



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Chemie und Metabolomics
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters

Metabolische Untersuchungen von Neutrophilen mit NMR-Spektroskopie

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

Vorgelegt von
Barbara Christine Richer
aus Bocholt

Lübeck, 2021

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Karsten Seeger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Hübner

Tag der mündlichen Prüfung: 01.11.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.11.2021

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Richer, B. C., Salei, N., Laskay, T. und Seeger, K. (2018). Changes in Neutrophil Metabolism upon Activation and Aging. *Inflammation* 41(2), 710-721

Hirose, M., Schilf, P., Zarse, K., Busch, H., Fuellen, G., Jöhren, O., Köhling, R., König, I.R., Richer, B., Rupp, J., Schwaninger, M., Seeger, K., Sina, C., Ristow, M. und Ibrahim, S. M. (2019). Maternally inherited differences within mitochondrial Complex I control murine healthspan. *Genes* 10 .7, 532.

Zusammenfassung

Neutrophile nehmen im Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen ein. Wenn die Neutrophilen durch Defekte oder Fehlregulation gestört sind, kann es zu Autoimmunerkrankungen (Jorch und Kubes 2017) oder bis zur Sepsis (Shen et al. 2017) kommen.

In dieser Arbeit wurden die metabolischen Veränderungen in humanen Neutrophilen untersucht. Dabei wurden zelluläre Zustände gewählt, die Start- und Endpunkt einer Infektion darstellen und daher für eine immunometabolische Untersuchung von großem Interesse sind. Diese Zustände sind Aktivierung und Alterung bzw. Apoptose von Neutrophilen.

Für die aktivierten Neutrophilen wurden dabei zwei unterschiedliche Aktivierungsstimuli betrachtet: TNF als körpereigenes Zytokin und LPS als Bestandteil der bakteriellen Zellmembran. Damit kann getestet werden, ob die Neutrophilen zwischen körperfremden und körpereigenen Signalen unterscheiden können, also unterschiedliche Signal und Stoffwechselwege beeinflusst sind.

Die wasserlöslichen und lipidlöslichen Metabolite wurden mit Methanol und Chloroform aus den Neutrophilen extrahiert. Für die NMR-Messungen wurden verschiedene Wasserunterdrückungen (Vorsättigung des Wassers und *Excitation Sculpting*) verglichen und die Notwendigkeit einer Unterdrückung von Makromolekülen überprüft.

Die metabolischen Profile der Extrakte von vier Gruppen (Kontrolle, TNF, LPS, Alterung/Apoptose) mit jeweils 20 Millionen Zellen wurden in zwei Messreihen mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Eine Zuordnung der Metabolite in den Zellextrakten erfolgte zunächst durch Referenzspektren und Zugabe kleiner Mengen von Referenzsubstanzen (*spiking*). Für die Identifizierung weiterer Metabolite wurden verschiedene *Pure Shift* Experimente getestet. Die vier Gruppen wurden statistisch auf ihre Unterschiede hin untersucht.

Die mit TNF bzw. LPS aktivierten Neutrophilenextrakte zeigen keine Unterschiede zueinander und nur wenige Unterschiede zur Kontrollgruppe. Möglicherweise ist es zu einer Desensibilisierung gegenüber den Stimuli oder zu einer Internalisierung der Rezeptoren gekommen, sodass die Neutrophilen nicht effizient aktiviert wurden.

Bei Alterung und Apoptose zeigten sich hingegen deutliche Unterschiede in vielen Metabolitkonzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe. Der größte Unterschied liegt in einer deutlichen Zunahme der NAD^+ -Konzentration. NAD^+ spielt im Energiemetabolismus eine wichtige Rolle und wird in der Atmungskette zusammen mit ATP gebildet. Für Glutamin und Lactat - zwei Moleküle, die in der Zelle als alternative Energiequelle genutzt werden können - zeigen sich entgegengesetzte Veränderungen zur Kontrolle im Vergleich zu einer Arbeit, die jüngere apoptotische Neutrophile untersucht hat. Damit stellt sich die Frage, ob die Energiegewinnung sich im Verlauf der Apoptose mehrfach ändert.

Diese Ergebnisse bilden eine Grundlage für Fluxanalysen und für Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Übergang in die Apoptose. Damit kann immunometabolisch der Endpunkt einer Entzündung untersucht werden.

Abstract

Neutrophils play an important role in the immune system in the defense against pathogens. Dysregulations or defects in neutrophils can lead to autoimmune diseases (Jorch und Kubes 2017) or even sepsis (Shen et al. 2017).

In this thesis, metabolic changes in human neutrophils were investigated. Cellular states were chosen that represent start and end points of infection and are therefore of great interest for a immunometabolic study. These states are activation and aging or apoptosis of neutrophils.

For activated neutrophils two different activation stimuli were considered: TNF as an endogenous cytokine and LPS as a component of the bacterial cell membrane. This can be used to test whether neutrophils can distinguish between exogenous and endogenous signals, i.e. whether different signaling and metabolic pathways are affected.

Water-soluble and lipid-soluble metabolites were extracted from neutrophils using the methanol and chloroform method. For NMR measurements, different water suppressions (presaturation of water and *Excitation Sculpting*) were compared. In addition the need for macromolecule suppression was checked.

The metabolic profiles of the extracts from four groups (control, TNF, LPS, aging/apoptosis) of 20 million cells each were determined in two batches by NMR spectroscopy. Assignment of metabolites in the cell extracts was initially performed by reference spectra and addition of small amounts of reference substances (*spiking*). For the identification of further metabolites, different *Pure Shift* experiments were tested. The four groups were statistically analyzed for their differences.

The neutrophil extracts activated with TNF or LPS showed no differences from each other and few differences from the control group. It is possible that desensitization to the stimuli or internalization of the receptors occurred, so that the neutrophils were not efficiently activated.

Aging and apoptosis showed marked differences in many metabolite concentrations compared with the control group. The major difference is a marked increase in NAD^+ concentration. NAD^+ plays an important role in energy metabolism and is formed in the respiratory chain together with ATP. For glutamine and lactate - two molecules that can be used as alternative energy sources in the cell - opposite changes to the control are shown compared to a work that examined apoptotic neutrophils a few hours younger. This raises the question of whether energy production changes multiple times during apoptosis.

These results provide a basis for flux analyses and for measurements at different time points in the transition to apoptosis. This allows immunometabolic investigation of the endpoint of inflammation.

Danksagung

Vielen Dank an PD Karsten Seeger für die gute Betreuung und die endlose Geduld. Danke an Dr. Thorsten Biet, von dem ich sehr viel über NMR lernen durfte und der mir geholfen hat die *Pure Shift* Experimente aufzusetzen.

Vielen Dank an das GRK1727 für die Finanzierung, für die Betreuung durch Prof. Detlef Zillikens, Prof. Tamás Laskay und PD Andreas Recke, die Kooperationsmöglichkeiten insbesondere mit Prof. Tamás Laskay und Dr. Natallia Salei, und die fächerübergreifenden wissenschaftlichen Vorträge.

Danke an das Phenome Training Center des Imperial College in London, von denen ich einige Matlab Skripte bekommen habe.

Und natürlich möchte ich mich auch beim gesamten Institut für Chemie und Metabolomics für das angenehme Arbeitsklima und hilfreiche Diskussionen bedanken. Vielen Dank besonders an Sophie, Lena, Robert und Franziska.

Für die seelisch-moralische Unterstützung aus nah und fern danke ich meinen Freunden - insbesondere Janka, Fiona und Anne - und für die liebevolle Unterstützung aus der Ferne bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern. Ein *Gans* großes Dankeschön geht an Andrea für die wissenschaftlich belegte, tierische Motivation (Nittono et al. 2012).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Neutrophile Granulozyten	1
1.2. Autoimmunerkrankungen der Haut	3
1.2.1. Aufbau der Haut	3
1.2.2. Dystrophe Epidermolysis Bullosa	4
1.2.3. Neutrophile in Epidermolysis bullosa acquisita	5
1.3. Metabolische Veränderungen bei Neutrophilen	6
1.4. Metabolomics	7
1.5. NMR-Spektroskopie	8
1.6. NMR-Methoden für metabolische Untersuchungen	9
1.6.1. 1D-NOESY mit Vorsättigung des Wassers	11
1.6.2. CPMG mit Vorsättigung des Wassers	12
1.6.3. Wasserunterdrückung mittels <i>Excitation Sculpting</i>	13
1.6.4. Chemische Kopplung in der indirekten Dimension - 2D (<i>J-resolved</i>)	14
1.6.5. <i>Pure Shift</i> Spektren mit der Zangger-Sterk Breitbandentkopplung	16
1.6.6. <i>Pure Shift</i> Spektren mit der PSYCHE Methode	17
1.6.7. Prozessierung der Spektren	18
1.6.8. Identifizierung von Metaboliten: Referenzspektren, <i>spiking</i> und STOCSY	19
1.7. Statistische Verfahren zur Analyse der Spektren	21
1.8. Signifikanz und multiples Testen	23
1.9. Biologische Bedeutung	24
1.10. Zielsetzung der Arbeit	24

Inhaltsverzeichnis

2. Materialien und Methoden	26
2.1. Chemikalien	26
2.2. Geräte	27
2.3. Metabolomics an Neutrophilen	28
2.3.1. Probengewinnung der Neutrophilen	29
2.3.2. Extraktion der Metabolite	29
2.4. NMR-Spektroskopie	31
2.4.1. Vergleich verschiedener Pulssequenzen	32
2.4.2. NMR-Spektroskopie an wässrigen Extrakten von Neutrophilen in D ₂ O	33
2.4.3. NMR-Spektroskopie an unpolaren Extrakten von Neutrophilen in CDCl ₃	34
2.4.4. Zuordnung: Reinsubstanzen, <i>spiking</i> und STOCSY	34
2.4.5. Zuordnung: <i>Pure Shift</i> Experimente	35
2.5. Statistische Auswertung der Metabolomics-Daten	36
2.5.1. Prozessierung der NMR-Spektren	36
2.5.2. Statistische Analyse der NMR-Spektren mittels Hauptkomponen- tenanalyse	37
2.5.3. Integrale und <i>p</i> -Werte	38
3. Ergebnisse	39
3.1. Methodenetablierung und Zuordnung mit Reinsubstanzspektren	39
3.1.1. Test der Extraktion und Vergleich der NMR-Experimente	39
3.1.2. Festlegung der Zellzahl	41
3.1.3. Zuordnung mit Reinsubstanzspektren	42
3.2. Messung Batch 1 und erweiterte Zuordnungsexperimente	44
3.2.1. Zuordnung mit <i>spiking</i> und STOCSY	46
3.2.2. <i>Pure Shift</i> Zuordnungsexperimente	47
3.3. Messung Batch 2 und der Batcheffekt	52
3.4. Variabilität innerhalb der Gruppen	54

Inhaltsverzeichnis

3.5. Analyse der Änderungen der Metabolitsignale	56
4. Diskussion	63
4.1. Induktion von Apoptose	63
4.2. Methodenetablierung	64
4.3. Identifikation der Metabolite	66
4.4. Unterschiede der beiden Messreihen	68
4.5. Unterschiede im Metabolismus der untersuchten Gruppen	68
4.5.1. Metabolische Änderungen bei Aktivierung der Neutrophilen	68
4.5.2. Metabolische Änderungen bei Alterung und Apoptose der Neutrophilen	69
4.6. Beteiligte Stoffwechselwege bei Aktivierung und Alterung von Neutrophilen	70
4.6.1. Taurin und Hypotaurin Metabolismus	71
4.6.2. NAD ⁺ Metabolismus	73
4.6.3. ATP Metabolismus	74
4.7. Schlussfolgerungen und Ausblick	74
5. Literatur	77
A. Anhang	86
A.1. Pulsprogramme	86
A.1.1. cpmgpr1d	86
A.1.2. jresgpprqf	87
A.1.3. noesypr1d	88
A.1.4. reset_psyche_1d	89
A.1.5. zgadc2	91
A.1.6. zgesgp	93
A.2. Ergänzende Abbildungen zu den Ergebnissen	94
B. Abbildungsverzeichnis	97
C. Tabellenverzeichnis	99

Abkürzungsverzeichnis

CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
DDEB	dominante dystrophe Epidermolysis Bullosa
DEB	dystrophe Epidermolysis Bullosa
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EBA	Epidermolysis Bullosa Acquisita
FID	<i>free induction decay</i>
GPC	Glycerophosphocholin
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum coherence</i>
J-res	<i>J-resolved coupling</i>
LPS	Lipopolysaccharide
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	nuklearer Overhauser Effekt
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

Inhaltsverzeichnis

PCA	<i>principal component analysis</i> , Hauptkomponentenanalyse
ppm	<i>parts per million</i>
PSYCHE	<i>pure shift yielded by chirp excitation</i>
RDEB	rezessive dystrophe Epidermolysis Bullosa
rpm	<i>revolutions per minute</i>
STOCSY	<i>Statistical Total Correlation Spectroscopy</i>
TNF	Tumornekrosefaktor- α
TSP-d_4	3-(Trimethylsilyl)-1-propionsäure-2,2,3,3- d_4

1. Einleitung

Seit 2011 erlebt der Immunometabolismus als Forschungsthema einen rasanten Anstieg. Zum Beispiel bei der Verbindung von Übergewicht zu einer andauernden Entzündung zeigt sich, dass Stoffwechselwege das Immunsystem modulieren können (Mathis und Shoelson 2011). Speziell der Metabolismus von Immunzellen kann daher wichtige Erkenntnisse über die Entstehung und den Verlauf von Entzündungen liefern.

1.1. Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (kurz Neutrophile) sind Zellen der Immunabwehr und gehören zu den Leukozyten. Im Gegensatz zu Erythrozyten haben sie einen Zellkern aber kein Hämoglobin, weswegen sie weiß erscheinen. Neutrophil bezieht sich darauf, dass diese Zellen gut mit neutralen Farbstoffen angefärbt werden können (im Gegensatz zu basophilen und eosinophilen Granulozyten). Neutrophile haben einen Durchmesser von 10 - 15 μm . Reife Zellen haben einen segmentierten Zellkern - sie sind polymorphkernig. Neutrophile beinhalten viele Granula-Vesikel gefüllt mit Substanzen zur Abwehr von Mikroorganismen (Amulic et al. 2012).

Neutrophile nehmen im Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen ein. Neutrophile üben verschiedene antimikrobielle Funktionen aus. Sie können Phagozytose durchführen, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und andere antimikrobielle Substanzen aus ihren Vesikeln freisetzen und *neutrophil extracellular traps* (NETs, NETose) bilden, um Bakterien abzutöten (Mayadas, Cullere und Lowell 2014; Delgado-Rizo et al. 2017; Teng et al. 2017). Wenn die Neutrophilen durch Defekte oder Fehlregulation

1. Einleitung

gestört sind, kann es zu Autoimmunerkrankungen (Jorch und Kubes 2017) oder bis zur Sepsis (Shen et al. 2017) kommen.

Im Knochenmark eines erwachsenen Menschen entstehen 10^{11} Neutrophile pro Tag. Die Lebensdauer von Neutrophilen ist dafür sehr kurz: Wenn sie nicht aktiviert werden, begeben sie sich bereits nach wenigen Stunden in Apoptose, also in den programmierten Zelltod mit intakter Zellmembran (Aga et al. 2002; Tak et al. 2013; Payne et al. 1994). Einen gegensätzlichen Zelltod dazu bildet die Nekrose, bei der die Zellmembran nicht intakt bleibt (Kroemer et al. 2009).

Am Ort einer Entzündung bewirken verschiedene Stimuli, dass nahe gelegene Endothelzellen auf der Innenseite von Blutgefäßen Adhäsionsmoleküle, insbesondere P-Selektine und E-Selektine, exprimieren (Borregaard 2010). Neutrophile, die in Kontakt mit den Adhäsionsmolekülen kommen, interagieren mit diesen und "rollen" am Endothel entlang (Lawrence et al. 1997). Durch die Interaktion mit den Selektinen, Chemokinen und bakteriellen Substanzen beginnt die Aktivierung der Neutrophilen. Diese kommen Integrinvermittelt zum Stillstand und migrieren ins Gewebe (Ley et al. 2007). Dabei folgen sie dem Konzentrationsgradienten der ausgeschütteten Chemokine zum Infektionsort. Um zwischen den Endothelzellen durchzuwandern, muss zum Teil die extrazelluläre Matrix aufgelöst werden (Amulic et al. 2012).

Durch Phagozytose, Ausschüttung ihrer Vesikel und NETose können Neutrophile Bakterien gut bekämpfen. Gleichzeitig kann insbesondere die Ausschüttung der Vesikel auch das Gewebe stark schädigen (Amulic et al. 2012). Im Verlauf einer Infektion kommt es daher zu einem Umschalten, um die Entzündung zu beenden. Neue Chemokine verhindern die weitere Rekrutierung von Neutrophilen und rekrutieren stattdessen Makrophagen. Neutrophile beginnen in Apoptose zu gehen und werden anschließend von Makrophagen aufgenommen (Amulic et al. 2012).

Während aktivierte Neutrophile pro-inflammatorisch sind, spielen apoptotische Neutrophile eine wichtige Rolle beim Abklingen von Entzündungen (El Kebir und Filep 2010; Ortega-Gómez, Perretti und Soehnlein 2013). Auch sie produzieren Signale, die eine weitere Rekrutierung von Neutrophilen beenden. Zusätzlich schalten Makrophagen nach Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen auf einen anti-inflammatorischen

1. Einleitung

Phänotyp um (Amulic et al. 2012). Die metabolischen Veränderungen in Neutrophilen während der Aktivierung und Apoptose sind nur unzureichend verstanden.

1.2. Autoimmunerkrankungen der Haut

Die beschriebenen Eigenschaften von Neutrophilen die extrazelluläre Matrix aufzulösen und das Gewebe zu zerstören spielt bei Entzündungen und bei Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle und macht Neutrophile damit zu einem potentiellen therapeutischen Angriffspunkt bei dieser Erkrankungsart. Neutrophile spielen bei blasenbildenden Autoimmunerkrankungen der Haut, insbesondere bei Epidermolysis bullosa acquisita (EBA), Pemphigoid und Pemphigus Erkrankungen, eine wichtige Rolle für den Schweregrad der Krankheiten (Liu et al. 1997; Chiriac et al. 2007). Diese Erkrankungen zeichnen sich durch Antikörperbildung gegen verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix aus. Dabei entstehen je nach Autoimmunerkrankung Blasen in unterschiedlichen Schichten der Haut (Beek, Zillikens und Schmidt 2018).

1.2.1. Aufbau der Haut

Die menschliche Haut ist das Grenzorgan, welches den Körper vor der Umwelt schützt. Sie stellt das größte Organ des Menschen dar. Im wesentlichen besteht die Haut aus drei Schichten: die oberste Schicht bildet das Plattenepithel der Epidermis (Oberhaut), dann folgt das Fasergeflecht der Dermis (Lederhaut), die auf dem darunterliegenden Fettgewebepolster, der Subkutis, aufsitzt.

Die Epidermis ist ein geschichtetes Plattenepithel, aus der die Hornschicht entsteht. Sie besteht zu über 90 % aus Keratinozyten. Die Epidermis wird ständig erneuert, wobei die Keratinozyten durch Mitose aus den Stammzellen der Basalschicht (Stratum basale), der innersten Schicht der Epidermis, entstehen. Eine Zelle verbleibt an der Basalschicht, während die andere Zelle aktiv nach außen wandert. Auf diesem Weg differenzieren die Keratinozyten, sodass sich die Epidermis in vier Zelllagen mit unterschiedlicher Differenzierung aufteilen lässt: Das Stratum basale mit den Stammzellen, das Stratum spinosum (Stachelzellschicht), das Stratum granulosum (Körnerschicht) und das Stra-

1. Einleitung

tum corneum (Hornschicht) (Lookingbill und Marks 1986). Die äußerste Schicht, das Stratum corneum, besteht aus flachen, hexagonalen Korneozyten. Diese Hornschicht stellt die Schutzbarriere der Haut zur Umwelt dar (Elias 2007).

Über die Basalmembran ist die Epidermis mit der Dermis verbunden. Die Grenzzone wird als dermo-epidermale Junktionszone bezeichnet (Abbildung 1.1). Der Übergang von Dermis zu Epidermis erfolgt wellenförmig, was eine bessere Haftung gewährleistet. Die Dermis ist ein reißfestes und elastisches Gewebe und beinhaltet im Gegensatz zur Epidermis Gefäße und Nerven. Neben den zellulären Bestandteilen (Fibroblasten, Mastzellen und weitere Gewebszellen) besteht die Dermis aus Kollagenfasern, elastischen Fasern, Mikrofibrillen und einer amorphen Grundsubstanz. Zusammen bilden diese nicht-zellulären Komponenten die extrazelluläre Matrix (Fritsch und Schwarz 2018).

1.2.2. Dystrophe Epidermolysis Bullosa

Epidermolysis Bullosa ist eine Hauterkrankung, bei der sich Blasen zwischen der Dermis und der Epidermis bilden. Die Erbkrankheit dystrophe Epidermolysis Bullosa (DEB) entsteht aufgrund von Mutationen im COL7A1-Gen. Dieses kodiert für Kollagen VII, den Hauptbestandteil der Ankerfibrillen, die die Dermis mit der Epidermis verbinden. Je nach Mutation kann es zu einer autosomal dominant (DDEB) oder rezessiv (RDEB) vererbten Form der Krankheit kommen. DDEB wird meistens durch Glycin-Substitutionen in der Tripelhelix ausgelöst. RDEB wird in der Regel durch verfrühte Stopcodons und Missense-Mutationen in der Tripelhelix oder in den nicht-kollagenösen Domänen verursacht. Gibt es auf beiden Allelen ein verfrühtes Stopcodon, ist der Krankheitsverlauf besonders schwer (Dang und Murrell 2008). Es gibt nur wenige Arbeiten zu Struktur und Interaktionen von Domänen von Kollagen VII (Brittingham, Uitto und Fertala 2006). Struktur und Bindungsstellen von Subdomänen von Kollagen VII wurden schon länger in der Arbeitsgruppe untersucht (Gebauer et al. 2020; Richer und Seeger 2014).

1. Einleitung

1.2.3. Neutrophile in Epidermolysis bullosa acquisita

Neben der Erbkrankheit gibt es auch die Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita (EBA). Hier kommt es zur Blasenbildung, weil Autoantikörper gegen Kollagen VII gebildet werden. Die Ursachen des Toleranzverlustes sind bisher nicht bekannt. Neutrophile sind die Zellen, die bei EBA für die Zerstörung des Gewebes verantwortlich sind (Abbildung 1.1). In Kleintiermodellen ohne funktionale Neutrophile löst die alleinige Gabe von anti-Kollagen VII Antikörpern keine EBA aus (Chiriac et al. 2007). Deswegen sind speziell für das bessere Verständnis der Entstehung und des Krankheitsverlaufs von EBA mehr Erkenntnisse über Neutrophile essenziell, um möglicherweise therapeutisch eingreifen zu können.

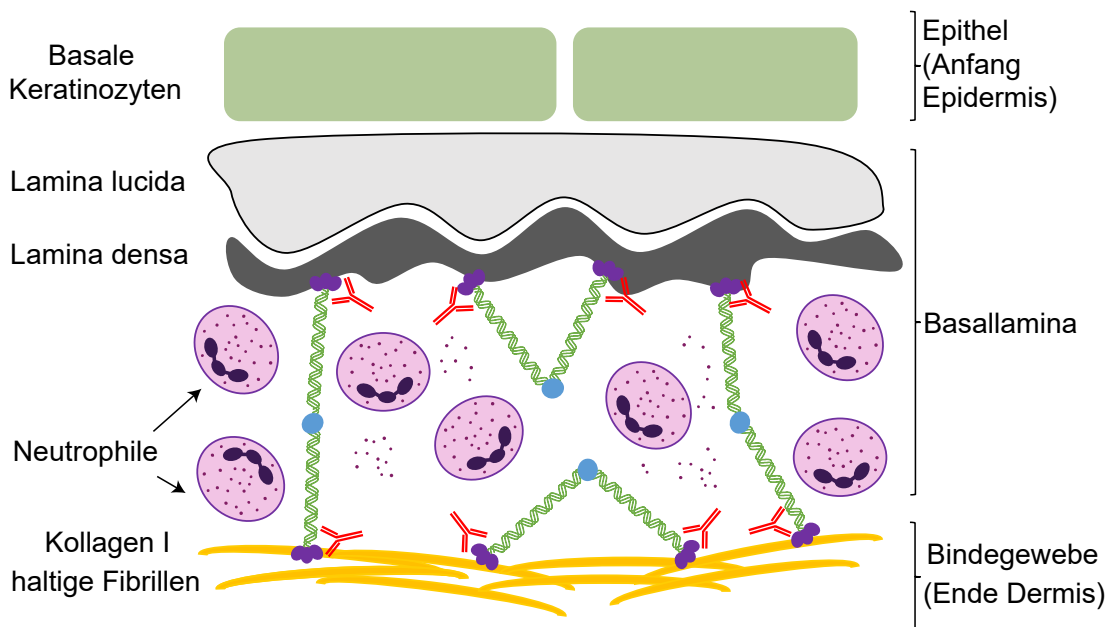


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung der dermo-epidermalen Junctionszone bei EBA. Die Ankerfibrillen (Kollagen VII) verbinden in der Haut die Kollagen I haltigen Fibrillen der Dermis mit dem Laminin-332 Kollagen IV Netzwerk der Lamina densa am Übergang zur Epidermis. Bei EBA werden Autoantikörper gegen Kollagen VII gebildet und es kommt zu einer Einwanderung von Neutrophilen mit anschließender Blasenbildung.

1.3. Metabolische Veränderungen bei Neutrophilen

Das Forschungsgebiet des Immunometabolismus befasst sich insbesondere mit den Veränderungen in den Stoffwechselwegen von Immunzellen und damit, wie diese Veränderungen ihre Funktion beeinflussen (O'Neill, Kishton und Rathmell 2016).

Die metabolischen Veränderungen in Neutrophilen während der Aktivierung und Apoptose sind nur unzureichend verstanden. Der Übergang von aktivierten Neutrophilen in die Apoptose ist wichtig, um andauernde Entzündungen zu vermeiden und den Schweregrad bei Autoimmunerkrankungen zu verringern. Deswegen ist ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Stoffwechselwege von großem Interesse (Amulic et al. 2012).

Eine frühe Studie zu den metabolischen Veränderungen durch Apoptose in Neutrophilen fand in Zellen, die sich nach 20 h Inkubation zu mehr als 70 % in Apoptose befanden, einige signifikante Unterschiede zu ruhenden Zellen: Phosphocholin, Tyrosin und Serin waren erhöht, Lactat und Glutamin reduziert (Nunn et al. 1996). Die Autoren vermuten erhöhten Lactat- und Glutaminverbrauch zur Energiegewinnung während der Apoptose. Auch das ATP/ADP-Verhältnis blieb bei den apoptotischen Zellen stabil, was dafür spricht, dass die Energieproduktion auch während der Apoptose noch funktioniert und Apoptose Energie benötigt (Nunn et al. 1996).

Phosphocholin kann durch direkten Abbau von Phosphatidylcholin über Phospholipase D entstehen. Dieser Weg konnte aber experimentell ausgeschlossen werden (Nunn et al. 1996). Stattdessen könnte ein Umbau der Zellmembran während der Apoptose die Zunahme erklären (Fadeel 2004). Taurin, mit einer Konzentration von 50 mM in Neutrophilen sehr stark vertreten (T. R. Green et al. 1991), war nicht signifikant verändert. Neutrophile enthalten nur wenige Mitochondrien (Maianski et al. 2004), die als ausgedehntes Netzwerk im Cytoplasma vorliegen (Fossati et al. 2003). Die ATP Konzentration in Neutrophilen ist unabhängig von einer Hemmung der Mitochondrienfunktion (Maianski et al. 2004; Borregaard und Herlin 1982). Neutrophile verfügen über einen vollständigen Citronensäurecyclus (Stjernholm 1967), trotzdem wird ATP bei Neutrophilen hauptsächlich in der Glycolyse gebildet (Borregaard und Herlin 1982). Während der Phagocytose sinkt die intrazelluläre ATP-Konzentration, die Glycolysegeschwindigkeit

1. Einleitung

keit bleibt aber konstant (Borregaard und Herlin 1982). Bei aktivierten Neutrophilen spielt ATP eine weitere wichtige Rolle. An Orten mit Hypoxie oder Infektion setzen Neutrophile ATP frei, welches von Endothelzellen extrazellulär in Adenosin gespalten wird, und dann u.a. die Barrierefunktion von Endothelzellen moduliert (Eltzschig, MacManus und Colgan 2008).

Diese Studien stellen eine metabolische Momentaufnahme dar bzw. haben sich auf einzelne Stoffwechselwege konzentriert und diese gut charakterisiert. Es ist aber auch interessant, nicht nur den Unterschied zwischen ruhenden und aktivierten Neutrophilen zu betrachten, sondern weitere Zustände einzubeziehen. Dabei sind einerseits die anti-inflammatorischen apoptotischen Neutrophilen von Interesse und andererseits lassen sich die aktivierten Neutrophilen noch nach der Art und Weise ihrer Aktivierung aufteilen.

Neutrophile können sowohl von körpereigenen Molekülen, beispielsweise über das zumeist von Makrophagen ausgeschüttete Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF), sowie über körperfremde Moleküle zum Beispiel Bestandteile aus der bakteriellen Zellmembran wie Lipopolysaccharide (LPS) - allgemein als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet - aktiviert werden (Amulic et al. 2012). Daher stellt sich die Frage, ob die Neutrophilen abhängig von der Herkunft des aktivierenden Stimulus unterschiedliche metabolische Veränderungen aufweisen und der Körper auf diese Art unterscheiden kann, ob Bakterien vorhanden sind oder nicht.

1.4. Metabolomics

Metabolomics stellt nach Genomics und Proteomics die nächste Ebene der Untersuchung auf dem Weg vom Gen zum Phänotyp dar. Dabei wird die Zusammensetzung der Stoffwechselprodukte (Metabolite) in einer Zellsorte, in einem Gewebe oder in einer biologischen Flüssigkeit gemessen. Die Messung dieser Stoffwechselprodukte lässt Rückschlüsse auf die biochemische Aktivität zu (Alonso, Marsal und Julià 2015).

Die beiden Hauptmethoden, mit denen die Metabolite gemessen werden, sind die Massenspektrometrie (in der Regel gekoppelt an eine Flüssig- oder Gaschromatographie)

1. Einleitung

und die NMR-Spektroskopie. Im Institut für Chemie und Metabolomics wird die NMR-Spektroskopie angewandt.

Bei der globalen Messung der Stoffwechselprodukte ohne eine spezifische Hypothese, welche Metabolite beeinflusst sein könnten, wird eine große Datenmenge generiert. An die Messung der Proben schließt sich daher eine komplexe statistische Auswertung an (Alonso, Marsal und Julià 2015).

1.5. NMR-Spektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie (engl. NMR) ist eine der wichtigsten Methoden zur Analyse von Molekülen. Sie beruht auf dem physikalischen Effekt des atomaren Kernspins von Atomen. Der Kernspin, eine inhärente Eigenschaft von Atomen, präzediert mit seiner Larmorfrequenz um die Achse eines konstant angelegten Magnetfeldes, bei Veranschaulichung im Vektormodell. Die Orientierung zum Magnetfeld des makroskopischen Magnetisierungsvektors ändert sich, wenn die Absorption oder Emission von elektromagnetischen Wechselfeldern mit der Larmorfrequenz resoniert. Gemessen wird in der NMR-Spektroskopie die Rückkehr zur Gleichgewichtsmagnetisierung nach Auslenkung durch eine bestimmte Abfolge von hochfrequenten Pulsen. Dieses Signal wird als freier Induktionsabfall (FID von Englisch *free induction decay*) bezeichnet. Die genaue Resonanzfrequenz eines Kerns ist von seiner chemischen Umgebung abhängig. Das spiegelt sich im Spektrum in unterschiedlichen chemischen Verschiebungen wider.

Die Spinquantenzahl I beschreibt die möglichen Orientierungen des Kernspins im externen Magnetfeld. I nimmt bei ungerader Nukleonenzahl (Protonen + Neutronen) halbzahlige Werte und bei gerader Nukleonenzahl ganzzahlige Werte an. Nur Kerne mit magnetischem Moment, also mit $I \neq 0$, können in der NMR-Spektroskopie betrachtet werden (Keeler 2013).

^1H -Atome (in der NMR auch als Protonen bezeichnet) haben kein Neutron im Kern, also eine Nukleonenzahl von 1 und eine Spinquantenzahl von $\frac{1}{2}$. Sie können daher in der NMR-Spektroskopie beobachtet werden.

1. Einleitung

^{13}C - und ^{15}N -Atome haben ebenfalls eine Spinquantenzahl von $\frac{1}{2}$. Im Gegensatz zu ^1H -Atomen haben diese Isotope aber den entscheidenden Nachteil, dass sie eine sehr viel niedrigere natürliche Häufigkeit aufweisen. Diese beträgt 99,98 % für Protonen, aber nur 1,1 % für ^{13}C - und 0,36 % für ^{15}N -Atome (Claridge 2016). Deshalb können ^1H -Proben, zum Beispiel im Bereich der Metabolomics, bei geringer Metabolitkonzentration trotzdem mit gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis gemessen werden. ^{13}C und ^{15}N spielen im Bereich der Metabolomics zum Beispiel dort eine Rolle, wo das Zellmedium mit isotopenmarkierten Molekülen versetzt wird, um zu verfolgen in welchen Molekülen sich die Isotope anreichern.

