Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Prof. Dr. med. J. Gärtner)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Metabolomische Identifizierung von Biomarkern zur Charakterisierung peroxisomaler Erkrankungen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Arne Manuel Brudy

aus

Neustadt an der Weinstraße

Göttingen 2022

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in:	Priv. Doz. Dr. rer. nat. R. Krätzner
Ko-Betreuer/in:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich

Prüfungskommission

Referent/in:	Priv. Doz. Dr. rer. nat. R. Krätzner
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. A. Fischer
Drittreferent/in:	Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 26.01.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Metabolomische Identifizierung von Biomarkern zur Charakterisierung peroxisomaler Erkrankungen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Neustadt, den …… ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis **2**

Tabellenverzeichnis **3**

Abkürzungsverzeichnis **4**

1. Einleitung **5**

1.1. Metabolomics 5

1.2. Peroxisomen 7

1.3. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren 12

1.4. Sphingolipide 17

1.5. Peroxisomale Erkrankungen 17

1.6. Zellweger-Syndrom-Spektrum 19

1.7. Adrenoleukodystrophie 21

1.8. Therapie 22

1.9. Diagnostik 24

2. Patienten, Material und Methoden **28**

2.1. Patienten 28

2.2. Geräte und Material 29

2.3. Methoden 31

2.4. Datenprozessierung 37

2.5. Statistische Auswertung 40

3. Ergebnis **41**

3.1. OPLS-DA und S-Plot 41

3.2. Vergleich hydrophober Probenvorbereitung mit und ohne saure Hydrolyse 45

3.3. Etablierung eines Messverfahrens für peroxisomale Biomarker 46

3.4. Überlangkettige Fettsäuren im Verhältnis – Vergleich der Gruppen 57

3.5. Identifizierung von Biomarkern des Docosahexaensäure Stoffwechselwegs 60

3.6. Eicosapentaensäure C20:5 und Docosapentaensäure C22:5 68

3.7. Neue Metabolite/Biomarker 71

4. Diskussion **88**

5. Zusammenfassung **93**

6. Literaturverzeichnis **94**

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die verschiedenen Bereiche der „-omics“- Wissenschaften 6
Abbildung 3: Struktur und Funktion von Peroxisomen 10
Abbildung 4: Biosynthese der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Leber 13
Abbildung 5: Rolle der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Gehirn 15
Abbildung 6: Flussdiagramm für Diagnosekriterien für peroxisomale biogenese Störungen.... 25
Abbildung 7: Flussdiagramm der metabolomischen Biomarkeridentifizierung 31
Abbildung 8: Schematischer Aufbau des benutzten Xevo G2-S QTof (Waters) 34
Abbildung 9: OPLS-DA der Rohdaten aus ProGenesis 43
Abbildung 10: S-Plot zur Markierung vermeintlicher Biomarker 45
Abbildung 11: Höhere Peakintensitäten durch saure Hydrolyse 45
Abbildung 12: Chromatogramm der Fettsäurestandards 48
Abbildung 13: Chromatogramm der überlangkettigen Fettsäuren 49
Abbildung 15: Isotopenmodell für die Summenformel C24:0 50
Abbildung 14: Isotopenmodell für die Summenformel C26:0 50
Abbildung 17: Isotopenmodell für die Summenformel Phytansäure 51
Abbildung 16: Isotopenmodell für die Summenformel C22:0 51
Abbildung 18: Isotopenmodell für die Summenformel Pristansäure 52
Abbildung 19: Vergleich der Peakintensitäten von Biomarkern in Testmessungen 53
Abbildung 20: Präzision in Serie: Vergleich der lang-/überlangkettigen Fettsäuren in Poolsamples/Qualitychecks (QC) 55
Abbildung 21: Annähernd gleiche Peakintensitäten bei UPLC-MS/MS und GC-MS 56
Abbildung 22: Chromatogramm der überlangkettigen Fettsäure C26:0 58
Abbildung 23: Erhöhte Mittelwerte von C26:0/C22:0 bei Zellweger- und ALD-Patienten 59
Abbildung 24: Erhöhte Mittelwerte von C24:0/C22:0 bei Zellweger- und ALD-Patienten 59
Abbildung 25: Biomarker aus dem Docosahexaensäure-Pathway 62
Abbildung 27: Isotopenmodell für die Summenformel Arachidonsäure 64
Abbildung 26: Isotopenmodell für die Summenformel Alpha-Linolensäure 64
Abbildung 29: Isotopenmodell für die Summenformel Tetracosahexaensäure 65
Abbildung 28: Isotopenmodell für die Summenformel Tetracosapentaensäure 65
Abbildung 30: Isotopenmodell für die Summenformel Docosahexaensäure 66
Abbildung 31: Keine Korrelation zwischen erhöhten C26:0-Werten und C22:6 67
Abbildung 32: Im Mittel erniedrigte Peakintensität von C20:5 und C22:5 bei Zellwegerpatienten 69
Abbildung 33: Isotopenmodell und m/z-Spektrum von Eicosapentaensäure 70
Abbildung 34: Isotopenmodell und m/z-Spektrum von Docosapentaensäure. 70
Abbildung 35: Chromatogramm der neuen Biomarker nach abgeschlossener Datenprozessierung 73
Abbildung 36: Signifikant erhöhte Peakintensitäten des neuen Biomarkers C26:2 bei Zellwegerpatienten 74
Abbildung 37: Signifikant erhöhtes Verhältnis C26:2/C22:0 bei Zellweger- und ALD-Patienten 75
Abbildung 38: Massenspektrum bei dem Peak des Biomarkers C26:2 76
Abbildung 39: Erhöhte Peakintensitäten von C28:1 bei Zellwegerpatienten 77
Abbildung 40: Signifikant erhöhtes Verhältnis C28:1/C22:0 bei Zellwegerpatienten 78

Abbildung 41: Massenspektrum des Biomarkerpeaks C28:1 79
Abbildung 42: Kein signifikanter Unterschied des Biomarkers C25:1 zwischen Zellweger- und Adrenoleukodystrophiepatienten 80
Abbildung 43: Differenzierung der untersuchten Gruppen anhand signifikanter Unterschiede der Biomarkerverhältnisse C25:1/C22:0 81
Abbildung 44: Massenspektrum des Biomarkers Pentacosensäure (C25:1) 82
Abbildung 45: Signifikante Unterschiede der Peakintensität des Biomarkers Calcitriol 83
Abbildung 46: Singifikant unterschiedliche Verhältnisse des Biomarkers Calcitriol zu Behensäure 84
Abbildung 47: Massenspektrum des Biomarkerpeaks C27H44O3 (Calcitriol) 85
Abbildung 48: Chromatogramm von SM 24:1 im positiven Modus 87
Abbildung 49: Massenspektrum von SM 24:1 in der zweiten MS-Spur 87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Material und Geräte 29
Tabelle 2: Software 29
Tabelle 3: Chemikalien 30
Tabelle 4: Konzentrationen der überlangkettigen Fettsäuren 32
Tabelle 5: Programm der Gradiententrennung Flüssigchromatographie UPLC 36
Tabelle 6: Eigenschaften der überlangkettigen Fettsäuren 47
Tabelle 7: Chromatographische Eigenschaften neuer Biomarker 73

Abkürzungsverzeichnis

ABCD1	*ATP binding cassette subfamily D 1*
eV	Elektronenvolt
IPA	Isopropanol
MS	Massenspektrometer
Ppm	*Parts per million* ($1x10^{-6}$)
Psi	*Pound-force per square inch*
ROS	*Reactive oxygen species* (reaktive Sauerstoffspezies)
UPLC	*Ultra Performance Liquid Chromatography*
XALD	X-chromosomale Adrenoleukodystrophie
ZSS	Zellweger-Syndrom-Spektrum

1. Einleitung

1.1. Metabolomics

Metabolomics zählt zu den neueren Omics-Wissenschaften, denen unter anderem Genomics, Transcriptomics und Proteomics angehören. Ein Metabolit ist eine Substanz, die im Stoffwechsel unseres Körpers interagiert und beispielsweise als Produkt der Nahrung, Medikation, durch Stoffwechselvorgänge oder andere Umwelteinflüsse entsteht, umgewandelt oder abgebaut wird. Zu den Metaboliten gehören Peptide, Aminosäuren, Zucker, Lipide, Steroide, Xenobiotika und andere Moleküle. Genomics beschäftigt sich dabei mit der Analyse des Genoms des Menschen, um so die Funktion von einzelnen Genen zu analysieren und zu verstehen. Gene sind der Bauplan des menschlichen Körpers, da sie beispielsweise Proteine wie z. B. Enzyme oder Ähnliches codieren. In Metabolomics werden kleinste Moleküle wie Substrate oder Produkte von Enzymen beschrieben und dadurch Rückschlüsse auf Stoffwechselwege oder molekulare Strukturen gezogen. So kann ein Molekül aufgrund eines Gendefektes, welcher sich im Genom und damit oft auch im Proteom zeigt, bei bestimmten Krankheiten im Vergleich zu gesunden Patienten chemisch verändert sein oder gar fehlen. Genomics, Transkriptomics, Proteomics und Metabolomics hängen also in gewisser Weise zusammen, was Abbildung 1 verdeutlicht. Teilweise werden die Begriffe Metabolom und Metabolomics verwechselt. Dabei ist das Metabolom die Gesamtheit aller Moleküle mit kleinem Molekulargewicht und Metabolomics die umfassende quantitative und qualitative Analyse dieser kleinen Moleküle. Um Rückschlüsse auf die Aufgaben der Moleküle im menschlichen Körper zu ziehen, ist es wichtig, nicht ein Molekül als einzelnes zu betrachten, sondern vielmehr eine Reihe zusammenhängender Substrate und Produkte eines oder mehrerer Enzyme. Das Metabolom einer Probe beschreibt dabei alle enthaltenen Moleküle, wobei zu berücksichtigen ist, dass der menschliche Körper immer ein dynamisches System darstellt und ständigen Änderungen der chemischen Zusammensetzung unterliegt.

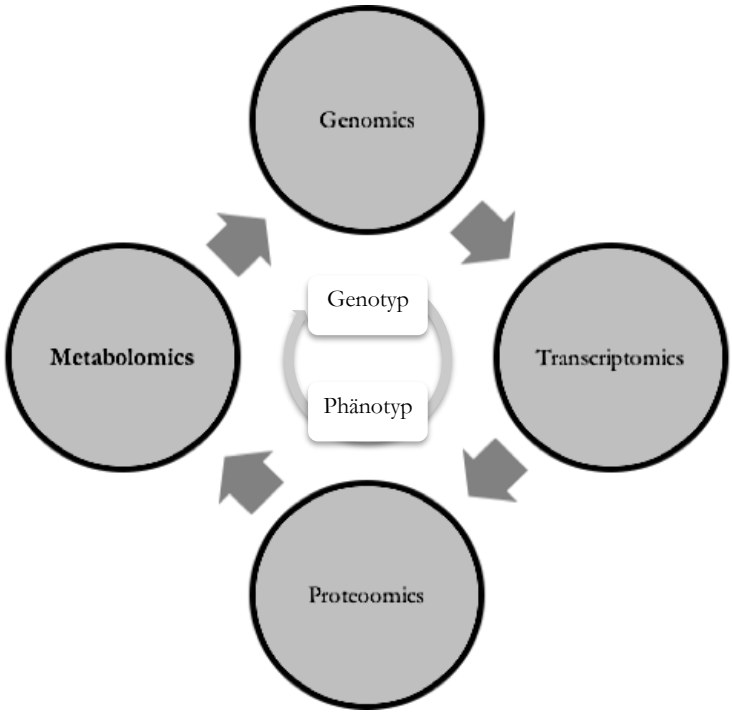


Abbildung 1: Die verschiedenen Bereiche der Omics-Wissenschaften zu denen unter anderem der Bereich Metabolomics zählt. Hier wird die Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp sowie den unterschiedlichen Bereichen untereinander dargestellt.

Bereits 1500 bis 2000 vor Christus benutzten traditionelle chinesische Ärzte Ameisen für die Evaluation von Urin, um hohe Konzentrationen an Glukose im Urin als Marker für Diabetes mellitus zu detektieren (Van der Greef und Smilde 2005). Im Prinzip war dies bereits ein früher Test, um ein Molekül in einer biologischen Flüssigkeit zu detektieren. Die heutigen analytischen Wurzeln liegen in der Papierchromatographie gefolgt von Dünnschicht-, Säulen- und Gaschromatographie. Der entscheidende Schritt für die Basis der metabolomischen Analyse wurde durch die Kopplung der Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie getan (Van der Greef und Smilde 2005). In den späten 1940er Jahren begann Roger Williams erstmals mit der Erstellung eines metabolischen Profils, wofür er 200 000 gaschromatographische Messungen auswertete und zwischen verschiedenen Individuen, welche unter unterschiedlichen Einflüssen wie zum Beispiel Alkohol standen, verglich (Gates und Sweeley 2005). Später wurde die Flüssigchromatographie *(liquid chromatography)* mit der Massenspektrometrie (LC-MS) gekoppelt verwendet, um metabolische Profile von Pflanzen zu erstellen (Games et al. 1984). Diese Methodik macht man sich auch heute noch zu Nutze, um menschliche Gewebe zu untersuchen und so beispielsweise frühe Biomarker für Krankheiten, toxikologische Stoffe, Stoffwechselwege, Funktionalität des Genoms oder Enzymaktivitäten zu analysieren. Damit lassen sich auch Metabolite und Stoffwechselwege von Zellorganellen des menschlichen Körpers untersuchen, die im folgenden Abschnitt 1.2 dargestellt werden.

1.2. Peroxisomen

Peroxisomen sind Bestandteile bzw. Kompartimente aller eukaryotischer Zellen, die in verschiedenen Stoffwechselwegen eine tragende Rolle spielen. Sie werden von einer einschichtigen Membran umgeben und beinhalten eine mit Proteinen gefüllte Matrix (Wanders und Waterham 2006). Gene, welche für die peroxisomale Biosynthese zuständig sind, werden *PEX*-Gene genannt und die Proteine, für welche sie kodieren, Peroxine. Wie Abbildung 2 zeigt, gibt es verschiedene Wege wie Peroxisomen entstehen. Zum einen können Peroxisomen durch autonome Teilung vorbestehender Organellen entstehen oder durch Knospung aus dem Endoplasmatischen Reticulum mit anschließendem Proteinimport entstehen. Die Biogenese peroxisomaler Proteine erfolgt an freien Polyribosomen im Cytoplasma, die dann posttranslationell in die Peroxisomen importiert werden (siehe Abbildung 2A unten). Damit Proteine, die in die Matrix der Peroxisomen gelangen sollen den Weg in das Peroxisom finden, benötigen sie bestimmte Erkennungssignale, von denen die *„peroxisomal targeting signals"* PTS1 und PTS2 bekannt sind (Wanders 2004). Sie dienen als Bindeglied zwischen dem Peroxin und einem Rezeptor im Peroxisom. Proteine, die in der Membran der Peroxisome verbleiben werden mit einem löslichen Chaperon Pex19 zu einem Membrankomplex bestehend aus Pex16 und Pex3 transportiert, wo sie in die Membran gelangen und Pex19 zurück ins Zytosol gelangt (siehe Abbildung 2B). So entdeckten Reuber et al. (1997) ein Gen, welches für den Import peroxisomaler Matrixproteine zuständig ist. Dieses *PEX1*-Gen kodiert für ein 147 kDa (kilo Dalton) schweres Protein der AAA-Proteinfamilie *(ATPase associated with diverse cellular activities)* und gehört zur ersten der zehn identifizierten Komplementationsgruppen der *PEX*-Gene, die für peroxisomale Biogenesestörungen verantwortlich sind. Die erste Komplementationsgruppe CG1 *(complementation group)* mit dem *PEX1*-Gen spielt dabei eine herausragende Rolle, da diese für ca. 70 % (Yik et al. 2009) aller an peroxisomaler Biogenesestörung leidenden Patienten verantwortlich ist (Reuber et al. 1997).

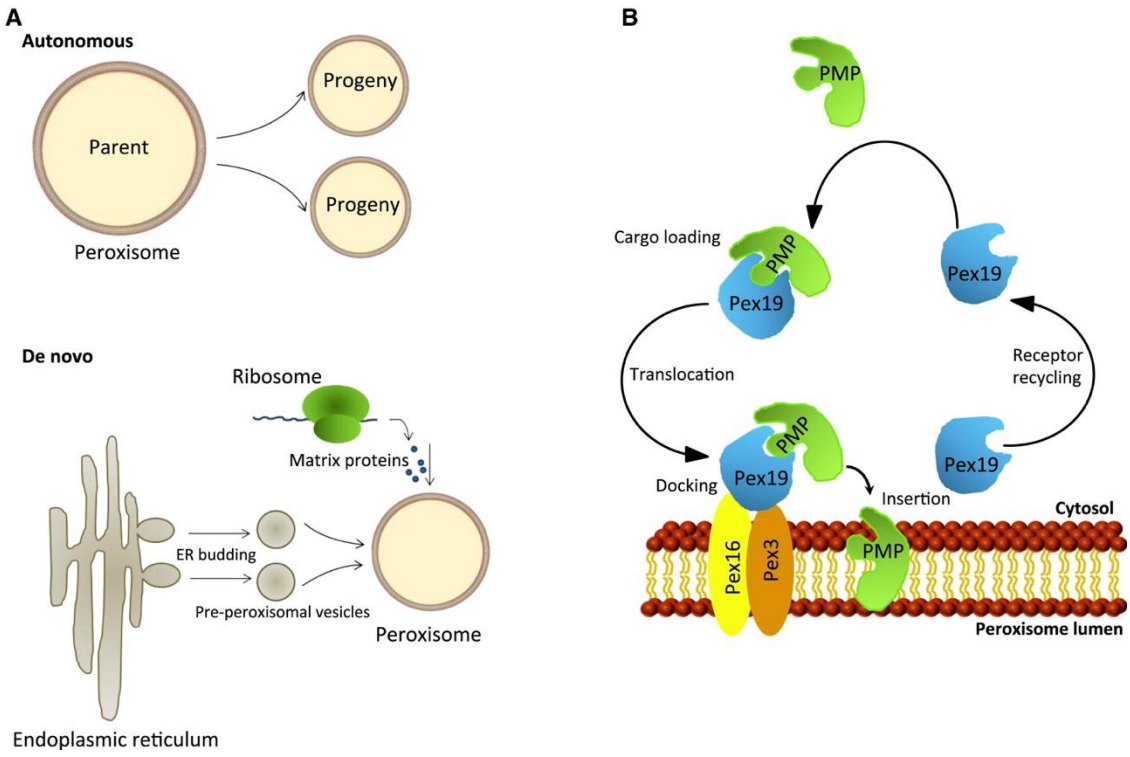


Abbildung 2: Mögliche Wege zur peroxisomalen Biogenese:
(A) Peroxisomen entstehen durch autonome Teilung vorbestehender Organellen (oben) oder durch neue Prozesse wie Knospung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) mit anschließendem Import von Matrixproteinen (unten).
(B) Peroxisomale Membran Proteine (PMPs) werden posttranslationell in die peroxisomale Matrix importiert. Pex19 ist ein lösliches Chaperon, das sich an die PMPs bindet und sie zur peroxisomalen Membran transportiert. Dort dockt es an einen Komplex aus Pex16 und Pex3 bestehend an wonach PMP in das Peroxisom und Pex19 zurück ins Zytosol gelangt. (Lodhi. und Semenkovich 2014). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlages.

Eine Fülle an Funktionen werden den Peroxisomen zugeordnet. Einige peroxisomale Enzyme sind ähnlich wie die der Mitochondrien aufgebaut und katalysieren dementsprechend ähnliche Stoffwechselvorgänge. Einer der wichtigsten Stoffwechselwege im Peroxsiom ist die Beta-Oxidation von Fettsäuren, die ähnlich wie die des Mitochondriums abläuft. Dabei werden Fettsäuren unterschiedlicher Länge in mehreren Schritten verkürzt und dann in anderen Zellkompartimenten zum Beispiel zur Energiegewinnung weiterverwendet. Bei Vorgängen wie der Beta-Oxidation im Peroxisom werden Elektronen durch Oxidasen von einer Fettsäure auf Flavinadenindinukleotid (FAD) übertragen. Im Mitochondrium dient FAD als Elektronenüberträger für die Atmungskette und damit dem Energiegewinn der Zelle. Im Peroxisom ist keine Atmungskette vorhanden und die Elektronen werden von FAD direkt auf Sauerstoff übertragen (Poirier et al. 2006).

Dabei entsteht Wasserstoffperoxid, welches durch das Leitenzym Katalase in Peroxisomen verstoffwechselt wird. Diese Oxidoreduktase baut zwei Moleküle Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff um und neutralisiert somit das toxische Molekül. Weitere ROS *(reactive oxygen species),* zu denen Wasserstoffperoxid zählt, sind Superoxidanionen oder Hydroxylradikale. Diese können beispielweise im Mitochondrium bei Prozessen der Atmungskette oder durch Zigarettenrauch entstehen und sind toxisch für Zellmembranen. Das Peroxisom kann diese ROS unschädlich machen (Schrader und Fahimi 2004).

Ist das Peroxisom funktionslos, wodurch reaktive Sauerstoffspezies nicht abgebaut werden, entsteht sogenannter oxidativer Stress, der durch die hoch reaktiven ROS gekennzeichnet ist und unter anderem Zellschäden verursachen kann. Der Körper kann als Gegenmechanismus Antioxidantien wie Vitamin E (Tocopherol-alpha) oder Vitamin C (Ascorbinsäure) bei funktionierendem Gastrointestinaltrakt mit der Nahrung aufnehmen. Die meisten bekannten Metabolite, die im Peroxisom verstoffwechselt werden, sind zunächst wenig bis gar nicht wasserlöslich und somit lipophil bzw. hydrophob. Stoffwechselvorgänge wie die Beta-Oxidation von lipophilen langkettigen Fettsäuren führen zu wasserlöslichen Molekülen bzw. Reaktionsprodukten. Somit wird deren Eliminierung möglich und weitere Verstoffwechselung in anderen Organellen möglich (Poirier et al. 2006).

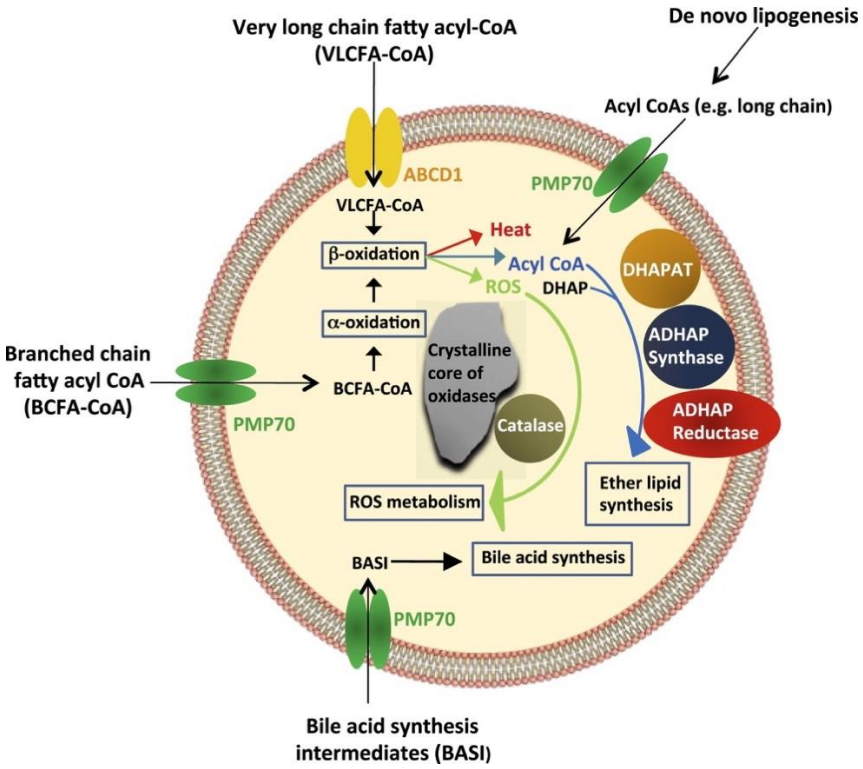


Abbildung 3: Struktur und Funktion von Peroxisomen:
Das Peroxisom ist ein von einer Einzelmembran umgebenes Organell, welches eine wichtige Rolle im Stoffwechsel einnimmt. Die Hauptfunktion in Eukaryonten beinhaltet die Beta-Oxidation von überlangkettigen Fettsäuren, alpha-Oxidation von verzweigtkettigen Fettsäuren, Synthese von Gallensäuren und Etherlipiden sowie Eliminierung von reaktiven Sauerstoffradikalen. Peroxisomen enthalten in vielen, aber nicht allen Zelltypen einen dichten kristallinen Kern mit oxidativen Enzymen.
(Lodhi und Semenkovich 2014). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlages.

Abbildung 3 gibt einen Überblick über einige der peroxisomalen Stoffwechselwege. Brown et al. fanden im Blutplasma von an Zellwegersyndrom erkrankten Patienten 1982 erhöhte Werte der überlangkettigen Fettsäuren C24:0 und C26:0, welche aus 24 bzw. 26 Kohlenstoffatomen bestehen. Überlangkettige Fettsäuren sind Fettsäuren, die zwischen 24 und 28 oder mehr Kohlenstoffatome besitzen. Dies führte zu der Vermutung, dass Peroxisomen an der Beta-Oxidation von Fettsäuren beteiligt sind. Einen Überblick einiger peroxisomaler Stoffwechselwege zeigt Abbildung 3. Hier werden vor allem die Beta-Oxidation überlangkettiger Fettsäuren, alpha-Oxidation von verzweigtkettigen Fettsäuren, Synthese von Gallensäuren und Etherlipiden sowie Eliminierung von reaktiven Sauerstoffradikalen dargestellt. Kurz- und mittellangkettige Fettsäuren können in Mitochondrien zu Acetyl-CoA abgebaut werden.

Acetyl-CoA wird dann in den Citratcyklus eingeschleust, um Energie zu gewinnen oder Ketonkörpersynthese zu betreiben. Bei überlangkettigen Fettsäuren, die mindestens 24 Kohlenstoffatome besitzen, kommen die Peroxisomen zum Einsatz, die diese Fettsäuren auf Kettenlängen verkürzen, die dann vom Mitochondrium abgebaut werden können oder für die Synthese von Etherlipiden oder Gallensäuren verwendet werden. Freie Fettsäuren werden entweder im Cytoplasma oder später im Peroxisom durch Acyl-CoA-Synthetasen mit Coenzym-A (CoA) verestert und somit reaktionsfähig gemacht. Veresterte Fettsäuren besitzen einen amphiphilen Charakter und sind somit sowohl hydrophil als auch lipophil. Sie können Membranen, wie die der Peroxisome nicht ohne Transportprotein passieren, wohingegen nicht veresterte Fettsäuren lipophil sind und Membranen passieren können (Rottensteiner und Theodoulou 2006). Daher gibt es die Annahme, dass Transporter der ABC-Proteinsuperfamilie *(ATP binding cassette)* am Transport beteiligt sein müssen (Theodoulou 2006). Abbildung 3 zeigt ein solches Transportprotein, das ABCD1, welches mit Coenzym A aktivierte überlangkettige Fettsäuren in das Peroxisom transportiert. Auch Prostaglandine und Leukotriene, die aus der Vorstufe der Arachidonsäure - einer omega-6-Fettsäure - entstehen, werden im Peroxisom durch Beta-Oxidation verstoffwechselt (Ferdinandusse et al. 2001).

Des weiteren zählt der Metabolismus der Myelinlipide (z. B. Plasmalogene, Cholesterol und überlangkettige Fettsäuren), die am Aufbau der Myelinscheide um Axone beteiligt sind, zu den Aufgaben der Peroxisomen (Schrader und Fahimi 2006). Peroxisomen sind aber nicht nur an der Beta-Oxidation, sondern auch an der alpha-Oxidation von Fettsäuren beteiligt und sorgen für die Verkürzung der Phytansäure und der aus deren Abbau entstehenden Pristansäure. Bei dem zu den Zellweger-Syndrom-Spektrum gehörenden Refsum-Syndrom ist der Mechanismus der alpha-Oxidation gestört, was zur Akkumulierung von Phytansäure und deren Derivaten führt.

Auch Di- und Trihydroxycholestansäure *(DHCA = Dihydroxycholicacid und THCA = Trihydrodycholicacid),* Intermediate des Gallensäurestoffwechsels, müssen durch peroxisomale Beta-Oxidation der Peroxisomen verstoffwechselt werden (Wanders und Waterham 2006; Wanders und Poll-The 2017).

1.3. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind an vielen wichtigen Funktionen im menschlichen Körper beteiligt. Sie bestehen aus einem Gerüst aus Kohlenstoffwasserstoffketten, die an einem Ende eine Carboxylgruppe und an dem anderen Ende eine Methylgruppe besitzen. Eine oder mehrere ihrer Bindungen bestehen aus einer Doppelbindung, was die räumliche Anordnung des Moleküls im Vergleich zu gesättigten Fettsäuren verändert. In der Nomenklatur der Fettsäuren bedeutet n-3 beispielsweise, dass sich die Doppelbindung am dritten Kohlenstoffatom vom Ende des Moleküls befindet, allgemein auch als Omega-3-Fettsäuren (= n-3 Fettsäure) bekannt. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren können im menschlichen Gehirn nicht de novo synthetisiert werden und müssen hauptsächlich aus dem Blut und damit aus der Nahrung substituiert werden (Rapoport 2013). Als Ausgangsmolekül der n-3 und n-6 Fettsäuren müssen die essentiellen Fettsäuren alpha-Linolensäure und Linolsäure mit der Nahrung aufgenommen werden (Bazinet und Layé 2014).

Dabei existieren zwei verschiedene Stoffwechselwege, die in Abbildung 4 aufgelistet sind. Linolsäure (n-6) wird dabei zunächst zu Arachidonsäure (*AA* = *Arachidonic acid*, C20:4, n-6) umgewandelt, welche im menschlichen Körper als bioaktives Ausgangsmolekül für viele wichtigen Substanzen, die als Eicosanoide zusammengefasst werden, dient. Zu den Eicosanoiden zählen die Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene. Das Äquivalent im Stoffwechselweg der n-3 Fettsäuren ist die Eicosapentaensäure (*EPA* = *Eicosapentaenoicacid*, C20:5, n-3), welche als Vorläufermolekül ähnlicher Metabolite wie der des n-6 Stoffwechselweges dienen. Docosahexaensäure (*DHA* = *Docosahexaenoicacid*, C22:6, n-3) ist dabei das Endprodukt des Stoffwechselweges (Catalá 2013).

Docosahexaensäure ist eine Omega-3-Fettsäure und zählt zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die die meist vorkommende mehrfach ungesättigte Fettsäure im Gewebe der Säugetiere ist (Diau et al. 2005). Sie zählt zu den häufigsten Fettsäuren im Körper, da sie ungefähr 10-15 % aller Fettsäuren und über 50 % aller mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Gehirn ausmacht (Diau et al. 2005). Des weiteren ist sie in hohen Konzentrationen in der Retina (Benolken et al. 1973) und dem cerebralen Kortex (Breckenreidge et al. 1971) zu finden, wo sie hauptsächlich an Serin und Ethanolaminphosphatidylglycerinen gebunden ist (Svennerholm 1968).

