknerkammeret i et invertert mikroskop. Dersom mer enn 5 – 10 % av cellene var døde ble en ny prøve tatt. Hvis denne prøven ga samme resultat ble ikke cellene fra denne kultiveringsflasken platet ut. Når andelen døde celler ikke gikk ned etter en liten periode med redusert eller økt splittingsforhold ble cellene kastet og nye celler tatt opp fra kryofryseren.

Generelt om utplating av celler

12 ml rent kultiveringsmedium ble overført til et gitt antall 150mm x 25mm petriskåler beregnet for cellekultivering (CORNING, Mrf#: 430599). Cellene som skulle plates ut ble trypsinert (se subkultivering) og tilsatt nytt kultiveringsmedium. Dersom mange plater skulle plates ut så ble innholdet i flere dyrkningsflasker overført til en dyrkningsflaske og fortynnet i nytt kultiveringsmedium. Cellesuspensjonen ble nøye resuspendert. Deretter ble en fraksjon av dette, for eksempel 10 mL overført til hver petriskål med friskt medium (for eksempel 15 ml) og resuspendert grundig til et totalt volum på 25 ml. Mellom hver gang en fraksjon ble tatt ut av cellesuspensjonen, ble den nøye resuspendert først. Kontakt med belegget i bunnen av petriskålen ble unngått da dette førte til redusert vekstareal. For å få en jevn distribusjon av celler over hele petriskålen ble platene forsiktig overført til inkubatoren og plassert på et jevnt underlag.

2.3 Sammenligning av kald metanol og varm etanol som ekstraksjonsmiddel

2.3.1 Metabolittekstraksjon etterfulgt av TMS derivatisering

$4,81 \cdot 10^6$ HeLa S3 celler ble platet ut på hver av syv petriskåler og fortynnet i friskt kultiveringsmedium til et totalt volum på 23 ml i hver petriskål. Cellene ble inkubert i ca. to døgn til ca. 50 % konfluens og celledettheten i hver petriskål ble visuelt estimert med et invertert lysmikroskop. De seks likeste petriskålene ble valgt ut til videre forsøk. Metabolittene på tre av petriskålene ble ekstrahert med kald metanol og tre av petriskålene ble ekstrahert med varm etanol. Rekkefølgen av ekstraksjonene ble randomisert.

Ekstraksjonsprotokoll med kald metanol

En ekstraksjonsprotokoll utviklet av Faijes et al. (2007) ble tilpasset formålet og brukt til ekstraksjon med kald metanol.

Det gamle kultiveringsmediumet ble helt av og cellene ble skylt to ganger med 12,5 ml PBSA (37 °C). Cellene ble svært raskt skylt med 12,5 ml Milli-Q vann (37 °C) en gang. Vannet ble helt rett på og av igjen for å redusere sjansen for metabolittlekkasje fra cellene. 10 ml nedkjølt 96 % metanol (-20 °C) ble helt over cellemonolaget og 10 µl 10 mM L-Alanin-3-3-3-d₃ (d₃-Alanin) ble blandet inn. d₃-Alanin ble tilsatt som intern standard for ekstraksjonen. Cellene ble løsnet og lysert ved hjelp av en celleskrape. Celleekstraktet ble overført til ett 15 ml rør som var oppbevart i isbad. 4 ml ekstra 96 % metanol (-20 °C) ble overført til petriskålen og restene av celleskraket ble skrapet sammen med celleskrapen og overført til 15 ml røret. Innholdet i røret ble straks frosset i flytende nitrogen (N₂) (-196 °C) og deretter tint i etanolbad (-20 °C) og vortekset i 60 sekunder før sentrifugering i en Eppendorf 5804R sentrifuge ved -9 °C, 5000 rpm i fem minutter. Supernatanten ble overført til ett nytt nedkjølt 15 ml rør og fryst i flytende nitrogen. Cellepelletten ble resuspendert i 0,5 ml Milli-Q vann (4 °C) og frosset i flytende nitrogen for deretter å bli tint ved 4 °C. Celleekstraktet ble sentrifugert ved -9 °C, 5000 rpm i fem minutter før supernatanten ble overført til det samme 15 ml røret som den metanolholdige supernatanten. Nye 0,5 ml Milli-Q vann (4 °C) ble tilsatt cellepelletten og blandingen ble vortekset i 60 sekunder før sentrifugering ved -9 °C, 5000 rpm i åtte minutter. Supernatanten ble blandet med de to tidligere supernatantene, homogenisert med pipettring og delt i to nye 15 ml rør.

Denne ekstraksjonen ble gjort på tre petriskåler. Ekstraksjonen fikk tre biologiske replikaer og to tekniske replikaer. Løsemiddelt ble dampet bort med en Savant SPD2010 SpeedVac konsentrator ved 55 °C og 5,1 Torr til ca. 1 ml vann var igjen, hvorpå temperaturen ble økt til 65 °C til vannrestene var dampet bort. De tørkede metabolittektaktene ble deretter derivatisert med trimetylklorosilylderivatisering (2.9.2) og analysert på GC-MS Singel kvadrupolen (2.10.1). Proteininnholdet i cellepelletene ble estimert med Bradford proteinassay (2.8.3).

Ekstraksjonsprotokoll med kokende etanol

Denne protokollen ble utviklet basert på metodene benyttet av Canelas et al. (2009) og Villas-Bôas et al. (2005a), men tilpasset formålet.

Det gamle kultiveringsmediumet ble helt av og cellene ble skylt to ganger med 12,5 ml PBSA (37 °C). Cellene ble skylt svært raskt en gang med 12,5 ml Milli-Q vann (37 °C). Vannet ble helt rett på og av igjen for å redusere sjansen for metabolittlekkasje fra cellene. Petriskålen ble plassert på en forhåndsoppvarmet metallblokk (90 °C) og 10 ml 75 % etanol (90 °C) ble helt over cellemonolaget. 10 µl 10 mM L-Alanin-3-3-3-d₃ (d₃-Alanin) ble blandet inn med etanolen, og ble benyttet som intern standard for ekstraksjonen. Cellene ble løsnet og lysert ved hjelp av en celleskrape. Celleekstraktet ble overført til ett oppvarmet 15 ml rør. 4 ml ekstra 75 % etanol (90 °C) ble overført til

petriskålen og restene av cellesktraktet ble skrapet sammen med celleskrapen og overført til 15 ml røret. Korken til røret ble skrudd godt til for å unngå fordamping og satt til inkubering i et 90 °C vannbad i fem minutter. Etter endt inkubasjon ble røret raskt kjølt ned i et is/vannbad (4 °C) og sentrifugert i en Eppendorf 5804R sentrifuge ved -9 °C, 5000 rpm i åtte minutter. Supernatanten ble homogenisert med pipettering og splittet i to nye 15 ml rør.

Ekstraksjonen ble gjort på tre petriskåler. Ekstraksjonen fikk tre biologiske replikaer og to tekniske replikaer. Løsemiddelt ble dampet bort med en Thermo Savant SPD2010 SpeedVac® konsentrator ved 55 °C og 5,1 Torr til ca. 2,5 ml vann var igjen, da ble temperaturen økt til 65 °C til vannrestene var dampet bort. De tørkede metabolittekstraktene ble deretter derivatisert med trimetylklorosilylderivatisering (2.9.2) og analysert på GC-MS Singel kvadrupolen (2.10.1). Proteininnholdet i cellepelletene ble estimert med Bradford proteinassay (2.8.3).

2.3.2 Metabolittekstraksjon etterfulgt av MCF derivatisering

$2,97 \cdot 10^6$ HeLa S3 celler ble platet ut på hver av syv petriskåler og fortynnet i friskt kultiveringsmedium til et totalt volum på 25 ml i hver petriskål. Cellene ble inkubert i ca. to døgn til ca. 50 % konfluens og celletettheten i hver petriskål ble estimert visuelt med et invertert lysmikroskop. De 6 likeste petriskålene ble valgt ut til videre forsøk. Metabolittene på tre av petriskålene ble ekstrahert med kald metanol og tre av petriskålene ble ekstrahert med varm etanol.

Ekstraksjonene ble gjennomført på samme måte som i avsnitt 2.3.1 med unntak av at de tørkede metabolittekstraktene ble derivatisert med metylklorformat derivatisering (2.9.1). Proteininnholdet i cellepelletene ble estimert med Bradford proteinassay (2.8.3).

2.4 Optimalisering av vasketrinn før metabolittekstraksjon

Innholdet i to konfluente dyrkningsflasker med T24 ble trypsinert, løst og overført til en kultiveringsflaske. De to flaskene ble skylt flere ganger med rent medium for å få med mest mulig av cellene i flaskene. Cellesuspensjonen ble fortynnet i friskt kultiveringsmedium til et totalt volum på 130 ml. 10 ml av celsuspensjonen ble platet ut på 13 petriskåler som allerede inneholdt 10 ml friskt kultiveringsmedium til et totalt volum på 20 ml. Cellene ble inkubert i ca. to døgn til ca. 60 % konfluens, og de 12 likeste platene ble valgt ut til videre arbeid. Innholdet i de 12 petriskålene ble ekstrahert på samme måte som i avsnitt 2.3.1 med unntak av at;

- Tre av petriskålene ble vasket to ganger med 12,5 ml PBSA (37 °C) etterfulgt av en veldig rask vannvask (37 °C)
- Tre av petriskålene ble vasket to ganger med 12,5 ml PBSA 37 °C, uten vannvask.
- Tre av petriskålene ble vasket to ganger med 12,5 ml PBSA (0 °C) etterfulgt av en veldig rask vannvask (0 °C)
- Tre av petriskålene ble vasket to ganger med 12,5 ml PBSA (0 °C), uten vannvask,

og at celleekstraktene ikke ble splittet opp i to, supernatanten ble overført til et nytt 15 ml rør. Rekkefølgen på de ulike behandlingene ble randomisert for å redusere effekten av hvor lenge hvert ekstrakt sto nedkjøling på isbad før sentrifugering. Etter vasking ble petriskålen plassert på en Framo - Gerätetechnik M21/1 varmeplate med en forhåndsoppvarmet stålplate (90 °C). Se figur 2.4 for oppsett av varmeplate med stålplate. Metabolittene ble ekstrahert i henhold til avsnitt 2.3.1, med unntak av at celleekstraktet ble inkubert ved 90 °C i 3 minutter etter ekstraksjon. Etter sentrifugering ble supernatanten overført til nye 15 ml rør og 10 µl 10 mM d₈-Valin ble blandet inn og ekstraktet ble frosset ved - 80 °C. d₈-Valin ble tilsatt som intern standard for frysetørkingen. Toppene ble byttet ut med topper med små hull og rørene ble straks overført til en Christ Alpha 1 – 4 LD Plus frysetørke og løsemiddelet ble sublimert ved - 62 °C (temperaturen på is - kondensoren) og med ett trykk på 0,030 mBar. Rørene ble oppbevart ved -80 °C over natten. Cellepelleten ble analysert med BCA mikroassay (2.8.3).



Figur 2.4: Varmeplate med en tykk stålplate på toppen. Konstruksjonen gav en jevnere temperatur enn varmeplaten alene. Foto: ASVF.

Celleekstraktene ble derivatisert med metylklorformatderivatisering (2.3.2) med unntak av at celleekstraktene ble løst i både 400 µl 1 M NaOH og 333 µl 96 % metanol for å øke volumet av løsemiddel og dermed løsne mest mulig av metabolittbelegget på veggene i røret. Etter at belegget var løst ble rørene sentrifugert med en fart på 1000 rpm i 1 minutt ved romtemperatur for å samle væsken i bunnet av røret. Derivatene ble analysert med GC-MS Trippel kvadrupol (2.10.2).

2.5 Valg av avdampingsmetode

50 µl 1,408 mM Standardmikts til trippel kvadrupol (Se vedlegg B, tabell B2) ble overført til fire 15 ml polypropylenrør med 10 ml 75 % etanol. To av rørene ble frosset ved - 80 °C, mens løsemiddelet i to rør ble dampet bort ved hjelp av en Savant SPD2010 SpeedVac ved 45 °C og med et trykk på 5,1 Torr. Toppene til de frossene standardene ble byttet ut med topper med små hull og straks overført til en nedkjølt Christ Alpha 1 – 4 LD Plus frysetørke hvor løsemiddelet ble sublimert ved trykk på 0,030 mBar og en temperatur på -62 °C (temperaturen på iskondensoren).

Metabolittstandardene ble derivatisert med metylklorformat derivatisering i henhold til avsnitt 2.9.1, med unntak av at de tørkede standardene ble løst i både 400 µl 1 M NaOH og 333 µl 96 % metanol for å øke volumet av løsemiddel og dermed løsne mest mulig av

belegget av standarden på veggene i røret. Etter belegget var løst ble rørene sentrifugert med en fart på 1000 rpm i 1 minutt ved romtemperatur for å samle væsken i bunnet av røret. d₅-glutamat ble ikke tilsatt. Med unntak av dette ble derivatiseringsprotokollen fulgt og prøvene ble analysert med GC-MS Trippel kvadrupolen (2.10.2).

2.6 Fjerning av lipidfraksjon

Deler av dette forsøket ble gjennomført i samarbeid med Ph. D student Hans Fredrik Nyvold Kvitvang.

På forhånd ble det undersøkt hvor god faseparasjonen mellom vann og ulike organiske faser var. Heksan og kloroform var de organiske fasene som hadde tydeligst faseparasjon fra vann, disse ble dermed benyttet i det videre arbeidet.

Innholdet i fire konfluente dyrkningsflasker med T24 celler ble trypsinert, løsnet og samlet i en dyrkningsflaske. Cellesuspensjonen ble fortynnet med friskt kultiveringsmedium til et totalt volum på 220 ml. 10 ml cellesuspensjon og 15 ml friskt kultiveringsmedium ble overført til 20 petriskåler og nøye resuspendert. En telleprøve ble tatt fra to av petriskålene (Se vedlegg A, figur A1 og A2). Etter to døgn var petriskålene ca. 70 % konfluent og petriskålene ble visuelt inspisert i et invertert mikroskop. De 18 likeste petriskålene ble valgt ut til videre arbeid.

Ekstraksjon

Metabolittene ble ekstrahert i henhold til avsnitt 2.3.1, med unntak av; Temperaturen på PBS vaskene før ekstraksjon var 4 °C i stedet for 37 °C, cellemonolaget ble ikke vasket med 12,5 ml Milli-Q vann og celleekstraktene ble inkubert ved 90 °C i 3 minutter. Varmeplaten med stålplaten som vist i figur ble benyttet i stedet for metallblokken. Etter ekstraksjon ble ekstraktet nedkjølt på is til 0 °C og sentrifugert ved -9 °C, 5000 rpm i åtte minutter. Supernatanten ble overført til et nytt 15 ml rør. 2,5 ml av hvert ekstrakt ble overført til fire nye 15 ml rør, tilsatt 10 µl 10 mM d₈-Valin og frosset ved -80 °C over natten.

Seks av de 18 celleekstraktene ble så brukt videre i lipidfjerningstesten (Seks ekstrakter delt i fire fraksjoner på 2,5 ml). En fraksjon fra hver av de seks ekstraktene ble vasket med heksan (Se væske-væske ekstraksjon med heksan). En fraksjon fra hver av de seks ekstraktene ble vasket med kloroform (Se væske-væske ekstraksjon med kloroform) og en fraksjon fra hver av de seks ekstraktene ble det ikke vasket med noe. Dersom noe ble gjort feil ble den siste reservefraksjonen brukt og vasketrinnet ble gjort om igjen.

Væske- væske ekstraksjon med heksan

Tørket celleekstrakt ble løst i 2,5 ml nedkjølt Milli-Q vann med et par dråper 1 M natriumhydroksid med vorteksing og tilsatt 750 µl nedkjølt n-heksan og vortekset kraftig i ett minutt. Blandingen ble sentrifugert i en Eppendorf 5804R sentrifuge ved -9 °C, 5000 rpm i to minutter. Hele vannfasen ble tatt ut og overført til et nytt 15 ml rør og

løsemiddelet ble dampet inn i en Savant SPD2010 SpeedVac ved 60 °C og med et trykk på 5,1 Torr i ca. to timer til ekstraktene var tørre.

Væske-væske ekstraksjon med kloroform

Tørket celleekstrakt ble løst i 2,5 ml nedkjølt Milli-Q vann med et par dråper 1 M Natriumhydroksid med vorteksing og tilsatt 750 µl nedkjølt kloroform og vortekset kraftig i ett minutt. Ekstraktet ble sentrifugert i en Eppendorf 5804R sentrifuge ved -9 °C, 5000 rpm i to minutter. Hele vannfasen ble tatt ut og overført til ett nytt 15 ml rør og dampet inn ved 60 °C i en Savant SPD2010 SpeedVac med et trykk på 5,1 Torr i ca. to timer til ekstraktet var tørt.

Ingen fettjerning

Tørket celleekstrakt ble løst i 2,5 ml nedkjølt Milli-Q vann med et par dråper 1 M Natriumhydroksid med vorteksing. Vannet ble dampet inn i en Savant SPD2010 SpeedVac med et trykk på 5,1 Torr ved 60 °C i ca. to timer til ekstraktet var tørt.

Alle ekstrakter ble dampet inn to ganger i en Savant SPD2010 SpeedVac ved 45 °C og med et trykk på 5,1 Torr til tørr. Etter inkubasjon ved 90 °C og frem til derivatisering så ble ekstraktene holdt nedkjølt hele tiden. Ekstraktene ble metylkloroformat derivatisert (2.9.1) og analysert med GC-MS Trippel kvadrupol(2.10.2)

2.7 Eksponeringsstudie med 5-Fluoruracil

Eksponeringsstudie var basert på funn fra Uehara et al. (2009), men modifisert til formålet.

Fem fulle dyrkningsflasker med HeLa S3 celler ble trypsinert og resuspendert i friskt dyrkningsmedium og slått sammen i en dyrkningsflaske til et totalt volum på 210 mL. Cellesuspensjonen ble resuspendert til cellene var i en enkel celle suspensjon. Det ble tilsatt 10 ml rent kultiveringsmedium sammen med 10 ml cellesuspensjon til tjue petriskåler. Blandingen ble nøye resuspendert. Det ble tatt telleprøver fra hver femte petriskål platet ut (Se vedlegg A, figur A3, A4 og A5). I gjennomsnitt ble ca. $6,3 \cdot 10^6$ celler platet ut per petriskål. Etter 48 timer ble det gamle kultiveringsmediumet fjernet og petriskålene ble tilført 25 ml friskt kultiveringsmedium. Tjue timer senere ble de 18 petriskålene med likest antall celler valgt ut.

- Cellene i tre petriskåler fikk 25 ml friskt kultiveringsmedium med 5 µM 5-Fluoruracil. Cellene i tre kontrollpetriskåler fikk 25 ml friskt kultiveringsmedium. Eksponeringen varte i **fem minutter** før ekstraksjon.
- Cellene i tre petriskåler fikk 25 ml friskt kultiveringsmedium med 5 µM 5-Fluoruracil. Cellene i tre kontroll petriskåler fikk 25 ml friskt kultiveringsmedium. Eksponeringen varte **to timer** før ekstraksjon.

- Cellene i tre petriskåler fikk 25 ml friskt kultiveringsmedium med 5 μ M 5-Fluoruracil. Cellene i tre kontroll petriskåler fikk 25 ml friskt kultiveringsmedium uten 5-FU. Eksponeringen varte i **åtte timer** før ekstraksjon.

For å sikre lik eksponeringsperioden blant biologiske replika og kontrollplater ble eksponeringsmiddelet tilsatt med et intervall på fem minutter.

Ekstraksjon med varm etanol

Det gamle kultiveringsmediumet ble helt av og cellene ble skylt to ganger med 12,5 ml (0 °C) PBS. Cellene ble skylt svært raskt en gang med 12,5 ml Milli-Q vann (0 °C). Vannet ble helt rett på og av igjen for å redusere sjansen for metabolittlekkasje fra cellene. Petriskålen ble plassert på en varmeplate med metallblokk (90 °C), se figur 2.4, og 10 ml 75 % etanol (90 °C) ble helt over cellemonolaget. 10 μ l 10 mM L-Alanin-3-³-³-³-^d₃ (^d₃-Alanin) ble blandet inn med etanolen og ble benyttet som intern standard for ekstraksjonen. Cellene ble løsnet og lysert ved hjelp av en celleskrape. Celleekstraktet ble overført til ett oppvarmet 15 ml rør. 4 ml ekstra 75 % etanol (90 °C) ble overført til petriskålen og restene av celleskraket ble skrapet sammen med celleskraperen og overført til 15 ml røret. Korken til røret ble skrudd godt til for å unngå fordamping og satt til inkubasjon i vannbad ved 90 °C i 3 minutter.

Etter endt inkubasjon ble røret raskt kjølt ned på isbad (4 °C) og sentrifugert i en Eppendorf 5804R sentrifuge ved -9 °C, 5000 rpm i åtte minutter. Supernatanten ble overført til ett nytt 15 ml rør. Cellepelletten ble frosset ved -80 °C over natten. Supernatanten ble tilsatt nedkjølt 75 % etanol opp til et volum på 13 ml. 10 μ l 10 mM ^d₈-Valin ble blandet inn i etanolekstraktet med vorteksing. Fire fraksjoner på 3,0 ml ble overført til fire nye nedkjølte 15 ml rør. Etter sentrifugeringen og frem til derivatisering ble alt arbeidet gjort på is.

Fettfjerning

Hver fraksjon ble tilsatt 900 μ l 98 % n-heksan og vortekset i 60 sekunder. Rørene ble sentrifugert ved -9 °C, 5000 rpm i 8 minutter. Den øvre fasen ble pipettert av og 2,4 ml av etanol-vannfasen ble overført til et nytt 15 ml rør sammen med 10 μ l 10 mM ^d₄-Succinat. Intern standarden ble vortekset inn. Ekstraktet ble frysetørket i en Christ Alpha 1 – 4 LD Plus frysetørke med ett trykk på 0,030 mBar og en temperatur på -62°C (temperaturen på iskondenseren) og oppbevart ved -80 °C over natten.

En fraksjon fra hvert ekstrakt ble derivatisert med metylklorformat derivatisering (2.9.1). Mengden av alle derivatiseringsreagenser ble redusert til ¼ av den opprinnelige protokollen. Det derivatiserte ekstraktet ble analysert med GC-MS Trippel kvadrupolen (2.10.2). Cellepelletten ble analysert med BCA mikroassay (2.8.3).

2.8 Korrigering for ulik cellevekst

2.8.1 Tørrvekt av cellepellet

Cellepelleten ble løst opp i 1,5 ml Milli-Q vann og overført til en tørket aluminiumskål. Røret ble vasket to ganger til med 2 ml vann for å forsikre at alle rester av cellepelleten ble overført til aluminiumskålen. Aluminiumskålen ble tørket ved 100 °C i 24 timer. Vekten av skålen ble veid med en mg vekt.

2.8.2 Proteininnhold i supernatant

Etter ekstraksjon og sentrifugering ble hele supernatanten overført til et nytt 15 ml rør og løsemiddelet ble dampet av i en Savant SPD2010 SpeedVac med et trykk på 5,1 Torr til tørr. Den tørkede supernatanten ble analysert med Bradford proteinassay (2.8.3).

2.8.3 Deteksjon av proteininnhold i cellepellet

- Etter metabolittekstraksjon med varm etanol ble fem cellepelletter løst i 200 µl Milli-Q vann ved vorteksing. Den løste pelletten ble sonikert kraftig i 3 minutter med en BRANSON Sonifier 250.
- Etter metabolittekstraksjon med kokende etanol ble fem cellepelletter løst i 200 µl 0,15 M NaCl vannløsning i stedet for Milli-Q vann, ellers var prosedyren den samme som beskrevet i det foregående punkt.
- Proteinkonsentrasjonen i alle pelletene ble målt med Bradford proteinassay (2.8.3).

Cellelysering/lysering av cellepellet

Fem cellepelletter ble løst i 200 µl fortynt Reporter Lysisbuffer (Promega, part#: E397A, Lot#: 26248401) og fem cellepelletter ble løst i RIPA lysisbuffer (Se vedlegg D). For to av pelletene løst i Reporter lysisbuffer ble en halv tablett Complete mini protease inhibitor cocktail (Roche part#:11836153001) tilsatt sammen med Reporter lysisbuffer. Proteinkonsentrasjon i pelletene ble målt med Bradford proteinassay og konvensjonelt BCA proteinassay (2.8.3).

Reporter Lysisbuffer

En del Reporter Lysisbuffer 5X (Promega, Part#: E397A) ble fortynt i fire deler Milli-Q vann og mikset. Hver cellepellet ble tilsatt 200 µl fortynt Reporter Lysisbuffer 5X (Promega, part#: E397A, Lot#: 26248401) og pipettert til cellepelleten var løst. Cellepelleten ble inkubert med lysisbuffer på is i 30 minutter før inkubasjon i et Telesonic ultralydbad i nye 30 minutter. Etter inkubasjon ble pelletten kraftig vorteket i 10 sekunder. Hver prøve ble deretter fortynt til passende⁹ konsentrasjon i fortynt Reporter lysisbuffer før protein assay.

RIPA lysisbuffer

Hver cellepellet ble tilsatt 200 µl RIPA lysisbuffer og pipettert til cellepelleten var løst. Cellepelleten ble inkubert med lysisbuffer på is i 30 minutter før inkubasjon i et Telesonic ultralydbad i nye 30 minutter. Etter inkubasjon ble pelletten vortekset kraftig

⁹ Vanligvis en fortynting på 1:10, men 1:25 med større celledetthet.

i 10 sekunder. Hver prøve ble deretter fortynnet til passende¹⁰ konsentrasjon i lysisbuffer før protein assay.

