



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

**Aus dem Institut für Ernährungsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Christian Sina**

**Charakterisierung metabolischer Profile bei COVID-19
mittels NMR-Spektroskopie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Franziska Schmelter
aus Witten

Lübeck, 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Sina
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Peters

Tag der mündlichen Prüfung: 18. August 2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24. August 2022

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2017 bis April 2021 bei der GALAB Laboratories GmbH in Hamburg-Bergedorf unter der Anleitung von Herrn Dr. Eckard Jantzen durchgeführt. Die Arbeit erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Ernährungsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und dem Institut für Chemie und Metabolomics aus der Sektion Naturwissenschaften der Universität zu Lübeck bis April 2022. Die formale akademische Betreuung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Christian Sina.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung der Arbeit unterstützt haben.

Der Firma GALAB Laboratories GmbH in Hamburg-Bergedorf, insbesondere Herrn Dr. Eckard Jantzen, gilt mein besonderer Dank für seine hervorragende Betreuung und die Bereitstellung aller nötigen Ressourcen. Seine zahlreichen Hinweise und kritischen Anmerkungen haben wesentlichen Anteil an der Vollendung dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich mich für die freie Gestaltung bei der Umsetzung des Projektes und das damit entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Mein Dank gilt zudem meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Christian Sina, für die wissenschaftliche Begleitung während des Projektes und die Übernahme der Begutachtung der Arbeit. Für die Begutachtung der Arbeit und den Prüfungsvorsitz möchte ich mich zudem auch bei Herrn Prof. Dr. Thomas Peters und Herrn Prof. Dr. Lars Redecke bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Chemie und Metabolomics der Universität zu Lübeck, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Günther, für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und kritischen Ideen, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bei den Mitarbeitern im Institut für Ernährungsmedizin und im Institut für Chemie und Metabolomics der Universität zu Lübeck möchte ich mich herzlich für die Unterstützung im Laboralltag und den wissenschaftlichen Gedankenaustausch bedanken. Den Mitarbeitern der Firma GALAB Laboratories in Hamburg-Bergedorf danke ich für die hilfreichen Tipps bei den experimentellen Fragestellungen, für die aufschlussreichen Diskussionen und für die ständige Hilfsbereitschaft.

Zudem möchte ich mich bei den verschiedenen Projektpartnern für die Bereitstellung der Probematerialien, der wissenschaftlichen Gespräche und der stetigen Unterstützung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt zudem den Korrekturlesern, die die Arbeit mit ihrem Wissen und ihrer Kompetenz wissenschaftlich und sprachlich beurteilt haben.

Meinen Eltern, meinem Freund und meinen Freunden danke ich für ihre immerwährende Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Erläuterung und Hinweise

Aufgrund ihrer komplexen Strukturen werden die in der Arbeit beschriebenen Substanzen nicht entsprechend der IUPAC-Nomenklatur, sondern mit den in der Fachliteratur üblichen Trivialnamen bezeichnet.

Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen sind im Text mit dem Zusatz „®“ versehen. Die fehlende Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichnungen in dieser Arbeit berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Begriffe handeln, wenn diese nicht eigens als solche markiert sind.

Literaturangaben sind im Text mit den Autoren und dem Erscheinungsjahr in Klammern angegeben. Bei mehreren Autoren erfolgt die Nennung des Erstautors unter dem Zusatz „et al.“. Die vollständigen Angaben sind im Literaturverzeichnis hinterlegt.

Zur besseren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Arbeit auf die gleichzeitige Verwendung weiblicher und männlicher Sprachformen verzichtet. Es wird das generische Maskulinum verwendet, wobei alle Geschlechter gleichermaßen gemeint sind.

Die Benennung der mittels *in-vitro diagnostic research* Protokoll analysierten Metaboliten und Lipoproteine erfolgt in Anlehnung an den zugehörigen Ergebnisreport. Dabei wird insbesondere die englische Nomenklatur der Metaboliten übernommen. Die im deutschen Sprachgebrauch üblicherweise verwendeten Bezeichnungen sind im Anhang in Tabelle 8-6 aufgeführt.

Alle Experimente, die nicht direkt von der Autorin durchgeführt wurden, sind als solche gekennzeichnet. Nicht oder nur geringfügig geänderte Abbildungen wurden nur dann aus den eingereichten oder bereits veröffentlichten Artikeln übernommen, wenn sie von der Autorin im Original erstellt worden sind (Schmelter et al. 2021).

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Erläuterung und Hinweise	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Maßeinheiten & Größen	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XV
1 ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	3
2 THEORETISCHER HINTERGRUND	5
2.1 COVID-19 und SARS-CoV-2	5
2.1.1 Ausbreitung und zeitliche Entwicklung	5
2.1.2 Genetik, Phylogenie und Taxonomie	6
2.1.3 Rezeptornutzung und Pathogenese	7
2.1.4 Nachweismethoden	8
2.1.5 Epidemiologische und klinische Eigenschaften sowie Therapieansätze	8
2.1.6 Schutzimpfungen gegen SARS-CoV-2	10
2.1.7 Long-/Post-COVID-19	11
2.2 Blut und Blutbestandteile	12
2.3 Metabolomics	14
2.4 Instrumentelle Analytik	17
2.4.1 Massenspektrometrie	18
2.4.2 Kernspinresonanz-Spektroskopie	24
2.4.2.1 NMR-Experimente	30
2.4.2.2 Quantitative Kernspinresonanz-Spektroskopie	32
2.5 Datenauswertung	34
2.5.1 Hauptkomponentenanalyse	35
2.5.2 <i>Partial Least Square-Analysis</i>	38

2.5.3	<i>Analysis of variances-simultaneous component analysis</i>	38
2.6	Metabolomics in COVID-19	39
3	ZIELSETZUNG UND PROBLEMSTELLUNG	42
4	MATERIAL UND METHODEN	43
4.1	Herstellung von Blutserum und -plasma	43
4.2	Herstellung eines Phosphat-Puffers	43
4.3	<i>In-vitro diagnostic research</i>	43
4.3.1	Probenvorbereitung	44
4.3.2	Kernspinresonanz-Spektroskopie	44
4.3.2.1	Qualitätskontrolle	45
4.3.2.2	Experimente	46
4.3.2.3	Automatische Datenprozessierung	48
4.4	Metaboliten im <i>in-vitro diagnostic research</i> Protokoll	49
4.4.1	Präparation und Analyse der Einzelstandards	49
4.4.2	Präparation und Analyse eines Multistandards	51
4.4.3	Dotierung einer Serumprobe mit Multistandard	51
4.5	Methodische Betrachtung des IVD _r Protokolls	51
4.5.1	Reproduzierbarkeit der Probenpräparation und Analyse	52
4.5.2	Veränderung der Scanzahl	53
4.5.3	Vergleich zwischen Serum, EDTA-Plasma und LiHeparin-Plasma	53
4.5.4	Gefrier- und Auftau-Zyklen	53
4.5.5	Zentrifugation von Plasmaproben	54
4.5.6	Lagerung präparierter Proben unmittelbar vor der Analyse	54
4.5.7	Stabilisierung mit TROLOX	54
4.6	Studien	55
4.6.1	LUERIC-Studie	55
4.6.2	ELISA-Studie	56
4.6.3	Schweregrade bei aktiven und post-COVID-19 Patienten	58
4.6.4	Impfstudie	59
4.7	Datenprozessierung und statistische Auswertung	60

4.7.1	Lageparameter	60
4.7.2	Absoluter, relativer und prozentualer Fehler	61
4.7.3	Korrelationskoeffizienten und Bestimmtheitsmaß	61
4.7.4	Lineare Regression.....	62
4.7.5	t-Test und multipler t-Test.....	62
4.7.6	Multivariate Analysen.....	63
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	64
5.1	Methodische Betrachtung des <i>in-vitro diagnostic research</i> Protokolls	64
5.1.1	Metaboliten im <i>in-vitro diagnostic research</i> Protokoll	64
5.1.1.1	Betrachtung ausgewählter Standardsubstanzen.....	64
5.1.1.2	Güte und Linearität der Metabolitquantifizierung mittels IVDr.....	67
5.1.2	Reproduzierbarkeit	74
5.1.3	Anzahl der Scans	75
5.1.4	Vergleich verschiedener Bluttypen.....	81
5.1.5	Veränderungen während der Aufarbeitung und Messung	90
5.1.6	Stabilisierung mit TROLOX.....	96
5.2	COVID-19 Studien.....	99
5.2.1	Metabolisches Profil intensivmedizinischer COVID-19 Patienten	99
5.2.2	Zeitliche Betrachtung des metabolischen Profils	106
5.2.3	Schweregrad und Krankheitsstatus	109
5.2.4	Assoziationen zwischen SARS-CoV-2 Antikörpertitern und Metabolomics.....	114
5.2.5	Exkurs: Stabilität des Lipidprofils	119
5.2.6	Veränderungen bei einer Infektion mit SARS-CoV-2.....	120
5.2.7	Impfung gegen SARS-CoV-2.....	122
5.2.8	Antikörpertiter nach einer Impfung gegen SARS-CoV-2	127
6	FAZIT UND AUSBLICK	129
7	LITERATURVERZEICHNIS	133
8	ANHANG	146
8.1	Materialien	146
8.1.1	Chemikalien.....	146

8.1.2	Verbrauchsmaterialien	150
8.1.3	Laborgeräte.....	151
8.1.4	Software.....	153
8.1.5	Webbasierte Dienste und Datenbanken	153
8.2	Pulsprogramme	154
8.2.1	<i>noesyggpr1d</i>	154
8.2.2	<i>cpmgpr1d</i>	154
8.3	Ergänzende Informationen	155

Maßeinheiten & Größen

°	Grad
%	Prozent
C	Celsius
Da	Dalton
dL	Deziliter
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
K	Kelvin
kg	Kilogramm
L	Liter
m	Meter
$M = \text{mol/L}$	Molar
m^2	Quadratmeter
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
$\text{mM} = \text{mmol/L}$	Millimolar
mmol	Millimol
mol	Mol
ms	Millisekunden
nm	Nanometer
ppm	Anteile pro Millionen, Millionstel (engl. <i>parts per million</i>)
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (engl. <i>relative centrifugal force</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
s	Sekunden
μL	Mikroliter
$\mu\text{M} = \mu\text{mol/L}$	Mikromolar
μs	Mikrosekunden
v/v	Volumen pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i>)

Abkürzungsverzeichnis

1D / 2D	eindimensional / zweidimensional
^1H	Proton
2019-nCoV	neuartiges Coronavirus 2019
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (engl. <i>angiotensin-converting enzyme 2</i>)
ANOVA	Varianzenanalyse (engl. <i>analysis of variances</i>)
APCI	chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (engl. <i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
Apo	Apolipoprotein
ARDS	akutes Lungenversagen (engl. <i>acute respiratory distress syndrome</i>)
ASCA	Varianzanalyse-simultane Komponentenanalyse (engl. <i>analysis of variances-simultaneous component analysis</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
AUROC	Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve (engl. <i>area under the receiver operating characteristic</i>)
B.I.BioBankQC	Bruker IVDr Qualitätskontrolle für Biobanken (engl. <i>Bruker IVDr BioBankQC</i>)
B.I.LISA	Bruker IVDr Lipoprotein Subklassen Analyse (engl. <i>Bruker IVDr lipoprotein subclass analysis</i>)
B.I.QUANT-PS 2.0	Bruker IVDr Quantifizierungsmethode in Plasma/Serum 2.0 (engl. <i>Bruker IVDr quantification in plasma/serum 2.0</i>)
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
Ca^{2+}	Calcium-Ion
CCS	Kollisionsquerschnitt (engl. <i>collision cross section</i>)
Chol	Cholesterin
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (engl. <i>collision-induced dissociation</i>)
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
CPMG	CARR-PURCELL-MEIBOOM-GILL
CS	kardiogener Schock (engl. <i>cardiogenic shock</i>)
d	Dublett

dd	Dublett-in-Dublett
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dt	Dublett-in-Triplett
D ₂ O	Deuteriumoxid
ECMO	extrakorporale Membranoxygenierung (engl. <i>extracorporeal membrane oxygenation</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoßionisation (engl. <i>electron ionization</i>)
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ELISA-Studie	Lübecker Längsschnittuntersuchung zu Infektionen mit SARS-CoV-2 Studie
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (engl. <i>European Medicines Agency</i>)
engl.	englisch
E-Protein	Hüll-Protein (engl. <i>envelope protein</i>)
ERETIC	<i>Electronic Reference To access in-vivo Concentrations</i>
ESI	Elektronensprayionisation (engl. <i>electrospray ionization</i>)
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i>
etc.	lat. <i>et cetera</i>
EU	Europäische Union
EUR	Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG
EUR S1 IgG+/-	positiver/negativer Euroimmun-Test von Immunglobulin G-Antikörpern durch die Verwendung der S1-Domäne
FC	freies Cholesterin
FDR	Falscherkennungsrate (engl. <i>false discovery rate</i>)
FID	freier Induktionszerfall (engl. <i>free induction decay</i>)
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (engl. <i>high density lipoprotein</i>)
H _{HETP}	theoretische Trennstufenhöhe (engl. <i>height equivalent to a theoretical plate</i>)
HMBD	<i>The Human Metabolome Database</i>
H ₂ O	Wasser
IDL	Lipoprotein mittlerer Dichte (engl. <i>intermediate density lipoprotein</i>)
IgG	Immunglobulin G

IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie (engl. <i>ion mobility spectrometry</i>)
ISO	Internationale Organisation für Normung (engl. <i>International Organization for Standardization</i>)
ITS	Intensivtherapiestation
IVDr	<i>in-vitro diagnostic research</i>
lat.	lateinisch
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (engl. <i>low density lipoprotein</i>)
LiHeparin-Plasma	Lithium-Heparin-Plasma
LOD	Nachweisgrenze (engl. <i>limit of detection</i>)
LUERIC-Studie	<i>Luebeck Registry of Intensive Care patients</i> -Studie
LV	latente Variable (engl. <i>latent variable</i>)
m	Multipllett
MALDI	Matrix-assoziierte Laser-Desorption-Ionisation (engl. <i>matrix-assisted laser desorption-ionization</i>)
MeOD	deuteriertes Methanol
MERS-CoV	<i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
M-Protein	Membran-Protein
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i> -Verhältnis	Masse-zu-Ladungsverhältnis (engl. <i>mass-to-charge-ratio</i>)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
(q)NMR	(quantitative) Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl. <i>(quantitative) nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
N-Gen/-Protein	Nucleocapsid-Gen/-Protein
NOESY	KERN-OVERHAUSER-Effekt (engl. <i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy-effect</i>)
OSC	orthogonale Signalkorrektur (engl. <i>orthogonal signal correction</i>)
PC	Hauptkomponente (engl. <i>principal component</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. <i>principle component analysis</i>)
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i>
PL	Phospholipid
PLS-DA	Diskriminanzanalyse der partiell kleinsten Quadrate (engl. <i>partial least square-discriminant analysis</i>)

Post-COVID-19	post-akute Folgen von COVID-19 (engl. <i>post-acute sequelae of COVID-19</i>)
PULCON	<i>Pulse-Length based Concentration</i>
q	Quartett
QC	Qualitätskontrolle (engl. <i>quality control</i>)
qNMR	quantitative Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl. <i>quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
Q-Trap	Quadrupol-Ionenfalle (engl. <i>quadrupol-trap</i>)
RBD	Rezeptorbindungsdomäne (engl. <i>receptor-binding domain</i>)
RBM	Rezeptorbindungsmotiv (engl. <i>receptor-binding motif</i>)
RNA-Virus	Ribonukleinsäure-Virus (engl. <i>ribonucleic acid virus</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
s	Singulett
SAPS II-Score	<i>Simplified Acute Physiology-Score II</i>
SARS-CoV(-2)	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus(-2)</i>
SARSr-CoV	<i>SARS-related coronavirus</i>
SCA	simultane Komponentenanalyse (engl. <i>simultaneous component analysis</i>)
SOP	Standardarbeitsanweisung (engl. <i>standard operating procedure</i>)
S-Gen/-Protein	Spike-Gen/-Protein
t	Triplett
TG	Triglyzerid
TMPRSS2	transmembrane Serinprotease 2 (engl. <i>transmembrane protease serine subtype 2</i>)
(Q)ToF-Massenspektrometer	(Quadrupol-)Flugzeit-Massenspektrometer (engl. <i>(quadrupole-)time-of-flight-mass spectrometer</i>)
TSP-d4	3-Trimethyl-silyl-[2,2,3,3- ² H ₄]propionic acid
TROLOX	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
VLDL	Lipoprotein sehr geringer Dichte (engl. <i>very low density lipoprotein</i>)
vs.	<i>versus</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: COVID-19 Infektionszahlen und Todeszahlen.	5
Abbildung 2-2: Multiorganeffekte von SARS-CoV-2.....	9
Abbildung 2-3: Impfstoffe gegen SARS-CoV-2.	10
Abbildung 2-4: Einteilung einer SARS-CoV-2 Infektion und deren Spätfolgen.	11
Abbildung 2-5: Übersicht über die Lipoproteine und deren Aufbau.	13
Abbildung 2-6: „-omics“-Kaskade und ihre Teilbereiche.....	15
Abbildung 2-7: Schematische Darstellung einer <i>non-targeted</i> Analyse des Metaboloms.	16
Abbildung 2-8: Schematische Darstellung einer <i>targeted</i> Analyse des Metaboloms.	16
Abbildung 2-9: Trennmechanismen im Rahmen der Massenspektrometrie.	19
Abbildung 2-10: Schematischer Aufbau eines hochauflösenden Flugzeit- Massenspektrometers.	22
Abbildung 2-11: Anregungsprinzip bei der NMR-Spektroskopie.	25
Abbildung 2-12: Chemische Verschiebungen bei der ^1H NMR-Spektroskopie.	27
Abbildung 2-13: Identifizierung der Aminosäure L-Alanin in der NMR-Spektroskopie.	28
Abbildung 2-14: Aufbau eines NMR-Spektrometers.	29
Abbildung 2-15: Schematische Pulsabfolge des 1D ^1H NOESY-Experiments.....	30
Abbildung 2-16: Schematische Pulsabfolge des CPMG-Experiments mit n Wiederholungen.	32
Abbildung 2-17: Graphische Erklärung einer Hauptkomponentenanalyse.	35
Abbildung 2-18: Mathematische Erklärung einer Hauptkomponentenanalyse.	37
Abbildung 4-1: Präparation der Serum- oder Plasmaproben für die Analyse mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie.....	44
Abbildung 4-2: Graphische Erklärung der automatischen Datenprozessierung.....	48
Abbildung 4-3: Schematische und graphische Darstellung verschiedener prä- und postanalytischer Untersuchungen (A bis G) im Zusammenhang mit dem IVDr Protokoll.	52
Abbildung 4-4: Schematischer Aufbau der intensivmedizinischen LUERIC-Studie.	55
Abbildung 4-5: Schematischer Aufbau der ELISA-Studie und die Auswahl der mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie analysierten Proben.....	57
Abbildung 4-6: Schematischer Aufbau der Studie zur NMR-spektroskopischen Analyse von Serumproben von Patienten mit verschiedenen Schweregraden einer COVID-19 Erkrankung.....	58
Abbildung 4-7: Schematischer Aufbau der Impfstudie.	59
Abbildung 4-8: Unterschied zwischen unabhängigen (ungepaarten) und abhängigen (gepaarten) Stichproben.....	62
Abbildung 5-1: 600 MHz 1D ^1H NOESY-Spektrum des Multistandards.....	65

Abbildung 5-2: Gruppe (A) dotierter Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$).....	71
Abbildung 5-3: Gruppe (B) dotierter Metabolit mit mäßigem Fitting ($50\% < \bar{p} < 95\%$).....	72
Abbildung 5-4: Gruppe (C) dotierter Metabolit mit schlechtem Fitting ($\bar{p} \leq 50\%$).	73
Abbildung 5-5: Gruppe (D) nicht dotierter Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$).	74
Abbildung 5-6: Reproduzierbarkeit der NMR-spektroskopischen Analyse.....	75
Abbildung 5-7: Vergleichbarkeit der Messungen mit 32 oder 128 Scans.....	77
Abbildung 5-8: Vergleich der mittels IVDr Verfahren quantifizierten Lipoproteine bei einer Scanzahl der 1D ^1H NOESY-Spektren von standardmäßig 32 oder 128 Scans.	78
Abbildung 5-9: 600 MHz 1D ^1H NOESY-Spektren im Bereich von 0,0 bis 4,0 ppm für Serum (rot), LiHeparin-Plasma (grün), EDTA-Plasma (blau) und der Reinsubstanz EDTA (grau).	81
Abbildung 5-10: Betrachtung verschiedener Bluttypen (Serum, EDTA- und LiHeparin- Plasma) bei drei Probanden.	83
Abbildung 5-11: Vergleich der Lipidprofile mehrerer Probanden.	84
Abbildung 5-12: Betrachtung des Einflusses von Gefrier-Auftau-Zyklen auf das Lipidprofil.	86
Abbildung 5-13: Intraindividueller Vergleich verschiedener Bluttypen (Serum, EDTA- und LiHeparin-Plasma).	87
Abbildung 5-14: Darstellung der relativen Fehler für die einzelnen Metaboliten und Lipoproteine bei verschiedenen Bluttypen und Probanden.	89
Abbildung 5-15: Relative Fehler der Quantifizierungen ausgewählter Metaboliten und Lipoproteine bei verschiedenen prä- und postanalytischen Variationen in Form einer Heatmap.	91
Abbildung 5-16: Stabilisierung des Serumlipidprofils durch das Antioxidationsmittel TROLOX.....	97
Abbildung 5-17: Differenzierung zwischen intensivmedizinisch behandelten Patienten mit COVID-19 oder kardiogenem Schock im Vergleich zu gesunden Kontrollen.....	99
Abbildung 5-18: Vergleich zwischen intensivmedizinisch behandelten COVID-19 Patienten und gesunden Kontrollen.	100
Abbildung 5-19: Vergleich zwischen zwei intensivmedizinisch behandelten Kohorten mit COVID-19 und kardiogenem Schock.	101
Abbildung 5-20: Detaillierte Betrachtung der analysierten Parameter verdeutlichen ein spezifisches Metabolitenprofil für die intensivmedizinischen Kohorten.....	103
Abbildung 5-21: Zeitliche Betrachtung der intensivmedizinischen COVID-19 Patienten und Patienten mit kardiogenem Schock.....	106
Abbildung 5-22: Betrachtung der gemittelten longitudinalen Verläufe der Patienten mit COVID-19 oder kardiogenem Schock für ausgewählte Parameter.....	108

Abbildung 5-23: Betrachtung der Blutprofile von Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad einer COVID-19 Erkrankung.	111
Abbildung 5-24: Signifikante Veränderungen im metabolischen Profil für den Vergleich zwischen COVID-19 (rot und orange) und gesunden Kontrollen (grün).	112
Abbildung 5-25: Vergleich des metabolischen Profils bei SARS-CoV-2 Antikörper-positiven Probanden und gesunden Kontrollen.	115
Abbildung 5-26: Zusammenhänge zwischen dem metabolischen Profil und EUR S1 IgG Antikörpertitern.	117
Abbildung 5-27: Assoziationen zwischen HDL-4 Cholesterin und EUR S1 IgG Antikörpertitern.	118
Abbildung 5-28: Stabilität der Hauptlipidfraktionen über ein Jahr.	120
Abbildung 5-29: Unverändertes Lipidprofils vor (grün) und nach (orange) einer Infektion mit SARS-CoV-2.	121
Abbildung 5-30: Veränderung des Lipidprofils nach einer Impfung gegen SARS-CoV-2.	124
Abbildung 5-31: Zeitliches Profil von Apolipoprotein A2 (ApoA2) in Abhängigkeit von den drei betrachteten Impfstoffen der Firmen AstraZeneca, BioNTech und Moderna Biotech.	126
Abbildung 5-32: Negative Korrelationen der LDL-Parameter mit EUR S1 IgG Antikörpertitern.	128
Abbildung 6-1: Spezifisches metabolisches Profil im Zusammenhang mit SARS-CoV-2.	129
Abbildung 8-1: Graphische Darstellung des 1D ¹ H NOESY-Pulsprogramms (<i>noesygppr1d</i>) der IVDr Experimente aus der Software TopSpin™ (Bruker).	154
Abbildung 8-2: Graphische Darstellung des CPMG-Pulsprogramms (<i>cpmgpr1d</i>) der IVDr Experimente aus der Software TopSpin™ (Bruker).	154
Abbildung 8-3: Betrachtung verschiedener Bluttypen (Serum, EDTA- und LiHeparin-Plasma) bei drei verschiedenen Probanden.	163
Abbildung 8-4: Relative Fehler der Quantifizierungen ausgewählter Metaboliten und Lipoproteine bei sechs prä- und postanalytischen Fragestellungen sowie deren Zusammenfassung (grau) in Form einer Heatmap.	165

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Vergleich analytischer Techniken der Metabolomics-Forschung.	17
Tabelle 2-2: NMR-Aktivität verschiedener Atomkerne.....	24
Tabelle 2-3: Aktuelle Publikationen zum Thema COVID-19 und Metabolomics.....	39
Tabelle 4-1: Akquisitionsparameter der IVDr Experimente.....	47
Tabelle 4-2: Klassifizierung der Lipoproteine.	49
Tabelle 4-3: Übersicht der Metaboliten im IVDr Verfahren..	49
Tabelle 4-4: Ausgewählte Akquisitionsparameter der 600 MHz 1D ¹ H NOESY-Messung der Standardsubstanzen.....	51
Tabelle 4-5: Metadaten der intensivmedizinischen Kohorte.	56
Tabelle 4-6: Metadaten der nicht-hospitalisierten Kohorte.....	57
Tabelle 4-7: Metadaten der aktiv- und post-COVID-19 Patienten mit verschiedenen Schweregraden der Erkrankung.	59
Tabelle 4-8: Metadaten der Impfstudie.....	60
Tabelle 5-1: Darstellung der im Multistandard betrachteten Metaboliten im 1D ¹ H NOESY-Spektrum mit den zugehörigen chemischen Verschiebungen und Multiplizitäten der NMR-Signale.....	65
Tabelle 5-2: Güteeinteilung der mittels IVDr B.I.QUANT-PS 2.0 identifizierten und quantifizierten Metaboliten.	68
Tabelle 5-3: Unterscheidung der Fittingqualität zwischen 1D ¹ H NOESY-Messungen mit 32 und 128 Scans.	79
Tabelle 5-4: Differenzierung des Schweregrades einer COVID-19 Erkrankung.....	110
Tabelle 8-1: Verwendete Chemikalien unter Angabe der Summenformel, der CAS- Nummer, des Herstellers und der Reinheit.	146
Tabelle 8-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien unter Angabe des Herstellers und der Spezifikation.	150
Tabelle 8-3: Verwendete Laborgeräte unter Angabe des Herstellers und der Spezifikation.	151
Tabelle 8-4: Verwendete Software unter Angabe der Version und des Herausgebers. ...	153
Tabelle 8-5: Verwendete online Datenbanken.....	153
Tabelle 8-6: Metaboliten im <i>in-vitro diagnostic reasearch</i> Protokoll.....	155
Tabelle 8-7: Lipoproteine im <i>in-vitro diagnostic reasearch</i> Protokoll.....	157
Tabelle 8-8: Vergleich der Quantifizierungen mittels IVDr Verfahren der 600 MHz 1D ¹ H NOESY-Experimente mit 32 und 128 Scans.....	161
Tabelle 8-9: Relative Fehler der Quantifizierungen ausgewählter Metaboliten und Lipoproteine bei verschiedenen prä- und postanalytischen Variationen.	164

1 ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT

1.1 Zusammenfassung

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) ist eine Atemwegserkrankung ausgelöst durch das humanpathogene *Coronavirus severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2). Bedingt durch eine hohe Reproduktionsfähigkeit sowie fehlender protektiver und therapeutischer Maßnahmen initiierte das neuartige Virus innerhalb kurzer Zeit eine globale Pandemie. Das Forschungsinteresse zur Entwicklung neuer Diagnose- und Therapiestrategien von COVID-19 Erkrankungen ist dementsprechend hoch. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der metabolischen Profile im Zusammenhang mit einer SARS-CoV-2 Infektion und einer COVID-19 Erkrankung unter Anwendung der Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*).

Serum- und Plasmaproben wurden mit dem validierten und zertifizierten *in-vitro diagnostic research* (IVDr) Verfahren analysiert sowie Metaboliten und Lipoproteine mithilfe einer automatisierten Routine identifiziert und quantifiziert (Bruker BioSpin 2019; Bruker Corporation 2019). Zunächst wurden einige prä- und postanalytische Einflussgrößen und Störfaktoren bei der NMR-Analytik von Blutproben betrachtet. Unter Anwendung dieser Erkenntnisse können die Ergebnisse klinischer Studien adäquat eingeordnet und beurteilt werden. Anschließend wurden die Metaboliten- und Lipidprofile von COVID-19 Patienten unter Berücksichtigung des Schweregrades der Erkrankung analysiert. Serologische Profile von schwerkranken, intensivmedizinisch behandelten COVID-19 Patienten wurden einerseits mit gesunden Kontrollen und andererseits mit intensivmedizinischen Patienten mit kardiogenem Schock (engl. *cardiogenic shock*, CS) verglichen. Weiterhin wurden die Zusammenhänge zwischen Metaboliten und Antikörpertitern gegen SARS-CoV-2 nach einer Infektion oder Impfung betrachtet.

Ein spezifisches metabolisches Profil intensivmedizinisch therapierter COVID-19 Patienten wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollen identifiziert. Im Detail war dieses durch erhöhte Konzentrationen der Triglyceride sowie VLDL-Fractionen der Cholesterine und Phospholipide gekennzeichnet. Eine Reduktion zeigte sich hingegen für deren LDL- und HDL-Fractionen sowie für die Apolipoproteine. Ein ähnliches Profil wurde zudem bei dem Vergleich mit schwerkranken, intensivmedizinisch behandelten Patienten mit einer kardialen Erkrankung deutlich. Auch über den longitudinalen Krankheitsverlauf der COVID-19 und CS-Patienten bestätigte sich eine anhaltende Dyslipidämie, die unter anderem durch reduzierte Konzentrationen von HDL und Apolipoprotein A2 gekennzeichnet war und mit dem Schweregrad einer COVID-19 Erkrankung assoziiert war. Infolgedessen wurde zwischen milderkrankten SARS-CoV-2 Infizierten und gesunden Kontrollen kein verändertes metabolisches Profil nachgewiesen, aber Zusammenhänge

zwischen Metaboliten und SARS-CoV-2 Antikörpertitern identifiziert. Weiterhin zeigte sich eine mögliche Beeinflussung des serologischen Lipidprofils ausgelöst durch eine Impfung gegen SARS-CoV-2. HDL-Parameter und Apolipoprotein A2 waren mit Antikörpertitern bei einer Impfung mit einem Vektorvakzin assoziiert. Ein guter Impfschutz, gekennzeichnet durch hohe Antikörpertiter, stand dabei im Zusammenhang mit niedrigen LDL-Konzentrationen, sodass diese als mögliche prognostische Marker des Impfansprechens diskutiert werden sollten.

Zusammenfassend beschreibt die vorliegende Arbeit ein spezifisches, durch Dyslipidämie geprägtes metabolisches Profil bei COVID-19. Obwohl nicht abschließend geklärt werden konnte, ob jenes Profil Ursache einer COVID-19 Erkrankung ist, legen die Ergebnisse nahe, dass ein ausgeprägtes Lipoproteinprofil ein möglicher Risikofaktor bei COVID-19 darstellt und als prognostischer Marker bei der Risikostratifizierung Anwendung finden könnte.

1.2 Abstract

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a respiratory disease caused by the human pathogenic coronavirus severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Due to the high reproductive capacity and lack of protective and therapeutic measures, the novel virus initiated a global pandemic within a short period of time. Accordingly, the research interest to develop new diagnostic and therapeutic strategies of COVID-19 diseases is high. The present work aims to characterize the metabolic profiles associated with SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR spectroscopy).

Serum and plasma samples were analyzed using the validated and certified *in-vitro* diagnostic research (IVDr) procedure (Bruker BioSpin 2019; Bruker Corporation 2019). Utilizing an automated routine, metabolites and lipoproteins were identified and further quantified. First, some pre- and postanalytical influencing variables and confounding factors in NMR analysis of blood samples were examined. Based on these findings, clinical study results were classified and assessed accordingly. Subsequently, metabolite and lipid profiles of COVID-19 patients were analyzed, considering the severity of the disease. The serological profiles of seriously ill, intensive care COVID-19 patients were compared to healthy controls and to patients suffering from cardiogenic shock (CS). Furthermore, the correlations between metabolites and antibody titers against SARS-CoV-2 after infection or vaccination were analyzed.

A specific metabolic profile of COVID-19 patients treated at the intensive care unit (ICU) was identified and compared to healthy controls. When comparing healthy controls with ICU-treated COVID-19 patients a specific metabolic profile was identified, which was characterized by increased concentrations of triglycerides as well as VLDL fractions of cholesterol and phospholipids. In contrast, a reduction was shown for LDL and HDL fractions for cholesterol and phospholipids as well as for apolipoproteins. Furthermore, a similar perturbed profile was evident in critically ill patients with CS. Persistent dyslipidemia was also confirmed over the longitudinal disease course of COVID-19 and CS-patients, which was characterized by reduced concentrations of HDL and apolipoprotein A2 and was associated with the severity of COVID-19 disease. Consequently, no altered metabolic profile was demonstrated between milder SARS-CoV-2 infected individuals and healthy controls. However, associations between metabolites and SARS-CoV-2 antibody titers were identified. Furthermore, a possible influence of the serological lipid profile triggered by vaccination against SARS-CoV-2 was shown. HDL parameters and apolipoprotein A2 were associated with antibody titers due to vaccination with a vector vaccine. Good vaccination protection, characterized by high antibody titers, was associated with low LDL levels classifying these as possible prognostic markers for vaccination response.

In conclusion, the present work outlines a specific metabolic profile in COVID-19 characterized by dyslipidemia. Although it could not be conclusively clarified whether that profile is the cause of COVID-19 disease, the results suggest that a distinct lipoprotein profile is a possible risk factor in COVID-19 and could find application as a prognostic marker in risk stratification.

2 THEORETISCHER HINTERGRUND

2.1 COVID-19 und SARS-CoV-2

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ist ein neuartiges Coronavirus, das hoch ansteckend und leicht übertragbar ist. Das humanpathogene Virus, welches Ende 2019 in China erstmals auftrat, löste eine weltweite Pandemie akuter Atemwegserkrankungen aus (Hu et al. 2021). An *coronavirus disease 2019* (COVID-19) erkrankten innerhalb eines Jahres weltweit 69 821 153 Menschen und 1 658 324 Infizierte starben in diesem Zusammenhang (Abbildung

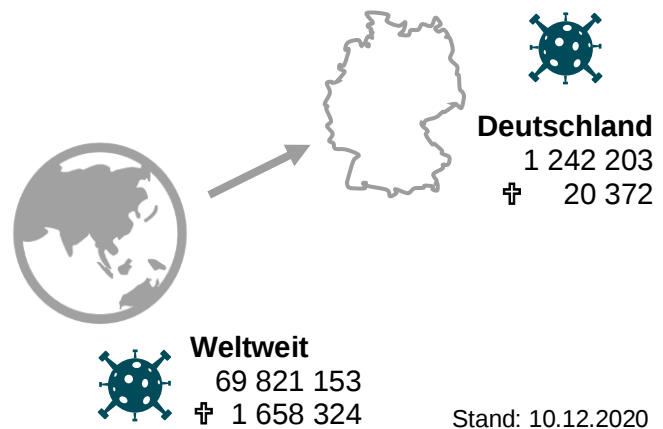


Abbildung 2-1: COVID-19 Infektionszahlen und Todeszahlen. Welt- und deutschlandweite Anzahl der Infektionen und Todesfälle im Zusammenhang mit COVID-19 ein Jahr nach Ausbruch (World Health Organization 2021c).

2-1). Nach einem weiteren Jahr hatten sich die Zahlen mehr als verdreifacht. Weltweit lag die Zahl der bestätigten Fälle am 10. Dezember 2021 bei 267 981 132, während 5 290 338 Infizierte verstorben waren. In Deutschland verfünffachte sich die Anzahl der SARS-CoV-2 Infizierten auf 6 423 520. Die Todeszahl im Zusammenhang mit COVID-19 lag deutschlandweit bei 104 996 (World Health Organization 2021c).

Während sich bei der Virusentwicklung fortlaufend neue Varianten bilden, wurde im Folgendem der Fokus auf den Wildtyp gelegt und Virusvarianten nicht weiter differenziert (World Health Organization 2021b).

2.1.1 Ausbreitung und zeitliche Entwicklung

Im Dezember 2019 traten in der Stadt Wuhan in China vermehrt Krankheitsfälle mit Atemwegsproblemen, Fieber, Husten und Brustbeschwerden unbekannter Ursache auf. Viele der ersten hospitalisierten Patienten wurden in Verbindung mit dem *Huanan Seafood Wholesale Market* in Wuhan gebracht, auf dem Meeresfrüchte und lebende Tiere verkauft wurden (Deng & Peng 2020). Am 31. Dezember 2019 informierte die *Wuhan Municipal Health Commission* die Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organization*, WHO) über eine virale Pneumonie unbekannter Ursache (Hu et al. 2021). Bereits wenige Tage später wurde durch Genomsequenzierung ein neuartiges Coronavirus aus der Familie der Betacoronaviren als Erreger identifiziert (F. Wu et al. 2020). In kürzester Zeit traten vermehrt Fälle innerhalb infizierter Familien und nosokomiale Übertragungen, das heißt Infektionen im Zusammenhang mit einer medizinischen Maßnahme, ohne epidemiologische Verbindung zum *Huanan Seafood Wholesale Market* in Wuhan auf (Deng

& Peng 2020; Fuk-Woo Chan et al. 2020). Dies führte zu der Annahme einer schnellen Übertragung des Virus von Mensch-zu-Mensch. Begünstigt durch menschliche Kontakte und internationale Reisen verbreitete sich das Virus über China in die ganze Welt (Deng & Peng 2020; Hu et al. 2021). Am 30. Januar 2020 erklärte die WHO den Ausbruch des neuartigen Coronavirus-2019 (2019-nCoV) zu einer gesundheitlichen Notlage von internationaler Tragweite (Eurosurveillance Editorial Team 2020). Das *International Committee on Taxonomy of Viruses* benannte das neuartige Coronavirus am 11. Februar 2020 als SARS-CoV-2 und die WHO nannte die ausgelöste Krankheit COVID-19 (Gorbalenya et al. 2020; Hu et al. 2021). Einen Monat später erklärte die WHO COVID-19 zu einer Pandemie (Hu et al. 2021).

2.1.2 Genetik, Phylogenie und Taxonomie

SARS-CoV-2 zählt zu den Coronaviren, die in der Natur weitverbreitet sind und viele verschiedene Tierarten infizieren. Innerhalb der Coronaviren wird die Zoonose in die Gattung des Betacoronavirus und in die Subgattung des Sarbecovirus eingeteilt. Bereits 2002 und 2012 traten die Betacoronaviren *severe acute respiratory syndrome coronavirus* (SARS-CoV) und *middle east respiratory syndrome coronavirus* (MERS-CoV) als hochinfektiöse Zoonosen beim Menschen auf und lösten schwerwiegende bis tödliche Atemwegserkrankungen aus (Hu et al. 2021; F. Wu et al. 2020). Coronaviren sind umhüllte einsträngige Ribonukleinsäure-Viren (engl. *ribonucleic acid viruses*, RNA-Viren). Das Genom kodiert für nicht-strukturelle Proteine, welche für die RNA-Replikation zuständig sind sowie für vier strukturelle Proteine. Zu den strukturellen Proteinen zählen das Spike- (S), Hüll- (engl. *envelope*) (E), Membran- (M) und Nucleocapsid-Protein (N). Das S-Protein ist wiederum in eine S1-Untereinheit mit einer Rezeptorbindungsdomäne (engl. *receptor-binding domain*, RBD), die an die Wirtszelle bindet, und einer S2-Untereinheit aufgebaut (Deng & Peng 2020; Maier et al. 2015).

Die Genomsequenz von SARS-CoV-2 ist zu 79% mit der von SARS-CoV und zu 50% mit der von MERS-CoV identisch. Im Hinblick auf die nicht-strukturellen Proteine stimmt die Aminosäuresequenz zwischen SARS-CoV-2 und SARS-CoV zu 85% überein, wohingegen bei den vier strukturellen Proteinen die Aminosäuresequenz zu 90% kongruent ist. Eine Ausnahme bildet hier das Spike-Gen (S-Gen), in dessen RBD die Aminosäuresequenz zwischen beiden Betacoronaviren lediglich zu 73% übereinstimmt (Hu et al. 2021; Lu et al. 2020). Eine weitere Besonderheit innerhalb des Genoms von SARS-CoV-2 sind die vier Aminosäurereste an der Verbindungsstelle der S1- und S2-Untereinheiten. Mithilfe der Phylogenetik wurden Cluster von SARS-CoV-2 zu SARS-CoV und *SARS-related coronaviruses* (SARSr-CoV), die in Fledermäusen gefunden wurden, identifiziert. Zu der Linie der SARS-CoV-2 Verwandten zählen neben den humanisierten Coronaviren auch Isolate aus Hufeisenfledermäusen und Schuppentieren. SARS-CoV-2 zeigt in Hinblick auf

die Aminosäuresequenz mit 96,2% eine sehr hohe Übereinstimmung zu dem Coronavirus RaTG13 aus der Fledermausart *Rhinolophus affinis*. Ebenso ist die Übereinstimmung in der Genomsequenz des hochvariablen S-Proteins zwischen beiden Coronaviren sehr hoch. Weiterhin zeigt sich bezüglich der Aminosäuresequenz des humanpathogenen SARS-CoV-2 auch zu anderen Coronaviren aus Fledermäusen eine hohe Deckungsgleichheit, wodurch die These gestützt wird, dass Fledermäuse mögliche Überträger des Virus auf den Menschen waren (Hu et al. 2021; Zhou et al. 2020). Auch malaiische Schuppentiere, die in den letzten Jahren nach China geschmuggelt wurden, wurden als potentielle Wirte identifiziert. Dabei wird innerhalb der Schuppentiere zwischen der Guangdong- und Guangxi-Linie differenziert. Die Guangdong-Linie zeigt mit 92% eine große Übereinstimmung der Genomsequenz, auch innerhalb der RBD, zu SARS-CoV-2. Das Rezeptorbindungsmotiv (engl. *receptor-binding motif*, RBM) als Teil der RBD variiert lediglich in einer Aminosäure (Hu et al. 2021; Xiao et al. 2020). Die Guangxi-Linie weist mit nur 85,5% eine deutlich geringere Übereinstimmung des Genoms auf (Lam et al. 2020). Trotz der scheinbar relativ hohen Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen von SARS-CoV-2 zu Coronaviren aus Fledermäusen und Schuppentieren spiegeln diese Affinitäten eine evolutionäre Entwicklung von mehreren Jahrzehnten wider, wodurch beide Tierarten nicht zwangsläufig als unmittelbarer Vorläuferwirt einzuordnen sind. Anders als Fledermäuse zeigen infizierte Schuppentiere klinische Symptome. Die Vermutung liegt daher nahe, dass Schuppentiere keine natürlichen Reservoirwirte, sondern höchstens Zwischenwirte des neuartigen Coronavirus sind. Nichtsdestotrotz ist die aus wissenschaftlichen Studien bekannte Genomsequenz lediglich zu 92% identisch und die Spannweite der evolutionären Entwicklung daher sehr groß. Zusammenfassend konnte der zoonotische Ursprung und die erstmalige Übertragung von SARS-CoV-2 auf den Menschen noch nicht hinreichend aufgeklärt werden (Hu et al. 2021).

2.1.3 Rezeptornutzung und Pathogenese

SARS-CoV-2 verwendet ebenso wie SARS-CoV das weitverbreitete Transmembranenzym Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (engl. *angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2) als Rezeptor zum Eintritt in die Wirtszelle, wobei die Bindungsaffinität an den ACE2-Rezeptor von SARS-CoV-2 im Vergleich zu SARS-CoV deutlich höher ist. Zum Eintritt in die Zelle sind zelluläre Proteasen wie die transmembrane Serinprotease 2 (engl. *transmembrane protease serine subtype 2*, TMPRSS2) notwendig, die durch Spaltung des S-Proteins die Endozytose aktivieren. ACE2 und TMPRSS2 sind in nasalen Epithelzellen der Lunge und Bronchialästen koexistent, wodurch die Erkrankung des Respirationstrakts im Zusammenhang mit COVID-19 erklärt werden kann. Die schnelle Replikation des Virus in den Alveolen der Lunge kann eine starke Immunantwort in Form eines lebensbedrohlichen Zytokinsturms auslösen (Hoffmann et al. 2020; Hu et al. 2021; Sungnak et al. 2020).

SARS-CoV-2 greift zunächst die oberen Atemwege an, wodurch eine Übertragung von Mensch-zu-Mensch durch die hohe Virenlast bereits zu Beginn der Krankheit in Form kleiner Flüssigkeitströpfchen beispielsweise beim Ausatmen oder Sprechen erfolgt. Weiterhin wurde das Virus in Nasensekret, Speichel, Urin, Faeces und Tränenflüssigkeit nachgewiesen. Auf Oberflächen und in sogenannten Aerosolen in der Luft überdauert das Virus mehrere Tage (Hu et al. 2021).

2.1.4 Nachweismethoden

Der Nachweis von SARS-CoV-2 erfolgt standardmäßig über die molekularbiologische Detektion der viralen Nukleinsäuren beispielsweise mithilfe der Reversen Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR). Das Ergebnis kann durch die Anwendung weiterer klinischer Verfahren wie dem Nachweis von Milchglastrübungen in der Lunge unter Anwendung der Computertomographie gefestigt werden (Hu et al. 2021; Zhang et al. 2020). Antigentest, die Proteine von SARS-CoV-2 in Atemwegssekreten nachweisen, werden als Labortest oder als Schnelltest eingesetzt. Als sogenannte Lateral-Flow-Tests sind diese für die patientennahe Anwendung kommerziell erhältlich (World Health Organization 2021a; Yamayoshi et al. 2020). Insbesondere am Ende sowie nach einer Erkrankung werden serologische Tests zum Nachweis der gebildeten Antikörper auf das S- oder N-Gen genutzt (Hu et al. 2021; Zhang et al. 2020).

2.1.5 Epidemiologische und klinische Eigenschaften sowie Therapieansätze

Generell können sich alle Altersschichten der Bevölkerung mit SARS-CoV-2 infizieren, wobei das mediale Alter der Erkrankten bei ungefähr 50 Jahren liegt. Die Schwere der Erkrankung verändert sich in Abhängigkeit vom Lebensalter maßgeblich. Während Kinder und Jugendliche oftmals milde bis asymptomatische Krankheitsverläufe zeigen, entwickeln insbesondere Männer fortgeschrittenen Alters (> 60 Jahre) mit Vorerkrankungen äußerst schwere Symptome und Komplikationen (Deng & Peng 2020; Hu et al. 2021). Die beschriebenen Symptome im Zusammenhang mit einer Infektion mit SARS-CoV-2 sind sehr vielfältig (Prasad & Prasad 2020). Abbildung 2-2 zeigt eine Übersicht der Effekte auf verschiedene Organe des menschlichen Körpers.

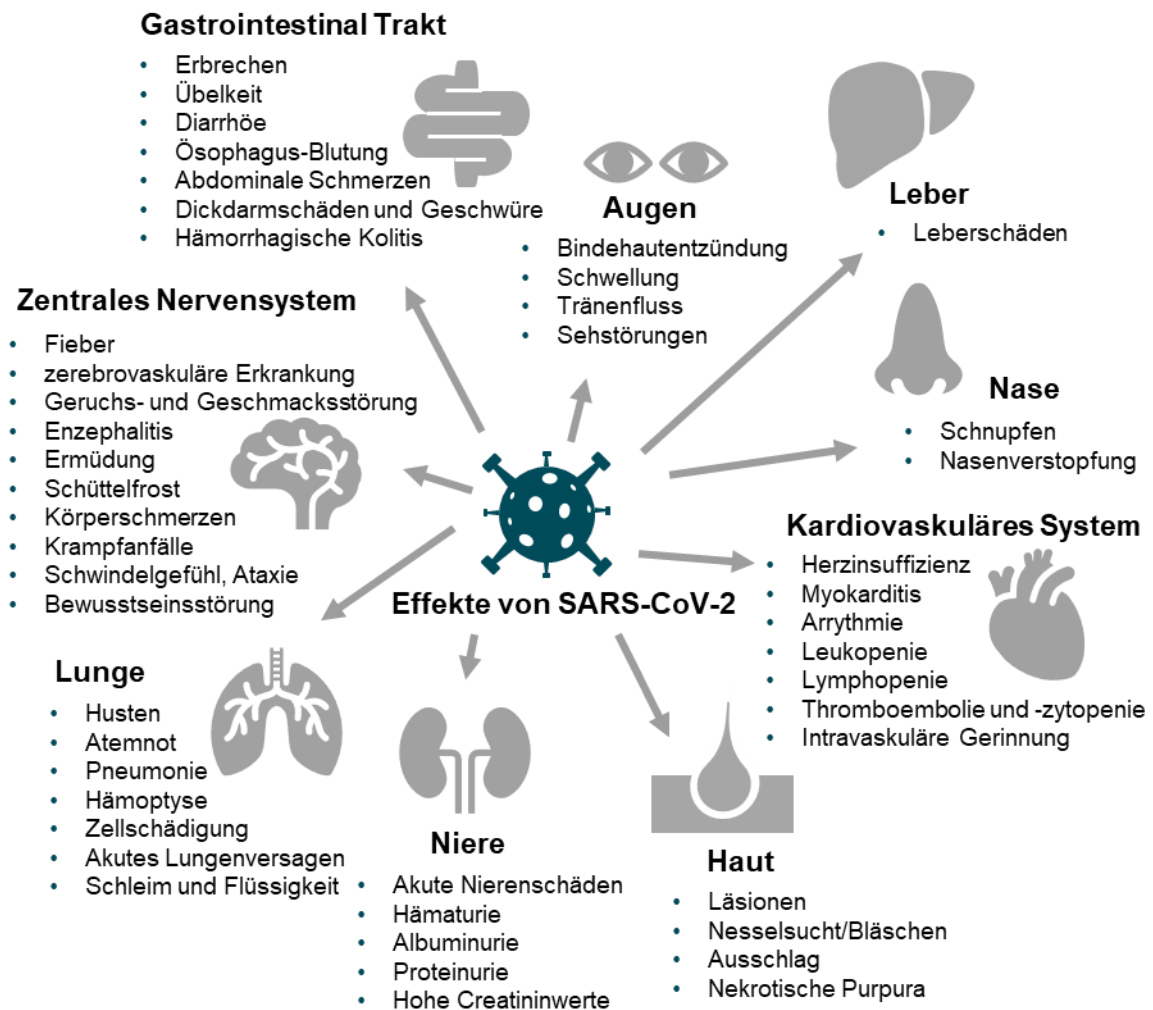


Abbildung 2-2: Multiorganeffekte von SARS-CoV-2. Graphische Zusammenfassung wichtiger Auswirkungen einer Infektion mit SARS-CoV-2 auf verschiedene Organe des menschlichen Körpers (Grant et al. 2020; Guan et al. 2020; Prasad & Prasad 2020).

Nach einer Infektionsperiode von typischerweise fünf Tagen zeigen sich klinische Symptome wie Fieber, Ermüdung und trockener Husten sowie Veränderungen des Geruchs- und Geschmackssinns. Selten wird von Kopf-, Hals- und Brustschmerzen, Durchfall, Schüttelfrost, Übelkeit und Erbrechen berichtet. Bei einigen Patienten treten Mangelerscheinungen in Form einer Leukopenie und Lymphopenie auf (Guan et al. 2020; Hu et al. 2021; Prasad & Prasad 2020). Neben einer Schattenbildung werden unter Anwendung der Computertomographie Milchglstrübungen der Lunge als häufigstes radiologisches Krankheitsbild beobachtet (Deng & Peng 2020). Innerhalb von etwa acht Tagen nach Krankheitsausbruch zeigen sich bei einigen Infizierten Dyspnoen und Pneumonien (Hu et al. 2021). Bei Patienten mit schweren Krankheitsverläufen sind zum Teil histopathologische Veränderungen der Lunge nachweisbar (Martines et al. 2020). Bei intensivmedizinisch betreuten Patienten mit lebensbedrohlichen Krankheitsverläufen treten neben dem akuten Lungenversagen (engl. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS) durch den ausgelösten Zytokinsturm immunopathologische Prozesse bis zum

Multiorganversagen auf (Hu et al. 2021; Huang et al. 2020). Die meisten Patienten können nach etwa zwei Wochen aus dem Krankenhaus entlassen werden (Hu et al. 2021).

Aufgrund divergierender Krankheitsverläufe von asymptomatischen bis lebensbedrohlichen Fällen und unterschiedlicher Schwere der Symptome werden verschiedene, oftmals antivirale Therapiemaßnahmen wie die Inhibierung des Viruseintritts in die Wirtszelle und die Replikation des Virus bis hin zur Immuntherapie angewendet (Hu et al. 2021).

2.1.6 Schutzimpfungen gegen SARS-CoV-2

Ein Jahr nach dem Ausbruch der Pandemie wurde der erste Impfstoff gegen SARS-CoV-2 zugelassen. Dieser ist seit dem 21. Dezember 2020 auch von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (engl. *European Medicines Agency*, EMA) genehmigt (European Medicines Agency 2022; Verband Forschender Arzneimittelhersteller 2022). Im Rahmen der deutschlandweiten Impfkampagne werden im Wesentlichen Impfstoffe mit Boten-Ribonukleinsäure (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) und Vektorimpfstoffe verabreicht (Abbildung 2-3).

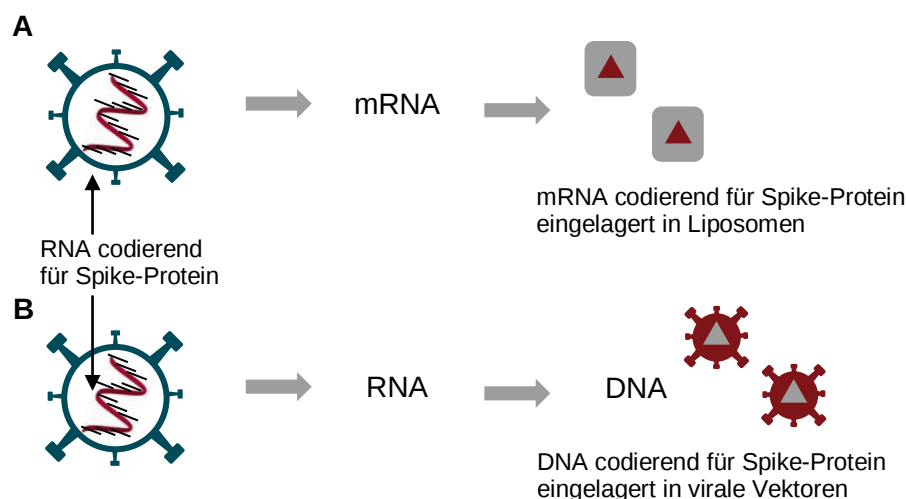


Abbildung 2-3: Impfstoffe gegen SARS-CoV-2. Impfstoffe mit Boten-Ribonukleinsäure (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) und Vektorimpfstoffe gegen SARS-CoV-2. Bei den mRNA-Impfstoffen (A) wird die mRNA codierend für das Spike-Protein in Liposomen eingelagert. Bei den Vektorimpfstoffen (B) wird die Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA) codierend für das Spike-Protein aus dem SARS-CoV-2 Virus isoliert und als Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) in harmlose virale Vektoren eingebettet (Forni et al. 2021).

Bei einem mRNA-Impfstoff (Abbildung 2-3 A) sind die Informationen des Zielantigens in Form der mRNA in Lipidmikrovesikel (Liposomen) eingebettet. Nach Eindringen in die menschliche Zelle produziert diese vorübergehend das Antigen, welches von der mRNA kodiert wird. Zu den mRNA-Impfstoffen zählt Comirnaty® der Firma BioNTech, welcher als erster Impfstoff in der Europäischen Union (EU) gegen SARS-CoV-2 zugelassen wurde. Außerdem wird der mRNA-Impfstoff Spikevax® (vorher COVID-19 Vaccine Moderna) der Firma Moderna Biotech verwendet, welcher seit dem 06. Januar 2021 in der EU zugelassen ist (European Medicines Agency 2022; Forni et al. 2021).

Bei einem Vektorimpfstoff (Abbildung 2-3 B) wird die Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA), die für das S-Protein kodiert, über einen viralen Vektor in die menschliche Zelle eingeschleust. Bei einer bestehenden Immunität gegen den harmlosen Virusvektor kann es zu einem Verlust der Replikationsfähigkeit und somit zu einer beeinträchtigten Wirksamkeit kommen. Daher werden häufig Primatenviren als Vektoren verwendet. Vaxzevria® (vorher COVID-19 Vaccine AstraZeneca) der Firma AstraZeneca war der am 29. Januar 2021 erste europäisch zugelassene Vektorimpfstoff gegen SARS-CoV-2. Am 11. März 2021 wurde COVID-19 Vaccine Jannssen® von Janssen-Cilag (Johnson&Johnson) als weiterer Vektorimpfstoff in der EU zugelassen.

Seit dem 20. Dezember 2021 ist zudem Nuvaxovid® des Pharmaunternehmens Novavax als erster proteinbasierter Impfstoff gegen SARS-CoV-2 in der EU für volljährige Personen genehmigt (European Medicines Agency 2022; Forni et al. 2021).

2.1.7 Long-/Post-COVID-19

Krankheitsfälle mit anhaltenden Symptomen und Beschwerden auch nach der akuten Phase einer SARS-CoV-2 Infektion häufen sich zunehmend. Krankheitsbilder, die mehr als vier Wochen anhalten, werden als Long-COVID-19 oder post-akute Folgen von COVID-19 (engl. *post-acute sequelae of COVID-19*, Post-COVID-19) zusammengefasst. Als Post-COVID-19 Syndrom werden anhaltende Beschwerden ab einem Zeitraum von mehr als zwölf Wochen bezeichnet (Abbildung 2-4) (Koczulla et al. 2021).

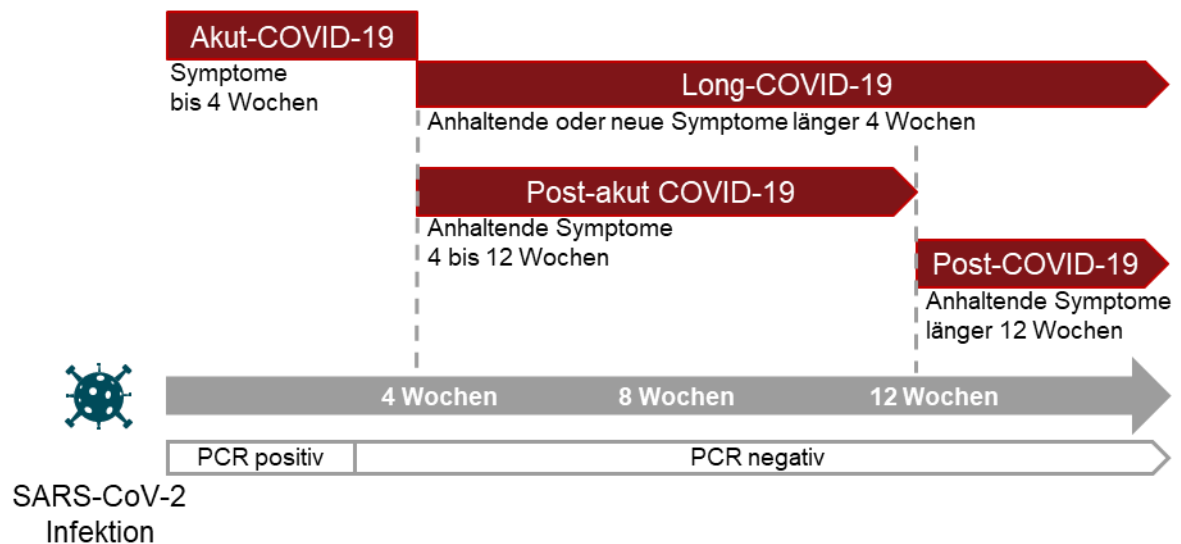


Abbildung 2-4: Einteilung einer SARS-CoV-2 Infektion und deren Spätfolgen. Schematische Darstellung einer akuten Infektion mit SARS-CoV-2, welche mittels positiven Testergebnis einer Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) nachgewiesen wurde. Zusätzlich sind die Spätfolgen einer Erkrankung in Long- und Post-COVID-19 unterteilt (Koczulla et al. 2021; Nalbandian et al. 2021).

In einer britischen Studie berichteten 13% der Befragten über anhaltende Symptome auch vier Wochen nach einer SARS-CoV-2 Infektion. 5% der Patienten hatten Beschwerden nach acht Wochen und 2% der Infizierten hatten nach zwölf Wochen Krankheitssymptome, die nicht durch eine andere Krankheit erklärt werden konnten (Sudre et al. 2021). Zu den

häufigsten Beschwerden zählen bei Long-/Post-COVID-19 Müdigkeit, Kopfschmerzen, Dyspnoe und Anosmie (Nalbandian et al. 2021; Sudre et al. 2021).

2.2 Blut und Blutbestandteile

Blut besteht aus zellulären Bestandteilen in einem flüssigen Medium, das Blutplasma genannt wird. Das Blutvolumen beträgt bei einem erwachsenen Menschen zwischen fünf und sechs Litern, dies entspricht 7-8% seines Körpergewichtes. Das native Blut, das in den Blutgefäßen zirkuliert, wird durch ein Puffersystem aus Kohlensäure und Hydrogencarbonat bei einem konstanten pH-Wert von 7,4 gehalten. Der zelluläre Volumenanteil des Blutes wird Hämatokrit genannt und beträgt bei Männern zwischen 41-50% und bei Frauen zwischen 37-46%. Er besteht zu 99% aus roten Blutkörperchen, den sogenannten Erythrozyten, welche viel Hämoglobin enthalten und somit am Sauerstofftransport beteiligt sind. Weiterhin setzt sich der Hämatokrit aus Blutplättchen, den Thrombozyten, die bei der Blutstillung mitwirken und den weißen Blutplättchen zusammen. Letztere werden auch Leukozyten genannt, teilen sich in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten auf und spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr (Löffler & Petrides 2014).

Das arteriell, venös oder kapillar entnommene Blut wird als Vollblut bezeichnet. Diese rote, trübe Flüssigkeit enthält alle Bestandteile des nativen Blutes und beginnt nach der Entnahme umgehend zu gerinnen. Durch die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren wandelt sich das Protein Fibrinogen zu Fibrin um und schließt sich zu Fibrinnetzwerken zusammen. Diese Zusammenschlüsse können durch Zentrifugation abgetrennt werden. Der erhaltene zellfreie, klare, gelbliche Überstand nach der Gerinnung wird als Blutserum bezeichnet. Die Serumröhrchen für die Blutabnahme enthalten ein Gel aus Polymethylacrylat oder Materialien auf Silikon-/Polyesterbasis. Dieses Trenngel hat eine geringere Dichte als die Fibrinnetzwerke und lagert sich daher als Schicht zwischen die Blutzellen und den Überstand, wodurch die Abtrennung des Überstandes von den Blutzellen erleichtert wird (Kuhlmann 2010; Löffler & Petrides 2014).

Durch den Zusatz von Antikoagulanzen wird die Gerinnung des Blutes gehemmt und dadurch anstatt Serum Blutplasma gewonnen. Die Gerinnungshemmung geschieht einerseits durch die Bindung von Calciumionen an Ethylendiamintetraacetat (EDTA) oder Citrat oder andererseits durch Heparin, welches die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin während der Blutgerinnung durch das Enzym Thrombin hemmt. Durch die Zentrifugation des mit Antikoagulanzen versetzten Blutes wird Plasma als zellfreier, klarer, gelblicher Überstand erhalten. In Abhängigkeit von dem verwendeten Antikoagulans wird EDTA-, Citrat- oder Heparin-Plasma erhalten (Kuhlmann 2010; Löffler & Petrides 2014). Blutplasma ist eine zellfreie, proteinreiche Flüssigkeit, welche für den Transport von Nährstoffen, Elektrolyten, Stoffwechselprodukten und Botenstoffen zuständig ist. Im gesamten Blutplasma mit einem Volumen von drei Litern sind über 200 g Proteine enthalten, wobei

Albumine mit 60% den größten Anteil neben Globulinen ausmachen. Durch Albumine werden unter anderem freie Fettsäuren transportiert. Der Transport von lipophilen Substanzen wie Triacylglyceriden, Phosphoglyceriden, Cholesterinen und Cholesterinestern in dem wässrigen Medium erfolgt durch die Bindung an Transportproteine. Die Lipoproteine werden entsprechend ihrer Dichte und ihres Durchmessers in Chylomikronen, Lipoproteine mit sehr geringer Dichte (engl. *very low density lipoprotein*, VLDL), geringer Dichte (engl. *low density lipoprotein*, LDL) und hoher Dichte (*high density lipoprotein*, HDL) eingeteilt (Abbildung 2-5 A). Teilweise erfolgt eine weitere Unterteilung in Lipoproteine mit mittlerer Dichte (engl. *intermediate density lipoprotein*, IDL), die hinsichtlich ihrer Eigenschaften zwischen VLDL und LDL einzuordnen sind. Die Lipoproteine bestehen aus spezifischen Apolipoproteinen, Cholesterinen, Phospholipiden und Triacylglyceriden (Abbildung 2-5 B). Lipoproteine sind mizellenähnlich aufgebaute Partikel. Auf ihrer Oberfläche befinden sich polare Proteine und unveresterte Cholesterine. Zusammen mit der polaren Kopfgruppe der amphiphilen Phospholipide bilden sie die Hülle des Lipoproteins. Die unpolaren Lipidreste der Phospholipide ragen in das Innere des Lipoproteins. Die Cholesterinester und Triacylglyceride bilden ihren unpolaren Kern. Die Apolipoproteine und Phospholipide sind demnach Lösungsvermittler für die unpolaren Cholesterine und Triacylglyceride. Die Zusammensetzung der Lipoproteine verändert sich, indem das Lipid-zu-Protein-Verhältnis, ausgehend von den Chylomikronen zum HDL, abnimmt (Bruker BioSpin 2019; Jiménez et al. 2018; Löffler & Petrides 2014).

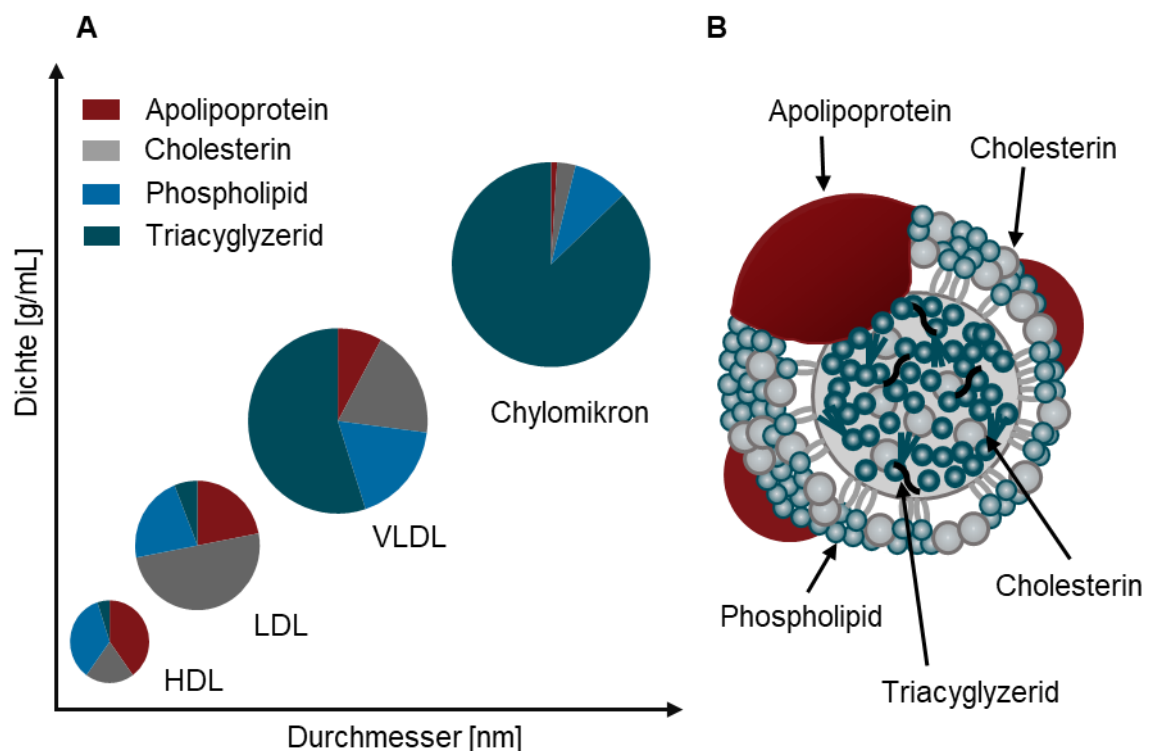


Abbildung 2-5: Übersicht über die Lipoproteine und deren Aufbau. (A) Darstellung der Chylomikronen, des *very low density lipoprotein* (VLDL), des *low density lipoprotein* (LDL) und des *high density lipoprotein* (HDL) in Abhängigkeit von ihrer Dichte und ihres Durchmessers. (B) Schematischer Aufbau der Lipoproteine aus Apolipoproteinen, Cholesterinen, Phospholipiden und Triacylglyceriden (Jiménez et al. 2018; Löffler & Petrides 2014).

Die Chylomikronen sind für den Transport der aus der Nahrung aufgenommenen Lipide zuständig. VLDL transportiert die in der Leber synthetisierten Triacylglyceride, Phospholipide und Cholesterine. Beim Abbau des VLDL wird LDL als cholesterinreiches Lipoprotein gebildet, welches insbesondere vom extrahepatischen Gewebe aufgenommen wird. HDL ist schlussendlich für den Rücktransport der Lipide zur Leber für die dortige Ausscheidung zuständig (Löffler & Petrides 2014).

2.3 Metabolomics

Der Begriff Metabolom wurde erstmals im Jahr 1998 von Stephen G. Oliver verwendet (Oliver et al. 1998). Verschiedene Definitionen des Metaboloms sind derzeit gebräuchlich. Nach Robert D. Hall umfasst das Metabolom die Gesamtheit niedermolekularer Stoffwechselprodukte in einem Organismus mit einer Masse kleiner 1 500 Da (Hall 2006). Katherine Hollywood definierte das Metabolom als messbare und quantifizierbare Bestandteile einer Zelle, wobei diese ein Masse-zu-Ladungsverhältnis (engl. *mass-to-charge-ratio*, *m/z*-Verhältnis) von kleiner 3 000 haben (Hollywood et al. 2006).