^{31}P -Atome haben zwar ebenfalls eine Spinquantenzahl von $\frac{1}{2}$ und sogar eine natürliche Häufigkeit von 100 % (Claridge 2016), der verwendete Probenkopf konnte aber nicht auf die Frequenz von ^{31}P eingestellt werden. Grundsätzlich können phosphoorganische Substanzen wie aktivierte Zucker, NAD und NADPH mit ^{31}P -Spektroskopie gemessen werden.

Zwischen NMR-aktiven Kernen, die über wenige Bindungen (abgesehen von aromatischen Verbindungen bis zu drei) miteinander verbunden sind, kommt es zur Kopplung, also zu Wechselwirkungen der magnetischen Momente. Diese Kopplung führt zu einer Feinaufspaltung der NMR-Signale um ihre chemische Verschiebung. Ohne eine Isotopenmarkierung werden in biologischen Proben in ^1H -Spektren hauptsächlich Kopplungen zwischen Protonen beobachtet. Das Signal wird dabei umso mehr aufgespalten, umso mehr Kopplungspartner vorhanden sind. Die Kopplung ist ein hilfreiches Werkzeug bei der Strukturaufklärung, gleichzeitig kann es durch die Aufspaltung auch zur Überlagerung verschiedener Signale kommen, was eine Zuordnung erschwert (Keeler 2013).

1.6. NMR-Methoden für metabolische Untersuchungen

Das Ziel der Metabolomics ist die qualitative und quantitative Messung kleiner Moleküle ($< 1,5\text{kDa}$) in Lösung (Wishart, Knox et al. 2009). Die allgemeine Herangehensweise an eine Metabolomics-Studie ist in Abbildung 1.2 aufgeführt. Nachdem das Studiendesign und die Fragestellung festgelegt sind, können Proben aus unterschiedlichen Quellen

1. Einleitung

gewonnen werden. Von der Probenvorbereitung hängt ab, wie die Spektren aufgenommen werden können. Auf die Prozessierung folgt eine statistische Auswertung, deren Ergebnisse biologisch interpretiert werden müssen.

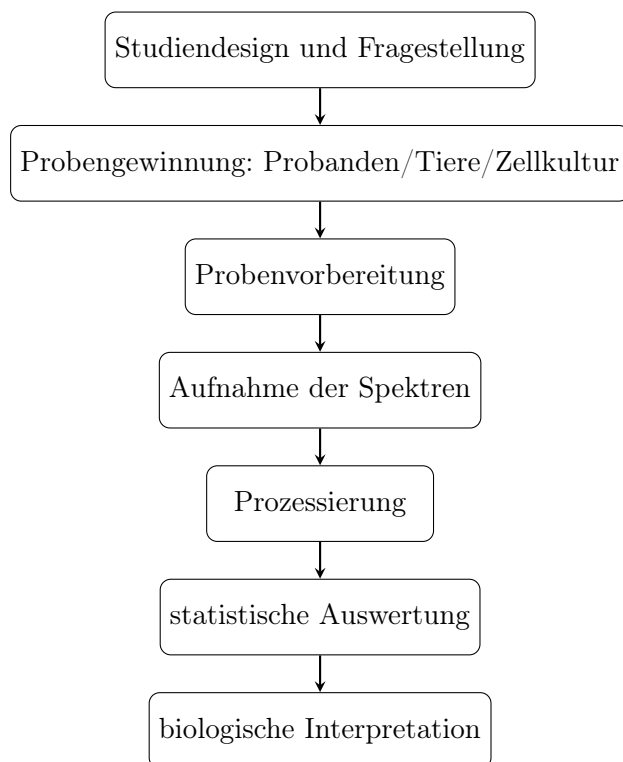


Abbildung 1.2.: Allgemeine Herangehensweise an Metabolomics: Es werden für eine geplante Studie eine Stichprobenzahl festgelegt und entsprechende Proben gesammelt. Die Metabolite werden, falls notwendig, mit einer geeigneten Extraktion isoliert. Anschließend werden z.B. NMR- oder Massenspektren aufgenommen und prozessiert. Darauf folgen eine statistische Auswertung und eine Interpretation der biologischen Relevanz.

Für die Wahl des richtigen Experiments ist die Probenzusammensetzung von zentraler Bedeutung. Diese lässt sich in zwei sehr unterschiedliche Gruppen einteilen: Extrahierte und nicht-extrahierte Proben. Bei extrahierten Proben werden die gewünschten Metabolite durch eine geeignete Extraktion isoliert. Dies ist z.B. bei Gewebeproben oder bei Zellen der Fall. Dabei werden zum Beispiel störende Proteine von den Metaboliten getrennt. Diese können dann in einem NMR-Lösemittel aufgenommen und direkt gemessen werden - polare Metabolite in wässrigem Puffer und unpolare Metabolite in organischem

1. Einleitung

Lösemittel. Extraktionen können den Nachteil haben, dass bestimmte Metabolite nicht isoliert werden können oder zu instabil sind (Lin et al. 2007).

Nicht-extrahierte Proben werden mit einem NMR-Puffer gemischt. Vorteilhaft sind die einfache Probenvorbereitung und die vollständige Verwendung der Probe. Gleichzeitig gibt es aber auch deutliche Nachteile: Serumproben zum Beispiel beinhalten neben Metaboliten auch Fette, Lipoproteine und Proteine, die NMR-Messungen stören können, indem sie Signale verbreitern und zu breiten Überlagerungen im Spektrum führen. Darüber hinaus haben solche Proben ein sehr intensives Wassersignal, sodass alle Pulssequenzen eine Wasserunterdrückung beinhalten müssen.

1.6.1. 1D-NOESY mit Vorsättigung des Wassers

Der nukleare Overhauser Effekt (NOE) ermöglicht es, die räumliche Nähe von zwei Protonen zu beobachten. Dies ist mit einem selektiven 1D oder mit einem 2D NOESY-Experiment messbar (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) (Bell und Saunders 1970). Das für Metabolomics verwendete noesypr1d-Experiment ist das erste Inkrement eines 2D-NOESY. Es wird nicht wegen des nuklearen Overhauser Effekts verwendet, sondern weil das Experiment eine robuste und einfach zu implementierende Wasserunterdrückung besitzt. Das Experiment ist mittlerweile zum *de facto* Standardexperiment für NMR-Metabolomics geworden (McKay 2011).

Das Pulsprogramm ist wie folgt aufgebaut: auf eine Wartezeit mit gleichzeitiger Sättigung des Wassers folgen zwei 90° Pulse. Nach der anschließenden Mischzeit (auch mit Wasserunterdrückung) folgt ein dritter 90° Puls. Im Anschluss wird der freie Induktionsabfall aufgenommen (Abbildung 1.3). Durch einen Phasenzzyklus (die ersten beiden 90° Pulse sind in der Summe im Wechsel 180° und 0°) können darüber hinaus Artefakte unterdrückt und die Wasserunterdrückung verbessert werden (McKay 2011).

Neben dem noesypr1d gibt es auch eine Variante, bei der zwei gepulste Feldgradienten verwendet werden (noesygprr1d, siehe Abbildung 1.4) (Dona, Jiménez et al. 2014). Hierbei ist eine kürzere Mischzeit τ_m möglich, in der weniger Artefakte entstehen können. Weiterhin soll damit eine bessere Linienbreite erreicht werden können.

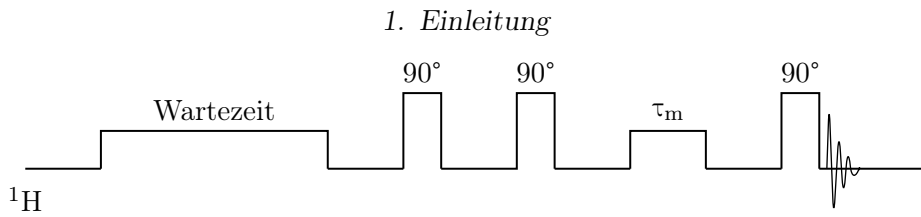


Abbildung 1.3.: Die Pulssequenz des 1D-NOESY mit Vorsättigung des Wassers (noesypr1d): selektive Anregung des Wassers während der Wartezeit, zwei harte 90° Pulse direkt nacheinander, selektive Anregung des Wassers während der Mischzeit τ_m , harter 90° Puls und Aufnahme eines FIDs.

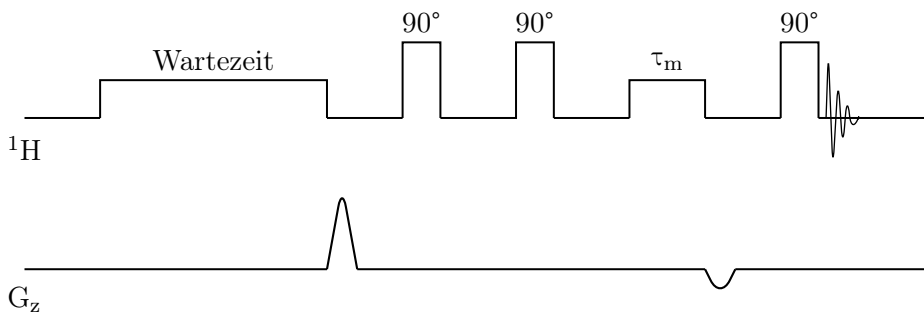


Abbildung 1.4.: Die Pulssequenz des 1D-NOESY mit Vorsättigung des Wassers und Gradientenpulsen (noesygpr1d): selektive Anregung des Wassers während der Wartezeit, 1. Gradient, zwei harte 90° Pulse direkt nacheinander, selektive Anregung des Wassers während der Mischzeit τ_m , 2. Gradient, harter 90° Puls und Aufnahme eines FIDs. Die Mischzeit τ_m kann hier deutlich kürzer gewählt werden als beim noesypr1d.

1.6.2. CPMG mit Vorsättigung des Wassers

In vielen Metabolomicsproben, insbesondere in Serumproben liegt ein Gemisch aus großen Molekülen und kleinen Metaboliten vor. Für die gezielte Analyse der kleinen Moleküle kann man eine Probe entweder filtrieren oder ein Experiment verwenden, welches nach Größe selektiert.

Die CPMG Sequenz (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) - benannt nach ihren Erfindern - wird kombiniert mit einer Wasserunterdrückung durch selektive Vorsättigung des Wassers (cpmgpr1d) als wichtiges Experiment für NMR Metabolomics verwendet. Sie basiert auf dem Prinzip des Spin-Echos. Nach der Vorsättigung wird die Magnetisierung über einen 90° Puls in die xy-Ebene befördert. Die Spins können während einer Zeit τ in der xy-Ebene dephasieren, bevor sie durch einen 180° Puls und eine weitere Zeit τ wieder rephasiert werden. Das zu diesem Zeitpunkt messbare Signal ist aufgrund von Relaxa-

1. Einleitung

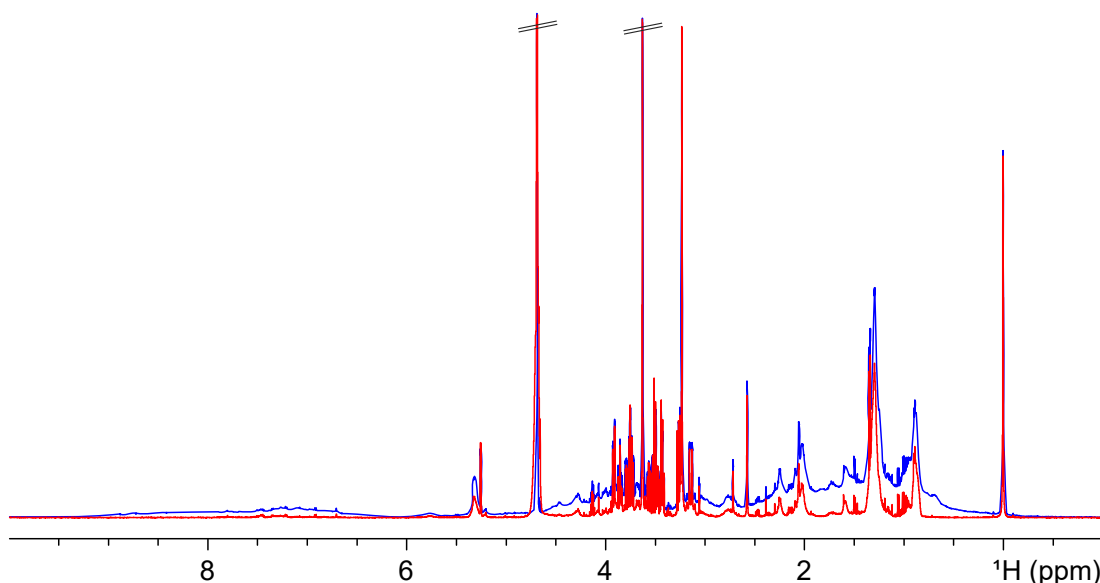


Abbildung 1.6.: Vergleich von 1D-NOESY und CPMG an einer Serumprobe. Im 1D-NOESY-Spektrum (blau) sieht man Signale der Makromoleküle (Lipoproteine, Fette, Proteine) im aromatischen (6,5 bis 9 ppm, NH-Bereich der Proteine) und im aliphatischen Bereich (1 bis 5 ppm). Durch Anwendung des T_2 -Filters im CPMG-Spektrum (rot) sind die Makromoleküle unterdrückt. Die Linienbreite gemessen am TSP-Signal verbessert sich dabei, weil alles was an Makromoleküle bindet mit unterdrückt wird. Kleine Moleküle, die zum Teil an Makromoleküle gebunden sind, verlieren dadurch an Intensität.

zwischen den beiden Gradienten jeweils einen selektiven Puls, mit dem nur das Wassersignal angeregt wird, und einen nicht-selektiven 180° Puls, der alle Spins in der Probe anregt (Abbildung 1.7). Dadurch werden am Ende des Echos jeweils alle Signale außer dem Wassersignal rephasiert (Berger und Braun 2004). Signale in der direkten Nähe zum Wassersignal werden in ihrer Intensität dabei deutlich reduziert.

1.6.4. Chemische Kopplung in der indirekten Dimension - 2D

(J-resolved)

Eindimensionale ^1H -NMR Spektren haben zwei große Vorteile: die Messzeit ist durch die hohe natürliche Häufigkeit und die Messung in der direkten Dimension sehr klein und eine Quantifizierung ist mit einem internen Standard direkt aus dem Spektrum möglich. Im Bereich der Metabolomics zeigt sich aber auch ein deutlicher Nachteil: Durch den schmalen spektralen Bereich der Protonen und die große Anzahl an Signalen pro

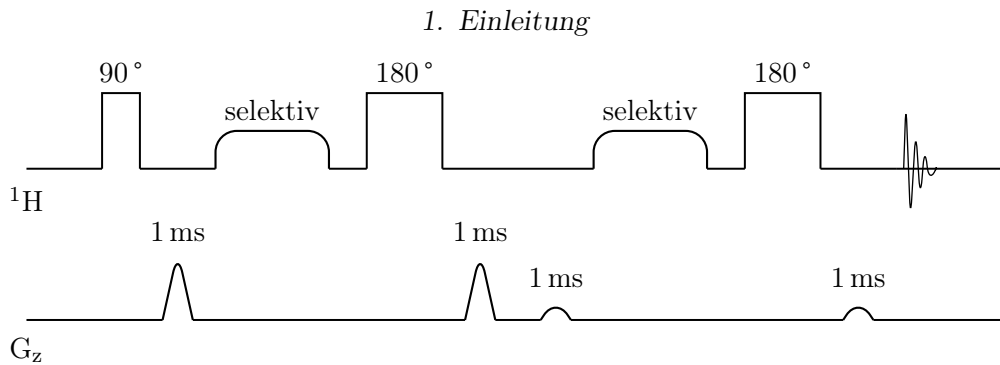


Abbildung 1.7.: Aufbau des zgesgp mit *Excitation Sculpting*. Zwei Gradientenechos mit unterschiedlicher Gradientenstärke beinhalten jeweils einen selektiven Puls auf das Wasser und einen harten 180° Puls. Da das Wasser im Echoelement mehr als einen 180° Puls erfährt, wird es am Ende nicht refokussiert. Die Wiederholung des Echos reduziert Probleme mit der Basislinie und der Phase.

Metabolit kommt es schnell zu einer Überlagerung von diversen Signalen. Ein Lösungsansatz ist es, nur die chemische Verschiebung zu messen und die Kopplung, also die Feinaufspaltung der Signale, zu unterdrücken.

Beim pseudo-zweidimensionalen J -res (J -resolved) befindet sich in der direkten Dimension die chemische Verschiebung und in der indirekten die J -Kopplung. Eine 1D-Projektion eines J -res ergibt dann ein ^1H -Spektrum ohne Kopplung. Die Anzahl überlagernder Signale wird dadurch deutlich reduziert, wodurch auch in Bereichen mit vielen Signalen Quantifizierungen möglich sind. Gleichzeitig kann das 2D-Spektrum auch bei der Identifikation von überlagerten Signalen helfen (Aue, Karhan und Ernst 1976). In dieser Arbeit wird das J -res mit Vorsättigung des Wassers und Gradientenpulsen (jres-gpprqf) verwendet.

Die Pulssequenz enthält nach der Wartezeit und dem 90° Puls im Prinzip ein Spin-Echo-Element ($\tau - 180^\circ - \tau$). Das Besondere dabei ist, dass die Zeit τ inkrementiert wird (Abbildung 1.8). Während der indirekten Zeitdimension $t_1 = 2\tau$ entwickelt sich die Spin-Spin Kopplung, während die chemische Verschiebung am Ende des Echos refokussiert wird. Eine 2D-Fouriertransformation kann daher diese beiden Komponenten trennen (Berger und Braun 2004).

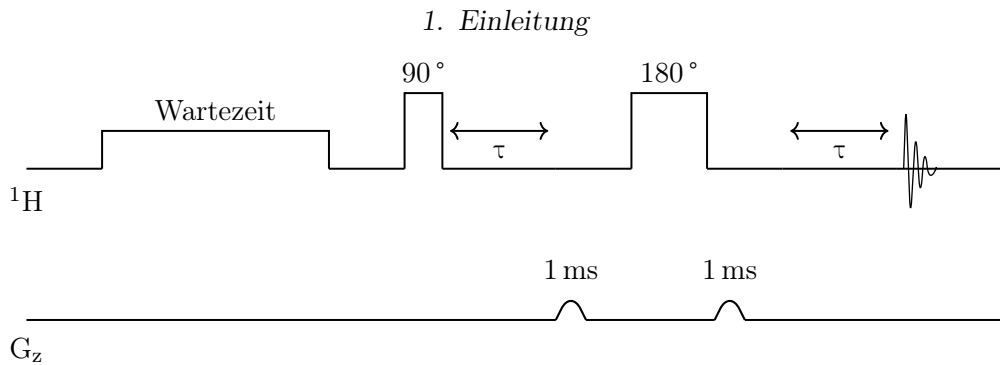


Abbildung 1.8.: Die Pulssequenz des 2D J -res mit Vorsättigung (jresgpprqf): selektive Anregung des Wassers während der Wartezeit, harter 90° Puls, Wartezeit τ , 1. Gradient, harter 180° Puls, 2. Gradient, Wartezeit τ und Aufnahme eines FIDs. Um eine zweite Dimension zu erhalten wird die Zeit τ inkrementiert.

1.6.5. *Pure Shift* Spektren mit der Zangger-Sterk

Breitbandentkopplung

Das J -res Experiment ermöglicht eine Entkopplung durch die indirekte Dimension. Gleichzeitig kann es dabei allerdings zu Problemen mit der Phase und dadurch der Linienform kommen (Zangger 2015). Alternativ zur Entkopplung durch eine zweite Dimension sind daher auch andere Ansätze entstanden, um 1D-Spektren zu generieren, die nur noch die Information der chemischen Verschiebung beinhalten - sogenannte *Pure Shift* Spektren. Die Zangger-Sterk Breitband-Entkopplung verwendet einen schwachen Gradienten, der durch das zusätzliche Magnetfeld die Larmorfrequenz ortsabhängig verändert. Das NMR-Röhrchen wird der Länge nach in Abhängigkeit der Larmorfrequenz in Scheiben unterteilt. Ein gleichzeitiger frequenzspezifischer 180° Puls regt dadurch in jeder Scheibe andere Frequenzen an. In Kombination mit einem harten 180° Puls erfährt das jeweils aktive *on-resonance* Signal einen 360° Puls, während alle anderen Signale invertiert werden. Die Kopplung, die sich vor dem zweiten Puls entwickelt hat, wird dabei refokussiert (Zangger und Sterk 1997) (Abbildung 1.9). Die verwendete Pulssequenz `zgadc2` befindet sich im Anhang (A.1.5). Jedes Signal wird nur in einer schmalen Scheibe der Probe angeregt. Dadurch zeigt das Zangger-Sterk Experiment eine deutliche schlechtere Sensitivität als übliche ^1H -Spektren. Der Verlust der Sensitivität ist dabei abhängig von der Anzahl der Scheiben, also der Bandbreite der Anregung. Gleichzei-

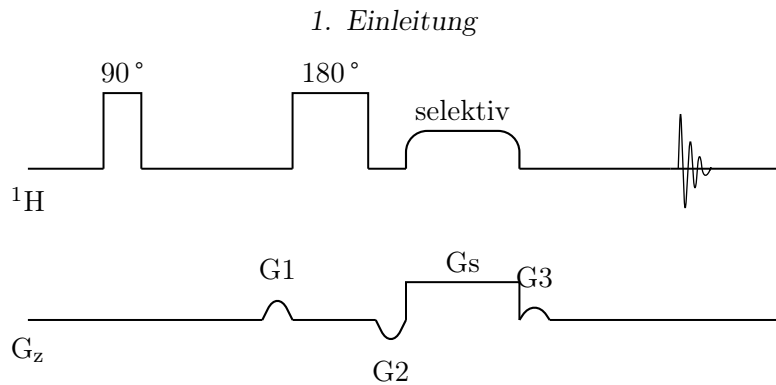


Abbildung 1.9.: Grundlegende Elemente der Breitbandentkopplung nach Zangger und Sterk. Das NMR-Röhrchen wird durch einen Gradienten in Abhängigkeit der Larmorfrequenz in Scheiben entlang der z-Achse unterteilt. Durch den gleichzeitigen frequenzspezifischen 180° Puls wird in jeder Scheibe ein unterschiedlicher Frequenzbereich angeregt, während alle anderen Signale invertiert werden.

tig gewinnt das Spektrum durch die Entkopplung aber auch wieder an Sensitivität - insbesondere bei Signalen mit hoher Aufspaltung.

1.6.6. *Pure Shift* Spektren mit der PSYCHE Methode

Eine weitere Methode zur Generierung von *Pure Shift* Spektren ist PSYCHE (*pure shift yielded by chirp excitation*). Das Prinzip basiert auf dem anti z-COSY (Foroozandeh et al. 2014). Zwei aufeinander folgende, adiabatische Chirp Pulse, in denen die Frequenz einmal ab- und einmal zunimmt, werden gleichzeitig mit einem schwachen Gradienten angewendet (Abbildung 1.10). Zusammen mit dem harten 180° Puls bleiben jeweils einige aktive Spins unbeeinflusst, während alle anderen (die passiven Spins) invertiert werden (Foroozandeh et al. 2014). Der Anteil der aktiven Spins ist nicht räumlich wie bei Zangger-Sterk, sondern ist statistisch proportional zu $\cos^2 \beta$, wobei β der Winkel der Chirp Pulse ist. Die Sensitivität wächst mit β , gleichzeitig gibt es bei höheren Winkeln aber auch mehr Artefakte (Zangger 2015). Insgesamt ist die Sensitivität auch beim PSYCHE-Experiment geringer als bei einem üblichen ^1H -Spektrum, liegt aber etwa zehnmal höher als andere *Pure Shift* Methoden (Foroozandeh et al. 2014).

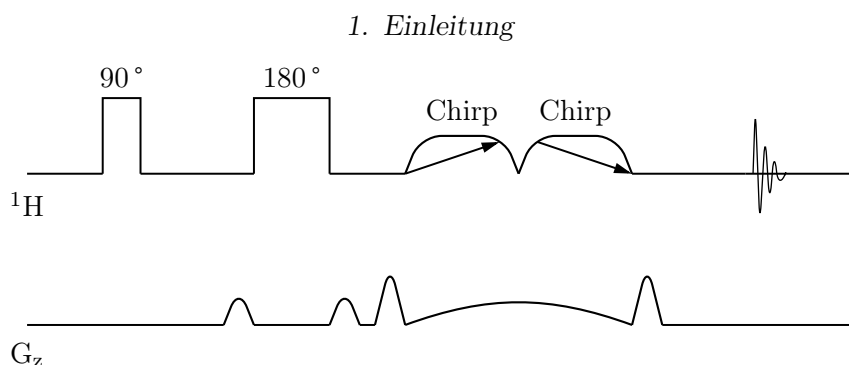


Abbildung 1.10.: Aufbau des PSYCHE-Experiments: zwei adiabatische Chirp-Pulse während eines schwachen Gradienten lassen jeweils einen aktiven Teil der Spins unbeeinflusst, während die übrigen, passiven Spins invertiert werden.

1.6.7. Prozessierung der Spektren

Für die Prozessierung von NMR-Daten werden die Datenpunkte des FID fouriertransformiert und damit von einer zeitlichen Skala in eine Frequenzskala überführt. Für eine Vergleichbarkeit der Skala zwischen unterschiedlichen Feldstärken werden die Frequenzen anschließend durch die Spektrometerfrequenz geteilt. Die daraus resultierende Skala ist einheitsfrei, aufgrund der sehr kleinen Werte erhält sie aber die Einheit ppm (*parts per million*). Nach der Fouriertransformation müssen die Phase und die Basislinie der Spektren korrigiert werden. Als Referenz für die chemische Verschiebung wird vierfach deuterierte Trimethylsilylpropionsäure (TSP- d_4) verwendet und auf einen Wert von 0 ppm gesetzt. Bevor die Spektren für eine statistische Auswertung normalisiert werden, ist es oft notwendig, einige Spektrenbereiche von der Analyse auszuschließen. Dazu gehören Lösungsmittelsignale, bekannte Verunreinigungen und eventuell zu intensive Signale.

Trotz der Referenzierung liegen die Signale der Spektren in der Regel, z.B. aufgrund minimaler Unterschiede im pH-Wert, nicht perfekt übereinander. Für eine statistische Analyse dieser Spektren gibt es dann zwei unterschiedliche Ansätze: Zum Einen kann man ganze spektrale Bereiche in sogenannten *buckets* zusammenfassen, wodurch kleinere chemische Verschiebungen nicht ins Gewicht fallen. Zum Anderen kann man jeden gemessenen Punkt verwenden (*pointbinning*), muss dafür aber jeweils lokal ein horizontales Angleichen der Spektren durchführen. Die Verwendung von *buckets* benötigt

1. Einleitung

weniger Aufwand in der Prozessierung. Korrekturen für multiples Testen (siehe Seite 22) sind direkt abhängig von der Anzahl der verwendeten *buckets*, während es beim *pointbinning* zehntausende Messpunkte und damit Parameter gibt. Allerdings reduziert man durch die Verwendung von *buckets* die Auflösung, die man durch die Feldstärke gewonnen hat. Außerdem können ungünstige Grenzen der *buckets* ebenfalls bei Unterschieden in der chemischen Verschiebung problematisch sein. Für diese Arbeit wurde eine horizontale Angleichung mit anschließendem *pointbinning* gewählt.

1.6.8. Identifizierung von Metaboliten: Referenzspektren, *spiking* und STOCSY

Da in NMR-Metabolomics-Spektren eine hohe Anzahl von Signalen vorliegt, stellt sich schnell das Problem der Zuordnung zu diversen Metaboliten. Der einfachste Ansatz ist ein Vergleich mit den Spektren von Reinsubstanzen. Viele Signale im ^1H -NMR Spektrum können direkt durch einen Vergleich mit Referenzspektren zugeordnet werden, die bei möglichst gleichen Bedingungen - pH, Temperatur, Konzentration, Feldstärke - aufgenommen wurden. Weil es Signale gibt, die sich abhängig vom pH, von der Temperatur und von der Konzentration verschieben oder mit anderen Signalen überlappen, ist ein solcher Vergleich limitiert, wenn man Reinsubstanzen aus einer Datenbank - z.B. der humanen Metabolomdatenbank (Wishart, Tzur et al. 2007) - verwendet. Da die Konzentration ebenfalls einen Einfluss auf die chemische Verschiebung haben kann (Huang et al. 2004), erlauben auch eigene Reinsubstanzspektren, die in der Regel höher konzentriert sind, als ein Metabolit in einer biologischen Probe, nicht immer eine klare Identifikation.

Eine experimentelle Lösung ist, der bereits gemessenen NMR-Probe eine geringe Menge eines Metaboliten zuzusetzen und die Messung zu wiederholen. Werden vorhandene Signale dadurch höher, können diese Signale dem titrierten Metabolit zugeordnet werden. Entstehen neue Signale, war der Metabolit vorher nicht in messbarer Konzentration vorhanden (siehe Abbildung 1.11). Dieses Verfahren bezeichnet man als *spiking*.

1. Einleitung

Für die zugegebene Menge empfehlen sich mindestens 25 % bis 50 % des in der Probe vorhandenen Signals. Eine zu geringe Konzentration kann zu unklaren Ergebnissen führen, deutlich zu viel kann das Ursprungssignal aber auch komplett überdecken, sodass eine Identitätsprüfung schwierig ist (Dona, Kyriakides et al. 2016).

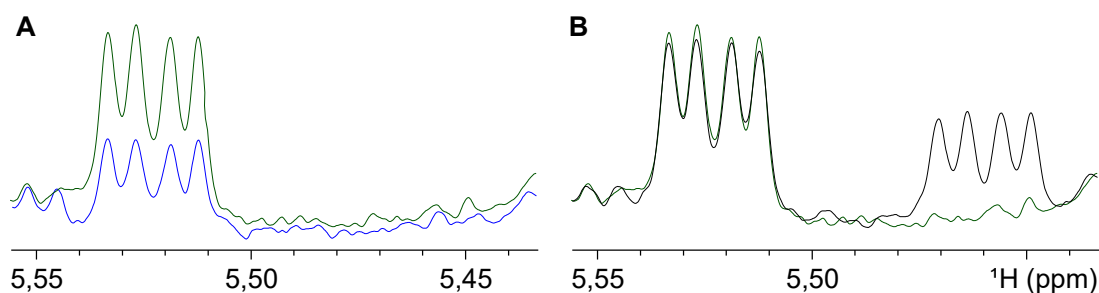


Abbildung 1.11.: *Spiking* am Beispiel von (A) einem Fibroblastenextrakt (blau) mit UDP-GlcNAc (grün) und (B) weiter mit Glucose-1-Phosphat (schwarz). Das Signal bei 5,52 kann UDP-GlcNAc zugeordnet werden, während Glucose-1-Phosphat unter dem Detektionslimit liegt. Für die Messungen verwendete Fibroblastenzelllinien sind publiziert (Hirose et al. 2019).

Im Gegensatz zum *spiking* stellt ein STOCSY (*Statistical Total Correlation Spectroscopy*) eine Möglichkeit dar, in der Datenauswertung bereits vorhandener Spektren die Zuordnung zu erleichtern (Cloarec et al. 2005). Für ein STOCSY ist eine Messreihe von prozessierten Spektren notwendig. Ausgehend von einer Frequenz im Spektrum wird die Korrelation und Kovarianz graphisch dargestellt (Abbildung 1.12). Eine hohe Korrelation über die Messreihe ist gegeben, wenn sich Intensitäten in den Spektren verändern, in denen sich auch die Ausgangsfrequenz verändert. Diese Veränderung kann in die gleiche oder in die entgegengesetzte Richtung erfolgen. Eine direkte Korrelation ist im STOCSY positiv, während eine Antikorrelation negativ dargestellt wird. Desweiteren zeigt die Kovarianz-Achse die Intensität der jeweiligen Veränderung an (Cloarec et al. 2005).

Signale eines Metaboliten zeigen eine maximale Korrelation (ein Korrelationskoeffizient von 0,9 bis 1), was die Zuordnung des Metaboliten deutlich erleichtert. Metabolite, die innerhalb eines Stoffwechselweges vorkommen sind, zeigen ebenfalls eine relativ hohe Korrelation, wodurch auch Rückschlüsse auf die vorhandenen Metabolite gezogen werden können.