Bradford proteinassay

Standardkurve

En fortynningsserie av proteinstandarden Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Kat#: A1900) ble løst i fortynnet Reporter lysisbuffer eller RIPA lysisbuffer¹¹ til en total konsentrasjon på 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml. I tillegg ble en blank (bare fortynnet reporter lysisbuffer) laget. Hver fortynning av standarder og blank ble laget i tre replikaer.

Preparering av fargereagens

En del Bio-Rad protein assay Dye Reagent Concentrat (Bio-Rad, Kat#:500-0006) ble blandet med fire deler Milli-Q vann. Blandingen ble filtrert gjennom ett Whatman #1 filter for å fjerne uløste partikler.

Konvensjonell Bradford

Nullstilte spektrofotometeret (VWR, V-1200) med Milli-Q vann. 50 µl av blank/standard/proteinprøve ble overført til et 15 ml polypropylenrør. Det ble laget tre replikaer. 2,5 ml av fortynnet fargereagens ble tilsatt og vorteket kraftig. Prøvene ble inkubert ved romtemperatur i fem minutter og overført til 2,0 ml polypropylenkyvetter og absorbansen ble målt ved 595 nm. Fargeutviklingen fortsatte og derfor ble alle prøver målt innenfor et så kort tidsrom som mulig. Absorbansen til gjennomsnittet av blankprøvene ble trukket fra absorbansen til standardene og prøver. Absorbansen til de kjente proteinstandardene ble plottet mot konsentrasjonen av BSA proteinstandarder og laget en standardkurve. Den korrigerede absorbansmålingen til prøvene ble deretter interpolert inn i ligningen for tangenten til standardkurven og proteinkonsentrasjon til prøvene ble beregnet ut fra formelen til tangenten til standardkurven. Beregnet konsentrasjonen av proteiner i den originale prøven, ved å korrigere for fortynningen.

BCA protein assay

Standardkurve

En fortynningsserie av Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Kat#: A1900) ble løst i fortynnet Reporter lysisbuffer eller RIPA lysisbuffer til en total konsentrasjon på 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml og 2000 µg/ml. I tillegg ble en blank (bare fortynnet Reporter lysisbuffer) laget. Hver fortynning av standarder og blank ble laget i åtte replikaer.

¹⁰ Se fotnote 9.

¹¹ Samme lysisbuffer ble brukt til å løse BSA standarden og cellepelleten.

Preparering av «working reagent»

BCA protein assay kit (Novagen, Kat#: 71285-3). 50 deler BCA solution (Novagen, Kat#: 71288) bestående av «bicinchoninic acid», natrium karbonat, natrium tartrat og natrium bikarbonat i 0,1 M NaOH, pH = 11,25) ble blandet med en del 4 % kobbersulfat (Novagen, Kat#: 71287) og vortekset lett. Blandingen omtales fra nå av som «Working reagent» (WR).

Konvensjonell BCA

50 µl av hver proteinstandard/prøve/blank ble blandet med 1,0 ml BCA WR og mikset med mild vorteksing. Standardene og blankprøver ble inkubert sammen med proteinprøvene ved 37 °C vannbad i 30 minutter. Standardene, blanken og prøvene ble nedkjølt til romtemperatur. Nullstilte spektrofotometeret (VWR, V-1200) med Milli-Q vann ved 562 nm. Blank (Bare Reporter lysisbuffer og WR), proteinstandarder og prøver ble overført 1,0 ml polypropylenkvytter og absorbansen ble målt i løpet av 10 minutter. Absorbansen til gjennomsnittet av blankprøvene ble trukket fra absorbansen til standardene og prøvene. Absorbansen til de kjente proteinstandardene ble plottet mot konsentrasjonen av BSA proteinstandarder og en standardkurve ble laget. Den korrigerede absorbansmålingen til prøvene ble deretter interpolert inn i ligningen for tangenten til standardkurven og proteinkonsentrasjon til prøvene ble beregnet ut fra formelen til tangenten til standardkurven. Beregnet konsentrasjonen av proteiner i den originale prøven, ved å korrigere for fortytning.

Mikroskala-96 brønnplateformat

25 µl av blank, standarder og prøver ble pipettert ved hjelp av en Proline multipipette over til 96 brønneplater (Bunn: Greiner, Kat#: 655163. Løkk: Corning, Kat#:3931) med åtte replikaer. Hver brønn ble tilsatt 200 µl WR og satt til satt på resting med en hastighet på 300 (1/min) på en IKA-SCHÜTTLER MTS 4 ved 37 °C i 30 minutter. Målte absorbansen til Milli-Q vann ved 562 nm og nullstilte spektrofotometeret. Etter inkubasjon ble brønneplaten nedkjølt til romtemperatur og absorbansen ble målt ved 562 nm 15 minutter etter endt inkubasjon på en SpectraMax Plus 384 mikroplateleser (MDS Analytical Technologies).

Den gjennomsnittelige absorbansen til blankprøvene ble trukket fra absorbansen til standarder og prøver. Absorbansen til de kjente proteinstandardene ble plottet mot konsentrasjonen av BSA proteinstandarder og en standardkurve ble laget. Den korrigerede absorbansmålingen til prøvene ble deretter interpolert inn i ligningen for tangenten til standardkurven og proteinkonsentrasjon til prøvene ble beregnet ut fra formelen til tangenten til standardkurven. Konsentrasjonen av proteiner i den originale prøven ble beregnet ved å korrigere for fortytning.

Dose – respons forsøk med BCA proteinassay

Syv petriskåler med HeLa S3 ble kultivert til ca. 50 % konfluens og trypsinert med 1,5 ml Trypsin – EDTA og fortynnet i 6 ml nytt kultiveringsmedium hver. Cellene ble samlet i et 50 ml rør og nøye resuspendert før en telleprøve ble tatt, vist i vedlegg A, figur A6. Rørene ble sentrifugert i en Eppendorf 5804R sentrifuge i 3 minutter, 1200 rpm ved 20 °C før supernatanten forsiktig ble pipettert av. Cellepelleten ble forsiktig resuspendert i 30 ml forhåndsoppvarmet PBS (37 °C) før sentrifugering ved 1200 rpm, 20 °C i 3 minutter. Supernatanten ble forsiktig pipettert av før pelleten ble forsiktig resuspendert i 50 ml PBS før celleduspensjonen ble fordelt i åtte 15 ml rør. To og to rør ble tilsatt henholdsvis 8,75 ml, 7,0 ml, 5,25 ml og 3,5 ml celleduspensjon og sentrifugert i 3 minutter, 1200 rpm ved 20 °C. Supernatanten ble forsiktig pipettert bort og hver cellepellet ble tilsatt 12 ml oppvarmet 75 % etanol (90 °C) og inkubert ved 90 °C i fem minutter. Etter inkubasjon ble celleekstraktet nedkjølt i isbad til alle ekstrakter var nedkjølte og sentrifugert i åtte minutter ved 5000 rpm, 4 °C. Supernatanten ble fjernet med pipettering og siste etanolrest ble fjernet ved hjelp av en bomullspinne (uten å berøre cellepelleten) før pelletene ble lagret ved - 80 °C til dagen etter. Cellepelletene ble løst i 200 µl Reporter lysisbuffer og inkubert på is i 30 minutter før inkubasjon i et Telesonic ultralydbad i nye 30 minutter. Etter inkubasjon ble pelleten kraftig vortekset i 10 sekunder. Cellepelletene ble deretter fortynnet 1:10 og 1:50 i Reporter lysisbuffer, med to replika og analysert med konvensjonell BCA proteinassay (2.8.3).

2.9 Derivatisering av tørket celleekstrakt

Alle derivatiserte prøver, standarder og blankprøver ble plassert på et kjølebrett på instrumentet mens de ventet på å bli analysert. Dette ble gjort for å redusere fordamping av prøvene.

2.9.1 Metylchlorformat derivatisering

En derivatiseringsprotokoll basert på metylchlorformat som derivatiseringsreagens utviklet av Villas-Bôas et al. (2003) ble benyttet med mindre modifikasjoner.

Det tørkede celleekstraktet ble løst i 390 µl 1M NaOH og overført til et 5 ml polypropylenrør. 10 µl 10 mM deuterert Glutamin-2,3,3,4,4-d₅ syre (d₅-Glutamat) ble deretter tilsatt som intern standard for derivatiseringen, og 333 µl 96 % metanol og 67 µl pyridin ble blandet inn ved vorteksing. Derivatiseringsreaksjonen startet med å tilsette 80 µl metylchlorformat med påfølgende vorteksing i 60 sekunder. For å separere MCF derivatene fra den reaktive blandingen ble 400 µl dagfersk kloroform tilsatt og vortekset inn i ti sekunder, med påfølgende tilsetning av 400 µl 50 mM NaHCO₃ etterfulgt av ti sekunders miksing. Ekstraktet ble sentrifugert i to minutter ved 20 °C, 5000 rpm i en Eppendorf 5804R sentrifuge for å øke faseparasjonen. Kloroformfasen ble deretter overført til ett nytt polypropylenrør og to spatler med NaSO₄ ble tilsatt og mikset inn for å fjerne rester av vann. Den vannfrie kloroformfasen ble overført til en GC-MS vial med insert. Lokket ble festet og prøven analysert.

For hver analyse ble også en blankprøve og en vial med standardmiks preparert. Blankprøven ble ikke tilsatt d₅-glutamat, men ellers ble protokollen fulgt. I standardmiksen ble bare 50 µl standardmiks blandet med 350 µl 1M NaOH og derivatisert på samme måte med unntak av at d₅-glutamat ikke ble tilsatt. For mer informasjon om innholdet i løsning se vedlegg B, tabell B1 for GC-MS Singel kvarupol analyse og tabell B2 for GC- MS Trippel kvadrupol analyse.

Under GC-MS analyse ble blankprøven og standardmiksløsning analysert først. Dette var for å kontrollere at derivatiseringsreagensene og GC-MS instrumentet virket optimalt. Da ionekromatogrammene så normale ut ble celleekstraktene/prøvene analysert. Injeksjonsrekkefølgen tilprøvene på gasskromatografen ble randomisert for å redusere effekten av ulik ventetid i den statistiske analysen.

2.9.2 Trimetylklorosilyl derivatisering

De tørkede celleekstraktene ble omdannet til trimetylsilyl derivater i henhold til metoden beskrevet av Kind et al. (2009) og Agilent Technologies (2008b) med mindre modifikasjoner.

Før derivatisering ble tre løsninger preparert;

d₂₇-Myristinsyre: En 11,74 mM løsning av deuterert myristin-d₂₇syre ble laget ved å løse 3 mg per ml av en blanding av vann:metanol:isopropanol i forholdet 2:5:2 (v/v/v). d₂₇-Myristinsyre ble benyttet som intern standard for derivatiseringen.

4 % metoksyamin HCl i pyridin: En 4 % løsning av metoksyamin HCl i pyridin ble laget samme dag. En del av denne løsningen ble overført til en GC-MS vial og Na₂SO₄ ble mikset inn for å fjerne rester av vann.

Suktermiksløsning: En suktermiksløsning bestående av likt volum av 10 mM frukose, 10 mM laktose, 10 mM maltose og 10 mM raffinose ble laget på forhånd.

Derivatiseringsprotokoll

Tilsatte 25 µl 11,74 mM myristin-d₂₇syre til det tørkede celleekstraktet. Celleekstraktet ble tørket i en Savant SPD2010 SpeedVac i ca. 30 minutter ved 45 °C og med et trykk på 5,1 Torr. Celleekstrakt og intern standard ble løst opp i 50 µl 4 % metoksyamin hydroklorid i pyridin ved hjelp av kraftig pippetterig og løsningen ble satt på risting ved 30 °C i 90 minutter. 20 µl av det metoksy aminerte celleekstraktet ble overført til en ny GC/MS vial og kombinert med 180 µl MSFTA¹² med 1 % TMCS¹³ og prøven ble ristet ved 37 °C i 30 minutter. Det derivatiserte celleekstraktet ble nedkjølt til romtemperatur og overført til en ny GC/MS vial med insert og topp.

I tillegg ble en blankprøve, en sukkerstandardmiks og en vial med intern standard tillaget.

Blankprøven ble preparert ved å følge derivatiseringsprosedyren bortsett fra at d₂₇-myristinsyre ikke ble tilsatt.

¹² N-Metyl-N-Trimetylsilyltrifluoracetamid.

¹³ Trimetylklorosilan.

Sukkerstandardmiks: 75 µl 3 mg/ml suktermiksløsning ble tørket i en Savant SPD2010 SpeedVac i ca. 30 minutter ved 45 °C og med et trykk på 5,1 Torr og deretter løst opp i 100 µl 4 % metoksyamin HCl i pyridin. Resten av derivatiseringsprotokollen ble fulgt med unntak av at 50 µl ble overført til en ny vial i stedet for 20 µl.

d₂₇-Myristinsyre 25 µl 11,74 mM myristin-d₂₇syre ble tilsatt til en ren GC/MS vial og tørket i en Savant SPD2010 SpeedVac i ca. 30 minutter ved 45 °C og med et trykk på 5,1 Torr. Deretter ble derivatiseringsprotokollen fulgt.

Under GC-MS analyse ble blankprøven, suktermiksløsningen og d₂₇-Myristinsyre analysert først. Dette var for å kontrollere at derivatiseringsreagensene og GC-MS instrumentet virket optimalt. Da ionekromatogrammene så normale ut ble cellekstraktene analysert. Injeksjonsrekkefølgen til prøvene på gasskromatografen ble randomisert for å redusere effekten av ulik ventetid i den statistiske analysen.

2.10 Gasskromatografi - massespektroskopi instrumentering

2.10.1 Gasskromatografi - massespektroskopi singel kvadrupol (GC-MS SQ)

GC-MS SQ analysen ble gjort med et Agilent 7890A Serie GC system koblet til en Agilent 5975 Inert Masseselektiv Detektor med en CTC Combi PAL autosampler. Bæregassen var helium. Forbindelsene ble separert på en 30 meter lang kapillærkolonne kalt DB-5MS +DuraGard (Agilent Technologies, Kat#: 122-5532G) med en indre diameter på 0,25 mm og en filmtykkelse på 0,25 µm. Dette var en upolar kolonne og stasjonærfasen besto av en fenylarylpolymer ekvivalent til (5 % Fenyl-)Metylpolysiloksan (Agilent Technologies 2012 s. 57). For mer informasjon om strukturen til stasjonærfasen se vedlegg B. figur B1. Derivatene ble ionisert med elektronionisering (EI) og ioniseringsspenningen var - 70 eV. Massespektrometeret ble kjørt i single ion monitoring (SIM) modus. Instrumentet ble styrt av Agilent Mass Selective Detector (MSD) Productivity ChemStation E.01.01.335 produsert av Agilent Technologies. Bilde av GC-MS SQ er vist i figur 2.10.1.



Figur 2.10.1: Bilde av GC-MS SQ instrumentet. Foto: ASVF.

Metoden benyttet på *MCF derivater* var retensjonslåst mot deuterert glutamin-2,3,3,4,4-d₅ syre. Ovnene ble programmert til å holde temperaturen til kolonnen på 45 °C i 2 minutter før temperaturen ble økt med 10 °C per minutt frem til kolonnen hadde en temperatur på 300 °C, denne temperaturen ble holdt isoterm i 7,5 minutter. Injektortemperaturen var satt til 290 °C og prøvene ble injisert med «pulsed split injection» med et splittforhold på 50:1. Injeksjonsvolumet var 2 µl. Massespektrometeret ble kjørt i sveipmodus og skannet etter masse/ladning forhold mellom 50,0 – 550 m/z. Terskelen for deteksjon ble satt til en «abundance» på 250. For mer detaljert informasjon se vedlegg C.

Metoden benyttet på *TMS derivater* var retensjonslåst mot deuterert Myristin-d₂₇ syre (CD₃(CD₂)₁₂CO₂H). Ovnene ble programmert til å holde temperaturen til kolonnen på 60 °C i ett minutt før temperaturen ble økt med 10 °C per minutt frem til kolonnen hadde en temperatur på 325 °C, denne temperaturen ble holdt isoterm i 10 minutter. Injektortemperaturen var 250 °C og prøven ble injisert med splitt injeksjon med et splittforhold på 10:1. Injeksjonsvolumet var 1 µl. Massespektrometeret ble kjørt i sveipmodus og skannet etter masse/ladning forhold mellom 50,0 – 600 m/z. Terskelen for deteksjon ble satt til en «abundance» på 150. For detaljert informasjon se vedlegg C.

2.10.2 Gasskromatografi-massespektroskopi trippel kvadrupol (GC-MS QhQ)

GC-MS QhQ analysen ble gjort med et Agilent 7890A GC system koblet til en Agilent Technologies 7000 MS QhQ med en CTC Combi PAL autosampler. Bærergassen var helium. Kolonnen var den samme som brukt i GC-MS SQ instrumentet, se vedlegg B, figur B1. Derivatene ble ionisert med positiv ion kjemisk ionisering (PCI) med metan som reagensgass. Massespektrometeret ble kjørt i multiple reaction monitoring (MRM) modus. Kollisjonsgassen var nitrogen og kollisjonsenergien var spesifikk for hver «MRM transition», for nærmere informasjon se vedlegg B, tabell B2. Instrumentet ble styrt av Agilent Masshunter programvare versjon B.05.00.412 (Agilent Technologies). Et bilde av GC-MS Trippel QhQ er vist i figur 2.10.2.



Figur 2.10.2: Bilde av GC-MS QhQ instrumentet. Foto: ASVF.

Metoden benyttet på *MCF derivater* var retensjonslåst mot deuterert Glutamin-2,3,3,4,4-d₅ syre. Ovnen ble programmert til å holde temperaturen til kolonnen på 40 °C i 3 minutter før temperaturen ble økt med 20 °C per minutt frem til kolonnen hadde en temperatur på 320 °C, denne temperaturen ble holdt i 3 minutter. Injektortemperaturen var 290 °C og prøvene ble injisert med «pulsed splittless injection». Injeksjonsvolumet var 1 µl. For detaljert informasjon se vedlegg C.

2.11 Identifikasjon og kvantitativ analyse

GC-MS SQ data

GC-MS SQ data ble analysert med Agilent Mass Selective Detector (MSD) Productivity ChemStation. De MCF derivatiserte prøvene ble analysert mot et internt MCF metabolittbibliotek, mens TMS derivatiserte prøver ble analysert mot Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL (Retention Time Locked) Library. Programvaren ble brukt til å identifisere og kvantifisere metabolittene som var lagt inn i biblioteket. For de metabolittene som dannet mer enn ett derivat under TMS derivatisering ble det derivatet med den høyeste kromatografiske toppen brukt i kvantifisering. Chemstations QEdit funksjon ble brukt til og manuelt vurdere tilstedeværelsen av metabolitter i ionekromatogrammet. Alle treff i metabolittbiblioteket ble manuelt undersøkt og en forbindelse ble kvantifisert ved at arealet under forbindelsens kromatografisk topp ble integrert. For å øke kvaliteten på kvantifiseringen ble integreringen av hver kromatografisk topp manuelt evaluert og tilpasset slik at toppen til den samme metabolitten ble integrert på samme måte i alle celleekstrakter. Kromatografiske topper med et lavere signal/støyforhold enn 10 ble forkastet. Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification Software (AMDIS; <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>) fra NIST (National Institute of Standards and Technology) ble brukt til å dekonvolvare overlappende kromatografiske topper med dekonvolveringsalgoritmer. AMDIS ble også brukt til å verifisere resultatene fra QEdit funksjonen. Uidentifiserte forbindelser ble forsøkt identifisert ved å sammenligne forbindelsen massespektrum med massespektrumene i NIST¹⁴ MS Search 2.0 biblioteket. Dette ble spesielt gjort med høye kromatografiske topper. Disse toppene ble ikke kvantifisert. Resultatene ble eksporterer til Microsoft Excel for videre bearbeidelse av datamateriale.

GC-MS QhQ data

GC-MS QhQ data ble analysert med MassHunter Workstation software for kvantitative analyse, versjon B.03.01 (Agilent Technologies). Kromatografiske topper ble identifisert basert treff på kromatografisk retensjonstid og m/z verdi i forhold til metabolske standarder lagt inn i metoden. Hver kromatografisk topp ble manuelt inspisert og toppen ble kvantifisert ved at arealet under ble integrert. For å øke kvaliteten på kvantifiseringen ble integreringen av hver kromatografisk topp manuelt evaluert og tilpasset slik at toppen til den samme metabolitten ble integrert på samme måte i alle

¹⁴ NIST MS Search 2.0 er et EI massespektrum bibliotek med 224 460 spektrum til 192 108 ulike forbindelser med navn, liste med synonymer, CAS registreringsnummer, molekylformel og vekt, kjemisk struktur osv. (Scientific Instrument Services Inc Ukjent år).

celleekstrakter. Kromatografiske topper med et lavere signal/støyforhold enn 10 ble forkastet. Resultatene ble eksporter til Microsoft Excel 2007 for videre bearbeidelse av datamateriale.

I utviklingen av ekstraksjonsprotokollen ble arealet under hver kromatografisk topp brukt til å bestemme relative konsentrasjoner av hver metabolitt. En absolutt kvantifisering av metabolittkonsentrasjonene var ikke nødvendig da dette var en komparativ studie (Duportet et al. 2011).

2.12 Statistisk analyse og databearbeidelse

Dataene ble normalisert mot proteininnhold der gode proteinmålinger var tilgjengelig og deretter normalisert mot innhold av intern-standarden d₃ – Alanin. Alle datasett ble studert både unormalisert og normalisert.

Statistiske analyser ble gjort i programvaren IBM SPSS versjon 19 for Windows, hvor signifikansnivået ble satt til $p = 0,05$. Andre matematiske beregninger ble gjort i Microsoft Excel for Windows 2007. Når p-verdien er oppgitt som 0,000 betyr at den er mindre enn 0,0005, nærmere opplysninger om signifikansen ble ikke gitt da dette ikke var interessant i dette tilfellet (Gray & Kinnear 2012 s. 281).

Normalfordeling

Shapiro-Wilks test ble brukt til å undersøke om verdiene i datasettene var signifikant forskjellig fra normalfordelingen. Både \log_{10} transformasjon, resiprok transformasjon og kvadratrot transformasjon ble testet ut. \log_{10} transformasjon resulterte i de mest normalfordelte datasettene og ble benyttet på alle ikke normalfordelte variabler.

Homogenitet i varians

Levenes test ble brukt til å undersøke om gruppene i datasettene hadde lik tilnærmet lik varians.

Sammenligning av enkeltmetabolitter i to grupper

Ved sammenligning av to grupper, ble uparet t-test brukt til å finne metabolitter hvor det var en signifikant forskjell i gjennomsnittskonsentrasjon mellom de to gruppene.

Variansanalyse

Toveis analyse av varians (ANOVA) ble brukt for å undersøke om det var en statistisk signifikant forskjell mellom gjennomsnittet til to eller flere grupper, og om hvorvidt det var en signifikant interaksjon mellom metabolittkonsentrasjon og behandling i modellen.

Post hoc prosedyre

Dersom toveis ANOVA viste at det var en statistisk signifikant forskjell mellom grupper ble Tukeys «Honestly Significant Difference» (HSD) test brukt for å finne hvilke grupper som var signifikant forskjellig fra hverandre.

Visualiseringsverktøy

Heat map

Heat map av identifiserte metabolitter ble laget i MultiExperimentViewer versjon 4.8.1. for Windows Vista. Før dataene ble importert til MultiExperimentViewer ble de normalisert mot innhold av intern standard d_3 -Alanin, for deretter å bli delt på medianverdien til alle prøvene i datasettet for den gitte metabolitten, og \log_{10} transformert. Dette ble gjort for å visualisere mest mulig av variasjonen i datasettet i «heat mappet».

Hierarkisk klyngeanalyse

Denne metoden «cluster» eller klynger sammen data til et tredigram eller dendrogram, som viser forholdet mellom prøver. Algoritmen starter med å beregne avstanden mellom alle par av datapunkter. De relative avstandene mellom prøver sammenlignes ved å bruke en likhetsindeks, 0 tilsvarer identiske prøver, mens 1 tilsvarer de prøvene som er mest separerte. For hver runde identifiseres de klyngene som klynger tettest og disse settes sammen og en ny klynge lages. Avstanden mellom den nye klyngen og alle andre klyngene beregnes deretter. Deretter finner algoritmen det paret som klynger tettest sammen ut fra de nye avstandene, setter de sammen og så videre, helt til alle punktene er med i en klynge (Lindon et al. 2007). Hierarkisk klyngeanalyse for identifiserte metabolitter ble gjort i MultiExperimentViewer (MeV) versjon 4.8.1. for Windows Vista, etter at et «heat map» var laget. «Average linkage» ble brukt som agglomereringsmetode og «Person Correlation» ble brukt som metrisk avstand (Saeed et al. 2006).

Principal component analysis (PCA)

Denne teknikken uttrykker det meste av variansen i et datasett ved hjelp av et mindre antall faktorer kalt principal komponenter (PC). Hver PC er en lineær kombinasjon av parametrene i det originale datasettet. Hver nye PC forklarer den maksimale mengden variasjon som ikke allerede er forklart med de tidligere PC'er. Hver PC er ortogonal og dermed uavhengig av de tidligere principal komponentene. Variasjonen i datasettet er vanligvis beskrevet med langt færre PC'er enn det originale antallet datapunkter fordi de mindre viktige PC'er bare viser støyvariasjoner i datasettet. Omdannelse av datamatriksen til PC'er resulterer i to matrikser kalt score og loading. Score er den lineære kombinasjonen av de originale variablene, de er koordinatene til prøvene i modellen og kan anses som de nye variablene. I et score plot så representerer et punkt i spektrumet en prøve. PC loadings viser hvordan de gamle variablene har blitt kombinert lineært og dannet nye variabler, de viser også de variablene som har bidratt mest til

variablenes nye posisjon i scores matriksen. I loading plottet representerer et punkt en spektral intensitet. Dette betyr at en gruppering eller clustering i et PC scores plot kan tolkes ved å studere loadingsplottet (Lindon et al. 2007). PCA analyse ble gjort i programvaren The Unscrambler versjon 10.2 (Evaluation Version) fra CAMO Software AS.