Metaboliten sind niedermolekulare Stoffwechselprodukte, die in inter- oder intrazellulären Bereichen biologischer Systeme wie Zellen, Organen oder Organismen vorliegen (Villas-Bas et al. 2007). Entsprechend werden Metaboliten, die durch das körpereigene Genom codiert und fortlaufend über die biochemische Kaskade in Zellen enzymatisch synthetisiert werden, als endogene Metaboliten bezeichnet. Hingegen werden exogene Metaboliten beispielsweise über die Nahrung oder als Medikament aufgenommen oder von wirtsspezifischen Mikroorganismen synthetisiert und liegen außerhalb der körpereigenen Zellen vor (Nielsen & Oliver 2005). Die Moleküle entstammen verschiedenen Substanzklassen wie Aminosäuren, Kohlenhydraten, Lipiden, organischen Säuren, Vitaminen, Polyphenolen, Alkaloiden und Mineralien. Diese sind am Stoffwechsel der Zelle beteiligt und tragen zur normalen Funktion, zum Wachstum und zur Reparatur der Zelle bei (Dunn & Ellis 2005; Wishart 2008a). Primäre Metaboliten sind dabei essentiell für die Eigenschaften und Prozesse eines Organismus, insbesondere der Zellteilung und des Wachstums. Stoffe, die vom Körper aus Primärmetaboliten synthetisiert werden, eine geringere Verbreitung im Körper haben und spezifische Aufgaben übernehmen, werden als Sekundärmetaboliten bezeichnet. Diese dienen häufig dem Schutz des Organismus und wirken als Botenstoffe. Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle bei der Kommunikation, denn Metaboliten in Körperflüssigkeiten stehen in einem dynamischen Gleichgewicht zu den Metaboliten in Zellen und Geweben eines Organismus (Villas-Bas et al. 2007).

Neben Genomics, Transcriptomics und Proteomics zählt Metabolomics zu den sogenannten „-omics“-Disziplinen (Abbildung 2-6). Der Informationsfluss vom Genom über das Transkriptom und Proteom bis zum Metabolom und letztendlich zum Phänotyp wird in der „omics“-Kaskade beschrieben (Dettmer et al. 2007).

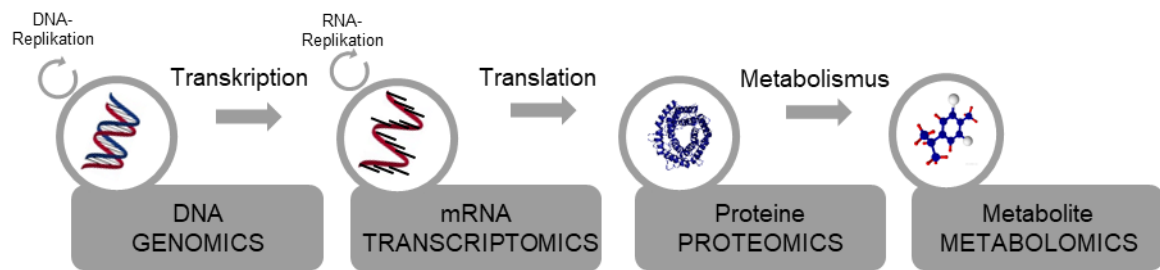


Abbildung 2-6: „-omics“-Kaskade und ihre Teilbereiche. Schematische Darstellung der "-omics"-Kaskade mit den Disziplinen Genomics, Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics (Dettmer et al. 2007).

Neben der genetischen Prädisposition wie Alter, Geschlecht und Epigenetik tragen umweltbedingte, externe Faktoren wie Ernährung, Darmflora, Sport und Krankheiten zur Veränderung des metabolischen Profils und zur Ausbildung eines individuellen Phänotyps bei (Bollard et al. 2005; Dettmer et al. 2007). Toxische oder metabolische Krankheitszustände als Resultat abnormaler zellulärer Vorgänge spiegeln sich daher in veränderten metabolischen Zusammensetzungen der Biofluide wider. Durch die systematische Analyse der Metaboliten werden diese Veränderungen untersucht (Nicholson et al. 1999).

Metabolomics beschreibt die Erfassung, Identifizierung und Quantifizierung möglichst aller Stoffwechselprodukte eines Organismus. Oliver Fiehn, der den Begriff Metabolomics prägte, befasst sich insbesondere mit der massenspektrometrischen Analyse von Mikroorganismen und Pflanzen (Fiehn 2001). Die Bezeichnung Metabonomics hingegen wurde zunächst von Jeremy K. Nicholson gewählt, der Säugetierstudien mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR-Spektroskopie) analysierte. Metabonomics beschreibt die quantitative Messung der Veränderungen des Metaboloms eines lebenden Systems als Antwort auf genetische Modifikationen oder pathophysiologische Einflüsse (Nicholson et al. 1999). Heutzutage werden beide Bezeichnungen synonym verwendet (Nicholson & Lindon 2008). Im Folgenden wurde einheitlich der Begriff Metabolomics genutzt.

Zur Klassifizierung der verschiedenen Metabolomanalysen wird zwischen hypothesengenerierenden, nicht-zielgerichteten (engl. *non-targeted*) und hypothesengesteuerten, zielgerichteten (engl. *targeted*) Ansätzen unterschieden (Herder et al. 2011; Patti et al. 2012).

Zu den *non-targeted* Analysen (Abbildung 2-7) zählt das *Metabolic Fingerprinting*, welches die hypothesenfreie Erfassung möglichst vieler Metaboliten eines biologischen Systems zum Ziel hat. Dabei ist weder eine Quantifizierung noch Identifizierung der Substanzen zwingend erforderlich (Dunn & Ellis 2005).

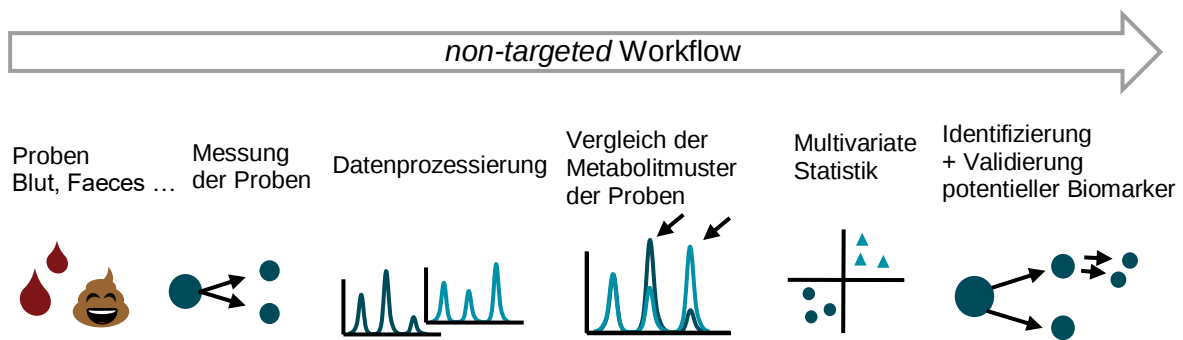


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung einer *non-targeted* Analyse des Metaboloms. Bei einem *non-targeted* Workflow werden die Proben gemessen und mithilfe der multivariaten Statistik ausgewertet. Mithilfe dieses nicht-zielgerichteten Ansatzes werden Unterschiede und potentielle Biomarker zwischen den Proben identifiziert (Patti et al. 2012).

Bei einem *non-targeted* Workflow wird eine unspezifische Aufarbeitungsmethode der biologischen Proben gewählt. Dadurch wird ein möglichst breites Metabolitspektrum erfasst und ein spezifisches Metabolitenmuster, ähnlich eines menschlichen Fingerabdrucks, erstellt. Im Anschluss werden die Metabolitenprofile verschiedener Gruppen verglichen. Mithilfe der multivariaten Datenanalyse werden Schlüsselmetaboliten charakterisiert, deren relative Konzentrationen sich zwischen den analysierten Gruppen signifikant unterscheiden. Die Schlüsselmetaboliten mit der größten Varianz können abschließend beispielsweise durch Datenbankrecherchen identifiziert werden. Dadurch können Aussagen über verschiedene Krankheitsbilder, exogene Einflüsse oder geographische Herkunft getroffen werden (Dunn & Ellis 2005; Patti et al. 2012).

An das *Metabolic Fingerprinting* schließt häufig das *Metabolic Profiling* an. Dabei handelt es sich um einen hypothesengesteuerten *quasi-targeted* Ansatz, bei dem Metaboliten aus einer Substanzklasse oder eines bestimmten Stoffwechselweges simultan analysiert werden (Dunn & Ellis 2005).

Bei dem *Metabolic Targeting* handelt es sich um einen hypothesengesteuerten, zielgerichteten Ansatz, bei dem wenige ausgewählte Schlüsselmetaboliten absolut quantifiziert werden. In Abbildung 2-8 ist die schematische Abfolge eines *targeted* Ansatzes dargestellt (Dunn & Ellis 2005; Patti et al. 2012).

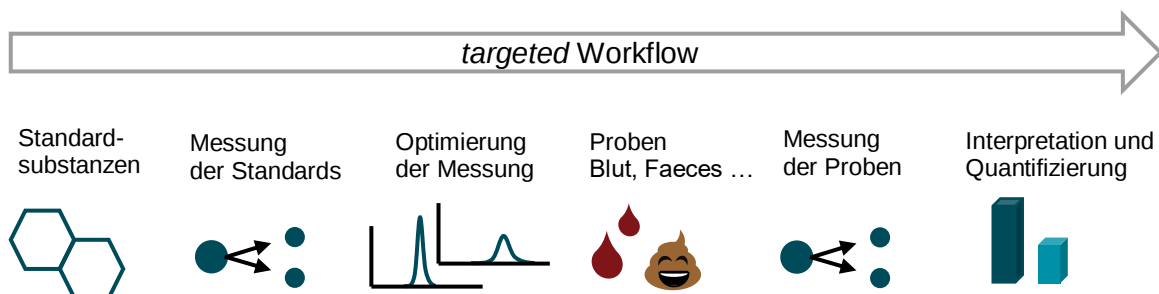


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung einer *targeted* Analyse des Metaboloms. Bei einem *targeted* Workflow werden die Proben spezifisch extrahiert, um bekannte Substanzen bestmöglich zu analysieren. Durch den Vergleich mit Standardsubstanzen können diese eindeutig identifiziert und quantifiziert werden (Patti et al. 2012).

Mithilfe von Standardsubstanzen wird die Messmethode für die zu analysierenden Verbindungen optimiert. Anschließend werden die Konzentrationen der Biomarker bestimmt und zwischen verschiedenen Proben verglichen. Diese Vorgehensweise setzt Kenntnisse über die Schlüsselmetaboliten einer Analyse voraus und ist daher häufig einem *non-targeted* Ansatz nachgeschaltet (Patti et al. 2012).

2.4 Instrumentelle Analytik

Die vollständige detaillierte Analyse des Metaboloms wird durch seine Diversität und Dynamik erschwert (Dettmer et al. 2007). Weiterhin liegen die Metaboliten mit verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften in einem biologischen System in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen vor. Eine große Anzahl der Metaboliten sowie die Komplexität der Matrices erschwert die Analyse ebenfalls. Durch eine geschickte Kombination verschiedener Extraktionsverfahren und komplementärer analytischer Techniken wird daher versucht, möglichst viele Metaboliten zu erfassen (Dunn & Ellis 2005; Nicholson et al. 1999). Im Wesentlichen werden die beiden hochauflösenden Verfahren der Massenspektrometrie (MS) und NMR-Spektroskopie eingesetzt. Insgesamt ist es allerdings nicht möglich, alle vorhandenen Metaboliten simultan zu identifizieren und zu quantifizieren (Dettmer et al. 2007).

Beide analytischen Techniken haben Vor- und Nachteile, die in Tabelle 2-1 aufgeführt sind.

Tabelle 2-1: Vergleich analytischer Techniken der Metabolomics-Forschung. Vor- und Nachteile der Massenspektrometrie (MS) und NMR-Spektroskopie (Dettmer et al. 2007; Karu et al. 2018; Nagana Gowda & Raftery 2014).

	Massenspektrometrie	NMR-Spektroskopie
	- hohe Sensitivität - hohe Selektivität - großer dynamischer Bereich - Kopplung mit chromatographischen Trennsystemen - verschiedene Ionisierungstechniken - Identifizierung mittels MS/MS-Experimenten	- gute Reproduzierbarkeit - minimale Probenvorbereitung - nicht-destruktive Messmethode - Analyse nicht oder schlecht ionisierbarer Metaboliten - einfache Quantifizierung - gute Automatisierungsmöglichkeiten - einfache Identifizierung und Strukturaufklärung
	- komplexe Probenvorbereitung - lange Analysendauer mit chromatographischer Trennung - eingeschränkte Reproduzierbarkeit	- eingeschränkte Sensitivität - komplexe Spektren mit Signalüberlappung - relativ hohe Nachweisgrenze

Massenspektrometrie	NMR-Spektroskopie
• komplexe Datenprozessierung	• verhältnismäßig geringer dynamischer Bereich • wenige Kopplungsmöglichkeiten

Die Massenspektrometrie zeichnet sich durch die hohe Sensitivität und Selektivität aus. Weiterhin besteht die Möglichkeit der Kopplung mit verschiedenen chromatographischen Trennsystemen wie der Flüssigchromatographie und Gaschromatographie sowie der Kapillarelektrophorese. Dadurch können die Ionensuppression reduziert, isobare Verbindungen getrennt, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis minimiert sowie insgesamt die Nachweisgrenze und Komplexität der Spektren verringert werden (Dettmer et al. 2007). Die Nachteile liegen allerdings in der häufig umfangreichen Probenvorbereitung, der komplexen Prozessierung großer Datenmengen und insbesondere in der eingeschränkten Reproduzierbarkeit. Im Gegensatz dazu liegen die Vorteile der NMR-Spektroskopie in der sehr guten Reproduzierbarkeit, der geringen Probenvorbereitung sowie der nicht-destruktiven Analyse. Ein Nachteil ist allerdings die geringere Sensitivität im Vergleich zur Massenspektrometrie. Durch die Vielzahl der Signale, verbunden mit den eingeschränkten Kopplungsmöglichkeiten, treten Signalüberlappungen in den komplexen NMR-Spektren auf, die zu einer limitierten Anzahl nachweisbarer und quantifizierbarer Metaboliten führen (Karu et al. 2018; Nagana Gowda & Raftery 2014).

2.4.1 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wird bei der Analyse komplexer biologischer Matrices häufig mit chromatographischen Trennsystemen und zunehmend auch mit der Ionenmobilitätsspektroskopie kombiniert. Für die Zuordnung und Identifizierung ergeben sich folgende Parameter, die Rückschlüsse auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Analyten liefern: (A) die Retentionszeit, (B) die Driftzeit als Maß für die räumliche Anordnung eines Ions, (C) das m/z -Verhältnis des Vorläuferions (engl. *precursor ions*), (D) das charakteristische Fragmentspektrum (Abbildung 2-9) (Hesse et al. 2005; Kanu et al. 2008).

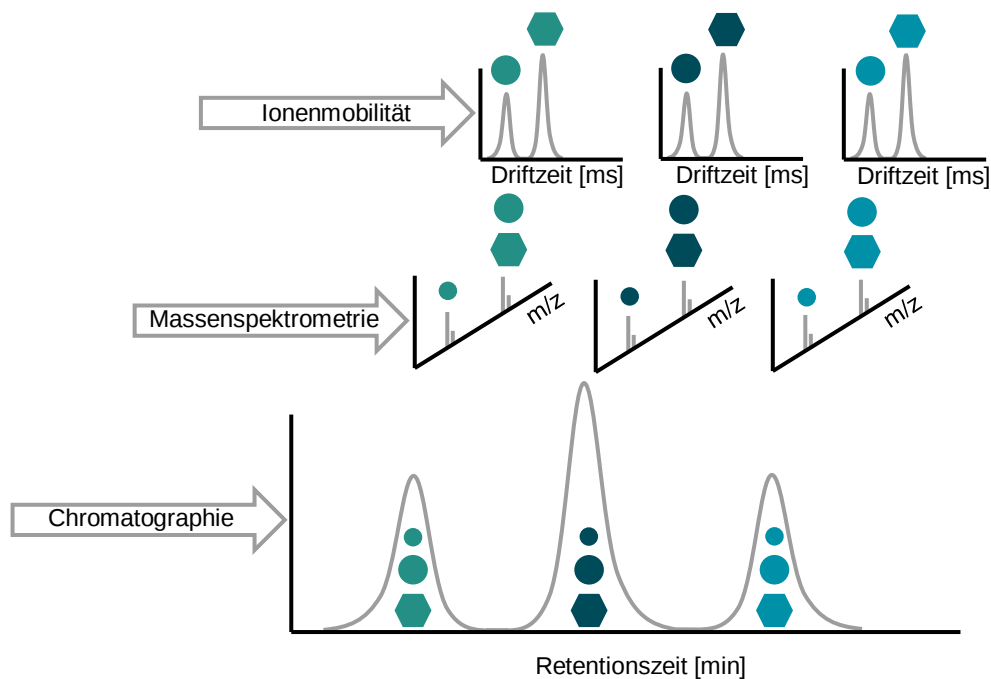


Abbildung 2-9: Trennmechanismen im Rahmen der Massenspektrometrie. Kopplung der Chromatographie, Massenspektrometrie und Ionenmobilität zur Charakterisierung und Identifizierung von Metaboliten über die Retentionszeit in Minuten (min), das Masse-zu-Ladungsverhältnis (engl. *mass-to-charge-ratio*, m/z-Verhältnis), das charakteristische Fragmentspektrum (nicht dargestellt) und die Driftzeit in Millisekunden (ms) (Gethings et al. 2012).

Die Chromatographie ist ein auf den physikalisch-chemischen Eigenschaften basierendes Trennverfahren für Stoffgemische zwischen zwei nicht-mischbaren Phasen. Die in einer mobilen Phase vollständig gelösten Analyten durchströmen eine immobilisierte, stationäre Phase. Durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen werden die zu trennenden Substanzen verschieden retardiert (Gey 2015; Ritgen 2019). Als Resultat wird ein Chromatogramm erstellt, bei dem auf der Ordinate die Intensität eines Signals und auf der Abszisse die Zeit aufgetragen ist (Gey 2015). Je nach Art der stationären und mobilen Phase wird unter anderem zwischen Adsorptions-, Ausschluss-, Austausch-, Affinitäts- und Ionenpaarchromatographie differenziert. Bei Analysen im Bereich der Metabolomics-Forschung wird häufig die Säulenchromatographie in Form der Flüssig- oder Gaschromatographie angewendet. Bei adsorptionschromatographischen Methoden werden die Analyten durch VAN-DER-WAALS-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Anziehung bzw. Abstoßung verschieden stark an der stationären Phase adsorbiert. Dabei stellt sich ein dynamisches Verteilungsgleichgewicht zwischen den Analyten in der stationären und der mobilen Phase ein. Die stoffspezifische Retardierung wird durch den Verteilungskoeffizienten K_v beschrieben, welcher sowohl von den Eigenschaften der Analyten als auch von denen des Säulenmaterials abhängig ist und das Verhältnis der Konzentration der Analyten in der stationären ($c_{\text{stationär}}$) und mobilen Phase (c_{mobil}) beschreibt (Gey 2015; Ritgen 2019).

$$K_v = \frac{c_{\text{stationär}}}{c_{\text{mobil}}}$$

Substanzen mit einem großen Verteilungskoeffizienten haben also eine hohe Affinität zur stationären Phase und werden stärker retardiert als Substanzen mit einem kleinen Verteilungskoeffizienten (Gey 2015).

Die Trennleistung eines chromatographischen Systems wird über die theoretische Trennstufenhöhe (engl. *height equivalent to a theoretical plate*, H_{HETP}) angegeben. Die chromatographische Trennung der Analyten wird von der EDDY-/Streudiffusion A, der Strömungsverteilung/Longitudinaldiffusion B und von Stoffaustauschprozessen C in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit u beeinflusst und über die vereinfachte VAN-DEEMTER-Gleichung beschrieben (van Deemter et al. 1956; Ritgen 2019; Skoog et al. 2007).

$$H_{\text{HETP}} = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

Hierbei wird die stationäre Phase in Trennböden unterteilt, in welchen sich ein dynamisches Gleichgewicht des Analyten zwischen stationärer und mobiler Phase einstellt. Je kleiner die Trennstufenhöhe H in Abhängigkeit von der Länge der Trennsäule L ist, desto mehr Trennböden N können ausgebildet werden und desto höher ist die Trennleistung des Systems (Gey 2015).

$$N = \frac{L}{H}$$

Die Effizienz eines chromatographischen Systems kann je nach Fragestellung durch die chemische Zusammensetzung der stationären und mobilen Phase, der Fließgeschwindigkeit, der Säulendimension, der Partikelgröße, der Elution (isokratisch/Gradientenelution) sowie der Temperatur gesteigert werden (Gey 2015; Ritgen 2019).

Nach der chromatographischen Trennung werden die Analyten in einer Ionenquelle unter Atmosphärendruck oder im Vakuum ionisiert, wobei zwischen harten und weichen Ionisationsarten unterschieden wird. Zu den harten Ionisationsarten wird beispielsweise die Elektronenstoßionisation (engl. *electron ionization*, EI) gezählt, die hochenergetisch ist und zu einer starken Fragmentierung der Analyten führt. EI-Quellen werden insbesondere bei massenspektrometrischen Kopplungen mit der Gaschromatographie angewendet. Zu den weichen Ionisationsarten gehören unter anderem die Elektronensprayionisation (engl. *electrospray ionization*, ESI), die chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) oder die Matrix-assoziierte Laser-Desorption-Ionisation (engl. *matrix-assisted laser desorption-ionization*, MALDI). Bei diesen weichen Ionisationsmethoden wird eine verhältnismäßig geringe Energie für die Ionisation angewendet, wodurch nur eine geringe Fragmentierung der Analyten auftritt. Je nach Art der angelegten Spannung können positive oder negative Ionen aus leicht ionisierbaren Molekülen M erzeugt werden. Durch Protonierung ($[M+nH]^{n+}$) oder Deprotonierung

($[M-nH]^n$) von vorzugsweise funktionellen Gruppen werden bei kleinen Analyten einfach geladene Pseudomolekülionen gebildet, wohingegen bei größeren Molekülen mit vielen funktionellen Gruppen die Tendenz zur Bildung von Mehrfachladungen steigt. Weiterhin können Adduktionen mit Alkalimetallen ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$), quartären Ammoniumsalzen ($[M+NH_4]^+$) im positiven Ionenmodus oder organischen Säuren ($[M+HCOO]^-$) im negativen Ionenmodus gebildet werden. Abschließend werden die gebildeten Ionen in der Gasphase fokussiert und in das Hochvakuum des Massenspektrometers geleitet (Budzikiewicz & Schäfer 2005; Gey 2015).

In einem Massenanalysator werden die Ionen in einem elektromagnetischen Feld entsprechend ihres m/z -Verhältnisses getrennt und detektiert (Gey 2015; Gross 2013). Bei der Tandem-Massenspektrometrie werden durch gezielte Fragmentierungsreaktionen eines zuvor ausgewählten *Precursor*-Ions strukturelle Informationen über die analysierte Verbindung erhalten. Gängige Masseanalysatoren sind Ionenfallen, Quadrupolmassenfilter (Single-Quadrupol, Triple-Quadrupol) und Flugzeit-Massenspektrometer (engl. *time-of-flight-mass spectrometer*, ToF-Massenspektrometer). Weiterhin können auch verschiedene Massenanalysatoren wie beispielsweise Quadrupol-Ionenfallen (engl. *quadrupole-trap*, Q-Trap) und Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (engl. *quadrupole-time-of-flight-mass spectrometer*, QToF-Massenspektrometer) miteinander kombiniert werden (Budzikiewicz & Schäfer 2005; Gey 2015; Gross 2013). Für *non-targeted* Analysen des Metaboloms, bei denen simultan eine Vielzahl von Metaboliten mit hoher Massengenauigkeit über einen großen dynamischen Bereich erfasst werden sollen, werden häufig hochauflösende QToF-Massenspektrometer (Abbildung 2-10) eingesetzt (Dettmer et al. 2007).

Wechselspannungsfeld überlagert wird, wobei die beiden gegenüberliegenden Elektroden die gleiche Polarität aufweisen. Durch die Anpassung der Gleich- und Wechselspannung an den jeweiligen Analyten passieren lediglich Ionen eines definierten m/z -Verhältnisses auf einer stabilen Kreisbahn den Massenfilter. Alle anderen Ionen bewegen sich auf instabilen oszillierenden Kreisbahnen und treffen schlussendlich auf eine der Elektroden, an denen sie neutralisiert werden. Die Ionen, die den Quadrupol passieren, gelangen in eine Kollisionszelle, welche mit einem Inertgas wie Stickstoff, Argon oder Helium gefüllt ist. Durch eine Erhöhung der Spannung erhalten die Ionen eine höhere kinetische Energie und treffen daher vermehrt auf das Inertgas. Durch diese Stöße werden die *Precursor*-Ionen angeregt und entsprechend ihrer Energien in charakteristische Fragmente zerlegt. Diese Fragmentierungsmethode wird als kollisionsinduzierte Dissoziation (engl. *collision-induced dissociation*, CID) bezeichnet. Die fokussierten Fragmente werden in einem ToF-Analysator im Hochvakuum untersucht. Bei einem Reflektron-ToF-Massenspektrometer werden die verlangsamten und zu Ionenpaketen komprimierten Ionen durch die angelegte Beschleunigungsspannung in Form eines kurzen Impulses orthogonal in die Richtung der feldfreien Driftstrecke beschleunigt. Durch die orthogonale Beschleunigung werden longitudinale Diffusionseffekte minimiert. Dabei findet eine zeitliche Auftrennung der Ionen entsprechend ihrer Geschwindigkeiten in einer definierten feldfreien Driftstrecke statt. Die Trennung beruht auf der Tatsache, dass Ionen unterschiedlicher m/z -Verhältnisse bei gleicher kinetischer Energie unterschiedlich stark beschleunigt werden. Ionen mit einem kleinen m/z -Verhältnis werden deutlich schneller beschleunigt als Ionen mit einem großen m/z -Verhältnis. Zum Zeitpunkt des Beschleunigungsimpulses befinden sich Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis in unterschiedlicher Entfernung zum Potentialursprung im orthogonalen Beschleuniger. Dadurch erhalten sie geringfügig unterschiedliche kinetische Energien. Durch die zeitliche Fokussierung mithilfe eines Reflektrons, welcher aus lamellenartig angeordneten Ringelektroden aufgebaut ist, an denen geringfügig verschiedene Spannungen angelegt sind, kann dieser Effekt kompensiert werden und die Massengenauigkeit erhöht werden. Da Ionen mit höherer kinetischer Energie tiefer in das Reflektron eindringen und daher eine längere Wegstrecke durchlaufen, treffen sie trotz unterschiedlicher Anfangsenergien mit langsameren Ionen eines m/z -Verhältnisses gleichzeitig auf den Detektor. Zusätzlich werden die Ionen durch das Reflektron in die entgegengesetzte Richtung umgelenkt und dadurch auf eine parabelförmige Flugbahn gelenkt. Durch diese Verlängerung der feldfreien Driftstrecke wird die Auflösung des Massenspektrometers verbessert. Abschließend wird der Ionenstrom meist durch einen Sekundärelektronenvervielfacher verstärkt und in ein elektrisches Messsignal in Abhängigkeit von der Zeit umgewandelt. Bei bekannten Bedingungen der Beschleunigungsspannung und der Driftstrecke ist das m/z -Verhältnis proportional zum Quadrat der Flugzeit. Daher wird durch die Messung der Zeit, die die Ionen bis zum

Auftreffen auf den Detektor benötigen, das m/z -Verhältnis berechnet (Budzikiewicz & Schäfer 2005; Gey 2015; Gross 2013). Um Massengenauigkeiten durch Schwankungen beispielsweise der Spannungen oder Temperaturen auszugleichen, wird häufig eine interne Rekalisierung mithilfe einer Locksubstanz bekannter Masse durchgeführt (Wachsmuth et al. 2013).

2.4.2 Kernspinresonanz-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie ist eine analytische Technik, bei der Atome, deren Kerne ein magnetisches Moment aufweisen, in einem äußeren Magnetfeld beobachtet werden. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie können strukturelle und quantitative Informationen über die Biomoleküle erhalten werden. Proben werden zu diesem Zweck in ein homogenes äußeres Magnetfeld gebracht und durch oszillierende elektromagnetische Felder im Radiofrequenzbereich angeregt. Die durch Absorption der Strahlung erzeugte Resonanz führt zur Induktion eines Stroms in einer Empfängerspule, wodurch ein detektierbares Signal erzeugt wird (Gey 2015; Ritgen 2020).

Unter Anwendung klassischer Theorien können die Prinzipien der NMR-Spektroskopie nur unzulänglich erklärt werden. Die entscheidende Größe für die Verwendung von Atomen für NMR-Messungen ist die Kernspinkquantenzahl I . Kernspins mit einer Spinkquantenzahl $I \neq 0$ sind NMR-aktiv. In der NMR-Theorie können die Spinkquantenzahlen ganzzahlige oder halbzahlige Werte annehmen. Bei der Betrachtung der Spinkquantenzahl treten daher folgende Fälle auf (Tabelle 2-2): (A) Die Anzahl der Protonen und Neutronen in einem Kern ist geradzahlig, wobei sich kein Gesamtspin ergibt, da sich die gegeneinander gepaarten Vektoren untereinander aufheben. Für die Spinkquantenzahl gilt $I = 0$. (B) Die Summe der Protonen und Neutronen in einem Atomkern ist ungeradzahlig, folglich ist die Spinkquantenzahl halbzahlig ($I = 1/2, 3/2, 5/2, \dots$). und von null verschieden ($I = 1, 2, 3, \dots$). (C) Ist die Anzahl der Protonen und Neutronen in einem Kern jeweils ungeradzahlig, so ist die Spinkquantenzahl ganzzahlig (Gey 2015; Ritgen 2020).

Tabelle 2-2: NMR-Aktivität verschiedener Atomkerne. Exemplarische Auswahl verschiedener Kerne und Spinkquantenzahlen im Zusammenhang mit geradzahligem (g) oder ungeradzahligem (u) Nukleonenzahlen (Gey 2015).

		Beispiel	Masse/ Ordnungszahl	Protonen/ Neutronen	Spin I	NMR- Aktivität
A	$I = 0$	^{12}C	g/g 12/6	g/g 6/6	0	👎
B	$I = n \cdot 1/2$	^1H	u/u 1/1	u/g 1/0	$1/2$	👍
		^{13}C	u/g 13/6	g/u 6/7	$1/2$	👍
C	$I = n \cdot 1$	^{14}N	g/u 14/7	u/u 7/7	1	👍

Das Verhalten von Atomkernspins unter dem Einfluss eines äußeren magnetischen Feldes und das Prinzip ihrer Anregung ist in Abbildung 2-11 erklärt.

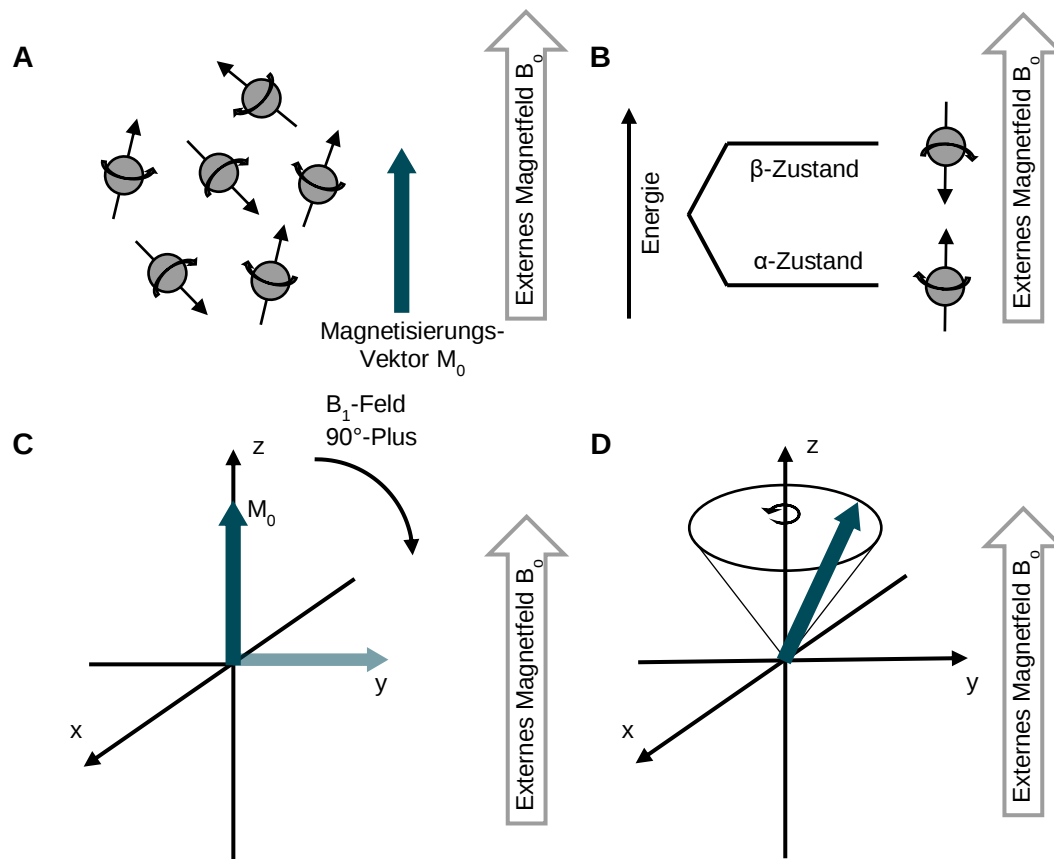


Abbildung 2-11: Anregungsprinzip bei der NMR-Spektroskopie. Schematische Darstellung des Verhaltens von Atomkernspins unter dem Einfluss eines äußeren magnetischen Feldes und das Prinzip ihrer Anregung am Beispiel einer Spinquantenzahl $I = 1/2$. (A) Ohne den Einfluss eines äußeren Magnetfeldes liegen die Kernspins in einem entarteten Grundzustand vor. (B) Unter Einfluss eines äußeren Magnetfeldes B_0 orientieren sich Kernspins parallel (α -Zustand) oder antiparallel (β -Zustand) zu diesem Feld. (C) Der makroskopische Magnetisierungsvektor ist in einem kartesischen Koordinatensystem in Richtung der z-Achse ausgerichtet. Durch einen Radiofrequenzpuls wird dieser in Richtung der x, y-Ebene ausgelenkt. Bei einem spezifischen 90°-Puls befindet sich dieser in der x, y-Ebene. (D) Anschließend erfolgt die Relaxation, bei der die Kernspins in den Gleichgewichtszustand zurückkehren (Gey 2015; Hesse et al. 2005; Keeler 2010; Ritgen 2020).

Ohne den Einfluss eines äußeren Magnetfeldes liegen die Kernspins in einem energetisch entarteten Grundzustand vor. In einem homogenen Magnetfeld der Stärke B_0 können magnetisch aktive Kerne aufgrund ihrer Quantelung $2I + 1$ Orientierungen (Energieniveaus) annehmen. Für die in der NMR-Spektroskopie häufig verwendeten Atomkerne ^1H und ^{13}C mit einer Spinquantenzahl $I = 1/2$ ergeben sich dementsprechend zwei verschiedene Energieniveaus. Diese werden KERN-ZEEMAN-Energieniveaus genannt. Die magnetischen Momente der Atomkerne können sich parallel zum Magnetfeld (α -Zustand, $m = +1/2$) oder antiparallel zum Magnetfeld (β -Zustand, $m = -1/2$) ausrichten (Abbildung 2-11 A + B). Die Verteilung der Spins innerhalb dieser beiden Energieniveaus ΔE wird durch die BOLTZMANN-Verteilung in Abhängigkeit von dem gyromagnetischen Verhältnis γ , der PLANK'SCHE Konstante h und der Stärke des Magnetfeldes B_0 beschrieben (Gey 2015; Hesse et al. 2005; Keeler 2010; Ritgen 2020).

$$\Delta E = \frac{\gamma \cdot h \cdot B_0}{2\pi}$$

Dabei gilt, dass ΔE für Protonen besonders groß ist, wenn das gyromagnetische Verhältnis γ der Kerne mit $I = 1/2$ groß ist. Die Empfindlichkeit des NMR-Experiments hängt von der Population der Energieniveaus nach der Boltzmann-Verteilung ab und ist damit direkt proportional zu ΔE . Aus diesem Grund basieren Messungen in biologischen Proben häufig auf der Beobachtung von ^1H Kernen (Protonen), weil sich damit eine hohe Empfindlichkeit erzielen lässt. Die z-Magnetisierung, die sich aus dem Populationsunterschied zwischen den Spinzuständen ergibt (Abbildung 2-11 B), lässt sich *per se* allerdings noch nicht detektieren. Dies wird durch die Einstrahlung eines elektromagnetischen Impulses der Frequenz ΔE , auch Larmorfrequenz genannt, in Form eines Radiomagnetfeldes B_1 , möglich. Dabei entsteht eine alternierende transversale Magnetisierung (x, y-Ebene). Diese Radiofrequenz wird im einfachsten Fall so eingestellt, dass die gesamte z-Magnetisierung in Transversalmagnetisierung überführt wird (90°-Puls). Anschließend erfolgt die Relaxation der Kernspins zurück in den Gleichgewichtszustand (Abbildung 2-11 C + D) (Gey 2015; Keeler 2010; Ritgen 2020). Die Geschwindigkeit der Relaxation ist abhängig von zwei parallel ablaufenden Vorgängen. (A) Die Spin-Gitter-Relaxationszeit oder longitudinale Relaxation (T_1) beschreibt den Verlust der Signalintensität des Magnetisierungsvektors parallel zum B_0 -Feld. Dabei wird die überschüssige Energie durch thermische Prozesse abgegeben. (B) Die Spin-Spin-Relaxationszeit oder transversale Relaxation (T_2) führt zur Verbreiterung des Signals des Magnetisierungsvektors orthogonal zum B_0 -Feld und basiert auf dem Energieaustausch zwischen einzelnen Spins. Beide Relaxationsphänomene sind eng mit der internen Dynamik, zu welcher die Kernspins gehören, verknüpft (Gey 2015; Hesse et al. 2005; Keeler 2010; Skoog et al. 2007). Die Präzessionsbewegung entlang der Transversalebene sowie ihre Abnahme während des Relaxationsprozesses induziert ein magnetisches Wechselfeld in der Empfängerspule. Die abklingende komplexe Wellenfunktion wird als freier Induktionszerfall (engl. *free induction decay*, FID) aufgezeichnet. Mithilfe der FOURIER-Transformation wird das zeitabhängige FID-Signal in ein Frequenzbereichsspektrum umgerechnet. Mittels Division durch die Trägerfrequenz wird ein quasi einheitsfreies Spektrum erhalten. Dieses liefert für verschiedene Magnetfeldstärken vergleichbare chemische Verschiebungen, die in *parts per million* (ppm) auf der Abszisse aufgetragen sind. Die Intensität des Signals ist in einem NMR-Spektrum auf der Ordinate dargestellt (Keeler 2010).

Für die Auswertung eines NMR-Spektrums und die Identifizierung der Analyten sind die chemischen Verschiebungen, Signalintegrale, Aufspaltungsmuster und Kopplungskonstanten wichtige Parameter (Abbildung 2-12). (A) Die Lage eines Signals im NMR-Spektrum ist abhängig von seiner Resonanzfrequenz, welche durch die Art der

chemischen Bindung und die chemische Umgebung des betrachteten Kerns beeinflusst wird. Die Abschirmung des äußeren Magnetfeldes B_0 durch benachbarte Atome in Abhängigkeit von ihrer Elektronendichte führt zu niedrigeren Resonanzfrequenzen. Die Signale treten bei niedrigeren chemischen Verschiebungen (Hochfeld) auf. Atomkerne mit einer verminderten Elektronendichte, die entsprechend entschirmt werden, treten analog bei höheren chemischen Verschiebungen in Resonanz (Tieffeld) (Ritgen 2020).

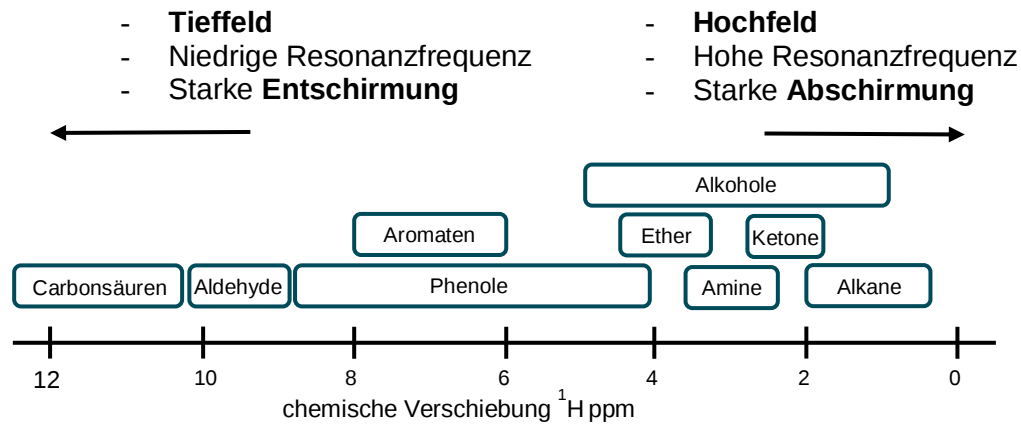


Abbildung 2-12: Chemische Verschiebungen bei der ^1H -NMR-Spektroskopie. Typische Bereiche der chemischen Verschiebungen in *parts per million* (ppm) wichtiger funktioneller Gruppen im Bereich der ^1H -NMR-Spektroskopie (Gey 2015; Hart 1989; Hesse et al. 2005).

(B) Das Integral eines Signals ist proportional zu der relativen Anzahl der Kerne, die dieses Signal erzeugen. Dadurch ist eine verhältnismäßig einfache Quantifizierung der Analyten möglich. (C) Atomkerne eines Moleküls, die über mehrere chemische Bindungen verbunden sind, wechselwirken miteinander. Durch diese Kopplung wird das Signal in mehrere Resonanzlinien aufgespalten und es bildet sich ein spezifisches Aufspaltungsmuster. Die Multiplizität einer Aufspaltung gibt Aufschluss über die benachbarten Spinsysteme. (D) Die Größe der Aufspaltung wird über die Kopplungskonstante J definiert, die in Hertz (Hz) angegeben wird und unabhängig von der Stärke des externen Magnetfeldes ist (Ritgen 2020).

In Abbildung 2-13 wird am Beispiel der Aminosäure L-Alanin die Identifizierung von Metaboliten anhand ihrer chemischen Verschiebung und Multiplizität der Signale mithilfe eines mittels NMR-Spektroskopie aufgenommenen eindimensionalen Protonenspektrums ($1D\ ^1H$ NMR-Spektrums) dargestellt.

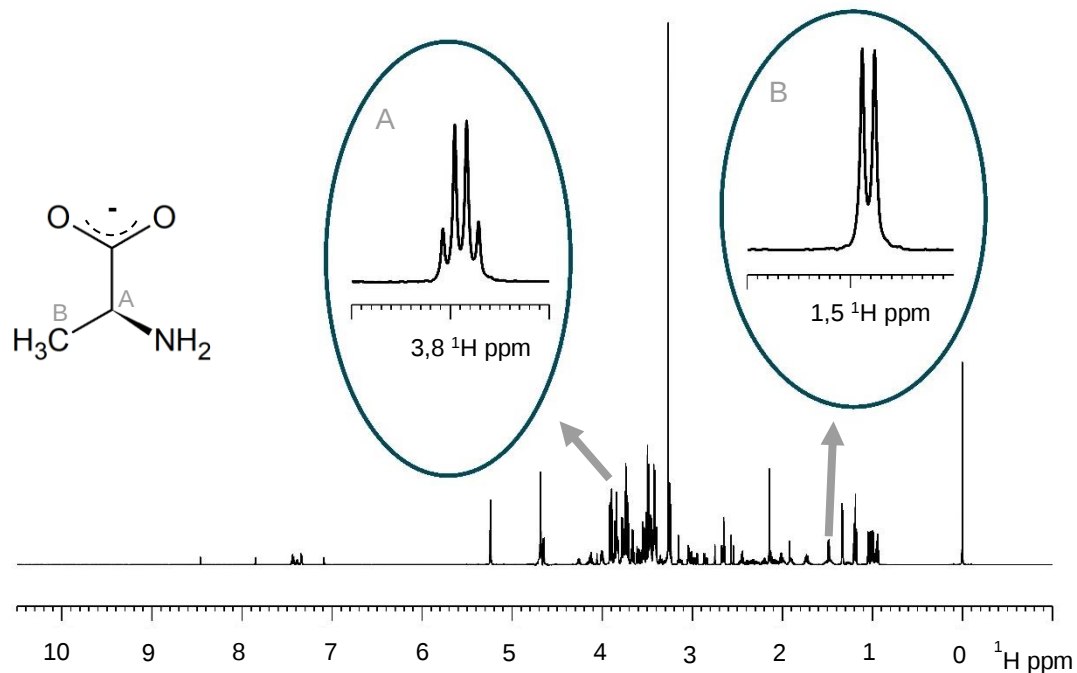


Abbildung 2-13: Identifizierung der Aminosäure L-Alanin in der NMR-Spektroskopie. Mithilfe eines $1D\ ^1H$ NMR-Experiments wird die Aminosäure L-Alanin durch die spezifischen chemischen Verschiebungen der funktionellen Gruppen in *parts per million* (ppm), ihre Multiplizität und die Kopplungskonstante aus einer komplexen Mischung verschiedener Metaboliten mithilfe der Datenbank *The Human Metabolome Database* (HMDB) identifiziert (Wishart et al. 2007, 2009, 2013, 2018).

Das $1D\ ^1H$ NMR-Spektrum der Aminosäure L-Alanin zeigt zwei Signale der CH- (A) und CH_3 - (B) Gruppe bei unterschiedlichen chemischen Verschiebungen ($\delta_{CH_3} = 1,5\text{ ppm}$ und $\delta_{CH} = 3,8\text{ ppm}$). Die drei Protonen der CH_3 -Gruppe sind chemisch äquivalent, da sie dieselbe chemische Umgebung haben. Die CH-Gruppe (A) erscheint im Vergleich zu der CH_3 -Gruppe (B) in einem niedrigeren Resonanzbereich. Das Signal ist aufgrund der stärkeren Abschirmung tieffeldverschoben, weil die benachbarte Carboxylgruppe ($-COO^-$) eine elektronenziehende Wirkung hat und dadurch die Elektronendichte am Proton der CH-Gruppe (A) deutlich herabgesetzt wird. Die beiden Signale zeigen unterschiedliche Multiplizitäten, die im Zusammenhang mit den J-Kopplungen benachbarter Atome der gleichen Atomsorte stehen. Die Anzahl der auftretenden Linien eines Multipletts M folgt der Regel $M = 2I + 1$ mit der Spinquantenzahl I . Für die Atomkerne 1H und ^{13}C mit einer Spinquantenzahl $I = \frac{1}{2}$ ergibt sich damit folgende Regel:

$$M = \text{Anzahl der koppelnden Atomkerne} + 1$$

Das Proton der CH-Gruppe (A) koppelt dabei mit den drei chemisch äquivalenten Protonen der CH_3 -Gruppe (B). Unter Anwendung der genannten Regel ergibt sich eine Aufspaltung in vier Linien. Dieses sogenannte Quartett ist auch in Abbildung 2-13 erkennbar. Analog

koppeln die drei Protonen der CH_3 -Gruppe (B) lediglich mit dem einen Proton der CH-Gruppe (A). Dadurch ergibt sich die Aufspaltung in ein Dublett (Ritgen 2020).

NMR-Spektrometer sind im Wesentlichen aus einem Magneten, einer Messzelle und einer Sonde mit einer Radiofrequenzsender-/empfängerspule aufgebaut (Abbildung 2-14). In der Praxis dient in konventionellen NMR-Spektrometern die Spule sowohl als Sender als auch als Empfänger, die sich eng an das NMR-Röhrchen (Tube) anlegt (Gey 2015).

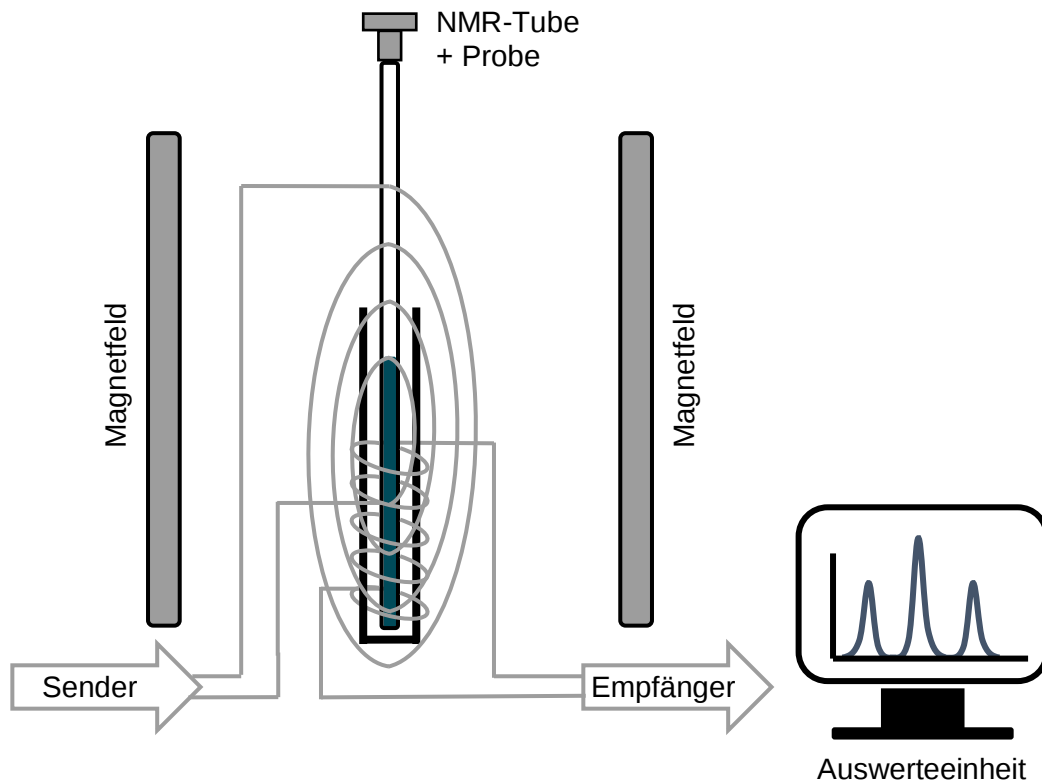


Abbildung 2-14: Aufbau eines NMR-Spektrometers. Wichtige Kompartimente, insbesondere das äußere Magnetfeld sowie die verschiedenen Spulen des Probenkopfes, in denen sich die Probe in einem NMR-Röhrchen befindet, sind schematisch dargestellt (Gey 2015).

Supraleitende Magneten werden verwendet, um ausreichend starke äußere Magnetfelder zu erzeugen und damit die Auflösung und Empfindlichkeit der Geräte zu verbessern. Über einen Probenwechsler wird die Probe, die sich in einem NMR-Röhrchen befindet, vertikal in den zylindrischen Magneten gebracht und im Probenkopf platziert. Neben einer Kontrolleinheit für die Proben temperatur enthält der Probenkopf eine oder mehrere Radiofrequenzspulen für die Frequenzen verschiedener Kerne (z.B. ^1H , ^{13}C , ^{15}N) sowie eine Spule für das Locksignal. Dieses Referenzsignal dient unter anderem der Kompensation kleinster Variationen des äußeren Magnetfeldes und zeitlicher Drifts. Den Proben wird zu diesem Zweck ein deuteriertes Lösungsmittel hinzugegeben und das Deuteriumsignal zur Lockstabilisierung verwendet. Die Kompensation erfolgt über die Lockspule, welche das Magnetfeld kurzfristig anpasst. Zusätzlich wird die Homogenität des externen Magnetfeldes über Shimspulen eingestellt (Gey 2015; Hesse et al. 2005; Wallmeier et al. 2017).

Im Bereich der Metabolomics-Forschung werden häufig ^1H NMR-Experimente durchgeführt. In biologischen Proben und organischen Molekülen ist die natürliche

Abundanz des ^1H -Isotops sehr hoch. Dementsprechend groß ist die Bandbreite der analysierbaren Verbindungen, während andere NMR-aktive Kerne wie ^{13}C , ^{15}N oder ^{31}P aufgrund ihrer geringen natürlichen Häufigkeit seltener analysiert werden. Weiterhin ist das gyromagnetische Verhältnis dieses Spinsystems und damit die Sensitivität hoch. Durch die Aufnahme zweidimensionaler Spektren (2D-Spektren) können auch komplexe Spektren weiter aufgeschlüsselt werden. Im Vergleich zu 1D ^1H NMR-Spektren ist die Messdauer allerdings deutlich höher und die Auswertung komplexer (Gey 2015; Nagana Gowda & Raftery 2014).

2.4.2.1 NMR-Experimente

Das 1D ^1H NOESY-Experiment (engl. *nuclear Overhauser enhancement spectroscopy-effect*, KERN-OVERHAUSER-Effekt) ist das in der Metabolomics-Forschung am häufigsten angewendete NMR-Experiment. Die Pulsfolge leitet sich von dem 2D NOESY-Experiment ab, wobei der eigentliche KERN-OVERHAUSER-Effekt aufgrund einer verkürzten Mischzeit nicht genutzt wird (McKay 2011). Bei der Metabolomics-Analyse mittels NMR tritt das *dynamic range* Problem auf. Dies bedeutet, dass niedrig konzentrierte Analyten bei Anwesenheit eines hoch konzentrierten Analyten nicht detektiert werden können. Das ubiquitäre Wasser, welches ein sehr großes NMR-Signal erzeugt, wird daher selektiv unterdrückt. Diese Lösungsmitteldiskriminierung ist durch die spezielle Pulsfolge des 1D ^1H NOESY-Experiments (Abbildung 2-15) möglich. Eine detailliertere, weniger schematische Darstellung ist in Abbildung 8-1 gezeigt (Davies et al. 1985; McKay 2011).

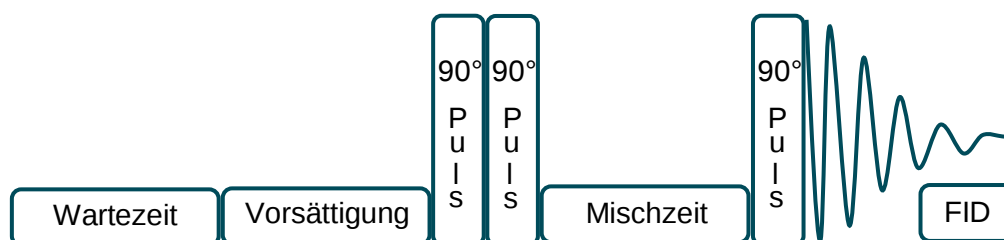


Abbildung 2-15: Schematische Pulsabfolge des 1D ^1H NOESY-Experiments. Nach spezifischen Wartezeiten und Pulsabfolgen wird der freie Induktionszerfall (engl. *free induction decay*, FID) aufgezeichnet (McKay 2011).

Dabei sind drei wesentliche Aspekte der Lösungsmittelunterdrückung zu berücksichtigen. (A) Die verschiedenen T_1 -Relaxationszeiten (Spin-Gitter-Relaxationszeiten) von Lösungsmittel und Metaboliten, um bei wiederholten Messungen den Gleichgewichtszustand wiederherzustellen, werden genutzt. Zunächst wird die Probe in ein homogenes äußeres Magnetfeld gebracht, wobei sich nach einer Verzögerungszeit (engl. *recovery delay*) ein energetisches Gleichgewicht einstellt. Anschließend erfolgt eine Vorsättigung des Wassersignals (engl. *presaturation*) durch einen langen, energiearmen Puls. Durch die zwei folgenden 90° -Pulse werden die Kernspins von der +z-Achse auf die -z-Achse verschoben (McKay 2011). Aufgrund der hohen Feldstärken moderner NMR-Spektrometer tritt der Effekt des *radiation damping* auf (Barjat et al. 1999; Bloembergen &

Pound 1954). Der große makroskopische Magnetisierungsvektor des Lösungsmittels induziert in der Empfängerspule ein entgegengesetztes elektromagnetisches Feld mit derselben Frequenz. Durch dieses zusätzliche Feld, welches auf das Lösungsmittel wirkt, relaxiert dieses deutlich schneller. Nach einer spezifischen Mischzeit befinden sich die Magnetisierungen der Metaboliten weiterhin auf der -z-Achse, während sich die Magnetisierung des Lösungsmittels durch einen Ausgleich zwischen der +z-Achse und -z-Achse und fehlender Phasenkohärenz aufhebt. Aufgrund der fehlenden z-Magnetisierung der Lösungsmittelspins werden diese durch den abschließenden 90° -Puls kaum angeregt. Die makroskopischen Magnetisierungsvektoren der Metaboliten werden in die Transversalebene verschoben und der FID aufgezeichnet. (B) Als weiterer Effekt tritt die *volume selection* auf, die Signale aus einem definierten, nicht optimierten Bereich des Spektrums isoliert. Trotz modernster Technik ist das angelegte Magnetfeld nur in der Mitte des NMR-Röhrchens nahezu perfekt homogen. Durch die Anregung der Kernspins mit einem 90° -Puls werden daher nicht alle Spins exakt auf die Transversalebene verschoben. Nur die Spins, die die volle Wirksamkeit des Pulses erfahren, weisen schmale Signale im Spektrum auf. Im Gegensatz dazu zeigen Resonanzen in Randbereichen der Probe unter anderem aufgrund der Inhomogenität des Magnetfeldes und aufgrund von inakkuraten Pulslängen breite Signale. Dies tritt insbesondere bei dem großen Anteil des Lösungsmittels im Vergleich zu den niedrig konzentrierten Analyten auf. Bei dem 1D ^1H NOESY-Experiment werden zwei abwechselnde Pulsfolgen verwendet ($90^\circ \times 90^\circ \times 90^\circ \times$ und $90^\circ \times 90^\circ \times 90^\circ \times$). Bei der letztgenannten Pulsfolge handelt es sich im Endeffekt um einen $90^\circ \times$ -Puls, allerdings nur für Spins, die die Pulsfolge exakt erfahren. Bei diesem (C) *phase cycling* ändert sich das Vorzeichen der gemessenen Signale. Im Prinzip werden Artefakte durch Addition mehrerer Transienten bei variierenden Phasenzyklen herausgerechnet. Daher wird bei dem 1D ^1H NOESY-Experiment kein 180° -Puls, sondern zwei aufeinanderfolgende 90° -Pulse angewendet (McKay 2011).

Ein weiteres sehr häufig angewendetes Experiment ist die CARR-PURCELL-MEIBOOM-GILL-Sequenz (CPMG-Sequenz) (Abbildung 2-16). In Abbildung 8-2 wurde eine detailliertere, weniger schematische Darstellung gewählt. Die Identifizierung und Quantifizierung von kleinen, gering konzentrierten Metaboliten werden bei Metabolomics-Experimenten von beispielsweise Blutseren aufgrund der Überlagerung mit Makromolekülen, wie Proteinen und Lipiden, erschwert (Wallmeier et al. 2017). Das CPMG-Experiment wird als T_2 -Filter angewendet, um Signale großer Moleküle mit kurzen Spin-Spin-Relaxationszeiten abzutrennen (Wishart 2008b).

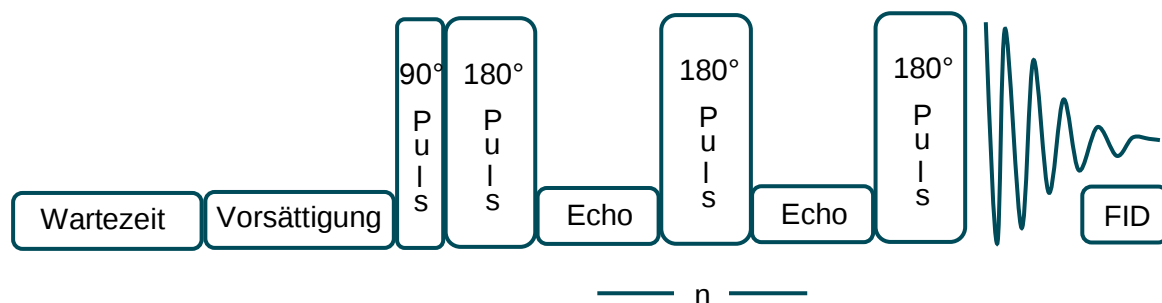


Abbildung 2-16: Schematische Pulsabfolge des CPMG-Experiments mit n Wiederholungen. Nach spezifischen Wartezeiten und Pulsabfolgen wird der freie Induktionszerfall (engl. *free induction decay*, FID) aufgezeichnet (Meiboom & Gill 1958).

Analog zum 1D ^1H NOESY-Experiment erfolgt auch bei dem CPMG-Experiment zunächst eine Phase der Verzögerung (engl. *recovery delay*) und Vorsättigung (engl. *presaturation*). Durch einen 90° -Puls wird die Magnetisierung auf die Transversalebene (x, y) eines kartesischen Koordinatensystems gelenkt. Auf dieser rotieren die Spins mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Nach einer gewissen Dauer haben schnellere Spins eine größere Strecke, also einen größeren Winkel in der Transversalebene zurückgelegt als langsamere Spins. Aufgrund dessen kommt es zur sogenannten Dephasierung der Spins. Nun erfolgt ein 180° -Puls, sodass die Spins wiederum entlang der Transversalebene ausgerichtet sind. Da die Spins in dieselbe Richtung präzedieren wie zuvor, werden die langsameren Spins wieder von den schnelleren Spins eingeholt. Ist die Dauer der Dephasierung identisch mit der Dauer der Rephasierung, sind die Spins wieder in Phase. Dies erzeugt ein deutliches Maximum des induzierten Signals, das sogenannte Spin-Echo. Die Größe der Polarisation und damit die Amplitude des Echos nimmt während dieses Vorgangs mit der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 ab (Meiboom & Gill 1958). Bei CPMG-Experimenten mit kurzen Echo-Zeiten sind große Moleküle mit kurzen T_2 -Zeiten also nach einigen Wiederholungen n bereits relaxiert bevor ein FID aufgenommen wird.

2.4.2.2 Quantitative Kernspinresonanz-Spektroskopie

Im Bereich der Metabolomics-Forschung ist es häufig das Ziel, relative Gehalte beispielsweise von Verunreinigungen oder absolute Konzentrationen von Metaboliten in komplexen Proben mit hoher Präzision und Genauigkeit simultan zu bestimmen. Die quantitative Kernspinresonanz-Spektroskopie (qNMR) ist dafür geeignet, da bei Protonenspektren die Fläche unter einer NMR-Resonanz proportional zur relativen Anzahl der Protonen ist, die dieses Signal erzeugen. Generell werden zur Quantifizierung in der NMR-Spektroskopie einfache Pulsexperimente wie das 1D ^1H NOESY-Experiment bei Metabolomics-Analysen angewendet. CPMG-Experimente sind für Quantifizierungen weniger geeignet, da sich durch die Relaxation während des Spin-Echos die Signalintensitäten verändern. Für die Kalibrierung werden interne oder externe Standards verwendet. Idealerweise überlagern die Resonanzen der internen Kalibrierstandards dabei nicht mit denen des Lösungsmittels oder des Analyten. Weiterhin sollten die

Kalibrierstandards fest, inert, stabil, nicht hygroskopisch, von hoher Reinheit und möglichst preiswert sein. Bei der Messung sind ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, eine ausreichend lange Spin-Relaxationszeit ($> 5T_1$) sowie für eine gute Linienform die Aufnahme von mindestens vier Datenpunkten, die die Resonanzlinienbreite abdecken, notwendig. Anschließend werden die FIDs vorprozessiert und eine *exponential window function*, ein *zero filling* sowie eine Phasen- und Basislinienkorrektur durchgeführt. Bei einer manuellen Integration sind der Anfang und das Ende des Integrals genau zu definieren. Weiterhin entstehen mögliche Probleme bei der Integration durch benachbarte Satelliten und überlappende Signale. Durch softwaregestützte *line shape fitting* und *deconvolution* Algorithmen können Cluster in einzelne Signale mit LORENTZIAN- oder GAUSS-Form zerlegt und integriert werden (Claridge 2016).

Häufig ist es problematisch, einen internen Kalibrierstandard mit den zuvor aufgeführten Eigenschaften und ähnlichen Relaxationseigenschaften zum Analyten zu finden. Weiterhin muss die Metabolomics-Probe durch Hinzugabe des internen Kalibrierstandards modifiziert und damit „verunreinigt“ werden. Daher werden häufig elektronische oder mathematische Verfahren wie die (A) ERETIC- (*Electronic Reference To access in-vivo Concentrations*) oder die (B) PULCON-Methode (*Pulse-Length based Concentration*) für die Quantifizierung eingesetzt.

Die (A) ERETIC-Methode liefert ein von einem elektronischen Gerät synthetisiertes Referenzsignal, über welches absolute Konzentrationen bestimmt werden können. Dabei wird ein zusätzliches Radiofrequenzsignal über eine weitere Spule in den FID gemischt und dadurch eine weitere Resonanzlinie an beliebiger Stelle im Spektrum erzeugt. Gegen eine chemische Kalibrierlösung wird zunächst die effektive Konzentration des ERETIC-Signals bestimmt, um anschließend unbekannte Substanzen aus der Analytlösung zu quantifizieren. Für die Durchführung der ERETIC-Methode sind allerdings physikalische Modifizierungen am Spektrometer notwendig, damit eine Radiofrequenzspule das entsprechende ERETIC-Signal erzeugen kann (Barantin et al. 1997; Claridge 2016).

Bei der (B) PULCON-Methode werden die absoluten Intensitäten von zwei verschiedenen Spektren korreliert, indem das Prinzip der Reziprozität genutzt wird. Dieses besagt, dass die Intensität des detektierten NMR-Signals umgekehrt proportional zur Länge des 90° -Pulses ist. Zunächst wird der bekannte Kalibrierstandard gemessen und die Konzentrationen der Resonanzen bestimmt. Unter den Voraussetzungen, dass die Konzentration des Kalibrierstandards C_C genau bekannt ist und der 90° -Puls gut kalibriert ist, wird die NMR-Signalintensität pro Proton des Analyten U aus der Probelösung mit der des Kalibrierstandards C verglichen. Unter Berücksichtigung des Integrals I , der Temperatur T , der Länge des 90° -Pulses θ und der Anzahl der Scans N wird die Konzentration des Analyten C_U bestimmt. Weiterhin wird ein Korrekturfaktor f

beispielsweise für unterschiedliche Protonenanzahlen eines Signals verwendet (Burton et al. 2005; Claridge 2016).

$$C_U = C_C \cdot f\left(\frac{I_U T_U \theta_U N_C}{I_C T_C \theta_C N_U}\right)$$

Allerdings sollte bei dieser Methode die Nachweisempfindlichkeit der NMR-Spulen im Hinblick auf verschiedene Lösungsmittel, Lösungsbedingungen und insbesondere der Ionenstärke wässriger Proben berücksichtigt werden (Claridge 2016).

2.5 Datenauswertung

Bei Metabolomics-Experimenten wird das metabolische Profil einer Probe als Momentaufnahme mit sämtlichen Einflussfaktoren erfasst (Dettmer et al. 2007; Dona et al. 2014). Für die Beantwortung metabolischer Fragestellungen wird häufig eine Vielzahl von Proben (Objekte) N analysiert, wobei durch die verwendeten hochauflösenden Technologien eine Vielzahl von Datenpunkten (Eigenschaften) M simultan bestimmt wird. Die erhaltene $N \times M$ -Matrix ist dementsprechend äußerst komplex und von enormer Größe. Nach einer Datenvorbereitung durch beispielsweise Alignment- und Skalierungsmethoden werden mithilfe der multivariaten Statistik korrelierende Eigenschaften zusammengefasst und in einen niederdimensionalen Raum projiziert (Kessler 2007; Ren et al. 2015). Dadurch wird der Datensatz reduziert und entsprechend vereinfacht. Durch das Entfernen des experimentellen und analytischen Rauschens und die Identifizierung von Ausreißern werden relevante Informationen und Klassifizierungen herausgefiltert. Unter Verwendung anschaulicher graphischer Modelle können Vorhersagen zu unbekannten Proben getroffen werden (Kessler 2007). Bei den *Pattern Recognition*-Methoden wird zwischen ungerichteten (engl. *unsupervised*) und gerichteten (engl. *supervised*) Analysen unterschieden. Bei dem *unsupervised* Ansatz, wie beispielsweise der Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*, PCA), werden keine Informationen vorgegeben und ungerichtete Zusammenhänge herausgearbeitet. Hingegen werden beispielsweise bei der Diskriminanzanalyse der partiell kleinsten Quadrate (engl. *partial least square-discriminant analysis*, PLS-DA) als einer *supervised* Methode Gruppenzugehörigkeiten vorgegeben und nach entsprechenden Unterschieden und Gemeinsamkeiten gesucht (Smirnov et al. 2016; Zhang et al. 2013).

Im Folgenden werden verschiedene Methoden der multivariaten Statistik beschrieben, wobei der Fokus auf die in dieser Arbeit verwendeten multivariaten Analysen PCA, PLS-DA und Varianzanalyse-simultane Komponentenanalyse (engl. *analysis of variances-simultaneous component analysis*, ASCA) gelegt wird.

2.5.1 Hauptkomponentenanalyse

Bei der PCA werden die untereinander korrelierenden, quantitativen Messdaten (Merkmale oder Variablen) unter minimalem Informationsverlust in wenige nicht messbare, unabhängige Einflussgrößen, sogenannte latente Variablen (Faktoren oder Hauptkomponenten), zusammengefasst, wobei die maximal mögliche Varianz abgebildet wird (Fahrmeir et al. 1996; Kessler 2007). Die Proben werden in einem neuen Koordinatensystem, dessen Achsen durch Linearkombination der Variablen gebildet werden, dargestellt. Eine Achse wird Hauptkomponente (engl. *principal component*, PC) genannt, diese fasst korrelierende Variablen zusammen und stellt die Summe verschieden gewichteter Originalvariablen dar (Kessler 2007). Jede PC_n ist per Definition orthogonal zu der jeweils vorangegangenen PC_{n-1} und spiegelt einen geringeren Teil der in der Datenmatrix enthaltenen Varianz wider. Daher wird durch die ersten PCs der größte Teil der Varianz eines Datensatzes beschrieben. Niedere PCs erklären lediglich einen geringeren Teil der Varianz und enthalten zunehmend experimentelles und analytisches Rauschen. Im Allgemeinen entspricht die maximale Anzahl möglicher PCs der kleinsten Anzahl gemessener Proben oder Variablen. Da die Daten mit der größten Varianz für einen Datensatz am aussagekräftigsten sind, werden bei der PCA nicht alle PCs betrachtet, wodurch eine Reduktion der Dimensionalität der Daten erzielt wird (Handl & Kuhlenkasper 2017; Kessler 2007).

Zur graphischen Veranschaulichung der PCA werden die Objekte (Proben) N in Abbildung 2-17, die durch die Eigenschaften x_1 und x_2 im zweidimensionalen Raum in Form eines Streudiagramms charakterisiert sind, in einen eindimensionalen Raum, also auf eine Gerade, projiziert (Kessler 2007).