In der Leber werden die n-3 Fettsäuren über mehrere Zwischenschritte zu Docosahexaensäure umgewandelt (Rapoport 2007), wobei die Fettsäure C24:6 zu C22:6 durch beta-Oxidation im Peroxisom umgewandelt wird (Ferdinandusse et al. 2001). Abbildung 4 zeigt den Stoffwechselweg der Docosahexaensäure.

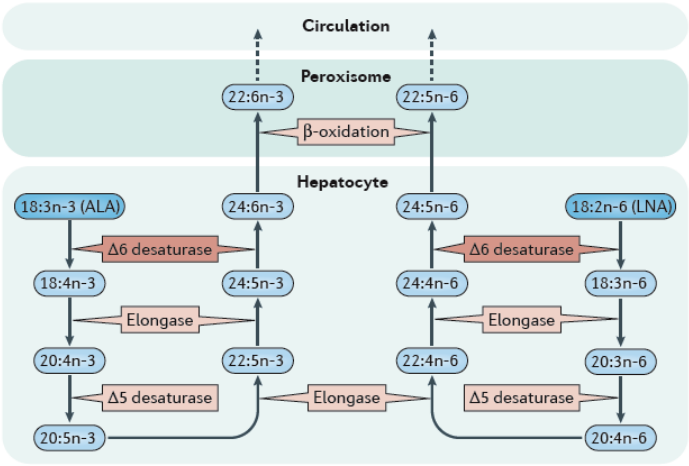


Figure 1 | **Synthesis of PUFAs in the liver.** In the liver, the n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) α-linolenic acid (ALA; 18:3n-3) and the n-6 PUFA linoleic acid (LNA; 18:2n-6) can be desaturated (which involves the addition of a double bond) and elongated to become longer-chain PUFAs. Of note, the enzyme Δ6 desaturase is considered to be the rate-limiting step for the synthesis of docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3). Not only are both ALA and LNA substrates for Δ6 desaturase, but 24:5n-3 and 24:4n-6 recycle back and require Δ6 desaturation before β-oxidation in the peroxisome. It is thought that both the n-3 PUFAs and n-6 PUFAs share the same enzymes and thus compete for their desaturation and elongation. Synthesized PUFAs, including DHA and docosapentaenoic acid n-6 (22:5n-6), but also arachidonic acid (20:4n-6), can be exported into the blood as lipoproteins.

Abbildung 4: Biosynthese der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Leber:
In der Leber können die mehrfach ungesättigten omega-3-Fettsäure alpha-Linolensäure (ALA; 18:3 n-3) und die omega-6-Fettsäure Linolsäure (LNA; 18:2 n-6) gesättigt und zu längeren mehrfach ungesättigten Fettsäuren verlängert werden. Zu beachten ist, dass das Enzym Δ6 Desaturase als das Raten-begrenzende Enzym in der Synthese von Docosahexaensäure (DHA; 22:6 n-3) zu sein scheint. Nicht nur beide ALA und LNA sind Substrate der Δ6 Desaturase, sondern auch C24:5 n-3 und C24:4 n-6 werden recycelt und benötigen eine Δ6 Desaturierung vor der beta-Oxidation im Peroxisom. Es wird angenommen, dass sich beide - die n-3 und n-6 mehrfach ungesättigten Fettsäuren - das selbe Enzym teilen und somit um die Desaturierung und Elongation konkurrieren. Synthetisierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Docosahexaensäure und Docosapentaensäure (22:5; n-6) aber auch Arachidonsäure (20:4; n-6), können ins Blut als Lipoproteine exportiert warden. (Bazinet und Layé 2014). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlages.

Anschließend wird Docosahexaensäure ins Blut aufgenommen und über zwei Wege transportiert: Zum einen als nicht veresterte Fettsäure oder mit Lysophosphatdiylcholin verestert an Albumin gebunden und zum anderen in Lipoproteinen, wo sie mit TAG (Triacylglycerin), DAG (Diacylcglycerin), CE (Cholesterin) oder Phospholipiden verestert sind (Chen et al. 2015). Docosahexaensäure kann aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit durch die luminale Membran cerebraler Endothelzellen dringen. Auf zytosolischer Seite der Endothelzellen muss Docosahexaensäure an ein Carrierprotein gebunden transportiert werden. Dafür ist das Protein *fatty acid–binding protein 5* (FABP-5) zuständig, welches in menschlichen Gehirnendothelzellen exprimiert wird (Pan et al. 2015).

Im Gehirn werden vor allem Arachidonsäure und Docosahexaensäure durch eine ACSL *(long-chain-fatty-acid-CoA-Ligase)*, die ein Enzym ist, welches zwei Phosphatmoleküle von ATP (Adenosintriphosphat) benutzt und damit langkettige Fettsäuren aktiviert. Anschließend werden diese mit Phospholipidmembranen verestert, welche unter anderem für den Aufbau der Axon umgegebenden Myelinschicht dienen. Außerdem werden Arachidonsäure und Docosahexaensäure nicht nur in die Zellmembran von Neuronen, sondern auch von Gliazellen eingebaut. Dort können sie durch die Phospholipase A2 aus der Membran gelöst werden und zu Prostaglandinen durch eine Cyclooxygenase verstoffwechselt werden, welche unter anderem inflammatorische Prozesse induziert (siehe Abbildung 5 Bild a). In Neuronen befinden sich hohe Konzentrationen der Docosahexaensäure in Phosphatidylserin, wo sie eine wichtige Rolle in der Neurogenese spielen (siehe Abbildung 5 Bild b) (Bazinet und Layé 2014).

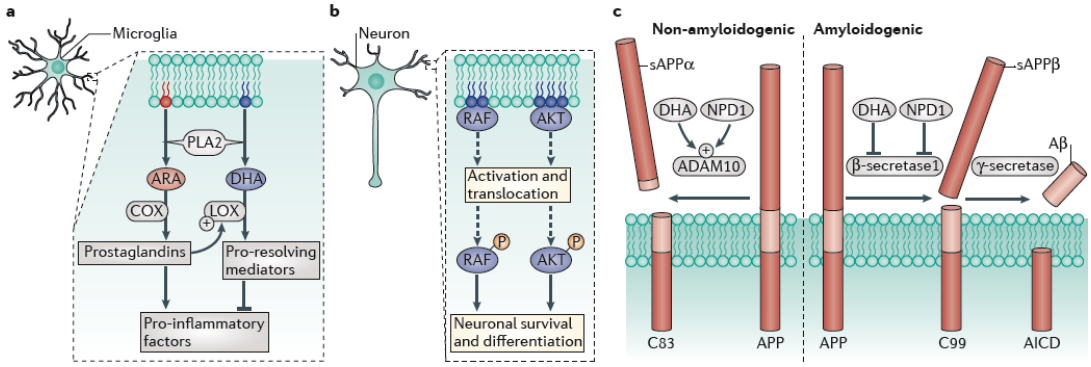


Abbildung 5: Rolle der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Gehirn: Docosahexaensäure (DHA) und Arachidonsäure (ARA) können durch Nahrungsmittel aufgenommen oder durch ihre Vorgängerfettsäuren aus der Nahrung in der Leber synthetisiert werden. Fettsäuren werden dann ins Gehirn transportiert, wo sie in Zellmembranen von Neuronen und Gliazellen inkorporiert werden.

a) In Mikrogliazellen kann Arachidonsäure nach der Freisetzung aus der Membran durch Phospholipase A2 (PLA2) von einer Cyclooxygenase (COX) in Prostaglandine, die pro-inflammatorische Signale fördern, umgewandelt werden. Prostaglandine können auch die Produktion von Lipoxygenase (LOX) durch andere Zellen, die spezielle pro-auflösende Mediatoren von DHA produzieren, auslösen.

b) DHA befindet sich in Neuronen in hohen Konzentrationen in Phosphatidylserin, wo es die Translokation und anschließend die Aktivierung von AKT und RAF1, die eine Rolle in der Neurogenese spielen fördert.

c) DHA und dessen Mediator Neuroprotectin D1 (NPD1) verschieben die Bearbeitung des Amyloid-Vorgängerprotein-beta (APPß) durch Herunterregeln der beta-Sekretase 1 (BACE1) und Aktivierung der alpha-Sekretase ADAM10 (ein Disintegrin- und Metalloproteinase enthaltener Abschnitt Protein 10) und lösliches APP-alpha vom amyloidogenen zum nicht-amyloidogenen Stoffwechselweg. Aß (amyolid beta); AICD (*amyloid precursor protein intracellular domain*). (Bazinet und Layé 2014). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlages.

Man vermutet, dass Docosahexaensäure eine entscheidende Rolle für visuelle sowie neuronale Vorgänge einnimmt, so beispielsweise bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Gibson et al. 2001). Vor allem kann der Omega-3-Fettsäurestatus innerhalb des ersten Lebensjahres für die neuronale Entwicklung wichtig sein (Voigt et al. 2002). Dabei werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Docosahexaensäure über die Muttermilch zugefügt.

Diau et al. machten 2001 Versuche mit Primaten, denen sie Docosahexaensäure und Arachidonsäure über die Nahrung substituierten und anschließend die Konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen analysierten. Dabei wurden die höchsten Konzentrationen im präcentralen Kortex gefunden, welcher für die Motorik des Körpers zuständig ist.

Im postcentralen Kortex, welchem die sensorische Wahrnehmung zugeschrieben wird, wurde die zweithöchste Konzentration an Docosahexaensäure detektiert. Hohe Konzentrationen wurden vor allem in Regionen gefunden, welche für die motorische Kontrolle des Körpers zuständig sind. Verringerte Konzentrationen von Docosahexaensäure und Arachidonsäure können auf einen Mangel in der Nahrung oder einen erhöhten Stoffwechsel zurückzuführen sein (Salem et al. 2001). Sie können im Blut oder in Erythrozyten gemessen werden (Martinez 1995). Dabei kann man von einer Defizienz der Metabolite im Blut auch auf eine Defizienz in anderen Geweben wie dem Gehirn rückschließen (Martinez 1995).

Im Abschnitt 1.5 werden peroxisomale Erkrankungen genauer erläutert, die unter anderem Defizite im Fettstoffwechsel der Peroxisomen aufweisen und somit Einschränkungen im Metabolismus der mehrfach ungesättigten Fettsäuren zeigen. So wurden in Patienten mit Zellwegersyndrom erniedrigte Docosahexaensäurekonzentrationen in Gehirn, Retina und Plasma entdeckt. Im Gegensatz dazu waren die Blutkonzentrationen bei Patienten mit Adrenoleukodystrophie normal, aber im Vergleich zur Kontrollgruppe waren Konzentrationen der Arachidonsäure leicht erniedrigt (Martinez 1995). Man nimmt sogar an, dass eine erniedrigte Konzentration der Omega-3-Fettsäure mit der Pathogenese peroxisomaler Erkrankungen verknüpft ist (Martinez 2001). Martinez behandelte Patienten, die an peroxisomalen Erkrankungen litten, mit Docosahexaensäure in Form von Ethyl-Estern in der Nahrung. Die konstanteste Verbesserung war der Anstieg der Fettsäure und eine bessere Leberfunktion. Außerdem verbesserten sich das Sehvermögen und der Muskeltonus bei einigen Patienten. Bei neun Patienten konnte durch Magnetresonanztomographie eine Verbesserung der Myelenisierung gezeigt werden. Des weiteren verringerten sich die Plasmakonzentrationen der Fettsäuren Hexacosansäure C26:0 und Hexacosaensäure C26:1 n-9. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob der Arachidonsäurestoffwechsel auch bei Zellwegerpatienten beeinträchtigt ist. Ebenso ist man sich im Stoffwechselweg der Docosahexaensäure nicht ganz sicher, welche Rolle er bei Patienten mit peroxisomalen Erkrankungen wie Zellwegersyndrom oder Adrenoleukodystrophie spielt.

1.4. Sphingolipide

Zu den Sphingolipiden zählen die Sphingomyeline, welche Phospholipide sind. Sie weisen aufgrund ihres hydrophilen Kopfes und der zwei hydrophoben Schwänze einen amphiphilen Charakter auf. Dabei bildet Sphingosin das Grundgerüst, an dem unterschiedliche lange Fettsäuren über eine Amidbindung gebunden sind. Sphingomyeline sind maßgeblich am Aufbau von Zellmembranen beteiligt. Dies dient vor allem der Myelenisierung von Nervenzellen bzw. deren Axonen. Tanaka et al. (1990) fanden erhöhte Konzentrationen der an Sphingomyelin gebundenen überlangkettigen Fettsäuren C24:0 und C26:0 in Erythrozytenmembranen bei Zellweger– und ALD-Patienten. Des weiteren konnte eine Reduktion von neun verschiedenen Spingomyelinen (u. A. Sphingomyelin (d18:1/24:1), (d18:1/16:0), (d18:1/22:0)) im Blut von Patienten, welche an peroxisomalen Biogenesestörungen leiden, festgestellt werden. Diese wurden erstmalig als neue Biomarker im Rahmen einer *untargeted metabolomics* (ohne Quantifizierung) Messung des Blutplasmas gefunden (Wangler et al. 2018). Sassa et al. (2014) behandelten Hela-Zellen mit der Mixtur von Lorenzo's Öl (4:1 Mischung aus Ölsäure und Erucasäure) und betrachteten dabei das Enzym ELOVL1 *(elongation of very-long chain fatty acid 1)*. Deutlich wurde, dass Konzentrationen der gesättigten überlangkettigen Fettsäuren Sphingomyeline (C22:0 und C24:0) nach Behandlung mit Lorenzo's Öl signifikant reduziert waren. Gegenüber stehen ungesättigte überlangkettige Fettsäure Sphingomyline (C24:1 und C26:1), deren Konzentrationen in den Hela-Zellen erhöht waren (Sassa et al. 2014).

1.5. Peroxisomale Erkrankungen

Peroxisomale Erkrankungen sind Erkrankungen, bei denen die Bildung oder die Struktur einzelner Proteine der Peroxisomen gestört ist. Sie zählen zu den autosomal-rezessiv vererbten Krankheiten (Braverman et al. 2016). Heute sind bereits 15 verschiedene peroxisomale Erkrankungen bekannt (Klouwer et al. 2015). Das klinische und genetische heterogene Krankheitsbild lässt sich in zwei Gruppen unterteilen. Zur ersten Gruppe zählt man peroxisomale Biogenesestörungen *(PBD = peroxisome biogenesis disorders)*, bei der die Biogenese, also die Bildung von Peroxisomen gestört ist. Hier sind meist Mutationen innerhalb von *PEX*-Genen für die Erkrankung verantwortlich (Gould und Valle 2000, Distel et al. 1996). Einzelne peroxisomale Protein-Dysfunktionen zählen zur zweiten Gruppe dieser Erkrankung, bei denen andere Gene wie beispielsweise das *ABCD1*-Gen *(ATP binding cassette subfamily D 1)* der X-ALD ursächlich sind (Wanders und Waterham 2005, Gould und Valle 2000). Hier ist nicht die Biogenese der Peroxisomen gestört, sondern die Synthese oder der Transport bestimmter Proteine in das Peroxisom. Enzyme oder Membrantransporter sind dann ohne Funktion.

Zur ersten der beiden Gruppen zählt man das Zellweger-Syndrom-Spektrum, welches aufgrund seiner verursachenden Symptomatik auch Cerebro-Hepatorenales-Syndrom genannt werden. Das Zellwegersyndrom, die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD), *infantile refsum disease* (IRD) und das Heimler-Syndrom werden heute unter dem Überbegriff Zellweger-Syndrom-Spektrum zusammengefasst. Die Rhizomelia chondrodysplasia punctata Typ1 wird zur Gruppe der peroxisomalen Biogenesestörungen gezählt. Die häufigste Erkrankung in der zweiten Gruppe ist die Adrenoleukodystrophie (ALD), welche X-chromosomal vererbt wird und daher auch unter dem Namen X-ALD bekannt ist.

Typischerweise akkumulieren überlangkettige Fettsäuren im Blut und anderen Gewebearten der Patienten aufgrund der fehlenden beta-Oxidation der Peroxisomen. Dies zeigt sich durch neuroinflammatorische, demyelenisierende und damit neurodegenerative Prozesse im zentralen Nervensystem (Braverman und Eichler 2009; Jedlitschky et al. 1991).

Patienten, die unter peroxisomalen Biogenesestörungen leiden, werden meist im Neugeborenenalter oder im Kindesalter klinisch auffällig, was sich äußerlich in einer charakteristischen kraniofazialen Dysmorphie äußert. Dabei ist die vordere Fontanelle vergrößert, der Vorderkopf prominent sichtbar und der Nasenrücken verbreitert und flach. Hinzu kommt eine Mikrognathie (Wilson et al. 1986). Krampfanfälle im neugeborenen Alter, sowie eine schwere Hypotonie und Entwicklungsverzögerungen sind Folge der neuronalen Entwicklungsstörung, was im MRT durch abnormal verkleinerte Gyri sichtbar wird. Damit geht ebenso eine verminderte Myelenisierung des Kortex einher (Barkovich und Peck 1997). Wie der Name Cerebro-Hepatorenales-Syndrom andeutet, fallen Patienten durch eine vergrößerte Leber mit Dysfunktionen des hepatobiliären Systems auf. In Folge dessen kann die Aufnahme von fettlöslichen Substanzen durch Gallensäuren aus dem Darm gestört sein. Defizite der lipophilen Vitamine A, D, K, E sind das Resultat. Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben fehlen damit auch Antioxidantien gegen reaktive Sauerstoffradikale. Viele Patienten leiden an Beeinträchtigungen des Gehörs bis hin zur Taubheit (Theil et al. 1992). Verlust der Sehfähigkeit wird durch retinale Dystrophie und Abnormalitäten des Sehnervs verursacht (Wilson et al. 1986). Eine primäre Nebenniereninsuffizienz sowie eine Niereninsuffizienz treten vermehrt auf, was mit sonographischen Kontrollen der Nieren und Hormonanalysen überwacht werden sollte (Berendse et al. 2014; Van Woerden et al. 2006).

1.6. Zellweger-Syndrom-Spektrum

Bowen et al. (1964) beschrieben das Zellwegersyndrom zum ersten Mal als Syndrom mit Symptomen wie angeborenem Glaukom, kraniofazialen Dysmorphien und frühem Tod der Patienten (vor dem zweiten Lebensjahr). Ein Jahr später wurde die Symptomatik des Zellwegersyndroms mit polyzystischen Nieren und Dysfunktion intrahepatischer Gallenproduktion charakterisiert (Smith et al. 1965). Erst 1973 wurde eine Verbindung des Zellwegersyndroms zu den Peroxisomen gezogen. Dies zeigten Goldfischer et al. (1973), welche das Fehlen von Peroxisomen in Hepatozyten und proximalen Tubuluszellen der Nieren nachwiesen. Die Erkrankung zählt zu den peroxisomalen Biogenesestörungen und ist eine Erbkrankheit, die autosomal rezessiv vererbt wird. Ihre geschätzte Inzidenz liegt bei 1:100 000 bis 1:200 000 (Gould et al. 2001). In Nord-Amerika beträgt die Inzidenz 1:50 000, was die Aufnahme in das Neugeborenenscreening mit sich brachte (Theda et al. 2014). Ursächlich für diese Erkrankung sind Mutationen innerhalb verschiedener PEX-Gene, wobei eine Mutation in PEX1 wie oben beschrieben zu den häufigsten Ursachen zählt (Reuber et al. 1997). Führt eine Mutation des PEX-Genes zu einer Dysfunktion eines Peroxins, können Proteine nicht mehr in die peroxisomale Matrix oder Membran transportiert werden und das Peroxisom bleibt ohne Funktion. Da dann wichtige Funktionen, wie die beta-Oxidation überlangkettiger Fettsäuren fehlen, akkumulieren vor allem C26:0, Pristansäure, Phytansäure und die Gallensäureintermediate DHCA und THCA im Blut der Patienten, wohingegen Plasmalogene vermindert vorhanden sind (Wanders et al. 2005). Die Akkumulierung der überlangkettigen Fettsäuren sorgt für einen toxischen Effekt auf Oligodendrozyten und Astrozyten, die dadurch absterben. Oligodendrozyten sind im zentralen Nervensystem für die Biosynthese der Myelinscheiden um die Axone zuständig, die sie nach dem Zelltod nicht mehr durchführen können. Erschwerend kommt hinzu, dass die akkumulierenden überlangkettigen Fettsäuren, vor allem C26:0, eine Demyelinisierung verursachen (Hein et al. 2008). Dies erklärt einige der schwerwiegenden Symptome der an ZSS erkrankten Patienten.

Neugeborene mit Zellwegesyndrom versterben meist innerhalb der ersten Lebensjahre, wohingegen ältere Kinder mit milderen peroxisomalen Erkrankungen wie ALD retinale Dystrophie, Schallempfindungsschwerhörigkeit, Entwicklungsverzögerung mit Muskelhypotonie sowie Leberdysfunktionen aufweisen (Steinberg et al. 2003). Es wurden allerdings auch andere Phänotypen, die sich als mildere Formen darstellen, gefunden, bei denen der Seh- und Hörverlust nicht auftrat und alle biochemischen Parameter im Normbereich lagen. Dies ist durch eine non-sense Mutation zu erklären (Ebberink et al. 2010). Das Zellweger-Syndrom-Spektrum kann in drei Gruppen je nach Ausprägung unterteilt werden, wobei man eine neonatal-infantile Form, eine im Kindesalter auftretende Form und eine im Jugendlichen bis Erwachsenenalter auftretende Form unterscheidet (Poll-The und Gärtner 2012). Das äußere klinische Erscheinungsbild der Patienten zeigt typischer Weise einen großen weiten fonticulus anterior (vordere Fontanelle), einen breiten großen Vorderkopf, Mikrognathie (Hypoplasie des Ober- oder Unterkiefers), Deformitäten des äußeren Ohres, tiefe und breite

Nase und redundante Hautfalten am Nacken (Wanders 2004). Das neurologische Erscheinungsbild wird durch eine tiefe Hypotonie der Körpermuskulatur dominiert, was in Saugschwäche und damit verbundener Sondenernährung, unterdrückten Sehnenreflexen und einem flachen Hinterkopf deutlich wird (Wanders 2004). Andere neurologische Abnormalitäten beinhalten einen abnormen Moro-Reflex, Hypo- oder Areflexia (abgeschwächte oder fehlende Reflexe) und Krampfanfälle. Das Auge betreffend treten Korneatrübung, angebohrenes Katarakt und Glaukom auf. Hinzu kommen retinale Degenerationen (Wanders 2004).

1.7. Adrenoleukodystrophie

Die x-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie ist die häufigste unter den peroxisomalen Erkrankungen und tritt bei nahezu 1 von 17 000 geborenen Jungen (Bezmann et al. 2001) und bei 1 von 28 000 Mädchen auf, da weibliche Träger heterozygot für eine Mutation eines Gen-Abschnittes sind. Dieses Gen codiert für das ABCD1 Protein, welches die Funktion eines Fettsäuretransporters innehat und dessen Ausfall die Symptomatik auslöst (Wanders et al. 2007). Dieser ABCD1-Transporter sorgt für den Transport der im Cytosol befindlichen überlangkettigen Fettsäuren in das Peroxisom, um dort durch peroxisomale beta-Oxidation abgebaut zu werden (Roermund et al. 2008). Als Folge eines Defekts akkumulieren auch hier überlangkettige Fettsäuren in Blut und anderen Geweben der Erkrankten. Vor allem sind die beiden Fettsäuren C26:0 und C24:0 erhöht (Moser et al. 1984). Dabei ist die häufigste Form die *childhood cerebral adrenoleukodystrophie*, welche zwischen 31 % und 57 % der hemizygoten Jungs betrifft (Kemper et al. 2017). Eine weitere Form der ALD ist die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD), welche nicht auf den Gendefekt des ABCD1-Transporters, sondern auf eine Mutation eines PEX-Genes zurückzuführen ist und damit zu den peroxisomalen Biogenesestörugen zählt.

Hein et al. erkannten 2008, dass im Blut akkumulierende überlangkettige Fettsäuren toxisch auf die Myelinschicht von Axonen wirken. Ebenso zerstören sie die Nierenrinden und die Hoden, was auf dem toxischen Effekt der Fettsäure C26:0 beruht, die auf Zellstruktur, Stabilität und Funktion einwirkt.

Symptome der ALD sind variabel und beinhalten Entwicklungsverzögerung, Hörverlust, Sehbeeinträchtigung, Leberdysfunktion, Episoden von Blutungen und intrakranielle Blutungen (Steinberg et al. 2003). Im Vergleich zum ZSS zeigt die Erkrankung einen langsameren progressiven Verlauf, der bei Patienten unterschiedlich sein kann.

1.8. Therapie

Zurzeit gibt es das ZSS betreffend keine spezifischen oder kausalen Therapien (Braverman et al. 2016). Es ist lediglich eine eingeschränkte symptomatische Behandlung möglich, was verdeutlicht, dass unter anderem Grundlagenforschung erforderlich ist. Um wirksame Therapien zu entwickeln, muss die Erkrankung besser charakterisiert und verstanden werden. Auch in Bezug auf die metabolischen Veränderungen der Patienten.

Die peroxisomale Erkrankung Adrenoleukodystrophie wurde unter anderem durch die Verfilmung „Lorenzo's Öl" bekannt, in dem die Eltern des an ALD erkrankten Lorenzo verschiedene Öle ausprobierten, um dessen Symptome zu lindern. Das Öl ist dafür bekannt, überlangkettige Fettsäuren im Plasma und Hautfibroblasten der an ALD leidenden Patienten zu senken. Des Weiteren zeigten Morita et al. 2018, dass sich die Genexpression von peroxisomalen Enzymen durch Lorenzo's Öl in Leberzellen von Mäusen steigern lässt. Allerdings wirkte sich die gesteigerte Genexpression nicht auf die überlangkettigen Fettsäuren im Serum aus.

Heute besteht Lorenzo's Öl aus einer 4:1-Mischung aus Glycerinestern der Ölsäure und Erucasäure. Bereits nach einer viermonatigen Therapie konnte eine Normalisierung der C26:0 assoziierten Sphingomyeline und Phosphatidylcholine sowie der überlangkettigen Fettsäure C26:0 im Plasma beobachtet werden. Dies führte zu der Annahme, dass die Therapie den demyelenisierenden Prozess bei mild ausgeprägter ALD aufhält (Rizzo et al. 1989). Moser et al. zeigten 1987, dass die Therapie für gesenkte Werte der überlangkettigen Fettsäuren im Plasma sorgte, was jedoch keine klinische Besserung mit sich brachte. Dafür wurde aber festgestellt, dass sich durch die Therapie die Werte der ungesättigten Fettsäure C26:1 im Plasma der Patienten erhöhten und DHA in Erythrozyten noch weiter sank. Dies sorgte für den Abbruch der Studie.

Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben übernimmt die Docosahexaensäure wichtige intrazelluläre Aufgaben und liegt vermindert im Blut und anderen Geweben von Patienten mit peroxisomalen Erkrankungen vor. Eine randomisierte Doppelblindstudie zeigte bei mit DHA behandelten Patienten, dass sich die Blutkonzentration der DHA erhöhten, aber keine Verbesserung der visuellen Funktionen oder bei der Entwicklung und des Wachstumes erkennbar waren (Paker et al. 2010), was den Beobachtungen von Martinez (2001) widerspricht. Eine Besserung der Leberfunktion bringt lediglich die orale Gabe von Vitamin K, welches aufgrund der gestörten Gallensäurebildung nicht richtig resorbiert werden kann. Dies soll mit 2,5 – 5 mg pro Tag dosiert werden (Clayton 1991). Cholsäure kann sich in Fällen ohne schwere Leberfunktionsstörung positiv auf die Suppression der Gallensäureproduktion auswirken (Berendse et al. 2016). Zuletzt wurde auch herausgefunden, dass Arginin die peroxisomale Funktion in Zellen von Patienten mit milderen peroxisomalen Biogenesestörungen verbessert (Berendse et al. 2013).

Heubi et al. veröffentlichten 2017 eine Studie bei der in einer Phase-3-Studie die orale Therapie mit Cholsäure bei Patienten mit Zellweger-Syndrom untersucht wurde. Die Patienten erhielten über einen Zeitraum von 18 Jahren 10 bis 15 mg/kg Körpergewicht/d Cholsäure per oral. Die lebertoxischen atypischen Gallensäuren, welche bei Patienten mit Zellweger-Syndrom anfallen, konnten im Urin signifikant ($p < 0{,}0001$) gesenkt werden. Ebenso konnten die Lebertransaminase ASAT und ALAT gesenkt werden ($p < 0{,}0001$). Des weiteren wurde eine Verbesserung der Gewichts- und Größenperzentilen nach Therapie beschrieben. Direktes Bilirubin konnte im Serum der Patienten signifikant ($p < 0{,}001$) gesenkt werden. Die orale Therapie mit Cholsäure wird als sicher beschrieben und wies in der Arbeit keine Medikamenten-assoziierten Todesfälle oder Komplikationen auf.

Die beschriebenen Ansätze dienen allerdings nur der symptomatischen Behandlung und können die Erkrankungen nicht kausal therapieren. Kausal können möglicherweise nur Gentherapien helfen. Hier wurden 2017 17 Patienten im Alter zwischen vier und 13 Jahren mit dem sogenannten „Lenti-D"-Medikament (lentiviraler Vektor) therapiert, welches mehrere Millionen $CD34^+$-Stammzellen pro kg Körpergewicht beinhaltet. Die Patienten erhielten nach der Infusion Granulozyten-stimulierenden Faktor (G-CSF). Es wurde kein toxischer Effekt durch das Medikament beobachtet. Des weiteren wurde keine Abstoßungsreaktion im Rahmen einer *Graft versus Host Disease* festgestellt. 88 % der behandelten Patienten waren am Leben und hatten keine größeren funktionellen Einschränkungen. Bei zwei Patienten schritten die neurologischen Defizite voran und einer der beiden Patienten verstarb an den Folgen der allogenen Transplantation. Allerdings war der Tod nicht auf das Medikament zurückzuführen, sondern auf eine Virusinfektion mit darauffolgender Rhabdomyolyse und Nierenversagen. Die Expression eines ALD-Proteins konnte in peripheren Blutleukozyten bei allen Patienten nachgewiesen werden. Es konnte allerdings keine Reduktion der überlangkettigen Fettsäuren im Blut der behandelten Patienten gezeigt werden. Abschließend konnte nicht gezeigt werden, dass sowohl die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen, als auch die Gentherapie die neurodegenerativen Prozesse der Adrenoleukodystrophie aufhalten.