1. Einleitung

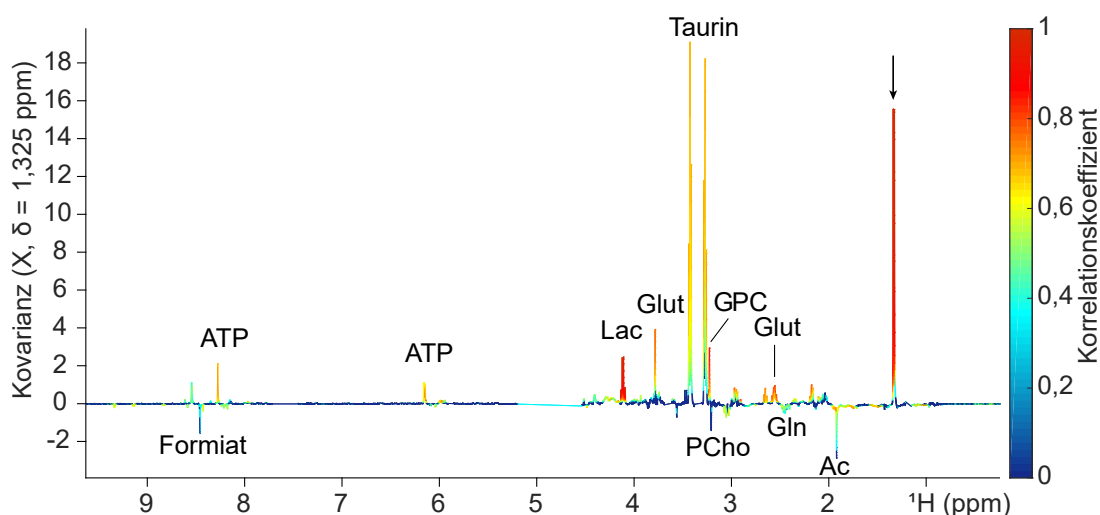


Abbildung 1.12.: Korrelation mit Lactat im STOCSY Plot. Das Signal bei 1,325 ppm (markiert mit einem Pfeil) zeigt eine maximale Korrelation mit dem Signal bei 4,1. Beide Signale gehören zum Molekül Lactat. Lactat (Lac) zeigt direkte Korrelationen mit Glutathion (Glut), Glycerophosphocholin (GPC), Taurin und ATP. Antikorrelationen gibt es mit Acetat (Ac), Glutamin (Gln), Phosphocholin (PCho) und Formiat.

1.7. Statistische Verfahren zur Analyse der Spektren

Um NMR-Metabolomics-Daten, die aus vielen Spektren mit zahlreichen Metaboliten bestehen, zu analysieren, sind Verfahren der multivariaten Statistik notwendig. Die Hauptkomponentenanalyse (englisch *principal component analysis*, kurz PCA, Abbildung 1.13) ermöglicht eine Vereinfachung eines Datensatzes, indem diverse Variablen als Linearkombinationen zusammengefasst werden (Bro und Smilde 2014). Eine Auftragung dieser Hauptkomponenten gegeneinander kann unterschiedliche Gruppen innerhalb des Datensatzes aufzeigen. Diese Gruppen sind der Analyse vorher nicht bekannt. Es handelt sich um ein nicht überwachtes statistisches Verfahren. Die PCA ermöglicht zusätzlich die Identifizierung von gruppenunabhängigen Ausreißern.

Ein typisches überwachtes statistisches Verfahren stellt die *partial least squares discriminant analysis* (kurz PLS-DA) dar. Hier sind der Analyse die verschiedenen Gruppen bekannt und es wird analysiert, ob die Gruppen tatsächlich unterschiedlich sind.

Wenn sich die Gruppen in der PCA oder PLS-DA unterscheiden, können anschließend die spektralen Bereiche bzw. nachfolgend die Metabolite entnommen werden, die für

1. Einleitung

diese Trennung der Gruppen wichtig sind. Die Änderung der Integrale der jeweiligen Metabolite lässt sich dann statistisch untersuchen. Da in einem NMR-Spektrum viele Parameter gleichzeitig untersucht werden, muss eine Korrektur für multiples Testen erfolgen.

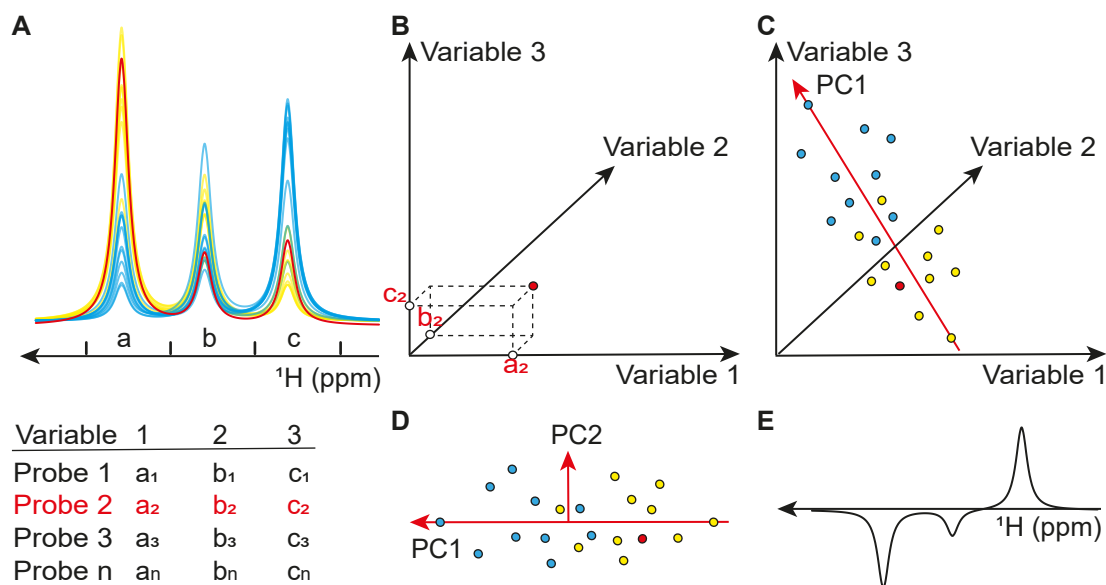


Abbildung 1.13.: Schematische Darstellung der Analyse eines Datensatzes mittels PCA. Zur Verdeutlichung der Methode wird das Spektrum von Probe 2 in rot hervorgehoben. (A) Eine Gruppe Spektren weist die Peaks a-c mit unterschiedlichen Intensitäten auf. Jedes Spektrum, also jede Probe, hat ein bestimmtes Peakintegral a_x - c_x . (B) Für jeden Peak gibt es eine Achse im Koordinatensystem, auf der die Integrale aufgetragen werden. Ein Punkt repräsentiert dabei eine Probe. (C) Eine neue Achse, die erste Hauptkomponente (PC1), wird zwischen den Punkten mit der größten Varianz gezogen. (D) Senkrecht auf PC1 erklärt die zweite Hauptkomponente (PC2) möglichst viel der verbliebenen Varianz zwischen den Proben. Die hier dargestellten Gruppen in gelb und blau können mit einem *t*-Test auf eine Trennung getestet werden. (E) Der *loading plot* von PC1 zeigt den Einfluss der ursprünglichen Signale auf die Verteilung der Proben. Spektren im negativen Bereich von PC1 haben größere Integrale a und b, während die Spektren im positiven Bereich von PC1 ein größeres Integral c aufweisen.

1.8. Signifikanz und multiples Testen

Wenn genug Hypothesen gleichzeitig getestet werden, läuft man allein wegen der Anzahl Gefahr, etwas statistisch Signifikantes zu finden. Deswegen ist es notwendig, eine Korrektur für multiples Testen zu verwenden (Simes 1986).

Eine sehr strenge Art der Korrektur ist die Korrektur nach Bonferroni: dabei wird die Grenze α für die Signifikanz durch die Gesamtzahl der getesteten Hypothesen geteilt. Nur p -Werte, die immer noch kleiner als dieses modifizierte α sind, gelten als signifikant. Bei einer Metabolomics Untersuchung stellt sich für jeden Metabolit die zu testende Hypothese, ob dieser signifikant verändert wurde. Dabei treten folgende Probleme auf: Zum Einen ist bei $^1\text{H-NMR}$ -Spektren komplexer Mischungen die Anzahl der Metabolite nicht immer genau festzusetzen. Die meisten Metabolite haben Signale bei mehreren chemischen Verschiebungen und diese spalten sich durch die Kopplung noch weiter auf. Bei nicht zugeordneten Signalen lässt sich dann nicht sagen, wie viele Metabolite sich hinter einer bestimmten Anzahl Signale verbergen. Weiterhin erstrecken sich die Metabolite über einen weiten Konzentrationsbereich, wodurch einige Signale im Rauschen untergehen oder von anderen Signalen überlagert werden. Zum Anderen ist ein auf diese Art modifiziertes α so streng, dass nur sehr wenige Änderungen als signifikant angesehen werden können.

Die Methode zur Kontrolle der *false discovery rate* (FDR) verwendet dagegen einen sequentiellen Ansatz (Benjamini und Hochberg 1995). Die p -Werte werden der Größe nach aufsteigend sortiert. Für die Formel wird „ i “ als die Position in dieser Liste verwendet. Statt alle p -Werte mit einem statischen, strengen α zu vergleichen, muss hier nur der kleinste p -Wert diese Bedingung erfüllen. Der zweitkleinste p -Wert wird mit einem größeren α verglichen. Der sortierte i . p -Wert muss dann jeweils noch kleiner sein als i mal 0,05 geteilt durch die Anzahl der Metabolite m (Gleichung 1.1).

$$p(i) \leq \frac{0,05 \cdot i}{m} \quad (1.1)$$

1. Einleitung

Ab dem ersten p -Wert, der diese Bedingung nicht erfüllt, gelten alle weiteren Änderungen als nicht signifikant. Da die genaue Anzahl der gemessenen Metabolite bei den Extrakten der Neutrophilen nicht genau feststeht, wird eine realistische Anzahl an Metaboliten angenommen und damit gerechnet.

1.9. Biologische Bedeutung

Die biologische Bedeutung von Unterschieden für verschiedene metabolische Zustände zu interpretieren ist komplex. Ein Spektrum stellt immer eine Momentaufnahme dar. Wenn z.B. in einem Zellextrakt eine erhöhte Metabolitkonzentration gemessen wird, kann dies sowohl eine erhöhte Aufnahme bzw. Synthese als auch einen verringerten Abbau bzw. einen verringerten Transport aus der Zelle bedeuten. Viele Metabolite sind zudem Teil von mehreren Stoffwechselwegen, sodass für eine klare Aussage, welcher Weg beeinflusst ist, oft weitere Daten notwendig sind. Eine Methode, bestimmte Ergebnisse weiter zu untersuchen, sind Fluxmessungen. So können z.B. die Ansäuerung des Mediums und der Sauerstoffverbrauch herangezogen werden (Voss et al. 2021). Diese extrazellulären Fluxanalysen des Transports von Lactat aus der Zelle und der oxidativen Phosphorylierung sind ein Maß für die Glycolyseaktivität bzw. für die Mitochondrienaktivität.

Auch mit isotopenmarkierten Metaboliten im Medium lässt sich weiter untersuchen, über welche Wege diese Moleküle im Stoffwechsel verwendet werden (Voss et al. 2021).

1.10. Zielsetzung der Arbeit

Wenn Neutrophile durch Defekte oder Fehlregulation gestört sind, kann es zu Autoimmunerkrankungen (Jorch und Kubes 2017) oder bis zur Sepsis (Shen et al. 2017) kommen. Neutrophile spielen bei blasenbildenden Autoimmunerkrankungen der Haut, insbesondere bei Epidermolysis bullosa acquisita (EBA), eine wichtige Rolle für den Schweregrad der Krankheiten (Chiriac et al. 2007).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die metabolischen Zustände und Veränderungen in humanen Neutrophilen bei der Aktivierung und bei Alterung und Apoptose zu untersuchen.

1. Einleitung

Diese Zustände stellen Start und Endpunkt einer Infektion dar und sind daher für eine immunometabolische Untersuchung von großem Interesse.

Für die aktivierten Neutrophilen wurden dabei zwei unterschiedliche Aktivierungsstimuli betrachtet: TNF (Tumornekrosefaktor- α) als körpereigenes Zytokin und LPS (Lipopolysaccharid) als bakterielles *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP). Zwei getrennte Stimuli wurden verwendet, um zu testen, ob die Neutrophilen zwischen körperfremden und körpereigenen Signalen unterscheiden können.

Die wasserlöslichen Metabolite von vier Gruppen (Kontrolle, TNF, LPS, Alterung/Apoptose) sollten extrahiert und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von ihnen aufgenommen werden. Dafür mussten zuerst die experimentellen Parameter optimiert werden. Die Metabolite wurden dann - unterstützt durch verschiedene experimentelle und statistische Verfahren - zugeordnet. Die Gruppen sollten statistisch auf ihre Unterschiede untersucht werden. Anschließend sollte sowohl für die veränderten als auch für die nicht beeinflussten Stoffwechselwege die biologische Bedeutung für die Funktion der neutrophilen Zellzustände analysiert und interpretiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Chemikalien

Tabelle 2.1.: Verwendete Chemikalien - es wurden jeweils die Substanzen mit der höchsten verfügbaren Reinheit verwendet.

Substanz	Hersteller
Adenosindiphosphat (ADP)	Boehringer
Adenosinmonophosphat (AMP)	Boehringer
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Buttersäureisopropylester, 99 %	Sigma-Aldrich
Chloroform, 99 % (stabilisiert mit Ethanol)	Merck
Chloroform-d, 99,96 %	Sigma-Aldrich
Deuteriumoxid, 99,9 %	Euriso-top
Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	Merck
Ethanol	Roth
Glucose-1-Phosphat	Sigma-Aldrich
Hypotaurin	Sigma-Aldrich
Methanol, 99,5 %	Merck
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, 98 %	Merck
Natriumhydroxid, >99 %	Baker
37 % Salzsäure	Merck, Roth
Stickstoffgas, 99,999 %	Air Liquide
3-(Trimethylsilyl)-1-propionsäure-2,2,3,3- d_4 Natriumsalz (TSP- d_4)	Sigma-Aldrich

2.2. Geräte

Tabelle 2.2.: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	55 MSV	SHP
Drehschieberpumpe	RD4	VacUUbrand
Druckpumpe	CA101	Alcatel
Kühlfalle	RVT400	Savant
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph
	IKA-MINI-MR	IKA [®]
	IKAMAG [®]	IKA [®]
Lyophilisator	Alpha 1-2 LDplus	Christ
NMR-Spektrometer	Bruker Avance DRX 500 mit TCI-Kryoprobenkopf	Bruker
	Bruker Avance III 600 mit TXI-Raumtemperaturprobenkopf	Bruker
pH-Meter	pH 330 mit Elektrode SenTix21	WTW
	pH 320 mit Elektrode SenTix21	WTW
Reinstwassersystem	AF100	Scotsman [®]
Sonotrode	Sonopuls HD 200	Bandelin
Ultraschallbad	Sonorex TK52 Transistor	Bandelin
Vakuumapparatur	MZ 2C	VacUUbrand
Vakuum-Konzentrator	SpeedVac [®] SPD111V	Savant
Vortex	Genius 3	IKA [®]
	K-550-GE	Bender & Hobein AG
	MS1 Minishaker	IKA [®]
Waagen	Mikrowaage MC 210 S	Sartorius
	PCB 1000-2	Kern
	PCB 3500-2	Kern
	BA BC 200	Kern

2. Materialien und Methoden

Tabelle 2.2.: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D	Eppendorf
	Heraeus Pico 17	Thermo
	Sorvall RC 5B Plus GS-3 und SA-600	Du Pont
	Universal 320 R	Hettich

Für das Pipettieren von wässrigen Lösungen wurden die im Labor vorhandenen mechanischen Luftpolsterpipetten (10 μ l, bis 1000 μ l Volumen von Eppendorf) verwendet. Organische Lösemittel wurden mit gasdichten Hamilton Spritzen (1 ml Volumen) transferiert.

Tabelle 2.3.: Verwendete Materialien

Material	Hersteller
3 mm NMR Röhrchen	hilgenberg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf

2.3. Metabolomics an Neutrophilen

Für die Untersuchung der metabolischen Veränderungen von Neutrophilen durch Aktivierung und Apoptose wurde ein Studiendesign gewählt, bei dem Neutrophile aus dem Blut gesunder Probanden isoliert und in vier Gruppen aufgeteilt wurden (Abbildung 2.1). Eine Gruppe unbehandelter Neutrophiler diente als Kontrolle für die weiteren Gruppen. Um die Fragestellung zu untersuchen, ob Neutrophile zwischen körpereigener und körperfremder Aktivierung unterscheiden kann, wurde eine Gruppe mit TNF und eine mit bakteriellem LPS aktiviert. In der vierten Gruppe wurde Apoptose induziert.

2. Materialien und Methoden

2.3.1. Probengewinnung der Neutrophilen

Die Blutentnahme, die Isolierung der Neutrophilen und die Stimulierung der Zellen wurde von Natallia Salei (Institut für Infektiologie und Mikrobiologie am UKSH Lübeck) durchgeführt. Nähere Details zur Probenvorbereitung sind publiziert (Richer, Salei et al. 2018). Zusammengefasst wurde Blut von gesunden Probandinnen zwischen 22 und 63 Jahren entnommen und die Neutrophilen isoliert. Die Reinheit der Zellen betrug über 99,9%. Die resuspendierten Neutrophilen wurden für die metabolische Untersuchung in vier Gruppen aufgeteilt. Drei Gruppen wurden für jeweils 30 Minuten bei 37 °C entweder ohne Zusätze kultiviert (Kontrollgruppe) oder mit 100 ng/ml TNF oder 100 ng/ml LPS stimuliert. Die 30 Minuten wurden gewählt, weil mit TNF aktivierte Neutrophile nach 30 Minuten ein Produktionsmaximum an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) haben. Außerdem sind 30 Minuten auch eine in der Literatur beschriebene Zeit für die Behandlung mit LPS (Böhmer, Trinkle und Staneck 1992; Soler-Rodriguez et al. 2000). Die vierte Gruppe wurde bei 37 °C für 30 Stunden inkubiert, um Apoptose zu induzieren. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde am Durchflusszytometer überprüft. Von jeder Gruppe wurden anschließend 20 Millionen Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bei –80 °C bis zur Extraktion eingefroren. An dieser Stelle habe ich die Proben erhalten und ins Institut für Chemie und Metabolomics überführt.

2.3.2. Extraktion der Metabolite

Die Zellpellets wurden bis zur Verwendung bei –80 °C in 15 ml Röhrchen gelagert. Die Metabolitextraktion erfolgte bei 4 °C. Zunächst wurden 900 µl einer frisch zubereiteten, kalten Methanol:Chloroform Lösung (1 Volumen Methanol, 2 Volumina Chloroform) zu einem Pellet gegeben. Die Probe wurde im Anschluss für etwa 5 Minuten mit einem Vortex gemischt, bis das Zellpellet gelöst war. Danach wurden die Zellen dreimal für 30 Sekunden mit 90 % der maximalen Leistung an Ultraschall beschallt. Im Anschluss wurden 900 µl mit Chloroform gesättigtes Wasser zu dem Lysat gegeben, gemischt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde zentrifugiert (20 min, 16000 g, 4 °C), sodass sich die einzelnen Phasen trennten. In der Chloroform-Phase befanden

2. Materialien und Methoden

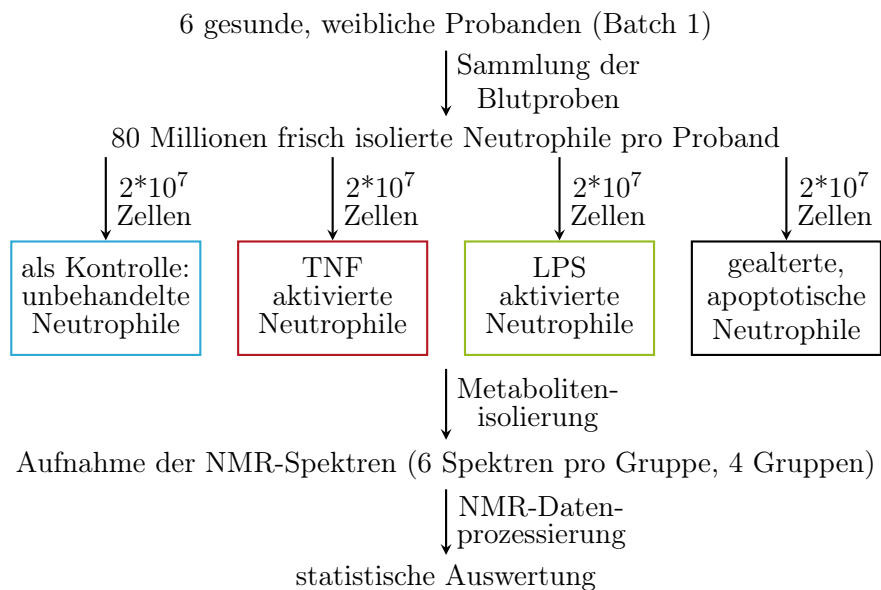


Abbildung 2.1.: Experimenteller Ansatz zur Untersuchung der metabolischen Veränderungen in Neutrophilen durch Aktivierung und Alterung. In einem ersten Durchgang wurden Neutrophile aus dem Blut von 6 Spenderinnen isoliert. Es wurden 80 Millionen Zellen pro Person verwendet, die für die weitere Analyse in vier Gruppen zu jeweils 20 Millionen Zellen aufgeteilt wurden. Die Metabolite wurden mit Chloroform und Methanol extrahiert. Nach Aufnahme von 1D Protonen-NMR-Spektren wurden die Daten statistisch ausgewertet. Das Experiment wurde unabhängig davon mit 6 weiteren Spenderinnen (Batch 2) wiederholt.

sich die Lipide, darüber entstand eine Grenzschicht, in der sich Proteine, DNA, RNA und Zelltrümmer ansammelten. Oben befanden sich die wasserlöslichen Metabolite in der Wasser/Methanol-Phase. Von den rechnerisch 1200 μl der oberen Phase wurden nur 1000 μl für die Messung abgenommen, um eine Kontamination mit Bestandteilen der Grenzschicht zu vermeiden. Die wässrige Phase wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und die Flüssigkeit mit einer SpeedVac verdampft. Von den rechnerisch 600 μl der unteren Phase wurden vorsichtig 500 μl abgenommen und ebenfalls in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Das Chloroform der Lipidphase wurde im Stickstoffstrom vorsichtig entfernt. Die Proben wurden bis zur Messung bei -80°C gelagert. Schematische Darstellung der Extraktion siehe Abbildung 2.2.

2. Materialien und Methoden

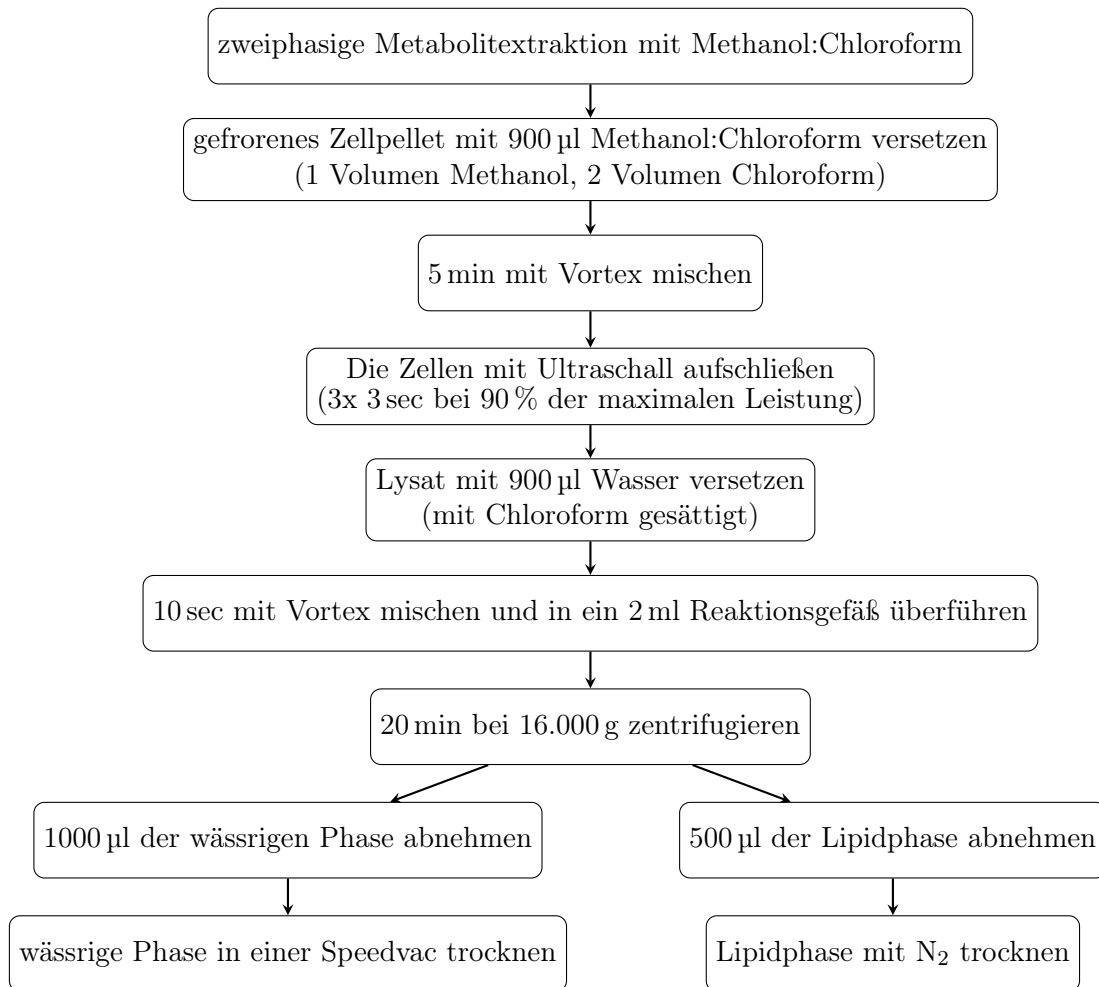


Abbildung 2.2.: Ablauf der zweiphasigen Metabolitextraktion von Neutrophilen (Lee et al. 2009). Bis einschließlich zur Zentrifugation wurden alle Schritte bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Nach der Trocknung wurden die Proben bei –80 °C gelagert.

2.4. NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Spektren für die Messung der metabolischen Profile wurden an einem Bruker Avance DRX 500 Spektrometer mit Cryoprobekopf in 3 mm-NMR-Röhrchen mit 100 % v/v D₂O als lock-Substanz aufgenommen. Die Spektren wurden bei 298 K gemessen und mit der Software TopSpin (Version 3.1 aufwärts) prozessiert und ausgewertet. Die weitere Auswertung erfolgte mit Matlab (Version 2015b aufwärts). NMR-Experimente für bestimmte Fragestellungen wurden an einem Bruker Avance III 600 MHz Spektrometer durchgeführt.

2. Materialien und Methoden

Tabelle 2.4.: Verwendeter Puffer für Messungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH	Verwendung
NMR-Puffer D ₂ O	100 mM Natriumphosphatpuffer 3x lyophilisiert, aufgenommen in 100 % v/v D ₂ O 0,1 mM TSP- <i>d</i> ₄	7,4	NMR-Spektroskopie der Neutrophilen, Vergleichsspekren und <i>spiking</i>

Es wurde für den Puffer 10 ml einer 10 mM Lösung von TSP-*d*₄ in D₂O hergestellt. Der pH* wurde auf etwa 7 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend bei -20 °C gelagert. Für den NMR-Puffer in D₂O wurden zuerst Dinatriumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat (100 ml, Gesamtkonzentration 100 mM) entsprechend der Henderson-Hasselbalch-Gleichung für einen pH von 7,4 eingewogen und in H₂O aufgenommen. Der pH wurde dann mit möglichst wenig HCl/NaOH auf 7,4 eingestellt und die Temperatur vermerkt. Der Puffer wurde zu genau 25 ml auf 50 ml Röhrrchen verteilt, eingefroren und gefriergetrocknet. Der Feststoff wurde in 5-10 ml D₂O resuspendiert, wieder eingefroren und erneut gefriergetrocknet. Nach der dritten Gefrier Trocknung wurden die Röhrrchen mit dem trockenen Puffer bei -20 °C gelagert. Vor der Verwendung wurde der Phosphatpuffer auf fast 25 ml mit D₂O aufgefüllt und ein Protonen-NMR-Spektrum zur Qualitätskontrolle gemessen. Dann wurde der Puffer mit 250 µl der 10 mM TSP-*d*₄ für eine finale Konzentration von 0,1 mM TSP-*d*₄ versetzt und ebenfalls ein Protonen-NMR-Spektrum aufgenommen. Der Puffer wurde anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Nutzung bei -20 °C gelagert. Abgesehen von einem Restwassersignal und TSP-*d*₄ zeigten die Spektren zur Qualitätskontrolle keine weiteren Signale.

2.4.1. Vergleich verschiedener Pulssequenzen

Für Metabolomics Messungen werden ¹H-Experimente verwendet. Es wurden drei verschiedene Pulssequenzen - noesypr1d, zgesgp und cpmgpr1d (Pulsprogramme im Anhang A.1.3, A.1.6 und A.1.1) - getestet, die unterschiedliche Vor- und Nachteile haben.

2. Materialien und Methoden

Um die Proben in praktikabler Zeit zu messen (begrenzte Messzeit, Probenstabilität), sollte für die späteren Probenmessungen nur eine Pulssequenz verwendet werden. Aspekte, nach denen das am besten geeignete Experiment gewählt werden sollte, waren die Wasserunterdrückung, gegebenenfalls die Unterdrückung der Signale von Makromolekülen, die Quantifizierbarkeit und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Die ursprüngliche Optimierung der Pulssequenzen wurde in Vorexperimenten an anderen Proben durchgeführt. Exemplarisch soll an einem Neutrophilenextrakt (Probe 2a) gezeigt werden, dass das `noesypr1d` die Pulssequenz der Wahl darstellt. Diese Messungen wurden an einem 600 MHz Spektrometer mit Raumtemperaturprobenkopf (also ohne Cryokopf) durchgeführt. Dementsprechend hat dieses Spektrometer eine deutlich schlechtere Sensitivität, weswegen die Vergleichsexperimente mit 2048 *scans* aufgenommen wurden.

Der 90° Protonenpuls wurde experimentell bestimmt. Um möglichst vergleichbare Spektren zu generieren, wurden alle drei Spektren mit 32k Datenpunkten und 4 *dummy scans* vorweg bei einer spektralen Weite von 12 ppm aufgenommen. Die Acquisitionszeit betrug jeweils 2,27 s. Der O1 wurde bei der Pulsbestimmung aus der Mitte des Wassersignals ermittelt. Die Wartezeit des 1D-NOESYs betrug 2 s und die Mischzeit 10 ms. Der Spin-Echo-Block ($\tau - 180^\circ - \tau$) des CPMGs wurde 4 Mal wiederholt mit $\tau = 1$ ms und einer gesamten Echozeit von 8 ms. Die Wartezeit betrug 2 s. Für das *Excitation Sculpting* Experiment wurde als selektiver Puls auf das Wassersignal `sincl.1000` verwendet. Die beiden Gradientenpaare hatten eine Stärke von 50 % und -10 %. Der *receiver gain* wurde für alle drei Pulssequenzen auf 724 gesetzt.

2.4.2. NMR-Spektroskopie an wässrigen Extrakten von Neutrophilen in D₂O

Die getrockneten Metabolite der wässrigen Phase aus der Chloroform-Methanol Extraktion wurden in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, 0,1 mM TSP-*d*₄ in D₂O pH 7,4 aufgenommen. Die Pulssequenz `noesygprr1d` wurde getestet, zeigte aber keine Vorteile gegenüber der Sequenz ohne Gradienten. Daher wurde nur die Pulssequenz `noesypr1d`

2. Materialien und Methoden

verwendet. Die Extraktionen aus jeweils 20 Millionen Neutrophilen wurden mit einer Vorsättigung während der initialen Wartezeit von 3 Sekunden, einer Mischzeit (D8) von 100 ms, 512 *scans* und einer Acquisitionszeit von 3,5 Sekunden (42k Datenpunkte im FID) gemessen. Der 90° Protonenpuls betrug zwischen 9,2 und 9,5 μs , der O1 wurde aus der Mitte des Spektrums der Pulsbestimmung bestimmt. Die spektrale Weite betrug 12 ppm. Der *receiver gain* wurde auf 912 gesetzt.

2.4.3. NMR-Spektroskopie an unpolaren Extrakten von Neutrophilen in CDCl_3

Die isolierten Metabolite der Lipidphase wurden testweise in CDCl_3 aufgenommen. Die ^1H Pulssequenz *zg* wurde mit 256 *scans* und einer Acquisitionszeit von 2,0 Sekunden (32k Datenpunkte im FID) gemessen. Für das zweidimensionale ^1H - ^1H TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*, Pulssequenz *mlevph*) wurden bei 16 *scans* 2048 Datenpunkte in der direkten und 256 Datenpunkte in der indirekten Dimension aufgenommen. Die TOCSY Mischzeit (D9) betrug 0,12 Sekunden. Ein ^{13}C -Spektrum wurde mit der Pulssequenz *zggd30* aufgenommen. Dabei wurden mit 512 *scans* und einer Acquisitionszeit von 1,1 Sekunden (Datenpunkte im FID = 65k) gemessen. Ein ^1H - ^{13}C HSQC wurde mit der Pulssequenz *hsqcetgp* gemessen. Dabei werden die Bindungen von ^1H zu ^{13}C Atomen sichtbar. Bei 64 *scans* wurden 2048 Datenpunkte in der direkten und 512 Datenpunkte in der indirekten Dimension aufgenommen.

2.4.4. Zuordnung: Reinsubstanzen, *spiking* und STOCSY

Viele Signale im ^1H -NMR Spektrum können direkt durch einen Vergleich mit Referenzspektren zugeordnet werden, die unter möglichst gleichen Bedingungen aufgenommen wurden. Von den Reinsubstanzen wurden Lösungen mit einer Konzentration von 20 mM in 0,1 M Natriumphosphatpuffer bei pH 7 mit 0,1 mM TSP- d_4 und 0,02 % Natriumazid in D_2O angesetzt. Diese wurden in 3 mm Röhrchen bei 298 K als *zgesgp* und als *noesypr1d* mit je 16 *scans* gemessen.