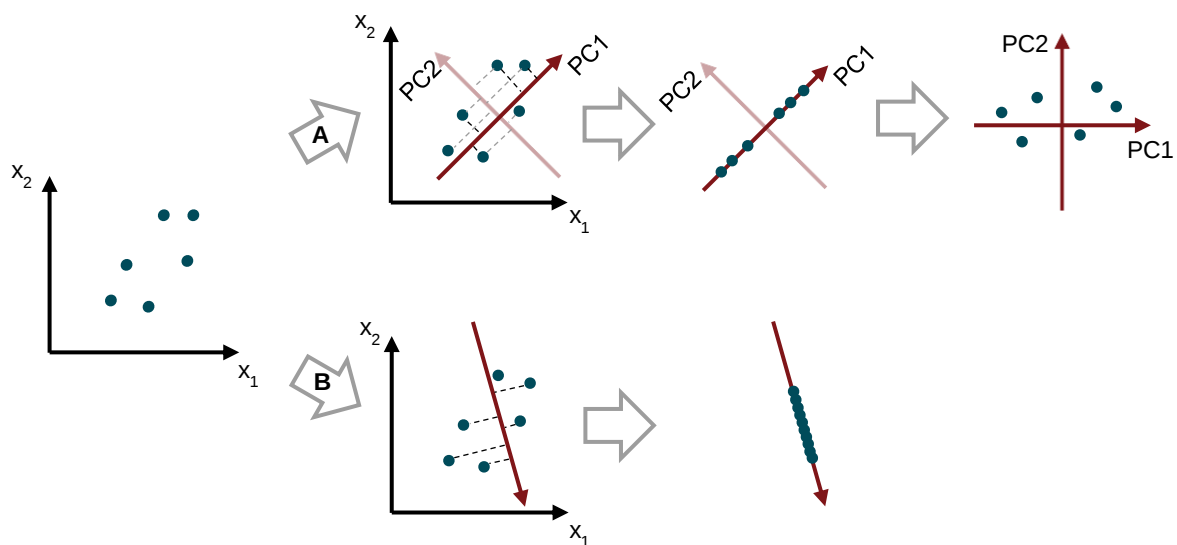


Abbildung 2-17: Graphische Erklärung einer Hauptkomponentenanalyse. Exemplarische Transformation eines Datensatzes mit sechs Objekten, die durch die Eigenschaften x_1 und x_2 im zweidimensionalen Raum charakterisiert sind, in einen eindimensionalen Raum. Dabei werden die Objekte orthogonal in zwei verschiedenen Varianten auf eine Gerade projiziert. Bei (A) zeigt die Gerade in Richtung der größten Varianz. Bei (B) wird eine Achse gewählt, die nicht die maximale Varianz wiedergibt. Die orthogonal projizierten Proben liegen dicht beieinander und der Informationsverlust ist entsprechend groß (Kessler 2007).

Die Lage der Geraden, auf die die Objekte transformiert werden, kann verschiedene Orientierungen haben, wobei der Informationsverlust der Daten minimal sein sollte. Die Gerade, auf die die Punkte projiziert werden, sollte den Unterschied, also die maximale Variation, innerhalb der Daten möglichst gut widerspiegeln. Bei der Variante B (Abbildung 2-17 B) liegen die auf die Gerade orthogonal projizierten Proben dicht beieinander und viele Informationen gehen verloren. Hingegen zeigt die Gerade der Variante A (Abbildung 2-17 A) in Richtung der maximalen Varianz. Diese Gerade mit minimalem Informationsverlust wird als PC1 bezeichnet. Die Gerade wird dabei so gewählt, dass der Schwerpunkt über dem Mittelwert der Variablen liegt. Die PC1 stellt das Ergebnis dieser beispielhaften PCA dar, wobei die Transformation eines zweidimensionalen Datensatzes in einen eindimensionalen Raum unter Hervorhebung der Informationen durchgeführt wurde. Die PC2 steht definitionsgemäß orthogonal zur PC1 und erklärt weniger Variation. Durch die orthogonalen Projektionen der Originaldaten auf die Hauptkomponentenachsen werden die Faktoren- oder Scorewerte erhalten. Jedem Objekt in Abbildung 2-17 sind zwei Faktorenwerte (engl. *scores*), einer von PC1 und einer von PC2, zuzuordnen. Im sogenannten Scoreplot sind daher die Lage und die Beziehungen der verschiedenen Objekte im neu berechneten Koordinatensystem (Faktorenraum) mithilfe ihrer Scorewerte dargestellt, wobei der Koordinatenursprung dem Schwerpunkt der Daten entspricht. Durch mögliche Clusterbildungen einzelner Objekte im Scoreplot können sowohl Gemeinsamkeiten und mögliche Gruppenzugehörigkeiten als auch Unterschiede und Ausreißer identifiziert werden. Die Faktoren setzen sich linear additiv aus den Produkten der Variablen x_i und deren Gewichtung w_i , den sogenannten Faktorenladungen (engl. *loadings*), zusammen. Im Loadingplot werden die verschiedenen Eigenschaften über ihre Faktorenladungen in Abhängigkeit von den Hauptkomponenten visualisiert (Kessler 2007). Graphisch betrachtet entspricht der Loadingwert der Lage der PCs relativ zu den ursprünglichen Achsen (Kemsley et al. 2007). Der Eigenwert eines Faktors gibt Auskunft, welchen Anteil ein Faktor an der Gesamtvarianz der Ausgangsdaten hat. Je größer der Loadingwert einer Variablen in der entsprechenden Hauptkomponente, desto größer ist der Einfluss auf den Scoreplot und dementsprechend größer die Varianz dieser Variablen im Originaldatensatz. Über die relative Lage der Loadings lassen sich daher Rückschlüsse auf die Variablen ziehen. Variablen, deren Loadings im Faktorenraum nah zusammenliegen, korrelieren beispielsweise positiv (Kessler 2007; Ren et al. 2015). Zusammenfassend werden durch die Scoreplots die Zusammenhänge der Objekte N und mithilfe des Loadingplots die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Eigenschaften M graphisch veranschaulicht.

Mathematisch betrachtet handelt es sich bei der PCA um eine lineare Transformation der Datenvektoren auf orthogonale Hauptachsen. Die beobachteten Variablen werden dabei in neue unkorrelierende, nach fallender Varianz geordneten Variablen, sogenannten

Hauptkomponenten, transformiert (Fahrmeir et al. 1996). Die Datenmatrix X aus M Eigenschaften (Spalten) und N Objekten (Zeilen) wird mathematisch in die Scorematrix T , eine Faktorenmatrix P^T und eine Residuenmatrix E transformiert. Die Residuenmatrix E beschreibt die durch die Datenreduktion erhaltene Differenz zwischen der Datenmatrix X und den über die Scores- und Faktorenmatrix reproduzierten Daten. Sie enthält damit den Teil der Originaldaten, der nur einen geringen Teil zur Gesamtvarianz beiträgt. Die allgemeine Formel der PCA lautet $X = T \cdot P^T + E$ (Abbildung 2-18) (Kessler 2007).

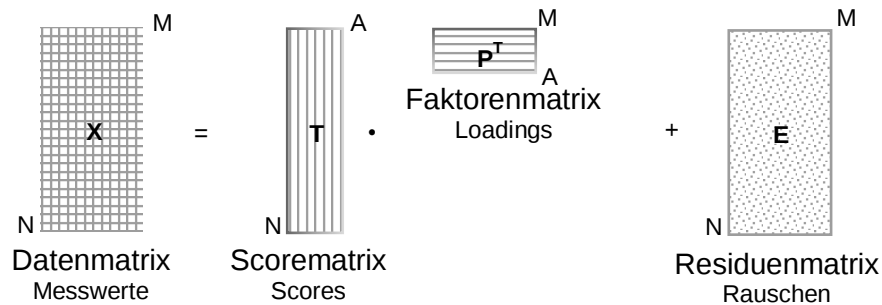


Abbildung 2-18: Mathematische Erklärung einer Hauptkomponentenanalyse. Matrizenfunktionen der Hauptkomponentenanalyse einer Datenmatrix X aus M Eigenschaften und N Objekten in die Scorematrix T und die Faktorenmatrix P^T sowie der Residuenmatrix E . A entspricht dabei der Anzahl der berücksichtigten Hauptkomponenten nach einer Datenreduktion (Kessler 2007).

Um die PCA zu berechnen, wird die Datenmatrix X mittelnzentriert, indem von dem Originalwert der Variablen der Mittelwert jeder Eigenschaft abgezogen wird. Bei der orthogonalen Rotationstransformation und damit der Hauptkomponentenanalyse handelt es sich um ein Eigenwertproblem (Fahrmeir et al. 1996; Kessler 2007). Aus der mittelnzentrierten Datenmatrix X wird die quadratische Varianz-Kovarianz- bzw. Korrelationsmatrix berechnet. Deren Eigenwerte und zugehörige Eigenvektoren bilden die Scorematrix T und die Faktorenmatrix P^T . Die Zeilen N der Matrix T stellen wie in der Datenmatrix X die Objekte dar. Die Spalten A stellen die nach der Datenreduktion berücksichtigten Faktorenwerte dar. Die Spalten der Matrix P entsprechen den Faktorenladungen. Die Zeilen M beschreiben die Eigenschaften M , die in der Datenmatrix X in den Spalten angeordnet waren. Bei der transponierten Matrix P^T entspricht die Anzahl der Zeilen A der Anzahl der berücksichtigten Hauptkomponenten. Der Betrag der Eigenwerte ist ein direktes Maß für den Varianzanteil eines Faktors an der Gesamtvarianz der Datenmatrix (Handl & Kuhlenkasper 2017; Kessler 2007).

Die PCA ist die am häufigsten angewendete Methode der multivariaten Statistik. Sie besitzt aber den Nachteil, dass sie lediglich die größte Varianz des Datensatzes herausfiltert, welcher aber nicht zwangsläufig die analytische Fragestellung widerspiegelt (Kemsley et al. 2007). Weiterhin handelt es sich durch die Orthogonalität der Hauptkomponenten um ein Modell mit starrer Struktur, wodurch Interpretationen dynamischer Systeme des Metaboloms teilweise nicht hinreichend gut beschrieben werden (Bertinetto et al. 2020; Smilde et al. 2005).

2.5.2 *Partial Least Square-Analysis*

Bei der *supervised* PLS-Methode handelt es sich um eine modifizierte PCA, da neben der Datenmatrix X ($X = T \cdot P^T + E$) eine definierte Zielgrößenmatrix Y (analog $Y = U \cdot Q^T + F$) betrachtet wird. Von der X - und Y -Matrix wird in Abhängigkeit voneinander eine PCA durchgeführt. In der in einem Zwischenschritt berechneten W -Matrix steckt dabei die Verbindung zwischen den beiden Matrices. Bei der PLS-Analyse wird die Kovarianz zwischen den unabhängigen Variablen X und den korrespondierenden abhängigen Variablen Y durch systematische Rotation der Hauptkomponenten der PCA maximiert. Die berechneten Faktoren sind vergleichbar mit denen der PCA und beschreiben die abhängigen Variablen Y . Analog zur PCA kann mit diesen Faktoren ein neues Koordinatensystem gebildet und in einem Scoreplot die unabhängigen Variablen X projiziert werden (Kessler 2007). Graphisch wird der Scoreplot einer PLS-Analyse durch die latenten Variablen (engl. *latent variable*, LV) gebildet (Kemsley et al. 2007; Kessler 2007).

Durch die Abhängigkeit der Zielgrößenmatrix Y von der Datenmatrix X können Zusammenhänge und Gruppenzugehörigkeiten in Hinblick auf eine konkrete analytische Fragestellung analysiert werden. Die Trennung verschiedener Gruppen kann aber auch auf Basis eines unzureichenden statistischen Modells beruhen und daher zu falsch positiven Ergebnissen führen. Die PLS kann als statistische Methode zum Aufbau von Vorhersagemodellen verwendet werden. Dabei ist es von besonderer Bedeutung, dass die Gruppenzugehörigkeit der Proben zum Aufbau des Modells eindeutig geklärt ist, um das Vorhersagemodell nicht schon im Aufbau massiv zu verfälschen und eine Übergewichtung von Ergebnissen zu vermeiden. Durch entsprechend hochwertige Modelle können unbekannte Proben den entsprechenden Gruppen zugeordnet werden (Kemsley et al. 2007; Szymanska et al. 2012).

2.5.3 *Analysis of variances-simultaneous component analysis*

Anders als bei einer PCA oder PLS-DA wird bei einer ASCA das Studiendesign berücksichtigt. Dadurch werden multivariate Zusammenhänge unter dem Einfluss weiterer Faktoren wie der Zeit, Dosis oder Gruppenzugehörigkeit analysiert. Bei einer ASCA wird die Idee einer Varianzanalyse (engl. *analysis of variances*, ANOVA) mit einer simultanen Komponentenanalyse (engl. *simultaneous component analysis*, SCA) kombiniert. Ziel einer ANOVA ist die Aufteilung des Datensatzes in orthogonale und unabhängige Faktoren. Bei einer SCA handelt es sich im Wesentlichen um eine PCA, die allerdings verschiedene Objekte gleichzeitig moduliert. Die allgemeine Gleichung der ASCA für die Datenmatrix Y ist im Folgenden aufgeführt:

$$Y = \mu + Y_a + Y_b + Y_{ab} + E$$

Dabei wird der Faktor A, beispielweise die Zeit, in Y_a und der Faktor B (z.B. Dosis) in Y_b ausgedrückt. Die Interaktion der beiden betrachteten Faktoren wird in Y_{ab} beschrieben. Analog zur PCA stellt E die Residuenmatrix dar (Bertinetto et al. 2020; Smilde et al. 2005).

2.6 Metabolomics in COVID-19

Innerhalb eines Jahres wurden einige wissenschaftliche Studien zum Thema der COVID-19 Pandemie aus dem Bereich der Metabolomics-Forschung veröffentlicht. Dabei wurden unter anderem Blutproben von Patienten mit COVID-19 mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie analysiert (Tabelle 2-3). Durch die Analyse des Metaboloms sollen physiologische Veränderungen erklärt und biologische Mechanismen im Zusammenhang mit COVID-19 untersucht werden. Daraus können möglicherweise therapeutische und prognostische Biomarker zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs und mögliche Therapieansätze entwickelt werden. Trotz einiger qualitativ hochwertiger Studien konnten viele Fragestellungen im Zusammenhang mit COVID-19 und SARS-CoV-2 noch nicht vollständig geklärt und verstanden werden. In Tabelle 2-3 sind die publizierten Studien entsprechend ihrer Analysetechnik in Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie unterteilt. Innerhalb dessen wurden die Publikationen chronologisch nach dem Datum der Veröffentlichung sortiert.

Tabelle 2-3: Aktuelle Publikationen zum Thema COVID-19 und Metabolomics. Überblick über das Studiendesign und die Ergebnisse veröffentlichter Untersuchungen aus der Metabolomics-Forschung im Zusammenhang mit COVID-19.

Studiendesign	Ergebnis Metaboliten/Stoffwechselwege	Referenz
Plasma Massenspektrometrie 34 COVID-19 (davon 9 fatal, 11 schwer, 14 mild) 10 gesunde Kontrollen	• Veränderungen des Metaboliten- und Lipidprofils in Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung und nach Ende der Hospitalisierung bei negativem RT-PCR-Test • Citrat- und Harnstoffzyklus, Pyrimidin-, Carbon- sowie Fructose- und Mannose-Metabolismus • Energiemetabolismus, Funktionsstörung der Leber	(D. Wu et al. 2020)
Serum Massenspektrometrie 65 COVID-19 25 nicht-COVID-19 (COVID-19 Symptome mit negativem RT-PCR) 28 gesunde Kontrollen	• Veränderungen des Protein-, Lipid- und Metabolitenprofils • Aminosäure-, Kynurenin- und Arginin-Metabolismus • Makrophagen, Thrombozytendegranulation, Komplementsystemwege und massive Stoffwechselsuppression	(Shen et al. 2020)
Serum Massenspektrometrie 33 COVID-19 16 gesunde Kontrollen	• Veränderungen des Lipid- und Metabolitenprofils (freie Fettsäuren, Glucose) • Aminosäure-, Nitrogen-, Tryptophan-, Arginin- und Kynurenin-Metabolismus, Carbonhomöostase • Oxidativer Stress, Proteolyse, Nierenfunktionsstörung, Entzündungsfaktoren, Immunsystem	(Thomas et al. 2020)

Studiendesign	Ergebnis Metaboliten/Stoffwechselwege	Referenz
Plasma Massenspektrometrie 55 COVID-19 45 nicht-COVID-19 (COVID-19 Symptome mit negativem RT-PCR)	• Diagnosevorhersage des Krankheitsverlaufs • Cytosin- und Tryptophan-Nikotinamid-Weg (Cytosin und Indol-3-phosphat)	(Blasco et al. 2020)
Serum Massenspektrometrie 120 COVID-19 (davon 49 schwer, 71 mild)	• Prädiktion des Schweregrades der Krankheit • Cytosin (Viruslast), Kynurenin (Entzündungsreaktion), Nikotinursäure, kurzkettige Acylcarnitine (Energienstoffwechsel)	(Roberts et al. 2022)
Plasma Massenspektrometrie 102 COVID-19 (51 nicht-ITS, 51 ITS) 26 nicht-COVID-19 (10 nicht-ITS, 16 ITS)	• Veränderung im Bereich Transkriptomics, Proteomics (Gelsolin), Lipidomics (Plasmalogene, Apolipoproteine) und Metabolomics (Citrat) • Lipidtransport, neutrophile Aktivierung, dysregulierte Thrombozytenfunktion, Blutgerinnung, akute-Phase-Reaktion und Endotheliopathie	(Overmyer et al. 2021)
Plasma NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie 17 COVID-19 25 gesunde Kontrollen	• Veränderungen im Metaboliten-, Lipid- und Glykoprotein-Aminosäureprofil (Kynurenin/Tryptophan-Verhältnis, Glutamin/Glutamat-Verhältnis, Glucose, Lipoproteine) • Tryptophanstoffwechsel • Funktionsstörung der Leber, Diabetes, koronares Herzkrankheitsrisiko	(Kimhofer et al. 2020)
Serum NMR-Spektroskopie 263 COVID-19 280 preCOVID	• Metabolismus und Lipidprofil • Partikelgröße und Zusammensetzung der Lipoproteine • Atherosklerotisches Risiko, Ketonkörper, hepatische Glutathion-Synthese, oxidativer Stress	(Bruzzzone et al. 2020)
Plasma NMR-Spektroskopie 30 COVID-19	• Veränderungen des Lipid- und Metabolitenprofils • Einfluss einer Behandlung mit Tocilizumab	(Meoni et al. 2020)
Plasma NMR-Spektroskopie 15 COVID-19 zu verschiedenen Zeitpunkten 35 nicht-COVID-19 (COVID-19/Influenza Symptome mit negativem RT-PCR) 34 gesunde Kontrollen	• metabolische Veränderungen auch nach der COVID-19 Erkrankung bei negativem RT-PCR-Test (longitudinale Entwicklung) • Plasma-Zytokin-Cluster	(Lodge, Nitschke, Kimhofer, Coudert, et al. 2021)
Plasma NMR-Spektroskopie 17 COVID-19 zu verschiedenen Zeitpunkten 35 nicht-COVID-19 (COVID-19/Influenza Symptome mit negativem RT-PCR) 26 gesunde Kontrollen	• Konzentrationsänderungen: Glykoproteine (GlycA und GlycB) erhöht, supramolekulare Phospholipide-Komposite (SPC_{total}) erniedrigt bei COVID-19 • Molekulare Marker einer COVID-19 Erkrankung: SPC_{total} und SPC_{total}/GlycA	(Lodge, Nitschke, Kimhofer, Wist, et al. 2021)

RT-PCR: Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*)

ITS: Intensivtherapiestation

Zusammenfassend wurden in den aufgeführten Studien, die Blutproben von Patienten mit COVID-19 mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie analysierten, Veränderungen im Metaboliten- und Lipidprofil festgestellt. Dabei waren hauptsächlich Stoffwechselwege der Aminosäuren (Arginin, Tryptophan) und des Kynurenins betroffen (Kimhofer et al. 2020; Thomas et al. 2020). Dyslipidämie wurden sowohl im Vergleich zu gesunden Kontrollen als auch zu anderen intensivmedizinisch betreuten Patienten identifiziert. Der Grad der Veränderungen hing unter anderem von der Schwere der Erkrankung ab. Weiterhin wurden bei der longitudinalen Analyse von Blutproben Veränderungen im Metabolitenprofil entdeckt, die auch nach einer Erkrankung mit COVID-19 und entsprechend negativem RT-PCR-Test anhielten (Lodge, Nitschke, Kimhofer, Wist, et al. 2021; D. Wu et al. 2020).

3 ZIELSETZUNG UND PROBLEMSTELLUNG

SARS-CoV-2, ein neuartiges Virus aus der Familie der Betacoronaviren, löste Anfang 2020 eine weltweite Pandemie akuter Atemwegserkrankungen aus. Durch eine äußerst rapide Übertragung und eine hohe Ansteckung wurden innerhalb eines Jahres etwa 70 Millionen Menschen infiziert (Hu et al. 2021; World Health Organization 2021c). Während einige Infizierte lediglich milde Symptome zeigen, werden andererseits lebensbedrohliche Krankheitsfälle mit akuten Lungen- und Multiorganversagen intensivmedizinisch behandelt. Dies führt in Hochinzidenzgebieten mit unzureichender medizinischer Infrastruktur zu einer Überlastung des Gesundheitssystems. Zudem ist der pathophysiologische Mechanismus von COVID-19 weitgehend unerforscht und adäquate therapeutische Maßnahmen fehlen (Hu et al. 2021).

Um die Entwicklung neuer therapeutischer und präventiver Strategien für die COVID-19 Pandemie voranzutreiben, ist es zwingend erforderlich, den molekularen Hintergrund der Krankheitsentwicklung zu entschlüsseln. Daher besteht die Hypothese der vorliegenden Arbeit darin, die metabolischen Profile im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 und einer COVID-19 Erkrankung zu beschreiben. Die Arbeit kann im Wesentlichen in einen methodischen und einen anwendungsbezogenen Teil gegliedert werden. Folgende spezifische Ziele sind Teil dieser Arbeit:

- Etablierung und Anwendung NMR-spektroskopischer *in-vitro diagnostic* Verfahren.
- Untersuchung verschiedener prä- und postanalytischer Fragestellungen und deren Auswirkung auf das metabolische Profil von Blutproben.
- Identifizierung eines spezifischen Serumprofils intensivmedizinisch behandelter COVID-19 Patienten in Abgrenzung einerseits zu gesunden Kontrollen und andererseits zu intensivmedizinisch behandelten Patienten mit kardialer Erkrankung sowie die Untersuchung der longitudinalen Entwicklung der stationären Patienten.
- Differenzierung verschiedener metabolischer Profile in Abhängigkeit vom Schweregrad einer COVID-19 Erkrankung.
- Erarbeitung des Zusammenhangs zwischen Antikörpern gegen SARS-CoV-2 und dem Metabolitenprofil.
- Klärung der Frage, ob ein spezifisches Lipidprofil Ursache oder Risikofaktor einer COVID-19 Erkrankung ist.
- Untersuchung des Einflusses einer Impfung gegen SARS-CoV-2 mit verschiedenen Vakzinen auf das Serummetabolom.

4 MATERIAL UND METHODEN

Eine detaillierte Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software ist im Anhang aufgeführt (siehe 8.1).

4.1 Herstellung von Blutserum und -plasma

Für die Blutabnahme wurden S-Monovetten® der Firma Sarstedt verwendet. Die Röhrchen für die Herstellung von Blutserum enthalten ein Silikat für die Abtrennung des Überstandes nach der Blutgerinnung. Für die Herstellung von EDTA-Plasma wurden Röhrchen mit EDTA-Zusatz als Antikoagulans zur Blockierung der Blutgerinnung eingesetzt. Lithium-Heparin-Plasma (LiHeparin-Plasma) wurde unter Verwendung entsprechender Röhrchen mit LiHeparin-Zusatz hergestellt. Nach der Blutabnahme wurden die Röhrchen manuell geschwenkt, um eine Mischung des Blutes mit den entsprechenden Zusätzen zu gewährleisten. Während die Serumproben zur Blutgerinnung vor der Zentrifugation zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur aufrecht gelagert wurden, wurden die Plasmaproben umgehend nach der Blutentnahme entsprechend der Herstellerangaben zentrifugiert (Labor Schottdorf 2016; Sarstedt n.d.). Abschließend wurde der Überstand in mehrere 1,5 mL- oder 2,0 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Analyse bei mindestens -70 °C gelagert. Idealerweise sollten Gefrier-Auftau-Zyklen vermieden werden.

4.2 Herstellung eines Phosphat-Puffers

Für die Herstellung von 500 mL 75 mM Natriumphosphat-Puffer wurden 5,32 g wasserfreies Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogenphosphat) in 380 mL destilliertem H_2O (Wasser) gelöst. 400 mg TSP-d4 (3-Trimethyl-silyl-[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$]propionic acid) wurden mit einer Analysenwaage eingewogen und in der Pufferlösung gelöst. Anschließend wurden 5 mL einer 4%igen wässrigen NaN_3 -Lösung (Natriumazid-Lösung), welche aus 0,4 g NaN_3 und 100 g destilliertem H_2O hergestellt worden war, hinzugegeben. Nach der Zugabe von 100 mL D_2O (Deuteriumoxid) wurde der pH-Wert, mit einer 1 M Salzsäure und gegebenenfalls einer 1 M Natriumhydroxid-Lösung, auf pH 7,4 eingestellt. Der Phosphat-Puffer wurde in einen 500 mL-Messkolben überführt und mit destilliertem H_2O bis zur Markierung aufgefüllt. Nach dem Mischen wurde der pH-Wert erneut überprüft und bei Bedarf nachjustiert (Dona et al. 2014).

4.3 *In-vitro diagnostic research*

Die nach der Internationalen Organisation für Normung (engl. *International Organization for Standardization*, ISO) ISO 9001 und ISO 13485 zertifizierte *in-vitro diagnostic research* (IVDr) Plattform wird als NMR-basierte präklinische Screening- und Diagnosemethode mit hoher Spezifität und Sensitivität zu Forschungszwecken eingesetzt. Durch die strikte

Qualitätskontrolle und standardisierten Analyseprotokolle mit geringem technischem und experimentellem Aufwand werden eine hohe Reproduzierbarkeit, Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit zwischen verschiedenen Plattformen gewährleistet. Dabei werden in Blutserum oder -plasma im Hochdurchsatz mit der Bruker IVDr Quantifizierungsmethode 2.0 (engl. *Bruker IVDr quantification in plasma/serum 2.0*, B.I.QUANT-PS 2.0) 41 Parameter im Bereich der Metaboliten und mit der Bruker IVDr Lipoprotein Subklassen Analyse (engl. *Bruker IVDr lipoprotein subclass analysis*, B.I.LISA) 112 Lipoproteine in Automation analysiert (Tabelle 8-6 und Tabelle 8-7). Weiterhin wird mithilfe der Bruker IVDr Qualitätskontrolle für Biobanken (engl. *Bruker IVDr BioBankQC*, B.I.BioBankQC) eine Überprüfung der Qualitätsparameter von der Präanalytik über die Probenbeschaffenheit und -präparation bis hin zur Messung erreicht (Bruker BioSpin 2019; Dona et al. 2014).

4.3.1 Probenvorbereitung

Aliquote der eingefrorenen Serum- und Plasmaproben wurden bei Raumtemperatur mehrere Minuten aufgetaut. Eine Volumeneinheit der aufgetauten Probe wurde anschließend mit einer Volumeneinheit eines 75 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) in einem 2 mL-Reaktionsgefäß versetzt und 60 Sekunden manuell geschwenkt. Abschließend wurde die Probe in ein NMR-Röhrchen überführt und der Deckel des Probenröhrchens mit einer Kunststoffkugel verschlossen (Abbildung 4-1) (Bruker Corporation 2019).

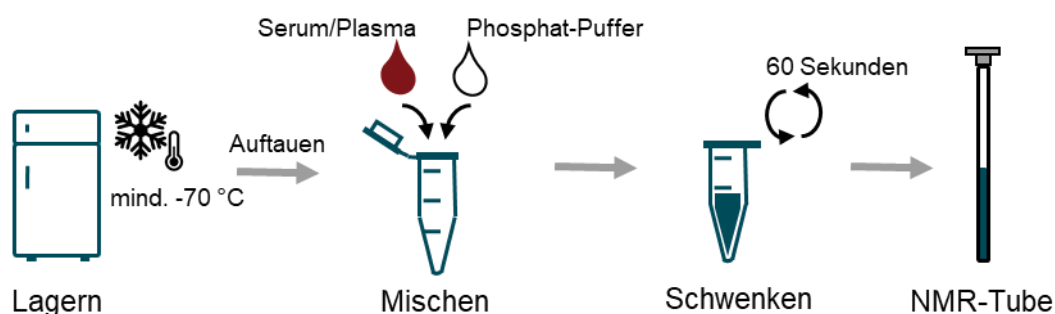


Abbildung 4-1: Präparation der Serum- oder Plasmaproben für die Analyse mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie. Die gefrorenen Proben werden aufgetaut mit einem Phosphat-Puffer durch manuelles Schwenken vermischt und für die Analyse in ein NMR-Röhrchen überführt (Bruker Corporation 2019).

4.3.2 Kernspinresonanz-Spektroskopie

NMR-Analysen wurden auf einem 600 MHz Avance III HD-Spektrometer der Firma Bruker Biospin mit einem TXI-Probenkopf durchgeführt. Das automatische Probenwechsler- und Kühlsystem Bruker SampleJet™ wurde auf 279,15 K temperiert. Unmittelbar vor der Messung wurden die NMR-Tubes für eine Minute auf 306,00 K temperiert. Die Proben wurden bei einer Temperatur von 310,00 K analysiert. Nach dem Einlass in das NMR-Spektrometer wurden die Proben zunächst weitere fünf Minuten bei dieser Temperatur äquilibriert und anschließend eine automatische Locking-, Tuning- und Matching- (ATMA unit) sowie Shimmingroutine durchgeführt. Die Messung der Blutproben erfolgte in Automation, wobei neben den genannten Parametern sowie einer automatischen

Pulskalibrierung und optimierter Einstellung der Vorsättigungsleistung auch eine automatische Phasen- und Basislinienkorrektur sowie eine Achsenkalibrierung im Rahmen der Datenprozessierung durchgeführt wurden. Die Software TopSpin™ 3.5pl7 und neuere Versionen sowie ICON™ NMR wurden für die Datenerfassung und -verarbeitung verwendet (Dona et al. 2014).

4.3.2.1 Qualitätskontrolle

Eine Qualitätskontrolle (engl. *quality control*, QC) des NMR-Spektrometers wurde arbeitstäglich durchgeführt, um die spektrale Qualität sowie konsistente, vergleichbare und genaue Ergebnisse innerhalb definierter Präzisionsgrenzen zu gewährleisten. Dafür wurden Überprüfungen (A) der Temperaturkalibrierung, (B) der Wasserunterdrückung und (C) der externen Kalibrierung mit einer Referenz für die Quantifizierung durchgeführt. Da die Bindungseigenschaften von Proteinen, Lipiden und Molekülaggregaten an kleine Moleküle in Blutproben temperaturabhängig sind, wurde (A) eine Temperaturkalibrierung durchgeführt, um die Messung bei einer exakten Temperatur zu gewährleisten. Entsprechend des IVDr Protokolls wurde eine Temperatur von 310,00 K gewählt, wodurch biologische Bedingungen im Hinblick auf die Körpertemperatur von Säugetieren geschaffen wurden. Für die Temperaturvalidierung bzw. -kalibrierung wurde eine 99,8% deuterierte Methanol-Standardprobe (MeOD) verwendet. Ein Standard-90°-Protonen-Parametersatz (*zg30*) mit einem Scan wurde genutzt. Das Methanol-Signal bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 3,33$ ppm sollte hierbei symmetrisch sein und aufgrund der H-D-Spinkopplung eine Multiplizität von 1:2:3:2:1 aufweisen. Um dies zu erreichen, wurde im Bedarfsfall eine Optimierung des Shims durchgeführt. Nach Anwendung einer exponentiellen Apodisationsfunktion (*line broadening*) von 3 Hz zur Rauschunterdrückung wurde der Abstand zwischen den beiden temperaturabhängigen Methanol-Signalen der CH₃- und OH-Gruppe unter Berücksichtigung einer vom Instrumentenhersteller gelieferten Kalibrierkurve bestimmt und die reale Temperatur der Probe berechnet (Findeisen et al. 2007). Der Signalabstand entspricht bei einer realen Temperatur von 310,00 K einer Verschiebungsdifferenz von 1,428 ppm. Die Zieltemperatur des Probenkopfes wurde so lange optimiert, bis die berechnete Temperatur der Probe bei $310,00 \pm 0,09$ K lag. (B) Die Shimperformance und die Qualität der Wasserunterdrückung wurde mit einer Saccharose-Standardprobe (2 mM Saccharose, 2 mM NaN₃, 0,5 mM TSP-d₄ in 9/1 v/v H₂O/D₂O) überprüft. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Integrität des Probenkopfes ein Gradientenprofil erstellt. Zunächst wurde zur Optimierung der Offset-Frequenz O1 ein 1D ¹H NMR-Experiment (Pulsprogramm *zgpr*) mit einer Vorsättigung, einer langen Relaxationsverzögerung und einem Scan aufgenommen. Anschließend wurden Experimente (Pulsprogramm *zgpr* und *noesygppr1d*) mit langen Verzögerungszeiten von D1 = 10 s und einem vollständigen Scanzzyklus von acht Scans zur Überprüfung der

Qualität der Wasserunterdrückung durchgeführt. Bei dem *zgpr*-Experiment durfte der *water hump* des Restwassersignals, gemessen bei 50% und 10% der Signalintensität des TSP-d4, nicht breiter als 30 Hz bzw. 50 Hz sein. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, welches am Signal des anomeren Protons der Saccharose bestimmt wurde, musste größer 100 sein sowie das Splitting weniger als 15% betragen. Um die Güte des Experimentes zu überprüfen, wurde die Linienbreite des Referenzsignals TSP-d4 ($\delta = 0,00$ ppm) auf halber Höhe bestimmt. Bei dem *zgpr*-Experiment musste diese kleiner als 0,80 Hz und bei dem *noesygppr1d*-Experiment kleiner als 1,10 Hz sein. Gegebenenfalls wurde die Shimperformance optimiert. Zur Überprüfung der Güte des Gradientenprofils wurde ein *imagegp1d*-Experiment durchgeführt, mit welchem Rückschlüsse auf Verunreinigungen des Probenkopfes gezogen werden können. Mithilfe einer externen Referenzprobe, bestehend aus stabilen Standardsubstanzen, die in Biofluiden vorkommen, wurde eine Quantifizierung der Metaboliten in Blutproben unter Anwendung der PULCON-Methode (siehe 2.4.2.2) durchgeführt. Daher erfolgte (C) eine Überprüfung der bestehenden Referenz zur Quantifizierung. Für die Analyse wurden dieselben experimentellen Parameter (Pulsprogramm *noesygppr1d*) verwendet, die auch bei der Analyse der Blutproben genutzt wurden. Für eine Qualitätskontrolle im Rahmen der vorgegebenen Grenzwerte musste die quantitative Kalibrierung bei $100,0 \pm 2,0\%$ liegen, ohne dass sie rekaliert wurde. Durch die berechnete maximale interne Abweichung, die unter 4,0% sein musste, wurde die Degradierung der Probe überprüft. Weiterhin wurde die Linienbreite des Referenzsignals TSP-d4 ($\delta = 0,00$ ppm) auf halber Höhe (Zielwert $<1,10$ Hz) bestimmt (Bruker Corporation 2019; Dona et al. 2014).

4.3.2.2 Experimente

Vier verschiedene ^1H NMR-Experimente wurden pro Probe in Automation analysiert. 1D Protonenspektren wurden unter Verwendung eines Standardpulsprogramms der Firma Bruker mit Wasserunterdrückung (*noesygppr1d*) aufgenommen (siehe 2.4.2.1). Die Pulssequenz hat die Form $-\text{RD} - g_{z,1} - 90^\circ - \text{T} - 90^\circ - \text{T}_m - g_{z,2} - 90^\circ - \text{ACQ}$. Dabei ist RD der *relaxation delay* ($\text{RD} = 4$ s), bei dem die Vorsättigung des Wassers stattfindet, T eine kurze Verzögerungszeit von etwa 4 μs , 90° beschreibt einen 90° -Radiofrequenzpuls, T_m drückt die Mischzeit von etwa 10 ms aus, $g_{z,1}$ und $g_{z,2}$ sind magnetische Feldgradienten in z-Richtung für 1 ms und ACQ beschreibt den Zeitraum der Datenakquisition. Außerdem wurden 1D CPMG-Spin-Echo-Experimente (Pulsprogramm: *cpmgpr1d*) zur Unterdrückung breiter Signale von Proteinen, Lipiden und anderen Makromolekülen gemessen (siehe 2.4.2.1). Die allgemeine Form der Pulssequenz lautet $-\text{RD} - 90^\circ - (\text{T} - 180^\circ - \text{T})_n - \text{ACQ}$. Dabei beträgt $\text{RD} = 4$ s, 90° bzw. 180° stehen wiederum für einen 90° - bzw. 180° -Radiofrequenzpuls, T beschreibt eine kurze Verzögerungszeit von 300 μs und ACQ die Zeit der Datenakquisition. Diese Spektren wurden jeweils mit 32 Scans aufgenommen (Tabelle

4-1). Darüber hinaus wurden 2D J-aufgelöste und diffusionsbearbeitete Experimente durchgeführt (Bruker Corporation 2019; Dona et al. 2014).

Tabelle 4-1: Akquisitionsparameter der IVDr Experimente. Ausgewählte Messparameter der 600 MHz 1D ^1H NOESY- und 1D CPMG-Spektren entsprechend des Standardprotokoll für IVDr Blutmessungen (Bruker Corporation 2019; Dona et al. 2014).

	1D ^1H NOESY	1D CPMG
Pulsprogramm	<i>noesygppr1d</i>	<i>cpmgpr1d</i>
Time domain	98 304	73 728
Dummy Scans	4	4
Scans	32	32
Sweep width	30 ppm	20 ppm
Acquisition time	2,726 s	3,067 s
Relaxation delay	4 s	4 s
Receiver gain	90,5	90,5
Dwell time	27,7 μs	41,6 μs
Mixing time	0,01 s	0,01 s
Line Broadening	0,3 Hz	0,3 Hz
Number of loops	-	128

Nach der Datenaufnahme wurden die Spektren automatisch prozessiert. Dabei wurden vor der FOURIER-Transformation der Daten zunächst ein *zero filling* und eine exponentielle Apodisationsfunktion (*line broadening*) von 0,3 Hz angewendet. Die resultierenden Spektren mit 132 072 Datenpunkten wurden phasenkorrigiert (0. Ordnung) und referenziert (Bruker Corporation 2019; Dona et al. 2014).

Zur Überprüfung der Güte des Spektrums wurden (A) die Linienbreite, (B) die Basislinie, (C) die Wasserunterdrückung und (D) die Phasenkorrektur überprüft. (A) Zunächst wurde die Linienbreite des TSP-Signals überprüft. Da TSP allerdings an Proteine bindet, verbreitert sich das Signal maßgeblich. Um dennoch die Linienbreite überprüfen zu können, wurde das Alanine-Dublett ($\delta = 1,48$ ppm) betrachtet, welches symmetrisch sein und eine Linienbreite von kleiner als 1,5 Hz haben sollte. Zusätzlich wurden gegebenenfalls die Lactat-Signale ($\delta_1 = 1,35$ ppm und $\delta_2 = 4,13$ ppm), welche eine Linienbreite von kleiner als 1,15 Hz haben sollten und das Dublett der α -Glucose ($\delta = 5,23$ ppm) betrachtet, welches zur Basislinie oder zu überlappenden Lipidresonanzen aufgelöst sein sollte. Außerdem sollte die (B) Basislinie unterhalb von -5 ppm und oberhalb von 15 ppm bei null liegen und keine Signale erkennbar sein. Um (C) die Güte der Wasserunterdrückung zu überprüfen, wurde der Bereich zwischen 4,6 ppm und 4,8 ppm betrachtet. Lediglich dieser Bereich des Spektrums sollte durch die Wasserunterdrückung beeinflusst sein. Nach der (D)

automatischen Phasenkorrektur 0. Ordnung sollte die Verzerrung im Bereich des TSP-Signals bei unter $0,2^\circ$ liegen und das Signal entsprechend symmetrisch sein. Eine Phasenkorrektur 1. Ordnung sollte nicht notwendig sein (Bruker BioSpin 2019; Bruker Corporation 2019; Dona et al. 2014).

4.3.2.3 Automatische Datenprozessierung

Bei der Untersuchung von Serum- oder Plasmaproben mit der IVDr Plattform werden in Automation drei verschiedene Datenanalysen durchgeführt und die Resultate in entsprechenden Reports dargestellt. Zunächst kann mit dem (A) B.I.BioBankQC eine Qualitätskontrolle der analysierten Blutproben durchgeführt werden. Mit der (B) B.I.QUANT-PS 2.0 werden 41 Parameter im Bereich der Metaboliten und mit der (C) B.I.LISA 112 Lipoproteine analysiert (Bruker BioSpin 2019). (A) Bei der Analyse ausgewählter Qualitätsparameter werden die NMR-Parameter sowie die Qualität des NMR-Experimentes und der Probenpräparation geprüft. Weiterhin erfolgt eine Identifizierung der Matrix (Serum oder Plasma), eine Kontrolle der Matrixintegrität sowie möglicher Kontaminationen. (B) Für die Quantifizierung der einzelnen Metaboliten wird das Integral eines NMR-Signals bestimmt. In Abbildung 4-2 wird das Originalspektrum sowie das berechnete Signal eines Metaboliten dargestellt. Die grau unterlegte Fläche stellt dabei das Konzentrationsäquivalent des betrachteten Metaboliten und damit die Rohkonzentration r in mmol/L dar. Aus dieser ergibt sich nach dem Abgleich mit der Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*, LOD) die finale Konzentration Conc. in mmol/L. Die Differenz zwischen dem Konzentrationsäquivalent des Metabolitsignals und des berechneten Fits ist mit dem Symbol Δ gekennzeichnet. Diese wird ebenfalls in mmol/L angegeben. Die Korrelation zwischen dem Originalspektrum und dem berechneten Signal wird als p in Prozent angegeben und kann als Maß für die Güte des Fittings interpretiert werden. Neben den aufgeführten Parametern (Conc., LOD, r , p und Δ) wird in dem Analysebericht des B.I.QUANT-PS 2.0 ein 95%-Bereich für jeden Parameter angegeben. Dadurch wird die Einordnung der gemessenen Konzentration in typische Konzentrationsbereiche im humanen Metabolismus erleichtert (Bruker BioSpin 2019).

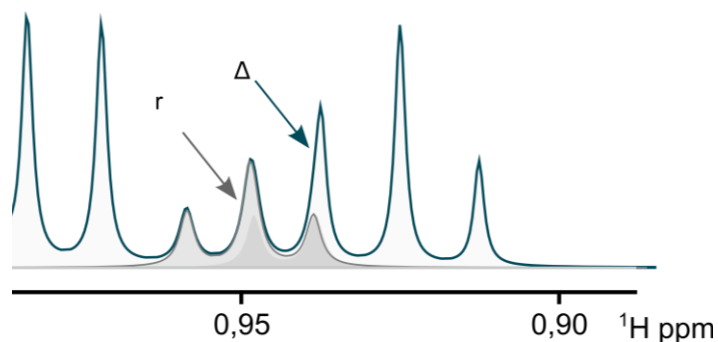


Abbildung 4-2: Graphische Erklärung der automatischen Datenprozessierung. Darstellung eines Originalspektrums sowie das berechnete Integral eines ausgewählten Metaboliten (grau). Dieses stellt das Konzentrationsäquivalent r eines Metaboliten dar. Die Differenz zwischen dem Originalspektrum und dem berechneten Integral wird als Δ gekennzeichnet (Bruker BioSpin 2019).

Mit der (C) B.I.LISA werden Lipoproteine aus dem Bereich der Triglyzeride (TG), freien und gebundenen Cholesterine (FC und Chol), Phospholipide (PL) und Apolipoproteine (Apo) der Klassen A1, A2 und B100 sowie Partikelnummern analysiert. Entsprechend ihrer Dichten werden die Lipoproteine in die vier Klassen HDL, IDL, LDL und VLDL und ihre Subfraktionen eingeteilt (Tabelle 4-2). Für eine erleichterte Einschätzung der bestimmten Konzentration wird auch hier der 95%-Bereich angegeben (Bruker BioSpin 2019). Die Quantifizierung der Lipoproteine basiert beim IVDr Verfahren auf der mathematischen Interrogation der $-CH_2$ ($\delta = 1,25$ ppm) und $-CH_3$ ($\delta = 0,8$ ppm) Signale (Mihaleva et al. 2014).

Tabelle 4-2: Klassifizierung der Lipoproteine. Entsprechend ihrer Dichten erfolgt eine Einteilung der Lipoproteine in *very low density lipoprotein* (VLDL), *intermediate density lipoprotein* (IDL), *low density lipoprotein* (LDL) und *high density lipoprotein* (HDL) sowie ihre Subfraktionen (Bruker BioSpin 2019).

	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte [kg /L]	0,950–1,006	1,006–1,019	1,019–1,063	1,063–1,210
Anzahl Subfraktionen	1-5	-	1-6	1-4

4.4 Metaboliten im *in-vitro diagnostic research* Protokoll

In dem IVDr Protokoll werden standardmäßig 41 Metaboliten bestimmt. Dazu zählen 39 Metaboliten und zwei technische Additive (Calcium- und Kalium-EDTA). Um die einzelnen Metaboliten NMR-spektroskopisch mithilfe ihrer chemischen Verschiebungen, Intensitäten und Multipletts zu identifizieren, wurden Einzel- und Multistandards präpariert.

4.4.1 Präparation und Analyse der Einzelstandards

Es wurden Einzelstandards der in Tabelle 4-3 aufgeführten 28 Substanzen hergestellt. Mit einer Analysenwaage wurden die Feststoffe separat eingewogen. Bei Flüssigkeiten wurde das entsprechende Volumen mit einer Kolbenhubpipette pipettiert. Die Substanzen wurden jeweils einzeln in einen 5 mL-Messkolben überführt und durch Zugabe von etwa 4 mL destilliertem H₂O gelöst. Nach dem Lösen wurde bis zur Markierung mit destilliertem H₂O aufgefüllt und die Lösungen in beschriftete 8 mL-Glasvials zur Lagerung überführt.

Tabelle 4-3: Übersicht der Metaboliten im IVDr Verfahren. Auflistung der verwendeten Standardsubstanzen, deren Einwaage/Volumen sowie die Konzentrationen in den Einzel- und Multistandards.

Substanzklasse	Substanz	Einwaage/ Volumen	Konzentration [mmol/L]	
			Einzelstandard	Multistandard
Alkohole	Ethanol	105 μ L	180	6
Amine	Trimethylamine-N-oxide dihydrat	159,80 mg	143,78	4,79
	Alanine	32,14 mg	36,08	1,20

Substanzklasse	Substanz	Einwaage/ Volumen	Konzentration [mmol/L]	
			Einzelstandard	Multistandard
Aminosäuren und Derivate	Asparagine monohydrat	134,99 mg	102,17	3,41
	Creatinine	20,14 mg	17,80	0,59
	Glutamic acid*	132,87 mg	90,31	-
	Glutamine	52,83 mg	36,15	2,42
	Glycine	14,08 mg	18,76	1,26
	Histidine	55,46 mg	35,75	1,19
	Isoleucine	71,02 mg	54,14	1,80
	Leucine	23,64 mg	18,02	1,20
	Lysine	105,54 mg	72,19	2,41
	Methionine	134,06 mg	89,95	2,99
	Phenylalanine	89,60 mg	54,24	1,81
	Proline	103,46 mg	89,86	3,00
	Sarcosine	16,20 mg	18,18	0,61
	Threonine	86,00 mg	72,20	2,41
	Tyrosine*	97,77 mg	53,96	-
	Valine	62,93 mg	53,72	1,79
Carbonsäuren	Acetic acid	10,3 µL	18	0,6
	Citric acid monohydrat	113,94 mg	54,25	1,81
	Formic acid	13,6 µL	36	1,2
	Lactic acid; Natrium-Salz	60,48 mg	53,97	1,80
Ketonsäuren	alpha-Ketoglutaric acid; Natrium-Salz	60,43 mg	35,95	1,20
	3-Hydroxybutyric acid; Natrium-Salz	45,46 mg	36,05	1,20
Zucker	D-Galactose**	355,17 mg	197,14	6,57
	Glucose	1751,43 mg	972,21	32,41
Sulfone	Dimethylsulfone	16,55 mg	17,58	0,59

* vollständiges Lösen nicht möglich

** nur bei Dotierung verwendet

Für die NMR-spektroskopische Analyse wurde eine Volumeneinheit des jeweiligen Einzelstandards mit einer Volumeneinheit eines 75 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) in einem 2 mL-Reaktionsgefäß versetzt und 60 Sekunden manuell mit einem Vortexmischer

vermischt. Anschließend wurden 600 µL der Lösung in ein 5 mm NMR-Tube überführt und mittels NMR-Spektroskopie analysiert (Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4: Ausgewählte Akquisitionsparameter der 600 MHz 1D ¹H NOESY-Messung der Standardsubstanzen (Bruker Corporation 2019).

1D ¹H NOESY	
Pulsprogramm	<i>noesygppr1d</i>
Time domain	32 768
Dummy Scans	4
Scans	Einzelstandard: 4; Multistandard: 32
Sweep width	12 ppm
Acquisition time	2,272 s
Relaxation delay	2 s
Dwell time	69,3 µs
Mixing time	0,01 s
Line Broadening	0,3 Hz

4.4.2 Präparation und Analyse eines Multistandards

Für die Herstellung des Multistandards wurden, mit Ausnahme der schwerlöslichen Aminosäuren Glutamic acid und Tyrosine, die Einzelstandards (Tabelle 4-3) verwendet. Von jedem Einzelstandard wurden 100 µL mit einer Kolbenhubpipette in ein 8 mL-Glasvial gegeben. Von Glycine, Glutamine und Leucine wurden 200 µL verwendet. Der Multistandard wurde mit destilliertem H₂O auf ein Volumen von 3 mL aufgefüllt. Eine Volumeneinheit der mit einem Vortexmischer gemischten Lösung wurde mit einer Volumeneinheit eines 75 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) in einem 2 mL-Reaktionsgefäß gemischt. Der präparierte Multistandard wurde in einem 5 mm NMR-Röhrchen analysiert (siehe 4.4.1, Tabelle 4-4).

4.4.3 Dotierung einer Serumprobe mit Multistandard

Fünf Serumproben wurden nach IVDr Protokoll präpariert (siehe 4.3.1). Anschließend wurden den präparierten Proben 1,0 µL, 2,5 µL, 5,0 µL und 10,0 µL entnommen und das entsprechende Volumen mit Multistandards (siehe 4.4.2) ersetzt. Die Proben wurden nach IVDr Protokoll NMR-spektroskopisch (siehe 4.3.2) analysiert.

4.5 Methodische Betrachtung des IVDr Protokolls

Bei dem IVDr Protokoll handelt es sich um ein Verfahren zur Analyse von Serum- oder Plasmaproben mittels NMR-Spektroskopie, das nach einer strikten

Standardarbeitsanweisung (engl. *standard operating procedure*, SOP) vorgeht (Bruker BioSpin 2019). Im Zusammenhang mit diesem Protokoll wurden einige praktische und methodische Fragestellungen der Präanalytik und Messung untersucht, die in Abbildung 4-3 skizziert sind. Dabei wurden die Blutproben standardmäßig in 5 mm NMR-Tubes analysiert.

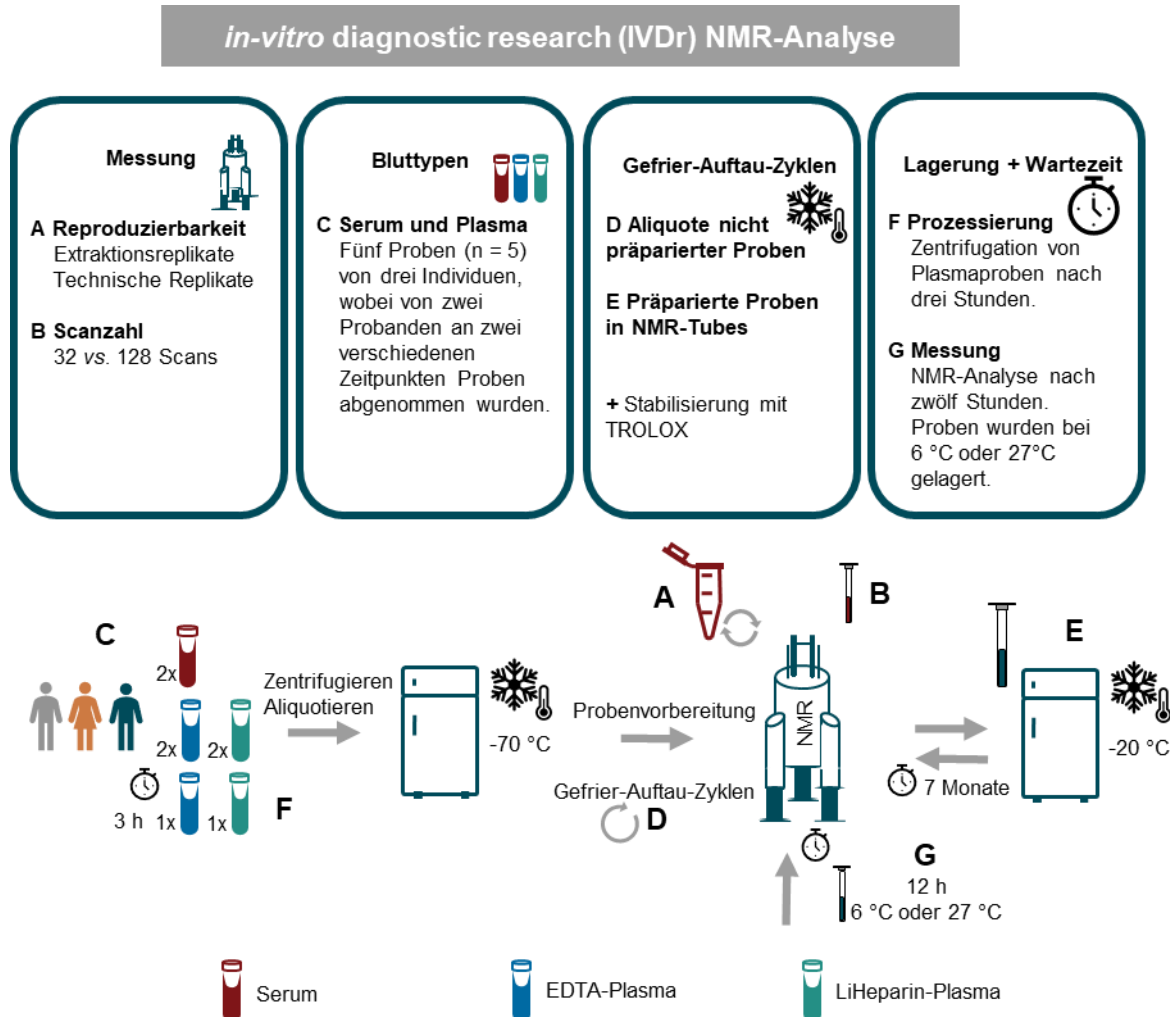


Abbildung 4-3: Schematische und graphische Darstellung verschiedener prä- und postanalytischer Untersuchungen (A bis G) im Zusammenhang mit dem IVDr Protokoll. Neben Fragestellungen zur Messmethode wurden verschiedene Bluttypen, der Einfluss von Gefrier-Auftau-Zyklen sowie andere Faktoren wie Lagerungen und Wartezeiten betrachtet.

4.5.1 Reproduzierbarkeit der Probenpräparation und Analyse

Für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Analyse (Abbildung 4-3 A) wurde eine Serumprobe dreimal entsprechend des IVDr Protokolls mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie analysiert (siehe 4.3.2) und die Spektren sowie Quantifizierungen der Metaboliten und Lipoproteine zwischen den technischen Replikaten verglichen. Weiterhin wurde eine Serumprobe dreimal aufgearbeitet (siehe 4.3.1) und die drei präparierten Proben NMR-spektroskopisch untersucht. Durch die vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der Extraktionsreplikate wurde die Reproduzierbarkeit der Probenpräparation untersucht.

4.5.2 Veränderung der Scanzahl

Standardmäßig werden die Metaboliten und Lipoproteine auf Basis der 600 MHz 1D ^1H NOESY-Spektren mit 32 Scans mittels IVDr Verfahren quantifiziert (Bruker Corporation 2019). Allerdings besteht auch die Möglichkeit, die Spektren im Rahmen des IVDr Verfahrens mit 128 Scans aufzunehmen (Lodge, Nitschke, Loo, et al. 2021). Die Vergleichbarkeit zwischen den Quantifizierungen der 1D ^1H NOESY-Spektren mit 32 und mit 128 Scans wurde daher begutachtet (Abbildung 4-3 B).

4.5.3 Vergleich zwischen Serum, EDTA-Plasma und LiHeparin-Plasma

Bei Blutproben unterscheidet man zwischen Vollblut, Serum oder Plasma, wobei beim Blutplasma in Abhängigkeit vom gewählten Antikoagulans beispielsweise zwischen EDTA-Plasma und LiHeparin-Plasma differenziert wird. Für die Untersuchung von Blutproben mittels IVDr Protokoll wurden Serum, EDTA-Plasma und LiHeparin-Plasma verwendet. Um die Vor- und Nachteile der verschiedenen Typen herauszuarbeiten, wurden drei Probanden entsprechende Blutproben (Abbildung 4-3 C) entnommen. Die Abnahme der Serum- und Plasmaproben erfolgte dabei bei derselben Punktion der Kanüle durch die Haut in eine Vene. Es wurden von zwei Probanden (Proband 1, weiblich und Proband 2, männlich) zwei Serumröhrchen, drei Röhrchen EDTA-Plasma und drei Röhrchen LiHeparin-Plasma abgenommen. Bei einer weiteren Punktion mit einem Abstand von mindestens einem halben Jahr wurden diesen beiden Probanden erneut zwei Röhrchen Serum, zwei Röhrchen EDTA-Plasma und zwei Röhrchen LiHeparin-Plasma entnommen. Von dem dritten Probanden (Proband 3, männlich) wurde einmalig jeweils ein Röhrchen jedes Bluttyps abgenommen. Die Serumproben wurden nach einer Gerinnungszeit von 30 Minuten nach der Abnahme zentrifugiert. Jeweils zwei S-Monovetten® der EDTA- und LiHeparin-Proben wurden entsprechend des Protokolls zur Herstellung von Blutplasma unmittelbar nach der Blutentnahme zentrifugiert (siehe 4.1). Die anderen Röhrchen wurden entsprechend 4.5.5 aufgearbeitet. Die Aliquote wurden bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank eingefroren. Die Serum- und Plasmaproben wurden nach dem Auftauen entsprechend des IVDr Protokolls aufgearbeitet und analysiert (siehe 4.3). Die NMR-Spektren der verschiedenen Bluttypen wurden verglichen sowie die quantifizierten Metaboliten und Lipoproteine unter Berücksichtigung der jeweiligen Probanden betrachtet. Dabei wurden sowohl die interindividuellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Probanden als auch die intraindividuellen Zusammenhänge zwischen den Serum- und Plasmaproben betrachtet.

4.5.4 Gefrier- und Auftau-Zyklen

Die Serum- und Plasmaproben (EDTA und LiHeparin) wurden bei Raumtemperatur mehrere Minuten aufgetaut und die Proben entsprechend des IVDr Protokolls aufgearbeitet

(siehe 4.3.1). Der Überstand der Aliquote wurde eingefroren und für eine weitere Analyse mittels IVDr Protokoll erneut bei Raumtemperatur aufgetaut (Abbildung 4-3 D). Weiterhin wurden die präparierten und gemessenen Proben in den NMR-Röhrchen nach der Messung bei -20 °C im Gefrierschrank eingefroren. Für eine erneute Messung wurden die NMR-Tubes bei Raumtemperatur für mehrere Minuten aufgetaut und mittels NMR-Spektroskopie analysiert (Abbildung 4-3 E). Die analysierten Metaboliten und Lipoproteine wurden zwischen den beiden Messzeitpunkten verglichen.

4.5.5 Zentrifugation von Plasmaproben

Die Plasmaproben wurden standardmäßig unmittelbar nach der Blutentnahme zentrifugiert und der Überstand aliquotiert (siehe 4.1). Von jedem der beiden Probanden (Proband 1 und Proband 2) wurde jeweils ein Röhrchen EDTA-Plasma und ein Röhrchen LiHeparin-Plasma nicht direkt nach der Blutentnahme zentrifugiert, sondern nach dem manuellen Schwenken zunächst drei Stunden bei 6 °C im Kühlschrank zwischengelagert (Abbildung 4-3 F). Anschließend wurden auch diese Proben entsprechend des Protokolls zur Herstellung von Blutplasma zentrifugiert, aliquotiert und bei -70 °C im Gefrierschrank eingefroren (siehe 4.1). Die Plasmaproben wurden nach dem IVDr Protokoll aufgearbeitet und mittels NMR-Spektroskopie analysiert (siehe 4.3). Die Proben, welche unmittelbar nach der Blutentnahme zentrifugiert worden waren, wurden mit denen, die drei Stunden im Kühlschrank bei 6 °C bis zur Zentrifugation gelagert wurden, verglichen. Durch die vergleichende Betrachtung der Metaboliten und Lipoproteine zwischen den Plasmaproben wurde der Einfluss der zeitlichen Dauer bis zur Zentrifugation der Blutproben untersucht.

4.5.6 Lagerung präparierter Proben unmittelbar vor der Analyse

Die Serum- und Plasmaproben der beiden Probanden (Proband 1 und Proband 2) wurden mittels IVDr Protokoll aufgearbeitet und analysiert (siehe 4.3). Die präparierten Proben der Probanden 1 wurden nach der Messung in den NMR-Röhrchen zwölf Stunden bei Raumtemperatur (27 °C) zwischengelagert und anschließend erneut mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie analysiert. Die präparierten und gemessenen Blutproben des Probanden 2 wurden bei 6 °C in NMR-Tubes aufbewahrt und nach zwölf Stunden abermals gemessen. Durch den Vergleich der beiden Zeitpunkte wurde der Einfluss der verschiedenen Temperaturen auf die präparierten Blutproben bis zur Messung betrachtet (Abbildung 4-3 G).

4.5.7 Stabilisierung mit TROLOX

Eine 1 mM Stammlösung des Tocopherol-Derivats 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure mit dem Trivialnamen TROLOX wurde (A) unmittelbar nach der Zentrifugation der Blutproben (siehe 4.1) oder (B) zusammen mit dem Phosphat-Puffer (siehe 4.3.1) zu den Serum- oder Plasmaproben der Probanden 1 und Probanden 2

hinzugegeben. Die finale Konzentration des Antioxidans in den analysierten Proben betrug 20 µM.

4.6 Studien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben aus verschiedenen Humanstudien analysiert, deren Studiendesign sowie Metadaten der Probanden und Patienten im Folgenden näher betrachtet werden.

4.6.1 LUERIC-Studie

Die Studie *Luebeck Registry of Intensive Care patients - characterization of the patients intestinal MICROBIOME* und die Substudie *Luebeck Registry of Intensive Care patients - characterization of the patient's metabolism under COVID-19 infection and acute respiratory distress syndrome* (LUERIC-MICROBIOME Nr.19-019 vom 28. Februar 2019 und 19-019 A vom 27. März 2020, Universität zu Lübeck) wurden als LUERIC-Studie zusammengefasst. Ziel dieser Studie ist eine systematische Beschreibung des Krankheitsverlaufes von Patienten, die intensivmedizinisch am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein am Standort Lübeck betreut wurden. Insbesondere wurden klinische Messparameter, Medikation und Ernährung bei erwachsenen Patienten (≥ 18 Jahre) mit COVID-19 oder kardiogenem Schock (engl. *cardiogenic shock*, CS) unter Vorlage einer schriftlichen Einverständniserklärung dokumentiert. Im Rahmen dieser Studie wurden Blut-, Urin- und Faecesproben im Zeitraum zwischen Januar 2020 und Juni 2021 untersucht. Die 347 Serumproben, welche morgens (7-9 Uhr) und abends (19-21 Uhr) abgenommen worden waren, wurden mittels NMR-Spektroskopie auf ihr metabolisches Profil und dessen zeitabhängige Veränderungen während der akuten Erkrankung unter intensivmedizinischer Behandlung analysiert (Abbildung 4-4).

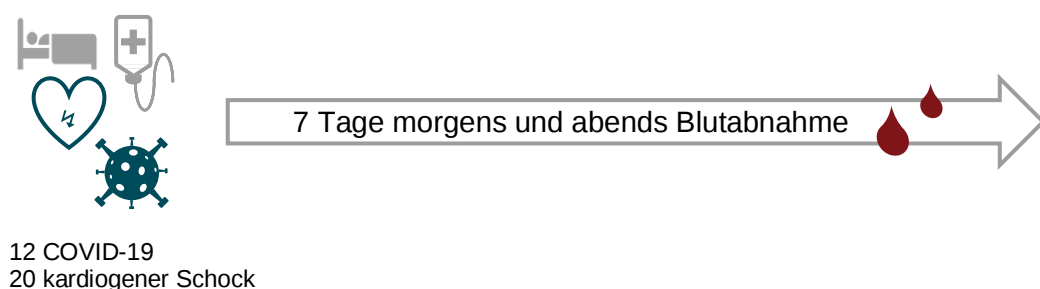


Abbildung 4-4: Schematischer Aufbau der intensivmedizinischen LUERIC-Studie.

Eine Auswahl der erfassten Metadaten dieser Studie sind in Tabelle 4-5 aufgeführt.

Tabelle 4-5: Metadaten der intensivmedizinischen Kohorte. Darstellung ausgewählter Parameter (Anzahl, Mittelwert, Standardabweichung) der LUERIC-Studie wie Geschlecht, Alter, Body-Mass-Index (BMI), *Simplified Acute Physiology-Score II* (SAPS II-Score).

	Anzahl	Geschlecht		Alter [Jahre]	BMI [kg/m ²]	SAPS II- Score
		♀	♂			
COVID-19	12	6 (50%)	6 (50%)	63,5 ± 9,1	28,7 ± 6,4	42,1 ± 12,0
Kardiogener Schock	20	16 (80%)	4 (20%)	69,1 ± 16,0	25,7 ± 3,1	48,7 ± 13,8

4.6.2 ELISA-Studie

Die Lübecker Längsschnittuntersuchung zu Infektionen mit SARS-CoV-2 (ELISA Nr. 20-150, Universität zu Lübeck) wurde als ELISA-Studie bezeichnet und soll Aufschluss über die Ausbreitung, Eindämmungs- und Lockerungsmaßnahmen im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 in der Hansestadt Lübeck und Umgebung geben. Die Blutentnahmen und Serumanalysen im Rahmen der Lübecker ELISA-Studie wurden im April 2020 genehmigt. Die Anzeige „Metabolomics nach COVID-19“ wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt und unter dem Aktenzeichen 22-100 geführt. Nach der Erhebung von Gesundheitsdaten wurden ausgewählte Gruppen über einen Zeitraum von mehreren Monaten auf eine SARS-CoV-2 Infektion untersucht. Eine SARS-CoV-2 Infektion wurde durch RT-PCR aus Nasopharynx-Abstrichen am selben Tag der Serumprobenahme bestimmt und Immunglobulin G-Antikörpern (IgG) gegen SARS-CoV-2 mittels enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) der Firma Euroimmun (EUR) von der Arbeitsgruppe Immunologie und Glykoanalytik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Standort Lübeck bestimmt. Um die metabolischen Veränderungen zu analysieren, wurden 324 Serumproben mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Insgesamt wurden 58 gesunde Kontrollen sowie 62 SARS-CoV-2 Antikörper-positive Personen mit vorausgegangenem symptomfreien oder milden Krankheitsverlauf untersucht. Die SARS-CoV-2 Antikörper-positiven Probanden wurden in zwei Subgruppen unterteilt. Erstere infizierte sich im Verlaufe der Screeningphase mit SARS-CoV-2, sodass Serumproben von 44 Probanden vor und nach einer Infektion betrachtet wurden. Letztere 18 Probanden wiesen bereits zu Beginn der Studienphase Antikörper gegen SARS-CoV-2 auf, wobei deren Antikörpertiter in Assoziation mit dem metabolischen Profil longitudinal über ein Jahr betrachtet wurde und

mit 18 EUR S1 IgG Antikörper-negativen Kontrollen verglichen wurden (Langzeit-EUR S1 IgG (Abbildung 4-5).

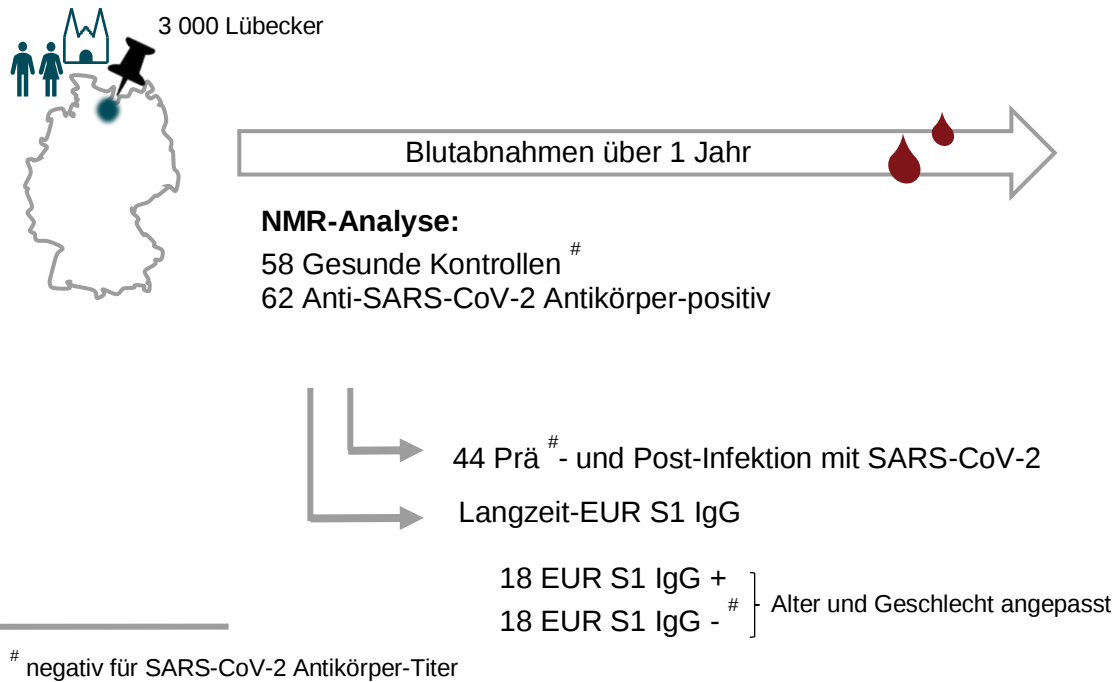


Abbildung 4-5: Schematischer Aufbau der ELISA-Studie und die Auswahl der mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie analysierten Proben. Über ein Jahr wurden Serumproben von Lübeckern auf SARS-CoV-2 Antikörper analysiert. NMR-spektroskopisch wurden 58 gesunde Kontrollen ohne nachweisbare Antikörper gegen SARS-CoV-2 und 62 SARS-CoV-2 Antikörper-positiv Probanden analysiert. Von letzteren wurden von 44 Probanden Serumproben vor und nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 analysiert. Von weiteren 18 Probanden, die positiv für SARS-CoV-2 Antikörper getestet wurden, wurden Blutproben über ein Jahr untersucht und diese mit SARS-CoV-2 Antikörper-negativen Kontrollen verglichen (Langzeit-EUR S1 IgG).