1.9. Diagnostik

Um peroxisomale Erkrankungen zu diagnostizieren, gibt es verschiedene, teils aufwändige Möglichkeiten. Zu untersuchende Gewebe sind dabei meist Blutplasma oder Serum, Urin, Erythrozyten, Cerebrospinalflüssigkeit (Liquor) oder Fibroblasten der Haut. Man nutzt dafür folgende bisher etablierte Methoden: Immunofluoreszenz-Mikroskopie, Messung der peroxisomalen alpha- und beta-Oxidationsrate, Immunoblotanalyse peroxisomaler Proteine, Aktivitätsbestimmung einzelner Enzyme und die Gensequenzierung bestimmter peroxisomaler PEX-Gene. Abbildung 6 zeigt eine Möglichkeit wie man bei der Diagnostik des Zellweger-Syndroms vorgehen kann. Dabei wird darauf hingewiesen, dass Kliniker von der Evaluation biochemischer Marker zur genetischen Analytik wechseln (Braverman et al. 2016). Dennoch wird bei Verdacht auf eine Stoffwechsel- oder peroxisomalen Erkrankung, in einem ersten Schritt die Konzentration überlangkettiger Fettsäuren in Blut oder Urin bestimmt. Dafür werden vor allem die Konzentrationen der Fettsäure C26:0 und C26:1 sowie die Verhältnisse von C24/C22 und C26/C22, bestimmt (Braverman et al. 2016). Auch Gallensäureintermediate wie DHCA und THCA werden gemessen und die Fettsäuren Pristansäure, Phytansäure und Pipecolinsäure dienen der Diagnostik. Des Weiteren können Plasmalogenwerte aus Erythrozyten und Lysophosphatidylcholin-C26:0 in getrockneten Bluttropfen herangezogen werden (Klouwer et al. 2015). Im Urin werden meist Gallensäure- und Oxalsäurewerte bestimmt (Steinberg et al. 2003). Allerdings können die erhobenen Werte je nach Ausprägung der Erkrankung unterschiedlich sein (Klouwer et al. 2016). Zur Diagnosebestätigung wird die Syntheseleistung von Plasmalogenen oder die Oxidation von Phytan- und Pristansäure in kulturierten Hautfibroblasten verwendet. Die Möglichkeit der Pränataldiagnostik kann erwogen werden und sollte im ersten oder zweiten Trimester der Schwangerschaft durchgeführt werden. Dabei werden biochemische oder genetische Tests der Chorionzellen oder kultivierte Amnionzellen durchgeführt. Ebenso ist eine Präimplantationsdiagnostik bei bekannter PEX-Genmutation möglich (Al-Sayed et al. 2007).

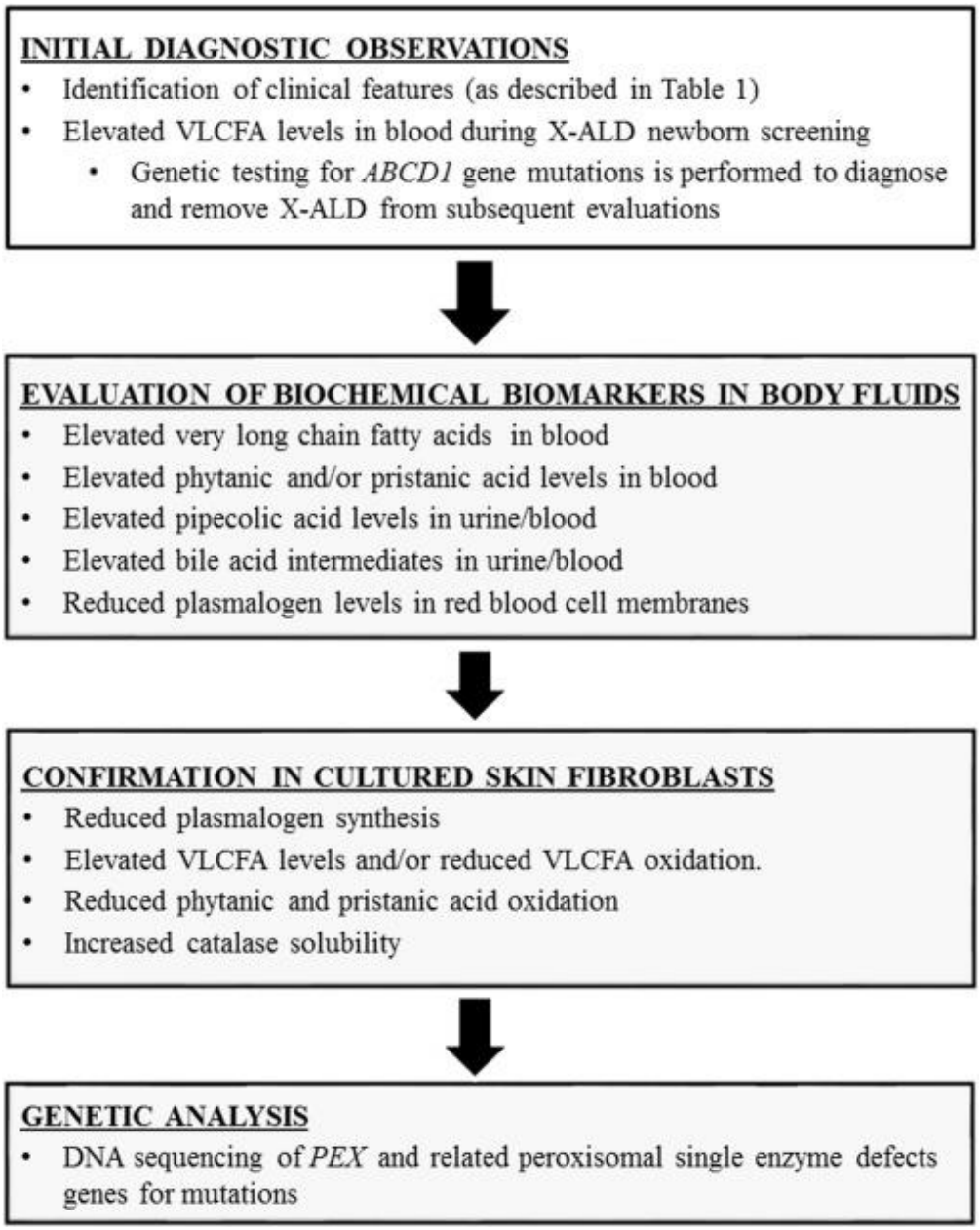


Abbildung 6: Flussdiagramm für Diagnosekriterien für peroxisomale biogenese Störungen - Zellwegersyndrom:
Angesichts der aktuellen Verfügbarkeit von *next generation sequencing panels,* sind Kliniker von der Evaluation biochemischer Marker zur genetischen Analyse zukünftiger Reproduktionsoptionen, „Carrier"-Tests bei Verwandten, Eignungszwecke in klinischen Studien und für schwerdiagnostizierbare Patienten gewechselt. In schwierigen Fällen kann es immer noch notwendig sein, kultivierte Fibroblasten zu bewerten, um die Auswirkungen bestimmter Mutationen für zukünftige interventionelle Studien zu ermitteln.
(Braverman et al. 2016). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlages

10-15 % der Patienten, bei denen ein ZSS-Verdacht besteht und die erhöhte Konzentrationen überlangkettiger Fettsäuren aufweisen, haben keine peroxisomale Biogenesestörung. Sie weisen jedoch einen einzelnen Enzymdefekt der beta-Oxidation auf, wie zum Beispiel eine Defizienz der überlangkettigen Acyl-CoA-Oxidase (ACOX1) oder des D-funktionalen-Proteins (Lieber et al. 2014). McMillan et al. (2012) zeigte, dass es verschiedene Formen der D-funktionalen-Protein-Störung gibt, bei denen eine Diagnose durch Erhebung der überlangkettigen Fettsäuren im Plasma nicht möglich war, da sie nicht auffällig erhöht sind. Auch Urin wurde ohne Auffälligkeiten untersucht und Fibroblastenuntersuchungen zeigten normale überlangkettige Fettsäurewerte.

Das D-funktionale Protein ist ein Enzym, welches mehrere Schritte in der beta-Oxidation der Peroxisomen übernimmt. Weitere Patienten mit milden oder nahezu normalen biochemischen Tests in Plasma und Urin stellten Zeharia et al. (2007), Steinberg et al. (2009) und Ebbrink et al. (2010) vor. Ebenso müssen bei Neugeborenen, die keiner speziellen Diät/Ernährung unterzogen wurden, Phytan- und Pristansäure nicht erhöht sein, diese können sogar erniedrigt sein (Steinberg et al. 2008; Takemoto et al. 2003).

Steht aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes trotz normaler Blut- und Urinwerte eine peroxisomale Erkrankung im Vordergrund, sollten die Fibroblasten der Patienten untersucht werden (Zeharia et al. 2007). Fibroblastenuntersuchungen werden benutzt, um peroxisomale Biogenesestörungen von einzelnen peroxisomalen Proteindefizienzen differenzieren zu können und Komplementationstests durchzuführen, um das defekte Gen zu lokalisieren. Eine Analyse bzgl. der Mutation des defekten Gens ist dann zwingend erforderlich, um die Diagnose zu bestätigen (Klouwer et al. 2015).

Da peroxisomale Erkrankungen noch nicht vollständig verstanden sind, sollen die Metabolitenmuster im Blut der Patienten weiteren Aufschluss über die Erkrankung bringen. Durch *untargeted metabolomics* können neue Biomarker entdeckt und somit Stoffwechselwege und peroxisomale Erkrankungen allgemein besser verstanden werden. Wie Abbildung 6 zeigt, sind aufwändige Bestätigungtests der Verdachtsdiagnose einer peroxisomalen Erkrankung erforderlich, da bisher bekannte Biomarker nicht sicher zwischen peroxisomalen Erkrankungen unterscheiden können. Signifikante Metabolitenmuster im Blut von Patienten peroxisomaler Erkrankungen können eine ergänzende Grundlage für vorhandene oder gar neue Diagnoseverfahren sein. So wurde beispielsweise 2016 in den USA das ALD-Screening zum Neugeborenenscreening hinzugefügt, da vor allem eine frühe Diagnose der ALD die Prognose der Erkrankten beeinflussen kann (Kemper et al. 2017). Neue Biomarker, die eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen, ermöglichen eine bessere Unterscheidung der unterschiedlichen peroxisomalen Erkrankungen untereinander und Abgrenzung zu anderen Erkrankungen. So kann beispielsweise das im Neugeborenenscreening gemessene C26:0-Lysophosphatidylcholin (C26:0-LPC) eine ALD und die damit verbundene Therapienotwendigkeit identifizieren, diese aber nicht sicher von anderen nicht-therapierbaren

peroxisomalen Erkrankungen wie dem Zellwegersyndrom abgrenzen. Ebenso dienen Biomarker als Entscheidungshilfe für weitere Diagnostik wie die der genetischen Untersuchung. Sie können aber auch als Verlaufsparameter während einer Therapie verwendet werden. Es werden wie in der Einleitung beschrieben häufig kortikale Abnormalitäten sowie verminderte Myelenisierung beschrieben. Hilfreich könnte dabei die Detektierung und Identifzierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie der Docosahexaensäure im Blut der Patienten sein, welche unter anderem für die neuronale Entwicklung zuständig ist. Metabolite wie Sphingomyelin, die am Aufbau der Myelinschicht beteiligt sind, können ebenso Aufschluss über die Charakteristik und den Progress der peroxisomalen Erkrankungen geben.

Anhand neuer Biomarker, welche charakteristisch für eine peroxisomale Erkrankung sind, können auch Rückschlüsse auf die Pathogenese der Störungen gezogen werden und bisherige Hypothesen widerlegt bzw. bestätigt werden. Außerdem ist die Bestimmung der bisher bekannten Biomarker – den überlangkettigen Fettsäuren (VLCFA) – anspruchsvoll und kann daher nur von wenigen Laboratorien durchgeführt werden.

Aufgrund der aufgeführten Problematik können bisherige Biomarker nicht sicher zwischen peroxisomalen Erkrankungen wie dem Zellwegersyndrom und der X-ALD untereinander unterscheiden. Deren Evaluation alleine reicht nicht zur Diagnosestellung aus, was sich durch die neuen Biomarker und zukünftige Studien ändern kann. Neue Biomarker können als Verlaufs- und/oder Prognoseparameter verwendet werden und weitere defizitäre Stoffwechselwege aufdecken, die wiederum einen neuen Therapieansatz ermöglichen können.

Daher lautet die Fragestellung dieser Arbeit: Können neue Biomarker mit einer neuen Methode gefunden werden?

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

Für das Projekt wurden 12 Blutproben von Patienten mit Zellweger-Syndrom benutzt, deren *PEX1*-Gen bereits sequenziert wurde und deren Konzentrationen überlangkettiger Fettsäuren anhand einer etablierten, zur Diagnostik eingesetzten gaschromatographischen Methode bestimmt wurden. Die Diagnose war somit vorher gesichert. Die Proben waren vor Entnahme bei -20° C archiviert. Das Datum der Probenentnahmen reicht von 1996 bis 2016. Voraussetzung für die Auswahl der Proben war ein Abgleich der Patientendaten mit dem DNA-Labor der Klinik für Kinder-und Jugendmedizin Göttingen, um nur die Blutproben der Patienten mit einer nachgewiesenen Mutation des PEX1-Gens zu untersuchen. Grund dafür ist, dass Mutationen des PEX1 Gens bei fast 65 % der Patienten Ursache für ZSS und NALD sind (Walter 2001). Ebenso wurden 12 archivierte Plasmaproben von Patienten mit Adrenoleukodystrophie für die Messungen rekrutiert. Beide Gruppen wurden dann mit einer Gruppe von 12 Patientenproben, die kein nachgewiesenes ZSS oder X-ALD hatten und somit als Referenz dienen sollten, verglichen. Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Ethikantrages 4/11/16 („Metabolom- und Genom-Analyse bei monogenetischen neurometabolischen Erkrankungen des Kindes- und Jungendalters“), Ethikkommission Göttingen, durchgeführt.

2.2. Geräte und Material

Tabelle 1: Material und Geräte

Material/Geräte	Firma
IKA Vortex Genius 3	Geyer
EBA 12	Hettich Zentrifugen
Rotina 38	Hettich Zentrifugen
Dri-Block 3	Techne
Pipettenspitzen (100, 1000 µl)	Sarstedt
Microtube (1,5 ml)	Sarstedt
Tube (13 ml)	Sarstedt
12x32 mm glass screw neck vial, cap & Pre-slit	Waters
12x32 mm screw top vial with cap & Pre-slit	Waters
Acquity I-Class	Waters
Binary Solvent Manager	Waters
Acquity FTN Autosampler	Waters
Xevo G2S-QTof	Waters
Acquity UPLC CSH C18 1,7 µm	Waters

Tabelle 2: Software

MassLynx	Waters
Progenesis	Nonlinear
EzInfo	Umetrics (Sartorius Stedim Biotech)
Excel	Microsoft
Word	Microsoft
SPSS	IBM

Tabelle 3: Chemikalien

Toluol	Th. Geyer (Chemsolute)
Hydrochloric Acid 37 %	Merck
Acetonitril	AppliChem GmbH
Acetonitril Optigrade (HPLC)	Promochem
Methanol	J.T.Baker
2-Propanol	Merck
2-Propanol (ULC/MS)	Biosolve
Chloroform	Merck
n-Hexan	Merck
Hexacosanoic acid	Sigma-Aldrich
Lignoceric acid	Sigma-Aldrich
Methylbehenate	Sigma-Aldrich
Phytanic acid	Sigma-Aldrich
Lockspray: Leucine-Enkephalin (200 pg/ml; 50 % H2O, 50 % ACN, 0,1 % FA)	Waters
Calibration: Sample Kit-2 (0,5 mM Sodiumformiate in 90:10 2-Propanol/H2O)	Waters
Formiat 99 % (ULC/MS)	Biosolve
Ammoniumformiat > 99,9995	Sigma-Aldrich
Water (LC-MS Chromasolv)	Sigma-Aldrich

2.3. Methoden

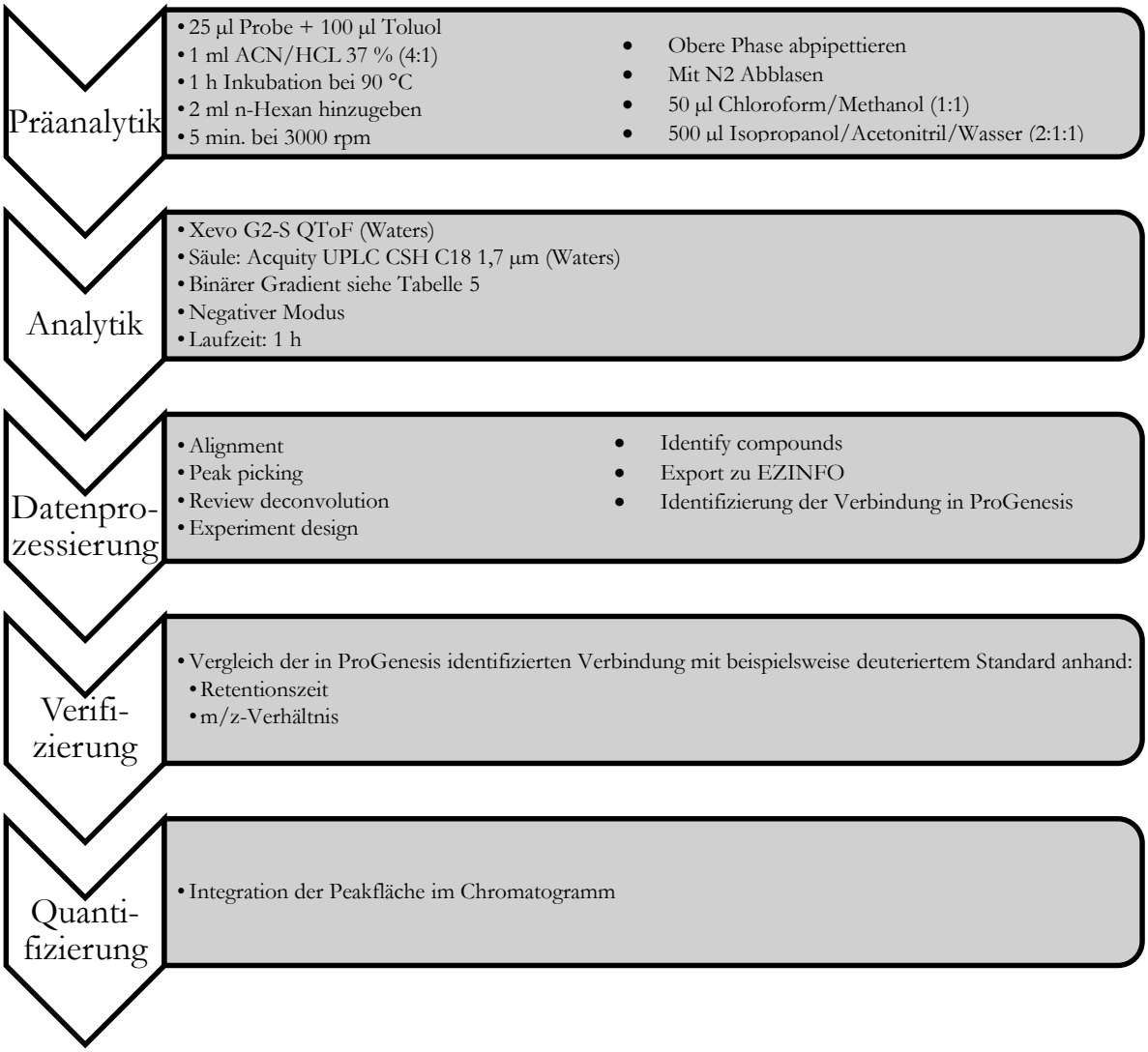


Abbildung 7: Flussdiagramm der metabolomischen Biomarkeridentifizierung: Überblick über den Ablauf der Biomarkeridentifizierung beginnend mit der Präanalytik, welche unter anderem durch saure Hydrolyse dafür sorgt, dass sich Esterbindungen in den Blutproben lösen und lipophile Verbindungen analysierbar macht. Nach der Präanalytik sollten Proben, die nicht direkt gemessen werden bei -20 °C archiviert werden. Es folgt die Analytik mit einem Xevo G2-S QTof der Firma Waters mittels UPLC MS/MS im negativen Modus. Die gemessenen Daten werden anschließend in ProGenesis importiert und mit Hilfe der Software EZInfo interessante Analyte herausgefiltert. Die identifizierten Verbindungen sollten mit einem käuflich erworbenen Standard verifiziert werden und anschließend mittels Peakintegration durch TargetLynx (Waters) quantifiziert werden.

2.3.1. Präanalytik

2.3.1.1. Probenvorbereitung

In der Probenvorbereitung musste bzgl. der Metabolite, die man identifizieren will, zunächst zwischen hydrophoben und hydrophilen Verbindungen unterschieden werden. Da viele der in der Literatur beschriebene Biomarker für peroxisomale Erkrankungen überwiegend lipohpil sind und eine Hauptaufgabe der Peroxisomen die Beta-Oxidation von Fettsäuren ist, wurde die Suche nach Molekülen vor allem auf lipophile Biomarker konzentriert. Zu Beginn der Versuche wurden verschiedene Methoden anhand mehrerer Messungen getestet, ob die Probenaufbereitung und das QTof-MS/MS-Verfahren (Erklärung: s. Abschnitt 2.3.2. Analytik) reproduzierbare und valide Messergebnisse liefern. Während der Messungen der Patientenproben wurde eine Poolprobe verwendet, welche jeweils 10 µL der ALD-, ZWS- und Kontrollprobe enthielt. Damit können eventuelle systemische Fehler in der chromatographischen Auftrennung und im Massenspektrometer erkannt werden, da Messschwankungen während des Messprozesses zu einer veränderten Detektion des Poolsamples führen. Ebenso wurde bei jeder Messung eine Probe mit dem Fettsäurestandard mitgemessen, um so Retentionszeiten der bekannten überlangkettigen Fettsäuren mit denen der späteren Softwareprozessierung zu vergleichen und einen Anhaltspunkt zur Stabilität der Messung zu haben. Die einzelnen Fettsäuren des Standards lagen dabei in den in Tabelle 4 beschriebenen Konzentrationen vor:

Tabelle 4: Konzentrationen der überlangkettigen Fettsäuren

Hexacosanoic acid (C26:0)	1 µMol/l
Lignoceric acid (C24:0)	20 µMol/l
Behenic acid (C22:0)	30 µMol/l
Phytanic acid (Phytansäure)	5 µMol/l
Pristanic acid (Pristansäure)	1 µMol/l

2.3.1.2. Probenvorbereitung lipophil ohne saure Hydrolyse

Zu 25 µl Blutprobe wurden 1 µl der Standardlösung und 100 µl Chloroform/Methanol (2:1) zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch für 30 Sekunden im Vortex vermischt. Nach 5 Minuten Ruhezeit wurde die Flüssigkeit für 5 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die obere organische Phase abpipettiert. Um den Proben das Wasser zu entziehen, wurde die Probe in Stickstoffstrom bis zur Trockenheit abgeblasen.

Die getrocknete Probe wurde in 25 µl Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen und im letzten Schritt mit 250 µl Isopropanol/Acetonitril/Wasser (2:1:1) verdünnt. Bis zur Messung wurden die Proben bei -20° C archiviert.

2.3.1.3. Probenvorbereitung lipophil mit saurer Hydrolyse

Wie in Abbildung 7 Schritt 1 zu sehen, wurde die Methode der sauren Hydrolyse für die Blutproben verwendet. 25 µl der Plasmaproben wurde mit 100 µl Toluol versetzt. Anschließend wurden 1 ml ACN/37 % HCL (4:1) hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 1 Stunde bei 90° C inkubiert. So erreichte man eine saure Hydrolyse, um beispielsweise Esterbindungen zu lösen. Sobald die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 2 ml n-Hexan hinzugefügt und gemischt. Danach wurde die Probe 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Ca. 75 % der oberen organischen Phase wurden abgenommen und mit Stickstoff bis zur Trockenheit bei 2 bar abgeblasen. Der Rückstand wurde dann in 50 µl Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen und im Anschluss mit 500 µl Isopropanol/Acetonitril/Wasser (2:1:1) verdünnt. Bis zur Messung wurden die Proben bei -20° C gelagert.

2.3.1.4. Probenvorbereitung Sphingolipide

Präanalytisch wurden 25 µL Blutprobe mit 50 µL Acetonitril im Vortex für 10 Sekunden vermischt. Anschließend wurde die Probe bei 4° C und 14 000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Vial überführt. Dieses wurde für die Messung bei -20° C archiviert bzw. zum Teil direkt gemessen.

2.3.2. Analytik

Abbildung 7 zeigt im zweiten Schritt die Analytik, worauf im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird. Zur Messung sowohl hydrophiler als auch hydrophober Verbindungen wurde ein *Ultra-Performance-Liquid-Chromatography* (UPLC) Verfahren und ein Massenspektrometriesystem mit Flugzeitanalysator *(Tof: Time of flight)* verwendet. Grundsätzlich teilt sich das Gerät in die UPLC und TOF auf. Dabei wird in der UPLC zwischen der festen Phase, die sich in einer Säule befindet und der mobilen Phase, die sich aus einem binären Gradienten zusammensetzt unterschieden. Zunächst wurde die Probe aus einem Acquity FTN Autosampler (Waters), in dem sie bei 10° C verblieben von einem Injektor aufgenommen. Eine Pumpe (Acquity Binary Solvent Manager (Waters)) erzeugte die mobile Phase der UPLC, die schließlich durch die feste Phase – der Säule – gelangt. Für das Projekt wurde eine Gradiententrennung gewählt, bei der sich die Lösungsmittelzusammensetzung über eine gewisse Zeit kontinuierlich ändert. Ein Druckaufnehmer, der sich an die Pumpe anschließt misst den Druck. Dieser erreicht bei der UPLC-Methode je nach Säule Werte bis zu 18 000 psi (= 1241 bar). Im Falle der hydrophoben Messungen war der maximale Druck 15 000 psi. Die Säule kann je nach Messbereich gewählt werden.

In der Säule befindet sich die stationäre Phase, welche aus Kieselgel besteht, an welchem bestimmte chemische Gruppen haften. Bei den Messungen lipophiler bzw. hydrophober Verbindungen wurde eine Acquity UPLC CSH™ C18 1,7 µm *(Charged Surface Hybrid)* Säule von Waters bei einer Temperatur von 55° C benutzt. An deren Kieselgel haften chemische Gruppen von 18 Kohlenstoffatomen. Diese apolaren Gruppen dienen in der stationären Phase als Anheftstelle für Moleküle, die in der durchfließenden mobilen Phase gelöst sind. Je nach Verbindung und den damit verbundenen unterschiedlichen chemischen Eigenschaften verbleiben die Moleküle unterschiedlich lange an der stationären Phase.

Die sogenannte Retentionszeit (RT) ist dann die Zeit, die eine Verbindung für den Durchlauf durch das C18-Material benötigt. Somit erfolgt die Auftrennung des Gemisches nach chromatographischer Auftrennung und die Moleküle verlassen die Säule in unterschiedlichen Abständen.

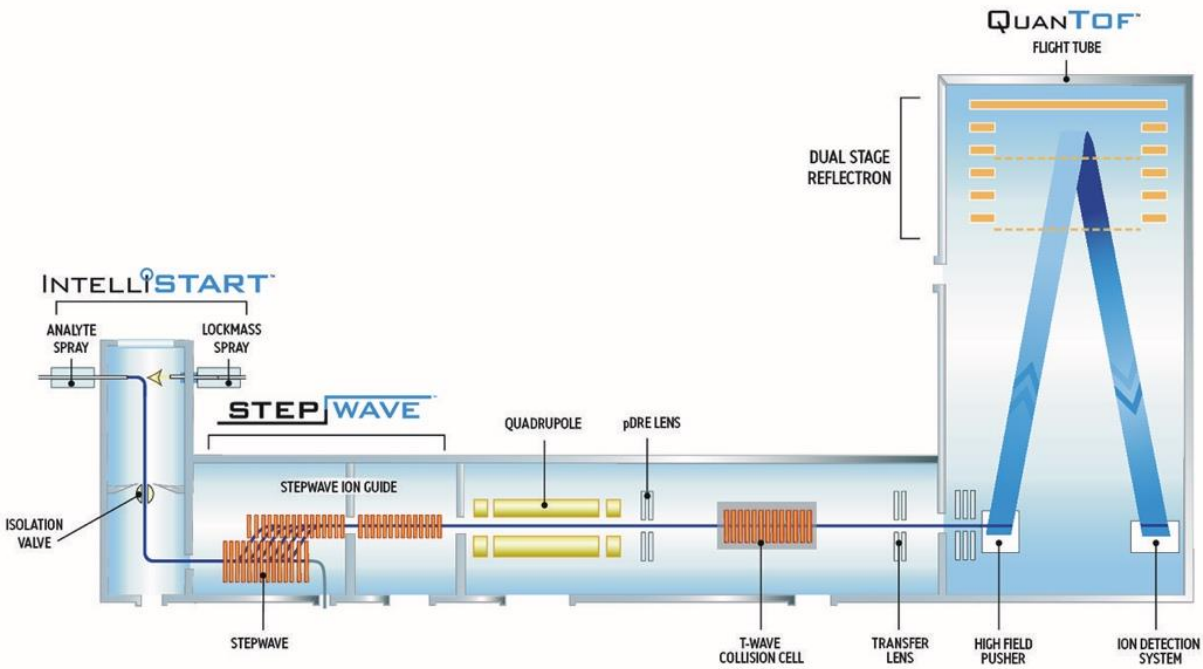


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des benutzten Xevo G2-S QTof (Waters). Der Abdruck/die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Waters GmbH Eschborn.

Es schließt sich eine Ionenquelle an, welche die Probe ionisiert. Dies erfolgt mittels Elektronenspray-Ionisierung (ESI) und kann je nach Spannung eine positive oder negative Ionisierung hervorrufen. Die Lösung mit den Analyten fließt dabei durch eine Metallkapillare, auf der eine Spannung anliegt. Auf deren Gegenseite sorgt eine Gegenelektrode für die Bildung eines elektrischen Feldes. Die Ionen fließen in Richtung Gegenelektrode, wobei sich Ionen der gleichen Ladung voneinander abstoßen. Durch einen Kegel *(Cone)* treten die Ionen als Aerosol aus. Das Hinzuströmen von einem Gas sorgt für eine schnellere Überführung der Lösung von flüssig zu gasförmig.

Dies hat zur Folge, dass die Tröpfchengröße immer kleiner wird und sie irgendwann durch die gegenseitige Abstoßung zerfallen. An einem bestimmten Punkt kann man davon ausgehen, dass ein Tropfen nur noch ein einziges Ion enthält. Darauffolgend befindet sich ein Quadrupol-Analysator, der zu einem bestimmten Zeitpunkt nur Ionen in einem bestimmten Masse-Ladungsverhältnis (m/z) durchlässt. Dieser Abschnitt des Gerätes wird in Abbildung 8 dargestellt. Anschließend folgt eine kollisionsinduzierte Dissoziation, bei der die Ionen mit Argon kollidieren und in Fragmente zerfallen. Je höher die Kollisionsenergie gewählt wird, desto mehr Fragmente resultieren aus dem Ion. Diese spezifischen Fragmentierungsmuster können später zur Identifizierung des Ions bzw. der Verbindung benutzt werden. Es ist ebenso möglich, die *Cone Voltage* (Stromspannung am Kegel) einzustellen, um die Energie zu regulieren, mit der die Elektronen den Analyten am Kegel der Ionisierungsquelle treffen. Man kann so unterschiedliche Fragmentierungen der Verbindung erzielen, die charakteristisch sind und später für einen Vergleich mit einer Datenbank benutzt werden. Dabei beobachtet man eine charakteristische Adduktbildung zwischen der ionisierten Probe und Bestandteilen der mobilen Phase. Daran schließt sich das Flugrohr an, wo die TOF-Messung erfolgt. Mittels Lockmass-Korrektur wird die Masse relativ zu einem konstant eingespritzten Leucin-/Enkephalin-Gemisch korrigiert und damit noch genauer.

