

NMR-basierte Metabolomstudien an Medaka sowie humanen Immunzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Hannah Soergel

1. Referentin: PD Dr. Claudia Muhle-Goll

2. Referent: Prof. Dr. Joachim Wittbrodt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2023

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. Januar 2020 bis zum 27. Oktober 2023 am Institut für Biologische Grenzflächen 4 des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Leitung von PD Dr. Claudia Muhle-Goll durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie Zitate kenntlich gemacht zu haben. Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität eingereicht.



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden NMR-spektroskopische Untersuchungen des Metaboloms zweier biologischer Systeme vorgestellt. Hierbei handelt es sich um den japanischen Reisfisch Medaka sowie humane Immunzellen.

Der erste Teil umfasst die Analyse des Stoffwechselprofils unterschiedlicher Inzucht-Stämme des Modellorganismus Medaka. Diese bieten ideale Voraussetzungen, um zu erforschen, wie das Genom sowie äußere Faktoren den Phänotyp beeinflussen und welche Rolle der Stoffwechsel in diesem Zusammenhang spielt. Während die Auswirkungen von Umweltfaktoren auf den Stoffwechsel und damit das Metabolom von Medaka bereits in zahlreichen Forschungsarbeiten betrachtet wurden, ist der Einfluss des Genoms noch weitgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde zunächst evaluiert, inwieweit sich der genetische Hintergrund verschiedener Medaka Inzucht-Stämme im Leber-Metabolom widerspiegelt. Hierzu wurden ¹H-NMR-Spektren von Leberextrakten männlicher und weiblicher Fische der beiden Stämme HO5 und iCab aufgenommen und mittels uni- sowie multivariater statistischer Methoden verglichen. Dabei konnten zahlreiche Metaboliten identifiziert werden, deren relative Konzentration sich zwischen den Inzucht-Stämmen unterscheidet. Diese weisen auf eine unterschiedliche Aktivität diverser Stoffwechselwege hin, wie etwa den Harnstoffzyklus, das Malat-Aspartat-Shuttle, den Cori-Zyklus sowie die Melanin- und Taurinsynthese. Auch zwischen männlichen und weiblichen Fischen waren Unterschiede im Metabolom erkennbar, die zwar geringer ausgeprägt, aber dennoch signifikant waren. Die vorliegenden Ergebnisse belegen zum einen, dass das Leber-Metabolom von Medaka abhängig vom genetischen Hintergrund variiert. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die hier verwendete NMR-basierte Methode geeignet ist, um diese subtilen Abweichungen zu erfassen. Folglich könnten NMR-basierte metabolische Untersuchungen zukünftig genomweite Assoziationsstudien an Medaka ergänzen.

Anschließend wurde das Metabolom von Medaka-Embryonen untersucht. Aus embryonalen Stammzellen der beiden Inzucht-Stämme iCab und QuiH werden, statt wie bisher üblich aus Säugetierzellen, in der Arbeitsgruppe von Prof. Joachim Wittbrodt an der Universität Heidelberg Netzhaut-Organoiden entwickelt. Dies gelang allerdings bisher nur mit Stammzellen des iCab-Stammes. Somit stellt sich die Frage welchen Einfluss der genetische Hintergrund auf

das Differenzierungspotenzial hat. Da im Rahmen dieser Arbeit zuvor bereits Unterschiede im Leber-Metabolom zweier Inzucht-Stämme identifiziert wurden, kann die Untersuchung des Metaboloms einen Ansatzpunkt bieten, um das unterschiedliche Differenzierungspotenzial der Zellen besser zu verstehen. Analog zu den Leberproben wurden ^1H -NMR-Spektren von Embryonen des iCab- und QuiH-Stammes aufgenommen und das metabolische Profil mittels uni- und multivariater statistischer Methoden verglichen. Hierdurch konnten diverse Metaboliten identifiziert werden, deren Konzentration sich zwischen den Inzucht-Stämmen unterscheidet und die mit der Differenzierung der Zellen in Richtung retinalen Gewebes in Verbindung stehen könnten. Besonders interessant ist die Beobachtung einer höheren Konzentration von Taurin, Betain und Methionin bei iCab-Embryonen. Taurin wird nachweislich in hohen Mengen in der Netzhaut produziert und ist für die Entwicklung und den Erhalt der selbigen notwendig. Betain und Methionin sind entscheidend für epigenetische Veränderungen, welche wiederum die Zelldifferenzierung beeinflussen können. Der tatsächliche Effekt dieser Substanzen auf die Entwicklung von Netzhaut-Organoiden aus embryonalen Stammzellen von Medaka wird zum aktuellen Zeitpunkt in der Arbeitsgruppe von Prof. Wittbrodt untersucht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde anhand einer Analyse des Zellkulturmediums der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen des bakteriellen Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS) auf die Entzündungsreaktion sowie den Metabolismus kultivierter humaner peripherer mononuklearer Blutzellen (PBMCs) ermittelt. LPS ist nicht nur ein bedeutender Auslöser akuter Entzündungsreaktionen nach einer bakteriellen Infektion, sondern auch niederschwelliger, nicht-infektiöser Entzündungen, deren Untersuchung Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

Als Erstes wurde analysiert, wie genau die Bedingungen *in vitro* die physiologische Umgebung der Zellen im Blut abbilden. Obwohl unphysiologische Bedingungen den zellulären Metabolismus maßgeblich beeinflussen können, wird dieser Aspekt in vielen Untersuchungen vernachlässigt. Mittels NMR-Spektroskopie wurde die Zusammensetzung des Zellkulturmediums sowie die Konzentration der einzelnen Komponenten bestimmt und mit der Menge im Blut verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Bestandteile des Zellkulturmediums zwar im Wesentlichen denen von Blutserum entsprechen, die Konzentration einiger Substanzen jedoch deutlich abweicht. Diese Beobachtungen können zukünftig genutzt werden, um ein zellspezifisches Kulturmedium zu entwickeln.

Um zu evaluieren, ab welcher LPS-Konzentration ein inflammatorischer Zustand der Zellen induziert wird, wurden PBMCs durch die Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Rodriguez Gomez am Max Rubner-Institut in Karlsruhe durch LPS in einem Konzentrationsbereich zwischen 0.001 und 0.1 ng/ml stimuliert und über mehrere Tage kultiviert. Dieser LPS-Spiegel, der weit geringer ist als bisher in einschlägigen Studien üblich, soll die Bedingungen eines niederschweligen Entzündungszustandes möglichst realitätsgetreu abbilden. Um das Vorliegen eines pro-inflammatorischen zellulären Phänotyps beurteilen zu können, wurde die extrazelluläre Konzentration der Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und IL-8 bestimmt. Zugleich wurde im Rahmen dieser Dissertation der Verlauf verbrauchter und neu gebildeter Substanzen im Zellkulturmedium mittels ^1H -NMR-Spektroskopie und anschließender statistischer Datenauswertung analysiert. Dadurch sollte ermittelt werden, ob diese Methode ebenso wie die gängigere aber deutlich aufwendigere Untersuchung intrazellulärer Metaboliten geeignet ist, um metabolische Veränderungen nach Stimulation mit LPS zu erfassen. Bereits bei Stimulation mit der zweitniedrigsten LPS-Konzentration von 0.005 ng/ml wies die Zunahme der Konzentration an IL-6 und IL-8 auf einen pro-inflammatorischen Zustand der Zellen hin. Gleichmaßen konnte ab dieser LPS-Konzentration eine Veränderung in der extrazellulären Konzentration diverser Substanzen beobachtet werden. Besonders auffällig war die hohe Umsetzungsrate von Glucose zu Lactat. Verantwortlich hierfür dürfte die Verschiebung des Stoffwechsels vom Citratzyklus zur sogenannten aeroben Glykolyse sein, ein charakteristisches Merkmal pro-inflammatorischer Immunzellen. Eine weitere Auffälligkeit war die Sekretion von Glutamat, welches eine wichtige Rolle als Immunmodulator spielt.

Diese Beobachtungen zeigen, dass bereits extrem niedrige LPS-Konzentrationen im Bereich von Pikogramm pro Milliliter zu einer Entzündungsreaktion in humanen Immunzellen führen können. Die NMR-spektroskopische Analyse des Zellkulturmediums bietet hierbei eine einfache und schnelle Möglichkeit, die damit einhergehende Umstellung des Stoffwechsels anhand einer Vielzahl von Metaboliten zu verfolgen. Basierend auf diesen Ergebnissen kann nun begonnen werden, den Einfluss verschiedener weiterer Faktoren auf die Entstehung niederschwelliger, chronischer Entzündungen *in vitro* zu untersuchen.

Abstract

This thesis presents NMR spectroscopic studies of the metabolome of two biological systems. These are the Japanese rice fish medaka and human immune cells.

The first part of this work comprises the analysis of the metabolic profile of different inbred strains of the model organism medaka. This organism provides ideal conditions to investigate how both the genome and external factors influence the phenotype, as well as the role of metabolism in this context. While the effects of environmental factors on the metabolism and thus the metabolome of medaka have been considered in numerous research studies, the influence of the genome remains largely unknown.

Initially, it was evaluated to what extent the genetic background of different medaka inbred strains is reflected in the liver metabolome. For this purpose, ^1H -NMR spectra of liver extracts from male and female fish of the two strains HO5 and iCab were recorded and compared using both univariate and multivariate statistical methods. Numerous metabolites were identified whose relative concentrations differ between the inbred strains. These indicate divergent activity of various metabolic pathways, such as the urea cycle, the malate-aspartate shuttle, the Cori cycle, as well as melanin and taurine synthesis. Differences in the metabolome were also evident between male and female fish, which, while less pronounced, were still significant. These results demonstrate that the liver metabolome of medaka varies depending on the genetic background. Moreover, it was shown that the NMR-based method described here is suitable to detect these subtle variations. Consequently, NMR-based metabolic studies could complement genome-wide association studies in medaka in the future.

Subsequently, the metabolome of medaka embryos was investigated. In the research group of Prof. Joachim Wittbrodt at the University of Heidelberg, retinal organoids are developed from embryonic stem cells of the two inbred strains iCab and QuiH and not, as is usually the case, from mammalian cells. However, success has so far been achieved only with stem cells from the iCab strain. This raises the question of how much the genetic background influences differentiation potential. Since differences in the liver metabolome of two inbred strains had already been identified in the course of this work, an examination of the metabolome might also offer insights into the distinct differentiation potential of these cells. Analogous to the liver samples, ^1H -NMR spectra of embryos from the iCab and QuiH strains were recorded, and their metabolic profiles were compared using both univariate and multivariate statistical

methods. In this manner, various metabolites were identified whose concentrations differ between the inbred strains and which might be related to cell differentiation towards retinal tissue. Of particular interest is the observation of higher concentrations of taurine, betaine, and methionine in iCab embryos. Taurine is known to be produced in high amounts in the retina and is necessary for its development and maintenance. Betaine and methionine are crucial for epigenetic changes, which in turn may influence cell differentiation. The actual impact of these substances on the development of retinal organoids from medaka embryonic stem cells is currently under investigation in the research group of Prof. Wittbrodt.

In the second part of this thesis, the influence of varying concentrations of the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) on the inflammatory response and the metabolism of cultured human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was determined through analysis of the cell culture medium. LPS is a significant trigger not only for acute inflammatory responses following bacterial infection, but also for low-grade, non-infectious inflammations, which are the subject of this study.

First, it was analyzed how accurately the *in vitro* conditions reflect the physiological environment of the cells in the blood. Although non-physiological conditions can significantly influence cell metabolism, this aspect is overlooked in many studies. To this end, the composition of the cell culture medium and the concentration of its individual components were determined using NMR spectroscopy and compared to their levels in the blood. It was found that while the components of the cell culture medium largely correspond to those in blood serum, the concentration of some substances differs significantly. These observations can be used in the future to develop a cell-specific culture medium.

To determine the LPS concentration at which an inflammatory state of the cells is induced, PBMCs were stimulated with LPS in a concentration range between 0.001 and 0.1 ng/ml and cultivated over several days by the research group of Dr. Manuel Rodriguez Gomez at the Max Rubner-Institute in Karlsruhe. This LPS level, which is much lower than commonly used in relevant studies, is intended to realistically reflect conditions of a low-grade inflammatory state. To assess the presence of a pro-inflammatory cellular phenotype, the extracellular concentrations of cytokines interleukin-6 (IL-6) and IL-8 were determined. Concurrently, within the scope of this thesis, the course of both consumed and newly formed substances in the cell culture medium was analyzed using ^1H -NMR spectroscopy and subsequent statistical data evaluation. The aim was to determine whether this method, similar to the more common

but also more complex examination of intracellular metabolites, could detect metabolic changes after LPS stimulation. Even at the second lowest LPS concentration of 0.005 ng/ml, the increase in the concentration of IL-6 and IL-8 indicated a pro-inflammatory state of the cells. Likewise, from this LPS concentration, changes in the extracellular concentration of various substances were observed. Particularly noticeable was the high conversion rate of glucose to lactate, likely resulting from a metabolic shift from the citric acid cycle to the so-called aerobic glycolysis, a characteristic feature of pro-inflammatory immune cells. Another notable observation was the secretion of glutamate, which plays an important role as an immunomodulator.

These findings suggest that even extremely low LPS concentrations, in the picogram per milliliter range, can induce an inflammatory response in human immune cells. The NMR spectroscopic analysis of the cell culture medium provides an easy and rapid method to track the associated metabolic shift using different metabolites. Based on these results, further research can now begin to explore the influence of various other factors on the development of low-grade, chronic inflammations *in vitro*.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract	IV
1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	4
2.1 NMR-Spektroskopie	4
2.1.1 Physikalische Grundlagen	4
2.1.2 Messverfahren	7
2.1.3 Spektrale Parameter	8
2.1.4 Quantitative NMR-Spektroskopie	10
2.1.5 Ein- und zweidimensionale NMR-Experimente	12
2.2 Statistische Datenauswertung	14
2.2.1 Prozessierung der Daten	14
2.2.2 Hypothesentests	16
2.2.3 Univariate Methoden.....	17
2.2.4 Multivariate Methoden.....	20
Teil A Metabolische Studien am Modellorganismus Medaka.....	22
3. Einleitung	22
4. Biologische Grundlagen	24
4.1 Der Modellorganismus Medaka.....	24
4.2 Entwicklungen in der Stammzell- und Organoidforschung	26
4.3 Regulation von Pluripotenz und Differenzierungspotenzial von Stammzellen	28
5. Themenstellung	32
6. Ergebnisse und Diskussion.....	33
6.1 Metabolische Untersuchungen an Medaka-Lebern	33
6.1.1 Überblick	33
6.1.2 NMR-spektroskopische Untersuchung der Leberextrakte	35

6.1.3	Vergleich unterschiedlicher <i>batches</i>	37
6.1.4	Multivariate Hauptkomponentenanalyse zur Klassifizierung der Daten.....	38
6.1.5	Unterschiede im Metabolom der Inzucht-Stämme HO5 und iCab.....	41
6.1.5.1	Klassifizierung mittels multivariater <i>partial least squares discriminant analysis</i>	41
6.1.5.2	Detailanalyse der Variablen mittels univariater Methoden.....	44
6.1.5.3	Diskussion zugrundeliegender Stoffwechselwege	51
6.1.6	Unterschiede im Metabolom männlicher und weiblicher Fische.....	55
6.1.6.1	Klassifizierung mittels multivariater <i>partial least squares discriminant analysis</i>	55
6.1.6.2	Detailanalyse der Variablen mittels univariater Methoden.....	57
6.1.6.3	Diskussion zugrundeliegender Stoffwechselwege	60
6.1.7	Zusammenfassung und Ausblick.....	61
6.2	Metabolische Untersuchungen an Medaka-Embryonen	63
6.2.1	Überblick	63
6.2.2	Entwicklung der Methode.....	64
6.2.3	NMR-spektroskopische Untersuchung der Embryonenextrakte.....	66
6.2.4	Vergleich der Embryonen von Fischen unterschiedlichen Alters	68
6.2.5	Unterschiede im Metabolom der Inzucht-Stämme iCab und QuiH.....	69
6.2.5.1	Vergleich unterschiedlicher <i>batches</i>	69
6.2.5.2	Multivariate Hauptkomponentenanalyse zur Klassifizierung der Daten	70
6.2.5.3	Detailanalyse der Variablen mittels univariater Methoden	71
6.2.5.4	Diskussion möglicher Zusammenhänge zwischen Metabolom und Differenzierungspotenzial	75
6.2.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	79
7.	Material und Methoden	81
7.1	Allgemeine Bemerkungen	81
7.2	Leberproben.....	82
7.2.1	Gewebeentnahme.....	82
7.2.2	Probenvorbereitung der Leberextrakte.....	82
7.2.3	NMR-Messungen.....	83
7.2.4	Datenauswertung.....	84
7.3	Embryonen und Stammzellen	85

7.3.1 Gewinnung der Proben	85
7.3.2 Probenvorbereitung der Zellextrakte	86
7.3.3 Probenvorbereitung der Embryonenextrakte	86
7.3.4 NMR-Messungen.....	86
7.3.5 Datenauswertung.....	87
Teil B Erforschung des Metabolismus kultivierter humaner Immunzellen	88
8. Einleitung	88
9. Biologische Grundlagen	90
9.1 Immunzellen und die Funktionsweise des Immunsystems	90
9.2 Bakteriellcs Lipopolysaccharid	92
9.3 Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen.....	93
9.4 Chronische Inflammationen und gesundheitliche Folgen	95
9.5 Immunmetabolismus von Makrophagen.....	97
10. Themenstellung	102
11. Ergebnisse und Diskussion.....	103
11.1 Etablierung der Zellkulturbedingungen	103
11.1.1 Überblick	103
11.1.2 Zusammensetzung des Mediums	105
11.1.3 Stabilität der Substanzen im Medium.....	111
11.1.4 Kultivierung von PBMCs ohne Stimulanzen	116
11.1.5 Diskussion möglicher Folgen unphysiologischer Konzentrationen	124
11.1.6 Diskussion des Zusammenhangs zwischen Zelldifferenzierung und Metabolismus.....	129
11.1.7 Zusammenfassung und Ausblick.....	139
11.2 Umstellung des Stoffwechsels bei Stimulation mit Lipopolysaccharid.....	140
11.2.1 Überblick	140
11.2.2 Charakterisierung von Stoffwechseledukten und -produkten	142
11.2.3 Sekretion der Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-8	154

11.2.4 Diskussion.....	155
11.2.5 Zusammenfassung und Ausblick.....	162
11.3 Methodische Einschätzungen	163
11.3.1 Bestimmung absoluter Konzentrationen.....	163
11.3.2 Beurteilung der Reproduzierbarkeit	169
11.3.3 Statistische Datenauswertung	174
11.3.4 Zusammenfassung und Ausblick.....	175
12. Material und Methoden	176
12.1 Isolation und Kultur von PBMCs.....	176
12.2 ELISA-Tests	178
12.3 ¹ H-NMR-Messungen.....	178
12.4 Identifizierung von Metaboliten	179
12.5 Bestimmung absoluter Konzentrationen.....	180
12.6 Datenauswertung.....	182
Literaturverzeichnis.....	183
Abkürzungsverzeichnis.....	212
Abbildungsverzeichnis.....	216
Tabellenverzeichnis	219
Anhang.....	220
Publikationen und Konferenzbeiträge	243
Danksagung	244

1. Einleitung

Das Forschungsfeld der Metabonomik wurde 1999 von Jeremy Nicholson definiert als „*the quantitative measurement of the dynamic multiparametric metabolic response of living systems to pathophysiological stimuli or genetic modification*“.^[1] Zwei Jahre später führte Oliver Fiehn für die umfassende und quantitative Analyse des Metaboloms, also aller niedermolekularen Stoffwechselprodukte in einer biologischen Probe, die Bezeichnung Metabolomik ein.^[2] Diese Stoffwechselprodukte, sogenannte Metaboliten, umfassen unter anderem Aminosäuren, organische Säuren, Nukleinsäuren, Fettsäuren, Kohlenhydrate und Vitamine.^[3] Damit ergänzt die Metabonomik, oder Metabolomik, den Forschungsbereich der Genomik, welche sich mit der Erforschung des Genoms (die Gesamtheit aller Gene) befasst, und den der Proteomik, welche die Erforschung des Proteoms (die Gesamtheit aller Proteine) umfasst. Die Verknüpfung dieser drei Bereiche ermöglicht die Beschreibung der komplexen biologischen und chemischen Zusammenhänge in einem Organismus.^[1, 2]

Die Ursprünge dieses Forschungsbereichs reichen weit zurück. Das wohl bekannteste Beispiel sind Urin-Tafeln, die bereits seit dem Mittelalter dafür verwendet wurden, verschiedene Krankheiten anhand von Farbe, Geruch und Geschmack des Urins zu diagnostizieren.^[4] Seit etwa 50 Jahren spielt auch die NMR-Spektroskopie eine Schlüsselrolle für unser Verständnis von Stoffwechselprozessen.^[5] Mitte der 1980er-Jahre erreichte diese Methode die nötige Empfindlichkeit, um Metaboliten in biologischen Proben charakterisieren zu können.^[4, 5] In diesem Zeitraum wurden auch die wohl ersten metabolischen Studien unter Verwendung der ¹H-NMR-Spektroskopie durchgeführt, in welchen die Zusammensetzung von humanem Serum und Urin analysiert wurde.^[6–8] Seit Anfang der 2000er-Jahre hat der Bereich der Metabolomik mit der Einführung multivariater statistischer Analysemethoden, welche die umfassende Auswertung komplexer Datensätze erlaubt, nochmal ein bedeutendes Wachstum erfahren.^[1, 9] Heutzutage werden Metabolomstudien häufig an Pflanzen, Mikroorganismen oder Säugetiersystemen durchgeführt. Bei Humanstudien umfassen die Anwendungsgebiete vorwiegend die Diagnose von Krankheiten und die Beobachtung von Arzneimittelwirkungen. Darüber hinaus werden biochemische Stoffwechselwege und ihre Veränderungen abhängig von Faktoren wie der Ernährung, Bewegung oder Alterungsprozessen untersucht.^[5, 10–12] Als zu untersuchende Proben können Körperflüssigkeiten wie Blut oder Urin, Zellen, Gewebe, Organe oder auch ganze Organismen zum Einsatz kommen.^[13–15] Je nach Fragestellung können

entweder zielgerichtete (*targeted*) oder nicht-zielgerichtete (*non-targeted*) Ansätze zur Durchführung von Metabolomstudien genutzt werden. Bei zielgerichteten Analysen werden nur bestimmte Analyten identifiziert und quantifiziert, die zuvor bereits als Biomarker ermittelt wurden oder mit spezifischen Stoffwechselwegen in Verbindung stehen. Mithilfe nicht-zielgerichteter Methoden dagegen werden alle nachweisbaren Analyten in einer Probe, einschließlich unbekannter Substanzen, erfasst. Dies ergibt für jede Probe ein charakteristisches Muster, das als chemischer Fingerabdruck bezeichnet wird. Durch den Vergleich dieser Fingerabdrücke kann eine Klassifizierung der Proben erfolgen, selbst wenn die einzelnen Analyten zuvor nicht identifiziert wurden.^[14]

Die beiden führenden analytischen Methoden für Metabolomstudien stellen die NMR-Spektroskopie (Kernspinresonanzspektroskopie, engl.: *nuclear magnetic resonance spectroscopy*) und die Massenspektrometrie dar.^[5, 12, 14, 16] Dabei bietet die NMR-Spektroskopie insbesondere für nicht-zielgerichtete Analysen sowie langfristige oder groß angelegte Studien zahlreiche Vorteile. Diese umfassen eine meist einfache Probenvorbereitung, eine hohe Reproduzierbarkeit sowie eine einfache Automatisierbarkeit. Auch handelt es sich dabei um eine zerstörungsfreie, nicht-invasive Messmethode, das heißt die Probe ist nach der Messung noch intakt und kann erneut analysiert werden. Des Weiteren kann mittels NMR-Spektroskopie eine Vielzahl verschiedener Metaboliten quantitativ detektiert werden, ohne dass zuvor detaillierte Kenntnisse über die in der Probe enthaltenen Substanzen notwendig sind, was wiederum die Identifizierung neuer Verbindungen ermöglicht. Dagegen muss bei massenspektrometrischen Methoden das eingesetzte Gemisch im Vorfeld aufwendig präpariert und chromatographisch aufgetrennt werden, was wiederum Kenntnisse über potenziell enthaltene Substanzen erfordert. Andererseits ist hierdurch häufig eine eindeutigere Identifizierung und Quantifizierung der enthaltenen Substanzen möglich als mittels NMR-Spektroskopie. Der größte Nachteil der NMR-Spektroskopie im Vergleich zur Massenspektrometrie liegt in der geringeren Empfindlichkeit. So befindet sich die untere Nachweisgrenze mittels NMR-Spektroskopie detektierbarer Konzentrationen im Bereich weniger Mikromol pro Liter, während massenspektrometrische Methoden die Erfassung von Konzentrationen im Bereich weniger Pikomol bis Nanomol pro Liter ermöglichen.^[5, 12, 14, 16] Um die aufgeführten Vorteile der NMR-Spektroskopie ausnutzen zu können, sollte auch die Probenvorbereitung möglichst schnell, reproduzierbar und mit einer hohen Ausbeute erfolgen. Bestimmte Bioflüssigkeiten wie Urin erfordern keine oder nur eine geringe

Vorbereitung.^[14] Andere Flüssigkeiten wie Blutserum und -plasma enthalten Proteine und Lipoproteine, die vergleichsweise breite Resonanzsignale ergeben und scharfe Signale kleiner Moleküle überlagern können.^[13, 17] In diesem Fall kann es notwendig sein, diese Makromoleküle mittels Präzipitation oder Ultrafiltration aus der Probenlösung abzutrennen.^[17] Die Extraktion von Metaboliten aus Geweben und Organen erfordert zunächst den mechanischen Aufschluss des Gewebes. Anschließend können polare Metaboliten mittels einphasiger, polarer Lösungsmittelsysteme, häufig Mischungen aus Acetonitril und Wasser, isoliert werden. Die Verwendung zweiphasiger Lösungsmittelsysteme, beispielsweise Methanol, Wasser und Chloroform, ermöglicht die kombinierte Isolation polarer und unpolarer Metaboliten.^[13] Im Falle von Zellproben erfolgt die Extraktion intrazellulärer Metaboliten typischerweise mit vergleichbaren Lösungsmittelsystemen, wobei kein vorausgehender mechanischer Aufschluss notwendig ist.^[15, 18] Obwohl üblicherweise Bioflüssigkeiten oder Gewebeextrakte untersucht werden, eignet sich die NMR-Spektroskopie auch zur Untersuchung von intakten Geweben, Organen und anderen festen Proben mittels *magic-angle-spinning*-NMR, einer speziellen Technik in der Festkörper-NMR-Spektroskopie.^[16]

Die Identifizierung der in einer Probe enthaltenen Metaboliten erfordert geeignete Referenzdatensätze. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl verschiedene Organismen als auch unterschiedliche Gewebe und Bioflüssigkeiten ein individuelles Metabolom besitzen, wurde eine Reihe spezifischer Metabolom-Datenbanken entwickelt.^[16] Die wohl bekannteste und umfassendste Datenbank in diesem Kontext ist die *Human Metabolome Database* (HMDB), deren erste Version 2007 von David Wishart und Kollegen veröffentlicht wurde.^[19] Aktuell umfasst sie Daten zu mehr als 200 000 Metaboliten im menschlichen Körper inklusive zahlreicher vorhergesagter sowie experimentell gemessener NMR- und Massenspektren.^[20] Dennoch übersteigt die Anzahl der kleinen Moleküle, die für einen Organismus von Bedeutung sind, bei weitem die Zahl derer, deren Spektren derzeit bekannt und in Datenbanken aufgeführt sind. Folglich umfasst die große Mehrheit der durch Metabolomstudien gesammelten Informationen chemische Signaturen, die noch nicht charakterisiert sind. Dieser Anteil wird häufig als „metabolische dunkle Materie“ bezeichnet.^[12, 21]

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit NMR-basierten Metabolomstudien an dem japanischen Reisfisch Medaka sowie humanen Immunzellen. Für eine detaillierte Einführung in diese Themengebiete soll an dieser Stelle auf spätere Kapitel verwiesen werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 NMR-Spektroskopie

Der Grundstein für die Entwicklung der NMR-Spektroskopie wurde 1946 mit dem ersten Nachweis magnetischer Resonanz von Kernspins gelegt.^[22, 23] Für diese Entdeckung wurden Felix Bloch und Edward Purcell 1952 mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet.^[24] In den Anfängen der NMR-Spektroskopie war die *continuous-wave*-Methode, bei der durch Variation der Frequenz die Resonanzen nacheinander angeregt werden, das verbreitetste Messverfahren.^[25, 26] Die Anwendung der Fourier-Transformationstechnik durch Richard Ernst und Weston Anderson im Jahr 1966 ermöglichte schließlich durch die gleichzeitige Anregung eines breiten Frequenzbands eine wesentlich schnellere Aufnahme der Spektren und somit eine deutliche Steigerung der Empfindlichkeit. Diese Modifikation der Messmethode ebnete den Weg für die moderne NMR-Spektroskopie.^[25, 26] 1991 erhielt Richard Ernst für seine Beiträge zur Entwicklung der Methodik der hochauflösenden NMR-Spektroskopie schließlich den Nobelpreis für Chemie.^[27] Der jüngste Nobelpreis im Bereich der NMR-Spektroskopie ging 2002 an Kurt Wüthrich für die Weiterentwicklung der NMR-Spektroskopie zur Strukturbestimmung von Proteinen in Lösung.^[28] Zu den wichtigsten technischen Verbesserungen in den letzten Jahren zählt insbesondere die Entwicklung von NMR-Spektrometern mit immer höheren Magnetfeldstärken von bis zu 1.2 GHz^[29] und die damit einhergehende Verbesserung der Empfindlichkeit und Auflösung.

2.1.1 Physikalische Grundlagen

Das Funktionsprinzip der Kernspinresonanz beruht auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments eines Atomkerns mit einem äußeren magnetischen Feld. Der Ursprung des magnetischen Moments μ ist der Eigendrehimpuls oder Kernspin P eines Atomkerns. Diese beiden vektoriellen Größen werden über das gyromagnetische Verhältnis γ , eine für jedes Isotop eines jeden Elements charakteristische Konstante, verknüpft:^[26, 30]

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{P} \quad 2.1$$

Nach den Gesetzen der Quantenmechanik ist der Eigendrehimpuls gequantelt:^[26]

$$\vec{P} = \sqrt{I(I + 1)}\hbar \quad 2.2$$

Dabei ist I die Kernspinquantenzahl und $\hbar$ die reduzierte Planck-Konstante. Für Kerne mit einer geraden Anzahl an Protonen und Neutronen, wie beispielsweise dem Kohlenstoff-Isotop ^{12}C , ist die Kernspinquantenzahl null. Somit besitzen diese Kerne nach Formel 2.1 und 2.2 kein magnetisches Moment und können folglich auch nicht NMR-spektroskopisch detektiert werden. Zu den sogenannten NMR-aktiven Kernen gehören alle Isotope mit I ungleich null. Bedeutsame Beispiele sind ^1H und ^{13}C , die eine Kernspinquantenzahl von $I = \frac{1}{2}$ besitzen.^[26, 30]

In einem äußeren statischen Magnetfeld richtet sich das magnetische Moment der Kerne relativ zur Feldrichtung, welche in z -Richtung definiert ist, aus. Die Anzahl möglicher Orientierungen wird durch die Kernspinquantenzahl I des jeweiligen Kerns bestimmt. Zu jeder Kernspinquantenzahl existieren $(2I + 1)$ mögliche Orientierungen, welche wiederum durch eine magnetische Quantenzahl m charakterisiert sind. Diese kann Werte zwischen $-I$ und $+I$ in ganzzahligen Schritten annehmen. Für Kerne mit $I = \frac{1}{2}$ ergeben sich folglich zwei mögliche Orientierungen mit $m = +\frac{1}{2}$ und $m = -\frac{1}{2}$.^[26, 30] Durch den Einfluss des äußeren statischen Magnetfelds B_0 kommt es zu einer Aufspaltung der Energieniveaus dieser beiden Zustände, was als Kern-Zeeman-Effekt bezeichnet wird. Die Energie E der sogenannten Kern-Zeeman-Niveaus ist definiert als:^[26, 30]

$$E = -\mu_z B_0 = -m\gamma\hbar B_0 \quad 2.3$$

Dabei bezeichnet μ_z die Komponente des magnetischen Moments in Feldrichtung z . Für Kerne mit $I = \frac{1}{2}$ und einem positiven gyromagnetischen Verhältnis wie ^1H und ^{13}C ergeben sich nach Formel 2.3 entsprechend der beiden Werte für die magnetische Quantenzahl m wie in Abbildung 2.1 dargestellt folgende zwei Energieniveaus: Der energieärmere α -Zustand mit einer parallelen Ausrichtung von μ_z zur Feldrichtung ($m = +\frac{1}{2}$) und der energiereichere β -Zustand mit einer antiparallelen Ausrichtung von μ_z ($m = -\frac{1}{2}$).^[26, 30] Die Energie, die für einen Übergang von α zu β benötigt wird, ist gegeben durch:^[30]

$$\Delta E_{\alpha \rightarrow \beta} = \gamma\hbar B_0 \quad 2.4$$

Wie aus Formel 2.4 ersichtlich und in Abbildung 2.1 veranschaulicht, ist der Betrag der Zeeman-Aufspaltung proportional zur Feldstärke B_0 , welche auf den betrachteten Kern wirkt.

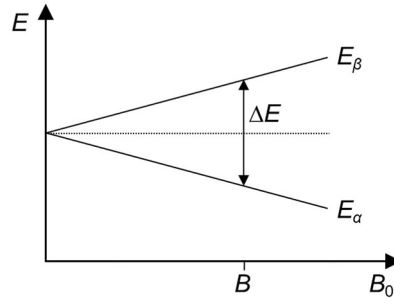


Abbildung 2.1: Kern-Zeeman-Aufspaltung für einen Kern mit $I = \frac{1}{2}$ und einem positiven gyromagnetischen Verhältnis im Magnetfeld B_0 . Dargestellt in Anlehnung an Friebolin.^[26]

Kernresonanz-Phänomene beruhen auf der Anregung von Übergängen der Kernspins zwischen diesen Zuständen. Aus Formel 2.4 ergibt sich zusammen mit der Energie eines Photons $E = h\nu$ (h : Planck-Konstante, ν : Frequenz des Photons) die Frequenz der Strahlung, die erforderlich ist, um einen Übergang von α zu β zu induzieren:^[30]

$$\nu_{\alpha \rightarrow \beta} = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad 2.5$$

Dieser Zusammenhang wird als Resonanzbedingung bezeichnet. Die Frequenz der Strahlung entspricht der sogenannten Larmorfrequenz ν_0 , welche die Präzession des Drehimpulses um das Magnetfeld B_0 beschreibt, wobei diese definitionsgemäß ein negatives Vorzeichen besitzt.^[30]

Das Besetzungsverhältnis der Energieniveaus im Gleichgewicht wird durch die Boltzmannverteilung vorhergesagt:^[30]

$$N_{\alpha,eq} = \frac{1}{2} N \exp\left(\frac{-E_\alpha}{k_B T}\right) \text{ und } N_{\beta,eq} = \frac{1}{2} N \exp\left(\frac{-E_\beta}{k_B T}\right) \quad 2.6$$

Dabei bezeichnen $N_{\alpha,eq}$ und $N_{\beta,eq}$ die Anzahl der Kerne im α - und β -Zustand, E_α und E_β die Energie der beiden Niveaus, N die Gesamtzahl der Kerne im System, k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur. Da der α -Zustand energieärmer ist, resultiert nach der Boltzmannverteilung im Gleichgewichtszustand $N_{\alpha,eq} > N_{\beta,eq}$ und somit eine Gesamtmagnetisierung in z-Richtung.^[30]

2.1.2 Messverfahren

Wenn eine Probe in ein äußeres Magnetfeld B_0 platziert wird, kommt es zu der zuvor beschriebenen Aufspaltung der Energieniveaus der einzelnen Zustände und einer Ausrichtung der magnetischen Momente. Dadurch entsteht eine Gesamtmagnetisierung in Richtung des Magnetfelds.^[30] Durch Anlegen eines schwachen zweiten magnetischen Felds, das mit der Larmorfrequenz oszilliert, wird die Magnetisierung um einen bestimmten Winkel ausgelenkt. Durch einen 90° -Puls wird die Magnetisierung vollständig in die Transversalebene ausgelenkt, woraus eine Quermagnetisierung resultiert. Die Frequenz des eingestrahlten Felds liegt im Radiowellen-Bereich, weshalb dieses auch als Radiofrequenzfeld bezeichnet wird.^[30] Die Resonanzbedingung kann auf verschiedene Arten erreicht werden. Bei dem veralteten *continuous-wave*-Verfahren wird die Frequenz des eingestrahlten Wechselfelds variiert, bis der Resonanzfall eintritt.^[26] Bei modernen Messverfahren, den sogenannten Impuls-Verfahren, wird eine Sequenz hochfrequenter Radiowellenimpulse eingestrahlt. Dadurch werden alle Kerne des jeweiligen Isotops gleichzeitig angeregt. Das Prinzip beruht darauf, dass ein kurzer Puls ein Frequenzband anregt, dessen Frequenzbreite über die Fourier-Beziehung umgekehrt proportional zur Dauer des Pulses ist.^[26] Nach der Anregung mit einem 90° -Puls oszilliert jeder Kernspin mit seiner individuellen Larmorfrequenz in der Transversalebene. Die Summe dieser Oszillationen, also die Präzession des Magnetisierungsvektors, induziert dann über elektromagnetische Induktion Spannung in einer Spule.^[30] Das empfangene Signal wird als FID (freier Induktionsabfall, engl.: *free induction decay*) bezeichnet und kann durch die Fourier-Transformation von einem zeitabhängigen in ein frequenzabhängiges Signal umgewandelt werden.^[30] Die anschließende Rückkehr der Kernspins in den thermischen Grundzustand findet über zwei verschiedene Relaxationsprozesse statt. Die longitudinale Relaxation (auch Spin-Gitter-Relaxation) beschreibt die Rückkehr der z-Magnetisierung in den Gleichgewichtszustand. Die Zeit, die dieser Prozess benötigt, wird als T_1 -Relaxationszeit bezeichnet.^[26, 30] Der Verlust der Phasenkohärenz zwischen den Kernspins, also die Rückkehr der Quermagnetisierung in ihren Gleichgewichtszustand, wird als transversale Relaxation (auch Spin-Spin-Relaxation) bezeichnet. Die hierfür benötigte Zeit wird T_2 -Relaxationszeit genannt.^[26, 30] Die Relaxationszeit eines Moleküls ist von der Rotationskorrelationszeit τ_c abhängig, welche die durchschnittliche Zeit bezeichnet, die ein Molekül für eine Drehung um einen Radiant benötigt. Für kleine, schnell rotierende Moleküle und somit sehr kleine τ_c -Werte sind T_1 und T_2 nahezu gleich und nehmen mit größer werdenden Werten für τ_c zunächst

gleichermaßen ab. Mit weiter zunehmenden Werten von τ_c durchläuft T_1 ein Minimum und nimmt wieder zu, wohingegen T_2 weiterhin nahezu linear abnimmt. So können bei langsam rotierenden Molekülen wie biologischen Makromolekülen die T_1 -Relaxationszeiten wiederum recht lang sein, während die T_2 -Zeiten deutlich kürzer sind.^[26, 31] Da die T_2 -Zeit immer kürzer ist als die T_1 -Zeit, wird letztere als Maß für die Zeit herangezogen, die für die Rückkehr der Kernspins in den thermischen Grundzustand benötigt wird.^[26, 30]

2.1.3 Spektrale Parameter

Im Folgenden werden kurz verschiedene Parameter erläutert, die für die Auswertung von ^1H -NMR-Spektren von Bedeutung sind. Hierzu gehören die chemische Verschiebung und die skalare Kopplung, welche wichtige Informationen für die Strukturaufklärung von Molekülen liefern. Die Qualität eines Spektrums kann über die Linienbreite sowie die Empfindlichkeit beziehungsweise das Signal-zu-Rausch Verhältnis beurteilt werden.

Die Resonanzfrequenz jedes Kerns wird von der jeweiligen chemischen Umgebung beeinflusst. Aufgrund von Sekundärfeldern, welche durch die chemische Umgebung induziert und durch die Abschirmkonstante σ beschrieben werden, wirkt am Kernort in der Regel ein schwächeres Magnetfeld B_{eff} als das angelegte Magnetfeld B_0 .^[26]

$$B_{\text{eff}} = B_0 - \sigma B_0 \quad 2.7$$

Im Umkehrschluss erlaubt die Messung der Resonanzfrequenz somit Rückschlüsse auf die chemische Natur des untersuchten Kerns. Üblicherweise wird die Resonanzfrequenz eines Kerns (ν_{Substanz}) in NMR-Spektren in Bezug auf die Resonanzfrequenz einer Referenzsubstanz (ν_{Referenz}) dargestellt, wodurch sie unabhängig von der Feldstärke des verwendeten Magneten ist. Als Referenzkomponente wird in der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie wässriger Lösungen üblicherweise TSP (Trimethylsilylpropionat) eingesetzt. Die daraus resultierende Position des Resonanzsignals einer Komponente im NMR-Spektrum wird als chemische Verschiebung δ angegeben. Da die Resonanzfrequenzen im Bereich von Megahertz, die Unterschiede aber im Bereich von Hertz liegen, wird der Wert mit 10^6 multipliziert und in ppm (engl.: *parts per million*) ausgedrückt.^[26, 30]

$$\delta \text{ (ppm)} = 10^6 \times \frac{\nu_{\text{Substanz}} - \nu_{\text{Referenz}}}{\nu_{\text{Referenz}}} \quad 2.8$$

Die Wechselwirkung benachbarter Kernspins über kovalente Bindungen hinweg, die sogenannte skalare Kopplung oder J -Kopplung, führt zu einer Aufspaltung der Signale im NMR-Spektrum zu Multipletts.^[26, 30] Dieser Effekt beruht darauf, dass für jeden Kern abhängig von der Ausrichtung der benachbarten Kernspins das lokale Magnetfeld leicht unterschiedlich ist, wodurch sich gemäß der Resonanzbedingung (Gleichung 2.5) auch die Resonanzfrequenz ändert. Ein Maß für die Größe der Wechselwirkung ist die Kopplungskonstante J . Wenn der Frequenzabstand der koppelnden Kernspins deutlich größer ist als die Kopplungskonstante, handelt es sich um Spektren erster Ordnung, auf welche sich die folgenden Erläuterungen beschränken sollen. Die skalare Kopplung wird durch maximal 3–4 Bindungen vermittelt und kann nur zwischen Kernen beobachtet werden, die chemisch nicht äquivalent sind. Für Kerne mit $I = \frac{1}{2}$ wird das Signal durch Kopplung mit n äquivalenten Kernen in ein $n+1$ -Multiplett mit Intensitätsverhältnissen entsprechend dem Pascalschen Dreieck aufgespalten. Folglich erscheint beispielsweise in einem ^1H -NMR-Spektrum das Resonanzsignal eines Wasserstoffatoms mit einer benachbarten CH-Gruppe als Dublett, während eine CH_2 -Gruppe ein Triplet und eine CH_3 -Gruppe ein Quartett erzeugt.^[26, 30] Somit geben das Kopplungsmuster sowie die Kopplungskonstante Aufschluss über die Konnektivität der Atome in einem Molekül.

Damit die einzelnen Signale beziehungsweise Multipletts klar voneinander getrennt sind, ist eine hohe Auflösung des Spektrums, das heißt eine geringe Linienbreite der einzelnen Resonanzsignale notwendig. Die Linienbreite bei halber Signalamplitude $\Delta\nu_{1/2}$ eines Resonanzsignals ist abhängig von der T_2 -Relaxationszeit:^[30]

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2} \quad 2.9$$

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, nimmt die T_2 -Zeit mit der Rotationskorrelationszeit und somit auch der Molekülgröße ab. Dies hat zur Folge, dass die Linienbreite mit zunehmender Molekülgröße steigt.

Ein inhärentes Problem der NMR-Spektroskopie ist die geringe Empfindlichkeit im Vergleich zu vielen anderen Spektroskopie-Methoden. Ursache hierfür ist der geringe Energieunterschied zwischen den Zeeman-Niveaus. Somit ist nach der Boltzmannverteilung (vergleiche Formel 2.6) auch der Populationsunterschied zwischen den Niveaus gering ($N_{\beta,\text{eq}}/N_{\alpha,\text{eq}} \approx 0.99995$ für Protonen bei $T = 300\text{ K}$ und $B_0 = 7.05\text{ T}$ beziehungsweise einer

Resonanzfrequenz von 300 MHz).^[26] Dies resultiert in einer schwachen Gesamtmagnetisierung und folglich einer geringen Messgröße. Da der Energieunterschied von der Stärke des Magnetfelds abhängt (vergleiche Formel 2.4 und Abbildung 2.1), kann die Empfindlichkeit von NMR-Spektrometern durch den Einsatz leistungsfähigerer Magnetsysteme, welche die Erzeugung höherer Feldstärken erlauben, verbessert werden.^[26]

Dargestellt wird die Empfindlichkeit einer NMR-Messung durch das Signal-zu-Rausch Verhältnis (SNR, engl.: *signal to noise ratio*). Dieses berechnet sich über:^[32]

$$\text{SNR} = \frac{N\gamma_{\text{ext}}T_2(\gamma_{\text{det}}B_0)^{3/2}\sqrt{NS}}{T} \quad 2.10$$

Neben dem oben beschriebenen Einfluss des magnetischen Felds B_0 ist die Empfindlichkeit einer NMR-Messung folglich abhängig von der Anzahl der Spins N im System, dem gyromagnetischen Verhältnis des angeregten (γ_{ext}) beziehungsweise detektierten (γ_{det}) Kerns, der Anzahl der Scans NS (engl.: *number of scans*), der transversalen Relaxationszeit T_2 sowie der Temperatur der Probe T .^[32] Nach Formel 2.10 kann die Empfindlichkeit NMR-spektroskopischer Methoden bei gegebener Magnetfeldstärke in einem festgelegten System somit nur durch eine Erhöhung der Scanzahl verbessert werden. Aufgrund des quadratischen Zusammenhangs zwischen Scanzahl und Signal-zu-Rausch Verhältnis führt dies jedoch zu einer erheblichen Verlängerung der Messdauer, weshalb man dabei in der Praxis schnell die Grenze der Machbarkeit erreicht.

2.1.4 Quantitative NMR-Spektroskopie

Neben dem qualitativen Einsatz der NMR-Spektroskopie als Methode zur Strukturaufklärung auf Basis von Kopplungseffekten und der chemischen Verschiebung wird sie auch immer häufiger als quantitative Analytikmethode eingesetzt. Die quantitative NMR-Spektroskopie beruht auf der Tatsache, dass die Fläche eines Resonanzsignals I direkt proportional zur Anzahl der Kerne N ist, die das Signal im NMR-Spektrum erzeugen. Der Proportionalitätsfaktor entspricht dabei der Spektrometerkonstanten.^[32, 33] Unter optimierten Bedingungen besitzt diese Konstante in einem ^1H -NMR-Spektrum für alle Signale denselben Wert.

Folglich kann das molare Verhältnis n_x/n_y zweier Substanzen X und Y berechnet werden über:^[33]

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{I_x}{I_y} \frac{N_y}{N_x} \quad 2.11$$

Die quantitative Genauigkeit wird von verschiedenen experimentellen Parametern wie der Pulssequenz, den Aufnahmeparametern sowie den Prozessierungsparametern beeinflusst. Ein wichtiger Einflussfaktor ist die Repetitionszeit. Diese setzt sich aus der Relaxationsverzögerung (engl.: *relaxation delay*) und der Akquisitionszeit zusammen und definiert die Gesamtzeit für die Aufnahme eines Spektrums mit einem Scan.^[32] Um 99 % der Gleichgewichtsmagnetisierung zu messen und somit eine hohe quantitative Genauigkeit zu erreichen, sollte die Repetitionszeit bei Verwendung eines 90°-Pulses etwa der Fünffachen T_1 -Zeit der am langsamsten relaxierenden Protonen in der Probe entsprechen.^[30] Bei mittelgroßen organischen Molekülen mit einer Molekülmasse von einigen hundert Gramm pro Mol liegt die T_1 -Zeit im Bereich von 0.5–5 Sekunden.^[31]

Die quantitative Analyse mittels NMR-Spektroskopie erfordert die Verwendung einer Referenz mit bekannter Konzentration. Dabei gibt es zahlreiche Möglichkeiten, wobei im Folgenden nur auf zwei, im Rahmen dieser Arbeit relevanten, Methoden eingegangen werden soll.^[32] i) Bei dem Einsatz eines internen Standards wird eine bekannte Menge einer Referenzsubstanz direkt im Probenvolumen gelöst. Nach Aufnahme des NMR-Spektrums kann die in der Probe enthaltene Stoffmenge des Analyten über Formel 2.11 berechnet werden. Die wichtigste Voraussetzung für die Wahl der Referenzsubstanz ist, dass es zu keiner chemischen Wechselwirkung zwischen Standard und Substanzen in der Probenlösung kommt. Des Weiteren sollte das Resonanzsignal des Standards im NMR-Spektrum separiert von den Resonanzsignalen der Analyten sowie des Lösungsmittels vorliegen. TSP wird häufig in wässrigen Lösungen als Referenzsubstanz für die chemische Verschiebung als auch die Quantifizierung verwendet. Allerdings interagiert TSP mit Proteinen und Fettsäuren, welche in den meisten biologischen Proben vorhanden sind. Dadurch kann die Genauigkeit der Quantifizierung beeinflusst werden.^[32] ii) Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Konzentration eines Analyten ist das Erstellen einer Kalibrierfunktion. Anstelle einer unspezifischen Referenzsubstanz wird dabei die zu quantifizierende Substanz verwendet, von welcher eine Verdünnungsreihe erstellt wird. Die verwendete Lösung sollte eine

Zusammensetzung aufweisen, die mit derjenigen der Analytlösung vergleichbar ist.^[32] Die Kalibrierung erfolgt anschließend durch Ermittlung des Signals (der abhängigen Variable y) in Abhängigkeit von der Konzentration (der unabhängigen Variable x). Bei Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen den beiden Größen kann dieser, mithilfe der regressionsanalytischen Methode der kleinsten Quadrate, über eine Gerade mit der Gleichung $y = bx + a$ (a : y -Achsenabschnitt, b : Steigung) dargestellt werden. Diese Gleichung ermöglicht wiederum die Berechnung der Analytkonzentration anhand des entsprechenden Signals in der zu untersuchenden Probe.^[32, 34] Die Linearität einer Kalibrierfunktion wird typischerweise über den Korrelationskoeffizienten R oder das Bestimmtheitsmaß R^2 beurteilt.^[34] Andere Parameter zur Beurteilung der Güte eines linearen Anpassungsmodells stellen die Reststandardabweichung, welche die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade beschreibt, sowie der daraus berechnete Verfahrensvariationskoeffizient dar. Dieser ist ein Maß für die relative Präzision der Kalibrierung.^[35] Die Verwendung einer Kalibrierfunktion bietet gegenüber anderen Methoden den Vorteil, dass die Repetitionszeit deutlich kürzer gewählt werden kann, da durch die Kalibrierung der Einfluss unterschiedlicher Relaxationszeiten nicht beachtet werden muss. Der große Nachteil dieser Methode ist, dass für jeden Analyten eine neue Kalibrierfunktion erstellt werden muss.^[32]

2.1.5 Ein- und zweidimensionale NMR-Experimente

Die am häufigsten verwendete NMR-Methode bei Metabolomstudien ist die eindimensionale ^1H -NMR-Spektroskopie.^[12, 16] Dies ist zunächst darauf zurückzuführen, dass ^1H -Atome in fast jeder organischen Verbindung, und damit auch in nahezu jedem bekannten Metaboliten, vorkommen.^[16] Des Weiteren weisen ^1H -Kerne ein hohes gyromagnetisches Verhältnis und eine natürlich vorkommende Häufigkeit von 99.99 % auf, wodurch diese Kerne mit einer für die NMR-Spektroskopie relativ großen Empfindlichkeit detektiert werden können.^[26, 30] Bei Proben mit einem hohen Anteil an Proteinen und Lipoproteinen, wie beispielsweise Blutproben, können bei der Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren spezielle Pulssequenzen wie die Carr-Purcel-Meiboom-Gill (CPMG) Pulssequenz zum Einsatz kommen. Diese unterdrückt die Resonanzsignale aller Moleküle mit kurzen T_2 -Zeiten, welche Makromoleküle wie Proteine und Lipoproteine umfassen. Dies ermöglicht einen deutlich besseren Nachweis niedermolekularer Metaboliten.^[13, 17]

Da die Proben bei Metabolomstudien üblicherweise in Wasser vorliegen und die Intensität des Wassersignals um ein vielfaches größer ist als die Signalintensität der interessierenden Substanzen, ist die Unterdrückung des Wassersignals ebenfalls ein wichtiger Aspekt bei der Aufnahme der NMR-Spektren.^[16, 36] Die am weitesten verbreitete Methode zur Unterdrückung von Lösungsmittelsignalen ist die Vorsättigung, bei welcher vor Aufnahme des Spektrums ein relativ langer Puls mit geringer Leistung mit der Frequenz des Lösungsmittelsignals eingestrahlt wird. Das Anregungsprofil dieses Pulses ist aufgrund seiner Länge sehr schmal und sättigt die Wasserresonanz somit selektiv, wodurch die Signalintensität stark reduziert wird. Trotz der Selektivität kann es dadurch aber auch zu einer Sättigung der Signale anderer Substanzen mit ähnlicher Resonanzfrequenz kommen.^[26, 36] Durch Verwendung von deuteriertem Wasser kann die Intensität des Wassersignals deutlich verringert und die Unterdrückung des Signals somit verbessert werden.^[16, 26] Zweidimensionale NMR-Methoden können darüber hinaus bei der eindeutigen Identifizierung von Substanzen in komplexen Gemischen helfen.^[16] Das einfachste zweidimensionale Experiment ist das homonukleare COSY-Experiment (engl.: *correlated spectroscopy*), bei welchem gleichartige Kerne, meist Wasserstoffatome, über skalare Kopplungen miteinander korreliert werden. Dadurch erhält man Informationen darüber, welche Wasserstoffatome über chemische Bindungen benachbart sind. Bei heteronuklearen Experimenten, wie dem HSQC (engl.: *heteronuclear single quantum coherence*) wird die Korrelation verschiedener Kernarten, wie zum Beispiel ^1H und ^{13}C dargestellt. Dadurch kann identifiziert werden, welches Wasserstoffatom an welches Kohlenstoffatom gebunden ist. Ein JRES (engl.: *J-resolved spectroscopy*) Experiment ermöglicht die gemeinsame Darstellung von chemischen Verschiebungen und *J*-Kopplungen in einem zweidimensionalen NMR-Spektrum.^[16]

2.2 Statistische Datenauswertung

Bei der statistischen Datenauswertung wird grundsätzlich zwischen univariaten und multivariaten Methoden unterschieden. Wie in den folgenden Unterkapiteln erläutert, wird bei univariaten Methoden jede variable Größe des Datensatzes für sich betrachtet, während bei multivariaten Methoden mehrere Variablen gemeinsam betrachtet werden.

2.2.1 Prozessierung der Daten

Im Vorfeld der statistischen Datenanalyse müssen die Rohdaten eine Reihe von Prozessierungsschritten durchlaufen. Ein NMR-Spektrum kann mehrere tausend Punkte und damit Variablen enthalten. Um die Dimensionalität der Daten zu reduzieren, werden die Spektren üblicherweise in einzelne Bereiche, sogenannte *bins* oder *buckets*, eingeteilt. Diese Methode bietet zudem den Vorteil, dass kleinere Verschiebungen der Resonanzsignale zwischen den einzelnen NMR-Spektren die statistische Auswertung nicht beeinträchtigen, solange diese Verschiebungen innerhalb eines *buckets* liegen. Anschließend wird die Gesamtfläche innerhalb jedes Bereichs berechnet, um das ursprüngliche Spektrum darzustellen.^[37] Es gibt verschiedene Methoden, ein NMR-Spektrum in *buckets* einzuteilen. Dazu gehören automatisierte Methoden wie eine Einteilung in Bereiche, welche eine jeweils gleich große chemische Verschiebung abdecken.^[37] Auch wurden bereits verschiedene Methoden implementiert, welche die jeweiligen Grenzen anhand des vorliegenden Signalmusters berechnen, was als intelligentes *binning* bezeichnet wird.^[37, 38] Eine weitere Methode umfasst die manuelle Einteilung des Spektrums in relevante Bereiche (ROIs, engl.: *regions of interest*). ROIs können annotierten Resonanzsignalen, also bekannten Verbindungen, oder auch zum Zeitpunkt der Analyse unbekannten Verbindungen entsprechen. Im Gegensatz zu den zuvor erwähnten Methoden werden die einzelnen Signale eines Multipletts dabei nicht auf mehrere *buckets* aufgeteilt. Folglich kann die Fläche unter einem solchen ROI als Maß für die relative Häufigkeit des jeweiligen Metaboliten in einer biologischen Probe angesehen werden.^[37] Aufgrund der enormen Anzahl an Metaboliten in biologischen Proben liegen in den ¹H-NMR-Spektren eine Vielzahl sich überschneidender Resonanzsignale vor. Eine Auftrennung überlagerter Resonanzsignale kann mithilfe sogenannter Dekonvolutionsmethoden erreicht werden.^[37] Auch wenn es aktuell bereits

verschiedene Methoden zur Dekonvolution von ^1H -NMR-Spektren gibt,^[37, 39] stellt diese immer noch eine große Herausforderung dar. Großes Potenzial könnten in diesem Zusammenhang die aktuellen Fortschritte im Bereich der künstlichen Intelligenz bieten. So wurde erst kürzlich für die Dekonvolution von NMR-Spektren eine sogenannte *deep learning* Methode vorgestellt, die auf künstlichen neuronalen Netzwerken basiert.^[40]

Aufgrund von Unterschieden hinsichtlich der Probenmenge (z.B. bei Zell- oder Gewebeproben) oder der Verdünnung (z.B. bei Urinproben) kann es zu Schwankungen in der Metabolitenkonzentration einzelner Proben kommen. Um diesen sogenannten Verdünnungseffekt zu eliminieren und eine Vergleichbarkeit der Proben zu schaffen, muss eine Normalisierung der Daten erfolgen.^[37, 41] Eine gängige Methode ist die Normalisierung auf die Gesamtintensität (*constant-sum normalization* oder *normalization by sum*), bei welcher das Gesamtintegral jedes Spektrums auf den selben Wert gesetzt und jedes *bucket* als Bruchteil des Gesamtintegrals ausgedrückt wird.^[37, 41] Auch die probabilistische Quotienten-Normalisierung (PQN, engl.: *probabilistic quotient normalization*) findet breite Anwendung.^[42] Bei dieser Methode wird für jede Probe über den Vergleich mit einem Referenzspektrum der wahrscheinlichste Verdünnungsfaktor berechnet. Als Referenzspektrum kann zum Beispiel das Median-Spektrum von Kontrollproben dienen. Dieser Ansatz beruht auf der Annahme, dass Änderungen der Konzentration einzelner Analyten nur Teile der Spektren beeinflussen, während Änderungen der Gesamtkonzentration einer Probe Auswirkungen auf das gesamte Spektrum haben. Besonders bei starken Schwankungen einzelner Metaboliten zwischen den Proben ist die PQN-Methode somit der Normalisierung auf die Gesamtintensität überlegen.^[42] Vor der Anwendung multivariater Methoden müssen die Daten außerdem zentriert und skaliert werden. Dadurch wird gewährleistet, dass große relative Variationen bei Signalen mit geringer Intensität nicht von kleinen relativen Variationen bei Signalen mit hoher Intensität, deren absolute Variation dennoch groß und somit dominant ist, überlagert und somit übersehen werden.^[37] Dafür wird bei der Zentrierung für jeden Wert zuerst der Abstand zum Mittelwert berechnet. Anschließend wird für jede Variable ein Skalierungsfaktor berechnet, der die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Variablen in Werte relativ zum Skalierungsfaktor transformiert. Ein Beispiel hierfür ist die Autoskalierung (*unit variance scaling*), bei welcher die Standardabweichung als Skalierungsfaktor dient. Nach der Autoskalierung sind die Daten dimensionslos und werden auf Basis von Korrelationen anstatt

von Kovarianzen analysiert. Außerdem werden in diesem Fall alle Variablen als gleich relevant angesehen.^[43] Bei der Paretoskalierung dagegen wird die Wurzel der Standardabweichung als Skalierungsfaktor verwendet, wodurch Variablen mit großer absoluter Variation eine höhere Wichtigkeit behalten als Variablen mit kleinerer absoluter Variation.^[43] Wenn eine verzerrte Verteilung der Daten vorliegt, können zusätzliche Skalierungsmethoden wie eine logarithmische Transformation angewendet werden.^[43] Jede der genannten Normalisierungs- und Skalierungsmethoden betont unterschiedliche Aspekte der Daten, wodurch sich die Wahl der Methode auch auf das Ergebnis der statistischen Datenanalyse auswirken kann.^[41, 43]

2.2.2 Hypothesentests

Metabolomik-Studien haben typischerweise das Ziel aus Beobachtungen, die anhand einer begrenzten Anzahl an Daten gemacht werden, allgemeine Regeln abzuleiten. Dafür wird eine Hypothese aufgestellt, die mit statistischen Methoden auf Basis eines Datensatzes geprüft wird. Bei univariaten Tests wird beispielsweise die Hypothese überprüft, dass ein Unterschied in der durchschnittlichen Konzentration des jeweils betrachteten Metaboliten zwischen eingeteilten Gruppen vorliegt. Sofern ein Unterschied beobachtet wird, muss, da sich die Beobachtung nur auf eine begrenzte Anzahl von Stichproben stützt, mithilfe statistischer Methoden abgeschätzt werden, ob die Beobachtung die ursprüngliche Hypothese stützt, oder nur dem Zufall zuzuschreiben ist.^[44] Dafür wird zunächst angenommen, dass die Verteilung der beobachteten Variablen bei allen Proben gleich ist und nur der Zufall für die beobachteten Unterschiede verantwortlich ist. Diese Annahme wird als Nullhypothese (H_0) bezeichnet. Eine geringe Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese deutet darauf hin, dass die beiden Gruppen tatsächlich unterschiedliche Mittelwerte aufweisen, sodass H_0 verworfen und die Alternativhypothese (H_1) angenommen werden kann.^[44] Die im Rahmen solcher Untersuchungen angewendeten Testverfahren liefern den viel diskutierten p -Wert, welcher die Wahrscheinlichkeit darstellt, einen Unterschied zu erhalten, der mindestens so groß ist wie der beobachtete Unterschied wenn die Nullhypothese wahr ist. Da immer die Möglichkeit besteht, dass Unterschiede zwischen den beiden Stichproben rein zufällig sind, kann ein solcher p -Wert nie den Wert null erreichen. Daher wird ein Signifikanzniveau α festgelegt, ab dessen ein Ergebnis als signifikant angesehen wird, wobei ein p -Wert kleiner als α bedeutet, dass man H_0 mit einem Vertrauensniveau von $1-\alpha$ zurückweist.^[44] Die Verwendung von

p -Werten als Kriterium für statistische Signifikanz ist weit verbreitet, wobei aus historischen Gründen üblicherweise ein Grenzwert von $\alpha = 0.05$ festgelegt wird.^[45, 46] Allerdings wird die Verwendung von p -Werten heutzutage kontrovers diskutiert. Dabei wird insbesondere kritisiert, dass in vielen Studien der p -Wert als einziges Kriterium für die Relevanz einer Beobachtung herangezogen wird, wobei das Signifikanzniveau α , obwohl es sich dabei um einen willkürlich gewählten Wert handelt, als starre Grenze angesehen wird.^[46, 47] Um die Reproduzierbarkeit wissenschaftlicher Studien zu verbessern wurde beispielsweise empfohlen, niedrigere Grenzwerte festzulegen.^[45] Andere Autoren haben vorgeschlagen, feste Grenzwerte zu vermeiden und p -Werte stattdessen als kontinuierliche Maße für die Stärke der Evidenz gegen die Nullhypothese zu interpretieren.^[48]

Wenn mehrere Hypothesen gleichzeitig getestet werden, wie beispielsweise bei der Betrachtung mehrerer Variablen, nimmt die Wahrscheinlichkeit für falsch-positive Ergebnisse zu, weshalb α angepasst werden sollte.^[44] Dies kann durch die Kontrolle der sogenannten *family-wise error rate*, der Wahrscheinlichkeit, dass bei der Testung multipler Hypothesen ein oder mehrere falsch-positive Entdeckungen gemacht werden, geschehen. Die wohl bekannteste Methode ist die Bonferroni-Korrektur, bei welcher α proportional zur Anzahl der Variablen N reduziert und der Grenzwert auf α/N festgelegt wird. Diese Methode ist aufgrund ihrer Einfachheit zwar attraktiv, aber insbesondere bei Experimenten mit vielen Variablen sehr streng, was zu einer geringeren Teststärke (die Wahrscheinlichkeit, dass ein vorliegender Unterschied tatsächlich entdeckt wird) führt.^[44, 49] Eine liberalere Methode stellt die Kontrolle der *false discovery rate* (FDR) dar, die den erwarteten Anteil falsch-positiver Entdeckungen bei multiplen Testungen kontrolliert. Die höhere Teststärke geht allerdings mit einer höheren Rate falsch-positiver Entdeckungen einher.^[44, 49, 50]

2.2.3 Univariate Methoden

Bei einer univariaten Analyse der Daten wird jede variable Größe des Datensatzes für sich betrachtet und durch bestimmte Kennzahlen, die sogenannten Lage- und Streuungsmaße, beschrieben.^[51] Die einfachsten Lagemaße sind der kleinste und größte Merkmalswert einer Verteilung. Ein repräsentativer Kennwert für die Stichprobenelemente wird über den Mittelwert festgelegt. Dabei gibt es drei gängige Mittelwerte, welchen verschiedene

Definitionen zugrunde liegen. Das arithmetische Mittel stellt den Durchschnitt aller Werte dar und berechnet sich, indem die Summe aller Werte durch deren Anzahl dividiert wird. Der Median zeigt den Wert innerhalb einer Verteilung an, welcher genau in der Mitte aller Werte liegt. Der häufigste Wert einer Verteilung wird schließlich als Modalwert bezeichnet.^[51] Weitere Kennzahlen einer Stichprobe sind die Quantile. Sie unterteilen eine Datenreihe so, dass ein bestimmter Anteil der Werte unter oder über einer definierten Grenze liegt. Eine besondere Form von Quantilen sind die Quartile, welche die Datenreihe in vier gleich große Teile unterteilen. Sie werden bezeichnet als unteres Quartil (25 %-Quantil), mittleres Quartil (50 %-Quantil), welches dem Median entspricht, und oberes Quartil (75 %-Quantil).^[51] Maße für die Streuung der Stichprobenelemente stellen die Spannweite, der Interquartilabstand, die Varianz sowie die Standardabweichung dar. Die Spannweite ist die Differenz zwischen dem größten und kleinsten Merkmalswert, wohingegen der Interquartilabstand als Differenz aus dem oberen und unteren Quartil definiert ist. Die Varianz berechnet sich als Quadrat des durchschnittlichen Abstands der Werte vom Mittelwert. Die Standardabweichung ist schließlich die Quadratwurzel der Varianz.^[51]

Um den Wert einer Variablen zwischen verschiedenen Datensätzen graphisch zu vergleichen, wird häufig der sogenannte Box-Plot (Abbildung 2.2) genutzt. Dieser zeigt den Median, das untere und obere Quartil, den kleinsten und größten Merkmalswert sowie mögliche Extremwerte einer Verteilung. Der Median und die Quartile bieten im Gegensatz zu dem arithmetischen Mittelwert und der Standardabweichung den Vorteil, dass sie robust gegenüber Extremwerten sind und somit aussagekräftige Indikatoren für die zentrale Tendenz einer Verteilung darstellen.^[51]

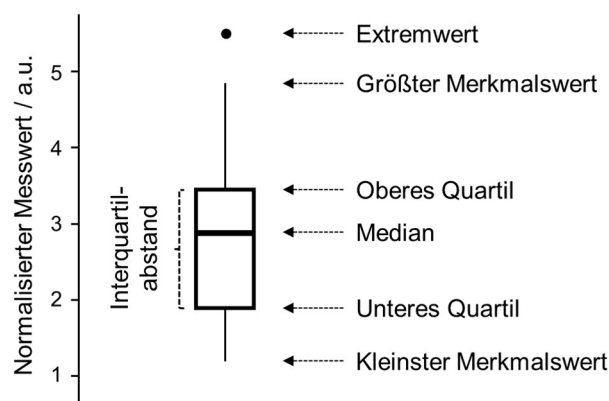


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Box-Plots mit den charakteristischen Lagemaßen.

Der absolute Unterschied in der durchschnittlichen relativen Konzentration eines Metaboliten zwischen zwei Populationen wird als *fold change* (FC) bezeichnet. Je größer der FC, desto größer ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen.^[52] Ein Hypothesentest zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den Mittelwerten zweier Populationen ist der sogenannte *t*-Test. Das Ergebnis dieses Verfahrens ist der zuvor beschriebene *p*-Wert.^[44, 49] Bei der ANOVA (Varianzanalyse, engl.: *analysis of variance*) dagegen werden die Mittelwerte von drei oder mehr Gruppen verglichen. Dabei wird mit einem *F*-Test die Variation zwischen den Mittelwerten mit der Variation innerhalb der Gruppen in Relation gesetzt. Folglich impliziert ein höherer *F*-Wert größere Unterschiede.^[53] Darüber hinaus wird bei statistischen Tests häufig auch die sogenannte Effektstärke angegeben, welche den Anteil der Variabilität in der Konzentration einer Substanz angibt, der durch die Gruppenzugehörigkeit erklärt wird. Zur Messung der Effektstärke können dabei unterschiedliche Effektmaße verwendet werden.^[54]

Abhängig von der Annahme der Daten bezüglich der Normalverteilung sind verschiedene univariate Tests möglich. So beruhen parametrische Tests wie der *t*-Test auf der Annahme der Normalverteilung der Daten, während die nicht-parametrischen Test wie der Mann-Whitney-*U*-Test von keiner bestimmten Verteilungspopulation ausgehen. Die nicht-parametrischen Tests sind jedoch weniger leistungsfähig und können somit leichter Unterschiede übersehen.^[44] Außerdem können unterschiedliche Tests durchgeführt werden abhängig davon, ob die Stichproben in den beiden Populationen unabhängig voneinander sind oder nicht. Eine Abhängigkeit liegt beispielsweise vor, wenn von denselben Individuen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten Daten erhoben werden, beispielsweise vor und nach einer Behandlung.^[55, 56] Für unabhängige Stichproben werden bei normalverteilten Daten der Zweistichproben-*t*-Test (*two-sample t-test*) beziehungsweise die ANOVA verwendet. Für abhängige Stichproben kommen der gepaarte *t*-Test (*paired t-test*) beziehungsweise die ANOVA mit Messwiederholungen (*repeated measures ANOVA*) zum Einsatz.^[53, 55, 56]

2.2.4 Multivariate Methoden

Da Metabolomik-Studien im Allgemeinen komplexe Datensätze generieren, werden neben der univariaten Analyse auch spezielle Formen der multivariaten Datenanalyse, wie die Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl.: *principal component analysis*) und die *partial least squares discriminant analysis* (PLS-DA) erforderlich.^[57] Das übergeordnete Ziel der PCA ist, aus einem komplexen Datensatz Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den einzelnen Proben sowie mögliche Gruppierungen, die sich auf beliebige biologisch relevante Klassifikationen beziehen, zu identifizieren. Die Technik der PCA ermöglicht, die Dimensionalität eines solchen Datensatzes unter Beibehaltung der Varianz zu reduzieren. Diese Reduktion erfolgt über Linearkombinationen der Ausgangsvariablen, aus denen eine neue Menge unkorrelierter Hauptkomponenten (PCs, engl.: *principal components*) resultiert. Die erste Hauptkomponente enthält dabei den größten Teil der Varianz des Datensatzes, mit steigender Hauptkomponentenzahl nimmt die Varianz ab. Bei der PCA handelt es sich um eine unüberwachte Methode (*unsupervised method*), das heißt eine Unterteilung in die verschiedenen Gruppen tritt nur auf, wenn die Varianz zwischen den Gruppen deutlich größer ist als die Varianz innerhalb einer Gruppe. Da sie einen unvoreingenommenen Überblick über die Informationen in einem Datensatz ermöglicht, kommt sie typischerweise bei explorativen Studien zum Einsatz, bei denen zuvor keine Kenntnisse über die zu erwartenden Unterschiede vorliegen.^[57] Die PLS-DA dagegen ist eine überwachte Methode (*supervised method*), welche wie die PCA eine Dimensionsreduktion durchführt, dabei allerdings die Klassenzugehörigkeit der Proben in die Auswertung mit einbezieht. Dadurch kommt es typischerweise zu einer deutlicheren Trennung der Gruppen, wodurch die Unterschiede besser ersichtlich werden. Allerdings kann dadurch auch eine rein zufällige Trennung der Gruppen entstehen, weshalb die PLS-DA immer in Korrelation mit der PCA betrachtet werden sollte.^[57] Anhand verschiedener Diagramme können die Ergebnisse der multivariaten Analysemethoden visuell dargestellt werden (vergleiche Abbildung 2.3). In einem zweidimensionalen *scores plot* werden die einzelnen Proben auf eine Ebene projiziert, die durch die Hauptkomponenten aufgespannt wird. Dadurch können vorhandene Gruppierungen der Proben ermittelt werden. Der *loadings plot* stellt den Einfluss der einzelnen Variablen auf die jeweilige Hauptkomponente dar. Aufgrund des ergänzenden Charakters dieser beiden Darstellungsmethoden können somit für die Einteilung der Gruppen verantwortliche Metaboliten identifiziert werden.^[57]

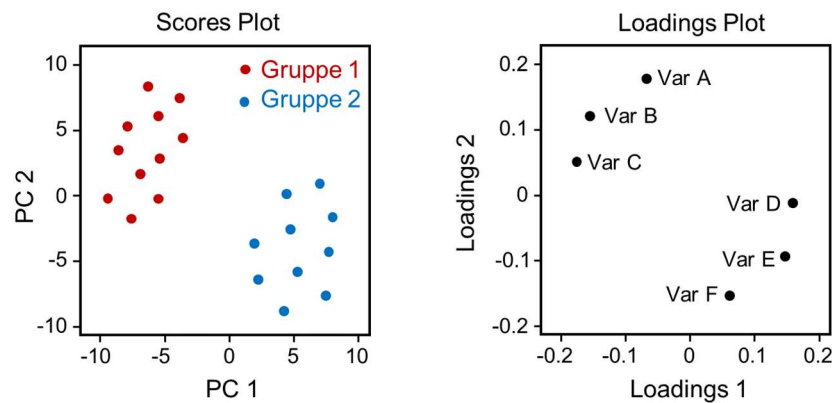


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines *scores plots* und eines *loadings plots*. Im *scores plot* ist jede Probe als Punkt dargestellt, die Position ergibt sich aus den beiden Hauptkomponenten PC 1 und PC 2. Der *loadings plot* zeigt den Beitrag jeder Variablen (Var) zu der jeweiligen Hauptkomponente.

Bei PLS-DA-Modellen ist außerdem der *VIP-score* (engl.: *variable importance in projection*) ein wichtiges Maß für die Bedeutung der einzelnen Variablen. Er fasst den Beitrag zusammen, den eine Variable zum Modell leistet, wobei Variablen mit einem hohen *VIP-score* den größten Einfluss haben und Variablen mit Werten größer als 1 typischerweise als wichtig angesehen werden.^[58] Da die PLS-DA auch zu einer rein zufälligen Trennung der Gruppen führen kann, muss die Vorhersagekraft des Modells bewertet werden. Ein spezielles Verfahren hierfür ist die Kreuzvalidierung (*cross validation*), bei welcher eine zufällige Zuordnung der Proben in eine zuvor festgelegte Anzahl an Untergruppen durchgeführt und das prognostizierte Ergebnis mit dem Ergebnis der tatsächlichen Zuordnung verglichen wird. Als Ergebnis der Kreuzvalidierung werden typischerweise der Q^2 - (Güte der Vorhersage) und der R^2 -Wert (Güte der Anpassung) angegeben, über welche die Vorhersagekraft des Modells abgeschätzt wird. Beide Parameter können Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Im Falle von R^2 bedeutet 1 ein perfekt angepasstes Modell und 0 keinerlei Anpassung, wobei es keinen genau definierten Vergleichsstandard gibt. Bei Q^2 wird häufig ein Wert über 0.5 als gut und ein Wert über 0.9 als ausgezeichnet angesehen. Außerdem sollte der Unterschied zwischen R^2 und Q^2 nicht mehr als 0.2–0.3 betragen.^[58] Des Weiteren kann ein Permutationstest durchgeführt werden, der in Form eines p -Wertes eine Aussage über die statistische Signifikanz der Vorhersagekraft liefert.^[58]

Teil A Metabolische Studien am Modellorganismus Medaka

3. Einleitung

Die einzelnen Individuen einer Population unterscheiden sich bekanntlich in ihrem Erscheinungsbild, dem sogenannten Phänotyp. Dieser umfasst neben morphologischen und physiologischen Eigenschaften auch das Verhalten sowie die Anfälligkeit gegenüber Krankheiten. Die unterschiedliche Ausprägung dieser Merkmale ist in der Regel auf genetische Variation zwischen den Individuen zurückzuführen und wird zudem von Umweltfaktoren beeinflusst.^[59] Kenntnisse über die genetische Grundlage phänotypischer Merkmale sind von entscheidender Bedeutung für die Beantwortung ungelöster evolutionärer Fragen und können darüber hinaus dazu beitragen, die Entstehung komplexer Krankheiten beim Menschen zu verstehen und individuelle Therapien zu entwickeln.^[59] Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen genetischer und phänotypischer Variation begann bereits vor über 100 Jahren^[60] und ist aufgrund des großen Potenzials auch heute noch Gegenstand intensiver Forschung.^[59] Genomweite Assoziationsstudien (GWAS, engl.: *genome-wide association study*), welche seit etwa 15 Jahren durchgeführt werden, haben maßgeblich zu unserem Verständnis der genetischen Grundlagen einer Vielzahl menschlicher Krankheiten beigetragen. Durch diese Studien konnten erfolgreich Genloci (Positionen von Genen im Genom), die mit einem erhöhten Risiko für verschiedene Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, identifiziert werden.^[61, 62] Allerdings gibt die Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp häufig noch keinen Aufschluss über den zugrundeliegenden Mechanismus, der zur Entstehung der entsprechenden Krankheit führt. Die Einbindung der Metabolomik kann zusätzliche Informationen über die damit in Verbindung stehenden Stoffwechselwege liefern und somit dabei helfen, den Zusammenhang besser zu verstehen.^[63, 64] Durch die Kombination von GWAS mit der Untersuchung des Metaboloms (mGWAS) konnten zahlreiche Assoziationen zwischen genetischer Variation und dem Stoffwechselprofil von Blut- oder Urinproben hergestellt werden.^[65–75] Die Gesamtheit der Genotyp-abhängigen Unterschiede im Metabolom wird dabei als GIM (engl.: *genetically influenced metabotype*) bezeichnet.^[75] Auch wenn die Forschung in diesem Bereich noch am Anfang steht, konnten bereits Zusammenhänge zwischen dem GIM und einem erhöhten Risiko für die Entstehung verschiedener Erkrankungen identifiziert werden. Dazu zählen unter anderem Typ-2-Diabetes, Arteriosklerose, Herzerkrankungen, Nierenerkrankungen, rheumatische Erkrankungen sowie

neurologische und psychische Erkrankungen.^[76–88] Erst kürzlich entwickelte die Arbeitsgruppe um Jianguo Xia den mGWAS-Explorer, eine webbasierte Plattform, die die Untersuchung möglicher kausaler Beziehungen zwischen Genen, Metaboliten und Phänotypen vereinfachen soll.^[89, 90]

Trotz zahlreicher Forschungsarbeiten in diesem Bereich sind noch viele Fragen unbeantwortet. Diese betreffen insbesondere den Einfluss epistatischer Interaktionen (Interaktionen zwischen den Genotypen an zwei oder mehr Loci) sowie verschiedener Umweltfaktoren.^[59, 62, 91] Es wurde bereits gezeigt, dass diese Interaktionen einen Einfluss auf die Ausprägung phänotypischer Merkmale haben. So ergab eine kürzlich durchgeführte Untersuchung verschiedener Biomoleküle im Blutserum menschlicher Individuen, dass die Varianz dieser Merkmale nicht nur durch einzelne mutmaßliche Hauptgene, sondern einen polygenen Hintergrund bestimmt wird.^[92] Darüber hinaus wird der Stoffwechsel sowohl bei Menschen als auch bei Tieren von periodischen Änderungen der Umweltbedingungen beeinflusst.^[93–98] Insbesondere circadiane Rhythmen (Rhythmen mit einer Periodenlänge von etwa 24 Stunden) haben Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit.^[95] Da äußere Faktoren insbesondere bei Humanstudien schwer zu kontrollieren sind, ist es zur systematischen Untersuchung dieser Wechselwirkungen notwendig mit Modellorganismen zu arbeiten, bei denen alle potenziellen Einflussfaktoren gezielt kontrolliert und variiert werden können.^[62, 91]

4. Biologische Grundlagen

4.1 Der Modellorganismus Medaka

Neben dem allseits bekannten Zebrafisch oder auch Zebrafisch (*Danio rerio*) ist auch der japanische Reisfisch Medaka (*Oryzias latipes*) ein etablierter und weit verbreiteter Modellorganismus.^[99–101] Bei diesen Arten, welche zu den Knochenfischen (Teleostei) gehören, handelt es sich um Wirbeltiere. Daher existieren bei diesen Spezies für mehr als 70 % der menschlichen Gene Orthologe und für fast alle wichtigen Organsysteme des Menschen entsprechende Gegenstücke. Somit lassen sich viele anhand dieser Modellorganismen gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen.^[102–104] Zudem vereint insbesondere der Medaka eine Reihe wichtiger Eigenschaften und bietet dadurch zahlreiche Vorteile gegenüber anderen Modellorganismen. Dazu zählen die kostengünstige Haltung, eine hohe Fruchtbarkeit sowie kurze Generationszeiten: Ein Weibchen kann am Tag zwischen zehn und 50 Eier legen,^[99, 101] deren Entwicklung von der Befruchtung bis zum Schlüpfen der Larven etwa zehn Tage dauert^[105]. Die Generationszeit beträgt unter Laborbedingungen nur etwa sechs bis acht Wochen.^[99] Dies ermöglicht die Durchführung zahlreicher Untersuchungen an einer großen Anzahl von Individuen.^[99, 101] Außerdem sind die Eier leicht zugänglich, da die Entwicklung außerhalb des Körpers der Mutter stattfindet. Zusammen mit der transparenten Hülle der Eier erlaubt dies die Beobachtung der verschiedenen Stadien der Embryogenese.^[99, 101, 105]

Des Weiteren sind Medaka seit über 100 Jahren Gegenstand der Genforschung.^[99] Bereits 1913 wurde an ihnen die Mendelsche Vererbung in Wirbeltieren nachgewiesen. Aufgrund der verschiedenen natürlich vorkommenden Farbmutanten und des Sexualdimorphismus (äußerliche Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Individuen derselben Art) konzentrierten sich nachfolgende genetische Studien auf die Pigmentierung und die Geschlechtsbestimmung.^[99, 101] 2007 wurde das Projekt zur Sequenzierung des Medaka-Genoms, welches auf dem Stamm HdrR beruht, erfolgreich abgeschlossen.^[106] Darüber hinaus steht heutzutage eine Vielzahl molekulargenetischer Werkzeuge zur Verfügung, die die vertiefte Erforschung von Genfunktionen und Phänotypen beim Modellorganismus Medaka ermöglichen.^[107] Dazu gehört auch die CRISPR/Cas-Methode, welche die gezielte Testung genetischer Varianten ermöglicht.^[108]

Ein weiterer Grund für die Bedeutung von Medaka als Modellorganismus ist die außergewöhnlich hohe Toleranz gegenüber Inzucht.^[99, 101] Die ersten Inzucht-Stämme wurden bereits 1985 von Yasuko Hyodo-Taguchi und Nobuo Egami etabliert.^[109, 110] Heute sind verschiedene Inzucht- und Wildstämme von Medaka über das *National BioResource Project* verfügbar.^[111] Als Grundlage für die Etablierung einer Reihe von Inzucht-Linien, eines sogenannten Inzucht-Panels, wurde vor etwa zehn Jahren in Zusammenarbeit von Felix Loosli, Kiyoshi Naruse, Ewan Birney und Joachim Wittbrodt die molekulare, genetische und phänotypische Variation einer wilden süd-japanischen Population aus Kiyosu beschrieben.^[112] Anhand einer Analyse der morphometrischen Merkmale fünf etablierter Inzucht-Stämme, welche als repräsentativ für die aus der Kiyosu-Population hervorgehenden Linien angenommen wurden, wurde die erwartete phänotypische Vielfalt zwischen den einzelnen Linien abgeschätzt. Die beobachteten phänotypischen Unterschiede zwischen den Inzucht-Stämmen legten nahe, dass auch im Panel eine phänotypische Zuordnung möglich sein wird.^[112] Mittlerweile wurde aus der Kiyosu-Population durch Inzucht von einzelnen Vollgeschwisterpaaren über neun Generationen hinweg ein Panel von 80 nahezu isogenen Inzuchtlinien erstellt, welches als *Medaka Inbred Kiyosu-Karlsruhe-* (MIKK-) Panel bekannt ist.^[104, 113] Die Genome dieser Inzucht-Linien sind vollständig sequenziert, wodurch ideale Voraussetzungen für Assoziationsstudien zwischen Phänotyp und Genotyp gegeben sind, bei denen alle potenziellen Einflussfaktoren kontrolliert und sowohl Gene als auch äußere Einflüsse gezielt variiert werden können.^[104, 113]

Auch bei Metabolomstudien sind Medaka vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt. Besonders im Bereich der Umwelttoxikologie werden sowohl Embryonen als auch adulte Fische eingesetzt, um den Einfluss mutmaßlich schädlicher Stoffe auf den Metabolismus zu untersuchen.^[114–119] Außerdem wurden die natürlichen Veränderungen im Stoffwechsel während der Embryogenese analysiert.^[120, 121] Weitere Arbeiten im Bereich der Grundlagenforschung offenbarten einen Sexualdimorphismus^[122] sowie circadiane Variationen^[96] im Leber-Metabolom adulter Fische. Auch saisonale Schwankungen des Fettsäurestoffwechsels in der Leber konnten bei Medaka, die unter Sommer- und Winter-Photoperioden gehalten wurden, festgestellt werden.^[97] Bei einer Analyse der genetischen Grundlage des Körpergewichts in zwei Medaka-Stämmen wurden Quantitative Trait Loci (Genomabschnitte, die die Ausprägung eines phänotypischen Merkmals beeinflussen) gefunden, die mit dem Körpergewicht oder dem Wachstum in Zusammenhang stehen.^[123] Da

das Körpergewicht durch die Wachstumsrate und den Stoffwechsel bestimmt wird, zeigt diese Studie indirekt die Beteiligung genetischer Faktoren an der metabolischen Variation.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit den Inzucht-Stämmen HO5, iCab und QuiH gearbeitet. Bei HO5 handelt es sich um einen lange etablierten Inzucht-Stamm, der bereits 1985 von Yasuko Hyodo-Taguchi und Nobuo Egami etabliert wurde.^[110] iCab wurde durch Inzucht aus dem Medaka-Stamm Cab entwickelt, welcher ursprünglich von der *Carolina Biological Supply Company* bezogen wurde.^[124] Der Inzucht-Stamm QuiH entstand aus einer Kreuzung der zwei Albinomutanten-Stämme Heino^[124] und Quintet^[125]. Ihm fehlt die Pigmentierung vollständig, wodurch auch bei adulten Tieren die inneren Organe sichtbar sind.^[107]

4.2 Entwicklungen in der Stammzell- und Organoidforschung

Pluripotente Stammzellen (PSCs, engl.: *pluripotent stem cells*) können sich zu jedem Zelltyp eines Organismus differenzieren, weshalb ihr Potenzial in der medizinischen Forschung einzigartig ist. Sie können an Stelle von Tiermodellen genutzt werden, um Krankheitsmodelle zu erzeugen und anhand dieser die Entstehung von Krankheiten zu untersuchen und neue Arzneimittel zu erforschen. Außerdem bieten sie eine Vielzahl von neuen Möglichkeiten für die Entwicklung von Zelltherapien sowie in der regenerativen Medizin.^[126–128] 1981 veröffentlichten Martin Evans, Matthew Kaufman und Gail Martin ihre Arbeiten über die ersten aus Mausembryonen abgeleiteten pluripotenten Zelllinien,^[129, 130] für welche Gail Martin den Begriff embryonale Stammzellen (ESCs, engl.: *embryonic stem cells*) einführte.^[130] Ein Großteil der heutigen Kenntnisse über den Mechanismus der Pluripotenz von ESCs geht auf die Arbeiten der Gruppe um Austin Smith zurück.^[131] Nachdem über viele Jahre hinweg ausschließlich ESCs für ein breites Anwendungsspektrum genutzt wurden,^[132] gelang es Kazutoshi Takahashi und Shinya Yamanaka im Jahre 2006, mithilfe definierter Faktoren somatische Zellen (Körperzellen, die keine undifferenzierten Stammzellen oder Geschlechtszellen sind) von Mäusen in Richtung Pluripotenz umzuprogrammieren, wodurch sie ESC-ähnliche Eigenschaften erhielten. Diese Zellen nannten sie induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs, engl.: *induced pluripotent stem cells*).^[133] In Folge intensiver Erforschung der iPSC-Technologie ist heutzutage auch die Erzeugung und Erhaltung humaner iPSCs

möglich.^[132] Hierdurch können ethische und rechtliche Einschränkungen, die mit der Verwendung von ESCs verbunden sind, überwunden werden.^[126] Allerdings bergen die Methoden zur Erzeugung und Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustands aus somatischen Zellen aktuell noch verschiedene Risiken, welche die wirksame Anwendung der gewonnenen Therapeutika einschränken. Dazu gehört ein erhöhtes Mutationsrisiko der Zellen sowie die Gefahr einer Immunantwort im menschlichen Körper als Reaktion auf die Zellen. Außerdem kann es zu einer Erhaltung des somatischen epigenetischen Gedächtnisses und einer Veränderung der funktionellen Eigenschaften differenzierter Zellen kommen.^[126, 127] In den letzten Jahren wurden bereits einige klinische Studien mit PSCs zur Behandlung verschiedener Erkrankungen begonnen, bei welchen ESCs und, trotz der genannten Risiken, iPSCs zum Einsatz kommen.^[126, 127]

Von großem Interesse ist auch das Potenzial pluripotenter Zellen, *in vitro* organähnliche, dreidimensionale Strukturen auszubilden. Diese sogenannten Organoiden bilden in deutlich kleinerem Maßstab wichtige Aspekte der Anatomie und des multizellulären Spektrums ihrer physiologischen Gegenstücke nach, wodurch *in vivo* Bedingungen weit besser abgebildet werden als mit herkömmlichen zweidimensionalen Kulturen. Somit können sie zur Nachbildung von Organen eingesetzt werden und bieten vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, die von der Grundlagenforschung über die Erforschung von Krankheiten und Arzneimitteln bis hin zur regenerativen Medizin reichen.^[134] Die Grundlage für viele der nachfolgenden Arbeiten mit Organoiden wurde vor etwa 15 Jahren durch die bahnbrechenden Arbeiten der Gruppen von Yoshiki Sasai und Hans Clevers gelegt.^[135, 136] Yoshiki Sasai und Kollegen konnten zeigen, dass aus murinen und humanen ESCs kortikales Gewebe gebildet werden kann.^[135] Die Arbeitsgruppe um Hans Clevers wies des Weiteren nach, dass aus adulten intestinalen Stammzellen von Mäusen Darmorganoiden gewonnen werden können.^[136] Diese Studien trugen zu der Vorstellung bei, dass Stammzellen die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu organisieren und dreidimensionale Strukturen auszubilden. In der Folge gelang es anderen Wissenschaftlern, aus pluripotenten oder adulten, bereits spezialisierten Stammzellen Organoiden vieler weiterer Organe und Gewebe, einschließlich des Magens, der Leber, Bauchspeicheldrüse, Lunge, Niere, Retina und des Gehirns zu erzeugen.^[134] Insbesondere die Retina stellt aufgrund ihrer einfachen Struktur ein ideales Modell für die Untersuchung zellulärer Pluripotenz, der Differenzierung sowie der Bildung von Organoiden unter Verwendung pluripotenter Zelllinien dar.^[137] Verschiedene Studien haben

bereits gezeigt, dass aggregierte und in dreidimensionaler Suspensionskultur kultivierte ESCs der Maus und des Menschen die Fähigkeit besitzen, retinales Gewebe zu bilden.^[138–140]

Die Organoidforschung hat sich lange auf die Verwendung von Säugetierzellen beschränkt.^[134] Allerdings deuten Untersuchungen an ESCs von Medaka und Zebrafischen darauf hin, dass die Pluripotenz der Zellen vergleichbar zu anderen Wirbeltierarten ist.^[141–146] In Übereinstimmung damit zeigte die Arbeitsgruppe von Joachim Wittbrodt erst kürzlich zum ersten Mal, dass PSCs aus Medaka- und Zebrafisch-Embryonen in der Lage sind, Aggregate mit neuralen Strukturen, insbesondere der Retina auszubilden. Dabei konnten die Autoren bereits nach zwei Tagen die Bildung des optischen Vesikels und nach drei Tagen den Beginn der Differenzierung beobachten.^[147]

4.3 Regulation von Pluripotenz und Differenzierungspotenzial von Stammzellen

Für die Anwendung von PSCs in der biomedizinischen Forschung sowie der Medizin ist es essenziell, die Regulationsprinzipien welche Pluripotenz und Differenzierung zugrunde liegen zu verstehen, um das zelluläre Verhalten gezielt beeinflussen zu können. Es ist bekannt, dass das Verhalten von Stammzellen auf verschiedenen Ebenen reguliert wird. So beeinflusst die genetische Variation zwischen PSCs verschiedener Individuen das Differenzierungspotenzial der Zellen.^[148–150] Da bei diesem Vorgang vermutlich hunderte von genetischen Varianten beteiligt sind, sind die Auswirkungen jedoch komplex und schwer zu manipulieren. Darüber hinaus wird die Differenzierung von Stammzellen auch von epigenetischen Veränderungen (Veränderungen, welche die Genaktivität regulieren, ohne die DNA-Sequenz zu verändern), begleitet und beeinflusst.^[151] Grundlage hierfür sind chemische Veränderungen am Chromatin, dem Material aus dem die Chromosomen bestehen. Es setzt sich aus einem Komplex aus DNA (Desoxyribonukleinsäure) und speziellen Proteinen, vorwiegend den sogenannten Histonen, zusammen. Das Chromatin kann geöffnet vorliegen, wodurch Transkriptionsfaktoren an die DNA binden und die Transkription in Gang setzen können. Diese epigenetische Plastizität ermöglicht PSCs, sich in unterschiedlichste Zelllinien zu differenzieren. Im Laufe der Differenzierung wird diese offene Chromatinkonfiguration zunehmend eingeschränkt, wodurch die Transkription gehemmt wird. Mechanistisch führt eine Histon-Acetylierung zu einer Öffnung des Chromatins, wohingegen eine Histon-

Methylierung je nach modifiziertem Bereich zu einer Öffnung oder Verdichtung des Chromatins führen kann. Die Methylierung der DNA selbst hemmt ebenfalls die Transkription.^[151–153] Des Weiteren besteht auch ein Zusammenhang zwischen dem Stoffwechsel und dem Differenzierungspotenzial von PSCs,^[154, 155] auf welchen später in diesem Kapitel im Detail eingegangen wird.