2. Materialien und Methoden

Wenn von einem Metabolit kein Referenzspektrum am eigenen Gerät vorliegt, können Spektren aus einer externen Datenbank sehr hilfreich sein. Insbesondere die humane Metabolomdatenbank (hmdb) verfügt über viele Spektren und ermöglicht eine Suche ausgehend von chemischen Verschiebungen (Wishart, Tzur et al. 2007). Durch mögliche Abweichungen in pH, Temperatur, Konzentration und Feldstärke bei externen Spektren, ist die Zuordnung dabei schwieriger als mit eigenen Referenzspektren.

Wenn man eine vorläufige Zuordnung der möglichen Metabolite in einer Probe erreicht hat, kann man diese Zuordnung mittels *spiking* überprüfen. Dabei wird eine kleine Menge eines möglichen Metabolits zur vorher bereits gemessenen Probe zugegeben und vermischt. Anschließend wird die Probe erneut gemessen. Wenn ein Signal im Spektrum durch das *spiking* größer wird, kann eine Zuordnung bestätigt werden. Wenn ein komplett neues Signal entsteht, ist die Zuordnung widerlegt (vgl. Abbildung 1.11). Hier wurden 0,4 bis 0,7 μl der Reinsubstanzlösungen (20 mM) benutzt, damit der Einfluss der Zugabe (Volumen, Pufferstärke, pH) möglichst klein blieb, da sich die beiden Puffer geringfügig unterschieden. Die finale Konzentration eines Metabolits in der Probe nahm dadurch um 0,05 mM bis 0,067 mM zu.

Eine rein statistische Art, die Zuordnung zu überprüfen oder zu verbessern, ist das STOCSY (*Statistical Total Correlation Spectroscopy*). Dafür wurden möglichst viele Spektren gleichzeitig mit der Matlab Funktion STOCSY.p der Nicholson Gruppe analysiert. Ausgehend von einer gewählten chemischen Verschiebung wird die Korrelation und Kovarianz des restlichen Spektrums berechnet. Signale mit maximaler Korrelation (Korrelationskoeffizient über 0,9) gehören in der Regel zum selben Molekül wie das Ausgangssignal (vgl. Abbildung 1.12).

2.4.5. Zuordnung: *Pure Shift* Experimente

In ^1H -NMR Spektren kommt es insbesondere im Bereich von 3,5 bis 4,5 ppm zur Überlagerung sehr vieler Signale. Eine Möglichkeit, diese Signale zu trennen und damit die Zuordnung zu verbessern, sind breitbandentkoppelte sogenannte *Pure Shift* Spektren. Diese Spektren beinhalten nur noch die chemische Verschiebung ohne die Kopplung.

2. Materialien und Methoden

Für die Zangger-Sterk Breitband-Entkopplung wurde das Pulsprogramm `zgadc2` (Anhang A.1.5) verwendet. Für die Optimierung der Messparameter wurde eine konzentrierte Probe mit stark aufgespaltenen Signalen benötigt. Für die Messungen wurde eine Probe Buttersäureisopropylester in deuteriertem Chloroform angesetzt. Dieses Molekül verfügt im normalen ^1H -NMR Spektrum über 5 gut isolierte Signale mit verschiedener Multiplizität. Mit dieser Probe wurden der Gradient (1 bis 4 %) während des selektiven Pulses (10 ms) und die Relaxationswartezeit (D1) (1 bis 20 Sekunden) variiert. Nachdem die Messbedingungen mit der Testprobe ausgiebig getestet und verglichen worden waren, wurde ein Zellextrakt einer Probe Neutrophiler (Probe 12a) mit 4096 *scans*, 1 % Gradientenstärke (entspricht 0,5 G/cm) und 1 sec D1 gemessen.

Für die PSYCHE Entkopplung wurde die Pulssequenz `reset__psyche__1d` (Anhang A.1.4) verwendet. Für die Optimierung der Acquisitionsparameter wurde ebenfalls die Probe Buttersäureisopropylester in deuteriertem Chloroform gemessen. Als Winkel für die Chirp Pulse β wurden die empfohlenen 20° verwendet. Die Sensitivität, aber auch die Artefakte, nehmen mit β zu. Die Anzahl komplexer Datenpunkte für die Spektrenrekonstruktion (L31) wurde optimiert. Final wurde mit einem L31 von 8, 8 *scans*, 1024 Datenpunkten in der direkten und 256 Datenpunkten in der indirekten Dimension gemessen. Mit den optimierten Parametern wurde ein Zellextrakt von Fibroblasten gemessen.

Das pseudo-zweidimensionale *J*-res (*J-resolved*) wurde mit der Pulssequenz `jresgppprqf` (Anhang A.1.2) aufgenommen. Bei diesem 2D Experiment erzeugt eine 1D-Projektion entlang der x-Achse auch ein *Pure Shift* Spektrum. Nach einer Parameteroptimierung wurde mit 30 *scans* und 8192 Datenpunkten in der direkten und 128 Datenpunkten in der indirekten Dimension gemessen.

2.5. Statistische Auswertung der Metabolomics-Daten

2.5.1. Prozessierung der NMR-Spektren

Die Spektren wurden mit TopSpin 3.1 oder höher manuell phasen- und basislinienkorrigiert. Die Referenzierung erfolgte auf TSP- d_4 . Es wurde ein zweifaches *Zero-filling* eingesetzt.

2. Materialien und Methoden

Wo Konzentrationen einzelner Signale von Interesse waren, konnten diese über das Integral von TSP- d_4 abgeschätzt werden. Dieses umfasst 3 Methylgruppen, also 9 Protonen. Für die Berechnung der Konzentration pro Zelle musste dann noch das Probenvolumen im Röhrchen (180 μ l), die Zellzahl ($2 \cdot 10^7$) sowie das durchschnittliche Zellvolumen von Neutrophilen (450 fl) (T. R. Green et al. 1991) eingerechnet werden.

Die weitere Prozessierung der Spektren der Neutrophilenextrakte erfolgte mit Matlab (Version 2015b aufwärts) Programmen vom Imperial International Phenome Training Center am Imperial College London (Ebbels, Nicholson). Diese beinhalteten eine erneute Basislinienkorrektur und Referenzierung auf das Hauptsignal von TSP- d_4 . Die Phasenkorrektur wurde ausgelassen, da sie das Restwassersignal nicht toleriert. Anschließend wurden die Regionen von TSP, DMSO, Wasser und Chloroform sowie - nach einer ersten Auswertung - Ethanol und Methanol aus den Spektren entfernt. Weiterhin wurden die Spektren mit den Skripten der Nicholson Gruppe auf ein Medianspektrum normalisiert und horizontal angeglichen. Auf *buckets* wurde zugunsten von *pointbinning* verzichtet.

2.5.2. Statistische Analyse der NMR-Spektren mittels

Hauptkomponentenanalyse

Um Unterschiede in den metabolischen Profilen zwischen den aktivierten und gealterten, apoptotischen sowie den Kontroll-Neutrophilen zu finden, wurde die Hauptkomponentenanalyse (englisch *Principal Component Analysis*, PCA) durchgeführt. Dabei werden die Spektren nach der Varianz der einzelnen Datenpunkte in ein neues Koordinatensystem übertragen und dort anhand neuer Achsen, genannt Hauptkomponenten, dargestellt. Es handelt sich um ein unüberwachtes statistisches Verfahren, das heißt erwartete Gruppierungen werden nicht mit in die Berechnung einbezogen. Die PCAs wurden mit Matlab mit den Funktionen `pca` und `Nipals` durchgeführt. Zur Visualisierung wurden *score plots* und *loading plots* erstellt. Um Unterschiede oder keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu zeigen, wurde in den *score plots* die doppelte Standardabweichung einer Gruppe als Ellipse dargestellt. Für viele dieser Anwendungen wurden kleine Matlabprogramme geschrieben, um die Auswertung zu erleichtern und zu beschleunigen.

2.5.3. Integrale und p -Werte

In den zugeordneten, horizontal angeglichenen Spektren wurden geeignete Grenzen für das Integrieren der isolierten Metabolitsignale ausgewählt. Die Integration erfolgte mit Matlab über die Trapezfunktion `trapz`.

Ausgehend von diesen Integralen wurden p -Werte für die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen über eine einfache Varianzanalyse (`anova1 + multcompare`) durchgeführt. Zusätzlich wurde berechnet, um welchen Faktor eine Konzentration zu oder abgenommen hatte, sowie in welchem Konfidenzintervall sich die Unterschiede bewegen.

Um falsch-positive Ergebnisse durch multiples Testen zu verhindern, wurde eine Kontrolle der *false discovery rate* (FDR) durchgeführt (Benjamini und Hochberg 1995). Dabei werden die p -Werte nach zunehmender Größe sortiert. Ausgehend von einem grundsätzlichen α von 5% gilt der i . p -Wert nur dann als signifikant, wenn er kleiner ist als i mal α geteilt durch die Anzahl der Metabolite. Ab dem ersten p -Wert, der dies nicht erfüllt, gelten alle weiteren Veränderungen als nicht signifikant. Da die genaue Anzahl der Metabolite in einem Spektrum - aufgrund von nicht zugeordneten Signalen und Signalen mit einem zu niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis - nicht feststeht, wurde die FDR-Korrektur mit 50, 100 und 200 als Metabolitanzahl durchgeführt und jeweils vermerkt, nach welcher Grenze eine Änderung der Metabolitkonzentration noch als signifikant gilt.

3. Ergebnisse

Neutrophile spielen bei Entzündungen eine wichtige Rolle und bei einer Fehlregulation kann es zu Autoimmunerkrankungen (Jorch und Kubes 2017) oder zu einer Sepsis (Shen et al. 2017) kommen. Um die Prozesse bei den für die Entzündungen wichtigen Zellzuständen besser zu verstehen, wurden aktivierte und gealterte Neutrophile hinsichtlich ihrer metabolischen Veränderungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe charakterisiert.

3.1. Methodenetablierung und Zuordnung mit Reinsubstanzspektren

Für Metabolomicsuntersuchungen müssen zuerst diverse Parameter in der Probenvorbereitung und Messung standardisiert werden. Für NMR-Metabolomics an Zellextrakten müssen insbesondere die Extraktionsmethode, die NMR-Experimente und die notwendige Zellzahl getestet werden.

Extrahiert wurde mit Chloroform/Methanol, weil diese Methode in der Literatur als eine geeignete Methode für Zellextrakte beschrieben wird (Tyagi et al. 1996; Lee et al. 2009) und in der Arbeitsgruppe bereits etabliert war (Gey und Seeger 2013; Windler, Gey und Seeger 2017).

3.1.1. Test der Extraktion und Vergleich der NMR-Experimente

Für die Aufnahme von NMR-Experimenten wurden drei gängige ^1H -Pulssequenzen mit Wasserunterdrückung verglichen. Die Experimente wurden in Vorexperimenten an Serumproben getestet. Dass diese Ergebnisse auf Zellextrakte übertragbar sind, wurde

3. Ergebnisse

exemplarisch an einem Neutrophilenextrakt gezeigt. Die Auflösung der Signale ist deutlich schlechter, weil die Messung an einem 600 MHz Spektrometer mit Raumtemperatur statt an einem 500 MHz Spektrometer mit Cryoprobekopf durchgeführt wurde. Die Güte der Wasserunterdrückung, die Abwesenheit von Makromolekülen und die Signalintensitäten lassen sich aber trotzdem gut beobachten (Abbildung 3.1). Wie erwartet erfolgt die beste - sogar vollständige - Wasserunterdrückung mit der Methode *Excitation Sculpting*. Der Nachteil dieser Methode liegt aber darin, dass auch die Signale rechts und links neben dem Wassersignal ($4,8 \pm 1$ ppm) zum Teil deutlich an Intensität verlieren. Die CPMG-Methode und die 1D-NOESY-Methode nutzen zur Wasserunterdrückung die Vorsättigung des Wassers. Beide Spektren weisen ein deutliches, aber relativ schmales Restwassersignal auf, welches sich nicht phasenrein darstellen lässt. Ein Nachteil der Vorsättigung liegt darin, dass austauschbare Protonen (z.B. NH-Protonen) mit gesättigt und damit unterdrückt werden. Dadurch, dass die Extrakte in einem D₂O-Puffer gemessen wurden, sind die austauschbaren Protonen deuteriert und daher unabhängig von der Pulssequenz nicht messbar. Ein möglicher Nachteil der Vorsättigung tritt auf, wenn ein Molekül ein Signal an der gleichen Frequenz wie Wasser hat. Dieses Molekül wird dann mit gesättigt und alle weiteren Signale des Moleküls werden ebenfalls beeinflusst und verlieren an Intensität. Im Spektrum mit *Excitation Sculpting* gibt es keine auffälligen Signale, die in den beiden anderen Spektren fehlen, sodass keine Moleküle mit gesättigt wurden. Das CPMG ist im gesamten spektralen Bereich nahezu deckungsgleich mit dem 1D-NOESY. Auch die Linienbreiten sind sehr ähnlich.

Die Extraktion mit Chloroform und Methanol erzielte also zufriedenstellende Ergebnisse. Der Verlauf der Basislinie und insbesondere der aromatische Spektrumbereich (vgl. Abbildung 3.2) zeigt, dass die wasserlöslichen Metabolite gut von den Makromolekülen getrennt wurden. Dies wird durch den Vergleich des CPMGs mit dem 1D-NOESY bestätigt.

3. Ergebnisse

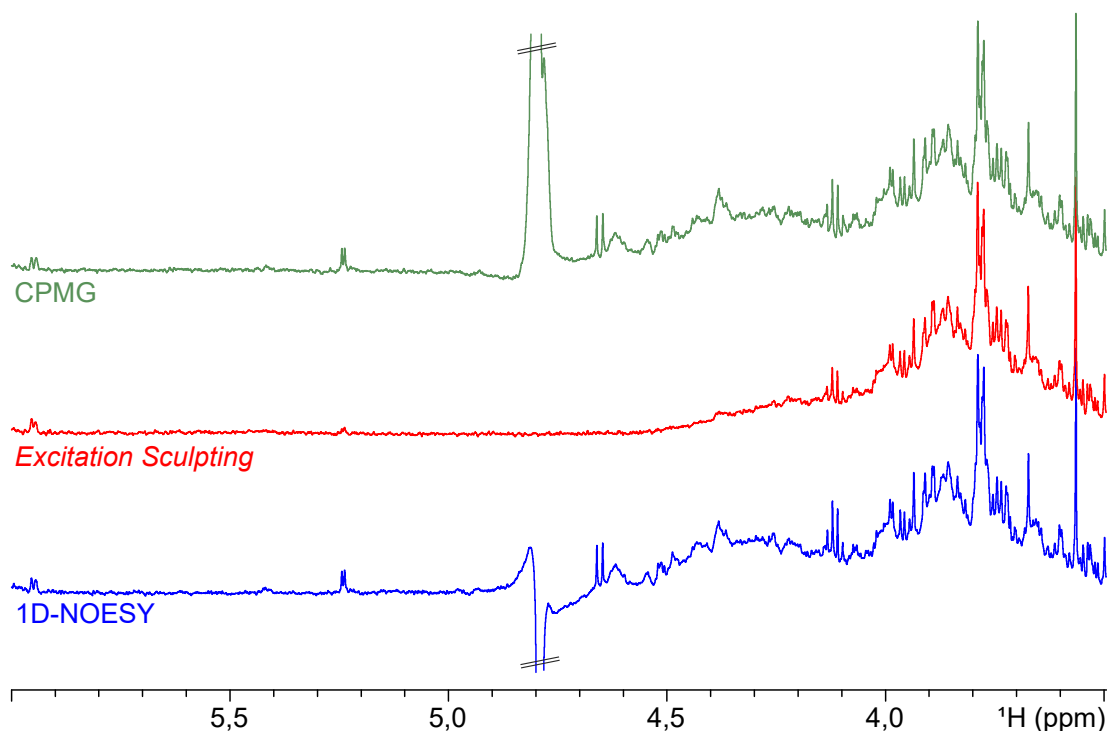


Abbildung 3.1.: Vergleich der Protonenspektren verschiedener Pulssequenzen für die Anwendung an Extrakten von Neutrophilen. Die Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer mit Raumtemperaturprobenkopf aufgenommen. In der Vergrößerung des Restwassersignals bei 4,8 ppm zeigt sich, dass das Spektrum, welches das Wasser mit *Excitation Sculpting* unterdrückt, die beste Wasserunterdrückung aufweist (rot). Diese Methode hat dabei den großen Nachteil, dass Signale in direkter Nähe der Frequenz des Wassers (± 1 ppm) an Intensität verlieren (rechts und links zu sehen). Signale in diesem Bereich können dann nicht integriert werden. Die beiden Methoden mit Wasserunterdrückung durch selektive Vorsättigung - die CPMG-Methode (grün) und 1D-NOESY (blau) - haben ein deutliches Restwassersignal, obwohl die Spektren jeweils in D_2O gemessen wurden, und gewisse Basislinienprobleme neben dem Wassersignal. Das 1D-NOESY und das CPMG Spektrum weisen im gesamten spektralen Bereich keine deutlichen Unterschiede auf. Das zeigt, dass die Extraktion erfolgreich war und die Makromoleküle entfernt wurden (vgl. Abbildung 1.6). Alle drei Spektren sind mit der gleichen Probe gemessen und auf das Integral des TSP-Signals skaliert. Die Linienbreiten sind vergleichbar.

3.1.2. Festlegung der Zellzahl

Für die Festlegung der Zellzahl für die metabolische Untersuchung von Neutrophilen wurden die wasserlöslichen Metabolite aus 70 Millionen Zellen und 20 Millionen Zellen mit einer Chloroform/Methanol-Extraktion isoliert und mit jeweils den gleichen

3. Ergebnisse

Einstellungen als 1D-NOESY gemessen (Spektrum von 20 Millionen Neutrophilen in Abbildung 3.2). Die Spektren beider Proben zeigen deutliche, vom Rauschen getrennte Signale. Bei 20 Millionen Zellen sind einige wenig intensive Signale unter dem Detektionslimit und konnten nicht mehr vom Rauschen getrennt werden. Die meisten übrigen Signale waren in beiden Proben gut aufgelöst.

3.1.3. Zuordnung mit Reinsubstanzspektren

Die Zuordnung der Signale erfolgte überwiegend durch Vergleich mit Spektren von Reinsubstanzen. Bei den Signalen mit gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis handelt es sich größtenteils um Aminosäuren und Nukleotide. Desweiteren wurden Formiat, Creatin, Lactat und Acetat nachgewiesen. Das mit Abstand intensivste Signal konnte der Aminosulfonsäure Taurin zugeordnet werden. Die meisten Signale heben sich bei beiden Zellzahlen vom Rauschen ab. Der einzige Metabolit mit gut isolierten Signalen, der nur bei 70 Millionen Zellen nachweisbar ist, bei 20 Millionen Zellen aber nicht mehr vom Rauschen getrennt werden kann, ist NADP^+ (Abbildung 3.3).

Das Spektrum der Lipidphase zeichnete sich durch große Bereiche der Lösemittelsignale, sehr variable Linienbreite und nur relativ wenige Signale aus (Abbildung 3.2). Wegen der variablen Spektrenqualität und begrenzten Messzeit wurde daher nur mit der wässrigen Phase weitergearbeitet.

Aufgrund der Testmessungen und der Menge an Neutrophilen, die pro Probandin gut isoliert werden können, erwiesen sich 20 Millionen Neutrophile je Probe als eine ausreichend gute Zellzahl für zufriedenstellende Spektren. So war es möglich 80 Millionen Neutrophile, die je Probandin isoliert werden konnten, in vier Testgruppen aufzuteilen. Die vier gewählten Gruppen waren eine Kontrollgruppe ohne Stimulation, eine Gruppe, in der die Neutrophilen mit LPS stimuliert wurden, eine Gruppe, in der die Neutrophilen mit TNF stimuliert wurden, sowie eine Gruppe, in der Apoptose induziert wurde.

3. Ergebnisse

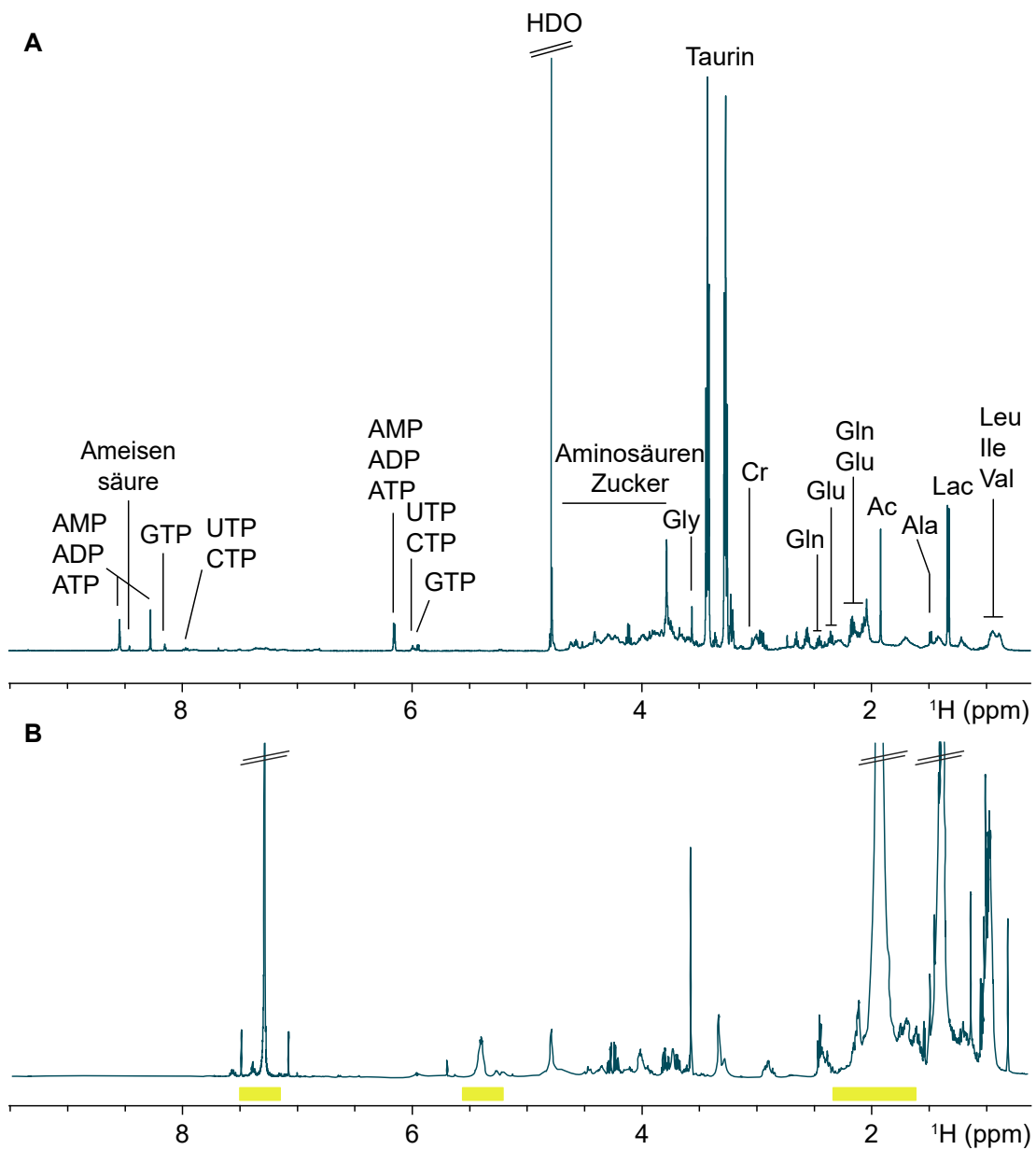


Abbildung 3.2.: (A) 500 MHz 1D-NOESY ^1H -Spektrum der wässrigen Phase einer mit Chloroform/Methanol extrahierten Probe aus 20 Millionen humanen Neutrophilen in D_2O . Aminosäuren und Nukleotide sind mit ihrem Dreibuchstabencode gekennzeichnet. Cr=Creatin, Ac=Acetat, Lac=Lactat. (B) 500 MHz ^1H -Spektrum der Lipidphase der Extraktion. Nicht auswertbare Lösemittelbereiche sind markiert. Im restlichen spektralen Bereich gibt es nur wenige Signale.

3. Ergebnisse

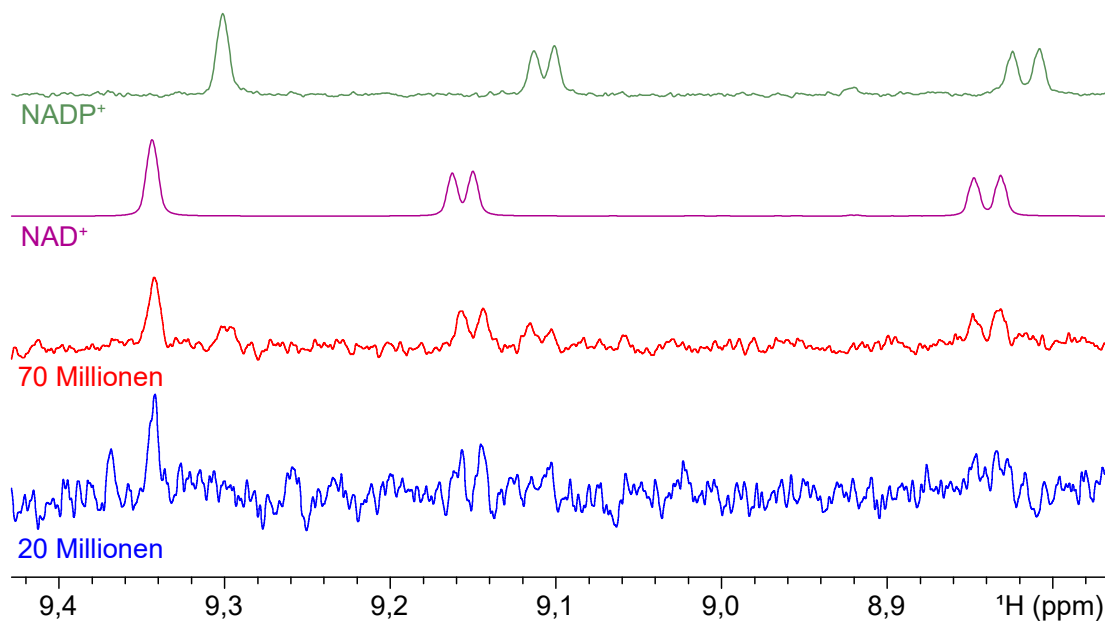


Abbildung 3.3.: 500 MHz 1D-NOESY ¹H-Spektrum der wässrigen Phase einer mit Chloroform/Methanol extrahierten Probe aus 20 Millionen (blau) und 70 Millionen (rot) humanen Neutrophilen in D₂O. Mit den Reinsubstanzspektren von NADP⁺ (grün) und NAD⁺ (violett) zeigt sich, dass NADP⁺ bei 20 Millionen Zellen unter dem Detektionslimit liegt und nicht mehr vom Rauschen getrennt werden kann.

3.2. Messung Batch 1 und erweiterte

Zuordnungsexperimente

Nachdem in den Vorversuchen eine Zellzahl von 20 Millionen je Testgruppe festgelegt wurde, wurden zunächst von 6 Probandinnen je 80 Millionen Neutrophile isoliert und auf die vier Gruppen aufgeteilt: Kontrollgruppe, Stimulation von Neutrophilen mit LPS, Stimulation von Neutrophilen mit TNF und gealterte Neutrophile (Apoptose). Insgesamt lagen so 24 Proben vor, von denen nach einer Chloroform/Methanol-Extraktion jeweils die wasserlöslichen Metabolite gemessen wurden.

Die prozessierten Spektren zeigten in der ersten Hauptkomponente einer PCA drei sehr deutliche Ausreißer (Abbildung 3.4). Diese Proben stammen von drei verschiedenen Probandinnen und drei verschiedenen Gruppen. Bei genauerer Betrachtung der Daten konnte festgestellt werden, dass diese drei Proben am selben Tag extrahiert wurden. Da in diesen Spektren unter anderem noch deutliche Signale der Lösemittel der Extraktion

3. Ergebnisse

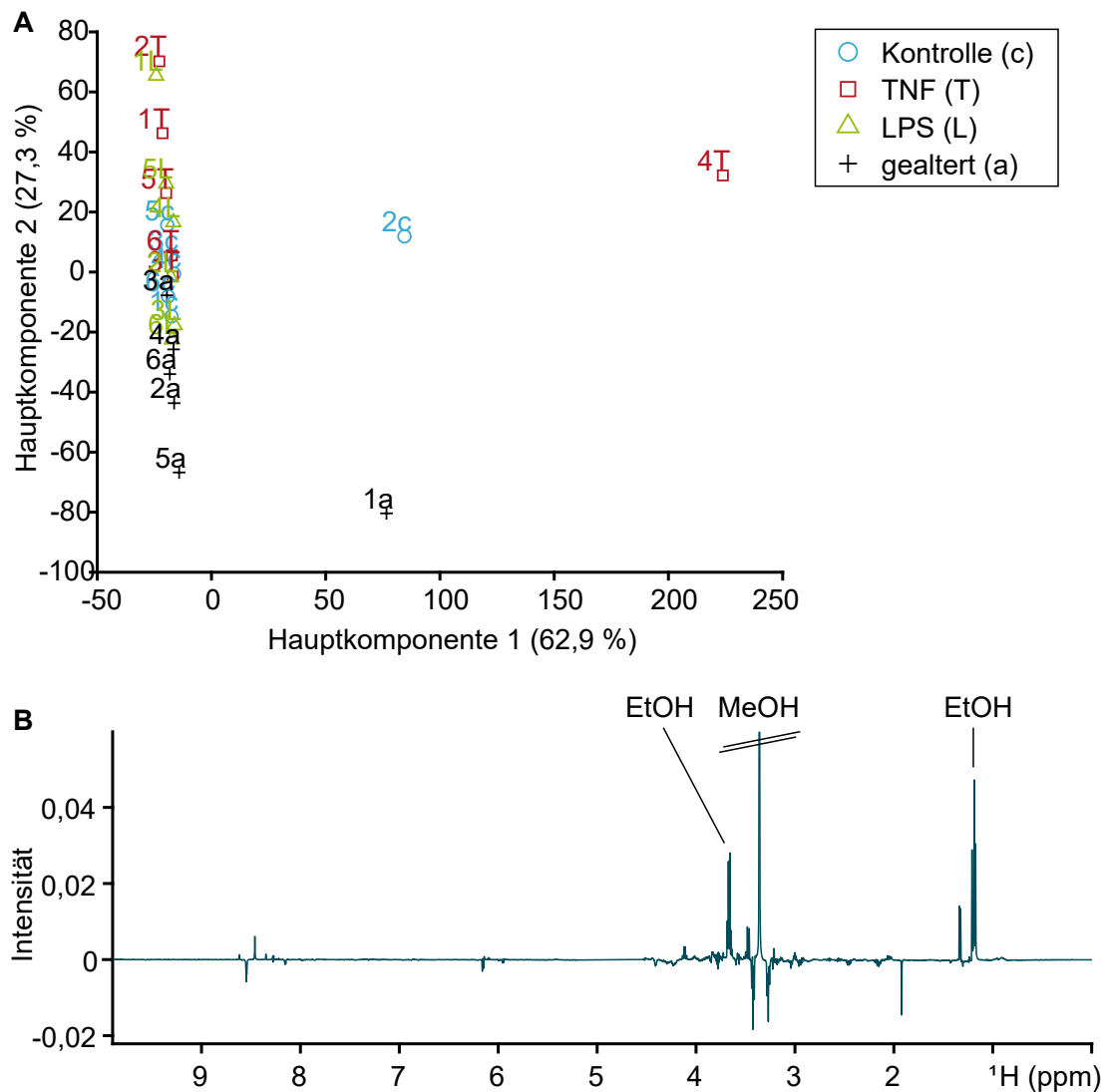


Abbildung 3.4.: **(A)** Die Proben von einem Extraktionstag weichen sehr stark in einer Hauptkomponentenanalyse von allen anderen Proben ab. Gleiche Zahlen entsprechen der gleichen Probandin, die Buchstaben sind Abkürzungen der vier Gruppen: Kontrollgruppe (blau, c), TNF-aktivierte Zellen (rot, T), LPS-aktivierte Zellen (grün, L) und gealterte, apoptotische Zellen (schwarz, a). Die Prozentzahlen entsprechen der durch die Hauptkomponente erklärten Varianz der Proben. Aufgrund der Ausreißer wurde auf die Darstellung von Ellipsen mit doppelter Standardabweichung verzichtet. **(B)** im *loading plot* von Hauptkomponente 1 sind die Ethanol- und Methanolsignale ausschlaggebend. Wenn die spektralen Regionen von Ethanol und Methanol (Extraktionsmittel) herausgeschnitten werden, sind die drei Proben keine Ausreißer mehr (siehe Abbildung 3.5). Die Entfernung der Lösemittel ist hier nicht vollständig abgelaufen.

3. Ergebnisse

sichtbar waren, wurden die spektralen Bereiche von Ethanol (als Stabilisator in Chloroform verwendet und ein Desinfektionsmittel im Labor) und Methanol vor der weiteren Analyse entfernt.