In Tabelle 4-6 sind ausgewählte Metadaten der ELISA-Studie der analysierten Subgruppen aufgelistet.

Tabelle 4-6: Metadaten der nicht-hospitalisierten Kohorte. Darstellung ausgewählter Parameter der ELISA-Studie wie Geschlecht und Alter.

	Anzahl	Geschlecht			Alter [Jahre]
		♀	♂	unbekannt	
Kontrollen	58	26 (45%)	30 (52%)	2 (3,6%)	51,0 ± 15,8
SARS-CoV-2 Antikörper-positiv	62	32 (52%)	30 (48%)	-	46,2 ± 16,4
Prä- und Post-Infektion	44	24 (55%)	20 (45%)	-	47,0 ± 16,7
EUR S1 IgG+	18	8 (44%)	10 (56%)	-	44,1 ± 15,9
EUR S1 IgG-	18	8 (44%)	10 (56%)	-	44,1 ± 15,9

4.6.3 Schweregrade bei aktiven und post-COVID-19 Patienten

In einer weiteren Studie wurden Serumproben von COVID-19 Patienten mit unterschiedlichen Schweregraden der Erkrankung analysiert. Die Blutentnahmen aus der Kohorte der an COVID-19 Erkrankten und gesunden Kontrollpersonen erfolgte in drei deutschen Kliniken. Die Blutentnahmen sowie die Analysen der EDTA-Proben wurden unter den Aktenzeichen D 474/20 von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und unter der Kennung 11/17 von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Frankfurt genehmigt. Von der Ethikkommission der Universität zu Köln wurden die Patienten in das Protokoll *Coronavirus Disease 19 - BioMaSOTA - Genetic factors and longitudinal monitoring of the immune response in COVID-19* (Kennung 20-1295, Universität zu Köln) und *Improving Diagnosis of Severe Infections of Immunocompromised Patients* (Kennung 08-160, Universität zu Köln) aufgenommen (Bacher et al. 2020). Bei einem Großteil der Patienten lag der Beginn der COVID-19 Erkrankung, diagnostiziert durch einen positiven RT-PCR Test auf SARS-CoV-2, bereits mehrere Wochen in der Vergangenheit. Die NMR-spektroskopisch analysierte Serumprobe wurde entsprechend an einem Zeitpunkt deutlich nach der akuten Krankheitsphase abgenommen. Diese Patienten wurden als sogenannte post-COVID-19 Patienten eingestuft (Abbildung 4-6).

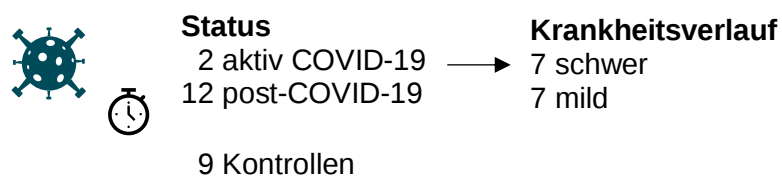


Abbildung 4-6. Schematischer Aufbau der Studie zur NMR-spektroskopischen Analyse von Serumproben von Patienten mit verschiedenen Schweregraden einer COVID-19 Erkrankung. Neben wenigen aktiven Fällen wurden sogenannte post-COVID-19 Patienten analysiert, deren positiver SARS-CoV-2 Test bereits weit in der Vergangenheit lag und die akute Krankheitsphase entsprechend beendet war.

In Tabelle 4-7 sind ausgewählte Metadaten der Studie aufgelistet. Die COVID-19 Patienten wurden entsprechend des Schweregrades der Erkrankung in schwere ($WHO \geq 4$) und milde ($WHO < 4$) Fälle eingeteilt. Bei den schweren COVID-19 Erkrankungen wurde weiterhin eine Unterteilung in aktive und post-COVID-19 gemacht. Bei den milden Erkrankungen wurden lediglich post-COVID-19 Patienten und keine aktiven Fälle analysiert, sodass diese Unterteilung nicht vorgenommen wurde.

Tabelle 4-7: Metadaten der aktiv- und post-COVID-19 Patienten mit verschiedenen Schweregraden der Erkrankung. Darstellung ausgewählter Parameter wie Geschlecht, Alter und Zeitraum nach positivem Test auf SARS-CoV-2 mittels Reverser Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR). Die Patienten wurden entsprechend des Schweregrades der Erkrankung (schwer/mild) und dem Status der Erkrankung (aktiv/post) weiter differenziert.

		Anzahl	Geschlecht		Alter [Jahre]	Positiver SARS-CoV-2 RT-PCR
			♀	♂		[Tage]
COVID-19	gesamt	14	6 (43%)	8 (57%)	49,8 ± 16,4	31,1 ± 15,6
schwer	gesamt	7	4 (57%)	3 (43%)	60,3 ± 10,2	27,3 ± 17,6
	aktiv	2	1 (50%)	1 (50%)	59,0 ± 12,7	6,0 ± 5,7
	post	5	3 (60%)	2 (40%)	60,8 ± 10,6	35,8 ± 11,9
mild	gesamt	7	2 (29%)	5 (71%)	39,3 ± 15,0	35,5 ± 12,8
Kontrollen	gesamt	9	3 (33%)	6 (66%)	32,4 ± 7,1	-

4.6.4 Impfstudie

Für die Entnahme und Untersuchung der Blut- und Speichelproben der Impfkohorte liegt eine schriftliche informierte Einwilligung unter dem Aktenzeichen 20-123 vor, welche von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck am 09. April 2020 genehmigt wurde. Ein Erweiterungsantrag wurde am 04. Mai 2020 genehmigt (Lixenfeld et al. 2021). Um den Einfluss einer SARS-CoV-2 Impfung auf das Metabolom zu untersuchen, wurden Serumproben vor und nach einer Impfung mit dem mRNA-Impfstoff Comirnaty® von BioNTech und Spikevax® der Firma Moderna Biotech sowie mit dem Vektorimpfstoff Vaxzevria® der Firma AstraZeneca mittels IVDr Verfahren analysiert. Insgesamt wurden 276 longitudinale Proben untersucht, davon 131 von BioNTech, 32 von Moderna Biotech und 113 von AstraZeneca (Abbildung 4-7).

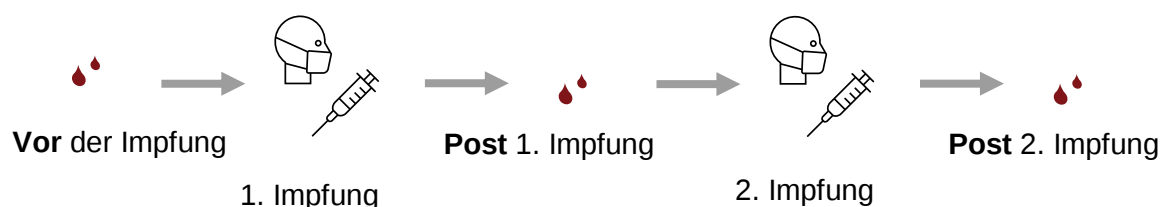


Abbildung 4-7: Schematischer Aufbau der Impfstudie. Dabei wurde Blut vor einer Impfung mit den Vakzinen der Firmen BioNTech, Moderna Biotech und AstraZeneca nach einer ersten Impfung und nach der zweiten Impfung abgenommen.

Die Metadaten dieser Studienprobanden sind in Tabelle 4-8 aufgeführt.

Tabelle 4-8: Metadaten der Impfstudie. Darstellung ausgewählter Parameter der Impfstudie wie Geschlecht und Alter.

	Anzahl	Geschlecht			Alter [Jahre]
		♀	♂	unbekannt	
AstraZeneca	15	10 (67%)	4 (27%)	1 (6,7%)	32,9 ± 12,0
BioNTech	29	15 (52%)	14 (48%)	-	36,6 ± 9,6
Moderna Biotech	9	5 (56%)	4 (44%)	-	29,1 ± 10,6

4.7 Datenprozessierung und statistische Auswertung

Die Prozessierung der NMR-Spektren erfolgte mithilfe der Software TopSpin™ (Bruker) sowie Matlab (TheMathworks) und MetaboLab (Günther et al. 2000; Ludwig & Günther 2011). Für die statistische Auswertung wurden Excel 2016 (Microsoft Corp.), Matlab (TheMathworks), PLS Toolbox (Eigenvector Research, Inc.) und GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) verwendet (siehe 8.1.4).

4.7.1 Lageparameter

Lageparameter werden in der deskriptiven Statistik angewendet, um die Verteilungen eines Datensatzes oder einer Stichprobe durch verschiedene Kennzahlen zu beschreiben.

Der arithmetische Mittelwert $\bar{x}$, welcher umgangssprachlich als Durchschnitt bezeichnet wird, gibt das Zentrum der Verteilung der Daten wieder. Für die Berechnung wird der Quotient der Summe der Stichprobenwerte ($x_1 + \dots + x_n$) durch deren Anzahl n gebildet (Ritgen 2019).

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Der arithmetische Mittelwert wird allerdings durch Extremwerte stark beeinflusst. Daher wird häufig der Median, welcher auch Zentralwert genannt wird, als robuster Parameter gegenüber Ausreißern betrachtet. Der Median $\tilde{x}$ teilt den geordneten Datensatz mit der Anzahl n in zwei gleichgroße Teile (Handl 2010).

$$\tilde{x} = x_{\left(\frac{n+1}{2}\right)} \quad n = \text{gerade}$$

$$\tilde{x} = \frac{1}{2} (x_{\left(\frac{n}{2}\right)} + x_{\left(\frac{n}{2}+1\right)}) \quad n = \text{ungerade}$$

Um die Verteilung der Daten um das Zentrum zu beschreiben, wird die Standardabweichung einer Stichprobe s sowie deren Varianz s^2 betrachtet. Die Standardabweichung s ist die Quadratwurzel der Varianz. Für die Berechnung von s^2 wird

für jeden Einzelwert x_i die Abweichung vom Mittelwert $\bar{x}$ addiert, quadriert und durch die Probenanzahl ($n - 1$) dividiert (Ritgen 2020).

$$s^2 = \frac{1}{n-1} [(x_1 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2] = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Das Konfidenzintervall KI beschreibt den Wertebereich, in dem der wahre Wert eines Parameters mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit liegt. Diese Wahrscheinlichkeit wird im sogenannte Konfidenzniveau festgelegt und liegt typischerweise bei 95%. Für den Mittelwert $\bar{x}$ berechnet sich KI aus dem Konfidenzniveau z sowie des Quotienten der Standardabweichung s der Population und der Anzahl n (Ritgen 2020).

$$KI = \bar{x} \pm z \frac{s}{\sqrt{n}}$$

4.7.2 Absoluter, relativer und prozentualer Fehler

Der absolute Fehler gibt den Wert zwischen einem experimentellen Messwert x_i und dem tatsächlichen Wert x an. Der Quotient aus dem absoluten Fehler und dem tatsächlichen Wert wird als relativer Fehler x_{rel} bezeichnet. Der relative Fehler in Prozent ist der prozentuale Fehler (Jiménez et al. 2018).

$$x_{rel} = \frac{x_i - x}{x}$$

4.7.3 Korrelationskoeffizienten und Bestimmtheitsmaß

Korrelationskoeffizienten R sind ein Maß für den Zusammenhang zwischen mindestens zwei Parametern. Die Korrelationskoeffizienten als Maß für die Stärke der Korrelation nehmen Werte zwischen -1 (negative Korrelation) und 1 (positive Korrelation) an. Bei einem Wert von null besteht kein linearer Zusammenhang zwischen den Daten.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen intervallskalierten Parametern. Das Quadrat dieses Korrelationskoeffizienten stellt das Bestimmtheitsmaß R^2 dar. Für den Korrelationskoeffizienten nach Pearson wird der Zusammenhang der Messwerte x_i und y_i in Abhängigkeit von ihren Mittelwerten $\bar{x}$ und $\bar{y}$ entsprechend der folgenden Gleichung berechnet (Fahrmeir et al. 2016).

Pearson:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman wird auch als Rangkorrelationskoeffizient bezeichnet. Anders als der Korrelationskoeffizient nach Pearson wird bei dem Rangkorrelationskoeffizienten kein linearer Zusammenhang zwischen den Parametern

vorausgesetzt. Der Zusammenhang zwischen den Parametern wird anhand ihrer Ränge r_{x_i} und r_{y_i} und nicht anhand ihrer tatsächlichen Messwerte berechnet. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman ist entsprechend robust gegenüber Ausreißern (Fahrmeir et al. 2016).

Spearman:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (r_{x_i} - \bar{r}_x) \cdot (r_{y_i} - \bar{r}_y)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (r_{x_i} - \bar{r}_x)^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (r_{y_i} - \bar{r}_y)^2}}$$

4.7.4 Lineare Regression

Die lineare Regression stellt die Abhängigkeit zweier Variablen über das Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate in einen linearen Zusammenhang, woraus eine Regressionsgerade resultiert. Der vorhergesagte Wert für das Kriterium y_i für den Messwert x_i berechnet sich dabei aus dem Produkt der Steigung der Regressionsgeraden m und dem i -ten Messwert auf den Prädiktor x_i in Addition mit dem y -Achsenabschnitt der Regressionsgeraden b (Ritgen 2020).

$$y_i = m \cdot x_i + b$$

4.7.5 t-Test und multipler t-Test

Bei einem t-Test werden die Mittelwerte zweier Stichproben verglichen. Im Wesentlichen wird die Differenz der Mittelwerte in Relation zum Standardfehler (Streuung) gesetzt. Bei einer kleinen Streuung der Daten und einer ausreichend großen Differenz der Mittelwerte wird davon ausgegangen, dass sich beide Stichproben unterscheiden. Bei einer großen Streuung der Daten ist es wahrscheinlich, dass die Unterschiede der Gruppenmittelwerte zufälliger Natur sind. Generell wird zwischen unabhängigen (ungepaarten) oder abhängigen (gepaarten) Gruppen differenziert (Abbildung 4-8) (DATAtab Team 2022).

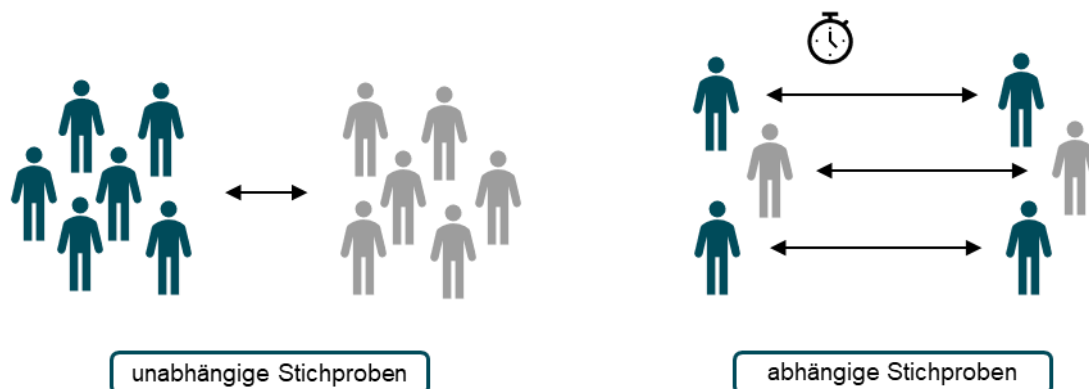


Abbildung 4-8: Unterschied zwischen unabhängigen (ungepaarten) und abhängigen (gepaarten) Stichproben (DATAtab Team 2022).

Während bei unabhängigen Gruppen der Unterschied zwischen zwei Kohorten verglichen wird, wird bei einem gepaarten t-Test der Unterschied innerhalb einer Gruppe zwischen zwei verschiedenen Zeitpunkten betrachtet (DATAtab Team 2022).

Im nächsten Schritt wird eine Nullhypothese und eine Alternativhypothese in Bezug auf die untersuchte Fragestellung formuliert. Während die Nullhypothese eine mögliche, aber noch nicht bewiesene Annahme der Realität darstellt, drückt die Alternativhypothese das Gegenteil aus. Ob eine Hypothese Bestand hat oder abzulehnen ist, wird mithilfe eines definierten Signifikanzniveaus α und dem Vergleich des p-Wertes bestimmt. Generell gilt $\alpha < 0,05$ als signifikant (DATAtab Team 2022).

Sofern mehrere Hypothesen gleichzeitig getestet werden, wird eine Korrektur für multiples Testen angenommen. Da die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art (α -Fehler), das heißt falsch-positive Ergebnisse, bei multiplen Testproblemen kumulativ zunimmt, muss der p-Wert korrigiert werden. Hierfür wurde das Verfahren von Benjamini, Krieger und Yekutieli gewählt, welches die Falscherkennungsrate (engl. *false discovery rate*, FDR) entsprechend kontrolliert (Benjamini et al. 2006).

4.7.6 Multivariate Analysen

Für die PCA wurden die Daten entsprechend der Varianzen skaliert und mittenzentriert. Bei der PLS-DA wurde zudem eine orthogonale Signalkorrektur (engl. *orthogonal signal correction*, OSC) durchgeführt. Für die Kreuzvalidierung wurden *venetian blinds* angewendet. Die Bewertung der Güte des Modells erfolgte über die Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve (engl. *area under the receiver operating characteristic*, AUROC). ASCA wurde unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit und der Zeitpunkte der Probenahme durchgeführt (siehe 2.5).

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Methodische Betrachtung des *in-vitro diagnostic research* Protokolls

Die IVDr Plattform ermöglicht eine NMR-basierte Screeningmethode unter anderem für die Analyse von Blutproben. Dabei werden mit der Methode B.I.QUANT-PS 2.0 41 Parameter im Bereich der Metaboliten automatisch identifiziert und quantifiziert (Bruker BioSpin 2019). In diesem Zusammenhang wurden einige prä- und postanalytische Fragestellungen untersucht, um kritische Parameter sowie möglich Einflussfaktoren einschätzen zu können. Diese Erkenntnisse sind wichtig, um die Ergebnisse klinischer Studien adäquat einordnen und bewerten zu können.

5.1.1 Metaboliten im *in-vitro diagnostic research* Protokoll

5.1.1.1 Betrachtung ausgewählter Standardsubstanzen

Um ein tiefgründiges Verständnis über die Funktionsweise der automatisierten Routine, der entsprechenden Identifizierung und Quantifizierung einzelner Metaboliten zu erhalten, wurde zunächst eine Mischung verschiedener Standardsubstanzen mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Das 1D ^1H NOESY-Spektrum von 25 ausgewählten Metaboliten, die routinemäßig im IVDr Protokoll quantifiziert werden, ist in Abbildung 5-1 dargestellt. Zudem wurden 600 MHz 1D ^1H NOESY-Spektren der Einzelsubstanzen aufgenommen (Spektren nicht gezeigt). Die Zuordnung der einzelnen Signale der Mischung erfolgte dabei vorwiegend durch Betrachtung der Signale in den jeweiligen Spektren der Einzelsubstanzen. Weiterhin wurde die Software Chenomx und die freizugängliche Online-Datenbank *The Human Metabolome Database* (HMDB) für die Identifizierung der NMR-Signale in dem Multistandard verwendet (Wishart et al. 2007, 2009, 2013, 2018). Die charakteristischen Signale wurden numerisch den einzelnen Metaboliten zugeordnet.

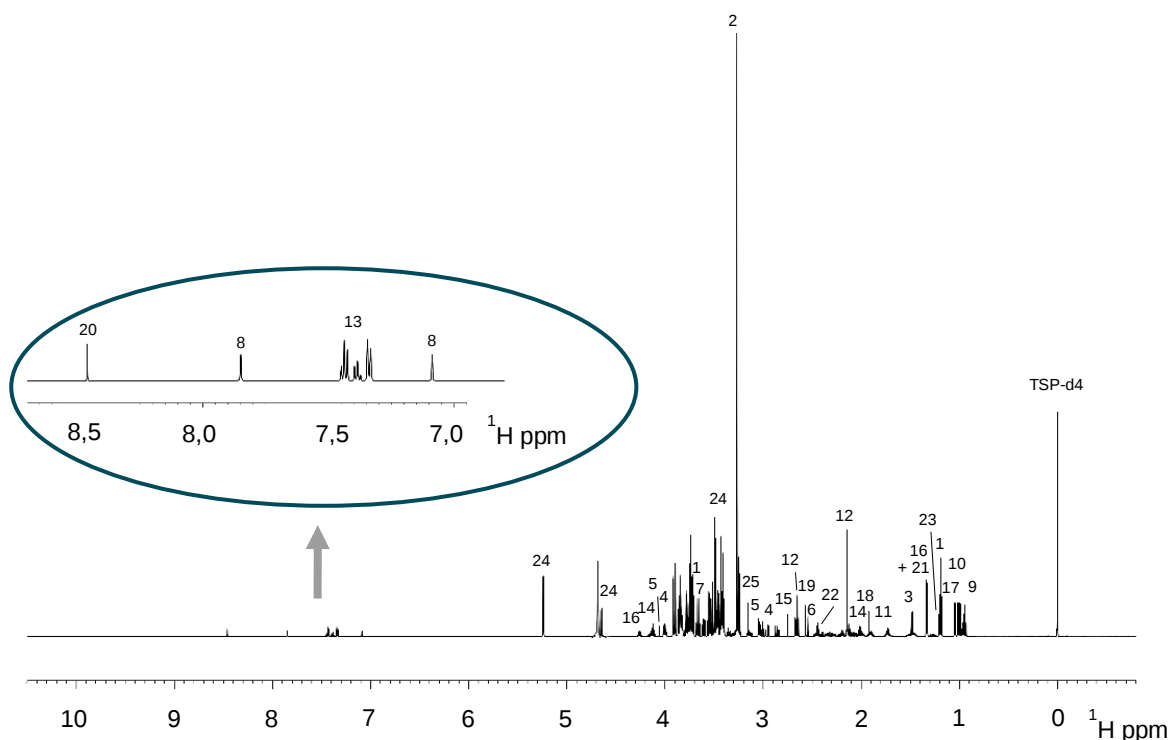


Abbildung 5-1: 600 MHz 1D ^1H NOESY-Spektrum des Multistandards. Ausgewählte Signale typischer Metaboliten, die im IVDr-Protokoll mittels B.I.QUANT-PS 2.0 in Blutproben analysiert werden, sind numerisch markiert. Ethanol (1), Trimethylamine-N-oxide (2), Alanine (3), Asparagine (4), Creatinine (5), Glutamine (6), Glycine (7), Histidine (8), Isoleucine (9), Leucine (10), Lysine (11), Methionine (12), Phenylalanine (13), Proline (14), Sarcosine (15), Threonine (16), Valine (17), Acetic acid (18), Citric acid (19), Formic acid (20), Lactic acid (21), alpha-Ketoglutaric acid (22), 3-Hydroxybutyric acid (23), Glucose (24), Dimethylsulfone (25).

In Tabelle 5-1 sind die chemischen Verschiebungen und Multiplizitäten der zugeordneten Metaboliten aufgelistet. Für die automatische Quantifizierung mittels B.I.QUANT-PS 2.0 wird pro Metabolit das Integral eines charakteristischen Signals im 1D ^1H NOESY-Spektrum herangezogen und in den Ergebnisreports gekennzeichnet. Das entsprechende Signal ist in Tabelle 5-1 hervorgehoben.

Tabelle 5-1: Darstellung der im Multistandard betrachteten Metaboliten im 1D ^1H NOESY-Spektrum mit den zugehörigen chemischen Verschiebungen und Multiplizitäten der NMR-Signale (s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett-in-Dublett, dt = Dublett-in-Triplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett). Die Signale, die im IVDr-Protokoll mittels B.I.QUANT-PS 2.0 für die Quantifizierung der Metaboliten in Blutproben verwendet werden, sind hervorgehoben (Bruker BioSpin 2019).

Substanzklasse	Substanz	Chemische Verschiebung [ppm] (Multiplizität)
Alkohole	Ethanol	1,17 (t) , 3,65 (q)
Amine	Trimethylamine-N-oxide	3,25 (s)
Aminosäuren und Derivate	Alanine	1,47 (d) , 3,77 (q)
	Asparagine	2,84 (m) , 2,94 (m), 4,00 (dd)
	Creatinine	3,03 (s) , 4,04 (s)

Substanzklasse	Substanz	Chemische Verschiebung [ppm] (Multiplizität)
	Glutamine	2,13 (m), 2,45 (m) , 3,76 (t)
	Glycine	3,55 (s)
	Histidine	3,13 (dd), 3,23 (dd), 3,98 (dd), 7,07 (d) , 7,83 (d)
	Isoleucine	0,93 (t), 1,00 (d) , 1,25 (m), 1,46 (m), 1,97 (m), 3,66 (d)
	Leucine	0,94 (d) , 0,95 (d) , 1,70 (m), 3,72 (m)
	Lysine	1,46 (m), 1,71 (m), 1,89 (m), 3,02 (t) , 3,74 (t)
	Methionine	2,11 (m), 2,13 (s) , 2,19 (m), 2,64 (t), 3,84 (dd)
	Phenylalanine	3,11 (m), 3,28 (m), 3,98 (m), 7,37 (m)
	Proline	2,00 (m), 2,08 (m), 2,34 (m), 3,32 (dt) , 3,41 (m), 4,12 (dd)
	Sarcosine	2,73 (s) , 3,60 (s)
	Threonine	1,32 (d), 3,58 (d), 4,24 (m)
	Valine	0,98 (d), 1,03 (d) , 2,26 (m), 3,60 (d)
Carbonsäuren	Acetic acid	1,90 (s)
	Citric acid	2,54 (d), 2,65 (d)
	Formic acid	8,44 (s)
	Lactic acid	1,32 (d) , 4,10 (q)
Ketonsäuren	alpha-Ketoglutaric acid	2,43 (t), 2,99 (t)
	3-Hydroxybutyric acid	1,19 (d) , 2,30 (dd), 2,39 (dd), 4,14 (m)
Zucker	Glucose	3,23 (dd), 3,40 (m), 3,46 (m), 3,52 (dd), 3,73 (m), 3,82 (m), 3,89 (dd), 4,63 (d), 5,22 (d)
Sulfone	Dimethylsulfone	3,14 (s)

5.1.1.2 Güte und Linearität der Metabolitquantifizierung mittels IVDr

Im Folgenden wird die Güte und Linearität der Quantifizierung für ausgewählte Metaboliten, die mittels IVDr Plattform in Blutproben quantifiziert werden, betrachtet. Ziel ist es, die Qualität der automatischen Quantifizierung zu untersuchen, aber auch mögliche Komplikationen und problematische Aspekte kritisch zu beleuchten. Mithilfe dieser Erkenntnisse können die Ergebnisse weiterer Studien aus der Metabolomics-Forschung besser eingeordnet werden.

Zur Beurteilung der Qualität der Quantifizierung der einzelnen Metaboliten wurde eine Serumprobe mit verschiedenen Volumina des Multistandards dotiert. Dabei wurden Konzentrationen gewählt, die für die Metaboliten in humanen Blutproben typisch sind (Bruker BioSpin 2019; Bruker Corporation 2019). Die dotierten Proben wurden in Mehrfachbestimmung ($n = 7$) gemessen. Pro dotiertem Volumen des Multistandards wurden entsprechend sieben technische Replikate erhalten. Bei der Auswertung der Linearitäten wurden die Konzentrationen der mittels IVDr Protokoll quantifizierten 41 Metaboliten (mit Ausnahme von zwei technischen Additiven) betrachtet. Für die technischen Replikate wurden die Mittelwerte der Rohkonzentrationen r für jeden Metaboliten berechnet. Bei der Rohkonzentration handelt es sich um das Konzentrationsäquivalent zum Flächenintegral im NMR-Spektrum vor dem Abgleich mit dem LOD. Außerdem wurde der Korrelationswert ρ zwischen dem Originalspektrum und dem berechneten Signal betrachtet und ebenfalls der Mittelwert für die technischen Replikate $\bar{\rho}$ für jeden Metaboliten berechnet (siehe 4.3.2.3). Daraus ergab sich die in Tabelle 5-2 aufgeführte Einteilung der Metaboliten für die sieben technischen Replikate in die folgenden vier Gruppen: (A) dotierter Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{\rho} \geq 95\%$), (B) dotierter Metabolit mit mäßigem Fitting $50\% < \bar{\rho} < 95\%$, (C) dotierter Metabolit mit schlechtem Fitting ($\bar{\rho} \leq 50\%$) und (D) nicht dotierter Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{\rho} \geq 95\%$). Für die dotierten Substanzen wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 als Maß für die Güte der zugrundeliegenden Linearität berechnet. Für die nicht dotierten Verbindungen wurde die Reproduzierbarkeit betrachtet. Nicht dotierte Metaboliten mit schlechter Fittingqualität ($\bar{\rho} < 95\%$) wurden bei der Auswertung nicht betrachtet. Weiterhin wurden die sieben technischen Replikate bei der Betrachtung der Linearität R^2 in zwei weitere Untergruppen bezüglich ihrer durchgeführten Basisprozeduren eingeteilt. Unter den Basisprozeduren wurden das Äquilibrieren der Temperatur, die automatische Locking-, Tuning- und Matching- (ATMA unit) sowie Shimmingroutine nach dem Einlassen des Röhrchens in das NMR-Spektrometer zusammengefasst. Einerseits wurden die Replikate für jede Messung erneut in das Spektrometer eingeführt ($n = 3$) und die Basisprozedur individuell vor jedem einzelnen 1D ^1H NOESY-Experiment durchgeführt (individuelle Basisprozedur). Andererseits wurden die Experimente viermal unmittelbar hintereinander aufgenommen, ohne dass das Probenröhrchen zwischen den Messungen aus dem NMR-Spektrometer

genommen wurde ($n = 4$). Entsprechend wurde die Basisprozedur lediglich einmal pro Probe vor der Messsequenz durchgeführt (einmalige Basisprozedur).

Tabelle 5-2: Güteinteilung der mittels IVDr B.I.QUANT-PS 2.0 identifizierten und quantifizierten Metaboliten. Folgende Gruppen wurden hinsichtlich der Dotierung und Fittingqualität für die sieben technischen Replikate gewählt: (A) dotierter Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$), (B) dotierter Metabolit mit mäßigem Fitting $50\% < \bar{p} < 95\%$, (C) dotierter Metabolit mit schlechtem Fitting ($\bar{p} \leq 50\%$) und (D) nicht dotierter Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$). Für diese Substanzen wurde die Linearität über das Bestimmtheitsmaß R^2 betrachtet. Für nicht dotierte Metaboliten wurde R^2 bei der Auswertung nicht bestimmt. Weiterhin wurden die sieben technischen Replikate in zwei Untergruppen aufgeteilt. Einerseits wurden die NMR-Tubes für jedes Experiment erneut in das NMR-Spektrometer geladen, äquilibriert und eine Locking-, Tuning- und Matching- sowie Shimmingroutine durchgeführt (individuelle Basisprozedur, $n = 3$). Andererseits wurden die 1D ^1H NOESY-Experimente durchgeführt, ohne dass das NMR-Röhrchen zwischen den Messungen aus dem Magneten genommen wurde (einmalige Basisprozedur, $n = 4$).

Gruppe	Substanzklasse	Substanz	Linearität R^2		
			$n = 7$	$n = 3$	$n = 4$
A	Amine	Trimethylamine-N-oxide	0,9898	0,9941	0,9905
	Aminosäuren und Derivate	Alanine	0,7977	0,8370	0,8417
		Creatinine	0,9367	0,9681	0,9267
		Glutamine	0,9169	0,9377	0,9411
		Glycine	0,9055	0,9431	0,8851
		Histidine	0,9619	0,9621	0,9628
		Isoleucine	0,9089	0,9090	0,9181
		Leucine	0,5690	0,4847	0,6452
		Phenylalanine	0,9422	0,9501	0,9426
		Valine	0,8101	0,8206	0,8117
	Carbonsäuren	Acetic acid	0,9884	0,9920	0,9877
		Formic acid	0,9771	0,9808	0,9760
		Lactic acid	0,8983	0,8896	0,9086
	Zucker	Glucose	0,9948	0,9970	0,9956
	Sulfone	Dimethylsulfone	0,9838	0,9888	0,9829
B	Alkohole	Ethanol	0,9871	0,9805	0,9924
	Aminosäuren und Derivate	Asparagine	0,9423	0,9679	0,9498
		Lysine*	0,6571	0,6840	0,6529

Gruppe	Substanzklasse	Substanz	Linearität R^2		
			n = 7	n = 3	n = 4
C		Methionine	0,9901	0,9859	0,9945
		Proline	0,6519	0,7009	0,6217
		Sarcosine	0,9786	0,9820	0,9779
	Carbonsäuren	Citric acid	0,5270	0,9415	0,4421
	Ketonsäuren	3-Hydroxybutyric acid	0,5195	0,5699	0,4840
	Aminosäuren und Derivate	Threonine	0,9042	0,9259	0,9027
		D-Galactose	0,7210	0,7032	0,7344
	Aminosäuren und Derivate	Creatine	-	-	-
		Tyrosine	-	-	-
	Ketonsäuren	Acetone	-	-	-
		Pyruvic acid	-	-	-
Nicht dotiert, schlechtes Fitting	Aminosäuren und Derivate	2-Aminobutyric acid	-	-	-
		Glutamic acid	-	-	-
		N.N-Dimethylglycine	-	-	-
		Ornithine	-	-	-
	Carbonsäuren	2-Hydroxybutyric acid	-	-	-
		Succinic acid	-	-	-
	Vitamine	Choline	-	-	-
	Ketonsäuren	2-Oxoglutaric acid	-	-	-
		Acetoacetic acid	-	-	-

* ohne Ausreißer

Zunächst wurde deutlich, dass die Linearitäten R^2 für jeden Metaboliten zwischen den sieben technischen Replikaten und deren Kategorisierung in die beiden Untergruppen individuelle sowie einmalige Basisprozedur vergleichbar waren. Das bedeutet, dass die Messung weitestgehend unabhängig dem Äquilibrieren der Temperatur und der

automatische Locking-, Tuning- und Matching- (ATMA unit) sowie Shimmingroutine war und die Qualität und Reproduzierbarkeit dieser entsprechend hoch war. Lediglich für Citric acid war das Bestimmtheitsmaß bei den Experimenten mit individueller Basisprozedur ($R^2 = 0,9415$) im Vergleich zu jenen mit einmaliger Basisprozedur ($R^2 = 0,4421$) höher. Möglicherweise war die einmalige Basisprozedur bei einer Probe nicht optimal, sodass es hier zu Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung gekommen war. Aufgrund der dennoch hohen Vergleichbarkeit wurden im Folgenden die sieben technischen Replikate zusammen betrachtet und die Differenzierung hinsichtlich der Basisprozedur nicht im Detail untersucht. Die Mittelwerte der Rohkonzentrationen r der technischen Replikate wurden für jeden Metaboliten in Abhängigkeit des Volumens des dotierten Multistandards in einem kartesischen Koordinatensystem aufgetragen und das LOD der einzelnen Metaboliten durch eine gestrichelte Horizontale gekennzeichnet. In Abbildung 5-2 sind die Metaboliten aus Gruppe (A) dotierter Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$) dargestellt. Insgesamt wurden von den dotierten Metaboliten 15 Substanzen identifiziert, die im IVDr Report ein gutes Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$) zeigten.

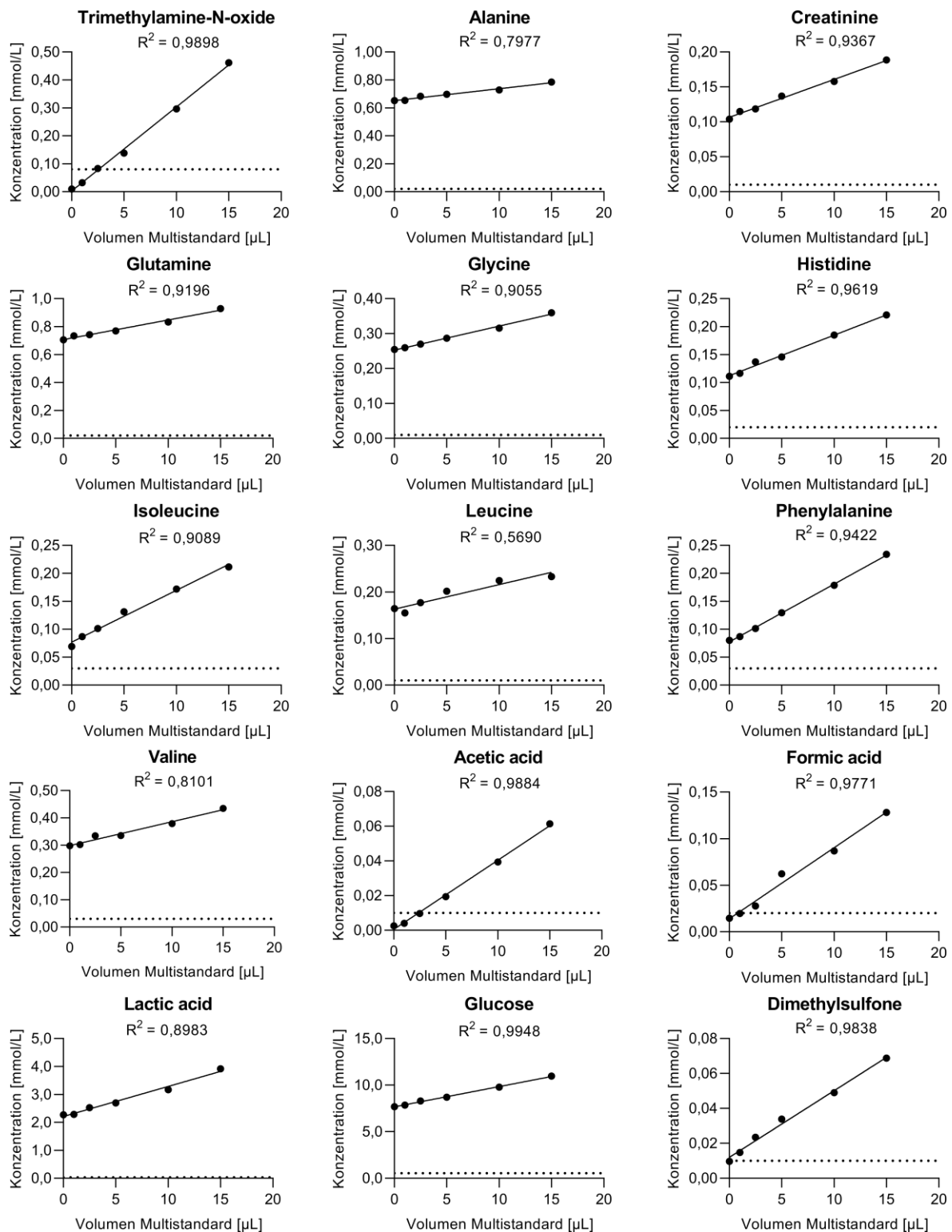


Abbildung 5-2: Gruppe (A) dotierter Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$). Graphische Auftragung der Konzentrationen der Metaboliten aus der Gruppe (A) dotierter Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$) in Abhängigkeit des Volumens des dotierten Multistandards. Zuvor wurde der Mittelwert der sieben technischen Replikate für jede der sechs Konzentrationen berechnet. Weiterhin ist die Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*, LOD) als gestrichelte Horizontale eingezeichnet und das Bestimmtheitsmaß R^2 für jeden Metaboliten als Maß für die Linearität angegeben.

Für die dotierten Metaboliten, deren mittels IVDr bestimmte Konzentrationen ein gutes Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$) aufweisen, sind hohe Bestimmtheitsmaße R^2 angesichts der Dotierungen zu erwarten. Für Trimethylamine-N-oxid, Histidine, Acetic acid, Formic acid, Glucose und

Dimethylsulfone wurden sehr gute Bestimmtheitsmaße von $R^2 \geq 0,95$ berechnet. Bestimmtheitsmaße von $R^2 > 0,90$ wurden zudem für die Metaboliten Creatinine, Glutamine, Glycine, Isoleucine und Phenylalanine bestimmt. Alanine, Valine und Lactic acid zeigten Bestimmtheitsmaße von $R^2 \geq 0,80$. Lediglich für Leucine wurde ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 < 0,80$ berechnet.

In Abbildung 5-3 sind analog die acht dotierten Metaboliten dargestellt, die zuvor in Gruppe (B) dotierter Metabolit mit mäßigem Fitting $50\% < \bar{p} < 95\%$ eingeordnet wurden. Aufgrund der geringeren Qualität des Fittings der in dieser Kategorie aufgeführten Metaboliten sind kleinere Bestimmtheitsmaße R^2 in Bezug auf die Linearität des dotierten Multistandards zu erwarten.

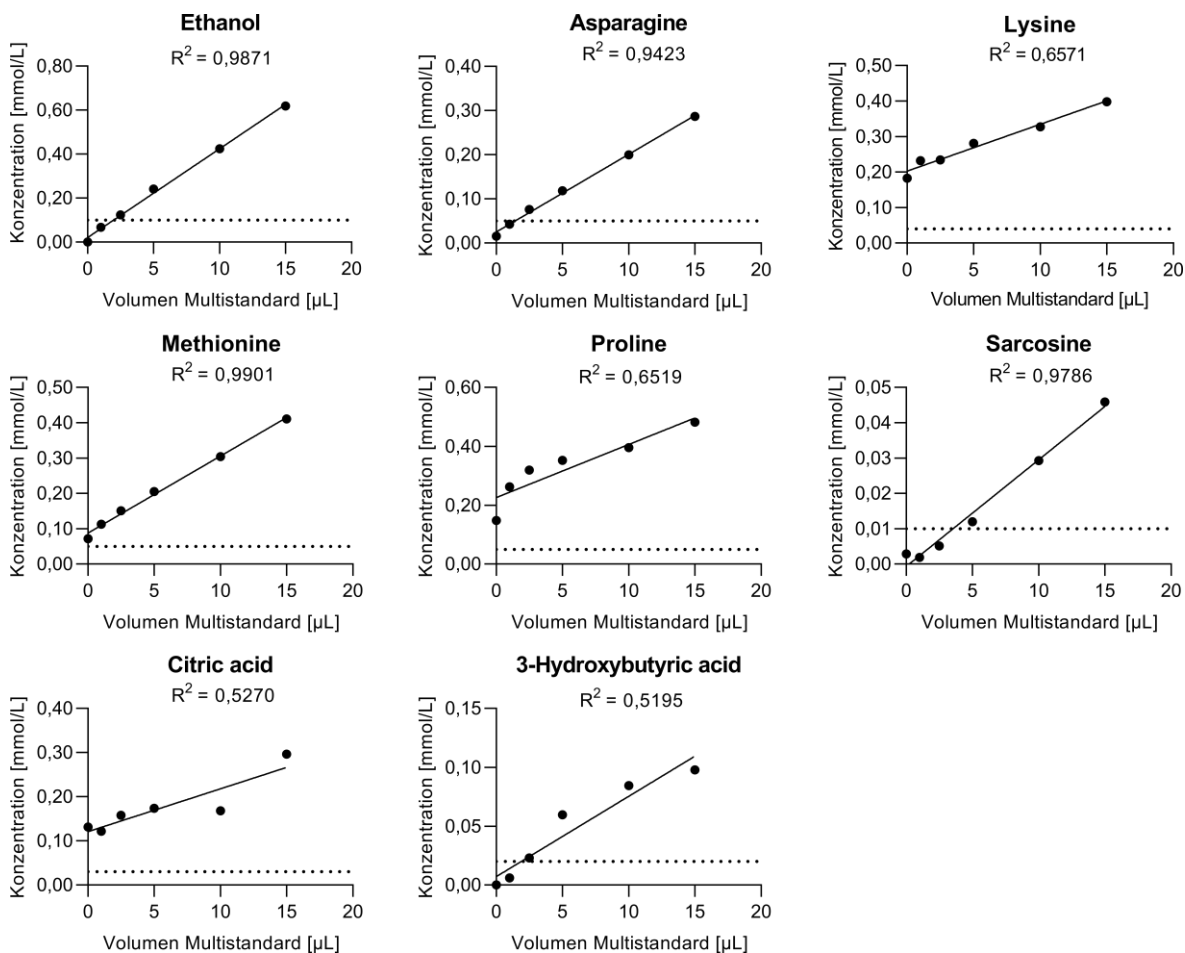


Abbildung 5-3: Gruppe (B) dotierter Metabolit mit mäßigem Fitting ($50\% < \bar{p} < 95\%$). Graphische Auftragung der Konzentrationen der Metaboliten aus der Gruppe (B) dotierter Metabolit mit mäßigem Fitting $50\% < \bar{p} < 95\%$ in Abhängigkeit des Volumens des dotierten Multistandards. Zuvor wurde der Mittelwert der sieben technischen Replikate für jeden der sechs Messpunkte berechnet. Weiterhin ist die Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*, LOD) als gestrichelte Horizontale eingezeichnet und das Bestimmtheitsmaß R^2 für jeden Metaboliten als Maß für die Linearität angegeben.

Gute Bestimmtheitsmaße von $R^2 \geq 0,90$ wurden trotz mäßiger Fittingqualität ($50\% < \bar{p} < 95\%$) für die Substanzen Ethanol, Asparagine, Methionine und Sarcosine berechnet. Für Lysine, Proline, Citric acid und 3-Hydroxybutyric acid wurden weiterhin Bestimmtheitsmaße von $R^2 \geq 0,50$ bestimmt. Trotz dotiertem Volumen des Multistandards von 10 µL und 15 µL wurde in einigen Replikaten Lysine aus ungeklärter Ursache nicht

detektiert. Bei der Analyse von Lysine wurden diese Replikate dementsprechend als Ausreißer klassifiziert und bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

In die Gruppe (C) dotierter Metabolit mit schlechtem Fitting ($\bar{p} \leq 50\%$) wurden die Aminosäure Threonine und der Zucker D-Galactose eingeordnet. Die graphische Darstellung der mittleren Rohkonzentration in Abhängigkeit vom Volumen des Multistandards ist für die beiden Metaboliten in Abbildung 5-4 gezeigt.

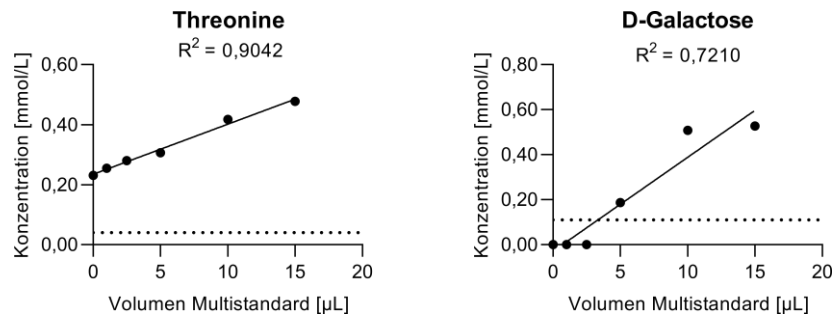


Abbildung 5-4: Gruppe (C) dotierter Metabolit mit schlechtem Fitting ($\bar{p} \leq 50\%$). Graphische Auftragung der Konzentrationen der Metaboliten aus der Gruppe (C) dotierter Metabolit mit schlechtem Fitting ($\bar{p} \leq 50\%$) in Abhängigkeit des Volumens des dotierten Multistandards. Zuvor wurde der Mittelwert der sieben technischen Replikate für jede der sechs Konzentrationen berechnet. Weiterhin ist die Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*, LOD) als gestrichelte Horizontale eingezeichnet und das Bestimmtheitsmaß R^2 für jeden Metaboliten als Maß für die Linearität berechnet.

Obwohl für die Metaboliten der Gruppe (C) lediglich eine schlechte Qualität des Fittings ($\bar{p} \leq 50\%$) bestimmt wurde, zeigte insbesondere Threonine eine gute Linearität mit $R^2 = 0,9042$. Für die meisten Metaboliten wurden im IVDr Report Rohkonzentrationen auch unterhalb des LOD angegeben. Für D-Galactose hingegen lagen die angegebenen Rohkonzentrationen unterhalb des LOD stets bei $r = 0,000$ mmol/L. Entsprechend war eine Beurteilung der Linearität bei D-Galactose erst oberhalb des LOD möglich.

Abschließend werden die Metaboliten betrachtet, die nicht dotiert wurden, aber trotzdem ein gutes Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$) zeigten. Dieser Gruppe (D) wurden die Aminosäuren und Derivate Creatine und Tyrosine sowie die Ketonsäuren Acetone und Pyruvic acid zugeordnet. Da es sich hierbei um Substanzen handelt, die nicht dotiert wurden, wurde nicht die Linearität über das Bestimmtheitsmaß R^2 betrachtet, sondern die Reproduzierbarkeit über die Mehrfachmessungen ($n = 7$). Der Mittelwert der mittels IVDr bestimmten Rohkonzentrationen wurde für die technischen Replikate berechnet und in Abhängigkeit von der Messung aufgetragen (Abbildung 5-5). Bei einer stabilen und reproduzierbaren Metabolitkonzentration ergibt sich eine horizontale Gerade.

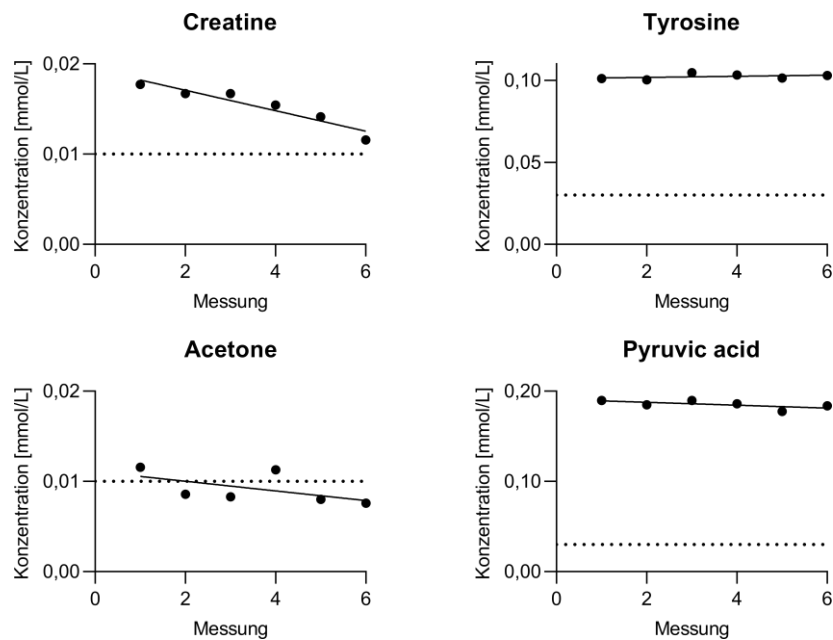


Abbildung 5-5: Gruppe (D) nicht dotierter Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$). Graphische Auftragung der Konzentrationen der Metaboliten aus der Gruppe (D) nicht dotierter Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$) in Abhängigkeit von der Messung. Zuvor wurde der Mittelwert der sieben technischen Replikate für jeden der sechs Messpunkte berechnet. Weiterhin ist die Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*, LOD) als gestrichelte Horizontale eingezeichnet.

Für Tyrosine und Pyruvic acid zeigten sich horizontale Geraden, welche auf eine stabile und reproduzierbare Quantifizierung schließen lässt. Die geplotteten Geraden für Creatine und Acetone hatten negative Steigungen. Creatine zeigte eine Gerade mit über die Zeit kontinuierlich leicht abnehmender Tendenz. Möglicherweise ist Creatine nicht ausreichend stabil und wird zu Creatinine abgebaut. Dies würde aber auch bedeuten, dass die gemessene Creatinine-Konzentration über die Zeit stetig ansteigt und die zuvor beschriebene Linearität bei Creatinine ein Artefakt aus dotierter Standardsubstanz und dem Abbau von Creatine ist. Für Acetone waren die gemessenen Konzentrationen hingegen nicht kontinuierlich abnehmend. Entsprechende Schwankungen bei Acetone sind dadurch erklärbar, dass die gemessenen Konzentrationen um das LOD von 0,01 mmol/L lagen und erst oberhalb des LOD eine gesicherte Identifizierung möglich ist sowie diese Verbindung sehr flüchtig ist.

5.1.2 Reproduzierbarkeit

Die NMR-Spektroskopie gilt als sehr reproduzierbare Technologie innerhalb der Metabolomics-Forschung (Karu et al. 2018). Um die Reproduzierbarkeit des standardisierten IVDr Protokolls hinsichtlich der Probenpräparation und Messung zu untersuchen, wurden drei Extraktionsreplikate und drei technische Replikate einer Serumprobe analysiert. In Abbildung 5-6 sind die mittels IVDr Protokoll bestimmten Konzentrationen sowie die 95%-Konfidenzintervalle ausgewählter Metaboliten für die Extraktionsreplikate und die technischen Replikate dargestellt. Dabei werden Metaboliten betrachtet, die im IVDr Report ein gutes Fitting ($\bar{p} \geq 95\%$) aufwiesen (siehe 4.3.2.3).

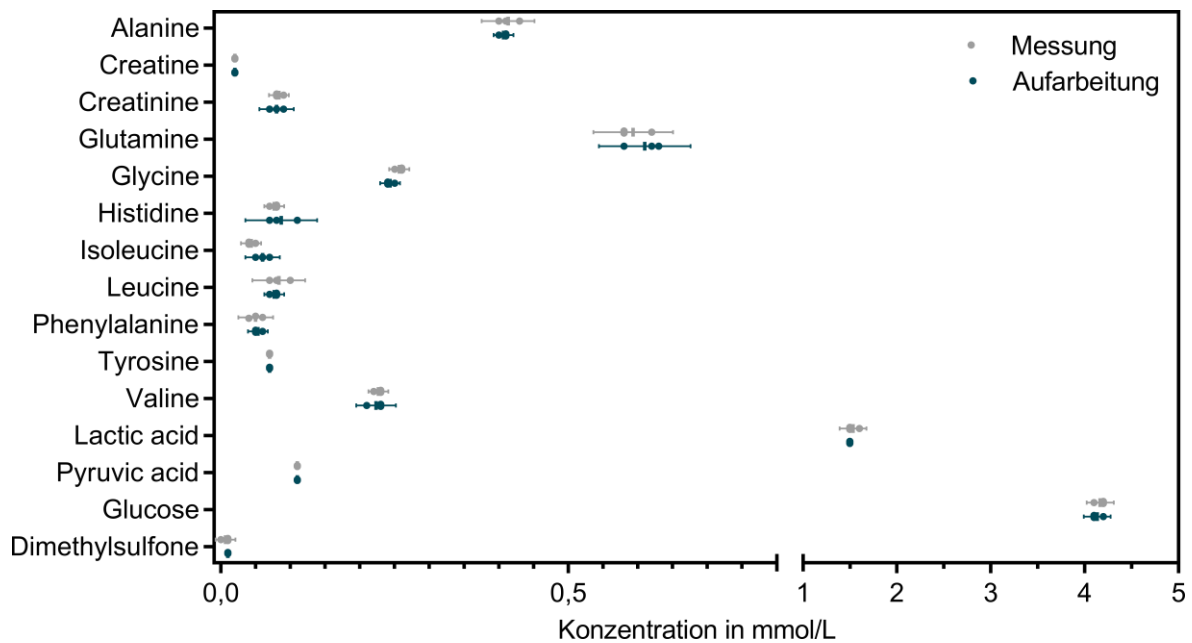


Abbildung 5-6: Reproduzierbarkeit der NMR-spektroskopischen Analyse. Auftragung der Konzentrationen sowie deren 95%-Konfidenzintervalle ausgewählter Metaboliten bei einer Mehrfachbestimmung ($n = 3$). Die technischen Replikate sind in einem grauen und die Extraktionsreplikate in einem blauen Farbton dargestellt.

Die gemessenen Konzentrationen der Replikate lagen sowohl für die betrachteten Metaboliten als auch für die Lipoproteine (Daten der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt) innerhalb des 95%-Konfidenzintervalls. Die äußerst reproduzierbare Quantifizierung der Lipoproteine wurde zudem auch in multizentrischen Studien sowie Ringversuchen gezeigt (Jiménez et al. 2018; Monsonis Centelles et al. 2017). Für die in Abbildung 5-6 gezeigten Metaboliten waren die auf Basis der Replikate berechneten 95%-Konfidenzintervalle unterschiedlich groß. Für Alanine und Leucine waren die 95%-Konfidenzintervalle für die technischen Replikate im Vergleich zu den anderen aufgeführten Metaboliten geringfügig größer. Ähnliches galt für die Extraktionsreplikate des Metaboliten Histidine. Bei Glutamine waren die Spannbreiten der 95%-Konfidenzintervalle sowohl für die technischen Replikate als auch für die Extraktionsreplikate im Vergleich zu anderen Metaboliten etwas größer. Zusammenfassend waren die mittels IVDr Protokoll bestimmten Konzentrationen für die technischen Replikate und die Extraktionsreplikate vergleichbar und Schwankungen zeigten sich nur innerhalb tolerierbarer Spannbreiten. Die Probenpräparation und die NMR-spektroskopische Messung war entsprechend reproduzierbar und stabil.

5.1.3 Anzahl der Scans

Durch die Anwendung des IVDr Verfahrens werden Serum- oder Plasmaproben mittels NMR-Spektroskopie in Automation analysiert. Dabei ist die Analyse in NMR-Röhrchen mit einem Durchmesser von 3 mm oder 5 mm möglich. Standardmäßig werden die biologischen Proben in NMR-Tubes mit einem Durchmesser von 5 mm analysiert. Die Messung in NMR-Tubes mit einem Durchmesser von 3 mm ermöglicht allerdings die Untersuchung von geringeren Probenvolumina (Dona et al. 2014; Lodge, Nitschke, Loo, et

al. 2021). Dies ist insbesondere bei multizentrischen und interdisziplinären Studien von besonderem Interesse, sofern für die einzelnen Untersuchungen nur ein geringes Probenvolumen zur Verfügung steht. Eine Studie der Arbeitsgruppe von Jeremy K. Nicholson beschäftigt sich mit der Vergleichbarkeit und Routinetauglichkeit der NMR-spektroskopischen Analyse bei einer Messung in Röhrchen mit einem Durchmesser von 3 mm oder 5 mm. Zusammenfassend wurde eine gute Vergleichbarkeit der Messungen festgestellt. Allerdings wurde aufgrund des geringeren Probenvolumens bei gleicher Probenkonzentration ein Verlust der Sensitivität, der Proportionalität und des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bei der Messung in 3 mm-Tubes bestimmt. Insbesondere waren die Signale der Metaboliten in der aromatischen Region nicht mehr detektierbar. Um diesen Einschränkungen entgegenzuwirken, wurde von den Autoren eine Erhöhung der Scanzahl und somit der Messdauer für die 600 MHz 1D ^1H NOESY-Spektren empfohlen (Lodge, Nitschke, Loo, et al. 2021).

Bei der Analyse unter Anwendung des IVDr Verfahrens werden die 1D ^1H NOESY- und CPMG-Spektren standardmäßig mit einer Scanzahl von 32 (dies entspricht einer Messdauer von vier bis fünf Minuten) aufgenommen. Allerdings ist es bei diesem standardisierten Verfahren nicht möglich, die Scanzahl beliebig zu verändern. Unter Anwendung des standardisierten Verfahrens ist neben den 32 Scans die Messung der 1D-Spektren mit einer Scanzahl von 128 möglich. Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit der mittels IVDr bestimmten Konzentrationen der Metaboliten und Lipoproteine bei verschiedenen Scanzahlen wurden Serumproben in NMR-Tubes mit einem Durchmesser von 3 mm in einer Messsequenz mit 32 und 128 Scans analysiert. Die Konzentrationen der Metaboliten und Lipoproteine wurden anschließend entsprechend der Varianzen skaliert. Der Scoreplot der PCA der skalierten Daten ist in Abbildung 5-7 dargestellt. Die 1D ^1H NOESY-Messungen mit 32 Scans sind blau und die 128 Scans grau dargestellt.

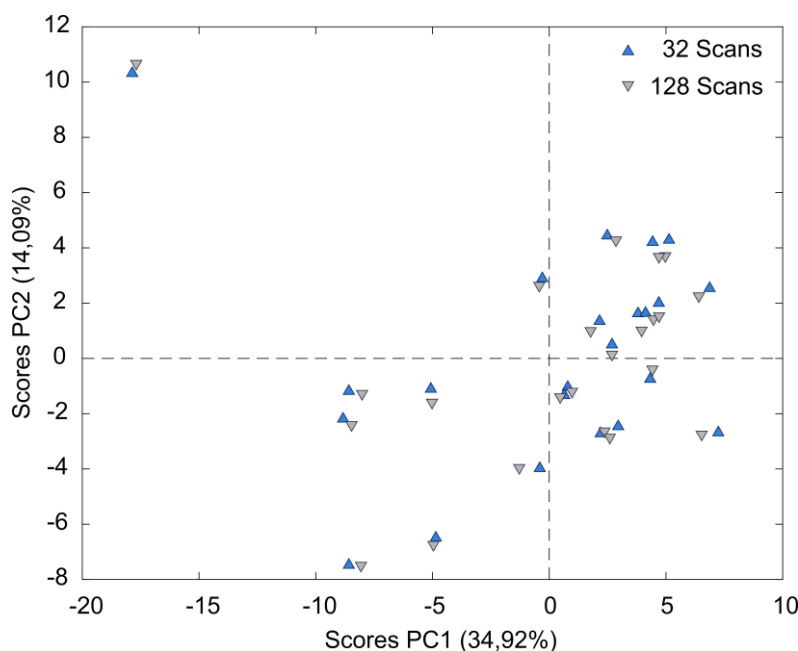


Abbildung 5-7: Vergleichbarkeit der Messungen mit 32 oder 128 Scans. Darstellung des Scoreplots einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*, PCA) der IVDr Daten ($n = 24$) für die Messung der 1D ^1H NOESY-Spektren mit verschiedenen Scanzahlen. Messungen mit einer Scanzahl von 32 sind blau und jene mit 128 Scans grau dargestellt.

Insgesamt sind in dem Scoreplot eindeutige Cluster zwischen den Analysen mit 32 sowie 128 Scans erkennbar. Die Analysen mit unterschiedlicher Scanzahl für eine Probe liegen unmittelbar nebeneinander. Dies zeigt, dass die Varianz der Konzentrationen zwischen den Messungen mit unterschiedlicher Scanzahl sehr gering war. Die mittels IVDr bestimmten Konzentrationen bei 1D ^1H NOESY-Messungen mit einer Scanzahl von 32 und 128 waren entsprechend vergleichbar.

Um die Proportionalität zwischen den Analysen mit unterschiedlicher Scanzahl im Detail zu betrachten, wurden die im IVDr bestimmten Konzentrationen für 32 und 128 Scans betrachtet. Auf der Ordinate wurde die Konzentration der Messung mit 128 Scans und auf der Abszisse die Konzentration der Messung mit 32 Scans aufgetragen. In Abbildung 5-8 ist dies beispielhaft für die Hauptparameter der Lipoproteine dargestellt. Zusätzlich wurde die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß R^2 der Regressionsgerade berechnet. Im Anhang sind die Geradengleichungen und die Bestimmtheitsmaße R^2 für alle mittels IVDr Protokoll quantifizierten Metaboliten und Lipoproteine aufgelistet (Tabelle 8-8).

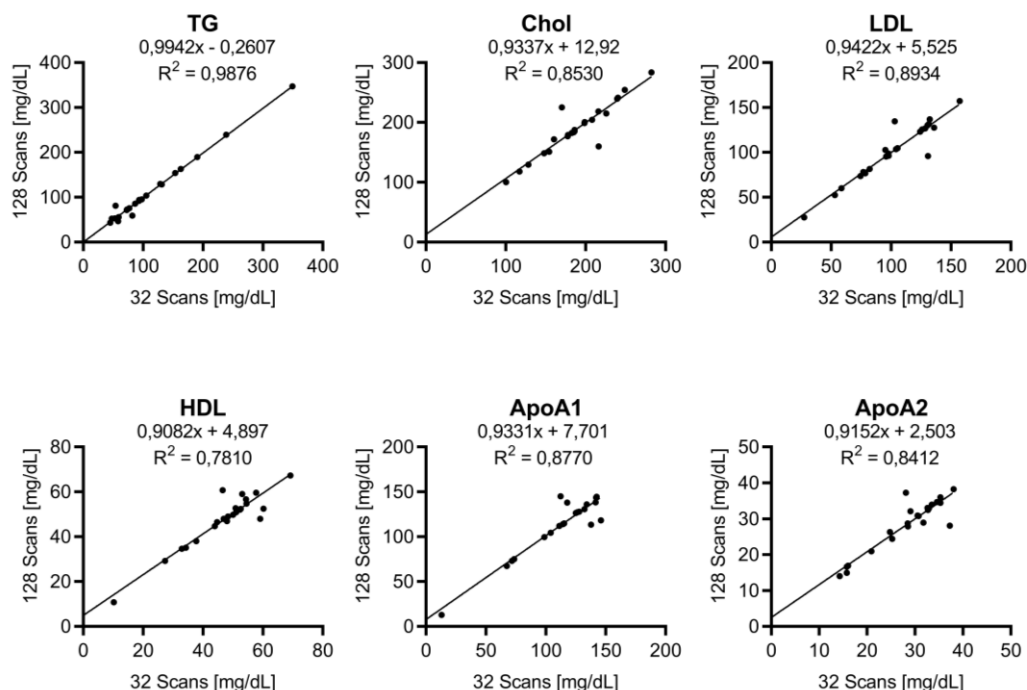


Abbildung 5-8: Vergleich der mittels IVDr Verfahren quantifizierten Lipoproteine bei einer Scanzahl der 1D ^1H NOESY-Spektren von standardmäßig 32 oder 128 Scans. Für die Hauptparameter der Lipoproteinanalyse Triglyzerid (TG), Cholesterin (Chol), *low density lipoprotein* (LDL), *high density lipoprotein* (HDL) sowie die Apolipoproteine (ApoA1 und ApoA2) sind die Geradengleichungen und das Bestimmtheitsmaß R^2 dargestellt.

Insgesamt zeigte sich eine gute Proportionalität der bestimmten Konzentrationen zwischen den 1D ^1H NOESY-Messungen in 3 mm-Tubes mit 32 und 128 Scans. Eine Vergleichbarkeit der Konzentrationen war daher unabhängig von der gewählten Scanzahl der 1D ^1H NOESY-Spektren gegeben.

Im Folgenden wird der Korrelationswert ρ bei einer Messung in NMR-Röhrchen mit einem Durchmesser von 3 mm zwischen dem Originalspektrum und dem berechneten Signal betrachtet. Der Mittelwert wurde sowohl für die Messung mit 32 als auch für die Messung mit 128 Scans berechnet (siehe 4.3.2.3). Daraus ergab sich die Einteilung in drei Gruppen: (A) Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{\rho} \geq 90\%$), (B) Metabolit mit mäßigem Fitting $50\% < \bar{\rho} < 90\%$, (C) Metabolit mit schlechtem Fitting ($\bar{\rho} \leq 50\%$). Innerhalb dieser drei Gruppen wurde der mittlere Korrelationswert $\bar{\rho}$ für jeden Metaboliten in Abhängigkeit der Scanzahl betrachtet und eine Unterteilung in die Untergruppen Metabolit (=) und Metabolit (Δ) vorgenommen. Dabei handelt es sich bei Metaboliten der Gruppe (=) um Substanzen, deren $\bar{\rho}$ sich zwischen den Analysen mit 32 oder 128 Scans nicht unterschied ($\Delta\bar{\rho} \leq 5\%$). Hingegen wurden Metaboliten, deren $\bar{\rho}$ sich in Abhängigkeit von der Scanzahl unterschied ($\Delta\bar{\rho} > 5\%$), in die Kategorie Δ eingeteilt (Tabelle 5-3).

Tabelle 5-3: Unterscheidung der Fittingqualität zwischen 1D ^1H NOESY-Messungen mit 32 und 128 Scans. Einteilung der Metaboliten, die mittels IVDr B.I.QUANT-PS 2.0 identifiziert und quantifiziert wurden, in folgende Gruppen hinsichtlich ihrer Fittingqualität: (A) Metabolit mit gutem Fitting ($\bar{p} \geq 90\%$), (B) Metabolit mit mäßigem Fitting ($50\% < \bar{p} < 95\%$), (C) Metabolit mit schlechtem Fitting ($\bar{p} \leq 50\%$). Weiterhin wurde die Veränderung der Fittingqualität zwischen den Messungen mit 32 und 128 Scans betrachtet. Substanzen, deren Qualität des Fittings sich dabei nicht änderte ($\Delta\bar{p} \leq 5\%$), wurden der Untergruppe Metabolit (=) zugeordnet. Hingegen wurden Metaboliten, die sich mit der Anzahl der Scans in ihrer Fittingqualität änderten ($\Delta\bar{p} > 5\%$), in die Gruppe Metabolit (Δ) eingeteilt.

	Metabolit (=)	$\bar{p}$		Metabolit (Δ)	$\bar{p}$	
		Scan			Scan	
		32	128		32	128
A	Alanine	99,76	99,80	Leucine	89,00	96,96
	Creatine	97,40	97,64	Formic acid	76,00	90,16
	Creatinine	97,40	97,64			
	Glycine	98,56	98,44			
	Isoleucine	93,08	92,92			
	Valine	99,56	99,72			
	Acetic acid	97,88	98,04			
	Lactic acid	99,68	99,68			
	Succinic acid	96,44	95,68			
	Glucose	99,92	99,96			
B	Trimethylamine-N-oxide	82,12	82,12	Glutamic acid	59,52	87,52
	Methionine	87,64	87,84	Glutamine	29,16	58,56
	3-Hydroxybutyric acid	88,20	87,12	Histidine	66,40	71,76
	Pyruvic acid	75,04	75,84	N,N-Dimethylglycine	57,36	79,92
				Phenylalanine	76,64	86,56
				Tyrosine	56,48	86,40
				Citric acid	61,24	79,72
				Acetoacetic acid	51,72	64,92
				Acetone	74,76	80,88
C	Ethanol	32,92	34,92	Ornithine	19,00	39,64
	2-Aminobutyric acid	1,64	3,44	Proline	3,12	8,40

Metabolit (=)	$\bar{\rho}$		Metabolit (Δ)	$\bar{\rho}$	
	Scan	32 128		Scan	32 128
Asparagine		0,00 0,00	Sarcosine		46,08 39,56
Lysine		29,12 24,72	D-Galactose		9,80 0,00
Threonine		2,88 6,24	Dimethylsulfone		36,36 47,68
2-Hydroxybutyric acid		13,32 17,84			
Choline		23,96 22,92			
2-Oxoglutaric acid		16,84 16,60			
Glycerol		10,20 6,48			

Die Qualität des Fittings mehrerer Metaboliten blieb bei einer Analyse mit unterschiedlichen Scanzahlen unverändert. Diese wurden der Gruppe Metabolit (=) zugeordnet. Bei zehn Metaboliten war das Fitting sowohl für die Messung mit 32 Scans als auch für die Messung mit 128 Scans sehr gut ($\bar{\rho} \geq 90\%$). In diese Gruppe (A) wurden beispielsweise Alanine, Glycine, Valine, Lactic acid und Glucose eingeteilt. Das Fitting für Trimethylamine-N-oxide, Methionine, 3-Hydroxybutyric acid und Pyruvic acid war unabhängig von der Scanzahl mäßig ($50\% < \bar{\rho} < 90\%$) (Gruppe (B)). Bei weiteren neun Metaboliten (z.B. Ethanol, Lysine, Threonine) war die Qualität des Fittings auch bei der Analyse mit mehr Scans nicht ausreichend ($\bar{\rho} \leq 50\%$) (Gruppe (C)). Durch die Erhöhung der Scanzahl bei den 1D ^1H NOESY-Spektren von 32 auf 128 Scans wird die Dauer der Messung zwar verlängert, aber das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert (Keeler 2010). Dadurch wurde die Qualität des Fittings einzelner Metaboliten erhöht. Durch die Verlängerung der Messdauer wurde das Fitting für Leucine und Formic acid deutlich verbessert, sodass diese bei der Analyse mit 128 Scans ein gutes Fitting ($\bar{\rho} \geq 90\%$) zeigten (Gruppe (A)). Auch für einige andere Metaboliten verbesserte sich die Qualität des Fittings durch die Erhöhung der Scanzahl. Ebenso wurde die Fittingqualität der Metaboliten der aromatischen Region (Histidine und Phenylalanine) durch die Erhöhung der Analysendauer verbessert ($50\% < \bar{\rho} < 90\%$). Trotzdem wurde auch durch die Erhöhung der Scanzahl beispielsweise für Ornithine, Sarcosine und Dimethylsulfone keine ausreichende Verbesserung der Fittingqualität erzielt ($\bar{\rho} \leq 50\%$) (Gruppe (C)). Dies kann unter anderem dadurch erklärt werden, dass die Konzentrationen dieser Metaboliten im Bereich des LOD lagen, sodass eine gesicherte Quantifizierung nicht immer möglich war.