Die verschiedenen Ebenen, auf denen das Verhalten von Stammzellen reguliert wird, also der genetische Hintergrund, epigenetische Mechanismen sowie der Stoffwechsel, stehen wiederum in enger Verbindung zueinander: Der Genotyp steuert die Genexpression und epigenetische Veränderungen.^[150, 156, 157] Die Regulation der Transkription beeinflusst wiederum den Stoffwechsel, wie anhand von Tumorzellen gezeigt wurde.^[158] Außerdem betreffen die ersten während der Reprogrammierung somatischer Zellen zurück in den pluripotenten Grundzustand auftretenden Expressionsänderungen Gene, die sowohl die Zellteilung als auch metabolische Veränderungen fördern.^[159, 160]

Die Untersuchung des Metaboloms hat auch im Bereich der Stammzellforschung in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen.^[161, 162] Heute ist bekannt, dass PSCs einen charakteristischen Stoffwechsel aufweisen, wobei sich im Verlauf der Reprogrammierung von somatischen Zellen zu iPSCs der zelluläre Stoffwechsel umstellt und dem Stoffwechsel von ESCs immer ähnlicher wird.^[159, 163–165] Der am häufigsten betrachtete Aspekt ist die Umstellung des Energiestoffwechsels vom Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung auf die sogenannte aerobe Glykolyse.^[154, 155, 163–166] Dies geht einher mit einer vermehrten Produktion von Lactat, dem Endprodukt der aeroben Glykolyse.^[165, 166] Ebenso reichern sich in PSCs im Vergleich zu differenzierten Zellen mehr Acetyl-Coenzym A (kurz Acetyl-CoA), das zentrale Abbauprodukt verschiedener Nährstoffklassen und Substrat des Citratzyklus, sowie Acetat an.^[165, 167] Die Konzentration verschiedener Intermediate des Citratzyklus dagegen nimmt durch die Umstellung des Energiestoffwechsels ab.^[163, 166] Außerdem ist der Aminosäurestoffwechsel in PSCs deutlich herabreguliert und dadurch der Gehalt fast aller Aminosäuren, außer Glutamin, niedriger als in somatischen Zellen.^[166] Auch der Gehalt an Purin- und Pyrimidin-Nukleotiden ist in PSCs im Vergleich zu somatischen Zellen geringer.^[163, 166] Des Weiteren zeichnen sich ESCs durch das Vorhandensein von Metaboliten mit ungesättigten Strukturen aus, deren Gehalt bei der Differenzierung abnimmt. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung oxidativer Signalwege für die Differenzierung wichtig ist.^[168]

Dabei repräsentiert das Metabolom einer Zelle nicht nur das Endprodukt des zellulären Stoffwechsels, sondern scheint eine elementare Rolle bei der Regulation der Pluripotenz und des Differenzierungspotenzials zu spielen. So fördert beispielsweise die Hochregulierung der Glykolyse die Reprogrammierung von somatischen Zellen zu iPSCs.^[163, 165] In Übereinstimmung mit der These, dass die Aktivierung oxidativer Signalwege für die Differenzierung wichtig ist, konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Supplementierung von kultivierten ESCs mit Metaboliten, die Substrate für den mitochondrialen oxidativen Stoffwechsel darstellen (z.B. gesättigte Fettsäuren und Acylcarnitine) zu einer signifikanten Steigerung der Differenzierung führt.^[168] Verschiedenen Metaboliten wird außerdem eine Beteiligung an Histonmodifikationen und somit ein Einfluss auf epigenetische Veränderungen, welche wie zuvor erläutert die Pluripotenz und das Differenzierungspotenzial der Zellen regulieren, nachgesagt. Zu den relevanten Substanzen zählen Acetat und Acetyl-CoA, welches die Histon-Acetylierung fördert.^[167] Ebenfalls bedeutsam sind S-Adenosylmethionin und an dessen Synthese beteiligte Stoffe wie Methionin.^[166, 169] Als der primäre Methyl donor für die meisten Methyltransferasen ist S-Adenosylmethionin für die DNA- und Histon-Methylierung von wesentlicher Bedeutung.^[170] In Übereinstimmung damit scheint die Zugabe von Threonin zum Kulturmedium, welches intrazellulär wiederum zu Acetyl-CoA verstoffwechselt und für die Synthese von S-Adenosylmethionin benötigt wird, essenziell für die Pluripotenz von ESCs zu sein.^[169, 171] Auch dem Verhältnis von α -Ketoglutarat zu Succinat sowie von Vitamin C zu Prolin im Medium wird ein Einfluss auf epigenetische Veränderungen und damit die Pluripotenz und das Differenzierungspotenzial zugeschrieben.^[172, 173]

Die Erkenntnis, dass der zelluläre Stoffwechsel nicht nur entscheidend für die Regulation von Pluripotenz und Differenzierungspotenzial ist, sondern auch durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen im Medium maßgeblich beeinflusst werden kann, bietet einen wichtigen Ansatzpunkt für die Manipulation des Verhaltens von Stammzellen. Aufgrund dessen wurde beispielsweise bereits vorgeschlagen, bei der Herstellung differenzierter Zellen für die medizinische Anwendung Glucose und Glutamin aus dem Medium zu entfernen, um verbleibende, undifferenzierte Zellen zu zerstören, wodurch eine mögliche Tumorbildung während der Stammzelltherapie verhindert werden kann.^[174]

Auch wenn die Mehrzahl der zuvor beschriebenen Untersuchungen mit massenspektrometrischen Methoden durchgeführt wurde, stellt auch die NMR-Spektroskopie eine geeignete Methode dar, um das metabolische Profil pluripotenter Stammzellen sowie differenzierter Zellen zu analysieren. Üblicherweise werden hierfür Zellextrakte verwendet.^[18, 175, 176] Darüber hinaus führten Elena-Herrmann *et al.* eine plattformübergreifende NMR-Untersuchung durch, bei der sie neben Zellextrakten auch ganze Zellen mittels Festkörper-NMR analysierten. Dabei fanden sie Unterschiede im Metabolom von PSCs im undifferenzierten Zustand und nach neuraler Differenzierung, die an epigenetischen Veränderungen beteiligt sein könnten.^[176]

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die aufgeführten Studien vorwiegend an Zellen der Maus^[18, 165, 167, 168, 171, 172, 175, 176] oder humanen Zellen^[163, 164, 167, 168] durchgeführt wurden. Eine metabolische Untersuchung von Fisch-Stammzellen ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht bekannt.

5. Themenstellung

Der Modellorganismus Medaka bietet ideale Voraussetzungen, um den Zusammenhang zwischen genetischer und phänotypischer Variation sowie den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Ausbildung des Phänotyps zu untersuchen. Die NMR-spektroskopische Analyse des Metaboloms kann hierbei zusätzliche Informationen über die damit in Verbindung stehenden Stoffwechselwege liefern und somit dabei helfen, zugrundeliegende Mechanismen besser zu verstehen.

Als Grundlage für zukünftige genom- und metabolomweite Assoziationsstudien mit verschiedenen Inzucht-Stämmen soll im Rahmen dieser Arbeit anhand der zwei etablierten Inzucht-Stämme HO5 und iCab NMR-spektroskopisch untersucht werden, ob sich die genetischen Unterschiede zwischen den beiden Stämmen auch im Metabolom der Leber widerspiegeln. Darüber hinaus soll evaluiert werden, ob auch Unterschiede im Metabolom männlicher und weiblicher Fische erkennbar sind.

Die Untersuchungen im zweiten Abschnitt sollen dazu dienen, den Zusammenhang zwischen Metabolom und Differenzierungspotenzial embryonaler Stammzellen besser zu verstehen. Da für embryonale Stammzellen der beiden Inzucht-Stämme iCab und QuiH ein unterschiedliches Potenzial für die Differenzierung in Richtung retinaler Zellen beobachtet werden konnte, soll nun das embryonale Metabolom dieser beiden Stämme untersucht werden. Durch einen Vergleich von Differenzierungsweg und Metabolom sollen anschließend Metaboliten identifiziert werden, die mit dem Verhalten der Zellen in Verbindung stehen könnten.

6. Ergebnisse und Diskussion

6.1 Metabolische Untersuchungen an Medaka-Lebern

Die folgende Arbeit wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Felix Loosli (Institut für Biologische und Chemische Systeme – Biologische Informationsprozessierung (IBCS-BIP), KIT) durchgeführt.

Die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse und experimentellen Daten sind zum Teil publiziert unter: *Strain-Specific Liver Metabolite Profiles in Medaka*: [H. Soergel](#), F. Loosli, C. Muhle-Goll, *Metabolites*, **2021**, 11, 744.

Das hier verwendete Extraktionsprotokoll zur Isolation relevanter Metaboliten wurde in der vorangegangenen Masterarbeit entwickelt. Ebenfalls wurde ein Teil der im Folgenden diskutierten experimentellen Daten bereits im Rahmen der Masterarbeit erhalten.^[177] Die Extraktion und NMR-spektroskopische Analyse weiterer Proben sowie die vollständige Auswertung der Daten erfolgte im Rahmen dieser Dissertation.

6.1.1 Überblick

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen genetischer Variation und phänotypischen Merkmalen sowie damit in Verbindung stehender Stoffwechselwege ist aktueller Gegenstand der Forschung.^[59, 63, 64, 75] Neben dem genetischen Hintergrund haben auch Umweltfaktoren einen erheblichen Einfluss auf den Stoffwechsel und die Ausprägung des Phänotyps. Allerdings sind die genauen Auswirkungen noch weitgehend unerforscht, da äußere Faktoren insbesondere bei Humanstudien schwer zu kontrollieren sind.^[62, 91] Eine systematische Untersuchung dieser Wechselwirkungen kann anhand von Modellorganismen wie Medaka erfolgen. Insbesondere das MIKK-Panel mit aktuell 80 Medaka Inzucht-Linien, welches in den letzten Jahren etabliert wurde, ermöglicht die Durchführung einer Vielzahl von Studien, bei denen sowohl Gene als auch äußere Einflüsse gezielt variiert werden können.^[104, 113] Als Grundlage für zukünftige mGWAS-Studien mit Inzucht-Linien des MIKK-Panels soll in diesem Abschnitt der Arbeit anhand der zwei etablierten Inzucht-Stämme HO5 und iCab, welche als repräsentativ für die Linien des Inzucht-Panels angesehen werden,^[112] NMR-spektroskopisch untersucht werden, ob sich die genetischen Unterschiede zwischen den beiden Stämmen auch

im Metabolom widerspiegeln. Da Sexualdimorphismus für Medaka sowohl in Hinblick auf das äußere Erscheinungsbild^[99, 101] als auch das Metabolom^[122] bekannt ist, soll außerdem analysiert werden, ob sich auch bei den vorliegenden Inzucht-Stämmen das Stoffwechselprofil männlicher und weiblicher Fische unterscheidet. Diese Untersuchungen sollen anhand von Leberextrakten durchgeführt werden, da die Leber bei Teleostei, ähnlich wie bei Säugetieren, eine zentrale Rolle im Stoffwechsel spielt und folglich als guter Indikator für den physiologischen Zustand des Organismus gilt. Ihre Aufgabe umfasst die Speicherung und Verstoffwechslung von Kohlenhydraten, Proteinen, Aminosäuren, Vitaminen und Lipiden. Außerdem ist sie essenziell für die Produktion von Plasmaproteinen und Galle sowie die Entgiftung des Körpers. Des Weiteren stellt die Leber das Hauptorgan für die Synthese von Eizellbestandteilen dar, weshalb sich die Leber männlicher und weiblicher Fische unterscheidet.^[178, 179]

Eine potenzielle Schwierigkeit bei NMR-basierten Untersuchungen von Leberextrakten stellt der hohe Lipidanteil dar, welcher in ¹H-NMR-Spektren breite Signale verursacht und dadurch die Resonanzen anderer, potenziell biologisch relevanter, Substanzen überdecken kann. Durch den Einsatz mehrphasiger Extraktionsmethoden wie beispielsweise einer Extraktion mit Wasser, Methanol und Chloroform kann diese Problematik umgangen werden, da Lipide in die unpolare Phase abgetrennt werden, während polare Metaboliten in der wässrigen Phase verbleiben. Anschließend kann die Zusammensetzung beider Phasen getrennt analysiert werden kann.^[180] Im Rahmen der dieser Dissertation vorangegangenen Masterarbeit wurde ein zweiphasiges Extraktionsprotokoll zur Isolation biologisch relevanter Metaboliten aus Medaka-Lebern entwickelt.^[177] Als Grundlage für die Entwicklung der Methode diente ein bestehendes Protokoll aus unserem Arbeitskreis für die Extraktion von Metaboliten aus Zebrafisch-Larven, welches auf dem mechanischen Aufschluss des Probenmaterials in einer Acetonitril/Wasser-Mischung basiert.^[181] Im Falle der Leberproben konnte durch Zugabe von Chloroform eine Abtrennung der enthaltenen Lipide in die unpolare Phase erreicht werden. Da der Fokus der darauffolgenden Untersuchungen auf polaren Metaboliten wie Zuckern, Aminosäuren und organische Säuren liegen sollte, wurde die organische Phase verworfen und die Effizienz der Extraktionsmethode anhand von ¹H-NMR-Spektren der polaren Phase beurteilt. Als besonders effektiv, sowohl in Hinblick auf die Reduktion der breiten Lipid-Signale als auch die Extraktion polarer Metaboliten, stellte sich die Extraktion mit einem Acetonitril/Wasser/Chloroform-Gemisch im Verhältnis 1:1:1 dar.^[177] Im Falle der vorliegenden

Leberproben war dieses Lösungsmittelgemisch effektiver als das typischerweise in der Literatur verwendete Gemisch aus Methanol, Wasser und Chloroform.^[177, 180]

6.1.2 NMR-spektroskopische Untersuchung der Leberextrakte

In Abbildung 6.1 sind repräsentative ^1H -NMR-Spektren der Leberextrakte männlicher und weiblicher Fische der Inzucht-Stämme HO5 und iCab abgebildet, wobei jede Probe aus der Extraktion einer Leber erhalten wurde. Mithilfe von zweidimensionalen NMR-Spektren und über den Vergleich mit Datenbankwerten konnten die Resonanzsignale zahlreichen Zuckern, Aminosäuren und organischen Säuren zugeordnet werden. Die Verifizierung der Zuordnung erfolgte über sogenannte *spiking* Experimente.

Bei Betrachtung der ^1H -NMR-Spektren sind deutliche Intensitätsunterschiede zwischen den Proben der jeweiligen Stämme sowie der beiden Geschlechter erkennbar. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass die Lebern des HO5-Stammes allgemein größer sind als die des iCab-Stammes und die Lebern weiblicher Fische größer als die männlicher Fische. Eine quantitative Bestimmung von Größe und Gewicht der einzelnen Lebern konnte nicht durchgeführt werden, da diese nach dem Sezieren direkt eingefroren und gefriergetrocknet wurden, um den Stoffwechsel zu stoppen. Damit die beobachteten Größenunterschiede zwischen den Lebern und die daraus resultierenden Intensitätsunterschiede in den ^1H -NMR-Spektren die statistische Datenauswertung nicht beeinflussen, wurden die Spektren auf die Gesamtintensität normalisiert (Abbildung 6.1). Für die statistische Datenauswertung wurden die Spektren manuell in 56 Bereiche, sogenannte *buckets*, eingeteilt (Anhang, Tabelle A.1). Alle Resonanzen, die sich Glucose sowie Mehrfachzuckern der Glucose zuordnen lassen, wurden nicht in die Analyse mit einbezogen, da bei wiederholten Messungen eine gewisse Veränderung der Intensität festgestellt wurde, die mutmaßlich auf einen verbleibenden Glykogenabbau zurückzuführen ist. Des Weiteren wurden Signale ausgeschlossen, die nicht in allen Spektren identifizierbar waren und Gallensäuren zugeordnet werden können.^[182] Für jede Substanz wurde nur das Resonanzsignal integriert, welches am wenigsten Überlagerungen mit anderen Signalen zeigt und dadurch am repräsentativsten ist. Sofern dies nicht möglich war, wurden die Substanzen durch mehrere *buckets* charakterisiert, welche sich verschiedenen funktionellen Gruppen des Moleküls zuordnen lassen.

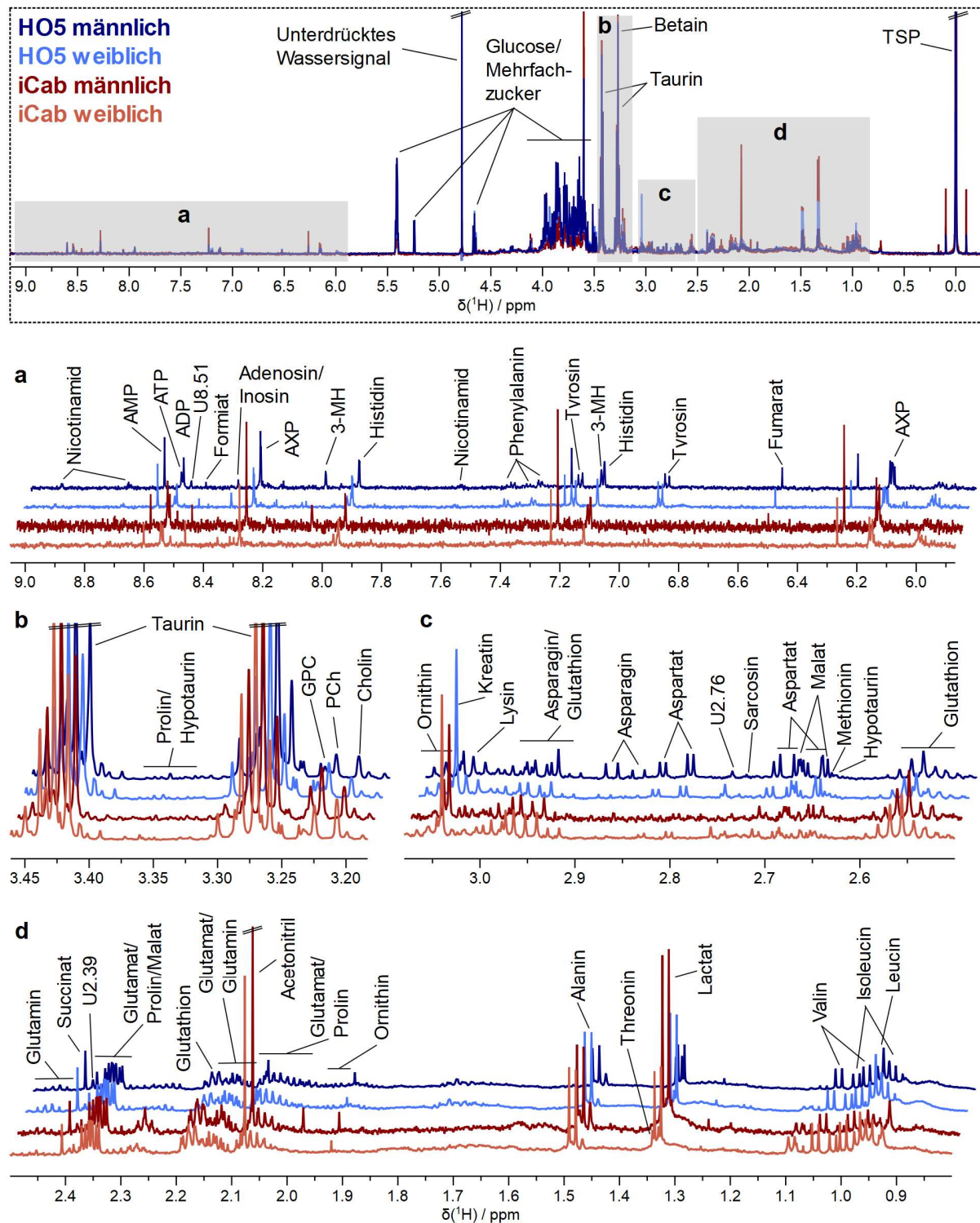


Abbildung 6.1: Repräsentative ^1H -NMR-Spektren von Leberextrakten der Inzucht-Stämme HO5 und iCab mit den identifizierten Metaboliten. Die Spektren wurden zuvor auf die Gesamtintensität normalisiert. a–d: Vergrößerte Spektralbereiche. a: $\delta = 5.87\text{--}9.05$ ppm, 4-fach hochskaliert. b: $\delta = 3.18\text{--}3.46$ ppm. c: $\delta = 2.50\text{--}3.08$ ppm, 2.5-fach hochskaliert. d: $\delta = 0.80\text{--}2.50$ ppm, 2-fach hochskaliert. Mehrfachzucker bezeichnen Mehrfachzucker der Glucose. Abkürzungen: 3-MH: 3-Methylhistidin, AMP: Adenosinmonophosphat, ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosin-triphosphat, AXP: AMP, ADP und ATP, PCh: Phosphorylcholin, GPC: L- α -Glycerolphosphorylcholin, TSP: Trimethylsilylpropionat., U: Unbekannte Substanzen.

6.1.3 Vergleich unterschiedlicher *batches*

Als *batch* wird im Allgemeinen eine Reihe von Proben bezeichnet, die innerhalb eines definierten Zeitraums mit demselben experimentellen Verfahren hergestellt und analysiert werden. Die quantitativen Ergebnisse unterschiedlicher *batches* können aufgrund verschiedener Faktoren wie unerwünschter biologischer Variation oder auch technischer Variation bei der Vorbereitung und Lagerung der Proben sowie dem analytischen Prozess erheblich voneinander abweichen. Dies wird als *batch*-Effekt bezeichnet.^[183] Beim Zusammenführen verschiedener *batches* ist es daher notwendig, die Daten auf Abweichungen zu untersuchen. Das Vorliegen eines *batch*-Effektes kann beispielsweise anhand des *scores plots* der PCA evaluiert werden, welcher einen graphischen Überblick über die Ähnlichkeit der Proben bietet. Sofern der *batch*-Effekt eine wesentliche Variationsquelle in den Daten darstellt, sollte im *scores plot* eine entsprechende Gruppierung der Datenpunkte zu erkennen sein.^[183] Da im Falle der beiden Inzucht-Stämme HO5 und iCab Proben aus zwei verschiedenen Generationen vorliegen, müssen Abweichungen zwischen den Daten aufgrund des *batch*-Effektes ausgeschlossen werden. Dafür wurde eine PCA durchgeführt, wobei die Datenpunkte im *scores plot* entsprechend den Inzucht-Stämmen sowie den *batches* eingefärbt wurden (Abbildung 6.2).

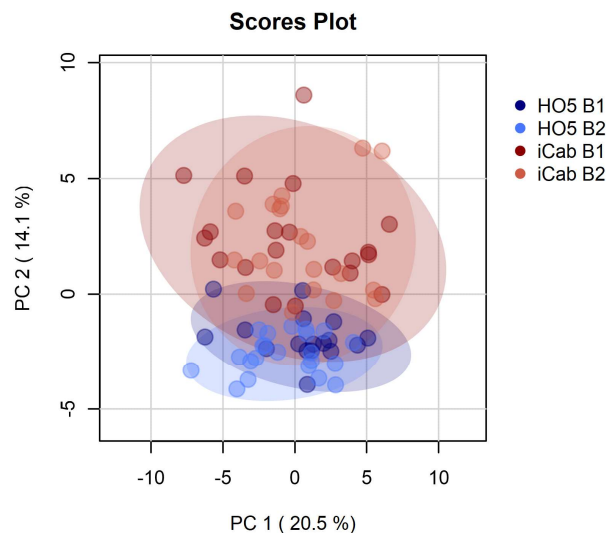


Abbildung 6.2: PCA *scores plot* zur Charakterisierung der untersuchten *batches* anhand des metabolischen Profils. Für die beiden Inzucht-Stämme HO5 und iCab liegen Proben aus zwei verschiedenen *batches* (B1 und B2) vor. Die schattierten Bereiche stellen die 95 % Konfidenzregionen der jeweiligen Datensätze dar.

Sowohl im Falle des iCab- als auch des HO5-Stammes ist keine Gruppierung der Datenpunkte hinsichtlich der *batches* zu beobachten. In beiden Fällen liegt ein Großteil der Datenpunkte in der Schnittfläche der 95 % Konfidenzregionen beider *batches*. Die Ausreißer können auf die Variation einzelner Individuen zurückgeführt werden, da jeder Datenpunkt die Leber eines Individuums repräsentiert. Demnach kann geschlussfolgert werden, dass keine systematische Abweichung zwischen den *batches* vorliegt.

6.1.4 Multivariate Hauptkomponentenanalyse zur Klassifizierung der Daten

Um etwaige Gruppierungen in den Daten hinsichtlich des Inzucht-Stammes sowie des Geschlechts zu ermitteln, wurde eine entsprechende PCA durchgeführt. Diese ermöglicht als unüberwachte Methode die Zusammenfassung und Visualisierung der Informationen in einem Datensatz. Im *scores plot* (Abbildung 6.3) ist eine eindeutige Unterteilung der Proben hinsichtlich des Stammes zu erkennen. So ist die Gruppierung in HO5 und iCab entlang der zweiten Hauptkomponente (PC 2) zu beobachten, welche 14.1 % der Varianz der Daten erklärt. Weiterhin ist auch das Geschlecht ein Kriterium, das zur Unterteilung der Datenpunkte führt. Eine Trennung der Geschlechtergruppen ist entlang der ersten Hauptkomponente (PC 1) erkennbar, jedoch nicht stark ausgeprägt. Zusätzlich macht PC 1 mit 20.5 % den größten Anteil der Varianz der Daten aus.

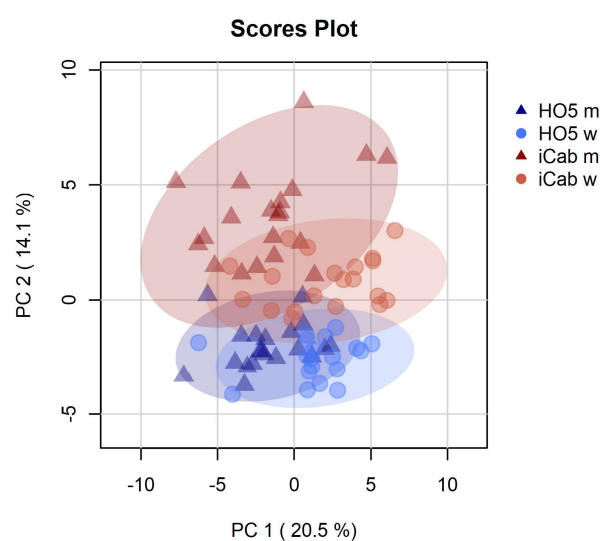


Abbildung 6.3: PCA *scores plot* zur Charakterisierung der Inzucht-Stämme HO5 und iCab sowie der männlichen und weiblichen Fische anhand des metabolischen Profils. Die schattierten Bereiche stellen die 95 % Konfidenzregionen der jeweiligen Datensätze dar.

Augenscheinlich wird somit ein Großteil der Varianz entlang PC 1 durch Unterschiede zwischen einzelnen Individuen und nicht durch klar separierte Gruppen hervorgerufen. Dies scheint auf den ersten Blick unerwartet, da es sich bei HO5 und iCab um nahezu isogene Inzucht-Stämme handelt, was bedeutet, dass die Individuen eines Stammes genetisch annähernd identisch sind. So liegt der Grad der genomweiten Homozygotie (Reinerbigkeit) vermutlich bei über 70 %.^[104] Außerdem wurden die Fische unter denselben definierten Bedingungen gehalten. Dennoch könnten die beobachteten Unterschiede zwischen den Individuen auf geringe stochastische Effekte zurückzuführen sein, deren Ursprung entweder im Genom liegen oder auch umgebungsbedingt sein kann, und die im Laufe der Lebenszeit der Fische zu individuellen Abweichungen führen können.

Anschließend wurden separate PCAs durchgeführt, um jeweils den Faktor Geschlecht beziehungsweise Stamm zu eliminieren (Abbildung 6.4 und Abbildung 6.5) und zu prüfen, ob somit eine eindeutigere Unterscheidung der Gruppen möglich ist. Bei Durchführung von zwei nach Geschlecht getrennten PCAs (Abbildung 6.4) zeigen die resultierenden *scores plots* sowohl für weibliche (links) als auch für männliche Fische (rechts) eine klare und vergleichbare Gruppierung der Inzucht-Stämme HO5 und iCab, wobei in beiden Fällen nur eine minimale Überlagerung der Cluster erkennbar ist. Dies steht in gutem Einklang mit den zuvor beschriebenen Beobachtungen im Falle des vollständigen PCA *scores plots* (Abbildung 6.3).

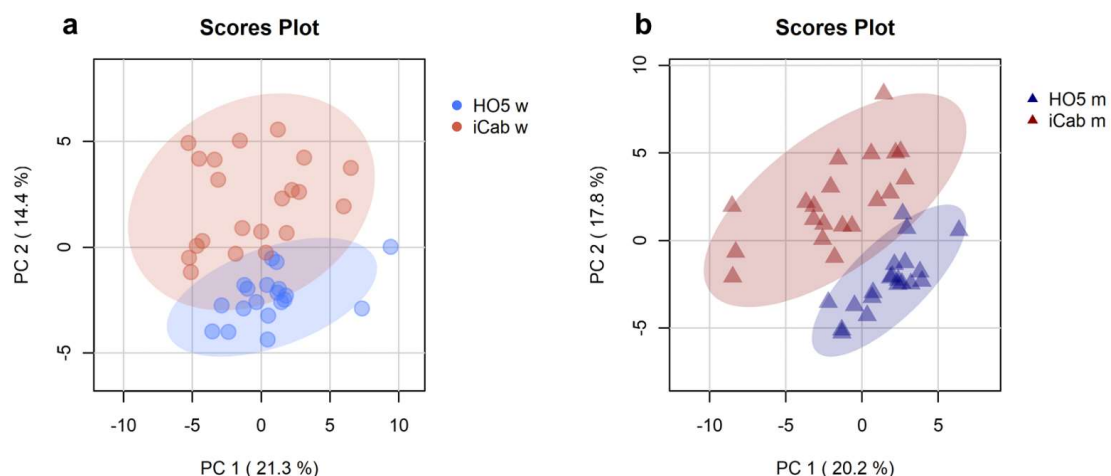


Abbildung 6.4: PCA *scores plot* zur Charakterisierung der Inzucht-Stämme HO5 und iCab anhand des metabolischen Profils. Die schattierten Bereiche stellen die 95 % Konfidenzregionen der jeweiligen Datensätze dar. a: Weibliche Fische. b: Männliche Fische.

Separate PCAs für die beiden Inzucht-Stämme resultieren in einer deutlich besser ersichtlichen Trennung der Geschlechtergruppen im *scores plot* (Abbildung 6.5) als es bei der vollständigen PCA der Fall ist (Abbildung 6.3). Die Cluster überlagern nur noch leicht, allerdings etwas mehr als beim Vergleich der Inzucht-Stämme. Dies impliziert, dass der Unterschied zwischen den Geschlechtergruppen geringer ist als der Unterschied zwischen den Stämmen.

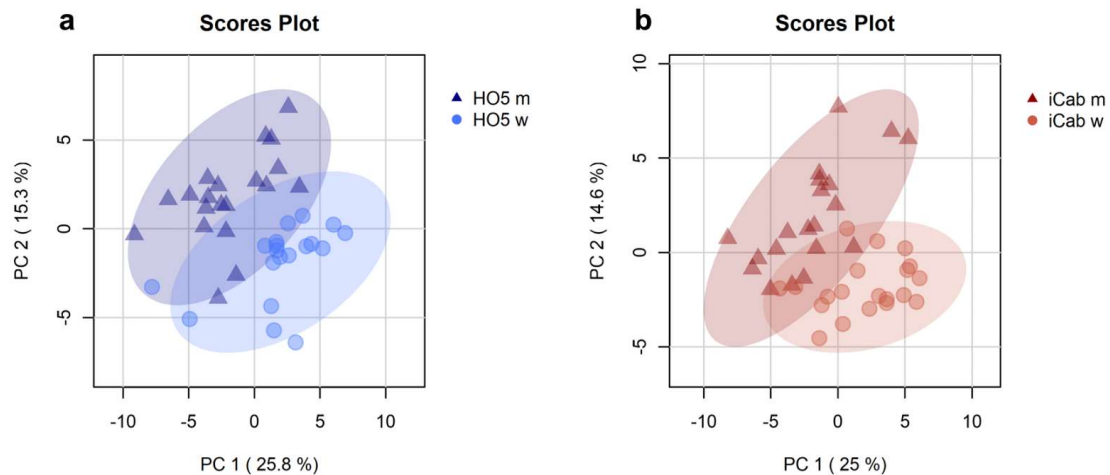


Abbildung 6.5: PCA *scores plot* zur Charakterisierung männlicher und weiblicher Fische anhand des metabolischen Profils. Die schattierten Bereiche stellen die 95 % Konfidenzregionen der jeweiligen Datensätze dar. a: HO5. b: iCab.

In den *loadings plots* in Abbildung A.1 und Abbildung A.2 im Anhang ist dargestellt, von welchen Variablen die beiden Hauptkomponenten jeweils bestimmt werden. Auf die Unterschiede zwischen den Inzucht-Stämmen sowie den Geschlechtergruppen wird in den folgenden Kapiteln im Detail eingegangen.

6.1.5 Unterschiede im Metabolom der Inzucht-Stämme HO5 und iCab

Die im vorherigen Kapitel durchgeführten PCAs zeigen, dass es sowohl im Leber-Metabolom männlicher und weiblicher Fische als auch der Inzucht-Stämme HO5 und iCab Unterschiede gibt. Der Fokus der folgenden Auswertungen soll auf dem Unterschied zwischen den beiden Stämmen liegen. Dabei werden alle Analysen einzeln mit den Daten männlicher und weiblicher Fische durchgeführt. Dadurch soll gewährleistet werden, dass die Varianz zwischen den Geschlechtern in keinem Fall die Unterschiede zwischen den Stämmen überdeckt. Zusätzlich werden die Daten männlicher und weiblicher Fische gemeinsam analysiert, um zu evaluieren, ob dies zu vergleichbaren Ergebnissen führt.

6.1.5.1 Klassifizierung mittels multivariater *partial least squares discriminant analysis*

Für die Identifizierung der wichtigsten Variablen, in welchen sich die beiden Inzucht-Stämme unterscheiden, wurde eine Klassifizierung der Daten mittels PLS-DA durchgeführt. Als überwachte Methode berücksichtigt diese im Gegensatz zur PCA die Gruppenzugehörigkeit der Proben. In Abbildung 6.6 (links) ist die Klasseneinteilung in HO5 und iCab nach einer PLS-DA abgebildet. Außerdem sind die Variablen, die nach der VIP-Methode jeweils den größten Beitrag zur Klassifizierung entlang Komponente 1 leisten, dargestellt. Variablen mit einem großen VIP-score haben den größten Einfluss, wobei Variablen mit Werten größer als 1 typischerweise als wichtig angesehen werden.^[58] Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen soll der Fokus auf Variablen mit einem VIP-score von mindestens 1.2 liegen. Die VIP-scores aller Variablen sind im Anhang in Tabelle A.2 zu finden. Die Validierung mittels Kreuzvalidierung und Permutationstest ergab für alle drei Modelle eine hohe Vorhersagekraft, wobei die Qualitätsparameter für weibliche Tiere etwas niedriger waren als für männliche Tiere (vergleiche Abbildung 6.6).

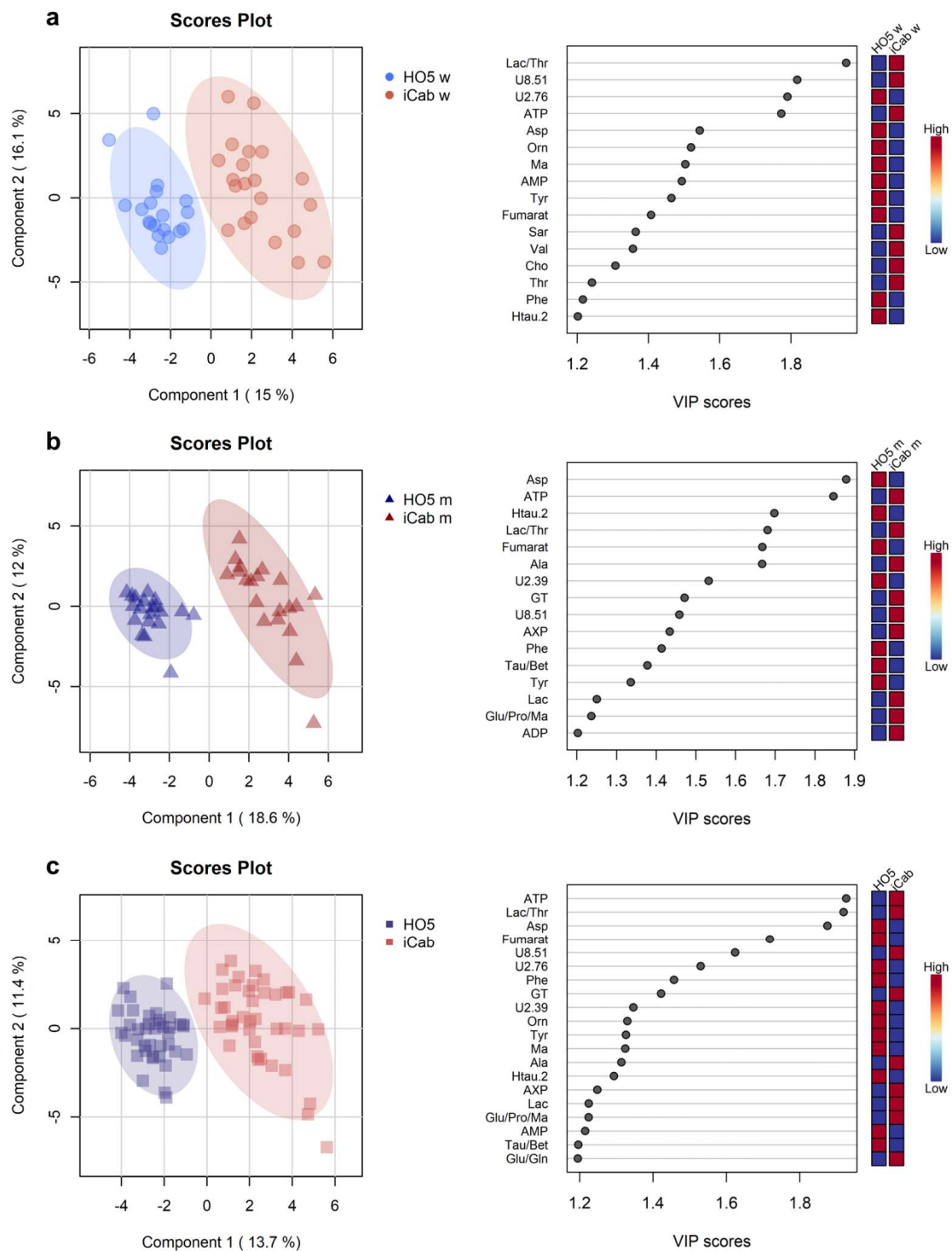


Abbildung 6.6: PLS-DA zur Unterscheidung der Inzucht-Stämme HO5 und iCab. Links: PLS-DA *scores plot*. Rechts: Variablen, die nach der VIP-Methode jeweils den größten Beitrag zur Trennung der Gruppen entlang Komponente 1 leisten (VIP-score ≥ 1.2). a: Weibliche Fische. R^2 : 0.86, Q^2 : 0.75, $p = 0.001$. b: Männliche Fische. R^2 : 0.93, Q^2 : 0.86, $p < 0.001$ c: Gemeinsame Analyse weiblicher und männlicher Fische. R^2 : 0.86, Q^2 : 0.82, $p < 0.001$. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit „U“ sowie der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode angegeben. Abkürzungen: ADP: Adenosindiphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintri-phosphat, AXP: AMP, ADP und ATP, Bet: Betain, Cho: Cholin, GT: Glutathion (reduziert und oxidiert), Htau: Hypotaurin, Lac: Lactat, Ma: Malat, Orn: Ornithin, Sar: Sarcosin, Tau: Taurin.

Von den Variablen, welche mit einem *VIP-score* von mindestens 1.2 einen wesentlichen Einfluss auf die Klassifizierung haben, können acht, mit unterschiedlichem Beitrag, sowohl in den getrennten Analysen männlicher und weiblicher Fische als auch in der gemeinsamen Analyse aller Proben identifiziert werden. Diese umfassen ATP (Adenosintriphosphat), Lactat/Threonin, Aspartat, Fumarat, Phenylalanin, Tyrosin, Hypotaurin sowie die Resonanz einer unbekannten Substanz bei 8.51 ppm. Im Falle von Hypotaurin muss jedoch beachtet werden, dass ein zweites, dieser Substanz zugeordnetes, *bucket* in allen drei Fällen einen *VIP-score* unter 1 aufweist.

Darüber hinaus sind auch geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen den Stämmen erkennbar. So tragen zusätzlich zu den zuvor genannten Substanzen insbesondere bei weiblichen Fischen Ornithin und eine unbekannte Substanz mit Resonanz bei 2.76 ppm (*VIP-score* von 1.14 bzw. 1.06 für männliche Fische) sowie nur bei weiblichen Fischen Malat, AMP (Adenosinmonophosphat), Sarcosin, Valin, Cholin und Threonin (*VIP-score* < 1 für männliche Fische) zur Einteilung der Proben in die beiden Stämme bei. Bei männlichen Fischen leisten zusätzlich Glutathion (*VIP-score* von 1.08 für weibliche Fische) sowie Alanin, eine unbekannte Substanz mit Resonanz bei 2.39 ppm, ein *bucket*, welches AMP, ADP (Adenosindiphosphat) und ATP enthält (bezeichnet als AXP), Taurin/Betain, Lactat, ein *bucket*, das Glutamat, Prolin und Malat enthält sowie ADP (*VIP-score* < 1 für weibliche Fische) einen entscheidenden Beitrag zur Klassifizierung. Bei der gemeinsamen Analyse männlicher und weiblicher Fische weist die Mehrzahl der geschlechtsspezifischen Variablen ebenfalls einen *VIP-score* von mindestens 1.2 auf. Bei Sarcosin, Cholin und Threonin ist mit einem *VIP-score* zwischen 1 und 1.2 ebenfalls ein, wenn auch geringerer, Beitrag zur Klassifizierung erkennbar. Nur im Falle von Valin und ADP ist mit einem Wert von unter 1 kein Einfluss dieser Variablen ersichtlich.

Folglich lässt sich zusammenfassen, dass, obwohl geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen den Inzucht-Stämmen bestehen, die Variablen mit dem stärksten Beitrag zur Vorhersage der Stammzugehörigkeit bei beiden Geschlechtern identifiziert werden können. Eine gemeinsame Betrachtung aller Daten ermöglicht ebenfalls die Identifizierung nahezu aller, auch geschlechtsspezifischer, Variablen.

6.1.5.2 Detailanalyse der Variablen mittels univariater Methoden

Im nächsten Schritt wurde mittels univariater Methoden im Detail untersucht, ob sich die Konzentration der einzelnen Metaboliten zwischen den beiden Stämmen unterscheidet und wie stark dieser Unterschied ausgeprägt ist. Zum einen wurde eine *fold change* Analyse durchgeführt, wobei für jede Variable anhand der unskalierten Daten der Mittelwert des HO5-Stammes mit dem des iCab-Stammes verglichen wurde. Das Verhältnis zwischen den beiden Mittelwerten wird als *fold change* (FC) angegeben. Analog zur PLS-DA im vorherigen Kapitel wurde diese Analyse einzeln mit den Daten männlicher und weiblicher Fische sowie gemeinsam mit den Daten beider Geschlechter durchgeführt. Als Hypothesentest wurde jeweils ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-*U*-Test mit anschließender FDR-Korrektur durchgeführt. Als Richtwert für die Interpretation der Ergebnisse wurde für den erhaltenen *p*-Wert ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0.01$ festgelegt, welches strenger ist als der weit verbreitete Wert von $\alpha = 0.05$.^[45]

Im Folgenden ist für die auffälligsten Variablen die Verteilung der Datenpunkte nach Stamm und Geschlecht unterteilt in Box-Plots dargestellt (Abbildung 6.7 bis Abbildung 6.10). Im Anhang in Tabelle A.3 sind die Ergebnisse der univariaten Analysen für alle Variablen sowie die gemeinsame Analyse beider Geschlechter aufgelistet. Bei Betrachtung der *p*-Werte fällt auf, dass die gemeinsame Analyse aller Proben kleinere Werte ergibt als die getrennten Analysen männlicher und weiblicher Fische. Der naheliegendste Grund dafür ist, dass eine größere Anzahl an Proben üblicherweise in niedrigeren *p*-Werten resultiert.^[184] Darüber hinaus ergibt die Analyse der weiblichen Fische *p*-Werte, die im Mittel etwa eine Größenordnung höher sind als bei den männlichen Fischen, wobei die Ursache hierfür nicht klar ist. Aus diesem Grund wurde für weibliche Fische ein weniger strenges Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ angewendet.

Der folgende Abschnitt gliedert sich in drei Teile. Zunächst erfolgt die Identifizierung von Metaboliten, welche für den HO5-Stamm höhere Konzentrationen aufweisen. Anschließend erfolgt eine entsprechende Analyse für den iCab-Stamm. Zuletzt werden geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen den beiden Inzucht-Stämmen behandelt.

i) Metaboliten mit höherer Konzentration im Falle des HO5-Stammes. Sowohl bei der univariaten Analyse männlicher als auch weiblicher Fische kann eine erhöhte Konzentration von Aspartat, Fumarat, Ornithin, Phenylalanin, Tyrosin, Hypotaurin, Malat, AMP sowie einer unbekannten Substanz mit Resonanz bei 2.76 ppm in den Lebern des HO5-Stammes identifiziert werden (Abbildung 6.7). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der PLS-DA (vergleiche Kapitel 6.1.5.1).

Aspartat, Fumarat, Ornithin, Phenylalanin, Tyrosin und Hypotaurin weisen für beide Vergleiche einen FC von über 1.3 auf. Die zugehörigen p -Werte liegen für männliche Fische unter beziehungsweise bei 0.001 (0.005 im Falle von Tyrosin). Für weibliche Fische sind die Werte etwas höher, liegen aber für Aspartat, Ornithin und Tyrosin dennoch unter 0.01 und für Fumarat, Phenylalanin und Hypotaurin unter 0.05. Der mit Abstand deutlichste Unterschied zwischen den Stämmen ist für Hypotaurin mit einem FC von über 5 in beiden Fällen zu finden. Bei weiblichen Fischen des HO5-Stammes ist im Box-Plot zu sehen, dass insbesondere die Konzentration einzelner Proben erhöht ist. Da der Vergleich männlicher Fische allerdings zu einem entsprechenden Ergebnis führt, kann davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Unterschied zwischen den Inzucht-Stämmen nicht nur auf einzelne Ausreißer zurückzuführen ist. Auffällig ist allerdings, dass für ein zweites, dem Hypotaurin zugeordnetes, *bucket* sowohl in der multivariaten PLS-DA als auch in der univariaten Analyse keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar sind. Daher ist zu vermuten, dass eines der *buckets* zusätzlich die Resonanzen einer weiteren Substanz umfasst, was allerdings sowohl in den eindimensionalen als auch den zweidimensionalen NMR-Spektren nicht verifiziert werden konnte. Aus diesem Grund muss die Bedeutung von Hypotaurin unter Vorbehalt betrachtet werden.

Bei Malat, AMP sowie der unbekannten Substanz mit Resonanz bei 2.76 ppm liegt der FC-Wert bei beiden Vergleichen zwischen 1.3 und 1.4. Allerdings sind die resultierenden p -Werte bei männlichen Fischen ($p = 0.03$ – 0.05) deutlich größer als bei weiblichen Fischen ($p < 0.001$ für AMP und U2.76, $p = 0.007$ für Malat). Dies deckt sich mit den zuvor beobachteten niedrigeren VIP-scores des PLS-DA-Modells für männliche Fische im Gegensatz zu weiblichen Fischen. Darüber hinaus ist bei Malat eine große Streuung der Datenpunkte des iCab-Stammes im Vergleich zu HO5 erkennbar.

Insbesondere bei Tyrosin, Ornithin und Hypotaurin fällt auf, dass es nicht nur einen Konzentrationsunterschied zwischen den Stämmen, sondern auch den Geschlechtern gibt, worauf in Kapitel 6.1.6 genauer eingegangen wird.

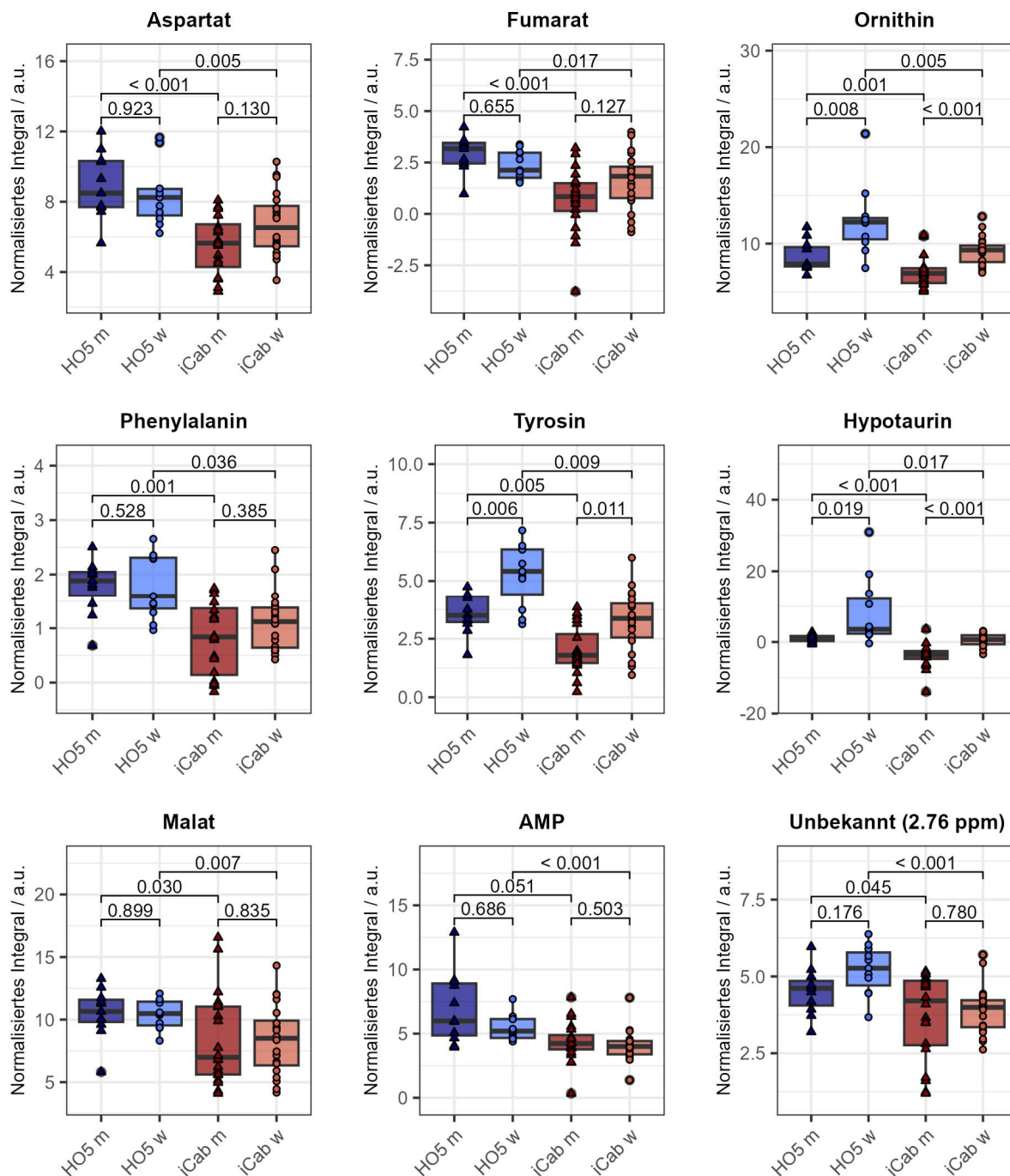


Abbildung 6.7: Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben des HO5-Stammes verglichen mit Mustern des iCab-Stammes. Die Daten sind nach Stamm sowie Geschlecht unterteilt. Angegeben sind p -Werte nach Mann-Whitney- U -Tests mit FDR-Korrektur zwischen den einzelnen Gruppen. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet.

ii) Metaboliten mit höherer Konzentration im Falle des iCab-Stammes. Eine erhöhte Konzentration in Lebern des iCab-Stammes sowohl bei der univariaten Analyse männlicher als auch weiblicher Fische konnte nur für ATP, Lactat/Threonin sowie eine unbekannte Substanz mit Resonanz bei 8.51 ppm gefunden werden (Abbildung 6.8), was sich ebenfalls mit den wichtigsten in der PLS-DA identifizierten Variablen deckt (vergleiche Kapitel 6.1.5.1). Diese drei Variablen weisen in beiden Analysen einen FC von unter 0.7 (was einer etwa 1.4-fach höheren Konzentration entspricht) sowie einen p -Wert kleiner als 0.001 ($p = 0.001$ für U8.51 bei männlichen Fischen) auf. Wie bereits in der PLS-DA beobachtet, zeigt ein zweites Lactat zugeordnetes *bucket* insbesondere bei der Betrachtung männlicher Fische ebenfalls eine höhere Konzentration im iCab-Stamm ($FC = 0.84$, $p = 0.004$, vergleiche Tabelle A.3 im Anhang). Dies lässt vermuten, dass die beobachteten Unterschiede für die Variable Lactat/Threonin auf Lactat und nicht auf Threonin zurückzuführen sind, welches darüber hinaus in deutlich höherer Konzentration vorliegt.

Bei ATP sowie der unbekannten Substanz mit Resonanz bei 8.51 ppm kann darüber hinaus ein Unterschied zwischen den Geschlechtern beobachtet werden. Im Falle von ATP ist dieser nur innerhalb des iCab-Stammes zu beobachten, im Falle der unbekannten Substanz innerhalb beider Stämme.

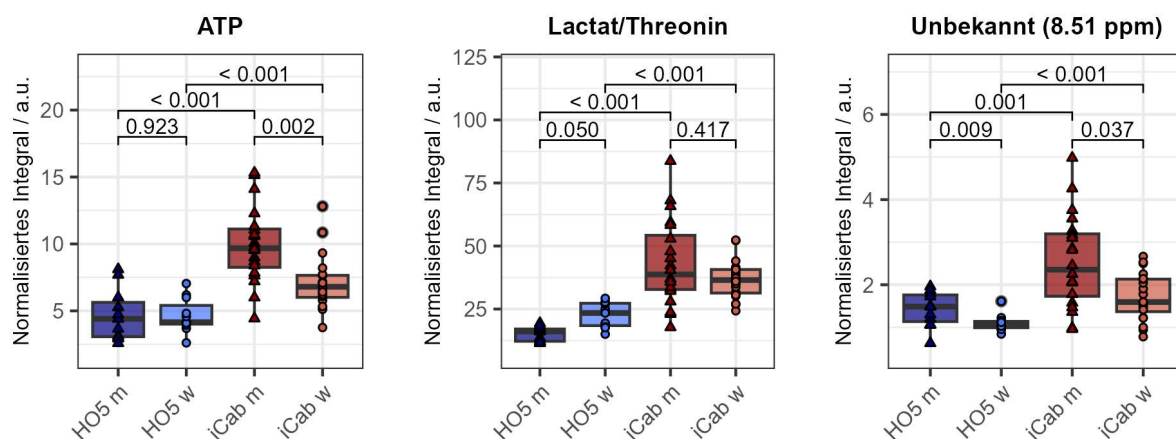


Abbildung 6.8: Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben des iCab-Stammes verglichen mit Mustern des HO5-Stammes. Die Daten sind nach Stamm sowie Geschlecht unterteilt. Angegeben sind p -Werte nach Mann-Whitney- U -Tests mit FDR-Korrektur zwischen den einzelnen Gruppen. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet.

iii) Geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen HO5- und iCab-Stamm. Wie schon in der PLS-DA beobachtet (vergleiche Kapitel 6.1.5.1), ist für einige Variablen nur bei einem der Geschlechter ein Unterschied zwischen den Inzucht-Stämmen erkennbar (Abbildung 6.9 und Abbildung 6.10).

Für Taurin/Betain, eine unbekannte Substanz mit Resonanz bei 2.39 ppm, Glutathion, Alanin, Glutamat/Prolin/Malat, ADP sowie AXP konnte nur bei männlichen Fischen ein Unterschied zwischen den Stämmen gefunden werden (Abbildung 6.9). Taurin/Betain ($FC = 1.18$, $p = 0.002$) sowie die unbekannte Substanz mit Resonanz bei 2.39 ppm ($FC = 2.06$, $p < 0.001$) liegen im HO5-Stamm in höherer Konzentration vor. Bei der unbekannten Substanz mit Resonanz bei 2.39 ppm ist dabei speziell die Konzentration bei männlichen Fischen des iCab-Stammes im Vergleich zu den anderen Gruppen geringer. Dies führt innerhalb des iCab-Stammes ebenfalls zu einem Konzentrationsunterschied zwischen den Proben männlicher und weiblicher Fische. Bei Taurin/Betain ist insbesondere die Konzentration bei den männlichen Fischen des HO5-Stammes erhöht, was innerhalb dieses Stammes ebenfalls in einem Konzentrationsunterschied zwischen den Geschlechtern resultiert. Auch ein zweites *bucket*, welches sich Taurin zuordnen lässt, zeigt univariat einen, wenn auch geringeren, Unterschied zwischen den männlichen Fischen beider Stämme ($FC = 1.12$, $p = 0.04$, vergleiche Tabelle A.3 im Anhang), obwohl dieses in der PLS-DA nicht zur Klassifizierung beträgt. Dies deutet darauf hin, dass sowohl Taurin als auch Betain bei männlichen Fischen des Stammes HO5 eine höhere Konzentration aufweisen. Glutathion, Alanin, Glutamat/Prolin/Malat, ADP sowie AXP sind, bei dem Vergleich männlicher Fische, in den Lebern des iCab-Stammes mit einem FC zwischen 0.7 und 0.8 in höherer Konzentration vorhanden. Die zugehörigen p -Werte liegen für Glutathion, Alanin und AXP unter beziehungsweise bei 0.001 und für Glutamat/Prolin/Malat sowie ADP unter 0.01. Zwei weitere *buckets*, die Glutamat enthalten, zeigen univariat auch einen geringen Unterschied zwischen den männlichen Fischen beider Stämme (Glutamat/Glutamin: $FC = 0.85$, $p = 0.03$, Glutamat/Prolin: $FC = 0.85$, $p = 0.09$, siehe Tabelle A.3 im Anhang), sodass nicht abschließend geklärt werden kann, auf welche Substanz diese Unterschiede tatsächlich zurückzuführen sind. Im Falle von Alanin und Glutamat/Prolin/Malat ist in männlichen Fischen des HO5-Stammes eine deutlich geringere Konzentration nachweisbar als in allen anderen Proben. Dies resultiert ebenfalls in einem Konzentrationsunterschied zwischen den Proben männlicher und weiblicher Fische innerhalb des HO5-Stammes. Bei ADP und AXP dagegen zeigen die männlichen Fische des iCab-Stammes

eine besonders hohe Konzentration, was innerhalb des iCab-Stammes ebenfalls zu einem Konzentrationsunterschied zwischen den Geschlechtern führt.

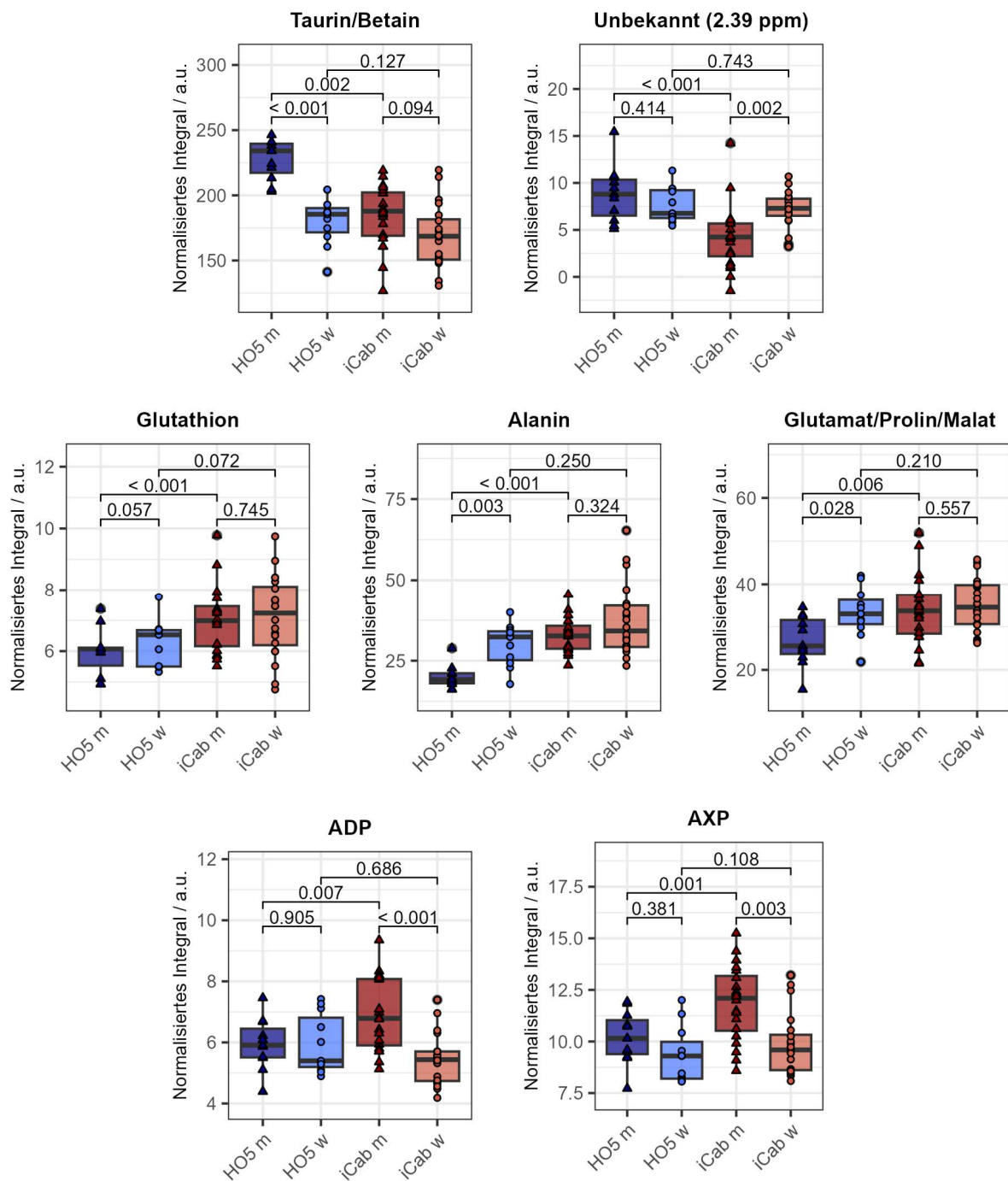


Abbildung 6.9: Box-Plots von Substanzen mit einem Konzentrationsunterschied zwischen HO5- und iCab-Stamm bei männlichen Fischen. Die Daten sind nach Stamm sowie Geschlecht unterteilt. Angegeben sind p -Werte nach Mann-Whitney- U -Tests mit FDR-Korrektur zwischen den einzelnen Gruppen. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet.

Im Falle von Threonin und Sarcosin ($p < 0.05$) sowie Cholin und Valin ($p < 0.01$) konnte mit einem FC zwischen 0.7 und 0.9 nur bei weiblichen Fischen ein Unterschied zwischen den Stämmen gefunden werden, wobei alle Substanzen eine höhere Konzentration in den Proben des iCab-Stammes aufweisen (Abbildung 6.10). Allerdings müssen für Sarcosin, Cholin und Valin die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Stämmen aufgrund der großen Streuung innerhalb der Proben des iCab-Stammes unter Vorbehalt betrachtet werden. Im Falle von Threonin ist darüber hinaus ein geringer Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Fischen zu erkennen.

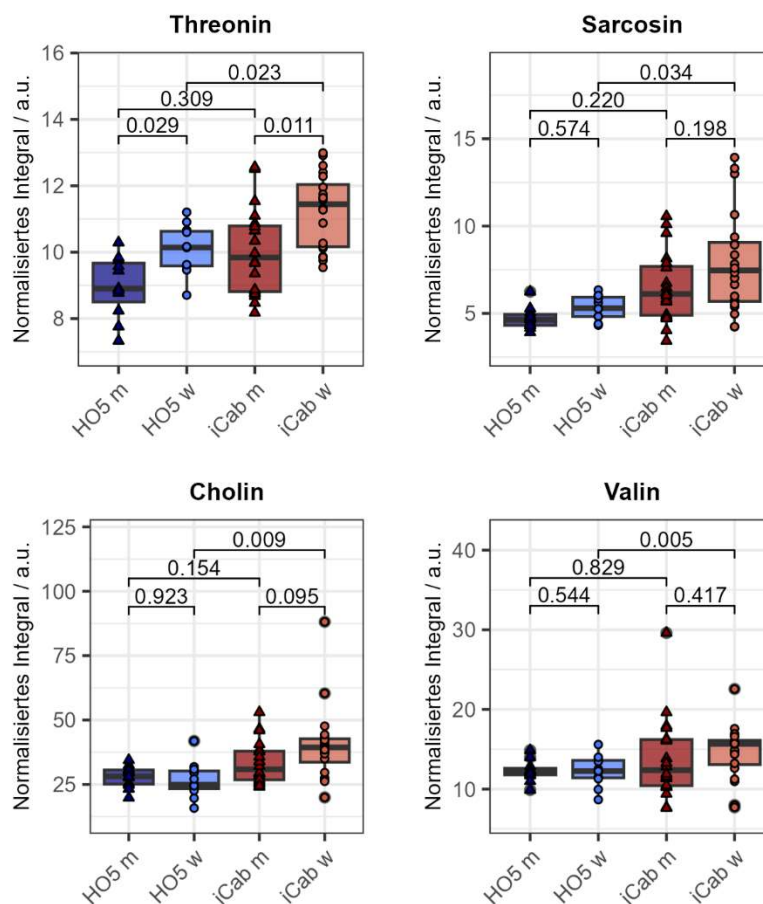


Abbildung 6.10: Box-Plots von Substanzen mit einem Konzentrationsunterschied zwischen HO5- und iCab-Stamm bei weiblichen Fischen. Die Daten sind nach Stamm sowie Geschlecht unterteilt. Angegeben sind p -Werte nach Mann-Whitney- U -Tests mit FDR-Korrektur zwischen den einzelnen Gruppen.

Bei der univariate Analyse aller Daten ohne Unterteilung nach Geschlecht konnten, trotz der hier beschriebenen und in Abbildung 6.9 und Abbildung 6.10 deutlich sichtbaren Unterschiede zwischen den Proben männlicher und weiblicher Fische, vergleichbare Unterschiede zwischen den Inzucht-Stämmen identifiziert werden (Anhang, Tabelle A.3). So können für nahezu alle zuvor diskutierten Substanzen p -Werte kleiner als 0.01 erhalten werden. Nur im Falle von Valin ($p = 0.03$) und ADP ($p = 0.2$) liegen diese höher. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der PLS-DA, in welcher eine gemeinsame Betrachtung aller Daten ebenfalls die Identifizierung nahezu aller, auch geschlechtsspezifischer, Variablen ermöglichte.

6.1.5.3 Diskussion zugrundeliegender Stoffwechselwege

In den beiden vorherigen Abschnitten wurden Unterschiede im Leber-Metabolom der beiden Inzucht-Stämme HO5 und iCab identifiziert. Die Metaboliten mit den deutlichsten Konzentrationsunterschieden zwischen dem HO5-Stamm und dem iCab-Stamm sowie Stoffwechselwege, die damit in Zusammenhang stehen könnten, sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tabelle 6.1: Substanzen mit unterschiedlicher Konzentration in Lebern des HO5- und des iCab-Stammes sowie damit in Verbindung stehende Stoffwechselwege. Die Pfeile geben an, ob die jeweilige Substanz im HO5-Stamm in höherer (↑) oder niedrigerer (↓) Konzentration vorhanden ist und wie stark dieser Unterschied ausgeprägt ist.

HO5 vs. iCab	
Substanz	Stoffwechselweg
Aspartat ↑↑↑ Fumarat ↑↑↑ Ornithin ↑↑	Harnstoffzyklus
Aspartat ↑↑↑ Malat ↑↑	Malat-Aspartat-Shuttle
Phenylalanin ↑↑↑ Tyrosin ↑↑↑	Melaninsynthese
Taurin ↑↑ Hypotaurin ↑↑↑	Taurinsynthese
Lactat ↓↓↓	Cori-Zyklus
AMP ↑↑ ADP ↓ ATP ↓↓↓ AXP ↓↓	Energiestoffwechsel

Aspartat, Fumarat und Ornithin sind Teil des Harnstoffzyklus,^[185] wobei weitere Metaboliten dieses Stoffwechselweges NMR-spektroskopisch nicht nachgewiesen werden konnten. Der Harnstoffzyklus dient bei Säugetieren dazu, toxische stickstoffhaltige Abbauprodukte, welche in Form von Ammoniumionen vorliegen, in der Leber zu Harnstoff umzuwandeln, welcher schließlich ausgeschieden wird.^[185] Die meisten Fische sind zwar ammoniotelische Organismen, die stickstoffhaltige Abbauprodukte meist direkt über die Kiemen als Ammoniak ausscheiden und nicht über den Harnstoffzyklus abbauen,^[185, 186] dennoch scheiden viele Fische Harnstoff aus^[186]. In verschiedenen Teleostei konnte außerdem die Anwesenheit einiger Schlüsselenzyme des Harnstoffzyklus nachgewiesen werden. Die Aktivität der entsprechenden Enzyme ist häufig nur gering, scheint jedoch mit bestimmten Umgebungsbedingungen wie einem erhöhten Ammoniaklevel im Wasser zu korrelieren. Eine Hypothese ist, dass der gebildete Harnstoff als Osmoregulator dient. Darüber hinaus scheint auch ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des Harnstoffzyklus und dem Lebenszyklus der Fische zu bestehen.^[186] Eine Untersuchung circadianer Schwankungen im Leber-Metabolom von Medaka ergab, dass unter den Metaboliten des Harnstoffzyklus tagsüber die Ornithin- und nachts die Citrullinkonzentration ansteigt. Dies deutet laut der Autoren darauf hin, dass der Harnstoffzyklus tagsüber verstärkt aktiviert wird.^[96] In der vorliegenden Arbeit weist die höhere Konzentration an Fumarat und Ornithin in den Lebern des HO5-Stammes ebenfalls auf eine verstärkte Aktivität des Harnstoffzyklus im Vergleich zum iCab-Stamm hin. Fraglich ist allerdings, warum Aspartat, welches ein Substrat des Harnstoffzyklus darstellt und somit verstärkt aufgebraucht werden sollte, ebenfalls erhöht ist. Möglicherweise wird Aspartat bei Fischen des HO5-Stammes vermehrt hergestellt, um den erhöhten Bedarf als Substrat für den Harnstoffzyklus zu decken. Des Weiteren könnte Aspartat auch im Rahmen anderer Stoffwechselwege, wie im nächsten Absatz dargelegt wird, entstehen. Warum die Aktivität des Harnstoffzyklus in den Lebern des HO5-Stammes erhöht sein könnte, ist bisher nicht klar. Da alle Tiere unter denselben Bedingungen gehalten wurden und ein identisches Alter aufwiesen, sind die Umgebungsbedingungen oder der Lebenszyklus der Tiere als Ursache für die Unterschiede zwischen den Stämmen unwahrscheinlich.

Die höhere Konzentration von Aspartat und Malat in den Lebern des HO5-Stammes könnte darüber hinaus auf eine verstärkte Aktivität des Malat-Aspartat-Shuttles zurückzuführen sein. Dieses System kommt bei Säugetieren unter anderem in der Leber vor und dient dem indirekten Transfer des in der Glykolyse erzeugten Reduktionsmittels NADH (Nicotinamid-

Adenin-Dinukleotid) vom Cytosol in die Mitochondrien. Dort wird es der Atmungskette zugeführt und dient als Energieträger für die ATP-Synthese.^[185] Auch in Medaka gibt es Hinweise auf das Vorhandensein der Aspartat-Aminotransferase, dem zentralen Enzym des Malat-Aspartat-Shuttles.^[187] Somit könnte die höhere Konzentration dieser beiden Substanzen auf einen erhöhten Energiebedarf des HO5-Stammes hindeuten.

Phenylalanin kann in der Leber zu Tyrosin umgewandelt werden, welches wiederum einen Ausgangsstoff für Melanin darstellt.^[185, 188] Dabei wird in den Melanozyten während der sogenannten Melanogenese Tyrosin durch das Enzym Tyrosinase erst zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin und schließlich zu Melanin umgewandelt, welches für die Pigmentierung der Haut verantwortlich ist.^[188] Auch bei Medaka ist die Tyrosinase vorhanden.^[189] Die höhere Konzentration von Phenylalanin und Tyrosin in den Lebern des HO5-Stammes zusammen mit einer verringerten Pigmentierung dieser Fische (unveröffentlichte Beobachtung von Felix Loosli) weist auf eine gestörte Melaninsynthese und eine dadurch bedingte Ansammlung der Intermediate hin. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass es bei Fischen im Gegensatz zu Säugetieren zusätzlich zu den Melanophoren noch bis zu fünf weitere Chromatophore gibt, wodurch die Vielfalt der Pigmentmuster sehr viel komplexer ist.^[190]

Darüber hinaus zeigen Taurin und Hypotaurin, letzteres stellt ein Intermediat in der Taurinsynthese dar, eine höhere Konzentration in Proben des HO5-Stammes. Taurin ist sowohl bei Menschen als auch bei Tieren elementarer Bestandteil verschiedener Prozesse wie der Konjugation von Gallensäuren, der Osmoregulation, Membranstabilisierung, Modulation des zellulären Kalziumspiegels und Entgiftung. Besonders wichtig scheint es dabei während der Entwicklung zu sein.^[191, 192] Taurin wird vorwiegend über die Nahrung aufgenommen, kann aber auch in der Leber aus Methionin über Cystein und Hypotaurin synthetisiert werden.^[191, 192] Zebrafische verfügen während der Embryonalentwicklung über einen vollständigen Taurin-Biosyntheseweg. Das mRNA-Transkript des Enzyms Cysteinsulfinat-decarboxylase, welches die Synthese von Hypotaurin katalysiert, konnte dabei unter anderem auch in embryonalem Lebergewebe gefunden werden.^[193] Dies weist darauf hin, dass Taurin bei Teleostei ebenfalls eine elementare Rolle im Stoffwechsel spielt, welche möglicherweise über die Embryonalentwicklung hinausgehen könnte. Die höhere Konzentration von Taurin

und Hypotaurin in den Lebern des HO5-Stammes könnte somit auf eine verstärkte Aktivität des Taurin-Biosynthesewegs zurückzuführen sein.

In der Leber vorliegendes Lactat ist normalerweise Teil des Cori-Zyklus, welcher den Austausch zwischen im Muskel anfallendem Lactat und Glucose aus der Leber umfasst. Während der anaeroben Glykolyse wird das in den Muskeln gespeicherte Glykogen zu Lactat umgewandelt und über das Blut zur Leber transportiert. Dort wird es durch die Lactat-Dehydrogenase zu Pyruvat verstoffwechselt, welches anschließend entweder über die Gluconeogenese zu Glucose oder Glykogen metabolisiert wird oder genutzt werden kann, um über den Citratzyklus und die Atmungskette den Energieträger ATP zu generieren.^[185] Die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase wurde in der Leber verschiedener Fisch-Spezies nachgewiesen, wobei die Aktivität sehr unterschiedlich und in manchen Arten kaum vorhanden war.^[194] In der Leber von Medaka konnte darüber hinaus ein Genloкус für die Lactat-Dehydrogenase sowie ein Isoenzym der Lactat-Dehydrogenase nachgewiesen werden, was grundsätzlich für das Vorhandensein dieses Stoffwechselweges spricht.^[195, 196] Die höhere Lactat-Konzentration in den Lebern des iCab-Stammes könnte somit entweder für einen geringeren Energiebedarf der Fische dieses Stammes oder eine unspezifische verringerte Aktivität der Lactat-Dehydrogenase sprechen.

ATP, ADP und AMP sind grundlegende Bestandteile des Energiestoffwechsels, wobei ATP der universelle Energieträger in Zellen ist.^[185] Aufgrund der Beteiligung dieser Substanzen an vielen Stoffwechselwegen, kann an dieser Stelle keine Korrelation zwischen den beobachteten Konzentrationen und spezifischen Stoffwechselwegen hergestellt werden.

6.1.6 Unterschiede im Metabolom männlicher und weiblicher Fische

Neben der im vorherigen Kapitel erörterten Klassifizierung nach Inzucht-Stamm wurde in der PCA (Kapitel 6.1.4, Abbildung 6.3 und Abbildung 6.5) ebenfalls eine, wenn auch nicht so stark ausgeprägte, Klassifizierung der Proben nach Geschlecht beobachtet. Weiterhin waren in Kapitel 6.1.5.1 und 6.1.5.2 geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen den Stämmen erkennbar. Entsprechend soll, analog zu den Analysen in Kapitel 6.1.5, ein kurzer Vergleich der Geschlechtergruppen erfolgen. Dieser wird getrennt für HO5 und iCab durchgeführt, damit die Varianz zwischen den Stämmen die Analyse nicht beeinflusst. Eine zusätzliche gemeinsame Analyse beider Stämme soll zeigen, ob dies zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf dem Unterschied zwischen den Stämmen liegt, sollen an dieser Stelle ausschließlich die auffälligsten Unterschiede zwischen den Geschlechtern thematisiert werden.

6.1.6.1 Klassifizierung mittels multivariater *partial least squares discriminant analysis*

In Abbildung 6.11 ist die Klasseneinteilung in männlich und weiblich nach einer PLS-DA zusammen mit den Variablen, die nach der VIP-Methode jeweils den größten Beitrag zum Modell leisten ($VIP\text{-score} \geq 1.2$), dargestellt. Die *VIP-scores* aller Variablen sind im Anhang in Tabelle A.4 zu finden. Die Validierung mittels Kreuzvalidierung und Permutationstest ergab für alle drei Modelle eine hohe Vorhersagekraft (vergleiche Abbildung 6.11).

Von den Variablen, welche mit einem *VIP-score* von mindestens 1.2 einen wesentlichen Einfluss auf die Klassifizierung haben, können acht sowohl in der separaten Analyse der Inzucht-Stämme als auch in der gemeinsamen Analyse aller Proben identifiziert werden, allerdings mit unterschiedlichem Beitrag. Diese umfassen Kreatin/Lysin, 3-Methylhistidin, Glutathion (reduziert), Tyrosin, Threonin, eine unbekannte Substanz mit Resonanz bei 7.96 ppm, bei welcher es sich vermutlich um einen Uridindiphosphat-Zucker handelt, sowie zwei unbekannte Substanzen mit Resonanzen bei 3.14 und 3.16 ppm.

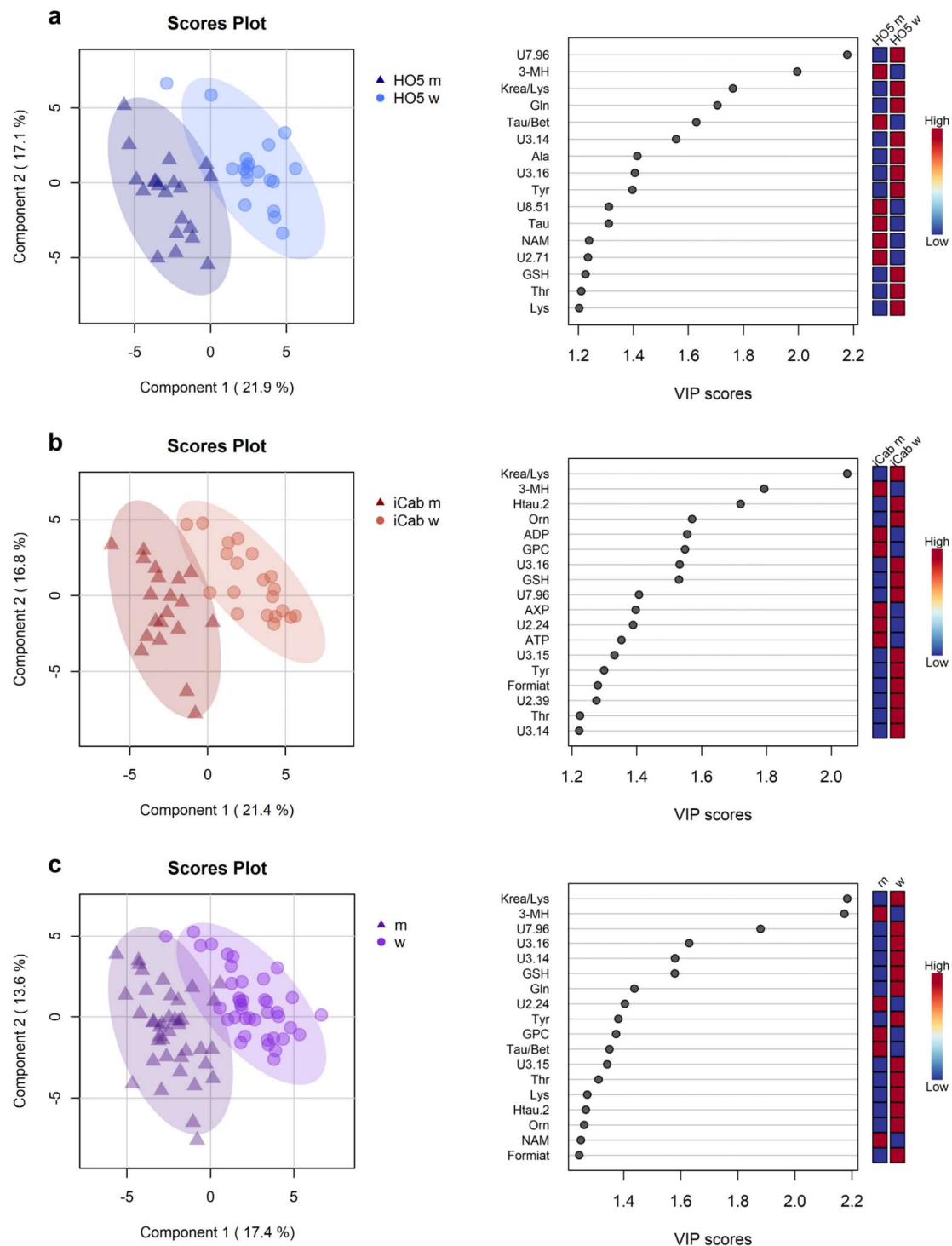


Abbildung 6.11: PLS-DA zur Unterscheidung männlicher und weiblicher Fische. Links: PLS-DA *scores plot*. Rechts: Variablen, die nach der VIP-Methode jeweils den größten Beitrag zur Trennung der Gruppen entlang Komponente 1 leisten (VIP-score ≥ 1.2). a: HO5. R^2 : 0.83, Q^2 : 0.70, $p = 0.005$. b: iCab. R^2 : 0.84, Q^2 : 0.76, $p < 0.001$. c: Gemeinsame Analyse beider Stämme. R^2 : 0.79, Q^2 : 0.72, $p < 0.001$. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit „U“ sowie der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode angegeben. Abkürzungen: 3-MH: 3-Methylhistidin, ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, AXP: AMP, ADP und ATP, Bet: Betain, GPC: L- α -Glycerolphosphorylcholin, GSH: Glutathion (reduziert), Htau: Hypotaurin, Krea: Kreatin, NAM: Nicotinamid, Orn: Ornithin, Tau: Taurin.

Darüber hinaus sind auch stammspezifische Unterschiede zwischen den Geschlechtern erkennbar. So tragen zusätzlich zu den zuvor genannten Substanzen insbesondere im Falle des HO5-Stammes eine unbekannte Substanz mit Resonanz bei 8.51 ppm, Lysin und Nicotinamid (VIP-score von 1.17, 1.08 und 1.07 für iCab) sowie ausschließlich bei HO5 Glutamin, Alanin, eine unbekannte Substanz mit Resonanz bei 2.71 ppm sowie Taurin und Taurin/Betain zur Einteilung in männlich und weiblich bei (VIP-score < 1 für iCab). Für den iCab-Stamm leisten zusätzlich Ornithin, Hypotaurin, Formiat und zwei unbekannte Substanzen mit Resonanzen bei 3.15 und 2.24 ppm (VIP-scores von 1.14, 1.01, 1.03, 1.11 und 1.07 für HO5) sowie L- α -Glycerolphosphorylcholin, ADP und ATP sowie eine unbekannte Substanz mit Resonanz bei 2.39 ppm einen Beitrag zur Klassifizierung (VIP-score < 1 für HO5). Wie bereits in Kapitel 6.1.5.1 beobachtet, weist auch hier im Falle von Hypotaurin nur eines der beiden *buckets* einen VIP-score größer als 1 auf. Bei der gemeinsamen Analyse der Proben beider Inzucht-Stämme besitzt mit Glutamin, L- α -Glycerolphosphorylcholin, Taurin/Betain, Lysin, Hypotaurin, Ornithin, Nicotinamid und Formiat sowie den unbekannten Substanzen mit Resonanzen bei 2.24 und 3.15 ppm etwa die Hälfte der stammspezifischen Variablen ebenfalls einen VIP-score von mindestens 1.2. Bei Taurin, Alanin und der unbekannten Substanz mit Resonanz bei 8.51 ppm ist mit einem VIP-score zwischen 1 und 1.2 ebenfalls ein, wenn auch geringerer, Beitrag zur Klassifizierung erkennbar. Im Falle von ADP und ATP sowie zwei unbekannten Substanzen mit Resonanz bei 2.39 und 2.71 ppm ist mit einem Wert von unter 1 allerdings kein Einfluss dieser Variablen ersichtlich.

6.1.6.2 Detailanalyse der Variablen mittels univariater Methoden

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Variablen mittels univariater Methoden im Detail untersucht. Es wurde eine *fold change* Analyse durchgeführt, wobei für jede Variable der Mittelwert männlicher Fische mit dem weiblicher Fische verglichen wurde und ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test mit anschließender FDR-Korrektur als Hypothesentest durchgeführt wurde. Als Richtwert für die Interpretation der Ergebnisse wurde für den erhaltenen *p*-Wert ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ festgelegt. Im Folgenden soll nur auf die auffälligsten Variablen eingegangen werden, die sowohl in der separaten Analyse der Inzucht-Stämme als auch in der gemeinsamen Analyse aller Proben identifiziert werden konnten. In Abbildung 6.12 und Abbildung 6.13 ist die Verteilung der Datenpunkte nach Stamm und

Geschlecht unterteilt in Box-Plots dargestellt. Im Anhang in Tabelle A.5 sind die Ergebnisse der univariaten Analysen für alle Variablen sowie die gemeinsame Analyse beider Stämme aufgelistet.

Von den Substanzen, welche in der PLS-DA sowohl bei der getrennten Analyse von HO5 und iCab als auch bei der gemeinsamen Analyse beider Stämme einen VIP-score von mindestens 1.2 besitzen, weist nur 3-Methylhistidin eine höhere Konzentration in Proben männlicher Fische auf. Mit einem FC von über 10 und p -Werten unter 0.001 ist dieser Unterschied bei beiden Stämmen allerdings deutlich ausgeprägt (Abbildung 6.12). Daneben konnte in der univariaten Analyse auch für Nicotinamid mit einem FC von etwa 1.6 ($p = 0.002$ für HO5 und $p = 0.005$ für iCab) und die unbekannte Substanz mit Resonanz bei 8.51 ppm mit einem FC zwischen 1.4 und 1.5 ($p = 0.009$ für HO5 und $p = 0.037$ für iCab, vergleiche Abbildung 6.8) eine höhere Konzentration bei männlichen Tieren festgestellt werden.

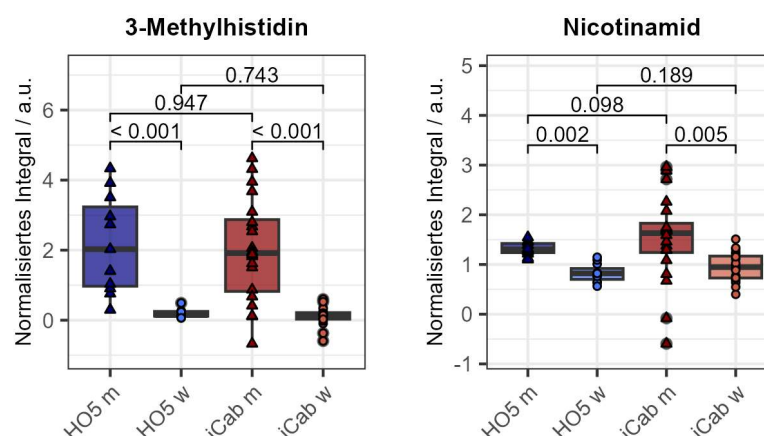


Abbildung 6.12. Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben männlicher Fische verglichen mit weiblichen Fischen. Die Daten sind nach Stamm sowie Geschlecht unterteilt. Angegeben sind p -Werte nach Mann-Whitney- U -Tests mit FDR-Korrektur zwischen den einzelnen Gruppen.

Die sonstigen in allen PLS-DA Modellen identifizierten Substanzen sind in den Lebern weiblicher Fische in höherer Konzentration vorhanden (Abbildung 6.13). Im Falle von Kreatin/Lysin liegt der FC bei beiden Vergleichen bei einem Wert von etwa 0.42 ($p < 0.001$), was bedeutet, dass Kreatin in den Lebern weiblicher Fische in mehr als der doppelten Konzentration vorliegt als in den Lebern männlicher Fische. Ein *bucket*, welches nur Lysin zuzuordnen ist, weist einen schlechteren FC von etwa 0.8 auf ($p = 0.01$ für HO5 und $p = 0.039$ für iCab). Dies weist darauf hin, dass sowohl Kreatin als auch Lysin in den Lebern weiblicher Fische in höherer Konzentration vorliegen. Auch reduziertes Glutathion (Abbildung 6.13), Tyrosin, Threonin (vergleiche Abbildung 6.7 und Abbildung 6.10) sowie die unbekannten

Substanzen mit Resonanz bei 3.14, 3.15 und 3.16 ppm sind mit FC-Werten zwischen 0.62 und 0.92 und p -Werten kleiner 0.05 erhöht. In der univariaten Analyse konnte darüber hinaus für Formiat (Abbildung 6.13) sowie Ornithin und Hypotaurin (Abbildung 6.7) ebenfalls bei weiblichen Fischen eine höhere Konzentration festgestellt werden. Bei Formiat und Hypotaurin ist der beobachtete Unterschied mit FC-Werten von etwa 0.2 stark ausgeprägt. Außer im Falle von Hypotaurin bei dem iCab-Stamm ($p < 0.001$) sind die p -Werte mit Werten zwischen 0.02 und 0.05 allerdings relativ hoch. Auch Ornithin weist einen FC von 0.76 bei einem p -Wert von 0.008 für HO5 beziehungsweise unter 0.001 für iCab auf.

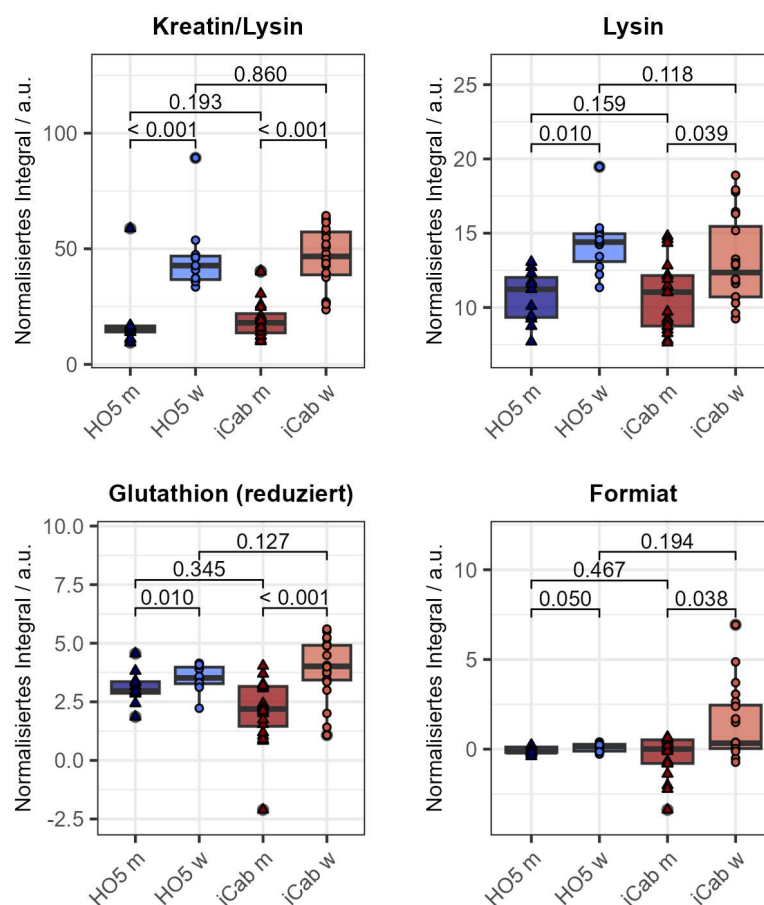


Abbildung 6.13: Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben weiblicher Fische verglichen mit männlichen Fischen. Die Daten sind nach Stamm sowie Geschlecht unterteilt. Angegeben sind p -Werte nach Mann-Whitney- U -Tests mit FDR-Korrektur zwischen den einzelnen Gruppen.

Die sonstigen Unterschiede, die in der PLS-DA oder univariat beobachtet werden konnten, wurden vorwiegend nur innerhalb der Proben eines Stammes identifiziert, weshalb diese an dieser Stelle nicht weiter betrachtet werden sollen.

6.1.6.3 Diskussion zugrundeliegender Stoffwechselwege

Im Folgenden sollen mögliche Ursachen für die beobachteten Konzentrationsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Fischen diskutiert werden, wobei nur auf die beiden auffälligsten Metabolite, Kreatin und 3-Methylhistidin eingegangen werden soll.

Kreatin spielt eine wesentliche Rolle im Energiestoffwechsel und trägt unter anderem zur Versorgung der Muskeln mit Energie bei. In Säugetieren findet die Synthese in zwei Schritten in den Nieren und der Leber statt.^[197] Die Kreatinsynthese in Teleost-Spezies wurde bisher nur wenig untersucht. Eine Studie kommt zu dem Schluss, dass die Expressionsmuster zweier Schlüsselenzyme in Zebrafischen und Säugetieren vergleichbar sind.^[198] Auch bei anderen Fischen wurde die Expression der wesentlichen an der Synthese von Kreatin beteiligten Enzyme in der Niere, der Leber sowie Muskelgewebe untersucht.^[199] Dabei kommen die Autoren allerdings zu dem Ergebnis, dass bei Fischen im Vergleich zu Säugetieren die Expressionslevel in Nieren und Leber deutlich niedriger und dafür in den Muskeln erhöht sind. Diese Ergebnisse bestätigen grundsätzlich das Vorliegen von Kreatin in der Leber von Fischen. Die hier beobachtete höhere Kreatinkonzentration in den Lebern weiblicher Fische weist auf einen erhöhten Energiebedarf hin. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Weibchen die verstärkte Energieversorgung für das Eierlegen benötigen.