Ohne die spektralen Bereiche von Ethanol und Methanol zeigte sich in den ersten beiden Hauptkomponenten eine klare Trennung der gealterten, apoptotischen Zellen von der Kontrollgruppe, kurz Kontrolle, und den aktivierten Zellen (Abbildung 3.5). Für eine Unterscheidung der beiden Gruppen aktivierter Neutrophiler von der Kontrolle zeigte sich ein Trend. Die *loading plots* geben Rückschluss auf die Signale, die die Unterschiede entlang der Hauptkomponenten verursachen. Die intensivsten Signale in den *loading plots* der ersten beiden Hauptkomponenten zeigen eine größere Konzentration an Lactat, Taurin, Glutathion und ATP/ADP bei den nicht apoptotischen Neutrophilen und größere Mengen an Acetat bei den gealterten, apoptotischen Zellen.

3.2.1. Zuordnung mit *spiking* und STOCSY

Bei der Auswertung der *loading plots* stellte sich heraus, dass einige der interessanten Bereiche Signale beinhalteten, die allein mit Reinsubstanzspektren noch nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, oder die überlagerten. Abhängig von Konzentrations- und pH-Effekten können sich Unterschiede in der chemischen Verschiebung im Spektrum der Reinsubstanz und in einer Testprobe ergeben. Dies war z.B. der Fall für die Adenosinnukleotide ATP, ADP und AMP. Spätestens an dieser Stelle ist aber eine genauere Zuordnung der Metabolitsignale notwendig. Zum Einen wurde insbesondere im Nukleotidbereich eine verbesserte Zuordnung mittels *spiking* angestrebt. Dafür wurden einer bereits gemessene Probe kleine Mengen des vermuteten Metabolits zugesetzt. Wenn dieser Metabolit schon vorhanden war, wurde dessen Signal größer, ansonsten entstand ein neues Signal (Abbildung 3.6).

Zum Anderen wurde die Zuordnung unbekannter Signale mit der STOCSY-Methode erweitert. Beispielsweise konnte über ein STOCSY festgestellt werden, dass das Triplet bei 3,35 ppm mit dem Triplet bei 2,6 ppm eine Korrelation von über 90 % zeigt (Abbildung 3.7). Diese beiden Signale zusammen deuten auf Hypotaurin hin. Ein anschließend aufgenommenes Spektrum der Reinsubstanz Hypotaurin bestätigte diese Zuordnung.

3. Ergebnisse

3.2.2. *Pure Shift* Zuordnungsexperimente

Mit *Pure Shift* Experimenten wurde überprüft, ob unter großen Signalen wie z.B. von Taurin noch weitere Signale vorhanden sind. Bei dieser Methode wird die chemische Verschiebung von der Kopplung getrennt, sodass jede Protonengruppe nur noch ein

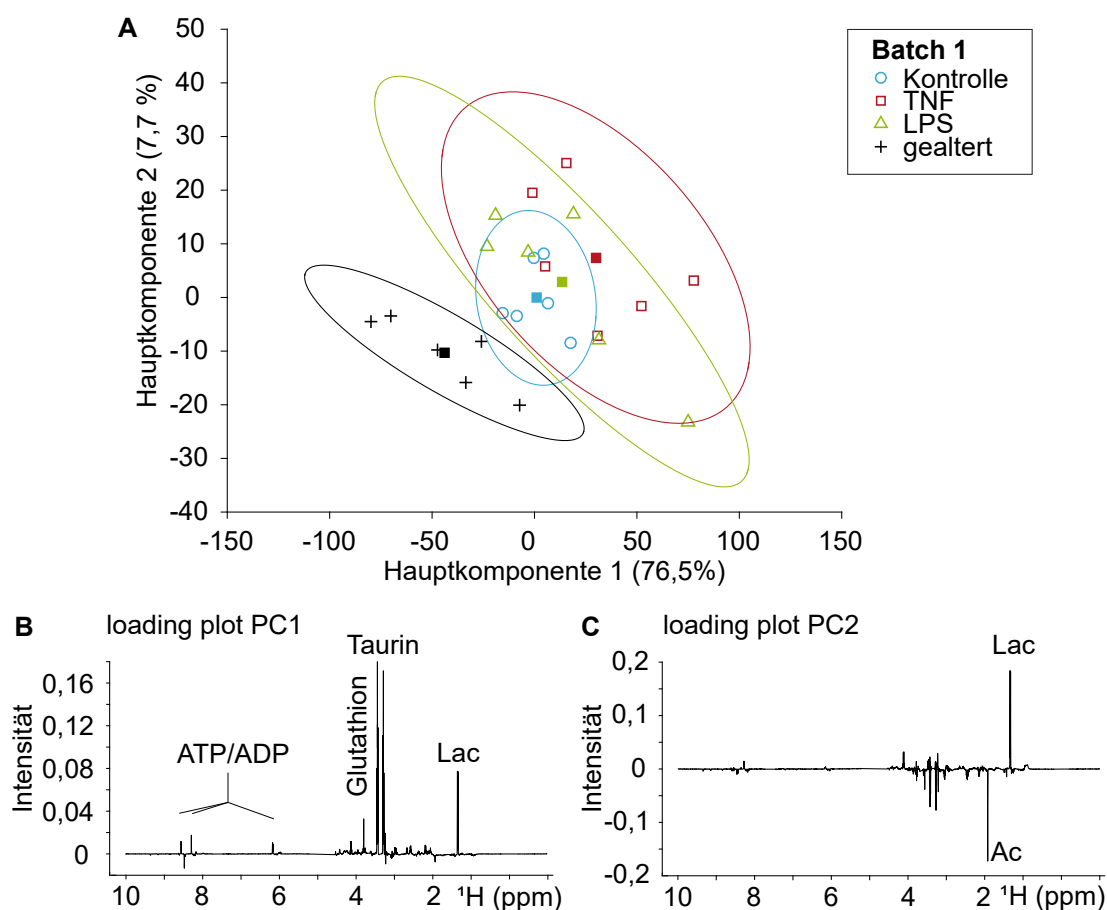


Abbildung 3.5.: (A) Der *Score plot* von Hauptkomponenten 1 und 2 zeigt eine Trennung der gealterten, apoptotischen Zellen von der Kontrollgruppe und den aktivierten Zellen. Für eine Trennung der Kontrollgruppe von den aktivierten Zellen zeigt sich ein leichter Trend. Farbcode wie in Abbildung 3.4, gefüllte Vierecke kennzeichnen den Durchschnitt der jeweiligen Gruppe. Die Ellipsen entsprechen der doppelten Standardabweichung der Gruppe. (B) Die *loading plots* von Hauptkomponente 1 und 2 zeigen, welche spektralen Bereiche die Hauptkomponenten in welche Richtung beeinflussen. ATP/ADP, Glutathion, Taurin und Lactat nehmen entlang der 1. Hauptkomponente zu, (C) Acetat sinkt entlang der 2. Hauptkomponente. Im *loading plot* fallen Signale, die im ursprünglichen Spektrum intensiv waren, mehr ins Gewicht. NAD^+ , welches entlang der 1. und 2. Hauptkomponente abnimmt, ist in dieser Vergrößerung nicht sichtbar.

3. Ergebnisse

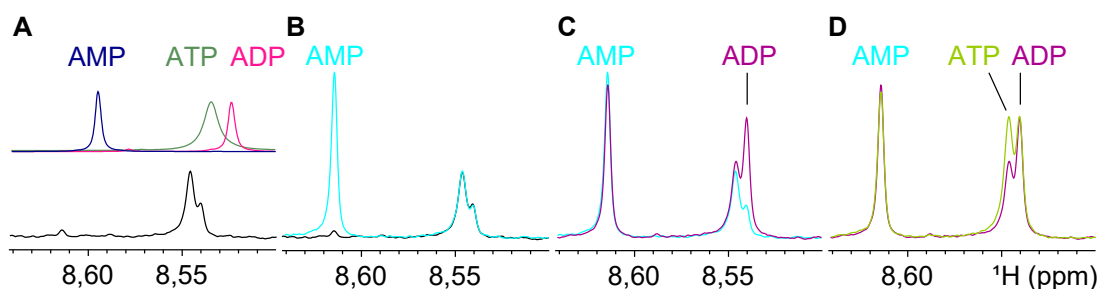


Abbildung 3.6.: *Spiking* zur Überprüfung der Zuordnung von AMP, ADP und ATP. (A) Ausschnitt der Adenosinnukleotide eines NMR-Spektrums eines Neutrophilenextrakts (schwarz) und die übereinander gelegten Reinstanzspektren von AMP (blau), ADP (pink) und ATP (grün). Die chemischen Verschiebungen stimmen nicht überein. (B) Dieselbe Probe Neutrophilenextrakt (schwarz) wird mit AMP (hellblau) versetzt (*gespiked*), (C) dann weiter mit ADP (violett) und (D) mit ATP (hellgrün). Die zugegebene Lösung erhöhte die Konzentration jeweils um etwa 70 μM .

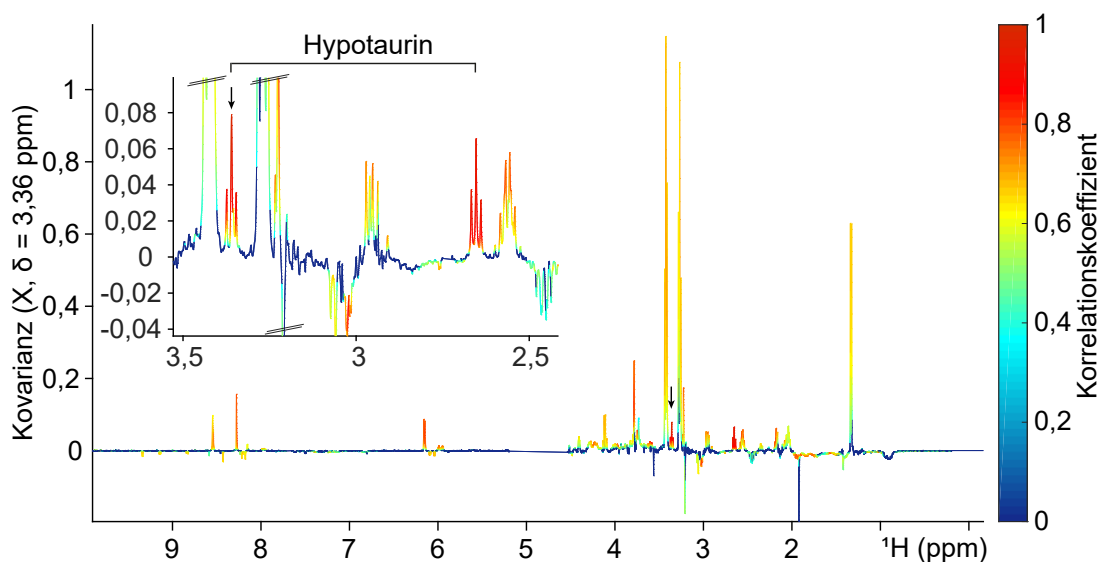


Abbildung 3.7.: Identifikation von Hypotaurin durch Korrelation in einem STOCYSY. Das Signal bei 3,36 ppm (Teil eines Triplets, markiert mit einem Pfeil) zeigt eine Korrelation von über 0,9 mit dem Triplett bei 2,65 ppm. Gemeinsam können die beiden Signale dem Metabolit Hypotaurin zugeordnet werden. Mit anderen Metaboliten (z.B. ATP, Taurin und Lactat) hat Hypotaurin eine Korrelation größer 0,6.

Singulett verursacht (Abbildung 3.8). Die Parameter und Pulssequenz der *Pure Shift*-Methode nach Zangger-Sterk werden nicht vom Betreiber des NMR-Spektrometers gestellt und wurden deshalb zuerst ausgiebig an einer konzentrierten Probe Buttersäureisopropylester getestet. Diese Verbindung wurde verwendet, weil sie mehrere verschie-

3. Ergebnisse

dene Kopplungsmuster zeigt. Anschließend wurden einige Neutrophilenextrakte damit gemessen (Abbildung 3.8). Die Methode konnte erfolgreich angewendet werden. Das Duplett von Lactat und die Triplets von Taurin zeigten im *Pure Shift* Spektrum nur noch ein Singulett. Da im Zangger-Sterk Experiment jedes Signal nur in einer Scheibe des NMR-Röhrchens angeregt wird, statt wie normalerweise im ganzen aktiven Volumen einer Probe, hat das resultierende *Pure Shift* Spektrum einen Verlust an Sensitivität und insgesamt kein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Der Gewinn an Sensitivität durch die Reduktion von aufgespaltenen Signalen auf ein Signal konnte das nicht kompensieren. Gleichzeitig zeigte das Experiment eine sehr viel schlechtere Wasserunterdrückung und Artefakte neben den Signalen. Abgesehen von einem zusätzlichen Signal, welches sich im *Pure Shift* Spektrum in der Schulter des rechten Taurinsignals zeigte, konnten mit der Zangger-Sterk Methode keine weiteren, neuen Erkenntnisse für die Zuordnung gewonnen werden.

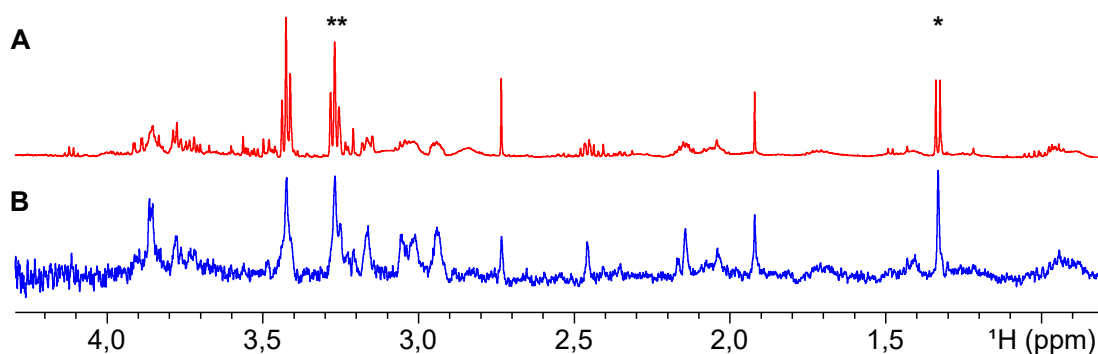


Abbildung 3.8.: *Pure Shift* als Test für überlagerte Signale. Während der Zuordnung wurden *Pure Shift* Experimente getestet, um durch eine Trennung von chemischer Verschiebung und Kopplung überlagerte Signale zu finden - exemplarisch an einem gealterten, apoptotischen Neutrophilenextrakt (Probe 11a). Dass das *Pure Shift* Experiment funktioniert (hier Zangger-Sterk), sieht man z.B. am Signal von Lactat (*, bei 1,3 ppm), welches von einem Duplett (A) auf eine einzige chemische Verschiebung (B) reduziert wird. Im rechten Taurinsignal (**, bei 3,3 ppm) gibt es dagegen ein zweites Signal, was vorher etwas überlagert.

Als eine weitere *Pure Shift* Methode wurde das PSYCHE Experiment getestet. Auch dabei handelt es sich nicht um eine Standard Bruker Pulssequenz. Die Pulsprogrammparameter wurden ebenfalls ausgiebig an einer konzentrierten Probe Buttersäureisopropylester optimiert und es zeigten sich in dieser Testprobe etwas weniger Artefakte als

3. Ergebnisse

mit der Zangger-Sterk Methode. Eine Messung an Zellextrakten wurde an einem Fibroblastenextrakt getestet (Abbildung A.1 im Anhang). Das *Pure Shift* Spektrum konnte auch hier erfolgreich generiert werden. Signale wie Lactat oder Alanin konnten auf Singulettts reduziert werden. Das Restwasser in der D₂O-Probe verursachte ähnlich große Probleme wie bei der Zangger-Sterk Methode. Gleichzeitig kamen stärkere Probleme mit Artefakten bei den Signalen dazu. Da die Messung an dem Fibroblastenextrakt keine Vorteile gegenüber dem Zangger-Sterk Spektrum zeigte, wurde das Experiment nicht an einem Neutrophilenextrakt wiederholt.

Eine weitere getestete Methode, mit der ein *Pure Shift* Spektrum erzeugt werden kann, stellt das *J-res* (*J-resolved*) Experiment dar. Diese Standard Bruker Sequenz erzeugt in erster Linie ein pseudo-zweidimensionales Spektrum, welches die ¹H-chemische Verschiebung entlang der x-Achse von der Kopplung entlang der y-Achse trennt. Die Signale sind ursprünglich leicht diagonal im Spektrum angeordnet, entsprechend ihrer ursprünglichen Position im ¹H-Spektrum. Bei der Prozessierung wird das Spektrum geringfügig gekippt, bis die Signale direkt übereinander liegen. Die anschließende Prozedur für eine bessere Symmetrie der Signale musste bei der Analyse genau beachtet werden, weil es möglich ist, dass Artefakte im Spektrum dadurch ein weiteres, scheinbar korrespondierendes Signal bekommen. Die 1D-Projektion des *J-res* Spektrums kann als *Pure Shift* Spektrum verwendet werden, wobei es keine quantitativen Aussagen ermöglicht, weil die Signalintensitäten in der Projektion nicht proportional zu den Signalen im Referenzspektrum sind. Dies ist am Beispiel eines *J-res* an einem Neutrophilenextrakt der Kontrollgruppe gezeigt (Abbildung 3.9).

Ursprüngliche Singulettts (Acetat, DMSO, Glycin) wurden in der 1D-Projektion deutlich intensiver dargestellt als zum Beispiel die Signale des um mehrere Größenordnungen größeren Taurins. Trotz der beeinflussten Intensitäten ergab die 1D-Projektion eines *J-res* eines Zellextrakts ein deutlich besseres *Pure Shift* Spektrum als die Zangger-Sterk Methode und die PSYCHE Methode. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und die Linienbreite im *J-res* waren überlegen.

Das pseudo-zweidimensionale *J-res* Spektrum konnte zusätzlich zur Bestätigung einiger Zuordnungen verwendet werden, wenn sich insbesondere im sehr überlagerten Bereich

3. Ergebnisse

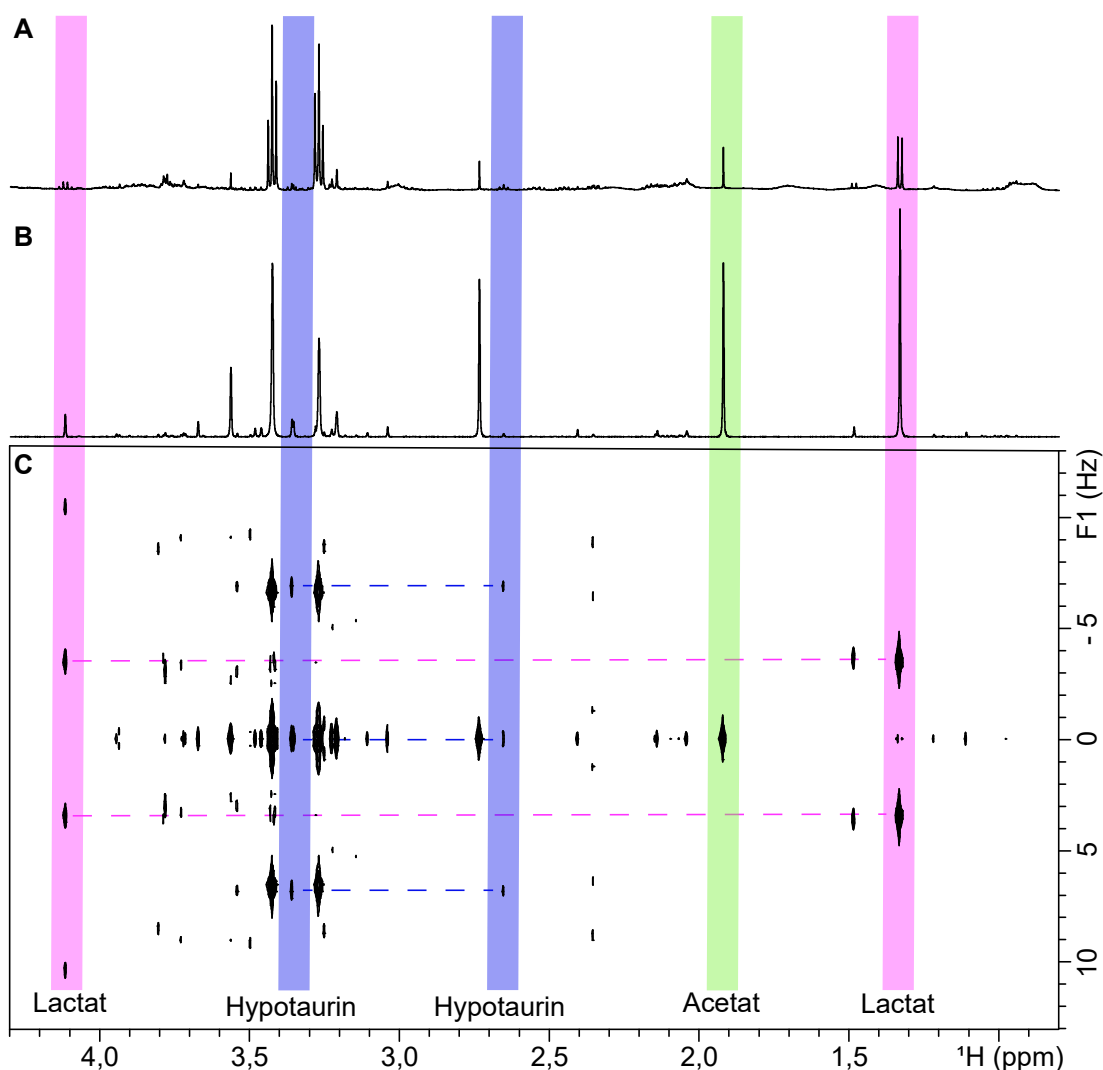


Abbildung 3.9.: *J-res* (*J-resolved*) als *Pure Shift*-Methode zum Test auf versteckte Signale ohne Verlust der Kopplungsinformation. (A) 1D-NOESY Referenzspektrum eines Neutrophilenextrakts der Kontrollgruppe. (B) 1D-Projektion des pseudo-zweidimensionalen *J-res* Spektrums (C). Das *J-res* zeigt in der direkten Dimension (x-Achse) nur noch die chemische Verschiebung, während die Kopplung in die indirekte Dimension entlang der y-Achse verlagert wird. Singulets liegen auf der 0 Hz Linie, während höhere Multiplizitäten ihre Signale ausgehend von der Mittellinie aufspalten. Die Projektion der direkten Dimension ergibt dann ein *Pure Shift*-Spektrum, welches mit einem normalen 1D-NOESY verglichen werden kann. Dabei sind die Intensitäten der Signale nicht proportional zu den Referenzsignalen - Beispiele unterschiedlicher Multiplizität sind farblich hervorgehoben. Das *J-res* kann verwendet werden, um in stark überlagerten Regionen die Aufspaltungen und Kopplungskonstanten von Signalen zu ermitteln. Dadurch können auch Zuordnungen von Metaboliten, die aus isolierten und überlagerten Signalen bestehen, bestätigt oder in Frage gestellt werden, je nachdem, ob sich passende Kopplungen im *J-res* zeigen, wie am Beispiel von Hypotaurin zu sehen.

3. Ergebnisse

von 3,5 bis 4,5 ppm ein weiteres Signal eines Metabolits finden ließ, was in einem anderen spektralen Bereich ein isoliertes Signal aufwies. Im Gegensatz zu einem 1D-*Pure Shift* Spektrum konnte hierfür nicht nur die Position des Signals, sondern auch die Kopplungskonstanten herangezogen werden. Die beiden Triplets von Hypotaurin mit ihren passenden Kopplungskonstanten konnten deutlich beobachtet werden. Gleichzeitig konnte bei dem einen Hypotaurin-Triplett auch die Überlagerung mit Methanol sehr gut gezeigt werden. Für Metabolite wie Lactat, Alanin, Glutamin, Glutamat und Glutathion konnten die korrespondierenden Signale im Bereich von 3,5 bis 4,5 ppm zugeordnet werden. In der Schulter des rechten Taurinsignals konnte ein Signal detektiert werden, welches aufgrund von Position und Kopplung Glucose zugeordnet werden konnte. Dieser Bereich blieb durch die Vielzahl der Zuckersignale und andere sehr gering konzentrierte Aminosäuren weiterhin unübersichtlich und konnte nicht vollständig zugeordnet werden.

3.3. Messung Batch 2 und der Batcheffekt

Nachdem in der ersten Messreihe eine Trennung der gealterten, apoptotischen Zellen von der Kontrollgruppe und ein leichter Trend bei den aktivierten Neutrophilen beobachtet werden konnte, wurden 6 weitere Probandinnen in die Studie eingeschlossen, um durch eine höhere Stichprobenzahl die Aussagekraft der Unterschiede zu erhöhen.

Auch bei diesen Proben lieferte die Extraktion zufriedenstellende Ergebnisse, die Trennung von den Makromolekülen war erfolgreich. Eine der Proben (8L) konnte nicht in die weiteren Analysen eingeschlossen werden, da das Reaktionsgefäß mit der Probe ausgelaufen war. Von den übrigen 23 Proben wurde wieder die wasserlösliche Phase gemessen und prozessiert.

Allgemein zeigt sich im zweiten Batch eine größere Streuung der Spektren in der PCA. Eine Trennung der gealterten, apoptotischen Zellen von der Kontrollgruppe lässt sich weiterhin beobachten, wenn auch etwas weniger deutlich.

Um zu überprüfen, ob die Trennungseffekte deutlicher erkennbar werden, wenn die Stichprobenzahl erhöht wird, wurden alle Proben einer gemeinsamen statistischen Analyse unterzogen (Abbildung 3.10). Dabei zeigte sich, dass sich die Trennung dadurch nicht

3. Ergebnisse

verbessern ließ. Die größere Streuung der neuen Proben führte zu weniger definierten Gruppen. Das Institut für Infektiologie und Mikrobiologie, in dem die Blutabnahme und Isolierung der Neutrophilen erfolgte, war zwischen der Probennahme der ersten 6 und der zweiten 6 Probandinnen in ein anderes Gebäude gezogen. Weiterhin herrschte eine andere Jahreszeit vor. Deswegen wurde entschieden, die neue Messreihe in der Folge als einen zweiten Batch zu betrachten und zunächst getrennt zu analysieren.

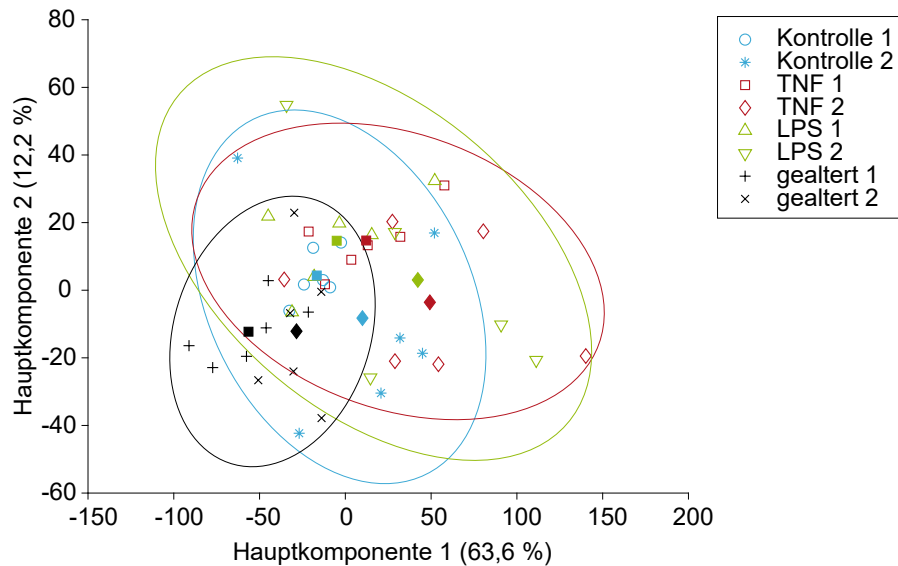


Abbildung 3.10.: Die Kombination von Batch 1 und 2 führt in einer PCA nicht zu einer besseren Trennung. Im *score plot* von Hauptkomponente 1 und 2 zeigt sich für die kombinierten Gruppen eine schlechtere Trennung als alleine für den ersten Batch. Der zweite Batch zeigt insgesamt eine größere Streuung. Die Farben der Gruppen sind wie in Abbildung 3.4, die verschiedenen Batche werden durch unterschiedliche Symbole dargestellt. Gefüllte Vierecke kennzeichnen den Durchschnitt der einzelnen Gruppen in Batch 1, gefüllte Rauten die Durchschnitte in Batch 2. Die Ellipsen zeigen die doppelte Standardabweichung der gemeinsamen Gruppen von Batch 1 und 2.

3. Ergebnisse

Für sich allein betrachtet zeigt sich im *score plot* der ersten beiden Hauptkomponenten von Batch 2 weiterhin, dass sich die Gruppe der gealterten, apoptotischen Neutrophilen von den anderen Gruppen unterscheidet. Die tatsächliche Trennung zwischen den Gruppen ist zwar nicht so deutlich wie im ersten Batch, aber diese Gruppe ist die einzige mit sehr geringer Varianz in Hauptkomponente 1, was für eine stärkere Gruppenzugehörigkeit spricht (Abbildung 3.11). Der *loading plot* von Hauptkomponente 1 zeigt wie in Batch 1 größere Mengen an Taurin und Lactat bei den nicht apoptotischen Neutrophilen. Durch die große Varianz aller Gruppen in Hauptkomponente 2 kann diese nicht für eine Trennung zwischen den Gruppen herangezogen werden. Acetat und Taurin sind im *loading plot* von PC2 in beide Richtungen gleichermaßen ausgeprägt.

3.4. Variabilität innerhalb der Gruppen

Die stärkere Gruppenzugehörigkeit der gealterten, apoptotischen Neutrophilen im zweiten Batch verglichen mit den anderen Gruppen lässt sich besonders gut veranschaulichen, wenn man eine Hauptkomponentenanalyse pro Gruppe von Batch 1 und Batch 2 durchführt (Abbildung 3.12). Die Kontrollgruppe der Neutrophilen zeigt bereits in Hauptkomponente 1 und 2 eine ganz klare Trennung von Batch 1 und 2. Bei den gealterten, apoptotischen Zellen wird die Trennung erst in höheren Komponenten sichtbar. Dabei handelt es sich nicht um eine Trennung der Messreihen entlang einer Hauptkomponenten, sondern eher um eine Streuung der Proben von Batch 2 um die von Batch 1. Der Batcheffekt ist also schwächer als der Effekt durch die Induktion der Apoptose. Für die TNF und LPS-aktivierten Neutrophilen zeigt sich im Wesentlichen das gleiche Bild wie für die Kontrollgruppe (vgl. Abbildung A.2). Während die niedrigen Hauptkomponenten von Batch 1 eine Trennung der verschiedenen Gruppen ermöglichen, zeigen sich die Unterschiede zwischen den verschiedenen Probandinnen erst in Hauptkomponente 5 und 6 (Abbildung 3.13). Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind bereits in den niedrigeren Komponenten erklärt, sodass nur noch die Unterschiede zwischen den Probandinnen erklärt werden müssen. Die Varianz in Batch 1 liegt also zu einem sehr großen Anteil an den verschiedenen Behandlungen der vier Gruppen und kaum an

3. Ergebnisse

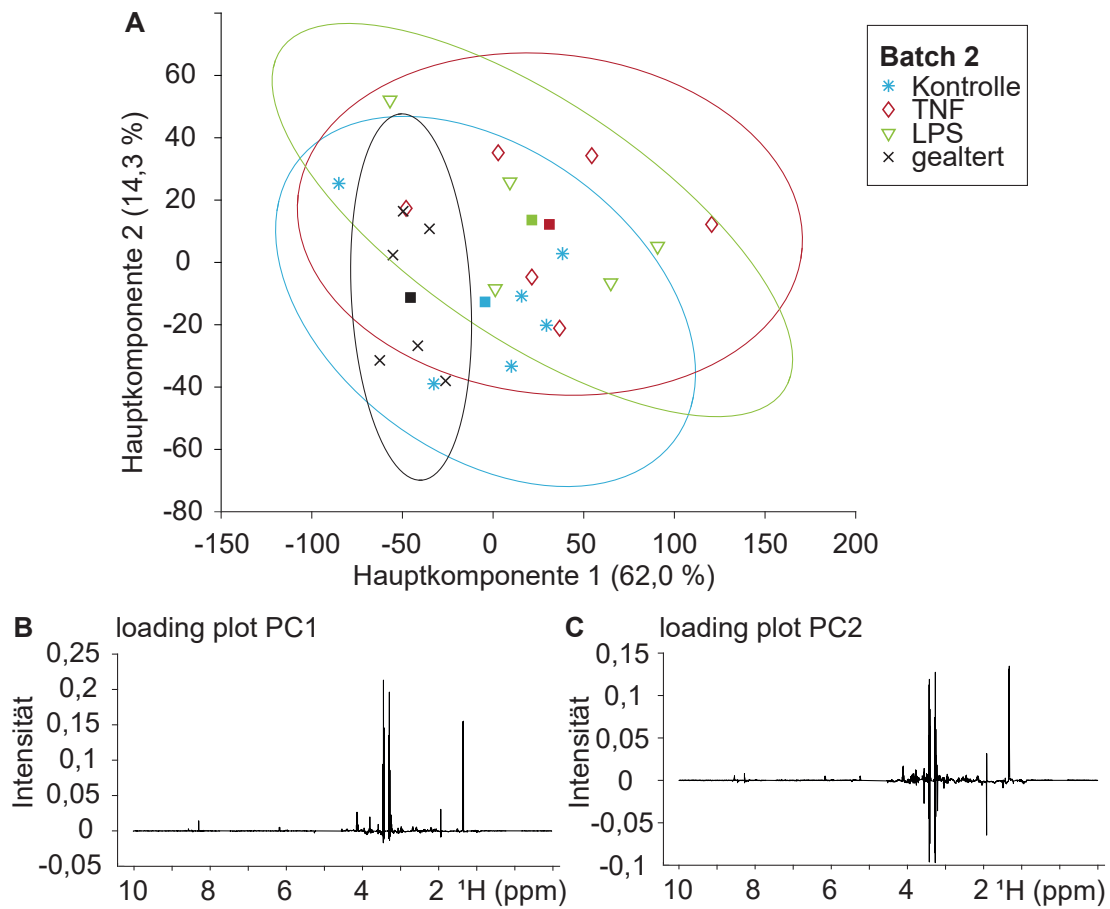


Abbildung 3.11.: (A) Im *score plot* von Hauptkomponente 1 und 2 lassen sich die Gruppen vom zweiten Batch kaum trennen. Abgesehen von der Gruppe der gealterten, apoptotischen Zellen, die wieder relativ isoliert ist, zeigen alle Gruppen des zweiten Batches eine relativ große Streuung. Gefüllte Vierecke kennzeichnen den Durchschnitt der jeweiligen Gruppe. Die Ellipsen entsprechen der doppelten Standardabweichung der Gruppe. (B) Im *loading plot* der ersten Hauptkomponente sind Taurin und Lactat wieder bestimmend. Die zweite Hauptkomponente kann nicht zur Trennung von den gealterten, apoptotischen Neutrophilen von den anderen Gruppen genutzt werden, da die meisten Gruppen im positiven und negativen Bereich der Achse liegen.

den verschiedenen Probandinnen. In Batch 2 clustern einige der Testpersonen bereits in Hauptkomponente 1 und 2. Die durch die Personen verursachte Varianz ist also ungleich größer.