Zusammenfassend waren die Spektren der 1D ^1H NOESY-Messungen in 3 mm-Tubes mit 32 und 128 Scans untereinander vergleichbar und die Ergebnisse zeigten eine gute

Proportionalität. Durch die Erhöhung der Scanzahl und damit der Messdauer wurde zudem die Qualität des Fittings für einige Metaboliten verbessert.

5.1.4 Vergleich verschiedener Bluttypen

Entsprechend des IVDr Verfahrens ist es unerheblich, ob bei der Analyse von Blutproben Serum oder Plasma untersucht werden. Der gewählte Bluttyp hat laut IVDr Protokoll keinen Einfluss auf die Messergebnisse und beeinflusst die Konzentrationen der analysierten Metaboliten und Lipoproteine nicht (Bruker Corporation 2019; Dona et al. 2014). Insbesondere bei ausgewählten Analysen aus dem Bereich der klinischen Diagnostik ist die Wahl des entsprechenden Untersuchungsmaterials (Serum/Plasma) allerdings von besonderer Bedeutung (Labor Schottdorf 2016; Lackner & Peetz 2013). Daher wurden im Folgenden die NMR-spektroskopische Messungen von Serum- und Plasmaproben genauer betrachtet.

In Abbildung 5-9 sind die 1D ^1H NOESY-Spektren für Serum (rot), LiHeparin- (grün) und EDTA-Plasma (blau) sowie ein Spektrum der Reinsubstanz EDTA dargestellt.

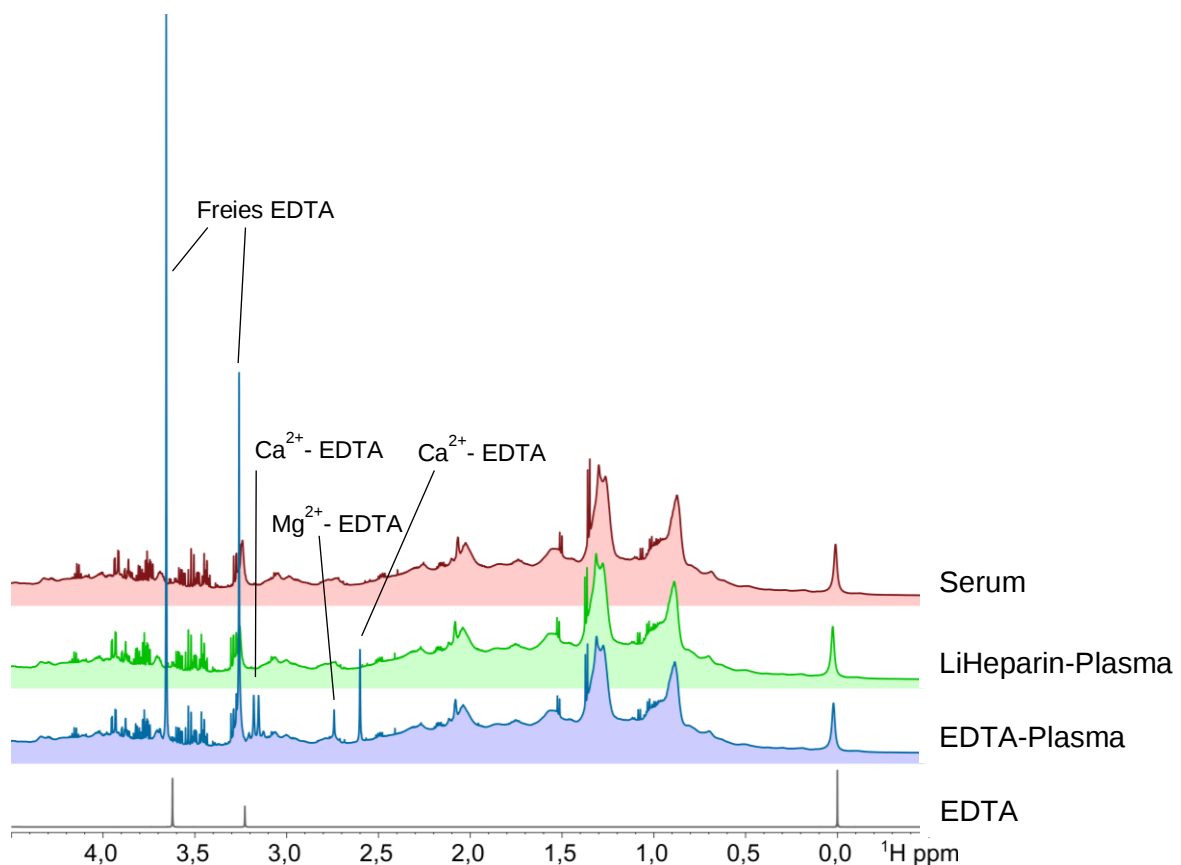


Abbildung 5-9: 600 MHz 1D ^1H NOESY-Spektren im Bereich von 0,0 bis 4,0 ppm für Serum (rot), LiHeparin-Plasma (grün), EDTA-Plasma (blau) und der Reinsubstanz EDTA (grau). Weiterhin sind die Signale des Antikoagulans EDTA in freier und an Erdalkalimetallionen (Calcium-Ionen, Ca^{2+} oder Magnesium-Ionen, Mg^{2+}) gebundener Form markiert (Dona et al. 2014; Monakhova et al. 2017).

Insbesondere im Spektrum des EDTA-Plasmas sind sehr intensive Signale erkennbar, die im Serum und LiHeparin-Plasma nicht deutlich wurden. Dabei handelt es sich um Signale des hinzugesetzten Antikoagulans EDTA. Wie bereits in dem Spektrum der Reinsubstanz

EDTA (grau) sichtbar wurde, traten zwei Signale des freien EDTA (3,3 ppm und 3,6 ppm) auf. Diese beiden Singulett-Signale waren auch in dem Spektrum des EDTA-Plasmas (blau) aufgrund der hohen EDTA-Konzentration deutlich zu sehen. Zudem traten im Spektrum des EDTA-Plasmas noch einige andere Signale auf. Dabei handelt es sich um Signale des mit Calcium- (Ca^{2+} -) oder Magnesium- (Mg^{2+} -) Ionen komplexierten EDTA (Monakhova et al. 2017). Diese durch das Antikoagulans EDTA zusätzlich entstandenen Signale können die Auswertung der Spektren stören. Beispielsweise überlagern diese Signale die Resonanzen interessanter Metaboliten, die dadurch nicht mehr erfasst werden. Auch das hinzugegebene Antikoagulans LiHeparin beeinflusste die Analyse der Metaboliten und Lipoproteine der Blutproben. Das Spektrum des LiHeparin-Plasmas wies anders als jenes des EDTA-Plasmas keine sichtbaren zusätzlichen Signale auf. Dennoch ist bekannt, dass das LiHeparin insbesondere mit den Lipoproteinen in Wechselwirkung tritt und mit diesen interagiert, wodurch die Quantifizierung dieser beeinträchtigt werden kann (Dona et al. 2014). Anders als bei Plasmaproben wird bei Serum kein Antikoagulans hinzugesetzt. Eine Beeinflussung der Probe durch Antikoagulanzen ist bei Serumproben entsprechend auszuschließen. Bei der Betrachtung der NMR-Spektren scheint daher Serum auf den ersten Blick geeigneter als Plasmaproben. Serum ist allerdings im klinischen Alltag schwieriger zu handhaben. Im Gegensatz zu Plasma können Serumproben nach der Blutentnahme nicht direkt zentrifugiert und verarbeitet werden, sondern benötigen eine halbstündige Gerinnungszeit. Diese Zeit muss sehr genau eingehalten werden, wodurch sich eine Fehlerquelle ergibt und eine präanalytische Variabilität zwischen den Proben entstehen kann (González-Domínguez et al. 2020; Niederau & Böhm 2021).

Bei der Betrachtung der verschiedenen Bluttypen wurden Vor- und Nachteile deutlich. Im Folgenden galt es daher zu eruieren, ob der gewählte Bluttyp einen Einfluss auf die im IVDr Protokoll betrachteten Metaboliten und Lipoproteine hat. Dafür wurden bei drei Probanden Blutproben abgenommen, wobei bei zwei Probanden Proben zu zwei verschiedenen Zeitpunkten mit einem Abstand von mindestens einem halben Jahr abgenommen wurden. Bei einer Punktion wurden Serum, EDTA- und LiHeparin-Plasma entnommen. Dadurch, dass alle drei Bluttypen zum selben Zeitpunkt genommen wurden, waren äußere Einflüsse wie Tageszeitpunkt, Ernährung, Körperlage etc. für diese Proben zu vernachlässigen (Labor Schottdorf 2016; Niederau & Böhm 2021). Die verschiedenen Bluttypen wurden mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Die mithilfe des IVDr Protokolls quantifizierten Metaboliten und Lipoproteine wurden entsprechend der Varianzen skaliert und eine PCA durchgeführt. Der Score- und Loadingplot ist in Abbildung 5-10 dargestellt.

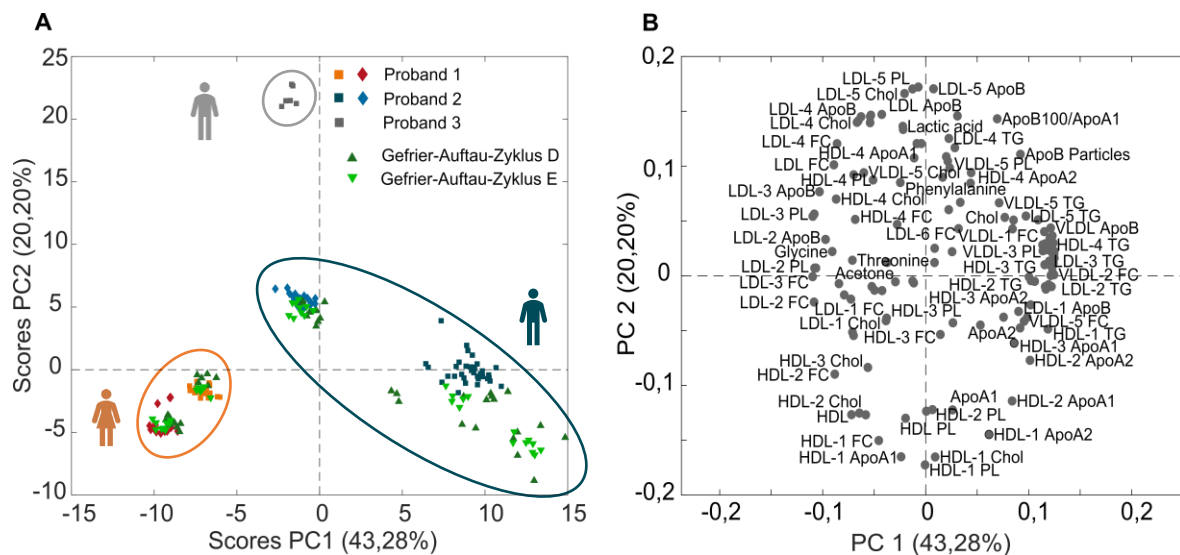


Abbildung 5-10: Betrachtung verschiedener Bluttypen (Serum, EDTA- und LiHeparin-Plasma) bei drei Probanden. Darstellung des Score- (A) und Loadingplot (B) einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*, PCA) der entsprechend der Varianzen skalierten IVDr Daten. Im Scoreplot sind die Proben des Probanden 1 orange, die des Probanden 2 blau und jene des Probanden 3 grau umfasst. Dem Probanden 1 (rot und orange) und Probanden 2 (hellblau und dunkelblau) wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen und die Proben farblich markiert. Zusätzlich sind die Proben des Probanden 1 und Probanden 2 mit Gefrier-Auftau-Zyklen grün dargestellt. Dunkelgrün sind Proben gekennzeichnet, deren Aliquote eingefroren wurden (Gefrier-Auftau-Zyklus D) und entsprechend hellgrün markierte Proben, die in NMR-Röhrchen eingefroren und aufgetaut wurden (Gefrier-Auftau-Zyklus E).

Der Scoreplot (Abbildung 5-10 A) zeigte entlang der PC1, welche eine Varianz von 43,28% erklärt, eine deutliche Separierung zwischen Proband 1 (orange umkreist) und Proband 2 (dunkelblau umkreist) unabhängig vom gewählten Bluttyp. Weiterhin waren sowohl für Proband 1 (rot und orange) als auch für Proband 2 (hellblau und dunkelblau) zwei verschiedene Cluster zu erkennen. Dabei handelte es sich um zwei verschiedene Zeitpunkte der Blutabnahme mit mindestens einem halben Jahr Abstand. Die PC2, welche eine Varianz von 20,20% erklärte, zeigte eine deutliche Trennung zwischen Proband 1 und Proband 2 auf der einen Seite sowie zu Proband 3 auf der anderen Seite (grau umkreist). Die interindividuelle Variabilität zwischen allen Probanden war entsprechend deutlich größer als der Einfluss des Bluttyps (Abbildung 8-3). Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Studie von Loo *et al.*, in der der interindividuelle Einfluss der verschiedenen Probanden ebenfalls prägnanter war als der Einfluss des gewählten Bluttyps (Loo *et al.* 2020).

Der zugehörige Loadingplot (Abbildung 5-10 B) deutete darauf hin, dass insbesondere Lipoproteine (VLDL und LDL) ausschlaggebend für eine Trennung entlang der PC1 und PC2 waren. Die Betrachtung der 1D ^1H NOESY-Spektren bei einem für die Lipoproteine typischen Verschiebungsbereich (0,8 bis 2,2 ppm) sind für die Probanden in Abbildung 5-11 dargestellt (Suna *et al.* 2007).

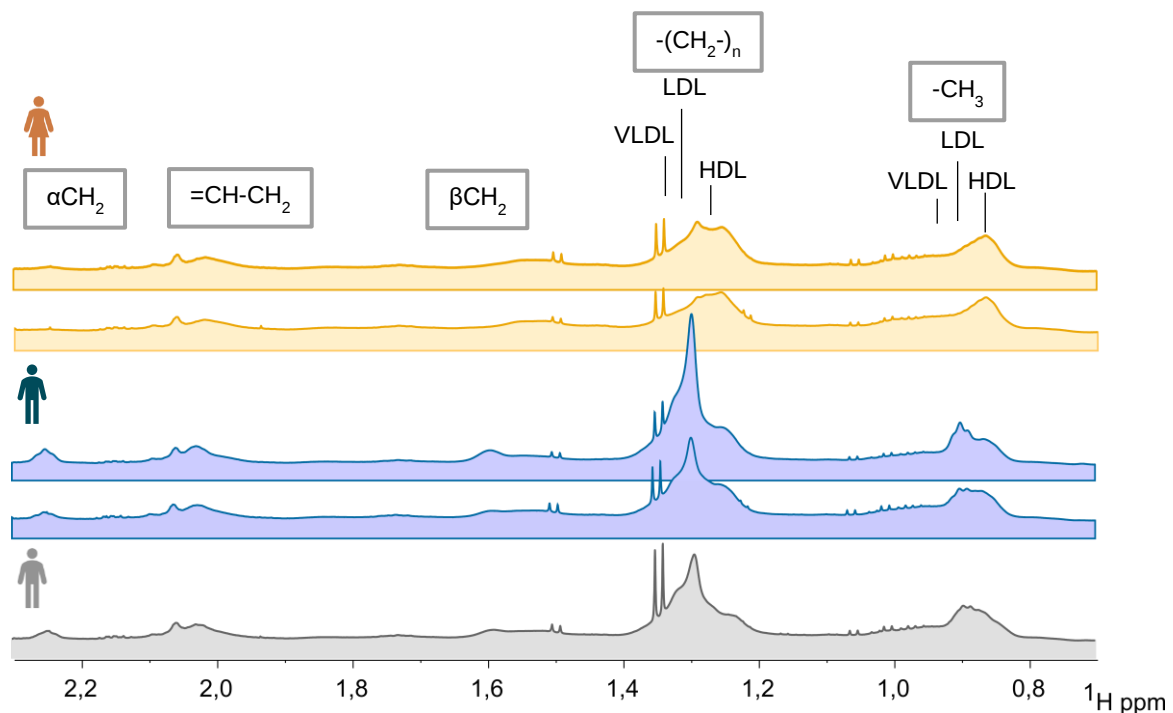


Abbildung 5-11: Vergleich der Lipidprofile mehrerer Probanden. 600 MHz 1D ^1H NOESY-Spektren im typischen Verschiebungsbereich der Lipoproteine zwischen 0,8 ppm und 2,2 ppm. Für Proband 1 (orange) und Proband 2 (blau) sind zwei Spektren dargestellt. Diese zeigen das Lipidprofil zweier Blutabnahmen von zwei verschiedenen Zeitpunkten mit einem Abstand von mindestens einem halben Jahr. Das Spektrum des Probanden 3 ist grau dargestellt. Die einzelnen Resonanzen sind den zugehörigen chemischen Gruppen zugeordnet (Suna et al. 2007).

Die 1D ^1H NOESY-Signale der Lipoproteine werden in einem Bereich der chemischen Verschiebung von 0,8 bis 2,2 ppm sichtbar. Methylgruppen ($-\text{CH}_3$) der Lipoproteine ergeben Signale bei einer chemischen Verschiebung von 0,8 bis 0,9 ppm. Die lange Fettsäurekette aus einer Verknüpfung mehrerer Methylengruppen ($-(\text{CH}_2)_n$) zeigt das intensivste Signal der Lipoproteine im Bereich von 1,2 bis 1,4 ppm. Weitere weniger intensive Signale der Lipoproteine werden bei chemischen Verschiebungen von 1,6 ppm (βCH_2), 2,0 bis 2,1 ppm ($=\text{CH}-\text{CH}_2$) sowie 2,1 ppm (αCH_2) deutlich (Suna et al. 2007). Bei der Betrachtung der Spektren für Proband 1 (orange), Proband 2 (dunkelblau) und Proband 3 (grau) war bereits optisch ein deutlicher Unterschied bezüglich des Lipoproteinprofils festzustellen (Abbildung 5-11). Die Intensitäten aller charakteristischen Signale der Lipoproteine waren bei Proband 2 im Vergleich zu Proband 1 und Proband 3 höher. Insbesondere waren bei Proband 2 die Intensitäten der VLDL- und LDL-Signale bei einer chemischen Verschiebung zwischen 1,2 und 1,4 ppm deutlich intensiver. Proband 1 hatte im Vergleich zu den anderen Probanden das Lipidprofil mit der geringsten Intensität. Bei der Betrachtung der Lipidprofile von einem Probanden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten fiel auf, dass dieses für den Probanden 1 sehr stabil war (Abbildung 5-11, orange). Hingegen zeigte sich für Proband 2 (Abbildung 5-11, blau), dass ein Spektrum (oben) ein deutlich prägnanteres Profil aufwies als jenes von einer Blutprobe, welche ein halbes Jahr später abgenommen wurde (unten). Die markanten Lipidprofile bestätigten die Ergebnisse der PCA, bei der eine Trennung der Proben zwischen den Probanden aufgrund der Lipoproteine aufgezeigt wurde.

Weiterhin war in dem Scoreplot (Abbildung 5-10 A) eine dichte Gruppierung der Proben des Probanden 1 (orange umkreist) zu erkennen. Hingegen wiesen die dunkelblau umkreisten Proben des Probanden 2 eine deutlich größere Streuung auf. Bereits bei der Analyse der Lipidspektren wurde gezeigt, dass sich das Profil des Probanden 2 innerhalb eines halben Jahres deutlich verändert hat (Abbildung 5-11, blau). Daher lagen die Cluster von Zeitpunkt 1 (dunkelblau) und Zeitpunkt 2 (hellblau) für den Probanden 2 in dem Scoreplot im Vergleich zu Proband 1, ohne sichtbare Veränderungen der Lipidprofile, weiter auseinander. Neben der Betrachtung unterschiedlicher Bluttypen mittels IVDr Protokoll wurden auch verschiedene andere methodische und präanalytische Fragestellungen betrachtet (siehe 4.5). Unter anderem wurde der Einfluss des Einfrierens und der erneuten Messung nach dem Auftauen bereits präparierter Proben in NMR-Röhrchen untersucht. Weiterhin wurden mögliche Veränderungen des metabolischen Profils unter Gefrier-Auftau-Zyklen der unpräparierten Serum- und Plasmaproben betrachtet. Anders als bei dem Probanden 1 zeigte sich für die Proben des Probanden 2 zum Zeitpunkt 1, welche als präparierte Proben im NMR-Tube nach dem Einfrieren und Auftauen erneut gemessen wurden, eine deutliche Verschiebung entlang der PC1 und PC2 (dunkelgrün). Diese Veränderung wurde für Serum-, EDTA- und LiHeparin-Proben, entsprechend unabhängig vom gewählten Bluttyp, erkannt. Bei dem Probanden 1 zeigten auch die Proben mit Gefrier-Auftau-Zyklen (hellgrün) weiterhin eine gute Gruppierung zu den frisch präparierten Proben (orange und rot). Dementsprechend wurde keine maßgebliche Veränderung der Metaboliten und Lipoproteine, die durch die PC1 und PC2 beschrieben wurden, erkannt. Wiederum anders verhielten sich die Proben des Probanden 2. Für die analysierten Proben des Probanden 2 zum Zeitpunkt 1, deren Aliquote im unpräparierten Zustand mehrfach eingefroren und wiederaufgetaut wurden, wurde für einige Proben eine Verschiebung entlang der PC2 erkannt. Dabei handelte es sich ausschließlich um LiHeparin-Proben. Anders als bei Serum und EDTA-Plasma zeigte sich im Scoreplot für die LiHeparin-Proben eine Veränderung des metabolischen Profils durch mehrmalige Gefrier-Auftau-Zyklen. Bei der entsprechenden Betrachtung der Loadings, die eine große Gewichtung auf die PC2 hatten, wurden insbesondere HDL- und LDL-Fraktionen identifiziert. Die Untersuchung der zugehörigen 1D ^1H NOESY-Spektren für den für Lipoproteine typischen Bereich der chemischen Verschiebung zwischen 1,20 ppm und 1,40 ppm sind für beide Probanden in Abbildung 5-12 dargestellt. Für beide Probanden wurden jeweils zwei Spektren für Serum, EDTA-Plasma und LiHeparin-Plasma betrachtet. Für jeden Bluttyp war das untere Spektrum jenes einer frischen Probe und das oberhalb dargestellte Spektrum jenes einer Probe mit Gefrier-Auftau-Zyklus.

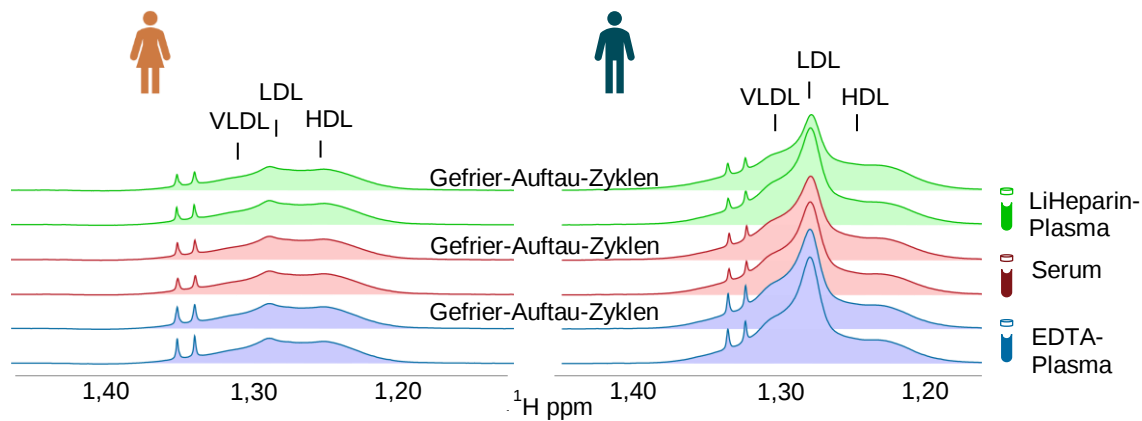


Abbildung 5-12: Betrachtung des Einflusses von Gefrier-Auftau-Zyklen auf das Lipidprofil. 600 MHz 1D ¹H NOESY-Spektren im Bereich der Resonanz von Lipoproteinen (1,20 bis 1,40 ppm) für die beiden Probanden 1 (orange) und 2 (dunkelblau). Für LiHeparin-Plasma (grün), Serum (rot) und EDTA-Plasma (blau) ist jeweils ein Spektrum einer frisch präparierten Probe und einer Probe mit mehreren Gefrier-Auftau-Zyklen dargestellt.

Für den Probanden 1 (orange) waren in dem gezeigten Bereich des Spektrums für die Lipoproteine der Serum- und Plasmaproben keine Unterscheidungen möglich. Die betrachteten Profile unterschieden sich bei dem Probanden 1 zwischen frischen Proben und Proben mit Gefrier-Auftau-Zyklen in Abhängigkeit vom Bluttyp nicht. Auch bei dem Probanden 2 (dunkelblau) unterschied sich das Lipoproteinprofil in dem gezeigten Bereich des Spektrums der Serum- und EDTA-Proben nicht. Im Gegensatz dazu zeigte das Spektrum des LiHeparin-Plasmas mit Gefrier-Auftau-Zyklus (grün, oben) eine sichtbare Veränderung des Lipidprofils im Vergleich zu dem Profil einer Probe ohne Gefrier-Auftau-Zyklus (grün, unten). Der Verlauf war im Vergleich zu den anderen Proben sichtbar flacher. Diese optische Beurteilung des 1D ¹H NOESY-Spektrums deckte sich mit den Ergebnissen der PCA, die ebenfalls eine Veränderung des Lipidprofils für LiHeparin-Plasma mit Gefrier-Auftau-Zyklen für den Probanden 2 entlang der PC2 aufzeigte.

Zusammenfassend zeigte die PCA (Abbildung 5-10), dass die interindividuellen Unterschiede der Probanden deutlich größer waren als der Einfluss der verschiedenen Bluttypen (Serum, EDTA- oder LiHeparin-Plasma). Bei Proband 2 mit einem ausgeprägten Lipoproteinprofil mit hohen VLDL- und LDL-Werten zum Probenahmezeitpunkt 1 wurde eine Veränderung des Profils durch Gefrier- und Auftauprozesse aufgezeigt. Das Profil bei der wiederholten Messung einer NMR-Probe nach einem Gefrier-Auftau-Zyklus änderte sich bei allen Bluttypen bei dem Probanden 2. Eine Veränderung der unpräparierten LiHeparin-Aliquoten durch Gefrier-Auftau-Zyklen wurde durch den Scoreplot der PCA aufgezeigt. Die Aliquote der Serum- und EDTA-Proben veränderten sich durch Gefrier-Auftau-Zyklen nicht sichtbar.

Fortführend wurde eine intraindividuelle Untersuchung der drei gewählten Bluttypen durchgeführt. Die mittels IVDr Verfahren bestimmten Metaboliten und Lipoproteine wurden entsprechend der Varianzen skaliert und die PCA für Proband 1 (orange) und Proband 2 (dunkelblau) separat durchgeführt. Die Scoreplots sind in Abbildung 5-13 dargestellt, wobei

die Proben bezüglich des analysierten Bluttyps eingefärbt sind. Die Serumproben sind rot, die EDTA-Proben blau und die LiHeparin-Proben grün dargestellt.

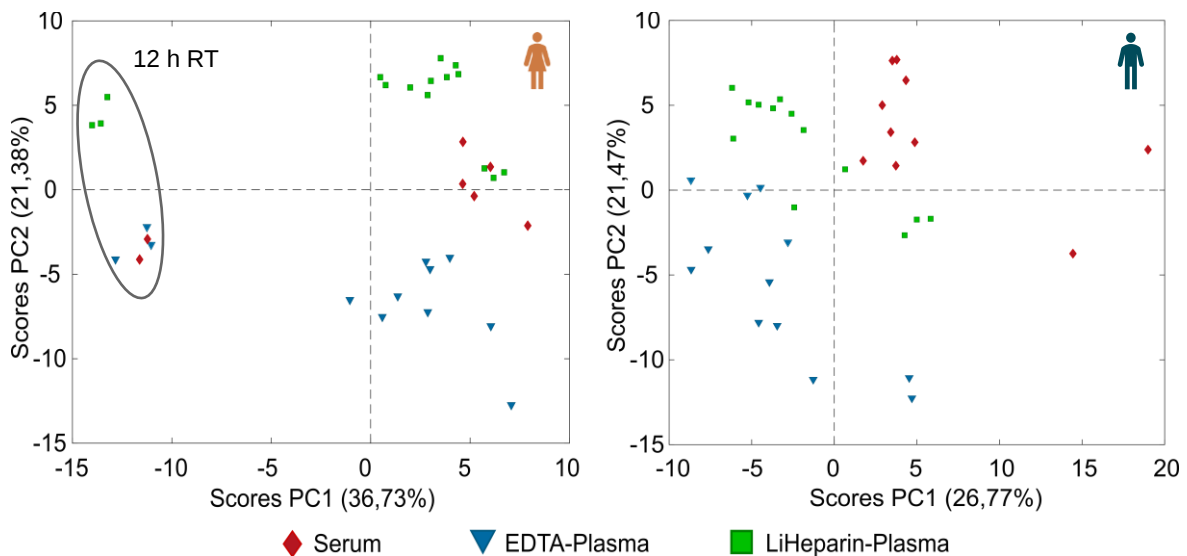


Abbildung 5-13: Intraindividuelle Vergleich verschiedener Bluttypen (Serum, EDTA- und LiHeparin-Plasma). Darstellung der intraindividuellen Scoreplots einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*, PCA) der IVDr Daten für Proband 1 (orange) und Proband 2 (dunkelblau). Die Proben sind entsprechend des Bluttyps nach Serum (rot), EDTA-Plasma (blau) und LiHeparin-Plasma (grün) markiert. Bei dem Probanden 1 ist eine Gruppierung entlang der PC-1 für präparierte Proben, die vor der Messung zwölf Stunden bei Raumtemperatur (12 h RT) gelagert wurden, erkennbar.

Der Scoreplot des Probanden 1 (orange) zeigte eine Auftrennung entlang der PC1, welche eine Varianz von 36,73% erklärte, in zwei Gruppen. Neben der Untersuchung verschiedener Bluttypen wurden bei diesem Versuchsaufbau auch weitere methodische Fragestellungen analysiert. Unter anderem wurde die Lagerung von präparierten Proben in NMR-Tubes unmittelbar vor der Analyse betrachtet (siehe 4.5.6). Einige Proben des Probanden 1 wurden vor der Messung zwölf Stunden bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie analysiert wurden. Der Einfluss dieser Maßnahme war deutlich im Scoreplot erkennbar und führte insbesondere zu Veränderungen im Lipidprofil (siehe 5.1.5). Weiterhin war für den Probanden 1 eine Auftrennung in die verschiedenen Bluttypen im Scoreplot erkennbar, wobei die Serumproben zwischen den EDTA- und LiHeparin-Proben lokalisiert waren. Diese Auftrennung wurde im Wesentlichen entlang der PC2 (21,38%) deutlich. Auch im Scoreplot des Probanden 2 (dunkelblau) zeigte sich eine Trennung entsprechend der verschiedenen Bluttypen. Anders als bei dem Probanden 1 lagen die LiHeparin-Proben zwischen den Serum- und EDTA-Proben und es wurden keine Proben des Probanden 2 vor der Messung zwölf Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die PC1 beschrieb hier eine Varianz von 26,77% und die PC2 von 21,47%.

Zusammenfassend zeigte sich durch eine PCA bei der Betrachtung mit mehreren Probanden, dass die interindividuellen Unterschiede zwischen den Probanden deutlich größer waren als der Einfluss der verschiedenen Bluttypen. Lediglich die intraindividuelle PCA machte eine Gruppierung in die einzelnen Bluttypen sichtbar. Bei Fragestellungen aus dem Bereich der Metabolomics-Forschung sollte daher lediglich ein Bluttyp analysiert und

verglichen werden, welcher zuvor im Studiendesign festgelegt wurde. Weiterhin werden zumeist interindividuelle Vergleiche durchgeführt. Die intraindividuelle Separierung in die verschiedenen Bluttypen stellt daher für Metabolomics-Analysen kein maßgebliches Problem dar.

Um einen möglichen Einfluss der verschiedenen Bluttypen auf die mittels IVDr quantifizierten Metaboliten und Lipoproteine zu untersuchen, wurden diese im Folgenden für Proband 1 und Proband 2 im Detail betrachtet. Neben der interindividuellen Differenzierung erfolgte weiterhin die Unterscheidung in die verschiedenen Bluttypen. Zunächst wurde der relative Fehler für jeden Analyten berechnet. Als Referenzwert (tatsächlicher Wert) wurde der Mittelwert für jede Substanz unabhängig vom Bluttypen, aber in Abhängigkeit vom Probanden, berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-14 dargestellt. Die analysierten Metaboliten und Lipoproteine wurden nach ihren Substanzklassen gruppiert. Weiterhin wurden die relativen Fehler der mittels IVDr quantifizierten Substanzen entsprechend des Probenmaterials in Serum (rot), EDTA-Plasma (blau) und LiHeparin-Plasma (grün) eingefärbt. Über die Form erfolgte die Differenzierung der Probanden 1 (Dreieck) und Proband 2 (Kreis).

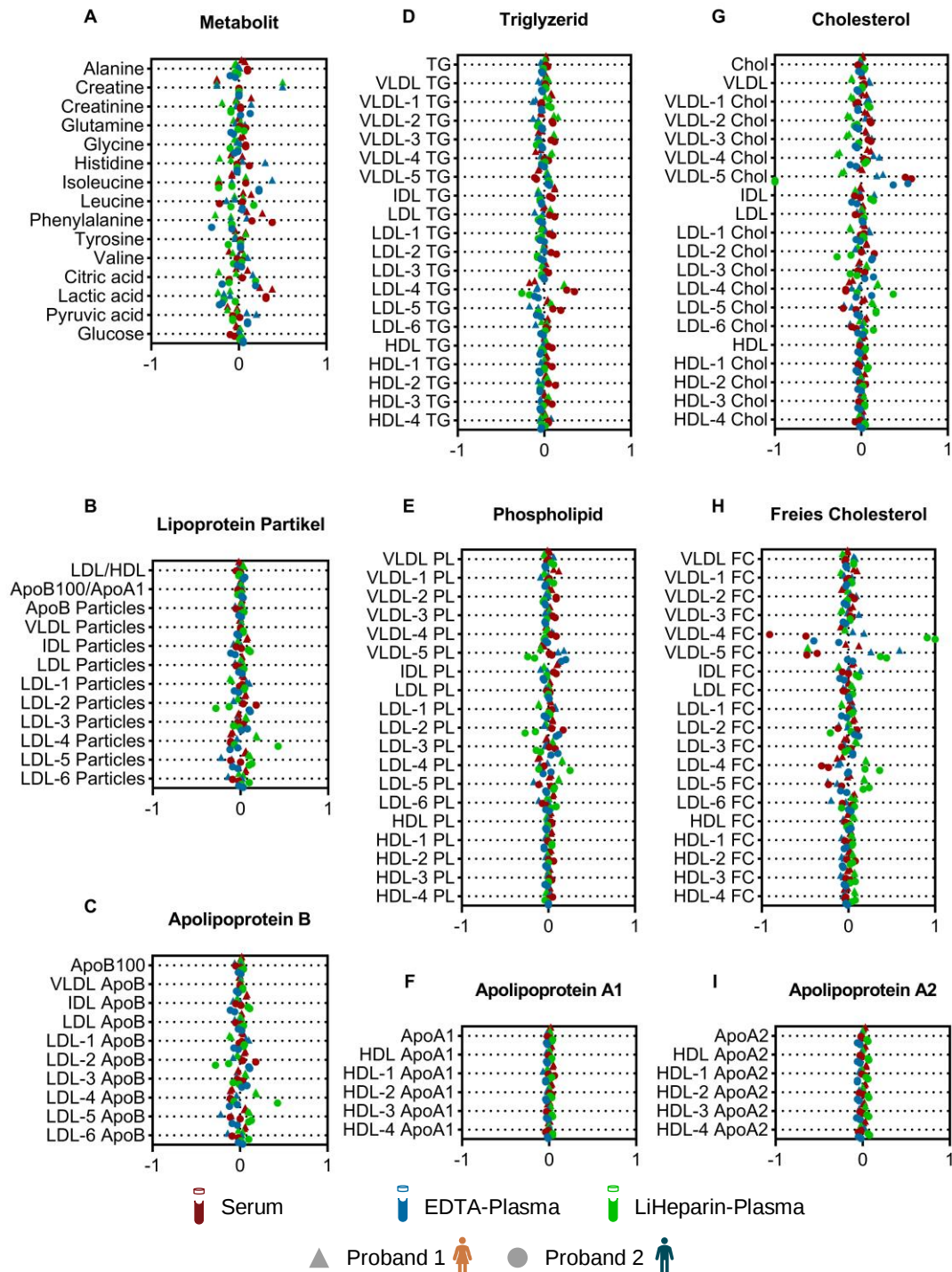


Abbildung 5-14: Darstellung der relativen Fehler für die einzelnen Metaboliten und Lipoproteine bei verschiedenen Bluttypen und Probanden. Als Referenzwert wurde der Mittelwert für jeden Analyten unter Berücksichtigung des jeweiligen Probanden, aber unabhängig vom Bluttyp berechnet. Die relativen Fehler sind dabei für Serum (rot), EDTA-Plasma (blau) und LiHeparin (grün) dargestellt. Weiterhin erfolgt eine Differenzierung entsprechend der Symbolform der beiden Probanden. Proband 1 ist mit einem Dreieck und Proband 2 mit einem Kreis gekennzeichnet.

Zusammenfassend war der relative Fehler, insbesondere für die betrachteten Lipoproteine, gering. Die Schwankungsbreiten der relativen Fehler für die mittels IVDr quantifizierte Metaboliten waren im Durchschnitt größer als für die Lipoproteine. Eine mögliche Erklärung liegt hier in der geringeren Sensitivität der Quantifizierung der Metaboliten im Vergleich zu derer der Lipoproteine. Im Einklang mit den Ergebnissen von Loo *et al.* wurden auch hier

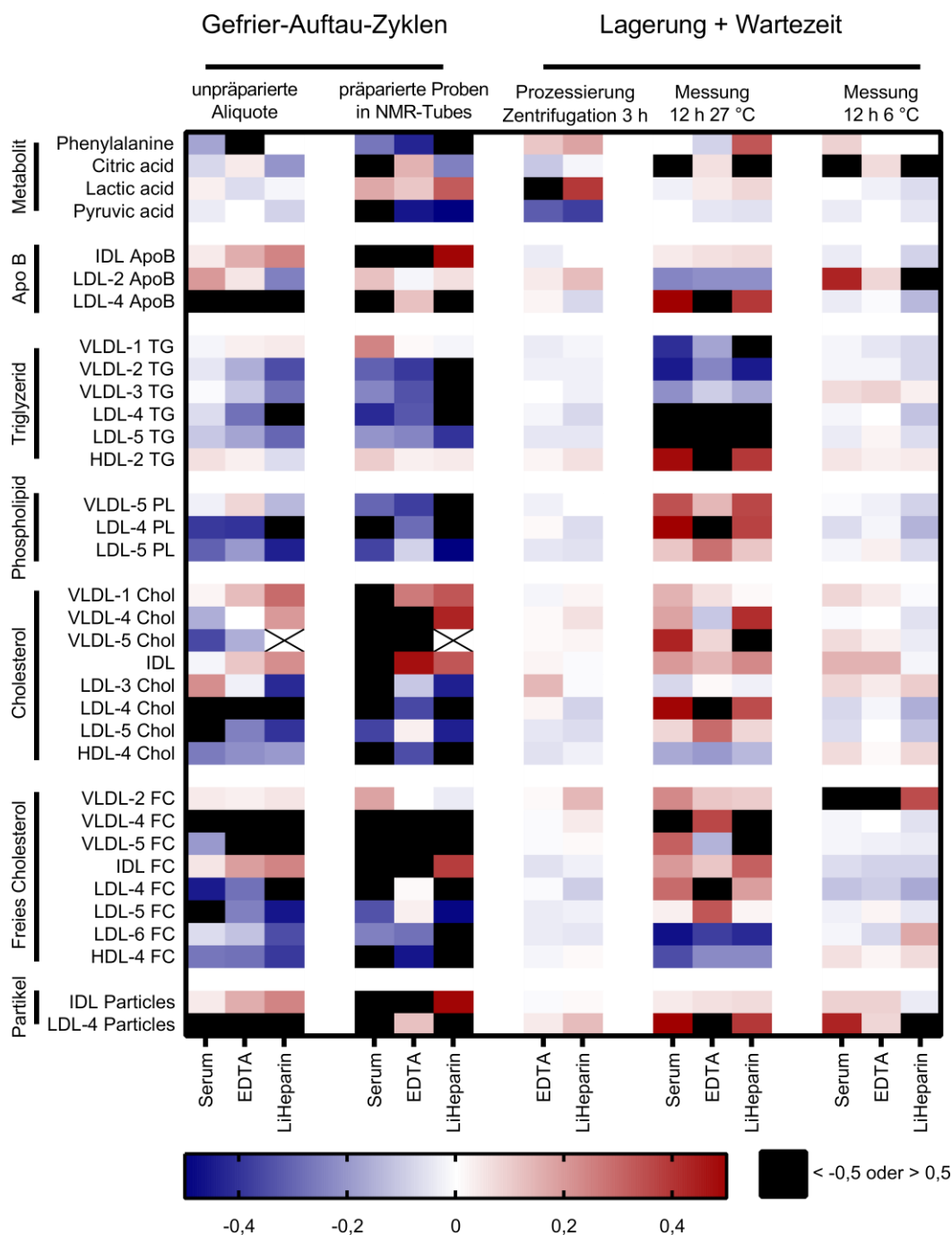
höhere Konzentrationen von Lactic acid in Serumproben im Vergleich zu Plasmaproben identifiziert. Weiterhin war auch Pyruvic acid in EDTA-Plasma geringfügig höher konzentriert. Im Gegensatz zu anderen Studien wurden aber keine Konzentrationsänderungen von Lactic acid in LiHeparin-Plasma im Vergleich zu anderen Bluttypen nachgewiesen (Loo et al. 2020). Bei den Lipoproteinen war der maximale relative Fehler größer als bei den Metaboliten. Als deutliche Ausreißer mit auffällig großen relativen Fehlern fielen VLDL-5 Chol sowie VLDL-4 FC und VLDL-5 FC auf. Generell waren die relativen Fehler für Cholesterin, freies Cholesterin und Phospholipide in den höheren Subfraktionen von VLDL und LDL größer. Ähnliches zeigte sich für die höheren Subfraktionen des LDL in der Lipidklasse der Triglyzeride sowie für die LDL-2 und LDL-4 Particles und ApoB. In Bezug auf die beiden betrachteten Probanden und die analysierten Bluttypen waren die relativen Fehler der Serumproben für den Probanden 2 in den LDL- und HDL-Fraktionen der Triglyzeride erhöht. Ebenfalls wurden in der Fraktion der Phospholipide höhere VLDL-Werte für die Serumproben festgestellt. Für die LiHeparin-Proben wurden erhöhte Werte für die höheren LDL- sowie für die HDL-Subfraktionen der freien Cholesterine analysiert. Hingegen wurden für die VLDL-Fraktionen des Cholesterins bei den LiHeparin-Proben des Probanden 1 niedrigere Werte berechnet. Die relativen Fehler für ApoA1 und ApoA2 waren weitestgehend unauffällig. Lediglich die Werte für ApoA2 der LiHeparin-Proben wiesen einen Trend für eine geringfügig Erhöhung auf.

Zusammenfassend wurden geringe relative Fehler berechnet. Die relativen Fehler der Metaboliten waren aufgrund der geringeren Sensitivität der Quantifizierung im Durchschnitt größer als jene der Lipoproteine. Die größten maximalen Abweichungen zeigten sich allerdings bei den Lipoproteinen für VLDL-5 Chol sowie für VLDL-4 FC und VLDL-5 FC. Insgesamt wurde auch bei der detaillierten Betrachtung der einzelnen quantifizierten Substanzen kein Favorit in Bezug auf die Art der Blutprobe (Serum oder Plasma) herausgearbeitet. Die mittels IVDr Verfahren quantifizierten Metaboliten und Lipoproteine waren soweit unabhängig von den Matrices Serum, EDTA- und LiHeparin-Plasma. Die aufgeführte Variabilität der LiHeparin-Proben bei mehrmaligen Gefrier-Auftau-Zyklen ist ebenso wie die zusätzlichen Signale der EDTA-Proben als nachteilig zu bewerten.

5.1.5 Veränderungen während der Aufarbeitung und Messung

Bei der Analyse von Metaboliten und Lipoproteinen in Serum- und Plasmaproben entwickeln sich einige (prä- und post-) analytische Fragestellungen. Im klinischen und chemischen Laboralltag ergeben sich trotz höchster Standardisierung und Präzision Situationen, bei denen von der strikten SOP-Anleitung abgewichen werden muss oder der Wunsch besteht, von dieser abzuweichen. Dementsprechend wird überprüft, inwieweit sich Abweichungen und Interventionen der SOP auf die Quantifizierung der Metaboliten und Lipoproteine mittels IVDr Verfahren auswirken. Im Folgenden wurden daher verschiedene

(prä- und post-) analytische Fragestellungen im Hinblick auf Gefrier-Auftau-Zyklen sowie auf Lagerung und Wartezeit analysiert (Abbildung 4-3). Als Referenzwerte (tatsächliche Werte) wurden die Mittelwerte der nach IVDr Verfahren bestimmten Konzentrationen der Proben, die entsprechend der SOP analysiert wurden, verwendet. Die relativen Fehler im Vergleich zu denen der Referenzproben wurden für jeden der drei analysierten Blutproben (Serum, EDTA- und LiHeparin-Plasma) separat berechnet und sind in Abbildung 5-15 in einer Heatmap dargestellt. Dabei sind positive relative Fehler rot und negative relative Fehler blau markiert. Weiterhin sind lediglich Metaboliten und Lipoproteine gezeigt, die bei mindestens einer der Fragestellungen einen relativen Fehler von kleiner -0,5 oder größer +0,5 aufwiesen. Eine Gesamtübersicht aller Substanzen ist in Abbildung 8-4 dargestellt.



Beschriftung der Abbildung folgt auf der nächsten Seite.

Abbildung 5-15: Relative Fehler der Quantifizierungen ausgewählter Metaboliten und Lipoproteine bei verschiedenen prä- und postanalytischen Variationen in Form einer Heatmap. In Bezug auf die sechs prä- und postanalytischen Fragestellungen sind lediglich die Substanzen aufgeführt, deren relativer Fehler bei mindestens einer Intervention $< -0,5$ oder $> 0,5$ war. Positive relative Fehler, also eine entsprechend erhöhte Konzentration im Vergleich zu den Referenzproben, sind rot dargestellt. Analog sind negative relative Fehler (niedrigere Konzentration als Referenzproben) blau dargestellt. Starke Abweichungen mit relativen Fehlern $< -0,5$ oder $> 0,5$ sind schwarz markiert. Fehlende Werte sind mit einem Kreuz dargestellt.

Die absoluten Werte sind in Tabelle 8-9 aufgelistet. Bei den Substanzen, für die bei mindestens einer der durchgeführten Interventionen ein relativer Fehler $x_{\text{rel}} > 0,5$ berechnet wurde, sind neben der Aminosäure Phenylalanine Carbon- und Ketonsäuren (Citric acid, Lactic acid, Pyruvic acid) vertreten. Bei den Lipoproteinen wurden insbesondere Triglyzeride sowie freie und gebundene Cholesterine durch die Interventionen stark beeinflusst. Vor allem die höheren Subfraktionen der VLDL- und LDL-Parameter zeigten größere relative Fehler. Die Gefrier-Auftau-Zyklen von Proben hatten einen sehr starken Einfluss auf das metabolische Profil. Auch Proben, die bis zur Messung zwölf Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurden, zeigten im Vergleich zu den entsprechend der SOP analysierten Proben größere Differenzen. Die Lagerung der präparierten Proben für zwölf Stunden bei 6 °C vor der Messung hatte hingegen einen geringeren Einfluss auf das Profil. Auch die Plasmaproben, die nicht direkt zentrifugiert worden waren, sondern erst drei Stunden nach der Probenahme, und somit nicht entsprechend der SOP prozessiert wurden, veränderten sich im Vergleich zu standardisierten Proben kaum.

Die einzelnen Untersuchungen, die im Hinblick auf die Verarbeitung der Proben durchgeführt wurden, werden nun im Detail diskutiert.

GEFRIER-AUFTAU-ZYKLEN

Generell sollte bei der Analyse des Metaboloms möglichst auf sogenannte Gefrier-Auftau-Zyklen verzichtet werden (Holland et al. 2003). Dennoch ist es aufgrund des begrenzten Probenmaterials insbesondere bei interdisziplinären, multizentrischen Studien oder bei der Nachmessung eventueller Ausreißerproben teilweise nicht möglich, Gefrier-Auftau-Zyklen vollständig zu vermeiden. Beispielsweise werden bei der Auswertung der analysierten Proben Unklarheiten identifiziert und Proben folglich als Ausreißer klassifiziert. Daher besteht der Wunsch, Proben erneut zu messen, um entsprechende Ergebnisse zu verifizieren. Hierfür stehen manchmal keine frischen Proben zur Verfügung und es müssen Aliquote analysiert werden, die bereits zuvor aufgetaut wurden. Weiterhin kann es auch vorkommen, dass neues Probenmaterial nicht zur Verfügung steht und eine bereits präparierte Probe, die nach der Messung in dem NMR-Röhrchen eingefroren wurde, erneut aufgetaut und analysiert werden muss.

Die entsprechenden Veränderungen auf die mittels IVDr quantifizierten Metaboliten und Lipoproteine wurden daher untersucht.

(D) Aliquote nicht präparierter Proben

Bei den Serum- und Plasmaproben, die mehrfach eingefroren und aufgetaut worden waren, zeigten sich deutliche Konzentrationsänderungen bei den quantifizierten Metaboliten und Lipoproteinen. Insgesamt waren vor allem negative relative Fehler (blau) in Bezug auf die Standardproben erkennbar. Dies deutete auf einen Verlust, beispielsweise durch Fällungsreaktionen, einiger Substanzen durch die Gefrier-Auftau-Zyklen hin. Besonders ausgeprägt waren diese Veränderungen für die LiHeparin-Proben. Unabhängig vom analysierten Bluttyp war die LDL-4 Fraktion von ApoB sowie der Cholesterine und Lipidpartikel reduziert. Die VLDL-4 Fraktion der freien Cholesterine hingegen war unabhängig vom Bluttyp erhöht. In Bezug auf die Standardproben bedeutet dies eine erhöhte Konzentration, das heißt eine Anreicherung der Parameter. Bei den Plasmaproben zeigte VLDL-5 FC einen positiven relativen Fehler im Vergleich zu den Referenzproben. In Serumproben war die Konzentration von LDL-5 Chol und LDL-5 FC im Vergleich zu den Referenzproben stark minimiert. Eine deutliche Reduktion zeigte sich im EDTA-Plasma für die Aminosäure Phenylalanine sowie für die LDL-4 Fraktion der Triglyzeride, Phospholipide und freien Cholesterine in LiHeparin-Proben.

(E) Präparierte Proben in NMR-Tubes

Die deutlichsten Veränderungen im Hinblick auf die Konzentrationen der Metaboliten und Lipoproteine wurden für die erneute Messung der präparierten Proben in NMR-Tubes beobachtet (siehe 5.1.4). Insgesamt wurde in nahezu allen aufgelisteten Metaboliten und Lipoproteinen ein negativer relativer Fehler berechnet. Dies bedeutet, dass die Konzentrationen der Substanzen in den erneut aufgetauten, präparierten Proben im Vergleich zu den nach SOP analysierten, frisch präparierten Proben verringert waren. Diese geringeren Konzentrationen waren möglicherweise ein Anzeichen für die Fällung einzelner Substanzen in den präparierten und erneut aufgetauten Proben. Insbesondere war dies in den Serum- und LiHeparin-Proben erkennbar. In allen drei analysierten Bluttypen wurden die Konzentrationen der Parameter VLDL-4 FC und VLDL-5 FC durch das Einfrieren und Auftauen deutlich erhöht. Für Serum- und EDTA-Plasma zeigte sich weiterhin eine deutliche Beeinflussung einiger IDL- (IDL ApoB, IDL FC und IDL Particles) sowie VLDL-Parameter (VLDL-4 Chol und VLDL-5 Chol). Die LDL-4 Fraktionen der Apolipoproteine B, Phospholipide, (freien) Cholesterine und Lipoproteinpartikel sowie die HDL-4 Fraktionen der Cholesterine waren in Serum- und LiHeparin-Proben im Vergleich zu den Referenzproben deutlich reduziert. Weiterhin zeigten sich deutliche Konzentrationsabweichungen für Citric acid und Pyruvic acid, VLDL-1 Chol, IDL und LDL-3 Chol in Serumproben. Die Aminosäure Phenylalanine sowie die Lipidfraktionen VLDL-2 TG und VLDL-3 TG, VLDL-5 PL sowie LDL-4 TG und LDL-6 FC waren in LiHeparin-Proben stark reduziert.

LAGERUNG UND WARTEZEIT

Aufgrund von Verzögerungen im klinischen Laboralltag kann es zu Wartezeiten während der Probenprozessierungen kommen, sodass die vorgegebenen Zeiten der SOP nicht immer exakt eingehalten werden können. Im Folgenden wurde daher der Einfluss von Verzögerungen während der Prozessierung von Plasmaproben analysiert. Anders als bei Serumproben benötigen Plasmaproben keine halbstündige Gerinnungszeit, sondern werden unmittelbar nach der Probenahme zentrifugiert (Labor Schottdorf 2016). Im klinischen Arbeitsalltag ist es allerdings aus verschiedenen Gründen (z.B. Arbeitszeit, Gerätekapazität) teilweise nicht möglich die Proben direkt zu zentrifugieren. Daher wurden Plasmaproben erst nach drei Stunden zentrifugiert und der Einfluss auf die Metaboliten und Lipoproteine analysiert. Außerdem wurden präparierte Proben in NMR-Tubes vor der Messung zwölf Stunden entweder bei 6 °C oder bei 27 °C gelagert. Die Analyse der Serum- und Plasmaproben erfolgte mittels standardisiertem IVDr Verfahren in Automation. Die Wartezeit der präparierten Proben, die am Anfang der Messsequenz analysiert werden, ist entsprechend geringer als die Zeit der Proben am Ende einer Sequenz. Entsprechend des IVDr Protokolls wird die Lagerung der präparierten Proben in NMR-Röhrchen bis zu ihrer Messung bei 280 K empfohlen (Bruker Corporation 2019). Für die Temperierung der Proben ist zusätzliches technisches Equipment notwendig. Da dieses nicht immer zur Verfügung steht, wurde zusätzlich auch der Einfluss dieser Wartezeit auf die quantifizierten Parameter bei Raumtemperatur betrachtet.

(F) Prozessierung

Durch die Zentrifugation der Plasmaproben nach drei Stunden traten geringfügige Veränderungen in den Konzentrationen der Metaboliten und Lipoproteinen auf, die im Vergleich zu den Änderungen durch Gefrier-Auftau-Zyklen aber deutlich geringer waren. Lediglich für Lactic acid wurden im Vergleich zu den Referenzproben deutlich höhere Werte quantifiziert, während für Pyruvic acid geringere Konzentrationen bestimmt wurden. Dadurch, dass die Plasmaproben nicht unmittelbar zentrifugiert und eingefroren wurden, wurden enzymatische Prozesse nicht inhibiert. Möglicherweise wurde daher Glucose über das Zwischenprodukt Pyruvic acid fortlaufend in das Endprodukt Lactic acid umgewandelt. Am Ende des Prozesses der Glykolyse wurde das Zwischenprodukt Pyruvic acid nahezu vollständig in Lactic acid umgewandelt und entsprechend sind die Konzentration von Pyruvic acid gering und die von Lactic acid als Endprodukt hoch (Bernini et al. 2011).

(G) Messung

Durch die Lagerung der präparierten Proben in NMR-Röhrchen vor der Messung bei Raumtemperatur wurden für einige Metaboliten und Lipoproteine starke Konzentrationsänderungen festgestellt. Ein positiver relativer Fehler, das bedeutet eine erhöhte Konzentration im Vergleich zu den unmittelbar analysierten Proben, wurde für die meisten IDL-, VLDL- und LDL-Fraktionen bestimmt. Als Ausnahmen mit einem negativen

relativen Fehler waren einige VLDL-Fraktionen (VLDL-1 TG bis VLDL-3 TG) sowie LDL-2 ApoB und LDL-6 FC zu nennen. Ähnliches galt auch für die HDL-4 Fraktionen der freien und gebundenen Cholesterine. Für Serum- und Plasmaproben wurden deutliche Veränderungen im Vergleich zu den Referenzproben für LDL-4 TG und LDL-5 TG bestimmt. Citric acid sowie VLDL-4 FC wiesen in Serum und LiHeparin-Plasma deutliche Konzentrationsänderungen auf. Einige VLDL-Parameter (VLDL-1 TG, VLDL-5 Chol, VLDL-5 FC) waren weiterhin in LiHeparin-Proben verändert, während in EDTA-Plasma insbesondere einige LDL-Fraktionen (LDL-4 ApoB, LDL-4 Chol, LDL-4 FC, LDL-4 PL, LDL-4 Particles) sowie HDL-2 TG Abweichungen zeigten.

Ähnliche Veränderungen sowie Tendenzen im Vergleich zu der Lagerung der präparierten Proben in NMR-Tubes vor der Messung bei 27 °C wurden auch bei den bei 6 °C gelagerten Proben gesehen. Die Veränderungen der Konzentrationen fielen allerdings bei den gekühlten Proben geringer aus als bei den bei Raumtemperatur gelagerten Proben. Trotzdem wurden auch hier insbesondere für Citric acid, LDL-2 ApoB, VLDL-2 FC und LDL-4 Particles sehr große relative Fehler von $x_{rel} > 0,5$ im Vergleich zum Referenzwert berechnet.

Zusammenfassend wurden bei den durchgeführten Interventionen einige erhebliche Konzentrationsänderungen der Metaboliten und Lipoproteine im Vergleich zu den Referenzproben beobachtet. Insbesondere durch das Auftauen und die erneute Messung bereits präparierter Proben in NMR-Tubes wurden sehr starke Veränderungen festgestellt. Die bestimmten Konzentrationen lagen deutlich unterhalb der Konzentrationen der Standardproben. Dies deutete auf einen möglichen Verlust der Substanzen beispielsweise durch eine Fällungsreaktion hin. Eine solche Intervention mit deutlichen Abweichungen stellt keine Vergleichbarkeit dar und sollte daher vermieden werden. Auch bei den mehrmaligen Gefrier-Auftau-Zyklen wurden einige verringerte Konzentrationen bestimmt, die auf eine Fällung hindeuteten. Die Abweichungen waren allerdings geringer als bei den aufgetauten NMR-Tubes. Bereits in anderen Arbeiten wurde der erhebliche Einfluss von Gefrier-Auftau-Zyklen auf das Lipidprofil evaluiert. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie von Loo *et al.* wurden verringerte Konzentrationen der Triglyzeride sowie einiger LDL-Fraktionen der Cholesterine nach Gefrier-Auftau-Zyklen nachgewiesen (Loo *et al.* 2020). In einer anderen Studie wurde der Einfluss mehrmaliger Gefrier-Auftau-Zyklen analysiert. Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden auch hier erhöhte IDL-Parameter der Partikel, Cholesterine und des ApoB bestimmt. Weiterhin wurden gestiegene Serumkonzentrationen der VLDL-Fraktionen der Cholesterine (VLDL-4 FC, VLDL-5 FC sowie VLDL-4 Chol) sowie reduzierte Level für HDL-4 Chol und LDL-4 PL quantifiziert (Wang *et al.* 2019). Insgesamt sollten daher Interventionen wie das Einfrieren und erneute Auftauen von Blutproben äußerst kritisch sowie mit enormer Sorgfalt betrachtet

werden und sofern möglich, für die Analyse im Bereich der Metabolomics-Forschung vermieden werden. Außerdem sollten die präparierten Proben in der Messsequenz nach Möglichkeit gekühlt gelagert werden. Die Veränderungen der Konzentrationen waren bei den Proben, die bei 27 °C gelagerten wurden, im Vergleich zu den bei 6 °C gelagerten Proben ausgeprägter. Dennoch wurden auch bei den Proben, die in der Messsequenz gekühlt gelagert wurden, einige Veränderungen der Konzentrationen bestimmt. Ähnliche Untersuchungen wurden auch von Loo *et al.* durchgeführt. Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls verringerte Level der Triglyzeride in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur bestimmt. Gegensätzlich wurden aber auch verringerte Konzentrationen von Cholesterin sowie erhöhte Konzentrationen der Apolipoproteine nachgewiesen. Auch hier waren die beobachteten Effekte bei einer Lagerung bei Raumtemperatur im Vergleich zu einer Kühlung ausgeprägter (Loo *et al.* 2020). Die Kenntnis möglicher kritischer Parameter ist für die Analyse und Datenauswertung von Metabolomics-Studien sehr wichtig. Aus diesem Grund sollten die Proben möglichst randomisiert analysiert werden, um eine Trennung verschiedener Probegruppen aufgrund der Abfolge der Messsequenz zu vermeiden (Dunn *et al.* 2012). Auch bei der Zentrifugation der Plasmaproben nach drei Stunden wurden einige Veränderungen festgestellt. Diese waren aber im Vergleich zu anderen Interventionen geringer. Trotzdem sollten, wenn möglich, die Probenpräparation nach SOP durchgeführt und die Plasmaproben umgehend zentrifugiert werden. Sofern eine Einhaltung dieses Verfahrens nicht möglich ist, sollten die Proben einer Studie identisch aufgearbeitet werden. Insbesondere ist bei einer Abweichung vom Aufarbeitungsprotokoll eine genaue Dokumentation wichtig.

5.1.6 Stabilisierung mit TROLOX

Gefrier-Auftau-Zyklen haben einen erheblichen Einfluss auf das metabolische Profil (Loo *et al.* 2020). Insbesondere das Auftauen bereits präparierter Proben in NMR-Tubes zeigte bei einer erneuten NMR-spektroskopischen Analyse ein verändertes Lipidprofil. Besonders markant waren die Reduktionen der Lipidkonzentrationen bei LiHeparin-Proben von Probanden mit ausgeprägtem Lipidprofil. Im Folgenden wurde daher versucht, das Lipidprofil zu stabilisieren. Hierfür wurde TROLOX verwendet. Dieses Tocopherol-Derivat wird als Antioxidationsmittel eingesetzt (Hajmoussa *et al.* 2017). Serum, EDTA- und LiHeparin-Plasma von Proband 1 und Proband 2 wurden NMR-spektroskopisch analysiert. (A) Neben Proben ohne Zugabe des Antioxidans TROLOX wurde dieses (B) vor dem Einfrieren zu der Serum- oder Plasmaprobe addiert. (C) Weiterhin wurde TROLOX vor der Messung zusammen mit dem Puffer der Probe hinzugegeben. Die Konzentrationen der mittels IVDr quantifizierten Metaboliten und Lipoproteine wurden entsprechend der Varianzen skaliert und der Scoreplot der PCA ist in Abbildung 5-16 A dargestellt.

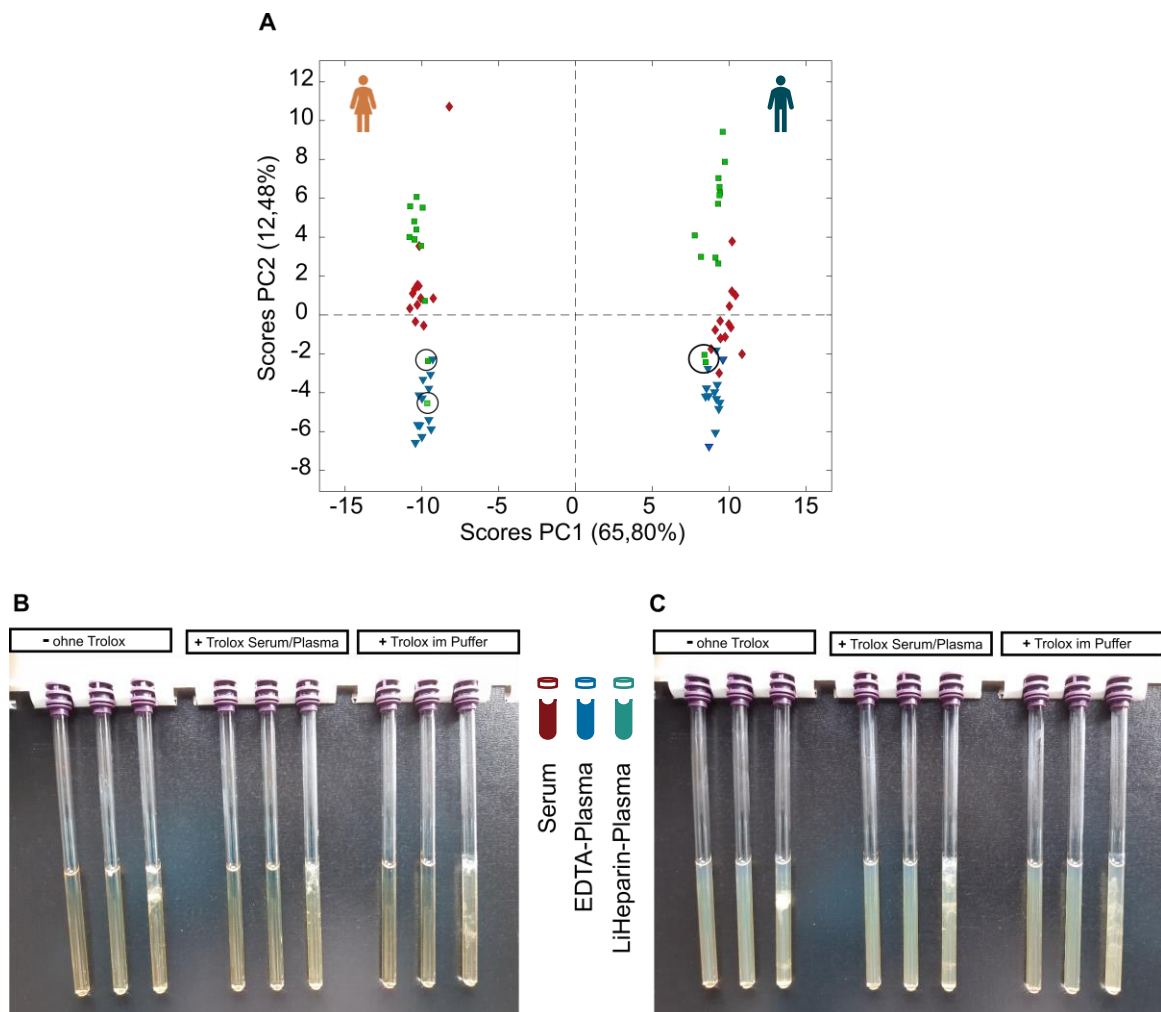


Abbildung 5-16: Stabilisierung des Serumlipidprofils durch das Antioxidationsmittel TROLOX. Scoreplot (A) zeigt eine Separierung der Probanden entlang der PC1 sowie intraindividuell eine Trennung in die Bluttypen Serum (rot), EDTA- (blau) und LiHeparin-Plasma (grün). Proben, die trotz Zugabe des Antioxidans TROLOX nach dem erneuten Auftauen eine deutliche Veränderung im metabolischen Profil zeigen, sind zusätzlich umkreist. Ein Niederschlag ist nach dem Einfrieren und Auftauen der präparierten NMR-Tubes für die LiHeparin-Proben für den Probanden 1 (B) und Probanden 2 (C) unabhängig von der TROLOX-Zugabe erkennbar.

Zunächst war eine deutliche Separierung der interindividuellen Unterschiede der beiden Probanden entlang der PC1, die eine Varianz von 65,80% erklärte, erkennbar. Entlang der PC2 mit einer Varianz von 12,48% zeigte sich intraindividuell eine Gruppierung entsprechend der analysierten Bluttypen. Bei beiden Probanden waren die Serumproben (rot) zwischen den LiHeparin- (grün) und EDTA-Proben (blau) angeordnet. Bei allen drei Bluttypen wurden einerseits Proben unmittelbar gemessen und andererseits nach Gefrier-Auftau-Zyklen. Im Wesentlichen war eine intraindividuelle Gruppierung der einzelnen Bluttypen erkennbar. Lediglich für einige LiHeparin-Proben (grün) wurde für beide Probanden eine Verschiebung entlang der PC2 sichtbar. Dabei handelte es sich um LiHeparin-Proben mit Gefrier-Auftau-Zyklen. Dies bestätigte vorherige Ergebnisse, dass der Einfluss des Einfrierens und Auftauens bei LiHeparin-Plasma besonders prägnant ist und im Scoreplot einer PCA, anders als für Serum und EDTA-Plasma, erkennbar war. Durch die Zugabe des Antioxidationsmittels TROLOX wurde versucht eine Stabilisierung der Proben zu erzielen. Die im Scoreplot der PCA verschobenen Proben, die zusätzlich

umkreist sind, enthielten das Antioxidationsmittel TROLOX. Sowohl die Addition von TROLOX zu der Probe vor dem Einfrieren als auch die Zugabe zusammen mit dem IVDr Puffer erzielten keine Stabilisierung der Proben. Die Proben waren weiterhin entlang der PC2 verschoben und clusterten nicht mit den LiHeparin-Proben ohne Gefrier-Auftau-Zyklus. Der Einfluss des Gefrier-Auftau-Zyklus auf die LiHeparin-Proben wurde bei der Betrachtung der NMR-Tubes, besonders deutlich (Abbildung 5-16 B + C). In den LiHeparin-Proben beider Probanden war nach dem erneuten Auftauen mit und ohne Zugabe von TROLOX eine deutliche Trübung und ein Niederschlag erkennbar. Die deutliche Verschiebung im Scoreplot lässt sich durch eine Fällung, die optisch erkennbar war, erklären. Diese Reaktion ließ sich auch durch die Zugabe von TROLOX nicht verhindern und die Proben konnten nicht ausreichend stabilisiert werden.