3-Methylhistidin stellt im Urin von Säugetieren einen Biomarker für den Abbau von Skelettmuskelprotein dar.^[200] Auch in den Muskeln der Regenbogenforelle wurden hohe Konzentrationen an 3-Methylhistidin gefunden.^[201] In Ratten konnte es neben den Muskeln ebenfalls in geringen Mengen in anderen Geweben wie der Leber nachgewiesen werden.^[202] Welche Relevanz 3-Methylhistidin allerdings in der Leber hat und warum bei den vorliegenden Daten eine höhere Konzentration in den Lebern männlicher Fischen beobachtet werden konnte, ist unklar. Möglicherweise könnte dies ebenfalls auf einen verstärkten Abbau und Umsatz von Skelettmuskelprotein hinweisen.

Nach aktuellem Stand wurde bisher erst in einer Studie von Qiao *et al.* das Leber-Metabolom männlicher und weiblicher Medaka mittels NMR-Spektroskopie verglichen.^[122] Dabei ist Kreatin der einzige Metabolit, für welchen in der vorliegenden Arbeit ein vergleichbarer Unterschied zwischen den Geschlechtern beobachtet werden konnte. Allerdings wurde in der Arbeit von Qiao *et al.*, trotz einer zur vorliegenden Arbeit vergleichbaren Extraktionsmethode eine deutliche höhere Anzahl an zum Teil sehr untypischen Metaboliten identifiziert.

Da anhand der vorliegenden Informationen nicht beurteilt werden, wie verlässlich diese Zuordnung ist, erscheint ein Vergleich mit den Ergebnissen dieser Studie nicht sinnvoll.

6.1.7 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurden die wasserlöslichen Metaboliten in den Lebern männlicher und weiblicher Fische der Medaka Inzucht-Stämme HO5 und iCab untersucht, wobei der Fokus auf der Unterscheidung der Stämme lag. Hierzu wurde zunächst eine unüberwachte PCA durchgeführt, in welcher bereits eine eindeutige Unterteilung der Proben hinsichtlich des Inzucht-Stammes zu erkennen war. Mittels überwachter PLS-DA konnte noch eine deutlichere Trennung zwischen HO5 und iCab erreicht und darüber hinaus Variablen identifiziert werden, die zur Klassifizierung der Daten beitragen. Anschließend wurden die relativen Konzentrationsunterschiede einzelner Variablen mittels univariater Methoden (*fold change* Analyse und Mann-Whitney-*U*-Test) untersucht. Alle Analysen wurden zum einen einzeln mit den Daten männlicher und weiblicher Fische und zum anderen mit allen Daten gemeinsam durchgeführt. Mit allen drei Datensätzen konnte annähernd dieselbe Gruppe an Metaboliten identifiziert werden, deren relative Konzentration sich zwischen den Inzucht-Stämmen unterscheidet. Die auffälligsten Unterschiede betreffen hierbei Aspartat, Fumarat, Ornithin, Malat, Phenylalanin, Tyrosin, Taurin und Hypotaurin, welche im HO5-Stamm in höherer Konzentration vorliegen, sowie ATP und Lactat mit erhöhter Konzentration im iCab-Stamm. Diese Beobachtungen weisen auf unterschiedlich aktive Stoffwechselwege hin wie etwa den Harnstoffzyklus, das Malat-Aspartat-Shuttle, den Cori-Zyklus sowie die Melanin- und Taurinsynthese. Auch das Metabolom männlicher und weiblicher Fische wurde analog verglichen. Dabei wurde deutlich, dass der Unterschied zwischen den Geschlechtergruppen zwar erkennbar, aber geringer ausgeprägt ist als der Unterschied zwischen den Stämmen. Besonders auffällig war dabei eine höhere Konzentration an Kreatin in weiblichen Fischen und an 3-Methylhistidin in männlichen Fischen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die hier verwendete NMR-basierte Methode geeignet ist, um subtile Unterschiede im Leber-Metabolom adulter Medaka zu erfassen. Die beobachteten metabolischen Unterschiede zwischen den beiden etablierten Inzucht-Stämmen HO5 und iCab legen nahe, dass auch zwischen den Linien des MIKK-Panels Unterschiede im Metabolom

detektierbar sein sollten. Der Modellorganismus Medaka, insbesondere die Inzucht-Linien des MIKK-Panels, ist in der biomedizinischen Forschung von großem Interesse für die Untersuchung komplexer Genotyp-Phänotyp-Interaktionen sowie der Auswirkung verschiedener Umweltfaktoren auf die Ausprägung des Phänotyps. Diese Zusammenhänge sollen zukünftig mithilfe von GWAS genauer untersucht werden, deren Durchführbarkeit an Medaka bereits erprobt wurde (unveröffentlichte Untersuchungen von Felix Loosli, Ewan Birney und Joachim Wittbrodt). Wie in diesem Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, kann die Analyse des Metaboloms mittels NMR-Spektroskopie zusätzliche Informationen über die damit in Verbindung stehenden Stoffwechselwege liefern und somit künftige Assoziationsstudien an Medaka ergänzen.

6.2 Metabolische Untersuchungen an Medaka-Embryonen

Die folgende Arbeit wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Joachim Wittbrodt, Dr. Lucie Zilova, und M.Sc. Christina Schlagheck (Centre for Organismal Studies (COS), Entwicklungsbiologie /-physiologie, Universität Heidelberg) durchgeführt.

6.2.1 Überblick

Erst kürzlich gelang es Lucie Zilova und Venera Weinhardt aus der Arbeitsgruppe von Joachim Wittbrodt aus ESCs von Medaka Organoide zu entwickeln, die das Netzhautgewebe nachbilden. Dafür verwendeten sie pluripotente Stammzellen, die aus Embryonen des Inzucht-Stammes iCab im Blastula-Stadium isoliert wurden.^[147] In diesem Stadium, welches etwa sechs Stunden nach der Befruchtung erreicht wird, bestehen die Embryonen aus einer großen Dotterkugel sowie einer Zellschicht, die auf dem Dotter aufliegt und etwa 1000–2000 pluripotente Zellen enthält.^[105, 147] Außerdem sind die Embryonen von einer dicken Eihülle, dem sogenannten Chorion umgeben (Abbildung 6.14).^[105]

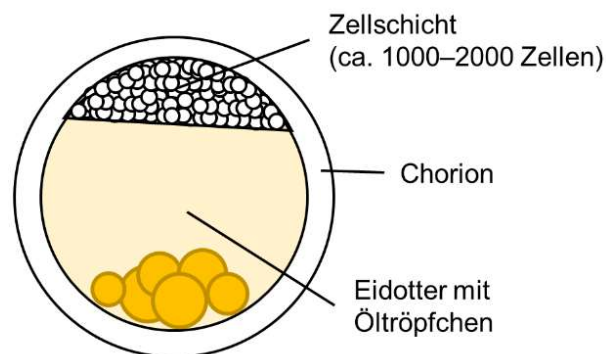


Abbildung 6.14: Schematische Darstellung eines Medaka-Embryos im Blastula-Stadium. Dargestellt in Anlehnung an Iwamatsu.^[105]

Analog dazu wurden Versuche mit ESCs des QuiH-Stammes durchgeführt. Bei den aus diesen Zellen gebildeten Aggregaten konnte jedoch keine retinale Morphologie beobachtet werden. Statt in Richtung des Neuroektoderms (Zellschicht, aus der sich im Laufe der Entwicklung das Nervensystem bildet), scheinen sich diese Zellen bevorzugt in Richtung des Mesoderms (Zellschicht, aus der sich im Laufe der Entwicklung Muskulatur und Skelett, verschiedene Gewebe und innere Organe des Körpers bilden) zu entwickeln (unveröffentlichte Beobachtungen von Lucie Zilova). Die Ursachen für das unterschiedliche Zellschicksal

(Differenzierungsweg einer undifferenzierten embryonalen Zelle zu einer Zelle im erwachsenen Organismus) können genetischer, epigenetischer oder metabolischer Natur sein, wobei diese drei Ebenen, wie in Kapitel 4.3 erläutert, in enger Verbindung zueinander stehen. Der zelluläre Metabolismus sowie epigenetische Mechanismen können wiederum durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen im Medium maßgeblich beeinflusst werden, was einen wichtigen Ansatzpunkt für die Manipulation des Verhaltens von Stammzellen bietet.^[168, 169, 171–174]

In diesem Kapitel soll nun der embryonale Metabolismus der beiden Medaka Inzucht-Stämme iCab und QuiH im Blastula-Stadium untersucht werden. Das metabolische Profil der Embryonen wird in den frühen Entwicklungsstadien maßgeblich durch die Metaboliten im Dotter bestimmt. Dieser besteht vorwiegend aus Proteinen, freien Aminosäuren, Lipiden und Kohlenhydraten, insbesondere Glycogen.^[203–207] Durch einen Vergleich des metabolischen Profils mit dem zellulären Verhalten sollen anschließend Metaboliten identifiziert werden, die einen Einfluss auf das Zellschicksal haben könnten. Diese können Ansatzpunkte für die Kontrolle des Differenzierungsverhaltens *in vitro* bieten. Darüber hinaus könnte mit dem Wissen, wie sich das Metabolom auf das Zellverhalten auswirkt, das Verhalten neuartiger Zelllinien anhand der Stoffwechselprofile vorhergesagt und dadurch die Herstellung von Organoiden vereinfacht werden. Für diese Untersuchungen ist die Verwendung zwei verschiedener Arten von Proben denkbar. Zum einen kann die Untersuchung des Metaboloms isolierter ESCs dabei helfen, den Zusammenhang zwischen dem Stoffwechsel und Differenzierungsweg der Zellen besser zu verstehen. Ein alternativer Ansatz besteht darin, das Metabolom der gesamten Embryonen inklusive des Dotters zu untersuchen, da Komponenten im Dotter das Zellschicksal extrinsisch beeinflussen könnten.

6.2.2 Entwicklung der Methode

Da sowohl das Metabolom isolierter Zellen als auch der gesamten Embryonen Einblicke in den Zusammenhang zwischen Metabolismus und Differenzierungsweg der ESCs liefern könnte, wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit die Eignung dieser beiden Probenarten für NMR-spektroskopische Untersuchungen evaluiert. Dabei wurde ersichtlich, dass der Umfang der Untersuchungen von der Anzahl an verfügbaren Embryonen begrenzt wird. So stehen je

Probe maximal 100 Embryonen zur Verfügung, was in einer Zellzahl von etwa $1\text{--}2 \times 10^5$ Zellen (vergleiche Abbildung 6.14) resultiert.

Für die Zellextrakte wurden die Zellen zuerst von den restlichen Bestandteilen der Eier getrennt. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellen und die Extraktion der intrazellulären Metaboliten in Übereinstimmung mit bisherigen Literaturvorschriften mit einer Acetonitril/Wasser-Mischung im Verhältnis 1:1.^[15, 18] Für die Untersuchung des Metaboloms der ganzen Embryonen wurde ein mechanischer Aufschluss mithilfe eines Homogenisators und einer Acetonitril/Wasser-Mischung (1:1), wie zuvor bereits in unserer Arbeitsgruppe für Zebrafisch-Larven etabliert, gewählt.^[181] Trotz des hohen Lipidgehalts der Embryonen war der Anteil an Lipid-Signalen im Spektrum gering (vergleiche Abbildung 6.15), weshalb auf eine aufwendigere zweiphasige Extraktionsmethode mit Abtrennung der Lipide in die organische Phase wie im Falle der Leberproben (vergleiche Kapitel 6.1) verzichtet wurde. In Abbildung 6.15 sind die erhaltenen ^1H -NMR-Spektren des Gesamtextrakts von 150 Embryonen (oben) sowie der Zellextrakte von 140 Embryonen (unten) dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit ist ebenfalls ein 60-fach hochskaliertes Spektrum der Zellextrakte abgebildet. Auffällig ist das geringe Signal-zu-Rausch Verhältnis im Falle der Zellextrakte. Insbesondere im aromatischen Bereich sind keine Signale erkennbar.

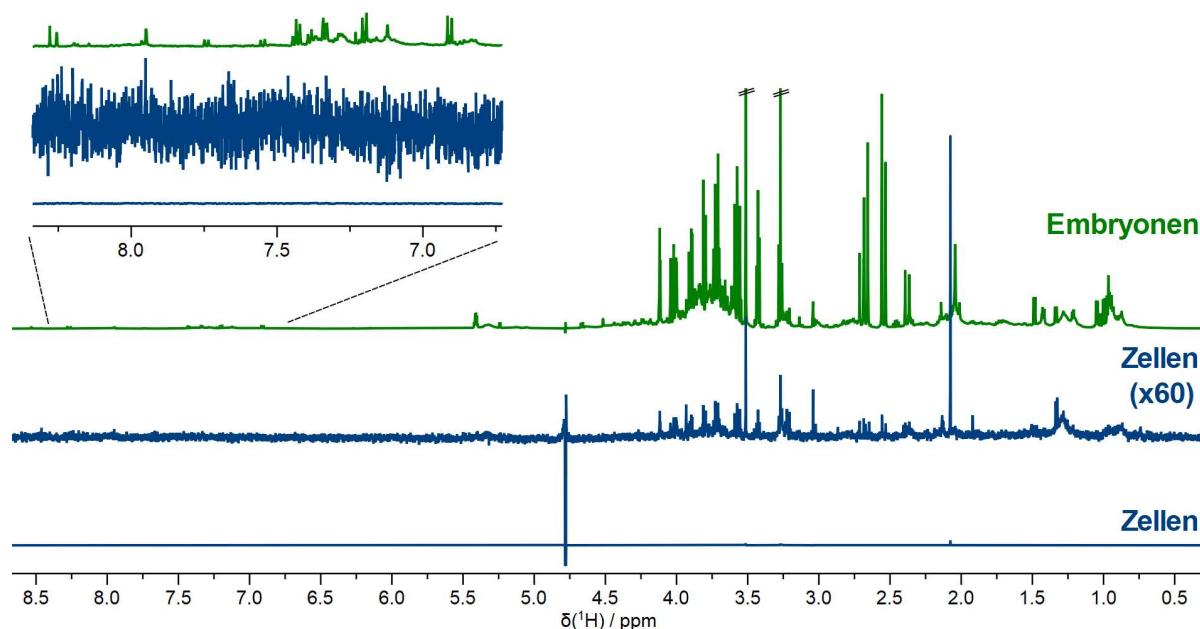


Abbildung 6.15: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von Embryonen- und Zellextrakten. Alle Spektren wurden mit 512 Scans aufgenommen. Der aromatische Bereich ist vergrößert dargestellt. Oben: Gesamtextrakt von 150 Embryonen. Mitte: Zellextrakt von 140 Embryonen, 60-fach hochskaliertes Spektrum. Unten: Zellextrakt von 140 Embryonen, unskaliertes Spektrum.

Dies zeigt, dass bei Verwendung von $1\text{--}2 \times 10^5$ Zellen die Konzentration der einzelnen Metaboliten in den Proben zu gering ist, um auswertbare Spektren zu erhalten. Dies deckt sich damit, dass für NMR-spektroskopische Untersuchungen von Zellextrakten typischerweise 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen verwendet werden.^[15, 18, 167, 175, 176] Aufgrund der Limitierung bei der Probenmenge, könnte eine Vergrößerung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses nur durch eine Erhöhung der Anzahl an Scans erreicht werden (vergleiche Formel 2.10 in Kapitel 2.1.3). Da für eine Verdopplung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses die vierfache Anzahl an Scans notwendig ist und bei der gewählten Scanzahl von 512 die Messzeit pro Probe bereits etwa eine Stunde betrug, hätte dies sehr lange Messzeiten von mehreren Stunden bis Tagen für jede Probe zur Folge. Dies ist bei der Messung einer großen Anzahl an Proben, wie es bei Metabolomik-Studien normalerweise der Fall ist, aus Zeitgründen jedoch nicht einfach umsetzbar. Aus diesem Grund werden im Folgenden nur Extrakte der gesamten Embryonen für die Analysen verwendet.

6.2.3 NMR-spektroskopische Untersuchung der Embryonenextrakte

In Abbildung 6.16 sind repräsentative ^1H -NMR-Spektren der Extrakte von Embryonen der Inzucht-Stämme iCab und QuiH abgebildet. Anhand von zweidimensionalen NMR-Spektren, dem Vergleich mit Datenbankwerten sowie *spiking* Experimenten konnten die Resonanzsignale zahlreichen Kohlenhydraten, Aminosäuren und organischen Säuren zugeordnet werden. Besonders auffällig ist die hohe Konzentration an Fructose, Taurin und Citrat.

Für jede Probe wurden etwa 100 Embryonen verwendet, wobei die exakte Anzahl aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit nicht immer eingehalten werden konnte. Damit die daraus resultierenden Intensitätsunterschiede in den ^1H -NMR-Spektren die statistische Datenauswertung nicht beeinflussen, wurde die Spektren zuvor normalisiert. Hierfür wurde die PQN-Methode genutzt, welche sich insbesondere dann eignet, wenn die Proben hohe Konzentrationen einzelner Metaboliten enthalten (vergleiche Kapitel 2.2.1)^[42], wie es bei den vorliegenden Proben der Fall ist. Für die statistische Datenauswertung wurden die Spektren manuell in 130 Bereiche, sogenannte *buckets*, eingeteilt. Spektrale Bereiche, in denen eine Überlagerung der Resonanzen vieler verschiedener Substanzen beobachtet werden konnte, wurden nicht in die Analyse miteinbezogen. Diese umfassen insbesondere den Bereich von 3.58–3.99 ppm sowie 4.05–4.50 ppm (Anhang, Tabelle A.6).

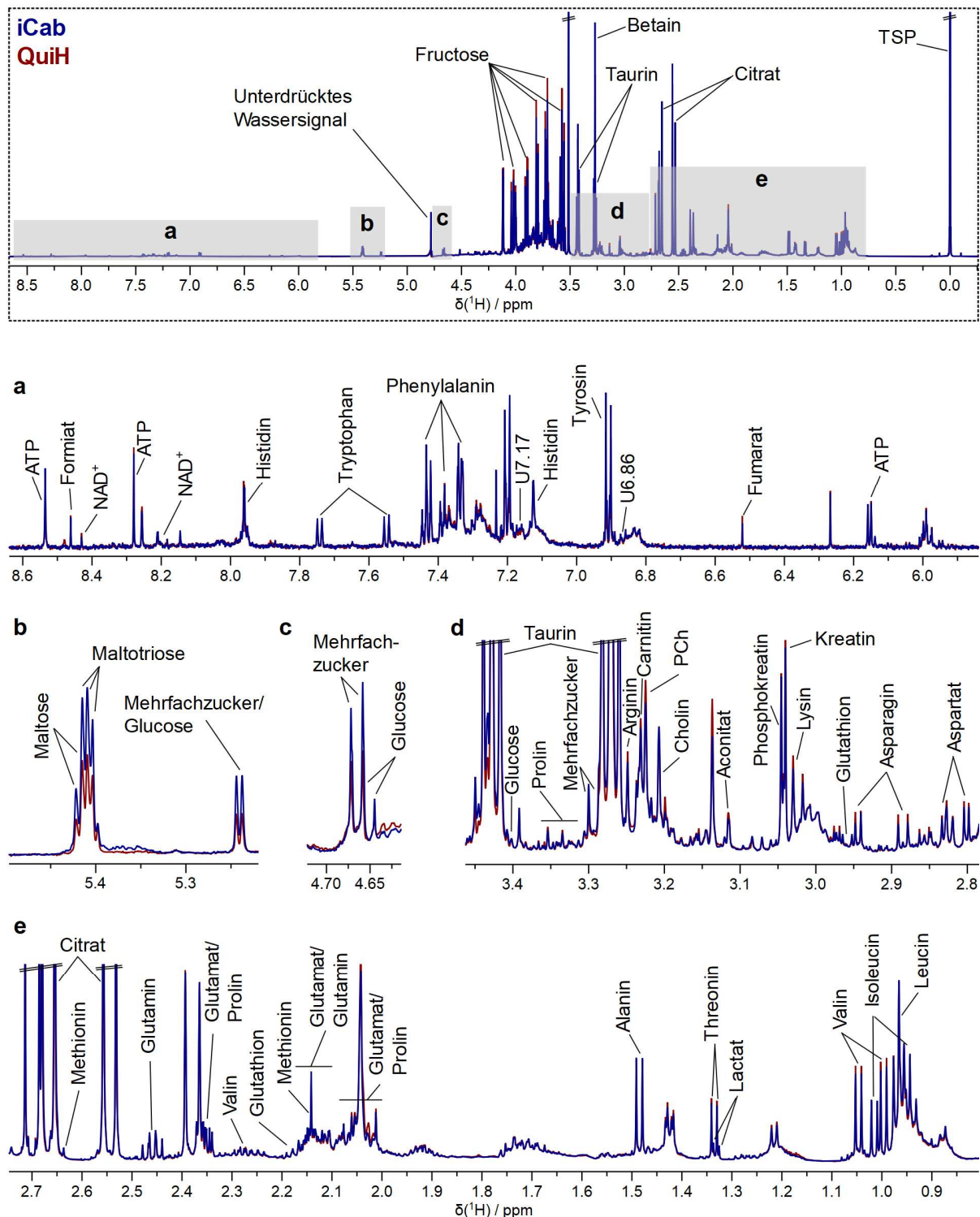


Abbildung 6.16: Repräsentative ^1H -NMR-Spektren von Embryonenextrakten der Inzucht-Stämme iCab und QuiH mit den identifizierten Metaboliten. Die Spektren wurden zuvor mittels der PQN-Methode normalisiert. a–e: Vergrößerte Spektralbereiche. a: $\delta = 5.84\text{--}8.64$ ppm, 35-fach hochskaliert. b: $\delta = 5.22\text{--}5.50$ ppm, 16-fach hochskaliert. c: $\delta = 4.61\text{--}4.72$ ppm, 20-fach hochskaliert, d: $\delta = 2.78\text{--}3.46$ ppm, 11-fach hochskaliert. e: $\delta = 0.81\text{--}2.75$ ppm, 4-fach hochskaliert. Mehrfachzucker bezeichnen Mehrfachzucker der Glucose. Abkürzungen: ATP: Adenosintriphosphat, NAD^+ : Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, PCh: Phosphorylcholin, TSP: Trimethylsilylpropionat, U: Unbekannte Substanzen.

6.2.4 Vergleich der Embryonen von Fischen unterschiedlichen Alters

Erste Versuche zur Herstellung von Netzhaut-Organoiden in der Arbeitsgruppe von Joachim Wittbrodt ließen vermuten, dass die Effizienz der Differenzierung nicht nur vom Inzucht-Stamm, sondern auch vom Alter der Fische, von denen die Embryonen stammen, abhängig sein könnte. Aus diesem Grund wurde das metabolische Profil von Embryonen untersucht, die von vier und zehn Monate alten Fischen stammen. Um etwaige Gruppierungen in den Daten hinsichtlich des Alters der Fische zu ermitteln, wurde eine PCA durchgeführt. Im PCA *scores plot* (Abbildung 6.17), welcher einen graphischen Überblick über die Ähnlichkeit der Proben bietet, ist erkennbar, dass bis auf zwei Ausreißer alle Proben in der Schnittfläche der 95 % Konfidenzregionen liegen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es keine mittels der verwendeten Methode detektierbaren Unterschiede im Metabolom der Embryonen abhängig vom Alter der Mütter gibt. Eine univariate Betrachtung der einzelnen Variablen mittels eines Mann-Whitney-*U*-Tests mit FDR-Korrektur ergab für alle Metaboliten *p*-Werte größer als 0.41, was diese Vermutung bestätigt.

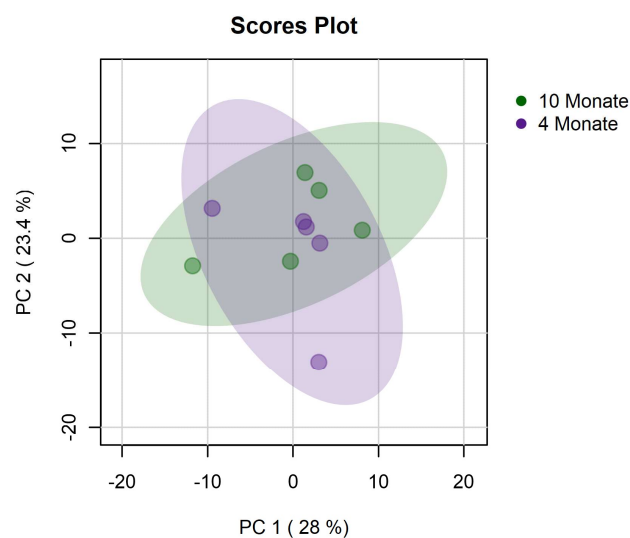


Abbildung 6.17: PCA *scores plot* zur Charakterisierung der Embryonen von Fischen unterschiedlichen Alters anhand des metabolischen Profils. Die schattierten Bereiche stellen die 95 % Konfidenzregionen der jeweiligen Datensätze dar.

6.2.5 Unterschiede im Metabolom der Inzucht-Stämme iCab und QuiH

6.2.5.1 Vergleich unterschiedlicher *batches*

Wie bereits bei den Leberproben (vergleiche Kapitel 6.1.3), wurden auch die Embryonen der beiden Inzucht-Stämme von Fischen aus zwei verschiedenen Generationen erhalten. Beim Zusammenführen dieser beiden sogenannten *batches* ist es notwendig, die Daten auf Abweichungen zu untersuchen. Dafür wurde eine PCA durchgeführt, wobei die Datenpunkte im *scores plot* entsprechend den Inzucht-Stämmen sowie den *batches* eingefärbt wurden (Abbildung 6.18). Bei keinem der Stämme ist eine Gruppierung der Datenpunkte hinsichtlich der *batches* zu beobachten. Sowohl beim iCab- als auch beim QuiH-Stamm liegt ein Großteil der Datenpunkte in der Schnittfläche der 95 % Konfidenzregionen beider *batches*. Demnach kann geschlussfolgert werden, dass keine systematische Abweichung zwischen den *batches* vorliegt.

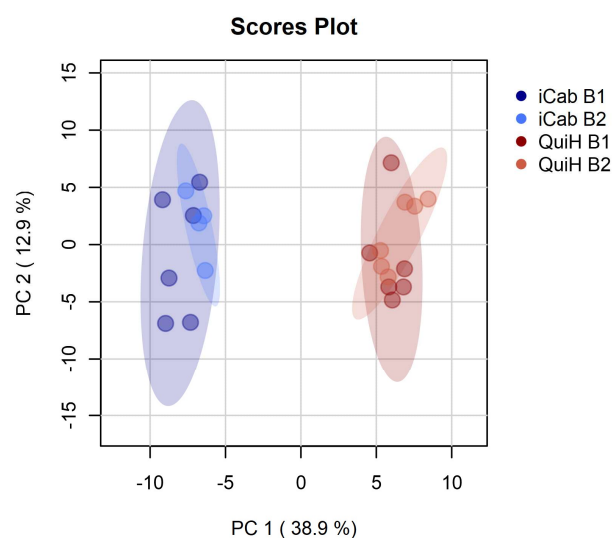


Abbildung 6.18: PCA *scores plot* zur Charakterisierung der untersuchten *batches* anhand des metabolischen Profils. Für beide Inzucht-Stämme iCab und QuiH liegen Embryonen aus zwei verschiedenen *batches* (B1 und B2) vor. Die schattierten Bereiche stellen die 95 % Konfidenzregionen der jeweiligen Datensätze dar.

6.2.5.2 Multivariate Hauptkomponentenanalyse zur Klassifizierung der Daten

Im Folgenden soll das metabolische Profil von Embryonen der beiden Inzucht-Stämme iCab und QuiH untersucht werden. Um etwaige Gruppierungen in den Daten zu ermitteln, wurde zuerst eine multivariate PCA durchgeführt, wobei die Daten beider *batches* aufgrund der Ergebnisse des vorherigen Abschnitts zusammengefasst wurden (Abbildung 6.19). Der resultierende *PCA scores plot* zeigt eine eindeutige, den Inzucht-Stämmen entsprechende Gruppierung der Proben entlang PC 1, welche mit 38.9 % einen großen Anteil der Varianz der Daten erklärt. Entlang PC 2 ist eine Streuung der Datenpunkte innerhalb der Inzucht-Stämme erkennbar. Mit 12.9 % erklärt PC 2 einen deutlich geringeren Anteil der Varianz der Daten als PC 1. Dies deutet darauf hin, dass zwischen den beiden Inzucht-Stämmen ausgeprägte Unterschiede im Metabolom der Embryonen vorliegen. Eine Betrachtung der Variablen von denen PC 1 bestimmt wird (Anhang, Tabelle A.7) zeigt, dass Zucker wie Maltose, Maltotriose und Fructose, verschiedene Aminosäuren sowie Taurin und Citrat einen wichtigen Anteil zur Trennung der Gruppen beitragen. Ein PLS-DA Modell analog zu den Leberproben (vergleiche Kapitel 6.1.5.1) ergab einen *p*-Wert von 0.865, was auf die geringere Anzahl an Proben zurückzuführen sein könnte.^[184] Aus diesem Grund wurde dieses Modell für die weitere Auswertung der Daten nicht herangezogen. Die relativen Konzentrationsunterschiede der einzelnen Metaboliten zwischen den Inzucht-Stämmen werden im nächsten Kapitel detailliert betrachtet.

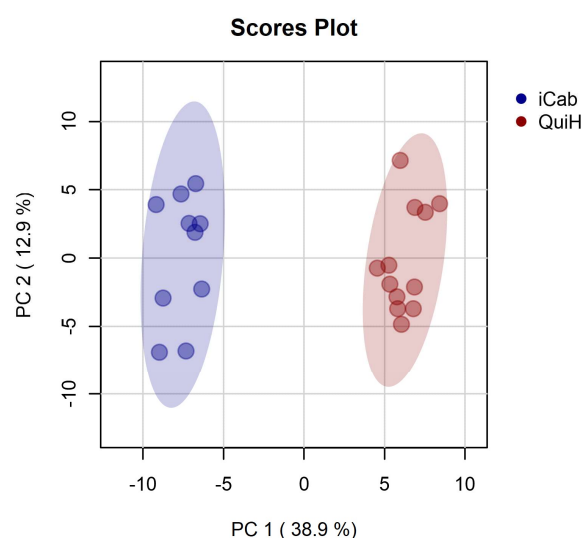


Abbildung 6.19: *PCA scores plot* zur Charakterisierung der Embryonen der Inzucht-Stämme iCab und QuiH anhand des metabolischen Profils. Die schattierten Bereiche stellen die 95 % Konfidenzregionen der jeweiligen Datensätze dar.

6.2.5.3 Detailanalyse der Variablen mittels univariater Methoden

Im nächsten Schritt wurde mittels univariater Methoden im Detail untersucht, ob sich die Konzentration der einzelnen Metaboliten zwischen den beiden Stämmen unterscheidet und wie stark dieser Unterschied ausgeprägt ist. Zum einen wurde eine *fold change* Analyse durchgeführt, wobei für jede Variable anhand der unskalierten Daten der Mittelwert des iCab-Stammes mit dem des QuiH-Stammes verglichen wurde. Als Hypothesentest wurde jeweils ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-*U*-Test mit anschließender FDR-Korrektur durchgeführt. Als Richtwert für die Interpretation der Ergebnisse wurde für den erhaltenen *p*-Wert ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0.01$ festgelegt, welches strenger ist als der weit verbreitete Wert von $\alpha = 0.05$.^[45] Im Folgenden ist für jede beschriebene Substanz nur der Box-Plot eines repräsentativen *buckets* gezeigt. Sofern nicht anders angegeben, wurden für die anderen dieser Substanz zugeordneten *buckets* vergleichbare Werte erhalten. In Tabelle A.7 im Anhang sind die Werte aller Variablen aufgelistet.

Zunächst werden diejenigen Substanzen aufgeführt, die eine höhere Konzentration in Embryonen des iCab-Stammes aufweisen (Abbildung 6.20). Besonders auffällig ist die erhöhte Konzentration an Maltose, Maltotriose und möglicherweise auch längerer Glucose-Oligosaccharide. Dieser Unterschied wird bereits bei Betrachtung der ¹H-NMR-Spektren ersichtlich (Abbildung 6.16). Folglich weisen die entsprechenden *buckets* die höchsten FC-Werte aller Variablen auf. In Abbildung 6.20 sind Box-Plots für Maltose sowie Maltotriose mit FC-Werten von 1.97 beziehungsweise 1.78 und *p*-Werten von unter 0.001 dargestellt. Interessanterweise ist für Glucose dagegen kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen erkennbar (Anhang, Tabelle A.7). Neben den Mehrfachzuckern der Glucose weisen auch alle Taurin zugeordneten *buckets* eine höhere Konzentration für den iCab-Stamm auf. Mit FC-Werten um 1.1 ($p < 0.001$) ist der Unterschied zwischen den Inzucht-Stämmen allerdings weniger stark ausgeprägt als bei den zuvor erwähnten Zuckern. Durch Überlagerung der Resonanzsignale von Taurin mit den Signalen der verschiedenen Zucker (Anhang, Tabelle A.7) kann es bei einigen *buckets* zu einer Verfälschung der Werte kommen. Aufgrund der vergleichsweise geringen Konzentration der Zucker (vergleiche Abbildung 6.16) kann der Einfluss jedoch als gering angenommen werden. Des Weiteren enthält das in Abbildung 6.20 dargestellte *bucket* von Taurin keine Resonanzen, die sich Maltose oder Maltotriose zuordnen lassen. Der FC von 1.07 sowie ein *p*-Wert von unter 0.001 lassen darauf schließen, dass auch

Taurin in Embryonen des iCab-Stammes tatsächlich in höherer Konzentration vorliegt. Ein *bucket* das Betain, Taurin und zu einem geringen Anteil auch die Mehrfachzucker der Glucose enthält, weist ebenfalls eine erhöhte Konzentration in Embryonen des iCab-Stammes auf. Da der FC mit einem Wert von 1.19 ($p < 0.001$) größer ist als bei den *buckets*, welche nur Taurin enthalten, kann angenommen werden, dass sich die Betainkonzentration ebenfalls zwischen den beiden Inzucht-Stämmen unterscheidet.

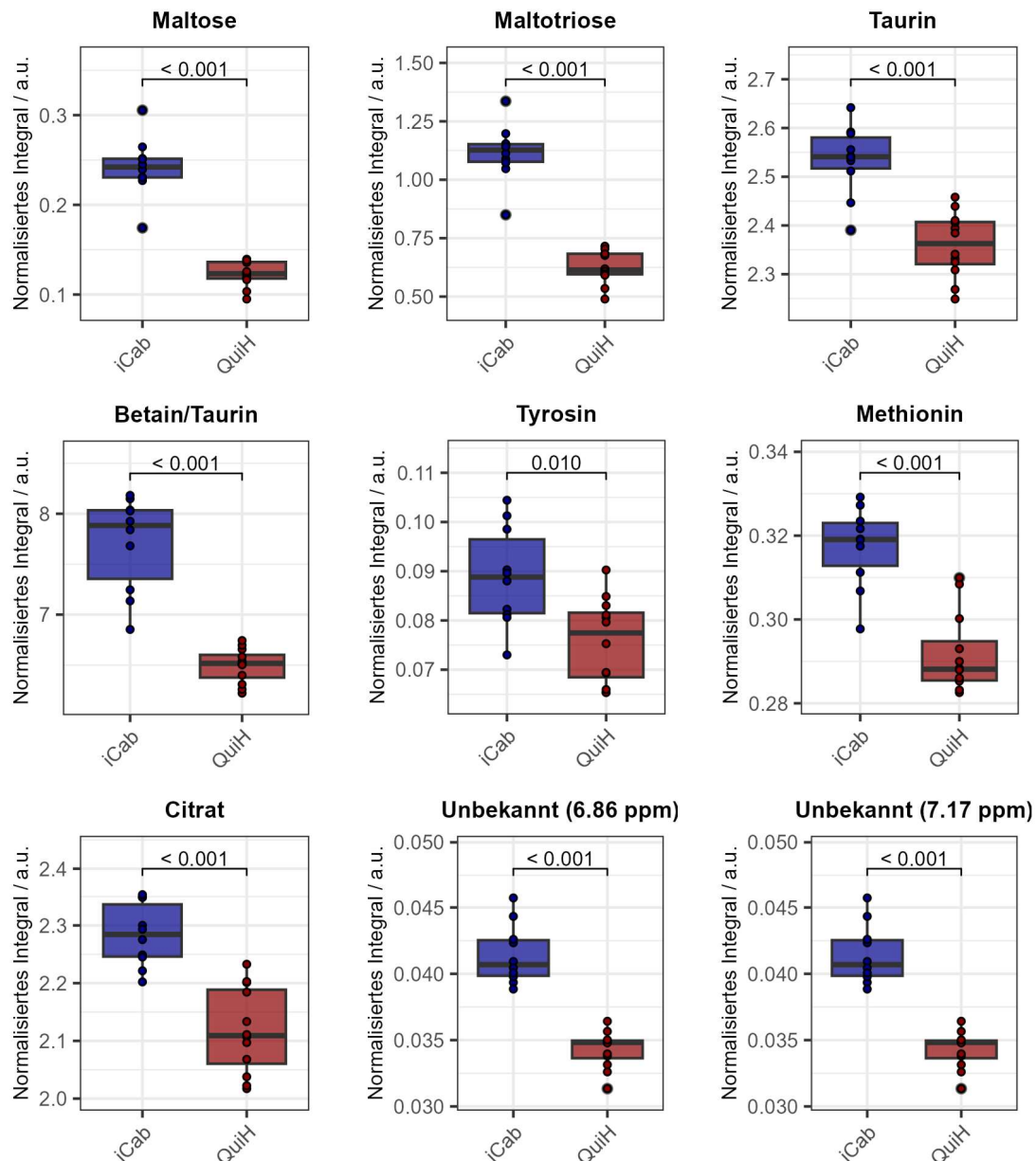


Abbildung 6.20: Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben des iCab-Stammes verglichen mit Mustern des QuiH-Stammes. Angegeben sind p -Werte nach einem Mann-Whitney- U -Test mit FDR-Korrektur. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet.

Darüber hinaus ist auch die relative Konzentration von Tyrosin ($FC = 1.17$, $p = 0.01$), Methionin ($FC = 1.09$, $p < 0.001$) und Citrat ($FC = 1.08$, $p < 0.001$) in den Embryonen des iCab-Stammes im Vergleich zum QuiH-Stamm erhöht. Im Falle von Methionin kann aufgrund der Nähe zu der Resonanzfrequenz von Citrat eine Verfälschung des Messwertes durch das intensive Citratsignal nicht ausgeschlossen werden (vergleiche Abbildung 6.16). Auch unbekannte Substanzen mit Resonanz bei 6.86 und 7.17 ppm sind mit einem FC von 1.21 und 1.17 ($p < 0.001$) in Proben des iCab-Stammes in höherer Konzentration vorhanden. Ein Vergleich mit Datenbankwerten zeigt, dass sich beide Resonanzen 4-Hydroxyphenylacetat oder 4-Hydroxyphenyllactat zuordnen lassen könnten. Aufgrund der geringen Signalintensität war es jedoch nicht möglich, diese Annahme mithilfe zweidimensionaler NMR-Experimente zu überprüfen. Auch eine Verifizierung mithilfe von *spiking* Experimenten wurde zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht durchgeführt. Die Integrale weiterer Resonanzsignale, denen derzeit noch keine Substanzen zugeordnet werden konnten, weisen ebenfalls einen erhöhten Wert für iCab-Proben auf (Anhang, Tabelle A.7).

In Embryonen des QuiH-Stammes ist im Vergleich zum iCab-Stamm insbesondere die relative Konzentration verschiedener Aminosäuren erhöht (Abbildung 6.21). Die deutlichsten Unterschiede können für Asparagin und Prolin mit einem FC von 0.80 beziehungsweise 0.82 (was einer 1.25- bzw. 1.22-fach höheren Konzentration entspricht) und p -Werten unter 0.001 beobachtet werden. In Falle von Lysin, Glycin, Valin, Histidin, Threonin sowie Alanin (jeweils $p < 0.001$) und Aspartat ($p = 0.002$) sind die Unterschiede mit einem FC zwischen 0.89 und 0.95 nur gering ausgeprägt. Darüber hinaus weisen auch Phosphorylcholin ($FC = 0.79$, $p < 0.001$) und Fructose ($FC = 0.91$, $p = 0.002$) eine erhöhte Konzentration in Proben des QuiH-Stammes auf. Auch für weitere Signale, denen zum aktuellen Zeitpunkt noch keine Substanzen zugeordnet werden konnten, konnte ein höherer Wert für QuiH-Proben festgestellt werden (Anhang, Tabelle A.7). Dazu gehören Resonanzsignale bei 8.50 ($FC = 0.34$, $p < 0.001$), 3.14 ($FC = 0.64$, $p < 0.001$), 8.26 ($FC = 0.78$, $p = 0.003$) und 7.90 ppm ($FC = 0.79$, $p < 0.001$).

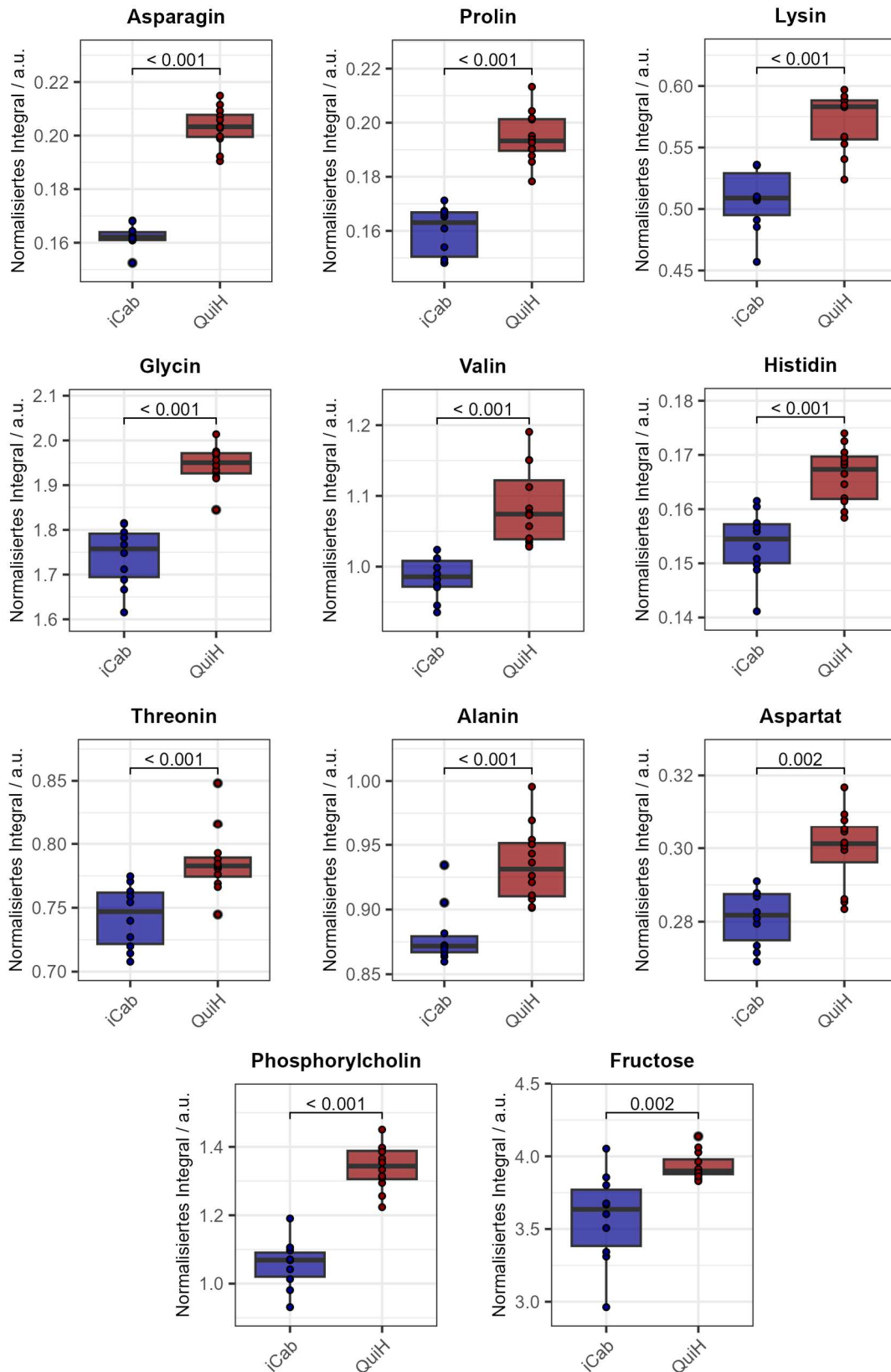


Abbildung 6.21: Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben des QuiH-Stammes verglichen mit Mustern des iCab-Stammes. Angegeben sind p -Werte nach einem Mann-Whitney- U -Test mit FDR-Korrektur.

6.2.5.4 Diskussion möglicher Zusammenhänge zwischen Metabolom und Differenzierungspotenzial

Die im Rahmen dieses Kapitels mittels NMR-Spektroskopie identifizierten Bestandteile von Medaka-Embryonen im Blastula-Stadium umfassen überwiegend Kohlenhydrate sowie Aminosäuren (vergleiche Abbildung 6.16). Dies deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Zusammensetzung von Fischeiern beziehungsweise dem Dotter verschiedener Fischarten.^[203–207] Wie im vorherigen Kapitel dargelegt wurde, ist für Embryonen des iCab-Stammes insbesondere eine höhere Konzentration der Substanzen Maltose, Maltotriose, Taurin, Betain, Methionin, Citrat, Tyrosin und 4-Hydroxyphenylacetat oder 4-Hydroxyphenyllactat charakteristisch, wohingegen QuiH-Embryonen eine erhöhte Konzentration an verschiedenen Aminosäuren sowie Fructose und Phosphorylcholin aufweisen. Für die Konzentrationsunterschiede zwischen den Inzucht-Stämmen kann es verschiedene Ursachen geben. So könnte die unterschiedliche Konzentration der jeweiligen Substanzen entweder seit Beginn der Embryogenese bestehen oder erst während der Entwicklung durch unterschiedlich regulierte Stoffwechselwege zustande kommen.

Zunächst soll kurz auf die Bedeutung des Kohlenhydrat- sowie des Aminosäurestoffwechsels in der Embryonalentwicklung verschiedener Fisch-Spezies eingegangen werden. Besonders während der frühen Embryogenese stellen Kohlenhydrate als Substrate für die Glykolyse eine entscheidende Energiequelle dar.^[206, 208–211] Folglich besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit verschiedener Kohlenhydrate wie Hexosen, Heptosen, Ribosen sowie Ketosen und der Entwicklungsfähigkeit von Embryonen.^[210] In späteren Stadien dagegen wird die Gluconeogenese wichtiger.^[210] Untersuchungen an der Süßwasser Teleost-Spezies *Coregonus* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die unbefruchteten Eier sowie die sich entwickelnden Embryonen die notwendigen Enzyme für die Glykolyse, die Gluconeogenese, die Fructosesynthese über den Polyol-Stoffwechselweg sowie den Pentosephosphatweg besitzen.^[210] Glucose und Fructose gehören zu den wichtigsten Kohlenhydraten in den Eiern,^[212] liegen aber zu einem Großteil gebunden in Oligosacchariden, Polysacchariden oder Glykoproteinen vor.^[210] So ist bei verschiedenen Fischen, unter anderem bei Zebrafischen, während der frühen Embryonalentwicklung kaum Glucose im Dotter vorhanden.^[209, 213] Entsprechend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit in den Embryonen Maltose, Maltotriose und möglicherweise längere Oligosaccharide sowie geringe Mengen an Glucose nachgewiesen werden. Überraschend ist dagegen die hohe

Fructosekonzentration bei beiden Inzucht-Stämmen (vergleiche Abbildung 6.16), welche bis zu zehnmal höher ist als die Konzentration der restlichen Kohlenhydrate. Obwohl, wie zuvor dargelegt, Fructose Bestandteil von Fischeiern ist, konnte keine Referenz für derartig hohe Konzentrationen gefunden werden. Unklar ist auch, ob diese hohe Fructosekonzentration von Beginn der Embryogenese an vorliegt oder im Verlauf der Entwicklung durch den Polyol-Stoffwechselweg entsteht. Neben dem Kohlenhydratstoffwechsel ist auch die Versorgung mit freien Aminosäuren während der Embryonalentwicklung essenziell, da diese als Substrate für den Energiestoffwechsel sowie die Proteinsynthese dienen.^[205] So ist während der Entwicklung allgemein ein Rückgang der Konzentration freier Aminosäuren im Dotter zu beobachten, wobei der genaue Zeitpunkt abhängig von der Fisch-Spezies ist.^[214] Bei der marinen Teleost-Spezies *Psetta maxima* beispielsweise findet dieser Rückgang insbesondere bis zum Morula-Stadium, welches dem Blastula-Stadium vorausgeht, statt.^[215] Im Gegensatz zu den proteinogenen Aminosäuren ist Taurin während der gesamten Embryonalentwicklung in konstanter Menge vorhanden.^[214] Untersuchungen des Metaboloms von Medaka-Embryonen während der Embryogenese konzentrierten sich bisher auf spätere Entwicklungsstadien als das in dieser Arbeit betrachtete Blastula-Stadium.^[120, 121] Um zu überprüfen, ob die Konzentrationsunterschiede der verschiedenen Substanzen zwischen den beiden Inzucht-Stämmen seit Beginn der Embryogenese bestehen oder erst während der Entwicklung durch unterschiedlich regulierte Stoffwechselwege zustande kommen, müssten Embryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien NMR-spektroskopisch untersucht werden. Anhand dieser Ergebnisse könnten dann genauere Rückschlüsse auf beteiligte Stoffwechselwege gezogen werden, welche wiederum, wie in Kapitel 4.3 erläutert, mit Pluripotenz und Differenzierungspotenzial der Zellen in Verbindung stehen könnten.

Im Folgenden sollen nun mögliche Auswirkungen einiger Metaboliten und Stoffwechselwege auf die Bestimmung des Zellschicksals sowie die Embryonalentwicklung diskutiert werden. Bei Säugetieren ist der Polyol-Stoffwechselweg im Rahmen einer diabetischen Erkrankung mitverantwortlich für die Entstehung von oxidativem Stress in der Linse und Netzhaut des Auges sowie allgemein im Nervensystem.^[216, 217] Somit könnte dieser Stoffwechselweg auch an der Entstehung der diabetischen Retinopathie, einer durch Diabetes hervorgerufenen Schädigung der Netzhaut beteiligt sein.^[217] Unter der Annahme, dass die höhere Fructosekonzentration in Embryonen des QuiH-Stammes tatsächlich auf eine erhöhte Aktivität des Polyol-Stoffwechselweges zurückzuführen ist, könnte der dadurch entstehende

oxidative Stress in Verbindung mit einem negativen Effekt auf die Differenzierung der ESCs zu retinalem Gewebe stehen.

Taurin, welches in den Embryonen des iCab-Stammes in erhöhter Konzentration vorhanden ist, ist bei Säugetieren eine der häufigsten Aminosäuren im zentralen Nervensystem, insbesondere in der Retina, und gilt als Schlüsselmolekül für die Entwicklung und Regeneration des zentralen Nervensystems.^[218–220] Die Supplementierung mit Taurin kann während der Entwicklung die Bildung von Organen unterstützen und im Erwachsenenalter die allgemeine Gesundheit beeinflussen.^[221, 222] Verschiedene Untersuchungen an Mäusen, Ratten und Affen ergaben, dass Taurin insbesondere für die Entwicklung und den Erhalt der Netzhaut notwendig ist.^[223–227] Auch in der Netzhaut verschiedener Fischarten liegen sowohl Taurintransporter als auch Taurin vor, was auf eine vergleichbare Bedeutung von Taurin hinweist wie bei Säugetieren.^[228, 229] Wie genau Taurin auf die Entwicklung und den Erhalt der Netzhaut wirkt ist noch unklar, ihm wird aber insbesondere ein antioxidativer Effekt zugeschrieben.^[230] Außerdem gilt Taurin als einer von mehreren Faktoren, der *in vitro* die Zelldifferenzierung zu Netzhautzellen fördert.^[231–237] Aus diesem Grund wird Taurin häufig als Zusatz in den Medien für die Herstellung von Netzhaut-Organoiden verwendet.^[138] Dementsprechend könnte die höhere Taurinkonzentration in Embryonen des iCab-Stammes verglichen mit dem QuiH-Stamm bereits den späteren Differenzierungsweg der ESCs in Richtung retinaler Zellen fördern. Eine Supplementierung des Mediums mit höheren Taurinkonzentrationen könnte dies möglicherweise noch verbessern.

Neben Taurin ist auch die Konzentration an Betain und Methionin in Embryonen des iCab-Stammes erhöht. Betain hat im Organismus zwei wichtige Funktionen. Es dient zum einen als Methyl donor und reguliert zum anderen den osmotischen Zustand eines Systems, wodurch es zum Schutz von Zellen beiträgt.^[238–240] Aufgrund seiner Rolle als Methyl donor ist Betain, wie auch Methionin, am S-Adenosylmethionin-Stoffwechsel beteiligt: S-Adenosylmethionin wird aus Methionin gebildet. Bei der Demethylierung von S-Adenosylmethionin durch Methyltransferasen entsteht S-Adosylhomocystein, welches anschließend in Homocystein umgewandelt wird. Unter Verwendung eines Methyl donors wie Betain kann aus Homocystein wiederum Methionin gebildet werden.^[170, 238–240] Wie bereits in Kapitel 4.3 erwähnt, ist S-Adenosylmethionin der wichtigste Methyl donor für die meisten Methyltransferasen und folglich für die DNA- und Histon-Methylierung von wesentlicher Bedeutung.^[170] Dies kann sich

wiederum auf die Regulation der Gentranskription sowie die Differenzierung der Zellen auswirken.^[151–153] Bei Säugetieren wird Betain außerdem eine positive Wirkung auf die Embryonalentwicklung zugeschrieben.^[239, 240] Dies kann zum einen auf den zuvor erläuterten Einfluss auf epigenetische Mechanismen zurückgeführt werden. So wurde für Mäuse beispielsweise gezeigt, dass ESCs vor Erreichen des Blastula-Stadiums Betain zur Erzeugung von S-Adenosylmethionin nutzen, was für die normale Entwicklung der inneren Zellmasse sowie die anfängliche embryonale DNA-Methylierung entscheidend ist.^[241, 242] Aber auch die Wirkung von Betain als Osmolyt scheint für die Embryonalentwicklung wichtig zu sein.^[243–247] Neben der zuvor aufgeführten Bedeutung von Transmethylierungen bei der Embryogenese, sind diese Reaktionen auch entscheidend für die Funktion der Retina. In Ratten konnten nach einer akuten Durchblutungsstörung der Retina, was eine der Hauptursachen für Sehstörungen ist, durch die Verabreichung von S-Adenosylmethionin Verletzungen der Netzhaut verringert und die Funktion der Photorezeptoren verbessert werden.^[248] Beim Menschen können Remethylierungsdefekte als seltene Erbkrankheiten auftreten, zu deren klinischen Anzeichen auch Sehstörungen gehören. Bei diesen Erkrankungen führt eine gestörte Remethylierung von Homocystein zu Methionin zu einer Unterbrechung der S-Adenosylmethionin-Synthese und folglich zu einer Störung zahlreicher Methylierungsreaktionen. Die empfohlene Therapie umfasst die Behandlung mit Betain und Methionin, wodurch die Synthese von S-Adenosylmethionin wieder ermöglicht werden soll.^[249] Auch eine Studie mit mutierten Zebrafischen als Modell für Remethylierungsdefekte wurde bereits durchgeführt. Dabei konnten mehrere bekannte klinische und pathologische Erscheinungen der betroffenen Patienten einschließlich der Netzhautpathologie nachgebildet werden. Darüber hinaus sprachen die Zebrafische auf für Menschen bekannte Therapeutika wie Betain und Methionin an.^[250] Die dargelegten Untersuchungen geben Anhaltspunkte dafür, dass die Zugänglichkeit von Betain und Methionin den Methylierungsstatus im Zellkern beeinflussen und sich folglich positiv auf den Differenzierungsweg der Zellen in Richtung retinalen Gewebes auswirken kann.

Auch Tyrosin und 4-Hydroxyphenylacetat, welches das Produkt eines Abbauweges von Tyrosin ist, weisen eine höhere Konzentration in Embryonen des iCab-Stammes auf. Bei Zebrafischen ist 4-Hydroxyphenylacetat ein mutmaßliches Pheromon für das Fortpflanzungsverhalten.^[251, 252] Demzufolge wäre auch ein Einfluss dieser beiden Substanzen auf die Embryonalentwicklung denkbar.

6.2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Versuche zur Herstellung von Netzhaut-Organoiden aus ESCs von Medaka in der Arbeitsgruppe von Joachim Wittbrodt zeigten, dass der Weg sowie die Effizienz der Differenzierung vom verwendeten Inzucht-Stamm abhängig sind. So gelang es mit Zellen des iCab-Stammes, Aggregate mit retinaler Morphologie zu bilden, während dies mit Zellen des QuiH-Stammes nicht möglich war. Weiterhin wurde vermutet, dass auch das Alter der Fische, von denen die Embryonen stammen, einen Einfluss haben könnte. Da sowohl dem zellulären Stoffwechsel als auch den Bestandteilen der Flüssigkeit, die die Zellen umgibt, ein Einfluss auf die Differenzierung zugeschrieben wird, wurde in diesem Kapitel das Metabolom der Embryonen der beiden Inzucht-Stämme iCab und QuiH untersucht. Eine Betrachtung der Extrakte isolierter ESCs war aufgrund der geringen Konzentration der enthaltenen Metaboliten in Verbindung mit der eingeschränkten Anzahl vorhandener Embryonen nicht möglich.

Sowohl mittels einer multivariaten PCA als auch eines univariaten Mann-Whitney-*U*-Tests konnten keine Unterschiede im Metabolom von Embryonen festgestellt werden, die von Fischen unterschiedlichen Alters erhalten wurden. Bei einem Vergleich der Embryonen des iCab- und des QuiH-Stammes dagegen konnten deutliche Unterschiede im Metabolom bestimmt werden. In der PCA war eine eindeutige Unterteilung der Proben hinsichtlich des Inzucht-Stammes zu erkennen. Anschließend wurden die relativen Konzentrationsunterschiede einzelner Variablen mittels univariater Methoden (*fold change* Analyse und Mann-Whitney-*U*-Test) untersucht. Dies ergab, dass das Stoffwechselprofil von Embryonen des iCab-Stammes durch eine erhöhte Konzentration der Substanzen Maltose, Maltotriose, Taurin, Betain, Methionin, Citrat, Tyrosin und 4-Hydroxyphenylacetat oder 4-Hydroxyphenyllactat gekennzeichnet ist, wohingegen QuiH-Embryonen eine höhere Konzentration an verschiedenen Aminosäuren sowie Fructose und Phosphorylcholin aufweisen.

Alle Substanzen, deren Konzentration in iCab-Embryonen erhöht ist, stellen grundsätzlich Kandidaten für die *in vitro* Manipulation des Zellschicksals in Richtung retinalen Gewebes dar. Dabei sind Taurin, Betain und Methionin besonders vielversprechende Kandidaten. Taurin wird nachweislich in hohen Mengen in der Netzhaut produziert und ist für die Entwicklung und den Erhalt dieser von großer Bedeutung. Betain und Methionin spielen eine wichtige Rolle

bei epigenetischen Veränderungen, welche wiederum die Zelldifferenzierung beeinflussen können. Zum aktuellen Zeitpunkt wird in der Arbeitsgruppe von Joachim Wittbrodt bereits untersucht, ob diese Metaboliten bei QuiH-Stammzellen eine zu iCab-Stammzellen vergleichbare Entwicklung einer retinalen organoiden Morphologie fördern können.

Auch in Bezug auf die Analyse des Metaboloms könnten weitere Untersuchungen dabei helfen, den Zusammenhang zwischen Inzucht-Stamm und Differenzierungsweg der ESCs besser zu verstehen. Da es sich bei den vorliegenden Ergebnissen nur um eine Momentaufnahme handelt, ist nicht klar, ob die unterschiedliche Konzentration der jeweiligen Substanzen seit Beginn der Embryogenese vorliegt oder erst während der Entwicklung durch unterschiedlich regulierte Stoffwechselwege zustande kommt. Dies könnte durch die Analyse von Embryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien aufgeklärt werden. Des Weiteren sollte auch die Umstellung des zellulären Stoffwechsels während der Differenzierung untersucht werden. Dies könnte einerseits anhand der Analyse von Zellextrakten geschehen, wobei die Anzahl der Zellen an dieser Stelle wieder limitierend wäre. Andererseits könnte auch die Konzentrationsänderung von Metaboliten im Medium betrachtet und anhand der aufgenommenen beziehungsweise ausgeschleusten Metaboliten Rückschlüsse auf den Stoffwechsel der Zellen gezogen werden.

7. Material und Methoden

7.1 Allgemeine Bemerkungen

Alle verwendeten Lösungsmittel (Wasser, Acetonitril, Chloroform) hatten eine hohe Reinheit (HPLC-grade) und eine Temperatur von 4 °C. Das für die NMR-Messungen verwendete D₂O wurde von *Eurisotop* (Saarbrücken, Deutschland) erhalten und hatte eine Reinheit von 99.9 %. Für alle Messungen kamen NMR-Röhrchen desselben Herstellers (*Boroeco-5-7, Deutero GmbH*, Kastellaun, Deutschland) zum Einsatz.

Die Fische wurden am Institut für Biologische und Chemische Systeme – Biologische Informationsprozessierung (IBCS-BIP) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) sowie am Centre for Organismal Studies (COS) an der Universität Heidelberg wie zuvor beschrieben in geschlossenen Zirkulationssystemen unter 14 h Licht / 10 h Dunkelheit-Zyklen bei 26 °C gehalten.^[124] Die Haltung der Fische erfolgte in Übereinstimmung mit den Richtlinien der EU-Richtlinie 2010/63/EU sowie den deutschen Tierschutzbestimmungen (Tierschutzgesetz §11, Abs. 1, Nr. 1; Regierungspräsidium Karlsruhe, Deutschland; KIT: Haltungsgenehmigung AZ35-9185.64/BH; Universität Heidelberg: Haltungsgenehmigung AZ35-9185.64/BH, Genehmigungsnummer für die Erzeugung der Linien: 35–9185.81/G-145/15 Wittbrodt). Die Fischanlagen stehen unter der Aufsicht des Regierungspräsidiums Karlsruhe, das die Versuchsverfahren genehmigt hat. Alle Fische, die für diese Studie verwendet wurden, wurden auf die gleiche Weise gefüttert. Sie erhielten morgens und nachmittags die gleiche Menge an Trockenflocken (Tetramin-Flocken, TETRA) und mittags die gleiche Menge an frischen *Artemia* Nauplien.

Die Probenvorbereitung sowie die NMR-spektroskopische Analyse der Leberextrakte erfolgte wie bereits von uns publiziert.^[253]

7.2 Leberproben

7.2.1 Gewebeentnahme

Die Bereitstellung der Lebern erfolgte durch Felix Loosli und Mitarbeiter (Institut für Biologische und Chemische Systeme – Biologische Informationsprozessierung (IBCS-BIP), KIT). Für diese Arbeit wurden sieben Monate alte Fische beider Geschlechter verwendet. Die Fische wurden entsprechend ihres Geschlechts und des Inzucht-Stammes in vier Gruppen eingeteilt. Jede Gruppe bestand aus 20 Fischen, beziehungsweise 19 Fischen bei der Gruppe HO5 weiblich, was eine Gesamtanzahl von 79 Fischen ergab. Im Falle beider Stämme wurden die Proben aus zwei verschiedenen Generationen erhalten. Die Fische wurden durch hypothermischen Schock getötet, die Lebern sofort seziiert und einzeln in leere 2 ml Homogenisator-Gefäße (*Precellys*® Keramik-Kit CK14/2 ml, *Bertin Technologies*, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) gegeben. Die Proben wurden direkt auf Trockeneis gelegt, anschließend gefriergetrocknet und bis zur Extraktion bei -25 °C gelagert.

7.2.2 Probenvorbereitung der Leberextrakte

Zu den Leberproben wurden 1.4 mm Keramikkügelchen (*Precellys*® Keramik-Kit CK14/2 ml, *Bertin Technologies*, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich), 1 ml Acetonitril/Wasser-Mischung (1:1) sowie 300 µl Chloroform hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben gevortext. Der Aufschluss des Gewebes erfolgte mit Hilfe eines Homogenisators (*Precellys*® 24 mit *Cryolys* Kühlmodul, *Bertin Technologies*, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) bei einer Temperatur von 4 °C. Es wurden vier Schüttelintervalle mit einer Dauer von 20 s und einer Geschwindigkeit von 6000 rpm durchgeführt, die Pause zwischen den Intervallen betrug jeweils 120 s. Danach wurden die Probenlösungen für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt in ein neues Gefäß überführt und erneut 200 µl Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext und für 10 min bei 4 °C inkubiert, um eine Phasentrennung zu erhalten. Dann wurden die Proben für 10 min bei 21382 g und 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurde die obere wässrige Phase (etwa 450 µl) in ein neues Gefäß überführt und 400 µl Wasser zugegeben. Die Mischung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, über Nacht gefriergetrocknet und der so erhaltene Rückstand bis zur NMR-Messung bei -25 °C gelagert.

7.2.3 NMR-Messungen

Für die NMR-Messungen wurden die Extrakte in 700 µl Phosphatpuffer (150 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ in D_2O mit 0.6 mM TSP als interne Referenz und 0.2 mM NaN_2 , pH 7.2) aufgenommen und für 10 min bei 21382 g und 4 °C zentrifugiert. 600 µl des Überstands wurden in ein NMR-Röhrchen überführt. Alle NMR-Spektren wurden auf einem 600 MHz *Bruker Avance II+* Spektrometer entweder mit ^1H -BBI (engl.: *double resonance broad band*) oder TBI (engl.: *triple resonance broad band*) Probenkopf (*Bruker BioSpin GmbH*, Rheinstetten, Deutschland) bei 300 ± 0.05 K aufgenommen. Die Reproduzierbarkeit der NMR-spektroskopischen Messungen wurde anhand von Qualitätskontrollproben sichergestellt, die sechs üblicherweise in Geweben vorkommende Metaboliten enthielten (Glucose, Valin, Glutamat, Cholin, Acetat und Phenylalanin) und im gleichen Phosphatpuffer wie die Leberextrakte hergestellt wurden. Aliquots dieser Proben wurden bis zur Messung, die einmal pro Tag durchgeführt wurde, bei -25 °C aufbewahrt.

Es wurden eindimensionale NOESY-Experimente (engl.: *nuclear overhauser enhancement spectroscopy*) mit der *Bruker* Pulssequenz *noesygppr1d* mit 512 Scans und 64k Datenpunkten bei einer spektralen Breite von 20 ppm aufgenommen. Dabei wurde eine Relaxationsverzögerung von 4 s sowie eine NOESY-Mischzeit von 10 ms und ein *receiver gain* von 90.5 verwendet. Die Wasserunterdrückung wurde durch Vorsättigung mit einem selektiven Puls mit einer Bandbreite von 25 Hz erreicht. Vor der Fourier-Transformation wurden die Spektren mit einer Exponentialfunktion mit einem Linienverbreiterungsfaktor von 0.3 Hz multipliziert. Es wurde eine manuelle Referenzierung auf das interne TSP sowie eine manuelle Phasenkorrektur und eine automatische Basislinienkorrektur durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte über die *Bruker*-Automationssoftware *IconNMR*, die Prozessierung der Spektren über verschiedene Versionen der *Bruker*-Software *Topspin*.

Für die Identifizierung und Zuordnung der enthaltenen Metaboliten wurden außerdem zweidimensionale NMR-Spektren aufgenommen. Um eine ausreichend hohe Probenkonzentration zu erhalten wurden 20 Lebern gemeinsam extrahiert. Anschließend wurden ^1H - ^{13}C -HSQC- sowie ^1H - ^1H -COSY-Experimente aufgenommen.

7.2.4 Datenauswertung

Die Spektren wurden mit *MestReNova 14.2* (*Mestrelab Research S.L.*, Santiago de Compostela, Spanien) analysiert. Die Zuordnung der Metaboliten erfolgte mit Hilfe der *Human Metabolome Database* (HMDB)^[20] sowie der Evaluierungsversion von *Chenomx NMR Suite 9.0* (*Chenomx*, Edmonton, Kanada). Um die Zuordnung zu verifizieren, wurden geringe Mengen der jeweiligen Substanzen zu repräsentativen Proben zugegeben (sogenanntes *spiken*). Alle Resonanzen, die Glucose, Mehrfachzuckern der Glucose sowie Gallensäuren zugeordnet werden konnten, wurden aufgrund von Schwankungen zwischen den einzelnen Proben ausgeschlossen. Die Spektren wurden manuell in 56 Bereiche, sogenannte *buckets* unterteilt. Für jede Substanz wurde nur das Signal *bucketiert*, welches am wenigsten Überlagerungen mit anderen Signalen zeigt und dadurch am repräsentativsten ist. Sofern dies nicht möglich war, wurden die Substanzen durch mehrere *buckets* charakterisiert, welche sich verschiedenen funktionellen Gruppen des Moleküls zuordnen lassen. Die Integrale der *buckets* wurden mit Hilfe des *Mestrenova Chemometrics* Moduls exportiert, wobei die Integralwerte durch die jeweilige Breite des *buckets* geteilt wurden. Die statistische Analyse erfolgte über die Weboberfläche von *MetaboAnalyst*^[254, 255] sowie mit dem *MetaboAnalyst*^[256] Paket für *R* (*R* Version 4.3.0 und *RStudio* Version 2023.03.0+386, *Posit PBC*). Vor der Datenanalyse wurden die Spektren des Phosphatpuffers als Leerwert subtrahiert. Außerdem wurden die Daten auf die Gesamtintensität normalisiert (*normalization by sum*) und im Vorfeld der multivariaten Datenanalyse autoskaliert (*unit variance scaling*). Als multivariate Methoden wurden bei der statistischen Datenauswertung sowohl die unüberwachte PCA als auch die überwachte PLS-DA verwendet. Um die Qualität der resultierenden PLS-DA-Modelle zu bewerten, wurden Permutationstests mit 1000 Permutationen sowie eine 5-fache interne Kreuzvalidierung durchgeführt. Die Vorhersagefähigkeit der Modelle wurde anhand der Qualitätsparameter Q^2 (Güte der Vorhersage) und R^2 (Güte der Anpassung) beurteilt. Vergleiche zwischen den Gruppen für die einzelnen Variablen wurden mittels univariater *fold change* Analyse durchgeführt. Als Hypothesentests wurden nicht-parametrische Mann-Whitney-*U*-Tests durchgeführt, wobei FDR-korrigierte *p*-Werte auf Grundlage des Benjamini-Hochberg-Verfahrens zur Korrektur für multiple Testungen erhalten wurden. Die univariaten Methoden wurden mit den unskalierten Daten durchgeführt. Folgende Gruppen wurden verglichen: HO5– iCab, HO5 weiblich – iCab weiblich, HO5 männlich – iCab männlich, männlich - weiblich, HO5 männlich – HO5 weiblich, iCab männlich – iCab weiblich.

Die Abbildungen wurden mithilfe des R-Pakets *MetaboAnalystR*^[256] (PCA und PLS-DA) sowie der *tidyverse* Sammlung von R-Paketen und des R-Pakets *ggpubr* (Box-Plots) erstellt.

7.3 Embryonen und Stammzellen

7.3.1 Gewinnung der Proben

Die Bereitstellung der Embryonen sowie der embryonalen Stammzellen erfolgte durch Dr. Lucie Zilova und M.Sc. Christina Schlagheck (Centre for Organismal Studies (COS), Universität Heidelberg). Die Embryonen wurden morgens gesammelt und in ERM (engl.: *embryo rearing medium*: 17 mM NaCl, 40 mM KCl, 0.27 mM CaCl₂, 0.66 mM MgSO₄) über 5 h bei 32 °C inkubiert. Entgegen der üblichen Zusammensetzung wurde ERM ohne HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, eine Puffersubstanz) verwendet, da dieses im ¹H-NMR-Spektrum mehrere Signale aufweist. Dann wurden die Embryonen entsprechend den Entwicklungsstufen eingeteilt und nur Embryonen im Blastula-Stadium weiterverwendet. Je nach Art der gewünschten Probe wurden die Embryonen anschließend unterschiedlich behandelt. Für die Gewinnung der Zellen wurde das Chorion entfernt, indem die Embryonen mit einem *hatching* Enzym inkubiert und anschließend mit ERM gewaschen wurden. Anschließend wurden die Embryonen wieder in ERM gegeben und durch vorsichtiges Pipettieren die Zellmasse vom Dotter getrennt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (180 g, 3 min, 4 °C). Dann wurden die Zellen mit ERM gewaschen, das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Verwendung ganzer Embryonen wurde das Medium vollständig entfernt und die Embryonen im Chorion in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für den Vergleich der Embryonen unterschiedlich alter Fische (Kapitel 6.2.4) wurden Embryonen des iCab-Stammes verwendet. Dabei standen jeweils fünf Proben von vier und zehn Monate alten Fischen zur Verfügung. Für den Vergleich der Embryonen verschiedener Inzucht-Stämme (Kapitel 6.2.5) wurden Embryonen des iCab- sowie des QuiH-Stammes verwendet. Dabei standen zehn Proben des iCab- und zwölf Proben des QuiH-Stammes zur Verfügung. Im Falle beider Stämme wurden die Proben aus zwei verschiedenen Generationen erhalten.

7.3.2 Probenvorbereitung der Zellextrakte

Zu den Zellpellets wurde 1 ml Acetonitril/Wasser-Mischung (1:1) hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie für 10 min bei 16060 g und 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurden 900 µl des Überstands in ein neues Gefäß überführt und 750 µl Wasser zugegeben. Die Mischung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, über Nacht gefriergetrocknet und der so erhaltene Rückstand bis zur NMR-Messung bei -80 °C gelagert.

7.3.3 Probenvorbereitung der Embryonenextrakte

Der Aufschluss der Embryonen und die Extraktion der Metaboliten erfolgte analog zu den Leberproben, nur ohne Zugabe von Chloroform (siehe Kapitel 7.2.2). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden 750 µl des Überstands in ein neues Gefäß überführt und 620 µl Wasser zugegeben. Die Mischung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, über Nacht gefriergetrocknet und der so erhaltene Rückstand bis zur NMR-Messung bei -80 °C gelagert.

7.3.4 NMR-Messungen

Für die NMR-Messungen wurden die Extrakte in 700 µl Phosphatpuffer (150 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 in D_2O mit 0.6 mM TSP als interne Referenz und 0.2 mM NaN_2 , pH 7.4) aufgenommen und 10 min bei 21382 g und 4 °C zentrifugiert. 600 µl des Überstands wurden in ein NMR-Röhrchen überführt. Alle NMR-Spektren wurden auf einem 600 MHz *Bruker Avance II+* Spektrometer mit ^1H -BBI Probenkopf (*Bruker BioSpin GmbH*, Rheinstetten, Deutschland) bei 300 ± 0.05 K aufgenommen. Die Reproduzierbarkeit der NMR-spektroskopischen Messungen wurde anhand von Qualitätskontrollproben sichergestellt, die sechs üblicherweise in Geweben vorkommende Metaboliten enthielten (Glucose, Valin, Glutamat, Citrat, Acetat und Phenylalanin) und im gleichen Phosphatpuffer wie die Zell- und Embryonenextrakte hergestellt wurden. Aliquots dieser Proben wurden bis zur Messung, die einmal pro Tag durchgeführt wurde, bei -25 °C aufbewahrt.

Von den Zellextrakten sowie den in Kapitel 6.2.4 untersuchten Embryonenextrakten wurden eindimensionale NOESY-Experimente mit denselben Parametern wie bei den Leberextrakten aufgenommen (vergleiche Kapitel 7.2.3). Von den in Kapitel 6.2.5 untersuchten Embryonenextrakten wurden eindimensionale CPMG-Experimente mit der *Bruker* Pulssequenz *cpmgpr1d* aufgenommen, bei welcher ein Spin-Echo-Element als T_2 -Filter vor der Aufnahme des Signals angewendet wird. Das Spin-Echo-Element wurde 128-mal wiederholt mit einer Echozeit von jeweils 300 μ s. Die Experimente wurden mit 1024 Scans aufgenommen. Weiterhin wurden dieselben Aufnahme- und Prozessierungsparameter verwendet wie bei den NOESY Spektren (vergleiche Kapitel 7.2.3). Die Prozessierung der Spektren erfolgte analog zu Kapitel 7.2.3.

Für die Identifizierung und Zuordnung der in den Embryonen enthaltenen Metaboliten wurden zweidimensionale NMR-Spektren aufgenommen. Um eine ausreichend hohe Probenkonzentration zu erreichen, wurden fünf der zuvor mittels eindimensionaler NMR-Spektroskopie analysierten Proben gepoolt, gefriergetrocknet und in D₂O resuspendiert. Anschließend wurden ^1H - ^{13}C -HSQC-, ^1H - ^1H -COSY- sowie ^1H -JRES-Experimente aufgenommen.

7.3.5 Datenauswertung

Für die Zuordnung der Metaboliten sowie die statistische Datenauswertung wurden dieselben Programme und Methoden verwendet wie für die Leberproben (vergleiche Kapitel 7.2.4). Die Spektren wurden manuell in 130 *buckets* eingeteilt. Spektrale Bereiche, in denen eine Überlagerung zu vieler Substanzen beobachtet werden konnte, wurden nicht in die Analyse mit einbezogen. Diese umfassen insbesondere den Bereich von 3.58–3.99 ppm sowie 4.05–4.50 ppm. Vor der Datenanalyse wurden die Daten manuell mittels der PQN-Methode normalisiert, wobei das Median-Spektrum aller Proben als Referenzspektrum verwendet wurde.^[42] Im Vorfeld der multivariaten Datenanalyse wurden die Daten außerdem autoskaliert (*unit variance scaling*). Im Rahmen der statistischen Datenanalyse wurde im Gegensatz zu den Leberproben keine PLS-DA durchgeführt. Folgende Gruppen wurden verglichen: iCab 10 Monate – iCab 4 Monate, iCab - QuiH

Teil B Erforschung des Metabolismus kultivierter humaner Immunzellen

8. Einleitung

Diabetes mellitus stellt eines der größten globalen Gesundheitsprobleme des 21. Jahrhunderts dar. 2021 lebte weltweit bereits mehr als eine halbe Milliarde Erwachsene mit Diabetes, was etwa 10 % der erwachsenen Weltbevölkerung entspricht, und Schätzungen gehen weiterhin von einem erheblichen Anstieg in den nächsten Jahrzehnten aus.^[257, 258] Mit über 90 % aller weltweiten Diabetesfälle ist Typ-2-Diabetes die häufigste Form. Dieser Diabetes-Typ ist gekennzeichnet durch einen hohen Blutzuckerspiegel, der durch eine Insulinresistenz entsteht.^[258] Als Risikofaktoren für die Erkrankung gelten unter anderem eine ungesunde Ernährung, wie sie in der westlichen Welt typisch ist, und Übergewicht.^[257–259]

Beide Faktoren können Auslöser einer niederschweligen, systemischen und chronischen Inflammation (Entzündung) sein.^[260–264] So ist ein charakteristisches Merkmal von Übergewicht insbesondere eine chronische Entzündung des Fettgewebes, was auf die vermehrte Ansammlung pro-inflammatorischer (entzündungsfördernder) Makrophagen und anderer Immunzellen zurückzuführen ist.^[265] Eine solche Störung des metabolischen Gleichgewichts kann zu einer beeinträchtigten Glucose-Aufnahme der Zellen, einer Insulin-Resistenz oder langfristig auch zur Entwicklung einer Typ-2-Diabetes Erkrankung führen.^[260–264] Um diese Art der chronischen Inflammation von klassischen Entzündungsreaktionen abzugrenzen, führte Gökhan Hotamisligil den Begriff Metaflammation (metabolisch induzierte Inflammation) ein.^[266] Häufig geht mit dieser Erkrankung auch eine dauerhaft gesteigerte Permeabilität der Darmschleimhaut einher. Diese hat zur Folge, dass bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharid (LPS) aus dem Darm in die Blutbahn gelangen können, wo sie mit dem Immunsystem in Kontakt kommen und wiederum die Entzündungsreaktion fördern können.^[267–269] Aufgrund hochspezifischer Rezeptoren reagieren insbesondere Monozyten und Makrophagen auf LPS und initiieren so die Immunantwort.^[269, 270]

Der Einfluss des zellulären Metabolismus auf die Aktivierung des Immunsystems sowie der Zusammenhang metabolischer Erkrankungen wie Diabetes mit einem inflammatorischen Zustand werden im Forschungsfeld des Immunmetabolismus untersucht.^[271, 272] Der Begriff Immunmetabolismus wurde 2011 erstmals in der wissenschaftlichen Literatur definiert als *“an emerging field of investigation at the interface between the historically distinct disciplines of*

immunology and metabolism“.^[272] Dennoch reicht die Forschung auf diesem Gebiet viel weiter zurück. Erste Beobachtungen hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen Infektionen und Stoffwechselkrankheiten wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts gemacht, als Ärzte bei Patienten mit einer Meningokokken-Meningitis eine vorübergehende Diabetes-Symptomatik entdeckten.^[273] Erst ab Mitte des 20. Jahrhunderts begann man jedoch, die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen.^[274] In verschiedensten Forschungsarbeiten wurde dargelegt, dass pro-inflammatorische Zytokine nicht nur als Reaktion auf Infektionen, sondern auch bei Adipositas freigesetzt werden. Diese stören wiederum den Glucosestoffwechsel und können Insulinresistenzen verursachen. Darüber hinaus ist auch die entscheidende Rolle des Zellstoffwechsels bei der Steuerung immunologischer Prozesse deutlich geworden.^[274] Im Laufe der letzten zehn Jahre hat die Forschung im Bereich des Immunmetabolismus zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen. Grund dafür ist vor allem ein technologischer Fortschritt, durch welchen es erst möglich wurde, die Veränderung von Stoffwechselprodukten, welche mit der Aktivierung von Immunzellen einhergeht, zu verfolgen.^[271] Aktuelle Erkenntnisse legen nahe, dass die gezielte Beeinflussung bestimmter Stoffwechselvorgänge Entzündungsreaktionen im Körper eindämmen könnte, was ein großes Potenzial für die Behandlung inflammatorischer Erkrankungen bietet.^[275]

9. Biologische Grundlagen

9.1 Immunzellen und die Funktionsweise des Immunsystems

Das Immunsystem umfasst alle Zellen und Moleküle, die an der Abwehr körperfremder, schädlicher Stoffe beteiligt sind. Dazu zählen Krankheitserreger und deren Toxine, aber auch krankhafte Zellen wie Tumorzellen.^[276] Ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Immunsystems sind die Immunzellen, die sogenannten Leukozyten oder weißen Blutzellen. Sie stellen neben den roten Blutzellen (Erythrozyten) und den Blutplättchen (Thrombozyten) eine der drei Hauptgruppen an Zellen im Blut dar.^[277] Alle Immunzellen entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen (blutbildenden) Stammzellen im Knochenmark und lassen sich danach unterteilen, ob sie entlang der lymphatischen (die Lymphe/Lymphknoten betreffend) oder der myeloischen (das Knochenmark betreffend) Entwicklungslinie differenzieren (Abbildung 9.1).^[276]

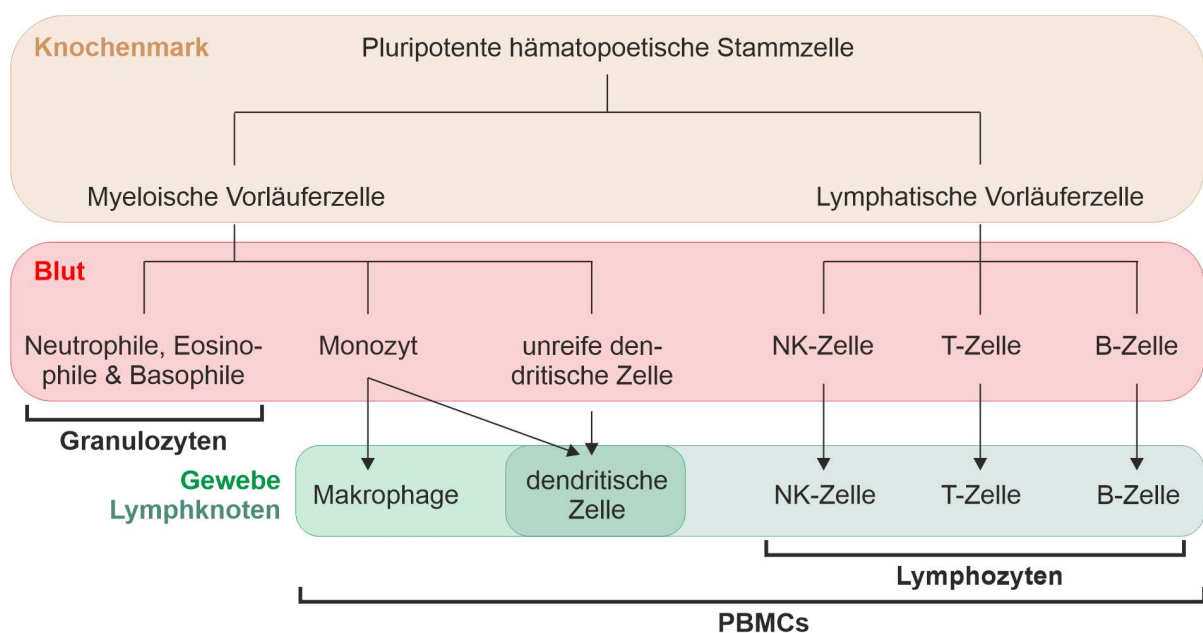


Abbildung 9.1: Übersicht über die Leukozyten, die zellulären Elemente des menschlichen Immunsystems. Im Rahmen dieser Arbeit werden Untersuchungen an der Fraktion der PBMCs (periphere mononukleare Blutzellen) durchgeführt. Dargestellt in Anlehnung an Murphy und Weaver.^[276]

Zu den myeloischen Zellen gehören die Granulozyten (neutrophile, eosinophile und basophile) und die Monozyten sowie die sich daraus entwickelnden Makrophagen und dendritischen Zellen. Die lymphatischen Zellen, oder auch Lymphozyten, lassen sich in drei verschiedene Zelltypen untergliedern, die T-Zellen, B-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen).^[276] Alle

Blutzellen mit nur einem Zellkern werden als periphere mononukleare Blutzellen (PBMCs, engl.: *peripheral blood mononuclear cells*) zusammengefasst (Abbildung 9.1). Den größten Anteil der PBMCs stellen die Lymphozyten mit 70–90 % dar, wovon wiederum 70–85 % T-Zellen, 5–10 % B-Zellen und 5–20 % NK-Zellen sind. Monozyten machen 10–20 % der PBMCs aus, dendritische Zellen nur etwa 1–2 %.^[278]

Unterteilen lässt sich das Immunsystem in die angeborene und die adaptive Immunantwort. Das angeborene Abwehrsystem reagiert sehr schnell auf Erreger, wirkt aber unspezifisch. Die Aktivierung des adaptiven, oder auch erworbenen Immunsystems dauert länger, dafür wirken die Mechanismen spezifisch und hocheffizient gegen einzelne Erreger.^[276] Die angeborene Immunantwort wird dadurch ausgelöst, dass Entzündungsinduktoren von Sensorzellen erkannt werden, woraufhin diese mit der Produktion von Entzündungsmediatoren beginnen. Zu den wichtigsten Sensorzellen gehören die Makrophagen, die dendritischen Zellen sowie die Neutrophilen. Zu Beginn der Entzündungsreaktion migrieren Monozyten aus dem Blut in das Gewebe, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren.^[276] Die Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren eine Reihe unterschiedlicher Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, engl.: *pattern recognition receptors*), welche verschiedene Komponenten von Erregern anhand charakteristischer Strukturen, sogenannter pathogenassoziierter molekularer Muster (PAMPs, engl.: *pathogen-associated molecular pattern*) erkennen können.^[276] Die Aktivierung der PRRs durch diese Entzündungsinduktoren kann zwei verschiedene Funktionen der Sensorzellen induzieren. Zum einen kann sie in diesen Zellen Effektorfunktionen auslösen, wie die Zerstörung der Erreger durch Phagozytose. Zum anderen sind die Sensorzellen in der Lage, eine Vielzahl chemischer Moleküle zu produzieren, welche als Entzündungsmediatoren an der Immunantwort mitwirken und diese steuern.^[276]

Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort basiert die adaptive Immunantwort auf Antigenrezeptoren, die spezifische Strukturen bestimmter Krankheitserreger erkennen. Beteiligt an der adaptiven Immunantwort sind zwei Arten von Lymphozyten, die B- und T-Zellen, welche nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen mit einer Aktivierung und Vermehrung reagieren. B-Zellen differenzieren sich zu sogenannten Plasmazellen, die spezifische Antikörper produzieren. Je nach Art des Signals können sich die T-Zellen zu T-Helferzellen, regulatorischen T-Zellen, zytotoxischen T-Zellen oder T-Gedächtniszellen differenzieren. Gedächtniszellen sind für die lang anhaltende Immunität verantwortlich und

bilden somit das immunologische Gedächtnis des Körpers.^[276] Obwohl NK-Zellen auch zu den Lymphozyten gehören, unterscheiden sie sich von den Zellen des adaptiven Immunsystems, da sie keine antigenspezifischen Rezeptoren besitzen. Stattdessen exprimieren sie verschiedene Rezeptoren, die abnorme Zellen wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen im Rahmen der angeborenen Immunität erkennen können.^[276]

Eine bedeutende Klasse der Entzündungsmediatoren stellen die Zytokine dar. Dabei handelt es sich um Proteine, die entweder pro- oder anti-inflammatorisch wirken können. Zu den wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokinen, die von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen als Reaktion auf die Aktivierung von PRRs sezerniert werden, zählen Interleukine (IL) wie IL-6 und IL-8.^[276, 279] Die Funktion von IL-6 besteht darin, Wachstum, Differenzierung sowie Antikörperproduktion von T- und B-Zellen zu fördern und in der Leber die Produktion von Akute-Phase-Proteinen auszulösen, welche wiederum die Immunantwort unterstützen. IL-8 (auch CXCL8) gehört zu der Untergruppe der chemotaktischen Zytokine (Chemokine). Chemokine lösen bei Immunzellen eine Wanderungsbewegung aus, die als Chemotaxis bezeichnet wird, und spielen daher eine zentrale Rolle bei der Migration von Zellen aus dem Blut zu Infektionsherden.^[276, 279]

9.2 Bakteriell Lipopolysaccharid

Wie im vorherigen Kapitel bereits beschrieben, spielt die Erkennung von PAMPs eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunreaktion. Ein solches PAMP ist das Endotoxin LPS, welches Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien ist.^[276, 280, 281] LPS ist in der Medizin von großer Bedeutung, da viele Krankheitssymptome einer Infektion mit gramnegativen Bakterien wie Schmerzen und Fieber bis hin zu einer Sepsis größtenteils darauf zurückzuführen sind.^[276, 280] Zudem wird es mit der Entstehung niederschwelliger, nicht-infektiöser Entzündungen in Verbindung gebracht, wie in Kapitel 9.4 genauer erläutert wird.

LPS ist über eine hydrophobe Domäne, den sogenannten Lipid A Teil, in der bakteriellen Membran verankert. Dieser Teil des LPS wirkt als Endotoxin und ist verantwortlich für das Auslösen der Immunantwort.^[281] Die Erkennung von LPS erfolgt über einen spezifischen PRR, das Oberflächenprotein TLR4, welches zu der Klasse der Toll-like-Rezeptoren (TLR) gehört.^[282, 283] Bei menschlichen Immunzellen exprimieren überwiegend myeloische Zellen

wie Monozyten und Makrophagen TLR4.^[270] Die Rolle von TLR4 bei der Erkennung von LPS konnte 1998 erstmals durch Untersuchungen an LPS-resistenten Mäusen gezeigt werden, bei denen eine Mutation am TLR4-Gen die Signalübertragung verhindert.^[284] Für diese Entdeckung hinsichtlich der Aktivierung des angeborenen Immunsystems erhielt Bruce Beutler zusammen mit Jules Hoffmann 2011 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.^[285] Der Erkennungsmechanismus von LPS durch TLR4 beruht auf einer Kaskade an Reaktionen, wodurch eine hohe Sensitivität erreicht wird (vergleiche auch Abbildung 9.2 in Kapitel 9.5). Zuerst bindet LPS an das Serumprotein Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP). Dann wird es auf ein zweites Protein, den Membranrezeptor CD14, übertragen. CD14 unterstützt wiederum die Aktivierung des TLR4/MD-2 (engl.: *myeloid differentiation factor 2*) Komplexes durch LPS.^[282, 283, 286, 287] Dadurch werden schließlich zwei verschiedene Signalwege ausgelöst, was zur Produktion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine führt.^[282] Monozyten und Makrophagen exprimieren sowohl CD14 als auch TLR4 und sind somit hauptverantwortlich für die Erkennung von LPS im Rahmen der Immunantwort.^[270, 288]

9.3 Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen

Die verschiedenen Immunzellen lassen sich anhand ihrer funktionellen Eigenschaften nochmals in einzelne Subpopulationen einteilen.^[276] Im Folgenden soll nur auf die Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen, welche im Allgemeinen als Phagozyten bekannt sind, eingegangen werden.