3. Ergebnisse

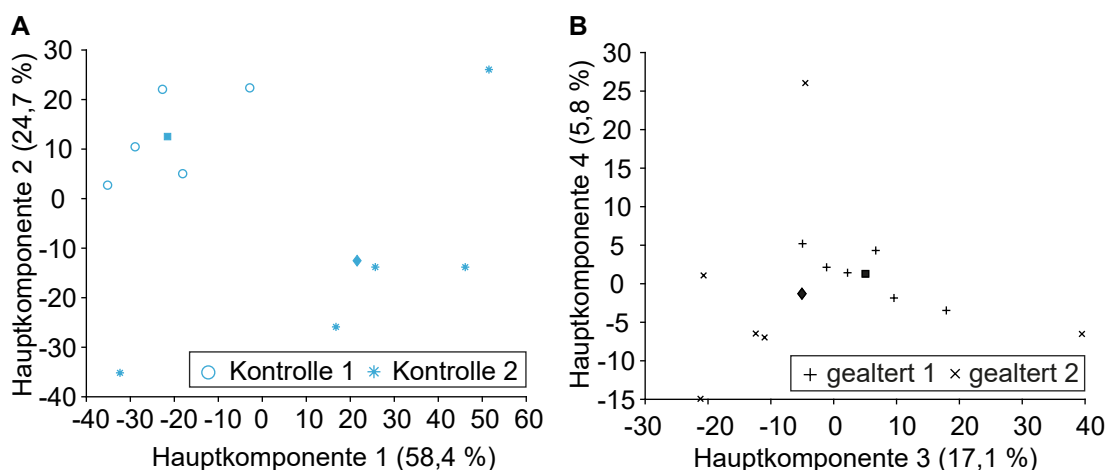


Abbildung 3.12.: Der Batcheffekt hat einen geringeren Einfluss auf die gealterten, apoptotischen Zellen als auf die anderen Gruppen. Um den Batcheffekt zwischen den einzelnen Gruppen näher zu betrachten, sind in (A) nur die beiden Kontrollgruppen mit Hauptkomponente 1 und 2 gezeigt. Zwei Ausreißer wurden hier entfernt. Farbcodes und Symbole wie in Abbildung 3.10. Bei der Kontrolle zeigt sich sowohl ein deutlicher Unterschied in der Position des Durchschnitts der beiden Batches als auch in der Streuung der Proben. (B) Bei den gealterten, apoptotischen Neutrophilen zeigt sich keine Trennung zwischen den Batches. Erst in höheren Hauptkomponenten sieht man einen Streueffekt von Batch 2 um die Proben von Batch 1. Der Effekt der Alterung ist also stärker als der Batcheffekt. Im Anhang ist Vergleich für alle Gruppen dargestellt (Abbildung A.2)

3.5. Analyse der Änderungen der Metabolitsignale

Bei einem direkten Vergleich der Spektren der verschiedenen Gruppen miteinander fällt insbesondere der aromatische Bereich auf. Die NAD^+ Signale von den gealterten, apoptotischen Neutrophilen sind um ein Vielfaches höher als bei allen anderen Gruppen. Die gemeinsamen Signale von ATP und ADP sind bei den aktivierten Neutrophilen etwas erhöht und bei den gealterten, apoptotischen Zellen deutlich erniedrigt (Abbildung 3.14).

Weil die NAD^+ -Signale nur bei den gealterten, apoptotischen Neutrophilen erhöht sind, kann man ein STOCSY auf eines der NAD^+ -Signale auch als eine Art *loading plot* für die Trennung der Gruppen verwenden (Abbildung 3.15). Für das STOCSY wurde das H2 von Nicotinamid bei 9,342 ppm ausgewählt, weil es als Singulett über die beste Signalintensität verfügt. Eine positive Korrelation mit NAD^+ und dementsprechend mit den

3. Ergebnisse

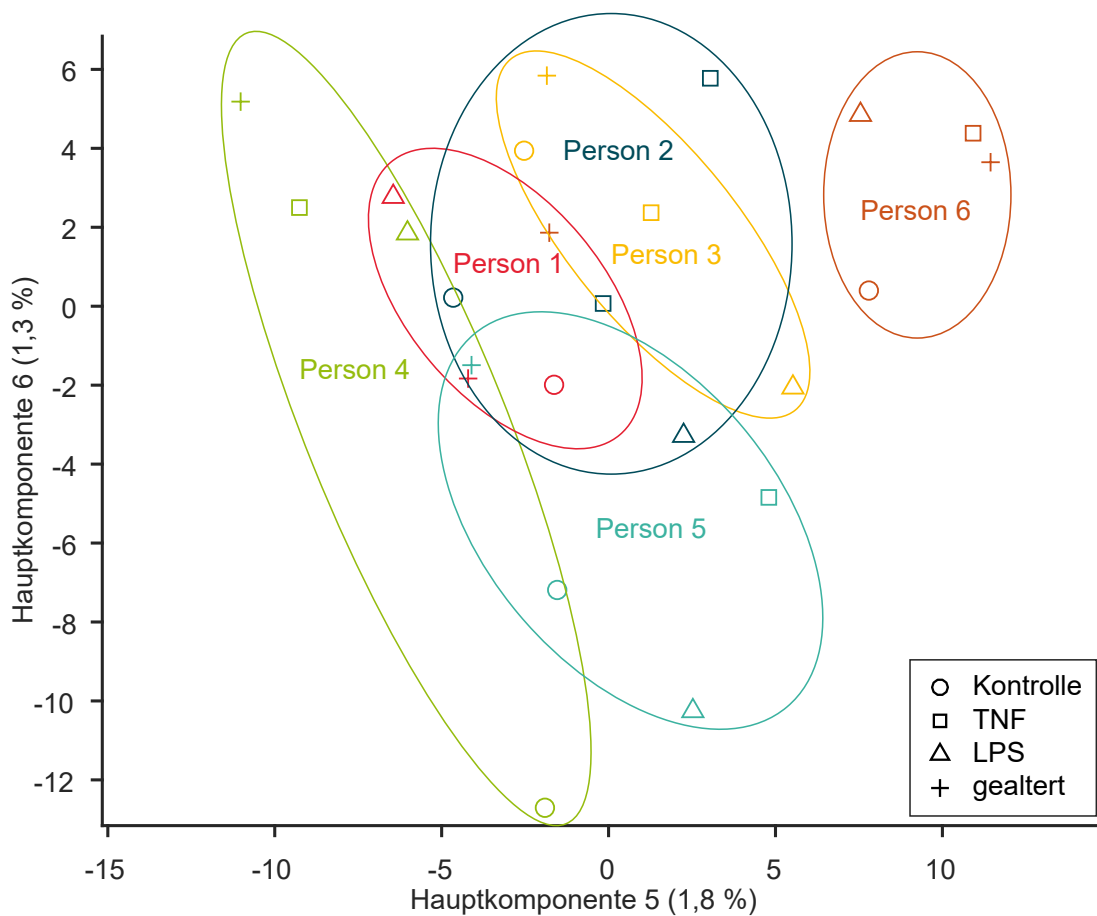


Abbildung 3.13.: In Hauptkomponente 5 und 6 zeigt sich für Batch 1 ein Clustern der Testpersonen. Da sich die Personen erst in höheren Komponenten wiederfinden lassen, spricht das für größere Unterschiede zwischen den Gruppen als zwischen den Personen. In Batch 2 sind die Unterschiede zwischen den Personen größer als in Batch 1, sodass bereits in Hauptkomponente 1 und 2 die Unterschiede zwischen den Gruppen mit denen zwischen den Personen konkurrieren. Die Farben kennzeichnen hier die verschiedenen Testpersonen, nicht die Gruppen. Die Ellipsen dienen hier der Zusammengehörigkeit der Gruppe, nicht der Standardabweichung.

gealterten, apoptotischen Zellen zeigen Glycin und Glutamin und in geringerer Intensität auch Cholin und Acetat. ATP zeigt eine intensive negative Korrelation, während Taurin, Phosphocholin und Lactat eine geringere negative Korrelation aufweisen.

Nach der Zuordnung der Metabolite wurden in übereinandergelegten Spektren Grenzen für die Signale gewählt, um die Signale in allen Spektren zu integrieren. Jetzt sollte nicht mehr nach globalen Unterschieden zwischen den Gruppen sondern nach spezi-

3. Ergebnisse

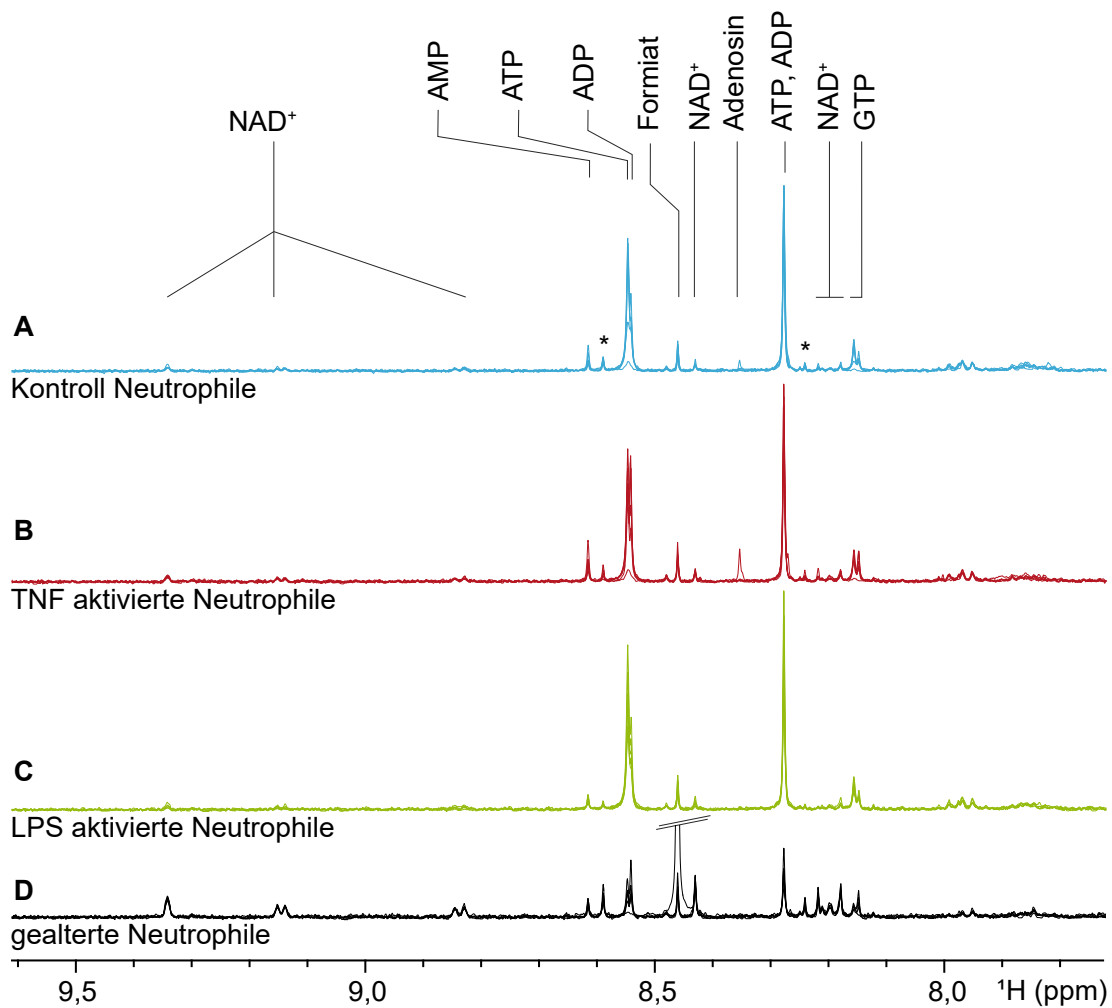


Abbildung 3.14.: Aromatischer Bereich des NMR-Spektrums, der die Resonanzen von NAD^+ , Adenin- und Guanosin-Nukleotiden zeigt. Alle sechs NMR-Spektren jeder Gruppe aus Batch 1 sind überlagert. Der Vergleich von Kontrollneutrophilen (**A**), TNF-behandelten (**B**), LPS-behandelten (**C**) und gealterten Neutrophilen (**D**) zeigt einen deutlichen Anstieg der NAD^+ -Signale bei gealterten Neutrophilen (**D**) und Änderungen der ATP- und ADP-Werte bei aktivierten Neutrophilen (**B**, **C**).

fischen, signifikanten Konzentrationsunterschieden der einzelnen Metabolite zwischen verschiedenen Gruppen gesucht werden. Aus den Integralen wurden p -Werte für die Unterschiede zwischen den Gruppen berechnet und es wurde kalkuliert, um ein wie Vielfaches sich ein Integral geändert hatte (Tabelle 3.1). Um Fehler durch multiples Testen zu vermeiden, wurde für die p -Werte eine *false discovery rate*-Korrektur mit 50, 100 und 200 Metaboliten durchgeführt. Die meisten Veränderungen sind auch für 200 angenommene Metabolite signifikant. Die aktivierten Neutrophilen unterscheiden

3. Ergebnisse

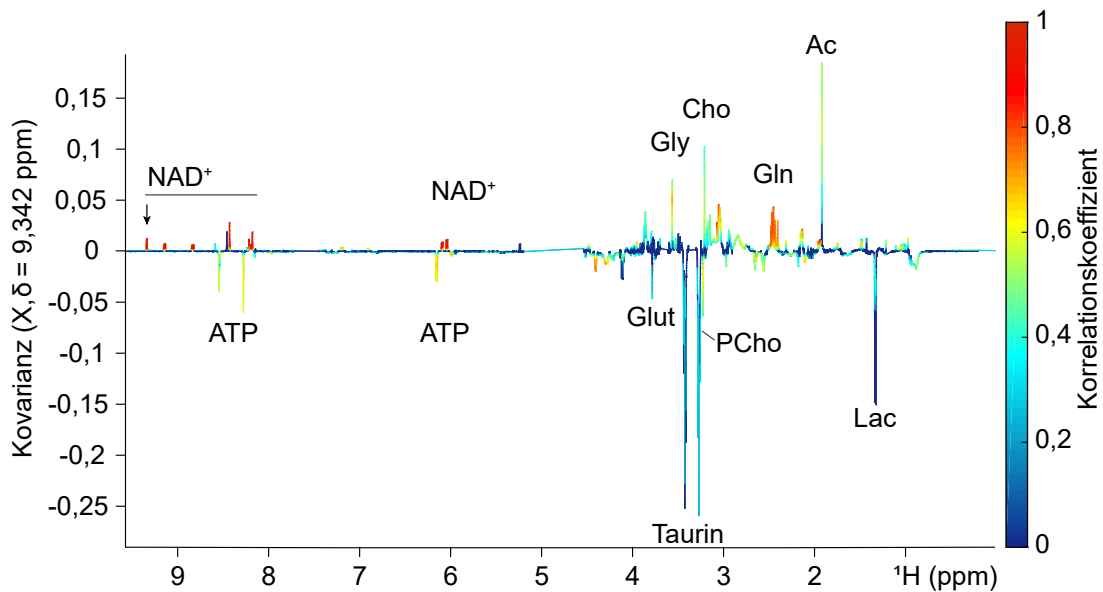


Abbildung 3.15.: Mit einem STOCSY Plot werden Metabolite identifiziert, die mit NAD^+ korrelieren. Eine hohe Korrelation zum NAD^+ Signal bei 9,342 ppm (H_2 von Nicotinamid) zeigen Glycin, Glutamin und ATP. Glutamin und Glycin nehmen mit NAD^+ zu und sind im Plot positiv dargestellt. ATP dagegen korreliert negativ mit NAD^+ und erscheint im Plot negativ.

sich von der Kontrolle nur in Lactat und Phosphocholin. Die unterschiedlich aktivierten Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, die entsprechende Spalte wird in der Tabelle daher weggelassen. Die gealterten, apoptotischen Zellen zeigen in diversen Metaboliten signifikante Unterschiede zur Kontrolle und den aktivierten Neutrophilen. Der niedrigste p -Wert und die größte Veränderung, eine deutliche Zunahme, zeigt sich wie erwartet für NAD^+ . Weiterhin zeigen sich deutliche Zunahmen in Acetat, Cholin, Glutamin, Glycin und Tyrosin. Deutliche Abnahmen bei den gealterten, apoptotischen Zellen zur Kontrolle und den aktivierten Zellen zeigen sich im gemeinsamen ATP und ADP Signal, in Glutathion, Hypotaurin und in Phosphocholin. Bei Lactat und Phosphocholin, die bei den aktivierten Zellen Zunahmen zur Kontrolle zeigen, weisen die gealterten, apoptotischen Zellen gleichzeitig eine Abnahme auf.

Eine Reihe Signale, die nicht zugeordnet werden konnten, zeigen ebenfalls klare Unterschiede zwischen den gealterten, apoptotischen Neutrophilen und den übrigen Gruppen.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.1.: Signifikante Veränderungen der Metabolitlevel zwischen den verschiedenen Gruppen. Veränderungen in den Metabolitkonzentrationen wurden für weitere Analysen in Betracht gezogen, wenn der p -Wert in einer ANOVA der kombinierten Batche kleiner als 0,05 war. Es werden auch Veränderungen mit p -Werten $p < 0,075$ angegeben, da in diesen Fällen oft signifikante Veränderungen in einem Batch beobachtet werden. Für die Übersichtlichkeit wird der Vergleich der beiden aktivierten Neutrophilen weggelassen, da keine signifikanten Veränderungen beobachtet wurden. Als Kontrolle für multiples Testen wurde anschließend eine FDR-Korrektur durchgeführt. Da es schwierig ist, die Anzahl der nachweisbaren Metaboliten in den Spektren abzuschätzen, wurde die FDR mit drei verschiedenen Werten - 50, 100 und 200 - durchgeführt. Metabolitenveränderungen, die nach der FDR signifikant sind, werden hellgrau (für 50 Variablen), dunkelgrau (100 Variablen) und hellgrün (für 200 Variablen) markiert. Die Veränderungen der Metabolitkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (in den ersten drei Spalten) bzw. im Vergleich zu TNF (vierte Spalte) und LPS (letzte Spalte) sind in Klammern angegeben.

Metabolit (Signalbereich in ppm)	Kontrolle vs			TNF vs	LPS vs
	TNF	LPS	Apoptose	Apoptose	Apoptose
Alanin (1,472 - 1,502)	-	-	8,57 E-3 (1,11)	4,05 E-4 (1,14)	2,27 E-3 (1,13)
Acetat (1,909 - 1,930)	-	-	9,27 E-6 (1,41)	3,18 E-4 (1,30)	6,09 E-3 (1,23)
ATP und ADP (8,268 - 8,286)	-	-	5,52 E-9 (0,39)	8,70 E-9 (0,40)	8,49 E-9 (0,39)
ADP (8,541 - 8,543)	-	-	-	0,013 (0,45)	-
ATP (8,546 - 8,548)	-	-	6,42 E-3 (0,32)	0,021 (0,35)	4,00 E-4 (0,27)
Cholin (3,205 - 3,217)	-	-	3,19 E-3 (1,72)	-	0,048 (1,45)
Glutamin (2,429 - 2,489)	-	-	2,58 E-6 (1,54)	2,64 E-5 (1,45)	2,33 E-5 (1,47)
Glutathion (2,489 - 2,631)	-	-	2,44 E-3 (0,84)	2,03 E-5 (0,79)	1,03 E-4 (0,80)
Glycin (3,559 - 3,574)	-	-	1,22 E-3 (1,32)	4,95 E-3 (1,27)	0,010 (1,25)
GTP (8,151 - 8,164)	-	-	-	-	0,060 (0,59)
Hypotaurin (2,631 - 2,675)	-	-	5,85 E-5 (0,78)	2,88 E-6 (0,75)	5,20 E-6 (0,75)
Isoleucin (0,986 - 1,068)	-	-	0,070 (1,10)	0,020 (1,12)	0,011 (1,13)
Lactat (1,317 - 1,350)	4,34 E-5 (1,62)	4,59 E-3 (1,44)	-	5,68 E-7 (0,52)	9,04E-5 (0,58)
NAD ⁺ (9,330 - 9,353)	-	-	3,77 E-9 (7,3)	3,77 E-9 (4,22)	3,77 E-9 (9,43)

3. Ergebnisse

Tabelle 3.1.: Signifikante Veränderungen der Metabolitlevel zwischen den verschiedenen Gruppen - fortgesetzt

Metabolit (Signalbereich in ppm)	Kontrolle vs		TNF vs	LPS vs	
	TNF	LPS	Apoptose	Apoptose	
Phosphocholin (3,217 - 3,231)	1,47 E-3 (1,25)	-	5,69 E-5 (0,69)	3,89 E-9 (0,55)	1,13 E-7 (0,61)
Taurin (3,392 - 3,453)	-	-	0,019 (0,81)	1,71 E-4 (0,74)	2,98 E-4 (0,74)
Tyrosin (7,183 - 7,213)	-	-	3,26 E-3 (1,33)	0,074 (1,20)	4,82 E-3 (1,32)
unbekannt (1,057 - 1,079)	-	-	5,30 E-3 (1,23)	3,60 E-3 (1,24)	0,029 (1,18)
unbekannt (1,100 - 1,120)	-	-	-	0,029 (1,21)	-
unbekannt (2,400 - 2,429)	-	-	7,23 E-5 (1,29)	1,96 E-4 (1,27)	2,77 E-4 (1,27)
unbekannt (2,792 - 2,809)	-	-	0,034 (1,37)	0,042 (1,36)	0,029 (1,39)
unbekannt (3,037 - 3,043)	-	-	0,021 (1,46)	0,022 (1,46)	0,035 (1,43)
unbekannt (3,065 - 3,080)	-	-	4,44 E-4 (1,82)	8,61 E-4 (1,75)	1,06 E-3 (1,76)
unbekannt (7,411 - 7,442)	-	-	4,38 E-3 (1,44)	0,025 (1,34)	0,050 (1,30)
unbekannt (7,945 - 7,960)	-	-	-	0,069 (0,79)	-
unbekannt (8,235 - 8,246)	-	-	0,065 (1,69)	0,020 (1,95)	2,40 E-3 (2,65)
unbekannt (8,583 - 8,597)	-	-	-	0,041 (1,89)	8,31 E-3 (2,42)

Im Anschluss wurde recherchiert, an welchen Stoffwechselwegen die bei den gealterten, apoptischen Neutrophilen signifikant veränderten Metabolite (mit FDR für mindestens 50 Metabolite) beteiligt sind (Tabelle 3.2). Ausgehend von der Größe der Veränderung und der Wahrscheinlichkeit, dass es diese Stoffwechselwege in Neutrophilen gibt, wurde die Tabelle in unterschiedlich relevante Stoffwechselwege unterteilt.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.2.: Beteiligte Stoffwechselwege

Stoffwechselweg	Metabolite
definitiv relevante Stoffwechselwege	
Taurin und Hypotaurin Metabolismus	Taurin, Hypotaurin
Nicotinsäure und Nicotinamid Metabolismus	NAD ⁺
Purin Metabolismus	ADP, ATP, Glutamin
möglicherweise relevante Stoffwechselwege	
Aminoacyl-rRNA Biosynthese	Alanin, Glutamin, Glycin, Isoleucin, Tyrosin
Glyoxylat und Dicarboxylat Metabolismus	Acetat, Glutamin, Glycin
Pyruvat Metabolismus	Acetat, Lactat
Alanin, Aspartat und Glutamat Metabolismus	Alanin, Glutamin
Glutathion Metabolismus	Glutathion, Glycin
Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan Biosynthese	Tyrosin
Glycin, Serin und Threonin Metabolismus	Cholin, Glycin
Glycerophospholipid Metabolismus	Cholin, Phosphocholin
Glutamin und Glutamat Metabolismus	Glutamin
Stickstoff Metabolismus	Glutamin
Ubiquinon und andere Terpenoide Biosynthese	Tyrosin
Phenylalanin Metabolismus	Tyrosin
Arginin Biosynthese	Glutamin
Glycolyse/Gluconeogenese	Acetat
Pyrimidin Metabolismus	Glutamin
Valin, Leucin und Isoleucin Katabolismus	Isoleucin
Tyrosin Metabolismus	Tyrosin
eher nicht relevante Stoffwechselwege	
Porphyrin und Chlorophyll Metabolismus	Glycin
Gallensäure Biosynthese	Glycin, Taurin

4. Diskussion

Neutrophile sind wichtige Immunzellen, deren Fehlregulation zu Autoimmunerkrankungen (Jorch und Kubes 2017) oder bis zur Sepsis (Shen et al. 2017) führen kann.

Es gibt einige metabolische Studien zu Neutrophilen, die Momentaufnahmen darstellen bzw. sich auf einzelne Stoffwechselwege, insbesondere auf den Energiemetabolismus und die Rolle der Mitochondrien, konzentriert haben (Stjernholm 1967; Borregaard und Herlin 1982; Fossati et al. 2003; Maianski et al. 2004).

Metabolomics Studien über Unterschiede zwischen ruhenden und inflammatorischen, aktivierten Neutrophilen - unterteilt in verschiedene Aktivierungsstimuli - sowie den antiinflammatorischen, apoptotischen Neutrophilen gibt es bisher nicht.

4.1. Induktion von Apoptose

Neutrophile haben eine kurze Halbwertszeit im Blut und gehen spontan in Apoptose. Um das Metabolom von gealterten Zellen zu analysieren, wurde Apoptose induziert, indem die Neutrophilen für 30 h inkubiert wurden. Wie erwartet wurden die meisten Neutrophilen (ca. 60 %) apoptotisch. Darüber hinaus waren ca. 15 % der Neutrophilen in Kultur bereits nekrotisch. Obwohl die Zellpopulation inhomogen ist, sollte der Einfluss auf die Ergebnisse gering sein. Da die verschiedenen Proben mit der Kontrolle, also mit ruhenden, nicht apoptotischen Neutrophilen, verglichen werden, kann das Vorhandensein von lebensfähigen Neutrophilen in den Proben der gealterten, apoptotischen Neutrophilen die beobachteten metabolischen Veränderungen abschwächen, so dass kleine Veränderungen im Stoffwechsel übersehen werden könnten. Für die nekrotischen Neutrophilen ist die Situation ähnlich: Weil diese Zellen keine intakte Zellmem-

4. Diskussion

bran mehr besitzen, wird ein Großteil ihrer Metabolite beim Waschen der Zellen in PBS verloren gegangen sein.

4.2. Methodenetablierung

Bevor Metabolomics Untersuchungen zwischen verschiedenen Gruppen von Neutrophilen durchgeführt werden konnten, wurden zuerst die Methoden etabliert. Dafür wurden Zellzahl, Extraktion, Pulsprogramm und Aufnahmeparameter getestet und festgelegt. In Vorexperimenten wurden verschiedene 1D-Pulssequenzen mit Wasserunterdrückung getestet und verglichen (Abbildung 3.1).

Die Methode *Excitation Sculpting* hat zwar die beste Wasserunterdrückung, aber Signale in der Nähe des Wassersignals büßen deutlich an Intensität ein (Berger und Braun 2004). Deswegen ist eine gleichmäßige Quantifizierung aller Signale nicht möglich. Weil die Proben nach der Metabolitextraktion getrocknet und anschließend in D₂O-Puffer aufgenommen wurden, verblieb in den Proben nur eine geringe Menge H₂O, weshalb auch eine weniger vollständige Wasserunterdrückung als die des *Excitation Sculpting* Experiments ausreicht. So verbleibt zwar ein Restwassersignal, aber die Signale in der Nähe der Frequenz des Wassers können quantifiziert werden.

Mit der CPMG-Pulssequenz mit Wasserunterdrückung durch selektive Vorsättigung können Makromoleküle wie Proteine unterdrückt werden, sodass das Ergebnis die Signale kleiner Moleküle fokussiert (Beckonert et al. 2007). Wenn auch nach der Extraktion Reste von Makromolekülen vorhanden wären, könnte das CPMG in einigen spektralen Regionen zu einem Informationsgewinn führen. Weil bei der Extraktion kleiner Moleküle im eindimensionalen NOESY mit Wasserunterdrückung durch selektive Vorsättigung keine größeren Moleküle zu sehen waren - also keine Extraktion von Proteinen stattgefunden hat - bringt die CPMG-Sequenz keine Verbesserung. Bei dem 1. Inkrement des NOESY-Experiments handelt es sich zusätzlich um das de facto Standardexperiment für 1D-Metabolomics, weswegen es für die weiteren Experimente gewählt wurde (McKay 2011).

4. Diskussion

Die ersten Spektren der Metabolitextraktion aus 20 Millionen und aus 70 Millionen Neutrophilen zeigen deutliche, vom Rauschen getrennte Signale. Da für weitere Messungen 20 Millionen Zellen verwendet wurden, fielen bei gleicher Messzeit einige wenig intensive Signale wie NADP^+ unter das Detektionslimit und konnten nicht mehr vom Rauschen getrennt werden (Abbildung 3.3). Die meisten übrigen Signale sind in beiden Proben zufriedenstellend aufgelöst. 20 Millionen Zellen stellen daher einen guten Kompromiss aus der erhältlichen Menge von Neutrophilen und einer handhabbaren NMR-Messzeit von einer Stunde dar. Chokesuwattanaskul et al. zeigten 2018, dass es möglich ist, sogar bei 2,5 Millionen Zellen noch eine gute Auflösung zu haben, wobei die Messzeit bis zu 4 Stunden betrug. Diese Gruppe verwendet dafür ein 700 MHz Spektrometer mit einem auf Protonen optimierten TCI Cryoprobekopf (Chokesuwattanaskul et al. 2018). Die Sensitivität ist daher gerätebedingt deutlich besser als an einem 500 MHz Spektrometer mit einem TCI Cryoprobekopf. Zusätzlich haben sie die Anzahl der Waschschriffe reduziert und sich mit Acetonitril/Wasser für eine Extraktionsmethode entschieden, die nur die polaren Metabolite extrahiert (Beckonert et al. 2007). Die verwendete Messzeit war für einige ihrer Experimente jedoch deutlich über einer Stunde.

Im Gegensatz zu einer nur polaren Extraktion entweder mit Acetonitril/Wasser oder klassisch mit Perchlorsäure erlaubt die Zweiphasenextraktion mit Chloroform/Methanol die Isolierung der polaren und unpolaren Metabolite gleichzeitig. Im Gegensatz zu der stark sauren Perchlorsäure bleibt der pH während der Extraktion im physiologischen Bereich, sodass mögliche pH-Effekte auf die Metabolite ausbleiben (Tyagi et al. 1996). Auch die Stabilität einiger Metabolite ist in Perchlorsäure problematisch (Lin et al. 2007). Beim Einstellen des pHs auf einen physiologischen pH-Wert ändert sich zudem die Ionenstärke, was sich auf die Linienbreite der Spektren sowie auf Signalpositionen auswirken kann (Asiago et al. 2008). In den Spektren der Lipidphase zeigte sich aber, dass die Spektrenqualität inklusive der Linienbreite extrem variabel war und abgesehen von breiten Lösemittelsignalen von Chloroform und Wasser nur eine geringe Anzahl Signale vorhanden war (Abbildung 3.2). Für die weitere Auswertung waren die polaren Extrakte daher vielversprechender.