3 RESULTAT OG DISKUSJON

Metodeutvikling for normalisering av celleantall har vært en del av oppgaven og omtales samlet i avsnitt 3.5.

Hvorfor statistisk analyse

Heat map, PCA og HCA er gode metoder for å vise trender og kan i mange tilfeller gi en indikasjon om hvilken metode som er den mest eller minst egnede. Datasettene presentert i denne avhandlingen består av få biologiske og tekniske replika, en liten utvalgsstørrelse gjør det nødvendig å gjennomføre statistiske analyser for å vise at forskjellene eller trendene man observerer faktisk skyldes forskjeller mellom det som sammenlignes.

Hvorfor toveis ANOVA

I metabolsk profilering ønsker en ekstraksjon av flest mulig metabolitter ved høyest mulig konsentrasjon. Datasettene inneholder et stort antall metabolitter med et vidt spekter av konsentrasjoner som kan gjøre en statistisk analyse komplisert. Dersom man studerer forskjeller i konsentrasjon for hver metabolitt separat, og finner for eksempel det ekstraksjonsmidlet som oftest har høyest gjennomsnittskonsentrasjon mister en viktig informasjon om størrelsen på forskjellene mellom ulike ekstraksjonsmidler og analysen blir unøyaktig. Man må derfor evaluere alle metabolittkonsentrasjonene i ekstraktene sett i et for å få et innblikk i hvilken metode som er best totalt. Dersom det er en statistisk signifikant interaksjon mellom behandling og metabolittkonsentrasjon, noe som det har vist seg å være i nesten alle datasettene, er dette noe en må ta hensyn til for å kunne si hvilken metode som helhetlig er den beste.

Mer utfyllende informasjon fra de statistiske testene er presentert i vedlegg E, men den informasjonen som er av betydelig interesse for tolkningen er presentert under de tilhørende avsnitt.

Navnene på metabolittene har ikke blitt oversatt fra engelsk til norsk for å sikre at de korrekte metabolittene omtales.

3.1 Valg av ekstraksjonsmiddel

En rekke ekstraksjonsmidler har blitt rapportert i litteraturen og samlet sett ble ekstraksjon med kald metanol og varm etanol ansett som de mest lovende kandidatene for metabolittekstraksjon i humane celler.

3.1.1 Metabolittekstraksjon etterfulgt av TMS derivatisering

For å sammenligne kald metanol og kokende etanol som ekstraksjonsmidler ble tre petriskåler med HeLa S3 celler ekstrahert med hvert ekstraksjonsmiddel, hvert ekstrakt ble deretter delt i to. Tre biologiske replikaer og to tekniske replikaer ble utarbeidet for å øke validiteten til den statistiske analysen. Det skjedde en bireaksjon i en teknisk

replika fra etanolekstraktene under derivatisering, denne prøven (10EtOH) ble derfor ikke tatt med i dataanalysen.

Åtte unike metabolitter i etanolekstraktene

64 metabolitter ble identifisert totalt i etanol- og metanolekstraktene som vist i tabell 3.1.1, åtte av disse metabolittene ble bare detektert i etanolekstraktene (Benzoic acid, Caprylic acid, α -Ketoglutaric acid, Lauric acid, Allo-inositol, D-Mannitol, Arachidic acid og Behenic acid). Disse metabolittene ble tatt ut av datasettet for å unngå at verdiene skulle ha stor påvirkning på den statistiske analysen. Ingen av de identifiserte metabolittene ble bare detektert i metanolekstraktene.

Tabell 3.1.1: Identifiserte metabolitter i TMS-derivatiserte etanolekstrakter fra HeLa S3 celler.

Identifiserte metabolitter i TMS-derivatiserte etanolekstrakter

ϵ -Caprolactam	D-Malic acid	Pyridoxine
L-Lactic acid	D-Threitol	D-Glucose
L-Valine	Aspartic acid	L-Lysine
L-Alanine	L-Pyroglutamic acid	D-Mannitol
L-Leucine	4-Guanidinobutyric acid	Tyrosine
DL-Isoleucine	Phenylalanine	Pantothenic acid
L-Mimosine	Creatinine	Palmitoleic acid
L-Valine	α -Ketoglutaric acid	Palmitic acid
Benzoic acid	L-Glutamic acid	Heptadecanoic acid
Urea	N-Acetyl-L-Aspartic acid	L-Tryptophan
L-Serine	Lauric acid	Oleic acid
Caprylic acid	Pyrophosphate	Stearic acid
Phosphoric acid	2-Amino-1-Phenylethanol	D-Glucose-6-Phosphate
L-Threonine	Glycerol 1-Phosphate	Arachidic acid
L-Proline	L-Glutamine	Diethyl phthalate
Glycine	3-Phosphoglycerate	Behenic acid
Succinic acid	Citric acid	Sucrose
Porphine	Myristic acid	Cellobiose
Uracil	Fructose	5'-Deoxy-5'-(MeS)Adenosine
Fumaric acid	Tagatose	Uridine 5'-Monophosphate
β -alanine	Allo-inositol	Adenosine-5-Monophosphate
		Cholesterol

Høyere konsentrasjon av intern standard i etanolekstrakter

Etanolekstraktene inneholdt nesten dobbelt så mye av intern standard d₂₇-Myristic acid enn metanolekstraktene. Dette var ikke forventet da like mye intern standard ble tilsatt hvert metabolittekstrakt under derivatisering. Det var problematisk å løse tørket celleekstrakt og intern standard i metoksyamin i pyridin underveis i derivatiseringen, men metanol- og etanolekstrakter ble vortekset og pipettert like lenge og burde derfor være like godt løst. Forskjellen kan kanskje tyde på at metanolekstraktene inneholder noe som «hemmer» derivatiseringsreaksjonen eller at etanolekstraktene inneholder noe øker effektiviteten av derivatiseringsreaksjonen. En forventer at metanol- og etanolekstraktene i hovedsak vil inneholde de samme metabolittene og at det derfor virker lite sannsynlig at en eller flere komponenter i etanol- eller metaolekstraktene vil kunne påvirke effektiviteten til derivatiseringsreaksjonen i så stor grad. Det kan derimot være tilfellet at etanolekstraktene gjennomgående inneholder et lavere antall metabolitter (at antallet molekyler i ekstraktet er mindre) enn metanolekstraktene, og at derivatiseringsreaksjonen derfor har vært mer effektiv i etanolekstraktene fordi det er færre metabolitter som «konkurrerer» om de samme derivatiseringsreagenset, på tross av at derivatiseringsreagenset var i overskudd.

Ikke signifikant forskjell i gjennomsnittlig metabolittkonsentrasjon

Toveis ANOVA av dataene etter normalisering mot intern standard og log₁₀ transformering viste at etanolekstraktene (Gj. snitt = 5,450) hadde en høyere gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitter enn metanolekstraktene (Gj. snitt = 5,380).

Den marginale forskjellen i gjennomsnittskonsentrasjon var derimot ikke signifikant (p = 0,062) som vist i tabell 3.1.2. Det var derimot en signifikant interaksjon mellom metabolittkonsentrasjon og ekstraksjonsmiddel (p < 0,000). En statistisk signifikant interaksjon medfører at forskjellen mellom etanol og metanol som ekstraksjonsmidler ikke er konstant, men fluktuerer for de ulike metabolittene.

Tabell 3.1.2: «Test of between-subjects effects» mellom ekstraksjonsmiddel og metabolittkonsentrasjon med tilhørende p-verdi.

	p-verdi
Metabolittkonsentrasjon	0,000
Ekstraksjonsmiddel	0,062
Metabolittkonsentrasjon * Ekstraksjonsmiddel	0,000

Kokende etanol ekstraherte en marginalt høyere konsentrasjon av 48 av 64 metabolitter og en klart høyere konsentrasjon av de resterende åtte metabolittene og ble derfor ansett som det mest effektive ekstraksjonsmidlet.

Silylering som derivatiseringsmetode for humane celleekstrakt

Silylering som derivatiseringsmetode har en rekke ulemper, flere av disse er omtalt i en artikkel av Villas-Bôas et al. (2011). Massespektra-biblioteket benyttet til identifisering

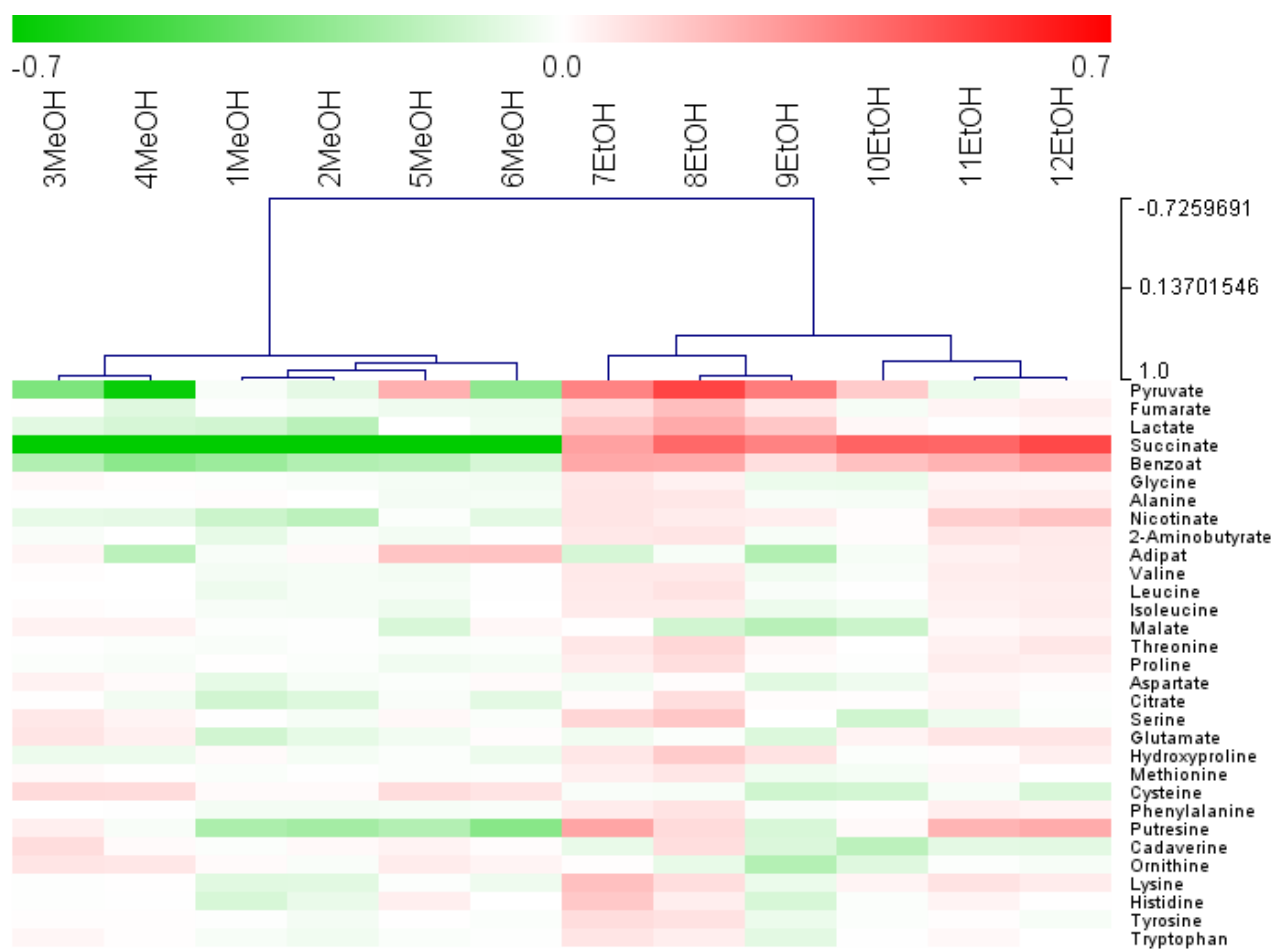
«Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library» har flere svakheter som øker sjansen for feilidentifisering. I dette studiet ble det i stor grad kompensert for disse svakhetene med svært nøye og omfattende manuell integrering av de kromatografiske toppene for å øke validiteten til identifiseringen og kvantifiseringen. Dette var derimot svært tidkrevende arbeid. Totalt sett ble derfor ikke silylering som derivatiseringsmetode brukt i det videre arbeidet med utviklingen av protokollen.

3.1.2 Metabolittekstraksjon etterfulgt av MCF derivatisering

For å sammenligne kald metanol og kokende etanol som ekstraksjonsmidler ble tre petriskåler med HeLa S3 celler ekstrahert med hvert ekstraksjonsmiddel, hvert ekstrakt ble deretter delt i to. Tre biologiske replikaer og to tekniske replikaer ble utarbeidet for å øke validiteten til den statistiske analysen.

De samme metabolittene identifisert i metanol- og etanolekstrakter

Totalt ble 31 metabolitter identifisert i etanol- og etanolekstraktene. Inge metabolitter var unike for etanol- eller etanolekstraktene. Det så derimot ut til å være en gjennomgående trend under manuell integrering av de kromatografiske toppene, at metabolittoppene ofte var litt høyere i etanolekstraktene enn metanolekstraktene. Denne observasjonen ble bekreftet av «heat mappet» i figur 3.1.1 viste at etanolekstraktene gjennomgående hadde en høyere metabolittkonsentrasjon enn metanolekstraktene av flere metabolitter. Den hierarkiske klyngeanalysen viser også at etanol- og etanolekstraktene danner separate klynger og har tydelige forskjeller i metabolsk profil på tross av at de samme metabolittene har blitt identifisert i både metanol- og etanolekstraktene.



Figur 3.1.1: Heat map og hierarkisk klyngeanalyse av seks MCF derivatiserte etanolekstrakter og seks MCF derivatiserte metanolekstrakter fra HeLa S3 celler. De identifiserte metabolittene i ekstraktene er vist til høyre i figuren. Rød farge indikerer høy konsentrasjon, hvit middels og grønn indikerer lav konsentrasjon av de gitte metabolittene.

Signifikant høyere gjennomsnittlig metabolittkonsentrasjon i etanolekstrakter

Toveis ANOVA av dataene etter normalisering mot intern standard d_3 -Alanin og \log_{10} transformering viste at etanolekstraktene (Gj. snitt = 6,523) hadde en høyere gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitter enn metanolekstraktene (Gj. snitt = 6,423). Denne forskjellen var statistisk signifikant ($p < 0,000$) som vist i tabell 3.1.3., etanolekstraktene inneholdt en signifikant høyere gjennomsnittlig metabolittkonsentrasjon enn metanolekstraktene. Det var også en signifikant interaksjon mellom ekstraksjonsmiddel og metabolittkonsentrasjon ($p < 0,000$).

Tabell 3.1.3: «Test of between-subjects effects» mellom ekstraksjonsmiddel og metabolittkonsentrasjon med tilhørende p-verdi.

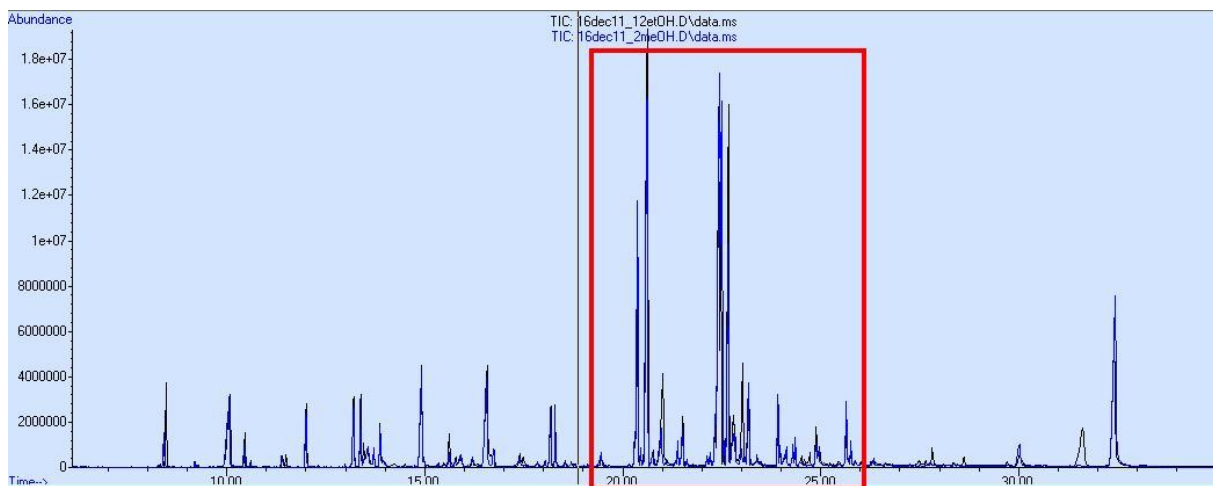
	p-verdi
Metabolittkonsentrasjon	0,000
Ekstraksjonsmiddel	0,000
Metabolittkonsentrasjon * Ekstraksjonsmiddel	0,000

Det ble også gjort seks innledende ekstraksjonsforsøk med kokende etanol og kald metanol (Data ikke vist). Alle viste de samme trendene som vist ovenfor, hvor ekstraksjon med varm etanol gav et gjennomgående høyere utbytte av metabolitter enn ekstraksjon med kald metanol.

Uidentifiserte metabolitter

Mange metabolitter i celleekstraktene ble ikke identifisert fordi de ikke var lagt inn i metabolittbiblioteket benyttet til identifisering. Gjennomsnittelig hadde etanolekstraktene (Gj. snitt = 648,2 ; Std.avvik = 25, 2) et større antall uidentifiserte metabolitter enn metanolekstraktene (Gj. snitt = 572,3 ; Std. avvik = 20,2), disse funnene er basert på treff i AMDIS.

Flere av de uidentifiserte kromatografiske toppene var blant de høyeste i hele ionekromatogrammene, og de fleste hadde en kromatografisk retensjonstid mellom 20–25 min som vist i figur 3.1.2.



Figur 3.1.2: To TIC – kromatogrammer fra Agilent (MSD) Productivity ChemStation lagt over hverandre, et fra et MCF derivatisert etanolekstrakt og et fra et MCF derivatisert metanolekstrakt. X-aksen viser kromatografisk retensjonstid i minutter og Y-aksen viser «abundance» til hver kromatografisk topp. De høyeste kromatografiske toppene er merket av i kromatogrammene i rødt, disse metabolittene hadde en kromatografisk retensjonstid mellom 20 og 25 minutter.

Ifølge NIST-biblioteket var disse toppene i hovedsak langkjedede fettsyrer og andre lipider. Tilstedeværelsen av en lipidfraksjon mellom kloroform- og vannfasen ble også observert under derivatisering. På bakgrunn av disse observasjonene ble to metoder for lipidfjerning utprøvd, og sammenlignet med metabolittkonsentrasjonen i metabolittekstrakter hvor lipidfraksjon ikke var fjernet (3.2).

Sammenligning av varm etanol og kald metanol som ekstraksjonsmiddel

Ekstraksjonsprotokollen med kald metanol inneholdt mange trinn og var svært tidkrevende. Underveis i ekstraksjon og prøveopparbeidelsen var ikke ekstraktet tilstrekkelig nedkjølt til at all enzymaktivitet var fullstendig stoppet, for eksempel under 60 sekunders vortekning, sentrifugering og homogenisering og oppdeling av celleekstraktet. Dette gjør at celleekstraktene ekstrahert med kald metanol mest trolig

ikke representerer de *in vivo* metabolittkonsentrasjonene i cellene, noe som gjør at den viktigste betingelsen for metabolomanalyse er brutt.

Enzymene ble derimot momentant denaturert og all enzymatisk aktivitet stoppet ved tilsetning av kokende etanol. Protokollen med kokende etanol var også kort, enkel å gjennomføre og en effektiv metode for opparbeidelse av et stort antall metabolittekstrakter fra humane celler. Ekstraksjon med kokende etanol førte også til en svært effektiv ekstraksjon av lipider fra cellene, dette gjør at en kan analysere lipidomet separat, noe som klart er av interesse da flere har vist at kreftceller har en endret lipidmetabolisme og lipidsammensetningen i forhold til normale celler, og at disse endringene i flere tilfeller er korrelert til hvor ondartet kreftsvulsten er (Griffin & Shockcor 2004; Nomura et al. 2010). Dette er noen en potensielt vil kunne utnytte til å utarbeide nye mål for kreftbehandling.

Den statistiske analysen viste at metanol- og etanolekstraktene hadde en veldig lik gjennomsnittskonsentrasjon av TMS-derivatiserte metabolitter, med unntak av åtte metabolitter bare detektert i etanolekstraktene. Etanolekstraktene inneholdt også en statistisk signifikant høyere gjennomsnittskonsentrasjon av MCF-derivatiserte metabolitter enn metanolekstraktene. Alle funnene fra dette studiet tyder på at ekstraksjon med kokende etanol fører til en mer fullstendig og effektiv ekstraksjon av metabolitter fra humane celler og ekstraksjon med kokende etanol ble derfor ansett som det mest egnede ekstraksjonsmidlet for metabolittekstraksjon i humane celler.

Flere har rapportert at ekstraksjon med kokende etanol førte til omdannelse eller nedbrytning av enkelte metabolitter (Dietmair et al. 2010; Prasad Maharjan & Ferenci 2003), mens andre har funnet at dette ikke er tilfellet (Gonzalez et al. 1997). Dette har ikke har blitt undersøkt i denne studien og kan derfor verken bekreftes eller avkreftes. På bakgrunn av disse mistankene, kombinert med funnene til Lange et al. (2001) og Gonzalez et al. (1997) ble inkubasjonstiden ved 90 °C redusert fra 5 minutter til 3 minutter i senere studier, for å redusere sjansen for temperaturindusert metabolittdegradering og omdannelse. Denne endringen så ikke ut til å redusere de ekstraherte metabolittkonsentrasjonene og ble derfor anbefalt for videre bruk.

Enkelte har også rapportert at ekstraksjon med kokende etanol fører til betydelige tap av polare metabolitter som sukkerer, sukkerfosfater og nukleotider (Dietmair et al. 2010; Villas-Bôas et al. 2005a). Det ble identifisert flere metabolitter fra disse metabolittklassene i de TMS-derivatiserte etanolekstraktene som vist i tabell 3.1.1. Fordi MCF derivatisering ikke fører til derivatisering av disse metabolittklassene (Wojtowicz et al. 2012), ble dette verken bekreftet eller avkreftet av de andre ekstraksjonene. Nylige funn fra LC-MS/MS analyse gjennomført av enkelte etanolekstrakter fra senere forsøk viste at ekstraktene inneholdt 5 nukleosider, 17 nukleotider, 15 sukkerfosfater og flere sukkerer (Data ikke vist). Det ser altså ut til at

ekstraksjon med kokende etanol fører til ekstraksjon også av sukre, sukkerfosfater og nukleotider.

Effektiviteten til derivatiseringen avhenger av prøvematriksen, og en prøve med færre metabolitter kan dermed være mer effektiv med et lavere antall metabolitter i prøven (Dietmair et al. 2010). Dette burde kanskje vært undersøkt med for eksempel LC-MS/MS analyse som ikke krever derivatisering. Dette var ikke mulig i løpet av arbeidsperioden da LC-MS/MS instrumentet ikke var tilgjengelig.

Sammenligningen av ekstraksjonsmidlene er basert på ekstrakter fra cellelinjen HeLa S3. Artikler basert på samme cellelinje, eller andre HeLa cellelinjer har ikke blitt funnet, og flere har vektlagt at effektiviteten til et gitt ekstraksjonsmiddel i stor grad også avhenger av organismen som studeres (Sellick et al. 2008).

Med disse punktene tatt i betraktning, basert på de tilgjengelige resultatene anses ekstraksjon med kokende etanol som en bedre metode for metabolittekstraksjon fra humane kreftceller enn ekstraksjon med kald metanol.

3.2 Fjerning av lipidfraksjon fra metabolittekstrakter

Metabolittekstraksjon med varm etanol førte til effektiv ekstraksjon av en rekke lipider som nevnt i avsnitt 3.1.1. Fordi lipidfraksjonen var så stor ble det mistenkt at andre metabolitter kunne bli liggende «gjemt» i lipidfraksjonen og dermed ikke ble derivatisert og kvantifisert under GC-MS/MS analyse. Dersom celleekstraktene skulle analyseres ved hjelp av andre analytiske plattformer enn GC-MS/MS, for eksempel LC-MS/MS eller LC(HILIC)-TOF, så ville det være gunstig å fjerne lipidfraksjonen da denne potensielt ville medføre problemer under analyse. I tillegg ville også være interessant å kunne analysere lipidfraksjonen separat av årsaker nevnt i avsnitt 3.1.

Innledende forsøk viste at heksan og kloroform hadde god faseseparasjon fra vann, væske-væske ekstraksjon med disse to organiske fasene ble derfor prøvd ut og metabolittkonsentrasjonen etter væske-væske ekstraksjon ble sammenlignet med ekstrakter hvor lipidfraksjonen ikke var fjernet. Seks metabolittekstrakter fra cellekulturer med T24 celler ble splittet i fire hvor en fraksjon gjennomgikk væske-væske ekstraksjon med kloroform, en fraksjon gjennomgikk væske-væske ekstraksjon med heksan og den tredje fraksjonen ble bare frysetørket og «SpeedVaccet» sammen med de andre fraksjonene. Hver behandling hadde dermed seks biologiske replikaer.