Monozyten galten lange nur als intermediärer Zelltyp mit dem einzigen Zweck, im Rahmen einer Entzündungsreaktion ins Gewebe einzuwandern und sich dort zu Makrophagen zu differenzieren.^[289, 290] Aus diesem Grund wurde bei der Untersuchung von Entzündungsreaktionen meist ausschließlich die Rolle von Makrophagen betrachtet. Heute ist jedoch bekannt, dass viele der im Gewebe vorliegenden Makrophagen aus embryonalen Vorläuferzellen entstehen. Folglich kam in den letzten Jahren vermehrt die Frage nach der tatsächlichen Funktion von Monozyten auf, und es wird zunehmend ihre eigene Rolle bei Entzündungsreaktionen und damit verbundenen Erkrankungen sowie der Reparatur von Gewebe erkannt.^[289–291]

Die Erforschung der Subpopulationen von Monozyten begann schon Ende der 1980er-Jahre und basiert vorwiegend auf Arbeiten von Loems Ziegler-Heitbrock.^[292–294] Anhand der Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16 lassen sich menschliche Monozyten in drei Subpopulationen einteilen. Dies sind die klassischen Monozyten, die nur CD14 exprimieren (CD14⁺⁺CD16⁻) sowie die intermediären (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassischen (CD14⁺CD16⁺⁺) Monozyten, die neben CD14 auch CD16 exprimieren (die Superskripte ⁺ und ⁺⁺ bezeichnen das relative Expressionsniveau).^[294] Dabei zählt die Mehrzahl der Monozyten im Blut zur Fraktion der klassischen Monozyten.^[295] Die phänotypischen und funktionellen Unterschiede zwischen den Subpopulationen wurden in einer Vielzahl an Studien untersucht und in umfassenden Übersichtsarbeiten erörtert.^[291, 296] Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in der Literatur war es jedoch bisher nicht möglich, mit den einzelnen Subtypen eindeutige Immunfunktionen in Verbindung zu bringen. Einzig ein Anstieg an CD16-positiven Monozyten kann mit entzündlichen Erkrankungen beim Menschen in Verbindung gebracht werden.^[291, 296] Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, künftig die Definition der Monozyten-Subpopulationen hinsichtlich ihrer spezifischen Funktionen zu verfeinern.^[297]

Makrophagen sind in der Lage, ihren Phänotyp und ihre Funktion als Antwort auf externe Stimuli schnell zu ändern. *In vivo* liegen zum einen in allen Geweben residente Makrophagen vor. Zum anderen können Makrophagen im Rahmen einer Entzündungsreaktion aus Monozyten, die aus der Blutbahn in das Gewebe einwandern, gebildet werden. Dort können sie durch verschiedene Faktoren aktiviert werden und durch einen als Polarisierung bezeichneten Vorgang einen pro-inflammatorischen (M1-Makrophagen) oder anti-inflammatorischen (M2-Makrophagen) Phänotyp ausbilden. M1-Makrophagen fördern die Entzündungsreaktion durch Phagozytose sowie die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und toxischer Effektormoleküle wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl.: *reactive oxygen species*) und Stickstoffmonoxid (NO). Im Gegensatz dazu haben M2-Makrophagen die Funktion, die Entzündungsreaktion aufzulösen und Reparaturprozesse des Gewebes zu fördern.^[298–300] *In vitro* wird die Reifung von Monozyten zu Makrophagen typischerweise durch Zugabe von M-CSF (engl.: *macrophage colony-stimulating factor*) oder GM-CSF (engl.: *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) ausgelöst.^[301] Durch Stimulation mit LPS und/oder Interferon- γ , einem Zytokin, das an Entzündungsprozessen beteiligt ist, kann *in vitro* anschließend die Polarisierung zu M1-Makrophagen induziert werden. Im Gegensatz dazu entstehen M2-Makrophagen in erster Linie nach Kontakt mit anti-inflammatorischen

Zytokinen wie IL-4.^[298–300] Das derzeitige Modell der M1- und M2-Polarisierung ist weit verbreitet. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass es nicht nur diese zwei klar getrennten Untergruppen, sondern ein ganzes Spektrum von Aktivierungszuständen mit komplexen, sogar gemischten Phänotypen gibt. Diese Erkenntnisse könnten dabei helfen, den Zusammenhang zwischen der Polarisierung von Makrophagen und der Entstehung verschiedener Krankheiten besser zu verstehen.^[299, 302]

9.4 Chronische Inflammationen und gesundheitliche Folgen

Im Verlauf der Immunantwort kommt es, wie in den vorherigen Kapiteln ausgeführt, zu einer akuten Entzündungsreaktion, welche essenziell für die Eliminierung von Krankheitserregern ist. Durch die Wirkung der Interleukine am Ort der Infektion entstehen die klassischen Symptome einer Entzündungsreaktion wie Rötung, Erwärmung, Schwellung und Schmerzen des betroffenen Bereichs.^[276] Auf eine erfolgreiche Abwehrreaktion folgt normalerweise die Resolutionsphase, in der die Entzündung langsam abklingt, was entscheidend für die Wiederherstellung der Homöostase (Gleichgewichtszustand eines offenen Systems) ist. Bei einer Fehlregulation der beteiligten Prozesse können die Immunzellen jedoch nicht auf einen entzündungshemmenden Zustand umschalten und die Entzündung bleibt über einen längeren Zeitraum bestehen, was zu einer chronischen, niederschweligen und systemischen Entzündung führt.^[303] Diese Art der Entzündungsreaktion, bei der das metabolische Gleichgewicht gestört ist, wird auch als Metaflammation bezeichnet.^[266, 304] Sie ist gekennzeichnet durch eine gestörte Zytokinproduktion sowie die Aktivierung eines Netzwerks an Entzündungssignalwegen.^[266] Diverse Faktoren werden damit in Verbindung gebracht, die Homöostase zu stören und somit die Entstehung einer chronischen Inflammation zu fördern. Dazu zählen beispielsweise körperliche Inaktivität, die Ernährungsweise, Übergewicht oder Stress.^[305] Ein chronischer Entzündungszustand im Körper geht wiederum einher mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung des sogenannten metabolischen Syndroms (das gemeinsame Auftreten von Übergewicht, Bluthochdruck, einem erhöhten Blutzuckerspiegel, einer Insulinresistenz sowie Fettstoffwechselstörungen)^[306], Typ-2-Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, aber auch neurodegenerative Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen.^[261–264, 304, 305] Aktuell wird insbesondere auch die Rolle einer chronischen

Inflammation bei den langfristigen Folgeerscheinungen einer SARS-CoV-2-Infektion, allgemein bekannt als „Long COVID“, untersucht und diskutiert.^[307]

Als bedeutender Risikofaktor für die Entstehung einer Metaflammation und damit auch von Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes gilt die westliche Ernährungsweise, die heutzutage in vielen Teilen der Welt vorherrschend ist.^[260] Diese zeichnet sich durch hochprozessierte Lebensmittel aus, welche meist einen hohen Anteil an Weißmehl, Fleischprodukten, gesättigten Fettsäuren, raffiniertem Zucker, zugesetztem Salz und Zusatzstoffen bei einem gleichzeitigen Mangel an Ballaststoffen, Vitaminen und Mineralstoffen enthalten.^[260] Entscheidend für den Zusammenhang zwischen der Ernährung und der Entstehung von Insulinresistenz, Übergewicht und Diabetes scheint das bakterielle Endotoxin LPS zu sein.^[308–310] Als Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien ist LPS im Darm in großer Menge vorhanden. Aber auch im Blut gesunder Menschen konnte LPS in geringer Konzentration nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass kleine Mengen kontinuierlich durch die Darmschleimhaut gelangen.^[311] Nach der Aufnahme fettreicher Nahrung steigt die LPS-Konzentration im Blutkreislauf an, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass das fettlösliche LPS zusammen mit Nahrungsfetten über die Darmschleimhaut transportiert wird.^[308, 310, 312] Dies verursacht eine postprandiale (nach dem Essen) Entzündungsreaktion, die zur Regulation der Zuckeraufnahme und der Immunantwort beiträgt und folglich dazu dient, das Gleichgewicht nach der Nahrungsaufnahme wiederherzustellen.^[313] Eine langfristige fettreiche Ernährung führt jedoch zu einer dauerhaft erhöhten Konzentration an LPS im Blutkreislauf und löst somit eine chronische Entzündungsreaktion aus, ein Zustand der als metabolische Endotoxämie bezeichnet wird.^[308] Diese Art der Endotoxämie wird wiederum mit der Entstehung von Typ-2-Diabetes in Verbindung gebracht.^[269, 308, 314, 315] Derartig erhöhte LPS-Konzentrationen im Blut können durch eine dauerhaft gesteigerte Permeabilität der Darmschleimhaut zustande kommen, durch welche vermehrt Endotoxine aus dem Darm in die Blutbahn gelangen können. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass die Darmpermeabilität durch eine fettreiche Ernährung erhöht wird, was wiederum das Risiko für die Entstehung von Typ-2-Diabetes erhöht.^[267, 316, 317] Die gemessenen Endotoxinwerte im Blut variieren zwischen verschiedenen Studien aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Methoden deutlich. Im Allgemeinen liegt die Konzentration bei gesunden Individuen aber unter 0.01 ng/ml wohingegen sie bei Adipositas um etwa das Fünffache und im Rahmen einer Sepsis um das Zehn- bis Zwanzigfache erhöht ist.^[311]

Ab welcher Endotoxinkonzentration und durch welche Mechanismen es schließlich zur Entstehung einer metabolischen Inflammation kommt und ab welchem Punkt diese einen negativen gesundheitlichen Einfluss hat, ist aktueller Gegensatz der Forschung.^[304]

9.5 Immunmetabolismus von Makrophagen

Die zellulären Stoffwechselwege dienen gewöhnlich der Bereitstellung von Energie und Metaboliten, die für das Wachstum und Überleben der Zelle notwendig sind. Der einfachste Weg zur Energieerzeugung in Form von ATP ist die Glykolyse, welche im Zytosol der Zelle stattfindet. Als Substrat dient dabei extrazelluläre Glucose, welche über eine Reihe von Glucosetransportern (GLUT1 bis GLUT14^[318]) aufgenommen wird. Diese wird im Zytoplasma zu Pyruvat umgewandelt, wobei aus einem Glucosemolekül zwei Moleküle Pyruvat entstehen. Dabei werden zwei Moleküle des Energieträgers ATP gebildet und zwei Moleküle NAD⁺ zu NADH reduziert.^[185, 271, 319] Darüber hinaus gehen Intermediate der Glykolyse in den Pentosephosphatweg ein und ermöglichen somit die Reduktion von NAD⁺ zu NADH, welches vielen Enzymen als Cofaktor dient. Anschließend wird das Pyruvat aus der Glykolyse in Acetyl-CoA umgewandelt, welches dann in den Mitochondrien im Citratzyklus weiter abgebaut wird. Zwei Hauptprodukte des Citratzyklus sind NADH und FADH₂ (Flavin-Adenin-Dinukleotid), welche in der oxidativen Phosphorylierung zur Bildung von ATP genutzt werden. Pro Glucosemolekül werden dabei 36 Moleküle ATP gebildet, womit der Citratzyklus mit anschließender oxidativer Phosphorylierung der effizienteste ATP-produzierende Prozess ist.^[185, 271, 319] Darüber hinaus besitzen Zellen in unterschiedlichem Umfang auch die Fähigkeit, andere Substrate wie Glutamin über die Glutaminolyse oder Fettsäuren über β -Oxidation zu verstoffwechseln, wodurch wiederum Substrate für die oxidative Phosphorylierung bereitgestellt werden.^[319] Unter Sauerstoffmangel wird das in der Glykolyse erzeugte Pyruvat in erster Linie zu Lactat und nicht zu Acetyl-CoA umgewandelt. Dieser Prozess, bei dem pro Molekül Glucose zwei Moleküle Lactat gebildet werden, wird als anaerobe Glykolyse bezeichnet.^[185, 319] Unter bestimmten Bedingungen kann jedoch auch in Anwesenheit von Sauerstoff eine analoge Umstellung des Stoffwechsels beobachtet werden. Dies wurde 1924 erstmals von Otto Warburg für Tumorzellen beschrieben und wird als aerobe Glykolyse oder auch „Warburg-Effekt“ bezeichnet. Bei Tumorzellen dient die aerobe Glykolyse der schnellen Bereitstellung von Energie und Stoffwechselintermediaten für die Zellteilung.^[320–322] Auch bei

pro-inflammatorischen Immunzellen kann eine zum „Warburg“-Effekt vergleichbare Umstellung des Stoffwechsels vom Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung auf die aerobe Glykolyse beobachtet werden. Diese Veränderung im Metabolismus ist essenziell für die Erfüllung ihrer immunologischen Funktion, wie im Folgenden eingehender erläutert wird.^[271, 319, 323]

Das im Rahmen dieser Arbeit zur Stimulation der Zellen eingesetzte LPS fördert insbesondere die Ausbildung eines pro-inflammatorischen Phänotyps bei Monozyten und Makrophagen.^[270] Da Monozyten häufig nur als Vorläufer von Makrophagen betrachtet werden (vergleiche Kapitel 9.3), sind immunmetabolische Vorgänge in diesen Zellen bisher wenig untersucht. Die metabolischen Veränderungen, die mit der Polarisierung von Makrophagen zu M1- und M2-Makrophagen einhergehen, wurden dagegen vielfach untersucht und in zahlreichen Übersichtsarbeiten behandelt.^[271, 319, 324–326] Pro-inflammatorische (M1) Makrophagen weisen eine gesteigerte Glykolyse und einen verstärkten Pentosephosphatweg auf,^[327, 328] wohingegen der Citratzyklus unterbrochen ist^[328–330] und die oxidative Phosphorylierung^[327] sowie die Fettsäureoxidation^[331] runterreguliert sind (Abbildung 9.2). Dagegen weisen M2-Makrophagen einen intakten Citratzyklus auf und ihre metabolische Aktivität ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Fettsäureoxidation und oxidative Phosphorylierung.^[325, 329] Eine gesteigerte Glykolyse bei pro-inflammatorischen Makrophagen konnte bereits 1970 von Hard^[332] und um 1990 von Newsholme *et al.*^[333–335] gezeigt werden. Mechanistische Untersuchungen ergaben außerdem, dass die Stimulation von Makrophagen mit LPS die Expression des Glucosetransporters GLUT1 erhöht, was wiederum eine schnellere Glucoseaufnahme zur Folge hat und die pro-inflammatorische Antwort der Zellen induziert.^[331, 336, 337] Die Steigerung der Glykolyse geht ebenfalls mit einer erhöhten Produktion von Lactat einher. Bei der Reduktion von Pyruvat zu Lactat wird NAD⁺ regeneriert, wodurch die hohe glykolytische Rate aufrecht erhalten wird.^[271] Auch der Lactattransporter MCT4 (Monocarboxylattransporter 4) wird in diesem Zusammenhang verstärkt exprimiert, wodurch vermehrt Lactat aus der Zelle ausgeschleust werden kann.^[338] Zwar ist die energetische Ausbeute wie zuvor erwähnt bei der Glykolyse geringer als bei der oxidativen Phosphorylierung, allerdings kann dieser Stoffwechselweg gut reguliert und schnell gesteigert werden.^[323, 339] Neben der schnellen Bereitstellung von ATP ermöglicht dies eine Vielzahl pro-inflammatorischer Funktionen der Makrophagen. Dazu gehören die Phagozytose, die ROS-Produktion über das im Pentosephosphatweg entstehende NADPH (Nicotinamid-Adenin-

Dinukleotid-Phosphat) sowie die Produktion und Sekretion entzündungsfördernder Zytokine.^[325, 337, 339] Die Unterbrechung des Citratzyklus an zwei Stellen führt zu einer Ansammlung von Citrat und Succinat, welche wiederum einen Einfluss auf die Immunantwort der Zellen haben.^[328–330, 340, 341] Das angesammelte Citrat wird aus den Mitochondrien ausgeschleust, wobei eine verstärkte Expression des Citratcarriers bei aktivierten Makrophagen nachgewiesen werden konnte.^[330, 342] Im Zytosol dient es als Substrat für Prostaglandine, welche eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen spielen und kann in andere Stoffwechselwege eingehen, welche mit NO und ROS wichtige Effektormoleküle von Makrophagen erzeugen.^[341, 342] Das angesammelte Succinat spielt als intrazellulärer Signalgeber ebenfalls eine Rolle bei der Immunantwort.^[328, 330]

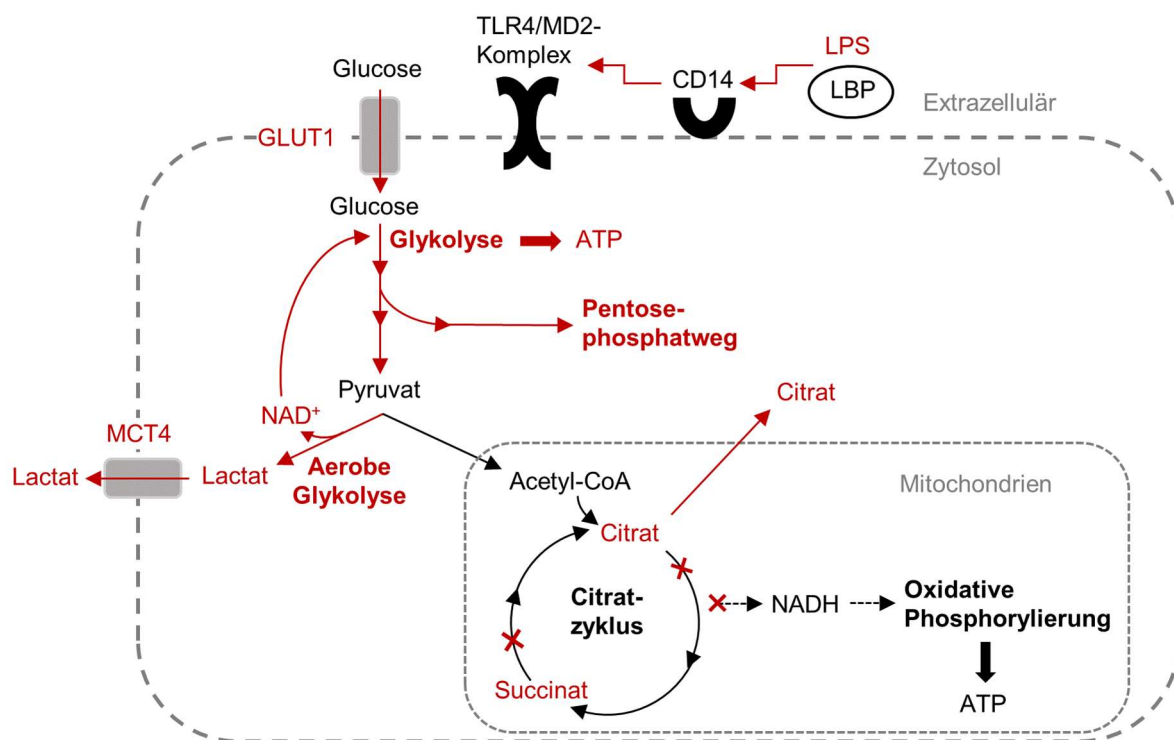


Abbildung 9.2: Schematische Darstellung der Umstellung des zellulären Stoffwechsels nach Stimulation mit LPS. Zuerst bindet LPS an das Serumprotein LBP und wird auf den Membranrezeptor CD14 übertragen, wodurch die Aktivierung des TLR4/MD-2 Komplexes gefördert wird. Dies führt zu einer charakteristischen Umstellung des Stoffwechsels vom Citratzyklus mit anschließender oxidativer Phosphorylierung zur aeroben Glykolyse. Dargestellt in Anlehnung an Ciesielska *et al.*^[282] sowie Diskin und Pålsson-McDermott^[325].

Auch die Bedeutung des Aminosäuremetabolismus bei der Prägung zellulärer Immunantworten ist in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt. Dabei wird immer deutlicher, dass Aminosäuren bei Immunzellen nicht nur zur Proteinsynthese dienen, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Erfüllung der

Effektorfunktion spielen.^[326, 343–345] Arginin ist das beste Beispiel dafür, dass die Regulierung des Stoffwechsels bei Makrophagen in Verbindung mit verschiedenen Phänotypen steht. So dient Arginin in M1-Makrophagen zur Synthese von NO, während es in M2-Makrophagen zu Ornithin und Urea hydrolysiert wird. Ornithin wird wiederum zu Polyaminen umgewandelt, die das Zellwachstum kontrollieren und für die Gewebereparatur wichtig sind.^[326, 343, 346] Glutamin dient in beiden Subtypen dazu, den Citratzyklus aufzufüllen.^[326, 343] In M1-Makrophagen führt dies zur vermehrten Anreicherung von Succinat.^[328] Außerdem wurde gezeigt, dass Glutamin von diesen Zellen benötigt wird um die LPS-induzierte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zu unterstützen.^[347] In M2-Makrophagen ist das aus Glutamin gebildete α -Ketoglutarat wichtig für die oxidative Phosphorylierung und die Fettsäureoxidation und fördert über epigenetische Veränderungen den M2-Phänotyp.^[326, 343] Darüber hinaus gilt Glutamat als Immunmodulator, der von dendritischen Zellen und Makrophagen ausgeschleust werden kann und zur Modulation der T-Zell-Aktivierung beiträgt.^[348, 349] Des Weiteren scheint auch Serin für die Immunantwort von Makrophagen nach Stimulation mit LPS wichtig zu sein. So dient Serin einerseits der Synthese von S-Adenosylmethionin, einem wichtigen Methyl donor, und fördert somit epigenetische Veränderungen, die für die pro-inflammatorische Antwort wichtig sind. Außerdem stellt Serin, durch Umwandlung in Glycin, ein Substrat für die Synthese von Glutathion, dem wichtigsten Antioxidans das die Zellen vor ROS schützt, dar.^[343, 350, 351]

Die Mehrzahl der zuvor aufgeführten Untersuchungen wurde an Makrophagen durchgeführt, die aus Mäusen gewonnen wurden. Auch wenn dieser Aspekt in vielen Übersichtsarbeiten nicht explizit erwähnt wird, ist nicht klar, inwiefern die mit der Polarisierung von Maus-Makrophagen einhergehenden Veränderungen im Stoffwechsel auf humane Makrophagen übertragbar sind.^[352–354] Besonders in Bezug auf die Produktion von NO aus Arginin scheinen deutliche Unterschiede zwischen den Spezies zu bestehen.^[353, 355] In den letzten Jahren wurde vermehrt der Einfluss von LPS auf den Stoffwechsel und die inflammatorische Reaktion humaner Monozyten und Makrophagen untersucht, wobei zu der Vergleichbarkeit mit Maus-Studien abweichende Beobachtungen gemacht wurden.^[356–359] So hat eine Studie ergeben, dass durch LPS aktivierte menschliche Makrophagen im Gegensatz zu Makrophagen der Maus keine metabolische Umprogrammierung in Richtung der Glykolyse durchlaufen, sondern weiterhin auf die oxidative Phosphorylierung zur Erzeugung von ATP angewiesen sind.^[357] Andere Untersuchungen dagegen zeigen, dass Stimulation mit LPS bei humanen Monozyten

und Makrophagen zu einer, mit Maus-Makrophagen vergleichbaren, Umstellung des Stoffwechsels von der oxidativen Phosphorylierung auf die aerobe Glykolyse führt.^[356, 358, 359]

Darüber hinaus wurden erst kürzlich umfassende Analysen des Metaboloms von aus humanen PBMCs gewonnenen Monozyten und Makrophagen durchgeführt. In einer Arbeit von Fuchs *et al.* wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie anhand des intrazellulären sowie des extrazellulären Metabolitenprofils der Stoffwechsel unstimulierter Makrophagen mit dem von M1- und M2-Makrophagen verglichen.^[360] Leacy *et al.* untersuchten mittels Massenspektrometrie die Änderungen im intrazellulären Metabolom von Monozyten nach Stimulation mit LPS.^[361] Beide Studien ergaben, dass neben den in diesem Kontext bekannten Stoffwechselwegen noch zahlreiche weitere an der Immunantwort der Zellen beteiligt sind. Eine detaillierte Aufführung würde den Umfang dieser Einleitung überschreiten.

10. Themenstellung

In diesem Teil der Arbeit soll anhand des extrazellulären Metabolitenprofils NMR-spektroskopisch untersucht werden, wie sich der Stoffwechsel von PBMCs, die zuvor aus dem Blut gesunder Spender isoliert wurden, *in vitro* als Reaktion auf Stimulation mit LPS verändert. Dies soll helfen zu verstehen, unter welchen Bedingungen sich physiologische Stoffwechselprozesse zu einer Metaflammation und folglich metabolisch induzierten Krankheiten wie Diabetes entwickeln können. Im Zuge dessen soll insbesondere geklärt werden, ob die Analyse des Zellkulturmediums eine geeignete Methode darstellt, um immunmetabolische Veränderungen in PBMCs zu verfolgen oder ob eine deutlich aufwendigere Untersuchung des intrazellulären Metaboloms erforderlich ist.

Um abschätzen zu können, wie genau die Bedingungen *in vitro* die physiologische Umgebung der Zellen im Blut abbilden, soll zuerst die Zusammensetzung des Zellkulturmediums sowie die Konzentration der einzelnen Komponenten bestimmt werden. Außerdem soll die Stabilität der Substanzen im Medium ohne Zugabe von Zellen evaluiert werden, um zu verstehen, welche Änderungen der extrazellulären Komponenten tatsächlich auf den zellulären Stoffwechsel zurückzuführen sind. Im Anschluss soll analysiert werden, wie sich die Konzentration der Metaboliten durch Kultivierung von PBMCs verändert, die ohne Zugabe von Stimulanzen wie LPS inkubiert wurden, und auf welche physiologischen Stoffwechselwege dies zurückzuführen sein könnte.

Aufbauend auf diesen Untersuchungen soll anschließend der Einfluss verschiedener LPS-Konzentrationen auf den Metabolismus von PBMCs untersucht werden. Dafür werden PBMCs vier verschiedener Individuen mit LPS-Konzentrationen zwischen 0.001 und 0.1 ng/ml inkubiert und der Verlauf an verbrauchten und gebildeten Substanzen im Zellkulturmedium über mehrere Inkubationstage analysiert. Dadurch soll ermittelt werden, ab welcher LPS-Konzentration und bei welcher Inkubationsdauer sich ein Phänotyp ausbildet, der an der Entstehung chronischer Entzündungsreaktionen beteiligt sein könnte.

11. Ergebnisse und Diskussion

Die folgende Arbeit wurde in Kooperation mit Dr. Manuel Rodriguez Gomez, Lara Stahl und Lars Uhlmann (Max Rubner-Institut (MRI) Karlsruhe, Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung – Labor Immunologie) durchgeführt. Alle Arbeiten mit den Zellkulturen sowie die ELISAs wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Rodriguez Gomez durchgeführt.

Teilergebnisse der folgenden Kapitel basieren auf der Zusammenarbeit mit B.Sc. Franziska Dopp im Rahmen ihrer Bachelorarbeit. Diese Arbeit erfolgte am KIT unter meiner Anleitung sowie am MRI im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Rodriguez Gomez.^[362]

11.1 Etablierung der Zellkulturbedingungen

11.1.1 Überblick

Die ersten Versuche zur Kultivierung tierischer Zellen wurden bereits in den frühen 1900er-Jahren durchgeführt. Diese zeigten, dass für die erfolgreiche Kultivierung häufig die Zugabe von Blutserum erforderlich ist.^[363] Mit der Etablierung der ersten Zelllinien in den 1940er-Jahren wurde es möglich, den Einfluss von Kulturmedien auf Zellen systematisch zu untersuchen. Dabei lag der Fokus insbesondere auf der Identifizierung von Komponenten, die zu einer Verbesserung der Zellteilung beitragen. Dies führte zur Entwicklung einer Reihe von Zellkulturmedien, die heute immer noch verwendet werden.^[363] Dazu gehört beispielsweise RPMI- (*Roswell Park Memorial Institute*-) Medium, welches aus einem Natriumbicarbonat-Puffersystem und einer Lösung von Salzen, Aminosäuren und Vitaminen besteht und typischerweise für die Kultivierung verschiedener Säugetierzellen wie Leukozyten verwendet wird.^[364] In späteren Studien konnte des Weiteren eine Vielzahl der in Blutserum enthaltenen Substanzen wie Proteine (vorwiegend Albumin), Lipide, Hormone, Wachstums- und Adhäsionsfaktoren, Reduktionsmittel sowie Aminosäuren und Vitamine identifiziert werden. Dies ermöglichte die Entwicklung serumfreier und chemisch definierter Medien.^[363] Dennoch sind heutzutage nach wie vor viele Kulturmedien serumbasiert, wobei FBS (*Fetales Kälberserum*, engl.: *fetal bovine serum*) in einer Konzentration von 10 % am häufigsten zum Einsatz kommt. Da FBS eine Mischung aus vielen Faktoren, die für die Zellvermehrung

und -erhaltung notwendig sind, darstellt, ist es ein nahezu universeller Wachstumszusatz, der bei der Kultivierung der meisten tierischen und menschlichen Zellen eingesetzt werden kann. Folglich muss keine spezifische Formulierung für jeden Zelltyp entwickelt werden, wie es bei synthetischen Medien üblicherweise der Fall ist. Aus diesem Grund sind serumbasierte Medien deutlich kostengünstiger als chemisch definierte Medien.^[363, 365] Allerdings birgt die Verwendung von FBS in Zellkulturen auch verschiedene Nachteile. So ist die genaue Zusammensetzung des FBS noch immer weitgehend unbekannt und kann darüber hinaus zwischen verschiedenen Chargen schwanken. Außerdem kann es verschiedene Mengen an Endotoxinen und mikrobiellen Kontaminanten enthalten. Folglich kann die Verwendung Qualität und Reproduzierbarkeit der Zellkulturen negativ beeinflussen. Des Weiteren ist FBS aufgrund der Gewinnung ethisch sehr umstritten.^[365, 366]

Wie zuvor beschrieben, wurden sowohl serumbasierte als auch chemisch definierte Zellkulturmedien ursprünglich dazu entwickelt, *in vitro* die Zellteilung zu fördern. Um eine langfristige Kultivierung der Zellen zu ermöglichen, wurden Komponenten, die normalerweise schnell aufgebraucht werden, in hoher Konzentration vorgelegt. Dagegen sind andere Substanzen, welche für das Zellwachstum nicht als wichtig erachtet wurden, in diesen Medien nicht enthalten.^[367] So wird beispielsweise Glutamin häufig in wesentlich höherer Konzentration zu Zellmedien zugegeben als andere Aminosäuren, da es insbesondere bei sich schnell teilenden Zellen als Energiequelle dient und Vorstufen für die Ribonucleotidsynthese liefert.^[366] Jedoch entsprechen die Konzentrationen in solchen synthetischen Medien nicht realen physiologischen Bedingungen. Bei Studien, die nicht auf ein möglichst hohes Zellwachstum abzielen sondern den Metabolismus der Zellen untersuchen, können diese unphysiologischen *in vitro* Bedingungen somit möglicherweise Auswirkungen auf die physiologische Relevanz und Aussagekraft der Ergebnisse haben.^[367]

In diesem Teil der Arbeit liegt der Fokus auf der Untersuchung des Metabolismus von PBMCs, die in RPMI-Medium mit 10 % FBS kultiviert wurden. Bevor in Kapitel 11.2 die eigentlichen Versuche zur Stimulation der Zellen mit dem bakteriellen Endotoxin LPS vorgestellt werden, soll in diesem Abschnitt zuerst die *in vitro* Umgebung der Zellen analysiert und anschließend beurteilt werden, wie gut diese die natürliche Umgebung der Zellen im Blut abbildet. Darauf aufbauend soll der Stoffwechsel von PBMCs ohne Zugabe von Stimulanzen wie LPS analysiert werden, um die Auswirkungen der Mediumskomponenten auf den Zellmetabolismus zu

bewerten. Zu diesem Zweck werden, im Gegensatz zur relativen Quantifizierung der Metaboliten im vorherigen Teil der Arbeit, die absoluten Konzentrationen der Metaboliten untersucht. Die in diesem Kapitel diskutierten Daten wurden aus der parallelen Inkubation von RPMI-Medium ohne Zusatz von FBS, RPMI-Medium mit 10 % FBS sowie RPMI-Medium mit 10 % FBS und PBMCs über einen Zeitraum von sechs Tagen erhalten. Zusätzlich wurde bei allen Medien Glucose (1.25 g/l, 6.94 mmol/l) zugegeben, die als Energiequelle für die Zellen dient. Von allen Proben wurden drei technische Replikate hergestellt. Bei diesen handelt es sich um in verschiedenen Kavitäten der Kulturplatte parallel inkubierte Ansätze derselben Ausgangsprobe, von welchen ebenfalls gesondert ^1H -NMR-Spektren aufgenommen wurden. Vor Beginn der eigentlichen Inkubation wurde eine Ruhephase von einem Tag mit anschließendem Wechsel des Mediums eingehalten. Alle 24 Stunden sowie vor und nach dem Wechsel des Mediums wurden Proben zur Analyse entnommen, wobei für jeden Zeitpunkt eine separate Zellkulturplatte verwendet wurde.

11.1.2 Zusammensetzung des Mediums

Im Folgenden wird zuerst die Zusammensetzung von RPMI-Medium ohne Zusatz von FBS untersucht und die Konzentration der einzelnen Substanzen mit den Herstellerangaben verglichen. Anschließend werden die Bestandteile des Mediums nach Zugabe von 10 % FBS, dessen Zusammensetzung wie zuvor erwähnt nicht genau definiert ist, betrachtet. Die ermittelten Konzentrationen werden dann mit Literaturwerten für Blutserum verglichen, um zu untersuchen, wie gut die Bedingungen *in vitro* die natürliche Umgebung der PBMCs abbilden.

Mithilfe von zweidimensionalen NMR-Spektren und über den Vergleich mit Datenbankwerten erfolgte zuerst die Identifizierung der in den Proben enthaltenen Substanzen. Diese umfassen vorwiegend Aminosäuren sowie einige organische Säuren (siehe Abbildung 11.1 und Tabelle 11.1, bzw. Tabelle A.8 im Anhang für die eingeteilten *buckets*). Weitere Resonanzsignale, denen zum aktuellen Zeitpunkt noch keine Verbindungen zugeordnet werden konnte, sollen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter betrachtet werden. Anschließend wurde die absolute Konzentration der annotierten Substanzen bestimmt. Auf die hierfür verwendeten Methoden sowie damit einhergehende Schwierigkeiten wird in Kapitel 11.3.1 eingegangen.

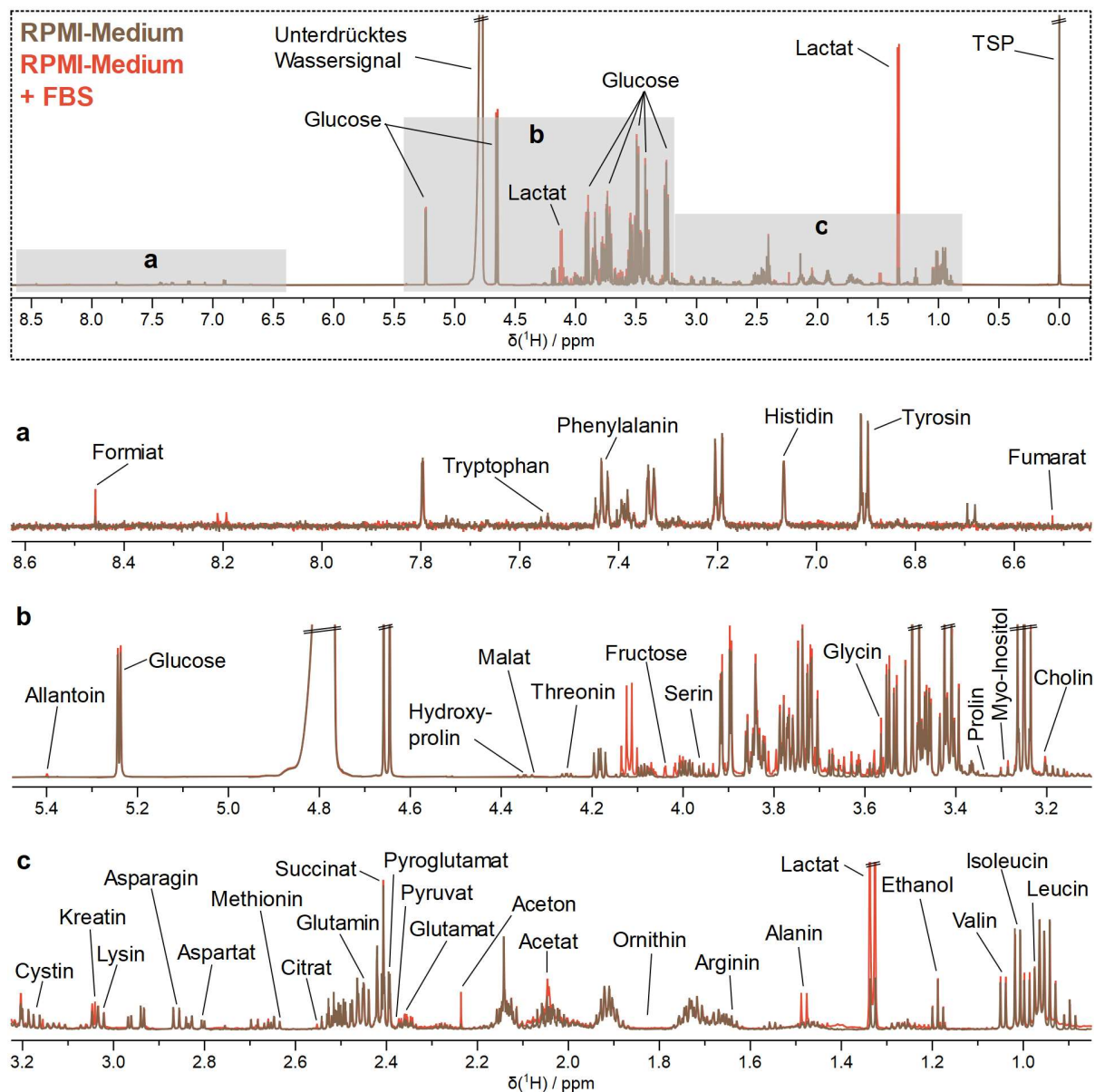


Abbildung 11.1: Repräsentative ^1H -NMR-Spektren von RPMI-Medium und RPMI-Medium mit FBS mit den identifizierten Substanzen. a–c: Vergrößerte Spektralbereiche. a: $\delta = 6.44\text{--}8.63$ ppm, 20-fach hochskaliert. b: $\delta = 3.10\text{--}5.48$ ppm, 1.5-fach hochskaliert. c: $\delta = 0.85\text{--}3.23$ ppm, 3-fach hochskaliert. In den vergrößerten Bereichen sind nur diejenigen Resonanzsignale jeder Substanz gekennzeichnet, die für die weitere Auswertung verwendet wurden.

Im RPMI-Medium konnten alle vom Hersteller angegebenen Substanzen mit einer Konzentration über $20\text{ }\mu\text{mol/l}$ Resonanzen im ^1H -NMR-Spektrum zugeordnet werden. Darüber hinaus wurden zusätzliche Resonanzsignale identifiziert, die sich Pyroglutamat, Acetat, Formiat, Aceton und Ethanol zuordnen lassen. Bei der Mehrzahl der enthaltenen Substanzen weicht die ermittelte Konzentration um bis zu 20 % von den Herstellerangaben ab (vergleiche Tabelle 11.1). Dies kann möglicherweise auf Ab- und Umbauprozesse der Bestandteile während der Lagerung des Mediums zurückgeführt werden. Weiterhin könnte

eine gewisse Abweichung auch methodischen Ursprungs sein, da, wie in Kapitel 11.3.1 beschrieben, die Genauigkeit der Quantifizierungsmethoden nicht bestimmt wurde. Bei vier Substanzen, Glutamat, Prolin, Myo-Inositol und Cholin, ist die gemessene Konzentration hingegen deutlich höher als angegeben. Im Falle von Glutamat (Abweichung um 78 %), Myo-Inositol (130 %) und Cholin (82 %) beruht dies vermutlich auf der Überlagerung der jeweiligen Resonanzsignale mit den Signalen anderer Substanzen (vergleiche Tabelle 11.1). Bei Prolin (121 %) ist die Ursache hierfür nicht klar, da im entsprechenden spektralen Bereich sowohl in den eindimensionalen als auch in den zweidimensionalen NMR-Spektren keine Resonanzsignale weiterer Substanzen erkennbar sind. Deutlich geringer als vom Hersteller angegeben ist dagegen die ermittelte Konzentration von Glutamin (Abweichung um 45 %). Für Glutamin ist bekannt, dass es in Lösung nicht stabil ist und in Zellkulturen typischerweise eine Zyklisierung von Glutamin zu Pyroglutamat stattfindet.^[366, 368] Diese Reaktion läuft bereits bei Lagerung des Mediums bei 4 °C ab, wobei in der Literatur von einem Glutamin-Abbau von 10 % innerhalb von neun Tagen berichtet wird.^[368] Dies erklärt auch das Vorliegen von Pyroglutamat im RPMI-Medium. Obwohl die Zyklisierungsreaktion äquimolar abläuft, also der Zerfall von Glutamin zu einer gleichen Anzahl an Pyroglutamat-Molekülen führt, ist die ermittelte Konzentration an Pyroglutamat 44 % höher als die Differenz aus Herstellerangabe und Messwert für Glutamin. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die berechnete Glutaminkonzentration aufgrund von Überlagerung mit der Resonanz von Hydroxyprolin höher als die tatsächliche Konzentration ist. Woher Acetat und Formiat im RPMI-Medium stammen, ist nicht klar. Allerdings ist Formiat nur in geringer Konzentration vorhanden, welche nahe der Bestimmungsgrenze (vergleiche Kapitel 11.3.2) liegt. Acetat lässt sich aufgrund der vollständigen Überlagerung mit den Resonanzen weiterer Substanzen nicht quantifizieren. Bei Ethanol und Aceton handelt es sich vermutlich um Verunreinigungen, da diese Substanzen im Labor typischerweise zur Reinigung von Materialien und Geräten zum Einsatz kommen.

Tabelle 11.1: Konzentrationen der in den Medien identifizierten Substanzen. Für jede Substanz ist die Konzentration im RPMI-Medium laut Herstellerangabe, die gemessene Konzentration im RPMI-Medium sowie im RPMI-Medium mit FBS und ein Literaturwert für Blutserum angegeben. Es wurde jeweils die Ausgangskonzentration im Medium zu Beginn der Ruhephase gemessen. Die angegebenen Messwerte stellen jeweils den Mittelwert aus drei technischen Replikaten dar. Die Referenzwerte stammen aus einer eingehenden Literaturrecherche, die von David Wishart und Kollegen durchgeführt wurde. Entsprechend der Literaturangabe ist dabei der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung oder ein Konzentrationsbereich angegeben.^[369]

Substanz	RPMI-Medium		RPMI-Medium + 10% FBS	Blutserum
	Herstellerangabe in $\mu\text{mol l}^{-1}$	Messwert in $\mu\text{mol l}^{-1}$	Messwert in $\mu\text{mol l}^{-1}$	Literaturwert ^[369] in $\mu\text{mol l}^{-1}$
L-Glutamin [+ L-Hydroxyprolin]	2053	[1121]	[914.5]	586 (502–670)
L-Arginin [+ Protein]	1148	1132	[1770]	111.6 (82.2–140.9)
L-Isoleucin	381.2	398.3	341.2	62 (48–76)
L-Leucin [+ Protein]	381.2	402.5	[446.5]	123 (98–148)
L-Asparagin	378.5	416.8	356.2	41 $\pm$ 10
L-Cystin	371.2	291.6	287.8	109.0 $\pm$ 24.0
L-Serin [+ Protein]	285.4	284.2	[326.1]	137.0 $\pm$ 35.0
L-Lysin [+ Protein]	219.0	235.0	[358.1]	183.0 $\pm$ 34.0
Myo-Inositol [+ L-Phenylalanin]	194.3	[447.2]	[561.0]	23.0 $\pm$ 8.0
L-Prolin	173.7	383.1	367.3	239.0 $\pm$ 70.0
L-Valin	170.8	192.6	206.0	233 (190–276)
L-Threonin	167.9	137.7	160.4	140 (107–173)
L-Hydroxyprolin	152.5	n.q.#	n.q.#	–
L-Aspartat	150.3	181.3	185.2	21.0 $\pm$ 5.0
L-Glutamat [+ L-Prolin]	136.0	[242.2] / 92	[310.5] / 161	21.0–150.0
Glycin [+ Protein]	133.2	126.6	[191.1]	230 (178–282)
L-Tyrosin	110.4	127.4	118.5	100 (55–147)
L-Methionin	100.5	114.1	104.1	30 (22–38)
L-Phenylalanin	90.81	104.1	75.60	65.0 $\pm$ 9.0
L-Histidin	96.71	115.3	95.73	82 (72–92)
L-Tryptophan	24.48	n.q.#	n.q.#	48.7 $\pm$ 11.6
Cholin [+ L-Cystin]	21.49	[39.10]	[47.05]	10.6 $\pm$ 1.9
Pyroglutamat	–	1339	1153	–
Lactat [+ L-Threonin]	–	[196.0] / 0	[1760] / 1564	1510 (740–2400)
L-Alanin [+ L-Isoleucin/L-Lysin]	–	[105.5] / 0	[218.8] / 113	333 (259–407)
L-Ornithin* [+ Protein]	–	[86.65] / 0	[231.1] / 0	55 (39–71)
Pyruvat* [+ L-Glutamat]	–	[14.74] / 0	[19.39] / 0	64 (22–258)
Formiat	–	n.q.#	17.76	121.7 $\pm$ 97.8
Acetat [+ L-Arginin/L-Lysin]	–	n.q.†	n.q.†	30 (22–40)
Fructose	–	–	218.1	n.q.

Substanz	RPMI-Medium		RPMI-Medium + 10% FBS	Blutserum
	Herstellerangabe in $\mu\text{mol l}^{-1}$	Messwert in $\mu\text{mol l}^{-1}$	Messwert in $\mu\text{mol l}^{-1}$	Literaturwert ^[369] in $\mu\text{mol l}^{-1}$
Citrat	–	–	61.39	190 (30–400)
Kreatin [+ Protein]	–	–	[43.91]	54.8 ± 21.0
Betain [+ Glucose]	–	–	n.q.†	82 (20–144)
Succinat [+ Pyroglutamat]	–	–	n.q.†	16.0 (0.0–32.0)
Fumarat	–	–	n.q.#	n.q.
Allantoin	–	–	n.q.#	–
Malat	–	–	n.q.#	–
Aceton	–	V	V	106 (35–170)
Ethanol	–	V	V	n.q.

Anmerkungen: Die Messwerte in eckigen Klammern liegen durch Überlagerung mit den Resonanzen anderer Substanzen oder Proteinuntergrund vermutlich über den tatsächlichen Werten. Sofern die tatsächliche Konzentration (anhand der ^1H -NMR-Spektren und der Beobachtungen in Kapitel 11.1.4) abgeschätzt werden konnte, ist diese hinter der Klammer angegeben. Der Messwert für Ornithin im reinen RPMI-Medium kommt nur durch Rauschen zustande.

*: Ornithin und Pyruvat sind in den Medien nicht enthalten und entstehen erst durch Inkubation des Mediums bzw. Kultivierung von Zellen.

–: Die Substanz konnte nicht nachgewiesen werden, bzw. ist in den Literaturdaten nicht aufgeführt.

n.q.: Die Substanz konnte nicht quantifiziert werden, bzw. in den Literaturdaten ist keine Konzentration angegeben. #: Die Konzentration liegt unterhalb der festgelegten Bestimmungsgrenze.

†: Die Konzentration konnte aufgrund zu starker Überlagerung mit den Resonanzen anderer Substanzen nicht bestimmt werden.

V: Bei diesen Substanzen handelt es sich vermutlich um Verunreinigungen

Ebenso wurde die Konzentration der identifizierten Substanzen nach Zugabe von 10 % FBS zum RPMI-Medium berechnet. Wie in Tabelle 11.1 erkennbar, ist je nach Substanz die ermittelte Konzentration etwas geringer oder höher als im reinen RPMI-Medium, wofür es unterschiedliche Gründe geben kann. Eine geringere Konzentration im Medium mit FBS kann dadurch zustande kommen, dass es durch die Zugabe von FBS zu einer Verdünnung des RPMI-Mediums kommt. Folglich lassen Konzentrationen, die nach Zugabe von FBS nur noch etwa 90 % betragen, wie beispielsweise im Falle von Pyroglutamat, darauf schließen, dass die jeweilige Substanz im reinen FBS nicht enthalten ist. Allerdings ist auch möglich, dass es sich dabei nicht um tatsächliche Konzentrationsunterschiede, sondern eine Unterquantifizierung aufgrund der Interaktion der jeweiligen Substanz mit den Proteinen aus dem FBS handelt (vergleiche Kapitel 11.3.1). Eine höhere Konzentration im RPMI-Medium mit FBS im Vergleich zum reinen RPMI-Medium spricht für das Vorliegen dieser Substanz im FBS, kann aber auch zu einem gewissen Teil durch Untergrund im Spektrum zustande kommen, welcher durch die

Proteine im FBS verursacht wird (vergleiche Kapitel 11.3.1). So ist insbesondere bei den Resonanzsignalen von Arginin, Glycin und Lysin, welche nach Zugabe von FBS mit 50–60 % die deutlichste Konzentrationszunahme aufweisen (Tabelle 11.1), auch eine merkliche Zunahme des Proteinuntergrunds zu beobachten (Abbildung 11.1). Folglich kann nicht abschließend beurteilt werden kann, um welchen Anteil die Konzentration tatsächlich zunimmt.

Darüber hinaus konnten im Medium mit FBS zusätzliche Resonanzen identifiziert werden, welche sich Alanin, Allantoin, Citrat, Fructose, Fumarat, Kreatin, Lactat, Malat, Ornithin, Succinat und Betain zuordnen lassen. Allerdings war eine quantitative Bestimmung bei einigen dieser Metaboliten nicht möglich, da die Konzentration entweder unter der Bestimmungsgrenze liegt (im Falle von Allantoin, Fumarat und Malat), oder sie eine zu starke Überlagerung mit den Resonanzen anderer Substanzen aufweisen (im Falle von Succinat und Betain). Die im FBS zusätzlich identifizierten Substanzen decken sich zum Großteil mit bekannten Bestandteilen in Blutserum: Serum enthält typischerweise verschiedene Aminosäuren sowie Zucker wie Glucose und Fructose. Allantoin ist ein Endprodukt des Abbaus von Purinbasen, welche ebenfalls in FBS enthalten sind. Die detektierten organischen Säuren sowie Betain und Kreatin dagegen sind nicht als Bestandteil tierischer Seren aufgelistet.^[366] Ein Vergleich mit dem Metabolom des, wenn auch menschlichen, Serums zeigt jedoch, dass das Vorliegen dieser Substanzen plausibel ist (Tabelle 11.1).^[369]

Die Konzentrationen der Substanzen im Zellkulturmedium wurden anschließend mit den physiologischen Konzentrationen in menschlichem Blutserum verglichen (Tabelle 11.1). Die angegebenen Referenzwerte sind das Ergebnis einer eingehenden Literaturrecherche, die von David Wishart und Kollegen durchgeführt wurde.^[369] Bei diesem Vergleich fällt auf, dass viele Substanzen im Medium in abweichender Konzentration zum Blutserum vorliegen, wobei ihre Konzentration meist höher ist. Die beiden Aminosäuren mit der höchsten Konzentration im Medium, Glutamin und Arginin, sind (bezogen auf die Herstellerangabe für das RPMI-Medium) knapp vier- beziehungsweise zehnfach höher konzentriert als in Blutserum. Auch Asparagin und Aspartat weisen im Medium eine sieben- bis neunfach erhöhte Konzentration auf. Darüber hinaus ist auch die Konzentration von Isoleucin, Leucin, Methionin, Cystin (ein Disulfid, das aus zwei Molekülen der Aminosäure L-Cystein besteht), Serin sowie Cholin deutlich höher als im Blutserum. Zu den Substanzen, die im Medium in geringerer Konzentration vorliegen als im Blutserum gehören Glycin, Alanin und Formiat. Auch die

ermittelte Konzentration von Citrat liegt an der unteren Grenze des in Blutserum gefundenen Konzentrationsbereichs. Von diesen Substanzen stammen Alanin und Citrat ausschließlich und Formiat vorwiegend aus dem FBS. Ornithin und Pyruvat sind zu Beginn der Inkubation in den Medien im Gegensatz zum Blutserum überhaupt nicht vorhanden.

Obwohl Lactat im RPMI-Medium nicht enthalten und nur in undefinierter Menge im FBS vorhanden ist, liegt die ermittelte Konzentration für das RPMI-Medium mit 10 % FBS interessanterweise genau innerhalb der Literaturwerte für Lactat in Blutserum. Für die supplementierte Konzentration an Glucose wurde mit 6.94 mmol/l ein Wert zwischen dem normalen Blutzuckerwert nüchtern (< 6.1 mmol/l) und dem Wert zwei Stunden nach einer Mahlzeit (< 7.8 mmol/l) gewählt.^[370] Aus diesem Grund ist diese Konzentration etwas höher als normalerweise in Blutserum (4.7–6.1 mmol/l)^[369]. Interessant ist dabei die gemessene Glucosekonzentration von 6.99 mmol/l im Medium mit FBS, was darauf hinweist, dass das FBS ebenfalls Glucose enthält.

Diese Untersuchungen bestätigen die Annahme, dass die Konzentration vieler Komponenten im Zellkulturmedium nicht der physiologischen Konzentration im Blut entspricht. Insbesondere zahlreiche Aminosäuren wie beispielsweise Glutamin sind im Medium in deutlich höherer Konzentration vorhanden. Mögliche Folgen dieser unphysiologischen Konzentrationen auf den Metabolismus der Zellen werden in Kapitel 11.1.5 gemeinsam mit den Ergebnissen der nächsten beiden Kapitel diskutiert.

11.1.3 Stabilität der Substanzen im Medium

Nachdem die Zusammensetzung des Kulturmediums ermittelt wurde, soll nun die Stabilität der enthaltenen Substanzen unter Zellkulturbedingungen bei 37 °C über einen Zeitraum von sechs Tagen untersucht werden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um bei der Kultivierung von Zellen definierte Aussagen darüber treffen zu können, welche Konzentrationsänderungen im Medium tatsächlich auf die Stoffwechselaktivität der Zellen zurückzuführen sind. Darüber hinaus könnte sowohl die Verminderung als auch die Anreicherung von Substanzen im Medium wiederum einen Einfluss auf den Metabolismus der Zellen haben.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde beobachtet, dass innerhalb des Inkubationszeitraums von sechs Tagen die Konzentration der einzelnen Substanzen nahezu linear um 5–10 % im RPMI-Medium und um etwa 2 % im RPMI-Medium mit FBS zunimmt. Um zu verifizieren, dass es sich dabei um einen substanzunabhängigen Effekt handelt, wurde die mittlere prozentuale Änderung aller Substanzen berechnet, welche nach sechs Tagen im RPMI-Medium 8 % und im RPMI-Medium mit FBS 2 % betrug (Abbildung 11.2). Dabei wurden Substanzen ausgenommen, deren Konzentrationsänderung von diesem Trend abweicht, worauf im weiteren Verlauf dieses Kapitels eingegangen wird.

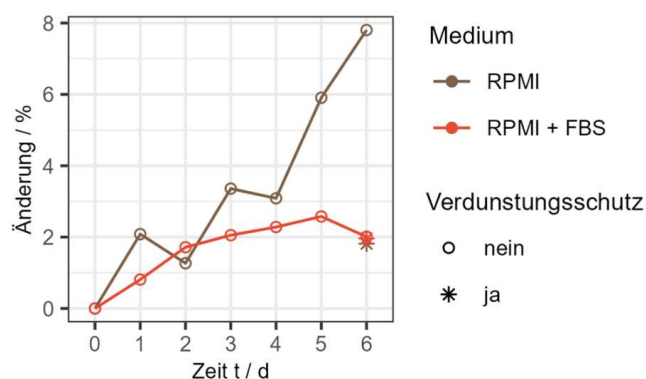


Abbildung 11.2: Mittlere prozentuale Änderung der Konzentration ausgewählter Substanzen im RPMI-Medium ohne und mit FBS im Verlauf der Inkubation. Die Punkte stellen die Mittelwerte der technischen Replikate dar. $t = 0$ d bezeichnet den Zeitpunkt nach dem Wechsel des Mediums. Für den Zeitpunkt $t = 6$ d wurde zusätzlich eine Probe mit Verdunstungsschutz angesetzt.

Eine Zunahme der Konzentration kann durch zwei verschiedene Faktoren zustande kommen, entweder eine Erhöhung der absoluten Menge an Substanz in der Probe oder eine Reduktion des Volumens. Da die hier beobachtete Konzentrationszunahme unabhängig von der betrachteten Substanz ist, ist eine tatsächliche Zunahme der Menge unwahrscheinlich. Somit ist die Anreicherung der Substanzen in den Medien vermutlich auf einen Volumenverlust durch Verdunstungseffekte zurückzuführen. Dieser tritt häufig vorwiegend in den äußeren Kavitäten von Mikrotiterplatten auf und ist in der Literatur als Randeffect beschrieben.^[371–373] Da das nicht mit FBS supplementierte RPMI-Medium in Vertiefungen der Ränder inkubiert wurde, das RPMI-Medium mit FBS jedoch von anderen gefüllten Kavitäten umgeben war (Abbildung 11.3), könnte dies eine erhöhte Verdunstungsrate des reinen RPMI-Mediums und folglich die stärker ausgeprägte Konzentrationszunahme erklären. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Zeitpunkten könnten auf die unterschiedliche Position der Platten im Inkubator zurückzuführen sein. In einem weiteren Versuch wurden die äußersten, zuvor leeren Kavitäten mit PBS-Lösung (engl.: *phosphate buffered saline*) befüllt, welche als

Verdunstungsschutz dienen soll. In diesem Fall wurde nur die Konzentrationsänderung nach sechs Tagen bestimmt. Durch diesen Verdunstungsschutz konnte die Anreicherung der Substanzen in beiden Medien auf etwa 2 % innerhalb von sechs Tagen begrenzt werden, was dem Wert im RPMI-Medium mit FBS ohne Verdunstungsschutz entspricht (Abbildung 11.2). Da dieser Wert als vernachlässigbar klein angenommen wird, wurde diese Art von Verdunstungsschutz für die nachfolgenden Versuche in Kapitel 11.2 eingesetzt.

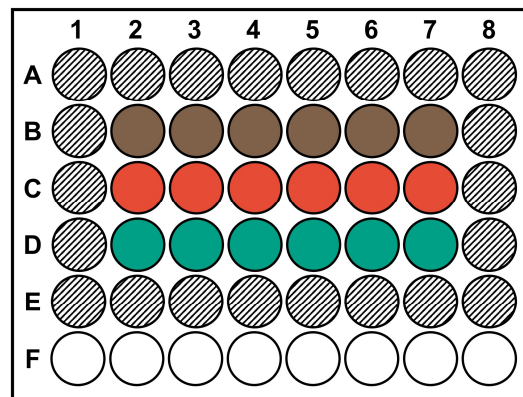


Abbildung 11.3: Schematische Darstellung der Probenanordnung in einer Mikrotiterplatte mit 48 Kavitäten. Je sechs Kavitäten wurden mit RPMI-Medium (braun), RPMI-Medium mit FBS (rot) sowie RPMI-Medium mit FBS und PBMCs (türkis) befüllt. Die schraffierten Kavitäten waren je nach Versuchsdurchführung leer oder wurden mit PBS-Lösung als Verdunstungsschutz befüllt.

Zusätzlich zur Anreicherung der Bestandteile im Medium durch Verdunstung konnten spezifische Konzentrationsänderungen einzelner Substanzen festgestellt werden. In Tabelle 11.2 ist die Anfangskonzentration dieser Substanzen nach der Ruhephase und dem Wechsel des Mediums sowie die Endkonzentration nach sechs Tagen unter Anwendung des Verdunstungsschutzes aufgeführt. (Anmerkung: In Tabelle 11.1 sind die Anfangskonzentrationen vor der Ruhephase dargestellt, weshalb die hier dargestellten Werte gering abweichen können). Sowohl im reinen RPMI-Medium als auch im RPMI-Medium mit FBS kann eine Abnahme der Glutaminkonzentration bei gleichzeitiger, annähernd äquimolarer Zunahme der Pyroglutamatkonzentration beobachtet werden. Im reinen RPMI-Medium fallen die absoluten Änderungen mit 364 $\mu\text{mol/l}$ für die Abnahme der Glutaminkonzentration und 361 $\mu\text{mol/l}$ für die Zunahme der Pyroglutamatkonzentration dabei stärker aus als im reinen RPMI-Medium mit 280 beziehungsweise 311 $\mu\text{mol/l}$. Die prozentuale Änderung ist jedoch in beiden Medien vergleichbar und liegt bei etwa 30 % innerhalb von sechs Tagen beziehungsweise 5 % innerhalb eines Tages. Wie in Kapitel 11.1.2 bereits angemerkt, ist dies vermutlich auf eine spontane Zyklisierung von Glutamin zu Pyroglutamat zurückzuführen, eine

bekannte Problematik bei der Arbeit mit Zellkulturen.^[366, 368] Im Vergleich zu der von Tritsch und Moore beobachteten Umsetzung von 10 % pro Tag bei 37 °C läuft diese Reaktion bei den vorliegenden Versuchen etwas langsamer ab.^[368]

Darüber hinaus kann im Medium mit FBS im Verlauf der Inkubation die Konzentrationsänderung weiterer Substanzen beobachtet werden. So sinkt die Konzentration von Arginin innerhalb von sechs Tagen um 273 µmol/l, während die Ornithinkonzentration um 327 µmol/l steigt. Des Weiteren sinkt die Asparaginkonzentration um 36.7 µmol/l bei gleichzeitiger Zunahme der Aspartatkonzentration um 46.5 µmol/l. Außerdem nimmt die Konzentration von Kreatin (3.71 µmol/l beziehungsweise 8 %) und Cholin (8.47 µmol/l beziehungsweise 19 %) leicht zu.

Tabelle 11.2: Konzentrationsänderung verschiedener Substanzen im RPMI-Medium ohne sowie mit FBS über einen Zeitraum von sechs Tagen. Als Anfangskonzentration ist jeweils die Konzentration zum Zeitpunkt nach der Ruhephase und dem Wechsel des Mediums angegeben. Die Konzentration nach sechs Tagen wurde unter Verwendung des Verdunstungsschutzes erhalten. Die angegebenen Werte stellen jeweils den Mittelwert aus drei technischen Replikaten dar.

Substanz	Medium	Anfangskonzentration in µmol l ⁻¹	Konzentration nach 6 d in µmol l ⁻¹	Änderung	
				in µmol l ⁻¹	in %
Glutamin	RPMI	1112	748.1	-364	-33
	RPMI + 10 % FBS	911.5	631.2	-280	-31
Pyroglutamat	RPMI	1339	1700	361	27
	RPMI + 10 % FBS	1165	1476	311	27
Arginin	RPMI	1131	1221	90	8
	RPMI + 10 % FBS	1708	1435	-273	-16
Ornithin	RPMI	86.39	88.29	1.90	–
	RPMI + 10 % FBS	242.3	569.5	327.2	–
Asparagin	RPMI	416.7	422.4	5.7	1
	RPMI + 10 % FBS	354.3	317.6	-36.7	-10
Aspartat	RPMI	173.1	176.7	3.6	2
	RPMI + 10 % FBS	180.7	227.2	46.5	26
Kreatin	RPMI	–	–	–	–
	RPMI + 10 % FBS	44.20	47.91	3.71	8
Cholin	RPMI	38.89	39.06	0.17	0
	RPMI + 10 % FBS	44.09	52.56	8.47	19

Anmerkungen: Der Messwert für Ornithin im reinen RPMI-Medium kommt nur durch Rauschen zustande, der Anfangswert im RPMI-Medium mit FBS durch Proteinuntergrund, weshalb die prozentuale Änderung nicht berechnet werden konnte. Die gemessenen Werte für Kreatin liegen durch Proteinuntergrund vermutlich über den tatsächlichen Werten. Die Änderungen wurde unter der Annahme berechnet, dass der Proteinuntergrund konstant bleibt.

Eine mögliche Erklärung für die Verringerung der Argininkonzentration bei gleichzeitiger Zunahme der Ornithinkonzentration könnte eine hydrolytische Spaltung von Arginin zu Ornithin und Harnstoff (in den vorliegenden Versuchen methodisch bedingt nicht detektierbar) durch das Enzym Arginase sein. In einer Studie von Kihara *et al.*^[374] konnte bei Inkubation von Zellmedium mit FBS dasselbe Phänomen beobachtet und darüber hinaus die Aktivität des Enzyms Arginase nachgewiesen werden. Auch nach einer Hitzebehandlung des FBS bei 60 °C für eine Stunde blieb 95 % der Arginase-Aktivität erhalten.^[374] Die Umwandlung von Asparagin zu Aspartat könnte durch das Enzym Asparaginase katalysiert werden. Bei einem Vergleich der Stabilität verschiedener Aminosäuren in FBS-freiem sowie FBS-haltigem Medium konnten Wein und Goetz vergleichbare Veränderungen beobachten.^[375] Des Weiteren konnten sie die Aktivität des Enzyms Asparaginase in FBS nachweisen, wobei durch Erhitzen des Mediums für 30 Minuten auf 56 °C die Aktivität zwar verringert, aber nicht gestoppt werden konnte.^[375] Dass die Zu- und Abnahme der jeweiligen Substanzen nicht exakt äquimolar ist, könnte auf mangelnde Präzision bei der Bestimmung der Konzentrationen zurückzuführen sein (siehe Kapitel 11.3.1). Denkbar wären auch weitere parallel ablaufende, bisher unbekannte, enzymatische Reaktionen. Die Ursache für die Konzentrationsänderung von Cholin und Kreatin ist bisher nicht bekannt.

Die Beobachtungen in diesem Kapitel haben gezeigt, dass in FBS, trotz thermischer Inaktivierung, noch Enzymaktivität vorhanden sein kann. Diese hat, zusätzlich zu der spontanen Zyklisierung von Glutamin zu Pyroglutamat, im Verlauf der Inkubation eine Konzentrationsänderung verschiedener Substanzen im Medium zur Folge. Dennoch liefert der Vergleich der Konzentrationen nach sechs Tagen mit den physiologischen Konzentrationen im Blutserum (Tabelle 11.1) vergleichbare Ergebnisse wie zu Beginn der Inkubation: Auch nach Ende der Inkubation ist Kreatin noch in physiologischer Konzentration vorhanden und die Konzentration der restlichen Substanzen liegt noch immer über der typischen Konzentration in Blutserum. Bei Ornithin, welches im Verlauf der Inkubation erst gebildet wird, liegt die Konzentration bereits nach dem zweiten Tag ebenfalls deutlich über der physiologischen Konzentration (Anhang, Abbildung A.3). Daraus lässt sich ableiten, dass bei Kultivierung von PBMCs die parallele Inkubation von RPMI-Medium mit FBS ohne Zellen als Blindwert notwendig ist, um beurteilen zu können, welche Konzentrationsänderungen tatsächlich auf zelluläre Aktivität zurückzuführen sind.

11.1.4 Kultivierung von PBMCs ohne Stimulanzen

Parallel zu den zuvor betrachteten Medien ohne Kultivierung von Zellen, wurden PBMCs in RPMI-Medium mit 10 % FBS inkubiert. Dadurch soll untersucht werden, welche Konzentrationsbereiche der Substanzen im Medium aufgrund des zellulären Stoffwechsels über die Inkubationsdauer von sechs Tagen erreicht werden. Dies ist relevant, da sowohl der Verbrauch bestimmter Substanzen als auch hohe, potenziell toxische Konzentrationen von sekretierten Metaboliten die Zellen beeinträchtigen könnten. Die Ergebnisse sollen Aufschluss darüber geben, wie lange eine Zellkultivierung möglich ist, bevor ein negativer Einfluss auf die Zellen zu erwarten ist. Außerdem soll analysiert werden, auf welche Stoffwechselwege Verbrauch und Produktion der jeweiligen Substanzen zurückzuführen sein könnten. Ziel ist es, ein tieferes Verständnis des physiologischen Metabolismus der PBMCs zu erlangen, bevor im nächsten Kapitel Veränderungen im Stoffwechsel nach einer Stimulation der Zellen mit LPS untersucht werden. Dabei wird nur auf die Substanzen eingegangen, deren Konzentration sich während der Inkubation am deutlichsten verändert. Der Verlauf weiterer, im Medium identifizierter und quantifizierter Substanzen ist im Anhang in Abbildung A.3 dargestellt.

Die in diesem Kapitel dargestellten Daten sind das Ergebnis der Kultivierung von PBMCs nur eines Blutspenders. Die Variation zwischen den Zellen verschiedener Individuen, den biologischen Replikaten, wird in einem gesonderten Kapitel (Kapitel 11.3.2) thematisiert.

Bereits bei Betrachtung der ^1H -NMR-Spektren des Zellkulturmediums kann eine deutliche Änderung der Konzentration diverser Substanzen im Verlauf der Inkubation beobachtet werden (Abbildung 11.4). Besonders auffällig ist die annähernd exponentielle Zunahme des im Medium vorliegenden Lactats bei gleichzeitiger Abnahme der Glucosekonzentration (Abbildung 11.5). Im Verlauf von sechs Tagen nimmt die Glucosekonzentration von 7.00 mmol/l auf 1.82 mmol/l ab, während die Konzentration an Lactat von 1.63 mmol/l auf 11.00 mmol/l ansteigt (durch Überlagerung mit Threonin liegt die in Abbildung 11.5 dargestellte Konzentration von Lactat etwa 0.2 mmol/l über der tatsächlichen Konzentration). Folglich entspricht die Stoffmenge des gebildeten Lactats nahezu der doppelten Stoffmenge an verbrauchter Glucose. Im Falle von Glucose wird zwischen dem vierten und fünften Tag die physiologische Konzentration im Blutserum unterschritten (Untergrenze von 4.7 mmol/l^[369]), bei Lactat wird sie bereits zwischen dem ersten und zweiten Tag überschritten (Obergrenze von 2.4 mmol/l^[369]).

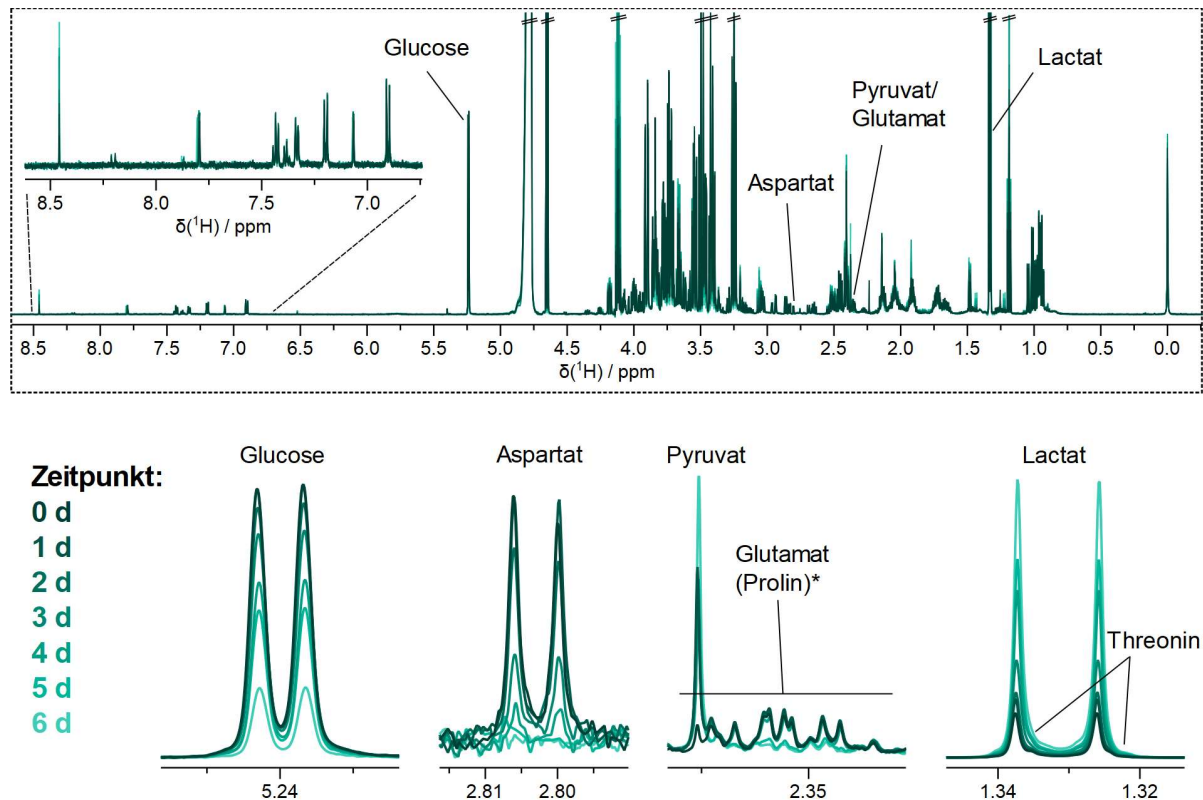


Abbildung 11.4: Repräsentative ^1H -NMR-Spektren von RPMI-Medium mit FBS nach Kultivierung von PBMCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Für jeden Zeitpunkt ist nur ein technisches Replikat dargestellt. Oben: Gesamter spektraler Bereich. Unten: Detailansicht ausgewählter Resonanzsignale. *Zu den letzten beiden Zeitpunkten ist das Signal nur auf die Resonanz von Prolin zurückzuführen.

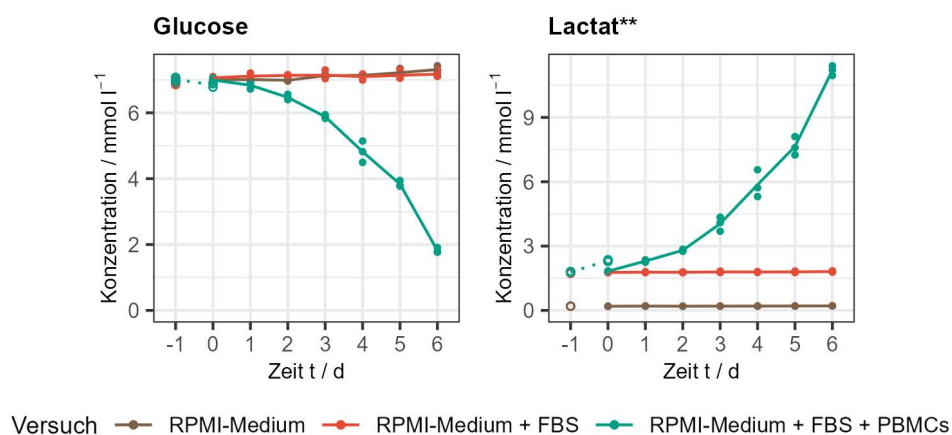


Abbildung 11.5: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Glucose und Lactat in RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie bei Kultivierung von PBMCs. Die Punkte stellen die technischen Replikate dar, die Linien verbinden die Mittelwerte. Die leeren Kreise und die gestrichelte Linie stellen die Werte in der Ruhephase ($t = -1$ d bis $t = 0$ d) vor dem Wechsel des Mediums dar. Für die Medien ohne Zellen liegt kein Messwert für das Ende der Ruhephase vor. Bei diesen Versuchen wurde kein Verdunstungsschutz eingesetzt. **Die ermittelte Konzentration von Lactat liegt durch Überlagerung mit Threonin für alle drei Versuche etwa 0.2 mmol/l über der tatsächlichen Konzentration.

Bei den zwei Carbonsäuren Citrat und Formiat kann bei Kultivierung von PBMCs eine lineare Zunahme der Konzentration im Medium über die gesamte Dauer der Inkubation beobachtet werden (Abbildung 11.6). Insgesamt nimmt Citrat auf etwa $110 \mu\text{mol/l}$ und Formiat auf $90 \mu\text{mol/l}$ zu. Dadurch werden Werte erreicht, welche innerhalb der physiologischen Konzentrationen in Blutserum liegen (vergleiche Tabelle 11.1). Einen gänzlich anderen Konzentrationsverlauf als die sonstigen Carbonsäuren weist Pyruvat auf (Abbildung 11.6). Bereits innerhalb der Ruhephase nimmt die Konzentration von Pyruvat im Medium um etwa $79 \mu\text{mol/l}$ zu. Durch den Wechsel des Mediums sinkt die Menge wieder nahezu auf den Ausgangswert und steigt dann innerhalb des ersten Inkubationstages wiederum um $67 \mu\text{mol/l}$. Dadurch wird jeweils eine Konzentration von etwa $80 \mu\text{mol/l}$ erreicht (durch Überlagerung mit Glutamat liegt die in Abbildung 11.6 dargestellte Konzentration von Pyruvat etwa $20 \mu\text{mol/l}$ über der tatsächlichen Konzentration), was etwa der Konzentration in Blutserum entspricht (vergleiche Tabelle 11.1). Im weiteren Verlauf der Kultivierung bleibt die Konzentration relativ konstant. Allerdings kann aufgrund der leichten Überlagerung mit der Resonanz von Glutamat, dessen Konzentration im Medium nach drei Tagen deutlich abnimmt (vergleiche Abbildung 11.4 und Abbildung 11.7) der weitere Verlauf nicht im Detail analysiert werden.

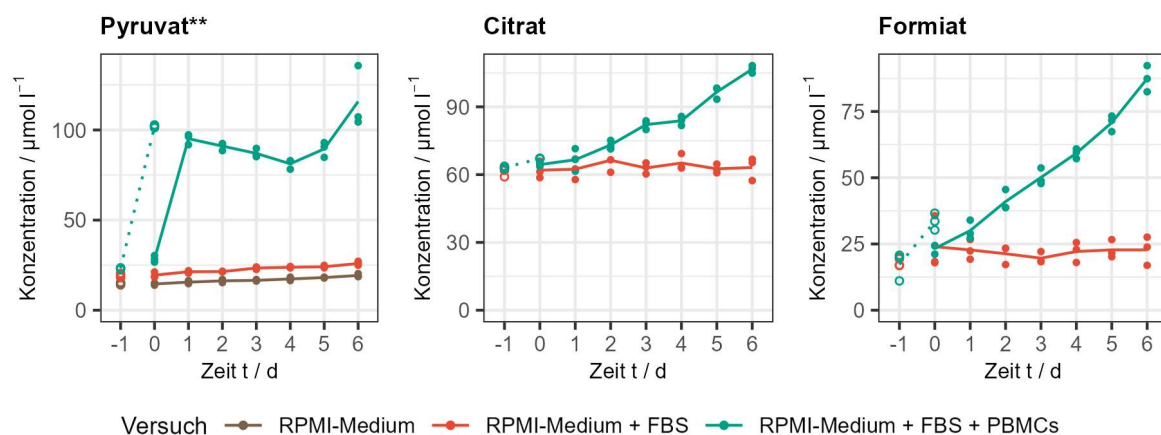


Abbildung 11.6: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Pyruvat, Citrat und Formiat in RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie bei Kultivierung von PBMCs. Die Punkte stellen die technischen Replikate dar, die Linien verbinden die Mittelwerte. Die leeren Kreise und die gestrichelte Linie stellen die Werte in der Ruhephase ($t = -1 \text{ d}$ bis $t = 0 \text{ d}$) vor dem Wechsel des Mediums dar. Für die Medien ohne Zellen liegt kein Messwert für das Ende der Ruhephase vor. Bei diesen Versuchen wurde kein Verdunstungsschutz eingesetzt. **Die ermittelte Konzentration von Pyruvat liegt durch Überlagerung mit Glutamat für alle drei Versuche etwa $20 \mu\text{mol/l}$ über der tatsächlichen Konzentration.

Weiterhin soll der Konzentrationsverlauf einiger Aminosäuren betrachtet werden. Der Fokus liegt auf den Aminosäuren, deren Konzentration sich im Verlauf der Inkubation am stärksten verändert, wobei es sich vorwiegend um nicht-essenzielle sowie semi-essenzielle Aminosäuren handelt. Bei Glutamat, Cystin, Serin und Aspartat kann bei Kultivierung von PBMCs im Verlauf der Inkubation eine Abnahme der Konzentration im Medium beobachtet werden, wobei diese bei Glutamat und Aspartat am deutlichsten ausgeprägt ist (Abbildung 11.7).

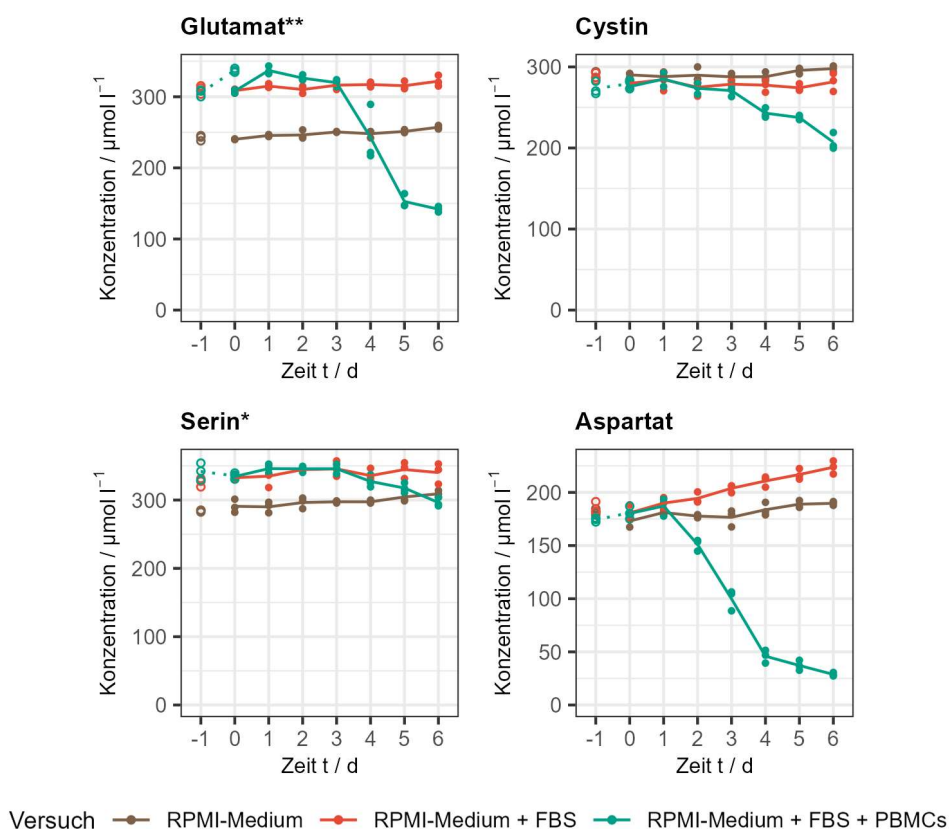


Abbildung 11.7: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Glutamat, Cystin, Serin und Aspartat in RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie bei Kultivierung von PBMCs. Die Punkte stellen die technischen Replikate dar, die Linien verbinden die Mittelwerte. Die leeren Kreise und die gestrichelte Linie stellen die Werte in der Ruhephase ($t = -1$ d bis $t = 0$ d) vor dem Wechsel des Mediums dar. Für die Medien ohne Zellen liegt kein Messwert für das Ende der Ruhephase vor. Bei diesen Versuchen wurde kein Verdunstungsschutz eingesetzt. *Die ermittelte Konzentration von Serin liegt bei den Versuchen mit FBS aufgrund von Proteinuntergrund über der tatsächlichen Konzentration. **Die ermittelte Konzentration von Glutamat liegt durch Überlagerung mit Prolin etwa $150 \mu\text{mol/l}$ über der tatsächlichen Konzentration.

Besonders auffällig ist dabei, nach einer geringen Konzentrationszunahme innerhalb des ersten Inkubationstages, die deutliche Reduktion der Glutamatkonzentration zwischen dem dritten und fünften Tag der Inkubation um etwa $170 \mu\text{mol/l}$. Dabei muss beachtet werden, dass die hier beobachtete Konzentrationsänderung von Glutamat durch eine

Konzentrationsänderung des überlagerten Prolins verfälscht werden könnte. Eine Betrachtung der ^1H -NMR-Spektren (Abbildung 11.4) zeigt jedoch, dass die hier diskutierten Beobachtungen vorwiegend auf eine Veränderung der Intensität des Resonanzsignals von Glutamat zurückgeführt werden können. Des Weiteren ist nach fünf Tagen kein Glutamatsignal mehr in den Spektren erkennbar. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass der Messwert zu diesem Zeitpunkt nur durch die Überlagerung mit der Prolinresonanz zustande kommt und kein Glutamat mehr im Medium vorhanden ist. Somit ist anzunehmen, dass die tatsächliche Konzentration von Glutamat zu jedem Zeitpunkt etwa $150\ \mu\text{mol/l}$ unter der ermittelten Konzentration liegt. Analog zu Glutamat ist auch bei Cystin insbesondere ab dem dritten Inkubationstag eine Reduktion der Konzentration zu beobachten. Allerdings wird Cystin im Verlauf der Inkubation nicht vollständig aufgebraucht. Nach sechs Tagen ist die minimale Konzentration von $207\ \mu\text{mol/l}$ erreicht, womit der Wert noch immer oberhalb der typischen Konzentration in Blutserum liegt (Tabelle 11.1). Auch bei Serin, Leucin und Isoleucin ist ein ähnlicher Verlauf zu beobachten, auch wenn die Abnahme der Konzentration nicht so stark ausgeprägt ist (für Leucin und Isoleucin siehe Anhang, Abbildung A.3). Im Gegensatz dazu sinkt die Menge an Aspartat im Medium schon zwischen dem ersten und vierten Tag der Inkubation. Bei Betrachtung der ^1H -NMR-Spektren (Abbildung 11.4) fällt auf, dass nach vier Tagen das Aspartat im Medium nahezu vollständig verbraucht ist. Da während der Inkubation aufgrund enzymatischer Reaktionen Aspartat gebildet wird (vergleiche Kapitel 11.1.3), wurde ebenfalls die Nettobilanz an verbrauchtem Aspartat berechnet (Abbildung 11.8). Dadurch wird ersichtlich, dass durch die kultivierten PBMCs über einen Zeitraum von fünf Tagen etwa $175\ \mu\text{mol/l}$ Aspartat verbraucht wird.

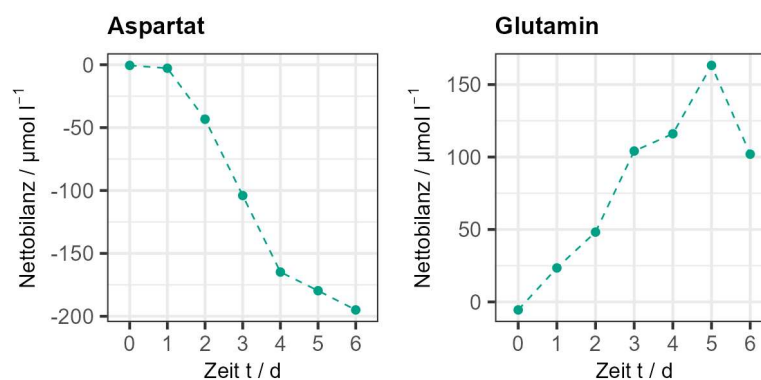


Abbildung 11.8: Nettobilanz der durch die PBMCs verbrauchten beziehungsweise gebildeten Menge an Aspartat und Glutamin im Verlauf der Inkubation. Die Punkte stellen die Mittelwerte der technischen Replikate dar. $t = 0\ \text{d}$ bezeichnet den Zeitpunkt nach dem Wechsel des Mediums. Bei diesen Versuchen wurde kein Verdunstungsschutz eingesetzt.

Die Konzentration von Glutamin sinkt bei Inkubation von PBMCs im Verlauf von sechs Tagen leicht auf etwa 730 $\mu\text{mol/l}$ (Abbildung 11.9), womit sie noch immer oberhalb der physiologischen Konzentration in Blutserum liegt (vergleiche Tabelle 11.1). Durch Signalüberlagerung mit Hydroxyprolin liegt die ermittelte Konzentration jedoch vermutlich leicht über der tatsächlichen Konzentration. Wie in Kapitel 11.1.3 bereits diskutiert, sinkt die Glutaminkonzentration auch ohne Zugabe von Zellen durch spontane Zyklisierung zu Pyroglutamat. Da durch Inkubation von PBMCs die Konzentration von Glutamin weniger stark abnimmt als in den Medien ohne Zellen, kann wiederum geschlussfolgert werden, dass diese Glutamin produzieren und ins Medium ausschleusen. Die berechnete Nettobilanz für Glutamin in Abbildung 11.8 verdeutlicht, dass innerhalb von fünf Tagen eine Menge von etwa 160 $\mu\text{mol/l}$ gebildet wird und innerhalb des letzten Inkubationstages wiederum 60 $\mu\text{mol/l}$ verbraucht werden. Da ein gewisser Anteil des entstehenden Glutamins direkt zu Pyroglutamat zyklisiert, kann die exakte Menge des gebildeten Glutamins jedoch nicht bestimmt werden.

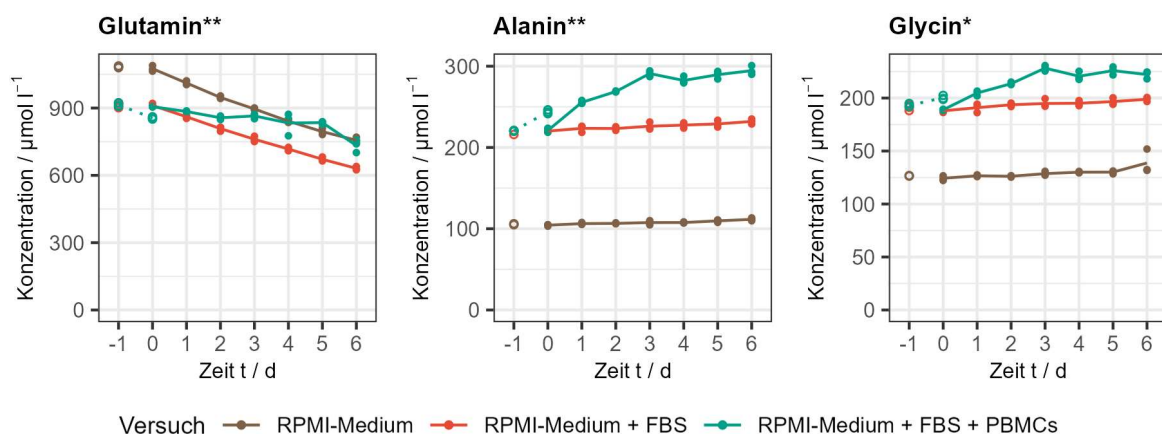


Abbildung 11.9: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Glutamin, Alanin und Glycin in RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie bei Kultivierung von PBMCs. Die Punkte stellen die technischen Replikate dar, die Linien verbinden die Mittelwerte. Die leeren Kreise und die gestrichelte Linie stellen die Werte in der Ruhephase ($t = -1$ d bis $t = 0$ d) vor dem Wechsel des Mediums dar. Für die Medien ohne Zellen liegt kein Messwert für das Ende der Ruhephase vor. Bei diesen Versuchen wurde kein Verdunstungsschutz eingesetzt. *Die ermittelte Konzentration von Glycin liegt bei den Versuchen mit FBS aufgrund von Proteinuntergrund über der tatsächlichen Konzentration. **Die ermittelte Konzentration von Alanin liegt durch Überlagerung mit Isoleucin und Lysin etwa 100 $\mu\text{mol/l}$ über der tatsächlichen Konzentration. Die ermittelte Konzentration von Glutamin liegt durch Überlagerung mit Hydroxyprolin leicht über der tatsächlichen Konzentration.

Bei den Aminosäuren Alanin und Glycin ist innerhalb der ersten drei Inkubationstage eine Zunahme der Konzentration zu beobachten, danach bleibt die Menge im Medium konstant (Abbildung 11.9). Die Alaninkonzentration steigt um etwa $70 \mu\text{mol/l}$ auf knapp $200 \mu\text{mol/l}$ (die in Abbildung 11.9 dargestellten Werte liegen aufgrund von Signalüberlagerung mit Isoleucin und Lysin etwa $100 \mu\text{mol/l}$ über der tatsächlichen Konzentration), womit die Konzentration immer noch leicht unter den physiologischen Werten in Blutserum liegt (vergleiche Tabelle 11.1). Die Glycinkonzentration nimmt im selben Zeitraum um $40 \mu\text{mol/l}$ auf $230 \mu\text{mol/l}$ zu, womit sie immer noch innerhalb der physiologischen Konzentrationen liegt (vergleiche Tabelle 11.1). Aufgrund der Überlagerung der Glycinresonanz mit Proteinuntergrund im ^1H -NMR-Spektrum (vergleiche Abbildung 11.1), ist die tatsächliche Konzentration vermutlich geringer, wobei die genaue Differenz nicht abgeschätzt werden kann.

Die im Medium enthaltenen essenziellen Aminosäuren Histidin, Lysin, Methionin, Phenylalanin und Valin sowie die nicht-essenzielle Aminosäure Asparagin und die semi-essenziellen Aminosäuren Prolin und Tyrosin zeigen bei Kultivierung von PBMCs einen untereinander vergleichbaren Konzentrationsverlauf. In Abbildung 11.10 ist Valin repräsentativ für diese Aminosäuren dargestellt. Der zeitliche Konzentrationsverlauf der weiteren Aminosäuren ist im Anhang in Abbildung A.3 dargestellt.

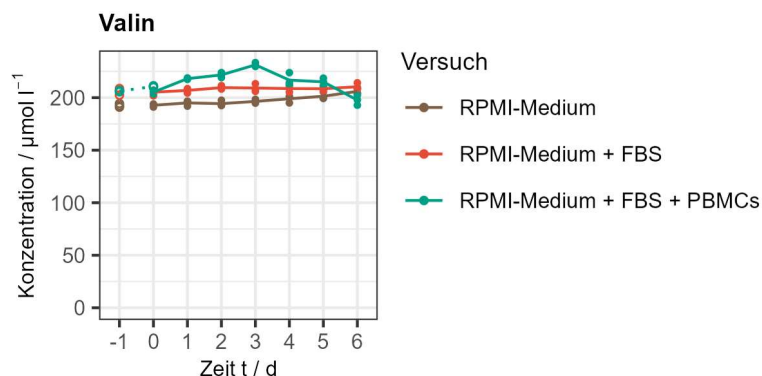


Abbildung 11.10: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Valin in RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie bei Kultivierung von PBMCs. Valin ist repräsentativ für diverse andere Aminosäuren dargestellt. Die Punkte stellen die technischen Replikate dar, die Linien verbinden die Mittelwerte. Die leeren Kreise und die gestrichelte Linie stellen die Werte in der Ruhephase ($t = -1 \text{ d}$ bis $t = 0 \text{ d}$) vor dem Wechsel des Mediums dar. Für die Medien ohne Zellen liegt kein Messwert für das Ende der Ruhephase vor. Bei diesen Versuchen wurde kein Verdunstungsschutz eingesetzt.

Innerhalb der ersten drei Tage steigt die Konzentration der genannten Aminosäuren etwas an, je nach Substanz um 8 % (im Falle von Prolin) bis zu 16 % (im Falle von Lysin) der Ausgangskonzentration. Diese Zunahme ist zu stark ausgeprägt, als dass sie sich allein durch Verdunstungseffekte erklären lassen könnte (vergleiche Kapitel 11.1.3). Zwischen dem dritten und dem sechsten Tag sinkt die Konzentration wieder um 5 % (im Falle von Histidin) bis zu 19 % (im Falle von Prolin) im Vergleich zur Konzentration nach drei Tagen. Somit sind die Endkonzentrationen nach sechs Tagen in etwa vergleichbar mit den Konzentrationen zu Beginn der Inkubation.

Eine weitere Auffälligkeit stellt der gemessene Integralwert des TSP-Signals, dem als Referenz für die chemische Verschiebung sowie die Quantifizierung zugegebenen Standard, dar (Abbildung 11.11). In den Medien, in welchen zuvor keine Zellen inkubiert wurden, ist der Integralwert zu allen Zeitpunkten annähernd gleich. Dagegen ist in den Zellkulturüberständen die TSP-Konzentration scheinbar umso höher, je länger die Zellen zuvor kultiviert wurden. Zwischen den Proben, welche zu Beginn der Inkubation und nach drei Tagen erhalten wurden, ist eine Zunahme um etwa 6 % zu beobachten. Bei länger kultivierten Zellen nimmt der Integralwert des TSP-Signals nicht weiter zu. Da das TSP erst kurz vor der NMR-spektroskopischen Analyse in definierter Menge hinzugegeben wurde, kann es sich hierbei nicht um eine tatsächliche Konzentrationszunahme handeln. Eine mögliche Ursache für die Beobachtungen wird in Kapitel 11.1.6 diskutiert.

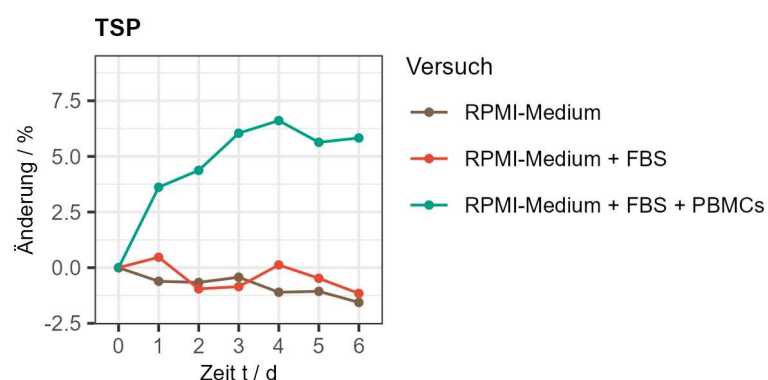


Abbildung 11.11: Prozentuale Änderung des TSP-Integrals abhängig von der Inkubationszeit der Medien. Die Punkte stellen die Mittelwerte der technischen Replikate dar. $t = 0$ d bezeichnet den Zeitpunkt nach dem Wechsel des Mediums. Bei diesen Versuchen wurde kein Verdunstungsschutz eingesetzt.