2.3.2.1. Analytik – hydrophobe Verbindungen

Die UPLC wurde mit einer Waters Acquity I-Class durchgeführt. Dort wurden von jeder Probe 2 µL injiziert. Mit einer Laufzeit von 60 Minuten bei 0,2 ml/min wurde Lösungsmittel A (10 mM NH_4-FA, 0,1 % FA, H_2O/ACN 40/60) und Lösungsmittel B (10 mM NH_4-FA, 0,1 % FA, ACN/IPN 10/90) durch die Säule gepumpt (Gradiententrennung s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Programm der Gradiententrennung Flüssigchromatographie UPLC

Zeit (min)	Durchfluss (ml/min)	Verhältnis A (%)	Verhältnis B (%)	Curve
Initial	0,2	65	35	6
1	0,2	65	35	6
5	0,2	60	40	6
15	0,2	57	43	6
15,10	0,2	50	50	6
40	0,2	46	54	6
41	0,2	30	70	6
55	0,2	10	90	6
55,10	0,2	65	35	6
60	0,2	65	35	6

Der untere Druckbereich lag bei 0 psi und der maximale bei 15 000 psi. In dem Waters Acquity FTN Autosampler wurde die Nadel nach 6 Sekunden der Injektion mit ACN/H_2O 90/10 gewaschen. Die Probentemperatur wurde auf 10° C eingestellt. Die Reinigungslösung (*Purge solvent*) war ein Gemisch aus ACN/H_2O (60:40).

Als Lockspray wurde ein Gemisch aus Leucin-Enkephalin in einer Konzentration von 200 pg/mL benutzt.

Der Massenbereich, in dem Analyten analysiert werden sollten, lag zwischen 50 Da bis 1200 Da. Gemessen wurde im negativen Modus (ES-). Analysiert wurde im sensitiven Modus mit einer Kapillarenergie *(Capillary)* von 3 kV, wobei die Quellentemperatur der Ionisierungsquelle 120° C betrug. Die *desolvation temperature* von 350° C, sowie der Gasdurchfluss von 100 l/h bei einem *desolvation gas flow* von 650 l/h durch den Kegel, waren für die Ionenquelle eingestellt. Ionen in der Ionenfalle wurden mit einer Kollisionsenergie von 6 eV fragmentiert.

2.4. Datenprozessierung

Die gemessenen Proben wurden durch die Software MassLynx 4.1 (Waters) im .raw Dateiformat in „Continuum-Modus“ gespeichert. Zur weiteren Auswertung wurde die Software ProGenesis QI (Nonlinear) verwendet. Der Arbeitsfluss in ProGenesis stellte sich wie folgt dar:

2.4.1. *Alignment*

Zunächst wurde ein Experiment erstellt, in das die .raw Dateien aus MassLynx importiert wurden. In dem Experiment wurde angegeben, dass die Dateien im Continuum und negativen Modus gemessen wurden. Im Gegensatz zum zentroidierten Modus enthält Continuum wesentlich mehr Informationen zu den gemessenen Signalen. Ebenso wurden die möglichen Addukte der Analyte, die durch Reaktionen in den Ionenquellen entstehen zentroidiert angegeben und gemessen. Diese sind je nach Lösungsmittel und Methode unterschiedlich. In diesem Projekt wurden die möglichen Addukte M-H (da im negativen Modus ein Proton abgespalten wird), M-H2O-H und M+Na-2H vorgegeben. Anschließend wurden die einzelnen Messungen anhand eines Referenzlaufes aneinander ausgerichtet, welchen ProGenesis automatisch bestimmt. Dies sorgt dafür, dass Verbindungen, die ähnliche oder gleiche m/z-Verhältnisse haben, aber messschwankungsbedingte Retentionszeitverschiebungen enthalten, angeglichen werden. ProGenesis nutzt dafür Vektoren, die den Ort auf einem 2D-Diagramm (x-Achse: m/z; y-Achse: RT) des Referenzions mit dem des zu vergleichenden Ions der ausgewählten Messung verbinden. Die Software gleicht aber nicht jede Verbindung an, sondern übersieht manche Komponenten. Durch manuelle Nachbearbeitung können so Systemfehler korrigiert werden. Dann können die Retentionszeiten der beiden Messungen verglichen werden und so werden Verbindungen, die trotz kleiner unterschiedlicher Retentionszeiten identisch sind, als gleiche Verbindung ausgewertet. Die korrekte Adduktzuordnung spielt als Dekonvolution eine wichtige Rolle für die Signalinterpretation und Identifikation.

2.4.2. *Peak picking*

Im nächsten Schritt sucht die Software nach *Peaks* im Chromatogramm. Dies macht die Software anhand wählbarer Stellgrößen automatisch. So kann man beispielsweise die Peakbreite in einem 2D-Diagramm anhand der Retentionszeit (x-Achse) in Sekunden eingrenzen. Ebenso die Peakintensität (y-Achse). Bei diesem Projekt wurden keine Einschränkungen vorgenommen, um möglichst keine Verbindungen auszugrenzen.

2.4.3. *Review deconvolution*

Nach dem *peak picking* werden detektierte Ionen gruppiert, die unterschiedliche Adduktformen derselben Verbindung aufweisen. Dieser Prozess wird als *deconvolution* bezeichnet. Diese

Verbindungen müssen die gleiche Retentionszeit besitzen, sowie eine Ionenmasse, die sich durch die Massendifferenz zwischen zwei angegebenen Addukten unterscheidet.

Haben zum Beispiel zwei Verbindungen eine Massendifferenz, die einer bestimmten Adduktform entspricht (z. B. H_2O), werden diese Verbindungen als die gleiche Verbindung mit unterschiedlichen Addukten gruppiert. So kann ProGenesis die Masse des Adduktes von der Masse des Molekülions abziehen und eine neutrale Masse berechnen. Manuell können Addukte der Verbindung je nach Übereinstimmung hinzugefügt oder entfernt werden.

2.4.4. *Experiment design*

Unter dieser Rubrik kann das Format des Projektes gewählt werden. Für die Analyse der Patientengruppen ALD, ZWS und Kontrollgruppe wurden verschiedene Experimentformate gewählt. Zum einen wurde die gleiche Anzahl der ALD- und Kontrollgruppenproben einer gleichnamigen Gruppe oder „Condition" zugeteilt, um ALD-Patienten mit der Kontrollgruppe zu vergleichen. Ebenso wurde dieses Format für die Zellweger-Patienten gewählt. Ergänzend wurden nach dem gleichen Prinzip ZWS- mit ALD-Patienten verglichen.

2.4.5. *Identify compounds*

Nachdem durch das *peak picking* eine Liste mit Masse und Retentionszeit erstellt wurde, können diese einzelnen Verbindungen anhand verschiedener Datenbanken identifiziert werden. Anhand der Retentionszeit, des m/z-Verhältnisses sowie der theoretischen Fragmentierung der Verbindung kann diese mit den Angaben einer Datenbank verglichen werden. MetaScope ist ein Algorithmus, der die unterschiedlichen Fragmente mit einer Datenbank abgleicht. Wolf et al. beschrieben dies 2010 ausführlicher. Jedes der entstehenden theoretischen Fragmente wird dann mit den Peaks des Experiments verglichen. Trifft die Masse des Fragments mit der Masse eines identifizierten Peaks überein, wird dieses Fragment den Komponenten zugeordnet. Sind die Messungen beispielsweise im negativen Modus aufgenommen, geht man davon aus, dass den Verbindungen ein Proton in Form von H+ fehlt und eine negative Ladung zurückbleibt. Dies erkennt Progenesis und markiert die Verbindung als M-H, was zu Beginn des Experiments als Addukt eingegeben wurde. Da sich durch die Ladungsänderung auch das m/z-Verhältnis ändert, muss dies Progenesis mitberechnen. M steht für eine beliebige Verbindung. Wenn M eine Masse von 20 Da und H eine Masse von 1 Da hat, wird M 1 Da abgezogen. Das Haupt-Ion wird jetzt der theoretischen Fragmentierung unterzogen. Angenommen es wird ein Fragment X der Größe 19,5 Da gefunden, welches dem Hauption entspringt. Dann wird der Peak des Hauptions bei 20 Da X+H und einem Massenerror von 0,5 Da markiert.

Da die Peakliste meist mehrere tausend Komponenten identifiziert, ist es sinnvoll, die für das Projekt relevanten Komponenten einzugrenzen. Dafür gibt es die Möglichkeit der Varianzanalyse (anova p-value), der x-fachen Veränderung der Komponenten *(fold change)* und minimale covariance (min CV %) im Vergleich der experimentellen Gruppen.

Für dieses Projekt wurden die Komponenten zunächst ungefiltert verwendet, um möglichst keine Metabolite auszugrenzen. Die Daten wurden zur weiteren Beurteilung in eine weitere Software namens „EZInfo 3" exportiert. Um ein S-Plot darstellen zu können, mussten die Daten zunächst in die Form einer OPLS-DA *(orthogonal projections to latent structures for discriminent analysis)* umgewandelt werden (s. Abschnitt 3.1). Diese Analyseform erlaubt es dem Benutzer Trennungen zwischen Gruppen in einem Score-Plot besser darzustellen. Im Anschluss können die Daten in einem S-Plot dargestellt werden (s. Abschnitt 3.1). Werte, die nicht in der Mehrheit der Daten in der Nähe der Achsen liegen, sondern außerhalb und sich damit von den anderen Daten abheben, wurden markiert. Dies sind also Verbindungen, die sich durch eine unterschiedliche Peakintensität und damit durch eine erhöhte oder erniedrigte Konzentration im untersuchten Gewebe von der untersuchten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle abheben. Anschließend wurden die markierten Daten zurück in Progenesis importiert, um dort genauer identifiziert zu werden. So konnten potentiell neue Biomarker analysiert und verglichen werden. Die identifizierten Biomarker können dann von ProGenesis in ein *Pathway-Tool* wie MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca) exportiert werden. Dort werden die Analyte einem oder mehreren Stoffwechselwegen zugeordnet. So wurden beispielsweise die überlangkettigen Fettsäuren aus dem Fettsäurestandard der Beta-Oxidation der Peroxisomen zugeordnet. Ebenso die mehrfach ungesättigten Fettsäuren dem Stoffwechselweg aus Abbildung 4. Zusätzlich wurden die Peaks der Moleküle anhand ihrer Masse und der spezifischen Fragmentierung mit einem für die Summenformel spezifischen Isotopen-Modell verglichen und damit zugeordnet.

2.5. Statistische Auswertung

Um die Ergebnisse des *untargeted metabolomics* (überlangkettige Fettsäuren und mehrfach ungesättigte Fettsäuren) innerhalb der Gruppen vergleichen zu können, wurde die deskriptive Statistik verwendet. Es wurden Mittelwert, Standardabweichung, Maximum und Minimum berechnet und in den Diagrammen dargestellt.

Für die neu identifizierten Biomarker sowie das quantifizierte Sphingomyelin, wurde der Kruskal-Wallis bzw. H-Test mit der Software SPSS (IBM®) ausgewertet. Damit können „voraussetzungsfrei" mehr als zwei Gruppen verglichen werden, welche Stichproben enthalten, die unabhängig voneinander sind. Ebenso stellt der Test geringe Anforderungen an die Verteilung der Messwerte. Der H-Test ist für diese Ergebnisse besonders von Vorteil, da er auch bei kleinen Stichproben und Ausreißern verwendet werden kann. Zunächst wird die Nullhypothese aufgestellt, dass es bezüglich der Konzentrationen der Biomarker zwischen Patienten, die an Zellwegersyndrom oder Adrenoleukodystrophie erkrankt sind, im Vergleich zu gesunden Patienten keinen signifikanten Unterschied gibt. Die Gegenhypothese bedeutet, dass es einen Unterschied zwischen diesen Gruppen gibt. Das Signifikanzniveau für den Kruskal-Wallis-Test wurde auf 0,05 festgelegt. Das Konfidenzintervall damit auf 95 %. Damit ist allerdings nicht bewiesen, welche Gruppen sich voneinander unterscheiden, sondern nur, dass es insgesamt einen Unterschied gibt. Daher wurde ein paarweiser Post-hoc Test angewendet (Dunn-Bunferroni-Test), welcher aufzeigt, welche Gruppen sich von welcher unterscheiden.

3. Ergebnis

3.1. OPLS-DA und S-Plot

Rohdaten, die nach vielen Messläufen ausgewertet werden sollen, beinhalten unzählige Informationen. Die Retentionszeitverschiebung und das m/z-Verhältnis sind nur ein kleiner Teil davon. Damit diese großen Dateien und verschiedensten Informationen einfacher ausgewertet werden können, müssen die gemessenen Analyte sortiert, geordnet und nach spezifischen Merkmalen eingeordnet werden und sich somit ein erster Überblick verschafft werden. Hilfreich können hier Methoden wie Diskrimanzanalyse oder Hauptkomponentenanalyse (PCA) in Form von Score-Plots bzw. OPLS-DA *(orthogonal projections to latent structures for discriminent anlysis)* Diagrammen sein, die sich besonders zur Abgrenzung von Biomarkern eignen. So lassen sich mehrere Gruppen mit mehreren Variablen unterscheiden. Der S-Plot aus Abbildung 10 eignet sich besonders gut um vermeintliche Biomarker zu markieren und in ProGenesis zu reimportieren, um den Biomarker einer genaueren Identifizierung zu unterziehen.

Wie in Abschnitt 2.4 erklärt, wurden die Rohdaten der Messungen in ProGensis importiert. Am Ende der Datenprozessierung wurden rund 6200 unidentifizierte Metabolite in die Software EzInfo exportiert. Hier konnten die Rohdaten der Gruppen Kontrollgruppe, Zellweger, Poolsample oder ALD in einem OPLS-DA Diagramm dargestellt werden, was in Abbildung 9 zu sehen ist. OPLS ist eine Methode, die anzeigt wie gut Informationen für Vorhersagen eingesetzt werden können. Score-Plot t [2] (y-Achse) stellt hier die Abweichung innerhalb einer Gruppe dar. Score-Plot t [1] (x-Achse) die Abweichung zwischen verschiedenen Gruppen. Die Ellipse stellt nach der Studentschen-t-Verteilung einen Toleranzbereich für die Daten dar. Abbildung 9 beschränkt sich nur auf die Gruppen Zellweger, Kontrollgruppe und Poolsample. Die Daten der Zellwegerproben (+) liegen in der oberen Hälfte des Diagramms aufgeführt, wohingegen die der Kontrollgruppe (Δ) im unteren bis mittleren Bereich zu finden sind. Die Poolsamples (•) bestehen wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben aus beiden Gruppen und sind in Abbildung 9 im Schnittbereich von Zellweger- und Kontrollguppe. Innerhalb der Gruppen unterscheiden sich Zellwegerproben von Kontrollgruppenproben. Da Poolsamples aus Proben aller Gruppen bestehen, ordnen sich ihre Daten um den Schnittpunkt von t [1] und t [2]. Sie bilden damit die Schnittmenge zwischen Zellwegerproben und Kontrollgruppenproben. Zellwegerproben und Kontrollgruppenproben ordnen sich eher vertikal entlang t [2] an, was darauf hindeutet, dass die Abweichung zwischen den beiden Gruppen generell eher gering ist. Dennoch finden sich wie Abschnitt 3.4, 3.5 und 3.6 zeigt bei genauerer Betrachtung signifikante Unterschiede bei Biomarkern der verschiedenen Gruppen. Das OPLS-DA Diagramm dient also zunächst nur zur ersten Einschätzung und für einen Überblick hinsichtlich der Unterschiede zwischen und innerhalb von Gruppen.

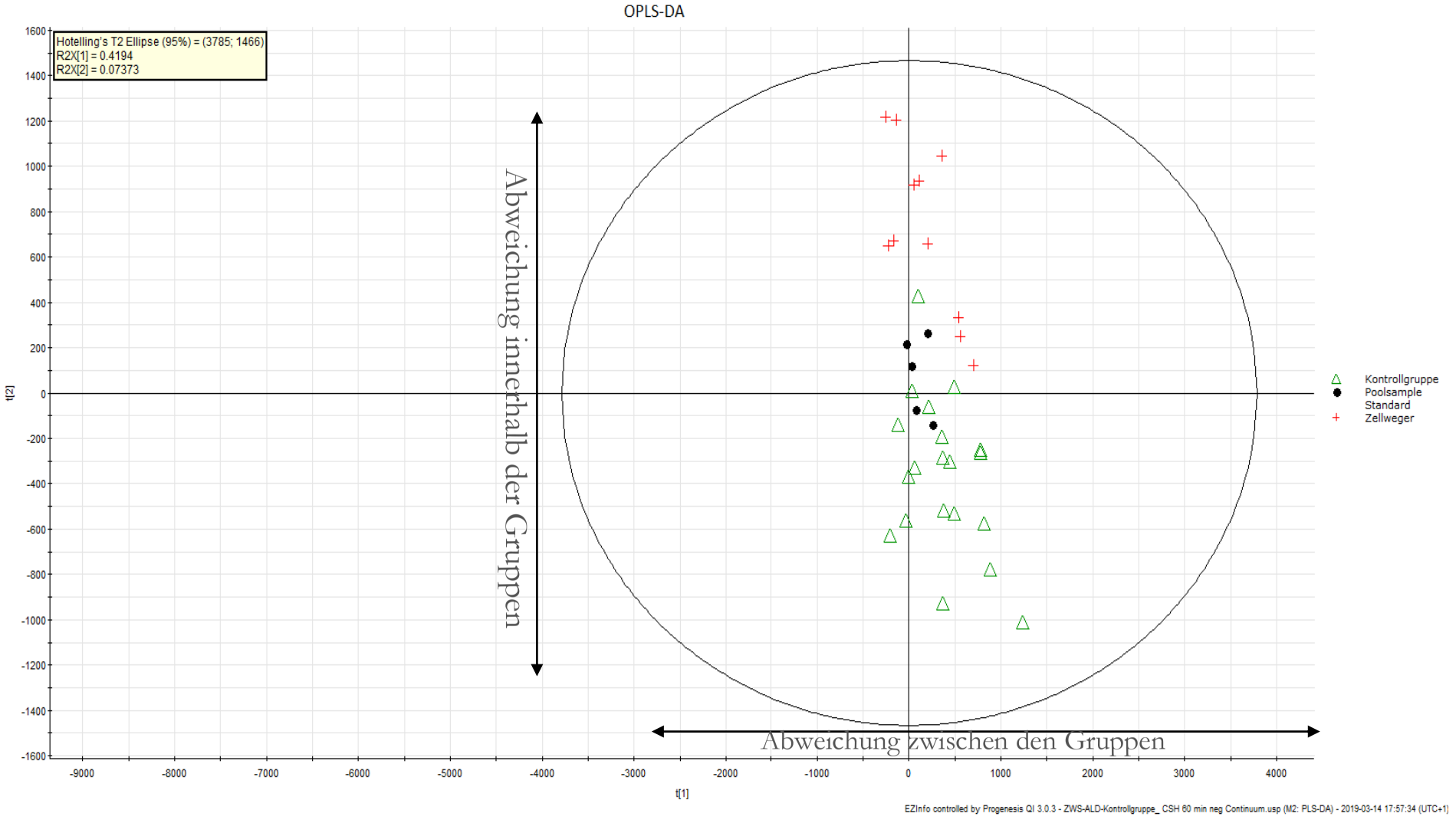

OPLS-DA
Hotelling's T2 Ellipse (95%) = (3785; 1466)
R2X[1] = 0.4194
R2X[2] = 0.07373
Abweichung innerhalb der Gruppen
Abweichung zwischen den Gruppen
t[2]
t[1]
Kontrollgruppe
Poolsample
Standard
Zellweger
EZInfo controlled by Progenesis QI 3.0.3 - ZWS-ALD-Kontrollgruppe_ CSH 60 min neg Continuum.usp (M2: PLS-DA) - 2019-03-14 17:57:34 (UTC+1)

Abbildung 9: OPLS-DA der Rohdaten aus ProGenesis:
Dargestellt ist ein Pareto skaliertes OPLS-DA-Diagramm *(orthogonal projections to latent structures for discriminent anlysis)*, welches 6200 Analyte der Zellweger- (+), Poolsample- (•) und Kontrollproben (Δ) in Gruppen aufgetrennt darstellt. Die beiden Gruppen Zellweger und Kontrolle unterscheiden sich entlang t [2]. Die Unterschiede zwischen den Gruppen t [1] sind gering. Die beiden Gruppen weichen zu 42 % in Abhängigkeit von t [2] voneinander ab. Ellipse: Hostelling T^2 (95 %) = Studentsche t-Verteilung erlaubt eine Toleranzregion der Daten. $R^2Y(cum)$ = 36 %, $Q^2(cum)$ = 19 %. R^2X [1] = 0,42 (42 %), R^2X [2] = 0,07 (7 %).

Der S-Plot visualisiert die einzelnen Meß-Parameter aus den Gruppen des OPLS-DA Diagramms. Die X-Achse „p [1] Loadings“ markiert das Außmaß jeder einzelnen Variablen. Die Y-Achse „p(corr)[1](Correlation)“ stellt die Zuverlässigkeit jeder einzelnen Variablen dar. Ist eine kontinuierliche Abweichung der Daten bzgl. der Peakintensitäten vorhanden, so präsentiert sich das Plot-Diagramm s-förmig. Peaks mit geringer Intensität ordnen sich um den Nullpunkt an. Vermeintlich ideale Biomarker mit hohen Peakintensitäten sind bei hohen positiven oder negativen p [1] und hohen p(corr)[1] Werten zu finden. Zu beachten ist jedoch, dass die idealen Biomarker im S-Plot nur statistisch signifikant sind und biochemisch möglicherweise nicht und umgekehrt.

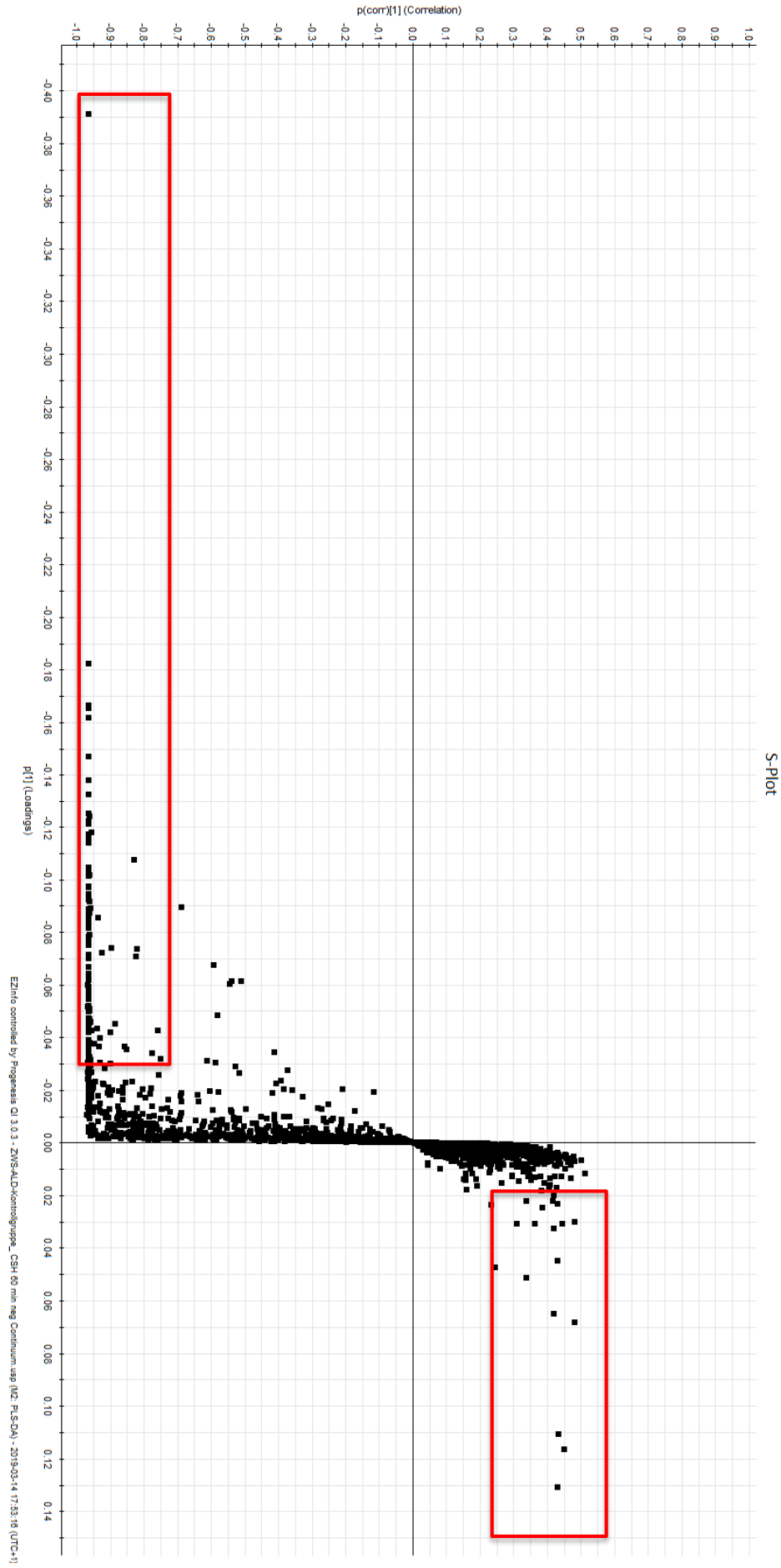

S-Plot
p(corr)[1] (Correlation)
p[1] (Loadings)
EZInfo controlled by Progenesis QI 3.0.3 - ZWS-ALD-Kontrollgruppe_ CSH 60 min neg Continuum.usp (M2: PLS-DA) - 2019-03-14 17:53:16 (UTC+1)

Abbildung 10: S-Plot zur Markierung vermeintlicher Biomarker:
Y-Achse = p(corr)[1](Correlation) – stellt die Zuverlässigkeit der Variablen dar. X-Achse = p [1] Loadings – stellt das Ausmaß jeder einzelnen Variablen dar. In diesem Fall die Peakintensität. Ideale Biomarker befinden sich am ehesten in den rot markierten Bereichen. Man muss beachten, dass diese nur statistisch signifikant sind und biochemisch nicht signifikant sein können. Im rechten oberen Bereich befinden sich die Biomarker Arachidonsäure C20:4, Docosahexaensäure C22:6 und Tetracosahexaensäure C24:6.

3.2. Vergleich hydrophober Probenvorbereitung mit und ohne saure Hydrolyse

Da zum einen die Fettsäurestandards aus Tabelle 4 als Ester vorliegen und insbesondere Fettsäuren physiologisch im Blut verestert vorliegen, wurde die präanalytische Methodik der sauren Hydrolyse für die Messungen hydrophober Metabolite benutzt. Diese Veresterungen mit diversen chemischen Gruppen können auch dynamisch wechseln. Die saure Hydrolyse wird durchgeführt, um alle veresterten Fettsäureanteile in die freie Form zu überführen und dann zu quantifizieren. Abbildung 11 zeigt, dass die Peakintensitäten bei gleicher Konzentration der gemessenen Fettsäurestandards mit saurer Hydrolyse deutlich höher sind als in Proben ohne saure Hydrolyse.

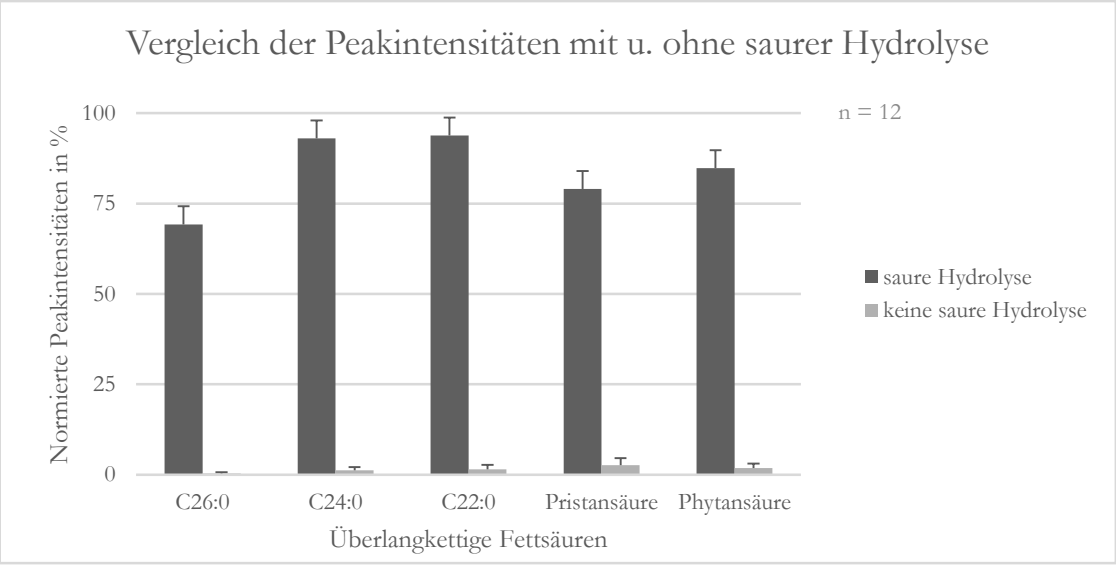


Abbildung 11: Höhere Peakintensitäten durch saure Hydrolyse:
Mittelwerte der Peakintensitäten von überlangkettigen Fettsäuren (VLCFA) bei n = 12 Proben. Zur leichteren Vergleichbarkeit wurde auf das Maximum der Peakintensitäten normiert. Es wurde 1 µl des Fettsäurestandards aus Tabelle 4 zu 25 µl einer Blutprobe gegeben

und mit Methode 2.3.1. „Probenvorbereitung lipophil mit saurer Hydrolyse“ und „Probenvorbereitung lipophil ohne saure Hydrolyse“ behandelt. Die Analytik wurde gleich durchgeführt. Deutlich wird, dass die Peakintensität bei Proben, die 1 h hydrolysiert wurden, höher sind.