Emulsjon under væske-væske ekstraksjon med heksan

Under væske-væske ekstraksjon med heksan ble det observert en tydelig emulsjon, en slik emulsjon ble derimot ikke observert under væske-væske ekstraksjon med kloroform. Emulsjonen tydet på at lite av lipidfasen gikk over i heksanfasen.

Liten lipidfraksjon i klorformvaskede celleekstrakter

Under MCF-derivatisering ble en betydelig lipidfraksjon mellom kloroformfasen og vannfasen observert i heksanvaskede og uvaskede metabolittekstrakter. I kloroformvaskede ekstrakter ble derimot bare en svært liten lipidfraksjon mellom de to fasene observert.

Lavere kromatografiske topper i klorformvaskede ekstrakter

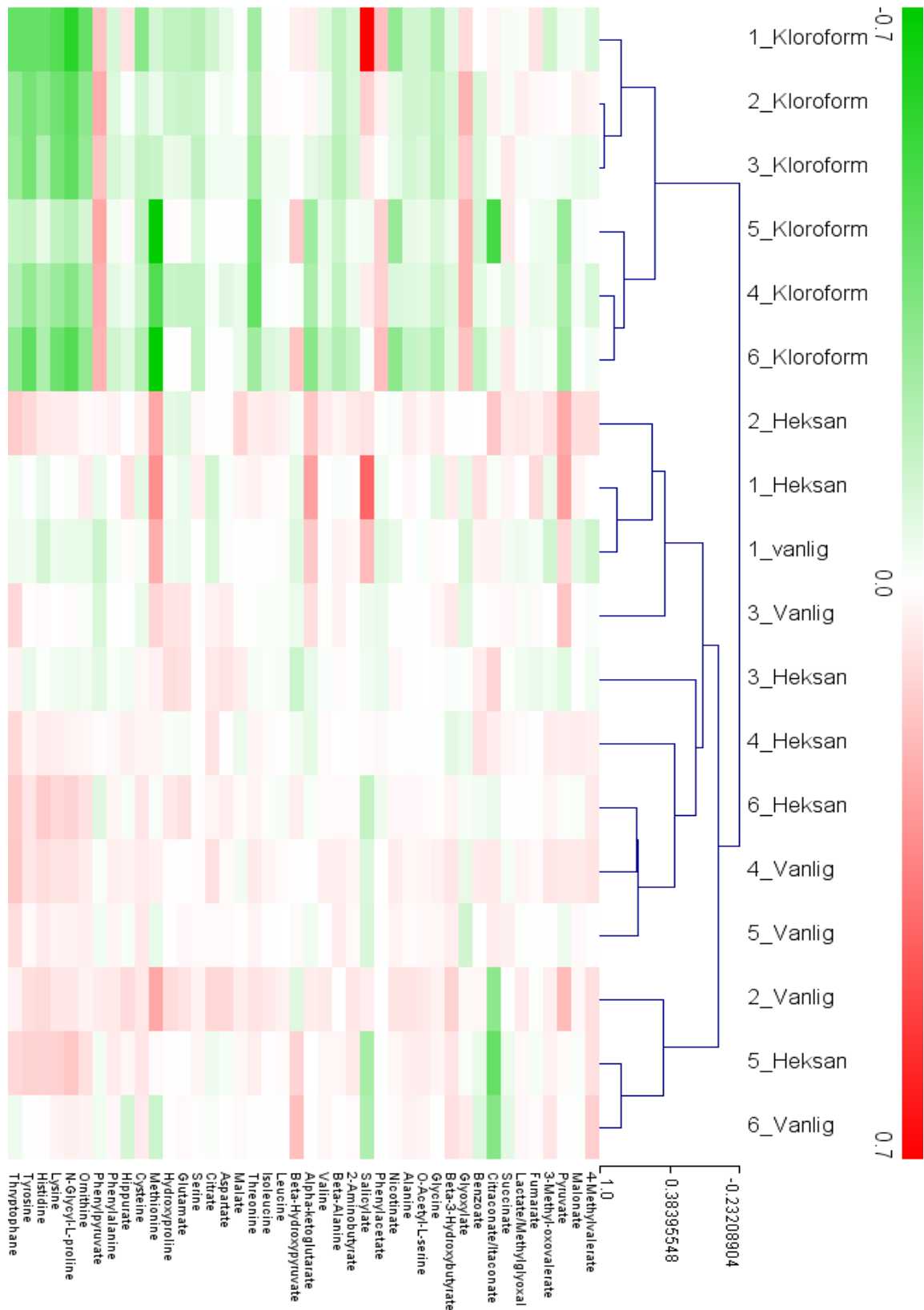
Under manuell integreringen av arealet under de kromatografiske toppene var det en gjennomgående trend at de kloroformvaskede ekstraktene hadde inneholdt lavere kromatografiske topper enn i de ekstraktene vasket med heksan eller ingen lipidfjerning. Ionekromatogrammene til metabolittekstraktene uten lipidfjerning hadde gjennomgående litt høyere kromatografiske topper enn heksanvaskede ekstrakter.

Ingen normalisering mot intern standard

Normalisering mot intern standard snudde trenden på hode. Dette tydet på at kloroformvasken eller de forskjellige behandlingene påvirket innholdet av intern standard i metabolittekstraktene, og dataene ble derfor ikke normalisert. Det unormaliserte datasettet ble derfor benyttet i det videre analysearbeidet.

Effekt av væske-væske ekstraksjon med kloroform og heksan på metabolittkonsentrasjonen

«Heat mappet» vist i figur 3.2.1 bekrefter observasjonen fra den manuelle integreringen av de kromatografiske toppene, at kloroformekstraktene gjennomgående inneholdt lavere metabolittkonsentrasjoner enn heksanvaskede og ikke-vaskede ekstraktene. Den hierarkiske klyngeanalysen i figur 3.2.1 viser også at de kloroformvaskede ekstraktene klynger også separat fra de to andre metodene.



Figur 3.2.1: Heat map og hierarkisk klyngeanalyse av identifiserte metabolitter i seks MCF derivatiserte celleekstrakter fra T24 celler gjennomgått væske - væske ekstraksjon med kloroform, seks MCF derivatiserte celleekstrakter fra T24 celler gjennomgått væske - væske ekstraksjon med heksan og seks MCF derivatiserte celleekstrakter fra T24 celler hvor ingen tiltak ble gjort for å fjerne lipidfraksjonen fra celleekstraktene. Grønn farge indikerer lav metabolittkonsentrasjon, hvit middels og rød høy konsentrasjon.

Toveis ANOVA viste at celleekstraktene vasket med kloroform (Gj. snitt = 4,763) hadde en lavere gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitter etter væske-væske ekstraksjon enn ekstraktene vasket med heksan (Gj. snitt = 4,883) og de uvaskede ekstraktene (Gj. snitt = 4,877). Uvaskede og heksanvaskede ekstrakter hadde derimot en tilnærmet lik gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitter.

Analysen viste at det var en signifikant forskjell mellom de tre behandlingene ($p < 0,000$). Det var også en signifikant interaksjon mellom metabolittkonsentrasjonen og de tre behandlingene ($p < 0,000$) som vist i tabell 3.2.1.

Tabell 3.2.1: «Test of between-subjects effects» mellom fettjerningsbehandling og metabolittkonsentrasjon med tilhørende p-verdi.

	p-verdi
Metabolittkonsentrasjon	0,000
Behandling	0,000
Metabolittkonsentrasjon * Behandling	0,000

Tukeys HSD post hoc-test viste at gjennomsnittskonsentrasjonen av metabolitter i kloroformvaskede ekstrakter var signifikant forskjellig fra gjennomsnittskonsentrasjonen av metabolitter i heksanvaskede ekstrakter og uvaskede ekstrakter. Tukeys post hoc-test viste også at den gjennomsnittlige metabolittkonsentrasjonen i heksanvaskede ekstrakter og uvaskede ekstrakter ikke var signifikant forskjellig som vist i tabell 3.2.2.

Tabell 3.2.2: Utfall fra Tukeys HSD post hoc-test ved parvis sammenligning av gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitter i kloroformvaskede-, heksanvaskede- og uvaskedecelleekstrakter med gjennomsnittelig forskjell og tilhørende p-verdi.

Metode 1	Metode 2	Gj. Snittlig forskjell	p-verdi
Kloroform	Heksan	-0,121	0,000
	Vanlig	-0,115	0,000
Heksan	Kloroform	0,121	0,000
	Vanlig	0,006	0,712

Væske-væske ekstraksjon med kloroform fører til et signifikant metabolittap

Kombinert med observasjoner under væske-væske ekstraksjon, og under derivatisering av metabolittekstraktene tyder funnene på at væske-væske ekstraksjon med kloroform fjerner en betydelig del av lipidfraksjonen i celleekstraktene, men at en fraksjon av de andre metabolittene i ekstraktet (intern standarden inkludert) også går over i kloroformfasen. Fordi væske-væske ekstraksjon med kloroform fører til et signifikant tap av metabolitter så anses ikke væske-væske ekstraksjon med kloroform som en egnet metode for fjerning av lipider i metabolittekstrakter.

Væske-væske ekstraksjon med heksan fjerner ikke lipidfraksjonen i metabolittekstraktet

Resultatene fra den statistiske analysen kombinert med den observerte emulsjonen under væske-væske ekstraksjon med heksan og den observerte lipidfraksjonen mellom kloroformfasen og vannfasen under derivatisering, tydet på at vasken med heksan ikke

førte til en signifikant fjerning av lipidfraksjonen av metabolittekstraktet, dette ble bekreftet av toveis ANOVA og Tukeys HSD post hoc-test som viste at den gjennomsnittelige metabolittkonsentrasjonen i heksanvaskede ekstrakter ikke var signifikant forskjellig fra celleekstrakter hvor lipidfraksjonen ikke var fjernet. Væskevæske ekstraksjon med heksan ser dermed ikke ut til å fjerne en signifikant andel av lipidfraksjonen i celleekstraktet og anses derfor ikke som en egnet metode for fjerning av lipider i metabolittekstrakter.

Sentrifugering forenklet MCF-derivatiseringen

Det ble derimot observert at et sentrifugeringstrinn underveis i MCF derivatiseringen for å konsentrere lipidfraksjonen mellom vannfasen og kloroformfasen betydelig forenklet og dette ble derfor gjort under senere derivatiseringer.

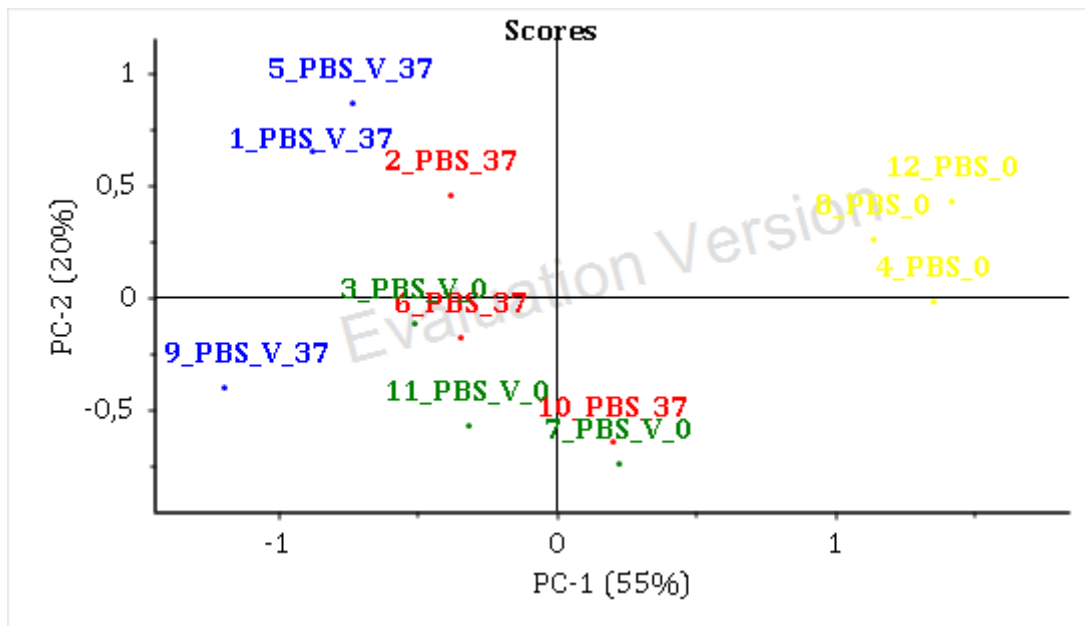
3.3 Optimalisering av vasketrinn før metabolittekstraksjon

Ulike vaskeløsninger og temperaturer på vaskeløsningene før metabolittekstraksjon rapporteres i litteraturen, et forsøk med to mye brukte vaskeløsninger (PBS og Milli-Q vann) ved to temperaturer ble derfor sammenlignet. Hver av de fire (1-4) behandlingene hadde tre biologiske replikaer.

1. Vasket to ganger med PBS (37 °C) og en gang med vann (37 °C),
2. Vasket to ganger med PBS (37 °C),
3. Vasket to ganger med PBS (0 °C) og en gang med vann (0 °C),
4. Vasket to ganger med PBS (0 °C).

Den metabolske profilen til celler bare vasket med kald PBS skiller seg ut

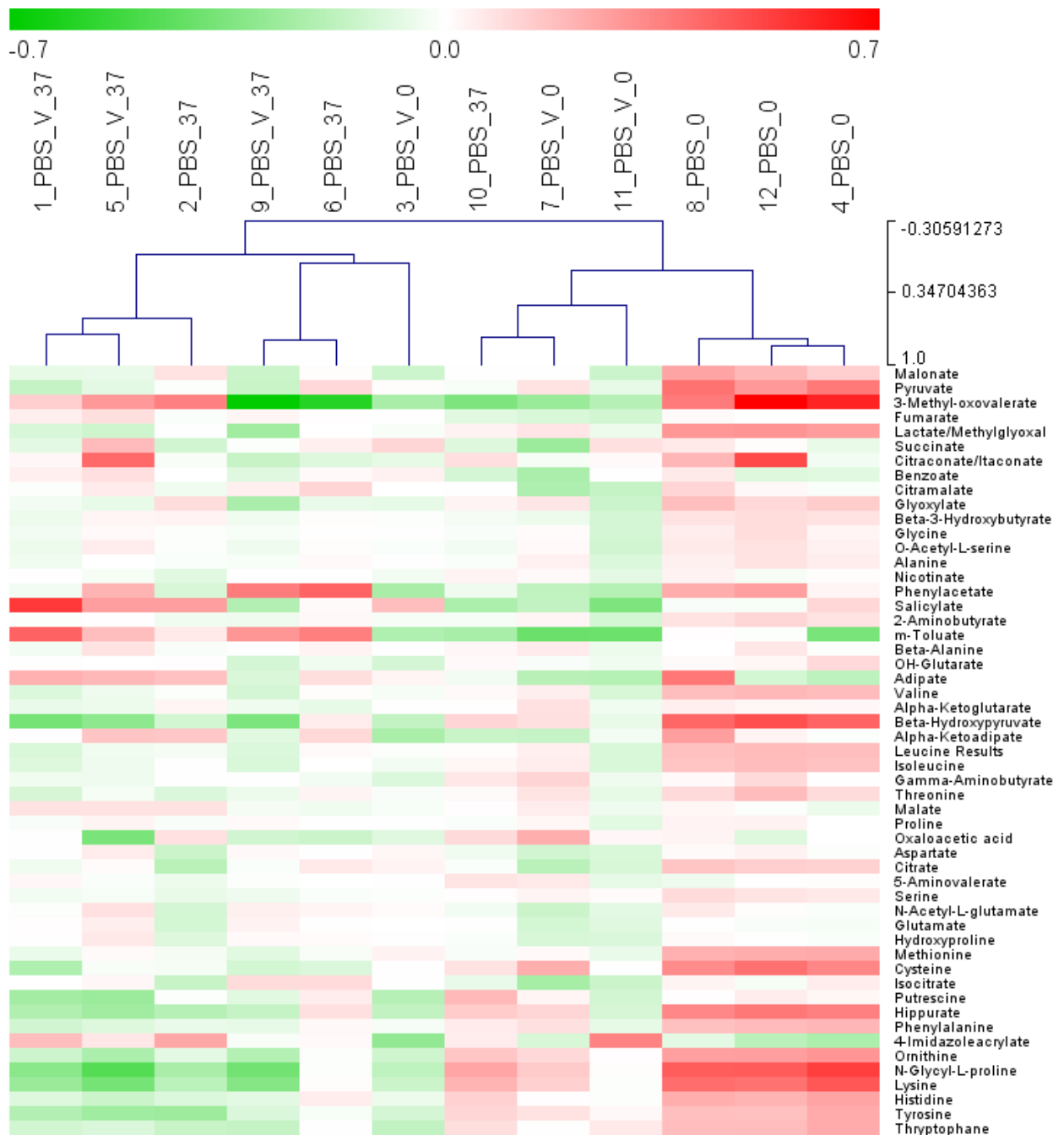
«Principal component analysis» av datasettet viste at celleekstraktene ekstrahert fra celler vasket to ganger med kald PBS (gult) hadde en metabolsk profil som tydelig separerte seg den metabolske profilen til cellene vasket med de andre vaskene som vist i figur 3.3.1. «PCA score plottet» viste også at de metabolske profilene til cellene vasket med varm PBS (rød) og kald PBS etterfulgt av vannvask (grønn) i stor grad overlappet. Den metabolske profilen til cellene vasket med varm PBS etterfulgt av en vannvask (blå) klynget også nært den metabolske profilen til de to ovenfor nevnte vaskebehandlingene. Figur 3.3.1 viser også at det var relativt liten variasjon i den metabolske profilen til celler vasket to ganger med kald PBS (gult), mellom biologiske replikaer da disse tre celleekstraktene klynget nært hverandre.



Figur 3.3.1: PCA score plot av metabolsk profil til T24 celler vasket med fire forskjellige vaskeløsninger. Celler vasket to ganger med PBS og en gang med Milli-Q vann er vist i grønt (0°C) og blått (37°C). Celler bare vasket to ganger med PBS er vist i gult (0°C) og rødt (37°C).

Celleekstrakter fra celler vasket bare med kald PBS inneholder høyere metabolittkonsentrasjoner

«Heat mappet» og den hierarkiske klyngeanalysen vist i figur 3.3.2 bekrefter at den metabolske profilen til celler vasket bare med kald PBS skiller seg ut betydelig fra de metabolske profilene til cellene vasket med andre vaskeløsninger. «Heat mappet» viser også at årsaken til at disse prøvene skiller seg ut at de gjennomgående har en høyere metabolittkonsentrasjon enn den de resterende metabolittekstraktene. Den hierarkiske klyngeanalysen bekrefter at den metabolske profilen til cellene vasket med kald PBS varierer relativt lite og danner dermed en separat klynge fra de andre celleekstraktene.



Figur 3.3.2: «Heat map» og hierarkisk klyngeanalyse av identifiserte metabolitter i tolv MCF-derivatiserte celleekstrakter ekstrahert etter fire forskjellige vasketrinn. Prøve 1, 5 og 9 er vasket to ganger med varm PBS og en gang med varmt vann. Prøve 2, 6 og 10 er vasket to ganger med varm PBS. Prøve 3, 7 og 11 er vasket to ganger med kald PBS og en gang med kaldt vann, og prøve 4, 8 og 12 er vasket to ganger med kald PBS. Grønn farge indikerer lav konsentrasjon av den gitte metabolitten, hvit indikerer middels konsentrasjon og rød indikerer høy konsentrasjon.

Toveis ANOVA viste at celleekstraktene fra celler bare vasket med kald PBS (Gj. snitt = 5,027) inneholdt den høyeste gjennomsnittskonsentrasjonen av metabolitter blant celleekstraktene fra celler vasket med forskjellige vaskeløsninger. Celleekstraktene fra celler bare vasket med varm PBS (Gj. snitt = 4,900), varm PBS med vannvask (Gj. snitt = 4,857) og kald PBS med vannvask (Gj. snitt = 4,852) inneholdt derimot en likere gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitter. Toveis ANOVA viste også at det var en

signifikant interaksjon ($p < 0,000$) mellom metabolittkonsentrasjon og hvilken vaskeprotokoll som ble benyttet som vist i tabell 3.3.1, og at det var en signifikant ($p < 0,000$) forskjell mellom enkelte av vaskeprotokollene.

Figur 3.3.1: «Test of between subjects effects» mellom vaskeprotokoll og metabolittkonsentrasjon med tilhørende p-verdi.

	p-verdi
Metabolittkonsentrasjon	0,000
Vaskeprotokoll	0,000
Metabolittkonsentrasjon * Vaskeprotokoll	0,000

Tukeys HSD post hoc-test viste at gjennomsnittskonsentrasjonen av metabolitter i celleekstrakter ekstrahert fra celler vasket med kald PBS var signifikant forskjellig ($p < 0,000$) fra gjennomsnittlig metabolittkonsentrasjon i celleekstraktene ekstrahert fra celler vasket med de andre vaskeløsningene, som vist i tabell 3.3.2. Celleekstraktene ekstrahert fra celler bare vasket med kald PBS inneholdt altså en signifikant høyere gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitter i forhold til metabolittekstraktene ekstrahert fra celler vasket med de andre vaskeløsningene. Tukeys HSD post hoc-test viste også at ekstraksjonsutbytte i metabolittekstrakter ekstrahert fra celler vasket med varm PBS og varmt vann, ikke var signifikant forskjellig ($p < 0,972$) fra celleekstraktene ekstrahert fra celler vasket med kald PBS og kaldt vann. Disse to var igjen signifikant forskjellig fra gjennomsnittlige metabolittkonsentrasjonen i celleekstrakter ekstrahert fra celler vasket med varm PBS.

Tabell 3.3.2: Utfall fra Tukeys HSD post hoc-test med parvis sammenligning av gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitter i de fire vaskeprotokollene med tilhørende gjennomsnittlig forskjell, standardfeil og p-verdi.

Metode 1	Metode 2	Gj. snittlig forskjell	p-verdi
PBS_V_37	PBS_37	-0,043	0,005
	PBS_V_0	0,006	0,972
	PBS_0	-0,169	0,000
PBS_37	PBS_V_37	0,043	0,005
	PBS_V_0	0,049	0,001
	PBS_0	-0,126	0,000
PBS_V_0	PBS_V_37	-0,006	0,972
	PBS_37	-0,049	0,001
	PBS_0	-0,175	0,000
PBS_0	PBS_V_37	0,169	0,000
	PBS_37	0,126	0,000
	PBS_V_0	0,175	0,000

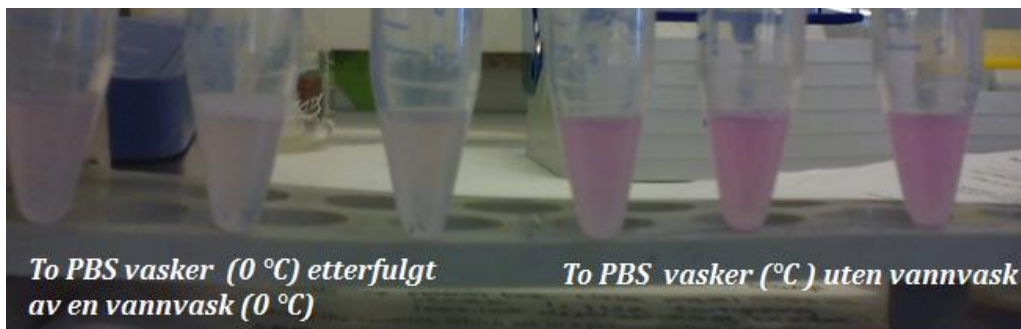
Metabolittekstrakter ekstrahert fra celler bare vasket med PBS inneholdt store mengder salt

Metabolittekstrakter fra celler ikke vasket med vann etter PBS vask inneholdt et tykt saltlag (rester fra PBS) etter inndamping, salter i disse mengdene vil kunne påvirke effektiviteten av derivatiseringen og den videre i GC-MS/MS analysen i form av matrikseffekter og ionesuppresjon (Sellick et al. 2008).

Rester av fenolrød

Metabolittekstrakter ekstrahert fra celler ikke vasket med vann så ut til å inneholde tydelige rester av indikatoren fenolrød fra kultiveringsmediet som vist i figur 3.3.3.

Dette er ikke hensiktsmessig da fenol rød har en forstyrrende effekt på BCA proteinassay (Novagen 2011), benyttet til proteinanalyse av cellepelletene. Dette kan eventuelt unngås ved å vaske cellepelleten en gang med vann for å fjerne rester av fenolrød.



Figur 3.3.3: Seks metabolittekstrakter fra vasketrinnprotokollforsøket underveis i MCF derivatisering. Celleekstraktene er løst i 1 M NaOH og metanol. Indikatoren fenolrød er rosa under svakt basiske forhold (Freshney 2010 s. 99). Foto: ASVF.

Vasketrinn med vann

På bakgrunn av dette vil kanskje en protokoll med et vasketrinn med vann likevel gi de mest pålitelige resultatene. Dette avhenger derimot av at vasketrinnet med vann ikke fører til at cellene lyserer og at metabolitter lekker ut i vaskeløsningen.

Uparet t-test av celleekstrakter ekstrahert etter vasketrinn med og uten en vannvask (uavhengig av temperatur) viste at celleekstrakter ekstrahert etter vannvask inneholdt en signifikant lavere gjennomsnittskonsentrasjon av 19 av de 53 identifiserte metabolittene som vist i tabell 3.3.3 i forhold til celleekstraktene ekstrahert etter vask bare med PBS. Dette kan tyde på at vannvasken fører til lekkasje av en rekke metabolitter. Ingen metabolitter hadde gjennomsnittlig en signifikant høyere konsentrasjon i celleekstrakter ekstrahert fra celler vasket med vann enn ekstrakter ekstrahert fra celler ikke vasket med vann.