5.2 COVID-19 Studien

5.2.1 Metabolisches Profil intensivmedizinischer COVID-19 Patienten

COVID-19 ist eine hochinfektiöse, virale Atemwegserkrankung verursacht durch den Erreger SARS-CoV-2, der Anfang 2020 eine globale Pandemie auslöste. Bei schweren Krankheitsverläufen können neben der Lunge eine Vielzahl weiterer Organe betroffen sein, sodass Multiorganversagen eine häufige Todesursache ist. Aufgrund der Neuartigkeit sind die molekularen Mechanismen und die Wirkungsweise des Erregers im Organismus noch nicht vollständig erforscht (Hu et al. 2021). Entsprechende Kenntnisse sind für die erfolgreiche prognostische und therapeutische Behandlung sowie die Entwicklung von Medikamenten und Impfstoffen aber essentiell. Im Folgenden wurde daher das metabolische Profil von intensivmedizinisch behandelten COVID-19 Patienten analysiert. Einerseits wurde dieses mit einer Kontrollkohorte gesunder Probanden verglichen. Andererseits wurde zudem eine Differenzierung zu einer Patientenkohorte mit kardiogenem Schock (engl. *cardiogenic shock*, CS), die im selben Zeitraum auf der Intensivtherapiestation (ITS) betreut wurden, vorgenommen. Die Serumproben wurden mittels IVDr Verfahren analysiert und die quantifizierten Metaboliten und Lipoproteine zunächst entsprechend der Varianzen skaliert und anschließend eine PCA durchgeführt (Abbildung 5-17).

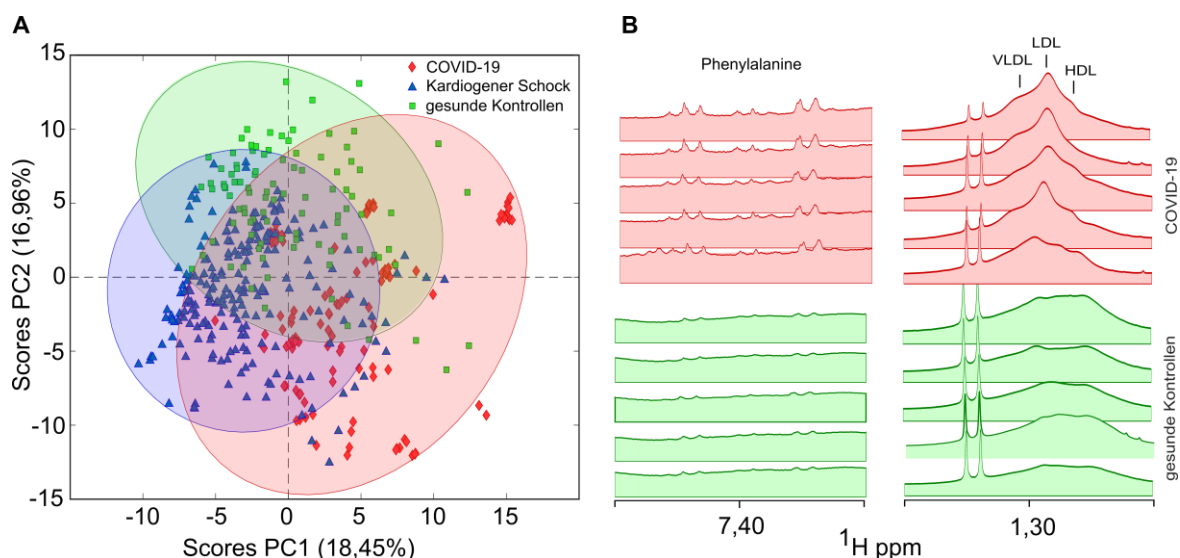


Abbildung 5-17: Differenzierung zwischen intensivmedizinisch behandelten Patienten mit COVID-19 oder kardiogenem Schock im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Scoreplot (A) einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*, PCA) mit Ellipsen, die die 95%-Konfidenzintervalle andeuten, zeigt eine partielle Separierung der COVID-19 Proben (rot), der Proben von Patienten mit kardiogenem Schock (blau) und der gesunden Kontrollen (grün). In Ausschnitten von jeweils vier 1D ^1H NOESY-Spektren (B) der COVID-19 Patienten und gesunden Kontrollen sind bereits optisch Unterschiede im Lipidprofil (1,20 bis 1,40 ppm) und für die Aminosäure Phenylalanine (7,30 bis 7,50 ppm) ersichtlich.

Der Scoreplot der PCA (Abbildung 5-17 A) zeigte eine Differenzierung zwischen COVID-19 (rot), CS-Patienten (blau) und gesunden Kontrollen (grün). Die PC1 erklärte eine Varianz von 18,45% und separiert im Wesentlichen COVID-19 Patienten von den beiden anderen

Kohorten. Entlang der PC2 mit einer erklärten Varianz von 16,96% wurden die gesunden Kontrollen und die intensivmedizinisch betreuten Patienten mit kardiogenem Schock differenziert. Ausschnitte der 1D ^1H NOESY-Spektren bei einer chemischen Verschiebung von 1,20 bis 1,40 ppm sowie von 7,30 bis 7,50 ppm sind in Abbildung 5-17 B exemplarisch für jeweils vier COVID-19 Patienten (rot) und gesunde Kontrollen (grün) gezeigt. Die typischen Signale der Lipoproteine VLDL, LDL und HDL werden bei einer chemischen Verschiebung zwischen 1,20 und 1,40 ppm sichtbar (Suna et al. 2007). Die deutlich markantere Ausprägung des Lipidprofil der SARS-CoV-2 Infizierten war bereits optisch anhand repräsentativer 1D ^1H NOESY-Spektren sichtbar. Ähnliches wurde auch für die Aminosäure Phenylalanine bei einer chemischen Verschiebung zwischen 7,20 und 7,40 ppm gezeigt.

Anschließend wurde das Metabolitenprofil der COVID-19 Patienten separat mit den beiden anderen Kohorten betrachtet. Die PCA für den Vergleich zwischen COVID-19 (rot) und gesunden Kontrollen (grün) ist in Abbildung 5-18 dargestellt.

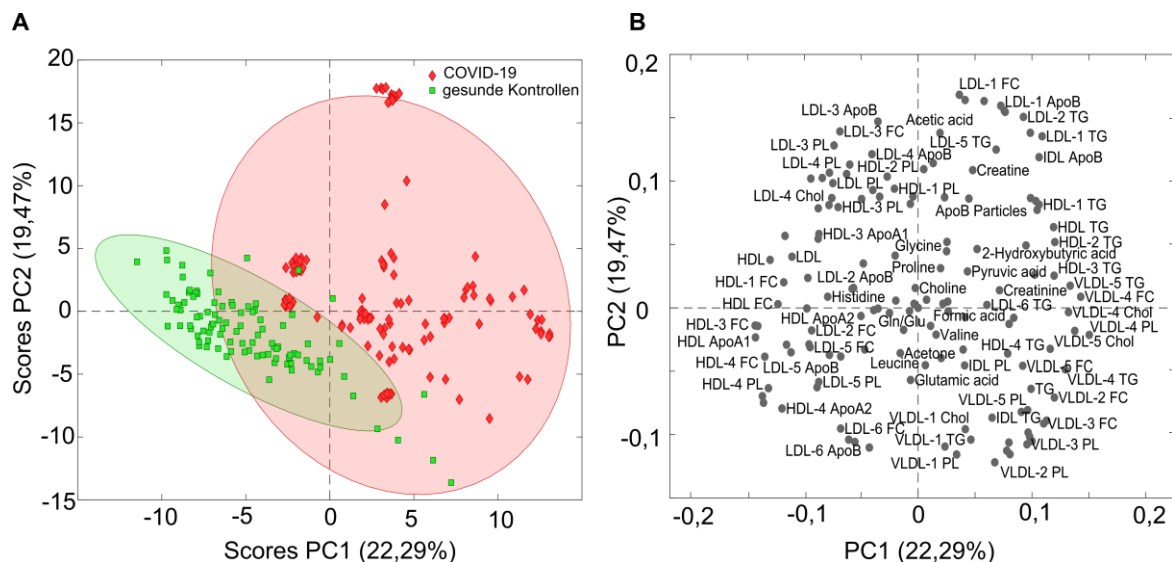


Abbildung 5-18: Vergleich zwischen intensivmedizinisch behandelten COVID-19 Patienten und gesunden Kontrollen. Scoreplot (A) einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*, PCA) mit Ellipsen, die die 95%-Konfidenzintervalle andeuten, zeigt eine Separierung der COVID-19 Proben (rot) und der Proben von gesunden Kontrollen (grün). Der Loadingplot (B) macht ein verändertes Lipidprofil als Grundlage der Trennung deutlich.

Eine nahezu vollständige Separierung zwischen den beiden Gruppen COVID-19 und den gesunden Kontrollen war im Scoreplot (Abbildung 5-18 A) entlang der PC1 (22,29%) und PC2 (19,47%) erkennbar. Entsprechend des Loadingplots (Abbildung 5-18 B) bewirkten HDL- und VLDL-Parameter eine Differenzierung entlang der PC1, während vorzugsweise LDL- sowie IDL- und VLDL-Fraktionen die Trennung der PC2 erklärten. Das metabolische Profil wird durch äußere Umwelteinflüsse wie Medikation, Ernährung und Bewegung stark beeinflusst (Bollard et al. 2005; Dettmer et al. 2007). Die Lebenssituation der gesunden Kontrollkohorte im Vergleich zu den intensivmedizinisch betreuten, schwerkranken COVID-19 Patienten ist augenscheinlich sehr verschieden. Entsprechend nachvollziehbar

ist das deutlich verschiedene Metaboliten- und Lipoproteinprofil. Eine Vergleichskohorte unter ähnlichen Umweltbedingungen ist daher umso wichtiger. Die analysierten CS-Patienten wurden im selben Zeitraum auf der ITS des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Standort Lübeck behandelt. Auch diese Patienten waren schwerkrank und die äußeren Einflüsse auf die Physiologie ähnelten denen der COVID-19 Patienten. Mögliche Unterschiede in den analysierten Metaboliten und Lipoproteinen lassen daher vorzugsweise Rückschlüsse auf die Krankheit *per se* und deren molekularen Mechanismus zu. Kritisch sollte allerdings berücksichtigt werden, dass es sich dennoch um zwei verschiedene Krankheitsbilder handelt. Während COVID-19 eine Atemwegserkrankung ist, die bei schweren Krankheitsverläufen meist mit akutem Lungenversagen einhergeht, ist Herzinfarkt auf der anderen Seite eine kardiale Erkrankung.

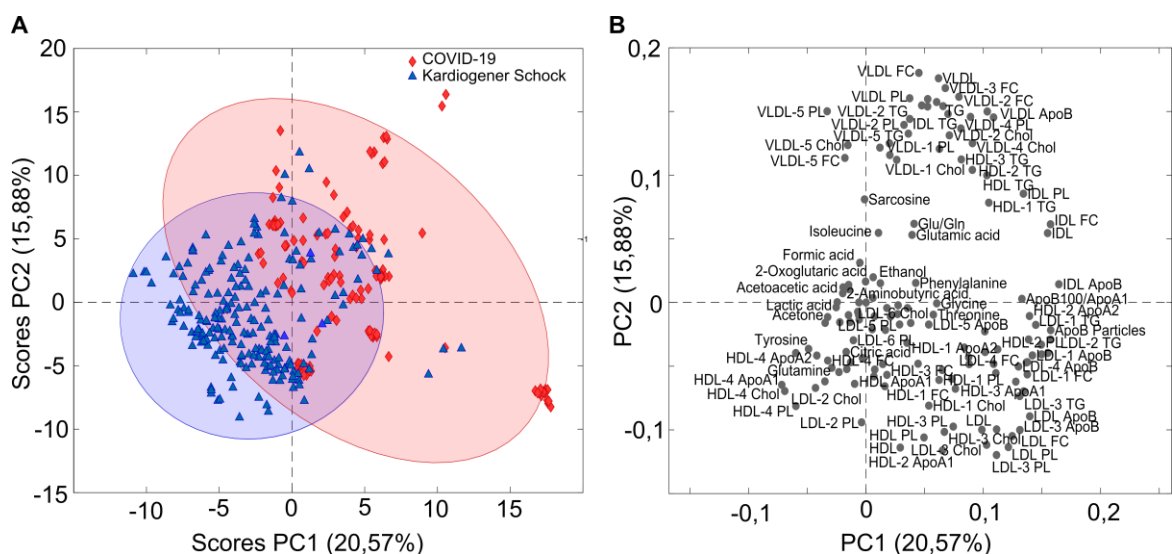


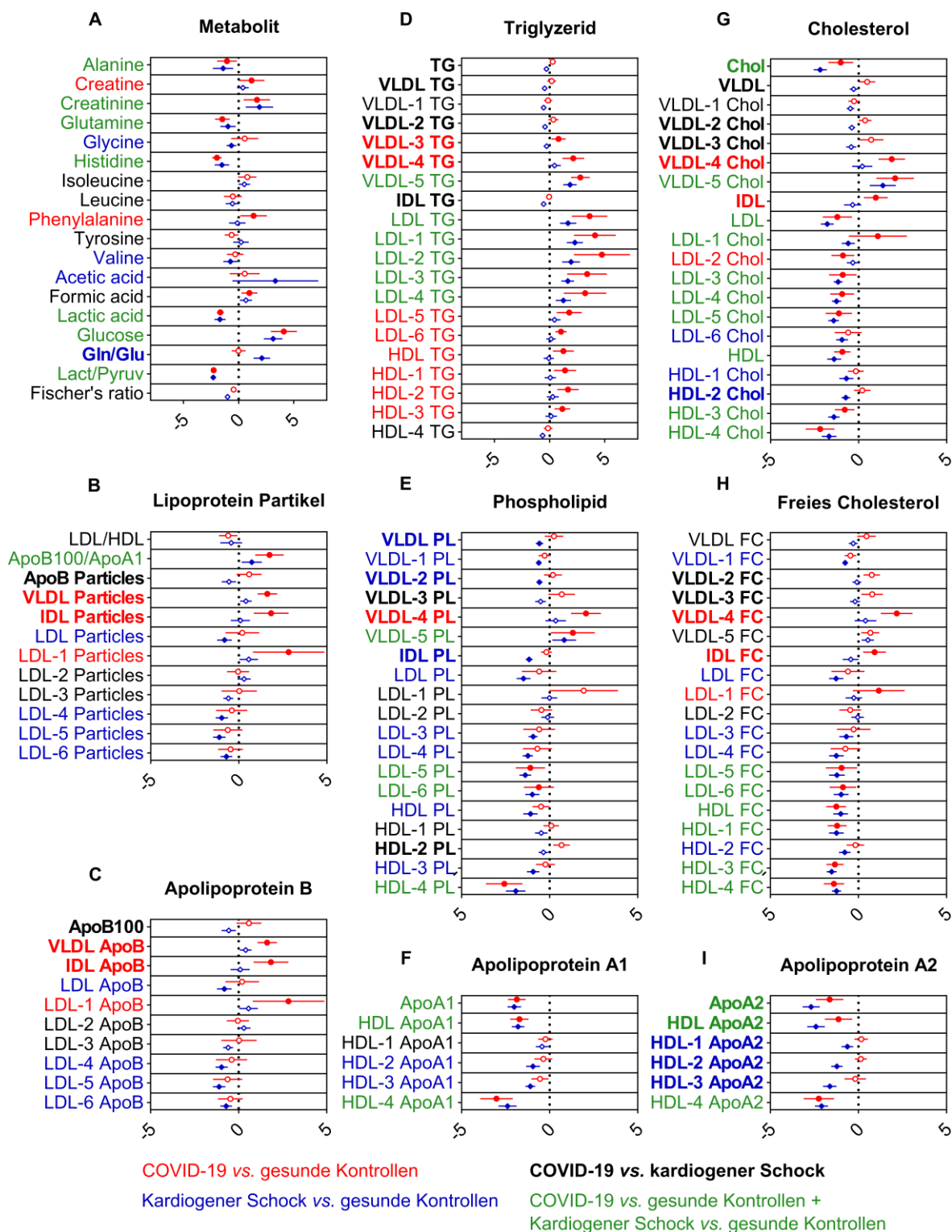
Abbildung 5-19: Vergleich zwischen zwei intensivmedizinisch behandelten Kohorten mit COVID-19 und kardiogenem Schock. Scoreplot (A) einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*, PCA) mit Ellipsen, die die 95%-Konfidenzintervalle andeuten, zeigt eine partielle Separierung der COVID-19 Proben (rot) und der Proben von intensivmedizinisch betreuten Patienten mit kardiogenem Schock (blau). Der Loadingplot (B) macht ein verändertes Lipidprofil als Grundlage der Trennung deutlich.

Der Scoreplot der entsprechend der Varianzen skalierten IVDr Daten der COVID-19 (rot) und CS-Patienten (blau) zeigte eine deutliche, aber nicht vollständige Separierung zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 5-19 A). Im Loadingplot (Abbildung 5-19 B) wurde deutlich, dass HDL- und LDL-Fraktionen eine Trennung entlang der PC1 mit einer erklärten Varianz von 20,57% ausmachten und VLDL- und HDL- sowie LDL-Fraktionen die Gruppierung entlang der PC2 (15,88%) erklärten.

Zusammenfassend wurden durch Anwendung der PCA metabolische Unterschiede zwischen schwerkranken Patienten mit COVID-19 und gesunden Kontrollen, aber auch zwischen COVID-19 und intensivmedizinisch behandelten Patienten mit kardiogenem Schock erarbeitet. Insbesondere das Lipidprofil war zwischen den Kohorten deutlich verändert und deutet auf eine ausgeprägte Dyslipidämie mit erhöhtem kardiovaskulärem

Risiko hin (Nordestgaard et al. 2007; Nordestgaard & Tybjaerg-Hansen 1992; Nordestgaard & Varbo 2014).

Im Folgenden wurden daher die einzelnen Metabolit- und Lipidparameter der IVDr Blutanalyse im Detail betrachtet (Abbildung 5-20).



Beschriftung der Abbildung folgt auf der nächsten Seite.

Abbildung 5-20: Detaillierte Betrachtung der analysierten Parameter verdeutlichen ein spezifisches Metabolitenprofil für die intensivmedizinischen Kohorten. Die vertikale Linie verdeutlicht den Mittelwert der gesunden Kontrollen, der als Referenzwert kalkuliert wurde. Die relativen Fehler wurden für jeden Parameter in Bezug auf die Referenz berechnet. Hierfür wurden die intraindividuellen Mittelwerte der Patienten über alle analysierten Zeitpunkte bestimmt. Der Mittelwert der relativen Fehler ist für Patienten mit COVID-19 (roter Kreis) und kardiogenem Schock (blaue Raute) zusammen mit den Standardabweichungen dargestellt. Ausgefüllte Kreise und Rauten verdeutlichen signifikante Änderungen. Diese wurden mit einem multiplen t-Test mit einer Korrektur für multiples Testen nach Benjamini, Krieger und Yekutieli mit einer Falscherkennungsrate (engl. *false discovery rate*, FDR) von 1% bestimmt. Drei Vergleiche wurden durchgeführt, wobei signifikante Parameter mit farbiger Schrift hervorgehoben sind: (1) COVID-19 vs. gesunde Kontrollen (rot), (2) kardiogener Schock vs. gesunde Kontrollen (blau), (3) COVID-19 vs. kardiogener Schock (fett gedruckt). Zusätzlich sind Parameter, die für die beiden Vergleiche COVID-19 vs. gesunde Kontrollen und kardiogener Schock vs. gesunde Kontrollen signifikant verändert waren, grün dargestellt. Fischer's ratio = (Valine + Leucine + Isoleucine)/(Phenylalanine + Tyrosine) (Benjamini et al. 2006; Kimhofer et al. 2020).

Die intraindividuellen Mittelwerte für jeden Parameter wurden berechnet und anschließend die relativen Fehler im Vergleich zu den gesunden Kontrollen kalkuliert. In Abbildung 5-20 stellt daher die vertikale Linie den Referenzwert der gesunden Kontrollen dar. Graphisch werden die relativen Abweichungen für zwei Vergleiche betrachtet. Einerseits ist eine Differenzierung der gesunden Kontrollen zu Patienten mit COVID-19 und andererseits zu CS-Patienten dargestellt. Die Mittelwerte der relativen Fehler der COVID-19 Patienten sind mit einem roten Kreis, während entsprechend die der CS-Patienten mit einer blauen Raute gekennzeichnet sind. Signifikante Änderungen sind mit ausgefüllten Kreisen bzw. Rauten hervorgehoben. Zusätzlich sind die berechneten Standardabweichungen in demselben Farbschema dargestellt. Neben den betrachteten relativen Fehlern der Vergleiche COVID-19 und gesunde Kontrollen sowie CS-Patienten und gesunde Kontrollen wurden multiple t-Tests mit einer Korrektur für multiples Testen nach Benjamini, Krieger und Yekutieli (FDR = 1%) durchgeführt (Benjamini et al. 2006). Hier wurden drei verschiedene Vergleiche betrachtet, deren Ergebnisse ebenfalls in Abbildung 5-20 dargestellt sind: (1) Signifikante Parameter des Vergleichs zwischen COVID-19 Patienten und gesunden Kontrollen sind mit einer roten Schriftfarbe gekennzeichnet. (2) Analog sind signifikante Parameter des Vergleichs zwischen CS-Patienten und gesunden Kontrollen mit einer blauen Schriftfarbe hervorgehoben. Zusätzlich sind Parameter, die sowohl für den Vergleich COVID-19 zu gesunden Kontrollen als auch für CS-Patienten mit gesunden Kontrollen signifikant verschieden waren, mit einer grünen Schriftfarbe hervorgehoben. (3) Parameter, die für den Vergleich zwischen COVID-19 Patienten und CS-Patienten signifikant waren, sind mit fetter Schrift markiert.

Bei der Betrachtung der relativen Fehler der einzelnen Parameter zeigte sich ein deutlich verändertes metabolisches Profil sowohl für Patienten mit COVID-19 (rote Kreise) als auch für CS-Patienten (blaue Rauten) im Vergleich zu der Referenzkohorte der gesunden Kontrollen (vertikale Linie). Insbesondere wurde ein verändertes Lipidprofil deutlich, welches im Detail betrachtet wurde.

Eine Vielzahl von Metaboliten und Lipoproteine waren sowohl für den Vergleich zwischen COVID-19 Patienten und gesunden Kontrollen als auch für den Vergleich zwischen CS-Patienten und gesunden Kontrollen signifikant verschieden (grüne Schriftfarbe). Die

Konzentrationen der Aminosäuren Alanine, Glutamine und Histidine waren bei den beiden intensivmedizinisch behandelten Kohorten im Vergleich zu der gesunden Referenzkohorte reduziert. Zusätzlich waren die Konzentrationen von Lactic acid sowie das Lactic acid-zu-Pyruvic acid-Verhältnis herabgesetzt, während jene von Creatinine und Glucose bei den ITS-Kohorten erhöht waren (Abbildung 5-20 A). Weiterhin wurden deutlich erhöhte Konzentrationen der Triglyzeride bei den ITS-Kohorten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen deutlich. Insbesondere zeigten sich signifikante Erhöhungen für VLDL-5 TG sowie LDL TG und nahezu alle Subfraktionen (LDL-1 TG bis LDL-4 TG) (Abbildung 5-20 D). Ein inverser Trend wurde für eine Vielzahl von Parameter der Cholesterin- und Phospholipid-Fraktion deutlich. Während die Level von VLDL-5 Chol und VLDL-5 PL bei beiden ITS-Kohorten erhöht waren, waren die Konzentrationen von Chol sowie LDL und deren Subfraktionen (LDL-1 Chol, LDL-3 Chol bis LDL-5 Chol) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen verringert. Dies zeigte sich auch für die höheren Subfraktionen der Phospholipide (LDL-5 PL und LDL-6 PL) sowie der freien Cholesterine (LDL-5 FC und LDL-6 FC). Reduzierte Konzentrationen zeigten sich für HDL-Parameter der (freien) Cholesterine (HDL und HDL FC) sowie für die höheren Subfraktionen der Cholesterine und Phospholipide (HDL-3 Chol und HDL-4 Chol, HDL-3 FC und HDL-4 FC sowie HDL-4 PL) (Abbildung 5-20 E + G + H). Das Verhältnis ApoB100-zu-ApoA1 war bei den intensivmedizinisch behandelten Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht (Abbildung 5-20 B), während die Konzentrationen von ApoA1 und ApoA2 erniedrigt waren. Ähnliches zeigte sich auch für die HDL-Fraktionen (HDL ApoA1 und HDL ApoA2) sowie deren höhere Subfraktionen (HDL-4 ApoA1 und HDL-4 ApoA2) (Abbildung 5-20 F + I). Bei den genannten Parametern handelt es sich um Substanzen, die für die beiden Kohorten der ITS im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant verändert waren. Möglicherweise handelt es sich daher um Metaboliten und Lipoproteine, die den äußeren Einfluss der intensivmedizinischen Behandlung widerspiegeln und nicht zwangsläufig auf den molekularen Mechanismus einer Krankheit zurückzuführen sind.

Daher wurden im Folgenden Parameter betrachtet, die lediglich für den Vergleich der intensivmedizinisch betreuten COVID-19 Patienten zu den gesunden Kontrollen (rote Schriftfarbe) signifikant verändert waren. Bei den Metaboliten zeigten sich dabei höhere Konzentrationen für Creatine und Phenylalanine (Abbildung 5-20 A). Deutlich erhöhte Konzentrationen bei COVID-19 Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen wurden weiterhin für einige Fraktionen der Triglyzeride deutlich. Insbesondere sind die höheren VLDL- und LDL-Fraktionen (VLDL-3 TG und VLDL-4 TG sowie LDL-5 TG und LDL-6 TG) sowie HDL TG und niedere Subfraktionen (HDL-1 TG bis HDL-3 TG) zu nennen (Abbildung 5-20 D). Für (freie) Cholesterine und Phospholipide wurden höhere Werte für die VLDL-4 Fraktion (VLDL-4 Chol, VLDL-4 FC und VLDL-4 PL), LDL-1 FC sowie IDL und IDL FC quantifiziert, aber geringere Konzentrationen für LDL-2 Chol (Abbildung 5-20 E + G + H).

Außerdem waren die VLDL- und IDL-Parameter der Lipoproteinpartikel und ApoB (VLDL Particles und IDL Particles sowie VLDL ApoB und IDL ApoB) sowie deren LDL-Subfraktion (LDL-1 Particles und LDL-1 ApoB) bei COVID-19 Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht (Abbildung 5-20 B + C).

Analog wurde der Vergleich der CS-Patienten mit den gesunden Kontrollen durchgeführt, deren signifikante Parameter in blauer Schriftfarbe hervorgehoben sind. Entsprechend wurden im Bereich der Metaboliten reduzierte Konzentrationen der Aminosäuren Glycine und Valine bestimmt, während Acetic acid und das Verhältnis von Glutamine-zu-Glutamat bei CS-Patienten erhöht war (Abbildung 5-20 A). Reduzierte Level zeigten sich für den Vergleich zwischen CS-Patienten und gesunden Kontrollen bei LDL-6 Chol sowie für die HDL-Fraktionen HDL-1 Chol und HDL-2 Chol (Abbildung 5-20 G). Deutlich minimierte Konzentrationen wurden auch für IDL PL und VLDL PL (Abbildung 5-20 E) bestimmt. Außerdem waren weitere Parameter der Phospholipide und freien Cholesterine reduziert. Dies zeigte sich bei den niederen Subfraktionen von VLDL (VLDL-1 PL und VLDL-2 PL sowie VLDL-1 FC), den LDL-Parametern (LDL PL und LDL FC) sowie einigen Subfraktionen (LDL-3 PL und LDL-4 PL sowie LDL-3 FC und LDL-4 FC). Neben HDL PL waren auch die Subfraktionen HDL-3 PL sowie HDL-2 FC bei CS-Patienten verringert (Abbildung 5-20 E + H). Auffällig war zudem die Reduktion der HDL-Subfraktionen der Apolipoproteine (HDL-2 ApoA1 und HDL-3 ApoA1 sowie HDL-1 ApoA2 bis HDL-3 ApoA2) (Abbildung 5-20 F + I). Die LDL-Fraktionen der Lipoproteinpartikel und ApoB (LDL Particles und LDL ApoB) sowie deren höhere Subfraktionen (LDL-4 Particles bis LDL-6 Particles sowie LDL-4 ApoB bis LDL-6 ApoB) waren bei CS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen ebenfalls verringert (Abbildung 5-20 B + C).

Besonders hervorzuheben sei schlussendlich der Vergleich der beiden schwerkranken intensivmedizinisch behandelten Patientenkohorten (fett gedruckte Schrift). Sowohl die COVID-19 Patienten als auch die CS-Patienten wurden im selben Zeitraum auf der ITS betreut, sodass die äußeren Umweltfaktoren, die das Metabolom stark beeinflussen, anders als bei den Vergleichen zu den gesunden Kontrollen sehr ähnlich sind. Signifikante Veränderungen zeigten sich bei den Metaboliten für das Verhältnis zwischen den Aminosäuren Glutamine und Glutamic acid bei dem Vergleich zwischen COVID-19 und CS-Patienten (Abbildung 5-20 A). Weiterhin waren veränderte Konzentrationen für TG und Chol erkennbar. Auch die Konzentrationen der IDL- und VLDL-Parameter der Triglyzeride, Cholesterine und Phospholipide (IDL TG und VLDL TG, IDL und VLDL, IDL PL und VLDL PL sowie IDL FC) sowie deren Subfraktionen (VLDL-2 TG bis VLDL-4 TG, VLDL-2 Chol bis VLDL-4 Chol, VLDL-2 PL bis VLDL-4 PL und VLDL-2 FC bis VLDL-4 FC) unterschieden sich signifikant. Die HDL-2 Subfraktionen der Cholesterine und Phospholipide waren zusätzlich verändert (Abbildung 5-20 D + E + G + H). Besonders auffällig waren die Differenzierungen bei ApoA2 sowie deren HDL-Fraktionen (HDL ApoA2, HDL-1 ApoA2 bis

HDL-3 ApoA2) (Abbildung 5-20 I). Die Lipoproteinpartikel von ApoB, VLDL und IDL (ApoB Particles, VLDL Particles und IDL Particles) sowie ApoB100 und die VLDL- und IDL-Fraktion von ApoB (VLDL ApoB und IDL ApoB) unterschieden sich signifikant zwischen den ITS-Kohorten (Abbildung 5-20 B + C).

Zusammenfassend wurde im Einklang mit bereits publizierten Kohorten aus Spanien und Australien ein deutlich verändertes Lipidprofil der COVID-19 Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen identifiziert (Bruzzzone et al. 2020; Kimhofer et al. 2020; Masuda et al. 2021). Insbesondere erhöhte Triglyzerid-Level deuten auf einen Risikofaktor für Atherosklerose hin. Weiterführend wurde in der vorliegenden Arbeit ein Vergleich der COVID-19 Patienten zu ebenfalls schwerkranken, intensivmedizinisch betreuten Patienten mit kardiogenem Schock durchgeführt. Diese Dyslipidämie blieb in weiten Teilen bestehen, wobei insbesondere erhöhte Konzentrationen der Parameter IDL und kleinerer VLDL-Fraktionen das kardiovaskuläre Risiko der COVID-19 Patienten bestätigen (Borén et al. 2020; Nordestgaard & Tybjaerg-Hansen 1992; Saeed et al. 2018).

5.2.2 Zeitliche Betrachtung des metabolischen Profils

Die Probenakquise der intensivmedizinisch behandelten COVID-19 und CS-Patienten erfolgte kontinuierlich über einen Zeitraum von mehreren Tagen. Die Entwicklung des metabolischen Profils wurde daher im weiteren Verlauf betrachtet (Abbildung 5-21).

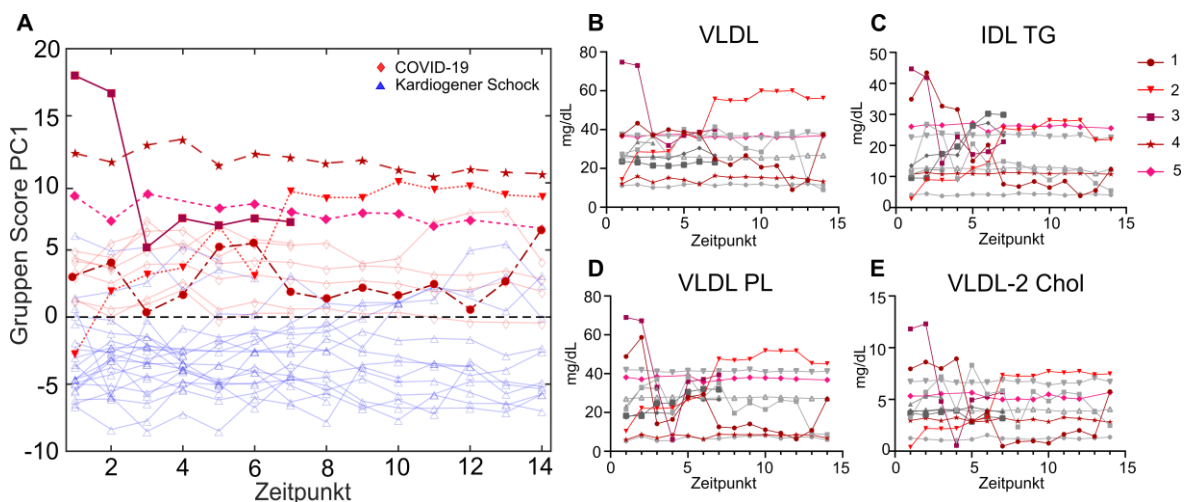


Abbildung 5-21: Zeitliche Betrachtung der intensivmedizinischen COVID-19 Patienten und Patienten mit kardiogenem Schock. Varianzanalyse-simultane Komponentenanalyse (engl. *analysis of variances-simultaneous component analysis*, ASCA) (A) zeigt unter Berücksichtigung aller mittels IVDr Verfahren quantifizierter Metaboliten und Lipoproteine eine Unterscheidung zwischen intensivmedizinisch behandelten Patienten mit COVID-19 (rot) und Patienten mit kardiogenem Schock (blau). Zeitverläufe einzelner Lipidfraktionen (B-E) machen spezifische Verläufe der COVID-19 Patienten deutlich.

Eine ASCA, die die zeitliche Komponente der Serumproben betrachtet, wurde für die beiden Kohorten COVID-19 (rot) und CS (blau) durchgeführt (Abbildung 5-21 A). Auch unter der Berücksichtigung des Studiendesigns und der kontinuierlichen Probenahme war die Separierung der beiden ITS-Kohorten über den analysierten Zeitraum ersichtlich. Dies deutete im Wesentlichen auf ein zeitlich konsistentes Lipidprofil während einer COVID-19

Erkrankung hin. Nichtsdestotrotz wurden von den analysierten Patienten mit COVID-19 einige markante Verläufe hervorgehoben, die hauptsächlich durch den Einfluss therapeutischer Maßnahmen erklärt werden. In Abbildung 5-21 B bis E sind vier Lipidparameter VLDL, IDL TG, VLDL PL und VLDL-2 Chol hervorgehoben. Für diese sind die zeitlichen Verläufe der COVID-19 Patienten individuell gezeigt. Bei den vier Substanzen handelt es sich um jene, die bei der Untersuchung der intensivmedizinischen Kohorten mittels multiplen t-Test signifikant waren (siehe 5.2.1). Bei der Betrachtung dieser vier Parameter wurden dieselben fünf Patienten wie in der ASCA hervorgehoben (Abbildung 5-21 A) und nummeriert. Die individuellen Krankheits- und Therapieverläufe wurden für die fünf Probanden exemplarisch herausgearbeitet. Patient 1 war zur Zeit der ITS-Behandlung 56 Jahre alt, männlich und hatte einen leicht erhöhten BMI von 28 kg/m². Das Lipidprofil des allergischen Asthmatikers veränderte sich während des Studienzeitraums deutlich. Die Abnahme der Lipidparameter war möglicherweise mit der zu diesem Zeitpunkt eingesetzten Dialyse assoziiert. Einige Wochen nach der Screeningphase ist dieser Patient verstorben. Patient 2 ist ebenfalls männlich, war zum Zeitpunkt der Analysen 64 Jahre alt und hatte einen normalen BMI von 25 kg/m². Dieser Patient wurde zuvor bereits in Frankreich behandelt. Dort bekam er eine Therapie mit Chloroquin. Die Beeinflussung des Lipidprofils durch den Einsatz von Chloroquin wurde bereits in wissenschaftlichen Studien bestätigt (Sachet et al. 2007). Bei Einschluss des Patienten in die Studienkohorte wurde das Chloroquin abgesetzt. In den Lipidprofilen in Abbildung 5-21 ist daraufhin ausgehend von äußerst niedrigen Lipidwerten eine Konzentrationszunahme für die gezeigten Parameter erkennbar. Patient 3 ist weiblich, war im Untersuchungszeitraum 47 Jahre alt und adipös (BMI > 30 kg/m²). Eine deutliche Reduktion der Lipidparameter zeigte sich für diesen Patienten. Der weibliche, normalgewichtige Patient 4 (BMI = 22 kg/m²) mit Parkinson war im Zeitraum der intensivmedizinischen Behandlung 77 Jahre alt und hatte einen stringenten Lipidverlauf auf niedrigem Niveau. Der 56-jährige, männliche, adipöse Patient 5 (BMI > 35 kg/m²) mit arterieller Hypertension hatte im Gegensatz dazu einen konstanten Verlauf mit hohen Lipidkonzentrationen. Anhand der Betrachtung der individuellen Krankheitsverläufe wurde eine Assoziation zwischen einem erhöhten Lipidprofil und dem BMI deutlich, wodurch der BMI als möglicher Risikofaktor für COVID-19 in Betrachtung gezogen werden sollte.

Abschließend wurden die zeitlichen Verläufe ausgewählter Lipoproteine der COVID-19 und CS-Patienten betrachtet (Abbildung 5-22).

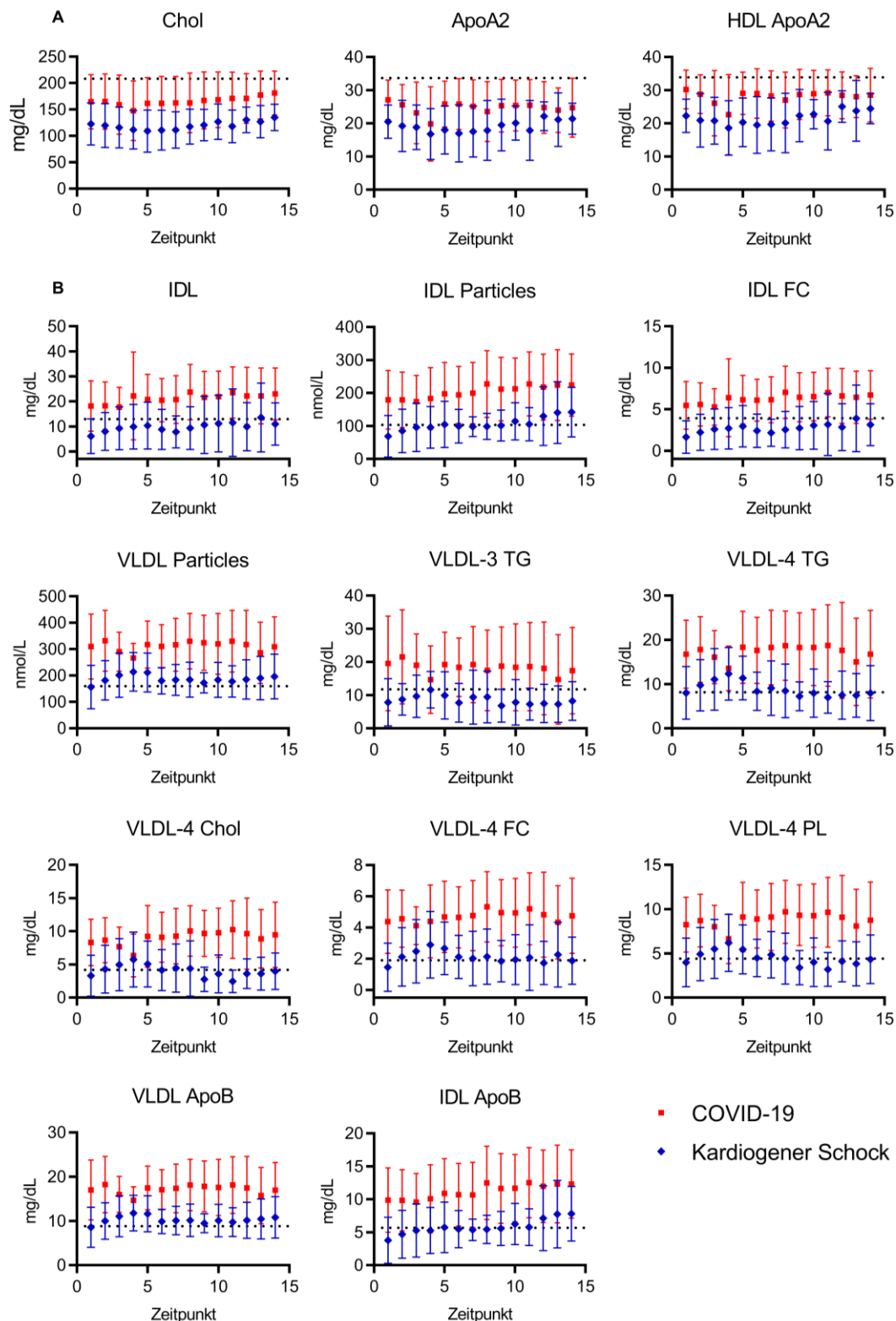


Abbildung 5-22: Betrachtung der gemittelten longitudinalen Verläufe der Patienten mit COVID-19 oder kardiogenem Schock für ausgewählte Parameter. Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentrationen ausgewählter Lipidparameter für COVID-19 (rot) und Patienten mit kardiogenem Schock (blau) zeigen eine Differenzierung über den zeitlichen Verlauf. Als Referenzwert ist der Mittelwert der gesunden Kontrollen als gestrichelte Linie eingefügt. In A sind Parameter aufgeführt, die bei einem multiplen t-Test mit einer Korrektur für multiples Testen nach Benjamini, Krieger und Yekutieli mit einer Falscherkennungsrate (engl. *false discovery rate*, FDR) von 1% für die folgenden drei Vergleiche signifikant waren: (1) COVID-19 vs. gesunde Kontrollen, (2) kardiogener Schock vs. gesunde Kontrollen und (3) COVID-19 vs. kardiogener Schock. In B sind analog alle signifikanten Lipidfraktionen für die Vergleiche COVID-19 vs. gesunde Kontrollen und COVID-19 vs. kardiogener Schock aufgeführt. Diese sind im Vergleich zu A, aber nicht für den Vergleich kardiogener Schock vs. gesunde Kontrollen signifikant (Benjamini et al. 2006).

In Abbildung 5-22 sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der Parameter für jeden Zeitpunkt der COVID-19 (rot) und CS-Patienten (blau) angegeben. Der Mittelwert der gesunden Kontrollen ist als gestrichelte Horizontale eingezeichnet. Die drei Lipidparameter Chol, ApoA2 und HDL ApoA2 (Abbildung 5-22 A) waren für die drei analysierten Vergleiche (COVID-19 vs. gesunde Kontrollen, CS vs. gesunde Kontrollen, COVID-19 vs. CS) mittels multiplen t-Test signifikant (siehe 5.2.1). Die Konzentrationen dieser Parameter waren bei den beiden intensivmedizinisch behandelten Kohorten über den gesamten zeitlichen Verlauf deutlich geringer im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Innerhalb der ITS-Kohorten hatten CS-Patienten sogar nochmals verringerte Level dieser Lipide als COVID-19 Patienten. In Abbildung 5-22 B sind weitere VLDL- und IDL-Fraktionen dargestellt. Gezeigt wurden Parameter, die für die Vergleiche COVID-19 und gesunde Kontrollen sowie COVID-19 und CS, aber nicht für CS und gesunde Kontrollen signifikant verschieden waren (siehe 5.2.1). Für alle gezeigten Lipidparameter waren die Serumkonzentrationen bei COVID-19 Patienten über den gesamten Zeitraum erhöht. Eine Veränderung während der COVID-19 Erkrankung wurde nicht deutlich, wodurch wiederum eine kontinuierlich anhaltende Dyslipidämie bei Patienten mit COVID-19 bestätigt wurde.

5.2.3 Schweregrad und Krankheitsstatus

Der Krankheitsverlauf und die Schwere einer COVID-19 Erkrankung ist hoch individuell. Während einige Infizierte lediglich milde oder asymptomatische Verläufe haben, erkranken andere Patienten stark und müssen intensivmedizinisch betreut werden (Hu et al. 2021). In Tabelle 5-4 ist eine entsprechend Einteilung der WHO gezeigt, mit welcher das Krankheitsbild anhand eines Scores differenziert werden kann (World Health Organization 2020).

Tabelle 5-4: Differenzierung des Schweregrades einer COVID-19 Erkrankung. Einteilung des Krankheitsbildes in acht Scores entsprechend ihrer klinischen Symptome und Therapien (World Health Organization 2020).

Patientenstatus	Beschreibung	Score
Nicht-infiziert	Keine klinischen oder virologischen Hinweise einer Infektion	0
Ambulanz	Ohne Aktivitätseinschränkungen	1
	Aktivitätseinschränkungen	2
Hospitalisierung mit milder Erkrankung	Hospitalisierung, keine Sauerstofftherapie	3
	Sauerstoffgabe über Maske oder Nasenbrille	4
Hospitalisierung mit schwerer Erkrankung	Nicht-invasive Beatmung oder <i>high-flow</i> Sauerstoffgabe	5
	Intubation oder mechanische Beatmung	6
	Beatmung + Organersatzverfahren - Pressors, Nierenersatztherapie, extrakorporale Membranoxygenierung (engl. <i>extracorporeal membrane oxygenation</i> , ECMO)	7
Tod	Tod	8

Im Folgenden wurden Blutproben von COVID-19 Erkrankten im aktiven Status, post-COVID-19 Proben sowie Proben von gesunden Kontrollen mittels NMR-Spektroskopie analysiert (siehe 4.6.3). Der PCA-Scoreplot der entsprechend der Varianzen skalierten und mittenzentrierten IVDr Daten zeigte eine partielle Separierung zwischen den COVID-19 Patienten (rot) und den gesunden Kontrollen (grün) (Abbildung 5-23).

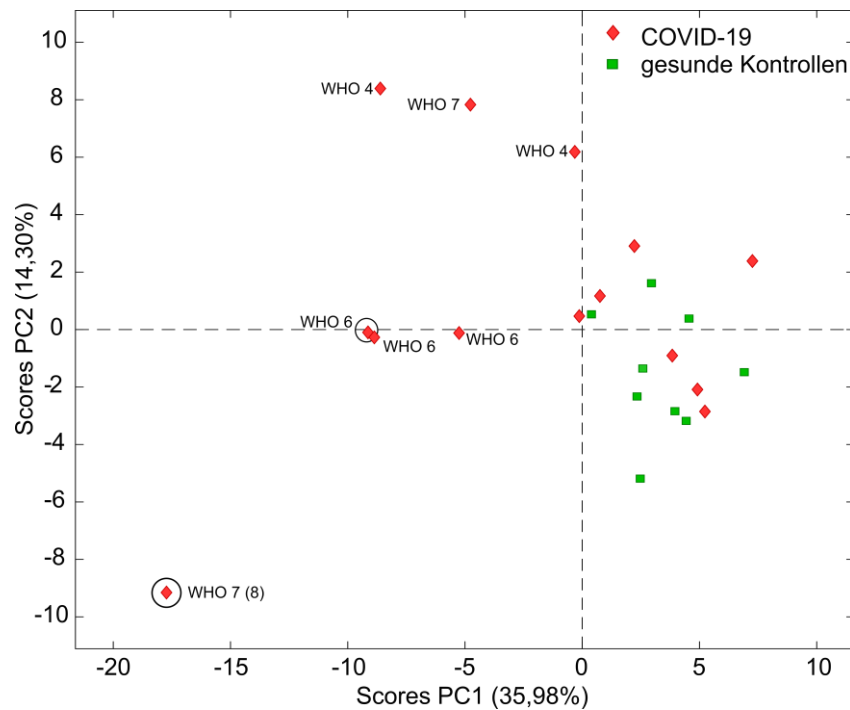


Abbildung 5-23: Betrachtung der Blutprofile von Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad einer COVID-19 Erkrankung. Scoreplot einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*, PCA) zeigt eine partielle Separierung der COVID-19 Proben und der gesunden Kontrollen in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung. Die Einteilung des Schweregrads ist entsprechend der Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organization*, WHO) für schwere Verläufe (WHO ≥ 4) angegeben. Aktive Krankheitsfälle sind zusätzlich umkreist.

Die PC1 erklärte dabei 35,98% der Varianz des Datensatzes und separiert maßgeblich zwischen den beiden Gruppen COVID-19 und gesunde Kontrollen. Insgesamt fiel auf, dass sich Blutproben von Patienten mit einem WHO-Score von mindestens vier, das heißt mit einem schweren Krankheitsverlauf, deutlich von den Proben der gesunden Kontrollen unterscheiden. Dabei differenzierten sowohl Proben im aktiven Status einer COVID-19 Erkrankung (mit Kreis markiert), also mit positiven RT-PCR-Test zum entsprechenden Zeitpunkt, als auch Proben von post-COVID-19 Fällen. Im Folgenden wurden daher Unterschiede in den Quantifizierungen einzelner Metaboliten und Lipoproteine zwischen schweren und milden COVID-19 Krankheitsverläufen sowie gesunden Kontrollen betrachtet (Abbildung 5-24). Dabei wurde eine Einteilung nicht auf Basis des WHO-Scores (Tabelle 5-4) gewählt, wobei milde Verläufe einen Score zwischen null und vier haben und Schwererkrankte zwischen fünf und acht, sondern anhand der Ergebnisse der PCA, bei welcher eine Veränderung des Metaboloms zwischen COVID-19 Patienten und gesunden Kontrollen ab einem Score von mindestens vier möglich war (Abbildung 5-23).

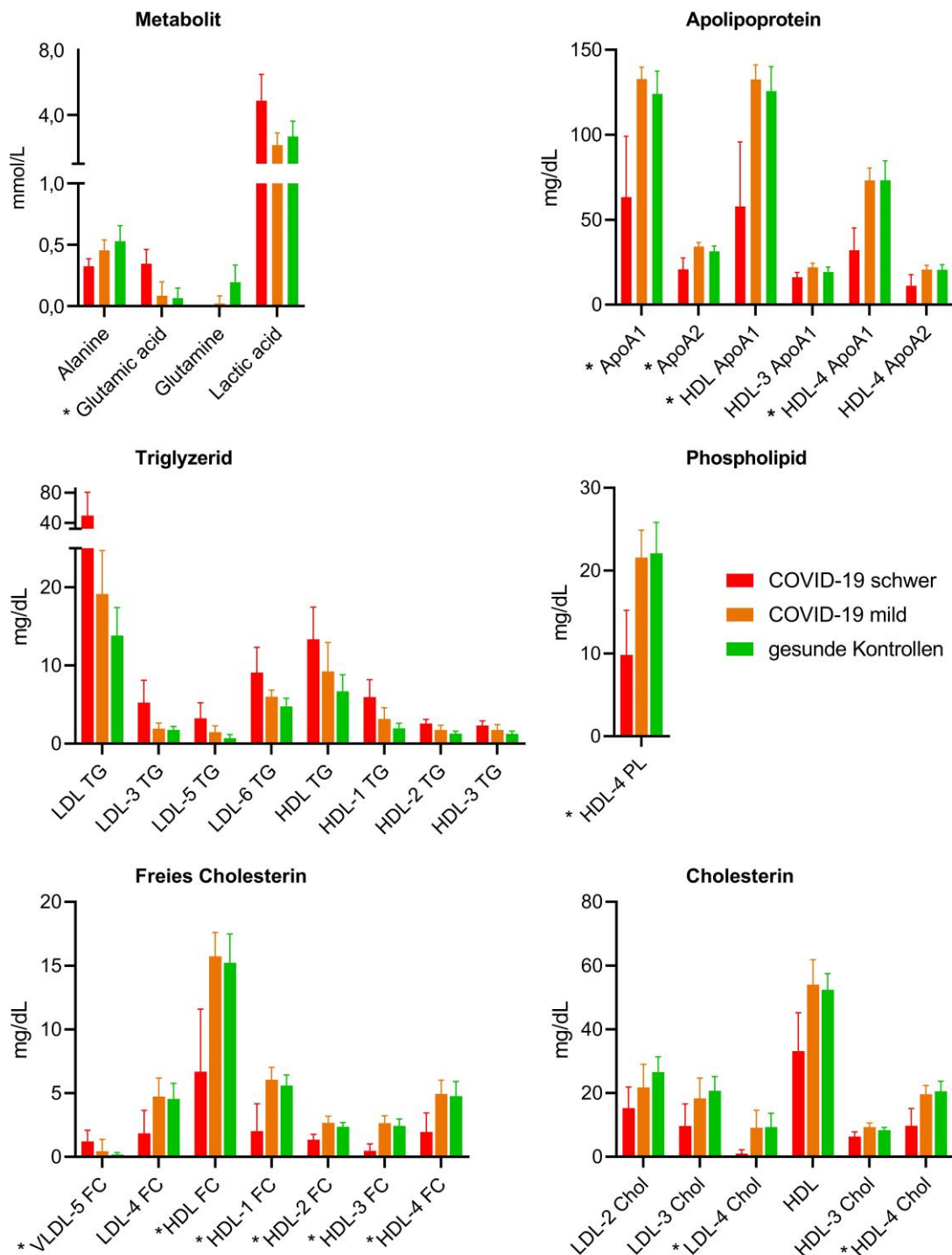


Abbildung 5-24: Signifikante Veränderungen im metabolischen Profil für den Vergleich zwischen COVID-19 (rot und orange) und gesunden Kontrollen (grün). Mit einem Sternchen am Namen sind signifikante Metabolitenveränderungen gekennzeichnet, die zwischen dem Schweregrad einer COVID-19 Erkrankung zwischen milden (orange) und schweren (Score ≥ 4 , rot) Verläufen differenzieren. Lediglich signifikante Veränderungen auf Basis eines multiple unpaired t-Test mit Korrektur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli für multiples Testen mit einer Falscherkennungsrate (engl. *false discovery rate*, FDR) von 1% sind dargestellt (Benjamini et al. 2006).

In Abbildung 5-24 sind Metaboliten und Lipoproteine gezeigt, die sich zwischen COVID-19 Patienten mit schweren Verläufen (Score ≥ 4) und gesunden Kontrollen unterschieden. Im Einklang mit den zuvor dargestellten Ergebnissen einer intensivmedizinischen COVID-19 Kohorte (siehe 5.2.1) war auch hier eine signifikante Reduktion der Aminosäuren Alanine und Glutamine bei den schweren COVID-19 Fällen im Vergleich zu den gesunden

Kontrollen erkennbar. Hingegen zeigten sich höhere Konzentrationen bei den Infizierten für Glutamic acid und Lactic acid. Im Bereich der Lipoproteine wurden signifikant geringere Konzentrationen für ApoA1 und ApoA2 sowie deren HDL-Fraktion HDL ApoA1 bestimmt. Ein ähnlicher Trend war auch für die HDL-Subfraktionen (HDL-3 ApoA1 und HDL-4 ApoA1 sowie HDL-4 ApoA2) erkennbar. Reduzierte HDL-4 PL Konzentrationen wurden bei den schweren COVID-19 Krankheitsverläufen deutlich. Bei den (freien) Cholesterinen wurden geringere HDL-Konzentrationen (HDL FC und HDL) sowie geringere Level der LDL- und HDL-Subfraktionen quantifiziert. Im Gegensatz dazu waren die Werte für VLDL-5 FC, LDL TG und HDL TG sowie deren Subfraktionen (LDL-3 TG, LDL-5 TG und LDL-6 TG sowie HDL-1 TG bis HDL-4 TG) bei COVID-19 Erkrankten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht.

Außerdem wurden signifikante Veränderungen im metabolischen Profil zwischen den SARS-CoV-2 Infizierten mit milder und schwerer COVID-19 Erkrankung herausgearbeitet, welche in Abbildung 5-24 mit einem Sternchen an der Bezeichnung markiert sind. Eine signifikante Erhöhung in den Konzentrationen von Glutamic acid bei schweren Krankheitsfällen im Vergleich zu milden Verläufen wurde bestimmt. Weiterhin hatten Schwerer Erkrankte deutlich geringe Level ApoA1 und ApoA2 als COVID-19 Erkrankte mit milden Verläufen. Ähnliches zeigte sich auch für HDL ApoA1 sowie deren Subfraktion HDL-4 ApoA1. Auch bei den Phospholipiden war eine reduzierte HDL-4 PL Konzentration bei schweren COVID-19 Fällen im Vergleich zu milden Verläufen erkennbar. HDL-FC und deren Subfraktionen (HDL-1 FC bis HDL-4 FC) sowie die LDL- und HDL-Subfraktionen des Cholesterins (LDL-4 Chol und HDL-4 Chol) waren bei Erkrankten mit schwerem Therapieergebnis im Vergleich zu Milderkranken reduziert. Ein inverser Trend zeigte sich für VLDL-5 FC bei dem Vergleich dieser beiden Gruppen.

Zusammenfassend hatten COVID-19 Patienten ein verändertes Lipoproteinprofil im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Insbesondere hatten sie reduzierte Level der Apolipoproteine und deren HDL-Fraktionen sowie der LDL- und HDL-Fraktionen der (freien) Cholesterine. Deutlich erhöhte Konzentrationen zeigten sich im Gegensatz für die LDL- und HDL-Fraktionen der Triglyzeride sowie für eine VLDL-Fraktion des freien Cholesterins (VLDL-5 FC). Einige der genannten Zusammenhänge zeigten sogar eine Differenzierung im Hinblick auf den Schweregrad der COVID-19 Erkrankung. So blieben signifikante Konzentrationsänderungen insbesondere für die Apolipoproteine, deren HDL-Fraktionen sowie für einige LDL- und HDL-Fraktionen der Cholesterine zwischen schweren und milden COVID-19 Krankheitsverläufen bestehen. Eine Assoziation des Schweregrades einer COVID-19 Erkrankung und zunehmender Dyslipidämie im Zusammenhang mit arteriosklerotischem Risiko wurde erkannt (Borén et al. 2020; Nordestgaard & Tybjaerg-Hansen 1992; Nordestgaard & Varbo 2014).

5.2.4 Assoziationen zwischen SARS-CoV-2 Antikörpertitern und Metabolomics

Deutliche Unterschiede im metabolischen Serumprofil wurden bei intensivmedizinisch behandelten, akuten COVID-19 Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, aber auch zu CS-Patienten, die auf derselben Intensivtherapiestation stationiert waren, beobachtet. Weiterhin wurde anhand einer kleinen Kohorte gezeigt, dass der Schweregrad einer COVID-19 Erkrankung mithilfe des NMR-spektroskopisch bestimmten Lipidprofils identifiziert werden kann. Zusätzlich wurden nun die Metaboliten und Lipoproteine aus Serumproben von SARS-CoV-2 Antikörper-positiven Probanden mittels IVDr Verfahren analysiert. Zuvor wurde ein spezifischer Nachweis von Immunglobulin G-Antikörpern gegen SARS-CoV-2 durch die Verwendung der S1-Domäne des S-Proteins inklusive der immunologisch relevanten RBD durchgeführt. Dieser ELISA-Test der Firma Euroimmun wurde von der Arbeitsgruppe Immunologie und Glykoanalytik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Standort Lübeck durchgeführt. Serumproben, die positiv auf SARS-CoV-2 Antikörper getestet wurden, wurden als EUR S1 IgG+ deklariert. Außerdem wurde eine akute SARS-CoV-2 Infektion durch RT-PCR aus Nasopharynx-Abstrichen am Tag der Serumprobenahme ausgeschlossen, sodass die EUR S1 IgG+ Probanden zwar SARS-CoV-2 Antikörper-positiv, aber nicht akut infiziert waren. Die mittels IVDr quantifizierten Parameter wurden entsprechend der Varianzen skaliert und eine ungerichtete sowie gerichtete Datenanalyse durchgeführt (Abbildung 5-25).

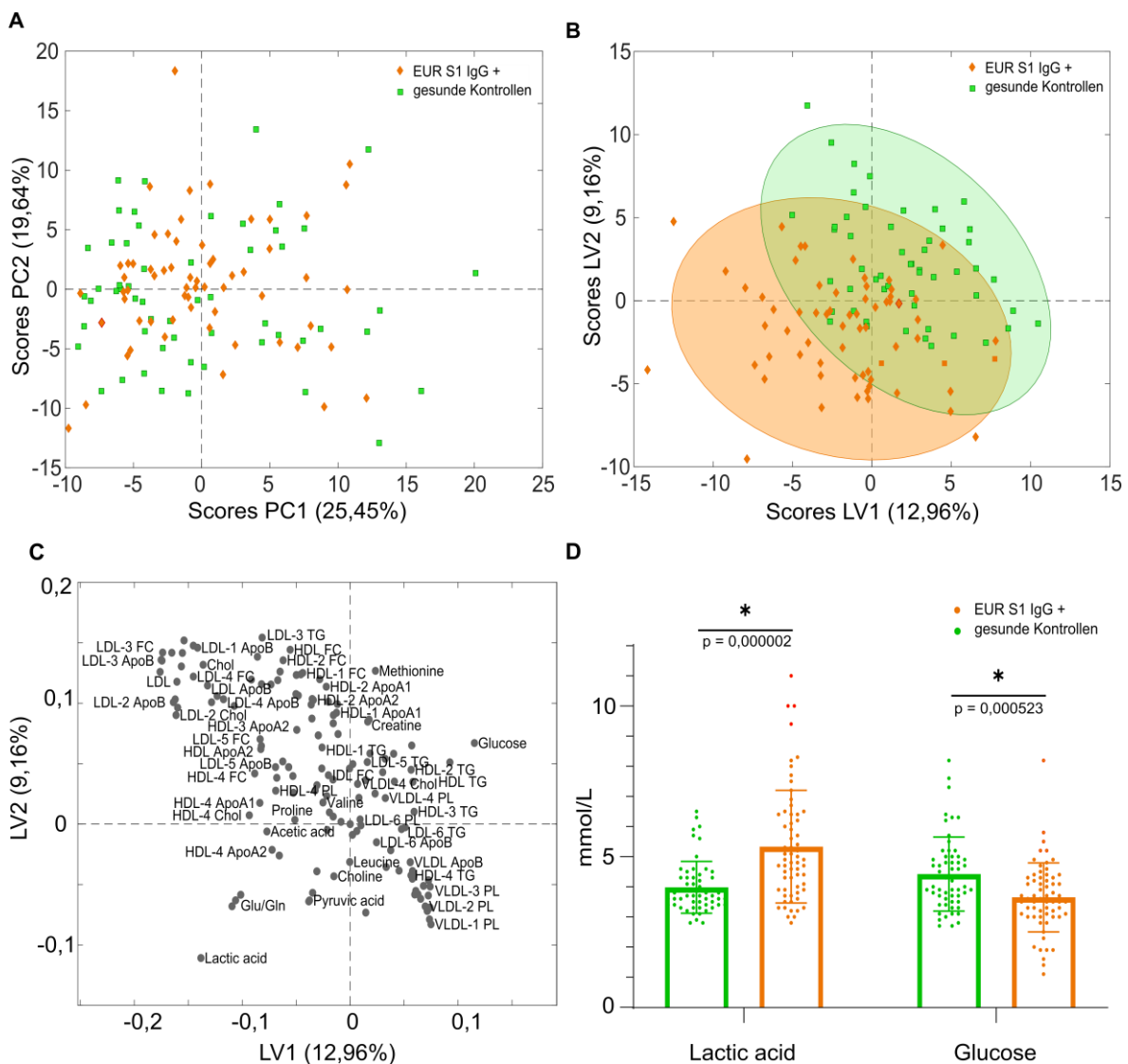


Abbildung 5-25: Vergleich des metabolischen Profils bei SARS-CoV-2 Antikörper-positiven Probanden und gesunden Kontrollen. (A) Der Scoreplot einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*, PCA) zeigt keine Separierung zwischen Probanden mit Immunglobulin G-Antikörpern gegen SARS-CoV-2 (EUR S1 IgG+, orange) und gesunden, SARS-CoV-2 Antikörper-negativen Kontrollen (grün). (B) Eine partielle Trennung der genannten Gruppen ist das Ergebnis einer gerichteten Diskriminanzanalyse der partiell kleinsten Quadrate (engl. *partial least square-discriminant analysis*, PLS-DA) mit Ellipsen, die die 95%-Konfidenzintervalle andeuten. Der zugehörige Loadingplot ist in (C) dargestellt. (D) Durch eine univariate Analyse wurde mithilfe eines unpaired t-Test mit Korrektur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli für multiples Testen mit einer Falscherkennungsrate (engl. *false discovery rate*, FDR) von 5% signifikante Veränderungen zwischen EUR S1 IgG+ (orange) und gesunden Kontrollen (grün) für die Metaboliten Lactic acid und Glucose identifiziert (Benjamini et al. 2006).

Bei der ungerichteten PCA (Abbildung 5-25 A) war kein Unterschied zwischen den EUR S1 IgG+ Probanden (orange) und den gesunden Kontrollen (grün) erkennbar. Die Proben beider Gruppen überlagerten im Scoreplot vollständig, sodass die größte Varianz, die durch PC1 (25,45%) und PC2 (19,64%) beschrieben wurde, nicht durch die beiden Gruppen EUR S1 IgG+ und gesunde Kontrollen erklärt wurde. Mithilfe einer gerichteten PLS-DA wurde eine teilweise Separierung der Proben in die beiden Gruppen erzielt (Abbildung 5-25 B), wobei lediglich 12,96% durch LV1 und 9,16% durch LV2 erklärt wurden. Die zugrundeliegende Clusterbildung der Gruppen beruht auf einem mäßig starken PLS-Modell (AUC = 0,9024 (*Calibration*) und AUC = 0,7785 (*Cross-Validation*)). Der Loadingplot

ist in Abbildung 5-25 C dargestellt. Lactic acid und Glucose lagen im Loadingplot weit außen und hatten somit einen starken Einfluss auf die Separierung der Proben. Entsprechendes wurde auch durch einen univariaten multiplen t-Test bestätigt (Abbildung 5-25 D). Dabei wurde eine signifikante Konzentrationserhöhung von Lactic acid ($p = 0,000002$) sowie eine Reduktion der Konzentration für Glucose ($p = 0,000523$) bei den EUR S1 IgG+ Probanden im Vergleich zu den gesunden Kontrollen gezeigt. Dies könnte möglicherweise auf eine Beeinflussung des Cori-Zyklus hindeuten. Dabei wird bei der anaeroben Glykolyse unter Freisetzung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) in den Muskelzellen Glucose über Pyruvat zu Lactat abgebaut. Der gegenläufige Prozess, die Gluconeogenese, findet hingegen in der Leber statt (Müller-Esterl 2018). Entsprechend könnten die Ergebnisse auf eine vermehrte Glykolyse bei EUR S1 IgG+ Probanden hindeuten, die durch einen erhöhten Energiebedarf ausgelöst wird. Andererseits wurde bei den akut erkrankten COVID-19 Patienten auf der Intensivtherapiestation eine vergleichbare Beobachtung nicht gemacht. Kritisch sollte daher berücksichtigt werden, dass sowohl Lactic acid als auch Glucose in biologischen Stoffwechselprozessen häufig beteiligt sind und auch erheblich durch externe Faktoren wie Ernährung und Sport beeinflusst werden. Die beobachteten Konzentrationsveränderungen der Metaboliten Lactic acid und Glucose bei EUR S1 IgG+ Probanden sind also nicht zwangsläufig auf eine vorausgegangene Infektion mit SARS-CoV-2 zurückzuführen (Müller-Esterl 2018).

Um den Zusammenhang zwischen den Anti-SARS-CoV-2 Titern und dem Metabolitenprofil zu untersuchen, wurden Pearson-Korrelationen zwischen den mittels IVDr quantifizierten Parametern und den EUR S1 IgG Titerwerten der EUR S1 IgG+ Probanden berechnet. Insgesamt wurde jeweils die zeitlich erste verfügbare Serumprobe, in der mittels ELISA SARS-CoV-2 Antikörper nachgewiesen wurden, von 62 Probanden analysiert (Abbildung 5-26).

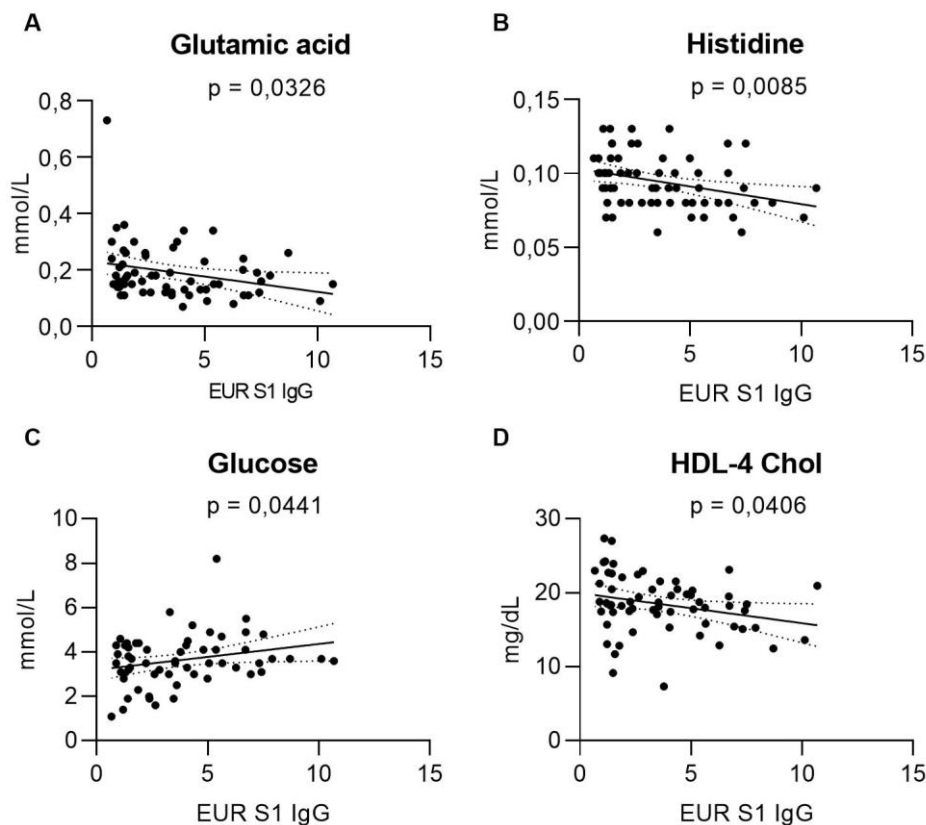


Abbildung 5-26: Zusammenhänge zwischen dem metabolischen Profil und EUR S1 IgG Antikörpertitern. A-D Signifikante Pearson-Korrelationen ($p \leq 0,05$) zwischen SARS-CoV-2 Antikörpertitern (EUR S1 IgG) und mittels IVDr Verfahren quantifizierter Metaboliten für 62 Individuen. Die lineare Regressionsgerade sowie die 95%-Konfidenzintervalle als gestrichelte Linie sind zusätzlich zu den Datenpunkten eingezeichnet.