3.3. Etablierung eines Messverfahrens für peroxisomale Biomarker

Um möglichst reproduzierbare Messungen und ein stabiles Messverfahren für die Proben zu etablieren, wurde ein Fettsäurestandard mit bekannten Metaboliten wie in Abschnitt 2.3.1.1 Tabelle 4 beschrieben verwendet. So konnten zunächst die Retentionszeit und die Masse der einzelnen Fettsäuren des Fettsäurestandards im Chromatogramm bestimmt werden. Hierdurch wird es möglich, diese Metabolite in der Probe über ihre Retentionszeit und Masse zu identifizieren. Abbildung 12 zeigt das Chromatogramm der verwendeten Fettsäurestandards, die mit der in Abschnitt 2.3.1.3 beschriebenen Methode gemessen wurden. Im Vergleich dazu sind in Abbildung 13 die Chromatogramme der Biomarker aus Tabelle 6 bei einer Blutprobe eines Zellwegerpatienten dargestellt. Hier konnten die im Fettsäurestandard bekannten Biomarker Hexacosansäure (C26:0), Tetracosansäure (C24:0), Behensäure (C22:0), Phytansäure und Pristansäure in Blutproben identifiziert werden. Außerdem wurde die Software Elemental Composition (MassLynx, Waters) benutzt, um Verbindungen mit einem vorgegebenen Isotopenmodell zu vergleichen (siehe Abbildung 14 - 18) und zu identifizieren.

Hierzu wurde die Summenformel eines Moleküls eingegeben und die Software zeigte spezifisch für dieses Molekül die monoisotopische Masse mit dem zugehörigen MS-Peak an. Umgekehrt konnten auch aus einem Peak im Chromatogramm die Masse und das Isotopenmuster zu einer Summenformel zugeordnet werden. Da die Biomarker im Chromatogramm von Abbildung 12 bzgl. Retentionszeit und m-/z-Verhältnis mit den Standards aus Tabelle 4, sowie die Spektren der Peaks mit dem Isotopenmodell übereinstimmen, ist davon auszugehen, dass es sich um die in Tabelle 6 genannten Biomarker handelt und die Methode als Messverfahren für peroxisomale Biomarker verwendet werden kann.

Folgende Retentionszeiten und Massen wurden für die Standardfettsäuren analysiert:

Tabelle 6: Eigenschaften der überlangkettigen Fettsäuren

Biomarker	Retentionszeit (min +/- 0,4)	Monoisotopische Masse (Da)	Durchschnittliche Masse (Da)	$[M-H]^-$ (Da)
Hexacosansäure (C26:0)	30,96	394,381073	394,674	395,3889
Tetracosansäure (C24:0)	24,13	368,365417	368,637	367,3576
Behensäure (C22:0)	19,05	340,334137	340,584	339,3263
Phytansäure	10,79	312,302826	312,530	311,2950
Pristansäure	9,16	298,287170	298,504	297,2794

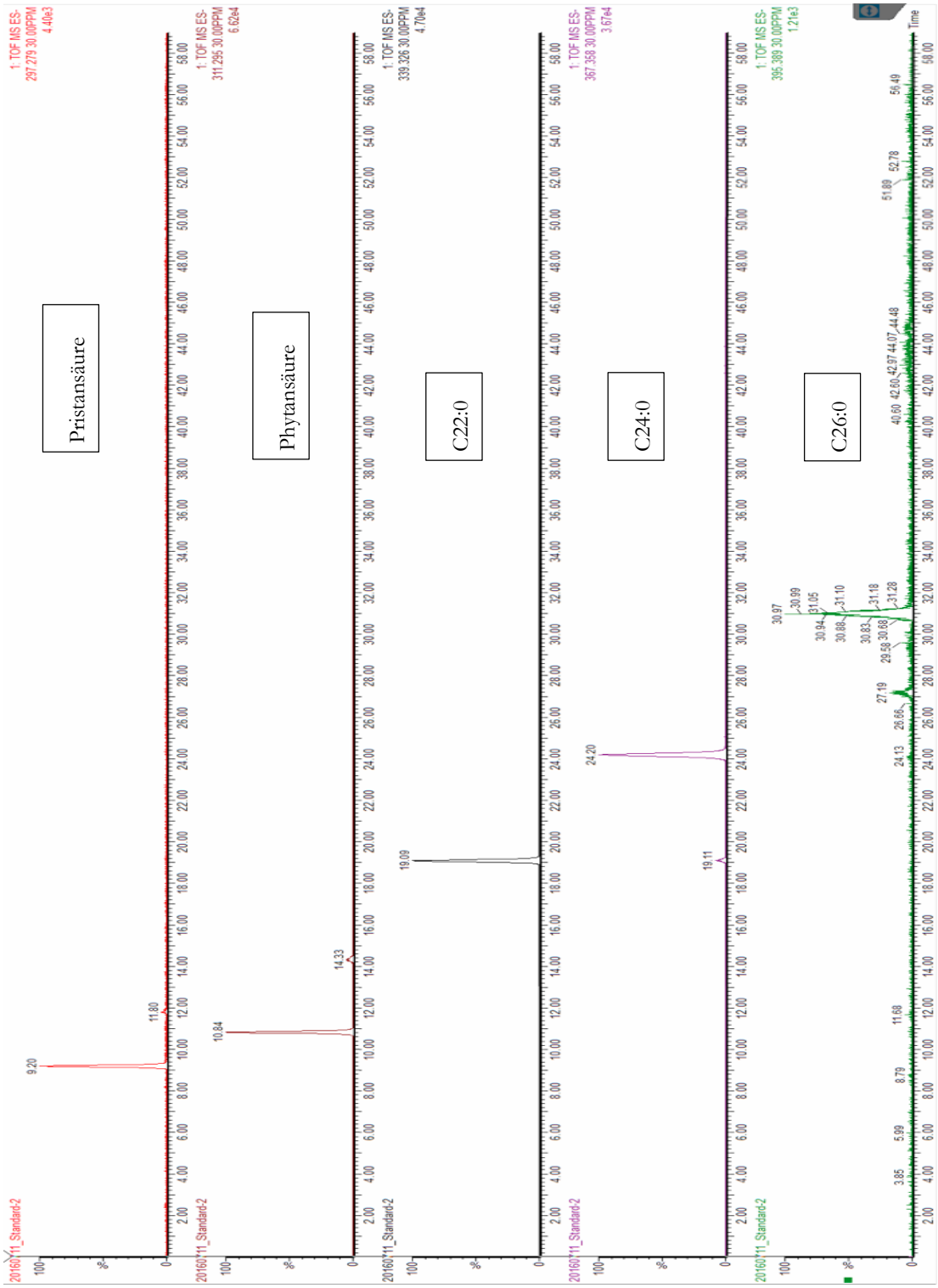


Abbildung 12: Chromatogramm der Fettsäurestandards:
Dargestellt ist das Chromatogramm der in Tabelle 4 aufgelisteten Fettsäuren, welche mit der in Abschnitt 2.3.1.3 beschriebenen Methode gemessen wurden. Die X-Achse stellt die Zeit bzw. Retentionszeit in Minuten dar. Die Y-Achse die relative Peakintensität in %. Alle Fettsäuren weisen einen eindeutigen Peak auf, der je nach Masse-/Ladungsverhältnis unterschiedliche Retentionszeiten aufweist.

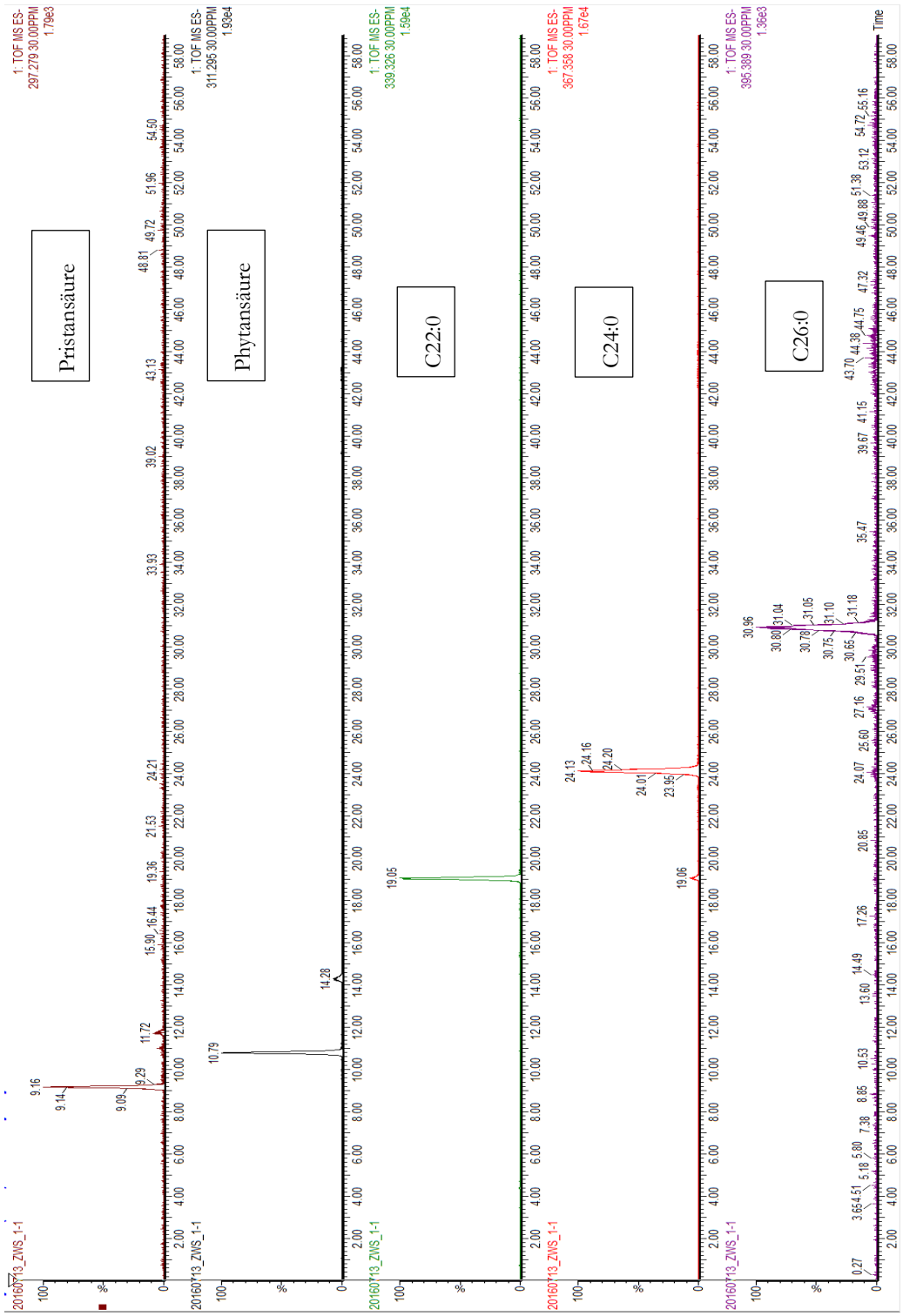


Abbildung 13: Chromatogramm der überlangkettigen Fettsäuren bei einer repräsentativen Probe der an ZSS leidenden Patienten:

Die Peaks der Fettsäurestandards aus Abbildung 12 stimmen mit ihrem m/z-Verhältnis mit denen dieser Probe bis auf leichte Retentionszeitverschiebungen überein. Daraus ist zu schließen, dass die Methode zur Identifizierung von lipophilen peroxisomalen Biomarkern verwendet werden kann.

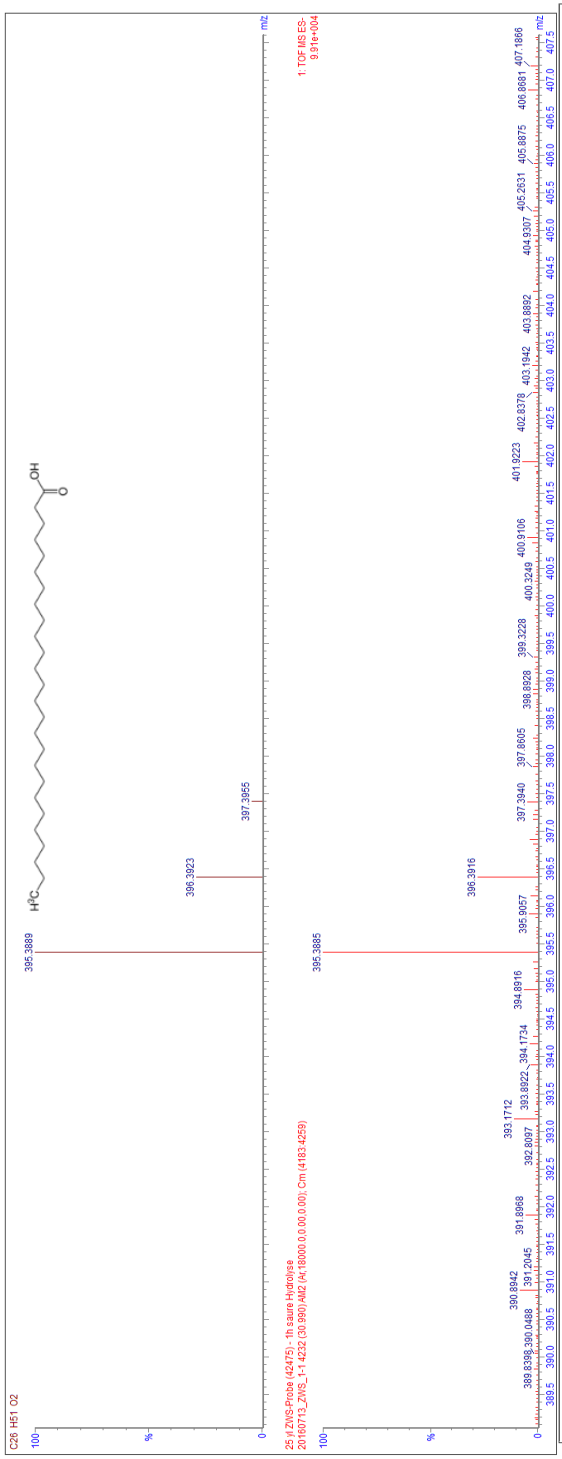


Abbildung 14: Isotopenmodell für die Summenformel C26:0 aus Waters MassLynx – Elemental Composition (oben) und m/z-Spektrum von C26:0 aus einer Zellwegerprobe (unten). Die Massenabweichung zum Isotopenmodell beträgt nur -0,4 mDa, - 1,0 ppm bzw. $1x10^{-6}$.

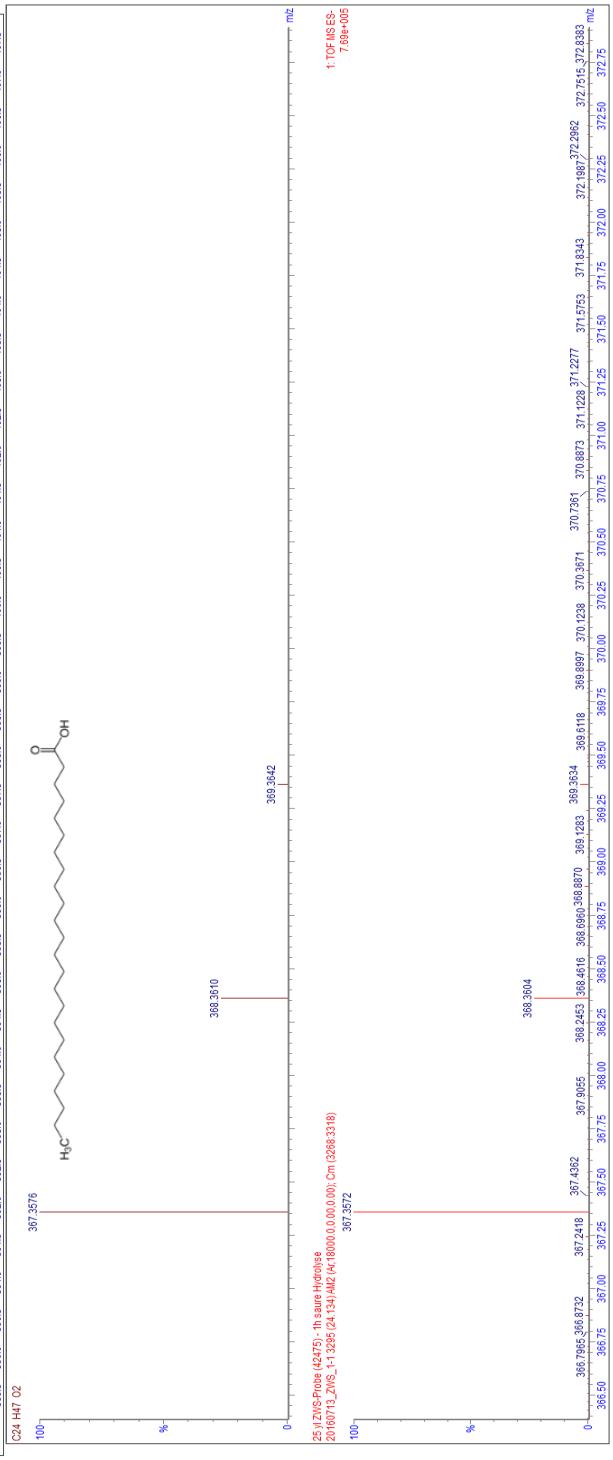


Abbildung 15: Isotopenmodell für die Summenformel C24:0 aus Waters MassLynx – Elemental Composition (oben) und m/z-Spektrum von C24:0 aus einer Zellwegerprobe (unten). Die Massenabweichung zum Isotopenmodell beträgt nur -0,4 mDa, -1,1 ppm bzw. $1,1x10^{-6}$.

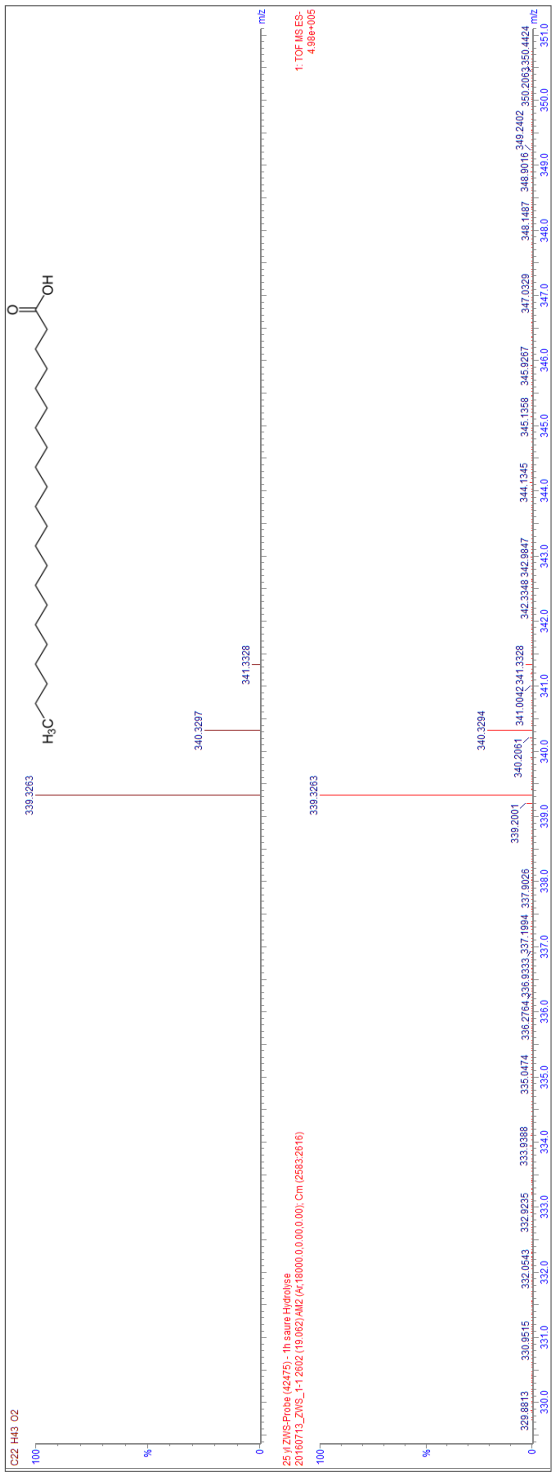


Abbildung 16: Isotopenmodell für die Summenformel C22:0 aus Waters MassLynx – Elemental Composition (oben) und m/z-Spektrum von C22:0 aus einer Zellwegerprobe (unten). Die Massenabweichung zum Isotopenmodell beträgt 0,0 mDa, 0,0 ppm.

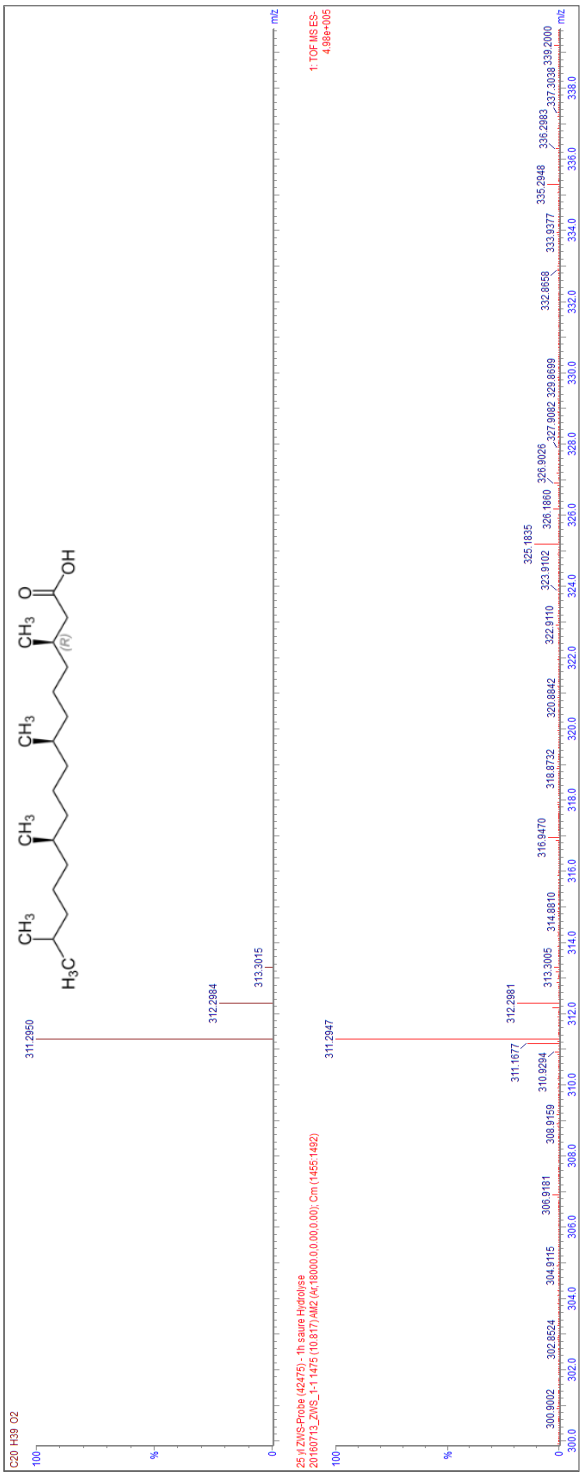


Abbildung 17: Isotopenmodell für die Summenformel Phytansäure aus Waters MassLynx – Elemental Composition (oben) und m/z-Spektrum von Phytansäure aus einer Zellwegerprobe (unten). Die Massenabweichung zum Isotopenmodell beträgt -0,3 mDa, -1,0 ppm.

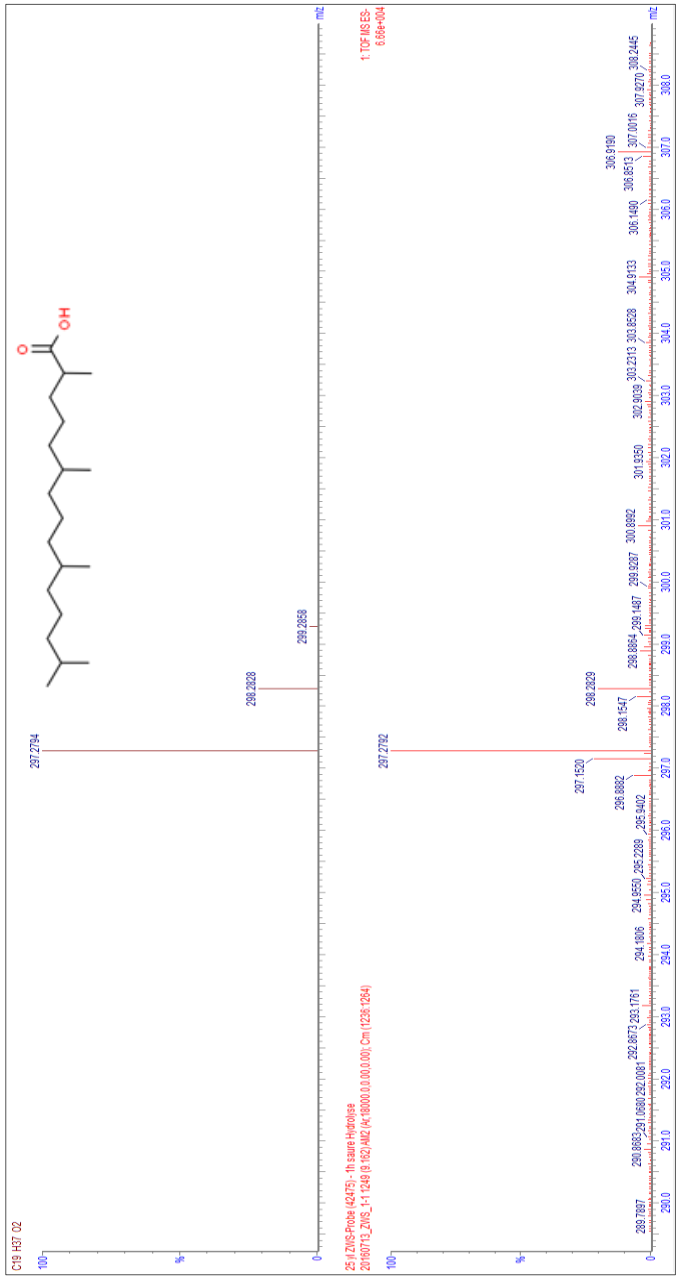


Abbildung 18: Isotopenmodell für die Summenformel Pristansäure aus Waters MassLynx – Elemental Composition (oben) und m/z-Spektrum von Pristansäure aus einer Zellweger-probe (unten). Die Massenabweichung zum Isotopenmodell beträgt -0,2 mDa, -0,7 ppm.

Nachdem die Messung des Fettsäurestandards als Referenz etabliert worden war, wurden Blutproben gemessen. Es wurden mehrere Proben vorbereitet und hintereinander gemessen. Dabei wurden stets die gleiche Präanalytik und UPLC-MS/MS-Methode (Analytik) verwendet. Jede Probe wurde zweifach gemessen, um so eine Differenz eventueller Fehlerquellen zwischen Probenvorbereitung und Gerät zu erfassen.

Verglichen wurden immer die Peakintensitäten der einzelnen Peaks der TIC-Chromatogramme *(total ion count)*. Die Peakhöhe ist dabei die Entfernung zwischen der sogenannten Basislinie des Chromatogramms zum Maximum des Peaks. Bei gut aufgelösten Peaks ist die Peakhöhe proportional zur Konzentration des Analyten und ist damit ein Maß für die Quantifizierung. Die Summenformel der Verbindung wurde in den Massenkalkulator von MassLynx gegeben, der dann die monoisotopische Masse $[M-H]^-$ oder $[M+H]^+$ berechnet. Wenn der gemessene Modus negativ ist, wurde der Masse ein Wasserstoffatom abgezogen. Im positiven Modus kommt ein Wasserstoffatom hinzu. Die monoisotopische Masse kann dann benutzt werden, um in den Chromatogrammen nach Molekülen der gleichen Masse zu suchen. Dabei wurde die Suche der Massengenauigkeit auf 30 ppm *(parts per million)* eingegrenzt.

Abbildung 19 zeigt den Vergleich der Biomarker-Peakintensitäten von 10 Testmessungen, bestehend aus 25 µL Blutprobe, sowie 1 µL des Fettsäurestandards. Der Fettsäurestandard wurde den Blutproben hinzugefügt, um zu überprüfen, ob mit der analytischen Methode bekannte Biomarker bzw. lang- und überlangkettige Fettsäuren im Blut identifiziert werden können und diese auch nach der Präanalytik stabil bleiben.

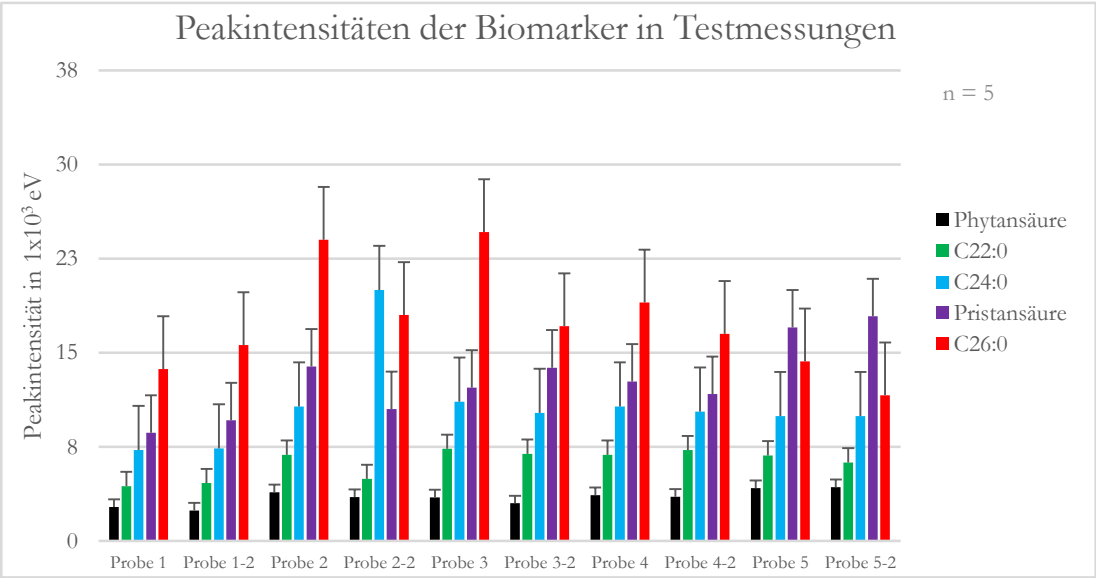


Abbildung 19: Vergleich der Peakintensitäten von Biomarkern in Testmessungen: Dargestellt sind die Peakintensitäten von n = 5 Proben und 10 Testmessungen. Jede Probe enthält 1 µl des Fettsäurestandards aus Tabelle 4 und wurde zweimal gemessen. Sie stellen somit technische Replikate dar. Unterschiede der Peakintensität zwischen einem technischen Replikat sind daher eher auf Ungenauigkeiten der Analytik zurückzuführen. Unterschiede zwischen den Proben deuten eher auf Ungenauigkeiten der Präanalytik oder die unterschiedlichen Blutproben hin. Die Standardabweichung ist durch die Fehlerbalken dargestellt. Präanalytisch wurde die hydrophobe Methode verwendet.

Für die Messungen der Patientengruppen wurden Poolsamples angefertigt, welche 10 µL jeder Probe beinhalten. Diese wurden jeweils vor jeder Messung, nach fünf bis sechs Messungen und am Ende eines Probendurchlaufes gemessen. Damit lassen sich Veränderungen während der Messungen erkennen, die auf externe Einflüsse wie beispielsweise Verunreinigungen des Messgerätes, Temperaturschwankungen oder Fehler in der Präanalytik zurückzuführen sind. Ebenso konnte anhand der Poolsamples die Stabilität der Messungen deutlicher gemacht werden, wie Abbildung 20 zeigt. Dabei ist zu beachten, dass dasselbe Poolsample zu verschiedenen Zeiten gemessen wurde.