Tabell 3.3.3: Metabolitter hvor den gjennomsnittlige konsentrasjonen var signifikant forskjellig mellom metabolittekstrakter ekstrahert fra celler vasket med og uten vannvask, i uparet t-test (uavhengig av temperatur), med gjennomsnittskonsentrasjoner, gjennomsnittlig forskjell og tosidig p-verdi.

Metabolitt	Gj. Snittskons. med vannvask	Gj. Snittskons. uten vannvask	Gj. Snittelig forskjell	Tosidig p-verdi
Malonate	3,257	3,56	0,203	0,001
Pyruvate	4,961	5,20	0,244	0,016
Lactate/Methylglyoxal	6,59	6,82	0,23	0,013
Glyoxylate	4,235	4,349	0,159	0,014
Beta-3-Hydroxybutyrate	4,264	4,349	0,085	0,013
OH-Glutarate	3,623	3,694	0,070	0,040
Valine	6,489	6,641	0,153	0,010
Beta-Hydroxypyruvate	4,166	4,593	0,427	0,007
Leucine	6,366	6,508	0,141	0,015
Isoleucine	6,307	6,45	0,143	0,009
Putrescine	4,445	4,647	0,201	0,004
Hippurate	3,331	3,643	0,313	0,013
Phenylalanine	6,308	6,453	0,145	0,021
Ornithine	3,883	4,131	0,247	0,013
N-Glycyl-L-proline	3,566	4,004	0,439	0,020
Lysine	4,892	5,274	0,382	0,016
Histidine	4,007	4,194	0,187	0,009
Tyrosine	5,764	5,928	0,187	0,016
Thryptophane	4,644	4,815	0,171	0,034

På bakgrunn av funnene til Ritter et al. (2008), og Dietmair et al. (2010) kombinert med egne observasjoner ble to vasketrinn med kald PBS ansett som gunstig for å fjerne medierester. Et vasketrinn med vann ser ut til å fjerne betydelige mengder salt fra cellene etter PBS-vask samtidig som siste rest av medierester (inkludert fenolrød) fjernes. En vannvask førte derimot til et signifikant metabolittap. Om en vannvask bør inkluderes i vaskeprotokollen er for eksempel avhengig av hvor påvirket den analytiske plattformen blir av salter. Basert på funnene fra denne studien anses ikke et vasketrinn med vann som egnet før metabolittekstraksjon i humane celler.

3.4 Sammenligning av «SpeedVac» og frysetørking til oppkonsentrering av metabolittekstrakt

I litteraturen brukes både «SpeedVac» og frysetørking til å fjerne ekstraksjonsmiddelet fra metabolittekstrakter, ofte benyttes begge i samme artikkel. Det var derfor interessant å se om inndampingsmetodene fører til det samme resultatet eller om en metode har en høyere gjenfinning («recovery») av metabolittene enn den andre. To rør med metabolittstandard løst i etanol ble derfor «SpeedVaccet» og to rør ble frosset og frysetørket.

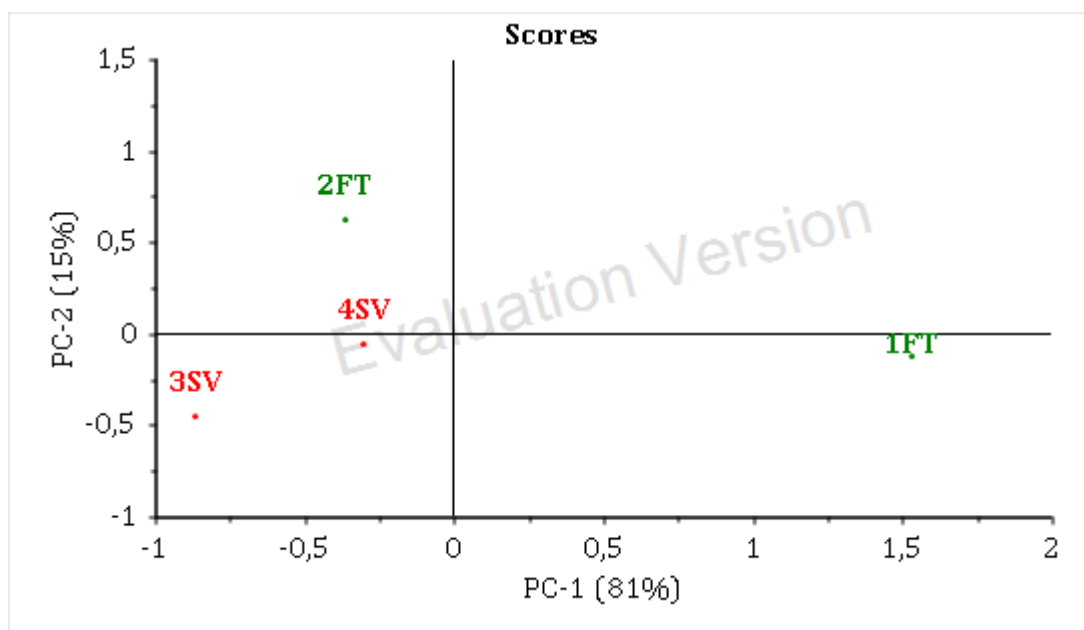
Frysetørkede prøver hadde høyere gjennomsnittskonsentrasjon av metabolittstandarder

Toveis ANOVA viste at frysetørkede standarder i gjennomsnitt inneholdt en høyere konsentrasjon (Gj. snitt = 5,923) enn «SpeedVaccede» standarder (Gj. snitt = 5,845). Forskjellen i gjennomsnittlig konsentrasjon av metabolittstandarder mellom de to avdampingsmetodene var statistisk signifikant ($p < 0,000$), men det var ikke en signifikant interaksjon mellom avdampingsmetode og metabolittkonsentrasjon ($p = 0,376$) som vist i tabell 3.4.1.

Tabell 3.4.1: «Test of between subjects effects» mellom inndampingsmetode og metabolittkonsentrasjon med tilhørende p-verdi.

	p-verdi
Metabolittkonsentrasjon	0,000
Inndampingsmetode	0,000
Metabolittkonsentrasjon * Inndampingsmetode	0,376

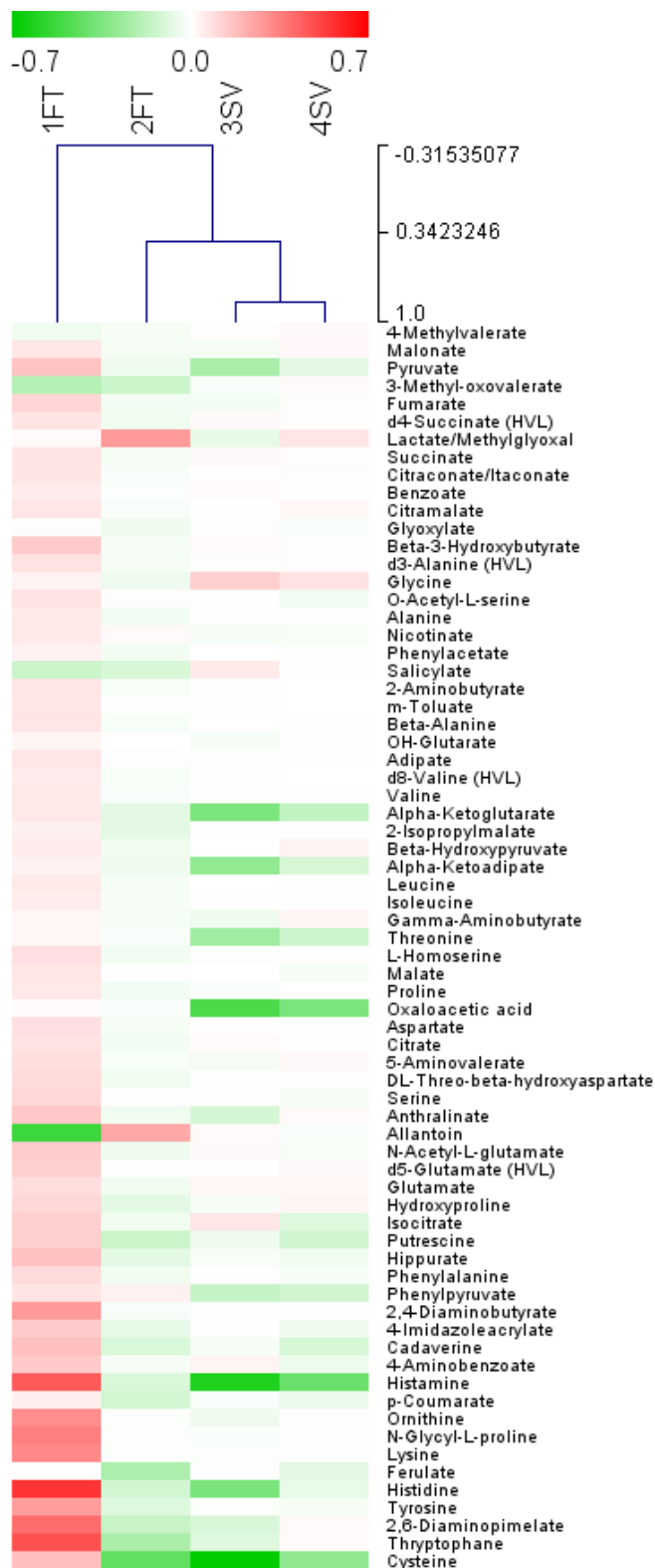
Den statistiske analysen tydet på at frysetørkede rør inneholdt en høyere gjennomsnittskonsentrasjon av metabolittstandarder enn de «SpeedVaccede» rørene. «PCA Score plottet» i figur 3.4.1 viser at de frysetørkede og «SpeedVaccede» rørene ikke danner tydelig separate klynger, men at et rør (FT1) avvirket fra de resterende tre. Dette tyder på betydelige forskjeller mellom de to frysetørkede rørene.



Figur 3.4.1: «PCA Score plot» av to frysetørkede rør (FT) med metabolittstandarder og to «Speedvaccede» (SP) rør med metabolittstandarder. Frysetørkede rør er vist i grønt og «SpeedVaccede» rør i rødt.

«Heat mappet» og den hierarkiske klyngeanalysen vist i figur 3.4.2 bekrefter at et rør (FT1) avvirket fra de tre andre rørene. Heat mappet viser at det avvirkende røret (FT1) inneholder gjennomgående høyere konsentrasjon av flere metabolittstandarder. Dette fører også til at de tre andre rørene klynger tettere sammen i den hierarkiske klyngeanalysen. Resultatet fra toveis ANOVA ble altså kraftig påvirket av en prøve, og siden bare to replikaer ble brukt var dette nok til å påvirke resultatet betydelig og det er

derfor mer usikkert om frysetørking av metabolittstandardene førte til et mindre metabolitttap enn «SpeedVaccing».



Figur 3.4.2: «Heat map» og hierarkisk klyngeanalyse av to frysetørkede rør (FT1 og FT2) og to «SpeedVacced» rør (SV3 og SV4) med metabolittstandarder. Grønn farge indikerer lav konsentrasjon, hvit indikerer middels konsentrasjon og rød indikerer høy konsentrasjon av metabolittstandardene. HVL betyr at metabolittstandardene er merket med deuterert hydrogen.

De to frysetørkede rørene gjennomgikk nøyaktig den samme behandling og burde dermed være likere. Dette kan tyde på at kanskje mer av metabolittstandardene ble tilsatt i prøverør FT1. På tross av disse observasjonene inneholder de frysetørkede rørene bare lave konsentrasjoner av et par metabolitter, mens begge de «SpeedVaccede» rørene inneholder lave konsentrasjoner av metabolitter som Alpha-Ketoglutarate, Alpha-Ketoadipate, Threonine, Oxaloacetic acid, Histamine og Cysteine.

I tillegg ble flere virkelige metabolittekstrakter frysetørket og «SpeedVaccet» i arbeidet med denne avhandlingen, og det tok vanligvis opp mot 8-10 timer å dampe inn hele ekstraksjonsmiddelt ved hjelp av «SpeedVac». Først ved ca 50 °C til all etanolen var dampet bort og i tillegg ca. 2 timer ved ca. 60 °C for å dampe inn vannet. Metabolittekstraktene ble derfor utsatt for hevede temperaturer over lengre tid, noe som bare øker sjansen for metabolittdegradering og omdannelse. Under frysetørking ble metabolittekstraktene derimot holdt nedkjølt under hele prosessen. Frysetørking ble derfor ansett som den mest egne metoden for oppkonsentrering av 75 % etanolbaserte metabolittekstrakter fra humane celler.

Disse funnene stemmer med funnene til Villas-Bôas et al. (2005a) som konkluderte med at «SpeedVaccing» ikke var en egnet metode for oppkonsentrering av vannholdige metabolittekstrakter da oppvarmingen vil kunne føre til metabolittdegradering og tap av flyktige metabolitter (Villas-Bôas et al. 2005a).

3.5 Korrigering for forskjell i cellevekst

Både HeLa S3 cellelinjen og T24 cellelinjen benyttet i utviklingen av denne ekstraksjonsprotokollen vokste adherent. Selv om et ganske likt antall celler ble platet ut i hver petriskål var ikke antallet celler det samme etter to dagers inkubasjon. Fordi cellene ikke kunne trypsineres før ekstraksjon, var det ikke mulig å telle antallet celler før ekstraksjon, og benyttet antallet celler til å normalisere mellom de forskjellige petriskålene. Flere potensielle normaliseringsteknikker ble derfor undersøkt. En figur som oppsummerer de viktigste funnene underveis i arbeidet er vist i figur 3.5.1. Supplerende materiale fra arbeidet med normaliseringsprotokollen er lagt ved i vedlegg D.

Metode	Cellepellet løst i	Utfall
Tørrvekt (mg)	Milli-Q vann/ 0,15 M NaCl vannløsning	For lite sensitiv
Bradford proteinassay	Milli-Q vann / 0,15 M NaCl vannløsning	For lite protein løst
Bradford proteinassay	Reporter lysisbuffer	Bradford sensitiv for detergenter
Konvensjonell BCA prtoteinasay	Reporter lysisbuffer	For mange prøver til å måle alle i løpet av 10 min.
BCA protein assay, mikroskala	Reporter lysisbuffer	Sensitiv for bl.a. cystein, lipider, fenolrød, tryptofan, tyrosin.

Figur 3.5.1: Oppsummering av hovedfunnene under arbeidet med utviklingen av en metode for korrigering for ulik cellevekst mellom petriskåler med celler.

3.5.1 Tørrvekt av cellepellet

Selv ved hjelp av en vekt som målte i milligram var vekten av de tørkede cellepelletene på den siste desimalen på vekten. Målingsmetoden ble derfor ikke ansett som sensitiv nok til å kunne detektere de små forskjellene i antall celler mellom forskjellige petriskåler, og ble derfor ikke benyttet i det videre arbeidet.

3.5.2 Proteininnhold i metabolittekstraktets supernatant

Det ble detektert proteiner ved hjelp av Bradford proteinassay når hele supernatanten ble dampet inn og deretter analysert. Proteinkonsentrasjonen var lav (på den nedre delen av standardkurven), dette gjør at en fraksjon av supernatanten ikke ville være nok til å kunne detektere forskjeller i proteinkonsentrasjonen i et celleekstrakt. Å ta ut en fraksjon av supernatanten ville heller ikke være gunstig da mest mulig av supernatanten (som inneholder de ekstraherte metabolittene) bør derivatiseres og analyseres.

3.5.3. Proteininnhold i cellepellet

3.5.3.1 Bradford proteinassay

Oppløsning av cellepellet

For å detektere proteinkonsentrasjonen i cellepelleten måtte cellepelleten løses opp, ulike løsemiddel ble prøvd ut.

Vann og saltvann

Når cellepelleten ble løst i Milli-Q vann eller 0,15 M NaCl ved hjelp av vorteksing og kraftig sonikering med en sonikeringsprobe ble en svært lav konsentrasjon av proteiner detekter ved hjelp av Bradford proteinassay. Oppløsning av cellepellet i vann eller saltvann ble derfor ikke ansett som en egnet metode.

Sonikering

Det ble observert at effektiviteten til sonikeringen varierte ettersom størrelsen på cellepelleten og væskevolumet varierte. Dette gjorde sonikeringen lite reproducerbar. Det ble også værende igjen biter av cellepelleten i sonikeringsproben, og hvor mye som ble sittende igjen varierte også fra gang til gang. Disse funnene gjorde av sonikering med sonikeringsprobe ikke ble ansett som en egnet metode for å løse cellepelleten, og ble derfor ikke benyttet i det videre arbeidet.

Oppløsning av cellepellet i lut

24 timers inkubasjon av cellepelleten i 1 M NaOH førte til en fullstendig oppløsning av pelleten. Det viste seg derimot at luten hadde en svært forstyrrende effekt på Bradford proteinassay, denne effekten var ikke konstant eller økte proporsjonalt med proteinmengden i cellepelleten. Oppløsning i lut ble ikke ansett som en egnet metode for å løse cellepelleten før Bradford proteinassay.

Lyseringsbufferer

Lysisbufferene Reporter lysisbuffer og RIPA lysisbuffer kombinert med ultralydbad virket effektivt i å løse opp cellepelleten. Detergentene i lysisbufferene virket derimot svært forstyrrende på Bradford proteinassay og kombinasjonen av Bradford proteinassay og lysisbuffer med detergent var derfor ikke gunstig.

3.5.3.2 BCA proteinassay

Fordi lysisbufferene ikke var kompatible med Bradford proteinassay ble derfor et annet proteinassay, ikke sensitiv for detergenter testet ut.

Sammenligning av Reporter lysisbuffer og RIPA lysisbuffer kombinert med BCA proteinassay

Effektiviteten til Reporter lysisbuffer og RIPA lysisbuffer var tilnærmet lik. Det var heller ingen merkbar effekt av å tilsette proteaseinhibitor til lysisbufferen. Dette kommer mest trolig av at de fleste proteaser allerede var denaturert under ekstraksjon med kokende etanol.

Effekten av Reporter lysisbuffer på BCA proteinassay

Reporter lysisbuffer kombinert med «Working reagent» hadde en litt høyere absorbans enn bare «Working reagent», dette tydet på at Reporter lysisbuffer hadde en mild «forstyrrende» effekt på BCA proteinassay. Denne effekten ble unngått ved å fortynne proteinstandarden i Reporter lysisbuffer på samme måte som cellelysatet. Standardkurven med BSA ble lineær. Dette tyder på at den forstyrrende effekten av Reporter lysisbuffer på BCA proteinassay var lineær og uproblematisk dersom standard og prøver behandles likt.

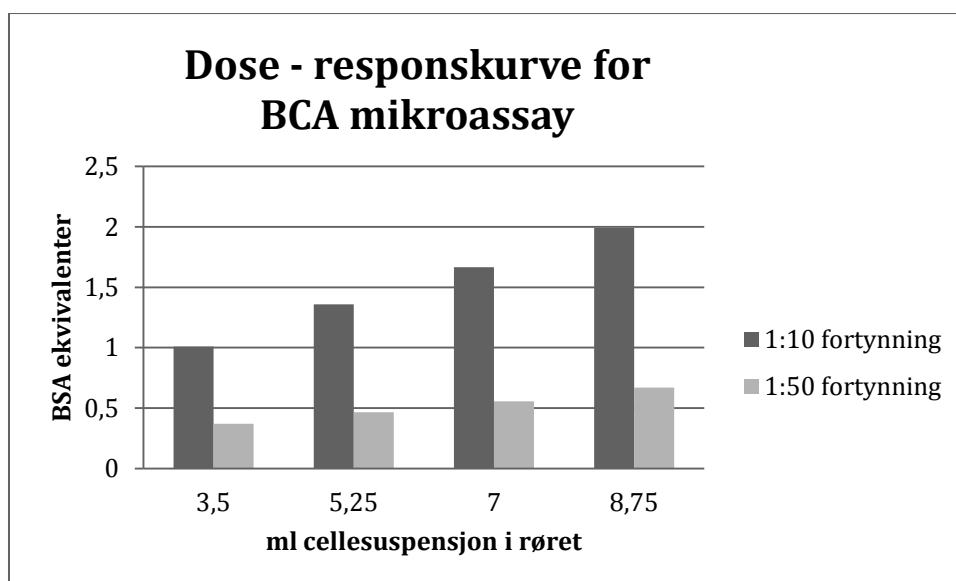
BCA proteinassay uten sentrifugering

Ifølge den tilhørende protokollen til Reporter lysisbuffer burde kultiveringsmediumet fra cellene fjernes og cellene vaskes to ganger med kald PBS (Promega Corporation

2012). Dette ble gjort i løpet av ekstraksjonen. Etter lysering og vorteksing burde lysatet også sentrifugeres i 15 sekunder ved 12000*g for å separere proteiner og andre cellekomponenter (Promega Corporation 2012). Når dette ble gjort ble de detekterte proteinkonsentrasjonene nesten så lav som blankprøven. Den beste løsningen ble derfor å ikke sentrifugere cellelysatet, men å vortekse lysatet kraftig og deretter ta ut en liten fraksjon til videre BCA proteinassay. Absorbansen som måles kan derfor ikke relateres direkte til proteinkonsentrasjon, men til en konsentrasjon av cellekomponenter og forbindelser som kan redusere Cu^{2+} til Cu^{+} . Denne metoden var ikke optimal, men likevel god nok til dette formålet, da det bare var nødvendig å ha et mål på relative forskjeller mellom petriskåler med celler.

Lineær sammenheng mellom antallet celler og BSA ekvivalenter detektert

Det ble også observert en tydelig korrelasjon mellom en visuell estimering av antall celler og BSA ekvivalenter detektert med BCA proteinassay. De petriskålene som har sett ut til å inneholde litt færre celler enn andre petriskålene har vist en tilsvarende lavere absorbans i BCA proteinassay enn petriskålen med visuelt estimert høyere celleantall. Denne trenden ble bekreftet i et dose-respons forsøk med BCA proteinassay. Resultatet fra dose-respons forsøket er vist i figur 3.5.2.



Figur 3.5.2: Resultat fra dose-respons forsøk med BCA proteinassay hvor cellepelletter i fire størrelser ble løst i Reporter lysisbuffer og deretter fortynnet igjen i Reporter lysisbuffer 1:10 og 1:50.

Resultatet fra dose-respons forsøket viste at det var en lineær sammenheng mellom størrelsen på cellepelletten (desto større cellepellet, desto flere antall celler) og antallet BSA ekvivalenter detektert i BCA proteinassay. Sammenhengen var lineær både for de 1:10 fortynnede og de 1:50 fortynnede prøvene. Dette forsøket viste at BCA proteinassay kombinert med Reporter lysisbuffer reflekterer forskjeller i antallet celler i cellepelletten.

Ikke-lineært forhold mellom BSA ekvivalenter detektert og fortynning av cellepellett lysat

Ved oppmultiplisering for fortynning av cellepellett lysatet ble det observert at antallet BSA ekvivalenter detektert i ulike fortynninger av samme cellelysat ikke var proporsjonalt som vist i tabell 3.5.

Tabell 3.5: Gjennomsnittelig antall BSA ekvivalenter for cellepelletter fra henholdsvis 3,5, 5,25, 7,0 og 8,75 ml celleduspensjon fortynnet 1:10 og 1:50 i Reporter lysisbuffer før absorbanmåling.

Antall ml celleduspensjon	Antall BSA	Ganget opp	Antall BSA	Ganget opp
	ekvivalenter i 1:10 fortynning	til ufortynnet	ekvivalenter i 1:50 fortynning	til ufortynnet
3,5	1,010	10,1	0,371	18,5
5,25	1,358	13,6	0,467	23,3
7	1,667	16,7	0,556	27,8
8,75	1,992	19,9	0,668	33,4

Det ser altså ut til at assayet detekterer flere BSA ekvivalenter desto mer cellepelletten er fortynnet i lysisbuffer. Dette kan forklares ved at den løste cellepelletten ikke sentrifugeres før BCA proteinassay slik at ikke bare proteiner, men alle andre cellekomponenter med reduserende egenskaper kan delta i reaksjonen. BCA proteinassay er på tross av dette en tilfredsstillende normaliseringsmetode for korrigering av ulikt celleantall til dette formålet, så lenge pelletene som sammenlignes fortynnes like mye.

Sammenligning av BCA proteinassay og BSA mikroassay

Konvensjonell BCA proteinassay krever et større volum (50 µl) av prøve, noe som gjør at en kanskje må redusere antallet replikaer. Effekten av eventuelle forstyrrende komponenter reduseres fordi forholdet mellom BCA «Working reagent» og proteinprøve er 1:20. I mikroskala assayet kreves bare halvparten av volumet (25 µl), noe som gjør at en kan ha dobbelt så mange replikaer. Å jobbe med en 96 brønnplate er også mer lettvent enn mange 1,5 ml eppendorfrør og bruk av multipipette reduserer sjansen for pipetteringsfeil. I mikroassayet er derimot forholdet mellom BCA «Working reagent» og proteinprøve 8:1 og effekten av den forstyrrende komponenten vil dermed være større enn det konvensjonelle assayet.

Det ble observert at ved gjennomføring av store forsøk hvor proteinkonsentrasjonen til mange prøver skal måles samtidig, er det umulig å måle absorban til alle prøver nøyaktig i løpet av 10 minutter (som er nødvendig da fargeutviklingen fortsetter etter endt inkubasjon). Det konvensjonelle assayet er derfor mest egnet for små forsøk.

Ved bruk av BCA mikroassay bør en i størst mulig grad eliminere effekten av «forstyrrende» komponenter og deretter anta at den «forstyrrende» effekten er tilnærmet lik i prøver som har fått nøyaktig samme behandling.