Signifikante Zusammenhänge wurden für die Metaboliten Glutamic acid ($p = 0,0326$), Histidine ($p = 0,0085$) und Glucose ($p = 0,0441$) sowie für die Lipidfraktion HDL-4 Chol ($p = 0,0406$) berechnet. Mit Ausnahme von Glucose zeigten alle anderen signifikanten Parameter einen inversen Zusammenhang zu den EUR S1 IgG Titerwerten. Hohe Titerwerte waren mit niedrigen Metabolitkonzentrationen assoziiert. Bei Glucose zeigte sich hingegen, dass hohe EUR S1 IgG Titer im Zusammenhang mit hohen Glucose-Konzentrationen stehen. Zusammenfassend wurde eine Assoziation der Antikörpertiter, die mittels ELISA bestimmt wurden und Blutparametern herausgearbeitet.

Dieselbe Analyse wurde auch bei einer Subgruppe von 18 EUR S1 IgG Probanden durchgeführt, bei denen Serum über ein Jahr an fünf verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich der Metabolitenprofile und der Antikörper analysiert wurden. Im Folgenden wird diese Kohorte als Langzeit-EUR S1 IgG+ bezeichnet. Anders als bei der zuvor gezeigten Betrachtung von 62 Individuen zu einem Zeitpunkt, wurden bei der Langzeit-EUR S1 IgG+ Subgruppe aus 18 Probanden eine Vielzahl signifikanter Lipidparameter durch Pearson-Korrelationen identifiziert. Allerdings zeigte sich lediglich die Lipidfraktion HDL-4 Chol bei beiden Analysen als signifikant und ist daher für die Langzeit-EUR S1 IgG+ Kohorte in Abbildung 5-27 näher betrachtet.

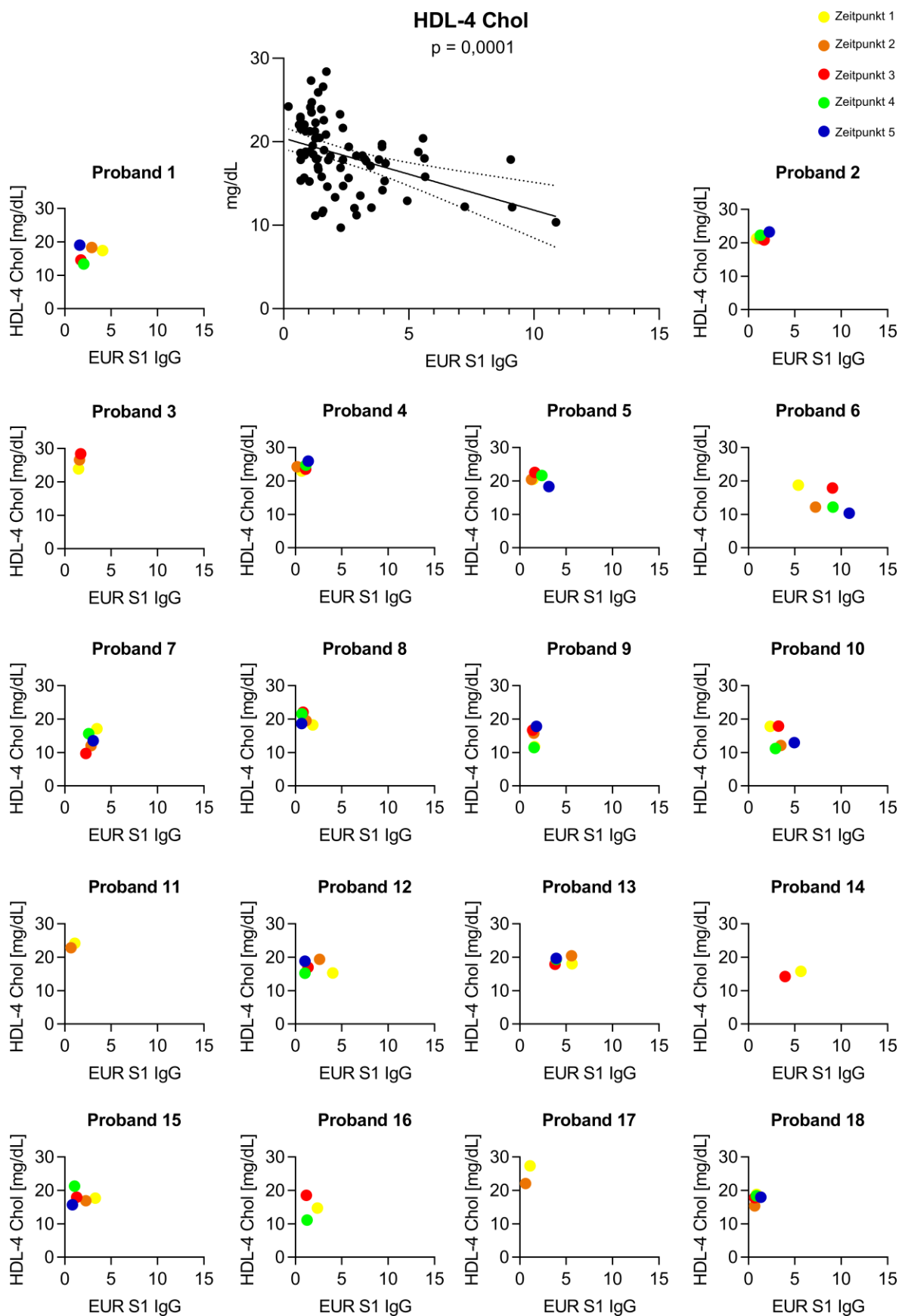


Abbildung 5-27: Assoziationen zwischen HDL-4 Cholesterin und EUR S1 IgG Antikörpertitern. Pearson-Korrelationen der HDL-4 Chol Konzentrationen und SARS-CoV-2 Antikörpertiter der 18 Langzeit-EUR S1 IgG+ Probanden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf eines Jahres. Die lineare Regressionsgerade sowie die 95%-Konfidenzintervalle als gestrichelte Linie sind für HDL-4 Chol zusätzlich zu den Datenpunkten aller Proben eingezeichnet.

Zunächst wurde auch bei den 18 Probanden zu fünf Zeitpunkten die Pearson-Korrelation betrachtet. Im Vergleich zu EUR S1 IgG+, deren Serumproben lediglich zu einem Zeitpunkt betrachtet wurden ($p = 0,0406$), ist die Signifikanz mit $p = 0,0001$ bei der Langzeit-EUR S1 IgG+ Kohorte deutlich größer. Anschließend wurde für jeden der 18 Probanden die HDL-4 Cholesterol Konzentration in einem kartesischen Koordinatensystem gegen den EUR S1 IgG Titer dargestellt. Die farbliche Markierung wurde so gewählt, dass die fünf Zeitpunkte der Probenahmen innerhalb eines Jahres entsprechend der Regenbogenfarben von gelb (Zeitpunkt 1) bis zu blau (Zeitpunkt 5) erkennbar sind. Für die Mehrheit der 18 Probanden liegen die farblichen Punkte in Abbildung 5-27 intraindividuell sehr dicht zusammen. Das bedeutet, dass sowohl die Konzentration des Lipidparameters HDL-4 Cholesterol als auch die Antikörpertiter innerhalb eines Jahres sehr stabil waren. Eine Ausnahme stellte lediglich Proband 6 dar, der über ein Jahr zunehmend weitere Antikörper gebildet hat und dessen Titerwerte in der Langzeit-EUR S1 IgG+ Subgruppe fortlaufend anstiegen. Entsprechend der Erwartungen werden SARS-CoV-2 Antikörper nach einer Virusinfektion gebildet und im Verlaufe der Zeit langsam abgebaut (Scheiblaue et al. 2022). Aufgrund der gezeigten Stabilität der Lipidkonzentration sowie der EUR S1 IgG Antikörper innerhalb eines Jahres lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse der Pearson-Korrelationen erklären. Während bei dem ersten Modell der EUR S1 IgG+ Probanden Serumproben von 62 Individuen zu einem Zeitpunkt analysiert wurden, wurden bei der Langzeit-EUR S1 IgG+ Kohorte 18 Individuen zu fünf Zeitpunkten betrachtet. Zudem waren sowohl die metabolischen Profile als auch die Titerwerte der analysierten Langzeit-EUR S1 IgG+ Probanden über ein Jahr sehr stabil. Bei Letzteren handelte es sich um biologische Replikate über ein Jahr. Zusammenfassend sollte die Pearson-Korrelationen der Langzeit-EUR S1 IgG+ Kohorte daher kritisch betrachtet werden, da biologische Replikate über ein Jahr betrachtet wurden. Statistisch bedeutendere Korrelationen wurden hingegen bei der EUR S1 IgG+ Kohorte erzielt.

5.2.5 Exkurs: Stabilität des Lipidprofils

Um die Studienergebnisse einordnen und interpretieren zu können, ist es wichtig, die analysierten Parameter und deren Eigenschaften möglichst detailliert zu kennen. Im Folgenden wurde daher die Stabilität einzelner Lipidparameter betrachtet. In Abbildung 5-28 ist der zeitliche Konzentrationsverlauf der acht analysierten Hauptfraktionen der Lipoproteine dargestellt. Dafür wurden die 18 Probanden der Langzeit-EUR S1 IgG Kohorte betrachtet, bei denen über knapp ein Jahr an fünf verschiedenen Zeitpunkten Serumproben abgenommen und mittels IVDr Verfahren analysiert wurden.

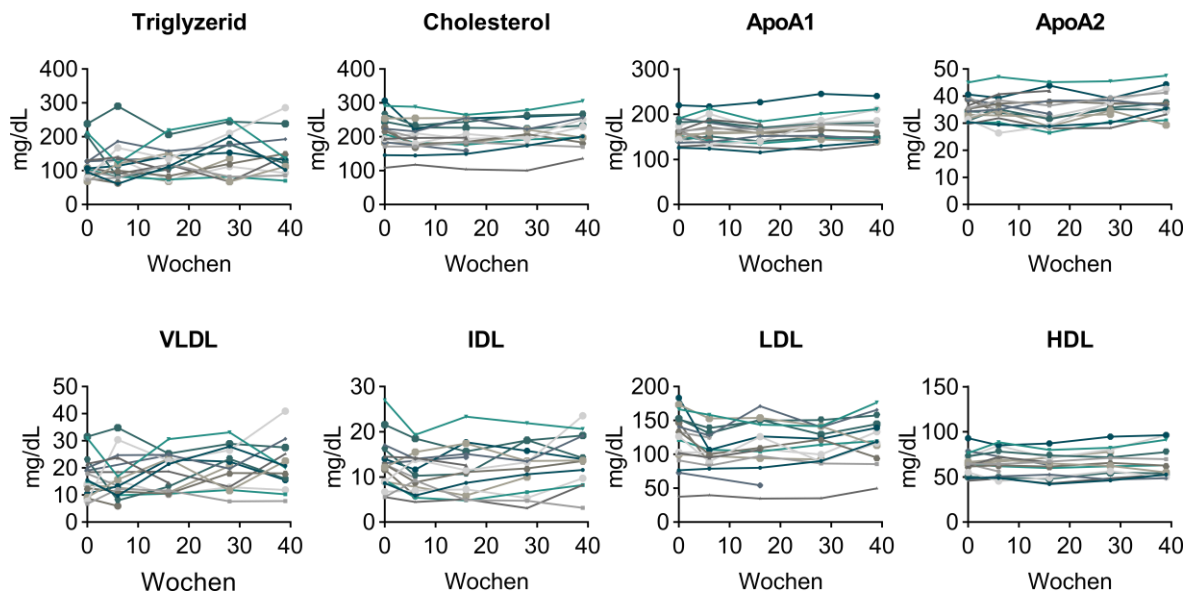


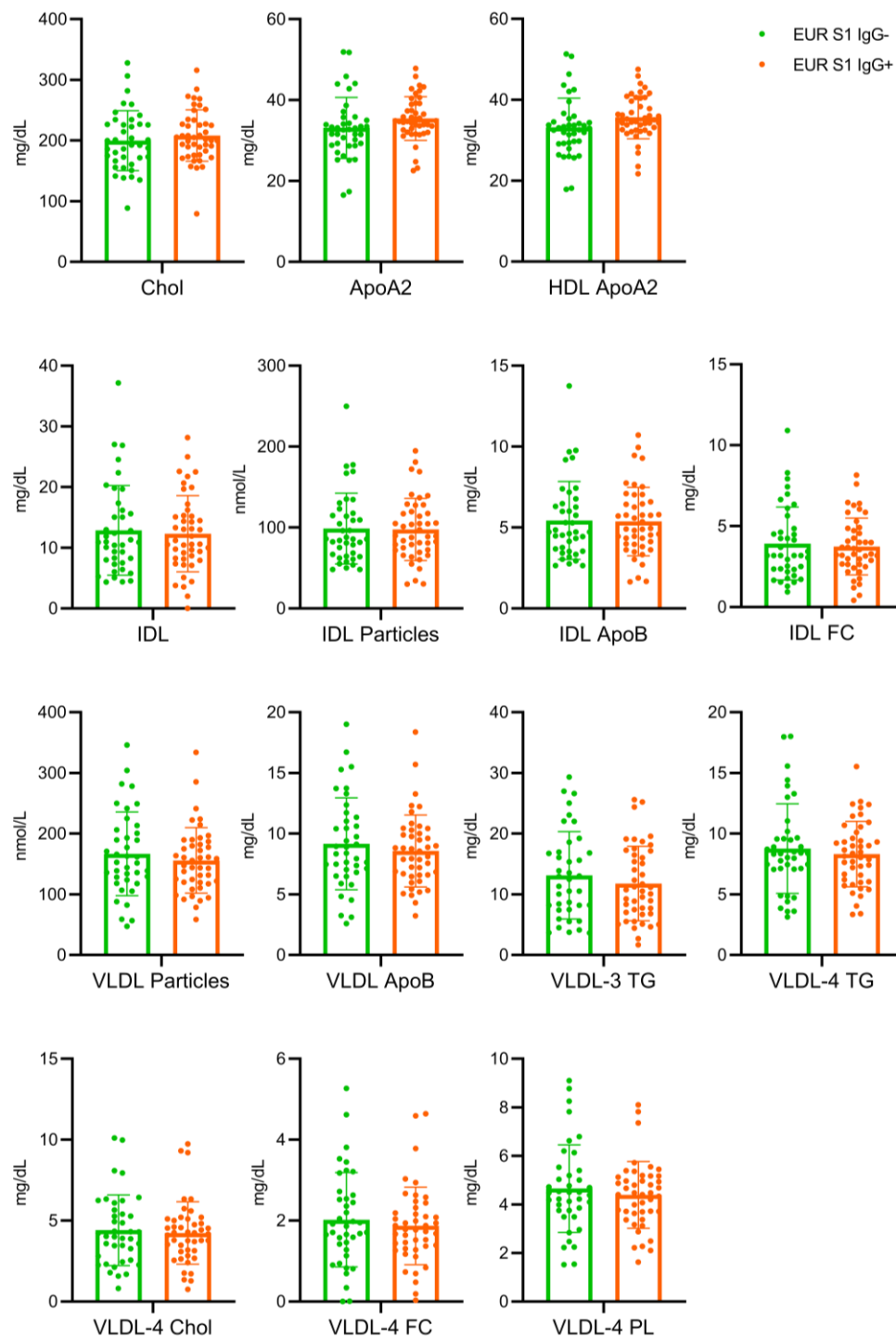
Abbildung 5-28: Stabilität der Hauptlipidfraktionen über ein Jahr. Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der Lipidhauptfraktionen bei 18 Probanden an fünf verschiedenen Zeitpunkten zeigt ein stabiles Lipidprofil innerhalb eines Jahres.

Die Hauptfraktionen der Lipoproteine waren über den Zeitraum von einem Jahr bei den untersuchten Probanden sehr stabil. Es waren lediglich minimale Schwankungen bei VLDL und IDL erkennbar. Diese beiden Parameter waren aber auch am geringsten konzentriert, sodass kleine Konzentrationsunterschiede zu einem großen relativen Fehler führen. Die Stabilität ist insbesondere vor dem Hintergrund auffällig, dass die Blutabnahmen der Probanden nicht unbedingt nüchtern erfolgten. Die Lipidparameter scheinen daher weniger stark durch äußere Umweltfaktoren wie die tägliche Ernährung beeinflusst zu sein. Dies zeigte, dass spezifische Lipidprofile wie sie beispielsweise bei COVID-19 Patienten identifiziert wurden, anscheinend auf die Krankheit und nicht auf natürliche Schwankungen und alltägliche Umwelteinflüsse zurückzuführen sind.

5.2.6 Veränderungen bei einer Infektion mit SARS-CoV-2

Ein spezifisches Lipoproteinprofil wurde für intensivmedizinisch behandelte COVID-19 Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, aber auch im Vergleich zu CS-Patienten, die auf derselben Intensivtherapiestation stationiert waren, erarbeitet. Fraglich war nun, ob dieses Lipidprofil Ursache eines schweren COVID-19 Verlaufs ist, das heißt, dass Personen ein höheres Risiko haben, schwer zu erkranken oder ob sich dieses Profil während einer COVID-19 Krankheit bildet. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Serumproben von denselben Probanden vor und nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 mittels IVDr analysiert. SARS-CoV-2 Antikörper wurde wiederum mittels ELISA von der Arbeitsgruppe Immunologie und Glykoanalytik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Standort Lübeck bestimmt (siehe 4.6.2). Entsprechend wurden Antikörper-negative Probanden vor einer Infektion als EUR S1 IgG- eingeteilt. Dieselben Probanden infizierten sich mit SARS-CoV-2, sodass Serumproben zu einem späteren Zeitpunkt Antikörper aufwiesen und

nun als EUR S1 IgG+ bezeichnet wurden. Im metabolischen Profil wurden keine signifikanten Unterschiede vor und nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 identifiziert. Allerdings ist davon auszugehen, dass bei den analysierten Probanden keine COVID-19 Erkrankungen mit schwerem, intensivmedizinisch behandeltem Verlauf vorlagen. In Abbildung 5-29 sind daher Lipidparameter dargestellt, die sich zwischen schwerkranken COVID-19 Patienten und CS-Patienten sowie zwischen den intensivmedizinisch behandelten Patienten mit COVID-19 und gesunden Kontrollen unterschieden (siehe 5.2.1).



Beschriftung der Abbildung folgt auf der nächsten Seite.

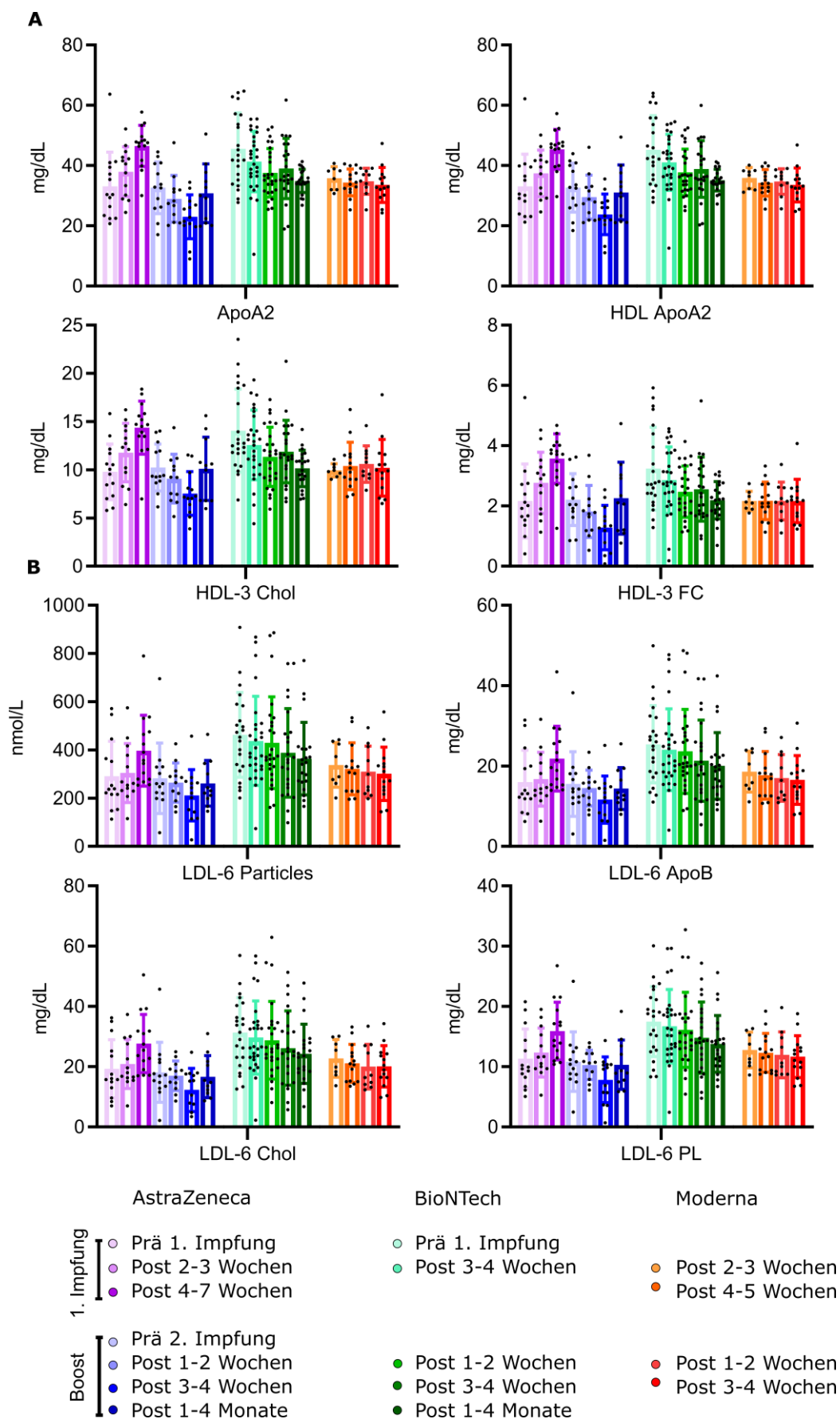
Abbildung 5-29: Unverändertes Lipidprofil vor (grün) und nach (orange) einer Infektion mit SARS-CoV-2. Das metabolische Profil von Probanden wurde vor einer Infektion mit SARS-CoV-2 (EUR S1 IgG-, grün) und nach einer Infektion (EUR S1 IgG+, orange), nachgewiesen durch SARS-CoV-2 Antikörper im Blutserum, mittels IVDr Verfahren analysiert. Keine statistisch signifikanten Unterschiede wurden durch einen paired t-Test mit Korrektur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli für multiples Testen mit einer Falscherkennungsrate (engl. *false discovery rate*, FDR) von 1% nachgewiesen. Exemplarisch sind die Konzentrationen vor und nach einer SARS-CoV-2 Infektion einiger Lipidfraktionen dargestellt. Es wurden Parameter gewählt, die sich zwischen intensivmedizinisch betreuten COVID-19 Patienten und CS-Patienten, zwischen schwerkranken COVID-19 Patienten und gesunden Kontrollen unterschieden (Benjamini et al. 2006).

Bei allen aufgeführten Parametern wurde deutlich, dass sich die Konzentrationen nicht aufgrund einer SARS-CoV-2 Infektion verändert haben und sich das Lipidprofil der COVID-19 Patienten nicht im Verlauf der Infektion gebildet hat. Kritisch sollte dabei allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei den EUR S1 IgG+ Serumproben um Antikörper-positive Proben nach und nicht während einer COVID-19 Erkrankung handelte. Dies wird durch die zuvor gezeigte Tatsache relativiert, dass ein spezifisches Lipidprofil auch nach der akuten Phase einer COVID-19 Erkrankung bestehen blieb (siehe 5.2.3). Bedeutender ist daher die Tatsache, dass die Schwere der COVID-19 Erkrankung der Patienten unklar war. Die Probanden wiesen Antikörper gegen SARS-CoV-2 auf, wodurch eine vorausgegangene Infektion mit SARS-CoV-2 bestätigt wird. Allerdings war der Schweregrad und der Verlauf der COVID-19 Erkrankung unbekannt, sodass keine eindeutigen Aussagen über asymptomatische, milde oder schwere Verläufe getroffen werden konnte. Die metabolischen Profile von Patienten mit milden COVID-19 Verläufen unterschieden sich im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht (siehe 5.2.3). Vermutlich handelte es sich bei den betrachteten Probanden vor und nach einer SARS-CoV-2 Infektion aber um asymptomatische oder milde COVID-19 Verläufe. Daher war basierend auf den zuvor gezeigten Ergebnissen keine Dyslipidämie vor und nach einer milden COVID-19 Erkrankung zu erwarten. Ein stark verändertes Lipidprofil ist basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit nur für schwerkranke, intensivmedizinisch behandelte COVID-19 Patienten zu erwarten (siehe 5.2.1). Ob das spezifische Lipidprofil schwerer COVID-19 Verläufe die Ursache für jenen Verlauf ist oder erst während einer Erkrankung gebildet wird, kann letztendlich nur durch die Analyse der Blutproben von SARS-CoV-2 Infizierten vor und nach einem schweren Krankheitsverlauf beantwortet werden. Da diese Proben nicht zur Verfügung stehen und auch im Rahmen großer Studien wie der ELISA-Studie keine Probanden mit schwerem Verlauf bekannt sind, wurde jene Frage daher noch nicht abschließend geklärt.

5.2.7 Impfung gegen SARS-CoV-2

Ein Schutz gegen eine Infektion mit SARS-CoV-2 und einer damit einhergehenden COVID-19 Erkrankung ist eine Impfung. Auch wenn die Impfung keinen vollständigen Schutz darstellt, wird das Risiko von schweren Krankheitsverläufen und stationären Behandlungen drastisch reduziert. Bei den zunächst eingesetzten Impfstoffen handelt es sich um verhältnismäßig neuartige mRNA- oder Vektorimpfstoffe. Die Wirkung auf den

Organismus dieser neu entwickelten Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 wurden daher noch nicht hinreichend untersucht. Weiterhin ist die Häufigkeit der beschriebenen Nebenwirkungen im Vergleich zu Totimpfstoffen, wie sie bei Influenza, Hepatitis oder Tetanus eingesetzt werden, höher (Forni et al. 2021; Menni et al. 2021). Um den Einfluss der mRNA- Impfstoffe Comirnaty® der Firma BioNTech und Spikevax® der Firma Moderna Biotech sowie des Vektorimpfstoffs Vaxzevria® der Firma AstraZeneca auf den Organismus zu untersuchen, wurde das metabolische Profil vor und nach einer Impfung betrachtet (European Medicines Agency 2022; Forni et al. 2021). Hierfür wurden longitudinal gesammelte Serumproben gesunder Probanden mittels IVDr Verfahren analysiert. Die Ergebnisse eines gepaarten multiplen t-Tests sind in Abbildung 5-30 dargestellt. Insbesondere bei einer Impfung mit dem Vektorimpfstoff von AstraZeneca zeigten sich deutliche Veränderungen im Serumlipidprofil. In Abbildung 5-30 sind dementsprechend nur ausgewählte Lipoproteine dargestellt, die sich unter anderem vor einer Impfung (prä 1. Impfung) und nach einer Impfung (post-Impfung) unterschieden. Bei diesen Parametern handelt es sich voraussichtlich um jene, die durch eine Impfung beeinflusst wurden.



Beschriftung der Abbildung folgt auf der nächsten Seite.

Abbildung 5-30: Veränderung des Lipidprofils nach einer Impfung gegen SARS-CoV-2. In (A) sind Parameter dargestellt, die signifikante Veränderungen vor und nach einer Impfung mit dem Vektorvakzin der Firma AstraZeneca (violett, blau) zeigten. Statistisch signifikante Unterschiede wurden durch einen paired t-Test mit Korrektur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli für multiples Testen mit einer Falscherkennungsrate (engl. *false discovery rate*, FDR) von 1% nachgewiesen (Benjamini et al. 2006). Es sind Substanzen aufgelistet, die zwischen den folgenden Vergleichen verändert waren: (A) Prä 1st - Post 1st (4-7 Wochen), Post 1st (2-3 Wochen) - Post 1st (4-7 Wochen), Post 1st (2-3 Wochen) - Post 2nd (3-4 Wochen), Post 1st (2-3 Wochen) - Post 2nd (1-4 Monate), Post 1st (4-7 Wochen) - Prä 2nd, Post 1st (4-7 Wochen) - Post 2nd (1-2 Wochen), Post 1st (4-7 Wochen) - Post 2nd (3-4 Wochen), Post 1st (4-7 Wochen) - Post 2nd (1-4 Monate), Prä 2nd - Post 2nd (3-4 Wochen). In (B) sind Parameter gezeigt, die durch eine Impfung mit dem Impfstoff der Firma BioNTech (grün) verändert waren: Prä 1st - Post 2nd (1-4 Monate), Post 2nd (1-2 Wochen) - Post 2nd (1-4 Monate), Post 2nd (3-4 Wochen) - Post 2nd (1-4 Monate). Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich vor und nach einer Impfung mit dem Vakzin der Firma Moderna Biotech (rot).

Abbildung 5-30 A fokussiert sich dabei auf stark veränderte Lipidparameter der Kohorte, die eine Erstimpfung mit dem Impfstoff von AstraZeneca erhalten haben. Die dargestellten Lipoproteine waren vor einer Impfung (prä 1. Impfung) deutlich geringer konzentriert als nach einer Impfung mit dem Vektorimpfstoff. Der kontinuierliche Konzentrationsanstieg erreichte sein Maximum vier bis sieben Wochen nach einer Impfung. Anschließend nahm die Konzentration der ApoA2- und HDL-Parameter wieder ab. In Abbildung 5-30 B sind entsprechend Lipide aufgeführt, deren Konzentrationen sich bei einer Impfung mit dem mRNA-Impfstoff der Firma BioNTech zwischen dem Zeitpunkt vor einer Impfung und Monate nach einer Impfung (1-4 Monate nach Zweitimpfung) veränderten. Dabei ist allerdings fraglich, ob die Veränderungen im Lipidprofil noch auf die Impfung mit dem mRNA-Impfstoff der Firma BioNTech zurückzuführen sind. Keine signifikanten Veränderungen wurden bei den mRNA-Impfstoffen zu früheren Zeitpunkten festgestellt. Eine signifikante Reduktion der LDL-Fractionen erst Monate nach der Impfung deutet darauf hin, dass die Veränderungen aufgrund der großen Zeitspanne nicht zwangsläufig im Zusammenhang mit der Impfung standen. Dies wird dadurch bekräftigt, dass auch bei dem zweiten mRNA-Impfstoff, welcher von der Firma Moderna Biotech produziert wird, keine signifikanten Veränderungen im metabolischen Profil vor und nach einer Impfung festgestellt wurden.

Um die Dynamik im Lipidprofil, insbesondere bei einer Impfung mit dem Vektorimpfstoff von AstraZeneca näher zu betrachten, wurde der zeitliche Verlauf für ApoA2 als eine Hauptfraktion im Blut detailliert betrachtet. In Abbildung 5-31 ist daher die Konzentration von ApoA2 auf der Ordinate und die Zeit in Tagen auf der Abszisse aufgetragen. Als Nullwert wurde der Tag der Erstimpfung gewählt.

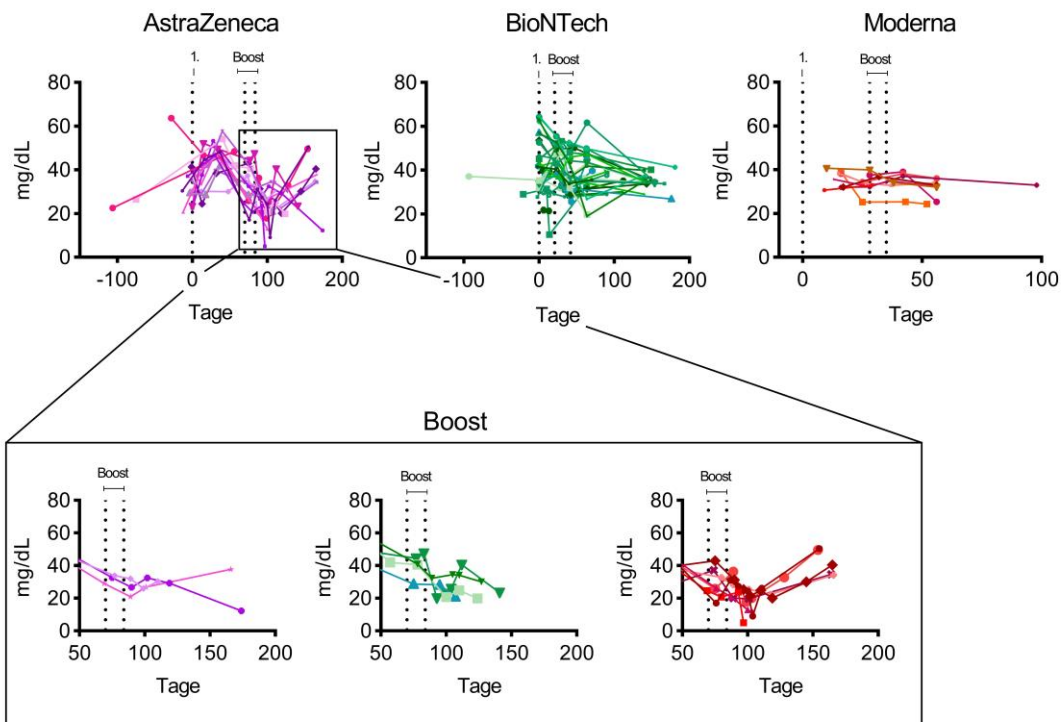
ApoA2

Abbildung 5-31: Zeitliches Profil von Apolipoprotein A2 (ApoA2) in Abhängigkeit von den drei betrachteten Impfstoffen der Firmen AstraZeneca, BioNTech und Moderna Biotech. Insbesondere das Lipidprofil nach einer Erstimpfung (1.) mit dem Vektorvakzin von AstraZeneca zeigt einen deutlichen Anstieg in den Konzentrationen von ApoA2. Eine detaillierte Betrachtung ist zudem für die Booster-Impfung der AstraZeneca Kohorte unter Berücksichtigung der drei möglichen Vakzine von AstraZeneca, BioNTech und Moderna Biotech gezeigt.

Bei der Kohorte, die eine erste Impfung mit dem Vektorimpfstoff von AstraZeneca bekommen hatte, zeigte sich ein deutlicher Konzentrationsanstieg für ApoA2 nach der Impfung. Besonders markant war diese Veränderung nach der Erstimpfung. Der Impfstoff des Boosters nach einer Erstimpfung mit dem Vektorvakzin der Firma AstraZeneca unterschied sich. Daher wurde die AstraZeneca Kohorte in drei Gruppen eingeteilt, die nochmals separat betrachtet wurden. Lediglich drei Probanden (Boost in violett), die eine Erstimpfung mit dem Vakzin von AstraZeneca erhalten hatten, wurden auch das zweite Mal mit diesem geimpft. Bei diesen Probanden war anders als bei der Erstimpfung keine Konzentrationszunahme für ApoA2 nach der zweiten Impfung mit dem Vektorimpfstoff erkennbar. Einige andere Probanden hatten eine Booster-Impfung mit dem mRNA-Impfstoff der Firma BioNTech bekommen (Boost in grün). Auch für diese Probanden wurden keine eindeutigen Veränderungen im Serumlipidprofil für ApoA2 im Zusammenhang mit dem Boost deutlich. Die meisten Probanden dieser Kohorte, die eine Erstimpfung mit dem Vektorimpfstoff erhalten hatten, wurden im Folgenden mit dem Vakzin von Moderna Biotech geimpft (Boost in rot). Möglicherweise war hier für ApoA2 die Tendenz für einen Konzentrationsanstieg nach einer Booster-Impfung nach mehreren Monaten erkennbar. Aufgrund der geringen Probandenanzahl, die zuerst eine Impfung mit dem AstraZeneca Vakzin und anschließend mit dem Impfstoff von Moderna Biotech erhalten hatten, sollte

dies allerdings kritisch betrachtet werden. Außerdem ist bei einer Konzentrationsänderung, die Monate nach einer Impfung auftritt, der Zusammenhang dieser Reaktion zur Vakzinierung fraglich. Für die beiden Gruppen, die mit den mRNA-Impfstoffen der Firmen BioNTech und Moderna Biotech geimpft wurden, war das Lipidprofil annähernd stabil und eine Veränderung, wie sie bei dem Vektorimpfstoff sichtbar wurde, war sowohl nach der ersten als auch nach der Booster-Impfung nicht erkennbar.

Zusammenfassend war eine deutliche Konzentrationszunahme für ApoA2 nach einer Erstimpfung mit einem Vektorimpfstoff erkennbar, während das Lipidprofil bei Impfungen mit mRNA-Vakzinen unverändert konstant blieb. ApoA2 ist mit 20% der zweithäufigste Proteinbestandteil des HDL. Auch wenn der Wirkmechanismus und die Pathophysiologie von ApoA2 noch nicht vollständig entschlüsselt sind, deuten einige Studien auf eine hepatische Regulation und eine pro-arteriosklerotische Funktion hin. Im Zusammenspiel mit HDL scheint ApoA2 den Cholesterintransport zu beeinflussen sowie protektiv auf oxidative Modifikationen des LDL zu wirken und stellt dementsprechend einen Schutzmechanismus vor Arteriosklerose dar (Blanco-Vaca et al. 2001). Im Zusammenhang mit einer SARS-CoV-2 Vakzinierung könnte ein Konzentrationsanstieg des ApoA2 auf einen molekularen Schutzmechanismus des Körpers hindeuten. Da bei einem Vektorimpfstoff anders als bei mRNA-Impfstoffen ein viraler Vektor in die Zelle eingebracht wird, fällt die Reaktion des Organismus möglicherweise stärker aus und eine Überexpression des protektiv wirkenden Apolipoproteins wird ausgelöst (Forni et al. 2021). Spekulativ handelt es sich dabei um eine akute und dynamische Reaktion, sodass sich die Serumkonzentrationen von ApoA2 schlussendlich wieder im Normalbereich einpendeln.

5.2.8 Antikörpertiter nach einer Impfung gegen SARS-CoV-2

Bei einer Impfung ist eine wichtige Frage, wie lange ein ausreichender Schutz gegen die auslösenden Bakterien und Viren besteht, das bedeutet, genügend Antikörper gegen diese im Organismus vorhanden sind. Die Antikörpertiter können mit molekularbiologischen Verfahren wie ELISA bestimmt werden. Prognostische Variablen, die den Antikörperstatus und dessen Verlauf vorhersagen, sind dabei von besonderem Interesse. In dieser Arbeit wurden daher Assoziationen des metabolischen Profils der Probanden vor einer Impfung gegen SARS-CoV-2 mit dem Antikörpertitern ein bis vier Monate nach einer Grundimmunisierung untersucht (Abbildung 5-32).

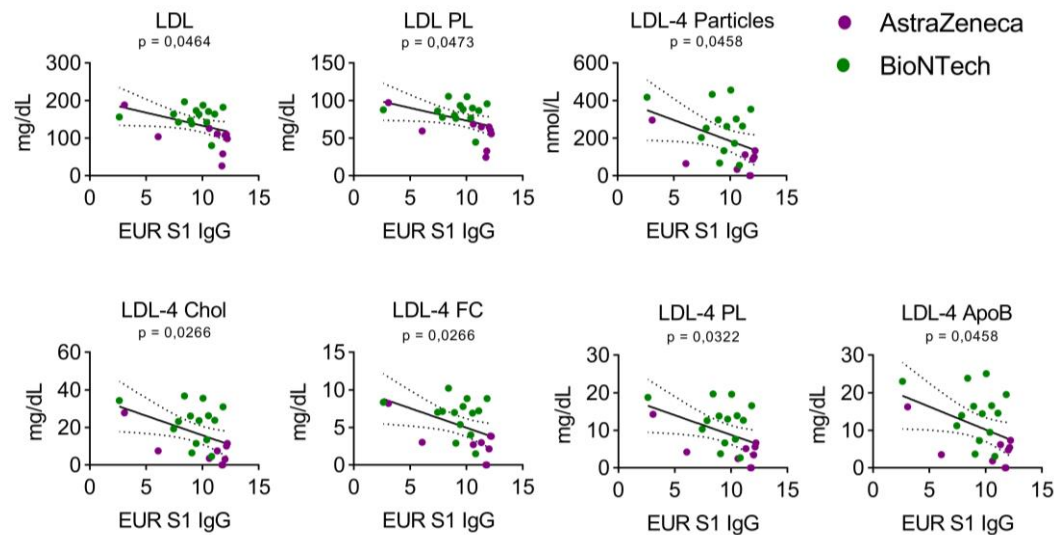


Abbildung 5-32: Negative Korrelationen der LDL-Parameter mit EUR S1 IgG Antikörpertitern. Signifikante Pearson-Korrelationen ($p \leq 0,05$) zwischen SARS-CoV-2 Antikörpertitern (EUR S1 IgG) ein bis vier Monate nach einer Impfung gegen SARS-CoV-2 mit den Vakzinen von AstraZeneca (violett) oder BioNTech (grün) und mittels IVDr Verfahren quantifizierter Metaboliten und Lipoproteinen vor einer Impfung. Die lineare Regressionsgerade sowie die 95%-Konfidenzintervalle als gestrichelte Linie sind zusätzlich zu den Datenpunkten eingezeichnet.

Negative Korrelationen zeigten sich für LDL-Parameter vor einer Impfung mit den Vakzinen der Firmen AstraZeneca und BioNTech sowie dem Antikörperstatus einige Monate nach einer Grundimmunisierung. Zu berücksichtigen ist dabei, dass es sich bei den gezeigten Zusammenhängen um Korrelationen handelt, bei denen sowohl Impfungen mit dem mRNA-Impfstoff von BioNTech, als auch mit dem Vektorimpfstoff von AstraZeneca also auch Hybridimpfungen mit dem Vektorimpfstoff und einer Zweitimpfung mit einem mRNA-Impfstoff analysiert wurden. Probanden mit hohen LDL-Werten wiesen nach einer abgeschlossenen Immunisierung entsprechend geringere Antikörperlevel auf als Probanden mit geringen LDL-Konzentrationen im Blutserum. Generell wirkt LDL proinflammatorisch und wird mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko in Verbindung gebracht (Bruckert & Rosenbaum 2011; Rosendorff 2002). Das Lipidprofil und insbesondere hohe LDL-Konzentrationen stehen möglicherweise im Zusammenhang mit dem Status der SARS-CoV-2 Antikörpertiter. Dementsprechend könnte dies für die prognostische Einschätzung eines unzureichenden Impftiters und einer notwendigen Auffrischungsimpfung herangezogen werden.

6 FAZIT UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurde ein spezifisches Metabolitenprofil im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 identifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-1 graphisch zusammengefasst.

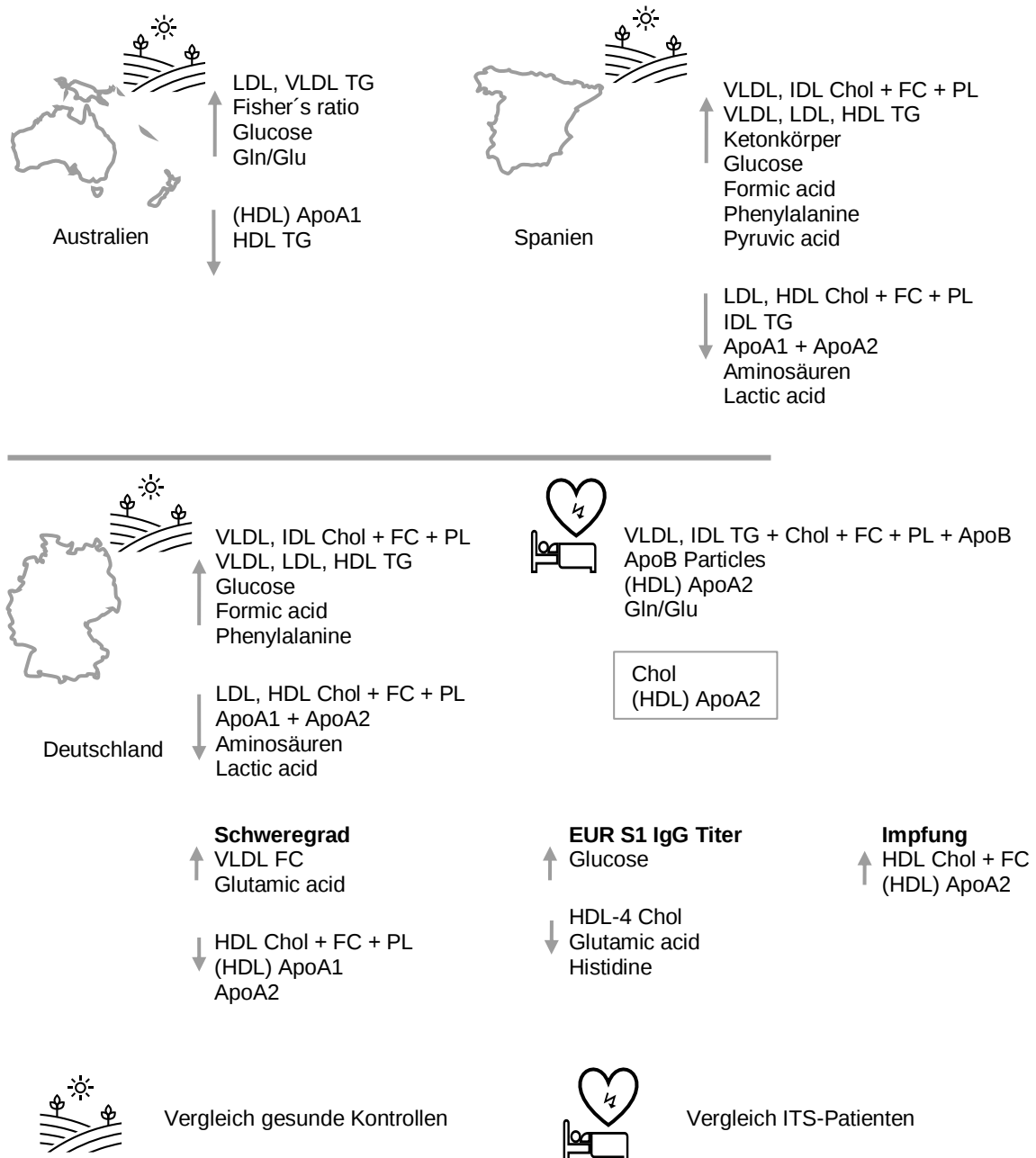


Abbildung 6-1: Spezifisches metabolisches Profil im Zusammenhang mit SARS-CoV-2. Lipidmarker, wie erhöhte Triglyzerid- und reduzierte Apolipoprotein-Level im Vergleich zu gesunden Kontrollen, wurden in dieser Arbeit identifiziert, die in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen aus australischen und spanischen Studien stehen (Bruzzone et al. 2020; Kimhofer et al. 2020). Weiterhin differenzierten Cholesterin und (HDL) ApoA2 COVID-19 Patienten von gesunden Kontrollen, aber auch von einer weiteren intensivmedizinischen Kohorte. Assoziationen im Zusammenhang mit dem Schweregrad der Erkrankung und Antikörpertitern nach einer milden Infektion wurden ebenso identifiziert wie ein dynamisches Lipidprofil nach einer Erstimpfung mit einem Vektorimpfstoff.

Zunächst wurde unter Anwendung NMR-spektroskopischer *in-vitro diagnostic* Analysen der Einfluss verschiedener prä- und postanalytischer Fragestellungen auf das metabolische

Profil von Blutproben analysiert. Dadurch wurden Parameter identifiziert, die besonders instabil sind und durch externe Faktoren stark beeinflusst werden. Für die Interpretation nachfolgender Analysen und Studien sind diese Erkenntnisse von besonderer Bedeutung und sollten daher unbedingt Berücksichtigung finden.

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde in Verbindung mit SARS-CoV-2 entsprechend der Fragestellungen ein spezifisches metabolisches Serumprofil identifiziert. Die Ergebnisse der intensivmedizinisch behandelten COVID-19 Patienten deuteten vorzugsweise auf erhöhte Triglyzerid-Level und reduzierte Apolipoprotein-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollen hin. Diese Dyslipidämie repliziert bereits publizierte Ergebnisse aus australischen und spanischen Kohorten (Bruzzzone et al. 2020; Kimhofer et al. 2020). Neuartig ist der Vergleich des metabolischen Profils bei COVID-19 zu einer intensivmedizinischen Kohorte mit einer kardiovaskulären Erkrankung. Die Differenzierung zu dieser ITS-Kohorte mit ähnlichen Umwelteinflüssen bestimmt durch Ernährung, Medikation und mangelnder Bewegung ist von besonderer Bedeutung. Die Serumlevel von Cholesterin und (HDL) ApoA2 zeigten sich spezifisch sowohl für den Vergleich von COVID-19 zu gesunden Kontrollen als auch zur longitudinalen Unterscheidung intensivmedizinisch behandelter Patienten mit kardiogenem Schock. Weiterhin wurde eine Assoziation des Blutprofils zum Schweregrad einer COVID-19 Erkrankung identifiziert, sowie erstmals Zusammenhänge zwischen Antikörpern gegen SARS-CoV-2 und den metabolischen Profilen aufgezeigt. Hingegen wurde die Frage, ob ein spezifisches Lipidprofil Ursache oder Risikofaktor einer COVID-19 Erkrankung ist, nicht final geklärt. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben allerdings Anlass zu der Vermutung, dass es sich um einen möglichen Risikofaktor insbesondere für einen schweren Krankheitsverlauf handelt. Neue Erkenntnisse wurden im Zusammenhang mit einer Impfung gegen SARS-CoV-2 erzielt. Bei der Impfung mit einem Vektorvakzin wurde eine dynamische Beeinflussung des Lipidprofils, insbesondere von (HDL) ApoA2, nach einer Erstimpfung erkennbar. Die erhöhten Konzentrationen einige Wochen nach der Impfung deuten möglicherweise auf eine Schutzreaktion des Organismus hin. Hohe LDL-Konzentrationen im Serum vor einer Impfung gegen SARS-CoV-2 stehen hingegen im Zusammenhang mit niedrigen Antikörpertitern nach einer Grundimmunisierung und könnten entsprechend für die prognostische Einschätzung einer notwendigen Auffrischungsimpfung herangezogen werden.

Die zugrundeliegende Pathophysiologie bei COVID-19 ist derzeit nicht vollständig aufgeklärt. Standardmäßig erfasste Laborparameter und klinische Scores können den komplexen Mechanismus nur unzureichend widerspiegeln. Moderne Analyseverfahren aus dem Bereich der Metabolomics-Forschung liefern detaillierte Einblicke in eine Vielzahl von Stoffwechselwegen. Die Anwendung des NMR-spektroskopischen IVDr Verfahrens stellt eine gegenwärtig einzigartige Möglichkeit dar Lipoproteine simultan zu analysieren.

Insbesondere die schnelle Quantifizierung diverser Lipidsubfraktionen ermöglicht differenzierte Hinweise hinsichtlich metabolischer Prozesse. Dadurch wurde erstmals eine spezifische Dyslipidämie im Zusammenhang mit COVID-19 identifiziert, wobei sowohl ApoA2 als auch verschiedene Cholesterin-Parameter wichtige Indikatoren im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 zu sein scheinen. Während den Parametern HDL und ApoA2 in einigen Studien eine protektive Wirkung zugesprochen wird, könnten entsprechend reduzierte Konzentrationen bei einer akuten COVID-19 Erkrankung auf einen unzureichenden Schutzmechanismus hindeuten. Im Gegensatz dazu wären erhöhte Konzentrationen wenige Wochen nach einer Impfung ein Indiz für eine Schutzreaktion des Körpers auf virale Impfstoffe (Maïga et al. 2014). Moderne Technologien wie das angewendete IVDr Verfahren bieten die Möglichkeit detaillierte Einblicke in komplexe Stoffwechselwege zu liefern. Zukünftig können damit pathophysiologische Prozesse untersucht werden und dadurch prognostische und therapeutische Maßnahmen abgeleitet werden wie sie für (Long-)COVID-19, aber auch für anderer Krankheitsbilder essentiell sind.

Nach einer detaillierten Diskussion der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse bleiben offene Fragen, die neue Perspektiven für zukünftige Untersuchungen eröffnen.

Die Ergebnisse des metabolischen Vergleichs schwerkranker, intensivmedizinisch behandelter COVID-19 Patienten zu gesunden Kontrollen sind in guter Übereinstimmung mit Studien aus Australien und Spanien (Bruzzzone et al. 2020; Kimhofer et al. 2020; Masuda et al. 2021). Limitierend sollte allerdings berücksichtigt werden, dass anders als bei der australischen Kohorte, sowohl in dieser Arbeit als auch in den Analysen aus Spanien lediglich die NMR-Spektroskopie Anwendung fand. Die Arbeitsgruppe aus Australien zeigte durch die massenspektrometrische Analyse Ergebnisse aus anderen Stoffwechselwegen, die mit dem IVDr Verfahren nicht betrachtet wurden. Insbesondere bei dem mittels Massenspektrometrie erfassten Kynurenin-Mechanismus wurden Veränderungen im metabolischen Profil bei COVID-19 Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen identifiziert, die als mögliche Biomarker dienen könnten (Thomas et al. 2020). Gleichwohl diese und andere bereits publizierte Studien eine limitierte Kohortengröße haben, sollten die Ergebnisse zukünftig mit weiteren Studien und größeren Kohorten aus anderen Regionen unter komplementärer Anwendung der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie gestützt werden.

Weiterhin wurde ein spezifisches metabolisches Profil erarbeitet, welches COVID-19 von gesunden Kontrollen, aber auch von anderen schwerkranken intensivmedizinisch behandelten Patienten abgrenzt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine kardiovaskulär erkrankte Kohorte mit COVID-19 verglichen. Zukünftig wäre ein Vergleich der metabolischen Profile mit einer ebenfalls pulmonalen Erkrankung wie beispielsweise ARDS wünschenswert. Dadurch erfolgt eine differenziertere Abgrenzung von COVID-19 zu

anderen Lungenkrankheiten, wodurch möglicherweise der pathophysiologische Mechanismus besser verstanden werden kann.

Weiterhin wurde die Frage, ob es sich bei dem spezifischen Metabolitenprofil um einen Risikofaktor für einen schweren COVID-19 Verlauf oder um das Ergebnis einer COVID-19 Erkrankung handelt, nur unzureichend geklärt. In dieser Arbeit wurde erstmals das metabolische Profil vor und nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 betrachtet. Der Schweregrad der COVID-19 Erkrankung war dabei allerdings nicht bekannt. Bei einem voraussichtlich milden oder asymptomatischen Krankheitsverlauf wurden keine Unterschiede im Serumprofil im Zusammenhang mit einer Infektion identifiziert. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass bei einem milden Krankheitsverlauf auch keine metabolische Differenzierung zu gesunden Kontrollen erkennbar war. Die Ausprägung des spezifischen Lipidprofils ist dementsprechend mit der Schwere des Krankheitsbildes assoziiert. Die metabolische Analyse vor einer Infektion mit SARS-CoV-2 sowie während bzw. nach einem schweren Krankheitsverlauf ist daher von besonderem Interesse. Dadurch würden neue Erkenntnisse gewonnen werden, die bei prognostischen und frühzeitigen therapeutischen Maßnahmen angewendet werden könnten.

Abschließend sollte weitere Forschung im Bereich von Long-COVID-19 durchgeführt werden. Für eine gezielte Risikostratifizierung sind zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend Daten vorhanden, sodass Gegenmaßnahmen nicht rechtzeitig eingeleitet werden können.

Bei den Impfungen und Boostern gegen SARS-CoV-2 sind das Ansprechen und die personalisierte Immunantwort des Organismus in Form von Antikörpern besonders interessant. Zukünftig könnte dadurch möglicherweise die Response auf eine Impfung prognostiziert und die Notwendigkeit einer Booster-Impfung zeitlich abgeschätzt werden. Auch weitere Untersuchungen des molekularen Mechanismus einer Impfung, insbesondere mit einem Vektorimpfstoff, helfen bei der Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen im Zusammenhang mit SARS-CoV-2.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Alelyunas, Smith, Cleland, Mortishire-Smith, and Wrona. 2017. "Building a Collision Cross Section Library of Pharmaceutical Drugs Using the Vion IMS QToF Platform: Verification of System Performance, Precision and Deviation of CCS Measurements." *Waters Application Note* (186006963):1–9.
- Bacher, Rosati, Esser, Martini, Saggau, Schiminsky, Dargvainiene, Schröder, Wieters, Khodamoradi, Eberhardt, Vehreschild, Neb, Sonntagbauer, Conrad, Tran, Rosenstiel, Markewitz, Wandinger, Augustin, Rybniker, Kochanek, Leypoldt, Cornely, Koehler, Franke, and Scheffold. 2020. "Low-Avidity CD4+ T Cell Responses to SARS-CoV-2 in Unexposed Individuals and Humans with Severe COVID-19." *Immunity* 53(6):1258–71.
- Barantin, Pape, and Akoka. 1997. "A New Method for Absolute Quantitation of MRS Metabolites." *MRM* 38:179–82.
- Barjat, Mattiello, and Freeman. 1999. "Suppression of Radiation Damping in High-Resolution NMR." *Journal of Magnetic Resonance* 136(1):114–17.
- Benjamini, Krieger, and Yekutieli. 2006. "Adaptive Linear Step-up Procedures That Control the False Discovery Rate." *Biometrika* 93(3):491–507.
- Bernini, Bertini, Luchinat, Nincheri, Staderini, and Turano. 2011. "Standard Operating Procedures for Pre-Analytical Handling of Blood and Urine for Metabolomic Studies and Biobanks." *Journal of Biomolecular NMR* 49(3–4):231–43.
- Bertinetto, Engel, and Jansen. 2020. "ANOVA Simultaneous Component Analysis: A Tutorial Review." *Analytica Chimica Acta: X* 6:100061.
- Blanco-Vaca, Escolà-Gil, Martín-Campos, and Julve. 2001. "Role of ApoA-II in Lipid Metabolism and Atherosclerosis: Advances in the Study of an Enigmatic Protein." *Journal of Lipid Research* 42(11):1727–39.
- Blasco, Bessy, Plantier, Lefevre, Piver, Bernard, Marlet, Stefic, Benz-de Bretagne, Cannet, Lumbu, Morel, Boulard, Andres, Vourc'h, Hérault, Guillon, and Emond. 2020. "The Specific Metabolome Profiling of Patients Infected by SARS-COV-2 Supports the Key Role of Tryptophan-Nicotinamide Pathway and Cytosine Metabolism." *Scientific Reports* 10(1):16824.
- Bloembergen, and Pound. 1954. "Radiation Damping in Magnetic Resonance Experiments." *Physical Review* 95(1):8–12.
- Bollard, Stanley, Lindon, Nicholson, and Holmes. 2005. "NMR-Based Metabonomic Approaches for Evaluating Physiological Influences on Biofluid Composition." *NMR in*

Biomedicine 18(3):143–62.

Borén, Chapman, Krauss, Packard, Bentzon, Binder, Daemen, Demer, Hegele, Nicholls, Nordestgaard, Watts, Bruckert, Fazio, Ference, Graham, Horton, Landmesser, Laufs, Masana, Pasterkamp, Raal, Ray, Schunkert, Taskinen, van de Sluis, Wiklund, Tokgozoglu, Catapano, and Ginsberg. 2020. “Low-Density Lipoproteins Cause Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Pathophysiological, Genetic, and Therapeutic Insights: A Consensus Statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel.” *European Heart Journal* 41(24):2313–30.

Bruckert, and Rosenbaum. 2011. “Lowering LDL-Cholesterol through Diet: Potential Role in the Statin Era.” *Current Opinion in Lipidology* 22(1):43–48.

Bruker BioSpin. 2019. “In Vitro Diagnostic Research Solutions.” (T165319):1–12.

Bruker Corporation. 2019. “AVANCE IVDTM IVDTM Methods User Manual.” (H161804_3_003):1–72.

Bruzzone, Bizkarguenaga, Gil-Redondo, Diercks, Arana, García de Vicuña, Seco, Bosch, Palazón, San Juan, Laín, Gil-Martínez, Bernardo-Seisdedos, Fernández-Ramos, Lopitz-Otsoa, Embade, Lu, Mato, and Millet. 2020. “SARS-CoV-2 Infection Dysregulates the Metabolomic and Lipidomic Profiles of Serum.” *IScience* 23(10):101645.

Budzikiewicz, and Schäfer. 2005. *Massenpektrometrie*. 5th ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Burton, Quilliam, and Walter. 2005. “Quantitative ¹H NMR with External Standards: Use in Preparation of Calibration Solutions for Algal Toxins and Other Natural Products.” *Analytical Chemistry* 77(10):3123–31.

Claridge. 2016. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Ltd.

DATATM Team. 2022. “DATATMtab: Online Statistics Calculator. DATATMtab e.U. Graz, Austria.” Retrieved January 6, 2022 (<https://datatab.de/>).

Davies, Bauer, Barker, and Freeman. 1985. “The Dynamic Range Problem in NMR.” *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 64(1):155–59.

van Deemter, Zuiderweg, and Klinkenberg. 1956. “Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Nonideality in Chromatography.” *Chemical Engineering Science* 5(6):271–89.

Deng, and Peng. 2020. “Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China.” *Journal of Clinical Medicine* 9(2):575.

- Dettmer, Aronov, and Hammock. 2007. "Mass Spectrometry-Based Metabolomics." *Mass Spectrometry Reviews* 26(1):51–78.
- Dona, Jiménez, Schafer, Humpfer, Spraul, Lewis, Pearce, Holmes, Lindon, and Nicholson. 2014. "Precision High-Throughput Proton NMR Spectroscopy of Human Urine, Serum, and Plasma for Large-Scale Metabolic Phenotyping." *Analytical Chemistry* 86(19):9887–94.
- Dunn, and Ellis. 2005. "Metabolomics: Current Analytical Platforms and Methodologies." *Trends in Analytical Chemistry* 24(4):285–94.
- Dunn, Wilson, Nicholls, and Broadhurst. 2012. "The Importance of Experimental Design and QC Samples in Large-Scale and MS-Driven Untargeted Metabolomic Studies of Humans." *Bioanalysis* 4(18):2249–64.
- European Medicines Agency. 2022. "COVID-19 Vaccines." Retrieved July 26, 2021 (<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/covid-19-vaccines>).
- Eurosurveillance Editorial Team. 2020. "Note from the Editors: World Health Organization Declares Novel Coronavirus (2019-NCoV) Sixth Public Health Emergency of International Concern." *Euro Surveill* 25(5):200121e.
- Fahrmeir, Hamerle, and Tutz. 1996. *Multivariate Statistische Verfahren*. 2nd ed. Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- Fahrmeir, Heumann, Künstler, Pigeot, and Tutz. 2016. *Statistik*. 8th ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Fiehn. 2001. "Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks." *Comparative and Functional Genomics* 2(3):155–68.
- Findeisen, Brand, and Berger. 2007. "A ¹H-NMR Thermometer Suitable for Cryoprobes." *Magnetic Resonance in Chemistry* 45(2):175–78.
- Forni, Mantovani, Moretta, Rappuoli, Rezza, Bagnasco, Barsacchi, Bussolati, Cacciari, Cappuccinelli, Cheli, Guarini, Bacci, Mancini, Marcuzzo, Morrone, Parisi, Pasquino, Patrono, Curzio, Remuzzi, Roncaglia, Schiaffino, and Vineis. 2021. "COVID-19 Vaccines: Where We Stand and Challenges Ahead." *Cell Death and Differentiation* 28(2):626–39.
- Fuk-Woo Chan, Yuan, Kok, Kai-Wang To, Chu, Yang, Xing, Liu, Chik-Yan Yip, Wing-Shan Poon, Tsoi, Kam-Fai Lo, Chan, Kwok-Man Poon, Chan, Ip, Cai, Chi-Chung Cheng, Chen, Kim-Ming Hui, and Yuen. 2020. "A Familial Cluster of Pneumonia Associated with the 2019 Novel Coronavirus Indicating Person to Person Transmission: A Study

- of a Family Cluster.” *The Lancet* 395(10223):514–23.
- Gethings, Kraljevic Pavelic, Sedic, Shockcor, McDonald, Vissers, Lamec, Batinic, and Langridge. 2012. “An Ion Mobility-Enabled Data Independent Multi-Omics Approach to Quantitatively Characterize Urine From Children Diagnosed With Idiopathic Nephrotic Syndrome.” *Waters Application Note* (720004329en):1–6.
- Gey. 2015. *Instrumentelle Analytik Und Bioanalytik*. 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- González-Domínguez, González-Domínguez, Sayago, and Fernández-Recamales. 2020. “Recommendations and Best Practices for Standardizing the Pre-Analytical Processing of Blood and Urine Samples in Metabolomics.” *Metabolites* 10(6):229.
- Gorbalenya, Baker, Baric, de Groot, Drosten, Gulyaeva, Haagmans, Lauber, Leontovich, Neuman, Penzar, Perlman, Poon, Samborskiy, Sidorov, Sola, and Ziebuhr. 2020. “The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-NCoV and Naming It SARS-CoV-2.” *Nature Microbiology* 5(4):536–44.
- Grant, Geoghegan, Arbyn, Mohammed, McGuinness, Clarke, and Wade. 2020. “The Prevalence of Symptoms in 24,410 Adults Infected by the Novel Coronavirus (SARS-CoV-2; COVID-19): A Systematic Review and Meta-Analysis of 148 Studies from 9 Countries.” *PLoS ONE* 15(6):e0234765.
- Gross. 2013. *Massenspektrometrie*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Guan, Ni, Hu, Liang, Ou, He, Liu, Shan, Lei, Hui, Du, Li, Zeng, Yuen, Chen, Tang, Wang, Chen, Xiang, Li, Wang, Liang, Peng, Wei, Liu, Hu, Peng, Wang, Liu, Chen, Li, Zheng, Qiu, Luo, Ye, Zhu, and Zhong. 2020. “Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China.” *New England Journal of Medicine* 382(18):1708–20.
- Günther, Ludwig, and Rüterjans. 2000. “NMRLAB-Advanced NMR Data Processing in Matlab.” *Journal of Magnetic Resonance* 145(2):201–8.
- Hajmoussa, Vogelaar, Brouwer, van der Graaf, Henning, and Krenning. 2017. “The 6-Chromanol Derivate SUL-109 Enables Prolonged Hypothermic Storage of Adipose Tissue-Derived Stem Cells.” *Biomaterials* 119:43–52.
- Hall. 2006. “Plant Metabolomics: From Holistic Hope, to Hype, to Hot Topic.” *New Phytologist* 169(3):453–68.
- Handl. 2010. *Multivariate Analysemethoden*. 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Handl, and Kuhlenkasper. 2017. *Multivariate Analysemethoden*. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag GmbH.
- Hart. 1989. *Organische Chemie*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.

- Herder, Karakas, and Koenig. 2011. "Biomarkers for the Prediction of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 90(1):52–66.
- Hesse, Meier, and Zeeh. 2005. *Spektroskopische Methoden in Der Organischen Chemie*. 7th ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG.
- Hoffmann, Kleine-Weber, Schroeder, Krüger, Herrler, Erichsen, Schiergens, Herrler, Wu, Nitsche, Müller, Drosten, and Pöhlmann. 2020. "SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor." *Cell* 181(2):271–80.
- Holland, Smith, Eskenazi, and Bastaki. 2003. "Biological Sample Collection and Processing for Molecular Epidemiological Studies." *Reviews in Mutation Research* 543(3):217–34.
- Hollywood, Brison, and Goodacre. 2006. "Metabolomics: Current Technologies and Future Trends." *Proteomics* 6(17):4716–23.
- Hu, Guo, Zhou, and Shi. 2021. "Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19." *Nature Reviews Microbiology* 19(3):141–54.
- Huang, Wang, Li, Ren, Zhao, Hu, Zhang, Fan, Xu, Gu, Cheng, Yu, Xia, Wei, Wu, Xie, Yin, Li, Liu, Xiao, Gao, Guo, Xie, Wang, Jiang, Gao, Jin, Wang, and Cao. 2020. "Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China." *The Lancet* 395(10223):497–506.
- Jiménez, Holmes, Heude, Tolson, Harvey, Lodge, Chetwynd, Cannet, Fang, Pearce, Lewis, Viant, Lindon, Spraul, Schäfer, and Nicholson. 2018. "Quantitative Lipoprotein Subclass and Low Molecular Weight Metabolite Analysis in Human Serum and Plasma by ¹H NMR Spectroscopy in a Multilaboratory Trial." *Analytical Chemistry* 90(20):11962–71.
- Kanu, Dwivedi, Tam, Matz, and Hill. 2008. "Ion Mobility-Mass Spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry* 43(1):1–22.
- Karu, Deng, Slae, Guo, Sajed, Huynh, Wine, and Wishart. 2018. "A Review on Human Fecal Metabolomics: Methods, Applications and the Human Fecal Metabolome Database." *Analytica Chimica Acta* 1030:1–24.
- Keeler. 2010. *Understanding NMR Spectroscopy*. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Kemsley, Le Gall, Dainty, Watson, Harvey, Tapp, and Colquhoun. 2007. "Multivariate Techniques and Their Application in Nutrition: A Metabolomics Case Study." *British Journal of Nutrition* 98(1):1–14.
- Kessler. 2007. *Multivariate Datenanalyse*. 1st ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH &

Co. KGaA.