4. Diskussion

Nach der Chloroform/Methanol-Extraktion waren in einigen Proben noch Reste von Chloroform, Methanol und zum Teil Ethanol zu finden. Ethanol wird Chloroform zur Stabilisierung in geringer Menge zugesetzt, kann aber auch aufgrund der Verwendung als Desinfektionsmittel aus der Raumluft kommen. Dadurch lassen sich Ethanol und Methanol in der Zelle nicht sinnvoll untersuchen, da die Herkunft der Signale nicht eindeutig zugeordnet werden kann. An einem Extraktionstag verblieben so große Reste an Ethanol und Methanol in den Proben, dass die Signalregionen entfernt werden mussten, um die Proben noch verwenden zu können (siehe Abbildung 3.4). Die Ethanol signale sind nur in den Proben intensiv, in denen auch Methanol und Chloroform in größerer Menge vorhanden ist. Das spricht eher dafür, dass das Ethanol aus dem Lösungsmittel stammt, als dass es aus der Laborluft kommt.

Ein Hypotaurinsignal überlagert mit dem Methanolsignal bei 3,35 ppm und ist damit in dem Datensatz mit allen Spektren der ersten Messreihe (genannt Batch 1), in denen die Frequenzbereiche von Ethanol und Methanol entfernt wurden, nicht mehr vorhanden. Bei einer STOCSY-Analyse werden von einer Ausgangsfrequenz aus Korrelation und Kovarianz von Signalen über einen Datensatz von Spektren berechnet. Wenn Teile der Spektren entfernt werden - wie das eine Hypotaurinsignal wegen der Überlagerung mit Methanol - fehlen Korrelationspartner anderer Signale.

STOCSY-Analysen funktionieren dementsprechend besser auf einem Teildatensatz mit weniger Spektren (hier 21), in dem dafür aber weniger Signale entfernt wurden. Die Spektren der drei Proben, bei denen die Trocknung in der Speedvac nicht vollständig erfolgte, wurden deswegen für die STOCSY-Analysen nicht berücksichtigt. So konnte z.B. die STOCSY-Analyse auf das Hypotaurinsignal bei 2,65 ppm nur hilfreiche Ergebnisse für die Identifikation bringen, weil beide Hypotaurintripletts im Datensatz vorhanden waren (vgl. Abbildung 3.7).

4.3. Identifikation der Metabolite

Die Hauptkomponentenanalyse (engl. PCA) ermöglicht globale Analysen über mögliche Gruppen im Datensatz auf Grundlage der vollständigen Spektren oder von Teilberei-

4. Diskussion

chen der Spektren. So kann eine Trennung zwischen Gruppen erzielt werden, ohne dass alle Metabolite zugeordnet sind. Für eine Auswertung von Unterschieden zwischen verschiedenen Gruppen ist aber eine Identifizierung der Metabolitsignale nötig.

Vergleichsspektren stellen dabei den ersten Schritt der Identifikation dar. Dafür sind eigene Vergleichsspektren (gleiches NMR-Spektrometer, gleiche experimentelle Bedingungen, gleicher Puffer) gegenüber Metabolitdatenbanken (z.B. die humane Metabolom Datenbank hmdb) besser geeignet. Bei Datenbankspektren können pH, Referenzsubstanz, Feldstärke und Lösemittel zu abweichenden Signalformen oder Signalpositionen führen.

Das intensivste Signal im Spektrum konnte so der Aminosulfonsäure Taurin zugeordnet werden. Taurin und insbesondere Taurinchloramin sind im Immunsystem an der Regulation von proinflammatorischen Mediatoren beteiligt (Schuller-Levis und Park 2004). Daher könnte die Taurinkonzentration ein interessanter Anhaltspunkt für weitere immunologische Untersuchungen sein. Die Signale von Taurin sind sehr pH-abhängig (Robert et al. 2011), aber in dem verwendeten 100 mM Phosphatpuffer sind sie stabil.

Die Signale einiger Metabolite sind sowohl isoliert als auch charakteristisch genug, dass eine Zuordnung über Vergleichsspektren bereits eine sichere Identifizierung ermöglichen. Für andere Signale - zum Beispiel die der Nukleotide - reichen Vergleichsspektren für eine Identifizierung nicht aus. Die Signale sind dabei konzentrations- und pH-abhängig verschoben (Huang et al. 2004). Im Fall von AMP, ADP und ATP konnte mittels *spiking* - der Zugabe einer sehr kleinen Menge der vermuteten Substanz in eine vorher bereits gemessene Probe - eine Zuordnung der Signale erreicht werden.

Weitere Signale lassen sich zwar zuordnen, befinden sich aber in so sehr überlagerten Bereichen, dass eine gute Quantifizierung nicht möglich ist. Es wurden daher verschiedene *Pure Shift* Methoden getestet, also Spektren, in denen die skalare Kopplung unterdrückt und im Besten Fall dadurch die Auflösung der einzelnen Signale verbessert wird. Final wurde insbesondere ein pseudo-zweidimensionales J-res und dessen 1D-Projektion verwendet. Damit konnte überprüft werden, ob die bestehende Zuordnung passte und ob weitere Signale entdeckt bzw. näher charakterisiert werden konnten. Für Metabolite wie Lactat, Alanin, Glutamin, Glutamat und Glutathion konnten weitere Signale zugeord-

4. Diskussion

net und damit ihre Identifikation bestätigt werden. Die Überlagerung von Methanol und Hypotaurin konnte zudem aufgelöst werden.

4.4. Unterschiede der beiden Messreihen

Die Messungen wurden zuerst mit 24 Proben von 6 Probandinnen gestartet. Damit sollte getestet werden, ob relevante Unterschiede sichtbar sein würden, um anschließend die Aussagekraft der Ergebnisse durch eine zweite Messreihe mit weiteren 24 Proben von 6 neuen Probandinnen zu überprüfen. In der Zwischenzeit war das Labor der Mikrobiologie, wo die Proben entnommen und bis zum gereinigten Zellpellet aufbereitet wurden, in ein anderes Gebäude umgezogen. Zusätzlich wurden die 6 neuen Proben in einer anderen Jahreszeit entnommen. Aufgrund des ausgeprägten Batch-Effektes wurden die beiden Messreihen daher als zwei getrennte Batches betrachtet, die sowohl gemeinsam als auch einzeln ausgewertet wurden.

4.5. Unterschiede im Metabolismus der untersuchten Gruppen

4.5.1. Metabolische Änderungen bei Aktivierung der Neutrophilen

Bei der verwendeten Dauer der Aktivierung und der verwendeten Konzentration an LPS bzw. TNF lässt sich kein Unterschied zwischen den beiden Aktivierungsstimuli in den metabolischen Profilen nachweisen. Kein einziger Metabolit weist signifikante Unterschiede zwischen den beiden aktivierten Gruppen auf. Dies deutet darauf hin, dass entweder die Dauer der Aktivierung zu kurz bemessen war, oder dass die metabolischen Veränderungen durch die Aktivierung unabhängig von ihrem Auslöser sind.

Die aktivierten Neutrophilen zeigen in zwei Metaboliten Unterschiede zur nicht-aktivierten Kontrolle: Zunahmen in Lactat und in Phosphocholin. Die Zunahme an Phosphocholin ist bei den TNF aktivierten Zellen nur für das niedrigste FDR (*false discovery rate*) Level signifikant, bei LPS aktivierten Zellen zeigt sich nur ein Trend. Lactat ist ein Marker für Entzündungen unter hypoxischen Bedingungen (Fitzpatrick und S. P. Young 2013).

4. Diskussion

Bei einem Mangel an Sauerstoff kann NADH nicht über die oxidative Phosphorylierung wieder zu NAD^+ oxidiert werden. Stattdessen kann Pyruvat, das Produkt der Glycolyse, anaerob zu Lactat reduziert werden (Fitzpatrick und S. P. Young 2013). Die anaerobe Glycolyse erzeugt deutlich weniger Energie als die aerobe Glycolyse mit anschließendem Citronensäurecyclus und Atmungskette. Für Neutrophile ist ein vollständiger Citronensäurecyclus nachgewiesen (Stjernholm 1967), trotzdem wird ATP bei Neutrophilen hauptsächlich in der Glycolyse gebildet (Borregaard und Herlin 1982). Hypoxische Bedingungen liegen zwar am Ort einer Infektion vor, dass aber auch isolierte Neutrophile, die ohne Sauerstoffmangel aktiviert wurden, mehr Lactat erzeugen, bestätigt, dass die Glycolyse eine wichtigere Rolle als der Citronensäurecyclus spielt.

4.5.2. Metabolische Änderungen bei Alterung und Apoptose der Neutrophilen

Die meisten Unterschiede wurden zwischen gealterten, apoptotischen Neutrophilen und der Kontrollgruppe gefunden (Tabelle 3.1). Gealterte, apoptotische Neutrophile zeigten eine Abnahme von ATP, ADP, Glutathion, Hypotaurin, Phosphocholin und Taurin. Die Konzentrationen von NAD^+ , Acetat und Glutamin nahmen dagegen zu. Die Veränderungen von ATP, NAD^+ , Hypotaurin und Taurin werden in den nächsten Abschnitten gesondert behandelt.

Einige der Unterschiede - nämlich die Metabolite Glutamin, Lactat und Phosphocholin - sind entgegengesetzt zu früheren Studien (Nunn et al. 1996). Abweichungen können an unterschiedlichen Studiendesigns liegen: die verwendete Zeit zur Induktion der Apoptose war in der Arbeit von Nunn et al. deutlich kürzer (20-26 h) und die Extraktion erfolgte mit Perchlorsäure. Nunn et al. stellen die Hypothese auf, dass die Glutamin und Lactat Konzentrationen bei gealterten, apoptotischen Proben erniedrigt sind, weil die beiden Metabolite als alternative Energiequelle eingesetzt werden. Die Lactat Konzentration bleibt in dieser Arbeit dagegen unverändert, während die Glutamin Konzentration sogar steigt. Der unterschiedliche Zeitraum könnte bedeuten, dass die Energiegewinnung im späteren Zeitraum der Apoptose sich erneut verändert.

4. Diskussion

Die Abnahme an Phosphocholin bei gealterten, apoptotischen Zellen könnte mit einem Umbau der Zellmembran während der Apoptose zusammenhängen (Fadeel 2004). Dass bei Nunn et al. hier stattdessen eine Zunahme gezeigt wurde, könnte erneut an dem unterschiedlichen Alter der Zellen liegen (Nunn et al. 1996).

Eine andere Erklärung wäre ein Zusammenhang zur Signaltransduktion. *Second Messenger* wie Diacylglycerol und Phosphatidsäure werden aus Phospholipiden hergestellt (Besterman, Duronio und Cuatrecasas 1986). Änderungen im Phosphocholingehalt könnten einen Einfluss auf die Signaltransduktion bei Neutrophilen haben. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass die Aktivität der Phospholipase D, die Phosphatidylcholin in Phosphatidsäure und Cholin spalten kann, bei Aktivierung der Neutrophilen zunimmt, während deren Inhibition den oxidativen Burst der Neutrophilen reduziert (Hu, Liu und Shen 2011). Cholin wiederum kann zu Phosphocholin phosphoryliert werden.

4.6. Beteiligte Stoffwechselwege bei Aktivierung und Alterung von Neutrophilen

Über die Analyse der Unterschiede in einzelnen Metaboliten hinaus ist insbesondere die Frage nach den beteiligten Stoffwechselwegen relevant. Stoffwechselwege, deren Metabolite (hauptsächlich bei den gealterten, apoptotischen Neutrophilen) signifikant verändert waren, sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Dabei sind sehr wahrscheinlich nicht alle dieser Stoffwechselwege verändert bzw. von Bedeutung. Zum Einen ist nicht jeder dieser Wege für reife Neutrophile nachgewiesen und zum Anderen gibt es viele Metabolite, die in verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt sind. Wenn nur wenige Metabolite aus einem Stoffwechselweg Veränderungen zeigen, bzw. wenn diese Veränderungen sehr klein sind, werden sie hier als weniger relevant betrachtet.

Taurin, NAD^+ und ATP haben intrazelluläre und extrazelluläre Effekte auf Neutrophile und werden deshalb nachfolgend diskutiert.

4. Diskussion

4.6.1. Taurin und Hypotaurin Metabolismus

Taurin kann als Aminosulfonsäure im Gegensatz zu Aminocarbonsäuren nicht in Peptide und Proteine eingebaut werden. Es wird entweder ausgehend von Cystein über 3-Sulfinoalanin und Hypotaurin synthetisiert oder über die Nahrung aufgenommen (Kim und Cha 2014).

Taurin ist in Neutrophilen mit etwa 21 nmol pro 10^6 Zellen sehr hoch konzentriert. Das entspricht etwa einer Konzentration von 50 mM in der Zelle (T. R. Green et al. 1991). In dieser Studie haben die Kontrollneutrophile etwa 12 nmol pro 10^6 Zellen, also etwa 26 mM pro Zelle. Die Konzentration wurde dabei ausgehend von dem TSP- d_4 Signal berechnet, dessen Konzentration nicht absolut exakt eingestellt, aber für alle Proben gleich war. Im Vergleich dazu wurden die Taurin und Hypotaurinkonzentrationen bei Green et al. per HPLC bestimmt.

Zusätzlich zu Taurin ist auch das im Stoffwechsel verwandte Hypotaurin im Cytoplasma von Neutrophilen nachweisbar. Green et al. messen für ruhende Neutrophile ein Verhältnis von Hypotaurin zu Taurin von 1 : 50. In Folge einer 30 minütigen Aktivierung mit Zymosan nahm die Hypotaurinkonzentration deutlich ab (Faktor 5). Die Konzentration von Taurin nahm gleichzeitig nur leicht ab - das Verhältnis von Hypotaurin zu Taurin erhöhte sich auf 1 : 260 (T. R. Green et al. 1991). Die große Veränderung der Hypotaurin-Konzentration setzen die Autoren mit einer Reaktion mit Hydroxylradikalen während der Aktivierung in Verbindung. Hier wurde ein Verhältnis von Hypotaurin zu Taurin von 1 : 18 in ruhenden Neutrophilen und Aktivierung mit LPS bzw. mit TNF sowie nach Alterung bzw. Apoptose von 1 : 19 gemessen. Taurin und Hypotaurin blieben nach der Aktivierung konstant, bei gealterten, apoptotischen Neutrophilen nahmen beide gleich stark ab. Da bei Green et al. ein anderer Aktivierungsstimuli verwendet wird (in Serum opsoniertes Zymosan), war die Aktivierung dort möglicherweise deutlich effektiver. Dabei wurde der *Priming* Effekt bei Neutrophilen genutzt. Eine Inkubation mit einem Aktivierungsstimuli macht die Zellen für eine Aktivierung mit einem anderen Stimuli deutlich sensitiver (Guthrie et al. 1984). Zudem ist auch für Neutrophile

4. Diskussion

beschrieben, dass es zu einer Desensibilisierung gegenüber einem Stimulus und sogar zur Internalisierung von Rezeptoren kommen kann (Didsbury et al. 1991).

Taurin wird über einen Taurintransporter aus dem Blut in die Neutrophilen aufgenommen (Marcinkiewicz und Kontny 2014). Taurin und Hypotaurin fungieren als Antioxidantien, um Schäden durch Entzündungen innerhalb der Zelle zu verringern (Cunningham, Tipton und Dixon 1998). So reagiert Taurin insbesondere mit hypochloriger Säure, welche von der neutrophilen Myeloperoxidase produziert wird. Dabei entsteht Taurinchloramin, welches weniger aggressiv ist als hypochlorige Säure (Abbildung 4.1) (Kim und Cha 2014).

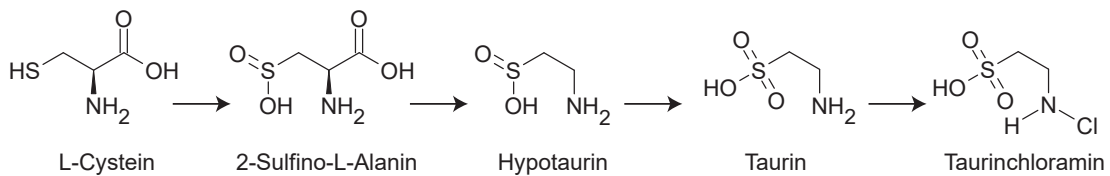


Abbildung 4.1.: Stoffwechselweg von Taurin. Ausgehend von L-Cystein werden Hypotaurin und Taurin in der Zelle gebildet. Taurin kann in Neutrophilen durch Reaktion mit hypochloriger Säure zu Taurinchloramin reagieren, welches weniger schädlich für die Zelle ist als die Säure.

Ein Zusatz von Taurin ins Trinkwasser von Ratten führt zu erhöhten Bluttaurinwerten. Aus diesen Ratten isolierte Neutrophile haben eine verstärkte Neigung zur Phagozytose und einen stärkeren bakteriziden Effekt (Masuda, Horisaka und Koeda 1984). Da hier in gealterten, apoptotischen Neutrophilen eine leichte Abnahme von Taurin gemessen wurde, könnte das bedeuten, dass Taurin in älteren Zellen keine so wichtige Rolle mehr spielt und die Synthese nicht fortgesetzt wird.

Eine frühe Studie zum Metabolismus von Neutrophilen hat keine signifikanten Veränderungen im Taurinlevel von apoptotischen Neutrophilen gefunden, im Trend zeigte sich aber auch eine leichte Abnahme (Nunn et al. 1996). Hier ist die Taurinkonzentration in gealterten, apoptotischen Neutrophilen signifikant erniedrigt. Der Unterschied könnte auch hier daran liegen, dass die verwendete Zeit zur Induktion der Apoptose bei Nunn et al. kürzer war und dass weniger Zellen eingesetzt wurden.

Im Gegensatz zur Nekrose bleibt bei der Apoptose die Zellmembran intakt, sodass das Zwitterion Taurin, welches sehr schlecht lipidlöslich ist, nicht unspezifisch aus der Zelle

4. Diskussion

diffundieren kann (Kobayashi 2015). Das Zellmedium, in dem die Apoptose induziert wurde, wurde nicht aufgefangen und gemessen. Daher kann nicht genau festgestellt werden, ob ein gezielter Taurintransport ins Medium stattgefunden hat oder ob Taurin metabolisiert wurde.

4.6.2. NAD⁺ Metabolismus

NAD⁺ ist als Coenzym an vielen Redoxreaktionen in der Zelle beteiligt. Es kann ein Proton und zwei Elektronen aufnehmen und wird dabei zu NADH (Cantó, Menzies und Auwerx 2015).

Die deutlich erhöhte Konzentration von NAD⁺ in gealterten, apoptotischen Neutrophilen im Vergleich zu Kontroll- und aktivierten Zellen ist vorher noch nicht beschrieben worden. NAD⁺ wird in der Glycolyse und im Citronensäurecyclus in NADH umgewandelt. Dieses wird dann in der Atmungskette oxidiert, wobei ATP synthetisiert und NAD⁺ wieder gebildet wird. Bei höherem Energiebedarf würde also mehr NAD⁺ entstehen. Dagegen spricht das erniedrigte ATP-Level in gealterten, apoptotischen Neutrophilen. Dieser Widerspruch könnte dadurch ausgehoben werden, dass gleichzeitig mit der verstärkten ATP-Produktion der ATP-Verbrauch auch ansteigt. Diese Hypothese passt zu einer Studie, bei der die Glycolysegeschwindigkeit bei Neutrophilen während der Phagocytose gleichbleibt, aber das intrazelluläre ATP Level abnimmt (Borregaard und Herlin 1982).

NAD⁺ spielt neben dem Energiemetabolismus auch eine Rolle als Cofaktor einer Klasse der Histon-Deacetylasen, den Sirtuinen. Diese Enzymklasse findet als Regulator von epigenetischen Modifikationen viel Beachtung (Houtkooper, Pirinen und Auwerx 2012). Es ist möglich, dass NAD⁺ die Genexpression in Neutrophilen beeinflusst, insbesondere, da ein Zusammenhang von Sirtuinen mit der Apoptose gezeigt wurde (Xia et al. 2009). Die Metabolite, aus denen NAD⁺ gebildet werden - Tryptophan, Nicotinamid und Nicotinsäure - wurden nicht detektiert. Es stellt sich daher die Frage, woher das zusätzliche NAD⁺ kommt. Das Verhältnis von NAD⁺ zu NADH ist *in vivo* fast vollständig auf Seiten von NAD⁺, sodass auch das nicht die Quelle einer solchen Steigerung sein kann.

4. Diskussion

Es gibt eine Studie über die extrazelluläre Wirkung von NAD^+ , welches spontane Apoptose herauszögert (Pliyev, Ivanova und Savchenko 2014). Zusätzlich ist bekannt, dass NAD^+ einen aktivierenden Effekt auf Neutrophile und andere Immunzellen hat (Adriouch et al. 2012).

4.6.3. ATP Metabolismus

ATP ist die Energiewährung der Zelle. Interessanterweise war die ATP Konzentration bei gealterten, apoptotischen Neutrophilen im Vergleich zur Kontrolle und im Vergleich zu den aktivierten Neutrophilen reduziert. Dies kann entweder für einen größeren Energiebedarf in Apoptose oder für eine geringere Produktion sprechen. Aktivierte Neutrophile verwenden ATP extrazellulär für eine purinerge Signalübertragung (Bao et al. 2014). Zusätzlich setzen aktivierte Neutrophile an Orten mit Hypoxie oder Infektion ATP frei, welches als extrazellulär umgewandelt in Adenosin u.a. die Barrierefunktion von Endothelzellen moduliert (Eltzschig, MacManus und Colgan 2008). Dieses ATP wird in den Mitochondrien generiert; gleichzeitig bleibt aber die intrazelluläre ATP Konzentration aktivierter Neutrophiler konstant (Bao et al. 2014). Eine weitere Studie vergleicht das ATP zu ADP Verhältnis in ruhenden und apoptotischen Neutrophilen und findet keine Veränderung (Nunn et al. 1996). Hier konnte dagegen eine Abnahme in ATP in gealterten, apoptotischen Neutrophilen gezeigt werden. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten sich durch andere Zeiträume in den Experimenten erklären lassen.

4.7. Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die metabolischen Veränderungen in humanen Neutrophilen untersucht. Dabei wurden zelluläre Zustände gewählt, die Start- und Endpunkt einer Infektion darstellen und daher für eine immunometabolische Untersuchung von großem Interesse sind. Diese Zustände sind Aktivierung und Alterung bzw. Apoptose von Neutrophilen.

4. Diskussion

Für die aktivierten Neutrophilen wurden dabei zwei unterschiedliche Aktivierungsstimuli betrachtet: TNF als körpereigenes Zytokin und LPS als bakterielles *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP). Damit kann getestet werden, ob die Neutrophilen zwischen körperfremden und körpereigenen Signalen unterscheiden können.

Nach Optimierung der experimentellen Parameter wurden die wasserlöslichen Metabolite von vier Gruppen (Kontrolle, TNF, LPS, Alterung/Apoptose) extrahiert. Die metabolischen Profile der Extrakte wurden mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Metabolite wurden dann - unterstützt durch verschiedene experimentelle und statistische Verfahren - zugeordnet und die Gruppen statistisch auf ihre Unterschiede hin untersucht.

Die mit TNF bzw. LPS aktivierten Neutrophilenextrakte zeigen keine Unterschiede zueinander und nur wenige Unterschiede zur Kontrollgruppe. Möglicherweise ist es zu einer Desensibilisierung gegenüber den Stimuli oder zu einer Internalisierung der Rezeptoren gekommen, sodass die Neutrophilen nicht effizient aktiviert wurden.

Bei Alterung und Apoptose zeigten sich deutliche Unterschiede in vielen Metabolitkonzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe. Der größte Unterschied liegt in einer deutlichen Zunahme der NAD^+ -Konzentration. NAD^+ spielt im Energiemetabolismus eine wichtige Rolle und wird in der Atmungskette zusammen mit ATP gebildet. Für Glutamin und Lactat - zwei Moleküle, die in der Zelle als alternative Energiequelle genutzt werden können - zeigen sich entgegengesetzte Veränderungen zur Kontrolle im Vergleich zu einer Arbeit, die einige Stunden jüngere apoptotische Neutrophile untersucht hat. Damit stellt sich die Frage, ob die Energiegewinnung sich im Verlauf der Apoptose mehrfach ändert.

Bei der Untersuchung verschiedener Aktivierungsstimuli wurden keine Unterschiede in den metabolischen Profilen im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden. Aufgrund von *Priming* Prozessen ist es möglich, dass die Inkubation mit nur je einem Stimulus nicht zu einer effizienten Aktivierung geführt hat. Eine Kombination verschiedener Stimuli könnte erfolgversprechender für die Untersuchung der metabolischen Veränderungen nach Aktivierung sein. Eine Trennung zwischen nur körperfremden und nur körpereigenen Stimuli ist dann allerdings nicht gut umsetzbar. Alternativ könnte versucht werden,

4. Diskussion

weiterhin nur mit einem Stimulus zu aktivieren, aber unterschiedliche Zeiten und Konzentrationen auszuprobieren und zu vergleichen.

Da Nunn und Mitarbeiter für kürzer gealterte Neutrophile entgegengesetzte Unterschiede in Lactat und Glutamin zu der Kontrollgruppe finden (Nunn et al. 1996), wäre es sehr interessant, den Zeitverlauf während der Alterung hin zur Apoptose besser zu untersuchen. Wenn es tatsächlich ein Umschalten zwischen verschiedenen Arten der Energiegewinnung gibt, ist eine Messung zu verschiedenen Zeitpunkten vielversprechend. Zum Einen könnten pro Proband unterschiedlich stark gealterte Neutrophile gemessen und verglichen werden. Zum Anderen könnten in Fluxmessungen an unterschiedlich alten Neutrophilen isotoopenmarkierte Metabolite (z.B. Glucose, Lactat oder Glutamin) ins Medium gegeben werden, um zu verfolgen, in welchen Molekülen sich die Isotoopenmarkierungen wiederfinden lassen. Für diese auf bestimmte Metabolite gezielte Fragestellung könnte dann auch die Massenspektrometrie zum Einsatz kommen, die eine niedrigere Nachweisgrenze als die NMR-Spektroskopie aufweist.

5. Literatur

- Adriouch, S., Haag, F., Boyer, O., Seman, M. und Koch-Nolte, F. (2012). Extracellular NAD^+ : a danger signal hindering regulatory T cells. *Microbes and Infection* *14*.14, 1284–1292.
- Aga, E., Katschinski, D.M., Zandbergen, G. van, Laufs, H., Hansen, B., Müller, K., Solbach, W. und Laskay, T. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *The Journal of Immunology* *169*.2, 898–905.
- Alonso, A., Marsal, S. und Julià, A. (2015). Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* *3*, 23.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D. und Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology* *30*, 459–489.
- Asiago, V.M., Gowda, G.N., Zhang, S., Shanaiah, N., Clark, J. und Raftery, D. (2008). Use of EDTA to minimize ionic strength dependent frequency shifts in the ^1H NMR spectra of urine. *Metabolomics* *4*.4, 328–336.
- Aue, W., Karhan, J. und Ernst, R. (1976). Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics* *64*.10, 4226–4227.
- Bao, Y., Ledderose, C., Seier, T., Graf, A.F., Brix, B., Chong, E. und Junger, W.G. (2014). Mitochondria regulate neutrophil activation by generating ATP for autocrine purinergic signaling. *Journal of Biological Chemistry* *289*.39, 26794–26803.

5. Literatur

- Beckonert, O., Keun, H.C., Ebbels, T.M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J.C. und Nicholson, J.K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols* 2.11, 2692–2703.
- Beek, N. van, Zillikens, D. und Schmidt, E. (2018). Diagnosis of autoimmune bullous diseases. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 16.9, 1077–1091.
- Bell, R. und Saunders, J. (1970). Correlation of the intramolecular nuclear Overhauser effect with internuclear distance. *Canadian Journal of Chemistry* 48.7, 1114–1122.
- Benjamini, Y. und Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57.1, 289–300.
- Berger, S. und Braun, S. (2004). 200 and more NMR experiments (Wiley-VCH Weinheim).
- Besterman, J.M., Duronio, V. und Cuatrecasas, P. (1986). Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: a pathway for generation of a second messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83.18, 6785–6789.
- Böhmer, R., Trinkle, L. und Staneck, J.L. (1992). Dose effects of LPS on neutrophils in a whole blood flow cytometric assay of phagocytosis and oxidative burst. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 13.5, 525–531.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33.5, 657–670.
- Borregaard, N. und Herlin, T. (1982). Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *The Journal of Clinical Investigation* 70.3, 550–557.
- Brittingham, R., Uitto, J. und Fertala, A. (2006). High-affinity binding of the NC1 domain of collagen VII to laminin 5 and collagen IV. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343, 692–699.
- Bro, R. und Smilde, A.K. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods* 6.9, 2812–2831.

5. Literatur

- Cantó, C., Menzies, K.J. und Auwerx, J. (2015). NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metabolism* 22.1, 31–53.
- Carr, H.Y. und Purcell, E.M. (1954). Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Physical Review* 94.3, 630–638.
- Chiriac, M., Roesler, J., Sindrilaru, A., Scharffetter-Kochanek, K., Zillikens, D. und Sitaru, C. (2007). NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 212.1, 56–65.
- Chokesuwattanaskul, S., Phelan, M.M., Edwards, S.W. und Wright, H.L. (2018). A robust intracellular metabolite extraction protocol for human neutrophil metabolic profiling. *PloS One* 13.12, e0209270.
- Claridge, T.D. (2016). *High-resolution NMR techniques in organic chemistry* Bd. 27. (Elsevier).
- Cloarec, O., Dumas, M.-E., Craig, A., Barton, R.H., Trygg, J., Hudson, J., Blancher, C., Gauguier, D., Lindon, J.C., Holmes, E. und Nicholson, J. (2005). Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ¹H NMR data sets. *Analytical Chemistry* 77.5, 1282–1289.
- Cunningham, C., Tipton, F.K. und Dixon, B.H. (1998). Conversion of taurine into N-chlorotaurine (taurine chloramine) and sulphoacetaldehyde in response to oxidative stress. *Biochemical Journal* 330.2, 939–945.
- Dang, N. und Murrell, D.F. (2008). Mutation analysis and characterization of COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Experimental Dermatology* 17, 553–568.
- Delgado-Rizo, V., Martínez-Guzmán, M.A., Iñiguez-Gutierrez, L., García-Orozco, A., Alvarado-Navarro, A. und Fafutis-Morris, M. (2017). Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. *Frontiers in Immunology* 8, 81.
- Didsbury, J.R., Uhing, R.J., Tomhave, E., Gerard, C., Gerard, N. und Snyderman, R. (1991). Receptor class desensitization of leukocyte chemoattractant receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88.24, 11564–11568.

5. Literatur

- Dona, A.C., Jiménez, B., Schäfer, H., Humpfer, E., Spraul, M., Lewis, M.R., Pearce, J.T., Holmes, E., Lindon, J.C. und Nicholson, J.K. (2014). Precision high-throughput proton NMR spectroscopy of human urine, serum, and plasma for large-scale metabolic phenotyping. *Analytical Chemistry* 86.19, 9887–9894.
- Dona, A.C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E.A., Varshavi, D., Veselkov, K. und Everett, J.R. (2016). A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabolomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 14, 135–153.
- El Kebir, D. und Filep, J.G. (2010). Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *The Scientific World Journal* 10.
- Elias, P.M. (2007). The skin barrier as an innate immune element. In *Seminars in Immunopathology*, Bd. 29. 1. (Springer).
- Eltzschig, H.K., MacManus, C.F. und Colgan, S.P. (2008). Neutrophils as sources of extracellular nucleotides: functional consequences at the vascular interface. *Trends in Cardiovascular Medicine* 18.3, 103–107.
- Fadeel, B. (2004). Plasma membrane alterations during apoptosis: role in corpse clearance. *Antioxidants and Redox Signaling* 6.2, 269–275.
- Fitzpatrick, M. und Young, S.P. (2013). Metabolomics—a novel window into inflammatory disease. *Swiss Medical Weekly* 143, w13743.
- Foroozandeh, M., Adams, R.W., Meharry, N.J., Jeannerat, D., Nilsson, M. und Morris, G.A. (2014). Ultrahigh-resolution NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* 53.27, 6990–6992.
- Fossati, G., Moulding, D.A., Spiller, D.G., Moots, R.J., White, M.R. und Edwards, S.W. (2003). The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *The Journal of Immunology* 170.4, 1964–1972.
- Fritsch, P. und Schwarz, T. (2018). *Dermatologie Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas.* (Springer-Verlag).