3.6 Eksponeringsstudie med 5-Fluoruracil

For å sammenligne effekten av eksponering av cellegiften 5-Fluoruracil ble tre petriskåler med celler eksponert i 5 minutter med 5-Fu, tre petriskåler eksponert i 2 timer med 5-Fu og tre petriskåler ble eksponert i 8 timer med 5-Fu. I tillegg ble tre kontrollpetriskåler analysert for hver «eksponeringstid».

Log₂ plot av gjennomsnittlig metabolittkonsentrasjon i kontroll delt på gjennomsnittlig metabolittkonsentrasjon i 5-Fu eksponerte celler viste at det ikke var en stor forskjell i konsentrasjon av aminosyrer og organiske syrer mellom kontrollceller og 5-Fu eksponerte celler for de tre eksponeringstidene, men at det var mindre metabolittspesifikke variasjoner. De tre log₂ plottene er lagt ved i vedlegg F.

3.6.1. 5 minutters eksponering med 5 – Fluoruracil

I celleekstrakter fra celler eksponert fem minutter med 5 – Fluoruracil ble det detektert en høyere gjennomsnittskonsentrasjon av Alpha – Ketoglutarate, Citrate og Glutamate, men også en litt høyere konsentrasjon av metabolitter som 4 – Methylvalerate, Pyruvate, 3 – Methyl-oxovalerate, Fumarate, Succinate, Citraconate/Itaconate, Phenylacetate og Salicylate. Hovedandelen av metabolittene hadde gjennomgående litt høyere konsentrasjon i kontrollcellene enn i de eksponerte cellene.

3.6.2 2 timers eksponering med 5 – Fluoruracil

I celleekstrakter ekstrahert fra celler eksponert 2 timer med 5 – Fluoruracil ble det detektert en lavere gjennomsnittskonsentrasjon av Salicylate, men også litt lavere konsentrasjon av 4 – Methylvalerate, 3 – Methyl – oxovalerate, Citraconate/Itaconate, Alpha – Ketoglutarate, Beta – Hydroxypyruvate og Allatoin enn i kontrollcellene.

Hovedandelen av metabolittene hadde gjennomgående litt høyere konsentrasjon i kontrollcellene enn i de eksponerte cellene.

3.6.3 8 timers eksponering med 5 – Fluoruracil

I celleekstrakter ekstrahert fra celler eksponert 8 timer med 5 – Fluoruracil hadde en gjennomgående lavere konsentrasjon av de fleste detekterte metabolitter sammenlignet med kontrollcellene, med unntak av Glyoxylate, L – Homoserine og Oxaloacetic acid som hadde litt høyere konsentrasjon i eksponerte celler.

Totalt sett er forskjellen i eksponerte celler og kontrollceller relativt liten, ingen metabolitter har dobbelt så høy konsentrasjon i eksponerte celler enn kontrollceller eller omvendt i gjennomsnitt ved noen av de tre eksponeringstidene.

3.7 Generelt

3.7.1 Mangel på celletelleprøver

Selv om det nøyaktige antallet celler som ble platet ut i hver petriskål er ukjent i flere av de gjennomførte forsøkene, ble det likevel under hele arbeidet med utviklingen av ekstraksjon- og analyseprotokollen fokusert på å gjøre petriskålene med celler likest mulig. Når enkelte plater avvirket i form av økt eller redusert antall celler i forhold til andre petriskåler med celler, ble disse petriskålene etter beste evne likt fordelt mellom behandlingene som skulle sammenlignes.

3.7.2 Normalisering mot intern standard

Normalisering av metabolittkonsentrasjoner mot en intern standard kan ha svært stor påvirkning på datasettet. Det er omdiskutert hvorvidt det er korrekt å normalisere alle metabolittkonsentrasjoner i en prøve mot en intern standard og optimalt bør hver metabolitt normaliseres mot en intern standard. Dette er derimot en langt mer omfattende prosess. På bakgrunn av dette har hvert datasett blitt studert før og etter normalisering og hvert datasett har blitt evaluert individuelt. Hvorvidt normalisering mot en eller et fåtall intern standarder er en tilfredsstillende metode bør undersøkes nærmere.

3.7.3 Svakheter ved den statistiske analysen

Enkelte av antagelsene for å gjennomføre toveis ANOVA har til tider blitt brutt i analysearbeidet. Antagelsen om homogenitet er den antagelsen som oftest har vært brutt. En liten utvalgsstørrelse (ofte bare tre paraleller) gjør det vanskeligere å oppnå signifikante resultater. Disse elementene ble tatt med i helhetsvurdering av hvert datasett og den statistiske analysen ble i hovedsak brukt som bekreftelse på trender observert under manuell integrering av arealet under de kromatografiske toppene, under PCA analyse, HCA analyse og heat map visualisering. Da toveis ANOVA sammenligner gjennomsnittsverdiene til gruppene som analyseres vil testen til en viss grad påvirkes av store verdier (metabolitter med høy konsentrasjon/detektorrespons), alle disse elementene har blitt tatt hensyn til i helhetsvurderingen av hvert enkelt resultat.

4 KONKLUSJON

I den optimaliserte protokollen for opparbeidelse av metabolittekstrakter fra adherente humane celler, fjernes kultiveringsmediet før cellene vaskes to ganger med kaldt (0 °C) fosfatbufret saltvann (PBS). Cellene vaskes ikke med kaldt vann dersom dette kan unngås, og de intracellulære metabolittene ekstraheres med kokende etanol. Lipidfraksjonen i metabolittekstraktet fjernes ikke ved hjelp av væske-væske ekstraksjon med kloroform eller heksan da disse metodene ikke ble ansett som egnede. Løsemiddelet i metabolittekstraktet fjernes ved hjelp av frysetørking da metabolittekstraktet holdes nedkjølt under hele prosessen og sjansen for tap av varmelabile metabolitter reduseres. Det tørkede metabolittekstraktet derivatiseres ved hjelp av metylkloroformat derivatisering og metabolittinnholdet kvantifiseres ved hjelp av GC-MS/MS analyse kombinert med andre analytiske plattformer. Dataene normaliseres så mot antall BSA ekvivalenter detektert med BCA mikroassay før videre dataanalyse.

Eksposering med 5 µM 5-Fluoruracil i 5 minutter, 2 timer og 8 timer på HeLa S3 celler førte ikke til store endringer i konsentrasjon av aminosyrer og organiske syrer.

Bibliografi

- Agilent Technologies. (2008a). *Agilent ChemStation: Understanding Your Chemstation*. Waldbronn: Agilent Technologies, 270 s.
- Agilent Technologies. (2008b). *Agilent G1676AA Agilent Fihn GC/MS Metabolomics RTL Library, Users Guide*. Manual Part Number G1676-90000: Agilent Technologies. 166 s.
- Agilent Technologies. (2012). *Agilent J&W GC Column Selection Guide: Speed your selection with this one-stop resource* [Online]: Agilent Technologies. Tilgjengelig fra: http://www.chem.agilent.com/Library/catalogs/Public/5990-9867EN_GC_CSG.pdf (lest 09.05.2012.).
- ATCC. (2012a). *Product Description: CCL-2.2™* [Online]. HeLa S3: American Type Culture Collection. Tilgjengelig fra: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-2.2&Template=cellBiology> (lest 21.04.2012).
- ATCC. (2012b). *Product Description: HTB-4™* [Online]. T24: American Type Culture Collection. Tilgjengelig fra: <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-4&Template=cellBiology> (lest 21.04.2012).
- Baker, M. (2011). Metabolomics: from small molecules to big ideas. *Nat Meth*, 8 (2): 117-121.
- Bubeník, J., Barešová, M., Viklický, V., Jakoubková, J., Sainerová, H. & Donner, J. (1973). Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *International Journal of Cancer*, 11 (3): 765-773.
- Buchholz, A., Hurlebaus, J., Wandrey, C. & Takors, R. (2002). Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomolecular Engineering*, 19 (1): 5-15.
- Büscher, J. r. M., Czernik, D., Ewald, J. C., Sauer, U. & Zamboni, N. (2009). Cross-Platform Comparison of Methods for Quantitative Metabolomics of Primary Metabolism. *Analytical Chemistry*, 81 (6): 2135-2143.
- Canelas, A. B., ten Pierick, A., Ras, C., Seifar, R. M., van Dam, J. C., van Gulik, W. M. & Heijnen, J. J. (2009). Quantitative Evaluation of Intracellular Metabolite Extraction Techniques for Yeast Metabolomics. *Analytical Chemistry*, 81 (17): 7379-7389.
- Čuperlović-Culf, M., Barnett, D. A., Culf, A. S. & Chute, I. (2010). Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discovery Today*, 15 (15-16): 610-621.
- Danielsson, A., Moritz, T., Mulder, H. & Spégel, P. (2012). Development of a gas chromatography/mass spectrometry based metabolomics protocol by means of statistical experimental design. *Metabolomics*, 8 (1): 50-63.
- Danielsson, A. P. H., Moritz, T., Mulder, H. & Spégel, P. (2010). Development and optimization of a metabolomic method for analysis of adherent cell cultures. *Analytical Biochemistry*, 404 (1): 30-39.
- De la Luz-Hdez, K. (2012). *Metabolomics and Mammalian Cell Culture*. Roessner, U. (red.). Metabolomics, 1: InTech. 364 s.
- Desbrosses, G., Steinhauser, D., Kopka, J. & Udvardi, M. (2005). Metabolome analysis using GC-MS. I: Márquez, A. J. (red.) *Lotus japonicus Handbook*, s. 384. Dordrecht: Springer.
- Dettmer, K., Aronov, P. A. & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26 (1): 51-78.
- Dettmer, K., Nürnberger, N., Kaspar, H., Gruber, M. A., Almstetter, M. F. & Oefner, P. J. (2011). Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399 (3): 1127-1139.
- DeVita, V. T., Hellman, S. & Rosenberg, S. A. (red.). (2011). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 9. utg. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2638 s.
- Dietmair, S., Timmins, N. E., Gray, P. P., Nielsen, L. K. & Krömer, J. O. (2010). Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol. *Analytical Biochemistry*, 404 (2): 155-164.

- Dunn, W. B., Bailey, N. J. C. & Johnson, H. E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, 130 (5): 606-625.
- Dunn, W. B. & Ellis, D. I. (2005). Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, 24 (4): 285-294.
- Duportet, X., Aggio, R. B. M., Carneiro, S. & Villas-Bôas, S. G. (2011). The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics*: 1-12.
- Faijes, M., Mars, A. E. & Smid, E. J. (2007). Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*. *Microbial cell factories*, 6 (1): 27.
- Freshney, R. I. (red.). (2010). *Culture of animal cells*. 6. utg. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. 732 s.
- Gey, G. O., Coffman, W. & Kubicek, M. T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, 12 (4): 264-265.
- Gonzalez, B., François, J. & Renaud, M. (1997). A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast*, 13 (14): 1347-1355.
- Gray, C. D. & Kinnear, P. R. (2012). *IBM SPSS STATISTICS 19: MADE SIMPLE*. Hove: Psychology Press. 671 s.
- Greibrokk, T., Lundanes, E. & Rasmussen, K. E. (red.). (2005). *Kromatografi. Separasjon og deteksjon*. 3. utg. Oslo: Universitetsforlaget. 300 s.
- Griffin, J. L. (2006). The Cinderella story of metabolic profiling: does metabolomics get to go to the functional genomics ball? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361 (1465): 147-161.
- Griffin, J. L. & Kauppinen, R. A. (2006). Tumour Metabolomics in Animal Models of Human Cancer. *Journal of Proteome Research*, 6 (2): 498-505.
- Griffin, J. L. & Shockcor, J. P. (2004). Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 4 (7): 551-561.
- Grob, M. K., O'Brien, K., Chu, J. J. & Chen, D. D. Y. (2003). Optimization of cellular nucleotide extraction and sample preparation for nucleotide pool analyses using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 788 (1): 103-111.
- Gross, J. (red.). (2011). *Mass Spectrometry: A textbook*. 2 utg. Berlin: Springer. 753 s.
- Hajjaj, H., Blanc, P. J., Goma, G. & François, J. (1998). Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 164 (1): 195-200.
- Henderson, W. & McIndoe, J. S. (2005). *MASS SPECTROMETRY of Inorganic and Organometallic Compounds: Tools - Techniques - Tips*. Chichester: John Wiley & Sons. 271 s.
- Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G. A. & Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate: A Metabolic Key Player in Cancer. *Cancer Research*, 71 (22): 6921-6925.
- Hoffmann, E. & Stroobant, V. (red.). (2007). *Mass Spectrometry*. 3. utg. Chichester: John Wiley & Sons. 489 s.
- Jessome, L. L. & Volmer, D. A. (2006). Ion suppression: A major concern in mass spectrometry. *LCGC NORTH AMERICA*, 24 (5): 498-510.
- Jiye, A., Trygg, J., Gullberg, J., Johansson, A. I., Jonsson, P., Antti, H., Marklund, S. L. & Moritz, T. (2005). Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Analytical Chemistry*, 77 (24): 8086-8094.
- Kanani, H., Chrysanthopoulos, P. K. & Klapa, M. I. (2008). Standardizing GC-MS metabolomics. *Journal of Chromatography B*, 871 (2): 191-201.
- Kanani, H. H. & Klapa, M. I. (2007). Data correction strategy for metabolomics analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *Metabolic Engineering*, 9 (1): 39-51.
- Khoo, S. H. G. & Al-Rubeai, M. (2007). Metabolomics as a complementary tool in cell culture. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 47 (2): 71-84.
- Kind, T., Wohlgemuth, G., Lee, D. Y., Lu, Y., Palazoglu, M., Shahbaz, S. & Fiehn, O. (2009). FiehnLib: Mass Spectral and Retention Index Libraries for Metabolomics Based on Quadrupole and Time-of-Flight Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81 (24): 10038-10048.

- Kopka, J. (2006). Current challenges and developments in GC–MS based metabolite profiling technology. *Journal of Biotechnology*, 124 (1): 312-322.
- Lange, H. C., Eman, M., van Zuijlen, G., Visser, D., van Dam, J. C., Frank, J., de Mattos, M. J. T. & Heijnen, J. J. (2001). Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 75 (4): 406-415.
- Lavagnini, I., Magno, F., Seraglia, R. & Traldi, P. (2006). *Quantitative Applications of Mass Spectrometry*: John Wiley & Sons. 138 s.
- Lewrence, E. (red.). (2005). *Henderson's dictionary of biology*. Edinburgh: Persons education limited. 748 s.
- Lien, S. K., Kvitvang, H. F. N. & Bruheim, P. (2012). Utilization of a deuterated derivatization agent to synthesize internal standards for gas chromatography - tandem mass spectrometry quantification of silylated metabolites. *Journal of Chromatography A*, Forestående.
- Lindon, J. C., Nicholson, J. K. & Holmes, E. (red.). (2007). *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*: ELSEVIER. 561 s.
- Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E., Keun, H. C., Craig, A., Pearce, J. T., Bruce, S. J., Hardy, N., Sansone, S. A., Antti, H., et al. (2005). Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses. *Nature Biotechnology*, 23 (7): 833-8.
- Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3 (5): 330-338.
- Lorenz, M. A., Burant, C. F. & Kennedy, R. T. (2011). Reducing Time and Increasing Sensitivity in Sample Preparation for Adherent Mammalian Cell Metabolomics. *Analytical Chemistry*, 83 (9): 3406-3414.
- Mashego, M., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W. & Heijnen, J. (2007). Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters*, 29 (1): 1-16.
- Nielsen, J. & Jewett, M. C. (2007). *Metabolomics: A Powerful Tool in Systems Biology*. Berlin, Heidelberg: Springer. 284 s.
- Nomura, D. K., Long, J. Z., Niessen, S., Hoover, H. S., Ng, S.-W. & Cravatt, B. F. (2010). Monoacylglycerol Lipase Regulates a Fatty Acid Network that Promotes Cancer Pathogenesis. *Cell*, 140 (1): 49-61.
- Novagen. (2011). *BCA Protein Assay Kit User Protocole TB380* [Online]: Novagen. Tilgjengelig fra: http://www.bioon.com.cn/custom/merck/20090910/TB380_BCA%20.pdf (lest 05.04.2012.).
- Prasad Maharjan, R. & Ferenci, T. (2003). Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, 313 (1): 145-154.
- Promega Corporation. (2012). *Preparation of Adherent Cell Lysate Using Reporter Lysis 5X Buffer: REF E2971*: Promega Corporation. 1 s.
- Puck, T. T. & Marcus, P. I. (1955). A Rapid Method for Viable Cell Titration and Clone Production with Hela Cells in Tissue Culture: The Use of X-Irradiated Cells to Supply Conditioning Factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 41 (7): 432-7.
- Ritter, J. B., Genzel, Y. & Reichl, U. (2008). Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: Optimization using experimental design. *Analytical Biochemistry*, 373 (2): 349-369.
- Saeed, A. I., Bhagabati, N. K., Braisted, J. C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E. A., Li, J., Thiagarajan, M., White, J. A. & Quackenbush, J. (2006). TM4 microarray software suite. *Methods in Enzymology*, 411: 134-93.
- Schaub, J., Schiesling, C., Reuss, M. & Dauner, M. (2006). Integrated Sampling Procedure for Metabolome Analysis. *Biotechnology Progress*, 22 (5): 1434-1442.

- Scientific Instrument Services Inc. (Ukjent år). *NIST '08: NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library - Version 2008* [Online]. Ringoes: Scientific Instrument Services Inc., Tilgjengelig fra: <http://www.sisweb.com/software/ms/nist08brochure.pdf> (lest 02.06.2012.).
- Sellick, C. A., Hansen, R., Maqsood, A. R., Dunn, W. B., Stephens, G. M., Goodacre, R. & Dickson, A. J. (2008). Effective Quenching Processes for Physiologically Valid Metabolite Profiling of Suspension Cultured Mammalian Cells. *Analytical Chemistry*, 81 (1): 174-183.
- Sheikh, K. D., Khanna, S., Byers, S. W., Fornace Jr, A. & Cheema, A. K. (2011). Small molecule metabolite extraction strategy for improving LC/MS detection of cancer cell metabolome. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 22 (1): 1.
- Sigma-Aldrich. (1997). *Bulletin 909: Guide to Derivatization Reagents for GC* [Online]: Sigma-Aldrich. Tilgjengelig fra: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/literature/guides.html> (lest 07.05.2012.).
- Silverstein, R., Webster, F. X. & Kiemle, D. J. (red.). (2005). *Spectrometric identification of organic compounds*. 7. utg. Hoboken: John Wiley & Sons. 502 s.
- Skloot, R. (2010). *The Immortal life of Henrietta Lacks*. New York: Crown Publishers. 431 s.
- Sparkman, O. D., Penton, Z. E. & Kitson, F. G. (red.). (2011). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. 2. utg. Amsterdam: ELSEVIER. 609 s.
- Spratlin, J. L., Serkova, N. J. & Eckhardt, S. G. (2009). Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: A Review. *Clinical Cancer Research*, 15 (2): 431-440.
- Stein, S. E. (1999). An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10 (8): 770-781.
- Teng, Q., Huang, W., Collette, T., Ekman, D. & Tan, C. (2009). A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics. *Metabolomics*, 5 (2): 199-208.
- Uehara, T., Yokoi, A., Aoshima, K., Tanaka, S., Kadowaki, T., Tanaka, M. & Oda, Y. (2009). Quantitative phosphorus metabolomics using nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry and culture-derived comprehensive global internal standards. *Analytical Chemistry*, 81 (10): 3836-3842.
- Vander Heiden, H. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324: 1029-1033.
- Villas-Bôas, S. G., Delicado, D. G., Åkesson, M. & Nielsen, J. (2003). Simultaneous analysis of amino and nonamino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 322 (1): 134-138.
- Villas-Bôas, S. G., Højer-Pedersen, J., Åkesson, M., Smedsgaard, J. & Nielsen, J. (2005a). Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast*, 22 (14): 1155-1169.
- Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J. & Nielsen, J. (2005b). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 24 (5): 613-46.
- Villas-Bôas, S. G., Smart, K. F., Sivakumaran, S. & Lane, G. A. (2011). Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS? *Metabolites*, 1 (1): 3-20.
- Winder, C. L., Dunn, W. B., Schuler, S., Broadhurst, D., Jarvis, R., Stephens, G. M. & Goodacre, R. (2008). Global metabolic profiling of Escherichia coli cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. *Analytical Chemistry*, 80 (8): 2939-2948.
- Wojtowicz, P., Zrostlíková, J., Šťastná, V., Dostálová, E., Žídková, L., Bruheim, P. & Adam, T. (2012). *Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry in Human Metabolomics*. Salih, B. & Çelikbiçak, Ö. (red.). Gas Chromatography - Biochemicals, Narcotics and Essential Oils, 2: InTech. 236 s.

VEDLEGGSLISTE

VEDLEGG A: CELLETELLING

VEDLEGG B: STANDARDMIKSER

VEDLEGG C: GC-MS OG GC-MS/MS PARAMETRE

VEDLEGG D: PROTEINASSAY

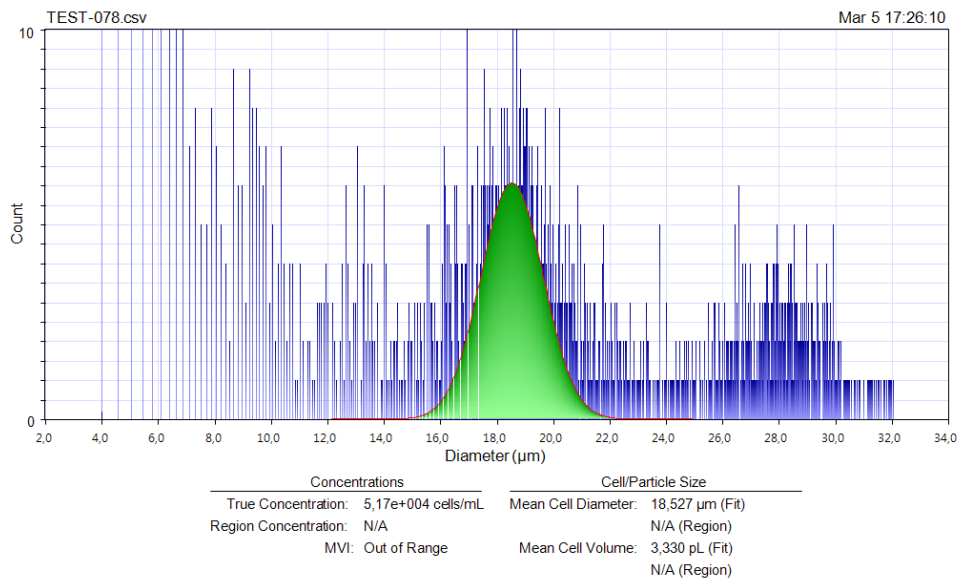
VEDLEGG E: STATISTISKE TESTER

VEDLEGG F: LOG₂ PLOT

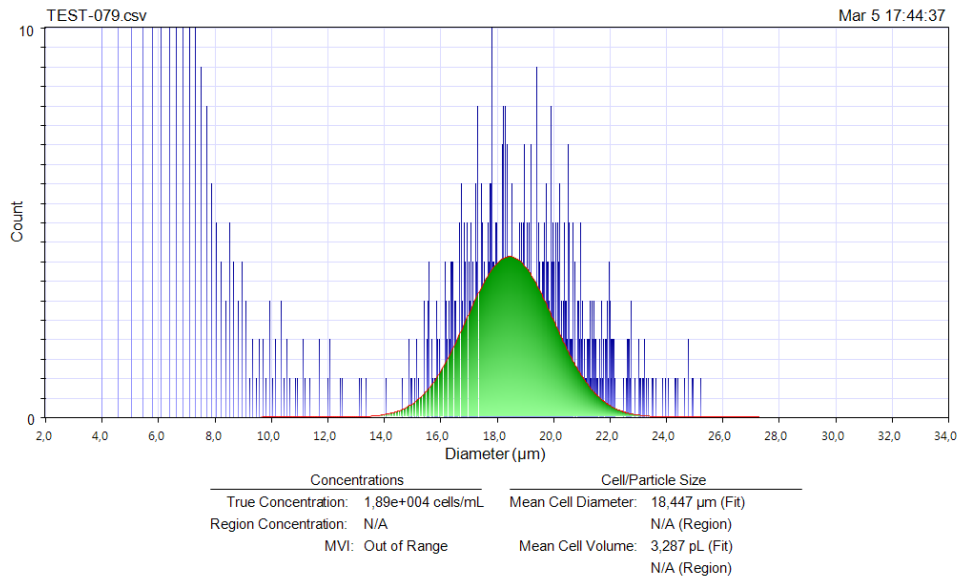
VEDLEGG A: CELLETELLING

Telleprøve fra T24 celler platet ut til lipidfjerningsforsøk

Telleprøven ble fortynnet 1:4 i friskt kultiveringsmedium før telling med ORFLO Moxi^z celledeller.



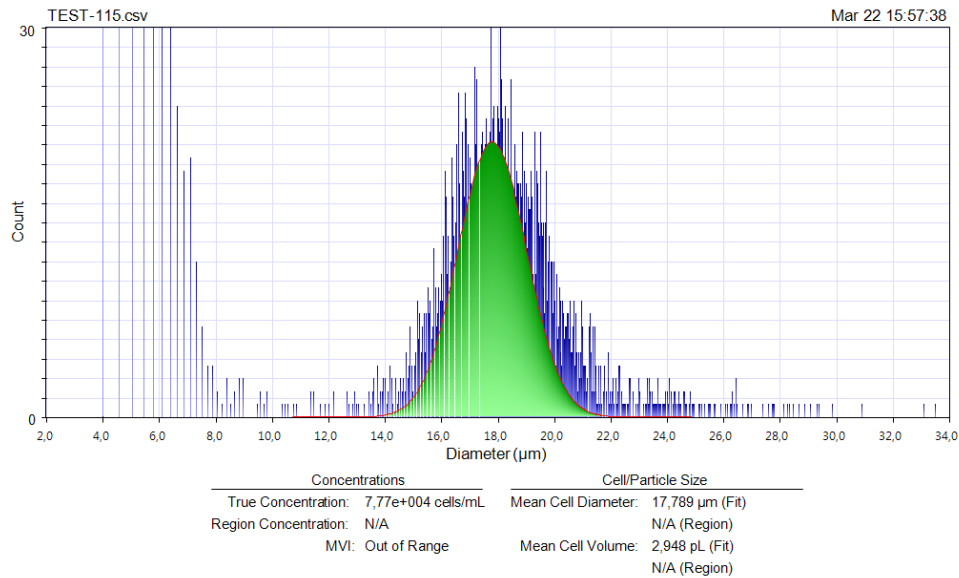
Figur A1: Petriskål Nr. 5.