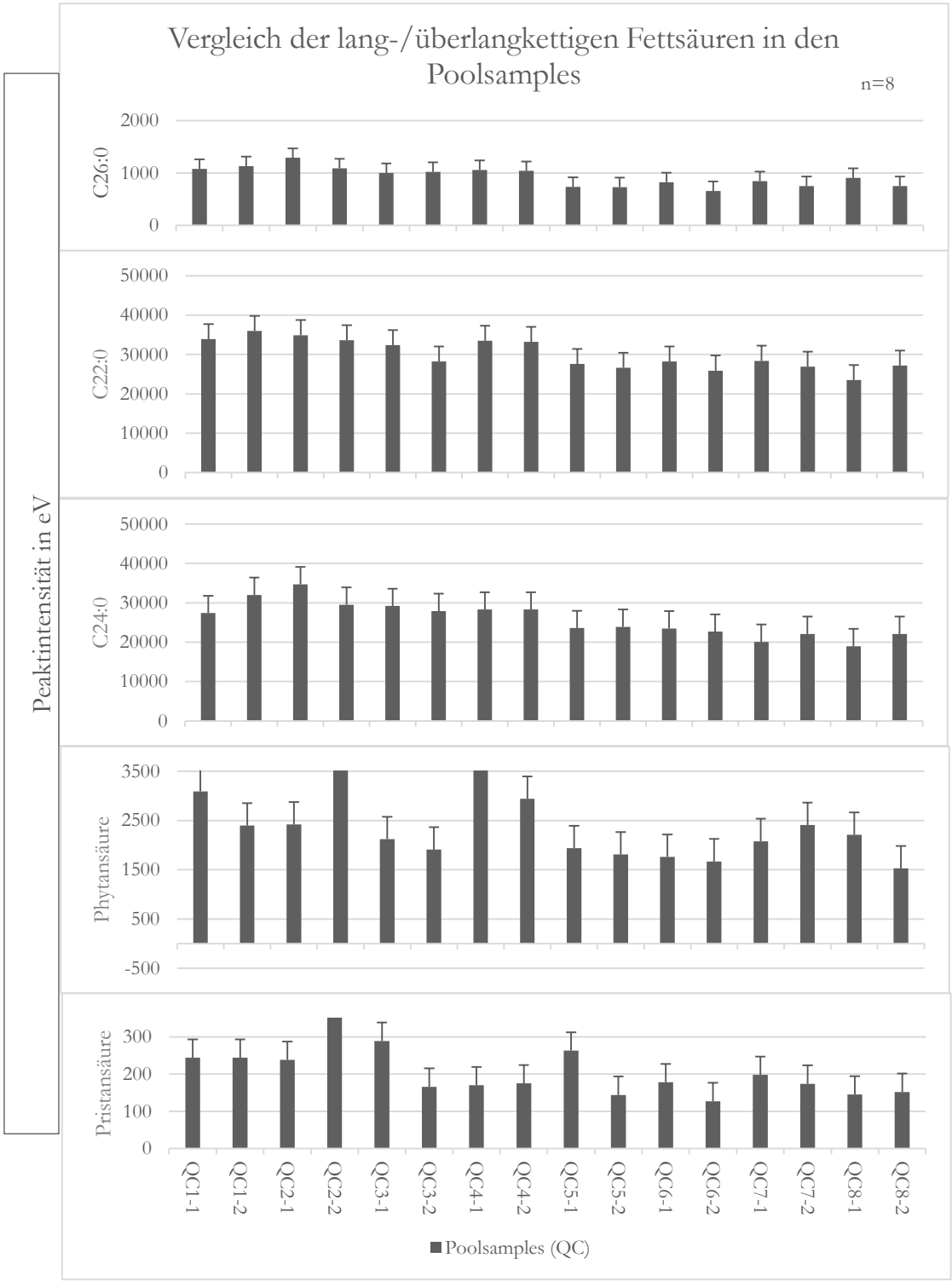


Abbildung 20: Präzision in Serie - Vergleich der lang-/überlangkettigen Fettsäuren in Poolsamples/Qualitychecks (QC):

Verglichen wurden insgesamt 16 Messungen von n = 8 Poolsamples (QC), die in verschiedenen Läufen also zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurden. Sie enthielten je 10 µL jeder Probe. Die y-Achse zeigt die absolute Peakintensität in eV. QC1-1 und QC1-2 sowie alle folgenden Poolsample-Paare, stellen technische Replikate dar.

Zur weiteren Beurteilung des Messverfahrens wurde ein Methodenvergleich mit einer diagnostisch etablierten Methode durchgeführt. Dafür wurden drei gemessene Patientenproben, bei denen das etablierte Verfahren bereits angewendet wurde, mit drei Proben derselben Patienten, die nach der neuen Methode analysiert wurden verglichen (s. Abbildung 21). Bei dem etablierten Verfahren werden Blutproben der Patienten mit einer GC-MS-Methode (gaschromatographischen Massenspektrometrie) gemessen, um überlangkettige Fettsäuren zu quantifizieren. Dabei werden überlangkettige Fettsäuren mit anderen ins Verhältnis gesetzt, um einen aussagekräftigen Wert zu erhalten (s. Abschnitt 3.4). Das Verhältnis C26/C22 der Proben von Patient zwei und drei sind annähernd gleich. Daraus ist zu schließen, dass bei diesen Patienten die neue Methode der UPLC-MS/MS fast gleiche Ergebnisse wie die etablierte Methode der GC-MS liefert. Der Unterschied der Peakintensität bei Patient eins beträgt in der relativen Einheit des Verhältnisses C26:0/C22:0 ca. 0,2. Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden können unterschiedliche Matrixeffekte sein. Da sich unter anderem die Präanalytik der Methoden unterscheidet kann es zu verschiedenen Interferenzen zwischen dem Analyten und anderen Probenbestandteilen kommen. Um eine signifikante Aussage über die Gleichwertigkeit der beiden Methoden zu erhalten, müssen weitere Patientenproben verglichen werden. Es deutet sich jedoch an, dass die neue Methode annähernd gleiche Peakintensitäten und damit Konzentrationen der bereits etablierten Biomarker C26:0 und C22:0 im Blut der Patienten messen kann.

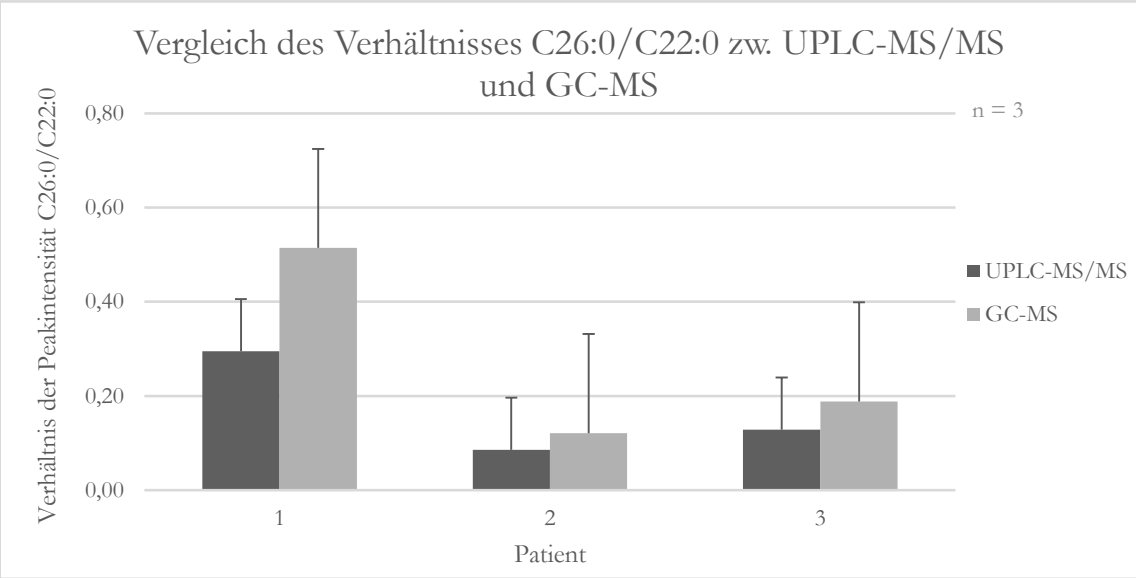


Abbildung 21: Annähernd gleiche Peakintensitäten bei UPLC-MS/MS und GC-MS: Die neue Methode UPLC-MS/MS und die bereits etablierte Methode GC-MS wurden bzgl. des Verhältnisses der Fettsäuren C26/C22 bei n = 3 Patientenproben verglichen. Beide Methoden liefern annähernd gleiche Ergebnisse, obwohl die Messungen der GC-MS teilweise Jahre vor der UPLC-MS/MS-Methode durchgeführt wurden.

3.4. Überlangkettige Fettsäuren im Verhältnis – Vergleich der Gruppen

Die überlangkettige Fettsäure C26:0 ist in Abbildung 22 für jede der untersuchten Gruppen im Chromatogramm dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die Probe des Zellwegerpatienten die höchste Peakintensität aufweist. Ebenso ist die Peakintensität der ALD-Probe im Vergleich zur Kontroll-Probe erhöht. Da Metabolitenkonzentrationen wie die der Fettsäure C26:0 aufgrund externer Einflüsse auf den Metabolismus wie zum Beispiel Ernährung, individueller Stoffwechsel, Krankheit oder evtl. Therapien im Verhältnis zu Metaboliten betrachtet werden sollten, welche weniger beeinflusst werden, kann man beispielsweise die Fettsäure C26:0 ins Verhältnis zur Fettsäure C22:0 setzen. Dies ist ein gängiges Verfahren der ZSS-Diagnostik. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen das Verhältnis der Peakintensitäten der Fettsäuren C26:0/C22:0 und C24:0/C22:0 bei Patienten mit bekanntem Zellwegersyndrom im Vergleich zu gesunden Patienten (Kontrollgruppe) und ALD-Patienten.

Auffällig ist, dass bei Patienten mit Zellwegersyndrom das Verhältnis der Peakintensität C26:0/C22:0 im Vergleich zur Kontrollgruppe 48-fach erhöht ist und im Vergleich zu ALD-Erkrankten um das Vierfache erhöht ist. Vergleicht man die Peakintensitäten von ALD-Patienten mit der Kontrollgruppe, so stellt sich ein 13-fach erhöhtes C26:0/C22:0 Verhältnis der Peakintensität dar. Betrachtet man das Verhältnis der Fettsäure C24:0 zu C22:0, so sind die Verhältnisse der Peakintensitäten bei Patienten mit Zellwegersyndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe sechsfach erhöht. Patienten, welche an Adrenoleukodystrophie leiden, weisen ein siebenfach erhöhtes Verhältnis der Fettsäuren C24:0 zu C22:0 auf.

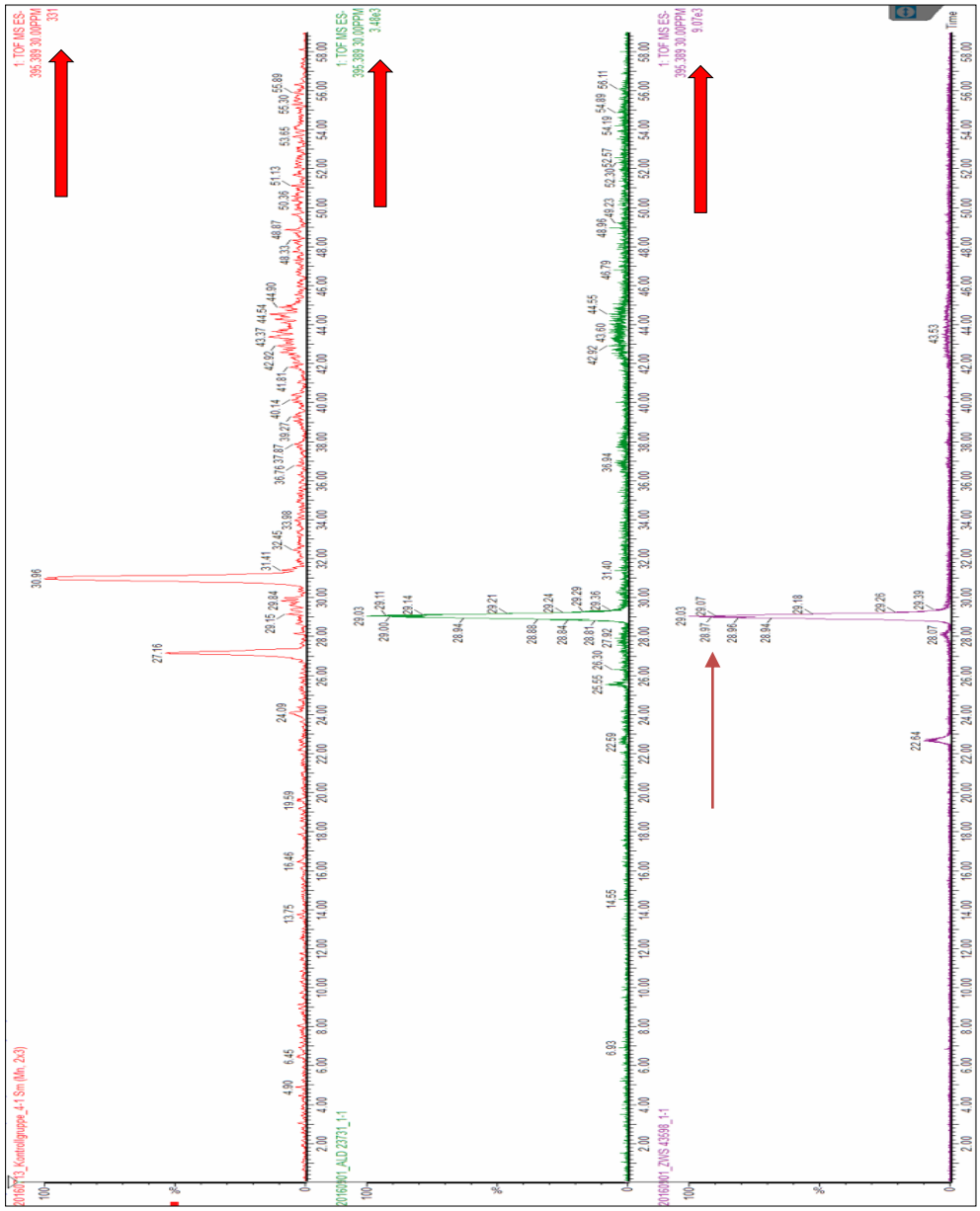


Abbildung 22: Chromatogramm der überlangkettigen Fettsäure C26:0:
C26:0 bei repräsentativem Zellweger-Patient (unten), ALD-Patient (mittig) und Kontroll-Patient (oben). Der mit Pfeil markierte Peak von C26:0 hat eine Retentionszeit von 29,03 Minuten. Die Kontrollgruppe weist eine relative Peakintensität von 331, die ALD-Gruppe von 3480 und die Zellweger-Gruppe von 9070 auf → Die Werte sind auf dem Chromatogramm mit einem roten dicken Pfeil markiert. Eine Retentionszeitverschiebung um fast zwei Sekunden zwischen der Kontrollgruppe und den beiden anderen Gruppen ist sichtbar. Mögliche Ursache könnte eine Verunreinigung der Kontrollprobe oder andere chemische Beschaffenheit der Fettsäure sein. Eventuell hängt noch eine weitere chemische Gruppe an der Fettsäure der Kontrollgruppe, wodurch sich die Retentionszeit verschiebt. Wahrscheinlicher ist aber eine Ungenauigkeit während der Präanalytik oder des analytischen Vorgangs.

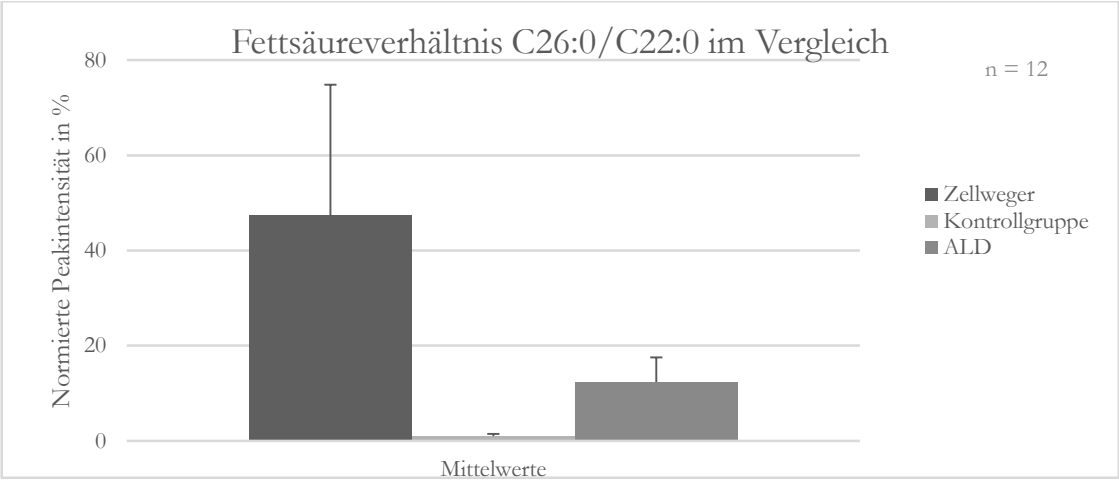


Abbildung 23: Erhöhte Mittelwerte von C26:0/C22:0 bei Zellweger- und ALD-Patienten: Das Diagramm zeigt die mittleren Peakintensitäten des Verhältnisses C26/C22. Die Peakintensitäten wurde auf die maximale Peakintensität normiert und in % angegeben. Das Verhältnis ist bei Zellwegerpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe 48-fach erhöht. Auch die ALD-Gruppe zeigt eine 13-fache Erhöhung des Verhältnisses gegenüber der Kontrollgruppe. Die Standardabweichung der Zellwegergruppe ist mit fast 30 relativ hoch, was bedeutet, dass das Verhältnis zwischen den einzelnen Patienten, also innerhalb der Zellwegergruppe variiert. Dennoch hebt sich die Zellwegergruppe deutlich von der der Kontrollpatienten ab.

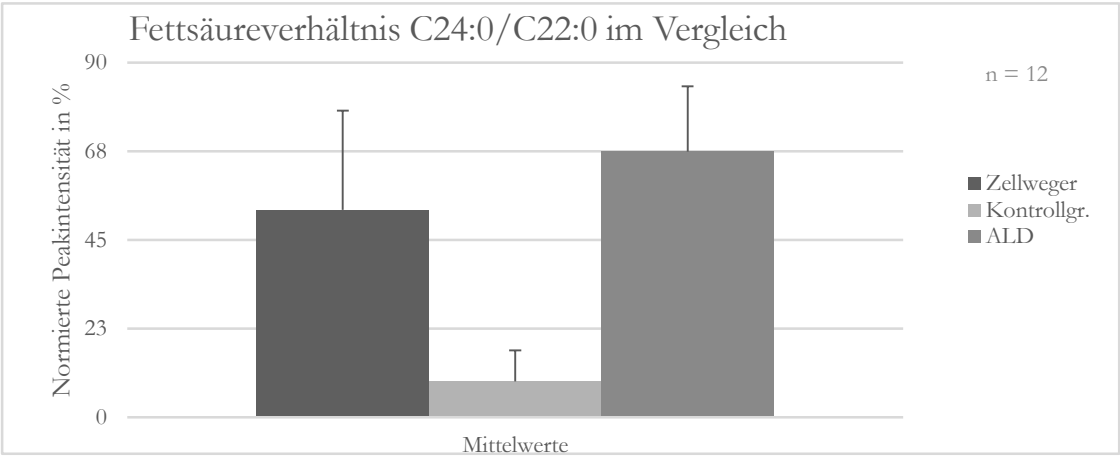


Abbildung 24: Erhöhte Mittelwerte von C24:0/C22:0 bei Zellweger- und ALD-Patienten: Anknüpfend an Abbildung 24 zeigen ALD-Patienten im Mittel das höchste Verhältnis des Fettsäureverhältnisses. Es ist im Vergleich zur Kontrollgruppe siebenfach erhöht. Das der Zellwegergruppe sechsfach. Die Streuung der Werte in der Zellwegergruppe ist relativ hoch, ändert aber nichts an der Deutlichkeit des Verhältnisses C24/C22 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Noch deutlicher ist es bei der ALD-Gruppe, da die Streuung der Werte geringer ist.

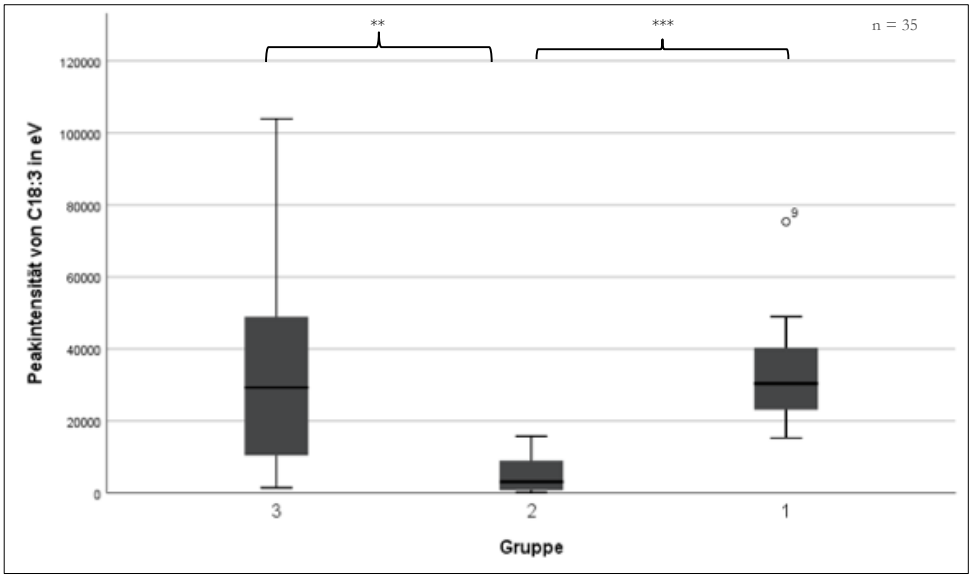
3.5. Identifizierung von Biomarkern des Docosahexaensäure Stoffwechselwegs

Die bekannten überlangkettigen Fettsäuren, die in Kapitel 3.4 behandelt wurden, konnten in den Proben durch Vergleich mit Standards identifiziert werden. Die folgenden Fettsäuren wurden über die in Kapitel 3.1 beschriebene Methode (OPLS-DA und S-Plot) gefunden und mithilfe von Progenesis identifiziert.

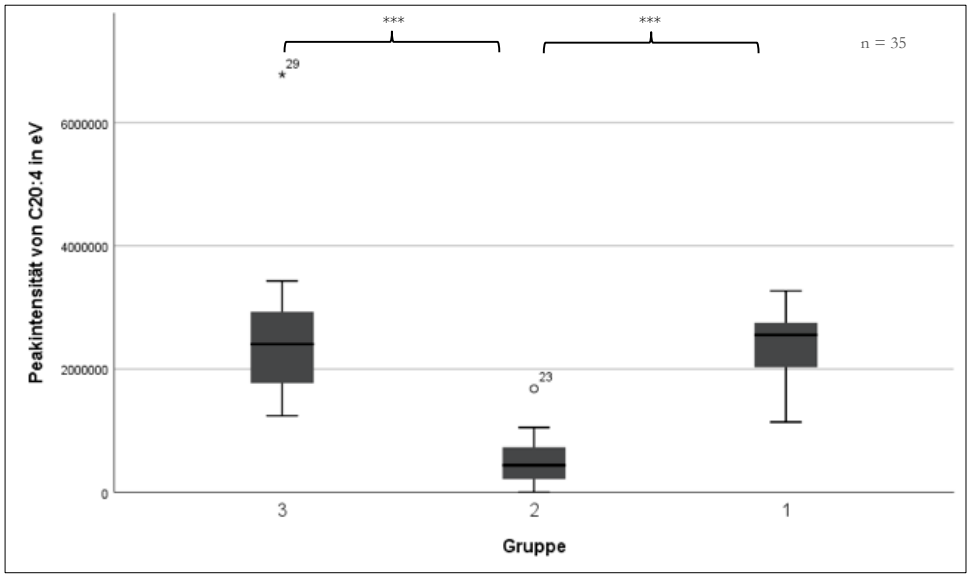
Abbildung 25 zeigt Peakintensitäten des Ausgangproduktes Alpha-Linolensäure (C18:3) (Grafik a) und den beiden Verbindungen Tetracosapentaen- (C24:5) und Tetracosahexaensäure (C24:6) (Grafik c und d), die beide die Vorläuferverbindung der Endprodukte des n-3 und n-6 Stoffwechselweges darstellen. Des weiteren sind Arachidonsäure (C20:4) (Grafik b) und beide Endprodukte Docosahexaensäure (C22:6) und Docosapentaensäure (C22:5) (Grafik e und f) dargestellt. Sie wurden über den in Abbildung 7 beschriebenen Prozess identifiziert. Besonders im OPLS-DA Plot fielen die Proben auf und konnten anschließend über den Reimport zu Progenesis mit Datenbanken identifiziert werden. Markant ist, dass die Fettsäuren Alpha-Linolensäure C18:3 und Arachidonsäure C20:4 bei Patienten mit Zellwegersyndrom signifikant erniedrigt sind. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Martinez (1995), in dessen Arbeit erniedrigte Konzentrationen der Docosahexaensäure bei Patienten mit Zellwegersyndrom in verschiedenen Geweben beschrieben wurde. Zusätzlich wurden in der Arbeit von Martinez normale Konzentrationen der Arachidonsäure und Docosahexaensäure im Blutplasma und Erythrozyten bei Patienten mit ALD festgestellt, was ebenfalls in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Die direkten Vorgängermoleküle C24:5 und C24:6 zeigen bei Zellwegerpatienten keine signifikanten Erniedrigungen, obwohl der Median der Werte deutlich niedriger ist als in der Kontrollgruppe. Allerdings streuen die Werte bei diesen beiden Biomarkern stark, weshalb sich keine Signifikanz ableiten lässt. Anschließend wurden die Peakintensitäten von elf an Zellwegersyndrom erkrankten Patienten mit zwölf gesunden Patienten und zwölf Patienten, die an Adrenoleukodystrophie leiden, im Chromatogramm verglichen. Abbildung 25 zeigt unter anderem signifikant erniedrigte Peakintensitäten des im Peroxisom entstehenden Endprodukts der mehrfach ungesättigten Docosahexaensäure (C22:6), die bei Zellwegerpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe achtfach und im Vergleich zu ALD-Patienten sechsfach erniedrigt ist. Dieser Biomarker ist somit in der Lage zwischen Zellweger- und ALD-Erkrankung zu differenzieren. Des Weiteren ist das Stoffwechselintermediat Arachidonsäure C20:4 in Anlehnung an Abschnitt 1.3, Abbildung 4 der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Abbildung 25 aufgeführt. Arachidonsäure zeigt signifikant erniedrigte Werte bei Zellwegerpatienten.

Abbildungen 26–30 zeigen die Spektren der in Abbildung 25 dargestellten Moleküle. Sie wurden anhand der detektierten Summenformel mit einem Isotopenmodell aus MassLynx (Waters) verglichen und dadurch zusätzlich zur Identifizierung mit der Datenbank in ProGenesis mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Docosahexaensäure-Pathway zugeordnet.