- Kimhofer, Lodge, Whiley, Gray, Loo, Lawler, Nitschke, Bong, Morrison, Begum, Richards, Yeap, Smith, Smith, Holmes, and Nicholson. 2020. "Integrative Modeling of Quantitative Plasma Lipoprotein, Metabolic, and Amino Acid Data Reveals a Multiorgan Pathological Signature of SARS-CoV-2 Infection." *Journal of Proteome Research* 19(11):4442–54.
- Koczulla, Ankermann, Behrends, Berlit, Böing, Brinkmann, Franke, Glöckl, Gogoll, Hummel, Kronsbein, Maibaum, Peters, Pfeifer, Platz, Pletz, Pongratz, Powitz, Rabe, Scheibenbogen, Stallmach, Stegbauer, Wagner, Waller, Wirtz, Zeiher, and Zwick. 2021. "S1-Leitlinie Post-COVID / Long-COVID." *AWMF Online* (020/027):1–76.
- Kuhlmann. 2010. *Präanalytik - Von Der Probennahme Bis Zur Labordiagnostik*. Koblenz.
- Labor Schotttdorf. 2016. *Handbuch Der Präanalytik: Ein Praktischer Leitfaden Für Die Probengewinnung Und Einsendung*. Augsburg: Labor Schotttdorf MVZ GmbH.
- Lackner, and Peetz. 2013. *Lexikon Der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Lam, Jia, Zhang, Shum, Jiang, Zhu, Tong, Shi, Ni, Liao, Li, Jiang, Wei, Yuan, Zheng, Cui, Li, Pei, Qiang, Cheung, Li, Sun, Qin, Huang, Leung, Holmes, Hu, Guan, and Cao. 2020. "Identifying SARS-CoV-2-Related Coronaviruses in Malayan Pangolins." *Nature* 583(7815):282–85.
- Lixenfeld, Künsting, Martin, von Kopylow, Lehrian, Lunding, Buhre, Quack, Steinhaus, Graf, Ehlers, and Rahmöller. 2021. "The BioNTech / Pfizer Vaccine BNT162b2 Induces Class-Switched SARS-CoV-2-Specific Plasma Cells and Potential Memory B Cells as Well as IgG and IgA Serum and IgG Saliva Antibodies upon the First Immunization." *MedRxiv* 2021.03.10.21252001.
- Lodge, Nitschke, Kimhofer, Coudert, Begum, Bong, Richards, Edgar, Raby, Spraul, Schaefer, Lindon, Loo, Holmes, and Nicholson. 2021. "NMR Spectroscopic Windows on the Systemic Effects of SARS-CoV-2 Infection on Plasma Lipoproteins and Metabolites in Relation to Circulating Cytokines." *Journal of Proteome Research* 20(2):1382–96.
- Lodge, Nitschke, Kimhofer, Wist, Bong, Loo, Masuda, Richards, Lindon, Bermel, Reinsperger, Schaefer, Spraul, Holmes, and Nicholson. 2021. "Diffusion and Relaxation Edited Proton NMR Spectroscopy of Plasma Reveals a High-Fidelity Supramolecular Biomarker Signature of SARS-CoV - 2 Infection." *Analytical Chemistry* 93(8):3876–3986.
- Lodge, Nitschke, Loo, Kimhofer, Bong, Richards, Spraul, Schaefer, Lindon, Holmes, and

- Nicholson. 2021. "Low Volume in Vitro Diagnostic Proton NMR Spectroscopy of 2 Human Blood Plasma for Lipoprotein and Metabolite Analysis: 3 Application to SARS-CoV - 2 Biomarkers 1." *Journal of Proteome Research* 20(2):1415–23.
- Löffler, and Petrides. 2014. *Biochemie Und Pathobiochemie*. 9th ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Loo, Lodge, Kimhofer, Bong, Begum, Whiley, Gray, Lindon, Nitschke, Lawler, Schäfer, Spraul, Richards, Nicholson, and Holmes. 2020. "Supplement Quantitative In-Vitro Diagnostic NMR Spectroscopy for Lipoprotein and Metabolite Measurements in Plasma and Serum: Recommendations for Analytical Artifact Minimization with Special Reference to COVID-19/SARS-CoV-2 Samples." *Journal of Proteome Research* 19(11):4428–41.
- Lu, Zhao, Li, Niu, Yang, Wu, Wang, Song, Huang, Zhu, Bi, Ma, Zhan, Wang, Hu, Zhou, Hu, Zhou, Zhao, Chen, Meng, Wang, Lin, Yuan, Xie, Ma, Liu, Wang, Xu, Holmes, Gao, Wu, Chen, Shi, and Tan. 2020. "Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding." *The Lancet* 395(10223):565–74.
- Ludwig, and Günther. 2011. "MetaboLab - Advanced NMR Data Processing and Analysis for Metabolomics." *BMC Bioinformatics* 12(1):366.
- Maier, Bickerton, and Britton. 2015. *Coronaviruses: Methods and Protocols*. New York, Heidelberg: Springer Science+Business Media.
- Maïga, Kalopissis, and Chabert. 2014. "Apolipoprotein A-II Is a Key Regulatory Factor of HDL Metabolism as Appears from Studies with Transgenic Animals and Clinical Outcomes." *Biochimie* 96(1):56–66.
- Martines, Ritter, Matkovic, Gary, Bollweg, Bullock, Goldsmith, Silva-Flannery, Seixas, Reagan-Steiner, Uyeki, Denison, Bhatnagar, Shieh, Zaki, Cole, Lewis, Fair, and Estetter. 2020. "Pathology and Pathogenesis of SARS-CoV-2 Associated with Fatal Coronavirus Disease, United States." *Emerging Infectious Diseases* 26(9):2005–15.
- Masuda, Lodge, Nitschke, Spraul, Schaefer, Bong, Kimhofer, Hall, Loo, Bizkarguenaga, Bruzzone, Gil-Redondo, Embade, Mato, Holmes, Wist, Millet, and Nicholson. 2021. "Integrative Modeling of Plasma Metabolic and Lipoprotein Biomarkers of SARS-CoV-2 Infection in Spanish and Australian COVID-19 Patient Cohorts." *Journal of Proteome Research* 20(8):4139–52.
- McKay. 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: Bridging Education and Research* 38

A(5):197–220.

Meiboom, and Gill. 1958. “Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times.” *Review of Scientific Instruments* 29(8):688–91.

Menni, Klaser, May, Polidori, Capdevila, Louca, Sudre, Nguyen, Drew, Merino, Hu, Selvachandran, Antonelli, Murray, Canas, Molteni, Graham, Modat, Joshi, Mangino, Hammers, Goodman, Chan, Wolf, Steves, Valdes, Ourselin, and Spector. 2021. “Vaccine Side-Effects and SARS-CoV-2 Infection after Vaccination in Users of the COVID Symptom Study App in the UK: A Prospective Observational Study.” *The Lancet Infectious Diseases* 21(7):939–49.

Meoni, Ghini, Maggi, Vignoli, Mazzoni, Salvati, Capone, Vanni, Tenori, Fontanari, Lavorini, Peris, Bartoloni, Liotta, Cosmi, Luchinat, Annunziato, Turano, VoPham, Chan, Ntzani, Vakalis, and Tsilidis. 2020. “Metabolomiclipidomic Profiling of COVID-19 and Individual Response to Tocilizumab.” *MedRxiv* 2020.11.10.20228361.

Mihaleva, van Schalkwijk, de Graaf, van Duynhoven, van Dorsten, Vervoort, Smilde, Westerhuis, and Jacobs. 2014. “A Systematic Approach to Obtain Validated Partial Least Square Models for Predicting Lipoprotein Subclasses from Serum NMR Spectra.” *Analytical Chemistry* 86(1):543–50.

Monakhova, Kuballa, Tschiersch, and Diehl. 2017. “Rapid NMR Determination of Inorganic Cations in Food Matrices: Application to Mineral Water.” *Food Chemistry* 221:1828–33.

Monsonis Centelles, Hoefsloot, Khakimov, Ebrahimi, Lind, Kristensen, De Roo, Jacobs, van Duynhoven, Cannet, Fang, Humpfer, Schäfer, Spraul, Engelsens, and Smilde. 2017. “Toward Reliable Lipoprotein Particle Predictions from NMR Spectra of Human Blood: An Interlaboratory Ring Test.” *Analytical Chemistry* 89(15):8004–12.

Müller-Esterl. 2018. *Biochemie*. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag GmbH.

Nagana Gowda, and Raftery. 2014. “Advances in NMR-Based Metabolomics.” *Comprehensive Analytical Chemistry* 63:187–211.

Nalbandian, Sehgal, Gupta, Madhavan, McGroder, Stevens, Cook, Nordvig, Shalev, Sehwat, Ahluwalia, Bikdeli, Dietz, Der-Nigoghossian, Liyanage-Don, Rosner, Bernstein, Mohan, Beckley, Seres, Choueiri, Uriel, Ausiello, Accili, Freedberg, Baldwin, Schwartz, Brodie, Garcia, Elkind, Connors, Bilezikian, Landry, and Wan. 2021. “Post-Acute COVID-19 Syndrome.” *Nature Medicine* 27(4):601–15.

Nicholson, and Lindon. 2008. “Metabonomics.” *Nature* 455:1054–56.

Nicholson, Lindon, and Holmes. 1999. “‘Metabonomics’: Understanding the Metabolic Responses of Living Systems to Pathophysiological Stimuli via Multivariate Statistical

- Analysis of Biological NMR Spectroscopic Data.” *Xenobiotica* 29(11):1181–89.
- Niederau, and Böhm. 2021. *Klinikleitfaden Labordiagnostik*. 7th ed. München: Elsevier GmbH.
- Nielsen, and Oliver. 2005. “The next Wave in Metabolome Analysis.” *Trends in Biotechnology* 23(11):544–46.
- Nordestgaard, Benn, Schnohr, and Tybjærg-Hansen. 2007. “Nonfasting Triglycerides and Risk of Myocardial Infarction, Ischemic Heart Disease, and Death in Men and Women.” *Journal of the American Medical Association* 298(3):299–308.
- Nordestgaard, and Tybjærg-Hansen. 1992. “IDL, VLDL, Chylomicrons and Atherosclerosis.” *European Journal of Epidemiology* 8:92–98.
- Nordestgaard, and Varbo. 2014. “Triglycerides and Cardiovascular Disease.” *The Lancet* 384(9943):626–35.
- Oliver, Winson, Kell, and Baganz. 1998. “Systematic Functional Analysis of the Yeast Genome.” *Trends in Biotechnology* 16(9):373–78.
- Overmyer, Shishkova, Miller, Balnis, Bernstein, Peters-Clarke, Meyer, Quan, Muehlbauer, Trujillo, He, Chopra, Chieng, Tiwari, Judson, Paulson, Brademan, Zhu, Serrano, Linke, Drake, Adam, Schwartz, Singer, Swanson, Mosher, Stewart, Coon, and Jaitovich. 2021. “Large-Scale Multi-Omic Analysis of COVID-19 Severity.” *Cell Systems* 12(1):23–40.
- Paglia, Williams, Menikarachchi, Thompson, Tyldesley-Worster, Halldórsson, Rolfsson, Moseley, Grant, Langridge, Palsson, and Astarita. 2014. “Ion Mobility Derived Collision Cross Sections to Support Metabolomics Applications.” *Analytical Chemistry* 86(8):3985–93.
- Patti, Yanes, and Siuzdak. 2012. “Metabolomics: The Apogee of the Omics Trilogy.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13(4):263–69.
- Prasad, and Prasad. 2020. “Single Virus Targeting Multiple Organs: What We Know and Where We Are Heading?” *Frontiers in Medicine* 7:370.
- Ren, Hinzman, Kang, Szczesniak, and Lu. 2015. “Computational and Statistical Analysis of Metabolomics Data.” *Metabolomics* 11(6):1492–1513.
- Ritgen. 2019. *Analytische Chemie I*. 1st ed. Berlin: Springer-Verlag GmbH.
- Ritgen. 2020. *Analytische Chemie II*. 1st ed. Berlin: Springer-Verlag GmbH.
- Roberts, Muelas, Taylor, Davison, Xu, Grixti, Gotts, Sorokin, Goodacre, and Kell. 2022. “Untargeted Metabolomics of COVID-19 Patient Serum Reveals Potential Prognostic Markers of Both Severity and Outcome.” *Metabolomics* 18:6.

- Rosendorff. 2002. "Effects of LDL Cholesterol on Vascular Function." *Journal of Human Hypertension* 16(1):26–28.
- Sachet, Borba, Bonfá, Vinagre, Silva, and Maranhão. 2007. "Chloroquine Increases Low-Density Lipoprotein Removal from Plasma in Systemic Lupus Patients." *Lupus* 16(4):273–78.
- Saeed, Feofanova, Yu, Sun, Virani, Nambi, Coresh, Guild, Boerwinkle, Ballantyne, and Hoogeveen. 2018. "Remnant-Like Particle Cholesterol, Low-Density Lipoprotein Triglycerides, and Incident Cardiovascular Disease." *Journal of the American College of Cardiology* 72(2):156–69.
- Sarstedt. n.d. *Zentrifugation - Zentrifugationsbedingungen Für Die S-Monovette*. Nürnberg: SARSTEDT AG & Co. KG.
- Scheiblauer, Nübling, Wolf, Khodamoradi, Bellinghausen, Sonntagbauer, Esser-Nobis, Filomena, Mahler, Maier, and Stephan. 2022. "Antibody Response to SARS-CoV-2 for More than One Year – Kinetics and Persistence of Detection Are Predominantly Determined by Avidity Progression and Test Design." *Journal of Clinical Virology* 146:105052.
- Schmelter, Föh, Mallagaray, Rahmöller, Ehlers, Lehrian, von Kopylow, Künsting, Lixenfeld, Martin, Ragab, Meyer-Saraei, Kreutzmann, Eitel, Taube, Käding, Jantzen, Graf, Sina, and Günther. 2021. "Metabolic and Lipidomic Markers Differentiate COVID-19 From Non-Hospitalized and Other Intensive Care Patients." *Frontiers in Molecular Biosciences* 8:737039.
- Shen, Yi, Sun, Bi, Du, Zhang, Quan, Zhang, Sun, Qian, Ge, Liu, Liang, Chen, Zhang, Li, Xu, He, Chen, Wang, Yan, Zheng, Wang, Zhu, Kong, Kang, Liang, Ding, Ruan, Xiang, Cai, Gao, Li, Li, Xiao, Lu, Zhu, Liu, Chen, and Guo. 2020. "Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera." *Cell* 182(1):59–72.
- Skoog, Holler, and Crouch. 2007. *Principles of Instrumental Analysis*. 6th ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole.
- Smilde, Jansen, Hoefsloot, Lamers, van der Greef, and Timmerman. 2005. "ANOVA-Simultaneous Component Analysis (ASCA): A New Tool for Analyzing Designed Metabolomics Data." *Bioinformatics* 21(13):3043–48.
- Smirnov, Maier, Walker, Heinzmann, Forcisi, Martinez, Walter, and Schmitt-Kopplin. 2016. "Challenges of Metabolomics in Human Gut Microbiota Research." *International Journal of Medical Microbiology* 306(5):266–79.
- Sudre, Murray, Varsavsky, Graham, Penfold, Bowyer, Pujol, Klaser, Antonelli, Canas, Molteni, Modat, Jorge Cardoso, May, Ganesh, Davies, Nguyen, Drew, Astley, Joshi,

- Merino, Tsereteli, Fall, Gomez, Duncan, Menni, Williams, Franks, Chan, Wolf, Ourselin, Spector, and Steves. 2021. "Attributes and Predictors of Long COVID." *Nature Medicine* 27(4):626–31.
- Suna, Salminen, Soininen, Laatikainen, Ingman, Mäkelä, Savolainen, Hannuksela, Jauhiainen, Taskinen, Kaski, and Ala-Korpela. 2007. "¹H NMR Metabonomics of Plasma Lipoprotein Subclasses: Elucidation of Metabolic Clustering by Self-Organising Maps." *NMR in Biomedicine* 20(7):658–72.
- Sungnak, Huang, Bécavin, Berg, Queen, Litvinukova, Talavera-López, Maatz, Reichart, Sampaziotis, Worlock, Yoshida, Barnes, Banovich, Barbry, Brazma, Collin, Desai, Duong, Eickelberg, Falk, Farzan, Glass, Gupta, Haniffa, Horvath, Hubner, Hung, Kaminski, Krasnow, Kropski, Kuhnemund, Lako, Lee, Leroy, Linnarson, Lundeborg, Meyer, Miao, Misharin, Nawijn, Nikolic, Nosedá, Ordovas-Montanes, Oudit, Pe'er, Powell, Quake, Rajagopal, Tata, Rawlins, Regev, Reyfman, Rozenblatt-Rosen, Saeb-Parsy, Samakovlis, Schiller, Schultze, Seibold, Seidman, Seidman, Shalek, Shepherd, Spence, Spira, Sun, Teichmann, Theis, Tsankov, Vallier, van den Berge, Whitsett, Xavier, Xu, Zaragosi, Zerti, Zhang, Zhang, Rojas, and Figueiredo. 2020. "SARS-CoV-2 Entry Factors Are Highly Expressed in Nasal Epithelial Cells Together with Innate Immune Genes." *Nature Medicine* 26(5):681–87.
- Szymanska, Saccenti, Smilde, and Westerhuis. 2012. "Double-Check: Validation of Diagnostic Statistics for PLS-DA Models in Metabolomics Studies." *Metabolomics* 8:S3–16.
- Thomas, Stefanoni, Reisz, Nemkov, Bertolone, Francis, Hudson, Zimring, Hansen, Hod, Spitalnik, and D'Alessandro. 2020. "COVID-19 Infection Alters Kynurenine and Fatty Acid Metabolism, Correlating with IL-6 Levels and Renal Status." *JCI Insight* 5(14):e140327.
- Verband Forschender Arzneimittelhersteller. 2022. "Impfstoffe Gegen Coronavirus – Aktueller Entwicklungsstand | Vfa." Retrieved January 30, 2021 (<https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/impfstoffe-zum-schutz-vor-coronavirus-2019-ncov>).
- Villas-Bas, Roessner, Hansen, Smedsgaard, and Nielsen. 2007. *Metabolome Analysis: An Introduction*. 1st ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Wachsmuth, Oefner, and Dettmer. 2013. "Equipment and Metabolite Identification (ID) Strategies for Mass-Based Metabolomic Analysis." Pp. 3–28 in *Metabolomics in Food and Nutrition*. Sawston: Woodhead Publishing.
- Wallmeier, Samol, Ellmann, Zacharias, Vogl, Garcia, Dettmer, Oefner, and Gronwald. 2017.

- "Quantification of Metabolites by NMR Spectroscopy in the Presence of Protein." *Journal of Proteome Research* 16(4):1784–96.
- Wang, Debik, Andreassen, Euceda, Haukaas, Cannet, Schäfer, Bathen, and Giskeødegård. 2019. "Effect of Repeated Freeze-Thaw Cycles on NMR-Measured Lipoproteins and Metabolites in Biofluids." *Journal of Proteome Research* 18(10):3681–88.
- Wishart. 2008a. "Metabolomics: Applications to Food Science and Nutrition Research." *Trends in Food Science and Technology* 19(9):482–93.
- Wishart. 2008b. "Quantitative Metabolomics Using NMR." *Trends in Analytical Chemistry* 27(3):228–37.
- Wishart, Feunang, Marcu, Guo, Liang, Vázquez-Fresno, Sajed, Johnson, Li, Karu, Sayeeda, Lo, Assempour, Berjanskii, Singhal, Arndt, Liang, Badran, Grant, Serra-Cayuela, Liu, Mandal, Neveu, Pon, Knox, Wilson, Manach, and Scalbert. 2018. "HMDB 4.0: The Human Metabolome Database for 2018." *Nucleic Acids Research* 46:D608–17.
- Wishart, Jewison, Guo, Wilson, Knox, Liu, Djoumbou, Mandal, Aziat, Dong, Bouatra, Sinelnikov, Arndt, Xia, Liu, Yallou, Bjorndahl, Perez-Pineiro, Eisner, Allen, Neveu, Greiner, and Scalbert. 2013. "HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013." *Nucleic Acids Research* 41:D801-7.
- Wishart, Knox, Guo, Eisner, Young, Gautam, Hau, Psychogios, Dong, Bouatra, Mandal, Sinelnikov, Xia, Jia, Cruz, Lim, Sobsey, Shrivastava, Huang, Liu, Fang, Peng, Fradette, Cheng, Tzur, Clements, Lewis, De Souza, Zuniga, Dawe, Xiong, Clive, Greiner, Nazyrova, Shaykhutdinov, Li, Vogel, and Forsythe. 2009. "HMDB: A Knowledgebase for the Human Metabolome." *Nucleic Acids Research* 37:D603-10.
- Wishart, Tzur, Knox, Eisner, Guo, Young, Cheng, Jewell, Arndt, Sawhney, Fung, Nikolai, Lewis, Coutouly, Forsythe, Tang, Shrivastava, Jeroncic, Stothard, Amegbey, Block, Hau, Wagner, Miniaci, Clements, Gebremedhin, Guo, Zhang, Duggan, Macinnis, Weljie, Dowlatabadi, Bamforth, Clive, Greiner, Li, Marrie, Sykes, Vogel, and Querengesser. 2007. "HMDB: The Human Metabolome Database." *Nucleic Acids Research* 35:D521-6.
- World Health Organization. 2020. "Novel Coronavirus." *Situation Report* 205(6):1–19.
- World Health Organization. 2021a. "Antigen-Detection in the Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection." *Interim Guidance*.
- World Health Organization. 2021b. "Tracking SARS-CoV-2 Variants." Retrieved December 22, 2021 (<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>).

- World Health Organization. 2021c. "WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard." Retrieved January 31, 2021 (<https://covid19.who.int/>).
- Wu, Di, Shu, Yang, Song, Zhang, Yao, Liu, Huang, Yu, Yang, Zhu, Xu, Mu, Wang, Wang, Tang, Ren, Wu, Lin, Qiu, Zhang, Shang, and Zhou. 2020. "Plasma Metabolomic and Lipidomic Alterations Associated with COVID-19." *National Science Review* 7(7):1157–68.
- Wu, Fan, Zhao, Yu, Chen, Wang, Song, Hu, Tao, Tian, Pei, Yuan, Zhang, Dai, Liu, Wang, Zheng, Xu, Holmes, and Zhang. 2020. "A New Coronavirus Associated with Human Respiratory Disease in China." *Nature* 579(7798):265–69.
- Xiao, Zhai, Feng, Zhou, Zhang, Zou, Li, Guo, Li, Shen, Zhang, Shu, Huang, Li, Zhang, Chen, Wu, Peng, Huang, Xie, Cai, Hou, Chen, Xiao, and Shen. 2020. "Isolation of SARS-CoV-2-Related Coronavirus from Malayan Pangolins." *Nature* 583(7815):286–89.
- Yamayoshi, Sakai-Tagawa, Koga, Akasaka, Nakachi, Koh, Maeda, Adachi, Saito, Nagai, Ikeuchi, Ogura, Baba, Fujita, Fukui, Ito, Hattori, Yamamoto, Nakamoto, Furusawa, Yasuhara, Ujie, Yamada, Ito, Mitsuya, Omagari, Yotsuyanagi, Iwatsuki-Horimoto, Imai, and Kawaoka. 2020. "Comparison of Rapid Antigen Tests for COVID-19." *Viruses* 12(12):1420.
- Zhang, Du, Li, Zheng, Yang, Hu, Wang, Xiao, Yan, Shi, and Zhou. 2020. "Molecular and Serological Investigation of 2019-NCoV Infected Patients: Implication of Multiple Shedding Routes." *Emerging Microbes and Infections* 9(1):386–89.
- Zhang, Sun, Qiu, and Wang. 2013. "NMR-Based Metabolomics Coupled with Pattern Recognition Methods in Biomarker Discovery and Disease Diagnosis." *Magnetic Resonance in Chemistry* 51(9):549–56.
- Zhou, Yang, Wang, Hu, Zhang, Zhang, Si, Zhu, Li, Huang, Chen, Chen, Luo, Guo, Jiang, Liu, Chen, Shen, Wang, Zheng, Zhao, Chen, Deng, Liu, Yan, Zhan, Wang, Xiao, and Shi. 2020. "A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin." *Nature* 579(7798):270–73.

8 ANHANG

8.1 Materialien

8.1.1 Chemikalien

Tabelle 8-1: Verwendete Chemikalien unter Angabe der Summenformel, der CAS-Nummer, des Herstellers und der Reinheit.

Substanz	Summenformel	CAS-Nummer	Hersteller	Reinheit
Acetic acid	CH_3COOH	64-19-7	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	100%
Alanine	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	56-41-7	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥99%
Asparagine monohydrate	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5794-18-8	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥99%
Citric acid monohydrate	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5949-29-1	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	p.a.
Creatinine	$\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$	57-00-1	Alfa Aesar, Ward Hill, USA	98%
Deuteriumoxid	D_2O	7789-20-0	Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA	99,8%
Dimethylsulfone	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2\text{S}$	67-71-0	Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA	98%

Substanz	Summenformel	CAS-Nummer	Hersteller	Reinheit
di-Natriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	7558-79-4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	≥99%, p.a.
Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	64-17-5	VWR International, Radnor, USA	absolut, 100%
Formic acid	HCOOH	64-18-6	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	98-100%
D-Galactose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	59-23-4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Bio-chem. Zwecke
Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	50-99-7	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	p.a.
Glutamic acid	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	56-86-0	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥99%
Glutamine	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$	56-85-9	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥99%
Glycine	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	56-40-6	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥99%
Histidine	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	71-00-1	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥99%

Substanz	Summenformel	CAS-Nummer	Hersteller	Reinheit
3-Hydroxybutyric acid; Natrium-Salz	C ₄ H ₈ O ₃	150-83-4	Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA	≥99%
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	73-32-5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	≥99%
alpha-Ketoglutaric acid; Natrium-Salz	C ₅ H ₅ O ₅ Na	22202-68-2	Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA	≥98%
Lactic acid; Natrium-Salz	C ₃ H ₅ O ₃ Na	127-09-3	Fluka, Buchs, Schweiz	≥99,0%
Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	61-90-5	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥99%
Lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	56-87-1	Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA	≥98%
Methionine	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	63-68-3	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥99%
Natriumazid	NaN ₃	26628-22-8	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥99,0%
Natriumhydroxid	NaOH	1310-73-2	Aldrich Chemical	98%

Substanz	Summenformel	CAS-Nummer	Hersteller	Reinheit
			Company, Milwaukee, USA	
Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	63-91-2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	≥99%
Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	147-85-3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	≥98,5%
Salzsäure	HCl	7647-01-0	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	25%
Sarcosine	C ₃ H ₇ NO ₂	107-97-1	Alfa Aesar, Ward Hill, USA	98%
Threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	72-19-5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	≥99%
Trimethylamine-N-oxide dihydrate	C ₃ H ₉ NO • 2 H ₂ O	62637-93-8	Alfa Aesar, Ward Hill, USA	98%
3-(Trimethylsilyl)- propionsäure-d ₄ Natriumsalz	C ₆ H ₉ D ₄ SiNaO ₂	24493-21-8	Aldrich Chemical Company,	98%

Substanz	Summenformel	CAS-Nummer	Hersteller	Reinheit
			Milwaukee, USA	
Tyrosine	$C_9H_{11}NO_3$	60-18-4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥99%
Valine	$C_5H_{11}NO_2$	72-18-4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	≥99%

8.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien unter Angabe des Herstellers und der Spezifikation.

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikation
Einmalspatel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Einmal-Kunststoff-Spatel Mikro, antistatisch, unsteril
Glasvials	Macherey und Nagel, Düren, Deutschland	V = 1,5 mL V = 8 mL
NMR-Tubes	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland	Rack mit 96 Sample Tubes für SampleJet Außendurchmesser = 3 mm Außendurchmesser = 5 mm POM Balls
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	ohne Wattestopfen, 230 mm
pH-Pufferlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	ROTI®Calipure gebrauchsfertige Pufferlösung pH 4,00 ± 0,02 pH 7,00 ± 0,02 pH 10,00 ± 0,02

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikation
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland	V = 0,1-10 µL V = 2-200 µL V = 50-1000 µL
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Eppendorf Safe-Lock Gefäße, Standard V = 1,5 mL V = 2,0 mL
S-Monovetten®	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland	Serum V = 9,0 mL EDTA K ₃ V = 9,0 mL Lithium-Heparin V = 4,5 mL
Schraubdeckelröhrchen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland	Schraubröhre Spitzboden, unsteril, PP V = 15 mL V = 50 mL

8.1.3 Laborgeräte

Tabelle 8-3: Verwendete Laborgeräte unter Angabe des Herstellers und der Spezifikation.

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikation
Analysenwaagen	KERN & SOHN GmbH, Ballingen, Deutschland	- Präzisionswaage PCB 1 000-2, max. 1 000 g, d = 0,01 g - EWJ 300-3, max. 300 g, d = 0,001 g
	Sartorius, Göttingen, Deutschland	Semimikrowaage MC210S, max. 210 g, d = 10 µg
Eismaschine	The Manitowoc Company Inc. Milwaukee, USA	R-290
Kolbenhubpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Research (variabel) V = 0,1-2,5 µL V = 0,5-10 µL

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikation
		V = 2-20 µL V = 10-100 µL V = 100-1000 µL Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland Transferringpipette® S V = 2-20 µL V = 20-200 µL V = 100-1000 µL V = 500-5000 µL
Kühl-/Gefrierschränke	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Liebherr AG, Bulle, Schweiz	CryoCube F740hi -70 °C • LGex 3410 MediLine • T 1700-21
NMR-Spektrometer	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland	Ascend™ 600 AVANCE III HD BCU HPPR II SampleJet
pH-Meter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Orion Star A221
pH-Mikrokominationselektrode	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Orion 8220BNW PerpHecT ROSS Comb. Micro
Vortexmischer	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland	RS-VA 10 speed 0-2 500 rpm
Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland	• Rotanta 460R, max. 3 800 rpm, 4 800 rcf • Universal 320 R, max. 16 000 rpm, 24 900 rcf • Mikro 185, max. 14 000 rpm, 18 845 rcf

8.1.4 Software

Tabelle 8-4: Verwendete Software unter Angabe der Version und des Herausgebers.

Bezeichnung	Version (+höher)	Herausgeber
ChemSketch	12.01	Advanced Chemistry Development, Inc.
Chenomx	nmrsuite 8.5 professional	Chenomx, Inc.
Gimp	2.10.18	GNOME Foundation
GraphPad Prism	9.1.0	GraphPad Software, Inc.
Inkscape	1.0.1	Free Software Foundation, Inc.
Matlab	R2019a	The MathWorks, Inc.
MetaboLab/NMRLab	1.0.1.1	Ulrich Günther Christian Ludwig
MS Office	2016	Microsoft Corporation
PLSToolbox	8	Eigenvector Research, Inc.
TopSpin	3.5 pl7	Bruker BioSpin GmbH

8.1.5 Webbasierte Dienste und Datenbanken

Tabelle 8-5: Verwendete online Datenbanken.

Datenbank
The Human Metabolom Database (Wishart et al. 2007, 2009, 2013, 2018)

8.2 Pulsprogramme

8.2.1 *noesygppr1d*

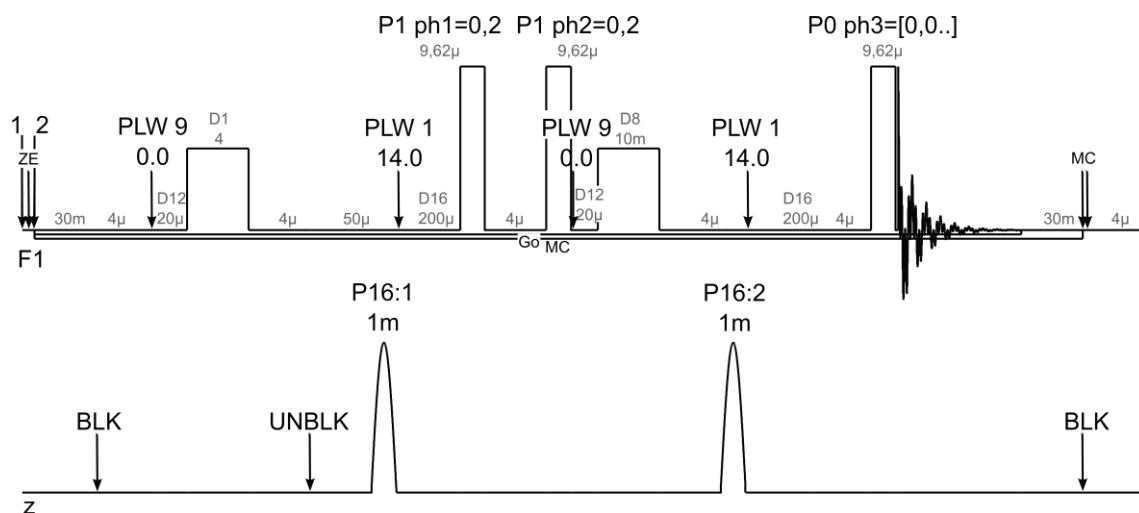


Abbildung 8-1: Graphische Darstellung des 1D ^1H NOESY-Pulsprogramms (*noesygppr1d*) der IVDr Experimente aus der Software TopSpin™ (Bruker).

8.2.2 *cpmgpr1d*

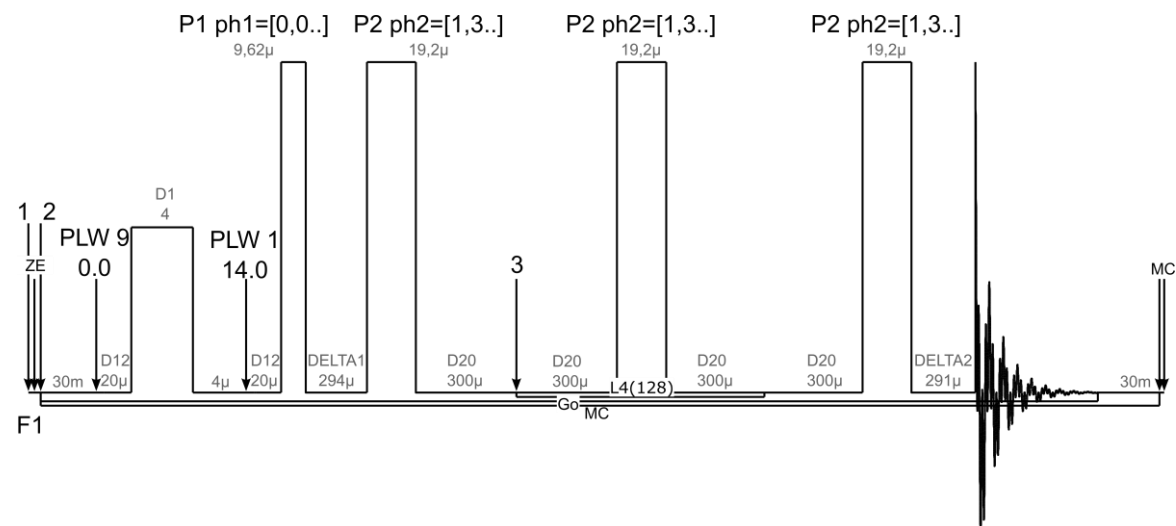


Abbildung 8-2: Graphische Darstellung des CPMG-Pulsprogramms (*cpmgpr1d*) der IVDr Experimente aus der Software TopSpin™ (Bruker).

8.3 Ergänzende Informationen

Tabelle 8-6: Metaboliten im *in-vitro diagnostic research* Protokoll. Quantifizierte Parameter unter Angabe der Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*, LOD) sowie typische Konzentrationsbereiche in humanen Organismen. Das LOD und die 95% Range wurde routinemäßig bei der Bruker IVDr Quantifizierungsmethode 2.0 (engl. *Bruker IVDr quantification in plasma/serum 2.0*, B.I.QUANT-PS 2.0) angegeben (Bruker BioSpin 2019).

Parameter	Deutsche Bezeichnung	Limit of Detection, LOD [mmol/L]	95% Range [mmol/L]
Alkohol und Derivate			
Ethanol	Ethanol	0,1	≤ 0,82
Amine und Derivate			
Trimethylamine-N-oxide	Trimethylamine-N-oxid	0,08	≤ 0,08
Aminosäuren und Derivate			
2-Aminobutyric acid	2-Aminobuttersäure	0,05	≤ 0,10
Alanine	Alanin	0,02	0,29 - 0,64
Asparagine	Asparagin	0,05	≤ 0,08
Creatine	Kreatin	0,01	≤ 0,07
Creatinine	Kreatinin	0,01	0,06 - 0,14
Glutamic acid	Glutaminsäure	0,05	≤ 0,24
Glutamine	Glutamin	0,02	0,30 - 0,83
Glycine	Glycin	0,01	0,17 - 0,44
Histidine	Histidin	0,02	0,07 - 0,16
Isoleucine	Isoleucin	0,03	0,03 - 0,11
Leucine	Leucin	0,01	0,07 - 0,20
Lysine	Lysin	0,04	≤ 0,29
Methionine	Methionin	0,05	0,05 - 0,13
N,N-Dimethylglycine	N,N-Dimethylglycin	0,01	≤ 0,01
Ornithine	Ornithin	0,02	≤ 0,16
Phenylalanine	Phenylalanin	0,03	≤ 0,07
Proline	Prolin	0,05	≤ 0,59
Sarcosine	Sarkosin	0,01	≤ 0,01
Threonine	Threonin	0,04	≤ 0,24
Tyrosine	Tyrosin	0,03	≤ 0,08
Valine	Valin	0,03	0,15 - 0,35
Carbonsäuren			
2-Hydroxybutyric acid	2-Hydroxybuttersäure	0,15	≤ 0,17
Acetic acid	Essigsäure	0,01	≤ 0,06
Citric acid	Zitronensäure	0,03	≤ 0,21

Parameter	Deutsche Bezeichnung	Limit of Detection, LOD [mmol/L]	95% Range [mmol/L]
Formic acid	Ameisensäure	0,02	≤ 0,03
Lactic acid	Milchsäure	0,03	2,23 - 7,14
Succinic acid	Bernsteinsäure	0,01	≤ 0,01
Essentielle Nährstoffe			
Choline	Cholin	0,05	≤ 0,06
Ketonsäuren und Derivate			
2-Oxoglutaric acid	2-Oxoglutarsäure	0,02	≤ 0,02
3-Hydroxybutyric acid	3-Hydroxybuttersäure	0,02	≤ 0,26
Acetoacetic acid	Acetessigsäure	0,01	≤ 0,02
Acetone	Aceton	0,01	≤ 0,06
Pyruvic acid	Brenztraubensäure	0,03	≤ 0,07
Zucker und Derivate			
D-Galactose	D-Galaktose	0,11	≤ 0,11
Glucose	Glukose	0,54	1,73 - 6,08
Glycerol	Glycerol	0,08	≤ 0,44
Sulfone			
Dimethylsulfone	Dimethylsulfon	0,01	≤ 0,02
Technische Additive			
Ca-EDTA	Ca-EDTA	0,5	1,90 - 2,60
K-EDTA	K-EDTA	0,5	4,50 - 7,50

Tabelle 8-7: Lipoproteine im *in-vitro diagnostic research* Protokoll. Quantifizierte Parameter unter Angabe des Keys und des Parameters entsprechend des IVDr Reports. Zusätzliche Angabe der klinischen Bezeichnung, der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kurzbezeichnung sowie typische Konzentrationsbereiche in humanen Organismen. Die 95% Range wurde routinemäßig mit der Bruker IVDr Lipoprotein Subklassen Analyse (engl. *Bruker IVDr lipoprotein subclass analysis*, B.I.LISA) bestimmt (Bruker BioSpin 2019).

Key	Parameter	Klinische Bezeichnung	Kürzel	95% Range
Hauptparameter [mg/dL]				
TPTG	TG	Triglycerides	TG	53,45 - 489,81
TPCH	Chol	Total Cholesterol	Chol	140,31 - 341,43
LDCH	LDL-Chol	LDL Cholesterol	LDL	54,52 - 226,60
HDCH	HDL-Chol	HDL Cholesterol	HDL	34,60 - 96,25
TPA1	Apo-A1	Apolipoprotein A1	ApoA1	112,00 - 216,85
TPA2	Apo-A2	Apolipoprotein A2	ApoA2	24,07 - 47,70
TPAB	Apo-B100	Apolipoprotein B100	ApoB100	48,18 - 159,94
Kalkulierte Parameter [nmol/L]				
LDHD	LDL-Chol/HDL-Chol	LDL/HDL ratio	LDL/HDL	0,98 - 4,08
ABA1	Apo-B100/Apo-A1	ApoB100/ApoA1 ratio	ApoB100/ApoA1	0,30 - 1,07
TBPN	Total Particle Number	Total ApoB100 Carrying Particles	ApoB Particles	876,01 - 2908,20
VLPN	VLDL Particle Number	VLDL Particle Number	VLDL Particles	50,11 - 473,04
IDPN	IDL Particle Number	IDL Particle Number	IDL Particles	35,95 - 316,39
LDPN	LDL Particle Number	LDL Particle Number	LDL Particles	760,42 - 2559,51
L1PN	LDL-1 Particle Number	LDL-1 Particle Number	LDL-1 Particles	98,10 - 567,23
L2PN	LDL-2 Particle Number	LDL-2 Particle Number	LDL-2 Particles	46,65 - 426,74
L3PN	LDL-3 Particle Number	LDL-3 Particle Number	LDL-3 Particles	51,24 - 499,00
L4PN	LDL-4 Particle Number	LDL-4 Particle Number	LDL-4 Particles	77,07 - 577,04
L5PN	LDL-5 Particle Number	LDL-5 Particle Number	LDL-5 Particles	85,60 - 614,86
L6PN	LDL-6 Particle Number	LDL-6 Particle Number	LDL-6 Particles	90,64 - 815,44
Lipoprotein Hauptfraktionen [mg/dL]				
VLTG	VLDL	VLDL Triglycerides	VLDL TG	21,38 - 335,60
IDTG	IDL	IDL Triglycerides	IDL TG	4,62 - 100,01
LDTG	LDL	LDL Triglycerides	LDL TG	11,77 - 45,22
HDTG	HDL	HDL Triglycerides	HDL TG	7,29 - 28,58
VLCH	VLDL	VLDL Cholesterol	VLDL	4,88 - 76,99
IDCH	IDL	IDL Cholesterol	IDL	3,91 - 49,96
LDCH	LDL	LDL Cholesterol	LDL	54,52 - 226,60

Key	Parameter	Klinische Bezeichnung	Kürzel	95% Range
HDCH	HDL	HDL Cholesterol	HDL	34,60 - 96,25
VLFC	VLDL	VLDL Free Cholesterol	VLDL FC	2,66 - 33,09
IDFC	IDL	IDL Free Cholesterol	IDL FC	0,94 - 13,89
LDFC	LDL	LDL Free Cholesterol	LDL FC	17,19 - 63,35
HDFC	HDL	HDL Free Cholesterol	HDL FC	6,98 - 27,05
VLPL	VLDL	VLDL Phospholipids	VLDL PL	6,44 - 67,58
IDPL	IDL	IDL Phospholipids	IDL PL	2,97 - 32,53
LDPL	LDL	LDL Phospholipids	LDL PL	36,69 - 120,76
HDPL	HDL	HDL Phospholipids	HDL PL	56,50 - 135,93
HDA1	HDL	HDL Apolipoprotein A1	HDL ApoA1	110,04 - 222,02
HDA2	HDL	HDL Apolipoprotein A2	HDL ApoA2	24,86 - 47,99
VLAB	VLDL	VLDL Apolipoprotein B	VLDL ApoB	2,76 - 26,02
IDAB	IDL	IDL Apolipoprotein B	IDL ApoB	1,98 - 17,40
LDAB	LDL	LDL Apolipoprotein B	LDL ApoB	41,82 - 140,77

VLDL Subfraktionen [mg/dL]

V1TG	VLDL-1	VLDL-1 Triglycerides	VLDL-1 TG	6,23 - 212,19
V2TG	VLDL-2	VLDL-2 Triglycerides	VLDL-2 TG	2,75 - 66,92
V3TG	VLDL-3	VLDL-3 Triglycerides	VLDL-3 TG	2,16 - 48,88
V4TG	VLDL-4	VLDL-4 Triglycerides	VLDL-4 TG	2,93 - 28,43
V5TG	VLDL-5	VLDL-5 Triglycerides	VLDL-5 TG	1,08 - 7,26
V1CH	VLDL-1	VLDL-1 Cholesterol	VLDL-1 Chol	0,80 - 35,13
V2CH	VLDL-2	VLDL-2 Cholesterol	VLDL-2 Chol	0,39 - 15,36
V3CH	VLDL-3	VLDL-3 Cholesterol	VLDL-3 Chol	0,48 - 16,23
V4CH	VLDL-4	VLDL-4 Cholesterol	VLDL-4 Chol	1,41 - 15,11
V5CH	VLDL-5	VLDL-5 Cholesterol	VLDL-5 Chol	0,10 - 3,93
V1FC	VLDL-1	VLDL-1 Free Cholesterol	VLDL-1 FC	0,11 - 12,89
V2FC	VLDL-2	VLDL-2 Free Cholesterol	VLDL-2 FC	0,04 - 6,60
V3FC	VLDL-3	VLDL-3 Free Cholesterol	VLDL-3 FC	0,05 - 8,09
V4FC	VLDL-4	VLDL-4 Free Cholesterol	VLDL-4 FC	0,15 - 7,21
V5FC	VLDL-5	VLDL-5 Free Cholesterol	VLDL-5 FC	0,02 - 2,20
V1PL	VLDL-1	VLDL-1 Phospholipids	VLDL-1 PL	1,31 - 32,41
V2PL	VLDL-2	VLDL-2 Phospholipids	VLDL-2 PL	0,81 - 15,43
V3PL	VLDL-3	VLDL-3 Phospholipids	VLDL-3 PL	0,82 - 13,53
V4PL	VLDL-4	VLDL-4 Phospholipids	VLDL-4 PL	1,62 - 12,87

Key	Parameter	Klinische Bezeichnung	Kürzel	95% Range
V5PL	VLDL-5	VLDL-5 Phospholipids	VLDL-5 PL	0,40 - 5,06
LDL Subfraktionen [mg/dL]				
L1TG	LDL-1	LDL-1 Triglycerides	LDL-1 TG	2,51 - 14,03
L2TG	LDL-2	LDL-2 Triglycerides	LDL-2 TG	1,19 - 6,40
L3TG	LDL-3	LDL-3 Triglycerides	LDL-3 TG	1,15 - 5,72
L4TG	LDL-4	LDL-4 Triglycerides	LDL-4 TG	1,21 - 8,43
L5TG	LDL-5	LDL-5 Triglycerides	LDL-5 TG	1,12 - 8,98
L6TG	LDL-6	LDL-6 Triglycerides	LDL-6 TG	1,35 - 13,16
L1CH	LDL-1	LDL-1 Cholesterol	LDL-1 Chol	8,07 - 58,72
L2CH	LDL-2	LDL-2 Cholesterol	LDL-2 Chol	2,48 - 48,09
L3CH	LDL-3	LDL-3 Cholesterol	LDL-3 Chol	3,19 - 45,64
L4CH	LDL-4	LDL-4 Cholesterol	LDL-4 Chol	4,32 - 48,86
L5CH	LDL-5	LDL-5 Cholesterol	LDL-5 Chol	5,41 - 48,69
L6CH	LDL-6	LDL-6 Cholesterol	LDL-6 Chol	6,26 - 54,19
L1FC	LDL-1	LDL-1 Free Cholesterol	LDL-1 FC	2,49 - 16,94
L2FC	LDL-2	LDL-2 Free Cholesterol	LDL-2 FC	0,99 - 14,35
L3FC	LDL-3	LDL-3 Free Cholesterol	LDL-3 FC	1,27 - 13,29
L4FC	LDL-4	LDL-4 Free Cholesterol	LDL-4 FC	1,07 - 12,49
L5FC	LDL-5	LDL-5 Free Cholesterol	LDL-5 FC	1,56 - 12,71
L6FC	LDL-6	LDL-6 Free Cholesterol	LDL-6 FC	1,78 - 12,18
L1PL	LDL-1	LDL-1 Phospholipids	LDL-1 PL	5,87 - 29,80
L2PL	LDL-2	LDL-2 Phospholipids	LDL-2 PL	2,20 - 24,82
L3PL	LDL-3	LDL-3 Phospholipids	LDL-3 PL	2,39 - 24,21
L4PL	LDL-4	LDL-4 Phospholipids	LDL-4 PL	3,05 - 25,06
L5PL	LDL-5	LDL-5 Phospholipids	LDL-5 PL	3,72 - 25,29
L6PL	LDL-6	LDL-6 Phospholipids	LDL-6 PL	4,44 - 27,91
L1AB	LDL-1	LDL-1 Apolipoprotein B	LDL-1 ApoB	5,40 - 31,20
L2AB	LDL-2	LDL-2 Apolipoprotein B	LDL-2 ApoB	2,57 - 23,47
L3AB	LDL-3	LDL-3 Apolipoprotein B	LDL-3 ApoB	2,82 - 27,44
L4AB	LDL-4	LDL-4 Apolipoprotein B	LDL-4 ApoB	4,24 - 31,74
L5AB	LDL-5	LDL-5 Apolipoprotein B	LDL-5 ApoB	4,71 - 33,82
L6AB	LDL-6	LDL-6 Apolipoprotein B	LDL-6 ApoB	4,98 - 44,85

Key	Parameter	Klinische Bezeichnung	Kürzel	95% Range
HDL Subfraktionen [mg/dL]				
H1TG	HDL-1	HDL-1 Triglycerides	HDL-1 TG	1,40 - 11,96
H2TG	HDL-2	HDL-2 Triglycerides	HDL-2 TG	0,98 - 5,47
H3TG	HDL-3	HDL-3 Triglycerides	HDL-3 TG	1,30 - 5,49
H4TG	HDL-4	HDL-4 Triglycerides	HDL-4 TG	1,94 - 8,49
H1CH	HDL-1	HDL-1 Cholesterol	HDL-1 Chol	6,10 - 46,07
H2CH	HDL-2	HDL-2 Cholesterol	HDL-2 Chol	3,98 - 15,58
H3CH	HDL-3	HDL-3 Cholesterol	HDL-3 Chol	6,82 - 18,79
H4CH	HDL-4	HDL-4 Cholesterol	HDL-4 Chol	10,64 - 30,26
H1FC	HDL-1	HDL-1 Free Cholesterol	HDL-1 FC	1,45 - 11,96
H2FC	HDL-2	HDL-2 Free Cholesterol	HDL-2 FC	0,74 - 4,59
H3FC	HDL-3	HDL-3 Free Cholesterol	HDL-3 FC	1,25 - 5,27
H4FC	HDL-4	HDL-4 Free Cholesterol	HDL-4 FC	2,13 - 8,54
H1PL	HDL-1	HDL-1 Phospholipids	HDL-1 PL	7,67 - 57,17
H2PL	HDL-2	HDL-2 Phospholipids	HDL-2 PL	7,40 - 26,82
H3PL	HDL-3	HDL-3 Phospholipids	HDL-3 PL	12,03 - 31,53
H4PL	HDL-4	HDL-4 Phospholipids	HDL-4 PL	19,75 - 43,53
H1A1	HDL-1	HDL-1 Apolipoprotein A1	HDL-1 ApoA1	5,95 - 75,40
H2A1	HDL-2	HDL-2 Apolipoprotein A1	HDL-2 ApoA1	9,94 - 36,22
H3A1	HDL-3	HDL-3 Apolipoprotein A1	HDL-3 ApoA1	18,26 - 47,09
H4A1	HDL-4	HDL-4 Apolipoprotein A1	HDL-4 ApoA1	56,03 - 110,49
H1A2	HDL-1	HDL-1 Apolipoprotein A2	HDL-1 ApoA2	0,77 - 8,31
H2A2	HDL-2	HDL-2 Apolipoprotein A2	HDL-2 ApoA2	1,88 - 7,78
H3A2	HDL-3	HDL-3 Apolipoprotein A2	HDL-3 ApoA2	4,85 - 11,84
H4A2	HDL-4	HDL-4 Apolipoprotein A2	HDL-4 ApoA2	12,02 - 29,58

Tabelle 8-8: Vergleich der Quantifizierungen mittels IVDr Verfahren der 600 MHz 1D ¹H NOESY-Experimente mit 32 und 128 Scans. Gezeigt werden die Geradengleichung sowie das Bestimmtheitsmaß R² (n = 24).

Substanz	Geradengleichung	R ²	Substanz	Geradengleichung	R ²
Alanine	0,9501x + 0,2002	0,7740	VLDL-1 FC	0,9811x - 0,01599	0,9961
Creatine	1,292x + 0,0000614	0,6961	VLDL-2 FC	1,009x - 0,03831	0,9701
Creatinine	1,250x - 0,01830	0,8207	VLDL-3 FC	0,9913x + 0,01293	0,9801
Glutamine	0,5639x + 0,1118	0,2842	VLDL-4 FC	1,000x - 0,01666	0,9845
Glycine	0,9044x + 0,02438	0,8462	VLDL-5 FC	0,9808x + 0,0008856	0,9712
Histidine	0,2514x + 0,03397	0,06758	VLDL-1 PL	0,9684x + 0,1312	0,9815
Isoleucine	0,9102x + 0,007403	0,6396	VLDL-2 PL	0,9791x + 0,08011	0,9334
Leucine	0,6380x + 0,04297	0,5359	VLDL-3 PL	0,9910x + 0,06157	0,9809
Lysine	0,1617x + 0,04598	0,03006	VLDL- 4 PL	1,002x + 0,02139	0,9925
Methionine	0,2172x + 0,009530	0,04717	VLDL-5 PL	0,9731x + 0,02828	0,9928
Phenylalanine	0,7923x + 0,01260	0,5207	LDL-1 TG	1,018x - 0,06502	0,9919
Tyrosine	0,3403x + 0,03555	0,1579	LDL-2 TG	1,001x + 0,04769	0,9674
Valine	0,8212x + 0,05019	0,7468	LDL-3 TG	1,004x + 0,02360	0,9633
Acetic acid	0,8053x + 0,02248	0,6879	LDL-4 TG	1,026x - 0,08821	0,9845
Citric acid	0,4114x + 0,1074	0,2908	LDL-5 TG	0,9723x - 0,004781	0,9540
Formic acid	0,2948x + 0,02353	0,09323	LDL-6 TG	0,9553x + 0,3657	0,9481
Lactic acid	0,9466x + 0,1850	0,8283	LDL-1 Chol	0,7885x + 5,647	0,6048
Succinic acid	1,178x - 0,0006334	0,8509	LDL-2 Chol	0,8663x + 3,201	0,7731
3-Hydroxybutyric acid	1,032x - 0,006743	0,9909	LDL-3 Chol	0,9249x + 1,328	0,8965
Acetone	0,6409x + 0,02989	0,06510	LDL-4 Chol	0,8879x + 0,2561	0,8671
Pyruvic acid	0,5892x + 0,009770	0,3455	LDL-5 Chol	0,8515x + 1,024	0,8008
Glucose	0,9485x + 0,3139	0,8400	LDL-6 Chol	0,9345x + 1,645	0,9464
TG	0,9942x - 0,2607	0,9876	LDL-1 FC	0,7605x + 2,026	0,5423
Chol	0,9337x + 12,92	0,8530	LDL-2 FC	0,8880x + 0,9523	0,8288
LDL	0,9422x + 5,525	0,8934	LDL-3 FC	0,9428x + 0,2919	0,9287
HDL	0,9082x + 4,897	0,7810	LDL-4 FC	0,9186x + 0,1526	0,9089

Substanz	Geradengleichung	R ²	Substanz	Geradengleichung	R ²
ApoA1	0,9331x + 7,701	0,8770	LDL-5 FC	0,8758x + 0,3184	0,8068
ApoA2	0,9152x + 2,503	0,8412	LDL- 6 FC	0,9303x 0,4656	0,9202
ApoB100	0,9348x + 5,133	0,8320	LDL-1 PL	0,8461x + 2,477	0,7020
LDL/HDL	0,8657x + 0,2531	0,8041	LDL-2 PL	0,8307x + 2,206	0,7165
ApoB100/ApoA1	1,010x - 0,01706	0,9979	LDL-3 PL	0,9038x + 0,9532	0,8795
ApoB Particles	0,9347x + 93,36	0,8320	LDL-4 PL	0,8875x + 0,2228	0,8645
VLDL Particles	1,007x - 1,370	0,9956	LDL-5 PL	0,8723x + 0,4520	0,8011
IDL Particles	1,007x - 0,8465	0,9751	LDL-6 PL	0,9336x + 0,9751	0,9434
LDL Particles	0,9037x + 111,3	0,8283	LDL-1 ApoB	0,8964x + 1,697	0,7820
LDL-1 Particles	0,8961x + 30,84	0,7818	LDL-2 ApoB	0,8150x + 2,368	0,6720
LDL-2 Particles	0,8453x + 42,99	0,6724	LDL-3 ApoB	0,8840x + 1,219	0,8322
LDL-3 Particles	0,8840x + 22,16	0,8321	LDL-4 ApoB	0,86657x + 0,2325	0,8093
LDL-4 Particles	0,8673x + 4,196	0,8097	LDL-5 ApoB	0,8644x + 0,7139	0,7980
LDL-5 Particles	0,8643x + 13,00	0,7980	LDL-6 ApoB	0,9340x + 1,345	0,9367
LDL-6 Particles	0,9340x + 24,47	0,9367	HDL-1 TG	1,006x - 0,006748	0,9908
VLDL TG	0,9795x + 0,2732	0,9792	HDL-2 TG	1,003x - 0,01751	0,9671
IDL TG	0,9911x + 0,04923	0,9873	HDL-3 TG	0,9971x - 0,009814	0,9524
LDL TG	1,024x - 0,5179	0,9906	HDL-4 TG	0,9726x + 0,04127	0,9037
HDL TG	1,001x - 0,05163	0,9674	HDL-1 Chol	0,9808x + 0,9483	0,9457
VLDL	0,9959x + 0,01347	0,9600	HDL-2 Chol	0,9800x + 0,2462	0,8974
IDL	0,9930x + 0,02270	0,9520	HDL-3 Chol	0,9239x + 0,7012	0,8495
VLDL FC	0,9925x - 0,07091	0,9771	HDL-4 Chol	0,9040x + 1,617	0,8129
IDL FC	0,9918x + 0,02743	0,9599	HDL-1 FC	0,9694x + 0,2078	0,9513
LDL FC	0,9322x + 2,019	0,8783	HDL-2 FC	0,9416x + 0,1455	0,9376
HDL FC	0,9468x + 0,6684	0,9114	HDL-3 FC	0,9088x + 0,1682	0,8715
VLDL PL	0,9788x + 0,2271	0,9799	HDL-4 FC	0,8669x + 0,4766	0,7742
IDL PL	0,9684x + 0,2293	0,9298	HDL-1 PL	0,9920x + 0,9295	0,9483
LDL PL	0,9098x + 5,236	0,8417	HDL-2 PL	1,001x + 0,2616	0,9328
HDL PL	0,9366x + 4,817	0,8917	HDL-3 PL	0,8678x + 1,544	0,7636
HDL ApoA1	0,9243x + 8,396	0,8714	HDL-4 PL	0,8956x + 2,113	0,7931

Substanz	Geradengleichung	R ²	Substanz	Geradengleichung	R ²
HDL ApoA2	0,8862x + 3,365	0,7826	HDL-1 ApoA1	0,9757x + 0,9866	0,9434
VLDL ApoB	1,006x - 0,07585	0,9956	HDL-2 ApoA1	0,8898x + 1,651	0,8115
IDL ApoB	1,007x - 0,04612	0,9752	HDL-3 ApoA1	0,8703x + 2,614	0,7167
LDL ApoB	0,9038x + 6,116	0,8237	HDL-4 ApoA1	0,8942x + 5,919	0,8150
VLDL-1 TG	0,9705x + 0,1576	0,9715	HDL-1 ApoA2	0,9808x + 0,1342	0,9545
VLDL-2 TG	0,9854x + 0,1722	0,9539	HDL-2 ApoA2	0,9611x + 0,1792	0,9669
VLDL-3 TG	0,9987x + 0,06482	0,9800	HDL-3 ApoA2	0,9697x + 0,2106	0,9137
VLDL-4 TG	1,001x + 0,03692	0,9973	HDL-4 ApoA2	0,9207x + 1,337	0,8332
VLDL-5 TG	0,9916x + 0,008365	0,9976			
VLDL-1 Chol	1,004x - 0,1891	0,9794			
VLDL-2 Chol	1,005x - 0,03741	0,9252			
VLDL-3 Chol	0,9861x + 0,08004	0,9465			
VLDL-4 Chol	0,9949x + 0,08837	0,9736			
VLDL-5 Chol	0,9895x + 0,02555	0,9927			

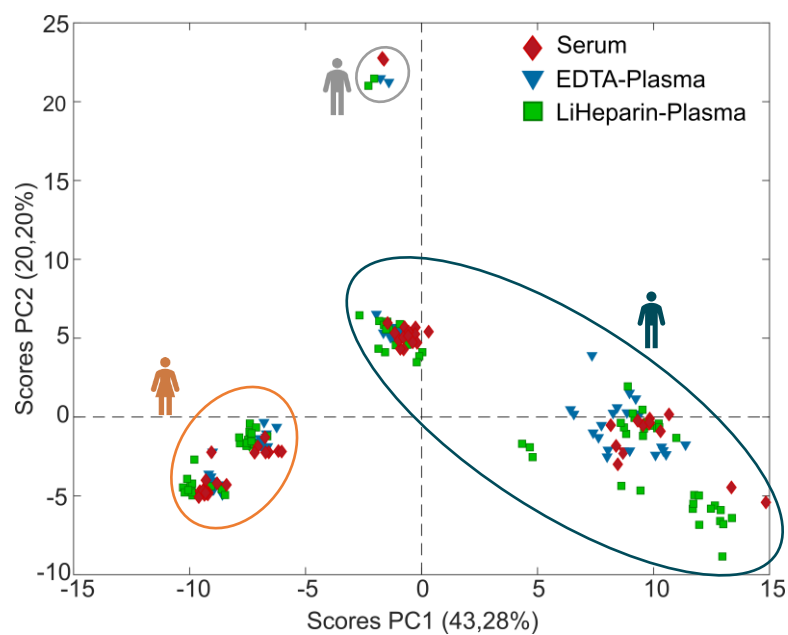
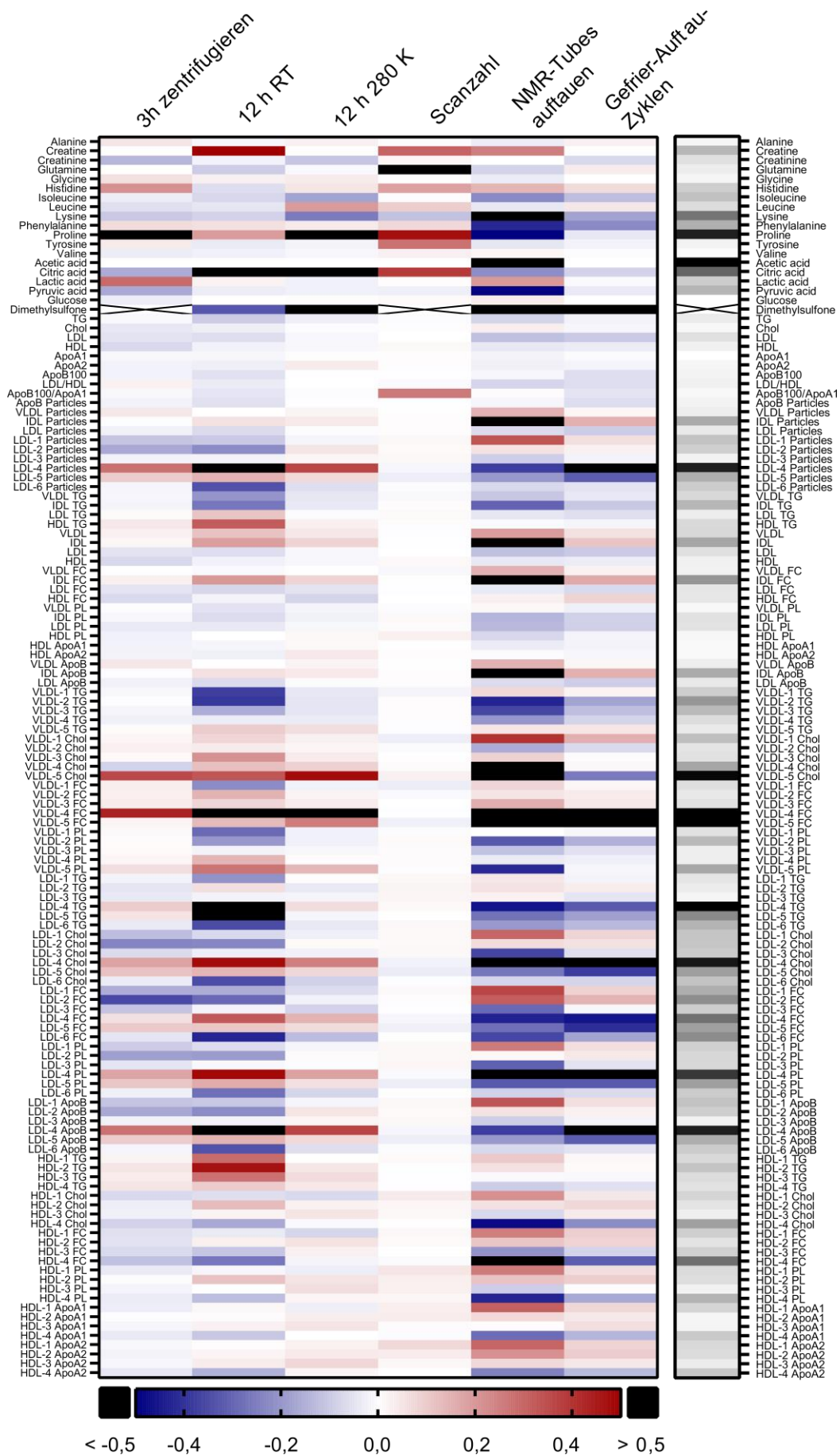


Abbildung 8-3: Betrachtung verschiedener Bluttypen (Serum, EDTA- und LiHeparin-Plasma) bei drei verschiedenen Probanden. Darstellung des Scoreplot einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*, PCA) der entsprechend der Varianzen skalierten IVDr Daten. Die Proben sind gemäß des Bluttyps in Serum (rot), EDTA-Plasma (blau) und LiHeparin-Plasma (grün) farblich hervorgehoben.

Tabelle 8-9: Relative Fehler der Quantifizierungen ausgewählter Metaboliten und Lipoproteine bei verschiedenen prä- und postanalytischen Variationen. In Bezug auf die sechs prä- und postanalytischen Fragestellungen sind lediglich die Substanzen aufgeführt, deren relativer Fehler bei mindestens einer Intervention im Vergleich zu den nach Standardverfahren präparierten Proben bei < -0,5 oder > 0,5 lag.

	unpräparierte			präparierte Proben in			Prozessierung		Messung			Messung		
	Aliquote			NMR-Tube					12 h 27 °C			12 h 6 °C		
	Serum	EDTA	LiHeparin	Serum	EDTA	LiHeparin	EDTA	LiHeparin	Serum	EDTA	LiHeparin	Serum	EDTA	LiHeparin
Phenylalanine	-0,18	-0,57	0,00	-0,27	-0,43	-0,63	0,11	0,18	0,00	-0,09	0,33	0,09	0,00	0,00
Citric acid	-0,08	0,04	-0,21	-0,58	0,15	-0,25	-0,11	-0,02	-1,00	0,06	-0,67	-0,73	0,07	-1,00
Lactic acid	0,03	-0,07	-0,02	0,17	0,11	0,32	0,52	0,39	-0,03	0,04	0,08	0,00	-0,03	-0,07
Pyruvic acid	-0,04	0,00	-0,09	-0,52	-0,46	-0,50	-0,32	-0,38	0,00	-0,05	-0,06	-0,04	0,00	-0,05
IDL ApoB	0,04	0,16	0,24	0,81	0,54	0,49	-0,04	0,00	0,04	0,06	0,07	-0,04	0,00	-0,09
LDL-2 ApoB	0,20	0,05	-0,25	0,12	-0,02	0,06	0,04	0,13	-0,24	-0,22	-0,22	0,43	0,08	0,54
LDL-4 ApoB	-0,71	-0,54	-0,74	-0,72	0,12	-0,51	0,02	-0,08	0,50	0,67	0,39	-0,04	-0,01	-0,14
VLDL-1 TG	-0,02	0,03	0,04	0,24	0,01	-0,02	-0,04	-0,02	-0,41	-0,18	-0,51	-0,02	-0,05	-0,08
VLDL-2 TG	-0,05	-0,16	-0,35	-0,31	-0,39	-0,61	-0,03	-0,03	-0,45	-0,24	-0,45	-0,02	-0,02	-0,08
VLDL-3 TG	-0,01	-0,11	-0,28	-0,24	-0,34	-0,53	0,00	-0,03	-0,22	-0,10	-0,17	0,07	0,09	0,03
LDL-4 TG	-0,07	-0,28	-0,80	-0,42	-0,33	-0,69	-0,02	-0,08	1,97	1,90	1,21	-0,02	0,00	-0,12
LDL-5 TG	-0,11	-0,18	-0,30	-0,21	-0,24	-0,40	-0,05	-0,05	0,63	0,81	0,54	-0,04	0,02	-0,07
HDL-2 TG	0,06	0,03	-0,07	0,10	0,03	0,04	0,02	0,06	0,48	0,52	0,39	0,05	0,03	0,04
VLDL-5 PL	-0,03	0,08	-0,14	-0,30	-0,38	-0,63	-0,03	0,00	0,34	0,14	0,36	-0,01	-0,03	-0,09
LDL-4 PL	-0,39	-0,40	-0,76	-0,85	-0,29	-0,65	0,01	-0,07	0,50	0,60	0,37	-0,07	-0,02	-0,15
LDL-5 PL	-0,31	-0,20	-0,44	-0,37	-0,09	-0,50	-0,05	-0,06	0,11	0,28	0,11	-0,02	0,03	-0,07
VLDL-1 Chol	0,02	0,13	0,29	0,62	0,26	0,33	-0,02	0,02	0,15	0,06	0,01	0,08	0,04	-0,01
VLDL-4 Chol	-0,16	0,00	0,20	0,81	0,56	0,43	0,01	0,06	0,18	-0,11	0,41	-0,01	0,00	-0,06
VLDL-5 Chol	-0,36	-0,16		-1,00	-1,00		0,01	0,02	0,43	0,08	0,58	0,07	0,03	-0,04
IDL	-0,02	0,11	0,22	0,79	0,47	0,33	0,02	-0,01	0,20	0,14	0,23	0,15	0,15	-0,02
LDL-3 Chol	0,22	-0,03	-0,42	-0,57	-0,11	-0,44	0,14	-0,01	-0,08	0,01	-0,03	0,08	0,04	0,10
LDL-4 Chol	-0,74	-0,54	-0,85	-1,00	-0,36	-0,70	0,02	-0,09	0,49	0,63	0,35	-0,08	-0,02	-0,16
LDL-5 Chol	-0,51	-0,25	-0,40	-0,37	0,03	-0,44	-0,05	-0,07	0,08	0,29	0,08	-0,07	0,00	-0,12
HDL-4 Chol	-0,26	-0,22	-0,20	-0,57	-0,35	-0,51	-0,06	-0,03	-0,17	-0,20	-0,14	0,07	0,01	0,08
VLDL-2 FC	0,04	0,03	0,05	0,18	0,00	-0,04	0,01	0,14	0,23	0,11	0,10	5,86	1,66	0,35
VLDL-4 FC	4,14	4,06	1,61	34,0	9,60	3,57	-0,01	0,04	0,57	0,36	0,63	-0,02	0,00	-0,06
VLDL-5 FC	-0,20	0,54	1,17	3,42	1,16	1,42	-0,01	0,01	0,31	-0,15	0,56	-0,02	-0,03	-0,04
IDL FC	0,05	0,19	0,24	0,89	0,51	0,38	-0,06	-0,03	0,20	0,11	0,31	-0,07	-0,09	-0,09
LDL-4 FC	-0,45	-0,28	-0,60	-0,75	0,01	-0,60	-0,01	-0,10	0,29	0,53	0,19	-0,12	-0,10	-0,17
LDL-5 FC	-0,53	-0,25	-0,46	-0,34	0,03	-0,49	-0,04	-0,03	0,03	0,33	0,02	-0,03	0,02	-0,05
LDL-6 FC	-0,07	-0,12	-0,35	-0,25	-0,28	-0,56	-0,04	-0,05	-0,47	-0,38	-0,42	-0,02	-0,08	0,17
HDL-4 FC	-0,27	-0,28	-0,39	-0,86	-0,46	-0,80	-0,02	0,01	-0,35	-0,23	-0,23	0,06	0,02	0,07
IDL Particles	0,04	0,16	0,24	0,81	0,54	0,49	-0,01	0,01	0,04	0,06	0,07	0,09	0,09	-0,04
LDL-4 Particles	-0,71	-0,54	-0,74	-0,72	0,12	-0,51	0,04	0,13	0,50	0,67	0,39	0,43	0,08	0,54



Beschriftung der Abbildung folgt auf der nächsten Seite.

Abbildung 8-4: Relative Fehler der Quantifizierungen ausgewählter Metaboliten und Lipoproteine bei sechs prä- und postanalytischen Fragestellungen sowie deren Zusammenfassung (grau) in Form einer Heatmap. Positive relative Fehler, also eine entsprechend erhöhte Konzentration im Vergleich zu den Referenzproben werden rot dargestellt. Analog werden negative relative Fehler (niedrigere Konzentration als Referenzproben) blau dargestellt. Starke Abweichungen mit relativen Fehlern $< -0,5$ oder $> 0,5$ wurden schwarz markiert. Der Betrag der relativen Fehler wurde berechnet und sein Mittelwert in einer schwarz-weiß Heatmap dargestellt, um sowohl stark variable Substanzen (schwarz) als auch stabile Substanzen (weiß) hervorzuheben.