11.1.5 Diskussion möglicher Folgen unphysiologischer Konzentrationen

In Kapitel 11.1.2 und 11.1.3 wurde die Konzentration der Komponenten im hier verwendeten Zellkulturmedium (RPMI-Medium mit 10 % FBS) mit der physiologischen Konzentration im Blutserum verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass viele Substanzen im Medium eine andere Konzentration aufweisen als im Blut. Im Folgenden soll diskutiert werden, inwiefern dies einen Einfluss auf den zellulären Stoffwechsel haben könnte. In Abbildung 11.12 ist eine schematische Übersicht über einige zelluläre Stoffwechselwege dargestellt, wobei der Fokus auf der Glykolyse, dem Citratzyklus sowie dem Aminosäurestoffwechsel liegt.

Eine Vielzahl an Substanzen ist im Medium in höherer Konzentration vorhanden als im Blutserum. Am deutlichsten ist der Unterschied bei Glutamin, Arginin, Asparagin und Aspartat, welche im Medium in bis zu 10-fach höherer Konzentration vorliegen als in Blutserum (vergleiche Tabelle 11.1). Darüber hinaus finden verschiedene Umwandlungsreaktionen im Medium statt, wodurch wiederum neue Substanzen wie Pyroglutamat und Ornithin gebildet werden (vergleiche Tabelle 11.2). Dadurch liegt Ornithin gegen Ende der Inkubation im Medium mit FBS ebenfalls in fast 10-fach höherer Konzentration vor als in Blutserum. Wie bereits in Kapitel 11.1.1 aufgeführt, wurden Zellkulturmedien ursprünglich dazu entwickelt, *in vitro* eine möglichst effiziente Zellteilung zu erreichen.^[367] So dient Glutamin dabei beispielsweise als Energiequelle und liefert Vorstufen für die Ribonucleotidsynthese.^[366] Auch das bei der Spaltung von Arginin entstehende Ornithin wird in Kulturen mit proliferativen Zellen für die Bildung von Polyaminen benötigt, welche eine wichtige Rolle bei der Zellteilung spielen.^[376, 377] Bei den hier durchgeführten Versuchen ist Aspartat die einzige der aufgeführten Substanzen, die in großem Umfang von den Zellen verbraucht und gegen Ende der Kultur sogar aufgebraucht wird (vergleiche Kapitel 11.1.4). Hierbei wäre denkbar, dass die hohe Konzentration an Aspartat Stoffwechselwege induziert, die unter physiologischen Bedingungen nicht ablaufen würden. Die restlichen dieser Substanzen dagegen werden von den hier untersuchten, vorwiegend nicht-proliferierenden Zellen gar nicht oder kaum verbraucht. Ob das Vorliegen dieser hohen Konzentrationen im Vergleich zu physiologischen Bedingungen dennoch einen Einfluss hat, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abgeschätzt werden.

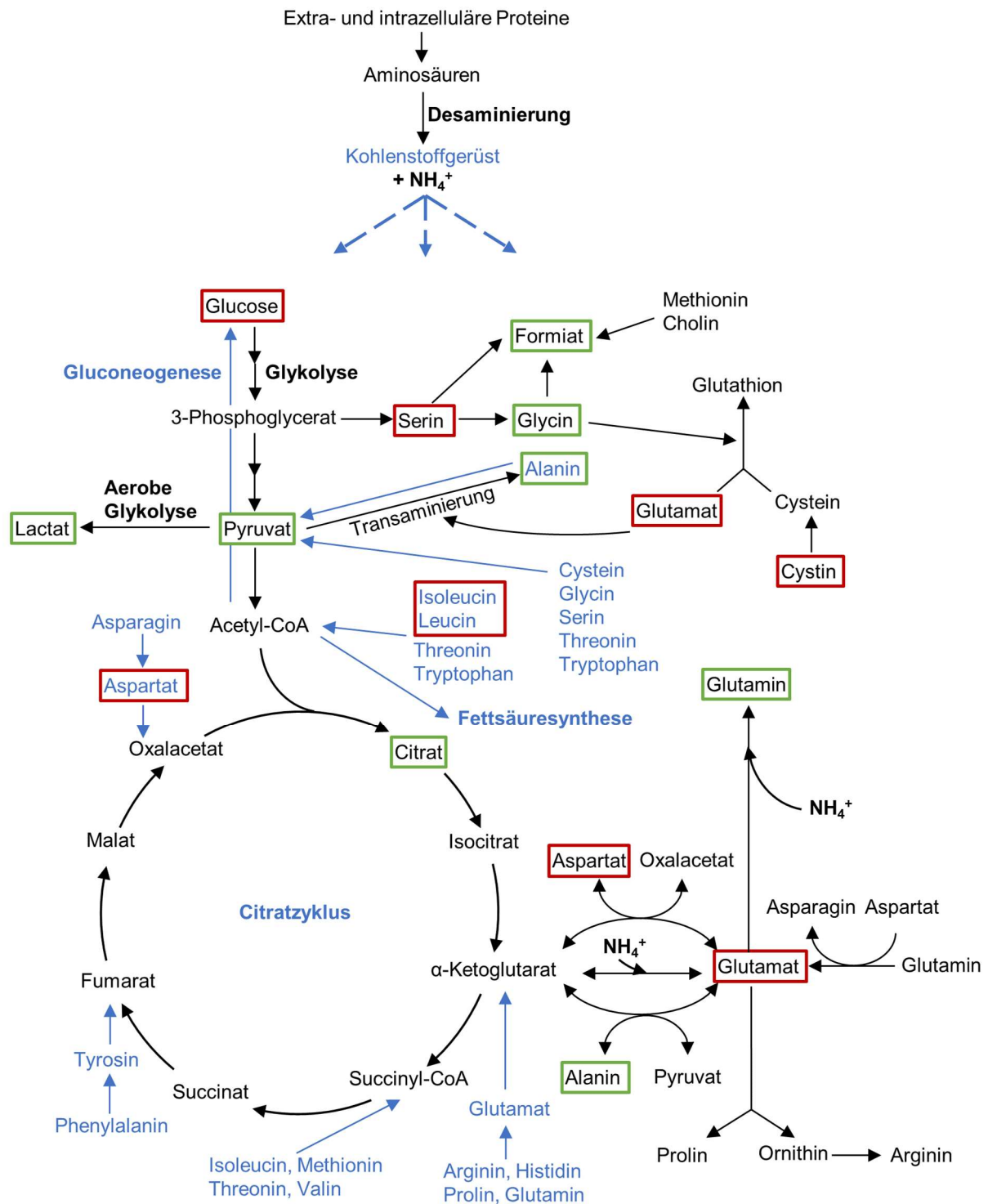


Abbildung 11.12: Schematische Darstellung zellulärer Stoffwechselwege mit Fokus auf der Glykolyse, dem Citratzyklus sowie dem Aminosäurestoffwechsel. Durch die Desaminierung von Aminosäuren entstehen ein Kohlenstoffgerüst und Ammonium (NH_4^+). Das Kohlenstoffgerüst der unterschiedlichen Aminosäuren (blau) kann in Intermediate verschiedener Stoffwechselwege eingehen. Metaboliten, deren Konzentration im vorliegenden Versuch im Medium im Verlauf der Inkubation abnimmt sind rot markiert, Metaboliten deren Konzentration zunimmt grün. Dargestellt in Anlehnung an Chandel^[378], Haddad und Harb^[379] sowie Pietzke *et al.*^[380]

Die Substanzen, die im Medium in niedrigerer Konzentration vorliegen als in Blutserum, umfassen Glycin, Alanin, Citrat und Formiat. Pyruvat ist im Medium im Gegensatz zum Blut gar nicht vorhanden (vergleiche Tabelle 11.1). Wie in Kapitel 11.1.4 gezeigt, nimmt die Konzentration dieser Komponenten bei Kultivierung von PBMCs mit der Zeit zu. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Sekretion dazu dient, physiologische Umgebungsbedingungen zu schaffen. Im Folgenden soll diskutiert werden, über welche Stoffwechselwege diese Metaboliten intrazellulär produziert werden können und zu welchem Zweck sie extrazellulär dienen könnten.

Besonders auffällig ist der Verlauf von Pyruvat bei Inkubation von PBMCs (vergleiche Abbildung 11.6). Pyruvat ist ein wichtiges Intermediat verschiedener Stoffwechselwege, das in der Glykolyse gebildet wird und entweder in den Citratzyklus eingehen oder zu Lactat reduziert werden kann. Die Tatsache, dass sowohl in der Ruhephase als auch innerhalb des ersten Tages nach dem Wechsel des Mediums die Pyruvatkonzentration bis zu einer Konzentration, die der im Blut entspricht, ansteigt und danach nicht weiter zunimmt, deutet darauf hin, dass das ausgeschleuste Pyruvat dazu dienen könnte, die Umgebungsbedingungen für die Zellen anzupassen. Pyruvat kann Zellen insbesondere vor zytotoxischem Wasserstoffperoxid schützen, da es mit Wasserstoffperoxid zu Acetat, Kohlenstoffdioxid und Wasser reagiert.^[381] In Blut konnte Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden, wobei die wichtigste Quelle hierfür NADPH-Oxidasen in der Plasmamembran verschiedener Zellen wie Phagozyten sind.^[381, 382] In Zellkulturen können daneben verschiedene chemische Reaktionen im Medium zur Entstehung von Wasserstoffperoxid führen. Darüber hinaus werden Zellkulturen typischerweise, wie auch in den vorliegenden Versuchen, bei einem nahezu atmosphärischen Sauerstoffgehalt (95 % Umgebungsluft und 5 % Kohlenstoffdioxid) inkubiert. Dieser Wert liegt über dem physiologischen Sauerstoffgehalt in Blut und Geweben, wodurch der oxidative Stress nochmals verstärkt wird. Zudem besitzen Zellkulturmedien häufig nur einen geringen Anteil an Antioxidantien.^[383, 384] Auch berichteten O'Donnell-Tormey *et al.* bereits 1987, dass Säugetierzellen Pyruvat zum Schutz vor Wasserstoffperoxid sekretieren.^[385] Die Autoren beobachteten, dass verschiedene Zellen von Mäusen und Menschen in Zellkultur Pyruvat freisetzen, bis die extrazelluläre Konzentration in etwa der in Plasma und Serum (je nach Quelle 90–120 $\mu\text{mol/l}$ ^[385] beziehungsweise 22–258 $\mu\text{mol/l}$ ^[369]) entspricht. Dabei nimmt die Konzentration insbesondere innerhalb der ersten sechs bis zwölf Stunden der Kultur zu und erreicht dann ein Plateau. Bei Inkubation in Medium mit 150 $\mu\text{mol/l}$

supplementiertem Pyruvat konnte von den Autoren keine zusätzliche Freisetzung von Pyruvat beobachtet werden.^[385] Sowohl die beschriebene Pyruvatkonzentration als auch der Zeitraum der Freisetzung sind in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit. Folglich kann angenommen werden, dass die hier kultivierten PBMCs Pyruvat ebenfalls als Schutzmechanismus sekretieren. Da zu Beginn der Inkubation kein Pyruvat im Medium vorliegt, könnte dies aufgrund der fehlenden antioxidativen Wirkung möglicherweise Stress für die Zellen bedeuten.

Bei Citrat und Formiat verläuft die Zunahme über den gesamten Inkubationszeitraum linear (vergleiche Abbildung 11.6), wodurch Konzentrationen erreicht werden, die mit denen im Blut vergleichbar sind. Da kein Plateau erreicht wird, kann vermutet werden, dass die Zellen jedoch noch höhere extrazelluläre Konzentrationen benötigen. Citrat stellt im Energiestoffwechsel aller Säugetierzellen ein wichtiges Intermediat dar. Es entsteht in den Mitochondrien aus Acetyl-CoA und geht dann in den Citratzyklus ein, wodurch bei der anschließenden oxidativen Phosphorylierung ATP gebildet wird. Darüber hinaus kann es aus den Mitochondrien ins Zytosol ausgeschleust werden, wo es außerdem einen regulatorischen Effekt auf die Glykolyse, die Gluconeogenese sowie die Fettsäuresynthese hat. Im Zytosol wird Citrat dann normalerweise zu Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten.^[341] Allerdings ist nur für einige spezialisierte Zellen beschrieben, dass sie Citrat auch sekretieren können. Dazu gehören Osteoblasten, die Citrat für den Einbau in die Knochenstruktur bereitstellen. Etwa 90 % des gesamten Citrats im Körper befinden sich in den Knochen, die damit ein wichtiges Citratreservoir darstellen. Dieses Reservoir stellt auch die Hauptquelle für Citrat im Blut dar.^[386] Auch für Prostatazellen ist eine Sekretion von Citrat als Endprodukt des Metabolismus, die mit einer extrazellulären Akkumulation einhergeht, beschrieben.^[341] Dabei dient das sekretierte Citrat als Energiequelle für die Spermien.^[387] Da das Citrat hierdurch intrazellulär nicht mehr für die Spaltung in Acetyl-CoA und Oxalacetat zur Verfügung steht, wird Oxalacetat von diesen Zellen durch Transaminierung aus Aspartat gebildet, das aus dem Blut in die Zellen transportiert wird.^[341] Auch wenn die Fähigkeit Citrat zu sekretieren für Immunzellen nach meinem Wissen bisher nicht bekannt ist, wäre eine Sekretion analog zu Prostatazellen denkbar, wobei das sekretierte Citrat ebenfalls als Energiequelle für andere Zellen dienen oder auf eine andere Weise geeignete Umgebungsbedingungen schaffen könnte. Ein solcher Mechanismus könnte somit auch die zeitgleiche Reduktion der Aspartatkonzentration (vergleiche Abbildung 11.7) erklären. Auch Formiat stellt im zellulären Stoffwechsel von

Säugetieren ein wichtiges Zwischenprodukt dar.^[380] Es kann aus Serin, Glycin, Methionin, Cholin oder Methanol gebildet werden und ist wiederum eine Vorstufe für die Synthese von Nucleotiden und Methylgruppen. Dies ist besonders relevant bei sich schnell teilenden Zellen wie Tumorzellen. Für diese Zellen wurde darüber hinaus eine übermäßige Produktion und Sekretion von Formiat beobachtet, wobei nicht endgültig geklärt ist, welchen Nutzen die Zellen davon haben.^[380] Welche Rolle die Produktion und Sekretion von Formiat in den hier untersuchten, vorwiegend nicht-proliferierenden Zellen haben könnte, ist ebenfalls nicht klar. Da die verschiedenen Substrate für Formiat nicht im selben Umfang aufgebraucht werden, wie Formiat produziert wird, kann ebenfalls keine Aussage darüber getroffen werden, über welchen Stoffwechselweg Formiat im vorliegenden Versuch intrazellulär gebildet wird.

Im Falle von Glycin und Alanin nimmt die Konzentration im Medium nur innerhalb der ersten drei Tage zu und bleibt dann konstant (vergleiche Abbildung 11.9). Dies könnte bedeuten, dass zu diesem Zeitpunkt die ideale Konzentration bereits erreicht ist. T-Zellen sind beispielsweise für ihre Aktivierung auf extrazelluläres Alanin angewiesen, wobei die hierfür benötigte Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ im vorliegenden Versuch mit einer Konzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ sogar überschritten wird.^[388] Alanin kann durch Transaminierung, ein Prozess der der Umwandlung von Aminosäuren dient, aus Pyruvat und Glutamat gebildet werden. Diese reversible Reaktion wird durch das Enzym Alanin-Aminotransferase katalysiert.^[378] Die Transaminierung von Pyruvat zu Alanin wird meist im Rahmen des Glucose-Alanin-Zyklus beschrieben, welcher den Kreislauf von Glucose und dessen Abbauprodukten zwischen Skelettmuskel (Glucoseverbrauch) und Leber (Verwertung der Abbauprodukte) darstellt, wobei die Transaminierung im Muskel stattfindet.^[389] Aber auch im Blut ist die Alanin-Aminotransferase vorhanden, sodass ein Vorkommen in Blutzellen ebenfalls denkbar wäre.^[390] Glycin entsteht über Serin aus 3-Phosphoglycerat, welches wiederum aus der Glykolyse stammt.^[378]

11.1.6 Diskussion des Zusammenhangs zwischen Zelldifferenzierung und Metabolismus

Abschließend sollen nun mögliche Zusammenhänge zwischen dem zellulären Metabolismus und einer potenziellen Reifung oder Differenzierung der PBMCs hergestellt werden.

Die Glykolyse gilt als der zentrale Stoffwechselweg in Immunzellen, welcher sich zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zellen charakteristisch unterscheidet. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion wird die Glykolyse hochreguliert und der Citratzyklus unterbrochen. Trotz der Anwesenheit von Sauerstoff wird das in der Glykolyse entstehende Pyruvat vermehrt zu Lactat reduziert, was als aerobe Glykolyse bezeichnet wird. Diese Umstellung des Stoffwechsels hat einen hohen Verbrauch an Glucose sowie eine vermehrte Sekretion an Lactat zur Folge, wobei bei einer vollständigen Umstellung des Stoffwechsels vom Citratzyklus auf die aerobe Glykolyse aus einem Molekül Glucose zwei Moleküle Lactat gebildet werden.^[323] Bei dem vorliegenden Versuch entspricht die Stoffmenge an sekretiertem Lactat zu jedem Zeitpunkt etwa der 1.8- bis 1.9-fachen Stoffmenge an aufgenommener Glucose (vergleiche Abbildung 11.5), was impliziert, dass ein Großteil der Glucose über die aerobe Glykolyse zu Lactat umgesetzt wird. Hierfür sind zwei verschiedene Ursachen denkbar: Entweder kann sich, obwohl die Zellen nicht spezifisch stimuliert wurden, ein pro-inflammatorischer Phänotyp entwickelt haben, oder aber die aerobe Glykolyse läuft bereits bei ruhenden Immunzellen in einem hohen Umfang ab. Ein absoluter Vergleich der beobachteten Werte mit Literaturwerten ist nicht einfach möglich, da in den meisten Studien im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit die Rate der Glykolyse und der mitochondrialen Atmung anhand der Aufnahmerate an Sauerstoff sowie der extrazellulären Ansäuerungsrate oder der Expression verschiedener Enzyme beurteilt wurde.^[328, 329, 337, 351] Allerdings können einige ältere Untersuchungen zum Stoffwechsel ruhender Immunzellen als Vergleich herangezogen werden. So kam Cline bereits 1965 bei der Begutachtung verschiedener Studien zu der Schlussfolgerung, dass bei Leukozyten verschiedener Spezies *in vitro* die aerobe Glykolyse den primären Stoffwechselweg zum Abbau von Glucose darstellt.^[391] Newsholme *et al.* konnten im Jahr 1987 ebenfalls zeigen, dass in ruhenden Makrophagen der Maus der Großteil der aufgenommenen Glucose direkt zu Lactat umgewandelt wird.^[334] Weiterhin konnten Rodríguez-Prados *et al.*, die in einer aktuelleren Studie aus dem Jahr 2010 unterschiedliche Aktivierungswege von Makrophagen der Maus untersuchten, zeigen, dass bereits ohne Stimulation sowie unabhängig vom Aktivierungsweg mehr als 95 % der aufgenommenen

Glucose zu Lactat umgewandelt werden.^[327] Diese Beobachtungen decken sich mit den vorliegenden Ergebnissen, wodurch die hier beobachtete hohe Rate der aeroben Glykolyse auch für unstimulierte Zellen plausibel erscheint. Es ist allerdings auch denkbar, dass diese hohe glykolytische Rate nicht physiologisch ist, sondern *in vitro* als Folge der Isolation der Zellen, von Anti-Koagulantien sowie des Mediums entsteht.^[391] Um diese Effekte zu minimieren, wurde im vorliegenden Versuch nach Isolation der PBMCs eine Ruhephase von 24 Stunden eingehalten, was aber aufgrund der zuvor diskutierten Beobachtungen möglicherweise zu kurz sein könnte.

Interessant ist auch, dass sowohl der Verbrauch von Glucose als auch die Sekretion von Lactat nicht linear verläuft, sondern mit der Zeit zunimmt. Ein solcher Verlauf könnte grundsätzlich durch eine Zunahme der Zellzahl erklärt werden, allerdings handelt es sich bei PBMCs, außer im Falle von aktivierten Lymphozyten, um nicht-proliferierende Zellen.^[276] Weiterhin ist eine Zunahme der Gesamtmenge an verbrauchter Glucose und produziertem Lactat charakteristisch für Makrophagen nach einer pro-inflammatorischen Stimulation.^[327, 328, 331, 336, 338] Obwohl die Zellen im vorliegenden Versuch nicht spezifisch stimuliert wurden, sprechen diese Beobachtungen dafür, dass die Zellen im Verlauf der Inkubation zu einem Reifungsprozess angeregt wurden.

Um realistischer einschätzen zu können, ab wann die im Medium vorliegende Menge an Glucose zu gering beziehungsweise die Lactatkonzentration zu hoch und somit die Zellen zusätzlich beeinflusst sein könnten, sollen Vergleichswerte aus dem Blutplasma herangezogen werden. Eine Glucosekonzentration im Plasma von weniger als 0.7 g/l (etwa 3.9 mmol/l) ist definiert als Unterzucker, auch als Hypoglykämie bezeichnet.^[392] Bei den vorliegenden Versuchsbedingungen fällt die Konzentration nach fünf Tagen auf 3.80 mmol/l, was *in vivo* etwa der Grenze zur Hypoglykämie entspricht. Nach sechs Tagen ist zwar immer noch Glucose im Medium vorhanden, mit einer Konzentration von etwa 1.8 mmol/l ist die Grenze zur Hypoglykämie allerdings weit unterschritten. Da Glucose die primäre Energiequelle der Zellen darstellt, führen zu niedrige Konzentrationen möglicherweise zum „Hungern“ der Zellen, was wiederum zu einer Umstellung des Stoffwechsels oder dem Absterben der Zellen führen könnte. In Übereinstimmung damit legt eine Untersuchung von Piarulli *et al.* nahe, dass eine Kultivierung mit niedrigen Glucosekonzentrationen von 2.5 mmol/l bei humanen Monozyten eine Entzündungsreaktion auslösen kann.^[393] Dies spricht dafür, dass bei den hier diskutierten

Versuchen nach sechs Inkubationstagen die Bedingungen nicht mehr geeignet sind, um den physiologischen Stoffwechsel der Zellen aufrecht zu erhalten.

Als alternative Energiequellen zu Glucose können von den Zellen im Allgemeinen Glutamin oder Pyruvat genutzt werden.^[366] Dies könnte den Glutaminverbrauch zwischen dem fünften und sechsten Tag der Inkubation erklären (vergleiche Abbildung 11.8). Für Pyruvat dagegen konnte keine vergleichbare Beobachtung gemacht werden.

Eine erhöhte Lactatkonzentration, entweder lokal oder systemisch, ist charakteristisch für viele Krankheiten und kann entweder durch eine verstärkte Produktion oder eine eingeschränkte Ausscheidung verursacht werden.^[394] Im Blut liegt die Lactatkonzentration normalerweise unter 2 mmol/l, bei einem Wert zwischen 2 und 4 mmol/l spricht man von einer Hyperlaktatämie und über einem Wert von 4 mmol/l von einer schwerwiegenden Laktatazidose.^[395] Auch als physiologische Reaktion auf Anstrengung können bei maximaler Trainingsbelastung im Blut Lactatkonzentrationen von 8–10 mmol/l und kurzzeitig sogar 15–25 mmol/l erreicht werden. Diese hohen Konzentrationen bleiben jedoch nur kurzfristig bestehen.^[396] In dem hier durchgeführten Versuch entspricht mit etwa 1.6 mmol/l die zu Beginn der Inkubation vorliegende Menge an Lactat noch physiologischen Werten. Aber schon nach einem Tag ist der Wert einer Hyperlaktatämie und nach drei bis vier Tagen der Wert einer schwerwiegenden Laktatazidose erreicht. Nach sechs Tagen wird sogar eine Konzentration von über 10 mmol/l erreicht. Je nach Pufferkapazität des Mediums kann das sekretierte Lactat auch zu einem Sinken des pH-Wertes im Medium führen, was wiederum nicht den physiologischen Bedingungen entspricht (eine Messung des pH-Wertes im Medium wurde für diese Versuche nicht durchgeführt). Beide Faktoren können eine Polarisierung der Zellen zur Folge haben, wie im Folgenden erläutert wird. Eine Akkumulation von extrazellulärem Lactat ist vor allem für Tumorzellen beschrieben, die im Rahmen des Warburg-Effekts die für schnelles Wachstum und Zellteilung benötigte Energie über die aerobe Glykolyse generieren.^[394, 397] In der unmittelbaren Tumorumgebung kann eine Lactatkonzentration von bis zu 40 mmol/l und ein pH-Wert von 6 bis 6.5 erreicht werden.^[394] Aus diesem Grund sollen an dieser Stelle Studien an humanen sowie murinen Immunzellen in der Tumorumgebung als Vergleich herangezogen werden. Immunzellen sind einerseits dafür zuständig, Tumorzellen zu erkennen und zu entfernen, können andererseits aber auch anti-inflammatorische Zytokine sekretieren und somit die gegen den Tumor gerichtete

Immunantwort unterdrücken.^[397] Es ist bekannt, dass die hohe Lactatkonzentration in der Tumorumgebung eine Polarisierung von Makrophagen zu einem M2-Typ fördert, welcher eine anti-inflammatorische Wirkung hat und das Tumorstadium fördert.^[394, 397–399] In verschiedenen Studien konnte bei Lactatkonzentrationen zwischen 2 und 50 mmol/l eine konzentrationsabhängige Zunahme des M2-Phänotyps beobachtet werden.^[400, 401] Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Lactatkonzentrationen von 40 mmol/l sogar den Zelltod der Makrophagen zur Folge haben können.^[402] Auf Zellen des adaptiven Immunsystems wie T-Zellen, kann eine erhöhte Lactatkonzentration außerdem einen inhibierenden Effekt haben.^[403] Dabei scheinen die beobachteten Effekte auf einem Zusammenspiel zwischen der erhöhten Lactatkonzentration und dem erniedrigten pH-Wert zu beruhen.^[394, 402, 403] Auch spielt die erneute Aufnahme des extrazellulären Lactats durch die Zellen über Monocarboxylattransporter wie MCT4 eine wichtige Rolle bei der Polarisierung der Makrophagen.^[394, 399, 404] Bei diesen Transportern handelt es sich um protonengekoppelte Symporter, weshalb die Aufnahme von Lactat durch den niedrigen extrazellulären pH-Wert gefördert wird.^[399, 405] Im Rahmen des hier durchgeführten Versuchs konnte zwar eine bis auf 10 mmol/l ansteigende Lactatkonzentration beobachtet werden, allerdings spricht die annähernd exponentielle Zunahme nicht für eine erneute Aufnahme des Lactats durch die Zellen. Somit ist eine zu den zuvor beschriebenen Untersuchungen analoge Ausbildung eines M2-Phänotyps unwahrscheinlich.

Darüber hinaus soll die Bedeutung einiger, in Kapitel 11.1.4 aufgeführter Aminosäuren für den zellulären Metabolismus diskutiert werden. Die Aufnahme von extrazellulärem Glutamin gilt sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen für viele Zellen des Immunsystems, wie Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten als essenziell. Ein Großteil des aufgenommenen Glutamins wird typischerweise zu Glutamat, Aspartat und Lactat umgewandelt.^[327, 406, 407] In Abweichung dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit bis zum fünften Tag der Inkubation eine Zunahme der extrazellulären Konzentration an Glutamin beobachtet werden, während im Medium vorliegendes Glutamat und Aspartat verbraucht wurden (vergleiche Abbildung 11.7 und Abbildung 11.8). Da viele Zellen diese Substanzen intrazellulär aus Glutamin beziehungsweise Asparagin synthetisieren und daher keine Transporter dafür benötigen,^[408] ist diese Beobachtung zunächst überraschend.

Aufgrund seiner Rolle als Neurotransmitter ist eine Aufnahme von Glutamat vorwiegend für Neuronen und Gliazellen beschrieben.^[409] Rimaniol *et al.* konnten darüber hinaus jedoch zeigen, dass auch humane Monozyten und Makrophagen analog zu diesen Zellen Glutamattransporter besitzen. Diese umfassen den X_{AG}^- -Transporter, welcher neben Glutamat auch Aspartat transportiert sowie den Cystin-Glutamat-Antiporter X_C^- .^[410, 411] Aus Cystein, welches aus Cystin entsteht, und Glutamat wird intrazellulär wiederum Glutathion gebildet. Glutathion ist das wichtigste Antioxidans, das die Zellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion vor ROS schützt.^[379] Entsprechend zeigten in den von Rimaniol *et al.* durchgeführten Versuchen speziell aus Monozyten differenzierte Makrophagen sowie pro-inflammatorisch stimulierte Monozyten eine hohe Aufnahmerate an Glutamat.^[410, 411] Bei den vorliegenden Versuchen bleibt die Konzentration an Glutamat und Cystin während der ersten drei Inkubationstage annähernd konstant und sinkt erst danach deutlich (vergleiche Abbildung 11.7), was auf einen erhöhten intrazellulären Bedarf der Zellen an Glutathion hinweist. Auch im verwendeten Medium ist Glutathion vorhanden, dieses war aber aufgrund der geringen Konzentration von 3.25 $\mu\text{mol/l}$ NMR-spektroskopisch nicht nachweisbar. Ursache für den erhöhten Bedarf an Glutathion nach drei Tagen könnte, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Rimaniol *et al.*^[411], eine Reifung von Monozyten zu Makrophagen oder die Ausbildung eines pro-inflammatorischen Phänotyps sein. Neben Glutamat kann Aspartat ebenfalls über den X_{AG}^- -Transporter von den Zellen aufgenommen^[409] und intrazellulär zu Glutamat umgewandelt werden, wodurch es wiederum für die Synthese von Glutathion zur Verfügung steht.^[410, 411] Alternativ kann auch Glutamin für die Synthese von Glutathion in die Zelle aufgenommen und durch die Glutaminase in Glutamat umgewandelt werden kann.^[410] Dies könnte die Verringerung des Glutamins im Medium im letzten Inkubationszeitraum erklären, da zu diesem Zeitpunkt das Glutamat im Medium bereits aufgebraucht ist.

Für die Einordnung des Konzentrationsverlaufs weiterer Aminosäuren muss zuerst der interne Standard TSP betrachtet werden. Wie in Kapitel 11.1.4 erläutert, ist in den Zellkulturüberständen die TSP-Konzentration scheinbar umso höher, je länger die Zellen zuvor inkubiert wurden (vergleiche Abbildung 11.11). Ab einer Inkubationsdauer von drei Tagen wird schließlich ein konstanter Wert gemessen. Dies kann folgendermaßen erklärt werden: Für TSP ist bekannt, dass es mit Proteinen interagiert. Die T_2 -Relaxationszeit der gebundenen Form ist im Vergleich zum freien Zustand verringert, wodurch während des CPMG-Zyklus bei

TSP analog zu Proteinen ebenfalls ein gewisser Anteil der Magnetisierung verloren geht, was wiederum zu einer Verringerung des gemessenen Integralwertes führt.^[412] Außerdem hat die verringerte T_2 -Relaxationszeit eine deutliche Verbreiterung des TSP-Signals im NMR-Spektrum zur Folge (vergleiche Kapitel 2.1.3, Formel 2.9). Dadurch wird bei der Signal-Integration ein geringerer Anteil des Signals von den gewählten Grenzen des *buckets* eingeschlossen, wodurch die Konzentration des TSP nochmals niedriger erscheint als sie tatsächlich ist. Die scheinbare Zunahme der TSP-Konzentration spricht folglich dafür, dass der Anteil an freiem TSP zunimmt, was wiederum ein Hinweis darauf sein kann, dass der Proteingehalt im Medium abnimmt. Solche Proteine können beispielsweise humanes Albumin oder Rinderalbumin sein, welche den größten Anteil der Proteine in Serum darstellen.^[32, 412–415] Für die Abnahme der Proteinkonzentration kommen verschiedene Prozesse infrage. Durch Peptidasen, oder auch Proteasen genannt, werden allgemein Proteine gespalten und zu Aminosäuren abgebaut.^[416] Ein Abbau durch im FBS möglicherweise enthaltene Proteasen ist jedoch unwahrscheinlich, da die hier diskutierte Zunahme der Intensität des TSP-Signals im Medium ohne Zellen nicht beobachtet werden konnte. Für das im menschlichen Blut, der physiologischen Umgebung der Zellen, enthaltene Albumin ist darüber hinaus beschrieben, dass für den Abbau verantwortliche Proteasen entweder durch die Lyse toter Zellen ins Medium gelangen oder von bestimmten Zellen sekretiert werden können. Allerdings scheint die Proteolyse bei physiologischen pH-Werten nicht stattzufinden, sondern erst bei pH-Werten von 6 oder niedriger, was dem physiologischen pH-Wert von Proteasen in den Lysosomen entspricht.^[417] Außerdem enthält FBS natürlicherweise einige Proteaseinhibitoren,^[366] welche je nach Spezifität auch die Proteolyse von Albumin inhibieren könnten. Aufgrund dieser Argumente ist ein extrazellulärer Abbau der Proteine unwahrscheinlich. Weiterhin kann Humanalbumin, und somit möglicherweise auch Rinderalbumin, über Pinozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose von Zellen aufgenommen und im sauren Milieu der Lysosomen enzymatisch abgebaut werden.^[417] Insbesondere für Phagozyten, aber auch für andere Immunzellen wie T-Zellen, ist beschrieben, dass sie konstitutiv Makropinozytose betreiben, was der unspezifischen Aufnahme und Erkennung von Pathogenen dient. Dadurch nehmen sie auch anderes extrazelluläres Material wie Proteine auf, welche anschließend in Lysosomen zu Peptiden unterschiedlicher Länge sowie freien Aminosäuren abgebaut werden können.^[418–420] Folglich könnte die hier angenommene Abnahme der Proteinkonzentration im Medium innerhalb der ersten drei Tage durch eine konstitutive Makropinozytose der PBMCs,

insbesondere der Fraktion der Phagozyten, erklärt werden. Nach drei Tagen scheint, zumindest der Intensität des TSP-Signals zufolge, dieser Prozess zum Erliegen zu kommen. Dies könnte mit einer Reifung oder Differenzierung der Zellen in Zusammenhang stehen. So scheinen Makropinozytose und Zellmigration (die aktive Ortsveränderung von Zellen) grundsätzlich miteinander konkurrierende Prozesse zu sein.^[421, 422] Da *in vivo* mit der Migration von Monozyten aus dem Blut in das Gewebe typischerweise eine Differenzierung zu Makrophagen einhergeht, könnte die verringerte Makropinozytose ebenfalls auf eine vergleichbare Differenzierung hinweisen. Außerdem berichteten Redka *et al.*, dass anti-inflammatorische Makrophagen konstitutiv und in hohem Maß Makropinozytose betreiben, während pro-inflammatorische Makrophagen praktisch inaktiv sind. Ursächlich hierfür könnte sein, dass die Funktion der Zellen nach pro-inflammatorischer Aktivierung von der Detektion zur Präsentation von Antigenen wechselt, womit eine weitere Aufnahme der Antigene überflüssig wäre.^[423] Ob der Prozess der Makropinozytose tatsächlich abläuft, könnte über spezifische Assays und das Mikroskopieren der Zellen untersucht werden.^[423]

Der Prozess der Makropinozytose sowie der anschließende Abbau aufgenommener Proteine in den Lysosomen könnte somit eine Erklärung für die in Kapitel 11.1.4 beobachtete Konzentrationsänderung verschiedener Aminosäuren im Medium darstellen. Da über den Aminosäurestoffwechsel in ruhenden Immunzellen weiterhin nicht viel bekannt ist, soll im Folgenden der allgemeine Aminosäurestoffwechsel in Säugetierzellen als Vergleich herangezogen werden (vergleiche Abbildung 11.12).^[378] Der Abbau von Proteinen in den Lysosomen führt zu einer Zunahme der intrazellulären Konzentration zahlreicher Aminosäuren. Da freie Aminosäuren intrazellulär nicht gespeichert werden können, werden sie entweder wieder für die Proteinsynthese verwendet oder es kommt über die Desaminierung (das Entfernen einer Aminogruppe) zu einem Abbau der Aminosäuren, wobei ein Kohlenstoffgerüst und Ammonium (NH_4^+) entstehen.^[378] Die entstandenen Kohlenstoffgerüste können anschließend in verschiedene Stoffwechselwege, insbesondere den Citratzyklus, eingehen. Ammonium, welches in hoher Konzentration toxisch für die Zellen ist, kann entfernt werden, indem es wiederum zur Synthese stickstoffhaltiger Substanzen wie Nukleotide oder anderer Aminosäuren verwendet wird. Ein Beispiel hierfür ist die Bildung von Glutamin aus Glutamat unter Verbrauch von Ammonium. Anschließend wird das Glutamin von den Zellen in den Blutstrom freigesetzt, um wiederum von der Leber aufgenommen und dort zu Glutamat und Ammonium umgebaut zu werden.^[378] Folglich könnte dieser Prozess eine

weitere mögliche Ursache für den in dieser Arbeit beobachteten Verbrauch an Glutamat sowie die Zunahme der Glutaminkonzentration darstellen. Dass die Glutaminkonzentration nach fünf Tagen nicht weiter zunimmt, könnte sich in diesem Zusammenhang dadurch erklären lassen, dass zu diesem Zeitpunkt das Glutamat im Medium aufgebraucht ist und daher vermutlich auch intrazellulär nur noch in geringer Konzentration vorliegt und nicht mehr als Substrat für Glutamin dienen kann. Darüber hinaus kann Ammonium auch über den Harnstoffzyklus entfernt werden, für welchen Aspartat wiederum als Substrat dient und Harnstoff und Fumarat als Produkte entstehen. Dieser läuft allerdings typischerweise nur in der Leber ab.^[378]

Des Weiteren konnte für die essenziellen Aminosäuren Histidin, Lysin, Methionin, Phenylalanin und Valin sowie die nicht-essenziellen Aminosäure Asparagin und die semi-essenziellen Aminosäuren Prolin und Tyrosin innerhalb der ersten drei Tage eine Zunahme der Konzentration beobachtet werden (vergleiche Abbildung 11.10). Insbesondere die essenziellen Aminosäuren können nicht von den Zellen synthetisiert werden, weshalb die Zunahme der Konzentration einen anderen Grund haben muss. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Lyse toter Zellen und die dadurch verursachte Freisetzung der Metaboliten sein. Unstimulierte PBMCs in Kultur sind allgemein anfällig gegenüber Apoptose.^[424] Allerdings kommt es bei diesem sogenannten programmierten Zelltod im Gegensatz zur Nekrose nicht zu einer Zerstörung der Plasmamembran. Stattdessen werden in der Zelle verschiedene Komponenten abgebaut und die verbleibenden Vesikel von Phagozyten aufgenommen.^[276] Dadurch sollten keine Substanzen aus den absterbenden Zellen freigesetzt werden. Gegen diese These spricht außerdem, dass zu keinem Zeitpunkt Resonanzsignale im ¹H-NMR-Spektrum beobachtet werden konnten, die sich zentralen intrazellulären Metaboliten wie Adenin- oder Nicotinamid-Nukleotiden zuordnen lassen.^[425] Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Entstehung freier Aminosäuren durch den zuvor erläuterten Prozess der Makropinozytose. Allerdings ist fraglich, ob die Zellen die entstehenden freien Aminosäuren, insbesondere wenn es sich dabei um essenzielle Aminosäuren handelt, tatsächlich sekretieren. Dies würde dafür sprechen, dass, wie zuvor für TSP diskutiert, nicht die absolute Konzentration der Aminosäuren im Medium, sondern nur der freie, messbare Anteil zunimmt. In Übereinstimmung mit dieser These ist in der Literatur für die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Tryptophan und Glycin aber auch für Acetat, Lactat, Pyruvat und Citrat eine Interaktion mit Proteinen beschrieben. Für Alanin, Valin, Glutamin, Asparagin,

Threonin und Glucose dagegen ist keine Interaktion bekannt. Für Histidin gibt es gegensätzliche Beobachtungen.^[412–415, 426–428] Dies deckt sich nur teilweise mit den hier beobachteten Konzentrationsverläufen. Insbesondere bei Valin, welches hier als Beispiel herangezogen wurde (vergleiche Abbildung 11.10), dürfte nach einem Vergleich mit den Literaturwerten bei dieser These keine Zunahme der Konzentration zu beobachten sein.

Die Konzentrationsabnahme der hier diskutierten Aminosäuren nach dem dritten Inkubationstag (vergleiche Abbildung 11.10) kann schließlich mit dem Ende der Makropinozytose zusammenhängen oder auf eine vermehrte Aufnahme durch die Zellen zurückgeführt werden. Intrazellulär können die Aminosäuren in Zwischenprodukte des Citratzyklus umgewandelt werden und anschließend über die oxidative Phosphorylierung zur Erzeugung von ATP dienen oder, wenn genug ATP vorhanden ist, Vorstufen für die Fettsäuresynthese und die Gluconeogenese liefern.^[378, 408] Welche Stoffwechselwege in den vorliegenden Zellen spezifisch ablaufen, kann zum aktuellen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt werden. Sowohl das Ende der Makropinozytose als auch der erhöhte Bedarf an Aminosäuren für die genannten Prozesse, könnte jedoch mit einer Reifung der Zellen in Zusammenhang stehen.

Die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse legen nahe, dass es im Verlauf der Kultivierung zu einer Reifung der PBMCs kommt. Dabei scheint sich der zelluläre Stoffwechsel speziell nach dem dritten Inkubationstag umzustellen. Hierfür kommen verschiedene Faktoren als Auslöser in Frage wie beispielsweise die unphysiologischen Nährstoffkonzentrationen oder die Ansammlung von Lactat im Medium. Auch konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass sich *in vitro* in Anwesenheit von Serum Monozyten zu Makrophagen differenzieren, was möglicherweise auf den Einfluss verschiedener Proteine im Serum zurückgeführt werden kann. Hierbei konnte die Differenzierung über einen Zeitraum von bis zu sieben Tagen hinweg beobachtet werden.^[429–431] Allerdings wurden diese Versuche mit humanem Serum durchgeführt, sodass unklar ist, ob das in diesem Versuch verwendete FBS denselben Effekt hat. Des Weiteren kann auch die Anheftung von Monozyten und Makrophagen an Oberflächen wie die Vertiefungen der Mikrotiterplatten den Phänotyp der Zellen beeinflussen.^[432, 433]

Bei den vorliegenden Versuchen weisen die verschiedenen zuvor diskutierten Beobachtungen auf unterschiedliche zelluläre Phänotypen hin: Die hohe Rate der aeroben Glykolyse kann einerseits auf einen pro-inflammatorischen Phänotyp hindeuten, scheint aber auch bereits für naive Immunzellen charakteristisch zu sein. Das angenommene Ende der Makropinozytose nach drei Tagen spricht für die Ausbildung eines pro-inflammatorischen Phänotyps, ebenso der beginnende Verbrauch an Glutamat und Cystin, welche der intrazellulären Produktion von Glutathion dienen können. Das zweite könnte aber auch auf eine Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen hindeuten. Die Anreicherung von Lactat im Verlauf der Inkubation dagegen kann die Ausbildung eines anti-inflammatorischen Phänotyps begünstigen.

In Kapitel 11.2.3 sind die im Rahmen eines weiteren Versuchs sezernierten Zytokinkonzentrationen unstimulierter sowie stimulierter PBMCs dargestellt. Diese weisen nicht auf einen pro-inflammatorischen Zustand der unstimulierten Zellen hin. Somit wären auch bei den hier diskutierten Ergebnissen andere zelluläre Reifungsprozesse, die nicht direkt mit einer inflammatorischen Antwort einhergehen, wie beispielsweise eine Reifung der Monozyten zu Makrophagen oder die Ausbildung weiterer Subtypen denkbar. Da Monozyten nur 10–20 % der PBMCs ausmachen,^[278] könnten die Beobachtungen zudem auch auf andere Zelltypen zurückzuführen sein. Um dies zu klären, kann anhand zellspezifischer Zytokine und durchflusszytometrischer Marker eine Charakterisierung der Zelltypen sowie Identifizierung möglicher Subpopulationen durchgeführt werden.^[297, 434–436] Weiterhin kann die Analyse der Expression verschiedener Gene für die Identifizierung von Subtypen genutzt werden.^[437]

11.1.7 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde zunächst die Zusammensetzung des Zellkulturmediums mit der Zusammensetzung von Blut, der natürlichen Umgebung von PBMCs, verglichen. Hierbei wurde deutlich, dass die Komponenten des Zellkulturmediums zwar mehrheitlich denen von Blutserum entsprechen, die Konzentration der einzelnen Substanzen jedoch teilweise deutlich abweicht. Dies könnte ursächlich für das Ablaufen einiger zuvor diskutierter zellulärer Stoffwechselwege sein und weist somit darauf hin, dass die unphysiologische Umgebung das Verhalten der Zellen beeinflusst. Um dies genauer zu evaluieren, sollten weitere Versuche durchgeführt werden, in denen die Konzentration der jeweiligen Substanzen in einem synthetischen Medium variiert wird. Insbesondere eine Supplementierung mit Pyruvat könnte hierbei sinnvoll sein, um zu Beginn der Inkubation oxidativen Stress der Zellen zu vermeiden. Insgesamt zeigen diese Beobachtungen, dass Metabolomik-Studien an Zellkulturmedien wertvolle Informationen für die Formulierung zellspezifischer Kulturmedien liefern und somit die Übertragbarkeit von *in vitro* Ergebnissen auf *in vivo* Situationen verbessern können.

Bei Kultivierung von PBMCs konnten Veränderungen in der Konzentration extrazellulärer Substanzen beobachtet werden, die Rückschlüsse auf zelluläre Stoffwechselwege wie die Glykolyse oder den Aminosäurestoffwechsel ermöglichen. Dabei konnten insbesondere nach dem dritten Inkubationstag diverse Veränderungen festgestellt werden, die auf eine Umstellung des zellulären Metabolismus hinweisen. Ursächlich hierfür könnte ein Reifungsprozess der Zellen wie beispielsweise eine Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen oder die Ausbildung anderer Subtypen sein. Um mögliche Subpopulationen zu identifizieren, sollten die einzelnen Zelltypen zukünftig anhand zellspezifischer Zytokine und Oberflächenmarker sowie Transkriptionsfaktoren charakterisiert werden.

11.2 Umstellung des Stoffwechsels bei Stimulation mit Lipopolysaccharid

11.2.1 Überblick

Das bakterielle Endotoxin LPS ist in der Medizin von großer Bedeutung, da viele Krankheitssymptome einer Infektion mit gramnegativen Bakterien wie Schmerzen und Fieber bis hin zu einer Sepsis größtenteils darauf zurückzuführen sind.^[276, 280] Auch im Rahmen einer niederschweligen, chronischen Inflammation können Endotoxine wie LPS aufgrund einer dauerhaft gesteigerten Permeabilität der Darmschleimhaut in die Blutbahn gelangen, wo sie mit dem Immunsystem in Kontakt kommen und die Entzündungsreaktion fördern.^[267–269] Aufgrund hochspezifischer Rezeptoren reagieren dort insbesondere Monozyten und Makrophagen auf LPS und initiieren so die Immunantwort.^[269, 270, 288] *In vitro* Studien können dabei helfen zu verstehen, unter welchen Bedingungen sich chronische Entzündungsreaktionen entwickeln und welche Stoffwechselwege daran beteiligt sein könnten. Typischerweise werden in Studien zur Untersuchung des Metabolismus von Immunzellen entweder Makrophagen verwendet, die aus Gewebe gewonnen oder durch Zugabe von M-CSF aus Monozyten erhalten werden. Um die Polarisierung zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen zu induzieren, werden die Makrophagen anschließend mit LPS und/oder Interferon- γ stimuliert, wobei meist LPS-Konzentrationen zwischen 5 und 100 ng/ml oder sogar darüber eingesetzt werden.^[327, 329, 331, 336–338, 347, 350, 351, 360, 361] Diese sind jedoch deutlich höher als der für metabolische Erkrankungen typische Endotoxinspiegel im Blut, welcher normalerweise unter 0.1 ng/ml liegt.^[311]

Im vorherigen Abschnitt wurde die Zusammensetzung des Zellkulturmediums sowie der Stoffwechsel von PBMCs ohne Zugabe von Stimulanzen analysiert und somit die Grundlage für weitere Untersuchungen an diesem System geschaffen. In diesem Kapitel soll nun der Einfluss von Stimulation mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen auf den Metabolismus von PBMCs untersucht werden. Dadurch soll abgeschätzt werden können, ab welchem LPS-Konzentrationsbereich es zu einer inflammatorischen Reaktion kommt und bis zu welchem Zeitpunkt diese am besten abgebildet wird. Die hier durchgeführten Versuche unterscheiden sich in verschiedenen Aspekten von bisherigen literaturbekannten Studien: Um zusätzliche potenzielle Einflussfaktoren auf das zelluläre Verhalten zu eliminieren, werden die Untersuchungen an der gesamten Fraktion der PBMCs durchgeführt, welche darüber hinaus nicht mit Faktoren wie M-CSF behandelt werden. Außerdem wird LPS in einem

vergleichsweise niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 0.001 und 0.1 ng/ml eingesetzt, um die Bedingungen einer niederschwelligen Inflammation möglichst realitätsgetreu abzubilden. Zum aktuellen Zeitpunkt sind zwei Studien bekannt, in denen der Einfluss solch niedriger LPS-Konzentrationen auf humane Monozyten untersucht wurde.^[438, 439] Die dabei beobachtete Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-8 weist auf eine pro-inflammatorische Reaktion der Zellen bei Stimulation mit LPS-Konzentrationen von nur 0.005 ng/ml^[439] beziehungsweise 0.02 ng/ml^[438] hin. Allerdings wurde der Stoffwechsel der Zellen im Rahmen dieser Untersuchungen nicht betrachtet. Um zu evaluieren, ob das Zellkulturmedium einen geeigneten Indikator für immunmetabolische Veränderungen darstellt, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine NMR-spektroskopische Analyse des extrazellulären Metabolitenprofils durchgeführt. Diese Methode stellt deutlich weniger Aufwand dar als die weit verbreitete Untersuchung intrazellulärer Metaboliten. Da für pro-inflammatorische Immunzellen eine verstärkte Aktivität der Glykolyse charakteristisch ist (vergleiche Kapitel 9.5)^[323, 324], soll der inflammatorische Zustand der Zellen anschließend insbesondere anhand des Verbrauchs von Glucose sowie der Produktion von Lactat als Endprodukt der aeroben Glykolyse beurteilt werden. Darüber hinaus wird auch die extrazelluläre Konzentration der Zytokine IL-6 und IL-8 zur Beurteilung über das Vorliegen eines inflammatorischen Zustandes herangezogen. Des Weiteren wird der Konzentrationsverlauf zusätzlicher, besonders auffälliger Metaboliten diskutiert, deren Verlauf bereits in Kapitel 11.1.4 für unstimulierte Zellen betrachtet wurde. Die Einordnung der Ergebnisse bezieht sich dabei insbesondere auf Monozyten und Makrophagen, da diese Zellen über ihre Rezeptoren hochspezifisch auf LPS reagieren können.^[269, 270, 288]

Die Daten, auf denen die in diesem Kapitel diskutierten Zellkulturergebnisse beruhen, wurden in zwei verschiedenen Versuchsdurchführungen erhoben, wobei jeweils die PBMCs zweier Spender parallel inkubiert wurden (im Folgenden als 1A und 1B sowie 2A und 2B bezeichnet). Die Zellen dieser vier Spender stellen die biologischen Replikate dar. Bei den Spendern handelt es sich um männliche Erwachsene mit einem BMI zwischen 20.2 und 25.0 kg/m² (der Wert normalgewichtiger Personen liegt zwischen 18.5 und 25.0 kg/m²)^[440] und einem Geburtsjahr zwischen 1987 und 1997, wodurch die Individuen eine relativ homogene Gruppe darstellen. Alle Zellen wurden nach einer Ruhephase von einem Tag mit anschließendem Wechsel des Mediums mit LPS-Konzentrationen von 0.001, 0.005, 0.025 und 0.1 ng/ml sowie als Negativkontrolle auch ohne LPS-Stimulation über einen Zeitraum von sechs Tagen kultiviert.

Im Gegensatz zu den Versuchen ohne LPS, die in Kapitel 11.1 dargestellt sind, wurden hierbei nur zu Beginn der Inkubation sowie nach einem, vier, fünf und sechs Tagen Proben entnommen. Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 11.1.3 wurde PBS-Lösung als Verdunstungsschutz in die äußeren Kavitäten gegeben und bei jedem Experiment parallel RPMI-Medium mit 10 % FBS ohne PBMCs als Blindwert inkubiert, welches im Folgenden als Kontrollmedium bezeichnet wird. Für jede Probe wurden mehrere Replikate in einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte inkubiert, welche hier als technische Replikate definiert wurden. Von den Kulturüberständen dreier technischer Replikate wurden anschließend ^1H -NMR-Spektren aufgenommen. Für die folgende statistische Datenauswertung wurden jeweils die Mittelwerte dieser drei technischen Replikate verwendet.

11.2.2 Charakterisierung von Stoffwechseledukten und -produkten

In diesem Kapitel wird der Einfluss der verschiedenen LPS-Konzentrationen auf die Konzentration der einzelnen Substanzen im Medium nach einem, vier sowie fünf Inkubationstagen untersucht. Da nach sechs Tagen eine zu große Variation sowohl zwischen den technischen als auch den biologischen Replikaten beobachtet werden konnte (vergleiche Kapitel 11.3.2), wurde dieser Zeitpunkt nicht weiter betrachtet. Die Zuordnung der Substanzen sowie die Zusammensetzung der Proben ist in Kapitel 11.1.2 beschrieben, die Quantifizierung erfolgte wie in Kapitel 11.3.1 erläutert. Im Gegensatz zum vorherigen Kapitel, in welchem der Fokus auf den absoluten Konzentrationen der Komponenten im Medium lag, wird im Folgenden für jede Substanz nur die Nettobilanz, also die Differenz zwischen dem Messwert für das Zellkulturmedium und dem Kontrollmedium angegeben. Dadurch wird sichergestellt, dass nur Veränderungen betrachtet werden, die durch die Zellen hervorgerufen werden, während Veränderungen im Medium (vergleiche Kapitel 11.1.3) herausgerechnet werden. Des Weiteren kann somit der Einfluss von Proteinuntergrund und überlagerten Resonanzsignalen anderer Substanzen, unter der Annahme, dass deren Konzentration konstant bleibt, auf die betrachteten Werte vernachlässigt werden. In Abbildung 11.13 sind repräsentativ ^1H -NMR-Spektren der Zellkulturmedien stimulierter und unstimulierter Zellen eines Spenders nach einer Inkubationsdauer von vier Tagen dargestellt. Insbesondere bei Glucose, Lactat, Pyruvat und Glutamat sind dabei deutliche Intensitätsunterschiede abhängig von der eingesetzten LPS-Konzentration erkennbar.

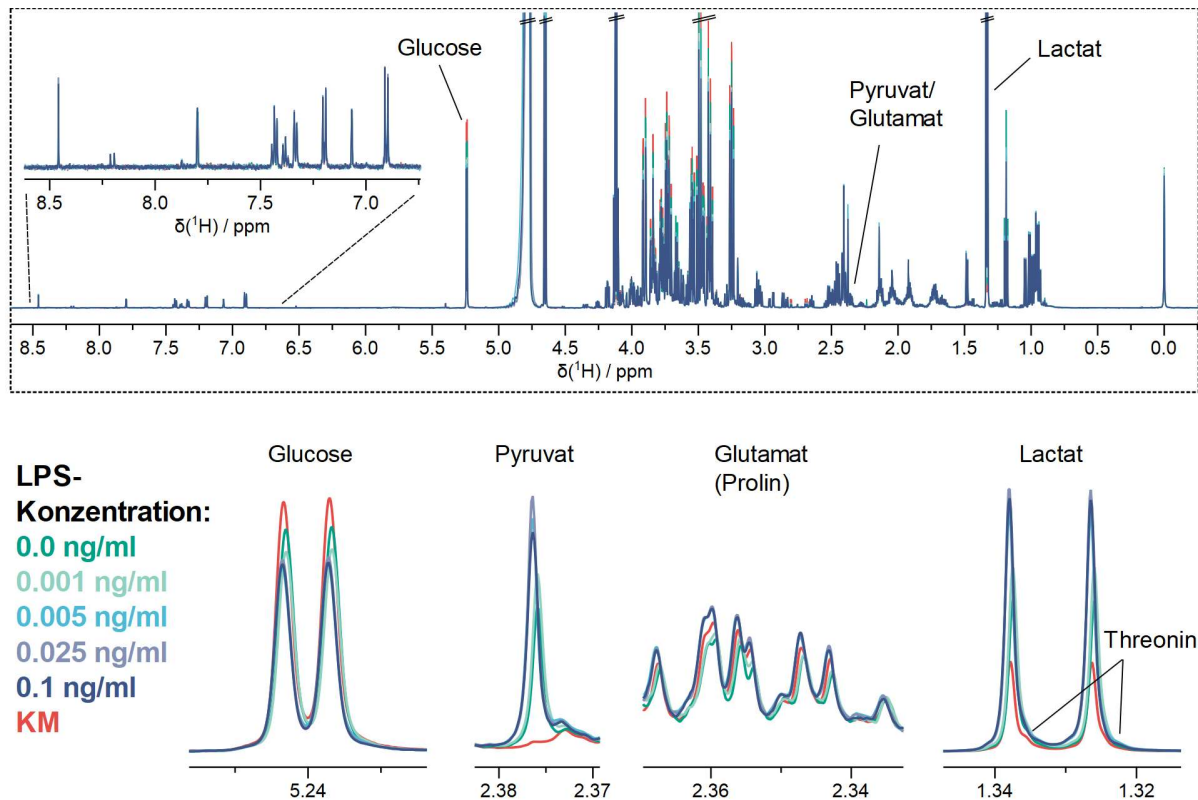


Abbildung 11.13: Repräsentative ^1H -NMR-Spektren von RPMI-Medium mit FBS nach Stimulation der PBMCs mit LPS und einer Inkubationsdauer von vier Tagen. Für jede LPS-Konzentration ist nur ein technisches Replikate dargestellt. Oben: Gesamter spektraler Bereich. Unten: Detailansicht ausgewählter Resonanzsignale. KM: Kontrollmedium

Im Rahmen dieser Auswertungen wurde für jede Substanz eine Zweiweg-ANOVA mit Messwiederholungen (*two-way repeated-measures ANOVA*) durchgeführt. Das Ergebnis dieser Methode sind der F -Wert mit den Freiheitsgraden, der p -Wert sowie die Effektstärke (siehe Kapitel 2.2.3). Das hier verwendete Maß für die Effektstärke η_g^2 kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Diese Parameter geben an, ob der Einfluss der LPS-Konzentration abhängig vom betrachteten Zeitpunkt ist, was als eine signifikante Interaktion zwischen LPS-Konzentration und Zeit definiert ist. Anschließend wurde zu jedem Zeitpunkt mit einem gepaarten t -Test mit FDR-Korrektur ein Vergleich der einzelnen LPS-Konzentrationen mit der Referenz ohne LPS durchgeführt. Die Einschränkungen, die bei diesen statistischen Tests mit der geringen Anzahl von vier Proben einhergehen, sind in Kapitel 11.3.3 erläutert.

Zunächst soll die verbrauchte Menge an Glucose sowie die gebildete Menge an Lactat abhängig von der LPS-Konzentration zu den unterschiedlichen Zeitpunkten betrachtet werden. In Abbildung 11.14 ist deutlich zu erkennen, dass für alle LPS-Konzentrationen die Glucosekonzentration im Medium stetig abnimmt, wohingegen die Lactatkonzentration proportional zunimmt.

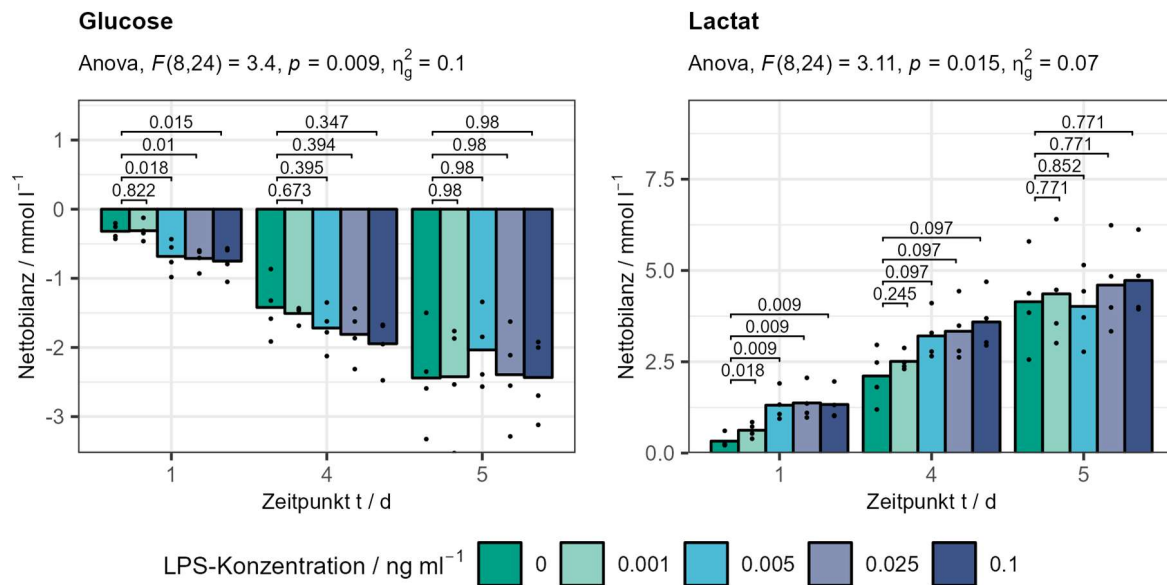


Abbildung 11.14: Nettobilanz für Glucose und Lactat bei Stimulation der PBMCs mit LPS. Dargestellt ist die verbrauchte beziehungsweise gebildete Menge nach $t = 1$ d, 4 d und 5 d im Vergleich zum Kontrollmedium ohne Zellen. Die Punkte stellen die Messwerte (gemittelte technische Replikate) der biologischen Replikate dar, die Balken den jeweiligen Mittelwert der biologischen Replikate. Die Überschrift gibt das Ergebnis der Zweifweg-ANOVA mit Messwiederholungen an. Die p -Werte in der Abbildung für den Vergleich mit der unbehandelten Referenzgruppe wurden mithilfe eines gepaarten t -Tests mit FDR-Korrektur erhalten.

Dieselbe Beobachtung wurde bereits in Kapitel 11.1.4 (Abbildung 11.5) für unstimulierte Zellen beschrieben. Bei beiden Substanzen unterscheidet sich der Einfluss der LPS-Konzentration abhängig vom Zeitpunkt ($p = 0.009$ für Glucose und $p = 0.015$ für Lactat), wobei die Effektstärke mit Werten von 0.1 und 0.07 nur gering ist.

Wie in Abbildung 11.14 zu sehen ist, unterscheidet sich nach einem Tag die verbrauchte Menge an Glucose deutlich zwischen den Versuchen ohne beziehungsweise mit 0.001 ng/ml LPS (0.32 ± 0.11 bzw. 0.31 ± 0.14 mmol/l) und den Versuchen mit 0.005, 0.025 und 0.1 ng/ml LPS (0.68 ± 0.24 , 0.71 ± 0.15 und 0.75 ± 0.22 mmol/l Glucose). Entsprechend ergibt der Vergleich der drei Versuche mit den hohen LPS-Konzentrationen mit der Referenz ohne LPS einen p -Wert kleiner 0.05. Nach vier Tagen ist diese klare Grenze zwischen 0.001 und 0.005 ng/ml LPS nicht mehr erkennbar. Stattdessen ist die verbrauchte Menge an Glucose größer, je höher die eingesetzte LPS-Konzentration ist (mit steigender LPS-Konzentration: 1.42 ± 0.44 , 1.51 ± 0.12 , 1.72 ± 0.32 , 1.81 ± 0.38 , 1.95 ± 0.38 mmol/l verbrauchte Glucose), allerdings ohne statistische Signifikanz ($p > 0.3$). Nach fünf Tagen gleicht sich die verbrauchte Menge an Glucose für alle LPS-Konzentrationen an. So wurde in allen Versuchen, bis auf den Versuch mit 0.005 ng/ml LPS (2.04 ± 0.56 mmol/l), mit etwa 2.4 mmol/l insgesamt nahezu

gleich viel Glucose verbraucht. Somit ist nach fünf Tagen je nach LPS-Konzentration im Mittel noch etwa 4–5 mmol/l Glucose im Medium vorhanden. Dies deckt sich mit auch mit der in Kapitel 11.1.4 beobachteten Menge.

Auch bei Lactat unterscheidet sich die extrazelluläre Konzentration nach einem Tag abhängig von der eingesetzten LPS-Konzentration (Abbildung 11.14). Umgekehrt zur Glucose ist hier die produzierte Menge bei 0 und 0.001 ng/ml LPS niedriger (0.33 ± 0.19 bzw. 0.63 ± 0.20 mmol/l Lactat) als bei den Versuchen mit 0.005, 0.025 und 0.1 ng/ml LPS (1.31 ± 0.43 , 1.37 ± 0.49 und 1.33 ± 0.44 mmol/l Lactat). Im Gegensatz zu Glucose ist dabei allerdings nicht nur ein Unterschied zwischen der Referenz ohne LPS und den Versuchen mit den drei hohen LPS-Konzentrationen ($p = 0.009$), sondern auch dem Versuch mit 0.001 ng/ml LPS ($p = 0.018$) zu erkennen. Nach vier Tagen ist die produzierte Menge an Lactat größer, je höher die eingesetzte LPS-Konzentration ist (mit steigender LPS-Konzentration: 2.11 ± 0.77 , 2.51 ± 0.26 ($p = 0.245$), 3.21 ± 0.66 , 3.34 ± 0.82 , 3.59 ± 0.81 mmol/l (jeweils $p = 0.097$) sekretiertes Lactat). Dies ist ebenfalls umgekehrt proportional zu der aufgenommenen Menge an Glucose. Nach fünf Tagen gleicht sich die Lactatproduktion bei den unterschiedlichen LPS-Konzentrationen an, im Gegensatz zur Glucose ist aber immer noch eine leichte Abstufung erkennbar. Somit wurden ohne LPS 4.14 ± 1.34 mmol/l und mit der höchsten LPS-Konzentration 4.73 ± 1.02 mmol/l Lactat produziert, womit die Konzentration im Medium im Mittel zwischen 5.7 und 6.3 mmol/l liegt. Die Lactatproduktion bei dem Versuch mit 0.005 ng/ml LPS ist am geringsten, was wiederum zu der Menge an verbrauchter Glucose passt. Dies deckt sich ebenfalls mit der in Kapitel 11.1.4 beobachteten Konzentration im Medium.

Häufig wird die Rate der Glykolyse und der mitochondrialen Atmung anhand der Aufnahmerate an Sauerstoff sowie der extrazellulären Ansäuerungsrate bestimmt. Da diese Parameter im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt wurden, soll die Rate der Glykolyse anhand des Verhältnisses aus gebildetem Lactat zu verbrauchter Glucose untersucht werden (Abbildung 11.15). Da während der aeroben Glykolyse aus einem Molekül Glucose zwei Moleküle Lactat entstehen, würde ein Verhältnis von zwei eine vollständige Umsetzung von Glucose zu Lactat implizieren.

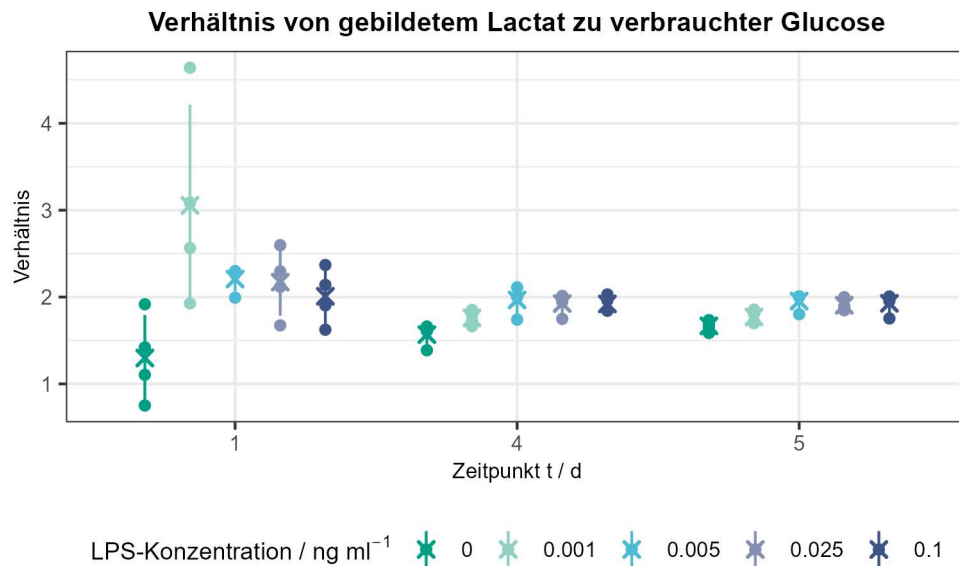


Abbildung 11.15: Verhältnis von gebildetem Lactat zu verbrauchter Glucose. Die Punkte stellen die Werte (gemittelte technische Replikate) der biologischen Replikate dar, die Kreuze die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Striche die Standardabweichung.

Im vorliegenden Versuch unterscheidet sich die innerhalb des ersten Tages umgesetzte Menge sowohl zwischen den eingesetzten LPS-Konzentrationen als auch den PBMCs der verschiedenen Spender deutlich. Bei der Referenz ohne LPS ist das Verhältnis mit einem Mittelwert der biologischen Replikate von 1.30 (0.75–1.92) am niedrigsten. Das höchste Verhältnis kann mit einem Mittelwert von 3.06 bei einer LPS-Konzentration von 0.001 ng/ml beobachtet werden, wobei es abhängig vom Spender mit Werten zwischen 1.92 und 4.64 deutlich variiert. Bei höheren LPS-Konzentrationen liegt das Verhältnis im Mittel ebenfalls über einem Wert von zwei. So beträgt es bei 0.005 ng/ml LPS 2.21 (1.99–2.30) bei 0.025 ng/ml LPS 2.17 (1.67–2.60) und bei 0.1 ng/ml LPS 2.01 (1.62–2.37). Nach vier beziehungsweise fünf Tagen ist die Schwankung zwischen den Zellen der einzelnen Spender deutlich geringer. Zu beiden Zeitpunkten ist mit steigender LPS-Konzentration eine Zunahme des Verhältnisses erkennbar, wobei es bei Konzentrationen von über 0.005 ng/ml LPS nicht weiter zunimmt. Bei der Referenz ohne LPS liegt das Verhältnis nach vier Tagen im Mittel bei 1.57 und steigt nach fünf Tagen auf 1.67. Bei Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS liegt es zu beiden Zeitpunkten bei vergleichbaren Werten von 1.76 beziehungsweise 1.77. Bei den Versuchen mit LPS-Konzentrationen von mindestens 0.005 ng/ml liegt es zu beiden Zeitpunkten zwischen 1.9 und 1.96. Somit kann zusammengefasst werden, dass die Rate der Glykolyse mit steigender LPS-Konzentration zunimmt, wobei sie ab einer Konzentration von 0.005 ng/ml konstant bleibt. Dies ist nach vier und fünf Tagen besonders deutlich, kann aber auch bereits nach

einem Tag, abgesehen von der deutlichen Abweichung bei Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS, beobachtet werden.

Besonders auffällig ist das Verhältnis von gebildetem Lactat zu verbrauchter Glucose nach dem ersten Tag der Inkubation. Hier liegt das Verhältnis bei allen LPS-Konzentrationen im Mittel über einem Wert von zwei. Unter der Annahme, dass Lactat in diesem Fall ausschließlich intrazellulär aus Glucose gebildet wird, würde dies bedeuten, dass mehr Lactat gebildet wurde als durch die im gleichen Zeitraum aufgenommene Glucose entstehen kann. Außerdem schwankt zu diesem Zeitpunkt das Verhältnis deutlich zwischen den PBMCs der unterschiedlichen Spender. Diese Beobachtungen können möglicherweise durch die Vorbehandlung des abgenommenen Blutes erklärt werden. Da dies jedoch nicht selbst durchgeführt wurde, können an dieser Stelle nur Vermutungen angestellt werden. Nach der Blutabnahme wird das Blut mit der Stabilisatorlösung CPD-A (Citrat-Phosphat-Dextrose mit Adenin) vermischt, wodurch die Zellen einer Glucosekonzentration von 3.13 g/l (etwa 17 mmol/l) ausgesetzt sind.^[441] Diese Konzentration ist etwa 2.5-fach höher als die in diesem Versuch zur Inkubation der Zellen eingesetzte Menge an Glucose. So könnte zu Beginn der Inkubation, trotz einer eintägigen Ruhephase, intrazellulär noch Glucose vorliegen, welche anschließend zu Lactat umgewandelt wird. Die Schwankungen zwischen den PBMCs der einzelnen Spender könnten darauf zurückzuführen sein, dass sich in der Mischung aus Blut und CPD-Stabilisator das Verhältnis zwischen Zellzahl und Glucosekonzentration je nach Spender unterscheidet. Warum sowohl das Verhältnis aus sekretiertem Lactat zu verbrauchter Glucose als auch die Schwankungen zwischen den PBMCs verschiedener Spender bei einer LPS-Konzentration von 0.001 ng/ml am größten sind, ist jedoch nicht klar.

Analog zu Kapitel 11.1.4 soll auch die Konzentration der weiteren im Medium identifizierten Carbonsäuren in Abhängigkeit von der eingesetzten LPS-Konzentration untersucht werden (Abbildung 11.16). Dabei konnte nur bei Pyruvat ($p = 0.007$) und Citrat ($p < 0.0001$) eine signifikante Interaktion zwischen Zeitpunkt und LPS-Konzentration ermittelt werden. Die beobachtete Effektstärke ist für Pyruvat mit einem Wert von 0.08 ähnlich gering wie bei Glucose und Lactat. Bei Citrat dagegen die Effektstärke deutlich größer ($\eta_g^2 = 0.57$). Im Falle von Formiat ist, wie bereits in Kapitel 11.1.4 besprochen, eine Zunahme der Konzentration mit der Dauer der Inkubation zu beobachten, welche allerdings unabhängig von der eingesetzten LPS-Konzentration ist ($p = 0.16$, $\eta_g^2 = 0.07$).

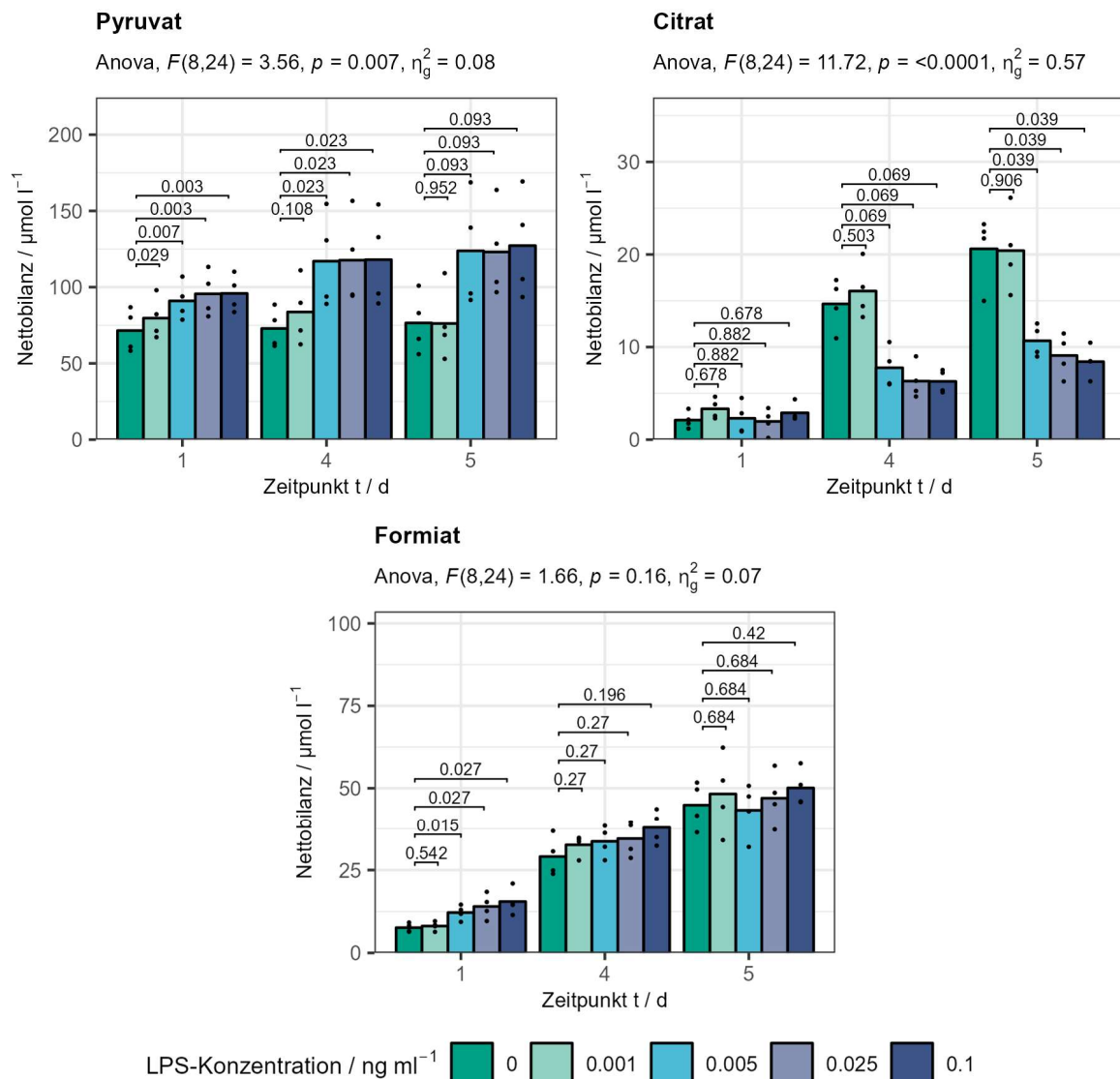


Abbildung 11.16: Nettobilanz für Pyruvat, Citrat und Formiat bei Stimulation der PBMCs mit LPS. Dargestellt ist die gebildete Menge nach $t = 1$ d, 4 d und 5 d im Vergleich zum Kontrollmedium ohne Zellen. Die Punkte stellen die Messwerte (gemittelte technische Replikate) der biologischen Replikate dar, die Balken den jeweiligen Mittelwert der biologischen Replikate. Die Überschrift gibt das Ergebnis der Zweiweg-ANOVA mit Messwiederholungen an. Die p -Werte in der Abbildung für den Vergleich mit der unbehandelten Referenzgruppe wurden mithilfe eines gepaarten t -Tests mit FDR-Korrektur erhalten.

Bei Pyruvat ist auffällig, dass sowohl bei unstimulierten als auch stimulierten Zellen der Großteil der vorliegenden Menge innerhalb des ersten Inkubationstages sekretiert wird, wobei die Konzentration mit steigender LPS-Konzentration zunimmt (mit steigender LPS-Konzentration: 72 ± 14 , 80 ± 14 , 91 ± 12 , 96 ± 15 , $96 \pm 12 \mu\text{mol/l}$ Pyruvat). Ohne sowie mit 0.001 ng/ml LPS bleibt diese Konzentration über alle Inkubationstage hinweg konstant. Bei LPS-Konzentrationen von mindestens 0.005 ng/ml steigt die Pyruvatkonzentration danach weiter an, wobei zwischen Stimulation mit 0.005 , 0.025 und 0.1 ng/ml LPS kein Unterschied erkennbar ist. Dies resultiert in sekretierten Pyruvatkonzentrationen von 124 ± 37 , 123 ± 30

und $127 \pm 35 \mu\text{mol/l}$ nach fünf Tagen. Der Vergleich mit der Referenz ohne LPS nach einem sowie vier Tagen ergibt p -Werte von unter 0.05. Im Falle von Citrat ist nach dem ersten Tag nur eine geringe Zunahme der extrazellulären Konzentration um bis zu $3 \mu\text{mol/l}$ erkennbar, welche für alle LPS-Konzentrationen vergleichbar ist. Danach steigt die Sekretion bei unstimulierten und mit nur 0.001 ng/ml LPS stimulierten Zellen deutlich an (21 ± 4 und $20 \pm 4 \mu\text{mol/l}$ innerhalb von fünf Tagen) wohingegen bei stärker stimulierten Zellen nur etwa halb so viel Citrat sekretiert wird (11 ± 2 , 9 ± 2 und $8 \pm 2 \mu\text{mol/l}$). Dies ergibt für LPS-Konzentrationen von mindestens 0.005 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle ohne LPS p -Werte von unter 0.1 nach vier und unter 0.05 nach fünf Tagen.

Des Weiteren soll auch der Einfluss von LPS auf die in Kapitel 11.1.4 betrachteten Aminosäuren analysiert werden. Dort konnte für unstimulierte Zellen für die Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Serin, Cystin, Isoleucin und Leucin eine Abnahme der Konzentration im Verlauf der Inkubation beobachtet werden (siehe Abbildung 11.7 und Anhang, Abbildung A.3). Nach Stimulation mit LPS ergibt sich eine zusätzliche Klassifizierung dieser Aminosäuren, wobei diese nach vier und fünf Tagen am deutlichsten ist.

Im Falle von Aspartat, Cystin und Isoleucin (Abbildung 11.17 und Anhang, Abbildung A.4) ist für alle LPS-Konzentrationen eine zeitliche Abnahme der Konzentration im Medium zu beobachten, wobei diese für unstimulierte Zellen am deutlichsten ist. Bis zu einer LPS-Konzentration von 0.005 ng/ml nimmt die jeweils aufgenommene Menge dieser Substanzen ab und steigt für 0.025 und 0.1 ng/ml LPS wieder an. Die ANOVA ergibt dabei nur bei Aspartat eine signifikante Interaktion zwischen Zeitpunkt und LPS-Konzentration ($p < 0.0001$) mit einer großen Effektstärke von 0.57. Auch der Vergleich der drei hohen LPS-Konzentrationen mit der Referenz ohne LPS resultiert nur für Aspartat nach fünf Tagen in p -Werten von unter 0.05. Die aufgenommene Menge an Aspartat ist deutlich größer als die Menge an Cystin und Isoleucin und liegt nach fünf Tagen bei 174 ± 12 , 161 ± 24 , 94 ± 12 , 116 ± 20 und $125 \pm 14 \mu\text{mol/l}$ (mit steigender LPS-Konzentration). Wie auch schon in Kapitel 11.1.4 beobachtet, ist bei dem Versuch ohne LPS-Stimulation die im Medium vorgelegte Menge an Aspartat von $185 \mu\text{mol/l}$ (vergleiche Tabelle 11.1) somit nach fünf Tagen nahezu vollständig aufgebraucht.

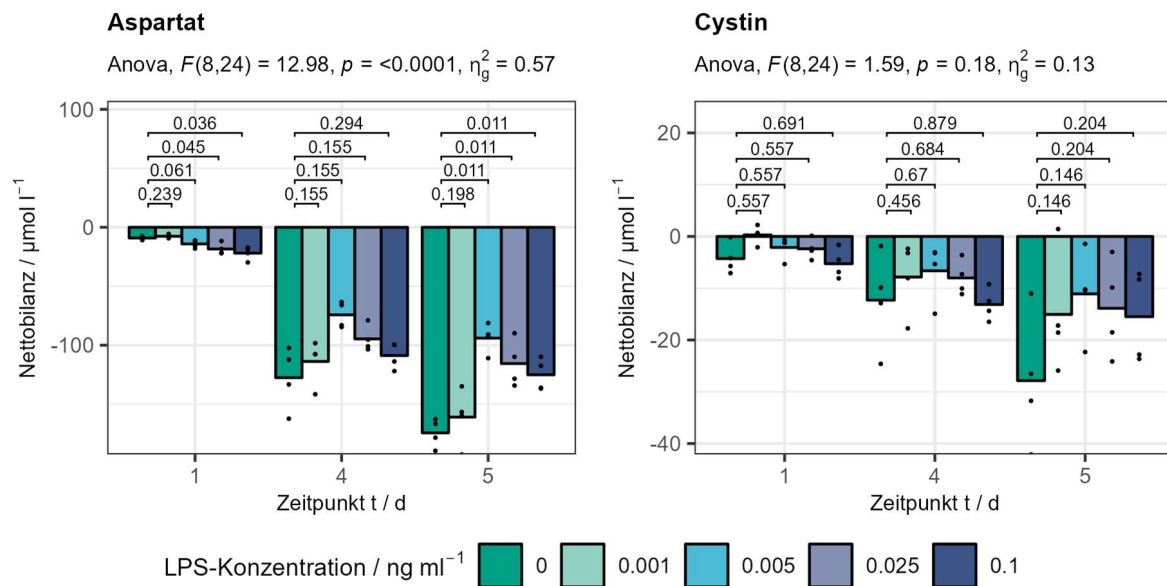


Abbildung 11.17: Nettobilanz für Aspartat und Cystin bei Stimulation der PBMCs mit LPS. Dargestellt ist die verbrauchte Menge nach $t = 1$ d, 4 d und 5 d im Vergleich zum Kontrollmedium ohne Zellen. Die Punkte stellen die Messwerte (gemittelte technische Replikate) der biologischen Replikate dar, die Balken den jeweiligen Mittelwert der biologischen Replikate. Die Überschrift gibt das Ergebnis der Zweifach-ANOVA mit Messwiederholungen an. Die p -Werte in der Abbildung für den Vergleich mit der unbehandelten Referenzgruppe wurden mithilfe eines gepaarten t -Tests mit FDR-Korrektur erhalten.

Bei Glutamat, Serin und Leucin ist abhängig von der LPS-Konzentration im Verlauf der Inkubation entweder eine Zu- oder Abnahme der Konzentration im Medium zu beobachten (Abbildung 11.18 und Anhang, Abbildung A.4). Für Glutamat ($p < 0.0001$) und Serin ($p = 0.00023$) ergibt die ANOVA eine signifikante Interaktion zwischen Zeitpunkt und LPS-Konzentration. Die beobachtete Effektstärke ist bei Glutamat mit einem Wert von 0.38 etwas höher als bei Serin mit einem Wert von 0.14. Nach dem ersten Inkubationstag ist die Konzentration dieser beiden Substanzen für alle LPS-Konzentrationen im Vergleich zur Referenz ohne LPS etwas erhöht, was in p -Werten kleiner als 0.05 resultiert. Bei längerer Inkubationsdauer ist nur für die Referenz ohne LPS sowie bei schwacher Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS eine Konzentrationsabnahme zu beobachten. Bei Stimulationen mit mindestens 0.005 ng/ml LPS nimmt die Konzentration im Falle von Glutamat weiter zu beziehungsweise bleibt im Falle von Serin annähernd konstant. Die aufgenommene beziehungsweise sekretierte Menge an Glutamat ist dabei deutlich größer als die Menge an Serin. Nach fünf Tagen wurden bei den Versuchen ohne und mit 0.001 ng/ml LPS 91 ± 80 und $49 \pm 104 \mu\text{mol/l}$ Glutamat aufgenommen und bei den Versuchen mit höheren LPS-Konzentrationen 89 ± 12 , 84 ± 16 und $75 \pm 15 \mu\text{mol/l}$ Glutamat sekretiert.

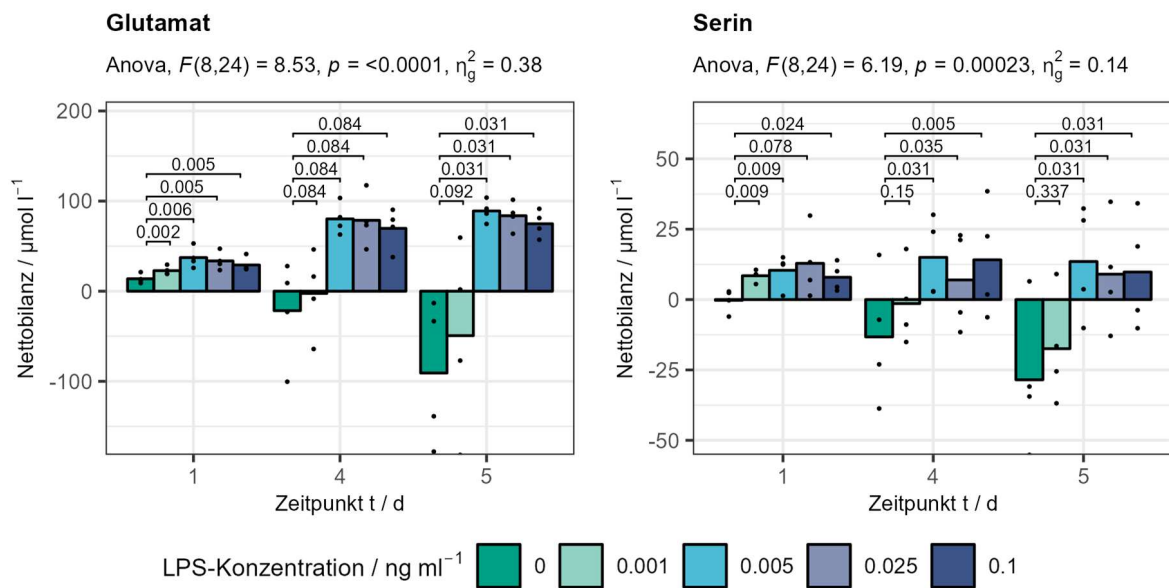


Abbildung 11.18: Nettobilanz für Glutamat und Serin bei Stimulation der PBMCs mit LPS. Dargestellt ist die verbrauchte beziehungsweise gebildete Menge nach $t = 1$ d, 4 d und 5 d im Vergleich zum Kontrollmedium ohne Zellen. Die Punkte stellen die Messwerte (gemittelte technische Replikate) der biologischen Replikate dar, die Balken den jeweiligen Mittelwert der biologischen Replikate. Die Überschrift gibt das Ergebnis der Zweiweg-ANOVA mit Messwiederholungen an. Die p -Werte in der Abbildung für den Vergleich mit der unbehandelten Referenzgruppe wurden mithilfe eines gepaarten t -Tests mit FDR-Korrektur erhalten.

Dabei sind sowohl für Glutamat als auch für Serin deutliche Unterschiede zwischen den PBMCs der unterschiedlichen Spender erkennbar. Dennoch resultiert der Vergleich der drei hohen LPS-Konzentrationen mit der Referenz ohne LPS für Serin nach vier und fünf Tagen und für Glutamat nach fünf Tagen in p -Werten kleiner als 0.05.

Die Konzentration von Glutamin, Alanin und Glycin nimmt, wie schon zuvor in Kapitel 11.1.4 ohne Stimulation mit LPS beobachtet (Abbildung 11.9) im Verlauf der Inkubation zu (Abbildung 11.19). Bei Alanin und Glycin steigt die sekretierte Menge zusätzlich mit der LPS-Konzentration an, wobei die sekretierte Menge jeweils für LPS-Konzentrationen von mindestens 0.005 ng/ml vergleichbar ist. Im Falle von Alanin ist die Abhängigkeit von der LPS-Konzentration zu allen Zeitpunkten gut erkennbar, bei Glycin erst nach vier und fünf Tagen. Im Falle von Glutamin ist kein merklicher Unterschied zwischen den LPS-Konzentrationen erkennbar. Folglich ergibt die ANOVA nur für Alanin ($p = 0.001$) und Glycin ($p = 0.00012$) eine signifikante Interaktion zwischen Zeitpunkt und LPS-Konzentration. Die beobachtete Effektgröße ist jedoch bei beiden Substanzen mit Werten von 0.03 und 0.05 nur sehr gering. Die sekretierte Menge ist bei Alanin am größten und liegt nach fünf Tagen bei 60 ± 26 , 68 ± 27 , 95 ± 35 , 92 ± 31 und 94 ± 31 $\mu\text{mol/l}$ (mit steigender LPS-Konzentration).

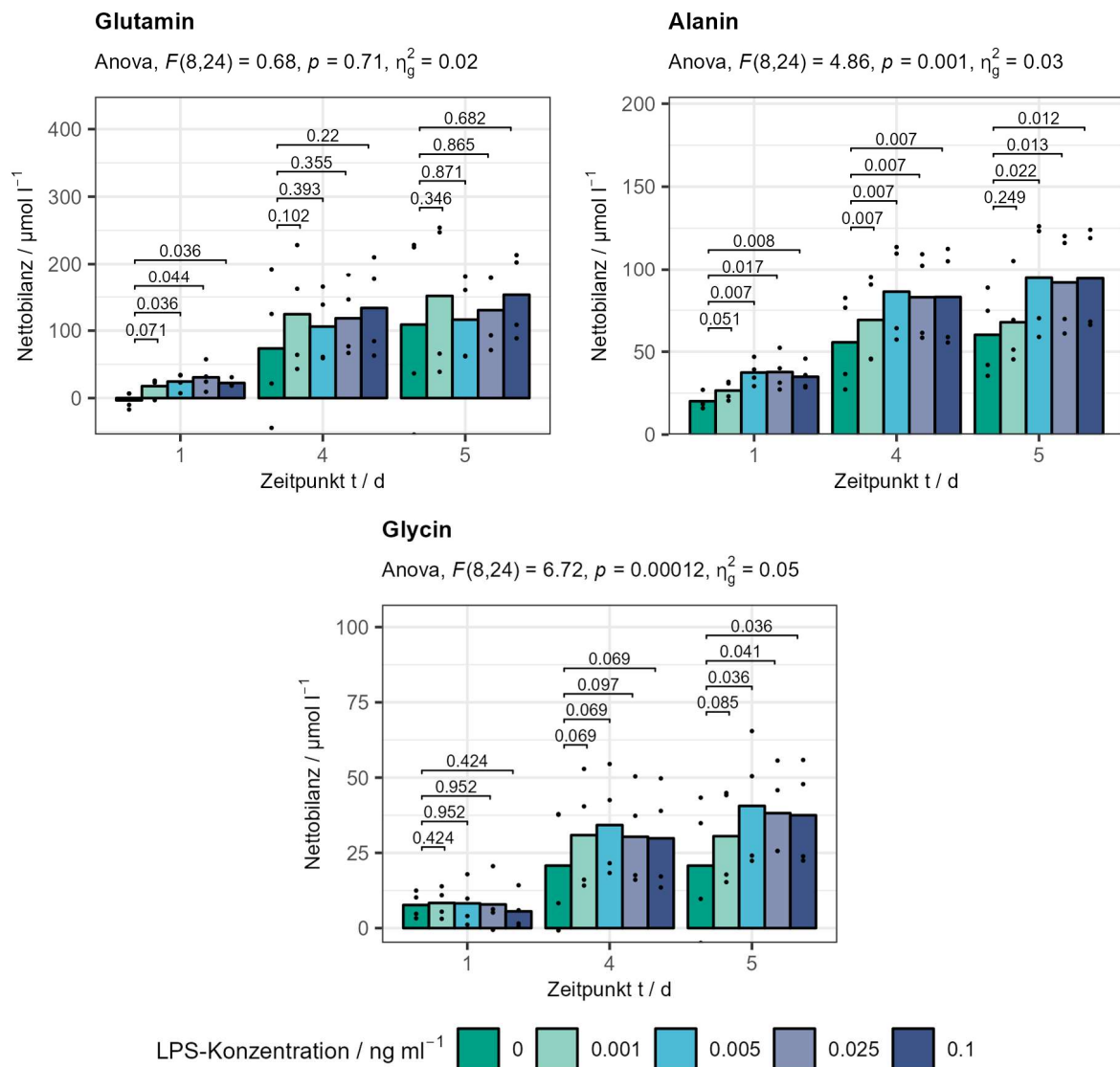


Abbildung 11.19: Nettobilanz für Glutamin, Alanin und Glycin bei Stimulation der PBMCs mit LPS. Dargestellt ist die gebildete Menge nach $t = 1$ d, 4 d und 5 d im Vergleich zum Kontrollmedium ohne Zellen. Die Punkte stellen die Messwerte (gemittelte technische Replikate) der biologischen Replikate dar, die Balken den jeweiligen Mittelwert der biologischen Replikate. Die Überschrift gibt das Ergebnis der Zweigweg-ANOVA mit Messwiederholungen an. Die p -Werte in der Abbildung für den Vergleich mit der unbehandelten Referenzgruppe wurden mithilfe eines gepaarten t -Tests mit FDR-Korrektur erhalten.