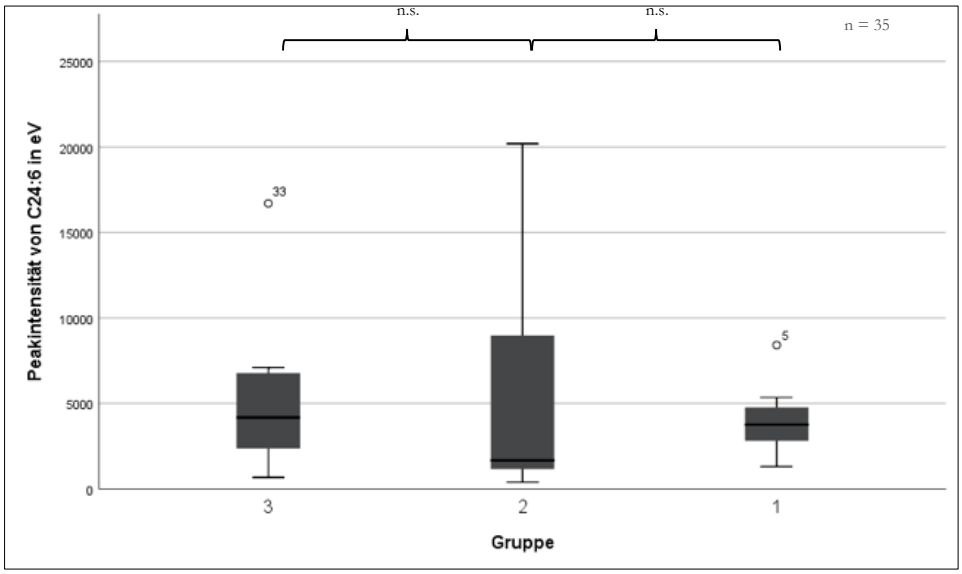
a)


**
***
n = 35
Peakintensität von C18:3 in eV
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
9
3
2
1
Gruppe

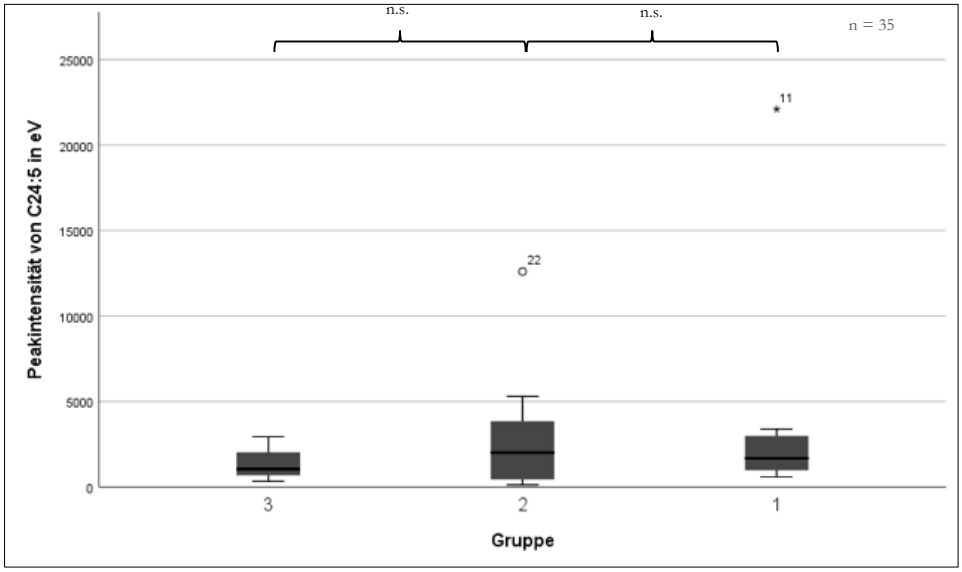
b)


***
***
n = 35
Peakintensität von C20:4 in eV
6000000
4000000
2000000
0
29
23
3
2
1
Gruppe

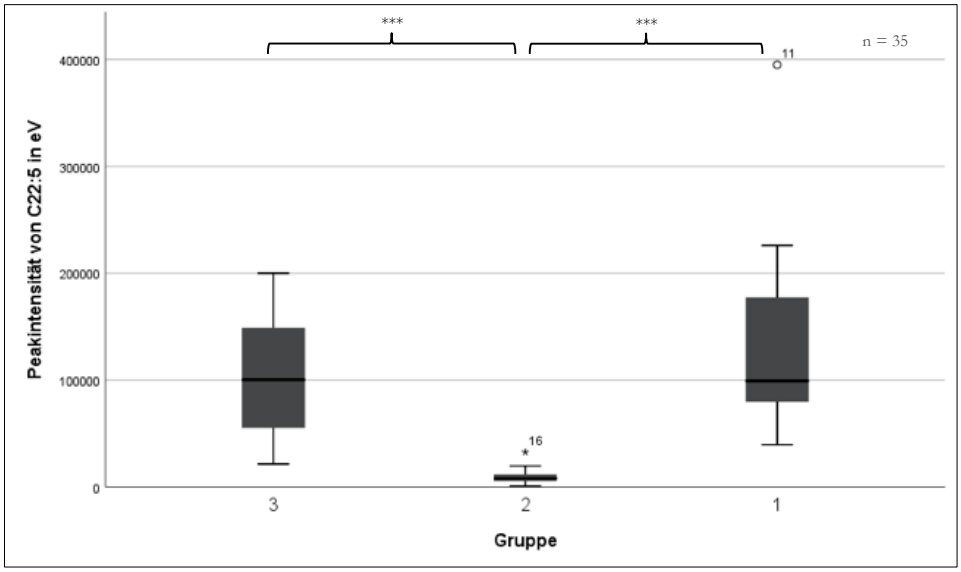
c)


n.s.
n.s.
n = 35
Peakintensität von C24:6 in eV
25000
20000
15000
10000
5000
0
33
5
3
2
1
Gruppe

d)


n.s.
n.s.
n = 35
Peakintensität von C24:5 in eV
25000
20000
15000
10000
5000
0
11
22
3
2
1
Gruppe

e)


***
***
n = 35
Peakintensität von C22:5 in eV
400000
300000
200000
100000
0
11
16
3
2
1
Gruppe

f)

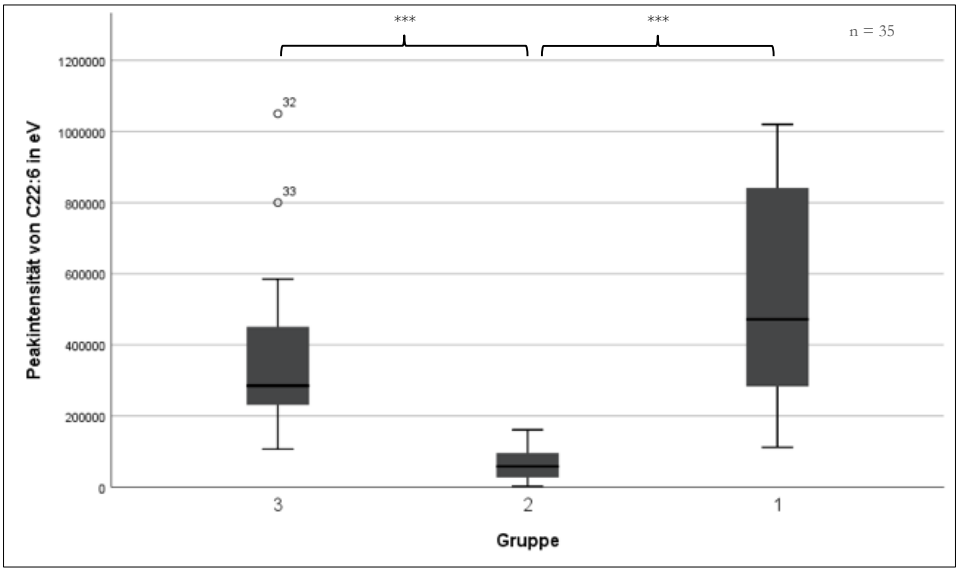

***
***
n = 35
Peakintensität von C22:6 in eV
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
32
33
3
2
1
Gruppe

Abbildung 25 a-f: Biomarker aus dem Docosahexaensäure-Pathway:
In Anlehnung an den Stoffwechselweg aus Abbildung 4 sind hier die mittleren Peakintensitäten von **a)** Alpha-Linolensäure (C18:3), **b)** Arachidonsäure (C20:4), **c)** Tetracosahexaensäure (C24:6), **d)** Tetracosapentaensäure (C24:5) und die im Peroxisom entstehenden Endprodukte **e)** Docosapentaensäure (C22:5) und **f)** Docosahexaensäure (C22:6) im Vergleich der drei Gruppen bei n = 35 Proben dargestellt.

Gruppe 1 = Kontrollgruppe, Gruppe 2 = Zellweger, Gruppe 3 = ALD. Die Vorläuferverbindungen C18:3 und C20:4 (Grafik a und b) liegen bei Zellwegerpatienten signifikant niedriger vor als bei der Kontrollgruppe. Der Biomarker kann auch zwischen ALD- und Zellwegerpatienten differenzieren, da Zellwegerpatienten signifikant niedrigere Peakintensitäten als ALD-Patienten haben. Die Moleküle C24:6 und C24:5 (Grafik c und d) werden in Peroxisome transportiert und dort durch Beta-Oxidation verkürzt. Der Median von C24:6 liegt bei Zellwegerpatienten niedriger vor als bei beiden anderen Gruppen. Der Unterschied ist allerdings aufgrund der Streuung der Werte nicht signifikant. Auf der Seite des n-6 Stoffwechselweges ist bei Zellwegerpatienten die Peakintensität von C24:5 ähnlich wie die der Kontrollgruppe. Die beiden Endprodukte, die im Peroxisom entstehen, sind bei Zellwegerpatienten signifikant erniedrigt. Auch diese beiden Biomarker können zwischen ALD- und Zellweger-Erkrankung differenzieren, da die Peakintensitäten der Zellwegergruppe niedriger als die der ALD-Gruppe sind. Die Siginifikanz wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test (H-Test) für unabhängige Stichproben mit einem anschließenden paarweisen Vergleich geprüft.

Siginifikanzwerte sind für das Signifikanzniveau p = 0,05 in den Diagrammen wie folgt gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant, *: p-Wert ≤ 0,05, **: p-Wert ≤ 0,01, ***: p-Wert ≤ 0,001.

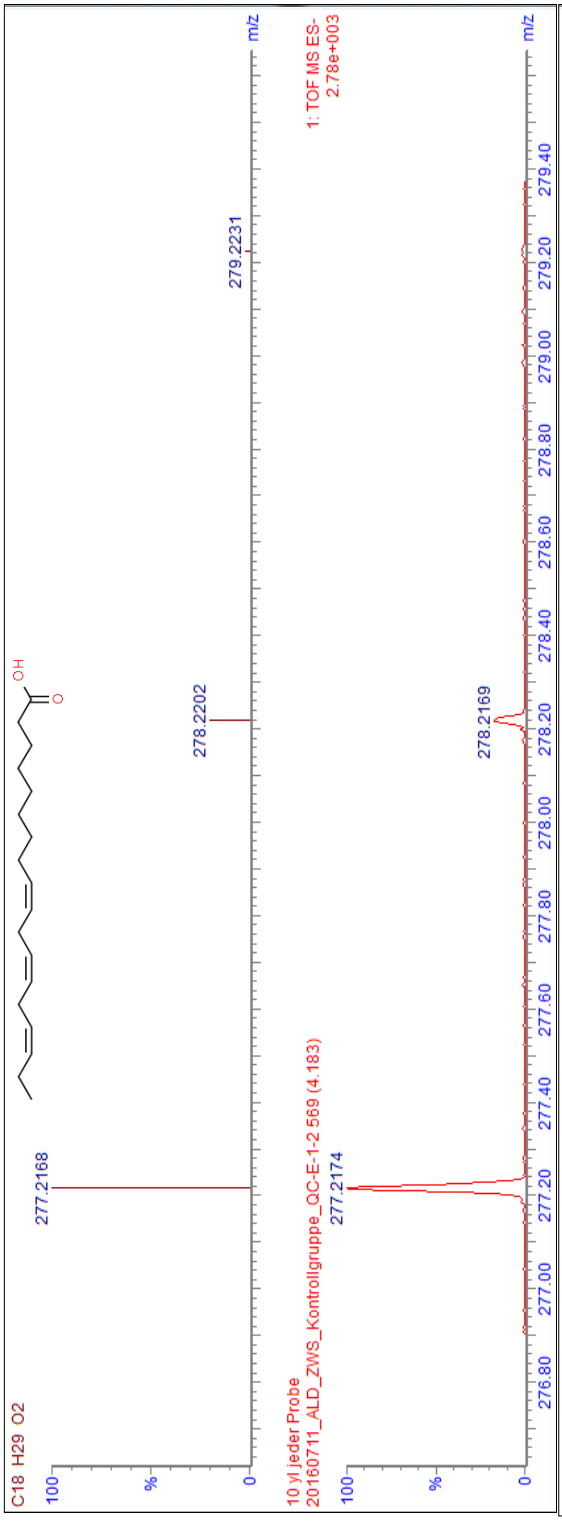


Abbildung 26: Isotopenmodell für die Summenformel Alpha-Linolensäure aus Waters MassLynx – Elemental Composition (oben) und m/z-Spektrum von Alpha-Linolensäure aus einer Zellwegerprobe (unten).

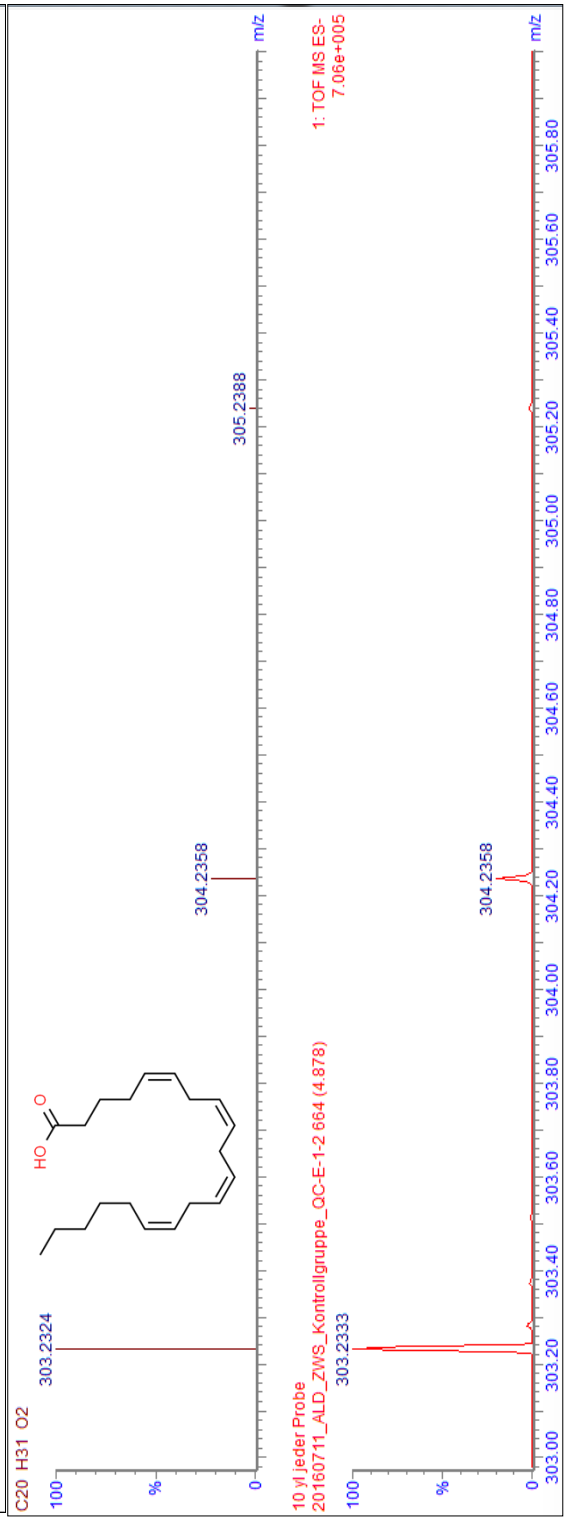


Abbildung 27: Isotopenmodell für die Summenformel Arachidonsäure aus Waters MassLynx – Elemental Composition (oben) und m/z-Spektrum von Arachidonsäure aus einer Zellwegerprobe (unten).

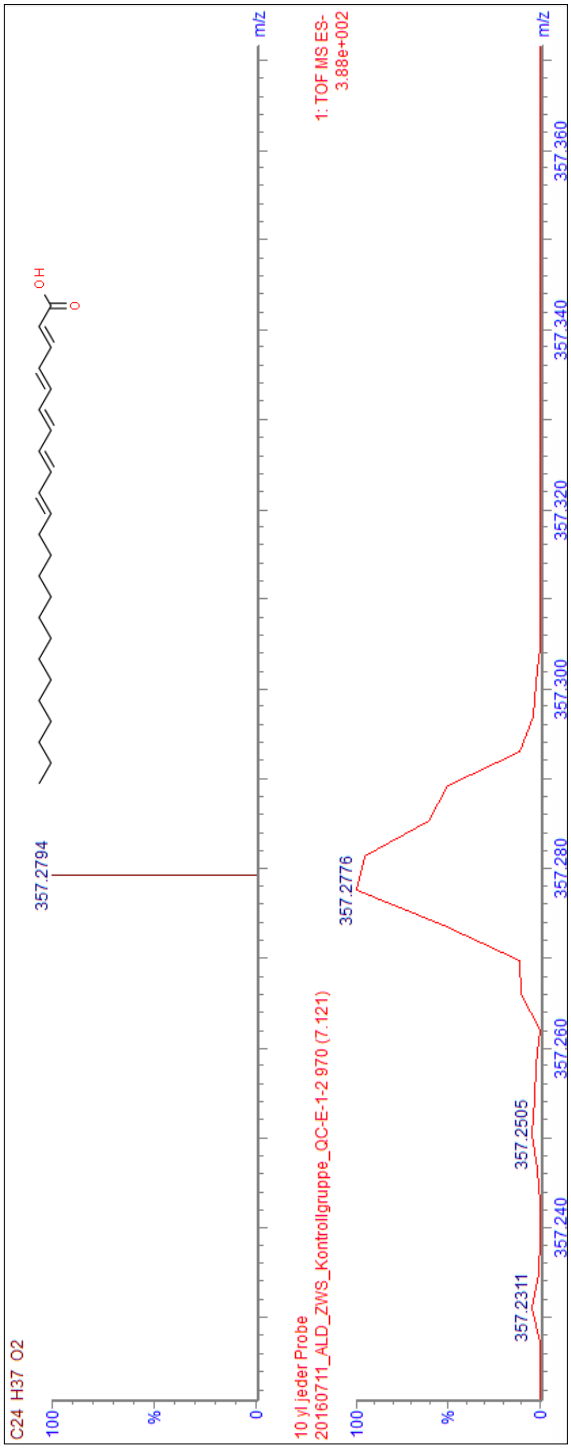


Abbildung 28: Isotopenmodell für die Summenformel Tetracosapentaensäure aus Waters MassLynx – Elemental Composition (oben) und m/z-Spektrum von Tetracosapentaensäure aus einer Zellwegerprobe (unten).

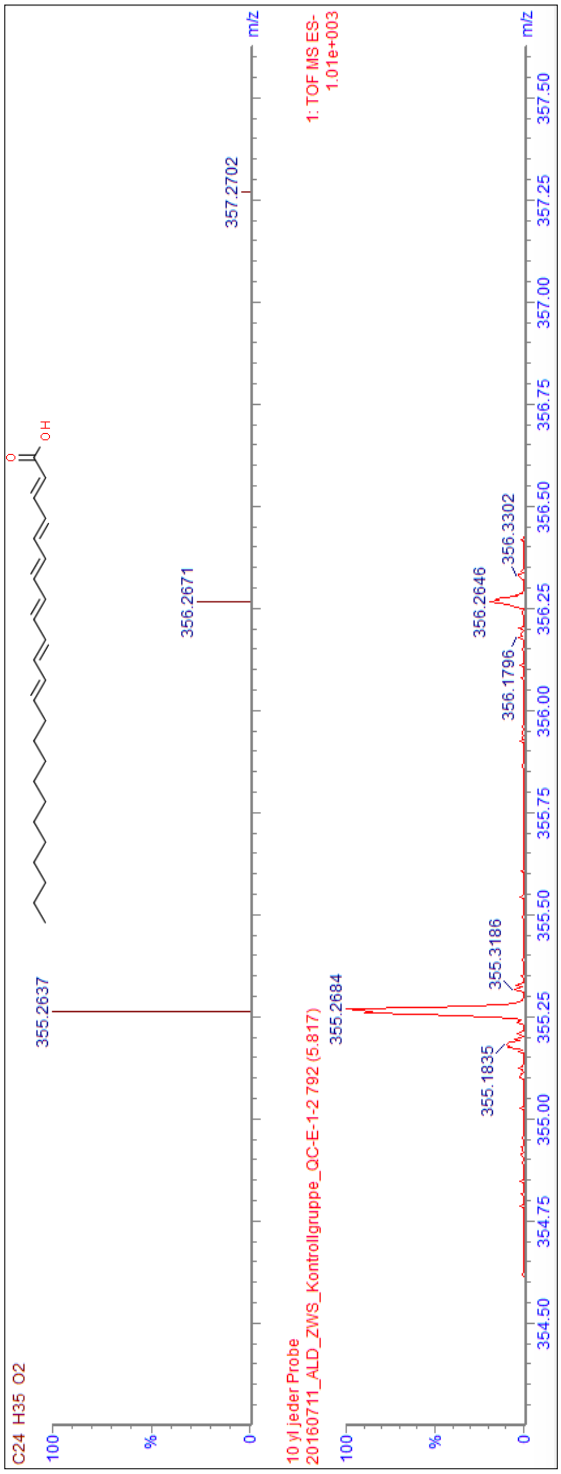


Abbildung 29: Isotopenmodell für die Summenformel Tetracosahexaensäure aus Waters MassLynx – Elemental Composition (oben) und m/z-Spektrum von Tetracosahexaensäure aus einer Zellwegerprobe (unten).

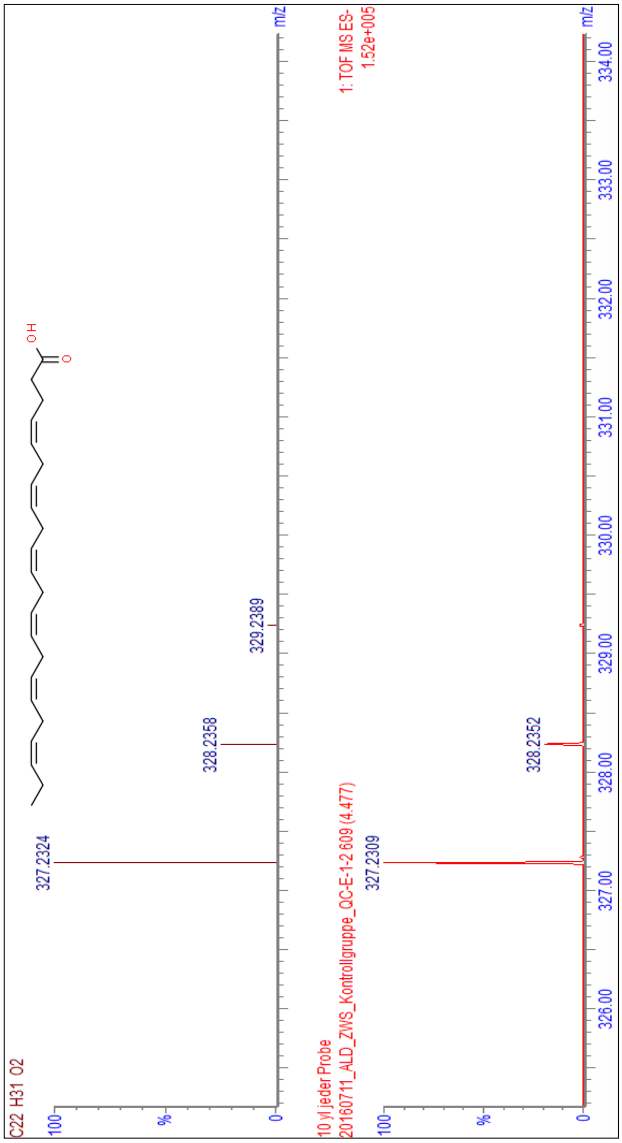


Abbildung 30: Isotopenmodell für die Summenformel Docosahexaensäure aus Waters MassLynx – Elemental Composition (oben) und m/z-Spektrum von Docosahexaensäure aus einer Zellwegerprobe (unten).

Martinez et al. beschrieben 2000 die Therapie mit Docosahexaensäure-Ethylestern von Patienten, welche an peroxisomalen Erkrankungen leiden. Dadurch normalisierte sich die Konzentration der Docosahexaensäure im Blut der Patienten. Außerdem konnten überlangkettige Fettsäuren im Blut reduziert werden. Allerdings konnte in einer randomisierten doppel-blind, plazebo-kontrollierten Studie kein vorteilhafter Effekt durch oral zugeführte Docosahexaensäure-Therapie festgestellt werden, was allerdings je nach PEX-Mutation und Krankheitsausprägung unterschiedlich sein kann (Paker et al. 2010). Ob bei Patienten mit Zellwegersyndrom ein Zusammenhang zwischen den erhöhten Peakintensitäten der Hexacosansäure (C26:0) und den erniedrigten der Docosahexaensäure (C22:6) besteht, zeigt die Korrelation über den Korrelationskoeffizienten (r) und seiner linearen Funktion (Abbildung 31).

Dieser ist aber so gering, dass er vernachlässigbar ist (r = 0,09). Es besteht also keine signifikante Korrelation zwischen erhöhten Peakintensitäten der C26:0 und erniedrigter C22:6. Dennoch wurde 2000 ein senkender Effekt von Docsahexaensäure-Ethylestern auf überlangkettige Fettsäuren im Blut der Patienten von Martinez et al. beschrieben.

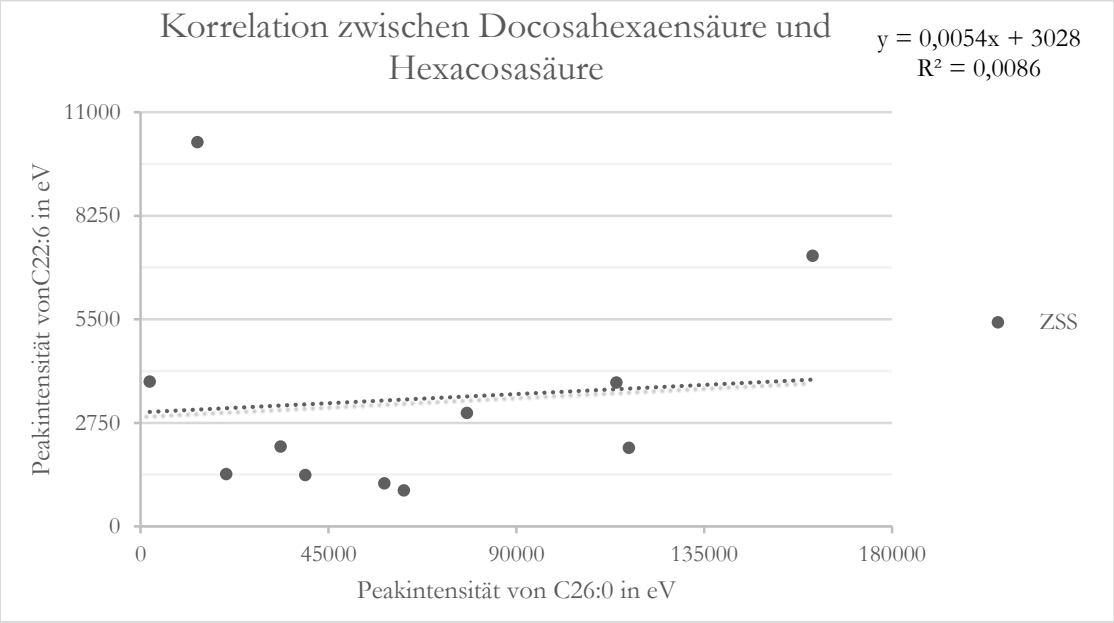
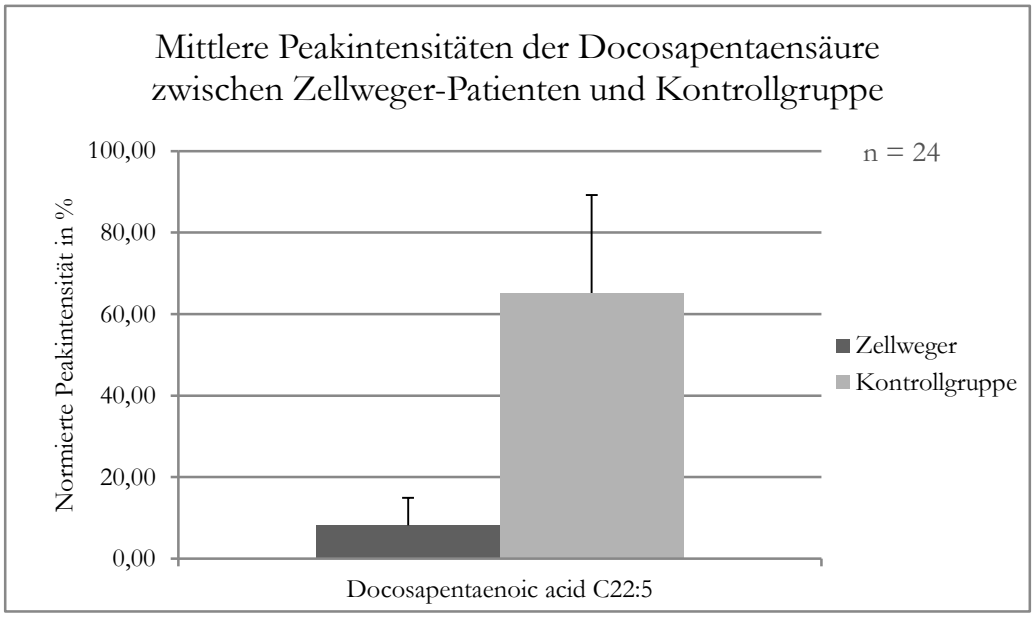


Abbildung 31: Keine Korrelation zwischen erhöhten C26:0-Werten und C22:6.
Die Punkte (•) im Diagramm stellen die einzelnen Werte der gemessenen Peakintensitäten von C22:6 und C26:0 in Elektronenvolt bei Zellwegerpatienten dar. X-Achse: Peakintensität von Hexacosansäure (C26:0) in eV; Y-Achse: Peakintensität von Docosahexaensäure (C22:6) in eV. Es wird eine lineare Funktion für diese Werte erstellt, die den Korrelationskoeffizienten „r“ mit Werten zwischen -1 und 1 berechnet. Dieser gibt die Steigung der Geraden wieder und ist ein Maß für den Zusammenhang der beiden Variablen. Hier beträgt der Korrelationskoeffizient r = 0,09, was bedeutet, dass es keinen Zusammenhang zwischen erhöhter Peakintensität von C26:0 und C22:6 gibt.

3.6. Eicosapentaensäure C20:5 & Docosapentaensäure C22:5

Eicosapentaensäure aus dem n-6-Pathway wird in ähnlicher Rate wie Docosahexaensäure ins Gehirn aufgenommen, allerdings ist die Gesamtkonzentration der C20:5 200-500fach geringer als die der C22:6. C20:5 wird durch Beta-Oxidation, Elongation und Desaturierung in Docosapentaensäure C22:5 und C22:6 umgewandelt (Chen und Bazinet 2015). Die beiden mehrfach ungesättigten Fettsäuren C20:5 und C22:5 sind jeweils bei Patienten mit Zellwegersyndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt, was Abbildung 32 verdeutlicht. Die Isotopenmodelle und die detektierten Spektren sind in Abbildung 33 und 34 abgebildet. Grønn et al. fanden 1990 heraus, dass die Fettsäure C22:6 auch in C20:5 rekonvertiert wird und in Fibroblasten bei Patienten mit Zellwegersyndrom nicht in C20:5 umgewandelt wird.



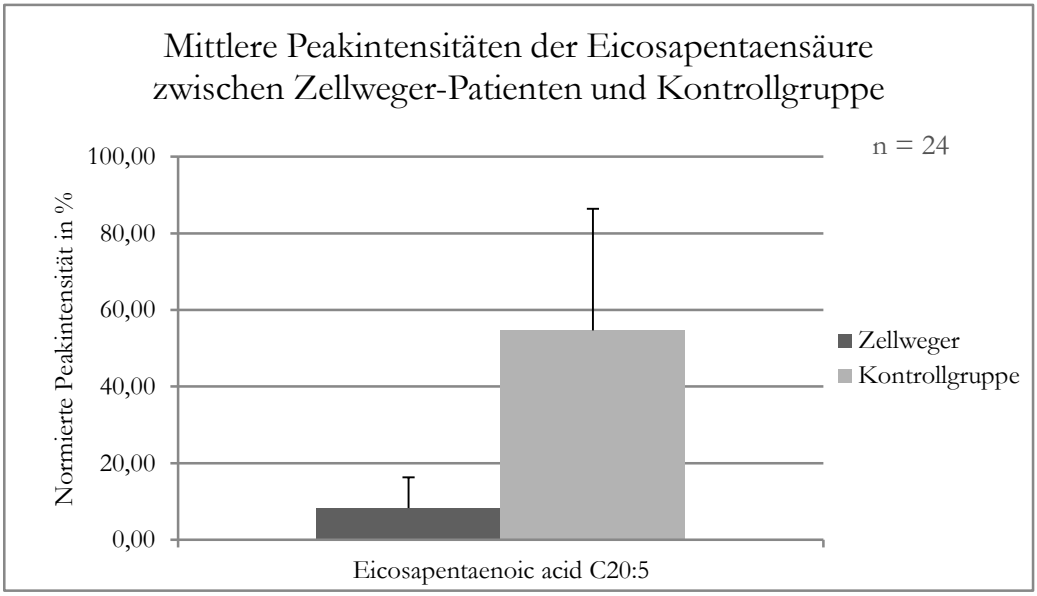


Abbildung 32: Im Mittel erniedrigte Peakintensität von C20:5 und C22:5 bei Zellwegerpatienten. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte der Peakintensitäten von C22:5 (oberes Diagramm) und C20:5 (unteres Diagramm) von 12 Zellweger- und 12 Kontrollpatienten, welche auf die maximale Peakintensität normiert wurden und in Prozent angegeben wurden. Deutlich wird, dass Patienten, die an Zellwegersyndrom leiden erniedrigte Werte der mehrfach ungesättigten Fettsäuren haben.