5. Literatur

- Gebauer, J.M., Flachsenberg, F., Windler, C., Richer, B., Baumann, U. und Seeger, K. (2020). Structural and biophysical characterization of the type VII collagen vWFA2 subdomain leads to identification of two binding sites. *FEBS Open Bio* *10.4*, 580–592.
- Gey, C. und Seeger, K. (2013). Metabolic changes during cellular senescence investigated by proton NMR-spectroscopy. *Mechanisms of Ageing and Development* *134.3-4*, 130–138.
- Green, T.R., Fellman, J.H., Eicher, A.L. und Pratt, K.L. (1991). Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* *1073.1*, 91–97.
- Guthrie, L.A., McPHAIL, L.C., Henson, P.M. und Johnston Jr, R. (1984). Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *The Journal of Experimental Medicine* *160.6*, 1656–1671.
- Hirose, M., Schilf, P., Zarse, K., Busch, H., Fuellen, G., Jöhren, O., Köhling, R., König, I.R., Richer, B., Rupp, J., Schwaninger, M., Seeger, K., Sina, C., Ristow, M. und Ibrahim, S.M. (2019). Maternally inherited differences within mitochondrial Complex I control murine healthspan. *Genes* *10.7*, 532.
- Houtkooper, R.H., Pirinen, E. und Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *13.4*, 225–238.
- Hu, T., Liu, Z. und Shen, X. (2011). Roles of phospholipase D in phorbol myristate acetate-stimulated neutrophil respiratory burst. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* *15.3*, 647–653.
- Huang, S.Y., Anklin, C., Walls, J.D. und Lin, Y.-Y. (2004). Sizable concentration-dependent frequency shifts in solution NMR using sensitive probes. *Journal of the American Chemical Society* *126.49*, 15936–15937.
- Hwang, T.-L. und Shaka, A. (1995). Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* *112.2*, 275–279.
- Jorch, S.K. und Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature Medicine* *23.3*, 279–287.

5. Literatur

- Keeler, J. (2013). *Understanding NMR spectroscopy* (John Wiley & Sons).
- Kim, C. und Cha, Y.-N. (2014). Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects. *Amino Acids* *46.1*, 89–100.
- Kobayashi, Y. (2015). Neutrophil biology: an update. *EXCLI Journal* *14*, 220.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., El-Deiry, W., Golstein, P., Green, D. et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation* *16.1*, 3–11.
- Lawrence, M.B., Kansas, G.S., Kunkel, E.J. und Ley, K. (1997). Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L, P, E). *The Journal of Cell Biology* *136.3*, 717–727.
- Lee, I.J., Hom, K., Bai, G. und Shapiro, M. (2009). NMR metabolomic analysis of caco-2 cell differentiation. *Journal of Proteome Research* *8.8*, 4104–4108.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. und Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* *7.9*, 678–689.
- Lin, C.Y., Wu, H., Tjeerdema, R.S. und Viant, M.R. (2007). Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics* *3.1*, 55–67.
- Liu, Z., Giudice, G.J., Zhou, X., Swartz, S.J., Troy, J.L., Fairley, J.A., Till, G.O., Diaz, L.A. et al. (1997). A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *The Journal of Clinical Investigation* *100.5*, 1256–1263.
- Lookingbill, D.P. und Marks, J.G. (1986). *Principles of dermatology* (Saunders).
- Maianski, N., Geissler, J., Srinivasula, S., Alnemri, E., Roos, D. und Kuijpers, T. (2004). Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death & Differentiation* *11.2*, 143–153.
- Marcinkiewicz, J. und Kontny, E. (2014). Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids* *46.1*, 7–20.

5. Literatur

- Masuda, M., Horisaka, K. und Koeda, T. (1984). Influences of taurine on functions of rat neutrophils. *The Japanese Journal of Pharmacology* 34.1, 116–118.
- Mathis, D. und Shoelson, S.E. (2011). Immunometabolism: an emerging frontier. *Nature Reviews Immunology* 11.2, 81–83.
- Mayadas, T.N., Cullere, X. und Lowell, C.A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 9, 181–218.
- McKay, R.T. (2011). How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* 38.5, 197–220.
- Meiboom, S. und Gill, D. (1958). Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Review of Scientific Instruments* 29.8, 688–691.
- Nittono, H., Fukushima, M., Yano, A. und Moriya, H. (2012). The power of kawaii: Viewing cute images promotes a careful behavior and narrows attentional focus. *PLoS One* 7.9, e46362.
- Nunn, A.V., Barnard, M.L., Bhakoo, K., Murray, J., Chilvers, E.J. und Bell, J.D. (1996). Characterisation of secondary metabolites associated with neutrophil apoptosis. *FEBS Letters* 392.3, 295–298.
- O'Neill, L.A., Kishton, R.J. und Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology* 16.9, 553.
- Ortega-Gómez, A., Perretti, M. und Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Molecular Medicine* 5.5, 661–674.
- Payne, C.M., Glasser, L., Tischler, M.E., Wyckoff, D., Cromey, D., Fiederlein, R. und Bohnert, O. (1994). Programmed cell death of the normal human neutrophil: an in vitro model of senescence. *Microscopy Research and Technique* 28.4, 327–344.
- Pliyev, B.K., Ivanova, A.V. und Savchenko, V.G. (2014). Extracellular NAD⁺ inhibits human neutrophil apoptosis. *Apoptosis* 19.4, 581–593.
- Richer, B.C., Salei, N., Laskay, T. und Seeger, K. (2018). Changes in neutrophil metabolism upon activation and aging. *Inflammation* 41.2, 710–721.
- Richer, B.C. und Seeger, K. (2014). The hinge region of type VII collagen is intrinsically disordered. *Matrix Biology* 36, 77–83.

5. Literatur

- Robert, O., Sabatier, J., Desoubzdanne, D., Lalande, J., Balayssac, S., Gilard, V., Martino, R. und Malet-Martino, M. (2011). pH optimization for a reliable quantification of brain tumor cell and tissue extracts with ^1H NMR: focus on choline-containing compounds and taurine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399, 987–999.
- Schuller-Levis, G.B. und Park, E. (2004). Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochemical Research* 29, 117–126.
- Shen, X., Cao, K., Jiang, J.-p., Guan, W.-X. und Du, J.-F. (2017). Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21.9, 1687–1697.
- Simes, R.J. (1986). An improved Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 73.3, 751–754.
- Soler-Rodriguez, A.M., Zhang, H., Lichenstein, H.S., Qureshi, N., Niesel, D.W., Crowe, S.E., Peterson, J.W. und Klimpel, G.R. (2000). Neutrophil activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14. *The Journal of Immunology* 164.5, 2674–2683.
- Stjernholm, R.L. (1967). Carbohydrate metabolism in leukocytes VII. Metabolism of glucose, acetate, and propionate by human plasma cells. *Journal of Bacteriology* 93.5, 1657–1661.
- Tak, T., Tesselaar, K., Pillay, J., Borghans, J.A. und Koenderman, L. (2013). What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *Journal of Leukocyte Biology* 94.4, 595–601.
- Teng, T.-S., Ji, A.-l., Ji, X.-Y. und Li, Y.-Z. (2017). Neutrophils and immunity: from bactericidal action to being conquered. *Journal of Immunology Research* 2017.
- Tyagi, R.K., Azrad, A., Degani, H. und Salomon, Y. (1996). Simultaneous extraction of cellular lipids and water-soluble metabolites: Evaluation by NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* 35.2, 194–200.
- Voss, K., Hong, H.S., Bader, J.E., Sugiura, A., Lyssiotis, C.A. und Rathmell, J.C. (2021). A guide to interrogating immunometabolism. *Nature Reviews Immunology*, 1–16.

5. Literatur

- Windler, C., Gey, C. und Seeger, K. (2017). Skin melanocytes and fibroblasts show different changes in choline metabolism during cellular senescence. *Mechanisms of Ageing and Development* *164*, 82–90.
- Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D.D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S. et al. (2009). HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research* *37*, D603–D610.
- Wishart, D.S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A.C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S. et al. (2007). HMDB: the human metabolome database. *Nucleic Acids Research* *35*.suppl_1, D521–D526.
- Xia, W., Wang, Z., Wang, Q., Han, J., Zhao, C., Hong, Y., Zeng, L., Tang, L. und Ying, W. (2009). Roles of NAD^+/NADH and $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ in cell death. *Current Pharmaceutical Design* *15*.1, 12–19.
- Zangger, K. (2015). Pure shift NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* *86*, 1–20.
- Zangger, K. und Sterk, H. (1997). Homonuclear broadband-decoupled NMR spectra. *Journal of Magnetic Resonance* *2*.124, 486–489.

A. Anhang

A.1. Pulsprogramme

A.1.1. cpmgpr1d

```
;cpmgpr1d
;avance-version (12/01/11)
;1D experiment with
; T2 filter using Carr-Purcell-Meiboom-
Gill sequence
;using f1 presaturation
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"d11=30m"
"d12=20u"
"DELTA1=d20-p1*2/3.1416"
"DELTA2=d20-de"
"acqt0=0"
baseopt_echo
1 ze
2 30m
d12 pl9:f1
d1 cw:f1 ph29
4u do:f1
d12 pl1:f1
p1 ph1
DELTA1
p2 ph2
d20
3 d20
p2 ph2
d20
lo to 3 times l4
d20
p2 ph2
```

```
DELTA2
go=2 ph31
30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit
ph1=0 0 2 2 1 1 3 3
ph2=1 3 1 3 0 2 0 2
ph29=0
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3
;p1 : f1 channel - power level for pulse
(default)
;p19 : f1 channel - power level for presatu-
ration
;p1 : f1 channel - 90 degree high power
pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power
pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d20: fixed echo time to allow elimination
of J-mod. effects
; d20 should be « 1/J ,but > (50 * P2) [1-2
msec]
;l4: loop for T2 filter [4 - 20]
;ns: 1 * n, total number of scans: NS * TD0
;ds: 16
;$Id: cpmgpr1d,v 1.8 2012/01/31 17:49:22
ber Exp $
```

A. Anhang

A.1.2. jresgpprqf

```
;jresgpprqf
;avance-version (12/01/11)
;homonuclear J-resolved 2D correlation
;with presaturation during relaxation de-
lay
;using gradients
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
"p2=p1*2"
"d11=30m"
"d12=20u"
"in0=inf1/2"
"d0=3u"
1 ze
2 d11
3 d12 pl9:f1
d1 cw:f1 ph29
4u do:f1
d12 pl1:f1
50u UNBLKGRAD
p1 ph1
4u
d0
p16:gp1
d16
p2 ph2
4u
p16:gp2
d16
d0 BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2 F1QF(caldel(d0, +in0))
exit
ph1=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph2=0 2 1 3 1 3 2 0 1 3 2 0 2 0 3 1
ph29=0
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3
;p11 : f1 channel - power level for pulse
(default)
;p19 : f1 channel - power level for presatu-
ration
;p1 : f1 channel - 90 degree high power
pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power
pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recove-
ry
;inf1: 1/w, w = max. width of multiplet
;in0: 1/(2 * w), w = max. width of multi-
plet
;nd0: 2
;ns: 4 * n
;ds: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: QF
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 10 : 10
;for z-only gradients:
;gpz1: 10;gpz2: 10;use gradient files:
;gpnam1: SMSQ10.100
;gpnam2: SMSQ10.100
;$Id: jresgpprqf,v 1.4 2012/01/31 17:49:26
ber Exp $
```

A. Anhang

A.1.3. noesypr1d

```
;d12: delay for power switching [20 usec]
;ns: 8 * n, total number of scans: NS * TD0
;ds: 4
;$Id: noesypr1d,v 1.12 2012/01/31 17:49:28
;with presaturation during relaxation de-
;ber Exp $
;
;CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
#include <Avance.incl>
"d11=30m"
"d12=20u"
"acqt0=-p1*2/3.1416"
1 ze
2 30m
d12 pl9:f1
d1 cw:f1 ph29
4u do:f1
d12 pl1:f1
p1 ph1
4u
p1 ph2
d12 pl9:f1
d8 cw:f1
4u do:f1
d12 pl1:f1
p1 ph3
go=2 ph31
30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2 1 1 3 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
;p11 : f1 channel - power level for pulse
(default)
;p19 : f1 channel - power level for presatu-
ration
;p1 : f1 channel - 90 degree high power
pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
```

A. Anhang

```

A.1.4. reset_psyche_1d      fspw37=plw1/cnst63"
                                1 ze
;reset_psyche_1d              2 d11
;avance-version (16/11/16)    3 d12
;pseudo 2D sequence           d1 pl1:f1
;broadband homodecoupling using psyche 50u UNBLKGRAD
element                        (p1 ph3):f1
;                               4u
;M. Foroozandeh, R.W. Adams, P. Kiraly, (p44:sp30 ph4):f1
M. Nilsson and G.A. Morris,    d0
; Chem. Commun. , x-x (2015)    p16:gp1*0.5
;M. Foroozandeh, R.W. Adams, N.J. Me- d16
harry, D. Jeannerat, M. Nilsson & TAU
; G.A. Morris, Angew. Chem. Int. Ed. , (p44:sp30 ph5):f1
(2014)                          TAU
;(K. Zangger & H. Sterk, J. Magn. Reson. p16:gp1*-0.5
124, 486-489 (1997) )          d16
;(J.A. Aguilar, S. Faulkner, M. Nilsson & DELTA3
G.A. Morris,                    (p49:sp37 ph2):f1 (p49:gp0)
; Angew. Chem. Int. Ed. 49, 3901-3903 4u
(2010) )                        p16:gp1*-1.0
;                               d16
;                               d0
;$CLASS=HighRes                4u BLKGRAD
;$DIM=2D                        go=2 ph31
;$TYPE=                          d11 mc #0 to 2
;$SUBTYPE=                       F1QF(caldel(d0, +in0))
;$COMMENT=                        exit
#include <Avance.incl>            ph2=0 1
#include <Grad.incl>              ph3=0 0 2 2
#include <Delay.incl>             ph4=0 0 0 0 1 1 1 1
define delay BETA                 ph5=0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
define delay SWi                  ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
define pulse P_in                 ;pl1 : f1 channel - power level for pulse
"d11=30m"                          (default)
"d12=20u"                           ;sp30: f1 channel - shaped pulse 180 degree
"in0=dw*131"                         (Bip720,50,20.1)
"d0=3u"                               ;sp37: f1 channel - shaped pulse 180 degree
"DELTA2=dw*131*2"                    for psyche element (Crp_psyche.20)
"DELTA3=p16+d16+d0*2-p1*2            ;p1 : f1 channel - 90 degree high power
/PI+de+dw*2*130+4u"                  pulse
SSWi=1000000/(131*2*dw)"            ;p16: homospoil/gradient pulse
"TAU=dw*131/2"                       ;p44: f1 channel - 180 degree shaped pulse
"l29=2*131*td1"                      for refocussing
"cnst62=(cnst61/360)*sqrt((2*cnst60)  ; Bip720,50,20.1 (200us at 600.13 MHz)
/(p49/2000000))"                     ;p49: f1 channel - 180 degree shaped pulse
"P_in = 1000000.0 / (cnst62*4)"        for psyche element [30 msec]
"BETA = cnst62 / (2.27 * 2) "
"cnst63= (P_in/p1) * (P_in/p1)"

```

A. Anhang

```
; Crp_psyche.20
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst60: sweepwidth of single chirp element
in Crp_psyche.20 [10000 Hz]
;cnst61: desired flip angle (ca. 20 degree)
;cnst62: gammaB1/2PI value for p49:sp37
(in Hz)
;cnst63: scaling factor for power (sp37)
;l29: total number of points in reconstructed FID
;l30: number of complex points at the beginning not to be included
; in reconstruction
;l31: number of complex points along the acquisition dimension per block
; block length (DELTA2) about 8 to 10ms
;BETA: flip angle (ca. 20 degree)
;SWi: sweep width in the pseudo dimension
; should be 2 to 3 times the width of the widest multiplett
;in0: = dw*l31
;ns: 1 * n, total number of scans: NS * TD0
;ds: 4
;FnMODE: QF
;for z-only gradients:
;gpz0: 1;gpz1: 19;use gradient files:
;gpnam0: RECT.1
;gpnam1: SMSQ10.100
;use AU-program proc_reset to process data
;$Id: reset_psyche_1d,v 1.4 2017/01/04
12:06:48 ber Exp $
```

A. Anhang

A.1.5. zgadc2

```
d12 gron1
# ifdef SF
;zgadc2 (p12:SPL_90 ph1)
;avance-version (06/01/20) # else
;1D sequence with explicit programming of (p12:sp12 ph1)
acquisition # endif
;Two D-Labels implemented d12 groff
;-DVLC for artifact suppression using d12 pl1:f1
varied data chunk durations ;-DSF for fre- ACQ_START(ph30,ph31)
quency shifted pulses, calibrated shaped 0.05u DWL_CLK_ON
pulse powerlevels must be applied in the 0.1u REC_UNBLK
shape list files d3:r
; 0.1u REC_BLK
;$CLASS=HighRes 0.05u DWL_CLK_OFF
;$DIM=1D p16:gp2
;$TYPE= d16 pl1:f1
;$SUBTYPE= p2 ph2
;$COMMENT= p16:gp2
#include <Avance.incl> d16
#include <De.incl> p16:gp3
#include <Grad.incl> d16 pl0:f1
#include <Delay.incl> 10u
define list<shape> SPL_90=<spl_90 d11 gron1
_jmfinal> # ifdef SF
define list<shape> SPL_180=<spl_180 (p13:SPL_180 ph3)
_jmfinal> # else
define list<delay> Dlist=<$VDLIST> (p13:sp13 ph3)
dwellmode explicit # endif
"d11=3u" d11 groff
"d12=6.5u" 10u
"d20=10u" p16:gp3
"l2=10*20" d16
"l1=l2-1" 3 0.05u DWL_CLK_ON
"d2=aq/l2" 0.1u REC_UNBLK
"d3=d2/2" d2:r
"p2=2*p1" 0.1u REC_BLK
1 ze 0.05u DWL_CLK_OFF
2 3m p16:gp2
# ifdef VLC d16 pl1:f1
"l5=l2*Dlist" p2 ph2
"l1=l5-1" p16:gp2
"d2=aq/l5" d16
"d3=d2/2" p16:gp3
# endif d16 pl0:f1
4u BLKGRAD 10u
d1 rpp2 d11 gron1
50u UNBLKGRAD # ifdef SF
d12 pl0:f1
```

A. Anhang

```
(p13:SPL_180 ph3)
# else
(p13:sp13 ph3)
# endif
d11 groff
10u
p16:gp3
d16
lo to 3 times l1
0.05u DWL_CLK_ON
0.1u REC_UNBLK
d3
25m
0.1u REC_BLK
0.05u DWL_CLK_OFF
#ifdef SF
10u SPL_90.inc
10u SPL_180.inc
#endif
#ifdef VLC
10u Dlist.inc
#endif
rcyc=2
wr #0
exit
ph1 = 0 2 2 0 1 3 3 1
ph2 = 0 2
ph3 = 2 0
ph30= 0
ph31= 0 2 2 0 1 3 3 1
;p11 : f1 channel - power level for pulse
(default)
;p1 : f1 channel - high power pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;NS: 1 * n, total number of scans: NS *
TD0
;l0: input loopcounter, good d2 range: 20-
25ms
;l5: varied loopcounter, redefined during
aquisition
;gpz1: 1 %, 2% for -DSF
;gpz2: 11 %
;gpz3: 5 %
;$Id: zgadc,v 1.12 2009/07/02 16:40:47 ber
Exp $
```

A. Anhang

```

A.1.6. zgesgp (p12:sp1 ph4:r):f1
4u
;zgesgp d12 pl1:f1
;avance-version (12/01/11) p2 ph5
;1D sequence 4u
;water suppression using excitation scul- p16:gp2
ping with gradients d16
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Re- go=2 ph31
son., 30m mc #0 to 2 F0(zd)
; Series A 112 275-279 (1995) 4u BLKGRAD
; exit
; $CLASS=HighRes ph1=0
; $DIM=1D ph2=0 1
; $TYPE= ph3=2 3
; $SUBTYPE= ph4=0 0 1 1
; $COMMENT= ph5=2 2 3 3
prosol relations=<triple> ph31=0 2 2 0
#include <Avance.incl> ;pl0 : 0W
#include <Grad.incl> ;pl1 : f1 channel - power level for pulse
#include <Delay.incl> (default)
"p2=p1*2" ;sp1 : f1 channel - shaped pulse 180 degree
"d12=20u" ;p1 : f1 channel - 90 degree high power
"TAU=de+p1*2/3.1416+50u" pulse
"acqt0=0" ;p2 : f1 channel - 180 degree high power
baseopt_echo pulse
1 ze ;p12: f1 channel - 180 degree shaped pulse
2 30m (Squa100.1000) [2 msec]
d12 pl1:f1 BLKGRAD ;p16: homospoil/gradient pulse
d1 ;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
p1 ph1 ;d12: delay for power switching [20 usec]
50u UNBLKGRAD ;d16: delay for homospoil/gradient recove-
p16:gp1 ry
d16 pl0:f1 ;ns: 8 * n, total number of scans: NS * TD0
(p12:sp1 ph2:r):f1 ;ds: 4
4u ;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
d12 pl1:f1 ; 31 : 11
p2 ph3 ;for z-only gradients:
4u ;gpz1: 31;gpz2: 11;use gradient files:
p16:gp1 ;gpnam1: SMSQ10.100
d16 ;gpnam2: SMSQ10.100
TAU ;$Id: zgesgp,v 1.9 2012/01/31 17:49:32 ber
p16:gp2 Exp $
d16 pl0:f1

```

A.2. Ergänzende Abbildungen zu den Ergebnissen

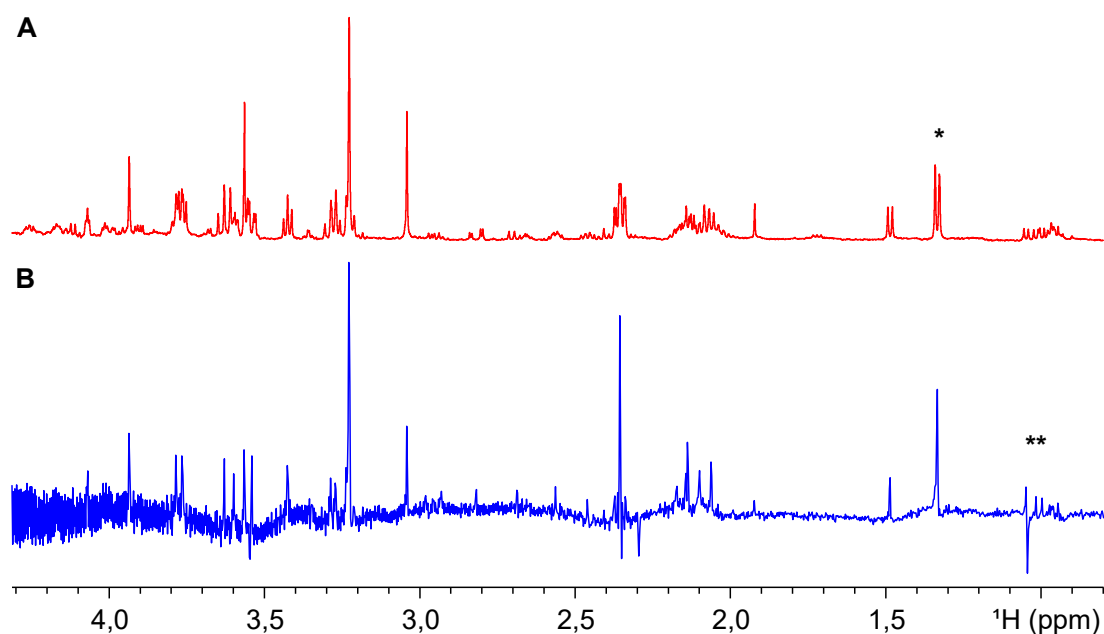


Abbildung A.1.: *Pure Shift* Experimente als Test für versteckte Signale. Während der Zuordnung wurden *Pure Shift* Experimente getestet, um durch eine Trennung von chemischer Verschiebung und Kopplung überlagerte Signale zu finden. Dass das *Pure Shift* Experiment funktioniert (hier PSYCHE), sieht man z.B. am Signal von Lactat (*, bei 1,3 ppm), welches von einem Duplett (A) auf eine einzige chemische Verschiebung (B) reduziert wird. Die PSYCHE-Methode wurde an einem Fibroblastenextrakt getestet. Da sie keine besseren Ergebnisse als die *Pure Shift* Methode von Zangger-Sterk (Abbildung 3.8) erzeugt und zusätzlich deutlich stärkere Artefakte (**, bei 1,1 ppm) hat, wurden keine Neutrophilen damit gemessen.

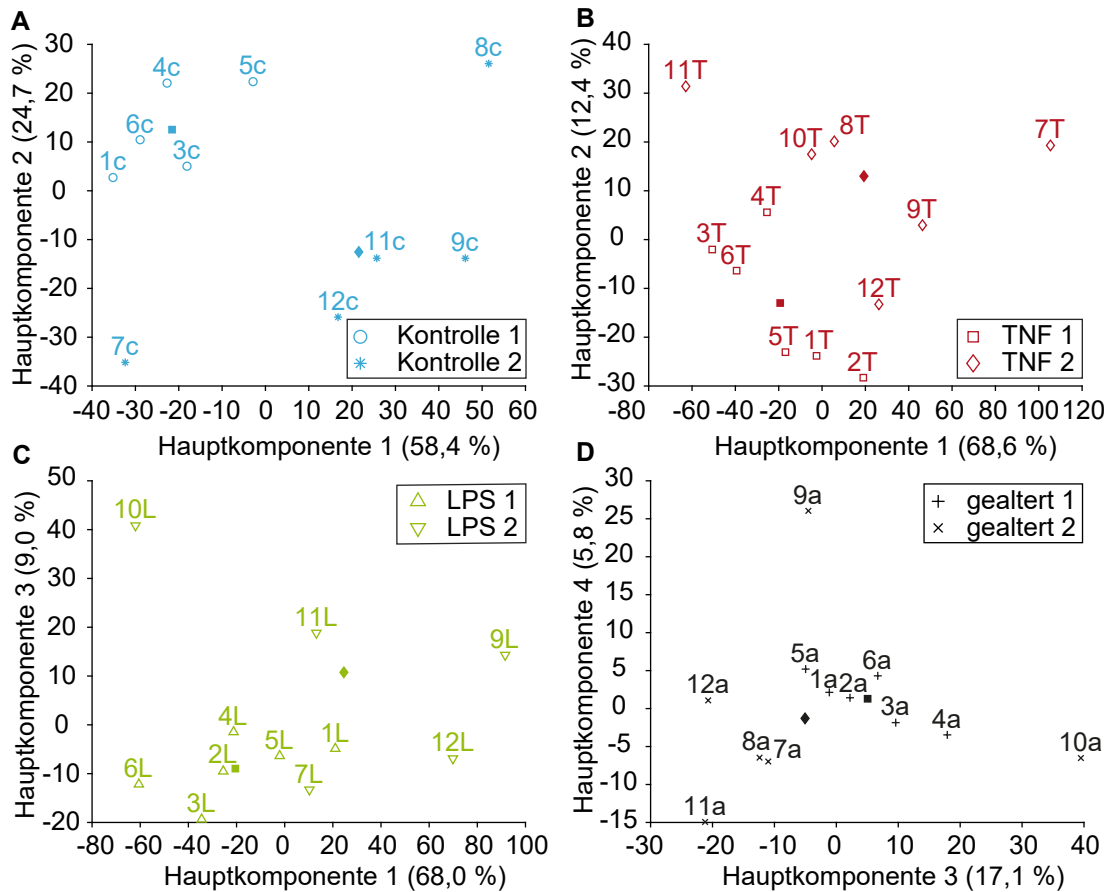


Abbildung A.2.: Ergänzung zu 3.12: Um den Batcheffekt zwischen den einzelnen Gruppen näher zu betrachten, wird jeweils nur die gleiche Gruppe für Batch 1 und Batch 2 in zwei geeigneten Hauptkomponenten verglichen. Farbcodes und Symbole wie in Abbildung 3.10. (A) Die beiden Kontrollgruppen zeigen Unterschiede in Position und Streuung. (B) und (C) zeigen ebenfalls eine Trennung bei TNF und LPS aktivierten Zellen zwischen Batch 1 und 2 sowie eine größere Streuung in Batch 2. (C) Bei den gealterten, apoptotischen Neutrophilen zeigen sich Unterschiede zwischen den Batches erst in höheren Hauptkomponenten. Gleichzeitig entsteht keine richtige Trennung der Batches sondern eher eine Streuung von Batch 2 um die Proben von Batch 1. Der Effekt der Alterung ist also stärker als der Batcheffekt.

A. Anhang

Tabelle A.1.: Probenbezeichnungen - Neutrophile der Kontrollgruppe (c), mit TNF aktivierte Neutrophile (T), mit LPS aktivierte Neutrophile (L), gealterte, apoptotische Neutrophile (a)

Bezeichnung	Bemerkungen
1c, 1T, 1L, 1a	Probandin 1, in Probe 1a verbleiben Lösemittelreste
2c, 2T, 2L, 2a	Probandin 2, in Probe 2c verbleiben Lösemittelreste
3c, 3T, 3L, 3a	Probandin 3
4c, 4T, 4L, 4a	Probandin 4, in Probe 4T verbleiben Lösemittelreste
5c, 5T, 5L, 5a	Probandin 5
6c, 6T, 6L, 6a	Probandin 6
7c, 7T, 7L, 7a	Probandin 7
8c, 8T, 8L, 8a	Probandin 8, Probe 8L bei der Vorbereitung ausgelaufen
9c, 9T, 9L, 9a	Probandin 9
10c, 10T, 10L, 10a	Probandin 10
11c, 11T, 11L, 11a	Probandin 11
12c, 12T, 12L, 12a	Probandin 12

B. Abbildungsverzeichnis

1.1.	Schematische Darstellung der dermo-epidermalen Junktionszone bei EBA mit Antikörpern gegen Kollagen VII und Einwanderung von Neutrophilen.	5
1.2.	Allgemeine Herangehensweise an Metabolomics	10
1.3.	Pulssequenz noesypr1d	12
1.4.	Pulssequenz noesygppr1d	12
1.5.	Pulssequenz cpmgpr1d	13
1.6.	Vergleich von 1D-NOESY und CPMG an einer Serumprobe	14
1.7.	Pulssequenz zgesgp	15
1.8.	Pulssequenz jresgpprqf	16
1.9.	Pulssequenz Zanger-Sterk Breitbandentkopplung	17
1.10.	Pulssequenz der Entkopplung mit PSYCHE	18
1.11.	<i>Spiking</i> am Beispiel von extrahierten Fibroblasten	20
1.12.	Korrelation mit Lactat im STOCSY Plot.	21
1.13.	Schematische Darstellung der Analyse eines Datensatzes mittels PCA.	22
2.1.	Experimenteller Ansatz zur Untersuchung der metabolischen Veränderungen in Neutrophilen durch Aktivierung und Alterung.	30
2.2.	Ablauf der zweiphasigen Metabolitextraktion von Neutrophilen.	31
3.1.	Vergleich der Protonenspektren verschiedener Pulssequenzen für die Anwendung an wässrigen Extrakten von Neutrophilen.	41
3.2.	(A) 500 MHz 1D-NOESY ^1H -Spektrum einer mit Chloroform/Methanol extrahierten Probe aus 20 Millionen humanen Neutrophilen. (B) 500 MHz ^1H -Spektrum der Lipidphase der Extraktion.	43
3.3.	500 MHz 1D-NOESY ^1H -Spektrum der wässrigen Phase einer mit Chloroform/Methanol extrahierten Probe aus 20 Millionen und 70 Millionen humanen Neutrophilen in D_2O . Detektionslimit von NADP^+	44
3.4.	Die Proben von einem Extraktionstag weichen sehr stark in einer Hauptkomponentenanalyse von allen anderen Proben ab.	45
3.5.	Der <i>Score plot</i> von Hauptkomponenten 1 und 2 zeigt eine Trennung der gealterten, apoptotischen Zellen von der Kontrollgruppe und den aktivierten Zellen.	47
3.6.	<i>Spiking</i> zur Überprüfung der Zuordnung von AMP, ADP und ATP.	48
3.7.	Korrelation mit Hypotaurin im STOCSY Plot.	48
3.8.	<i>Pure Shift</i> als Test für überlagerte Signale: Zanger-Sterk.	49
3.9.	<i>J-res</i> (<i>J-resolved</i>) als <i>Pure Shift</i> -Methode zum Test auf versteckte Signale ohne Verlust der Kopplungsinformation. (A) 1D-NOESY Referenzspektrum eines Neutrophilenextrakts der Kontrollgruppe.	51
3.10.	Die Kombination von Batch 1 und 2 führt in einer PCA nicht zu einer besseren Trennung.	53

B. Abbildungsverzeichnis

3.11. Im <i>score plot</i> von Hauptkomponente 1 und 2 lassen sich die Gruppen vom zweiten Batch kaum trennen.	55
3.12. Der Batcheffekt hat einen geringeren Einfluss auf die gealterten, apoptotischen Zellen als auf die anderen Gruppen.	56
3.13. Clustern der Testpersonen in höheren Komponenten	57
3.14. Aromatischer Bereich des NMR-Spektrums, der die Resonanzen von NAD ⁺ , Adenin- und Guanosin-Nukleotiden zeigt.	58
3.15. Korrelation mit NAD ⁺ im STOCSY Plot.	59
4.1. Stoffwechselweg von Taurin.	72
A.1. <i>Pure Shift</i> Experimente als Test für versteckte Signale: Die PSYCHE Methode.	94
A.2. Batch Effekt zwischen den einzelnen Gruppen - vollständig	95

C. Tabellenverzeichnis

2.1. Verwendete Chemikalien	26
2.2. Verwendete Geräte	27
2.3. Verwendete Materialien	28
2.4. Verwendeter Puffer für Messungen	32
3.1. Signifikante Veränderungen der Metabolitlevel zwischen den verschiedenen Gruppen	60
3.2. Beteiligte Stoffwechselwege	62
A.1. Probenbezeichnungen der Neutrophilenextrakte	96