Wie schon in Kapitel 11.1.4 erörtert weisen die restlichen im Medium enthaltenen Aminosäuren einen untereinander vergleichbaren Konzentrationsverlauf auf, was sich auch durch Stimulation mit LPS nicht ändert. Charakteristisch für diese Aminosäuren ist bei unstimulierten PBMCs die Zunahme der Konzentration innerhalb der ersten drei Inkubationstage mit anschließender Abnahme der Konzentration (vergleiche Abbildung 11.10 für Valin). In Abbildung 11.20 ist die sekretierte Menge an Valin nach LPS-Stimulation repräsentativ für diese Aminosäuren dargestellt (für die restlichen Substanzen siehe Anhang, Abbildung A.4).

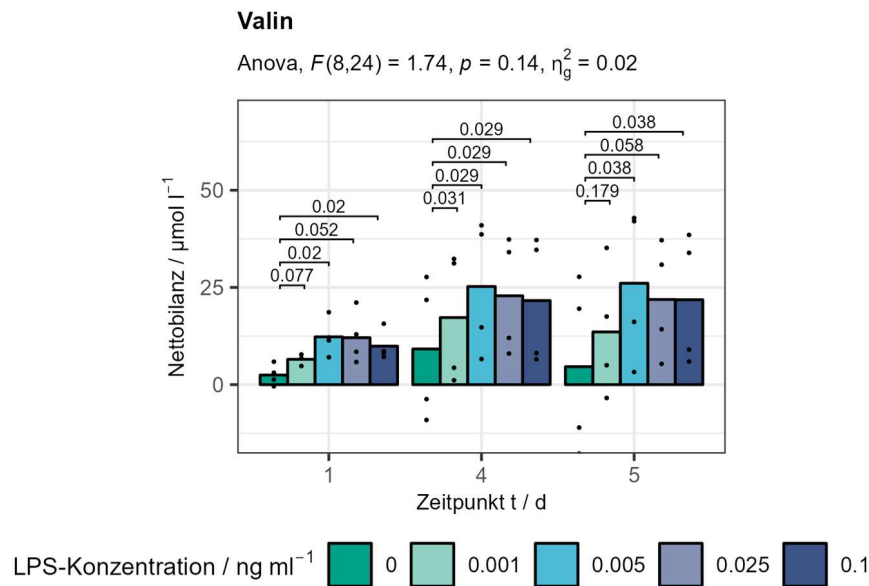


Abbildung 11.20: Nettobilanz für Valin bei Stimulation der PBMCs mit LPS. Dargestellt ist die gebildete Menge nach $t = 1$ d, 4 d und 5 d im Vergleich zum Kontrollmedium ohne Zellen. Valin ist repräsentativ für diverse andere Aminosäuren dargestellt. Die Punkte stellen die Messwerte (gemittelte technische Replikate) der biologischen Replikate dar, die Balken den jeweiligen Mittelwert der biologischen Replikate. Die Überschrift gibt das Ergebnis der Zweiweg-ANOVA mit Messwiederholungen an. Die p -Werte in der Abbildung für den Vergleich mit der unbehandelten Referenzgruppe wurden mithilfe eines gepaarten t -Tests mit FDR-Korrektur erhalten.

Dabei fällt auf, dass die sekretierte Menge mit steigender LPS-Konzentration zunimmt, wobei der höchste Wert bei einer Konzentration von 0.005 ng/ml LPS gemessen wird. Eine signifikante Interaktion zwischen Zeitpunkt und LPS-Konzentration kann nur für Phenylalanin und Tyrosin erhalten werden und auch der Vergleich der verschiedenen LPS-Konzentrationen mit der Referenz ohne LPS ergibt nur bei wenigen Vergleichen einen p -Wert von unter 0.05 (Anhang, Abbildung A.4). Dies weist darauf hin, dass die hier beschriebenen Effekte im Vergleich zu den zuvor erläuterten Substanzen nur gering sind.

11.2.3 Sekretion der Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-8

Pro-inflammatorische Monozyten und Makrophagen sezernieren als Antwort auf Stimulation mit LPS Zytokine und Chemokine wie IL-6 und IL-8.^[263, 266, 309, 438, 439] Um im Rahmen der vorliegenden Arbeit die inflammatorische Reaktion der Zellen beurteilen zu können, wurde die extrazelluläre Konzentration dieser beiden Zytokine mittels eines ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*) bestimmt (Abbildung 11.21). Da nicht für alle Proben Messwerte vorlagen, konnte eine statistische Auswertung, wie für die Substanzen in Kapitel 11.2.2, nicht durchgeführt werden.

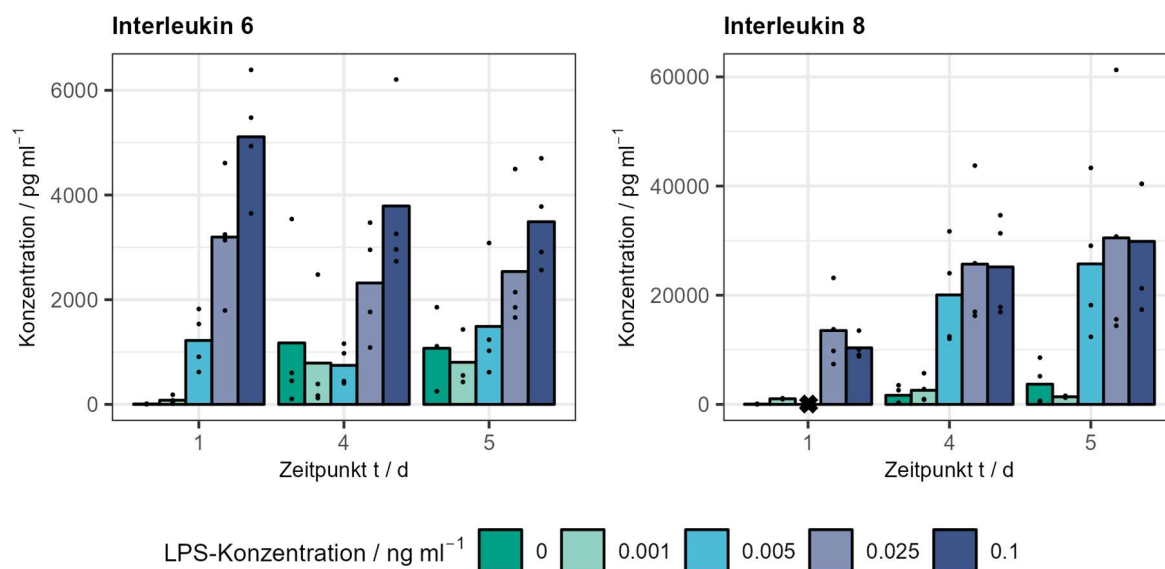


Abbildung 11.21: Konzentration von IL-6 und IL-8 bei Stimulation der PBMCs mit LPS nach $t = 1$ d, 4 d und 5 d. Die Punkte stellen Einzelmessungen der biologischen Replikate dar, die Balken den jeweiligen Mittelwert der biologischen Replikate. Für IL-8 liegen zum Zeitpunkt $t = 1$ d für 0.005 ng/ml LPS keine Messwerte vor.

Im Falle von IL-6 ist sowohl für den Versuch ohne LPS also auch mit 0.001 ng/ml LPS nach einem Tag noch keine Sekretion erkennbar. Dagegen ist bei den Versuchen mit höheren LPS-Konzentrationen eine deutliche Zunahme der IL-6 Konzentration zu sehen, wobei die Menge mit der LPS-Konzentration ansteigt. Nach vier Tagen ist ebenfalls für die Versuche ohne LPS und mit 0.001 ng/ml LPS ein Anstieg der IL-6 Konzentration ersichtlich. Dabei wird im Medium eine vergleichbare Menge wie bei Stimulation mit 0.005 ng/ml LPS erreicht. Bei den Versuchen mit mindestens 0.005 ng/ml LPS ist keine weitere Zunahme der IL-6 Konzentration erkennbar. Die Messwerte nach fünf Tagen sind insgesamt vergleichbar mit denen nach vier Tagen. Bei IL-8 ist nach einem Tag bei der Referenz ohne LPS ebenfalls noch keine Sekretion erkennbar, wohingegen bei Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS eine geringe Menge detektierbar

ist. Bei den Versuchen mit 0.025 und 0.1 ng/ml LPS ist bereits eine deutliche Zunahme der IL-8 Konzentration erkennbar. Messwerte für den Versuch mit 0.005 ng/ml LPS fehlen. Nach vier beziehungsweise fünf Tagen ist bei den Versuchen ohne LPS und mit 0.001 ng/ml LPS eine minimale Zunahme der IL-8 Konzentration ersichtlich. Bei den Versuchen mit mindestens 0.005 ng/ml LPS steigt die Konzentration im Verlauf der Inkubation nochmals an, wobei im Gegensatz zur IL-6 Konzentration kein merklicher Unterschied zwischen den drei hohen LPS-Konzentrationen erkennbar ist.

11.2.4 Diskussion

Im Rahmen dieses Kapitels wurden humane PBMCs mit LPS-Konzentrationen zwischen 0.001 und 0.1 ng/ml stimuliert und mit einer unstimulierten Referenz verglichen. Diese Untersuchungen sollen klären, ob bereits derart niedrige Konzentrationen einen Einfluss auf den Metabolismus und inflammatorischen Zustand der Zellen haben und bei welcher Konzentration möglicherweise die Grenze liegen könnte. Da insbesondere Monozyten und Makrophagen auf LPS reagieren,^[269, 270, 288] soll sich die folgende Diskussion auf diese Zellen beschränken. Da Monozyten allerdings nur etwa 10–20 % der Phagozyten ausmachen,^[278] könnte auch der basale Stoffwechsel anderer Immunzellen einen Einfluss auf die Konzentration der Metaboliten im Medium haben. Dies soll im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter ausgeführt werden.

Charakteristisch für pro-inflammatorische Phagozyten ist, wie in Kapitel 9.5 erläutert, eine Umstellung des Stoffwechsels für die ATP-Produktion vom Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung zu einer verstärkten Glykolyse mit anschließender Reduktion von Pyruvat zu Lactat, der sogenannten aeroben Glykolyse.^[271, 319, 324] Dies resultiert in einer erhöhten Aufnahme an Glucose sowie einer verstärkten Produktion von Lactat.^[327, 328, 331, 336, 338] Die verstärkte Aktivität der Glykolyse ist entscheidend für die Modulation der Effektorfunktion der Zellen wie Phagozytose, pro-inflammatorische Zytokinproduktion und ROS-Produktion.^[325, 337, 339] Aus diesem Grund gelten auch Zytokine wie IL-6 und IL-8 als Marker für eine pro-inflammatorische Reaktion. Nach aktuellem Stand ist der Stoffwechsel von Immunzellen bei LPS-Konzentrationen von unter 0.1 ng/ml wie sie im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden, noch nicht untersucht. Allerdings ist bekannt, dass IL-6 und IL-8 bereits bei einem so geringen LPS-Spiegel produziert^[439] und sekretiert^[438] werden.

Im vorliegenden Versuch weisen sowohl der Konzentrationsverlauf von Glucose und Lactat als auch die Konzentration von IL-6 und IL-8 darauf hin, dass zwischen einer LPS-Konzentration von 0.001 und 0.005 ng/ml die Schwelle liegt, ab welcher ein pro-inflammatorischer Zustand der Zellen erreicht wird. Ab einer LPS-Konzentration von 0.005 ng/ml wird ein Verhältnis von sekretiertem Laktat zu aufgenommener Glucose von über 1.9 erreicht, welches mit steigender LPS-Konzentration nicht weiter zunimmt (vergleiche Abbildung 11.15). Dies impliziert eine nahezu vollständige Verschiebung des Stoffwechsels vom Citratzyklus zur aeroben Glykolyse, ein typisches Charakteristikum pro-inflammatorischer Zellen, und könnte bereits der maximal erreichbaren Umsetzungsrate entsprechen. Auch der Konzentrationsverlauf von IL-8 stützt diese These (vergleiche Abbildung 11.21). So wird IL-8 zu allen Zeitpunkten bei Stimulation mit mindestens 0.005 ng/ml LPS in deutlich höherer Menge sekretiert als bei den unstimulierten und nur mit 0.001 ng/ml LPS stimulierten Zellen. Die Konzentration an IL-6 dagegen steigt mit zunehmender LPS-Konzentration konstant an. Dies könnte dafür sprechen, dass sich zwar ab einer Konzentration von 0.005 ng/ml LPS ein pro-inflammatorischer Zustand der Zellen ausbildet, dieser allerdings durch eine höhere LPS-Konzentration nochmals verstärkt wird.

Wie bereits in Kapitel 11.1.6 dargelegt, nimmt bei unstimulierten, beziehungsweise wenig stimulierten Zellen die absolute Menge an aufgenommener Glucose und sekretiertem Lactat im Verlauf der Inkubation zu und ist nach fünf Tagen genauso hoch ist wie bei stärker stimulierten Zellen (vergleiche Abbildung 11.14). Dies könnte, wie bereits zuvor diskutiert, mit einem unbeabsichtigten Reifungsprozess der Zellen zusammenhängen. Dennoch impliziert die niedrigere Umsetzungsrate von Glucose zu Lactat im Vergleich zur Stimulation mit höheren LPS-Konzentrationen (vergleiche Abbildung 11.15) eine geringere Verschiebung des Stoffwechsels vom Citratzyklus zur aeroben Glykolyse, was für einen weniger ausgeprägten inflammatorischen Zustand spricht. Bei Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS scheint ein intermediärer Zustand vorzuliegen. Ein solcher Reifungsprozess der Zellen könnte auch die geringe Zunahme der Zytokinkonzentration im Verlauf der Inkubation erklären.

Die hohen extrazellulären Lactatkonzentrationen könnten, wie bereits in Kapitel 11.1.6 diskutiert, den Stoffwechsel der Zellen ebenfalls beeinflussen. In einer Studie von Dietl *et al.*^[442] wurde in der Tumorumgebung spezifisch der Einfluss extrazellulärer Lactatkonzentrationen sowie des pH-Wertes auf LPS-stimulierte humane Monozyten untersucht. Dabei fanden die Autoren heraus, dass zu hohe Lactatkonzentrationen zu einer

erneuten Aufnahme des extrazellulären Lactats führen, was den glykolytischen Fluss und damit die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine inhibiert. In dieser Untersuchung wurde die Sekretion von TNF α (Tumornekrosefaktor-alpha), ebenfalls ein pro-inflammatorisches Zytokin, ab einer Lactatkonzentration von 5 mmol/l und die Sekretion von IL-6 bei einer Lactatkonzentration von 20 mmol/l gehemmt. Eine Lactatkonzentration von 5 mmol/l entspricht bereits dem Wert einer Laktatazidose (vergleiche Kapitel 11.1.6) und wird im vorliegenden Versuch nach etwa vier Tagen erreicht. Zwar wurde die Konzentration von TNF α in diesem Versuch nicht bestimmt, es ist jedoch denkbar, dass eine so hohe Lactatkonzentration den Stoffwechsel der Zellen auch anderweitig beeinflusst, wobei die genauen Auswirkungen nicht abgeschätzt werden können. Eine Konzentration von 20 mmol/l wird zu den betrachteten Zeitpunkten nicht erreicht, weshalb die in Kapitel 11.2.3 gezeigten IL-6 Konzentrationen tatsächlich auf eine Reaktion der Zellen auf die unterschiedlichen LPS-Konzentrationen und nicht auf eine Reaktion auf das Lactat hindeuten.

Die These, dass der Citratzyklus mit zunehmender LPS-Konzentration unterbrochen wird, kann anhand der Anreicherung von Intermediaten des Citratzyklus überprüft werden. Extrazellulär konnten dabei nur Citrat, Fumarat und Succinat in ausreichend hoher Konzentration nachgewiesen werden, wobei Succinat aufgrund von Überlagerung mit anderen Substanzen nicht quantitativ ausgewertet werden konnte. Im Falle von Fumarat kann keine LPS-abhängige Änderung der Konzentration beobachtet werden (vergleiche Abbildung 11.16). Bei Citrat dagegen ist die sekretierte Menge geringer, je höher die eingesetzte LPS-Konzentration ist, wobei in Übereinstimmung zu den zuvor diskutierten Ergebnissen eine klare Grenze zwischen Stimulation mit 0.001 und 0.005 ng/ml LPS erkennbar ist. Dies deutet auf einen erhöhten intrazellulären Bedarf an Citrat hin. Bei pro-inflammatorischen Zellen dient Citrat im Zytosol als Substrat für Prostaglandine, welche eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen spielen, und kann in andere Stoffwechselwege eingehen, welche mit NO und ROS wichtige Effektormoleküle von Makrophagen erzeugen.^[341, 342] Somit könnte ein erhöhter Bedarf an Citrat auf einen pro-inflammatorischen Zustand der Zellen hinweisen.

Neben den zuvor diskutierten Substanzen konnte auch der Einfluss von LPS auf die Konzentration weiterer Metaboliten beobachtet werden. Vergleichbare Beobachtungen wurden nach aktuellem Stand für PBMCs so noch nicht beschrieben. Aus diesem Grund soll im Folgenden ein hypothetischer Zusammenhang zwischen den Beobachtungen und der zuvor

postulierten pro-inflammatorischen Aktivierung der Zellen ab einer LPS-Konzentration von 0.005 ng/ml hergestellt werden.

Im Falle von Pyruvat, welches Glykolyse und Citratzyklus miteinander verknüpft, ist die sekretierte Menge höher, je größer die eingesetzte LPS-Konzentration ist, wobei wiederum eine klare Grenze zwischen Stimulation mit 0.001 und 0.005 ng/ml LPS erkennbar ist (Abbildung 11.16). Die grundsätzliche Sekretion von Pyruvat deckt sich mit den Beobachtungen für unstimulierte Zellen und könnte, wie bereits diskutiert (vergleiche Kapitel 11.1.5), der Anpassung der extrazellulären Umgebung dienen, da Pyruvat als Antioxidans wirkt und zytotoxisches Wasserstoffperoxid entfernt, das sowohl in Blut als auch in Zellkulturen gebildet wird.^[381–383, 385] Eine wichtige Quelle für Wasserstoffperoxid stellen NADPH-Oxidasen dar, die in der Plasmamembran verschiedener Zellen wie Phagozyten vorliegen.^[381, 382] Durch Entzündungsreaktionen werden diese verstärkt aktiviert, was zu einer extrazellulären Anhäufung von Wasserstoffperoxid führt.^[381] So konnten auch im Blut im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen deutlich erhöhte Wasserstoffperoxidkonzentrationen gefunden werden.^[382] Folglich ist auch die erhöhte extrazelluläre Pyruvatkonzentration bei LPS-Konzentrationen von mindestens 0.005 ng/ml in Übereinstimmung mit einem pro-inflammatorischen Zustand der Zellen.

Auch bei einem Großteil der Aminosäuren scheint die Konzentration von 0.005 ng/ml eine Grenze zu markieren. Dies ist besonders auffällig für Glutamat und Serin, welche im Verlauf der Inkubation von unstimulierten sowie mit nur 0.001 ng/ml LPS stimulierten Zellen verbraucht werden, wohingegen sie bei stärkerer Stimulation freigesetzt werden (vergleiche Abbildung 11.18). Glutamat kann, wie bereits in Kapitel 11.1.6 diskutiert, von den Zellen aufgenommen und zusammen mit Cystin, Serin und Glycin zur Synthese von Glutathion genutzt werden, wobei dieser Stoffwechselweg in unstimulierten Zellen und, in geringerem Ausmaß, auch in mit 0.001 ng/ml LPS stimulierten Zellen abzulaufen scheint. Die Sekretion von Glutamat bei LPS-Konzentrationen von mindestens 0.005 ng/ml kann damit erklärt werden, dass Glutamat auch eine wichtige Rolle als Immunmodulator spielt.^[344, 348, 349] Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen können über ihre Transporter Glutamat nicht nur aufnehmen, sondern auch sekretieren.^[344, 348, 410] T-Zellen dagegen besitzen Glutamatrezeptoren, wodurch freigesetztes Glutamat zur Modulation der T-Zell-Aktivierung beitragen kann.^[348, 349] Fraglich ist allerdings, wie das sekretierte Glutamat in den hier

vorliegenden Versuchen gebildet wird. Normalerweise wird Glutamat intrazellulär aus aufgenommenem Glutamin gebildet,^[344] allerdings kann in diesem Versuch keine entsprechende Abnahme der Glutaminkonzentration im Medium beobachtet werden. Die Sekretion von Glutamat bedeutet im Umkehrschluss auch, dass kein Glutamat mehr für die Produktion von Glutathion genutzt werden kann, sofern intrazellulär nicht große Mengen an Glutamat gebildet werden. In Einklang damit wird in den vorliegenden Versuchen bei Stimulation mit mindestens 0.005 ng/ml LPS Serin ebenfalls nicht mehr und Cystin nur noch in einem geringeren Umfang aufgenommen. Zur Bedeutung von Antioxidantien wie Glutathion im Rahmen einer Entzündungsreaktion gibt es gegensätzliche Annahmen. Glutathion wird eine entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben, da es eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des intrazellulären Reduktions-Oxidations-Gleichgewichts spielt und Zellbestandteile vor freien Radikalen wie ROS schützt.^[379] Somit werden Antioxidantien einerseits benötigt um die Zelle vor ROS, welche bei einer pro-inflammatorischen Reaktion vermehrt gebildet werden, zu schützen.^[343] Dies steht im Gegensatz zu der hier angenommenen geringeren Bildung von Glutathion bei Stimulation mit LPS. Andererseits kann eine positive Korrelation zwischen der verringerten Bildung von Glutathion bei Stimulation mit LPS und der inflammatorischen Reaktion der Zellen anhand verschiedener Literaturquellen erklärt werden: ROS sind auch Signalmoleküle, die für das Fortschreiten von Entzündungskrankheiten essenziell sind.^[443] So wurde sowohl eine intrazelluläre Verringerung an Glutathion als auch das Vorliegen mitochondrialer ROS mit der vermehrten Freisetzung von IL-6 in Verbindung gebracht^[444, 445] und auch die LPS-induzierte Expression des IL-8-Gens wird durch den Entzug von Glutathion deutlich verstärkt.^[446] Mechanistisch konnte außerdem gezeigt werden, dass LPS in Maus-Makrophagen die Expression der katalytischen Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase, des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms bei der Glutathion-Synthese, reduziert.^[447]

Im Folgenden sollen ebenfalls mögliche Ursachen für die veränderte Aufnahme sowie Sekretion weiterer Aminosäuren im Rahmen der angenommenen pro-inflammatorischen Reaktion ab einer LPS-Konzentration von 0.005 ng/ml diskutiert werden. Ein gemeinsames Charakteristikum der in Kapitel 11.2.2 aufgeführten Aminosäuren ist die erhöhte Konzentration bei den Versuchen mit mindestens 0.005 ng/ml LPS im Vergleich zur Referenz ohne LPS und dem Versuch mit 0.001 ng/ml LPS. Diese Beobachtung ist unabhängig davon, ob die jeweilige Substanz von den Zellen aufgenommen oder produziert wird. Interessanterweise

ist dabei die Konzentration der jeweiligen Substanzen bei 0.005 ng/ml LPS meistens am höchsten. Die Ursache hierfür ist nicht klar, jedoch zeigt dies wiederum den besonderen Einfluss dieser Konzentration. Der geringere Verbrauch an Aminosäuren bei Stimulation mit LPS steht im Gegensatz zu der Tatsache, dass Aminosäuren Substrate für Substanzen mit immunregulatorischen Eigenschaften wie beispielsweise Zytokine darstellen und aktivierte Immunzellen deshalb allgemein einen erhöhten Bedarf an Aminosäuren besitzen.^[344] Somit besteht die Möglichkeit, dass bei den gegebenen Versuchsbedingungen entgegen der gängigen Literatur die Zellen einen geringeren Bedarf an Aminosäuren besitzen, wobei die Ursache hierfür nicht klar ist. Jedoch muss bei der Interpretation der Daten beachtet werden, dass hier nur die extrazellulären, jedoch nicht die intrazellulären Konzentrationen gemessen wurden. Deshalb kann von der Konzentration der Aminosäuren im Medium nur bedingt auf den Verbrauch durch die Zellen geschlossen werden kann. Anstatt freie Aminosäuren aus dem Medium aufzunehmen, könnten die Zellen nach Stimulation auch andere Quellen nutzen, um ihren Bedarf zu decken. Eine mögliche Quelle wäre die in Kapitel 11.1.6 diskutierte Makropinozytose. In der Literatur wird berichtet, dass diese als Reaktion auf LPS in Makrophagen erhöht ist und größere Makropinosomen gebildet werden.^[448] Das Vorliegen der Makropinozytose bei unstimulierten Zellen wurde in Kapitel 11.1.6 anhand der Zunahme des TSP-Integrals als Folge der Abnahme der Proteinkonzentration im Medium geschlussfolgert. Bei Stimulation mit LPS konnte allerdings keine Zunahme des TSP-Integrals festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch wird in der Literatur diskutiert, dass die Erhöhung der Makropinozytose nur ein kurzfristiger Effekt ist und bei langfristiger Stimulation mit LPS verringert wird.^[423] Aus diesen Gründen wird auch bei den vorliegenden Versuchen eine langfristige Zunahme der Makropinozytose durch Stimulation mit LPS als unwahrscheinlich angesehen. Darüber hinaus können freie Aminosäuren intrazellulär auch durch Autophagie, den Abbau von Organellen und Proteinaggregaten, entstehen.^[449] Typischerweise wird dieser Prozess initiiert, wenn ein extrazellulärer Mangel an Nährstoffen vorliegt. Jedoch wird auch die Rolle der Autophagie im Rahmen einer Inflammation diskutiert, wobei sie durch die Erkennung von PAMPs durch TLRs gesteuert wird.^[450] Insbesondere wurde gezeigt, dass in Monozyten und Makrophagen Autophagie über den TLR4-Signalweg reguliert und durch LPS induziert werden kann, wobei dieser Signalweg im Gegensatz zum autophagischen Tod die Lebensfähigkeit der Zellen nicht beeinflusst.^[451] Des Weiteren wird postuliert, dass die TLR-Signalisierung die Prozesse der Phagozytose und Autophagie

miteinander verknüpfen könnte, um die Funktion der konventionellen Phagosomen (Organellen im Inneren von Phagozyten, in denen einige Partikel nach der Phagozytose abgebaut werden) zu verbessern.^[452] Somit ist denkbar, dass auch bei den vorliegenden Versuchen die Stimulation mit LPS zu einer Induktion der Autophagie führt, wodurch intrazellulär freie Aminosäuren entstehen. Diese können von den Zellen genutzt werden, womit der Bedarf an extrazellulären Aminosäuren wiederum geringer ist. Da somit anhand der extrazellulären Konzentration der einzelnen Aminosäuren ohne Kenntnisse über die intrazelluläre Konzentration nicht direkt auf den Verbrauch durch die Zellen geschlossen werden kann, erscheint eine detaillierte Diskussion weiterer Aminosäuren nicht zielführend.

Die in den vorherigen beiden Kapiteln aufgeführten und hier diskutierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass ab einer Konzentration von 0.005 ng/ml LPS eine pro-inflammatorische Reaktion der Zellen vorliegt, wobei diese Konzentration keine starre Grenze darstellt. So können bereits bei Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS im Vergleich zu unstimulierten Zellen einige Veränderungen im Stoffwechsel beobachtet werden. Auch die Stimulation mit Konzentrationen über 0.005 ng/ml LPS führt noch zu einer weiteren Steigerung der pro-inflammatorischen Antwort, wie insbesondere an der Sekretion von IL-6 ersichtlich wird. Unklar ist allerdings, ob diese Beobachtungen nur auf Monozyten zurückzuführen sind, die einen pro-inflammatorischen Phänotyp ausbilden, oder sich die Monozyten auch zu Makrophagen differenzieren, welche wiederum einen pro-inflammatorischen M1-Phänotyp ausbilden können. Bei *in vitro* Versuchen zur Polarisierung von Makrophagen werden vor Stimulation der Zellen mit LPS typischerweise zuerst durch Zugabe von M-CSF aus naiven Zellen Makrophagen erzeugt, weshalb ein direkter Vergleich mit Literaturdaten an dieser Stelle nicht möglich ist. Wie in Kapitel 11.1.6 bereits diskutiert, könnte es durch den Einfluss von Komponenten im Serum sowie die Anheftung der Zellen zu einer Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen kommen^[429–433] woraufhin die Stimulation mit LPS einen pro-inflammatorischen Phänotyp induzieren könnte. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die Zugabe von LPS die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen inhibieren kann, wobei dieser Effekt bereits bei LPS-Konzentrationen im Bereich von Subnanogramm beobachtet werden konnte.^[429] Folglich kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden, ob die inflammatorische Reaktion auf pro-inflammatorische Monozyten und/oder M1-Makrophagen zurückzuführen ist. Um dies zu klären, könnte die

Analyse zellspezifischer Zytokine oder durchflusszytometrischer Marker sowie der Expression verschiedener Gene helfen.^[297, 434–437]

11.2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Das langfristige Ziel des vorliegenden Projekts ist die Etablierung eines *in vitro* Systems, das genutzt werden kann, um die Entstehung einer niederschwelligen, chronischen Inflammation zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine erste Machbarkeitsstudie für die Entwicklung dieses Systems durchgeführt. Hierfür wurden PBMCs über mehrere Tage kultiviert und mit LPS in einem Konzentrationsbereich zwischen 0.001 und 0.1 ng/ml stimuliert. Anschließend wurde der Verlauf an verbrauchten und gebildeten Substanzen sowie der Zytokine IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium analysiert. Dabei konnten bereits bei einer LPS-Konzentration von 0.005 ng/ml charakteristische Konzentrationsänderungen beobachtet werden, die auf einen pro-inflammatorischen Zustand von Monozyten und Makrophagen hinweisen. Besonders auffällig war die hohe Umsetzungsrate von Glucose zu Lactat, was auf eine Verschiebung des Stoffwechsels vom Citratzyklus zur sogenannten aeroben Glykolyse zurückzuführen sein dürfte und ein charakteristisches Merkmal pro-inflammatorischer Immunzellen darstellt. Aktuell sind noch einige Fragen offen, wie beispielsweise die genaue Art der gebildeten zellulären Subtypen. Zudem sollten für eine höhere statistische Aussagekraft die hier durchgeführten Versuche mit den PBMCs einer größeren Anzahl an Individuen wiederholt werden. Dennoch zeigen die Beobachtungen bereits die gute Eignung des Systems für weitere Untersuchungen.

Abschließend kann auf Basis dieser Ergebnisse gesagt werden, dass die NMR-spektroskopische Analyse des Zellkulturmediums eine geeignete Methode darstellt, um metabolische Veränderungen in PBMCs zu erfassen und somit Rückschlüsse auf den inflammatorischen Zustand der Zellen zu ziehen. Ob in diesem Zusammenhang eine Untersuchung des intrazellulären Metaboloms zusätzliche Informationen liefert, oder durch die deutlich einfachere Analyse extrazellulärer Metaboliten vollständig ersetzt werden kann, muss in einer Vergleichsstudie evaluiert werden.

11.3 Methodische Einschätzungen

Im Folgenden soll eine Einschätzung der in diesem Teil der Arbeit verwendeten Methoden erfolgen. Diese Betrachtung ist wesentlich, um die Güte sowie mögliche Limitierungen der in Kapitel 11.1 und 11.2 aufgeführten und diskutierten Ergebnisse abschätzen zu können. Dabei wird speziell die Genauigkeit der ermittelten absoluten Konzentrationen, die Reproduzierbarkeit der Methode sowie die statistische Aussagekraft der Datenanalyse thematisiert.

11.3.1 Bestimmung absoluter Konzentrationen

Für die im Rahmen dieses Teils der Arbeit durchgeführten Auswertungen wurden die aus den ^1H -NMR-Spektren erhaltenen Integralwerte in absolute Konzentrationen umgerechnet. Dafür wurden die Spektren zuerst manuell anhand annotierter Verbindungen in relevante Bereiche, sogenannte *buckets*, eingeteilt. Für jede Substanz wurde im ^1H -NMR-Spektrum nur das Signal integriert, welches am wenigsten Überlagerungen mit anderen Signalen zeigt und dadurch am repräsentativsten ist (für die verwendeten *buckets* siehe Anhang, Tabelle A.8). Bei dieser Methode kann die Fläche unter einem *bucket* als Maß für die relative Häufigkeit des jeweiligen Metaboliten in einer biologischen Probe angesehen werden. Anschließend wurde die absolute Konzentration der jeweiligen Substanzen unter Anwendung verschiedener Methoden aus den in den ^1H -NMR-Spektren gemessenen Integralwerten berechnet. Die Anwendung mehrerer Methoden war einerseits notwendig, da die Proben aufgrund der Verwendung von Medium ohne und mit FBS verschiedene Eigenschaften aufweisen, welche im Folgenden erläutert werden. Darüber hinaus wurden die ^1H -NMR-Messungen, auf denen die in den Kapiteln 11.1 und 11.2 besprochenen Ergebnisse beruhen, mit unterschiedlichen Messparametern aufgenommen (Anzahl der Scans $NS = 32$ und Wiederholungen des Spin-Echo-Elements $L4 = 60$ gegenüber $NS = 64$ und $L4 = 134$).

Da die Probenmatrix durch das RPMI-Medium mit 10 % FBS dargestellt wird und in dieser die jeweiligen Substanzen bereits in hoher Konzentration enthalten sind (vergleiche Tabelle 11.1), konnte die genaue Nachweisgrenze der Substanzen nicht bestimmt werden. Für die Festlegung der Bestimmungsgrenze wurde deshalb der Variationskoeffizient der technischen Replikate der einzelnen *buckets* herangezogen (vergleiche Kapitel 11.3.2). Ein

Variationskoeffizient von unter 10 %, welcher bei den vorliegenden Daten in der Regel mit einem Signal-zu-Rausch Verhältnis von über 10 korreliert, wird in der Literatur häufig als akzeptabel für eine ausreichende Genauigkeit angenommen,^[15] weshalb dieser Wert auch im vorliegenden Versuch als Bestimmungsgrenze gewählt wurde.

Für die Proben in RPMI-Medium ohne FBS wurde das für die NMR-Messung in einer definierten Konzentration zugegebene TSP als interner Standard für die Berechnung der Analytkonzentrationen verwendet (siehe Kapitel 2.1.4, Formel 2.11). TSP ist eine der am häufigsten verwendeten Verbindungen für die Referenzierung der chemischen Verschiebung sowie die Quantifizierung in wässrigen Lösungen.^[32] Hierbei wird die Genauigkeit der Quantifizierung jedoch von der T_1 -Zeit der einzelnen Metaboliten sowie der gewählten Repetitionszeit beeinflusst. Für eine quantitative Genauigkeit von 99 % sollte die Repetitionszeit das Fünffache der T_1 -Zeit der am langsamsten relaxierenden Protonen betragen.^[32, 453] Hierfür werden häufig Repetitionszeiten von bis zu 60 Sekunden gewählt, was jedoch zu einer deutlichen Verlängerung der Messzeit führt und daher bei der Messung einer großen Anzahl an Proben, wie es bei Metabolomik-Studien normalerweise der Fall ist, nicht umsetzbar ist.^[32, 453] Um den Effekt der Relaxation zu untersuchen wurde ein ^1H -NMR-Spektrum mit vollständiger Relaxation ($D1 = 60\text{ s}$) aufgenommen und der Integralwert jedes *buckets* auf 100 % gesetzt. Die Aufnahme eines Spektrums mit der für die vorliegenden Versuche gewählten Relaxationszeit ($D1 = 10\text{ s}$) ergab im Vergleich dazu für TSP einen Integralwert von 98 % und für alle weiteren Substanzen im Mittel Integralwerte von 99 % (96–106 %). Da somit auch mit der hier gewählten kürzeren Relaxationszeit von zehn Sekunden annähernd 100 % der maximalen Intensität erhalten wurden, wird diese als ausreichend angesehen.

Bei Proben mit FBS kann diese Methode aufgrund der im FBS enthaltenen Proteine nicht angewendet werden. Da TSP mit Proteinen interagiert, was die T_2 -Relaxationszeit herabsetzt, ist bei diesen Proben eine deutliche Verbreiterung des TSP-Signals im ^1H -NMR-Spektrum zu erwarten (siehe Kapitel 2.1.3, Formel 2.9). Dadurch wird bei der Integration ein geringerer Anteil des Signals von den gewählten Grenzen des *buckets* eingeschlossen, was zu einer Unterquantifizierung führen kann. Außerdem geht durch die kürzere T_2 -Zeit während des CPMG-Zyklus ebenfalls ein gewisses Maß an Magnetisierung verloren, wodurch das erhaltene TSP-Integral im Vergleich zum freien Zustand verringert ist.^[412] Folglich kann TSP unter diesen

Umständen nicht als interner Standard dienen.^[32, 412] Aber auch andere Metaboliten können, wenn auch nur begrenzt, an Proteine binden, wodurch ein vergleichbarer Einfluss auf die T_2 -Relaxationszeit und ebenfalls eine Unterquantifizierung zu erwarten ist.^[412–415, 426–428] Aus diesem Grund wurden für die in Kapitel 11.2 analysierten Proben (RPMI-Medium mit 10 % FBS, ohne sowie mit PBMCs) für den Großteil der Substanzen über ^1H -NMR-Messungen Kalibriergeraden erstellt. Die Kalibrierlösungen wurden in RPMI-Medium mit 10 % FBS hergestellt, um eine Zusammensetzung zu erhalten, die derjenigen der Analytlösung entspricht. Unter der Annahme, dass der Proteingehalt in allen Proben vergleichbar ist, ermöglicht diese Methode eine gute Quantifizierbarkeit. Da das verwendete Medium nicht frei von Analyten war, wurde eine Hintergrundsubtraktion durchgeführt, wie in der Literatur analog für massenspektrometrische Messungen beschrieben.^[454] Es wird angenommen, dass dies aufgrund des linearen Zusammenhangs zwischen Konzentration und Messsignal bei ^1H -NMR-Messungen gut möglich ist. In Tabelle 11.3 sind die zur Beurteilung der Güte der Funktionen betrachteten Parameter aufgelistet. Die erhaltenen Kalibriergeraden sind im Anhang in Abbildung A.5 dargestellt. Für alle Kalibrierfunktionen liegt sowohl der Korrelationskoeffizient R als auch das Bestimmtheitsmaß R^2 über einem Wert von 0.99, wodurch der lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und Messsignal verifiziert wurde. Auch die Verfahrensvariationskoeffizienten weisen mit Werten unter 5 % für die Mehrzahl der Kalibrierfunktionen auf eine gute relative Präzision hin. Für die restlichen Funktionen liegt der Wert mit bis zu 10 % ebenfalls in einem tolerierbaren Bereich.

Da die in Kapitel 11.1 analysierten Proben mit FBS (ebenfalls RPMI-Medium mit 10 % FBS, ohne sowie mit PBMCs) mit anderen Messparametern aufgenommen wurden, können die zuvor beschriebenen Kalibrierfunktionen in diesem Fall nicht direkt für die Bestimmung der Konzentrationen verwendet werden. Aus diesem Grund wurden Experimente mit den verschiedenen Messparametern durchgeführt und anhand der gemessenen Integralwerte ein Umrechnungsfaktor berechnet, welcher für alle *buckets* im Mittel 1.81 (1.68-1.94) betrug. Anschließend wurden die über die Kalibrierfunktionen berechneten Konzentrationen um den Faktor 1.81 korrigiert.

Tabelle 11.3: Parameter zur Beurteilung der Güte der Kalibrierfunktionen. Der Korrelationskoeffizient R , das Bestimmtheitsmaß R^2 und die Reststandardabweichung wurden aus Origin erhalten.

Substanz	R	R^2	Reststandard- abweichung	Verfahrensvariations- koeffizient in %
Glucose	0.9999	0.9999	3.290×10^5	0.90
Lactat	0.9999	0.9999	4.842×10^6	0.89
Pyruvat	1.0000	0.9999	5.548×10^4	0.69
Arginin	0.9979	0.9957	5.348×10^4	5.98
Glutamin	0.9999	0.9998	2.533×10^5	1.14
Aspartat	0.9990	0.9980	3.461×10^4	4.10
Alanin	0.9994	0.9989	1.511×10^5	3.03
Histidin	0.9988	0.9976	4.213×10^4	4.43
Leucin	0.9990	0.9980	1.195×10^5	4.07
Glycin	0.9987	0.9974	1.178×10^5	4.67
Lysin	0.9970	0.9941	1.025×10^5	7.06
Methionin	0.9989	0.9978	1.929×10^4	4.26
Asparagin	0.9991	0.9981	6.457×10^4	3.96
Glutamat	0.9991	0.9982	1.023×10^5	3.92
Serin	0.9987	0.9973	3.150×10^4	4.74
Isoleucin	0.9994	0.9989	2.438×10^5	3.04
Ornithin	0.9962	0.9924	1.513×10^5	8.00
Phenylalanin	0.9999	0.9998	1.818×10^4	1.26
Prolin	0.9970	0.9939	3.944×10^4	7.14
Valin	0.9973	0.9947	2.333×10^5	6.68
Cholin	0.9992	0.9984	7.097×10^4	3.61
Citrat	0.9946	0.9892	1.523×10^4	9.54
Kreatin	0.9993	0.9986	2.471×10^4	3.41

Die Konzentration von Substanzen, für die keine Kalibrierfunktion erstellt wurde, wurde ebenfalls nach Formel 2.11 berechnet. Diese Substanzen umfassen Pyroglutamat, Cystin, Myo-Inositol, Fructose und Tyrosin. Als Referenz diente dabei Valin mit der über die Kalibrierfunktion bestimmten Konzentration. Valin wurde aufgrund der separierten Lage des Resonanzsignals sowie der nicht vorhandenen Interaktion mit Proteinen gewählt.^[413, 415] Analog zum reinen RPMI-Medium wurde der Effekt der Relaxation untersucht, wobei mit einer $D1$ -Zeit von zehn Sekunden für Valin sowie die entsprechenden Substanzen 99 % (96-105 %, ohne Einberechnung von Formiat) der vollständigen Signalintensität erhalten wurde. Im Falle von Formiat, welches mit einer T_1 -Zeit von über neun Sekunden^[455] die längste Relaxationszeit der enthaltenen Substanzen aufweist, ist es wahrscheinlich, dass bei einer $D1$ -Zeit von nur

zehn Sekunden nicht die vollständige Signalintensität erreicht werden kann. Da Formiat mit einem Signal-zu-Rausch Verhältnis von unter 20 im Medium jedoch nahe der definierten Bestimmungsgrenze vorliegt (vergleiche Kapitel 11.3.2), konnte anhand der durchgeführten Einzelmessung kein zuverlässiger Umrechnungsfaktor berechnet werden. Für eine grobe Abschätzung wurde die Konzentration von Formiat ebenfalls ohne Korrekturfaktor berechnet.

Da die Quantifizierung der Substanzen in den Medien ohne Zellen nur zur Etablierung der Methode diente, wurden aus Zeitgründen für die zuvor beschriebenen Berechnungen nur Einzelmessungen durchgeführt, weshalb diese mit Unsicherheiten behaftet sind. Dies ist vermutlich auch die Ursache für die beobachteten Schwankungen der Umrechnungsfaktoren um den jeweiligen Mittelwert. Des Weiteren können bei allen angewendeten Methoden verschiedene Faktoren zu einer Überquantifizierung der Metaboliten führen. Dies kann einerseits die Überlagerung mit den Signalen anderer Substanzen oder mit restlichen breiten Proteinsignalen, welche auch bei Verwendung von CPMG-Experimenten nie vollständig unterdrückt werden können, sein (siehe Abbildung 11.1 und Tabelle 11.1). Aufgrund der Überlagerungen von Resonanzsignalen verschiedener Substanzen wurden häufig nur einzelne Bereiche der Signale integriert. Dies ist in Abbildung 11.4 anhand des Glutamat-Signals erkennbar, welches teilweise vom Pyruvat-Signal überdeckt wird. Folglich stellt bei der Berechnung über einen internen Standard nach Formel 2.11 das Ermitteln der Anzahl der Kerne N , die den jeweiligen Bereich des Signals im ^1H -NMR-Spektrum erzeugen, eine weitere Schwierigkeit und mögliche Ursache für eine mangelnde Präzision bei der Quantifizierung dar. Die Erstellung von Kalibrierfunktionen für alle Substanzen bietet grundsätzlich den Vorteil, dass Relaxationseffekte, sowohl bezüglich der T_1 - als auch der T_2 -Zeit, nicht beachtet werden müssen. Diese Methode ist aber deutlich aufwendiger als die Verwendung eines internen Standards, da jede Substanz einzeln kalibriert werden muss. Außerdem sind bei Änderung der Messparameter oder Probenmatrix die ursprünglichen Kalibrierfunktionen nur bedingt übertragbar. Dabei ist ein großer Vorteil der ^1H -NMR-Spektroskopie gegenüber anderen analytischen Methoden wie der Massenspektrometrie oder chromatographischen Methoden gerade die Möglichkeit der einfachen und schnellen Quantifizierung aller in einer Mischung enthaltenen Substanzen über einen internen Standard. Damit dies auch zukünftig möglich ist, sollten zusätzliche Versuche zur Etablierung dieser Methode durchgeführt werden. Diese sollten Messungen zur Bestimmung der T_1 -Zeit aller Substanzen beinhalten, um zu untersuchen, ob eine $D1$ -Zeit von zehn Sekunden tatsächlich ausreichend für eine vollständige

Relaxation ist. Um den Einfluss von Proteinen zu minimieren, könnten diese während der Probenpräparation durch Ultrafiltration oder Präzipitation abgetrennt werden. Dies stellt jedoch immer einen erheblichen Aufwand dar und kann darüber hinaus auch zu einer Abtrennung von kleinen, potenziell biologisch relevanten, Molekülen führen.^[17, 412] Stattdessen könnte zukünftig auch ein interner Standard eingesetzt werden, der nicht mit Proteinen im Medium interagiert. Dafür kann beispielsweise DSA (4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-Ammoniumtrifluoracetat)^[456] oder Maleinsäure^[17, 413] verwendet werden. Um zu überprüfen, ob die enthaltenen Metaboliten an die im FBS enthaltenen Proteine binden, sollten Messungen zur Bestimmung der T_2 -Zeit ohne sowie mit FBS durchgeführt werden. Sofern notwendig, könnten sowohl T_1 - als auch T_2 -Korrekturfaktoren, wie von Bharti *et al.*^[453] oder Wallmeier *et al.*^[412] vorgeschlagen, angewendet werden. Um die Bindung von kleinen Molekülen an Proteine zu verringern, könnten darüber hinaus auch höhere Konzentrationen an TSP, welches aufgrund der höheren Affinität als Bindungsinhibitor wirkt, zugegeben werden. Dafür wurden in der Literatur, im Gegensatz zu der hier eingesetzten Konzentration von 0.46 mmol/l fast 10-fach höhere Werte im Bereich von 3–4 mmol/l vorgeschlagen.^[413, 415] Zur Bestimmung der benötigten TSP-Konzentration sowie der Validierung dieser Methode wären Titrationsversuche mit TSP notwendig.

Das Einteilen der Spektren in definierte Bereiche, sogenannte *buckets*, welche anschließend integriert werden, ist immer noch eine häufig verwendete Methode bei Metabolomik-Studien. Allerdings führt bei diesem Ansatz, wie zuvor beschrieben, die Überlagerung von Resonanzsignalen zu einer fehlerhaften Quantifizierung. Die Differenzierung der Resonanzen verschiedener Substanzen könnte in Zukunft durch sogenannte Dekonvolutions-Methoden erreicht werden. Da diese immer noch eine große Herausforderung darstellen, werden aktuell immer neue Methoden entwickelt.^[37, 39, 40]

Zum aktuellen Zeitpunkt wurden noch für keine der Methoden Validierungsparameter wie Präzision oder Richtigkeit bestimmt, weshalb der Fehler bei der Konzentrationsbestimmung nicht abgeschätzt werden kann. Ein Vergleich mit den Herstellerangaben für das RPMI-Medium zeigt jedoch plausible Werte für die ermittelten Konzentrationen (Tabelle 11.1). Um bei zukünftigen Studien eine möglichst hohe Genauigkeit der Quantifizierung zu erhalten, sollten diese Validierungsparameter für die in Zukunft angewendete Methode bestimmt werden.

11.3.2 Beurteilung der Reproduzierbarkeit

Die quantitativen Ergebnisse einzelner Proben können aufgrund verschiedener Faktoren wie biologischer Variation oder auch technischer Variation bei der Zellkulturtechnik, der Vorbereitung und Lagerung der Proben sowie dem analytischen Prozess erheblich voneinander abweichen. Im Folgenden soll daher die Reproduzierbarkeit der Methode anhand der Variabilität zwischen den technischen Replikaten betrachtet werden. Die technischen Replikate bezeichnen dabei die in verschiedenen Kavitäten der Kulturplatte parallel inkubierten Ansätze derselben Ausgangsprobe, von welchen ebenfalls gesondert ^1H -NMR-Spektren aufgenommen wurden. Als Maß für die Reproduzierbarkeit wurde der Variationskoeffizient, oder die relative Standardabweichung, herangezogen, welcher als Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert berechnet wird und in Prozent angegeben ist.^[457] Die Reproduzierbarkeit NMR-spektroskopischer Messungen ist stark vom Signal-zu-Rausch Verhältnis (vergleiche Kapitel 2.1.3) der einzelnen Resonanzsignale abhängig, welches durch die Anzahl an Scans beeinflusst wird. Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit werden die Daten aus Kapitel 11.2 herangezogen. Trotz der abweichenden Messparameter ist die Reproduzierbarkeit der Daten in Kapitel 11.1 ($NS = 32$ und $L4 = 60$ gegenüber $NS = 64$ und $L4 = 134$) annähernd vergleichbar.

Sowohl im Kontrollmedium als auch bei Inkubation von Zellen beträgt der Variationskoeffizient zwischen den drei technischen Replikaten bei allen *buckets* mit einem Signal-zu-Rausch Verhältnis von über 30 weniger als 5 %. Bei *buckets* mit einem Signal-zu-Rausch Verhältnis zwischen 10 und 30 können Variationskoeffizienten von bis zu 10 % beobachtet werden. Bei den Signalen von Threonin, Hydroxyprolin und Allantoin, welche ein Signal-zu-Rausch Verhältnis kleiner 20 besitzen und gleichzeitig Nachbarresonanzen des spezifisch unterdrückten Wassersignals sind, ist ein deutlicherer Unterschied zwischen den technischen Replikaten erkennbar, hier beträgt der Variationskoeffizient bis zu 30 %. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Variation durch den Einfluss von Sättigungseffekten der Wasserunterdrückung zustande kommt, welche zwischen den einzelnen NMR-Messungen aufgrund eines etwas unterschiedlichen *shims* variieren können und sich bei Signalen mit einem kleinen Signal-zu-Rausch Verhältnis besonders stark bemerkbar machen. Auch bei Fumarat, Malat und Tryptophan ($\text{SNR} < 10$) beträgt der Variationskoeffizient über 30 %. Diese Werte sind unabhängig von der Inkubationsdauer

sowie der eingesetzten LPS-Konzentration. In Abbildung 11.22 (unten) ist beispielhaft für Valin (SNR > 30) bei Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS die Konzentrationen in den einzelnen Proben (links) sowie der Variationskoeffizient der jeweiligen technischen Replikate (Mitte) dargestellt.

Im Gegensatz zu der zuvor dargelegten hohen technischen Reproduzierbarkeit für die Mehrzahl der Substanzen, nimmt der Variationskoeffizient der technischen Replikate für Glucose und Lactat mit der Inkubationsdauer auf über 30 % zu (Abbildung 11.22 oben und in der Mitte). Auch hier konnten bei allen LPS-Konzentrationen zwar ähnliche Verläufe beobachtet werden, allerdings weist der Variationskoeffizient bei der hier dargestellten Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS die größten Werte auf (vergleiche Anhang, Abbildung A.6).

Ein Vergleich mit Literaturwerten zeigt, dass die beobachteten Abweichungen zwischen den technischen Replikaten (außer bei Glucose und Lactat) das Maß der durch die Messmethode erwarteten Unterschiede nicht übersteigen^[457, 458] und somit im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchung von einer hohen Reproduzierbarkeit der Zellkulturversuche gesprochen werden kann. Ein größerer Variationskoeffizient zwischen den technischen Replikaten, wie im Falle von Glucose und Lactat, kann beispielsweise durch eine abweichende Zellzahl oder auch Verunreinigungen einzelner Proben zustande kommen. Mit zunehmender Dauer der Inkubation können sich diese Effekte dann verstärken. Dabei ist erstaunlich, dass eine so große Variation zwischen den technischen Replikaten nur für Glucose und Lactat beobachtet werden konnte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die aerobe Glykolyse bereits bei unstimulierten Zellen der aktivste Stoffwechselweg ist (vergleiche Kapitel 11.1.6) und bei Stimulation mit LPS nochmals hochreguliert wird (vergleiche Kapitel 11.2.4). Dadurch könnten die zuvor genannten Faktoren bei diesen Substanzen deutlichere Schwankungen zwischen den technischen Replikaten verursachen als bei den Metaboliten weniger aktiver Stoffwechselwege.

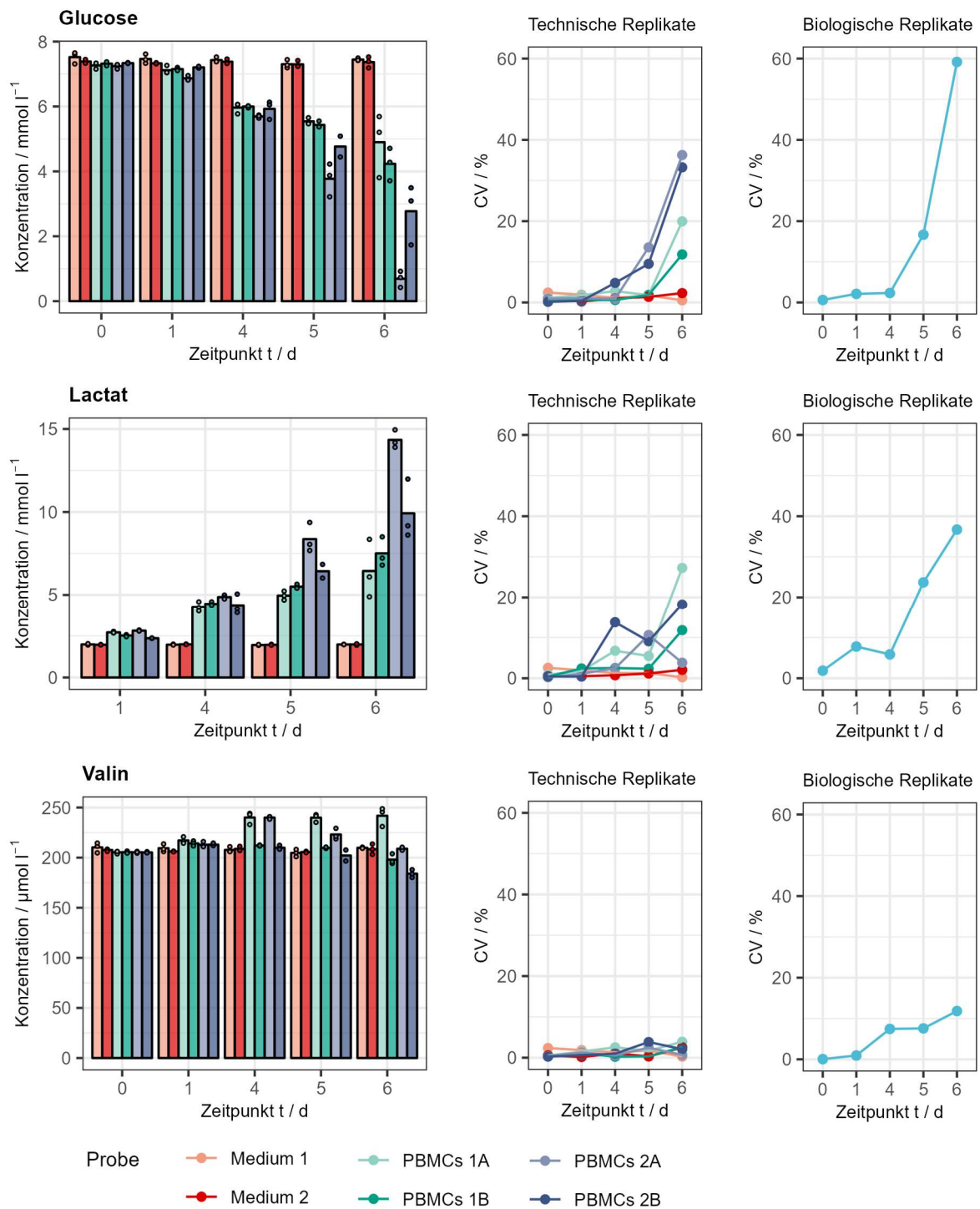


Abbildung 11.22: Reproduzierbarkeit der Messwerte für Glucose, Lactat und Valin bei Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS. Valin ist repräsentativ für eine Vielzahl anderer Substanzen dargestellt. Links: Berechnete Konzentrationen für die Kontrollmedien sowie die Proben mit PBMCs vier verschiedener Spender (1A–2B). Die Punkte stellen die technischen Replikate, die Balken die jeweiligen Mittelwerte dar. Mitte: Variationskoeffizient (CV) der technischen Replikate. Rechts: CV der biologischen Replikate für die Proben mit PBMCs.

Neben der Variation zwischen den technischen Replikaten wurde auch die Variation zwischen den biologischen Replikaten, also den PBMCs verschiedener Spender, verglichen (siehe Abbildung 11.22, rechts). Für alle Substanzen nehmen die Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten mit der Inkubationsdauer zu, wodurch der Variationskoeffizient (außer bei Glucose und Lactat) einen maximalen Wert von 10 % erreicht. Im Falle von Glucose und Lactat ist der Unterschied zwischen den PBMCs verschiedener Spender deutlicher zu sehen. Bei Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS steigt der Variationskoeffizient nach dem vierten Inkubationstag stark an und beträgt nach sechs Tagen knapp 40 % für Lactat und 60 % für Glucose. Bei den anderen LPS-Konzentrationen sind wiederum ähnliche Verläufe zu beobachten, wobei bei der Referenz ohne LPS sowie Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS der Variationskoeffizient die größten Werte aufweist (Anhang, Abbildung A.7).

Die beobachteten Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten sind, außer bei Glucose und Lactat, mit maximal 10 % im Vergleich zu Literaturwerten ebenfalls gering, was auf eine gute Vergleichbarkeit der Zellen verschiedener Spender hinweist.^[457] Die geringe Variation zwischen den biologischen Replikaten könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen aufgrund individueller Faktoren der Spender wie Gesundheitszustand, Ernährungsweise, Fitness, einer Infektion oder Medikamenteneinnahme unterschiedlich geprägt sind und daher unterschiedliche Reaktionen zeigen. Diese Effekte können sich mit zunehmender Dauer der Inkubation verstärken. Im Falle von Glucose und Lactat könnte sich diese unterschiedliche Prägung der Zellen verschiedener Spender bei der hohen Rate der Glykolyse deutlicher bemerkbar machen als bei anderen Stoffwechselwegen. In einer Studie von Vrieling *et al.*^[459] wurde die Variation der glykolytischen Aktivität zwischen den PBMCs verschiedener Individuen unter anderem nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml) untersucht. Dabei konnten deutliche Unterschiede zwischen den Individuen festgestellt werden, welche auf einen unterschiedlichen Anteil der Monozyten-Fraktion (etwa 10–50 %) zurückgeführt wurden. Das Alter sowie der BMI dagegen hatten nur einen geringen Einfluss auf die glykolytische Rate.^[459] Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der glykolytischen Aktivität und der Zellzahl zu untersuchen, sollte bei zukünftigen Versuchen ebenfalls die Zellzahl, insbesondere der Anteil der Monozyten zu den einzelnen Zeitpunkten bestimmt werden.

Wie zuvor bereits erwähnt, ist der Variationskoeffizient von Glucose und Lactat sowohl zwischen den technischen als auch den biologischen Replikaten bei einer LPS-Konzentration von 0.001 ng/ml am größten. Dies könnte darauf hinweisen, dass in diesem Konzentrationsbereich die Grenze liegt, ab welcher die Zellen einen inflammatorischen Zustand ausbilden und manche Zellen bereits stärker reagieren als andere (vergleiche auch Kapitel 11.2.4).

Abschließend kann gesagt werden, dass für die vorliegenden Messwerte ein Variationskoeffizient zwischen den technischen Replikaten von bis zu 10 %, welcher hier in der Regel mit einem Signal-zu-Rausch Verhältnis von über 10 korreliert, wie auch häufig in der Literatur als tolerierbar angesehen wird.^[15] Bei einem niedrigen Signal-zu-Rausch Verhältnis kann, methodisch bedingt, eine gewisse Abweichung der Messwerte nicht verhindert werden. Eine Vergrößerung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses und somit eine Verringerung des Variationskoeffizienten könnte durch eine Erhöhung der Anzahl an Scans verbessert werden (vergleiche Kapitel 2.1.3, Formel 2.10). Da für eine Verdopplung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses die vierfache Anzahl an Scans notwendig ist, hätte dies jedoch sehr lange Messzeiten von mehreren Stunden pro Probe zur Folge. Dies ist bei der Messung einer großen Anzahl an Proben, wie es bei Metabolomik-Studien normalerweise der Fall ist, jedoch nicht einfach umsetzbar. Folglich werden Fumarat, Malat, Tryptophan, Threonin, Hydroxyprolin und Allantoin aufgrund der zuvor beschriebenen Messunsicherheit im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter betrachtet. Aufgrund der zuvor diskutierten deutlichen Variation zwischen den technischen (Variationskoeffizient von etwa 30 %) sowie den biologischen Replikaten (Variationskoeffizient von bis zu 60 %) im Falle von Glucose und Lactat nach sechs Tagen kann geschlussfolgert werden, dass bei dieser Inkubationsdauer keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden können.

11.3.3 Statistische Datenauswertung

Die in Kapitel 11.1 dargestellten Ergebnisse beruhen auf nur einer Versuchsdurchführung mit den Blutzellen eines einzigen Individuums. Da es sich bei den einzelnen Messwerten folglich nur um technische Replikate handelt, wurde für diese Daten keine statistische Auswertung durchgeführt.^[460] Ein Vergleich mit den in Kapitel 11.2 dargestellten Ergebnisse sowie die im vorherigen Abschnitt dargelegte hohe Reproduzierbarkeit der Zellkulturtechnik und der biologischen Replikate lässt dennoch auf eine hohe Allgemeingültigkeit der Beobachtungen schließen.

Um zu analysieren, ob sich der Effekt der LPS-Stimulation zwischen den einzelnen Zeitpunkten unterscheidet, wurde in Kapitel 11.2.2 für jeden Metaboliten eine Zweiweg-ANOVA mit Messwiederholungen (engl.: *two-way repeated-measures ANOVA* oder *two-way within-subjects ANOVA*) durchgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl an Proben konnten jedoch notwendige Annahmen wie eine Normalverteilung der Daten, das Fehlen von Ausreißern sowie die Spherizität der Daten nicht aussagekräftig getestet werden.^[56, 461] Eine mögliche Verletzung dieser Annahmen kann eine geringe statistische Aussagekraft zur Folge haben. Anschließend wurde zu jedem Zeitpunkt mit einem gepaarten *t*-Test mit FDR-Korrektur ein Vergleich der einzelnen LPS-Konzentrationen mit der Referenz ohne LPS durchgeführt. Auch dabei ist die statistische Aussagekraft aufgrund der kleinen Stichprobengröße gering.^[184] Folglich sollten für eine höhere statistische Aussagekraft die hier durchgeführten Versuche mit den PBMCs einer größeren Anzahl an Individuen wiederholt werden.

11.3.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die in diesem Kapitel erörterten Aspekte weisen bereits auf eine gute Qualität der technischen Durchführung hin. Insbesondere zeigen die Ergebnisse, sofern die Dauer der Kultivierung auf fünf Tage begrenzt wird, eine hohe technische und biologische Reproduzierbarkeit der verwendeten Methode. Für eine höhere statistische Aussagekraft wäre jedoch eine größere Anzahl biologischer Replikate notwendig. Darüber hinaus sollte auch die Genauigkeit der Quantifizierung noch verbessert werden. Die Bestimmung absoluter Konzentrationen erfolgte in den einzelnen Versuchen anhand verschiedener Methoden, entweder über Kalibriergeraden oder einen internen Standard. Für die endgültige Etablierung des Systems sollten die Vor- und Nachteile dieser Methoden abgewogen und Validierungsparameter wie Präzision und Richtigkeit bestimmt werden. In diesem Kontext führen auch die im FBS enthaltenen Proteine zu verschiedenen Schwierigkeiten. Der dadurch entstehende Proteinuntergrund im NMR-Spektrum kann zu einer Überquantifizierung von Stoffen führen, während eine mögliche Interaktion der Substanzen mit den Proteinen eine Unterquantifizierung zur Folge haben kann. Allerdings ist eine Substitution des FBS nicht einfach möglich, da es viele teilweise unbekannte Faktoren, die für das Überleben und die Funktion der Zellen notwendig sind, enthält. Ein möglicher Lösungsansatz wäre eine Abtrennung der Proteine vor der Aufnahme der NMR-Experimente. Ebenso könnte eine Unterquantifizierung möglicherweise durch die Zugabe einer höheren Menge an TSP als Bindungsinhibitor verhindert werden. Eine weitere Problematik stellt die Überlagerung von Resonanzsignalen dar, welche ebenfalls zu einer fehlerhaften Quantifizierung führen kann. Hierbei könnten in Zukunft Dekonvolutions-Methoden genutzt werden, welche die Differenzierung der Resonanzen verschiedener Substanzen ermöglichen.

12. Material und Methoden

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen sowie die ELISA-Tests wurden am Max Rubner-Institut (MRI) in Karlsruhe in der Gruppe von Dr. Manuel Rodriguez Gomez (Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung – Labor Immunologie) entweder von Lara Stahl oder von B.Sc. Franziska Dopp im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Alle zellkulturtechnischen Arbeiten erfolgten unter antiseptischen Bedingungen.

12.1 Isolation und Kultur von PBMCs

Das zur Isolation von PBMCs verwendete Leukozytenkonzentrat, auch *Buffy Coat* genannt, wurde von der Blutspendezentrale des Städtischen Klinikums Karlsruhe mit freundlicher Unterstützung von Dr. med. Klaus-Dieter Knoblauch und seinem Team anonym erworben. Das abgenommene Blut wurde zunächst mit der Stabilisatorlösung CPD-A vermischt. Anschließend wurde das Vollblut durch Zentrifugation in Plasma, Leukozytenkonzentrat und Erythrozyten unterteilt und das Leukozytenkonzentrat bei Raumtemperatur für bis zu 24 h aufbewahrt.

Aus dem Leukozytenkonzentrat wurde am MRI die PBMC-Fraktion mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierzu wurden 20 ml Leukozytenkonzentrat mit 20 ml PBS-Lösung (PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , Art. Nr.: 882126-12, *Lonza Group AG*, Basel, Schweiz) bei Raumtemperatur gemischt. Anschließend wurden zweimal 20 ml Lymphozyten-Separationsmedium (*Lymphosep*, *Biowest*, Nuaille, Frankreich) mit jeweils 20 ml des verdünnten Leukozytenkonzentrats überschichtet. Im Anschluss wurde bei 700 g und 20 °C für 20 min zentrifugiert, wobei die Beschleunigung sowie das Bremsen langsam ausgeführt wurden. Die Phase der PBMCs wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und dreimal durch Resuspension in 30 ml PBS-Lösung, Zentrifugation bei 300 g und 20 °C für 10 min und Absaugen des Überstandes gewaschen. Danach wurde das Zellpellet in 10 ml RPMI-Medium (*BioWhittaker™ RPMI-1640* mit L-Glutamin und ohne Glucose (Katalognummer BE12-752, *Lonza Group AG*, Basel, Schweiz)) supplementiert mit 10 % FBS (Herkunft Südamerika, Cat No. S1810, *Biowest*, Nuaille, Frankreich; inaktiviert bei 56° C für 30 min) und 1.25 g/l Glucose (*Gibco™* Glucose-Lösung 200 g/L, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit einem *LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter* (*Logos Biosystems*, Südkorea) bestimmt und auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Jeweils 1.2×10^6 Zellen (600 µl

der Lösung) wurden in die einzelnen Kavitäten von Mikrotiterplatten (*Cellstar*[®] Multiwellplatte mit hydrophober Oberfläche für Suspensionskultur, 48 Well, *Greiner Bio-One GmbH*, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ über einen Zeitraum von sechs Tagen. Vor Beginn der eigentlichen Inkubation und Stimulation der Zellen wurde eine Ruhephase von einem Tag mit anschließendem Wechsel des Mediums eingehalten. Für den Wechsel des Mediums wurden die Zellkulturplatten bei 300 g und 20 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl des alten Mediums entfernt und 500 µl frisches Medium hinzugegeben. Dabei wurde, abhängig von der Versuchsdurchführung, zusätzlich eine definierte Menge an LPS zur Stimulation der Zellen hinzugegeben. Für jede Probe wurden fünf technische Replikate in einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte angesetzt, wobei jeweils drei Replikate später für ¹H-NMR-spektroskopische Messungen und zwei Replikate für weitere Analysen wie ELISAs verwendet wurden. Zudem wurden für jede Probe parallele Ansätze in separaten Zellkulturplatten hergestellt, sodass für jeden Analysezeitpunkt eine Platte zur Verfügung stand. Alle 24 h sowie vor und nach dem Wechsel des Mediums wurden Proben entnommen. Dafür wurde die jeweilige Platte bei 300 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um die suspendierten Zellen abzutrennen, 500 µl des Überstandes abgenommen und bei -20 °C, beziehungsweise im Falle der Proben für die NMR-spektroskopischen Messungen bei -80 °C, eingefroren.

Für den in Kapitel 11.1 betrachteten Versuch wurden die PBMCs aus dem Blut eines männlichen, gesunden Spenders gewonnen, über welchen keine genaueren Informationen vorliegen. Die Isolation der PBMC-Fraktion sowie die Kultivierung erfolgte wie zuvor beschrieben, wobei die Zellen nicht mit LPS stimuliert wurden. Analog dazu wurde parallel RPMI-Medium mit 1.25 g/l Glucose sowie RPMI-Medium mit 1.25 g/l Glucose und 10 % FBS inkubiert, wobei in beiden Fällen keine PBMCs zugegeben wurden.

Für den in Kapitel 11.2 durchgeführten Versuch wurden die PBMCs aus dem Blut vier männlicher, gesunder Spender mit einem BMI zwischen 20.2 und 25.0 und einem Geburtsjahr zwischen 1987 und 1997 gewonnen. Die PBMCs aller Spender wurden mit LPS-Konzentrationen von 0, 0.001, 0.005, 0.025 und 0.1 ng/ml stimuliert (Lipopolysaccharid aus *Escherichia coli* O55:B5, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) wobei die PBMCs zweier Spender jeweils parallel inkubiert wurden (als 1A und 1B sowie 2A und 2B bezeichnet). Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 11.1.3 wurde bei jeder der zwei

Versuchsdurchführungen parallel RPMI-Medium mit 1.25 g/l Glucose und 10 % FBS ohne PBMCs als Blindwert inkubiert, welches als Kontrollmedium bezeichnet wird. Außerdem wurden aufgrund der in Kapitel 11.1.3 festgestellten Verdunstung des Mediums in den äußeren Kavitäten der Mikrotiterplatten während der Inkubation die Kavitäten um die Proben als Verdunstungsschutz mit PBS-Lösung befüllt. Bei diesem Versuch wurden nur Proben zu Beginn der Inkubation sowie nach einem, vier, fünf und sechs Tagen entnommen.

12.2 ELISA-Tests

Mittels Sandwich-ELISA wurde die extrazelluläre Konzentration der Zytokine IL-6 und IL-8 bestimmt (*ELISA MAX™ Standard Set Human IL-6* und *ELISA MAX™ Standard Set Human IL-8*, *BioLegend*, San Diego, CA, USA). Die Assays wurden entsprechend der vom Hersteller angegebenen Protokolle durchgeführt. Die Absorptionsmessungen wurden in einem Photometer (*Molecular Devices Thermomax Mikrotiterplatten-Photometer*, *MWG Biotech*, Ebersberg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur bei 570 nm durchgeführt.

12.3 ¹H-NMR-Messungen

Für die ¹H-NMR-Messungen wurden die Proben für 30 min aufgetaut und anschließend gevortext. 350 µl der Proben wurden mit 350 µl Phosphatpuffer (70 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ in 80 % H₂O und 20 % D₂O mit 0.46 mM TSP als interne Referenz und 6.1 mM NaN₃, pH 7.4) gemischt. Anschließend wurde die Lösung für 5 min bei 16060 g und 4 °C zentrifugiert. 600 µl des Überstands wurden in ein 5 mm NMR-Röhrchen überführt (*Boroeco-5-7*, *Deutero GmbH*, Kastellaun, Deutschland) und anschließend mittels ¹H-NMR-Spektroskopie analysiert. Die Reproduzierbarkeit der NMR-spektroskopischen Messungen wurde anhand von Qualitätskontrollproben sichergestellt, die vier üblicherweise in Zellmedien vorkommende Metaboliten enthielten (Glucose, Valin, Phenylalanin und Arginin) und im gleichen Phosphatpuffer hergestellt wurden, mit dem auch die Zellmedien gemischt wurden. Aliquots dieser Proben wurden bis zur Messung, die einmal pro Tag durchgeführt wurde, bei -25 °C aufbewahrt.

Alle NMR-Spektren wurden auf einem 600 MHz *Bruker Avance II+* Spektrometer mit ^1H -BBI Probenkopf (*Bruker BioSpin GmbH*, Rheinstetten, Deutschland) bei 300 ± 0.05 K aufgenommen. Es wurden eindimensionale CPMG-Experimente (*Bruker* Pulssequenz *cpmgpr1d*) aufgenommen, bei welchen ein Spin-Echo-Element als T_2 -Filter angewendet wird, um Signale von Makromolekülen zu unterdrücken. Die Spektren wurden mit 32 (Kapitel 11.1) beziehungsweise 64 (Kapitel 11.2) Scans (Parameter *NS*) und 64k Datenpunkten bei einer spektralen Breite von 20 ppm aufgenommen. Das Spin-Echo-Element wurde 60 (Kapitel 11.1) beziehungsweise 134 (Kapitel 11.2) Mal wiederholt (Parameter *L4*) mit einer Echozeit von jeweils 300 μs . Es wurde eine Relaxationsverzögerung (Parameter *D1*) von 10 s verwendet, was zusammen mit der Akquisitionszeit von 2.73 s eine Repetitionszeit von 12.73 s ergibt. Der *receiver gain* wurde für alle Messungen auf 90.5 festgelegt. Die Wasserunterdrückung wurde durch Vorsättigung mit einem selektiven Puls mit einer Feldstärke von 25 Hz erreicht. Vor der Fourier-Transformation wurden die Spektren mit einer Exponentialfunktion mit einem Linienverbreiterungsfaktor von 0.3 Hz multipliziert. Es wurde eine automatische Referenzierung der chemischen Verschiebung auf das interne TSP sowie eine automatische Phasenkorrektur durch Verwendung des *Bruker* AU Programms *apk0* und eine automatische Basislinienkorrektur durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte über die *Bruker*-Automationssoftware *IcnNMR*, die Prozessierung der Spektren über verschiedene Versionen der *Bruker*-Software *Topspin*.

12.4 Identifizierung von Metaboliten

Die Identifizierung und Zuordnung der Metaboliten erfolgte mit Hilfe der *Human Metabolome Database* (HMDB)^[20] sowie der Evaluierungsversion der Software *Chenomx NMR Suite 9.0* (*Chenomx*, Edmonton, Kanada). Zusätzlich zu den ^1H -NMR-Spektren wurden dafür zweidimensionale NMR-Spektren von nicht inkubiertem RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie einer Probe mit unstimulierten PBMCs nach einer Inkubationsdauer von vier Tagen aufgenommen. Von allen drei Proben wurde ein ^1H - ^{13}C -HSQC-Experiment, von der Probe mit Zellen zusätzlich ein ^1H - ^1H -COSY-Experiment sowie ein ^1H -JRES-Experiment aufgenommen. Die Signalpositionen der jeweiligen Substanzen wurden mit Hilfe des sogenannten *spikens* verifiziert. Dabei werden geringe Mengen der jeweiligen Substanzen zu repräsentativen, zuvor

bereits mittels ^1H -NMR analysierten Proben zugegeben und im Anschluss erneut Spektren aufgenommen.

12.5 Bestimmung absoluter Konzentrationen

Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit *MestReNova 14.2* (*Mestrelab Research S.L.*, Santiago de Compostela, Spanien) manuell in Bereiche, sogenannte *buckets* eingeteilt. Dabei wurden die Grenzen so gewählt, dass jedes *bucket* möglichst nur die Resonanzen einer Substanz umfasst. Anschließend wurden die Integrale der *buckets* mit Hilfe des *MestReNova Chemometrics* Moduls exportiert. Für die Umrechnung der Integrale in Konzentrationen wurden verschiedene Methoden angewendet. Für die Proben in reinem RPMI-Medium ohne Zugabe von FBS wurde das in einer definierten Konzentration zum Phosphatpuffer zugegebene TSP als interner Standard für die Berechnung der Substanz-Konzentrationen verwendet (vergleiche Formel 2.11). Um den Effekt der Relaxation zu untersuchen, wurde zusätzlich ein Experiment mit einer *D1*-Zeit von 60 s durchgeführt.

Für Proben mit FBS kann, aufgrund der Wechselwirkung zwischen TSP und den Proteinen im FBS, diese Methode nicht angewendet werden. Aus diesem Grund wurden für die in Kapitel 11.2 analysierten Proben für den Großteil der Substanzen über ^1H -NMR-Messungen Kalibriergeraden erstellt. Dafür wurde RPMI-Medium mit 10 % FBS 1:1 mit Phosphatpuffer gemischt, welchem definierte Konzentrationen der jeweiligen Substanzen zugegeben wurden. Für Glucose, Lactat und Pyruvat wurde eine 8-Punkt-Kalibrierung mit Triplikaten durchgeführt. Für alle weiteren Substanzen wurde eine 5-Punkt-Kalibrierung mit Einzelmessungen durchgeführt. Es wurde jeweils für mehrere Substanzen gemeinsam eine Kalibrierlösung angesetzt. Die verwendeten Kalibrierlösungen mit den eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 12.1 dargestellt. Da die verwendete Matrix nicht frei von Analyten war, wurde eine Hintergrundsubtraktion durchgeführt, wie in der Literatur für massenspektrometrische Messungen beschrieben.^[454] Dafür wurde für jedes *bucket* der Integralwert der Ausgangsprobe von den Integralwerten der hinzugefügten Standards abgezogen. Die subtrahierten Integralwerte wurden anschließend zur Erstellung der Kalibriergeraden in *OriginPro 2023* (*OriginLab Corporation*, Northampton, MA, USA) verwendet. Zur Beurteilung der Güte der Kalibriergeraden wurden die in Origin berechneten Werte für den

Korrelationskoeffizienten R , das Bestimmtheitsmaß R^2 sowie die Reststandardabweichung herangezogen. Anhand der Reststandardabweichung wurde außerdem der Verfahrensvariationskoeffizient berechnet.^[35]

Tabelle 12.1: Verwendete Kalibrierlösungen mit Konzentrationsbereich der Substanzen. Die Konzentrationen beziehen sich auf die zugegebene Menge vor 1:1 Verdünnung mit Phosphatpuffer. Für Glucose, Lactat und Pyruvat wurde eine 8-Punkt-Kalibrierung mit Triplikaten durchgeführt. Für alle weiteren Substanzen wurde eine 5-Punkt-Kalibrierung mit Einzelmessungen durchgeführt.

Probe	Substanzen	Konzentrationsbereich in $\mu\text{mol l}^{-1}$
1	Glucose	0–14 010
	Lactat	0–30 230
	Pyruvat	0–516.6
2	Arginin	0–1 784
	Glutamin	0–2 342
3	Aspartat	0–251.1
	Alanin	0–291.6
	Histidin	0–139.1
	Leucin	0–378.4
4	Glycin	0–226.1
	Lysin	0–225.9
	Methionin	0–133.4
	Asparagin	0–394.2
5	Glutamat	0–250.5
	Serin	0–290.8
	Isoleucin	0–435.0
	Ornithin	0–305.7
6	Phenylalanin	0–100.5
	Prolin	0–169.0
7	Valin	0–203.5
8	Cholin	0–39.25
	Citrat	0–42.11
	Kreatin	0–40.92

Die Konzentration von Substanzen, für die keine Kalibrierfunktion erstellt wurde, wurde ebenfalls nach Formel 2.11 berechnet. Diese Substanzen umfassen Pyroglutamat, Cystin, Myo-Inositol, Fructose, Tyrosin und Formiat. Als Referenz diente dabei Valin mit der über die Kalibrierfunktion bestimmten Konzentration. Um den Effekt der Relaxation zu untersuchen, wurde analog zum reinen RPMI-Medium zusätzlich ein Experiment mit einer $D1$ -Zeit von 60 s durchgeführt.

Da die in Kapitel 11.1 analysierten Proben mit anderen Messparametern aufgenommen wurden, können die Kalibrierfunktionen in diesem Fall nicht direkt für die Bestimmung der Konzentrationen verwendet werden. Aus diesem Grund wurden Experimente mit den unterschiedlichen Messparametern ($NS = 32$ und $L4 = 60$ beziehungsweise $NS = 64$ und $L4 = 134$) durchgeführt und anhand der gemessenen Integralwerte ein Umrechnungsfaktor berechnet.

12.6 Datenauswertung

Da für jede Probe dieselbe Zellzahl sowie das dasselbe Volumen an Zellkulturmedium verwendet wurde, wurden die Daten vor der Auswertung nicht normalisiert. Des Weiteren wurden die Daten nicht skaliert.

Die Visualisierung der Daten erfolgte mit den *R*-Paketen *tidyverse* und *ggpubr* (*R* Version 4.3.0 und *RStudio* Version 2023.03.0+386, *Posit PBC*). Die statistische Auswertung der Daten in Kapitel 11.2.2 erfolgte mittels einer Zweiweg-ANOVA mit Messwiederholungen (*two-way repeated-measures* ANOVA oder *two-way within-subjects* ANOVA) mithilfe des *R*-Paketes *rstatix* entsprechend des Programmiergerüsts von Kassambara.^[461] Dafür wurde angenommen, dass die Daten normalverteilt sind, was jedoch aufgrund der geringen Probenanzahl nicht formell getestet wurde. Aus demselben Grund wurden ebenfalls keine Daten als Ausreißer von der Analyse ausgeschlossen. Die Daten wurden mithilfe des Mauchly-Tests auf Sphärizität getestet. Bei einer Verletzung der Sphärizität ($p < 0.05$) wurde eine Greenhouse-Geisser Korrektur angewendet. Anschließend wurde zu jedem Zeitpunkt mit einem gepaarten *t*-Test mit FDR-Korrektur ein Vergleich der einzelnen LPS-Konzentrationen mit der Referenz ohne LPS durchgeführt.

Als Maß für die Reproduzierbarkeit wurde der Variationskoeffizient, oder die relative Standardabweichung, herangezogen, welcher als Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert berechnet wird und in Prozent angegeben ist.^[457] Das Signal-zu-Rausch Verhältnis der *buckets* wurde über *NMRProcFlow 1.4* (*INRA UMR 1332 BFP, Bordeaux Metabolomics Facility, Frankreich*) erhalten.^[462]

Literaturverzeichnis

- [1] J. K. Nicholson, J. C. Lindon, E. Holmes. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, *Xenobiotica* **1999**, 29, 1181–1189.
- [2] O. Fiehn. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks, *Comp. Funct. Genomics* **2001**, 2, 155–168.
- [3] D. S. Wishart. Proteomics and the human metabolome project, *Expert Rev. Proteomics* **2007**, 4, 333–335.
- [4] J. K. Nicholson, J. C. Lindon. Systems biology: Metabonomics, *Nature* **2008**, 455, 1054–1056.
- [5] D. S. Wishart. NMR metabolomics: A look ahead, *J. Magn. Reson.* **2019**, 306, 155–161.
- [6] J. L. Bock. Analysis of serum by high-field proton nuclear magnetic resonance, *Clin. Chem.* **1982**, 28, 1873–1877.
- [7] J. K. Nicholson, M. J. Buckingham, P. J. Sadler. High resolution ¹H NMR studies of vertebrate blood and plasma, *Biochem. J.* **1983**, 211, 605–615.
- [8] J. R. Bales, D. P. Higham, I. Howe, J. K. Nicholson, P. J. Sadler. Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine, *Clin. Chem.* **1984**, 30, 426–432.
- [9] J. Trygg, E. Holmes, T. Lundstedt. Chemometrics in metabonomics, *J. Proteome Res.* **2007**, 6, 469–479.
- [10] A. Aharoni, R. Goodacre, A. R. Fernie. Plant and microbial sciences as key drivers in the development of metabolomics research, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2023**, 120, e2217383120.
- [11] M. Giera, O. Yanes, G. Siuzdak. Metabolite discovery: biochemistry's scientific driver, *Cell Metab.* **2022**, 34, 21–34.
- [12] J. L. Markley, R. Brüschweiler, A. S. Edison, H. R. Eghbalnia, R. Powers, D. Raftery, D. S. Wishart. The future of NMR-based metabolomics, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, 43, 34–40.
- [13] O. Beckonert, H. C. Keun, T. M. D. Ebbels, J. Bundy, E. Holmes, J. C. Lindon, J. K. Nicholson. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 2692–2703.
- [14] A. Vignoli, V. Ghini, G. Meoni, C. Licari, P. G. Takis, L. Tenori, P. Turano, C. Luchinat. High-throughput metabolomics by 1D NMR, *Angew. Chem. Int. Ed* **2019**, 58, 968–994.
- [15] S. Kostidis, R. D. Addie, H. Morreau, O. A. Mayboroda, M. Giera. Quantitative NMR analysis of intra- and extracellular metabolism of mammalian cells: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* **2017**, 980, 1–24.
- [16] A.-H. Emwas, R. Roy, R. T. McKay, L. Tenori, E. Saccenti, G. A. N. Gowda, D. Raftery, F. Alahmari, L. Jaremko, M. Jaremko, D. S. Wishart. NMR Spectroscopy for metabolomics research, *Metabolites* **2019**, 9, 123.
- [17] N. G. Bliziotis, U. F. H. Engelke, R. L. E. G. Aspers, J. Engel, J. Deinum, H. J. L. M. Timmers, R. A. Wevers, L. A. J. Kluijtmans. A comparison of high-throughput plasma NMR protocols for comparative untargeted metabolomics, *Metabolomics* **2020**, 16, 64.

- [18] F. Castiglione, M. Ferro, E. Mavrouidakis, R. Pellitteri, P. Bossolasco, D. Zaccheo, M. Morbidelli, V. Silani, A. Mele, D. Moscatelli, L. Cova. NMR metabolomics for stem cell type discrimination, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15808.
- [19] D. S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A. C. Guo, N. Young, D. Cheng, K. Jewell, D. Arndt, S. Sawhney...L. Querengesser. HMDB: the Human Metabolome Database, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 521–526.
- [20] D. S. Wishart, A. Guo, E. Oler, F. Wang, A. Anjum, H. Peters, R. Dizon, Z. Sayeeda, S. Tian, B. L. Lee...V. Gautam. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022, *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, 622–631.
- [21] R. R. da Silva, P. C. Dorrestein, R. A. Quinn. Illuminating the dark matter in metabolomics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 12549–12550.
- [22] F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard. The nuclear induction experiment, *Phys. Rev.* **1946**, *70*, 474–485.
- [23] E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid, *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37–38.
- [24] NobelPrize.org, Nobel Prize Outreach, The Nobel Prize in Physics 1952, abgerufen am 31.08.2023, <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1952/summary/>.
- [25] R. R. Ernst, W. A. Anderson. Application of fourier transform spectroscopy to magnetic resonance, *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*, 93–102.
- [26] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 5. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [27] NobelPrize.org, Nobel Prize Outreach, The Nobel Prize in Chemistry 1991, abgerufen am 31.08.2023, <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1991/summary/>.
- [28] NobelPrize.org, Nobel Prize Outreach, The Nobel Prize in Chemistry 2002, abgerufen am 31.08.2023, <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/summary/>.
- [29] H. Schwalbe. New 1.2 GHz NMR spectrometers- new horizons?, *Angew. Chem. Int. Ed* **2017**, *56*, 10252–10253.
- [30] J. Keeler, *Understanding NMR spectroscopy*, 2. Aufl., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, **2010**.
- [31] T. D. W. Claridge, *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*, Elsevier, Amsterdam, **2016**.
- [32] S. K. Bharti, R. Roy. Quantitative ^1H NMR spectroscopy, *Trends Anal. Chem.* **2012**, *35*, 5–26.
- [33] F. Malz, H. Jancke. Validation of quantitative NMR, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 813–823.
- [34] L. Cuadros Rodríguez, A. M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment, *Anal. Lett.* **1993**, *26*, 1243–1258.
- [35] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, *Qualitätssicherung in der analytischen Chemie*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [36] P. Giraudeau, V. Silvestre, S. Akoka. Optimizing water suppression for quantitative NMR-based metabolomics: a tutorial review, *Metabolomics* **2015**, *11*, 1041–1055.
- [37] M. Vinaixa, N. Rankin, J. Everett, R. Salek. Nuclear magnetic resonance spectroscopy data processing in *Metabolomics: Practical guide to design and analysis* (Hrsg.: R. Wehrens, R. Salek), CRC Press, Boca Raton, **2019**, S. 101–128.

- [38] T. de Meyer, D. Sinnaeve, B. van Gasse, E. Tsiporkova, E. R. Rietzschel, M. L. de Buyzere, T. C. Gillebert, S. Bekaert, J. C. Martins, W. van Criekinge. NMR-based characterization of metabolic alterations in hypertension using an adaptive, intelligent binning algorithm, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3783–3790.
- [39] J. Hao, M. Liebeke, W. Astle, M. de Iorio, J. G. Bundy, T. M. D. Ebbels. Bayesian deconvolution and quantification of metabolites in complex 1D NMR spectra using BATMAN, *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 1416–1427.
- [40] N. Schmid, S. Bruderer, F. Paruzzo, G. Fischetti, G. Toscano, D. Graf, M. Fey, A. Henrici, V. Ziebart, B. Heitmann...D. Wilhelm. Deconvolution of 1D NMR spectra: A deep learning-based approach, *J. Magn. Reson.* **2023**, *347*, 107357.
- [41] A. Craig, O. Cloarec, E. Holmes, J. K. Nicholson, J. C. Lindon. Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2262–2267.
- [42] F. Dieterle, A. Ross, G. Schlotterbeck, H. Senn. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4281–4290.
- [43] R. A. van den Berg, H. C. J. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, M. J. van der Werf. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data, *BMC Genomics* **2006**, *7*, 142.
- [44] R. Wehrens, P. Franceschi. Statistics: The essentials in *Metabolomics: Practical guide to design and analysis* (Hrsg.: R. Wehrens, R. Salek), CRC Press, Boca Raton, **2019**, S. 129–156.
- [45] D. J. Benjamin, J. O. Berger, M. Johannesson, B. A. Nosek, E.-J. Wagenmakers, R. Berk, K. A. Bollen, B. Brembs, L. Brown, C. Camerer...V. E. Johnson. Redefine statistical significance, *Nat. Hum. Behav.* **2018**, *2*, 6–10.
- [46] R. L. Wasserstein, N. A. Lazar. The ASA statement on p-values: context, process, and purpose, *Am. Stat.* **2016**, *70*, 129–133.
- [47] R. L. Wasserstein, A. L. Schirm, N. A. Lazar. Moving to a world beyond “ $p < 0.05$ ”, *Am. Stat.* **2019**, *73*, 1–19.
- [48] V. Amrhein, F. Korner-Nievergelt, T. Roth. The earth is flat ($p < 0.05$): significance thresholds and the crisis of unreplicable research, *PeerJ* **2017**, *5*, e3544.
- [49] D. I. Broadhurst, D. B. Kell. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments, *Metabolomics* **2007**, *2*, 171–196.
- [50] Y. Benjamini, Y. Hochberg. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **1995**, *57*, 289–300.
- [51] W. Timischl, *Angewandte Statistik*, Springer, Wien, **2013**.
- [52] J. Hageman. Relevant metabolites’ selection strategies in *Metabolomics perspectives: From theory to practical application* (Hrsg.: J. Troisi), Academic Press, **2022**, S. 381–398.
- [53] L. Stahle, S. Wold. Analysis of variance (ANOVA), *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1989**, *6*, 259–272.
- [54] M. Tomczak, E. Tomczak. The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size, *Trends Sport Sci.* **2014**, *21*, 19–25.