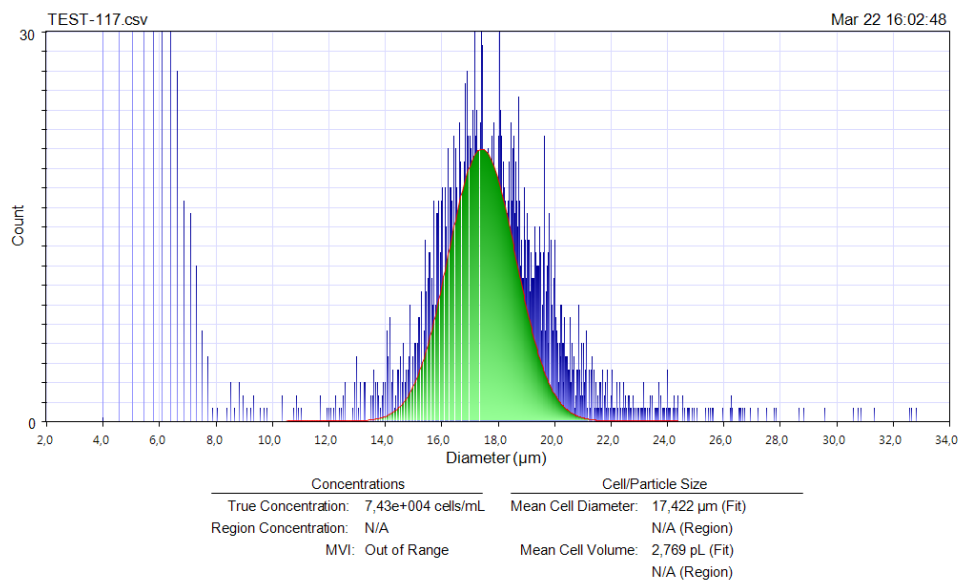
Figur A2: Petriskål Nr. 14.

Telleprøve fra HeLa S3 celler platet ut til 5-FU eksponeringsstudie

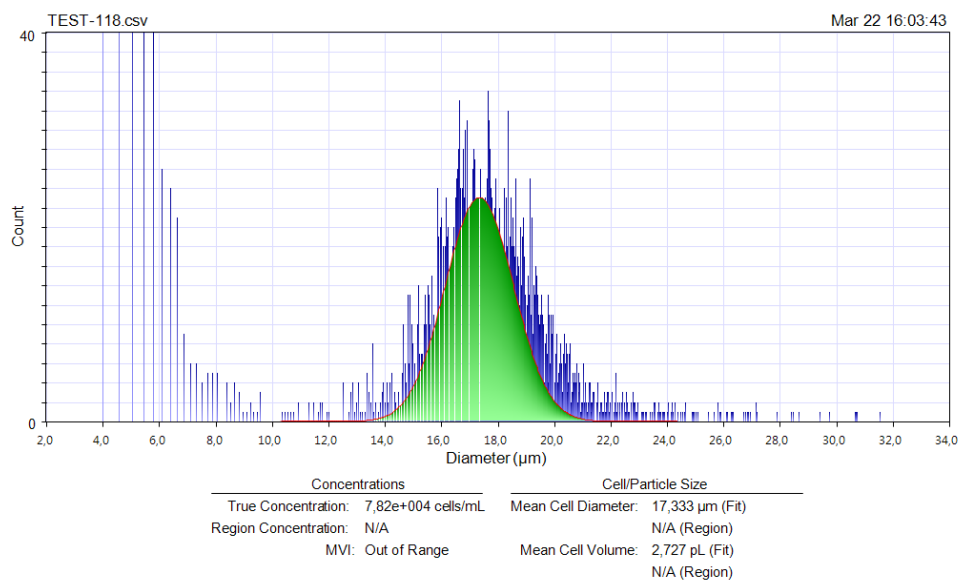
Telleprøven ble fortynnet 1:4 i friskt kultiveringsmedium før celling med ORFLO Moxi^z cellteller.



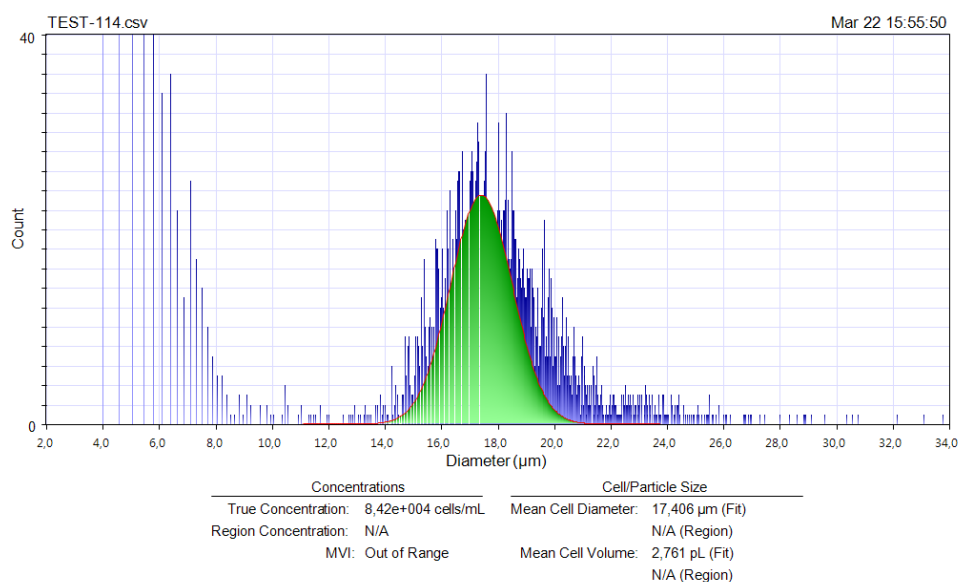
Figur A3: Petriskål Nr. 5.



Figur A4: Petriskål Nr. 10.



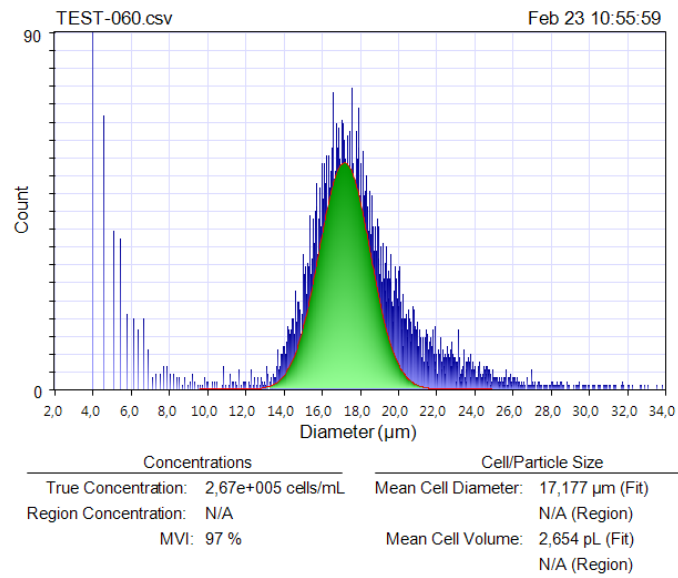
Figur A5: Petriskål Nr. 15.



Figur A6: Petriskål Nr. 20.

Telleprøve fra celleduspensjon med HeLa S3 celler før dose-respons

Telleprøven ble fortynnet 1:4 i friskt kultiveringsmedium før telling med ORFLO Moxi^z celledetektor.



Figur A7: Celleduspensjon før dose-respons.

VEDLEGG B: STANDARDMIKSER

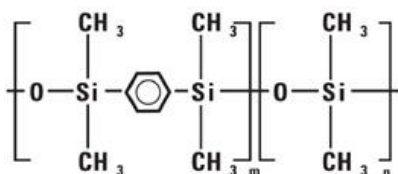
Preparering av standardmikser for metylklorformat derivatisering til GC-MS SQ analyse

Blandet 1 ml av en 10 mM løsning av alle metabolittstandardene vist i tabell B2, til en total konsentrasjon av hver forbindelse på 0,5 mM.

Tabell B1: Metabolittstandarder i standardmikser til metylklorformat derivatisering til GC-MS SQ med «target ion» og kromatografisk retensjonstid.

Metabolittstd.	Target ion	Rt ¹⁵ (min.)
Fumarate-1	113	8,320
Fumarate-2	113	8,364
Succinate	55	8,498
d3-Alanine	105	10,042
Alanine	102	10,075
Valine	130	12,086
a-Ketoglutarate	115	12,097
Threonine	115	13,564
Proline	128	13,941
Aspartate	160	14,963
Citrate	143	15,019
d5-Glutamate	179	16,519
Glutamate	114	16,585
BMAA ¹⁶	102	17,508
Phenylalanine	162	18,262
Cadaverine	88	19,285
Ornithine	128	20,485
Lysine	142	21,585
Histidine	210	22,174
Tyrosine	121	23,250
Tryptophan	130	25,062

Stasjonærfase DB-5ms



Figur B1: Strukturen til DB-5ms (Agilent Technologies 2012).

¹⁵ Retensjonstid.

¹⁶ β -Metylamino- L-Alanin.

Preparering av standardmiks for metylklorformat derivatisering til GC-MS QhQ analyse

100 mM løsning av hver av forbindelsene i tabell x ble løst ifølge lot. spesifikke beskrivelser og 100 µM av alle disse løsningene ble blandet i en vial til en total konsentrasjon på 1,408 mM.

Tabell B2: Metabolittstandarder i standardmiksløsning til GC-MS QhQ analyse. Metabolittnavn, kromatografisk retensjonstid, MRM – transition og optimalisert kollisjonsenergi for hver forbindelse.

Metabolittstandard	MRM-transition			
	Retensjonstid (min.)	Precursor ion scan (m/z)	Product ion (m/z)	Kollisjonsenergi (eV)
4-Methylvalerate	6,438	131,0	43,0	20
Malonic acid	6,769	132,9	68,8	20
Pyruvate	6,967	117,0	56,8	10
(+)-3-Methyl-2-oxovalerate	7,220	126,9	67,0	15
Fumarate	7,740	145,0	84,8	15
d4-succinateHVL	7,782	119,0	57,8	15
Lactate/Methylglyox ¹⁷	7,803	131,0	30,8	15
Succinate	7,813	115,0	54,8	15
Citraconate/Itaconat ¹⁸	8,369	126,9	41,0	20
Benzoate	8,491	136,9	77,0	25
Citramalate	8,584	116,9	43,0	15
Glyoxylate	8,687	103,2	75,0	5
β-3-hydroxybutyrate	8,696	100,9	41,0	25
d3-AlanineHVL	8,711	165,0	60,8	20
Glycine	8,720	116,0	43,8	15
Alanine	8,727	162,0	101,9	10
O-Acetyl-L-Serine	8,735	101,9	42,0	10
Nicotinate	8,875	137,9	77,9	25
Phenylacetate	9,185	151,0	91,0	10
Salicylate	9,378	153,0	121,0	15
2-Aminobutyrate	9,422	115,9	57,1	15
m-Toluate	9,460	151,1	91,0	15
Beta-Alanine	9,495	129,9	44,0	15
OH-Glutarate	9,659	145,3	98,7	14
Adipate	9,679	143,0	73,0	15
d8-Valine	9,777	138,0	61,9	15
Valine	9,825	130,0	70,9	20
Alfa-Ketoglutarat	9,848	175,0	55,0	15
2-Isopropylmalate	9,943	144,9	43,0	25
beta-hydroxypyruvate	10,049	174,9	74,9	10
alpha-ketoadipate	10,363	157,0	68,9	15
Leucine	10,466	144,0	43,1	15
Isoleucine1	10,497	144,0	68,9	25

¹⁷ Danner det samme derivatiseringsproduktet.

¹⁸ Danner det samme derivatiseringsproduktet.

gamma-aminobutyrate	10,544	176,0	69,0	25
Isoleucine2	10,548	144,0	68,9	25
Threonine	10,621	160,0	55,8	15
Malate	10,703	145,0	0,8	21/8
L-Homoserine	10,718	131,9	30,0	15
Proline	10,836	188,0	83,8	25
OAA (Oxaloacetate)	10,847	143,0	68,8	25
Aspartate	11,345	160,0	74,8	25
Citrate	11,381	175,0	100,8	15
5-aminovalerate	11,412	158,0	55,0	20
Threo-beta-hydroxyaspartate	11,583	234,0	81,9	25/20
Serine	11,819	160,0	99,7	15
Anthranilate	11,827	177,9	89,9	25
Allantoin	11,922	145,9	41,9	10
N-Acetyl-L-Glutamate	12,169	218,1	84,0	10
d5-GlutamateHVL	12,177	207,0	102,9	15
Glutamate	12,204	202,0	97,8	30
Hydroxyproline	12,323	144,0	81,8	10
Methionine	12,342	162,0	60,8	10
Beta-Methylamino-L-alanine	12,679	249,0	98,0	25
2-oxobutyrate	12,809	259,0	67,0	30
Cysteine1	12,917	192,0	88,7	15
Isocitrate	13,003	217,0	75,0	15
Putrescine	13,006	173,0	55,0	25
Hippurate	13,069	194,0	104,9	10
Phenylalanine	13,126	178,0	127,9	20
Phenylpyruvate	13,139	204,9	115,0	15
2,4-Diaminobutyrate	13,465	217,0	70,0	25
4-imidazoleacrylate	13,503	211,0	107,0	20
Cadaverine	13,642	187,1	69,0	25
4-Aminobenzoate	13,742	210,0	90,8	20
Histamine	13,963	228,0	109,1	25
p-Coumarate	14,092	237,0	132,9	20
Ornithine	14,256	231,0	128,0	10
N-GlycylL-Proline	14,708	213,0	70,0	25
Lysine	14,833	245,0	142,0	10
Ferulate	15,104	267,0	176,0	20
Histidine	15,154	286,0	150,0	25
Tyrosine	15,736	252,0	158,0	20
2,6-diaminopimelate	15,844	200,0	139,9	10
Tryptophane	16,713	245,0	185,0	15
Cystein2	17,543	162,1	73,9	25

VEDLEGG C: GC-MS OG GC-MS/MS PARAMETRE

GC-MS Singel-kvadrupol MCF parametere

=====

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GC7890-MS5975

=====

Method name: SKLMCFRTL#2_mod.m

Control Information6

Sample Inlet: GC

Injection Source: CTC PAL ALS

Mass Spectrometer: Enabled

=====

CTCPAL METHOD

=====

Injection Volume: 2.00 ul

Syringe Size: 10ul

Cycle File: GC-Inj

CYCLE DETAILS

Air Volume (µl):	0
Pre Clean with Solvent 1 (MeOH):	5
Pre Clean with Solvent 2 (Isopropanol):	5
Pre Clean with Sample (The sample to be analyzed):	2
%Fill for Wash (%):	70
Sample Fill (µl):	5
Filling Speed (µl/s):	2
Filling Strokes:	6
Inject to:	GC Inj1
Injection Speed (µl/s):	50
Pre Inject Delay (ms):	500
Post Inject Delay (ms):	500
Post Clean with Solvent 1 (MeOH):	5
Post Clean with Solvent 2 (Isopropanol):	5

=====

OVEN

=====

Equilibration Time 1 min
Oven Program
45 degrees C for 2 min
then 10 °C/min to 300 degrees C for 7.5 min
Post Run Temperature 70 degrees C

=====
Front Injector
=====

Front Inlet SS

Heater On 290 °C
Pressure On 0.77957 bar
Total Flow On 104.39 mL/min
Septum Purge Flow On 3 mL/min
Mode Pulsed Splitless
Gas Saver On 20 mL/min After 5 min
Split Ratio 50 :1
Split Flow 69.486 mL/min
Injection Pulse Pressure 1.7237 bar Until 1.58 min

=====
Thermal Aux 2(MSD Transfer Line)
=====

Heater On
Temperature Program
 300 degrees C for 35 min

Column #1
J&W 122-5532G: 325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm
DB-5ms: 1078.48374
In: Front SS Inlet He
Out: Vacuum

=====
MS ACQUISITION PARAMETERS
=====

Acquisition Mode: Scan

MS Information

Solvent Delay: 6.00 min
Resulting EM Voltage: 1388.2

[Scan Parameters]

Low Mass: 50.0
High Mass: 550.0
Threshold: 250
MS Source: 230 C maximum 250 °C
MS Quad: 150 C maximum 200 °C

GC-MS Singel-kvadrupol TMS parametere

=====

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GC7890-MS5975

=====

Method name: SKLFiehn.M

Control Information

Sample Inlet: GC

Injection Source: CTC PAL ALS

Mass Spectrometer: Enabled

=====

CTCPAL METHOD

=====

Injection Volume: 1.00 ul

Syringe Size: 10ul

Cycle File: GC-Inj

CYCLE DETAIL

Air Volume (µl):	0
Pre Clean with Solvent 1 (MeOH):	4
Pre Clean with Solvent 2 (Isopropanol):	0
Pre Clean with Sample (The sample to be analyzed):	2
%Fill for Wash (%):	70
Sample Fill (µl):	5
Filling Speed (µl/s):	2
Filling Strokes:	3
Inject to:	GC Inj1
Injection Speed (µl/s):	50
Pre Inject Delay (ms):	500
Post Inject Delay (ms):	500
Post Clean with Solvent 1 (MeOH):	8
Post Clean with Solvent 2 (Isopropanol):	0

=====

OVEN

=====

Equilibration Time 1 min

Oven Program

60 degrees C for 1 min

then 10 °C/min to 325 degrees C for 10 min

Post Run Temperature 60 degrees C

=====

Front Injector

=====
Front Inlet SS

Heater On 250 °C
Pressure On 0.4461 bar
Total Flow On 12.375 mL/min
Septum Purge Flow On 3 mL/min
Mode Split
Gas Saver On 20 mL/min After 5 min
Split Ratio 10 :1
Split Flow 8.5224 mL/min
Injection Pulse Pressure 1.7237 bar Until 1.58 min

=====
Thermal Aux 2 (MSD Transfer Line)

=====
Heater On
Temperature Program
 300 degrees C for 37.5 min

Column #1
J&W 122-5532G: 325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm
DB-5ms: 1078.48374
In: Front SS Inlet He
Out: Vacuum

=====
MS ACQUISITION PARAMETERS

=====
Acquisition Mode : Scan

MS Information

Solvent Delay: 5.90 min
Resulting EM Voltage: 1247.1

[Scan Parameters]

Low Mass: 50.0
High Mass: 600.0
Threshold: 150
Plot 2 low mass: 271.8
Plot 2 high mass: 272.1
MS Source: 230 °C maximum 250 °C
MS Quad: 150 °C maximum 200 °C

GC-MS Trippel-kvadrupol MCF parametere

=====

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GC7MS 7000

=====

Method name: 20120227_HFK_MCF_PCI_MRM_quant.M

Control Information

Sample Inlet: GC

Injection Source: CTC PAL ALS

Mass Spectrometer: Enabled

=====

CTC PAL METHOD

=====

Injection Volume 1.00µl
Syringe Size 10ul
Cycle File A-GC-Inj R1

CYCLE DETAILS

Air Volume (µl)	0
Pre Clean with Solvent 1 (MeOH)	2
Pre Clean with Solvent 2 (Isopropanol)	2
Pre Clean with Sample (The sample to be analyzed)	1
Filling Speed (µl/s)	2
Filling Strokes:	1
Inject to:	GC Inj1
Injection Speed (µl/s)	50
Pre Inject Delay (ms)	500
Post Inject Delay (ms)	500
Post Clean with Solvent 1 (MeOH)	5
Post Clean with Solvent 2 (Isopropanol)	5

=====

OVEN

=====

Equilibration Time	0.5 min
Oven Program	
40 °C for 3 min	
then 20 °C/min to 320 °C for 3 min	
Run Time	20 min
5 min (Post Run)	320 °C

=====

QQQ Collision Cell EPC

=====

He Quench Gas On 2.25 mL/min
N₂ Collision Gas On 1.5 mL/min

=====
Front MM Inlet He
=====

Mode Pulsed Splitless
Heater On 290 °C
Pressure On 14.5 psi
Total Flow On 104.8 mL/min
Septum Purge Flow On 3 mL/min
Temperature Program
 290 °C for 0 min
Run Time 20 min

Gas Saver 20 mL/min After 5 min
Injection Pulse Pressure 25 psi Until 0.5 min
Purge Flow to Split Vent 100 mL/min at 1.48 min

=====
Thermal Aux 2 (MSD Transfer Line)
=====

Temperature Program
 320 °C for 0 min
Run Time 20 min

Column #1
DB-5ms: J&W 122-5532G
DB-5ms
325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm
In: Front MM Inlet He
Out: Vacuum

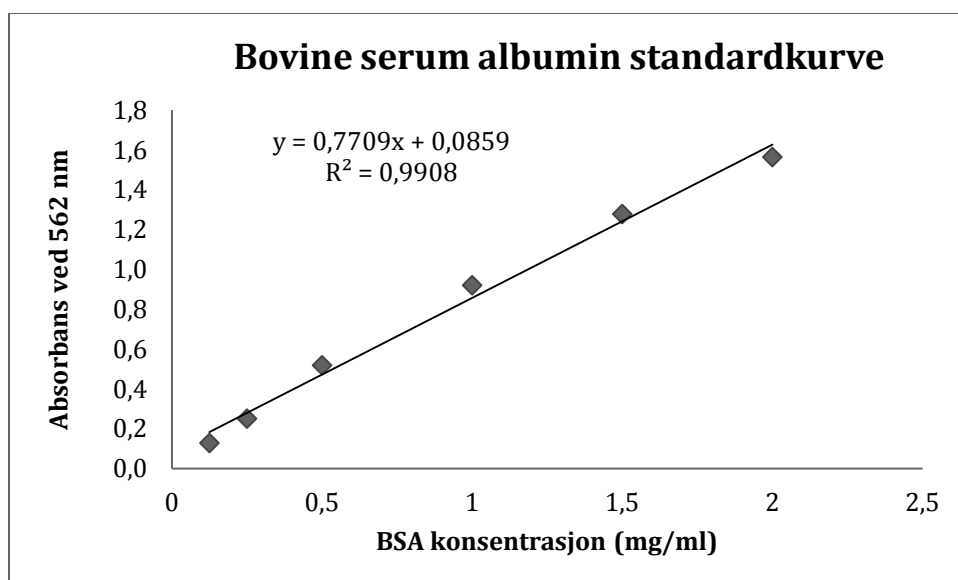
(Initial) 40 °C
Pressure 14.5 psi
Flow 1.7993 mL/min
Average Velocity 48.64 cm/sec
Holdup Time 1.028 min
Pressure Program On
 14.5 psi for 0 min
Run Time 20 min
5 min (Post Run) 14.5 psi

VEDLEGG D: PROTEIN ASSAY

RIPA-buffer

- Tris-(hydroksymetyl)aminometan 50 mM, pH 7,5 (justert med HCl)
- 150 Mm NaCl
- 0,1 % SDS
- 0,5 % Natriumdesoksyholat
- 1,0 % Triton X 100
- Roche Complete Protease inhibitor

BSA mikroassay: Vaskeløsningsforsøk

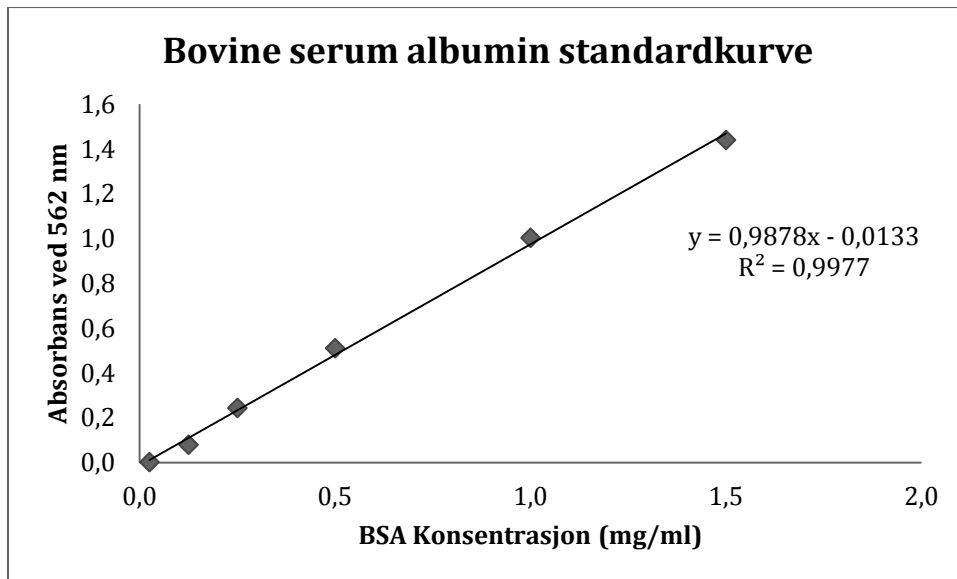


Figur D1: BSA standardkurve med BCA mikroassay.