- [55] M. Xu, D. Fralick, J. Z. Zheng, B. Wang, X. M. Tu, C. Feng. The differences and similarities between two-sample t-test and paired t-test, *Shanghai Arch. Psychiatry* **2017**, 29, 184–188.
- [56] E. Park, M. Cho, C.-S. Ki. Correct use of repeated measures analysis of variance, *Korean J. Lab. Med.* **2009**, 29, 1–9.
- [57] B. Worley, R. Powers. Multivariate analysis in metabolomics, *Curr. Metabolomics* **2013**, 1, 92–107.
- [58] L. Eriksson, T. Byrne, E. Johansson, J. Trygg, C. Vikström, *Multi- and megavariable data analysis: Basic principles and applications*, 3. Aufl., MKS Umetrics AB, Malmö, **2013**.
- [59] T. F. C. Mackay, E. A. Stone, J. F. Ayroles. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, 10, 565–577.
- [60] R. A. Fisher. The correlation between relatives on the supposition of mendelian inheritance, *Trans. R. Soc. Edinburgh* **1919**, 52, 399–433.
- [61] P. M. Visscher, N. R. Wray, Q. Zhang, P. Sklar, M. I. McCarthy, M. A. Brown, J. Yang. 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation, *Am. J. Hum. Genet.* **2017**, 101, 5–22.
- [62] V. Tam, N. Patel, M. Turcotte, Y. Bossé, G. Paré, D. Meyre. Benefits and limitations of genome-wide association studies, *Nat. Rev. Genet.* **2019**, 20, 467–484.
- [63] J. Adamski. Genome-wide association studies with metabolomics, *Genome Med.* **2012**, 4, 34.
- [64] J. Adamski, K. Suhre. Metabolomics platforms for genome wide association studies—linking the genome to the metabolome, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, 24, 39–47.
- [65] C. Gieger, L. Geistlinger, E. Altmaier, M. Hrabé de Angelis, F. Kronenberg, T. Meitinger, H.-W. Mewes, H.-E. Wichmann, K. M. Weinberger, J. Adamski...K. Suhre. Genetics meets metabolomics: a genome-wide association study of metabolite profiles in human serum, *PLoS Genet.* **2008**, 4, e1000282.
- [66] S.-Y. Shin, E. B. Fauman, A.-K. Petersen, J. Krumsiek, R. Santos, J. Huang, M. Arnold, I. Erte, V. Forgetta, T.-P. Yang...N. Soranzo. An atlas of genetic influences on human blood metabolites, *Nat. Genet.* **2014**, 46, 543–550.
- [67] L. A. Lotta, M. Pietzner, I. D. Stewart, L. B. L. Wittemans, C. Li, R. Bonelli, J. Raffler, E. K. Biggs, C. Oliver-Williams, V. P. W. Auyeung...C. Langenberg. A cross-platform approach identifies genetic regulators of human metabolism and health, *Nat. Genet.* **2021**, 53, 54–64.
- [68] P. Surendran, I. D. Stewart, V. P. W. Au Yeung, M. Pietzner, J. Raffler, M. A. Wörheide, C. Li, R. F. Smith, L. B. L. Wittemans, L. Bombardieri...C. Langenberg. Rare and common genetic determinants of metabolic individuality and their effects on human health, *Nat. Med.* **2022**, 28, 2321–2332.
- [69] T. Illig, C. Gieger, G. Zhai, W. Römisch-Margl, R. Wang-Sattler, C. Prehn, E. Altmaier, G. Kastenmüller, B. S. Kato, H.-W. Mewes...K. Suhre. A genome-wide perspective of genetic variation in human metabolism, *Nat. Genet.* **2010**, 42, 137–141.
- [70] K. Suhre, H. Wallaschofski, J. Raffler, N. Friedrich, R. Haring, K. Michael, C. Wasner, A. Krebs, F. Kronenberg, D. Chang...M. Nauck. A genome-wide association study of metabolic traits in human urine, *Nat. Genet.* **2011**, 43, 565–569.
- [71] H. H. M. Draisma, R. Pool, M. Kobl, R. Jansen, A.-K. Petersen, A. A. M. Vaarhorst, I. Yet, T. Haller, A. Demirkan, T. Esko...D. I. Boomsma. Genome-wide association study

- identifies novel genetic variants contributing to variation in blood metabolite levels, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7208.
- [72] P. G. Hysi, M. Mangino, P. Christofidou, M. Falchi, E. D. Karoly, B. I. Nehr, R. P. Mohny, A. M. Valdes, T. D. Spector, C. Menni. Metabolome genome-wide association study identifies 74 novel genomic regions influencing plasma metabolites levels, *Metabolites* **2022**, *12*, 61.
- [73] G. Nicholson, M. Rantalainen, J. V. Li, A. D. Maher, D. Malmudin, K. R. Ahmadi, J. H. Faber, A. Barrett, J. L. Min, N. W. Rayner...C. C. Holmes. A genome-wide metabolic QTL analysis in Europeans implicates two loci shaped by recent positive selection, *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1002270.
- [74] E. P. Rhee, J. E. Ho, M.-H. Chen, D. Shen, S. Cheng, M. G. Larson, A. Ghorbani, X. Shi, I. T. Helenius, C. J. O'Donnell...R. E. Gerszten. A genome-wide association study of the human metabolome in a community-based cohort, *Cell Metab.* **2013**, *18*, 130–143.
- [75] K. Suhre, J. Raffler, G. Kastenmüller. Biochemical insights from population studies with genetics and metabolomics, *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *589*, 168–176.
- [76] S. Liggi, J. L. Griffin. Metabolomics applied to diabetes-lessons from human population studies, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2017**, *93*, 136–147.
- [77] Q. Jian, Y. Wu, F. Zhang. Metabolomics in diabetic retinopathy: from potential biomarkers to molecular basis of oxidative stress, *Cells* **2022**, *11*, 3005.
- [78] A. Köttgen, J. Raffler, P. Sekula, G. Kastenmüller. Genome-wide association studies of metabolite concentrations (mGWAS): relevance for nephrology, *Semin. Nephrol.* **2018**, *38*, 151–174.
- [79] C. Menni, J. Zierer, A. M. Valdes, T. D. Spector. Mixing omics: combining genetics and metabolomics to study rheumatic diseases, *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 174–181.
- [80] A. T. Kopylov, A. A. Stepanov, T. V. Butkova, K. A. Malsagova, N. V. Zakharova, G. P. Kostyuk, A. U. Elmuratov, A. L. Kaysheva. Consolidation of metabolomic, proteomic, and GWAS data in connective model of schizophrenia, *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 2139.
- [81] X. Yin, D. Bose, A. Kwon, S. C. Hanks, A. U. Jackson, H. M. Stringham, R. Welch, A. Oravilahti, L. Fernandes Silva, A. E. Locke...X. Wen. Integrating transcriptomics, metabolomics, and GWAS helps reveal molecular mechanisms for metabolite levels and disease risk, *Am. J. Hum. Genet.* **2022**, *109*, 1727–1741.
- [82] D. J. Panyard, K. M. Kim, B. F. Darst, Y. K. Deming, X. Zhong, Y. Wu, H. Kang, C. M. Carlsson, S. C. Johnson, S. Asthana...Q. Lu. Cerebrospinal fluid metabolomics identifies 19 brain-related phenotype associations, *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 63.
- [83] E. V. Feofanova, H. Chen, Y. Dai, P. Jia, M. L. Grove, A. C. Morrison, Q. Qi, M. Daviglus, J. Cai, K. E. North...B. Yu. A genome-wide association study discovers 46 loci of the human metabolome in the Hispanic community health study/study of Latinos, *Am. J. Hum. Genet.* **2020**, *107*, 849–863.
- [84] J. A. Hartiala, W. H. W. Tang, Z. Wang, A. L. Crow, A. F. R. Stewart, R. Roberts, R. McPherson, J. Erdmann, C. Willenborg, S. L. Hazen, H. Allayee. Genome-wide association study and targeted metabolomics identifies sex-specific association of CPS1 with coronary artery disease, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10558.
- [85] J. Raffler, N. Friedrich, M. Arnold, T. Kacprowski, R. Rueedi, E. Altmaier, S. Bergmann, K. Budde, C. Gieger, G. Homuth...K. Suhre. Genome-wide association study with targeted

- and non-targeted NMR metabolomics identifies 15 novel loci of urinary human metabolic individuality, *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005487.
- [86] R. Rueedi, M. Ledda, A. W. Nicholls, R. M. Salek, P. Marques-Vidal, E. Morya, K. Sameshima, I. Montoliu, L. Da Silva, S. Collino...Z. Kutalik. Genome-wide association study of metabolic traits reveals novel gene-metabolite-disease links, *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004132.
- [87] B. Yu, Y. Zheng, D. Alexander, T. A. Manolio, A. Alonso, J. A. Nettleton, E. Boerwinkle. Genome-wide association study of a heart failure related metabolomic profile among African Americans in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study, *Genet. Epidemiol.* **2013**, *37*, 840–845.
- [88] K. Suhre, S.-Y. Shin, A.-K. Petersen, R. P. Mohny, D. Meredith, B. Wägele, E. Altmaier, P. Deloukas, J. Erdmann, E. Grundberg...C. Gieger. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research, *Nature* **2011**, *477*, 54–60.
- [89] L. Chang, G. Zhou, H. Ou, J. Xia. mGWAS-Explorer: Linking SNPs, genes, metabolites, and diseases for functional insights, *Metabolites* **2022**, *12*, 526.
- [90] L. Chang, G. Zhou, J. Xia. mGWAS-Explorer 2.0: Causal analysis and interpretation of metabolite-phenotype associations, *Metabolites* **2023**, *13*, 826.
- [91] A. Korte, A. Farlow. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review, *Plant Methods* **2013**, *9*, 29.
- [92] N. Sinnott-Armstrong, S. Naqvi, M. Rivas, J. K. Pritchard. GWAS of three molecular traits highlights core genes and pathways alongside a highly polygenic background, *eLife* **2021**, *10*, e58615.
- [93] A. Clarke, K. P. P. Fraser. Why does metabolism scale with temperature?, *Funct. Ecol.* **2004**, *18*, 243–251.
- [94] W. R. Leonard, S. B. Levy, L. A. Tarskaia, T. M. Klimova, V. I. Fedorova, M. E. Baltakhinova, V. G. Krivoschapkin, J. J. Snodgrass. Seasonal variation in basal metabolic rates among the Yakut (Sakha) of northeastern Siberia, *Am. J. Hum. Biol.* **2014**, *26*, 437–445.
- [95] K. A. Dyar, K. L. Eckel-Mahan. Circadian metabolomics in time and space, *Front. Neurosci.* **2017**, *11*, 369.
- [96] K. Fujisawa, T. Takami, Y. Kimoto, T. Matsumoto, N. Yamamoto, S. Terai, I. Sakaida. Circadian variations in the liver metabolites of medaka (*Oryzias latipes*), *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20916.
- [97] K. Fujisawa, T. Takami, H. Shintani, N. Sasai, T. Matsumoto, N. Yamamoto, I. Sakaida. Seasonal variations in photoperiod affect hepatic metabolism of medaka (*Oryzias latipes*), *FEBS Open Bio* **2021**, *11*, 1029–1040.
- [98] Y. Li, G. Li, B. Göring, B. Luy, J. Du, J. Yan. Integrative analysis of circadian transcriptome and metabolic network reveals the role of de novo purine synthesis in circadian control of cell cycle, *PLoS Comput. Biol.* **2015**, *11*, e1004086.
- [99] J. Wittbrodt, A. Shima, M. Schartl. Medaka—a model organism from the far east, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 53–64.
- [100] C.-Y. Lin, C.-Y. Chiang, H.-J. Tsai. Zebrafish and medaka: new model organisms for modern biomedical research, *J. Biomed. Sci.* **2016**, *23*, 19.
- [101] H. Takeda, A. Shimada. The art of medaka genetics and genomics: what makes them so unique?, *Annu. Rev. Genet.* **2010**, *44*, 217–241.

- [102] A. J. Vilella, J. Severin, A. Ureta-Vidal, L. Heng, R. Durbin, E. Birney. EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates, *Genome Res.* **2009**, *19*, 327–335.
- [103] K. Howe, M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews...D. L. Stemple. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome, *Nature* **2013**, *496*, 498–503.
- [104] T. Fitzgerald, I. Brettell, A. Leger, N. Wolf, N. Kusminski, J. Monahan, C. Barton, C. Herder, N. Aadeputu, J. Gierten...F. Loosli. The Medaka Inbred Kiyosu-Karlsruhe (MIKK) panel, *Genome Biol.* **2022**, *23*, 59.
- [105] T. Iwamatsu. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*, *Mech. Dev.* **2004**, *121*, 605–618.
- [106] M. Kasahara, K. Naruse, S. Sasaki, Y. Nakatani, W. Qu, B. Ahsan, T. Yamada, Y. Nagayasu, K. Doi, Y. Kasai...Y. Kohara. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution, *Nature* **2007**, *447*, 714–719.
- [107] S. Kirchmaier, K. Naruse, J. Wittbrodt, F. Loosli. The genomic and genetic toolbox of the teleost medaka (*Oryzias latipes*), *Genetics* **2015**, *199*, 905–918.
- [108] J. A. Gutierrez-Triana, T. Tavhelidse, T. Thumberger, I. Thomas, B. Wittbrodt, T. Kellner, K. Anlas, E. Tsingos, J. Wittbrodt. Efficient single-copy HDR by 5' modified long dsDNA donors, *eLife* **2018**, *7*, e39468.
- [109] Y. Hyodo-Taguchi. Inbred strains of the medaka, *Oryzias latipes*, *Fish Biol. J. Medaka* **1996**, *8*, 11–14.
- [110] Y. Hyodo-Taguchi, N. Egami. Establishment of inbred strains of the medaka *Oryzias latipes* and the usefulness of the strains for biomedical research, *Zool. Sci.* **1985**, *2*, 305–316.
- [111] T. Sasado, M. Tanaka, K. Kobayashi, T. Sato, M. Sakaizumi, K. Naruse. The National BioResource Project Medaka (NBRP Medaka): an integrated bioresource for biological and biomedical sciences, *Exp. Anim.* **2010**, *59*, 13–23.
- [112] M. Spivakov, T. O. Auer, R. Peravali, I. Dunham, D. Dolle, A. Fujiyama, A. Toyoda, T. Aizu, Y. Minakuchi, F. Loosli...J. Wittbrodt. Genomic and phenotypic characterization of a wild medaka population: towards the establishment of an isogenic population genetic resource in fish, *G3 Genes Genomes Genet.* **2014**, *4*, 433–445.
- [113] A. Leger, I. Brettell, J. Monahan, C. Barton, N. Wolf, N. Kusminski, C. Herder, N. Aadeputu, C. Becker, J. Gierten...T. Fitzgerald. Genomic variations and epigenomic landscape of the Medaka Inbred Kiyosu-Karlsruhe (MIKK) panel, *Genome Biol.* **2022**, *23*, 58.
- [114] M. R. Viant, J. G. Bundy, C. A. Pincetich, J. S. de Ropp, R. S. Tjeerdema. NMR-derived developmental metabolic trajectories: an approach for visualizing the toxic actions of trichloroethylene during embryogenesis, *Metabolomics* **2005**, *1*, 149–158.
- [115] M. R. Viant, C. A. Pincetich, D. E. Hinton, R. S. Tjeerdema. Toxic actions of dinoseb in medaka (*Oryzias latipes*) embryos as determined by in vivo ³¹P NMR, HPLC-UV and ¹H NMR metabolomics, *Aquat. Toxicol.* **2006**, *76*, 329–342.
- [116] B. Sotton, A. Paris, S. Le Manach, A. Blond, G. Lacroix, A. Millot, C. Duval, H. Huet, Q. Qiao, S. Labrut...B. Marie. Metabolic changes in medaka fish induced by cyanobacterial exposures in mesocosms: an integrative approach combining proteomic and metabolomic analyses, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4051.

- [117] E. Kokushi, A. Shintoyo, J. Koyama, S. Uno. Evaluation of 2,4-dichlorophenol exposure of Japanese medaka, *Oryzias latipes*, using a metabolomics approach, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, 24, 27678–27686.
- [118] P. Foucault, A. Gallet, C. Duval, B. Marie, S. Duperron. Gut microbiota and holobiont metabolome composition of the medaka fish (*Oryzias latipes*) are affected by a short exposure to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Aquat. Toxicol.* **2022**, 253, 106329.
- [119] S. Le Manach, B. Sotton, H. Huet, C. Duval, A. Paris, A. Marie, C. Yépreman, A. Catherine, L. Mathéron, J. Vinh...B. Marie. Physiological effects caused by microcystin-producing and non-microcystin producing *Microcystis aeruginosa* on medaka fish: a proteomic and metabolomic study on liver, *Environ. Pollut.* **2018**, 234, 523–537.
- [120] C. A. Pincetich, M. R. Viant, D. E. Hinton, R. S. Tjeerdema. Metabolic changes in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) during embryogenesis and hypoxia as determined by in vivo ³¹P NMR, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2005**, 140, 103–113.
- [121] M. R. Viant. Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 310, 943–948.
- [122] Q. Qiao, S. Le Manach, B. Sotton, H. Huet, E. Duvernois-Berthet, A. Paris, C. Duval, L. Ponger, A. Marie, A. Blond...B. Marie. Deep sexual dimorphism in adult medaka fish liver highlighted by multi-omic approach, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 32459.
- [123] T. I. Yassumoto, M. Nakatsukasa, A. J. Nagano, M. Yasugi, T. Yoshimura, A. Shinomiya. Genetic analysis of body weight in wild populations of medaka fish from different latitudes, *PLoS One* **2020**, 15, e0234803.
- [124] F. Loosli, R. W. Köster, M. Carl, R. Kühnlein, T. Henrich, M. Mücke, A. Krone, J. Wittbrodt. A genetic screen for mutations affecting embryonic development in medaka fish (*Oryzias latipes*), *Mech. Dev.* **2000**, 97, 133–139.
- [125] Y. Kuroyanagi, T. Okuyama, Y. Suehiro, H. Imada, A. Shimada, K. Naruse, H. Takeda, T. Kubo, H. Takeuchi. Proliferation zones in adult medaka (*Oryzias latipes*) brain, *Brain Res.* **2010**, 1323, 33–40.
- [126] J. Colter, K. Murari, J. Biernaskie, M. S. Kallos. Induced pluripotency in the context of stem cell expansion bioprocess development, optimization, and manufacturing: a roadmap to the clinic, *npj Regener. Med.* **2021**, 6, 72.
- [127] A. Trounson, N. D. DeWitt. Pluripotent stem cells progressing to the clinic, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, 17, 194–200.
- [128] Y. Avior, I. Sagi, N. Benvenisty. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, 17, 170–182.
- [129] M. J. Evans, M. H. Kaufman. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature* **1981**, 292, 154–156.
- [130] G. R. Martin. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, 78, 7634–7638.
- [131] T. Burdon, I. Chambers, C. Stracey, H. Niwa, A. Smith. Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells, *Cells Tissues Organs* **1999**, 165, 131–143.

- [132] K. Takahashi, S. Yamanaka. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 183–193.
- [133] K. Takahashi, S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* **2006**, *126*, 663–676.
- [134] G. Rossi, A. Manfrin, M. P. Lutolf. Progress and potential in organoid research, *Nat. Rev. Genet.* **2018**, *19*, 671–687.
- [135] M. Eiraku, K. Watanabe, M. Matsuo-Takasaki, M. Kawada, S. Yonemura, M. Matsumura, T. Wataya, A. Nishiyama, K. Muguruma, Y. Sasai. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals, *Cell Stem Cell* **2008**, *3*, 519–532.
- [136] T. Sato, R. G. Vries, H. J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D. E. Stange, J. H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P. J. Peters, H. Clevers. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche, *Nature* **2009**, *459*, 262–265.
- [137] M. Agathocleous, W. A. Harris. From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2009**, *25*, 45–69.
- [138] M. Eiraku, N. Takata, H. Ishibashi, M. Kawada, E. Sakakura, S. Okuda, K. Sekiguchi, T. Adachi, Y. Sasai. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture, *Nature* **2011**, *472*, 51–56.
- [139] T. Nakano, S. Ando, N. Takata, M. Kawada, K. Muguruma, K. Sekiguchi, K. Saito, S. Yonemura, M. Eiraku, Y. Sasai. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs, *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 771–785.
- [140] A. Kuwahara, C. Ozone, T. Nakano, K. Saito, M. Eiraku, Y. Sasai. Generation of a ciliary margin-like stem cell niche from self-organizing human retinal tissue, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6286.
- [141] Y. Hong, C. Winkler, M. Scharl. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*), *Mech. Dev.* **1996**, *60*, 33–44.
- [142] Y. Hong, C. Winkler, M. Scharl. Production of medakafish chimeras from a stable embryonic stem cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 3679–3684.
- [143] M. Yi, N. Hong, Y. Hong. Derivation and characterization of haploid embryonic stem cell cultures in medaka fish, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1418–1430.
- [144] V. Robles, M. Martí, J. C. Izpisua Belmonte. Study of pluripotency markers in zebrafish embryos and transient embryonic stem cell cultures, *Zebrafish* **2011**, *8*, 57–63.
- [145] S. Y. Ho, C. W. P. Goh, J. Y. Gan, Y. S. Lee, M. K. K. Lam, N. Hong, Y. Hong, W. K. Chan, A. C. Shu-Chien. Derivation and long-term culture of an embryonic stem cell-like line from zebrafish blastomeres under feeder-free condition, *Zebrafish* **2014**, *11*, 407–420.
- [146] L. Peng, Y. Zhou, W. Xu, M. Jiang, H. Li, M. Long, W. Liu, J. Liu, X. Zhao, Y. Xiao. Generation of stable induced pluripotent stem-like cells from adult zebra fish fibroblasts, *Int. J. Biol. Sci.* **2019**, *15*, 2340–2349.
- [147] L. Zilova, V. Weinhardt, T. Tavhelidse, C. Schlagheck, T. Thumberger, J. Wittbrodt. Fish primary embryonic pluripotent cells assemble into retinal tissue mirroring in vivo early eye development, *eLife* **2021**, *10*, e66998.
- [148] O. Suzuki, J. Matsuda, K. Takano, Y. Yamamoto, T. Asano, M. Naiki, M. Kusanagi. Effect of genetic background on establishment of mouse embryonic stem cells, *Exp. Anim.* **1999**, *48*, 213–216.

- [149] C. S. Cowan, M. Renner, B. Gross-Scherf, D. Goldblum, M. Munz, J. Krol, T. Szikra, P. Papasaikas, R. Cuttat, A. Waladt...B. Roska. Cell types of the human retina and its organoids at single-cell resolution: developmental convergence, transcriptomic identity, and disease map, *Cell* **2020**, *182*, 1623–1640.
- [150] H. Kilpinen, A. Goncalves, A. Leha, V. Afzal, K. Alasoo, S. Ashford, S. Bala, D. Bensaddek, F. P. Casale, O. J. Culley...D. J. Gaffney. Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs, *Nature* **2017**, *546*, 370–375.
- [151] Y. Atlasi, H. G. Stunnenberg. The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development, *Nat. Rev. Genet.* **2017**, *18*, 643–658.
- [152] S. Melcer, H. Hezroni, E. Rand, M. Nissim-Rafinia, A. Skoultchi, C. L. Stewart, M. Bustin, E. Meshorer. Histone modifications and lamin A regulate chromatin protein dynamics in early embryonic stem cell differentiation, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 910.
- [153] J. A. Lessard, G. R. Crabtree. Chromatin regulatory mechanisms in pluripotency, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 503–532.
- [154] C. D. L. Folmes, A. Terzic. Energy metabolism in the acquisition and maintenance of stemness, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2016**, *52*, 68–75.
- [155] A. Moussaieff, N. M. Kogan, D. Aberdam. Concise review: Energy metabolites: Key mediators of the epigenetic state of pluripotency, *Stem cells* **2015**, *33*, 2374–2380.
- [156] F. Rouhani, N. Kumasaka, M. C. de Brito, A. Bradley, L. Vallier, D. Gaffney. Genetic background drives transcriptional variation in human induced pluripotent stem cells, *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004432.
- [157] C. K. Burrows, N. E. Banovich, B. J. Pavlovic, K. Patterson, I. Gallego Romero, J. K. Pritchard, Y. Gilad. Genetic variation, not cell type of origin, underlies the majority of identifiable regulatory differences in iPSCs, *PLoS Genet.* **2016**, *12*, e1005793.
- [158] K. Ortmayr, S. Dubuis, M. Zampieri. Metabolic profiling of cancer cells reveals genome-wide crosstalk between transcriptional regulators and metabolism, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1841.
- [159] D. Cacchiarelli, C. Trapnell, M. J. Ziller, M. Soumillon, M. Cesana, R. Karnik, J. Donaghey, Z. D. Smith, S. Ratanasirintrao, X. Zhang...T. S. Mikkelsen. Integrative analyses of human reprogramming reveal dynamic nature of induced pluripotency, *Cell* **2015**, *162*, 412–424.
- [160] J. M. Polo, E. Anderssen, R. M. Walsh, B. A. Schwarz, C. M. Nefzger, S. M. Lim, M. Borkent, E. Apostolou, S. Alaei, J. Cloutier...K. Hochedlinger. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells, *Cell* **2012**, *151*, 1617–1632.
- [161] G. Martano, E. M. Borroni, E. Lopci, M. G. Cattaneo, M. Mattioli, A. Bachi, I. Decimo, F. Bifari. Metabolism of stem and progenitor cells: proper methods to answer specific questions, *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *12*, 151.
- [162] D. S. C. Bispo, C. S. H. Jesus, I. M. C. Marques, K. M. Romek, M. B. Oliveira, J. F. Mano, A. M. Gil. Metabolomic applications in stem cell research: a review, *Stem Cell Rev. Rep.* **2021**, 2003–2024.
- [163] A. D. Panopoulos, O. Yanes, S. Ruiz, Y. S. Kida, D. Diep, R. Tautenhahn, A. Herrerías, E. M. Batchelder, N. Plongthongkum, M. Lutz...J. C. Izpisua Belmonte. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming, *Cell Res.* **2012**, *22*, 168–177.

- [164] S.-J. Park, S. A. Lee, N. Prasain, D. Bae, H. Kang, T. Ha, J. S. Kim, K.-S. Hong, C. Mantel, S.-H. Moon...M. R. Lee. Metabolome profiling of partial and fully reprogrammed induced pluripotent stem cells, *Stem Cells Dev.* **2017**, *26*, 734–742.
- [165] C. D. L. Folmes, T. J. Nelson, A. Martinez-Fernandez, D. K. Arrell, J. Z. Lindor, P. P. Dzeja, Y. Ikeda, C. Perez-Terzic, A. Terzic. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming, *Cell Metab.* **2011**, *14*, 264–271.
- [166] V. V. Sherstyuk, L. V. Yanshole, E. A. Zelentsova, A. D. Melnikov, S. P. Medvedev, Y. P. Tsentalovich, S. M. Zakian. Comparative metabolomic profiling of rat embryonic and induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Rev. Rep.* **2020**, *16*, 1256–1265.
- [167] A. Moussaieff, M. Rouleau, D. Kitsberg, M. Cohen, G. Levy, D. Barasch, A. Nemirovski, S. Shen-Orr, I. Laevsky, M. Amit...Y. Nahmias. Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells, *Cell Metab.* **2015**, *21*, 392–402.
- [168] O. Yanes, J. Clark, D. M. Wong, G. J. Patti, A. Sánchez-Ruiz, H. P. Benton, S. A. Trauger, C. Despons, S. Ding, G. Siuzdak. Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 411–417.
- [169] N. Shyh-Chang, J. W. Locasale, C. A. Lyssiotis, Y. Zheng, R. Y. Teo, S. Ratanasirinrawoot, J. Zhang, T. Onder, J. J. Unternaehrer, H. Zhu...L. C. Cantley. Influence of threonine metabolism on S-adenosylmethionine and histone methylation, *Science* **2013**, *339*, 222–226.
- [170] W. Loenen. S -Adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything?, *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 330–333.
- [171] J. Wang, P. Alexander, L. Wu, R. Hammer, O. Cleaver, S. L. McKnight. Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism, *Science* **2009**, *325*, 435–439.
- [172] B. W. Carey, L. W. S. Finley, J. R. Cross, C. D. Allis, C. B. Thompson. Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells, *Nature* **2015**, *518*, 413–416.
- [173] C. D'Aniello, E. Habibi, F. Cermola, D. Paris, F. Russo, A. Fiorenzano, G. Di Napoli, D. J. Melck, G. Cobellis, C. Angelini...G. Minchiotti. Vitamin C and L-proline antagonistic effects capture alternative states in the pluripotency continuum, *Stem Cell Rep.* **2017**, *8*, 1–10.
- [174] S. Tohyama, J. Fujita, T. Hishiki, T. Matsuura, F. Hattori, R. Ohno, H. Kanazawa, T. Seki, K. Nakajima, Y. Kishino...K. Fukuda. Glutamine oxidation is indispensable for survival of human pluripotent stem cells, *Cell Metab.* **2016**, *23*, 663–674.
- [175] J. F. A. Jansen, M. J. Shablott, P. C. M. van Zijl, K. K. Lehtimäki, J. W. M. Bulte, J. D. Gearhart, J. M. Hakumäki. Stem cell profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Magn. Reson. Med.* **2006**, *56*, 666–670.
- [176] B. Elena-Herrmann, E. Montellier, A. Fages, R. Bruck-Haimson, A. Moussaieff. Multi-platform NMR study of pluripotent stem cells unveils complementary metabolic signatures towards differentiation, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1622.
- [177] H. Soergel, Metabolomics-Studien im medizinischen und biologischen Umfeld, Masterthesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2019**.
- [178] L. B. de Oliveira, A. S. Leonardo, E. M. M. de Lima. Macro- and microstructural descriptions of the zebrafish (*Danio rerio*) liver, *Folia Morphol.* **2016**, *75*, 382–387.

- [179] A. L. Menke, J. M. Spitsbergen, A. P. M. Wolterbeek, R. A. Woutersen. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish, *Toxicol. Pathol.* **2011**, *39*, 759–775.
- [180] J. E. Le Belle, N. G. Harris, S. R. Williams, K. K. Bhakoo. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy, *NMR Biomed.* **2002**, *15*, 37–44.
- [181] B. D. Weger, M. Weger, B. Göring, A. Schink, C. Gobet, C. Keime, G. Poschet, B. Jost, N. Krone, R. Hell...T. Dickmeis. Extensive regulation of diurnal transcription and metabolism by glucocorticoids, *PLoS Genet.* **2016**, *12*, e1006512.
- [182] D. V. Waterhous, S. Barnes, D. D. Muccio. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of bile acids. Development of two-dimensional NMR methods for the elucidation of proton resonance assignments for five common hydroxylated bile acids, and their parent bile acid, 5 beta-cholanoic acid, *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 1068–1078.
- [183] W. Han, L. Li. Evaluating and minimizing batch effects in metabolomics, *Mass Spectrom. Rev.* **2022**, *41*, 421–442.
- [184] E. Whitley, J. Ball. Statistics review 4: Sample size calculations, *Crit. Care* **2002**, *6*, 335–341.
- [185] D. L. Nelson, M. M. Cox, A. A. Hoskins, *Lehninger principles of biochemistry*, Macmillan International Higher Education, New York, **2021**.
- [186] P. M. Anderson. Urea cycle in fish: molecular and mitochondrial studies in *Fish Physiology*, Vol. 14 (Hrsg.: C. M. Wood, T. J. Shuttleworth), Academic Press, New York, **1995**, S. 57–83.
- [187] UniProt, Aspartate aminotransferase. abgerufen am 10.10.2023, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/H2LYP8/entry>.
- [188] I. F. dos Santos Videira, D. F. Lima Moura, S. Magina. Mechanisms regulating melanogenesis, *An. Bras. Dermatol.* **2013**, *88*, 76–83.
- [189] UniProt, Tyrosinase. abgerufen am 10.10.2023, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P55025/entry>.
- [190] L. Cal, P. Suarez-Bregua, J. M. Cerdá-Reverter, I. Braasch, J. Rotllant. Fish pigmentation and the melanocortin system, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2017**, *211*, 26–33.
- [191] R. J. Huxtable. Physiological actions of taurine, *Physiol. Rev.* **1992**, *72*, 101–163.
- [192] M. Bae, K. Ahmed, J.-E. Yim. Beneficial effects of taurine on metabolic parameters in animals and humans, *J. Obes. Metab. Syndr.* **2022**, *31*, 134–146.
- [193] Y.-C. Chang, S.-T. Ding, Y.-H. Lee, Y.-C. Wang, M.-F. Huang, I.-H. Liu. Taurine homeostasis requires de novo synthesis via cysteine sulfinic acid decarboxylase during zebrafish early embryogenesis, *Amino Acids* **2013**, *44*, 615–629.
- [194] P. R. Dando. Lactate metabolism in fish, *J. Mar. Biol. Ass.* **1969**, *49*, 209–223.
- [195] D. P. Philipp, G. S. Whitt. Patterns of gene expression during teleost embryogenesis: lactate dehydrogenase isozyme ontogeny in the medaka (*Oryzias latipes*), *Dev. Biol.* **1977**, *59*, 183–197.
- [196] E. Nakano, A. H. Whiteley. Differentiation of multiple molecular forms of four dehydrogenases in the teleost, *Oryzias latipes*, studied by disc electrophoresis, *J. Exp. Zool.* **1965**, *159*, 167–179.

- [197] R. P. Barcelos, S. T. Stefanello, J. L. Mauriz, J. Gonzalez-Gallego, F. A. A. Soares. Creatine and the liver: metabolism and possible interactions, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2016**, *16*, 12–18.
- [198] L. Wang, D. Chen, L. Yang, S. Huang, Y. Zhang, H. Zhang. Expression patterns of the creatine metabolism-related molecules AGAT, GAMT and CT1 in adult zebrafish *Danio rerio*, *J. Fish Biol.* **2010**, *76*, 1212–1219.
- [199] A. Borchel, M. Verleih, C. Kühn, A. Rebl, T. Goldammer. Evolutionary expression differences of creatine synthesis-related genes: Implications for skeletal muscle metabolism in fish, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5429.
- [200] D. L. Chinkes. Methods for measuring tissue protein breakdown rate in vivo, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2005**, *8*, 534–537.
- [201] J. Gras, Y. Gudefin, F. Chagny. Free amino-acids and ninhydrin-positive substances in fish—I. muscle and skin of the rainbow trout (*salmo gairdnerii richardson*), *Comp. Biochem. Physiol.* **1978**, *60*, 369–372.
- [202] L. N. Haverberg, P. T. Omstedt, H. N. Munro, V. R. Young. Ntau-methylhistidine content of mixed proteins in various rat tissues, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *405*, 67–71.
- [203] E. Kamler. Resource allocation in yolk-feeding fish, *Rev. Fish Biol. Fish.* **2008**, *18*, 143–200.
- [204] M. R. Riddle, C.-K. Hu. Fish models for investigating nutritional regulation of embryonic development, *Dev. Biol.* **2021**, *476*, 101–111.
- [205] R. N. Finn, H. J. Fyhn. Requirement for amino acids in ontogeny of fish, *Aquacult. Res.* **2010**, *41*, 684–716.
- [206] H. Boulekbache. Energy metabolism in fish development, *Am. Zool.* **1981**, *21*, 377–389.
- [207] E. Nakano, S. Yamamoto. Amino acid component in the fish egg, *Dev. Biol.* **1972**, *28*, 528–530.
- [208] J. Huang, E. Amenyogbe, G. Chen, W. Wang. Biochemical composition and activities of digestive and antioxidant enzymes during the egg and yolk-sac larval development of the cobia (*Rachycentron canadum*), *Aquacult. Res.* **2021**, *52*, 1643–1656.
- [209] R. N. Finn, J. Widdows, H. J. Fyhn. Calorespirometry of developing embryos and yolk-sac larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*), *Mar. Biol.* **1995**, *122*, 157–163.
- [210] F. Lahnsteiner. Carbohydrate metabolism of eggs of the whitefish, *Coregonus* spp. during embryogenesis and its relationship with egg quality, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *142*, 46–55.
- [211] R. N. Finn, H. J. Fyhn, R. J. Henderson, M. S. Evjen. The sequence of catabolic substrate oxidation and enthalpy balance of developing embryos and yolk-sac larvae of turbot (*Scophthalmus maximus* L.), *Comp. Biochem. Physiol.* **1996**, *115*, 133–151.
- [212] F. Lahnsteiner, T. Weismann, R. A. Patzner. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*, *Fish Physiol. Biochem.* **1999**, *20*, 375–388.
- [213] F. Rocha, J. Dias, S. Engrola, P. Gavaia, I. Geurden, M. T. Dinis, S. Panserat. Glucose overload in yolk has little effect on the long-term modulation of carbohydrate metabolic genes in zebrafish (*Danio rerio*), *J. Exp. Biol.* **2014**, *217*, 1139–1149.
- [214] I. Rønnestad, H. J. Fyhn. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae, *Rev. Fish. Sci.* **1993**, *1*, 239–259.

- [215] D. Pouliquen, M.-H. Omnes, F. Seguin, J.-L. Gaignon. Changes in the dynamics of structured water and metabolite contents in early developing stages of eggs of turbot (*Psetta maxima*), *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *120*, 715–726.
- [216] S. S. M. Chung, E. C. M. Ho, K. S. L. Lam, S. K. Chung. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2003**, *14*, S233–6.
- [217] M. Lorenzi. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient, *Exp. Diabetes Res.* **2007**, *2007*, 61038.
- [218] L. M. Suárez, M.-D. Muñoz, R. Martín del Río, J. M. Solís. Taurine content in different brain structures during ageing: effect on hippocampal synaptic plasticity, *Amino Acids* **2016**, *48*, 1199–1208.
- [219] B. Mersman, W. Zaidi, N. I. Syed, F. Xu. Taurine promotes neurite outgrowth and synapse development of both vertebrate and invertebrate central neurons, *Front. Synaptic Neurosci.* **2020**, *12*, 29.
- [220] N. Froger, L. Moutsimilli, L. Cadetti, F. Jammoul, Q.-P. Wang, Y. Fan, D. Gaucher, S. G. Rosolen, N. Neveux, L. Cynober...S. Picaud. Taurine: the comeback of a nutraceutical in the prevention of retinal degenerations, *Prog. Retinal Eye Res.* **2014**, *41*, 44–63.
- [221] S. Tochitani. Taurine: A maternally derived nutrient linking mother and offspring, *Metabolites* **2022**, *12*, 228.
- [222] P. Singh, K. Gollapalli, S. Mangiola, D. Schraner, M. A. Yusuf, M. Chamoli, S. L. Shi, B. Lopes Bastos, T. Nair, A. Riermeier...V. K. Yadav. Taurine deficiency as a driver of aging, *Science* **2023**, *380*, eabn9257.
- [223] M. Neuringer, J. Sturman. Visual acuity loss in rhesus monkey infants fed a taurine-free human infant formula, *J. Neurosci. Res.* **1987**, *18*, 597–601.
- [224] N. Froger, L. Cadetti, H. Lorach, J. Martins, A.-P. Bemelmans, E. Dubus, J. Degardin, D. Pain, V. Forster, L. Chicaud...S. Picaud. Taurine provides neuroprotection against retinal ganglion cell degeneration, *PLoS One* **2012**, *7*, e42017.
- [225] W. Hadj-Saïd, N. Froger, I. Ivkovic, M. Jiménez-López, É. Dubus, J. Dégardin-Chicaud, M. Simonutti, C. Quénot, N. Neveux, M. P. Villegas-Pérez...D. García-Ayuso. Quantitative and topographical analysis of the losses of cone photoreceptors and retinal ganglion cells under taurine depletion, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2016**, *57*, 4692–4703.
- [226] D. García-Ayuso, J. Di Pierdomenico, W. Hadj-Said, M. Marie, M. Agudo-Barriuso, M. Vidal-Sanz, S. Picaud, M. P. Villegas-Pérez. Taurine depletion causes ipRGC loss and increases light-induced photoreceptor degeneration, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2018**, *59*, 1396–1409.
- [227] A. Martínez-Vacas, J. Di Pierdomenico, F. J. Valiente-Soriano, M. Vidal-Sanz, S. Picaud, M. P. Villegas-Pérez, D. García-Ayuso. Glial cell activation and oxidative stress in retinal degeneration induced by β -alanine caused taurine depletion and light exposure, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *23*.
- [228] S. Nusetti, V. Salazar, L. Lima. Localization of taurine transporter, taurine, and zinc in goldfish retina, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *643*, 233–242.
- [229] Y. Omura, R. Yoshimura. Immunocytochemical localization of taurine in the developing retina of the lefteye flounder *Paralichthys olivaceus*, *Arch. Histol. Cytol.* **1999**, *62*, 441–446.

- [230] D. García-Ayuso, J. Di Pierdomenico, A. Martínez-Vacas, M. Vidal-Sanz, S. Picaud, M. P. Villegas-Pérez. Taurine: a promising nutraceutical in the prevention of retinal degeneration, *Neural Regener. Res.* **2023**, *19*, 606–610.
- [231] E. M. Levine, S. Fuhrmann, T. A. Reh. Soluble factors and the development of rod photoreceptors, *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 224–234.
- [232] F. Osakada, H. Ikeda, M. Mandai, T. Wataya, K. Watanabe, N. Yoshimura, A. Akaike, Y. Sasai, M. Takahashi. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 215–224.
- [233] D. Altshuler, J. J. Lo Turco, J. Rush, C. Cepko. Taurine promotes the differentiation of a vertebrate retinal cell type in vitro, *Development* **1993**, *119*, 1317–1328.
- [234] W. Jin, Y. Xing, A. Yang. Epidermal growth factor promotes the differentiation of stem cells derived from human umbilical cord blood into neuron-like cells via taurine induction in vitro, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2009**, *45*, 321–327.
- [235] F. Forouzanfar, M. Soleimannejad, A. Soltani, P. Sadat Mirsafaei, S. Asgharzade. Retinoic acid and taurine enhance differentiation of the human bone marrow stem cells into cone photoreceptor cells and retinal ganglion cells, *J. Cell. Biochem.* **2021**, *122*, 1915–1924.
- [236] L. Huang, M. Chen, W. Zhang, X. Sun, B. Liu, J. Ge. Retinoid acid and taurine promote NeuroD1-induced differentiation of induced pluripotent stem cells into retinal ganglion cells, *Mol. Cell. Biochem.* **2018**, *438*, 67–76.
- [237] A. Martínez-Vacas, J. Di Pierdomenico, A. Gallego-Ortega, F. J. Valiente-Soriano, M. Vidal-Sanz, S. Picaud, M. P. Villegas-Pérez, D. García-Ayuso. Systemic taurine treatment affords functional and morphological neuroprotection of photoreceptors and restores retinal pigment epithelium function in RCS rats, *Redox Biol.* **2022**, *57*, 102506.
- [238] J. Simon. Choline, betaine and methionine interactions in chickens, pigs and fish (including crustaceans), *World's Poult. Sci. J.* **1999**, *55*, 353–374.
- [239] M. Lever, S. Slow. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism, *Clin. Biochem.* **2010**, *43*, 732–744.
- [240] R. Fu, Q. Wang, C. Kong, K. Liu, H. Si, S. Sui. Mechanism of action and the uses betaine in pig production, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2022**, *106*, 528–536.
- [241] B. Zhang, M. M. Denomme, C. R. White, K.-Y. Leung, M. B. Lee, N. D. E. Greene, M. R. W. Mann, J. M. Trasler, J. M. Baltz. Both the folate cycle and betaine-homocysteine methyltransferase contribute methyl groups for DNA methylation in mouse blastocysts, *FASEB J.* **2015**, *29*, 1069–1079.
- [242] M. B. Lee, M. Kooistra, B. Zhang, S. Slow, A. L. Fortier, T. A. Garrow, M. Lever, J. M. Trasler, J. M. Baltz. Betaine homocysteine methyltransferase is active in the mouse blastocyst and promotes inner cell mass development, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33094–33103.
- [243] M.-K. I. Anas, M. B. Lee, C. Zhou, M.-A. Hammer, S. Slow, J. Karmouch, X. J. Liu, S. Bröer, M. Lever, J. M. Baltz. SIT1 is a betaine/proline transporter that is activated in mouse eggs after fertilization and functions until the 2-cell stage, *Development* **2008**, *135*, 4123–4130.
- [244] M.-K. I. Anas, M.-A. Hammer, M. Lever, J.-A. L. Stanton, J. M. Baltz. The organic osmolytes betaine and proline are transported by a shared system in early preimplantation mouse embryos, *J. Cell. Physiol.* **2007**, *210*, 266–277.

- [245] K. M. Dawson, J. M. Baltz. Organic osmolytes and embryos: substrates of the gly and beta transport systems protect mouse zygotes against the effects of raised osmolarity, *Biol. Reprod.* **1997**, *56*, 1550–1558.
- [246] K. Anbari, R. M. Schultz. Effect of sodium and betaine in culture media on development and relative rates of protein synthesis in preimplantation mouse embryos in vitro, *Mol. Reprod. Dev.* **1993**, *35*, 24–28.
- [247] J. D. Biggers, J. A. Lawitts, C. P. Lechene. The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos in vitro, *Mol. Reprod. Dev.* **1993**, *34*, 380–390.
- [248] L. Moxon-Lester, K. Takamoto, P. B. Colditz, N. L. Barnett. S-adenosyl-L-methionine restores photoreceptor function following acute retinal ischemia, *Vis. Neurosci.* **2009**, *26*, 429–441.
- [249] M. Huemer, D. Diodato, B. Schwahn, M. Schiff, A. Bandeira, J.-F. Benoist, A. Burlina, R. Cerone, M. L. Couce, A. Garcia-Cazorla...C. Dionisi-Vici. Guidelines for diagnosis and management of the cobalamin-related remethylation disorders cblC, cblD, cblE, cblF, cblG, cblJ and MTHFR deficiency, *J. Inherited Metab. Dis.* **2017**, *40*, 21–48.
- [250] J. L. Sloan, N. P. Achilly, M. L. Arnold, J. L. Catlett, T. Blake, K. Bishop, M. Jones, U. Harper, M. A. English, S. Anderson...C. P. Venditti. The vitamin B12 processing enzyme, mmachc, is essential for zebrafish survival, growth and retinal morphology, *Hum. Mol. Genet.* **2020**, *29*, 2109–2123.
- [251] G. Ahuja, S. Korsching. Zebrafish olfactory receptor ORA1 recognizes a putative reproductive pheromone, *Commun. Integr. Biol.* **2014**, *7*.
- [252] M. Behrens, O. Frank, H. Rawel, G. Ahuja, C. Potting, T. Hofmann, W. Meyerhof, S. Korsching. ORA1, a zebrafish olfactory receptor ancestral to all mammalian V1R genes, recognizes 4-hydroxyphenylacetic acid, a putative reproductive pheromone, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 19778–19788.
- [253] H. Soergel, F. Loosli, C. Muhle-Goll. Strain-Specific Liver Metabolite Profiles in Medaka, *Metabolites* **2021**, *11*, 744.
- [254] J. Xia, N. Psychogios, N. Young, D. S. Wishart. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 652–660.
- [255] Z. Pang, J. Chong, G. Zhou, D. A. de Lima Morais, L. Chang, M. Barrette, C. Gauthier, P.-É. Jacques, S. Li, J. Xia. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 388–396.
- [256] J. Chong, J. Xia. MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data, *Bioinformatics* **2018**, *34*, 4313–4314.
- [257] P. Z. Zimmet. Diabetes and its drivers: the largest epidemic in human history?, *Clin. Diabetes Endocrinol.* **2017**, *3*, 1.
- [258] D. Magliano, E. J. Boyko, *IDF diabetes atlas*, 10. Aufl., International Diabetes Federation, Brüssel, **2021**.
- [259] M. B. Schulze, K. Hoffmann, J. E. Manson, W. C. Willett, J. B. Meigs, C. Weikert, C. Heidemann, G. A. Colditz, F. B. Hu. Dietary pattern, inflammation, and incidence of type 2 diabetes in women, *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *82*, 675–684.
- [260] A. Christ, M. Lauterbach, E. Latz. Western diet and the immune system: an inflammatory connection, *Immunity* **2019**, *51*, 794–811.

- [261] S. Tateya, F. Kim, Y. Tamori. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance, *Front. Endocrinol.* **2013**, 4, 93.
- [262] J.-P. Bastard, M. Maachi, C. Lagathu, M. J. Kim, M. Caron, H. Vidal, J. Capeau, B. Feve. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance, *Eur. Cytokine Network* **2006**, 17, 4–12.
- [263] K. E. Wellen, G. S. Hotamisligil. Inflammation, stress, and diabetes, *J. Clin. Invest.* **2005**, 115, 1111–1119.
- [264] M. F. Gregor, G. S. Hotamisligil. Inflammatory mechanisms in obesity, *Annu. Rev. Immunol.* **2011**, 29, 415–445.
- [265] Y. S. Lee, J. Olefsky. Chronic tissue inflammation and metabolic disease, *Genes Dev.* **2021**, 35, 307–328.
- [266] G. S. Hotamisligil. Inflammation and metabolic disorders, *Nature* **2006**, 444, 860–867.
- [267] A. J. Cox, P. Zhang, D. W. Bowden, B. Devereaux, P. M. Davoren, A. W. Cripps, N. P. West. Increased intestinal permeability as a risk factor for type 2 diabetes, *Diabetes Metab.* **2017**, 43, 163–166.
- [268] A. Fasano. Leaky gut and autoimmune diseases, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2012**, 42, 71–78.
- [269] B. Jayashree, Y. S. Bibin, D. Prabhu, C. S. Shanthirani, K. Gokulakrishnan, B. S. Lakshmi, V. Mohan, M. Balasubramanyam. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes, *Mol. Cell. Biochem.* **2014**, 388, 203–210.
- [270] C. Vaure, Y. Liu. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species, *Front. Immunol.* **2014**, 5, 316.
- [271] L. A. J. O'Neill, R. J. Kishton, J. Rathmell. A guide to immunometabolism for immunologists, *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, 16, 553–565.
- [272] D. Mathis, S. E. Shoelson. Immunometabolism: an emerging frontier, *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, 11, 81.
- [273] M. J. Fox, J. F. Kuzma, W. T. Washam. Transitory diabetic syndrome associated with meningococcal meningitis, *Arch. Intern. Med.* **1947**, 79, 614–621.
- [274] G. S. Hotamisligil. Foundations of immunometabolism and implications for metabolic health and disease, *Immunity* **2017**, 47, 406–420.
- [275] E. M. Pålsson-McDermott, L. A. J. O'Neill. Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy, *Cell Res.* **2020**, 30, 300–314.
- [276] K. Murphy, C. Weaver, *Janeway's immunobiology*, 9. Aufl., Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, **2017**.
- [277] A. Glenn, C. E. Armstrong. Physiology of red and white blood cells, *Anaesth. Intensive Care Med.* **2019**, 20, 170–174.
- [278] C. R. Kleiveland. Peripheral blood mononuclear cells in *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models* (Hrsg.: K. Verhoeckx), Springer, Cham, **2015**, S. 161–167.
- [279] C. A. Feghali, T. M. Wright. Cytokines in acute and chronic inflammation, *Front. Biosci.* **1997**, 2, 12–26.
- [280] B. Beutler, E. T. Rietschel. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin, *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, 3, 169–176.

- [281] C. R. H. Raetz, C. Whitfield. Lipopolysaccharide endotoxins, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 635–700.
- [282] A. Ciesielska, M. Matyjek, K. Kwiatkowska. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling, *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 1233–1261.
- [283] K. A. Fitzgerald, J. C. Kagan. Toll-like receptors and the control of immunity, *Cell* **2020**, *180*, 1044–1066.
- [284] A. Poltorak, X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos...B. Beutler. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene, *Science* **1998**, *282*, 2085–2088.
- [285] NobelPrize.org, Nobel Prize Outreach, The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2011, abgerufen am 31.08.2023, <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2011/summary/>.
- [286] T. L. Gioannini, A. Teghanemt, D. Zhang, N. P. Coussens, W. Dockstader, S. Ramaswamy, J. P. Weiss. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 4186–4191.
- [287] E. Hailman, H. S. Lichenstein, M. M. Wurfel, D. S. Miller, D. A. Johnson, M. Kelley, L. A. Busse, M. M. Zukowski, S. D. Wright. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14, *J. Exp. Med.* **1994**, *179*, 269–277.
- [288] H. W. L. Ziegler-Heitbrock, R. J. Ulevitch. CD14: cell surface receptor and differentiation marker, *Immunol. Today* **1993**, *14*, 121–125.
- [289] Y. C. Teh, J. L. Ding, L. G. Ng, S. Z. Chong. Capturing the fantastic voyage of monocytes through time and space, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 834.
- [290] M. Guilleams, A. Mildner, S. Yona. Developmental and functional heterogeneity of monocytes, *Immunity* **2018**, *49*, 595–613.
- [291] J. Yang, L. Zhang, C. Yu, X.-F. Yang, H. Wang. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases, *Biomark. Res.* **2014**, *2*, 1.
- [292] B. Passlick, D. Flieger, H. W. L. Ziegler-Heitbrock. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood, *Blood* **1989**, *74*, 2527–2534.
- [293] L. Ziegler-Heitbrock. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation, *J. Leukocyte Biol.* **2007**, *81*, 584–592.
- [294] L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. M. Leenen, Y.-J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph...M. B. Lutz. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood, *Blood* **2010**, *116*, 74–80.
- [295] H. W. L. Ziegler-Heitbrock, G. Fingerle, M. Ströbel, W. Schraut, F. Stelter, C. Schütt, B. Passlick, A. Pforte. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages, *Eur. J. Immunol.* **1993**, *23*, 2053–2058.
- [296] K. L. Wong, W. H. Yeap, J. J. Y. Tai, S. M. Ong, T. M. Dang, S. C. Wong. The three human monocyte subsets: implications for health and disease, *Immunol. Res.* **2012**, *53*, 41–57.
- [297] F. Merah-Mourah, S. O. Cohen, D. Charron, N. Mooney, A. Haziot. Identification of novel human monocyte subsets and evidence for phenotypic groups defined by interindividual variations of expression of adhesion molecules, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4397.

- [298] P. Italiani, D. Boraschi. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation, *Front. Immunol.* **2014**, 5, 514.
- [299] F. O. Martinez, S. Gordon. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, *F1000Prime Rep.* **2014**, 6, 13.
- [300] D. M. Mosser, J. P. Edwards. Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, 8, 958–969.
- [301] D. Y. S. Vogel, J. E. Glim, A. W. D. Stavenhagen, M. Breur, P. Heijnen, S. Amor, C. D. Dijkstra, R. H. J. Beelen. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared, *Immunobiology* **2014**, 219, 695–703.
- [302] J. Xue, S. V. Schmidt, J. Sander, A. Draffehn, W. Krebs, I. Quester, D. de Nardo, T. D. Gohel, M. Emde, L. Schmidleithner...J. L. Schultze. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation, *Immunity* **2014**, 40, 274–288.
- [303] G. Schett, M. F. Neurath. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts, *Nat. Commun.* **2018**, 9, 3261.
- [304] G. S. Hotamisligil. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders, *Nature* **2017**, 542, 177–185.
- [305] D. Furman, J. Campisi, E. Verdin, P. Carrera-Bastos, S. Targ, C. Franceschi, L. Ferrucci, D. W. Gilroy, A. Fasano, G. W. Miller...G. M. Slavich. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span, *Nat. Med.* **2019**, 25, 1822–1832.
- [306] K. G. M. M. Alberti, R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J.-C. Fruchart, W. P. T. James, C. M. Loria, S. C. Smith. Harmonizing the metabolic syndrome, *Circulation* **2009**, 120, 1640–1645.
- [307] M. C. Woodruff, K. S. Bonham, F. A. Anam, T. A. Walker, C. E. Faliti, Y. Ishii, C. Y. Kaminski, M. C. Ruunstrom, K. R. Cooper, A. D. Truong...I. Sanz. Chronic inflammation, neutrophil activity, and autoreactivity splits long COVID, *Nat. Commun.* **2023**, 14, 4201.
- [308] P. D. Cani, J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, F. Fava, K. M. Tuohy, C. Chabo...R. Burcelin. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance, *Diabetes* **2007**, 56, 1761–1772.
- [309] M. Herieka, C. Erridge. High-fat meal induced postprandial inflammation, *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, 58, 136–146.
- [310] C. J. Kelly, S. P. Colgan, D. N. Frank. Of microbes and meals: the health consequences of dietary endotoxemia, *Nutr. Clin. Pract.* **2012**, 27, 215–225.
- [311] A. Gnauck, R. G. Lentle, M. C. Kruger. Chasing a ghost?—Issues with the determination of circulating levels of endotoxin in human blood, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2016**, 53, 197–215.
- [312] C. Erridge, T. Attina, C. M. Spickett, D. J. Webb. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation, *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, 86, 1286–1292.
- [313] E. Dror, E. Dalmás, D. T. Meier, S. Wueest, J. Thévenet, C. Thienel, K. Timper, T. M. Nordmann, S. Traub, F. Schulze...M. Y. Donath. Postprandial macrophage-derived IL-1 β stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation, *Nat. Immunol.* **2017**, 18, 283–292.

- [314] P. J. Pussinen, A. S. Havulinna, M. Lehto, J. Sundvall, V. Salomaa. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes, *Diabetes care* **2011**, *34*, 392–397.
- [315] J. M. Geraldo Gomes, J. de Assis Costa, R. de Cássia Gonçalves Alfenas. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: a systematic review, *Metabolism* **2017**, *68*, 133–144.
- [316] A. P. Boroni Moreira, T. F. Salles Texeira, A. Barbosa Ferreira, M. do Carmo Gouveia Peluzio, R. de Cássia Gonçalves Alfenas. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia, *Br. J. Nutr.* **2012**, *108*, 801–809.
- [317] P. D. Cani, R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne, R. Burcelin. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice, *Diabetes* **2008**, *57*, 1470–1481.
- [318] M. Mueckler, B. Thorens. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters, *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 121–138.
- [319] E. L. Pearce, E. J. Pearce. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence, *Immunity* **2013**, *38*, 633–643.
- [320] O. Warburg. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle, *Naturwissenschaften* **1924**, *12*, 1131–1137.
- [321] O. Warburg. On the origin of cancer cells, *Science* **1956**, *123*, 309–314.
- [322] O. Warburg, F. Wind, E. Negelein. The metabolism of tumors in the body, *J. Gen. Physiol.* **1927**, *8*, 519–530.
- [323] G. Soto-Herederó, M. M. Gómez de las Heras, E. Gabandé-Rodríguez, J. Oller, M. Mittelbrunn. Glycolysis - a key player in the inflammatory response, *FEBS J.* **2020**, *287*, 3350–3369.
- [324] B. Kelly, L. A. J. O'Neill. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity, *Cell Res.* **2015**, *25*, 771–784.
- [325] C. Diskin, E. M. Pålsson-McDermott. Metabolic modulation in macrophage effector function, *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 270.
- [326] A. Viola, F. Munari, R. Sánchez-Rodríguez, T. Scolaro, A. Castegna. The metabolic signature of macrophage responses, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1462.
- [327] J.-C. Rodríguez-Prados, P. G. Través, J. Cuenca, D. Rico, J. Aragonés, P. Martín-Sanz, M. Cascante, L. Boscá. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation, *J. Immunol.* **2010**, *185*, 605–614.
- [328] G. M. Tannahill, A. M. Curtis, J. Adamik, E. M. Pålsson-McDermott, A. F. McGettrick, G. Goel, C. Frezza, N. J. Bernard, B. Kelly, N. H. Foley...L. A. J. O'Neill. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α , *Nature* **2013**, *496*, 238–242.
- [329] A. K. Jha, S. C.-C. Huang, A. Sergushichev, V. Lampropoulou, Y. Ivanova, E. Loginicheva, K. Chmielewski, K. M. Stewart, J. Ashall, B. Everts...M. N. Artyomov. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization, *Immunity* **2015**, *42*, 419–430.
- [330] D. G. Ryan, L. A. J. O'Neill. Krebs cycle reborn in macrophage immunometabolism, *Annu. Rev. Immunol.* **2020**, *38*, 289–313.
- [331] K. R. Feingold, J. K. Shigenaga, M. R. Kazemi, C. M. McDonald, S. M. Patzek, A. S. Cross, A. Moser, C. Grunfeld. Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages, *J. Leukocyte Biol.* **2012**, *92*, 829–839.

- [332] G. C. Hard. Some biochemical aspects of the immune macrophage, *Br. J. Exp. Pathol.* **1970**, *51*, 97–105.
- [333] P. Newsholme, R. Curi, S. Gordon, E. A. Newsholme. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages, *Biochem. J.* **1986**, *239*, 121–125.
- [334] P. Newsholme, S. Gordon, E. A. Newsholme. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages, *Biochem. J.* **1987**, *242*, 631–636.
- [335] P. Newsholme, E. A. Newsholme. Rates of utilization of glucose, glutamine and oleate and formation of end-products by mouse peritoneal macrophages in culture, *Biochem. J.* **1989**, *261*, 211–218.
- [336] M. Fukuzumi, H. Shinomiya, Y. Shimizu, K. Ohishi, S. Utsumi. Endotoxin-induced enhancement of glucose influx into murine peritoneal macrophages via GLUT1, *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 108–112.
- [337] A. J. Freerman, A. R. Johnson, G. N. Sacks, J. J. Milner, E. L. Kirk, M. A. Troester, A. N. Macintyre, P. Goraksha-Hicks, J. C. Rathmell, L. Makowski. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 7884–7896.
- [338] Z. Tan, N. Xie, S. Banerjee, H. Cui, M. Fu, V. J. Thannickal, G. Liu. The monocarboxylate transporter 4 is required for glycolytic reprogramming and inflammatory response in macrophages, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 46–55.
- [339] C. Nagy, A. Haschemi. Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: the process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway, *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 164.
- [340] A. Michelucci, T. Cordes, J. Ghelfi, A. Pailot, N. Reiling, O. Goldmann, T. Binz, A. Wegner, A. Tallam, A. Rausell...K. Hiller. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 7820–7825.
- [341] V. Iacobazzi, V. Infantino. Citrate—new functions for an old metabolite, *Biol. Chem.* **2014**, *395*, 387–399.
- [342] V. Infantino, P. Convertini, L. Cucci, M. A. Panaro, M. A. Di Noia, R. Calvello, F. Palmieri, V. Iacobazzi. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation, *Biochem. J.* **2011**, *438*, 433–436.
- [343] M. Kieler, M. Hofmann, G. Schabbauer. More than just protein building blocks: how amino acids and related metabolic pathways fuel macrophage polarization, *FEBS J.* **2021**, *288*, 3694–3714.
- [344] M. Miyajima. Amino acids: key sources for immunometabolites and immunotransmitters, *Int. Immunol.* **2020**, *32*, 435–446.
- [345] B. Kelly, E. L. Pearce. Amino assets: how amino acids support immunity, *Cell Metab.* **2020**, *32*, 154–175.
- [346] M. Rath, I. Müller, P. Kropf, E. I. Closs, M. Munder. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages, *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 532.
- [347] C. Wallace, D. Keast. Glutamine and macrophage function, *Metabolism* **1992**, *41*, 1016–1020.

- [348] R. Pacheco, H. Oliva, J. M. Martinez-Navío, N. Climent, F. Ciruela, J. M. Gatell, T. Gallart, J. Mallol, C. Lluís, R. Franco. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation, *J. Immunol.* **2006**, 177, 6695–6704.
- [349] R. Pacheco, T. Gallart, C. Lluís, R. Franco. Role of glutamate on T-cell mediated immunity, *J. Neuroimmunol.* **2007**, 185, 9–19.
- [350] W. Yu, Z. Wang, K. Zhang, Z. Chi, T. Xu, D. Jiang, S. Chen, W. Li, X. Yang, X. Zhang...Di Wang. One-carbon metabolism supports S-Adenosylmethionine and histone methylation to drive inflammatory macrophages, *Mol. Cell* **2019**, 75, 1147-1160.
- [351] A. E. Rodriguez, G. S. Ducker, L. K. Billingham, C. A. Martinez, N. Mainolfi, V. Suri, A. Friedman, M. G. Manfredi, S. E. Weinberg, J. D. Rabinowitz, N. S. Chandel. Serine metabolism supports macrophage IL-1 β production, *Cell Metab.* **2019**, 29, 1003-1011.
- [352] M. Schneemann, G. Schoeden. Macrophage biology and immunology: man is not a mouse, *J. Leukocyte Biol.* **2007**, 81, 579.
- [353] M. Schneemann, G. Schoeden. Species differences in macrophage NO production are important, *Nat. Immunol.* **2002**, 3, 102.
- [354] J. Mestas, C. C. W. Hughes. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology, *J. Immunol.* **2004**, 172, 2731–2738.
- [355] V. Venketaraman, M. T. Talaue, Y. K. Dayaram, M. A. Peteroy-Kelly, W. Bu, N. D. Connell. Nitric oxide regulation of L-arginine uptake in murine and human macrophages, *Tuberculosis* **2003**, 83, 311–318.
- [356] E. Lachmandas, L. Boutens, J. M. Ratter, A. Hijmans, G. J. Hooiveld, L. A. B. Joosten, R. J. Rodenburg, J. A. M. Fransen, R. H. Houtkooper, R. van Crevel...R. Stienstra. Microbial stimulation of different Toll-like receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes, *Nat. Microbiol.* **2016**, 2, 16246.
- [357] V. Vijayan, P. Pradhan, L. Braud, H. R. Fuchs, F. Gueller, R. Motterlini, R. Foresti, S. Immenschuh. Human and murine macrophages exhibit differential metabolic responses to lipopolysaccharide - A divergent role for glycolysis, *Redox Biol.* **2019**, 22, 101147.
- [358] M. K. S. Lee, A. Al-Sharea, W. A. Shihata, C. Bertuzzo Veiga, O. D. Cooney, A. J. Fleetwood, M. C. Flynn, E. Claeson, C. S. Palmer, G. I. Lancaster...A. J. Murphy. Glycolysis is required for LPS-induced activation and adhesion of human CD14+CD16- monocytes, *Front. Immunol.* **2019**, 10, 2054.
- [359] E. Hickman, T. Smyth, C. Cobos-Urbe, R. Immormino, M. E. Rebuli, T. Moran, N. E. Alexis, I. Jaspers. Expanded characterization of in vitro polarized M0, M1, and M2 human monocyte-derived macrophages: Bioenergetic and secreted mediator profiles, *PLoS One* **2023**, 18, e0279037.
- [360] A. L. Fuchs, S. M. Schiller, W. J. Keegan, M. C. B. Ammons, B. Eilers, B. Tripet, V. Copié. Quantitative 1H NMR metabolomics reveal distinct metabolic adaptations in human macrophages following differential activation, *Metabolites* **2019**, 9, 248.
- [361] E. Leacy, I. Batten, L. Sanelli, M. McElheron, G. Brady, M. A. Little, H. Khouri. Optimal LC-MS metabolomic profiling reveals emergent changes to monocyte metabolism in response to lipopolysaccharide, *Front. Immunol.* **2023**, 14, 1116760.
- [362] F. Dopp, NMR-Spektroskopische Untersuchung der Silent Inflammation von kultivierten peripheren mononuklearen Blutzellen, Bachelorthesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2022**.

- [363] T. Yao, Y. Asayama. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues, *Reprod. Med. Biol.* **2017**, *16*, 99–117.
- [364] G. E. Moore. Culture of normal human leukocytes, *J. Am. Med. Assoc.* **1967**, *199*, 519.
- [365] G. Gstraunthaler. Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture, *ALTEX* **2003**, 257–281.
- [366] G. Gstraunthaler, T. Lindl, *Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*, 7. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, **2013**.
- [367] S. Lagziel, E. Gottlieb, T. Shlomi. Mind your media, *Nat. Metab.* **2020**, *2*, 1369–1372.
- [368] G. L. Tritsch, G. E. Moore. Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media, *Exp. Cell Res.* **1962**, *28*, 360–364.
- [369] N. Psychogios, D. D. Hau, J. Peng, A. C. Guo, R. Mandal, S. Bouatra, I. Sinelnikov, R. Krishnamurthy, R. Eisner, B. Gautam...D. S. Wishart. The human serum metabolome, *PLoS One* **2011**, *6*, e16957.
- [370] Y. Seino, K. Nanjo, N. Tajima, T. Kadowaki, A. Kashiwagi, E. Araki, C. Ito, N. Inagaki, Y. Iwamoto, M. Kasuga...K. Ueki. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus, *Diabetol. Int.* **2010**, *1*, 2–20.
- [371] Walzl A., Kramer N., Mazza G., Rosner M., Falkenhagen D., Hengstschläger M., Schwanzer-Pfeiffer D., Dolznig H. A simple and cost efficient method to avoid unequal evaporation in cellular screening assays, which restores cellular metabolic activity, *Int. J. Appl. Sci. Technol.* **2012**.
- [372] M. I. Patel, R. Tuckerman, Q. Dong. A pitfall of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethonyphenol)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay due to evaporation in wells on the edge of a 96 well plate, *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 805–808.
- [373] M. Mansoury, M. Hamed, R. Karmustaji, F. Al Hannan, S. T. Safrany. The edge effect: A global problem. The trouble with culturing cells in 96-well plates, *Biochem. Biophys. Rep.* **2021**, *26*, 100987.
- [374] H. Kihara, S. D. de La Flor. Arginase in fetal calf serum, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1968**, *129*, 303–304.
- [375] J. Wein, I. E. Goetz. Asparaginase and glutaminase activities in culture media containing dialyzed fetal calf serum, *In vitro* **1973**, *9*, 186–193.
- [376] T. Thomas, T. J. Thomas. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications, *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 244–258.
- [377] S. J. Froud, J. McLean, A. Mint. Polyamine enhanced product expression from transformed and recombinant cell lines in *Production of biologicals from animal cells in culture* (Hrsg.: R. E. Spier, J. B. Griffiths, B. Meignier), Butterworth-Heinemann, Oxford, **1991**, S. 107–109.
- [378] N. S. Chandel. Amino acid metabolism, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2021**, *13*, a040584.
- [379] J. J. Haddad, H. L. Harb. L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)?, *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 987–1014.
- [380] M. Pietzke, J. Meiser, A. Vazquez. Formate metabolism in health and disease, *Mol. Metab.* **2020**, *33*, 23–37.

- [381] V. A. Guarino, W. M. Oldham, J. Loscalzo, Y.-Y. Zhang. Reaction rate of pyruvate and hydrogen peroxide: assessing antioxidant capacity of pyruvate under biological conditions, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 19568.
- [382] H. J. Forman, A. Bernardo, K. J. A. Davies. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma?, *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *603*, 48–53.
- [383] B. Halliwell, M. V. Clement, J. Ramalingam, L. H. Long. Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo?, *IUBMB Life* **2000**, *50*, 251–257.
- [384] L. Jagannathan, S. Cuddapah, M. Costa. Oxidative stress under ambient and physiological oxygen tension in tissue culture, *Curr. Pharmacol. Rep.* **2016**, *2*, 64–72.
- [385] J. O'Donnell-Tormey, C. F. Nathan, K. Lanks, C. J. DeBoer, J. de la Harpe. Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells, *J. Exp. Med.* **1987**, *165*, 500–514.
- [386] L. C. Costello, R. B. Franklin. Plasma citrate homeostasis: How it is regulated; and its physiological and clinical implications. An important, but neglected, relationship in medicine, *J. Hum. Endocrinol.* **2016**, *1*, 5.
- [387] A. Medrano, J. M. Fernández-Novell, L. Ramió, J. Alvarez, E. Goldberg, M. Montserrat Rivera, J. J. Guinovart, T. Rigau, J. E. Rodríguez-Gil. Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa, *Mol. Reprod. Dev.* **2006**, *73*, 369–378.
- [388] N. Ron-Harel, J. M. Ghergurovich, G. Notarangelo, M. W. LaFleur, Y. Tsubosaka, A. H. Sharpe, J. D. Rabinowitz, M. C. Haigis. T cell activation depends on extracellular alanine, *Cell Rep.* **2019**, *28*, 3011–3021.
- [389] P. Felig. The glucose-alanine cycle, *Metabolism* **1973**, *22*, 179–207.
- [390] A. Karmen, F. Wróblewski, J. S. LaDue. Transaminase activity in human blood, *J. Clin. Invest.* **1955**, *34*, 126–131.
- [391] M. J. Cline. Metabolism of the circulating leukocyte, *Physiol. Rev.* **1965**, *45*, 674–720.
- [392] P. Mathew, D. Thoppil, Hypoglycemia, *StatPearls*, StatPearls Publishing. abgerufen am 19.09.2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534841/>.
- [393] F. Piarulli, G. Sartore, A. Sechi, D. Basso, P. Fogar, E. Greco, E. Ragazzi, A. Lapolla. Low glucose concentrations induce a similar inflammatory response in monocytes from type 2 diabetic patients and healthy subjects, *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2017**, *2017*, 9185272.
- [394] H. L. Caslin, D. Abebayehu, J. A. Pinette, J. J. Ryan. Lactate is a metabolic mediator that shapes immune cell fate and function, *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 688485.
- [395] C. D. Foucher, R. E. Tubben, Lactic Acidosis, *StatPearls*, StatPearls Publishing. abgerufen am 26.06.2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470202/>.
- [396] M. L. Goodwin, J. E. Harris, A. Hernández, L. B. Gladden. Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians, *J. Diabetes Sci. Technol.* **2007**, *1*, 558–569.
- [397] Z. Li, Q. Wang, X. Huang, M. Yang, S. Zhou, Z. Li, Z. Fang, Y. Tang, Q. Chen, H. Hou...A. Gong. Lactate in the tumor microenvironment: a rising star for targeted tumor therapy, *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1113739.
- [398] H.-C. Zhou, X.-Y. Yan, W.-W. Yu, X.-Q. Liang, X.-Y. Du, Z.-C. Liu, J.-P. Long, G.-H. Zhao, H.-B. Liu. Lactic acid in macrophage polarization: The significant role in inflammation and cancer, *Int. Rev. Immunol.* **2022**, *41*, 4–18.

- [399] O. R. Colegio, N.-Q. Chu, A. L. Szabo, T. Chu, A. M. Rhebergen, V. Jairam, N. Cyrus, C. E. Brokowski, S. C. Eisenbarth, G. M. Phillips...R. Medzhitov. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid, *Nature* **2014**, *513*, 559–563.
- [400] N. Liu, J. Luo, D. Kuang, S. Xu, Y. Duan, Y. Xia, Z. Wei, X. Xie, B. Yin, F. Chen...X.-P. Yang. Lactate inhibits ATP6V0d2 expression in tumor-associated macrophages to promote HIF-2 α -mediated tumor progression, *J. Clin. Invest.* **2019**, *129*, 631–646.
- [401] L. Zhang, S. Li. Lactic acid promotes macrophage polarization through MCT-HIF1 α signaling in gastric cancer, *Exp. Cell Res.* **2020**, *388*, 111846.
- [402] K. Yang, J. Xu, M. Fan, F. Tu, X. Wang, T. Ha, D. L. Williams, C. Li. Lactate suppresses macrophage pro-inflammatory response to LPS stimulation by inhibition of YAP and NF- κ B activation via GPR81-mediated signaling, *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 587913.
- [403] K. Fischer, P. Hoffmann, S. Voelkl, N. Meidenbauer, J. Ammer, M. Edinger, E. Gottfried, S. Schwarz, G. Rothe, S. Hoves...M. Kreutz. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells, *Blood* **2007**, *109*, 3812–3819.
- [404] L. Paolini, C. Adam, C. Beauvillain, L. Preisser, S. Blanchard, P. Pignon, V. Seegers, L.-M. Chevalier, M. Campone, R. Wernert...P. Jeannin. Lactic acidosis together with GM-CSF and M-CSF induces human macrophages toward an inflammatory protumor phenotype, *Cancer Immunol. Res.* **2020**, *8*, 383–395.
- [405] A. P. Halestrap, N. T. Price. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation, *Biochem. J.* **1999**, *343*, 281–299.
- [406] P. Newsholme, J. Procopio, M. M. Ramos Lima, T. C. Pithon-Curi, R. Curi. Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function, *Cell Biochem. Funct.* **2003**, *21*, 1–9.
- [407] C. Murphy, P. Newsholme. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production, *Clin. Sci.* **1998**, *95*, 397–407.
- [408] S. Bröer, G. Gauthier-Coles. Amino acid homeostasis in mammalian cells with a focus on amino acid transport, *J. Nutr.* **2022**, *152*, 16–28.
- [409] N. C. Danbolt. Glutamate uptake, *Progress in neurobiology* **2001**, *65*, 1–105.
- [410] A. C. Rimaniol, P. Mialocq, P. Clayette, D. Dormont, G. Gras. Role of glutamate transporters in the regulation of glutathione levels in human macrophages, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2001**, *281*, 1964–1970.
- [411] A. C. Rimaniol, S. Haïk, M. Martin, R. Le Grand, F. D. Boussin, N. Dereuddre-Bosquet, G. Gras, D. Dormont. Na⁺-dependent high-affinity glutamate transport in macrophages, *J. Immunol.* **2000**, *164*, 5430–5438.
- [412] J. Wallmeier, C. Samol, L. Ellmann, H. U. Zacharias, F. C. Vogl, M. Garcia, K. Dettmer, P. J. Oefner, W. Gronwald. Quantification of metabolites by NMR spectroscopy in the presence of protein, *J. Proteome Res.* **2017**, *16*, 1784–1796.
- [413] E. Derveaux, M. Thomeer, L. Mesotten, G. Reekmans, P. Adriaenssens. Detection of lung cancer via blood plasma and 1H-NMR metabolomics: validation by a semi-targeted and quantitative approach using a protein-binding competitor, *Metabolites* **2021**, *11*, 537.
- [414] Z. Wang, S. Pisano, V. Ghini, P. Kadeřávek, M. Zachrdla, P. Pelulessy, M. Kazmierczak, T. Marquardsen, J.-M. Tyburn, G. Bouvignies...F. Ferrage. Detection of metabolite-

- protein interactions in complex biological samples by high-resolution relaxometry: toward interactomics by NMR, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 9393–9404.
- [415] R. Barrilero, N. Ramírez, J. C. Vallvé, D. Taverner, R. Fuertes, N. Amigó, X. Correig. Unravelling and quantifying the "NMR-invisible" metabolites interacting with human serum albumin by binding competition and T2 relaxation-based decomposition analysis, *J. Proteome Res.* **2017**, *16*, 1847–1856.
- [416] C. López-Otín, J. S. Bond. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 30433–30437.
- [417] U. Kragh-Hansen. Possible mechanisms by which enzymatic degradation of human serum albumin can lead to bioactive peptides and biomarkers, *Front. Mol. Biosci.* **2018**, *5*, 63.
- [418] X. P. Lin, J. D. Minter, P. A. Gleeson. Macropinocytosis in different cell types: similarities and differences, *Membranes* **2020**, *10*, 177.
- [419] J. S. Blum, P. A. Wearsch, P. Cresswell. Pathways of antigen processing, *Annu. Rev. Immunol.* **2013**, *31*, 443–473.
- [420] J. Canton. Macropinocytosis: New insights into its underappreciated role in innate immune cell surveillance, *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2286.
- [421] D. M. Veltman. Drink or drive: competition between macropinocytosis and cell migration, *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 129–132.
- [422] D. M. Veltman, M. G. Lemieux, D. A. Knecht, R. H. Insall. PIP₃-dependent macropinocytosis is incompatible with chemotaxis, *J. Cell Biol.* **2014**, *204*, 497–505.
- [423] D. S. Redka, M. Gütschow, S. Grinstein, J. Canton. Differential ability of proinflammatory and anti-inflammatory macrophages to perform macropinocytosis, *Mol. Biol. Cell* **2018**, *29*, 53–65.
- [424] G. Hodge, S. Hodge, P. Han. Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by Annexin V binding: relevance to cytokine production, *Cytokine* **2000**, *12*, 1763–1768.
- [425] C. A. Sellick, R. Hansen, A. R. Maqsood, W. B. Dunn, G. M. Stephens, R. Goodacre, A. J. Dickson. Effective quenching processes for physiologically valid metabolite profiling of suspension cultured mammalian cells, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 174–183.
- [426] J. D. Bell, J. C. Brown, G. Kubal, P. J. Sadler. NMR-invisible lactate in blood plasma, *FEBS Lett.* **1988**, *235*, 81–86.
- [427] J. K. Nicholson, K. P. Gartland. ¹H NMR studies on protein binding of histidine, tyrosine and phenylalanine in blood plasma, *NMR Biomed.* **1989**, *2*, 77–82.
- [428] M. Jupin, P. J. Michiels, F. C. Girard, M. Spraul, S. S. Wijmenga. NMR identification of endogenous metabolites interacting with fatty and non-fatty human serum albumin in blood plasma: Fatty acids influence the HSA-metabolite interaction, *J. Magn. Reson.* **2013**, *228*, 81–94.
- [429] W. Brugger, D. Reinhardt, C. Galanos, R. Andreesen. Inhibition of in vitro differentiation of human monocytes to macrophages by lipopolysaccharides (LPS): phenotypic and functional analysis, *Int. Immunol.* **1991**, *3*, 221–227.
- [430] R. A. Musson. Human serum induces maturation of human monocytes in vitro. Changes in cytolytic activity, intracellular lysosomal enzymes, and nonspecific esterase activity, *Am. J. Pathol.* **1983**, *111*, 331–340.

- [431] Y. Akiyama, R. Griffith, P. Miller, G. W. Stevenson, S. Lund, D. J. Kanapa, H. C. Stevenson. Effects of adherence, activation and distinct serum proteins on the in vitro human monocyte maturation process, *J. Leukocyte Biol.* **1988**, *43*, 224–231.
- [432] J. Kzhyshkowska, A. Gudima, V. Riabov, C. Dollinger, P. Lavallo, N. E. Vrana. Macrophage responses to implants: prospects for personalized medicine, *J. Leukocyte Biol.* **2015**, *98*, 953–962.
- [433] A. Klinder, J. Markhoff, A. Jonitz-Heincke, P. Sterna, A. Salamon, R. Bader. Comparison of different cell culture plates for the enrichment of non-adherent human mononuclear cells, *Exp. Ther. Med.* **2019**, *17*, 2004–2012.
- [434] S. Gordon, P. R. Taylor. Monocyte and macrophage heterogeneity, *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 953–964.
- [435] M. van Wolfswinkel, K. E. van Meijgaarden, T. H. M. Ottenhoff, P. Niewold, S. A. Joosten. Extensive flow cytometric immunophenotyping of human PBMC incorporating detection of chemokine receptors, cytokines and tetramers, *Cytometry Part A* **2023**, *103*, 600–610.
- [436] C. Lambert, F. W. M. B. Preijers, G. Yanikkaya Demirel, U. Sack. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry, *Cytometry Part B* **2017**, *92*, 180–188.
- [437] C. Schmidl, K. Renner, K. Peter, R. Eder, T. Lassmann, P. J. Balwierz, M. Itoh, S. Nagao-Sato, H. Kawaji, P. Carninci...M. Rehli. Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets, *Blood* **2014**, *123*, 90–99.
- [438] H. Schwarz, M. Schmittner, A. Duschl, J. Horejs-Hoeck. Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells, *PLoS One* **2014**, *9*, e113840.
- [439] R. Chaiwut, W. Kasinrer. Very low concentration of lipopolysaccharide can induce the production of various cytokines and chemokines in human primary monocytes, *BMC Res. Notes* **2022**, *15*, 42.
- [440] WHO Consultation. Obesity: Preventing and managing the global epidemic, *W. H. O. Tech. Rep. Ser.* **2000**, *894*, 1–253.
- [441] U. J. H. Sachs, J. Bux. Gewinnung, Herstellung und Lagerung von Blut und Blutkomponenten in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie* (Hrsg.: V. Kiefel, C. Mueller-Eckhardt), Springer, Berlin, Heidelberg, **2010**, S. 223–243.
- [442] K. Dietl, K. Renner, K. Dettmer, B. Timischl, K. Eberhart, C. Dorn, C. Hellerbrand, M. Kastenberger, L. A. Kunz-Schughart, P. J. Oefner...M. P. Kreutz. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes, *J. Immunol.* **2010**, *184*, 1200–1209.
- [443] M. Mittal, M. R. Siddiqui, K. Tran, S. P. Reddy, A. B. Malik. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury, *Antioxid. Redox Signaling* **2014**, *20*, 1126–1167.
- [444] J. J. Haddad. Glutathione depletion is associated with augmenting a proinflammatory signal: evidence for an antioxidant/pro-oxidant mechanism regulating cytokines in the alveolar epithelium, *Cytokines Cell. Mol. Ther.* **2000**, *6*, 177–187.
- [445] A. C. Bulua, A. Simon, R. Maddipati, M. Pelletier, H. Park, K.-Y. Kim, M. N. Sack, D. L. Kastner, R. M. Siegel. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS), *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 519–533.

- [446] Tanaka, C., et al. Redox regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced interleukin-8 (IL-8) gene expression mediated by NF κ B and AP-1 in human astrocytoma U373 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 232, 568–573.
- [447] M. L. Tomasi, M. Ryoo, H. Yang, A. Iglesias Ara, K. S. Ko, S. C. Lu. Molecular mechanisms of lipopolysaccharide-mediated inhibition of glutathione synthesis in mice, *Free Radical Biol. Med.* **2014**, 68, 148–158.
- [448] N. D. Condon, J. M. Heddlestone, T.-L. Chew, L. Luo, P. S. McPherson, M. S. Ioannou, L. Hodgson, J. L. Stow, A. A. Wall. Macropinosome formation by tent pole ruffling in macrophages, *J. Cell Biol.* **2018**, 217, 3873–3885.
- [449] A. J. Clarke, A. K. Simon. Autophagy in the renewal, differentiation and homeostasis of immune cells, *Nat. Rev. Immunol.* **2019**, 19, 170–183.
- [450] M. A. Delgado, R. A. Elmaoued, A. S. Davis, G. Kyei, V. Deretic. Toll-like receptors control autophagy, *EMBO J.* **2008**, 27, 1110–1121.
- [451] Y. Xu, C. Jagannath, X.-D. Liu, A. Sharafkhaneh, K. E. Kolodziejska, N. T. Eissa. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity, *Immunity* **2007**, 27, 135–144.
- [452] M. A. Sanjuan, C. P. Dillon, S. W. G. Tait, S. Moshiah, F. Dorsey, S. Connell, M. Komatsu, K. Tanaka, J. L. Cleveland, S. Withoff, D. R. Green. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis, *Nature* **2007**, 450, 1253–1257.
- [453] S. K. Bharti, N. Sinha, B. S. Joshi, S. K. Mandal, R. Roy, C. L. Khetrapal. Improved quantification from ¹H-NMR spectra using reduced repetition times, *Metabolomics* **2008**, 4, 367–376.
- [454] R. Thakare, Y. S. Chhonker, N. Gautam, J. A. Alamoudi, Y. Alnouti. Quantitative analysis of endogenous compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 128, 426–437.
- [455] F. A. A. Mulder, L. Tenori, C. Luchinat. Fast and quantitative NMR metabolite analysis afforded by a paramagnetic co-solute, *Angew. Chem. Int. Ed* **2019**, 58, 15283–15286.
- [456] M. F. Alum, P. A. Shaw, B. C. Sweatman, B. K. Ubhi, J. N. Haselden, S. C. Connor. 4,4-Dimethyl-4-silapentane-1-ammonium trifluoroacetate (DSA), a promising universal internal standard for NMR-based metabolic profiling studies of biofluids, including blood plasma and serum, *Metabolomics* **2008**, 4, 122–127.
- [457] H. M. Parsons, D. R. Ekman, T. W. Collette, M. R. Viant. Spectral relative standard deviation: a practical benchmark in metabolomics, *Analyst* **2009**, 134, 478–485.
- [458] B. Wang, A. M. Goodpaster, M. A. Kennedy. Coefficient of variation, signal-to-noise ratio, and effects of normalization in validation of biomarkers from NMR-based metabolomics studies, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2013**, 128, 9–16.
- [459] F. Vrieling, X. A. M. H. van Dierendonck, M. Jaeger, A. W. M. Janssen, A. Hijmans, M. G. Netea, C. J. Tack, R. Stienstra. Glycolytic activity in human immune cells: inter-individual variation and functional implications during health and diabetes, *Immunometabolism* **2022**, 4, e00008.
- [460] D. L. Vaux, F. Fidler, G. Cumming. Replicates and repeats—what is the difference and is it significant? A brief discussion of statistics and experimental design, *EMBO Rep.* **2012**, 13, 291–296.
- [461] A. Kassambara, *Practical statistics in R II. Comparing groups: Numerical variables*, 1. Aufl., Datanova, **2019**.

- [462] D. Jacob, C. Deborde, M. Lefebvre, M. Maucourt, A. Moing. NMRProcFlow: a graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics, *Metabolomics* **2017**, 13, 36.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen:

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: <i>analysis of variance</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
AXP	AMP, ADP und ATP
BBI	engl.: <i>double resonance broad band</i>
COSY	engl.: <i>correlated spectroscopy</i>
CPD-A	Citrat-Phosphat-Dextrose mit Adenin
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERM	engl.: <i>embryo rearing medium</i>
ESC	Embryonale Stammzelle (engl.: <i>embryonic stem cell</i>)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	Fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal bovine serum</i>)
FC	engl.: <i>fold change</i>
FDR	engl.: <i>false discovery rate</i>
FID	Freier Induktionsabfall (engl.: <i>free induction decay</i>)
GIM	engl.: <i>genetically influenced metabotype</i>
GLUT	Glucosetransporter
GM-CSF	engl.: <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie (engl.: <i>genome-wide association study</i>)
H_0	Nullhypothese
H_1	Alternativhypothese
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
HSQC	engl.: <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IL	Interleukin
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzelle (engl.: <i>induced pluripotent stem cell</i>)

JRES	engl.: <i>J-resolved spectroscopy</i>
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M1-Makrophagen	Pro-inflammatorische Makrophagen
M2-Makrophagen	Anti-inflammatorische Makrophagen
MCT	Monocarboxylattransporter
M-CSF	engl.: <i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MD-2	engl.: <i>myeloid differentiation factor 2</i>
mGWAS	Genom- und metabolomweite Assoziationsstudie (engl.: <i>genome- and metabolome-wide association study</i>)
MIKK	<i>Medaka Inbred Kiyosu-Karlsruhe</i>
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMR	Kernspinresonanz (engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOESY	engl.: <i>nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i>
PAMP	Pathogenassoziiertes molekulares Muster (engl.: <i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBMC	Periphere mononukleare Blutzelle (engl.: <i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PC	Hauptkomponente (engl.: <i>principal component</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl.: <i>principal component analysis</i>)
PLS-DA	engl.: <i>partial least squares discriminant analysis</i>
ppm	engl.: <i>parts per million</i>
PQN	Probabilistische Quotienten-Normalisierung (engl.: <i>probabilistic quotient normalization</i>)
PRR	Mustererkennungsrezeptor (engl.: <i>pattern recognition receptor</i>)
PSC	Pluripotente Stammzelle (engl.: <i>pluripotent stem cell</i>)
ROI	engl.: <i>regions of interest</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>reactive oxygen species</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SNR	Signal-zu-Rausch Verhältnis (engl.: <i>signal to noise ratio</i>)
TBI	engl.: <i>triple resonance broad band</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha

TSP	Trimethylsilylpropionat
VIP	engl.: <i>variable importance in projection</i>

Symbole und Messparameter:

a	y-Achsenabschnitt
α	Signifikanzniveau
b	Steigung
B_0	Äußeres statisches Magnetfeld
B_{eff}	Effektives Magnetfeld am Kernort
$D1$	Relaxationsverzögerung (engl.: <i>relaxation delay</i>)
δ	Chemische Verschiebung, bezogen auf einen Standard (hier: TSP)
E	Energie
ΔE	Energieunterschied zwischen zwei Niveaus
γ	Gyromagnetisches Verhältnis
h	Planck-Konstante
$\hbar$	Reduzierte Planck-Konstante ($\hbar = h/2\pi$)
I	Kernspinquantenzahl
I	Fläche eines Resonanzsignals im NMR-Spektrum
J	Kopplungskonstante
k_B	Boltzmann-Konstante
$L4$	Wiederholungen des Spin-Echo-Elements
m	Magnetische Quantenzahl
μ	Magnetisches Moment
μ_z	Komponente des magnetischen Moments in Feldrichtung z
n	Stoffmenge
N	Anzahl der Kerne
$N_{\alpha,\text{eq}}$ und $N_{\beta,\text{eq}}$	Anzahl der Kerne im α - und β -Zustand im Gleichgewichtszustand
NS	Anzahl der Scans (engl.: <i>number of scans</i>)
$\Delta\nu_{1/2}$	Linienbreite bei halber Signalamplitude
ν	Frequenz
ν_0	Larmorfrequenz
P	Eigendrehimpuls oder Kernspin eines Atomkerns
Q^2	Güte der Vorhersage

R	Korrelationskoeffizient
R^2 (Kalibrierung)	Bestimmtheitsmaß
R^2 (PLS-DA)	Güte der Anpassung
σ	Abschirmkonstante
T	Absolute Temperatur in K
T_1	Spin-Gitter- oder longitudinale Relaxationszeit
T_2	Spin-Spin- oder transversale Relaxationszeit
τ_c	Rotationskorrelationszeit

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Kern-Zeeman-Aufspaltung für einen Kern mit $I = \frac{1}{2}$ und einem positiven gyromagnetischen Verhältnis im Magnetfeld B_0 .	6
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Box-Plots mit den charakteristischen Lagemaßen.	18
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines <i>scores plots</i> und eines <i>loadings plots</i> .	21
Abbildung 6.1: Repräsentative ^1H -NMR-Spektren von Leberextrakten der Inzucht-Stämme HO5 und iCab mit den identifizierten Metaboliten.	36
Abbildung 6.2: PCA <i>scores plot</i> zur Charakterisierung der untersuchten <i>batches</i> anhand des metabolischen Profils.	37
Abbildung 6.3: PCA <i>scores plot</i> zur Charakterisierung der Inzucht-Stämme HO5 und iCab sowie der männlichen und weiblichen Fische anhand des metabolischen Profils.	38
Abbildung 6.4: PCA <i>scores plot</i> zur Charakterisierung der Inzucht-Stämme HO5 und iCab anhand des metabolischen Profils.	39
Abbildung 6.5: PCA <i>scores plot</i> zur Charakterisierung männlicher und weiblicher Fische anhand des metabolischen Profils.	40
Abbildung 6.6: PLS-DA zur Unterscheidung der Inzucht-Stämme HO5 und iCab.	42
Abbildung 6.7: Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben des HO5-Stammes verglichen mit Mustern des iCab-Stammes.	46
Abbildung 6.8: Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben des iCab-Stammes verglichen mit Mustern des HO5-Stammes.	47
Abbildung 6.9: Box-Plots von Substanzen mit einem Konzentrationsunterschied zwischen HO5- und iCab-Stamm bei männlichen Fischen.	49
Abbildung 6.10: Box-Plots von Substanzen mit einem Konzentrationsunterschied zwischen HO5- und iCab-Stamm bei weiblichen Fischen.	50
Abbildung 6.11: PLS-DA zur Unterscheidung männlicher und weiblicher Fische.	56
Abbildung 6.12: Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben männlicher Fische verglichen mit weiblichen Fischen.	58
Abbildung 6.13: Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben weiblicher Fische verglichen mit männlichen Fischen.	59
Abbildung 6.14: Schematische Darstellung eines Medaka-Embryos im Blastula-Stadium.	63
Abbildung 6.15: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von Embryonen- und Zellextrakten.	65
Abbildung 6.16: Repräsentative ^1H -NMR-Spektren von Embryonenextrakten der Inzucht-Stämme iCab und QuiH mit den identifizierten Metaboliten.	67
Abbildung 6.17: PCA <i>scores plot</i> zur Charakterisierung der Embryonen von Fischen unterschiedlichen Alters anhand des metabolischen Profils.	68
Abbildung 6.18: PCA <i>scores plot</i> zur Charakterisierung der untersuchten <i>batches</i> anhand des metabolischen Profils.	69

Abbildung 6.19: PCA <i>scores plot</i> zur Charakterisierung der Embryonen der Inzucht-Stämme iCab und QuiH anhand des metabolischen Profils.	70
Abbildung 6.20: Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben des iCab-Stammes verglichen mit Mustern des QuiH-Stammes.....	72
Abbildung 6.21: Box-Plots von Substanzen mit höherer Konzentration in Proben des QuiH-Stammes verglichen mit Mustern des iCab-Stammes.....	74
Abbildung 9.1: Übersicht über die Leukozyten, die zellulären Elemente des menschlichen Immunsystems.	90
Abbildung 9.2: Schematische Darstellung der Umstellung des zellulären Stoffwechsels nach Stimulation mit LPS.....	99
Abbildung 11.1: Repräsentative ¹ H-NMR-Spektren von RPMI-Medium und RPMI-Medium mit FBS mit den identifizierten Substanzen.	106
Abbildung 11.2: Mittlere prozentuale Änderung der Konzentration ausgewählter Substanzen im RPMI-Medium ohne und mit FBS im Verlauf der Inkubation.....	112
Abbildung 11.3: Schematische Darstellung der Probenanordnung in einer Mikrotiterplatte mit 48 Kavitäten.	113
Abbildung 11.4: Repräsentative ¹ H-NMR-Spektren von RPMI-Medium mit FBS nach Kultivierung von PBMCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten.	117
Abbildung 11.5: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Glucose und Lactat in RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie bei Kultivierung von PBMCs.....	117
Abbildung 11.6: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Pyruvat, Citrat und Formiat in RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie bei Kultivierung von PBMCs.....	118
Abbildung 11.7: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Glutamat, Cystin, Serin und Aspartat in RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie bei Kultivierung von PBMCs.	119
Abbildung 11.8: Nettobilanz der durch die PBMCs verbrauchten beziehungsweise gebildeten Menge an Aspartat und Glutamin im Verlauf der Inkubation.....	120
Abbildung 11.9: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Glutamin, Alanin und Glycin in RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie bei Kultivierung von PBMCs.....	121
Abbildung 11.10: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Valin in RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie bei Kultivierung von PBMCs.....	122
Abbildung 11.11: Prozentuale Änderung des TSP-Integrals abhängig von der Inkubationszeit der Medien.	123
Abbildung 11.12: Schematische Darstellung zellulärer Stoffwechselwege mit Fokus auf der Glykolyse, dem Citratzyklus sowie dem Aminosäurestoffwechsel.....	125
Abbildung 11.13: Repräsentative ¹ H-NMR-Spektren von RPMI-Medium mit FBS nach Stimulation der PBMCs mit LPS und einer Inkubationsdauer von vier Tagen.	143
Abbildung 11.14: Nettobilanz für Glucose und Lactat bei Stimulation der PBMCs mit LPS. .	144
Abbildung 11.15: Verhältnis von gebildetem Lactat zu verbrauchter Glucose.	146
Abbildung 11.16: Nettobilanz für Pyruvat, Citrat und Formiat bei Stimulation der PBMCs mit LPS.	148

Abbildung 11.17: Nettobilanz für Aspartat und Cystin bei Stimulation der PBMCs mit LPS.	150
Abbildung 11.18: Nettobilanz für Glutamat und Serin bei Stimulation der PBMCs mit LPS.	151
Abbildung 11.19: Nettobilanz für Glutamin, Alanin und Glycin bei Stimulation der PBMCs mit LPS.	152
Abbildung 11.20: Nettobilanz für Valin bei Stimulation der PBMCs mit LPS.	153
Abbildung 11.21: Konzentration von IL-6 und IL-8 bei Stimulation der PBMCs mit LPS	154
Abbildung 11.22: Reproduzierbarkeit der Messwerte für Glucose, Lactat und Valin bei Stimulation mit 0.001 ng/ml LPS.	171

Tabellenverzeichnis

Tabelle 6.1: Substanzen mit unterschiedlicher Konzentration in Lebern des HO5- und des iCab-Stammes sowie damit in Verbindung stehende Stoffwechselwege.....	51
Tabelle 11.1: Konzentrationen der in den Medien identifizierten Substanzen.....	108
Tabelle 11.2: Konzentrationsänderung verschiedener Substanzen im RPMI-Medium ohne sowie mit FBS über einen Zeitraum von sechs Tagen.....	114
Tabelle 11.3: Parameter zur Beurteilung der Güte der Kalibrierfunktionen.	166
Tabelle 12.1: Verwendete Kalibrierlösungen mit Konzentrationsbereich der Substanzen...	181

Anhang

Tabelle A.1: Chemische Verschiebung δ der in Kapitel 6.1 verwendeten *buckets* mit den zugeordneten Substanzen. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit „U“ sowie der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode angegeben. Abkürzungen: 3-MH: 3-Methylhistidin, Ade: Adenin, Ado: Adenosin, ADP: Adenosindiphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, AXP: AMP, ADP und ATP, Bet: Betain, Cho: Cholin, GPC: L- α -Glycerylphosphorylcholin, GSH: Glutathion (reduziert), GT: Glutathion (reduziert und oxidiert), Htau: Hypotaurin, Ino: Inosin, Krea: Kreatin, Lac: Lactat, Ma: Malat, NAM: Nicotinamid, Orn: Ornithin, PCh: Phosphorylcholin, Pyr: Pyruvat, Sar: Sarcosin, Suc: Succinat, Tau: Taurin.

δ in ppm	Substanzen	δ in ppm	Substanzen	δ in ppm	Substanzen
0.960–0.981	Leu	2.739–2.745	Sar	4.251–4.269	Thr
1.006–1.026	Ile	2.760–2.763	U2.76	4.559–4.588	GSH
1.033–1.058	Val	2.794–2.808	Asp	6.518–6.524	Fumarat
1.316–1.350	Lac/Thr	2.874–2.895	Asn	7.110–7.125	His
1.472–1.497	Ala	3.011–3.035	Lys	7.185–7.215	Tyr
2.024–2.072	Glu/Pro	3.035–3.044	Krea/Lys	7.416–7.452	Phe
2.102–2.137	Glu/Gln	3.052–3.075	Orn	7.956–7.968	U7.96
2.230–2.240	U2.24	3.134–3.140	U3.14	8.049–8.066	3-MH
2.333–2.374	Glu/Pro/Ma	3.140–3.151	U3.15	8.197–8.204	U8.20
2.374–2.378	Pyr/Glu	3.152–3.167	U3.16	8.205–8.210	Ade
2.389–2.396	U2.39	3.202–3.211	Cho	8.273–8.286	AXP
2.400–2.411	Suc	3.218–3.228	PCh	8.348–8.356	Ado/Ino
2.435–2.483	Gln	3.230–3.236	GPC	8.459–8.464	Formiat
2.513–2.550	GT	3.267–3.276	Tau/Bet	8.507–8.518	U8.51
2.634–2.638	Met	3.352–3.357	Pro	8.531–8.540	ADP
2.638–2.645	Htau.1	3.357–3.364	Htau.2	8.539–8.549	ATP
2.655–2.659	Ma	3.424–3.430	Tau	8.596–8.606	AMP
2.670–2.675	U2.67	3.560–3.565	Gly	8.711–8.727	NAM
2.711–2.717	U2.71	4.092–4.110	Lac		

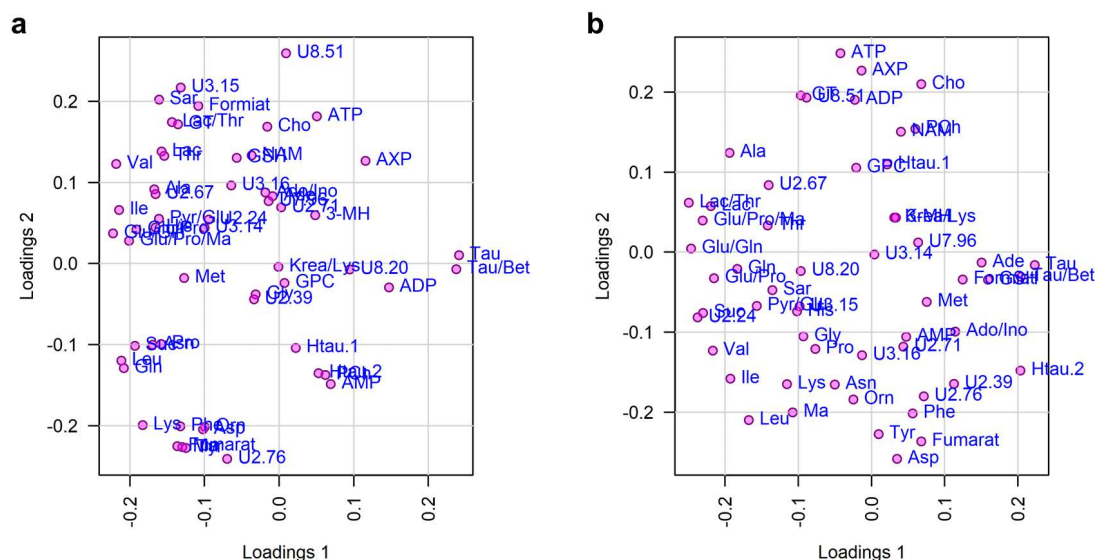


Abbildung A.1: PCA *loadings plot* zur Charakterisierung der Inzucht-Stämme HO5 und iCab anhand des metabolischen Profils. a: Weibliche Fische. b: Männliche Fische. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit „U“ sowie der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode angegeben. Abkürzungen: 3-MH: 3-Methylhistidin, Ade: Adenin, Ado: Adenosin, ADP: Adenosindiphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, AXP: AMP, ADP und ATP, Bet: Betain, Cho: Cholin, GPC: L- α -Glycerylphosphorylcholin, GSH: Glutathion (reduziert), GT: Glutathion (reduziert und oxidiert), Htau: Hypotaurin, Ino: Inosin, Krea: Kreatin, Lac: Lactat, Ma: Malat, NAM: Nicotinamid, Orn: Ornithin, PCh: Phosphorylcholin, Pyr: Pyruvat, Sar: Sarcosin, Suc: Succinat, Tau: Taurin.

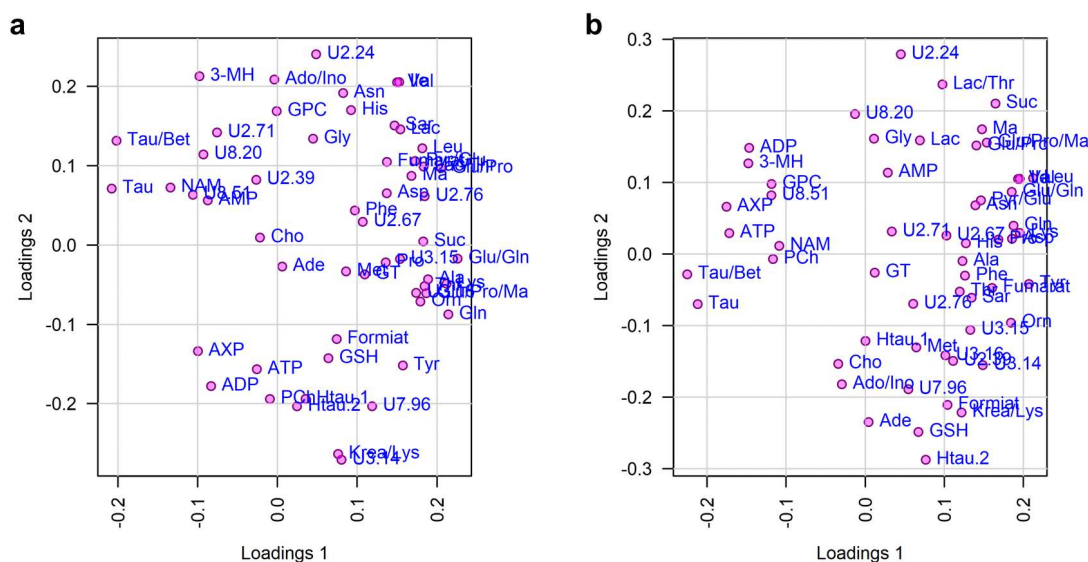


Abbildung A.2: PCA *loadings plot* zur Charakterisierung männlicher und weiblicher Fische anhand des metabolischen Profils. a: HO5. b: iCab. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit „U“ sowie der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode angegeben. Abkürzungen: 3-MH: 3-Methylhistidin, Ade: Adenin, Ado: Adenosin, ADP: Adenosindiphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, AXP: AMP, ADP und ATP, Bet: Betain, Cho: Cholin, GPC: L- α -Glycerylphosphorylcholin, GSH: Glutathion (reduziert), GT: Glutathion (reduziert und oxidiert), Htau: Hypotaurin, Ino: Inosin, Krea: Kreatin, Lac: Lactat, Ma: Malat, NAM: Nicotinamid, Orn: Ornithin, PCh: Phosphorylcholin, Pyr: Pyruvat, Sar: Sarcosin, Suc: Succinat, Tau: Taurin.

Tabelle A.2: PLS-DA VIP-scores (Komponente 1) zur Unterscheidung der Inzucht-Stämme HO5 und iCab. Die Werte sind nach absteigendem VIP-score für die gemeinsame Betrachtung beider Geschlechter sortiert. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit „U“ sowie der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode angegeben. Abkürzungen: 3-MH: 3-Methylhistidin, Ade: Adenin, Ado: Adenosin, ADP: Adenosindiphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, AXP: AMP, ADP und ATP, Bet: Betain, Cho: Cholin, GPC: L- α -Glycerylphosphorylcholin, GSH: Glutathion (reduziert), GT: Glutathion (reduziert und oxidiert), Htau: Hypotaurin, Ino: Inosin, Krea: Kreatin, Lac: Lactat, Ma: Malat, NAM: Nicotinamid, Orn: Ornithin, PCh: Phosphorylcholin, Pyr: Pyruvat, Sar: Sarcosin, Suc: Succinat, Tau: Taurin.

Substanzen	δ in ppm	Weiblich	Männlich	Beide Geschlechter
		VIP-score	VIP-score	VIP-score
ATP	8.539–8.549	1.77	1.85	1.93
Lac/Thr	1.316–1.350	1.96	1.68	1.92
Asp	2.794–2.808	1.54	1.88	1.88
Fumarat	6.518–6.524	1.41	1.67	1.72
U8.51	8.507–8.518	1.82	1.46	1.62
U2.76	2.760–2.763	1.79	1.06	1.53
Phe	7.416–7.452	1.22	1.41	1.46
GT	2.513–2.550	1.08	1.47	1.42
U2.39	2.389–2.396	0.542	1.53	1.35
Orn	3.052–3.075	1.52	1.14	1.33
Tyr	7.185–7.215	1.46	1.34	1.33
Ma	2.655–2.659	1.50	0.985	1.32
Ala	1.472–1.497	0.904	1.67	1.31
Htau.2	3.357–3.364	1.20	1.70	1.29
AXP	8.273–8.286	0.791	1.43	1.25
Glu/Pro/Ma	2.333–2.374	0.854	1.24	1.22
Lac	4.092–4.110	0.921	1.25	1.22
AMP	8.596–8.606	1.49	0.923	1.22
Glu/Gln	2.102–2.137	1.05	1.12	1.20
Tau/Bet	3.267–3.276	0.808	1.38	1.20
Cho	3.202–3.211	1.31	0.801	1.17
U2.67	2.670–2.675	1.17	0.845	1.11
Sar	2.739–2.745	1.36	0.500	1.08
Thr	4.251–4.269	1.24	0.705	1.05
Glu/Pro	2.024–2.072	0.998	0.844	0.945
Val	1.033–1.058	1.36	0.394	0.850
Pyr/Glu	2.374–2.378	1.07	0.663	0.843
Tau	3.424–3.430	0.475	1.00	0.834
Ado/Ino	8.348–8.356	0.0337	0.965	0.785
U2.71	2.711–2.717	0.181	1.17	0.754

Substanzen	δ in ppm	Weiblich	Männlich	Beide Geschlechter
		VIP-score	VIP-score	VIP-score
Lys	3.011–3.035	0.840	0.645	0.686
U3.15	3.140–3.151	1.12	0.0772	0.670
ADP	8.531–8.540	0.505	1.20	0.664
GPC	3.230–3.236	0.0628	0.965	0.623
NAM	8.711–8.727	0.901	0.535	0.599
Formiat	8.459–8.464	1.07	0.134	0.598
Gln	2.435–2.483	0.0306	1.06	0.521
Ile	1.006–1.026	1.09	0.125	0.500
U2.24	2.230–2.240	0.648	0.544	0.498
Asn	2.874–2.895	0.305	0.934	0.489
His	7.110–7.125	0.885	0.0568	0.471
Leu	0.960–0.981	0.332	0.407	0.436
Ade	8.205–8.210	0.0425	0.602	0.403
Gly	3.560–3.565	0.249	0.185	0.341
Suc	2.400–2.411	0.380	0.623	0.322
Htau.1	2.638–2.645	0.788	0.802	0.266
Met	2.634–2.638	0.111	0.489	0.253
U3.16	3.152–3.167	0.672	0.498	0.220
U7.96	7.956–7.968	0.493	0.0770	0.217
U3.14	3.134–3.140	0.0143	0.195	0.160
PCh	3.218–3.228	0.708	0.471	0.0698
Pro	3.352–3.357	0.0418	0.151	0.0529
3-MH	8.049–8.066	0.0658	0.0125	0.0468
U8.20	8.197–8.204	0.000954	0.119	0.0397
Krea/Lys	3.035–3.044	0.169	0.0128	0.0375
GSH	4.559–4.588	0.720	0.550	0.0126

Tabelle A.3: Ergebnisse der univariaten Datenanalyse für den Vergleich HO5 gegen iCab. Die Werte sind nach absteigendem FC für die gemeinsame Betrachtung beider Geschlechter sortiert. Die *p*-Werte sind das Ergebnis eines nicht-parametrischen Mann-Whitney-*U*-Tests mit FDR-Korrektur. Die mit * gekennzeichneten *buckets* wurden für die Darstellung der Boxplots genutzt. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit „U“ sowie der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode angegeben. Abkürzungen: 3-MH: 3-Methylhistidin, Ade: Adenin, Ado: Adenosin, ADP: Adenosindiphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, AXP: AMP, ADP und ATP, Bet: Betain, Cho: Cholin, GPC: L- α -Glycerolphosphorylcholin, GSH: Glutathion (reduziert), GT: Glutathion (reduziert und oxidiert), Htau: Hypotaurin, Ino: Inosin, Krea: Kreatin, Lac: Lactat, Ma: Malat, NAM: Nicotinamid, Orn: Ornithin, PCh: Phosphorylcholin, Pyr: Pyruvat, Sar: Sarcosin, Suc: Succinat, Tau: Taurin.

Substanzen	δ in ppm	Weiblich		Männlich		Beide Geschlechter	
		FC	<i>p</i> -Wert	FC	<i>p</i> -Wert	FC	<i>p</i> -Wert
Htau.2*	3.357–3.364*	5.53	1.73×10^{-2}	5.23	4.93×10^{-6}	5.18	2.68×10^{-5}
Fumarat*	6.518–6.524*	1.75	1.71×10^{-2}	3.08	1.85×10^{-5}	2.21	4.85×10^{-7}
Phe*	7.416–7.452*	1.45	3.60×10^{-2}	2.00	1.02×10^{-3}	1.65	1.36×10^{-4}
Asp*	2.794–2.808*	1.44	4.95×10^{-3}	1.70	2.85×10^{-6}	1.54	1.15×10^{-8}
Tyr*	7.185–7.215*	1.48	9.25×10^{-3}	1.60	4.82×10^{-3}	1.49	4.61×10^{-4}
U2.39*	2.389–2.396*	1.10	7.43×10^{-1}	2.06	7.72×10^{-5}	1.47	2.38×10^{-4}
AMP*	8.596–8.606*	1.32	6.08×10^{-4}	1.38	5.07×10^{-2}	1.36	1.68×10^{-4}
Ma*	2.655–2.659*	1.39	6.72×10^{-3}	1.31	2.99×10^{-2}	1.34	2.38×10^{-4}
Orn*	3.052–3.075*	1.33	4.95×10^{-3}	1.34	1.06×10^{-3}	1.34	2.38×10^{-4}
Ado/Ino	8.348–8.356	1.01	9.49×10^{-1}	1.63	6.53×10^{-2}	1.34	8.71×10^{-2}
U2.76*	2.760–2.763*	1.31	6.08×10^{-4}	1.27	4.54×10^{-2}	1.30	2.68×10^{-5}
U2.71	2.711–2.717	0.973	5.75×10^{-1}	1.31	5.82×10^{-3}	1.15	1.26×10^{-1}
Tau/Bet*	3.267–3.276*	1.07	1.27×10^{-1}	1.18	1.60×10^{-3}	1.13	2.79×10^{-3}
Lys*	3.011–3.035	1.13	1.18×10^{-1}	1.12	1.59×10^{-1}	1.11	6.01×10^{-2}
Htau.1	2.638–2.645	1.40	7.43×10^{-1}	0.833	1.01×10^{-1}	1.10	3.82×10^{-1}
Tau	3.424–3.430	1.05	6.86×10^{-1}	1.12	4.05×10^{-2}	1.10	8.71×10^{-2}
Asn	2.874–2.895	0.955	9.79×10^{-1}	1.25	3.48×10^{-2}	1.09	1.47×10^{-1}
Leu	0.960–0.981	1.04	7.43×10^{-1}	1.10	3.68×10^{-1}	1.07	3.03×10^{-1}
Gly	3.560–3.565	1.05	7.43×10^{-1}	1.04	8.35×10^{-1}	1.07	4.50×10^{-1}
Ade	8.205–8.210	1.01	8.60×10^{-1}	1.26	9.78×10^{-2}	1.07	5.66×10^{-1}
Met	2.634–2.638	0.985	9.49×10^{-1}	1.12	3.16×10^{-1}	1.04	6.36×10^{-1}
Pro	3.352–3.357	1.01	9.53×10^{-1}	1.04	7.09×10^{-1}	1.01	8.88×10^{-1}
3-MH*	8.049–8.066	0.936	7.43×10^{-1}	0.977	9.47×10^{-1}	1.01	5.66×10^{-1}
Krea/Lys*	3.035–3.044	1.04	8.60×10^{-1}	0.993	1.93×10^{-1}	0.986	5.83×10^{-1}
U3.16	3.152–3.167	0.946	1.64×10^{-1}	1.04	3.23×10^{-1}	0.981	7.29×10^{-1}
PCh	3.218–3.228	1.18	2.39×10^{-1}	0.821	3.61×10^{-2}	0.980	4.21×10^{-1}
GSH*	4.559–4.588	0.875	1.27×10^{-1}	1.19	3.45×10^{-1}	0.979	8.02×10^{-1}
U8.20	8.197–8.204	1.00	9.39×10^{-1}	0.936	8.29×10^{-1}	0.978	9.11×10^{-1}
U3.14	3.134–3.140	1.00	8.60×10^{-1}	0.953	8.27×10^{-1}	0.967	7.63×10^{-1}

Substanzen	δ in ppm	Weiblich		Männlich		Beide Geschlechter	
		FC	p-Wert	FC	p-Wert	FC	p-Wert
Suc	2.400–2.411	1.05	5.47×10^{-1}	0.866	6.59×10^{-1}	0.949	7.63×10^{-1}
His	7.110–7.125	0.886	5.22×10^{-2}	1.01	8.29×10^{-1}	0.934	1.99×10^{-1}
U7.96	7.956–7.968	0.949	5.82×10^{-1}	0.934	4.59×10^{-1}	0.932	2.00×10^{-1}
Gln	2.435–2.483	0.996	8.60×10^{-1}	0.863	3.48×10^{-2}	0.927	3.03×10^{-1}
Ile	1.006–1.026	0.858	2.83×10^{-2}	0.971	8.29×10^{-1}	0.921	2.37×10^{-1}
U2.24	2.230–2.240	0.932	2.50×10^{-1}	0.893	1.33×10^{-1}	0.920	1.75×10^{-1}
Thr*	4.251–4.269*	0.917	2.32×10^{-2}	0.936	3.09×10^{-1}	0.920	9.03×10^{-3}
ADP*	8.531–8.540*	1.05	6.86×10^{-1}	0.789	6.74×10^{-3}	0.909	2.00×10^{-1}
U3.15	3.140–3.151	0.848	1.27×10^{-1}	0.987	6.30×10^{-1}	0.900	5.12×10^{-1}
Glu/Pro	2.024–2.072	0.903	1.39×10^{-1}	0.847	9.48×10^{-2}	0.884	2.17×10^{-2}
Lac	4.092–4.110	0.917	1.60×10^{-1}	0.839	4.16×10^{-3}	0.879	1.07×10^{-3}
Glu/Gln	2.102–2.137	0.896	1.08×10^{-1}	0.852	2.99×10^{-2}	0.869	2.86×10^{-3}
Val*	1.033–1.058	0.813	5.43×10^{-3}	0.913	8.29×10^{-1}	0.864	3.21×10^{-2}
GPC	3.230–3.236	0.990	9.12×10^{-1}	0.754	2.57×10^{-2}	0.862	2.26×10^{-1}
AXP*	8.273–8.286*	0.921	1.08×10^{-1}	0.794	1.02×10^{-3}	0.854	1.12×10^{-3}
Pyr/Glu	2.374–2.378	0.855	5.22×10^{-2}	0.826	2.75×10^{-1}	0.851	2.01×10^{-2}
GT*	2.513–2.550*	0.879	7.23×10^{-2}	0.814	6.37×10^{-4}	0.845	1.47×10^{-4}
U2.67	2.670–2.675	0.835	3.60×10^{-2}	0.859	9.78×10^{-2}	0.844	3.66×10^{-3}
Glu/Pro/Ma*	2.333–2.374*	0.899	2.10×10^{-1}	0.785	5.82×10^{-3}	0.837	1.07×10^{-3}
NAM*	8.711–8.727	0.822	1.89×10^{-1}	0.784	9.78×10^{-2}	0.798	1.30×10^{-1}
Sar*	2.739–2.745*	0.712	3.43×10^{-2}	0.885	2.20×10^{-1}	0.782	7.00×10^{-3}
Cho*	3.202–3.211*	0.723	9.32×10^{-3}	0.862	1.54×10^{-1}	0.781	1.12×10^{-3}
Ala*	1.472–1.497*	0.840	2.50×10^{-1}	0.714	3.85×10^{-5}	0.774	2.42×10^{-4}
U8.51*	8.507–8.518*	0.578	6.08×10^{-4}	0.551	1.02×10^{-3}	0.562	3.97×10^{-6}
Lac/Thr*	1.316–1.350*	0.677	2.02×10^{-4}	0.463	8.65×10^{-6}	0.560	5.78×10^{-10}
ATP*	8.539–8.549*	0.654	4.58×10^{-4}	0.484	3.76×10^{-6}	0.558	1.86×10^{-9}
Formiat*	8.459–8.464	0.206	1.94×10^{-1}	0.211	4.67×10^{-1}	0.194	1.04×10^{-1}

Tabelle A.4: PLS-DA VIP-scores (Komponente 1) zur Unterscheidung männlicher und weiblicher Fische. Die Werte sind nach absteigendem VIP-score für die gemeinsame Betrachtung beider Stämme sortiert. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit „U“ sowie der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode angegeben. Abkürzungen: 3-MH: 3-Methylhistidin, Ade: Adenin, Ado: Adenosin, ADP: Adenosindiphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, AXP: AMP, ADP und ATP, Bet: Betain, Cho: Cholin, GPC: L- α -Glycerylphosphorylcholin, GSH: Glutathion (reduziert), GT: Glutathion (reduziert und oxidiert), Htau: Hypotaurin, Ino: Inosin, Krea: Kreatin, Lac: Lactat, Ma: Malat, NAM: Nicotinamid, Orn: Ornithin, PCh: Phosphorylcholin, Pyr: Pyruvat, Sar: Sarcosin, Suc: Succinat, Tau: Taurin.

Substanzen	δ in ppm	H05	iCab	Beide Stämme
		VIP-score	VIP-score	VIP-score
Krea/Lys	3.035–3.044	1.76	2.05	2.18
3-MH	8.049–8.066	2.00	1.79	2.17
U7.96	7.956–7.968	2.18	1.41	1.88
U3.16	3.152–3.167	1.41	1.53	1.63
U3.14	3.134–3.140	1.56	1.22	1.58
GSH	4.559–4.588	1.23	1.53	1.58
Gln	2.435–2.483	1.71	0.860	1.44
U2.24	2.230–2.240	1.07	1.39	1.40
Tyr	7.185–7.215	1.40	1.30	1.38
GPC	3.230–3.236	0.763	1.55	1.37
Tau/Bet	3.267–3.276	1.63	0.841	1.35
U3.15	3.140–3.151	1.11	1.33	1.34
Thr	4.251–4.269	1.21	1.22	1.31
Lys	3.011–3.035	1.20	1.08	1.27
Htau.2	3.357–3.364	1.01	1.72	1.27
Orn	3.052–3.075	1.14	1.57	1.26
NAM	8.711–8.727	1.24	1.07	1.25
Formiat	8.459–8.464	1.03	1.28	1.24
Tau	3.424–3.430	1.31	0.805	1.19
Ala	1.472–1.497	1.41	0.722	1.09
U8.51	8.507–8.518	1.31	1.17	1.09
Glu/Gln	2.102–2.137	1.17	0.843	1.07
U8.20	8.197–8.204	0.912	0.920	1.05
Ade	8.205–8.210	0.881	0.980	0.992
AXP	8.273–8.286	0.271	1.40	0.926
Pro	3.352–3.357	0.691	0.671	0.773
ATP	8.539–8.549	0.0903	1.35	0.753
Gly	3.560–3.565	0.505	0.824	0.751
Htau.1	2.638–2.645	0.956	0.00108	0.722
U2.71	2.711–2.717	1.24	0.182	0.707
Glu/Pro/Ma	2.333–2.374	1.14	0.272	0.703

Substanzen	δ in ppm	H05	iCab	Beide Stämme
		VIP-score	VIP-score	VIP-score
ADP	8.531–8.540	0.395	1.56	0.647
Met	2.634–2.638	0.193	0.720	0.595
Cho	3.202–3.211	0.00654	0.781	0.543
U2.39	2.389–2.396	0.468	1.28	0.528
Sar	2.739–2.745	0.172	0.775	0.477
Leu	0.960–0.981	0.365	0.449	0.463
GT	2.513–2.550	0.857	0.104	0.431
U2.76	2.760–2.763	0.745	0.213	0.410
U2.67	2.670–2.675	0.293	0.418	0.402
AMP	8.596–8.606	0.424	0.281	0.395
Asp	2.794–2.808	0.0435	0.923	0.368
Fumarat	6.518–6.524	0.245	0.818	0.329
Pyr/Glu	2.374–2.378	0.625	0.101	0.288
His	7.110–7.125	0.347	0.607	0.254
Ado/Ino	8.348–8.356	0.743	0.334	0.252
Suc	2.400–2.411	1.06	0.233	0.227
PCh	3.218–3.228	0.644	0.388	0.223
Phe	7.416–7.452	0.239	0.666	0.221
Lac	4.092–4.110	0.409	0.491	0.148
Glu/Pro	2.024–2.072	0.572	0.148	0.142
Ile	1.006–1.026	0.314	0.300	0.0954
Lac/Thr	1.316–1.350	0.900	0.658	0.0785
Val	1.033–1.058	0.417	0.277	0.0762
Ma	2.655–2.659	0.182	0.0152	0.0567
Asn	2.874–2.895	0.748	0.662	0.0242

Tabelle A.5: Ergebnisse der univariaten Datenanalyse für den Vergleich männlich gegen weiblich. Die Werte sind nach absteigendem FC für die gemeinsame Betrachtung beider Stämme sortiert. Die *p*-Werte sind das Ergebnis eines nicht-parametrischen Mann-Whitney-*U*-Tests mit FDR-Korrektur. Die mit * gekennzeichneten *buckets* wurden für die Darstellung der Boxplots genutzt. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit „U“ sowie der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode angegeben. Abkürzungen: 3-MH: 3-Methylhistidin, Ade: Adenin, Ado: Adenosin, ADP: Adenosindiphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, AXP: AMP, ADP und ATP, Bet: Betain, Cho: Cholin, GPC: L- α -Glycerolphosphorylcholin, GSH: Glutathion (reduziert), GT: Glutathion (reduziert und oxidiert), Htau: Hypotaurin, Ino: Inosin, Krea: Kreatin, Lac: Lactat, Ma: Malat, NAM: Nicotinamid, Orn: Ornithin, PCh: Phosphorylcholin, Pyr: Pyruvat, Sar: Sarcosin, Suc: Succinat, Tau: Taurin.

Substanzen	δ in ppm	HO5		iCab		Beide Stämme	
		FC	<i>p</i> -Wert	FC	<i>p</i> -Wert	FC	<i>p</i> -Wert
3-MH*	8.049–8.066*	10.5	7.43×10^{-7}	12.2	1.09×10^{-4}	11.4	1.45×10^{-11}
NAM*	8.711–8.727*	1.57	2.07×10^{-3}	1.63	5.36×10^{-3}	1.60	3.24×10^{-5}
U8.20	8.197–8.204	1.41	6.58×10^{-2}	1.56	8.52×10^{-2}	1.49	6.54×10^{-3}
U8.51*	8.507–8.518*	1.43	9.42×10^{-3}	1.48	3.69×10^{-2}	1.45	8.40×10^{-3}
GPC	3.230–3.236	1.17	2.58×10^{-1}	1.60	1.35×10^{-4}	1.38	1.40×10^{-4}
U2.24	2.230–2.240	1.22	3.52×10^{-2}	1.30	2.57×10^{-3}	1.26	1.49×10^{-4}
ATP*	8.539–8.549	1.02	9.23×10^{-1}	1.40	1.74×10^{-3}	1.24	1.05×10^{-1}
Tau/Bet*	3.267–3.276	1.20	6.07×10^{-4}	1.09	9.37×10^{-2}	1.15	2.42×10^{-4}
Gly	3.560–3.565	1.12	4.06×10^{-1}	1.18	9.53×10^{-2}	1.15	6.42×10^{-2}
Tau	3.424–3.430	1.17	6.44×10^{-3}	1.10	1.30×10^{-1}	1.14	8.93×10^{-4}
U2.71	2.711–2.717	1.30	6.29×10^{-3}	0.968	6.95×10^{-1}	1.13	6.85×10^{-2}
AXP*	8.273–8.286	1.03	3.81×10^{-1}	1.20	2.99×10^{-3}	1.12	7.17×10^{-3}
Ado/Ino	8.348–8.356	1.33	1.76×10^{-1}	0.877	6.46×10^{-1}	1.11	5.07×10^{-1}
ADP*	8.531–8.540	0.936	9.05×10^{-1}	1.26	3.61×10^{-4}	1.10	1.88×10^{-2}
AMP*	8.596–8.606	1.12	6.86×10^{-1}	1.07	5.03×10^{-1}	1.10	5.46×10^{-1}
Lac/Thr*	1.316–1.350	0.806	5.04×10^{-2}	1.18	4.17×10^{-1}	1.02	5.07×10^{-1}
Lac	4.092–4.110	0.966	4.59×10^{-1}	1.06	5.03×10^{-1}	1.02	9.96×10^{-1}
Asn	2.874–2.895	1.14	3.56×10^{-1}	0.865	1.46×10^{-1}	0.996	7.24×10^{-1}
Ma*	2.655–2.659	0.969	8.99×10^{-1}	1.00	8.35×10^{-1}	0.988	9.96×10^{-1}
Val*	1.033–1.058	1.05	5.44×10^{-1}	0.940	4.17×10^{-1}	0.987	5.10×10^{-1}
Ile	1.006–1.026	1.04	6.94×10^{-1}	0.937	2.03×10^{-1}	0.985	5.03×10^{-1}
Glu/Pro	2.024–2.072	0.939	1.18×10^{-1}	1.02	5.49×10^{-1}	0.982	1.04×10^{-1}
His	7.110–7.125	1.05	6.25×10^{-1}	0.896	1.98×10^{-1}	0.965	4.66×10^{-1}
Suc	2.400–2.411	0.878	2.98×10^{-2}	1.05	7.80×10^{-1}	0.964	3.06×10^{-1}
GT*	2.513–2.550	0.914	5.65×10^{-2}	0.987	7.45×10^{-1}	0.951	2.34×10^{-1}
Pyr/Glu	2.374–2.378	0.919	1.76×10^{-1}	0.975	3.46×10^{-1}	0.947	1.02×10^{-1}
U2.67	2.670–2.675	0.962	7.69×10^{-1}	0.929	3.24×10^{-1}	0.942	2.55×10^{-1}
PCh	3.218–3.228	0.785	1.34×10^{-2}	1.11	8.62×10^{-1}	0.939	9.26×10^{-2}
U2.76*	2.760–2.763	0.912	1.76×10^{-1}	0.955	7.80×10^{-1}	0.934	6.48×10^{-1}
Phe*	7.416–7.452	1.06	5.28×10^{-1}	0.743	3.85×10^{-1}	0.934	9.96×10^{-1}

Substanzen	δ in ppm	HO5		iCab		Beide Stämme	
		FC	<i>p</i> -Wert	FC	<i>p</i> -Wert	FC	<i>p</i> -Wert
Leu	0.960–0.981	0.947	5.44×10^{-1}	0.908	3.11×10^{-1}	0.929	1.97×10^{-1}
Asp*	2.794–2.808	0.992	9.23×10^{-1}	0.814	1.30×10^{-1}	0.922	5.07×10^{-1}
Glu/Pro/Ma*	2.333–2.374	0.846	2.76×10^{-2}	0.960	5.57×10^{-1}	0.905	4.33×10^{-2}
Met	2.634–2.638	0.974	8.46×10^{-1}	0.838	1.30×10^{-1}	0.905	2.15×10^{-1}
Thr*	4.251–4.269*	0.919	2.87×10^{-2}	0.891	1.06×10^{-2}	0.903	4.51×10^{-4}
Sar*	2.739–2.745	1.03	5.74×10^{-1}	0.814	1.98×10^{-1}	0.900	2.53×10^{-1}
Fumarat*	6.518–6.524	1.07	6.55×10^{-1}	0.590	1.27×10^{-1}	0.899	5.07×10^{-1}
Cho*	3.202–3.211	0.999	9.23×10^{-1}	0.826	9.53×10^{-2}	0.894	2.37×10^{-1}
Glu/Gln	2.102–2.137	0.867	9.53×10^{-3}	0.903	9.53×10^{-2}	0.885	1.65×10^{-3}
U3.16	3.152–3.167	0.919	3.02×10^{-3}	0.829	2.33×10^{-4}	0.872	2.75×10^{-7}
U2.39*	2.389–2.396	1.10	4.14×10^{-1}	0.598	1.74×10^{-3}	0.866	1.91×10^{-1}
Pro	3.352–3.357	0.878	2.14×10^{-1}	0.834	1.68×10^{-1}	0.856	5.16×10^{-2}
Lys*	3.011–3.035*	0.827	9.53×10^{-3}	0.824	3.94×10^{-2}	0.827	5.98×10^{-4}
Gln	2.435–2.483	0.759	2.49×10^{-4}	0.869	1.42×10^{-1}	0.814	1.39×10^{-4}
Ala*	1.472–1.497	0.748	3.01×10^{-3}	0.871	3.24×10^{-1}	0.813	6.18×10^{-3}
U3.15	3.140–3.151	0.888	3.11×10^{-2}	0.752	4.94×10^{-4}	0.812	9.83×10^{-6}
Htau.1	2.638–2.645	0.602	5.04×10^{-2}	1.00	8.35×10^{-1}	0.772	9.83×10^{-2}
Orn*	3.052–3.075*	0.760	8.22×10^{-3}	0.762	2.33×10^{-4}	0.763	3.56×10^{-5}
U3.14	3.134–3.140	0.712	2.81×10^{-5}	0.736	5.58×10^{-3}	0.724	2.75×10^{-7}
Ade	8.205–8.210	0.766	5.88×10^{-2}	0.587	3.69×10^{-2}	0.675	2.56×10^{-3}
Tyr*	7.185–7.215*	0.695	5.52×10^{-3}	0.619	1.10×10^{-2}	0.667	2.47×10^{-4}
GSH*	4.559–4.588*	0.769	9.53×10^{-3}	0.563	4.20×10^{-4}	0.658	2.59×10^{-6}
U7.96	7.956–7.968	0.621	3.09×10^{-8}	0.624	6.68×10^{-4}	0.622	1.07×10^{-10}
Krea/Lys*	3.035–3.044*	0.423	3.79×10^{-5}	0.425	2.21×10^{-6}	0.424	6.65×10^{-12}
Htau.2*	3.357–3.364*	0.188	1.85×10^{-2}	0.189	3.15×10^{-5}	0.191	1.20×10^{-4}
Formiat*	8.459–8.464*	0.201	5.04×10^{-2}	0.158	3.81×10^{-2}	0.158	1.54×10^{-3}

Tabelle A.6: Chemische Verschiebung δ der in Kapitel 6.2 verwendeten *buckets* mit den zugeordneten Substanzen. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit „U“ sowie der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode angegeben. Abkürzungen: Aco: Aconitat, Asc: Ascorbat. ATP: Adenosintri-phosphat, Bet: Betain, Car: Carnitin, Cho: Cholin, Cit: Citrat, Frc: Fructose, Glc: Glucose, GT: Glutathion (reduziert und oxidiert), Krea: Kreatin, Lac: Lactat, Mal: Maltose, MGlc: Mehrfachzucker der Glucose, Mlt: Maltotriose, NAD⁺: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form), PCh: Phosphorylcholin, Pkrea: Phosphokreatin, Tau: Taurin.

δ in ppm	Substanzen	δ in ppm	Substanzen	δ in ppm	Substanzen
0.959–0.971	Leu/U.1	2.824–2.838	Asp/U	3.989–4.015	Frc.1
0.971–0.984	Leu/U.2	2.839–2.853	Asn/U	4.015–4.028	Frc.2
0.986–1.005	Val.1	2.853–2.861	U2.86	4.034–4.048	Frc.3
1.006–1.026	Ile	2.860–2.865	Asn.1	4.511–4.523	Asc
1.036–1.058	Val.2	2.874–2.883	Asn.2	4.641–4.649	Glc.3
1.204–1.228	U1.22	2.883–2.887	U2.89	4.653–4.663	MGlc/Glc.1
1.323–1.327	Lac.1	2.888–2.895*	Asn.3*	4.667–4.676	MGlc.3
1.327–1.333	Thr.1	2.903–2.915	U2.92	5.230–5.252	MGlc/Glc.2
1.334–1.338	Lac.2	2.915–2.931	GT.2	5.395–5.400	MGlc.4
1.338–1.345	Thr.2	2.937–2.950	Asn/GT.1	5.400–5.406	Mlt.1
1.407–1.441	U1.42	2.950–2.966	GT.3	5.406–5.412	Mlt.2
1.472–1.496	Ala	2.966–2.978	Asn/GT.2	5.412–5.418	Mal/Mlt
1.643–1.768	Lys/Leu/Arg	2.978–3.014	U3.00	5.418–5.430	Mal
1.884–1.948	Lys/Arg	3.025–3.035	Lys	5.594–5.622	U5.61
2.005–2.015	U/Pro.1	3.036–3.042	Krea/Lys	5.696–5.710	Aco
2.023–2.033	U/Pro.2	3.044–3.050	Pkrea	5.937–5.958	U5.95
2.032–2.050	U/Pro.3	3.065–3.076	Tyr.1	5.971–5.979	U5.98
2.051–2.070	Glu/Pro.1	3.110–3.118	Aco/U	5.984–6.014	U6.00
2.072–2.079	U/Glu/Pro.1	3.118–3.123	U3.12	6.133–6.142	U6.14
2.082–2.138	Glu/Gln/Pro/U	3.130–3.141	U3.14	6.143–6.166	ATP.1
2.139–2.144	Met/Glu/Gln/U	3.194–3.201	U3.20	6.516–6.526	Fumarat
2.144–2.163	Gln/Glu/U	3.202–3.210	Cho	6.852–6.878	U6.86
2.162–2.196	GT/Gln/U	3.215–3.219	U3.22	6.885–6.932	Tyr.2
2.196–2.209	GT.1	3.220–3.228	PCh	7.116–7.131	His
2.216–2.254	U/Val	3.228–3.235	Car/U	7.149–7.178	U7.17
2.255–2.300	Val/U	3.245–3.252	Arg/Glc	7.180–7.223	Tyr/Trp
2.334–2.355	Glu/Pro.2	3.254–3.264	Tau	7.337–7.349	Phe.1
2.355–2.377	U/Glu/Pro.2	3.264–3.277	Bet/Tau/Glc/MGlc	7.349–7.373	Phe/U.1
2.381–2.400	U2.39	3.277–3.290	Tau/MGlc.1	7.374–7.402	Phe/U.2
2.403–2.416	U/Car	3.295–3.303	MGlc.1	7.411–7.454	Phe.2
2.421–2.435	U/Car/Gln	3.331–3.337	Pro.1	7.535–7.563	Trp.1
2.436–2.485	Gln	3.350–3.357	Pro.2	7.726–7.756	Trp.2
2.485–2.495	U/Gln	3.357–3.363	U3.36	7.940–7.976	His/U

δ in ppm	Substanzen	δ in ppm	Substanzen	δ in ppm	Substanzen
2.519–2.576	Cit.1	3.364–3.369	Pro.3	7.978–7.990	U7.90
2.633–2.639	Met	3.387–3.396	Glc/U	8.138–8.151	U8.15
2.642–2.668	Cit.2	3.410–3.421	Tau/MGlc/Glc	8.178–8.186	NAD+.1
2.668–2.698	Cit/U	3.421–3.432	Tau/MGlc.2	8.205–8.216	U/NAD+
2.700–2.726	U2.71	3.436–3.443	Tau/MGlc.3	8.247–8.263	U8.26
2.732–2.748	U2.74	3.447–3.454	MGlc.2	8.271–8.287	ATP.2
2.755–2.760	U2.76	3.454–3.472	Glc.1	8.427–8.434	NAD+.2
2.766–2.774	U2.77	3.472–3.488	Glc.2	8.456–8.465	Formiat
2.779–2.788	U2.78	3.499–3.524	U3.51	8.470–8.486	U8.50
2.795–2.810	Asp	3.560–3.564	Gly	8.525–8.545	ATP.3
2.813–2.824	U2.82				

Tabelle A.7: Ergebnisse der uni- und multivariaten Datenanalyse zur Unterscheidung der Embryonen der Inzucht-Stämme iCab und QuiH. Der FC-Wert wurde aus dem Vergleich iCab gegen QuiH erhalten. Die *p*-Werte sind das Ergebnis eines nicht-parametrischen Mann-Whitney-*U*-Tests mit FDR-Korrektur. Die Werte sind nach absteigendem FC sortiert. Die mit * gekennzeichneten *buckets* wurden für die Darstellung der Boxplots genutzt. Resonanzen, denen keine Substanz zugeordnet werden konnte, sind mit „U“ sowie der jeweiligen chemischen Verschiebung bezeichnet. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode angegeben. Abkürzungen: Aco: Aconitat, Asc: Ascorbat. ATP: Adenosintriphosphat, Bet: Betain, Car: Carnitin, Cho: Cholin, Cit: Citrat, Frc: Fructose, Glc: Glucose, GT: Glutathion (reduziert und oxidiert), Krea: Kreatin, Lac: Lactat, Mal: Maltose, MGlc: Mehrfachzucker der Glucose, Mlt: Maltotriose, NAD+: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form), PCh: Phosphorylcholin, Pkrea: Phosphokreatin, Tau: Taurin.

Substanzen	δ in ppm	Multivariat (PCA)		Univariat	
		PC 1	PC 2	FC	<i>p</i> -Wert
Mal*	5.418–5.430*	-0.132	0.0549	1.97	1.68×10^{-5}
Mal/Mlt	5.412–5.418	-0.133	0.0538	1.79	1.68×10^{-5}
Mlt.2*	5.406–5.412*	-0.133	0.0572	1.78	1.68×10^{-5}
Mlt.1	5.400–5.406	-0.133	0.0568	1.76	1.68×10^{-5}
MGlc/Glc.2	5.230–5.252	-0.125	0.0585	1.71	2.87×10^{-5}
MGlc.4	5.395–5.400	-0.107	0.0304	1.56	5.86×10^{-4}
MGlc/Glc.1	4.653–4.663	-0.121	0.0525	1.41	5.36×10^{-5}
MGlc.2	3.447–3.454	-0.129	0.0688	1.37	1.68×10^{-5}
MGlc.3	4.667–4.676	-0.126	0.0465	1.35	7.82×10^{-5}
MGlc.1	3.295–3.303	-0.122	0.0979	1.26	1.68×10^{-5}
U/NAD+	8.205–8.216	-0.113	0.0103	1.25	1.91×10^{-4}
U6.86*	6.852–6.878*	-0.127	-0.00933	1.21	1.68×10^{-5}
U/Glu/Pro.1	2.072–2.079	-0.0696	-0.00529	1.20	7.96×10^{-4}
Bet/Tau/Glc/MGlc*	3.264–3.277*	-0.121	0.0665	1.19	1.68×10^{-5}
Tyr.2*	6.885–6.932*	-0.0785	0.0654	1.17	1.02×10^{-2}
U7.17*	7.149–7.178*	-0.129	0.00240	1.17	1.68×10^{-5}

Substanzen	δ in ppm	Multivariat (PCA)		Univariat	
		PC 1	PC 2	FC	p-Wert
Tyr/Trp	7.180–7.223	-0.0821	0.0780	1.14	1.02×10^{-2}
Tau/MGlc.1	3.277–3.290	-0.127	0.0572	1.13	2.87×10^{-5}
Tau/MGlc/Glc	3.410–3.421	-0.124	0.0507	1.13	2.87×10^{-5}
Tau/MGlc.2	3.421–3.432	-0.120	0.0500	1.12	7.82×10^{-5}
U2.82	2.813–2.824	-0.111	-0.124	1.11	5.86×10^{-4}
Tau/MGlc.3	3.436–3.443	-0.121	0.0296	1.11	7.82×10^{-5}
U/Val	2.216–2.254	-0.0950	-0.0752	1.09	7.82×10^{-5}
Met*	2.633–2.639*	-0.104	0.0774	1.09	1.91×10^{-4}
GT.1	2.196–2.209	-0.111	-0.0128	1.08	5.36×10^{-5}
Cit.1*	2.519–2.576*	-0.117	0.0000487	1.08	7.82×10^{-5}
Cit.2	2.642–2.668	-0.123	0.0122	1.08	1.68×10^{-5}
U2.74	2.732–2.748	-0.117	-0.102	1.08	2.87×10^{-4}
U1.22	1.204–1.228	-0.0775	-0.167	1.07	2.85×10^{-2}
U2.89	2.883–2.887	-0.0926	-0.0645	1.07	3.18×10^{-3}
Tau*	3.254–3.264*	-0.111	0.0555	1.07	2.87×10^{-4}
U3.36	3.357–3.363	-0.0156	0.0952	1.07	8.92×10^{-1}
U1.42	1.407–1.441	-0.0801	-0.170	1.06	2.85×10^{-2}
U2.92	2.903–2.915	-0.0788	-0.110	1.06	2.85×10^{-2}
Lac.1	1.323–1.327	-0.0212	0.0147	1.05	4.46×10^{-1}
U/Car	2.403–2.416	-0.0948	0.0751	1.05	1.07×10^{-3}
Glc.1	3.454–3.472	-0.0530	0.0536	1.05	8.64×10^{-2}
U6.14	6.133–6.142	-0.0339	-0.0380	1.05	6.42×10^{-1}
Lac.2	1.334–1.338	-0.0315	0.0596	1.04	3.85×10^{-1}
Glu/Gln/Pro/U	2.082–2.138	-0.0946	-0.152	1.04	2.53×10^{-3}
Met/Glu/Gln/U	2.139–2.144	-0.0478	0.142	1.04	8.64×10^{-2}
U/Car/Gln	2.421–2.435	-0.0626	0.0697	1.04	1.70×10^{-1}
U2.86	2.853–2.861	-0.0729	-0.166	1.04	6.75×10^{-2}
Glc/U	3.387–3.396	-0.0684	0.0798	1.04	3.43×10^{-2}
U8.15	8.138–8.151	-0.0484	-0.0439	1.04	3.54×10^{-1}
U/Pro.1	2.005–2.015	-0.0430	-0.187	1.03	3.85×10^{-1}
Glu/Pro.2	2.334–2.355	-0.0626	0.0754	1.03	4.10×10^{-2}
U2.77	2.766–2.774	-0.0482	-0.196	1.03	1.70×10^{-1}
Asn/U	2.839–2.853	-0.0515	-0.141	1.03	7.70×10^{-2}
GT.2	2.915–2.931	-0.0189	-0.0847	1.03	4.46×10^{-1}
Phe.2	7.411–7.454	-0.0153	0.163	1.03	5.66×10^{-1}
GT/Gln/U	2.162–2.196	-0.0415	-0.0761	1.02	1.51×10^{-1}
U/Gln	2.485–2.495	-0.0500	0.126	1.02	2.67×10^{-1}
Cit/U	2.668–2.698	-0.0509	0.0186	1.02	2.16×10^{-1}
Trp.1	7.535–7.563	-0.0168	0.132	1.02	6.80×10^{-1}

Substanzen	δ in ppm	Multivariat (PCA)		Univariat	
		PC 1	PC 2	FC	p-Wert
Trp.2	7.726–7.756	-0.0201	0.174	1.02	4.46×10^{-1}
ATP.3	8.525–8.545	-0.0337	-0.0215	1.02	6.42×10^{-1}
Leu/U.1	0.959–0.971	-0.0233	-0.0187	1.01	3.54×10^{-1}
U2.78	2.779–2.788	-0.0162	-0.211	1.01	8.61×10^{-1}
Tyr.1	3.065–3.076	-0.000916	0.0235	1.01	8.92×10^{-1}
Leu/U.2	0.971–0.984	0.0000564	-0.0286	1.00	8.92×10^{-1}
Asp/U	2.824–2.838	-0.00650	-0.183	1.00	9.89×10^{-1}
Formiat	8.456–8.465	0.00159	-0.0906	0.999	8.22×10^{-1}
U3.00	2.978–3.014	-0.000621	-0.165	0.998	7.76×10^{-1}
Gln	2.436–2.485	0.0131	0.189	0.995	8.61×10^{-1}
Pkrea	3.044–3.050	0.00106	0.00593	0.993	1.00×10^0
Krea/Lys	3.036–3.042	0.00976	0.0974	0.992	5.29×10^{-1}
U/Glu/Pro.2	2.355–2.377	0.0254	0.0255	0.990	6.09×10^{-1}
ATP.1	6.143–6.166	-0.00339	-0.0582	0.990	6.80×10^{-1}
Gln/Glu/U	2.144–2.163	0.0515	0.00761	0.988	5.75×10^{-2}
Aco	5.696–5.710	0.0163	-0.0114	0.977	6.42×10^{-1}
U5.95	5.937–5.958	0.00504	0.0197	0.971	1.00×10^0
Glc.3	4.641–4.649	0.0124	-0.0286	0.970	5.66×10^{-1}
U2.71	2.700–2.726	0.0739	0.0460	0.969	3.18×10^{-3}
U6.00	5.984–6.014	0.0294	0.00726	0.967	3.31×10^{-1}
Phe.1	7.337–7.349	0.0455	0.132	0.967	4.46×10^{-1}
U2.39	2.381–2.400	0.0766	0.0443	0.963	4.09×10^{-3}
ATP.2	8.271–8.287	0.0224	-0.103	0.960	2.67×10^{-1}
Lys/Leu/Arg	1.643–1.768	0.0871	-0.0429	0.958	6.57×10^{-3}
Glc.2	3.472–3.488	0.0425	0.00994	0.958	2.85×10^{-2}
U3.12	3.118–3.123	0.0557	0.0425	0.953	8.64×10^{-2}
Lys/Arg	1.884–1.948	0.0903	-0.0416	0.952	1.02×10^{-2}
GT.3	2.950–2.966	0.0218	-0.112	0.952	4.46×10^{-1}
Car/U	3.228–3.235	0.0675	-0.0213	0.950	2.85×10^{-2}
Thr.2	1.338–1.345	0.101	0.0762	0.948	1.47×10^{-3}
Thr.1*	1.327–1.333*	0.100	0.0607	0.945	7.96×10^{-4}
Asc	4.511–4.523	0.0332	-0.134	0.945	2.42×10^{-1}
Ile	1.006–1.026	0.0748	0.103	0.944	1.92×10^{-1}
U3.51	3.499–3.524	0.0945	0.0383	0.944	1.07×10^{-3}
Val/U	2.255–2.300	0.113	-0.0207	0.943	5.86×10^{-4}
U3.22	3.215–3.219	0.0954	-0.0866	0.943	3.18×10^{-3}
Ala*	1.472–1.496*	0.110	0.0747	0.941	5.86×10^{-4}
Pro.3	3.364–3.369	0.0678	0.137	0.941	7.70×10^{-2}
Asp*	2.795–2.810*	0.107	0.00120	0.937	1.93×10^{-3}

Substanzen	δ in ppm	Multivariat (PCA)		Univariat	
		PC 1	PC 2	FC	p-Wert
U2.76	2.755–2.760	0.0320	0.0492	0.936	3.54×10^{-1}
Val.2	1.036–1.058	0.0931	0.147	0.935	3.18×10^{-3}
Arg/Glc	3.245–3.252	0.0806	-0.00640	0.935	4.87×10^{-2}
Glu/Pro.1	2.051–2.070	0.0833	-0.181	0.933	6.57×10^{-3}
U5.98	5.971–5.979	0.0512	0.00582	0.927	8.64×10^{-2}
His*	7.116–7.131*	0.114	-0.0102	0.923	1.91×10^{-4}
Phe/U.2	7.374–7.402	0.103	0.0456	0.923	1.07×10^{-3}
Frc.1	3.989–4.015	0.0870	0.115	0.920	1.93×10^{-3}
U/Pro.3	2.032–2.050	0.0771	-0.183	0.914	1.02×10^{-2}
Frc.2*	4.015–4.028*	0.0906	0.0981	0.910	1.93×10^{-3}
Frc.3	4.034–4.048	0.0882	0.105	0.909	4.09×10^{-3}
Val.1*	0.986–1.005*	0.115	0.115	0.907	1.68×10^{-5}
Pro.2	3.350–3.357	0.0913	0.134	0.905	5.21×10^{-3}
U3.20	3.194–3.201	0.0953	0.0223	0.900	7.96×10^{-4}
His/U	7.940–7.976	0.120	0.0273	0.897	1.68×10^{-5}
Gly*	3.560–3.564*	0.123	0.0432	0.895	1.68×10^{-5}
Cho	3.202–3.210	0.0550	0.133	0.894	3.54×10^{-1}
Lys*	3.025–3.035*	0.120	-0.00746	0.889	7.82×10^{-5}
U5.61	5.594–5.622	0.0418	-0.00268	0.884	1.15×10^{-1}
Phe/U.1	7.349–7.373	0.125	-0.0699	0.869	1.68×10^{-5}
Asn.1	2.860–2.865	0.134	-0.00151	0.864	1.68×10^{-5}
Asn.2	2.874–2.883	0.131	0.0137	0.864	1.68×10^{-5}
Fumarat	6.516–6.526	0.0636	-0.0116	0.859	7.70×10^{-2}
NAD+.2	8.427–8.434	0.0559	-0.00637	0.855	9.99×10^{-2}
U/Pro.2	2.023–2.033	0.118	-0.114	0.841	1.68×10^{-5}
Asn/GT.2	2.966–2.978	0.112	-0.0745	0.837	1.91×10^{-4}
Aco/U	3.110–3.118	0.124	-0.0322	0.832	1.68×10^{-5}
NAD+.1	8.178–8.186	0.0832	-0.0689	0.828	5.21×10^{-3}
Pro.1*	3.331–3.337*	0.127	0.0613	0.821	1.68×10^{-5}
Asn/GT.1	2.937–2.950	0.124	-0.0290	0.810	1.68×10^{-5}
Asn.3*	2.888–2.895*	0.137	0.00795	0.798	1.68×10^{-5}
U7.90	7.978–7.990	0.124	-0.0371	0.792	2.87×10^{-5}
PCh*	3.220–3.228*	0.129	0.0310	0.789	1.68×10^{-5}
U8.26	8.247–8.263	0.0755	-0.0890	0.779	2.53×10^{-3}
U3.14	3.130–3.141	0.117	-0.0202	0.639	1.68×10^{-5}
U8.50	8.470–8.486	0.121	-0.0688	0.337	1.68×10^{-5}

Tabelle A.8: Chemische Verschiebung δ der in Kapitel 11 verwendeten *buckets* mit den zugeordneten Substanzen.

δ in ppm	Substanz	δ in ppm	Substanz
0.970–0.980	L-Leucin (+ Proteinuntergrund)	3.038–3.043	Kreatin (+ Proteinuntergrund)
1.002–1.027	L-Isoleucin	3.159–3.191	L-Cystin
1.031–1.058	L-Valin	3.198–3.208	Cholin (+L-Cystin)
1.162–1.205	Ethanol	3.257–3.275	Betain (+ Glucose)
1.297–1.358	Lactat (+ L-Threonin)	3.276–3.308	Myo-Inositol (+ L-Phenylalanin)
1.468–1.497	L-Alanin (+ L-Isoleucin/L-Lysin)	3.317–3.347	L-Prolin
1.610–1.632	L-Arginin (+ Proteinuntergrund)	3.562–3.567	Glycin (+ Proteinuntergrund)
1.784–1.862	L-Ornithin (+ Proteinuntergrund)	3.960–3.969	L-Serin (+ Proteinuntergrund)
1.915–1.924	Acetat (+ L-Arginin/L-Lysin)	4.013–4.048	Fructose
2.232–2.240	Aceton	4.262–4.281	L-Threonin
2.339–2.369	L-Glutamat (+ L-Prolin)	4.291–4.308	Malat
2.374–2.381	Pyruvat (+ L-Glutamat)	4.324–4.371	L-Hydroxyprolin
2.384–2.399	Pyroglutamat	5.200–5.276	Glucose
2.399–2.414	Succinat (+ Pyroglutamat)	5.390–5.408	Allantoin
2.431–2.471	L-Glutamin (+ L-Hydroxyprolin)	6.518–6.528	Fumarat
2.548–2.556	Citrat	6.883–6.920	L-Tyrosin
2.626–2.640	L-Methionin	7.052–7.082	L-Histidin
2.795–2.812	L-Aspartat	7.413–7.453	L-Phenylalanin
2.849–2.877	L-Asparagin	7.537–7.562	L-Tryptophan
3.013–3.038	L-Lysin (+ Proteinuntergrund)	8.450–8.465	Formiat

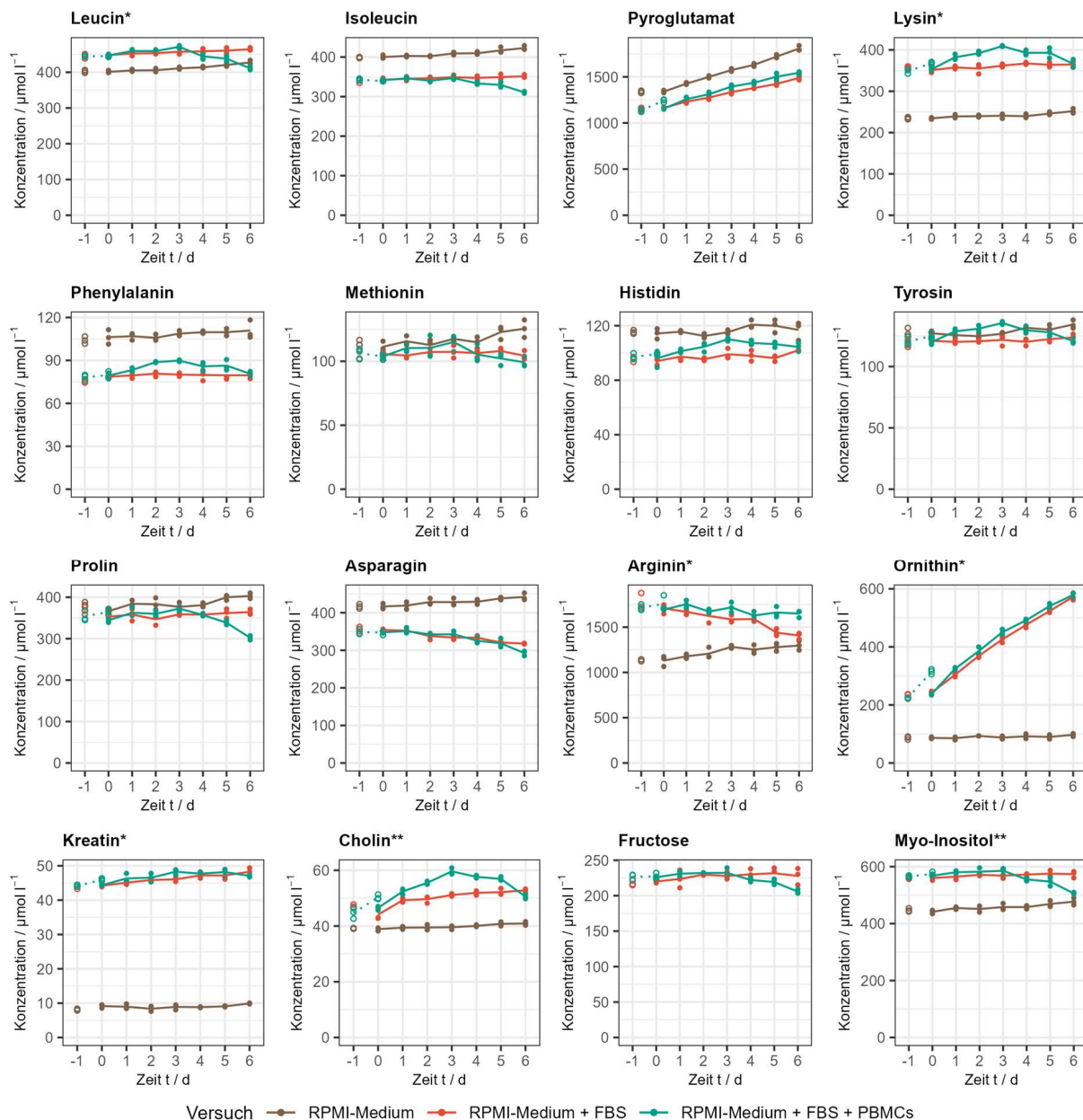


Abbildung A.3: Zeitlicher Verlauf der Konzentration verschiedener Substanzen in RPMI-Medium ohne und mit FBS sowie bei Kultivierung von PBMCs in RPMI-Medium mit FBS. Die Punkte stellen die technischen Replikate dar, die Linien verbinden die Mittelwerte. Die leeren Kreise und die gestrichelte Linie stellen die Werte in der Ruhephase ($t = -1$ d bis $t = 0$ d) vor dem Wechsel des Mediums dar. Für die Medien ohne Zellen liegt kein Messwert für das Ende der Ruhephase vor. Bei diesen Versuchen wurde kein Verdunstungsschutz eingesetzt. *Die ermittelte Konzentration liegt bei den Versuchen mit FBS aufgrund von Proteinuntergrund über der tatsächlichen Konzentration. Der Messwert für Ornithin im reinen RPMI-Medium kommt nur durch Rauschen zustande. **Die ermittelte Konzentration von Cholin liegt durch Überlagerung mit Cystin über der tatsächlichen Konzentration. Die ermittelte Konzentration von Myo-Inositol liegt durch Überlagerung mit Phenylalanin über der tatsächlichen Konzentration.

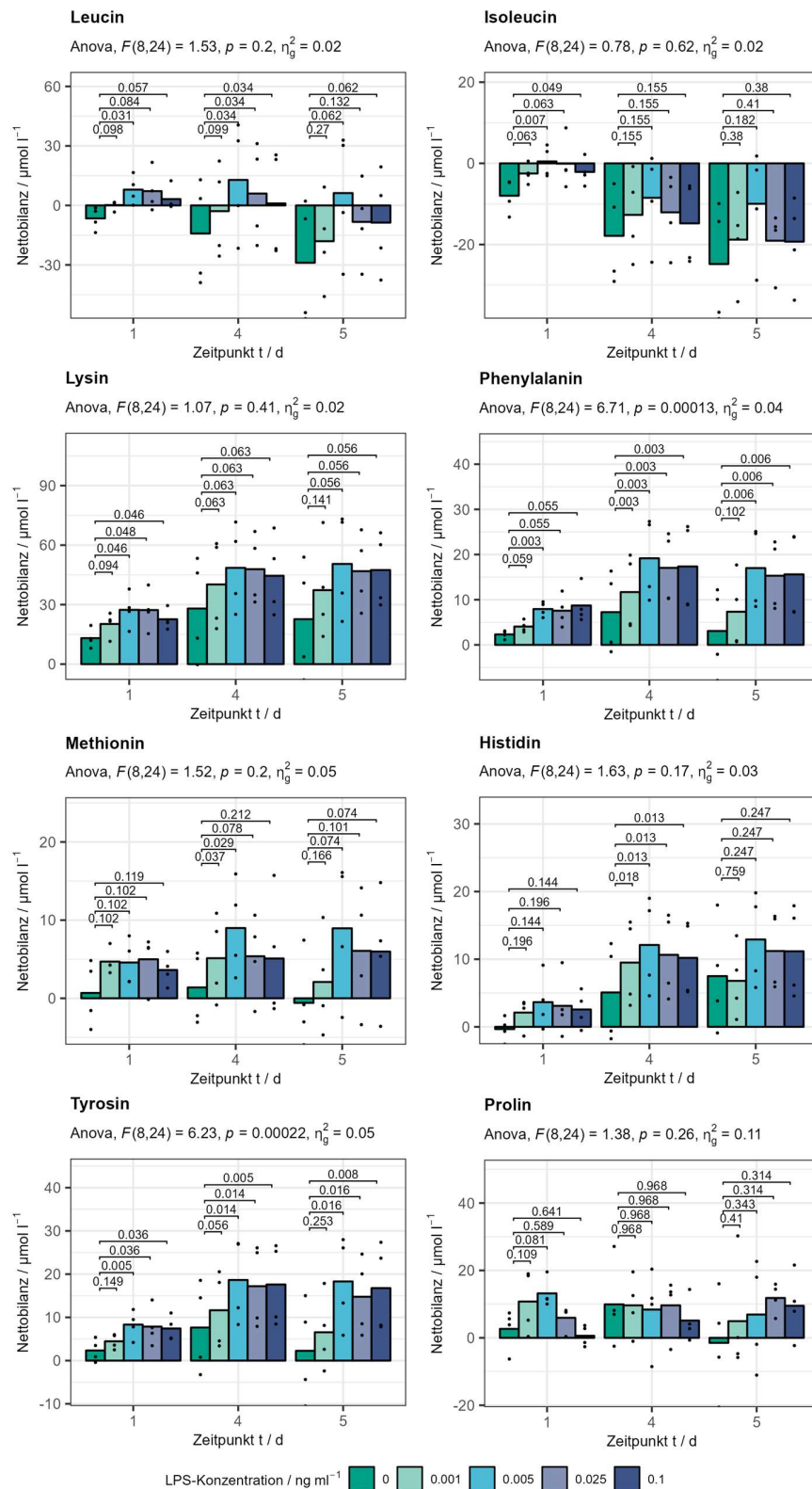


Abbildung A.4: Nettobilanz verschiedener Substanzen bei Stimulation der PBMCs mit LPS. Dargestellt ist die verbrauchte beziehungsweise gebildete Menge nach $t = 1$ d, 4 d und 5 d im Vergleich zum Kontrollmedium ohne Zellen. Die Punkte stellen die Messwerte (gemittelte technische Replikate) der biologischen Replikate dar, die Balken den jeweiligen Mittelwert der biologischen Replikate. Die Überschrift gibt das Ergebnis der Zweiweg-ANOVA mit Messwiederholungen an. Die p -Werte in der Abbildung für den Vergleich mit der unbehandelten Referenzgruppe wurden mithilfe eines gepaarten t -Tests mit FDR-Korrektur erhalten.

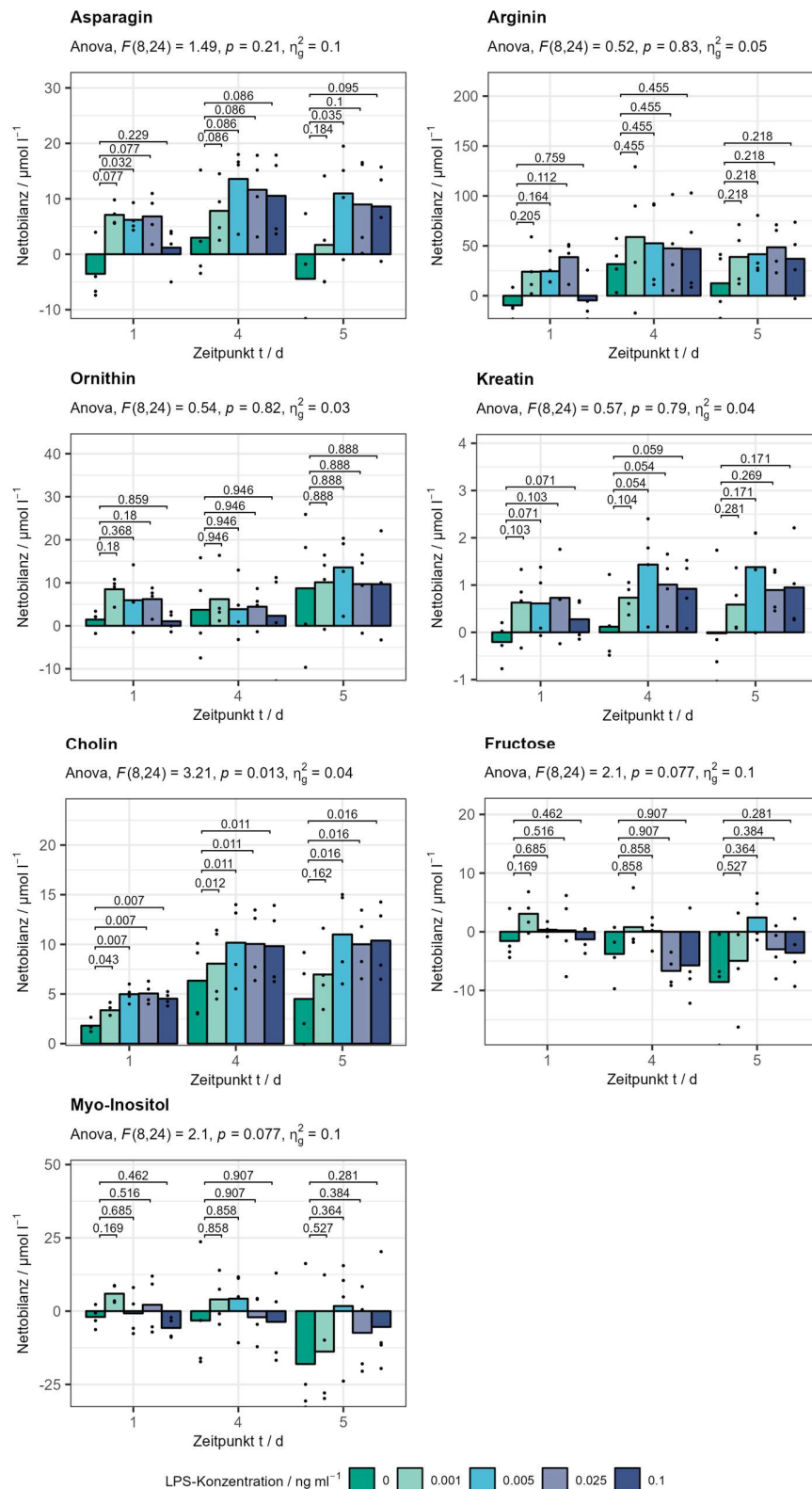


Abbildung A.4 (Fortsetzung): Nettabilanz verschiedener Substanzen bei Stimulation der PBMCs mit LPS. Dargestellt ist die verbrauchte beziehungsweise gebildete Menge nach $t = 1$ d, 4 d und 5 d im Vergleich zum Kontrollmedium ohne Zellen. Die Punkte stellen die Messwerte (gemittelte technische Replikate) der biologischen Replikate dar, die Balken den jeweiligen Mittelwert der biologischen Replikate. Die Überschrift gibt das Ergebnis der Zweifach-ANOVA mit Messwiederholungen an. Die p -Werte in der Abbildung für den Vergleich mit der unbehandelten Referenzgruppe wurden mithilfe eines gepaarten t-Tests mit FDR-Korrektur erhalten.

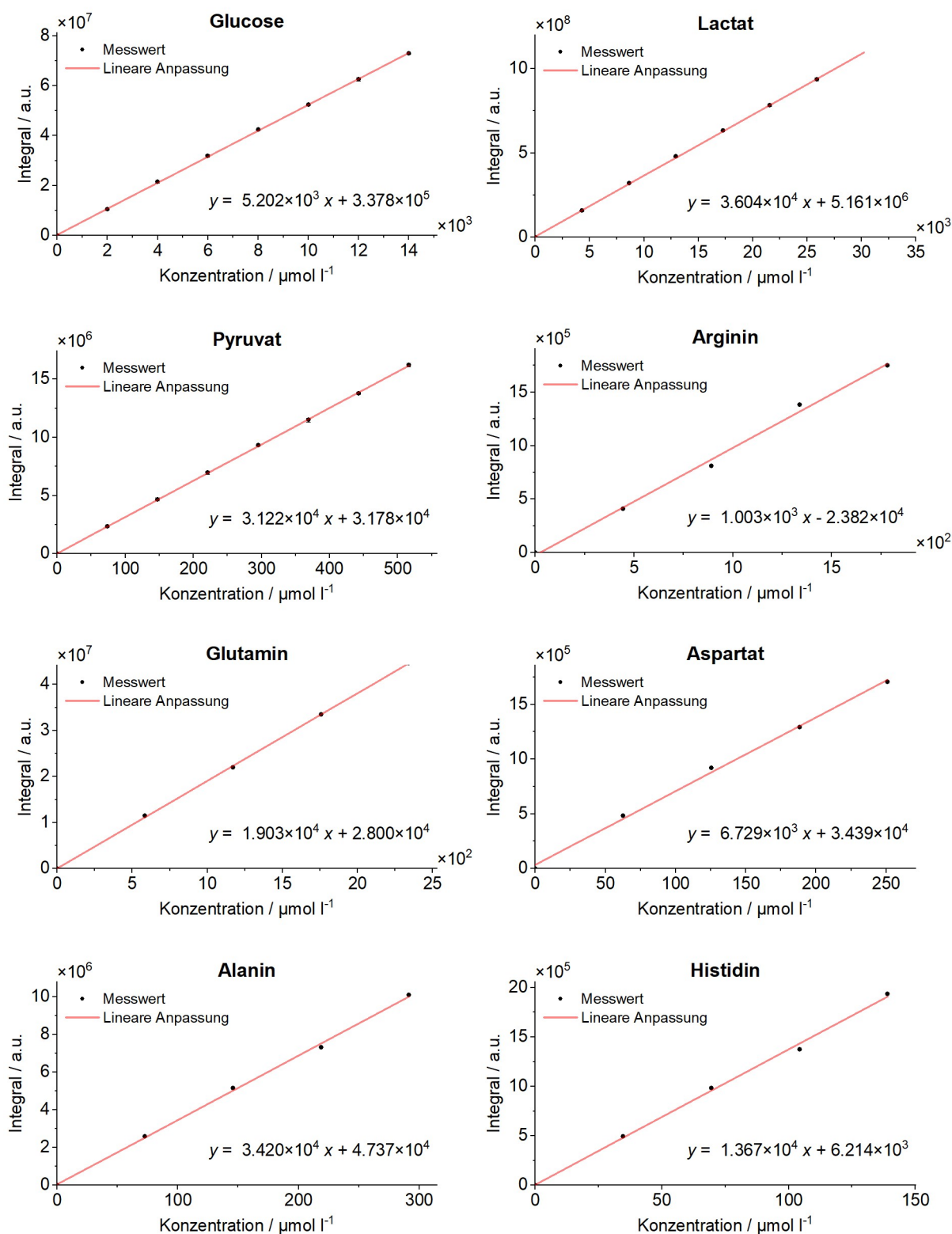


Abbildung A.5: Kalibriergeraden für die in Kapitel 11 quantifizierten Substanzen.

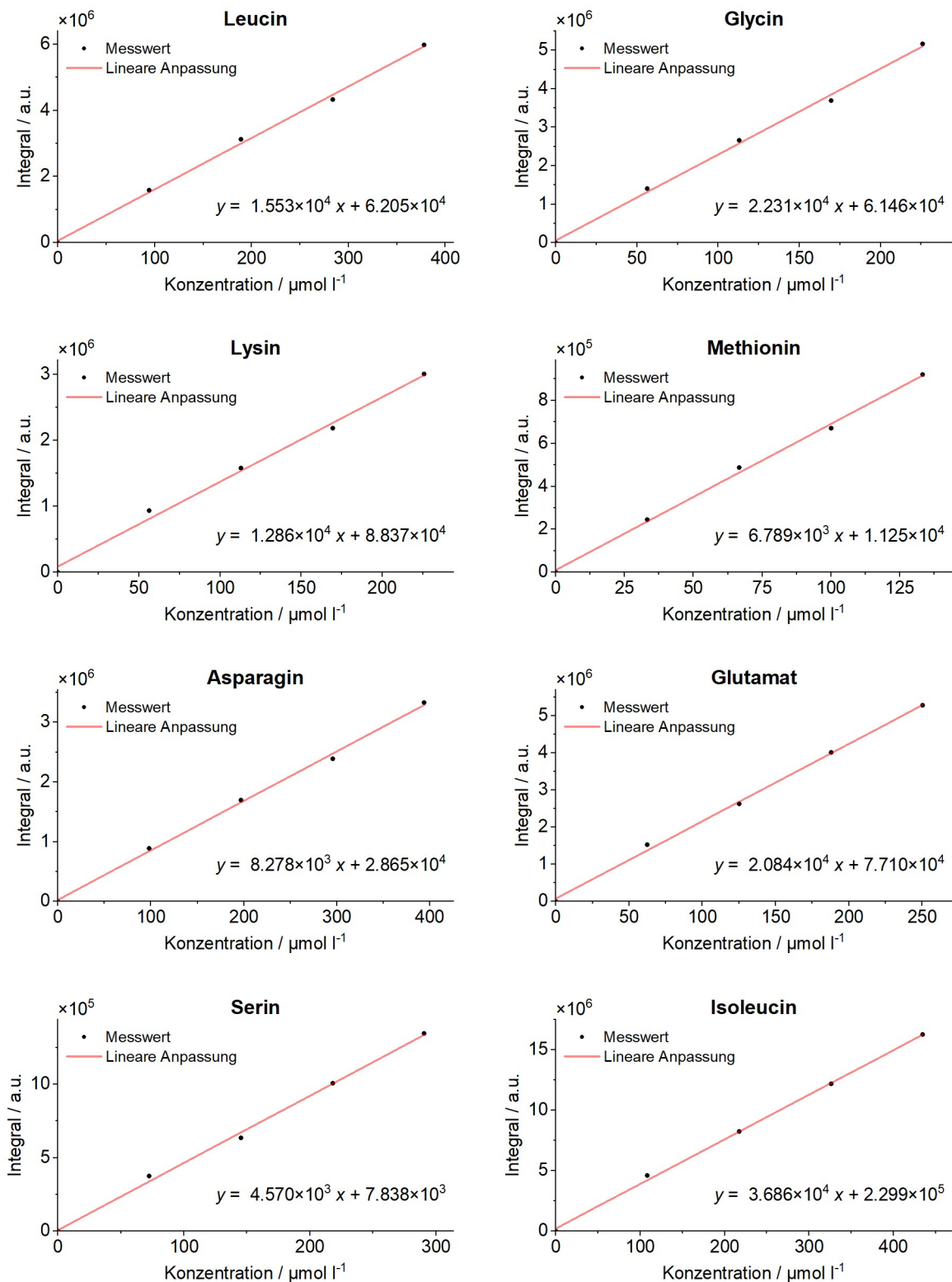


Abbildung A.5 (Fortsetzung): Kalibriergeraden für die in Kapitel 11 quantifizierten Substanzen.

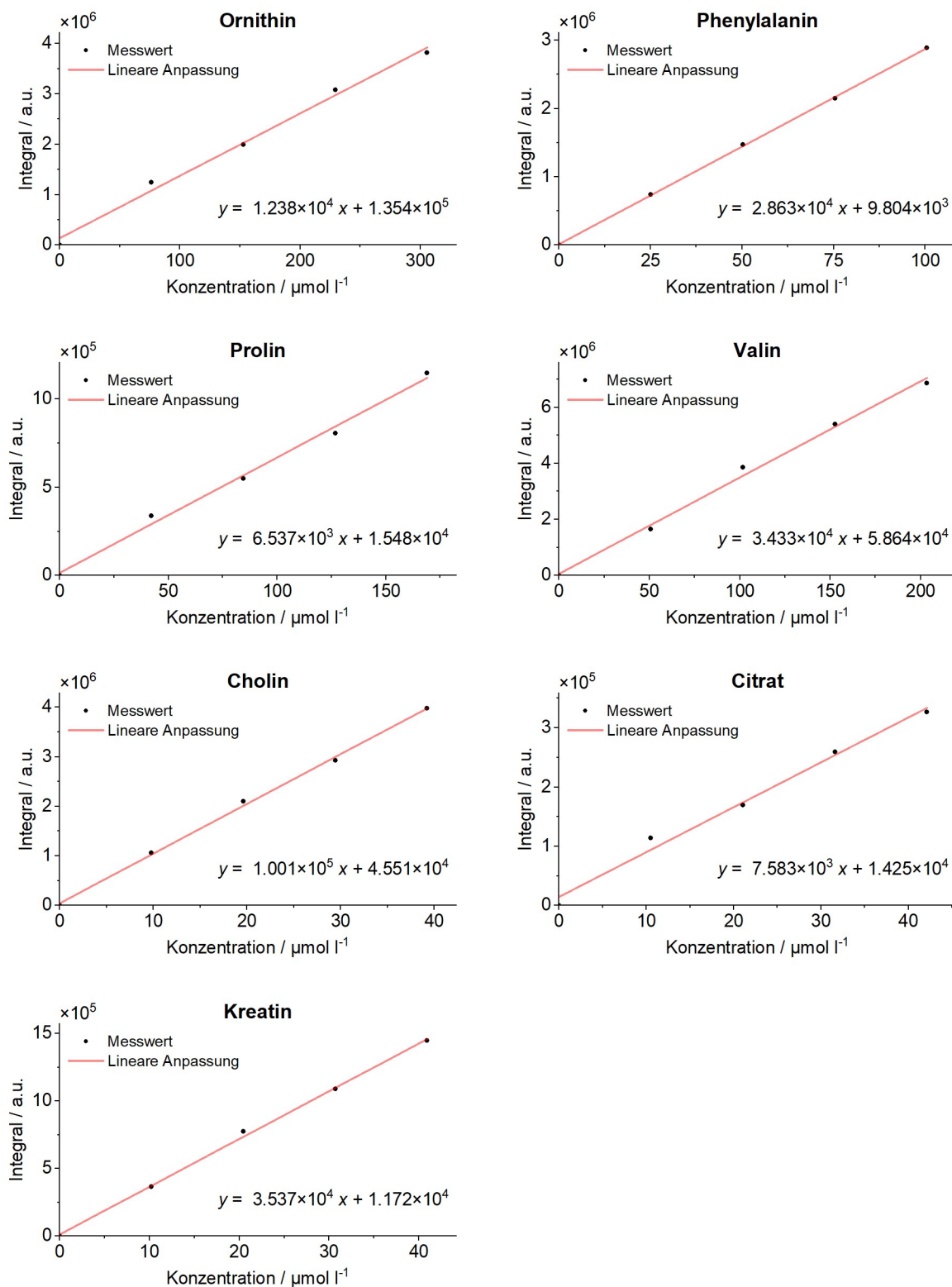


Abbildung A.5 (Fortsetzung): Kalibriergeraden für die in Kapitel 11 quantifizierten Substanzen.

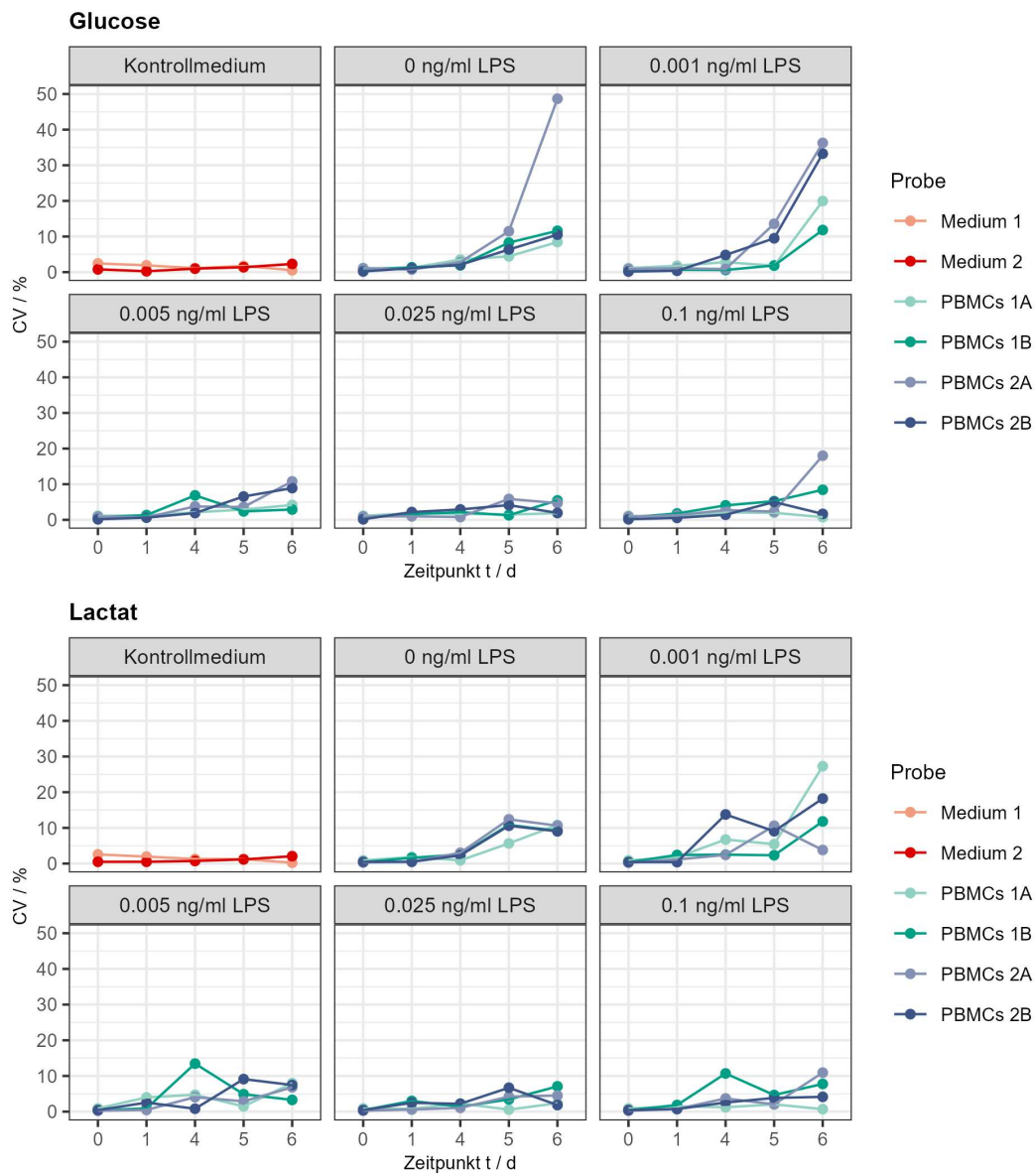


Abbildung A.6: Variationskoeffizient zwischen den technischen Replikaten für Glucose und Lactat in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration sowie dem Spender (1A–2B).

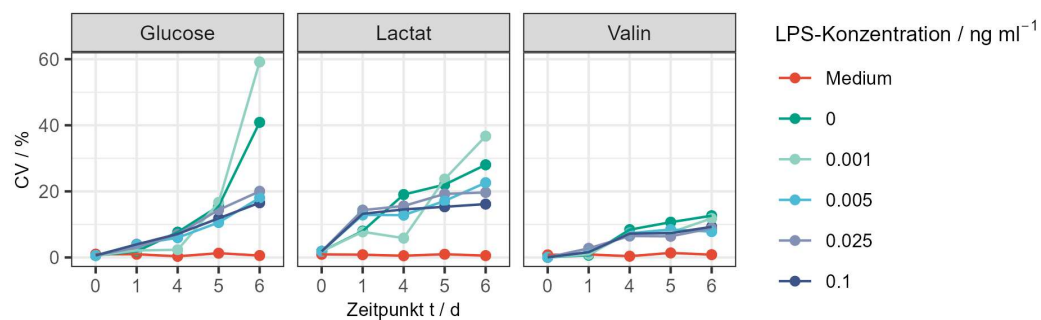


Abbildung A.7: Variationskoeffizient zwischen den biologischen Replikaten für Glucose, Lactat und Valin in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationsliste

1. *Ultrasonic welding for the rapid integration of fluidic connectors into microfluidic chips*: T. Finkbeiner, H. Soergel, M. P. Koschitzky, R. Ahrens, A. E. Guber, *J. Micromech. Microeng.*, **2019**, 29, 065011.
2. *Lipase-Catalyzed Production of Sorbitol Laurate in a “2-in-1” Deep Eutectic System: Factors Affecting the Synthesis and Scalability*: A. Delavault, O. OPOCHENSKA, L. LANEQUE, H. Soergel, C. Muhle-Goll, K. Ochsenreither, C. Sylatak, *Molecules*, **2021**, 26, 2759.
3. *Strain-Specific Liver Metabolite Profiles in Medaka*: H. Soergel, F. Loosli, C. Muhle-Goll, *Metabolites*, **2021**, 11, 744.
4. *Lipase-Mediated Mechanoenzymatic Synthesis of Sugar Esters in Dissolved Unconventional and Neat Reaction Systems*: R. Hollenbach, A. Delavault, L. Gebhardt, H. Soergel, C. Muhle-Goll, K. Ochsenreither, C. Sylatak, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2022**, 10, 10192.

Konferenzbesuche

Future 3D Additive Manufacturing – The 3DMM20 Conference 2021, Online, 2021.

Poster: *NMR metabolomic profiling for efficient derivation of retinal organoids.*

EUROMAR, Utrecht, 2022.

Poster: *Metabolic characterization of medaka inbred strains – a possible link between genotype and phenotype.*

EMBO Practical Course on Metabolomics Bioinformatics for Life Scientists, Wageningen, 2022.

Poster: *Metabolic characterization of medaka inbred strains – a possible link between genotype and phenotype.*

FGMR annual discussion meeting, Karlsruhe, 2022.

Poster: *Metabolic characterization of medaka inbred strains – a possible link between genotype and phenotype.*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst gilt mein Dank PD Dr. Claudia Muhle-Goll für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit durchführen zu können, die spannenden Forschungsthemen sowie die vielen Freiheiten bei der eigenen Forschung. Ich danke dir für die vielfältigen und lehrreichen Gespräche, die umfassende und vertrauensvolle Unterstützung und nicht zuletzt die mir entgegengebrachte Geduld.

Prof. Dr. Burkhard Luy danke ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis und dafür, dass er mir die Grundlagen der NMR-Spektroskopie nähergebracht hat.

Besonderer Dank gilt auch meinen Kooperationspartnern, ohne welche die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Prof. Dr. Jochen Wittbrodt sowie seinen Mitarbeiterinnen Dr. Lucie Zilova und Christina Schlagheck danke ich für die Bereitstellung der Proben sowie zahlreiche spannende und informative Diskussionen. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Jochen Wittbrodt für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Betreuung innerhalb der HEiKA Graduiertenschule „Functional Materials“ danken.

Dr. Felix Loosli und Mitarbeiter:innen, insbesondere Cathrin Herder, danke ich für viele interessante Gespräche und die Bereitstellung der Proben.

Ein großer Dank geht ebenfalls an Dr. Manuel Rodriguez Gomez, Lara Stahl und Lars Uhlmann. Auch wenn mir unser Projekt so manches Kopfzerbrechen bereitet hat, haben mir die zahlreichen Diskussionen und die Zusammenarbeit mit euch viel Spaß gemacht. Danke, dass ihr euch immer Zeit für meine vielen Fragen genommen und mir mit eurem Fachwissen weitergeholfen habt. In diesem Zusammenhang geht auch ein besonderer Dank an Dr. Mara Silber und Lars Uhlmann, ohne die diese Zusammenarbeit vermutlich nie zustande gekommen wäre.

Vielen Dank auch an meine Bachelorstudentin Franziska Dopp für deine Unterstützung und großartige Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder des Arbeitskreises für die gemeinsame Zeit und die Unterstützung, sowie die zahlreichen und immer abwechslungsreichen Kaffee- und Mittagspausen. Mein besonderer Dank gilt Dr. Mara Silber und Celine Moser für die fachliche aber auch besonders die moralische Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Ich bin froh, dass ich den Großteil meiner Promotion mit euch verbringen durfte. Danke auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit, ihr wart mir eine große Hilfe. Ein besonderes Dankeschön gebührt auch Philipp Eisenmann, ohne den ich meinen Weg in den Arbeitskreis nicht gefunden hätte. Ein großer Dank geht auch an Janine Bodemer. Nicht nur für deine Hilfe bei allen bürokratischen Belangen, sondern vor allem für dein offenes Ohr und deinen moralischen Beistand.

Dem Exzellenzcluster „3D Matter Made to Order“ danke ich für die finanzielle Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit und die Möglichkeit zur Teilnahme an diversen Kursen und Veranstaltungen in der Graduiertenschule.

Ein großer Dank geht auch an Verena, Jana, Maren und Annika. Unsere (mehr oder weniger) regelmäßigen Skype-Dates waren besonders in der Corona Zeit eine schöne Abwechslung vom Arbeitsalltag und haben so manchen Tag verbessert.

Mein größter Dank gilt meinem Freund Luca und meiner Familie. Danke Luca, dass du alle Höhen und vor allem auch Tiefen mit mir durchgestanden und mich immer wieder ermutigt und angespornt hast. Danke für deine Unterstützung zu jeder Zeit und auf jede erdenkliche Art. Danke Mama und Papa, dass ihr mir meinen Weg bis hier hin ermöglicht, mich in jeder Situation unterstützt und mir immer Rückhalt gegeben habt.

Danke Julian, für die gemeinsame Zeit.