Tabell D1: Absorbans i BCA proteinassay til cellepelleter fra vasketrinnforsøk. Beregningen av BSA ekvivalenter er basert på ligningen til tangenten til BSA standardkurven vist i figur E1.

Cellepelleter nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Absorbans ved 562 nm	0,790	0,275	1,052	0,374	0,704	0,466	0,727	0,357	0,537	0,444	0,621	0,475
	0,787	0,253	0,919	0,368	0,711	0,459	0,770	0,355	0,634	0,329	0,663	0,492
	0,771	0,268	1,174	0,400	0,759	0,481	0,778	0,365	0,636	0,444	0,739	0,505
	0,779	0,267	0,938	0,368	0,735	0,454	0,832	0,381	0,765	0,454	0,696	0,472
	0,749	0,344	1,178	0,377	0,731	0,437	0,783	0,382	0,694	0,429	0,683	0,492
Gj. Snitt. Abs.	0,775	0,281	1,052	0,377	0,728	0,460	0,778	0,368	0,653	0,420	0,680	0,487
BSA ekvivalenter	8,94	2,53	12,5	3,78	8,33	4,85	8,98	3,66	7,36	4,34	7,71	5,21

Dose-respons forsøk med konvensjonell BCA assay

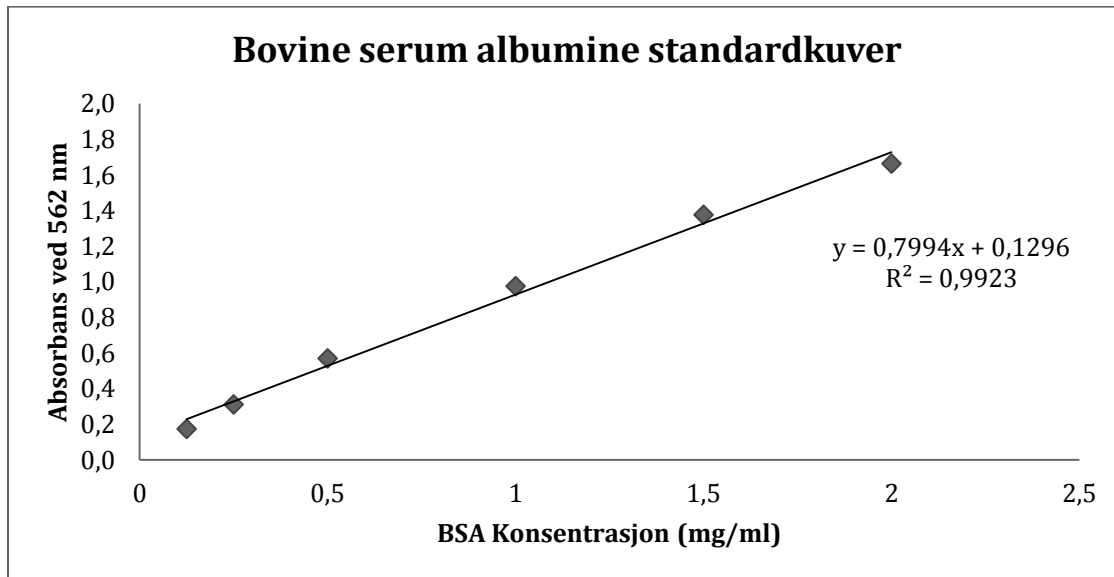


Figur D2:BSA standardkurve for BCA protein assay.

Tabell D2: Absorbansmåling til BCA proteinassay til dose-respons fra åtte cellepelletter, fortynnet 1:10 og 1:50.

Rør nr.	Antall ml cellesuspensjon i røret	Absorbans ved 562 nm, 1:10 fortynning		Gj. Snitt 1:10 fortynning	Absorbans ved 562 nm, 1:50 fortynning		Gj. Snitt 1:50 fortynning
1	8,750	2,006	1,972	1,989	0,664	0,665	0,665
5	8,750	1,925	1,913	1,919	0,619	0,640	0,630
2	7,000	1,541	1,575	1,558	0,524	0,527	0,526
6	7,000	1,731	1,686	1,709	0,541	0,553	0,547
3	5,250	1,289	1,277	1,283	0,403	0,424	0,414
7	5,250	1,376	1,371	1,374	0,481	0,483	0,482
4	3,500	0,952	0,963	0,958	0,340	0,347	0,344
8	3,500	1,055	0,967	1,011	0,368	0,356	0,362

Eksponeringsstudie med 5 - Fluoruracil



Figur D3: Bovine serum albumine standardkurve for BCA mikroassay til 5-Fluoruracil eksponeringsstudie.

Tabell D3: Antall BSA ekvivalenter detektert med BCA mikroassay i cellepelleter fra 5-Fluoruracil eksponeringsstudie.

Cellepelleter nr.	Antall BSA ekvivalenter	Behandling
1	28,3	Kontroll 8 timer
2	22,3	
3	16,5	
4	27,9	5-Fluoruracil 8 timer
5	28,4	
6	27,8	
7	26,8	Kontroll 5 min.
8	24,0	
9	21,6	
10	28,6	5-Fluoruracil 5 min.
11	25,6	
12	23,6	
13	25,9	Kontroll 2 timer
14	25,3	
15	30,0	
16	25,7	5-Fluoruracil 2 timer
17	25,4	
18	31,7	

VEDLEGG E: STATISTISKE TESTER

TMS-derivatiserte metanol- og etanolekstrakter

Tabell E1: «Estimated marginal means» estimert ved hjelp av toveis ANOVA med gjennomsnittsnittskonsentrasjon, standardfeil og konfidensintervallet for de to ekstraksjonsmidlene metanol og etanol.

Ekstraksjonsmiddel	Gj. Snitt	Std. Feil	Konfidensintervall	
			Nedre grense	Øvre grense
Metanol	6,423	0,006	6,412	6,434
Etanol	6,523	0,006	6,512	6,534

Tabell E2: «Test of between-subjects effects» mellom ekstraksjonsmiddel og metabolittkonsentrasjon med summen av kvadratavvikene, antall frihetsgrader (FG), gj. snittelig kvadratavvik, F-verdi, signifikans og feilledd.

	Type III Summen av kvadratavvikene	FG	Gj. Snitt kvadratavvik	F	Signifikans
Metabolitter	458,983	55	8,345	39,602	0,000
Ekstraksjonsmiddel	0,739	1	0,739	3,509	0,062
Metabolitter *	38,726	55	0,704	3,341	0,000
Ekstraksjonsmiddel Feilledd	106,205	504	0,211		

MCF-derivatiserte metanol- og etanolekstrakter

Tabell E3: «Estimated marginal means» estimert ved hjelp av toveis ANOVA med gjennomsnittsnittskonsentrasjon, standardfeil og konfidensintervallet for de to ekstraksjonsmidlene metanol og etanol.

Ekstraksjonsmiddel	Gj. Snitt	Std. Feil	Konfidensintervall	
			Nedre grense	Øvre grense
Metanol	6,423	0,006	6,412	6,434
Etanol	6,523	0,006	6,512	6,534

Tabell E4: «Test of between-subjects effects» mellom ekstraksjonsmiddel og metabolittkonsentrasjon med sum av kvadratavvikene, antall frihetsgrader (FG), gj. snittelig kvadratavvik, F-verdi, signifikans og feilledd.

	Type III Summen av kvadratavvikene	FG	Gj. Snitt kvadratavvik	F	Signifikans
Ekstraksjonsmiddel	0,931	1	0,931	155,575	0,000
Metabolitter	346,198	30	11,54	1929,07	0,000
Ekstraksjonsmiddel *	5,214	30	0,174	29,052	0,000
Metabolitter Feilledd	1,854	310	0,006		

Lipidfjerning: MCF-derivatiserte etanolekstrakter

Tabell E5: «Estimated marginal means» estimert ved hjelp av toveis ANOVA med gjennomsnittskonsentrasjon, standardfeil og konfidensintervallet for kloroformvask, heksanvask og ingen fettfjerning.

Fettfjerningsmetode	Gj. snitt	Std. feil	Konfidensintervall	
			Nedre grense	Øvre grense
Kloroform	4,762	0,005	4,752	4,773
Heksan	4,883	0,005	4,872	4,893
Vanlig/Ingen fettfjerning	4,877	0,005	4,866	4,888

Tabell E6: «Test of between-subjects effects» mellom fettfjerningsmetode og metabolittkonsentrasjon med sum av kvadratavvikene, antall frihetsgrader (FG), gj. snittelig kvadratavvik, F-verdi, signifikans og feilledd for kloroformvask, heksanvask og ingen fettfjerning.

	Type III Summen av kvadratavvikene	FG	Gj. snittelig kvadratavvik	F	Signifikans
Metabolitter	710,738	41	17,335	2402,217	0,000
Fettfjerning	2,330	2	1,165	161,432	0,000
Metabolitter * Fettfjerning	4,494	82	0,055	7,595	0,000
Feilledd	4,546	630	0,007		

Tabell E7: Utfall fra Tukey's HSD post hoc test ved sammenligning av gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitter i kloroformvaskede-, heksanvaskede- og celleekstrakter uten lipidfjerning, med gjennomsnittlig forskjell, standardfeil og signifikans.

Metode 1	Metode 2	Gj. Snittelig forskjell	Std. Feil	Signifikans
Kloroform	Heksan	-0,121	0,008	0,000
	Vanlig	-0,115	0,008	0,000
Heksan	Kloroform	0,121	0,008	0,000
	Vanlig	0,006	0,008	0,712

Optimalisering av vasketrinn: MCF- derivatiserte etanolekstrakter

Tabell E8: «Estimated marginal means» estimert ved hjelp av toveis ANOVA med gjennomsnitt, standardfeil og konfidensintervallet for de fire vaskeprotokollene.

Vaskeprotokoll	Gj. Snitt	Std. feil	Konfidensintervall	
			Nedre grense	Øvre grense
PBS_V_37 °C	4,857	0,009	4,840	4,875
PBS_37 °C	4,900	0,009	4,882	4,918
PBS_V_0 °C	4,852	0,009	4,834	4,870
PBS_0 °C	5,027	0,009	5,009	5,044

Tabell E9: «Test of between subjects effects» mellom vaskeprotokoll og metabolittkonsentrasjon med sum av kvadratavvikene, antall frihetsgrader (FG), gj. snittelig kvadratavvik, F-verdi, signifikans og feilledd.

	Type III summen av kvadratavvikene	FG	Gj. snittelig kvadratavvik	F	Signifikans
Vaskeprotokoll	3,150	3	1,050	79,156	0,000
Metabolitter	821,934	52	15,806	1191,769	0,000
Vaskeprotokoll * Metabolitt	6,902	156	0,044	3,336	0,000
Feilledd	5,624	424	0,013		

Tabell E10: Utfall fra Tukey`s HSD post hoc test ved parvis sammenligning av gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitter i de fire vaskeprotokollene med gjennomsnittelig forskjell, standardfeil og signifikans.

		Gj. snittelig forskjell	Std. feil	Signifikans
PBS_V_37	PBS_37	-0,043	0,013	0,005
	PBS_V_0	0,006	0,013	0,972
	PBS_0	-0,169	0,013	0,000
PBS_37	PBS_V_37	0,043	0,013	0,005
	PBS_V_0	0,049	0,013	0,001
	PBS_0	-0,126	0,013	0,000
PBS_V_0	PBS_V_37	-0,006	0,013	0,972
	PBS_37	-0,049	0,013	0,001
	PBS_0	-0,175	0,013	0,000
PBS_0	PBS_V_37	0,169	0,013	0,000
	PBS_37	0,126	0,013	0,000
	PBS_V_0	0,175	0,013	0,000

Tabell E11: Resultat fra t-test med t-verdi, frihetsgrader, tosidig signifikans, gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitt, gjennomsnittelig forskjell og standardfeilen til forskjellen av gjennomsnittskonsentrasjon av metabolitter for protokoll med vannvask og protokoll uten vannvask, uavhengig av temperatur (37 °C/0 °C).

Metabolitt	t	FG	Tosidig signifikans	Gj. snitt med vannvask	Gj. snitt uten vannvask	Gj. Snittelig forskjell	Std. feil til forskjellen
Malonate	-4,338	10	0,001	3,257	3,56	-0,203	0,047
Pyruvate	-2,898	10	0,016	4,961	5,2	-0,244	0,084
Lactate/ Methylglyoxal	-3,007	10	0,013	6,59	6,82	-0,23	0,076
Glyoxylate	-2,961	10	0,014	4,235	4,349	-0,159	0,054
Beta-3- Hydroxybutyrate	-3,03	10	0,013	4,264	4,349	-0,085	0,028
OH-Glutarate	-2,365	10	0,04	3,623	3,694	-0,07	0,03
Valine	-3,182	10	0,01	6,489	6,641	-0,153	0,048

Beta-Hydroxypyruvate	-3,37	10	0,007	4,166	4,593	-0,427	0,127
Leucine	-2,927	10	0,015	6,366	6,508	-0,141	0,048
Isoleucine	-3,233	10	0,009	6,307	6,45	-0,143	0,044
Putrescine	-3,658	10	0,004	4,445	4,647	-0,201	0,055
Hippurate	-3,008	10	0,013	3,331	3,643	-0,313	0,104
Phenylalanine	-2,745	10	0,021	6,308	6,453	-0,145	0,053
Ornithine	-2,995	10	0,013	3,883	4,131	-0,247	0,083
N-Glycyl-L-proline	-2,777	10	0,02	3,566	4,004	-0,439	0,158
Lysine	-2,886	10	0,016	4,892	5,274	-0,382	0,132
Histidine	-3,216	10	0,009	4,007	4,194	-0,187	0,058
Tyrosine	-3,216	10	0,016	5,764	5,928	-0,187	0,058
Thryptophane	-2,463	10	0,034	4,644	4,815	-0,171	0,07

Frysetørking versus SpeedVac

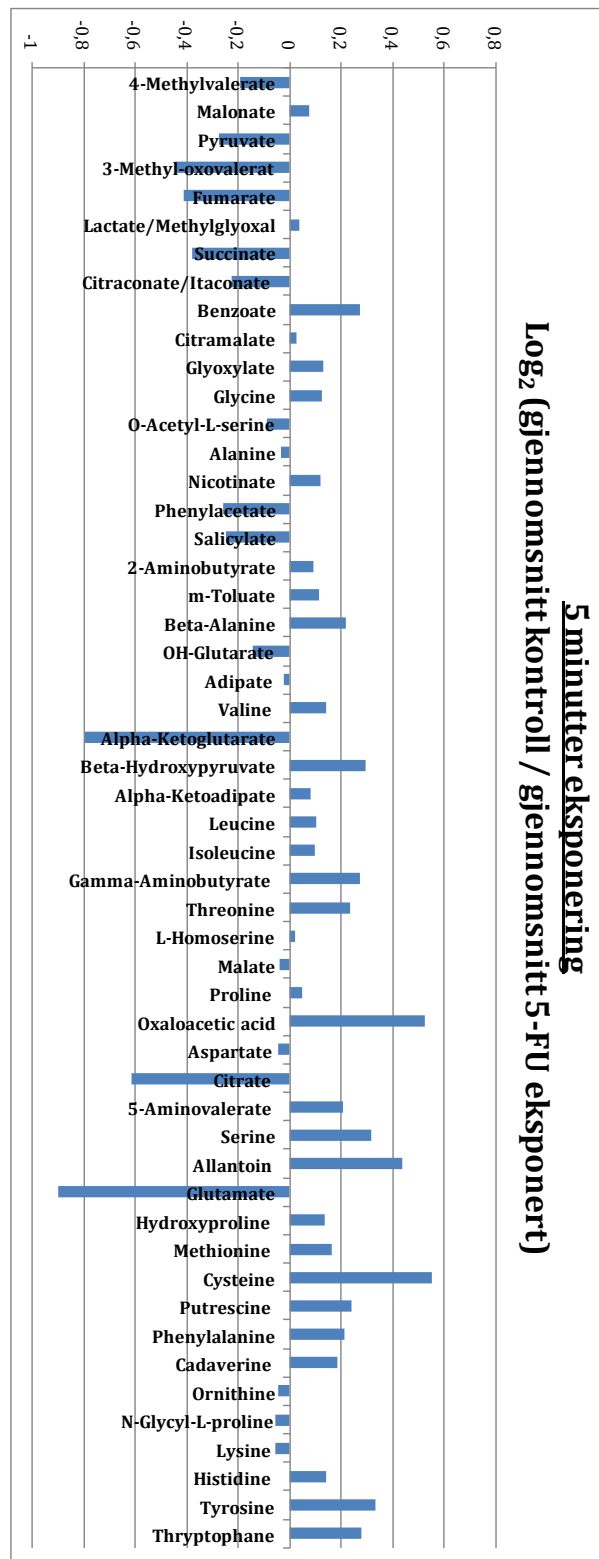
Tabell E12: «Estimated marginal means» estimert ved hjelp av tosidig variansanalyse med gjennomsnittskonsentrasjon av metabolittstandarder i frysetørkede prøver og speedvaccede prøver med standardfeil og konfidensintervallet for de to avdampningsmetodene.

Inndampingsmetode	Gj. snitt	Std. feil	95 % Konfidensintervall	
			Nedre grense	Øvre grense
Frysetørking	5,923	0,011	5,901	5,945
SpeedVaccing	5,845	0,011	5,827	5,871

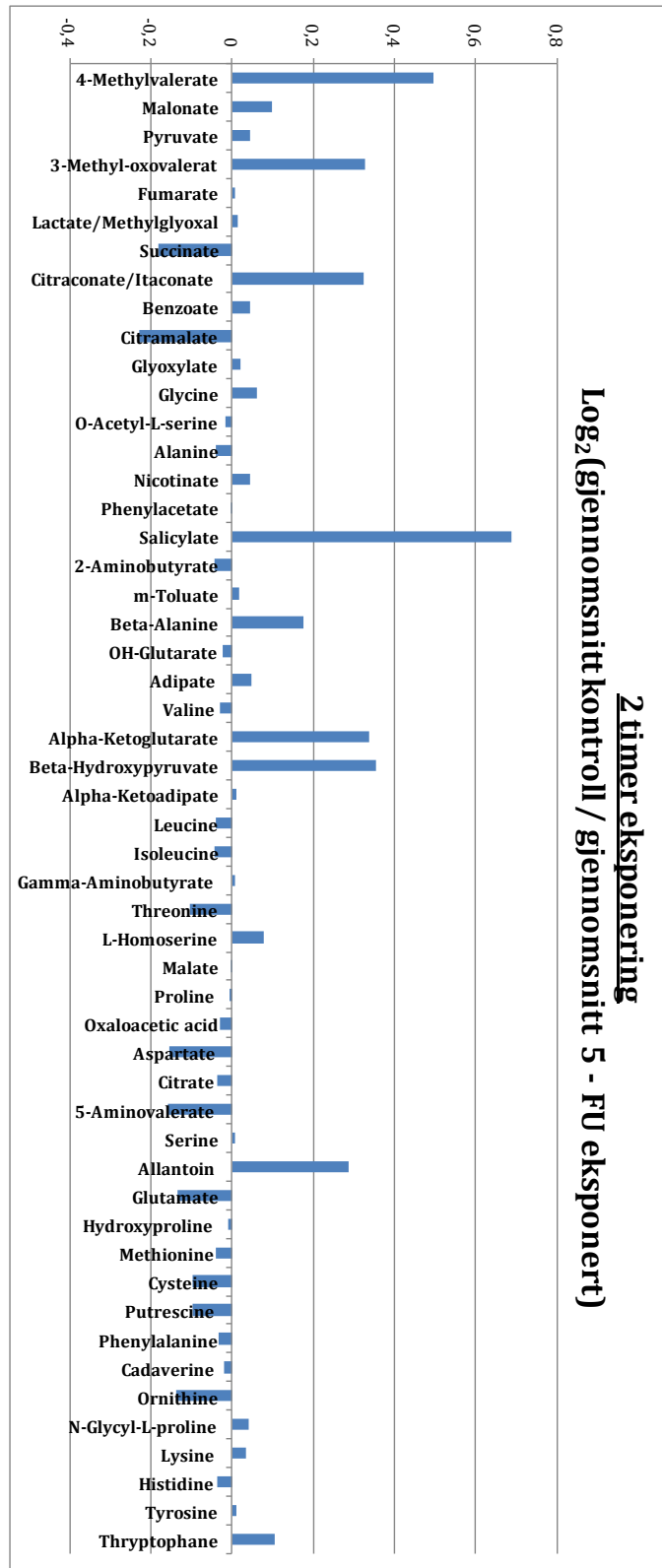
Tabell E13: Test of between subjects effect mellom metabolittstandarer avdampningsmetode med summen av kvadratavvikene, antall frihetsgrader (FG), gjennomsnittelig kvadratavvik, F-verdi, signifikans og feilledd.

	Type III Summen av kvadratavvikene	FG	Gj. Kvadratavvik	F	Signifikans
Metabolitter	164,859	69	2,389	137,384	0,000
Avdampningsmetode	0,380	1	0,380	21,863	0,000
Metabolitter * Avdampningsmetode	1,275	69	0,018	1,063	0,376
Feilledd	2,435	140	0,017		

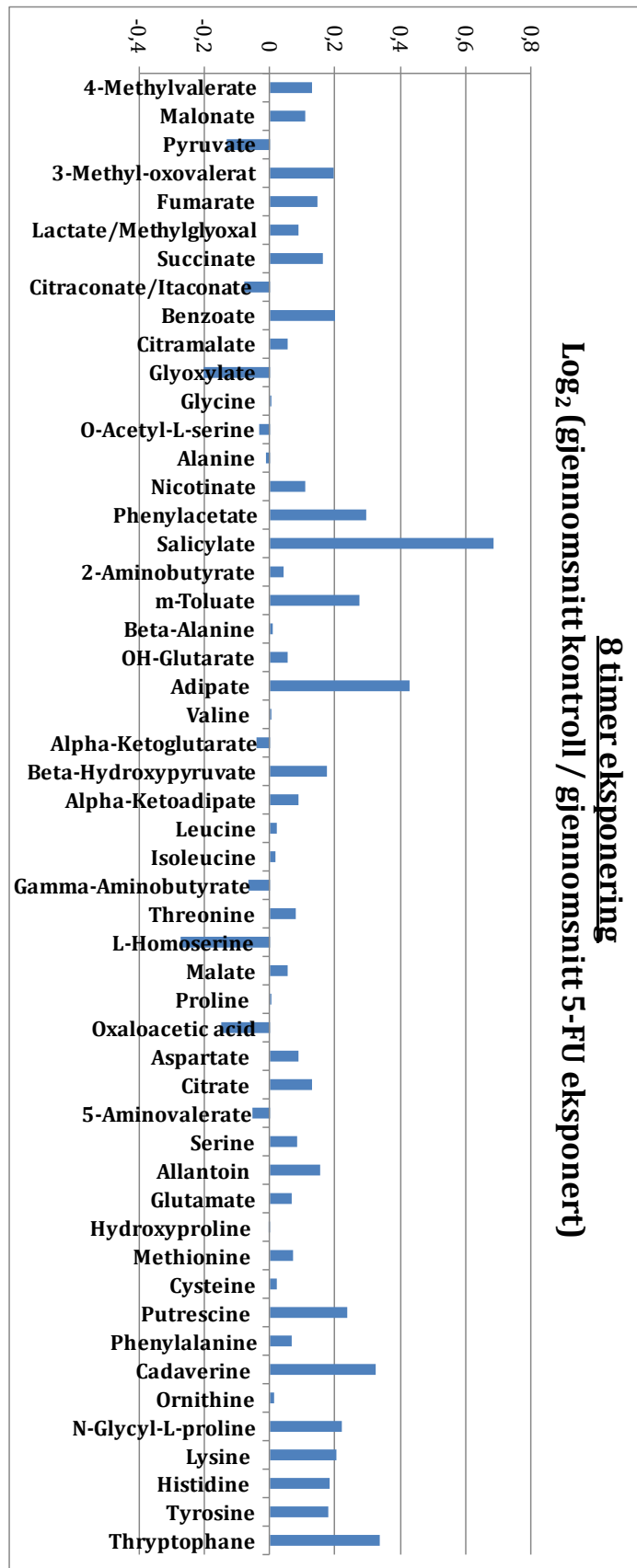
VEDLEGG F: LOG₂ PLOT



Figur F1: Log₂ (gjennomsnitt kontroll 5 minutter / gjennomsnitt eksponert med 5-FU i 5 minutter) plot. Positive verdier viser at den gjennomsnittlige metabolittkonsentrasjonen var høyest i kontrollcellene, mens negative verdier viser at de eksponerte cellene hadde høyest gjennomsnittsverdi for den gitte metabolitten. Metabolittkonsentrasjonene er normalisert mot proteininnhold i cellepellet og internstandard d₃-Alanin.



Figur F2: Log₂ (gjennomsnitt kontroll 2 timer/gjennomsnitt eksponert med 5-FU i 2 timer) plot. Positive verdier viser at den gjennomsnittlige metabolittkonsentrasjonen var høyest i kontrollcellene, mens negative verdier viser at de eksponerte cellene hadde høyest gjennomsnittsverdi for den gitte metabolitten. Metabolittkonsentrasjonene er normalisert mot proteininnhold i cellepellet og internstandard d₃-Alanin.



Figur F3: Log₂ (gjennomsnitt kontroll 8 timer/gjennomsnitt eksponert med 5-FU i 8 timer) plot. Positive verdier viser at den gjennomsnittlige metabolittkonsentrasjonen var høyest i kontrollcellene, mens negative verdier viser at de eksponerte cellene hadde høyest gjennomsnittsverdi for den gitte metabolitten. Metabolittkonsentrasjonene er normalisert mot proteininnhold i cellepellet og internstandard d₃-Alanin.