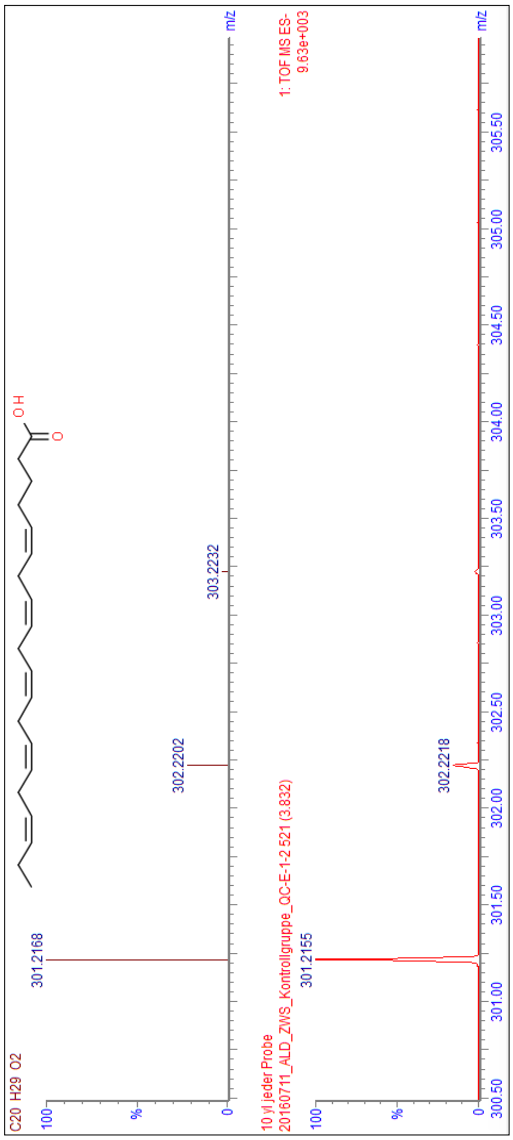


Abbildung 33: Isotopenmodell (oben) und m/z-Spektrum (Masse-/Ladungsverhältnis) von Eicosapentaensäure (C20H30O2)(unten).

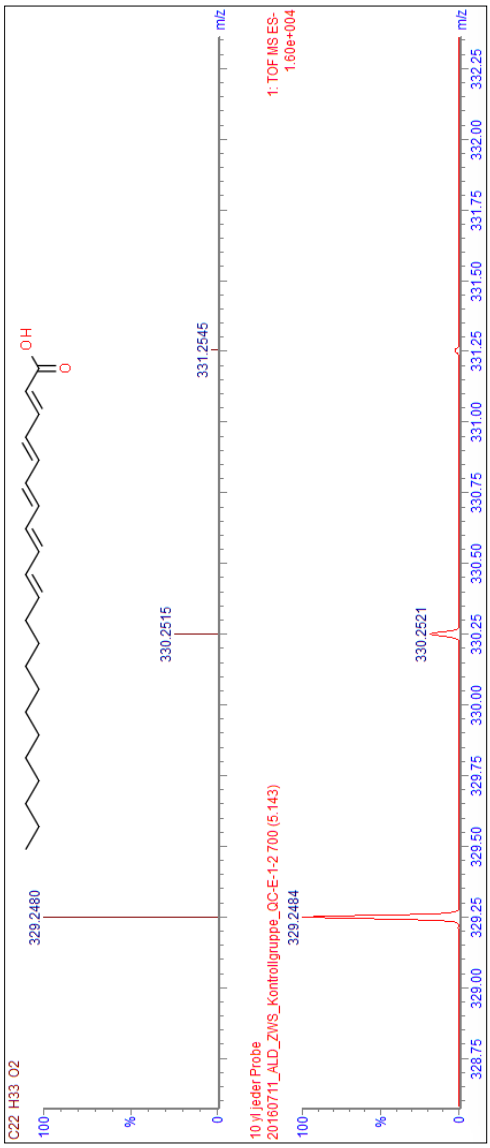


Abbildung 34: Isotopenmodell (oben) und m/z-Spektrum (Masse-/Ladungsverhältnis) von Docosapentaensäure (C22H34O2)(unten).

3.7. Neue Metabolite/Biomarker zur Charakterisierung und Differenzierung von ZWS und ALD

Wie Abbildung 7 zeigt, wurden die Proben zunächst präanalytisch aufbereitet. Anschließend werden sie mit der beschriebenen UPLC-MS/MS-Methode gemessen. In der Datenprozessierung durch ProGenesis wurden zunächst alle Analyte mit Datenbanken verglichen und möglichen Molekülen namentlich zugeordnet. Durch den Export der Daten in EZInfo und die Darstellung in einem OPLS-DA-Diagramm und dem darauffolgenden S-Plot konnten vielversprechende Biomarker markiert und anschließend zurück in ProGenesis importiert werden. Hier erfolgte die detaillierte Betrachtung der Biomarker. Diese wurden zusätzlich im Chromatogramm bzgl. des Isotopenmusters, der Retentionszeit, des MS-Spektrums und der Masse genauer betrachtet (siehe Chromatogramm der Abbildung 35). Dadurch konnten neue, bisher nicht mit peroxisomalen Störungen in Verbindung gebrachte Metabolite gefunden werden. Tabelle 7 zeigt die dazugehörigen Eigenschaften bzgl. Retentionszeit und Masse. Werden die Biomarker einzeln betrachtet kann deutlich zwischen Zellwegerpatienten und Kontrollgruppe unterschieden werden. Dies gilt allerdings nicht für ALD-Patienten. Setzt man den Biomarker ins Verhältnis zu C22:0, so gibt es zusätzlich einen signifikanten Unterschied zwischen ALD- und Zellwegerpatienten. Damit können die gefundenen Biomarker auch zwischen den Erkrankungen Zellwegersyndrom und Adrenoleukodystrophie differenzieren. Nachfolgend werden die Biomarker mit Namen bezeichnet. Allerdings ist zu beachten, dass die Verbindungen nur mit gewisser Wahrscheinlichkeit den aufgeführten Namen tragen. Die Software Progenesis vergleicht das Fragmentierungsmuster, Retentionszeit und die Masse der gemessenen Moleküle mit verschiedenen Datenbanken wie der *„human metabolome database“* (www.hmdb.ca) oder *„Chemspider“* (www.chemspider.com). Dort sind verschiedenste Verbindungen mit deren chemischen Eigenschaften und massenspektrometrischen Chromatogrammen hinterlegt. Beweisend für die richtige Identifizierung ist der Vergleich mit deuterierten Standards. So können die Messparameter der Reinsubstanz mit denen der neu identifizierten Biomarker verglichen und diese dann verifiziert werden.

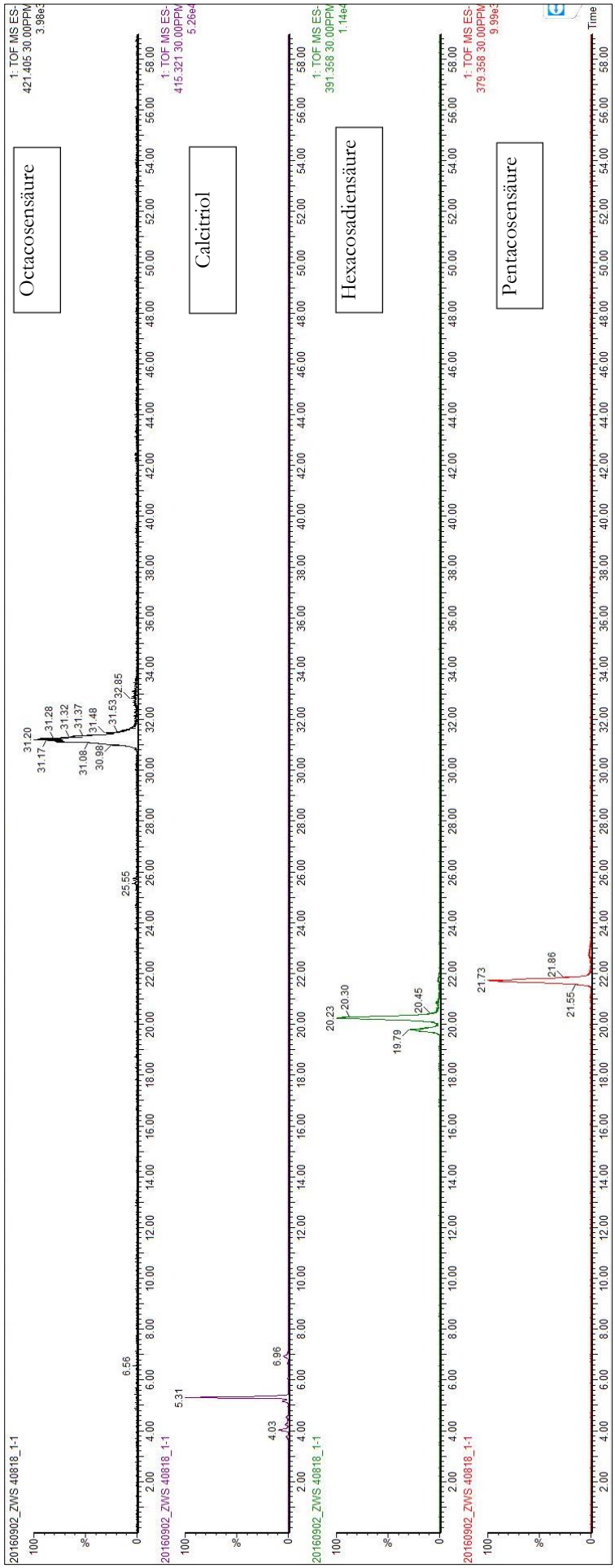

Octacosensäure
Calcitriol
Hexacosadiensäure
Pentacosensäure
20160902_ZWS 40818_1-1
1: TOF MS ES-
421.405 30.00PPM
3.98e3
415.321 30.00PPM
5.26e4
391.358 30.00PPM
1.14e4
379.358 30.00PPM
9.99e3
Time

Abbildung 35: Chromatogramm der neuen Biomarker nach abgeschlossener Datenprozessierung. Dargestellt sind vier Chromatogramme der einzelnen identifizierten Biomarker aus Tabelle 7. Die Chromatogramme sind zur Veranschaulichung alle aus einer Zellwegerprobe. Die Peaks treten bei einer spezifischen Retentionszeit (X-Achse) mit unterschiedlicher Intensität (Y-Achse) auf. Die Peakintensitäten betragen für Pentacosensäure 9999, Hexacosadiensäure 11400, Calcitriol 52600 und Octacosensäure 3980. Diese Informationen werden unter anderem zur Identifizierung mit einer Datenbank verwendet. Die Peaks aller neuen Biomarker zeigen deutliche Peaks die sich von der Basislinie bzw. dem „Grundrauschen" abheben.

Tabelle 7: Chromatographische Eigenschaften neuer Biomarker

Biomarker	Retentionszeit (min +/- 0,4)	Monoisotopische Masse (Da)	Durchschnittliche Masse (Da)	$[M-H]^-$ (Da)
Pentacosensäure C25:1 (C25H48O2)	21,7	380,365417	380,647	379,34576
Hexacosadiensäure C26:2 (C26H48O2)	20,2	392,365417	392,658	391,3576
Calcitriol (C27H44O3)	5,3	416,329041	416,637	415,3212
Octacosensäure C28:1 (C28H54O2)	31,2	422,412384	422,727	421,4046

Zunächst konnte ein Molekül detektiert werden, welches eine maximale Peakintensität bei 20 min zeigte. Die exakte Masse $[M-H]^-$ beträgt 391,3576 Da. Die Summenformel für genau diese Molekülmasse lautet C26H48O2 nur dann, wenn Stickstoff, Phosphat u. a. Elemente ausgeschlossen werden. Dann kann das Molekül als zweifach ungesättigte überlangkettige Fettsäure Hexosadiensäure interpretiert werden, was auch im Vergleich mit mehreren Datenbanken durch die Software Progenesis als wahrscheinlichstes Molekül in Frage kommt. Nachfolgend zeigt das Boxplot-Diagramm von Abbildung 36 signifikante Unterschiede zwischen der Zellwegergruppe und Kontrollgruppe. Nicht signifikant ist jedoch der Unterschied

zwischen Zellweger- und ALD-Patienten. Vergleicht man jedoch das Verhältnis des Biomarkers zur Behensäure C22:0, liegen auch zwischen Zellweger- und ALD-Patienten signifikante Unterschiede der Peakintensität vor. Deutlich wird hierbei, dass Zellwegerpatienten bis zu 1095-fach erhöhte Peakintensitäten des Verhältnisses C26:2 zu C22:0 im Vergleich zur Kontrollgruppe haben. Die Gruppe der ALD-Patienten weisen hingegen nur 3,6-fach erhöhte Peakintensitäten auf.

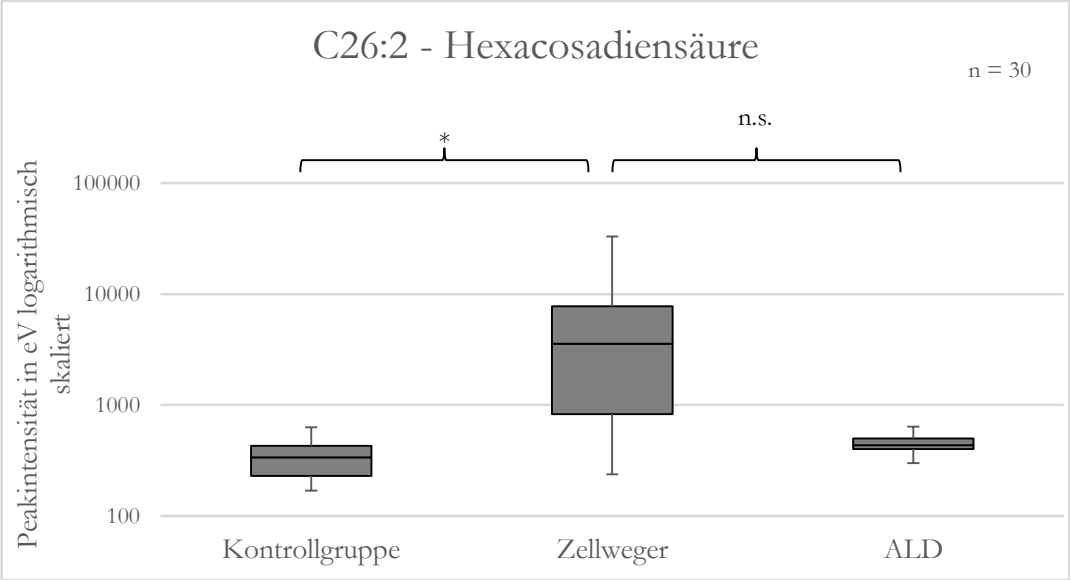


Abbildung 36: Signifikant erhöhte Peakintensitäten des neuen Biomarkers C26:2 bei Zellwegerpatienten. Verglichen wurde die Peakintensität von n = 30 Patientenproben und in einem Boxplot dargestellt. Die Y-Achse wurde zur anschaulicheren Skalierung logarithmisch (log10) skaliert. Median: Kontrollgruppe = 337 eV, Zellweger = 3555 eV, ALD = 434 eV. Nach der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests werden die korrigierten Siginifikanzwerte für das Signifikanzniveau p = 0,05 wie folgt gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant, *: p-Wert ≤ 0,05, **: p-Wert ≤ 0,01, ***: p-Wert ≤ 0,001.

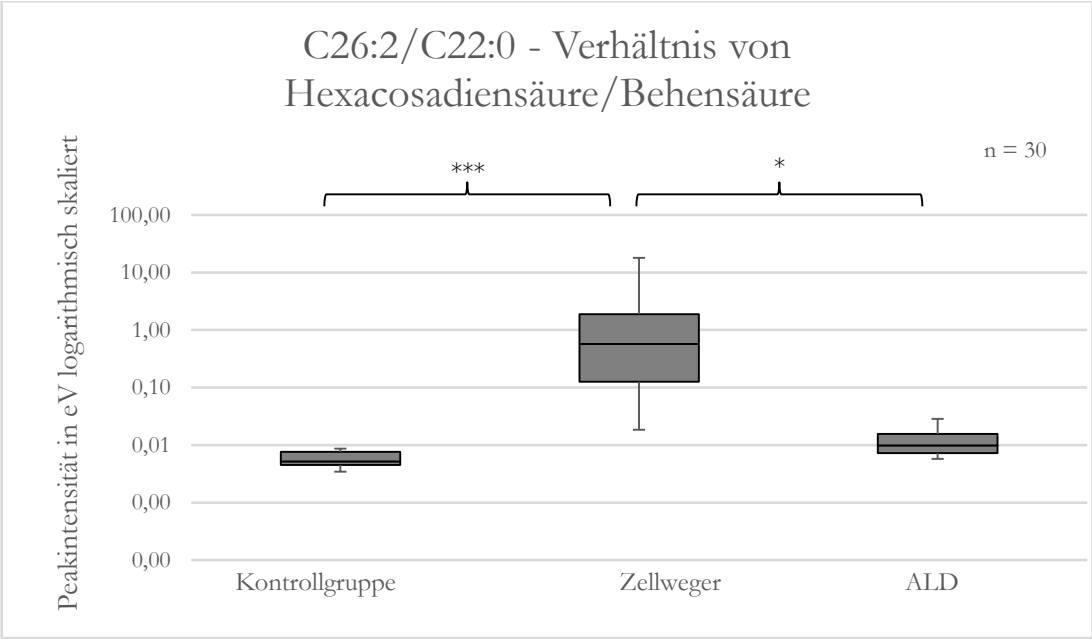


Abbildung 37: Signifikant erhöhtes Verhältnis C26:2/C22:0 bei Zellweger- und ALD-Patienten.

Verglichen wurde das Verhältnis der Peakintensität von C26:0 und C22:0 von n = 30 Patientenproben und in einem Boxplot dargestellt. Die Y-Achse wurde logarithmisch (log10) skaliert. Median: Kontrollgruppe = 5,18 x10^{-3} eV, Zellweger = 5,72 x 10^{-1} eV, ALD = 9,89 x 10^{-3} eV. Deutlich wird, dass der Biomarker im Verhältnis zu C22:0 auch zwischen Zellweger- und ALD-Patienten signifikant unterscheiden kann. Nach der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests werden die korrigierten Siginifikanzwerte für das Signifikanzniveau p = 0,05 wie folgt gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant, *: p-Wert ≤ 0,05, **: p-Wert ≤ 0,01, ***: p-Wert ≤ 0,001.

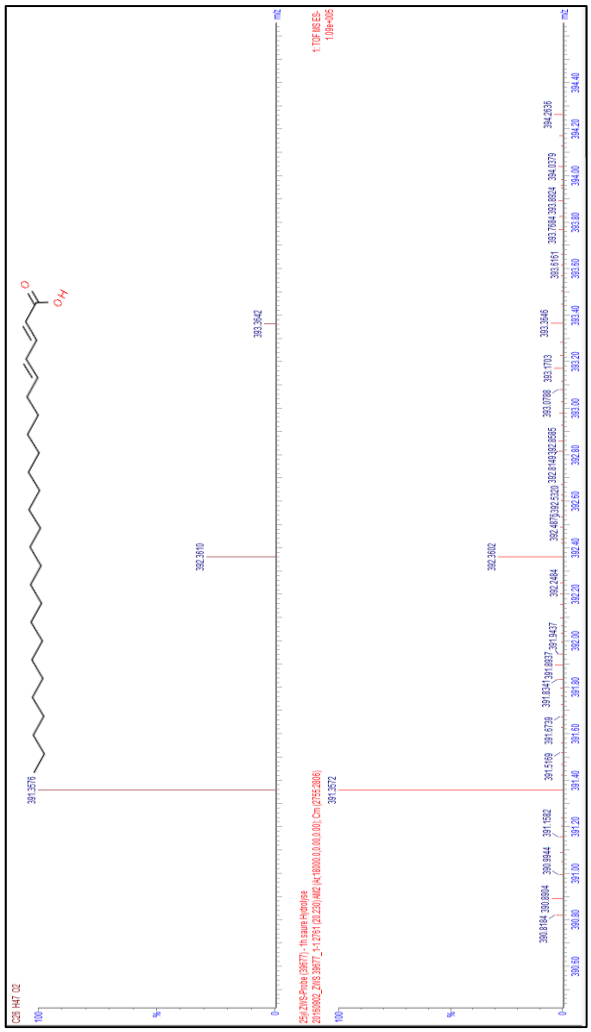


Abbildung 38: Massenspektrum bei dem Peak des Biomarkers C26:2. Repräsentative Probe eines Zellwegerpatienten (unten) im Vergleich mit dem Peak der monoisotopischen Masse der Summenformen C26H48O2 (oben). Aufgrund der geringen Massenabweichung von -0,4 mDa, -1 ppm zum Isotop, ist die Summenformel des Biomarkers mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit C26H48O2.

Die einfach ungesättigte überlangkettige Fettsäure Octacosensäure C28:1 konnte mit einer Retentionszeit von ca. 31 min und einer Masse $[M-H]^-$ von 421,4046 Da detektiert werden. Der Biomarker weist erhöhte Werte im Blut der an Zellweger erkrankten Personen auf. Auch ALD-Patienten haben erhöhte Werte der Fettsäure, wie die nachfolgenden Boxplot-Diagramme darstellen. Betrachtet man C28:1 im Verhältnis zu C22:0, so können ALD-Patienten von Zellwegerpatienten differenziert werden.

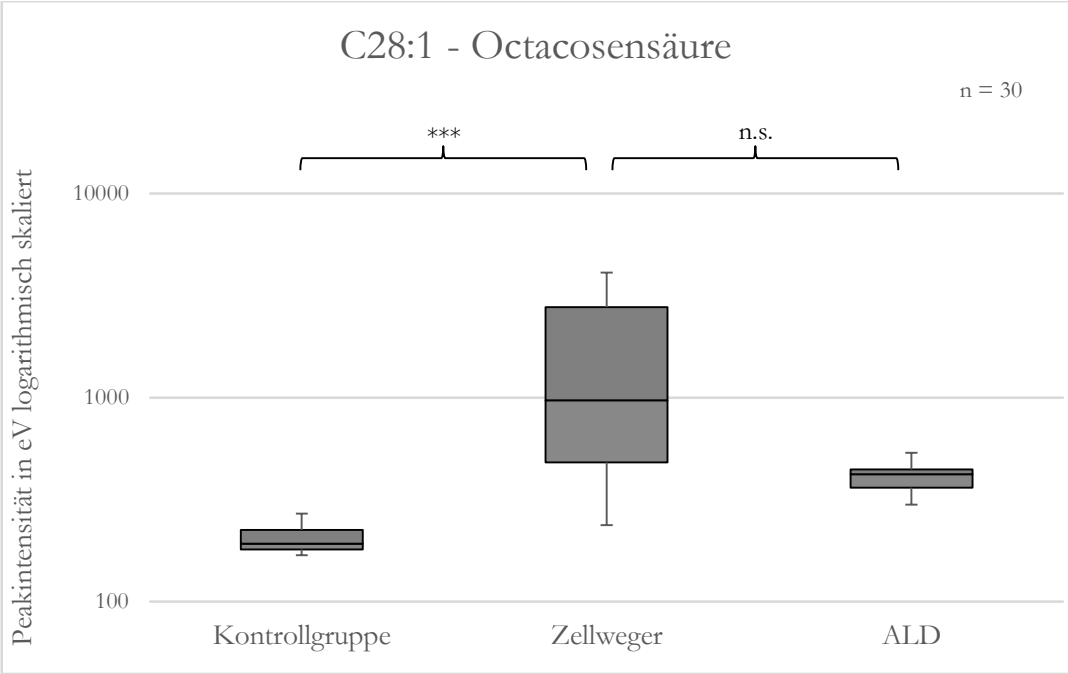


Abbildung 39: Erhöhte Peakintensitäten von C28:1 bei Zellwegerpatienten. Verglichen wurden 10 Patienten pro Gruppe (n = 30). Die Peakintensität von Zellwegerpatienten ist im Mittel um das zehnfache höher als bei der Kontrollgruppe. Der Biomarker alleine ist nicht in der Lage signifikant zwischen ALD-Erkrankung und Zellwegersyndrom zu unterscheiden. Median: Kontrollgruppe = 94 eV, Zellweger = 941 eV, ALD = 215 eV. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich ausgewertet. Nach der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests werden die korrigierten Siginifikanzwerte für das Signifikanzniveau p = 0,05 wie folgt gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant, *: p-Wert ≤ 0,05, **: p-Wert ≤ 0,01, ***: p-Wert ≤ 0,001.

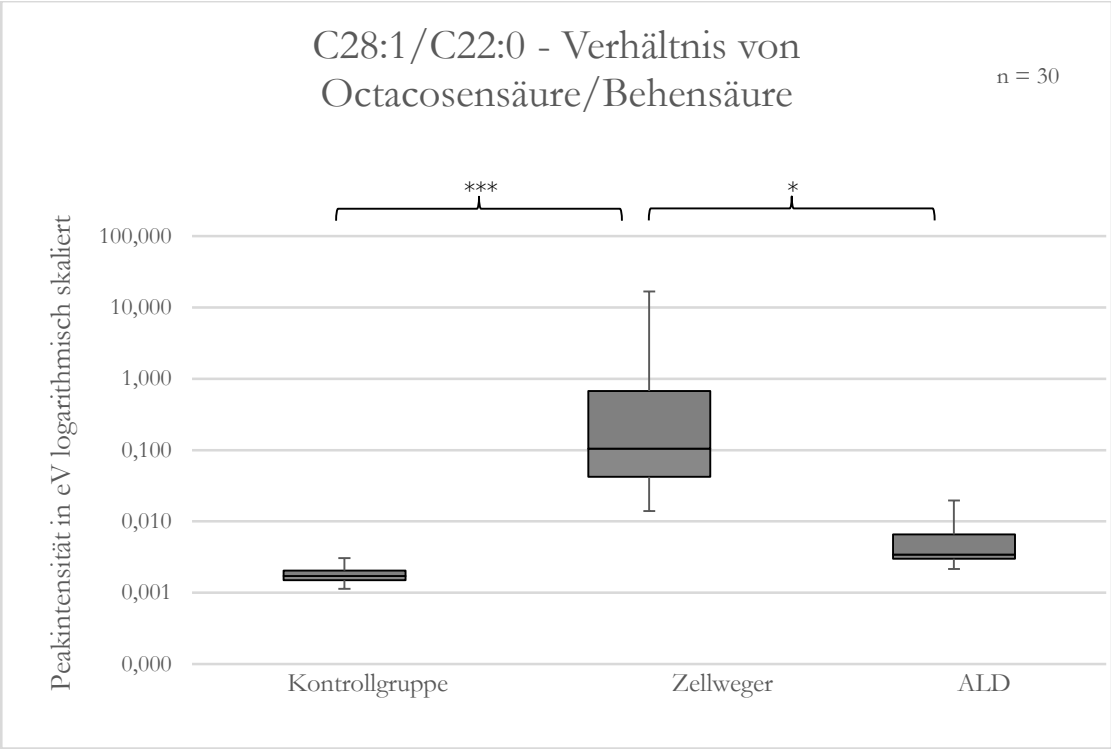


Abbildung 40: Signifikant erhöhtes Verhältnis C28:1/C22:0 bei Zellwegerpatienten. Hier wurden n = 30 Patienten anhand ihres Verhältnisses C28:1 zu C22:0 verglichen. Das Verhältnis des neuen Biomarkers C28:1 kann Zellwegerpatienten sowohl von der Kontrollgruppe als auch von ALD-Patienten unterscheiden. Median: Kontrollgruppe = 1,71 $x10^{-3}$ eV, Zellweger = 1,05 x 10^{-1} eV, ALD = 3,44 x 10^{-3} eV. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich ausgewertet. Nach der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests werden die korrigierten Siginifikanzwerte für das Signifikanzniveau p = 0,05 wie folgt gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant, *: p-Wert ≤ 0,05, **: p-Wert ≤ 0,01, ***: p-Wert ≤ 0,001.

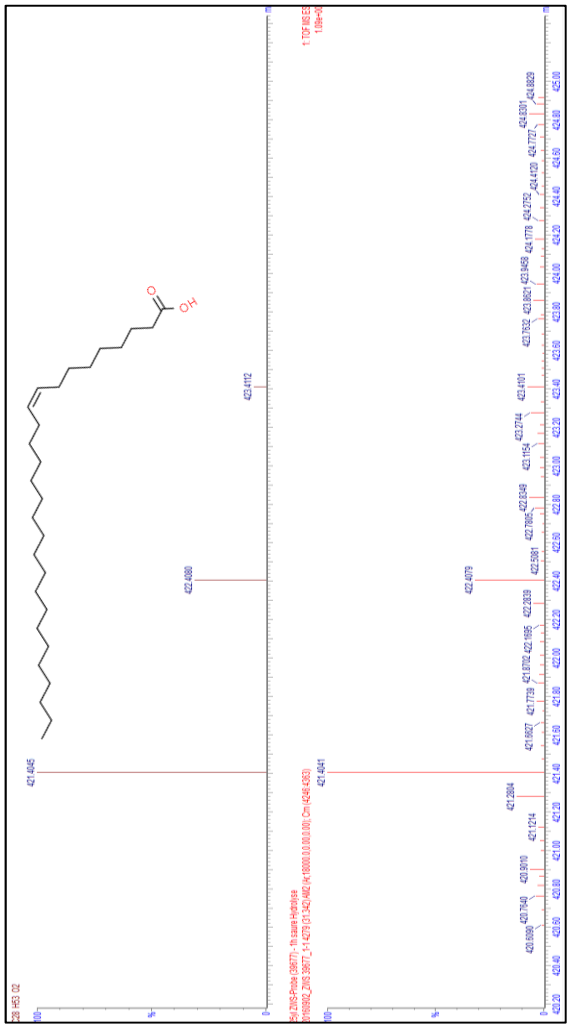


Abbildung 41: Massenspektrum des Biomarkerpeaks C28:1.
Massenspektrum des neuen Biomarkers Octacosensäure (C28:1) einer repräsentativen Probe eines Zellwegerpatienten (unten) im Vergleich mit dem Massenspektrum der monoisotopischen Masse der Summenformen C28H54O2 (oben). Aufgrund der geringen Massenabweichung = -0,5 mDa, -1,2 ppm ist davon auszugehen, dass die Summenformel für den Biomarker zutrifft.

Zusätzlich konnte eine weitere Fettsäure mit 25 Kohlestoffatomen identifiziert werden. Ihre Masse beträgt $[M-H]^-$ 379,34576 Da und hat eine Retentionszeit von 21,7 min. Diese einfach ungesättigte Fettsäure wurde als Pentacosensäure C25:1 bezeichnet und weißt nur einen geringen nicht signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen Zellwegerpatienten und der Kontrollgruppe auf. Wenn man allerdings das Verhältnis C25:1 zu C22:0 betrachtet, stellt sich ein signifikanter Unterschied von $p < 0{,}001$ zwischen den beiden Gruppen dar. Ebenso sind Peakintensitäten des Biomarkers im Verhältnis zur Behensäure (C22:0) bei Zellwegerpatienten im Vergleich zu Adrenoleukodystrophiepatienten siginifikant erhöht ($p = 0{,}021$) (s. Abbildung 43).

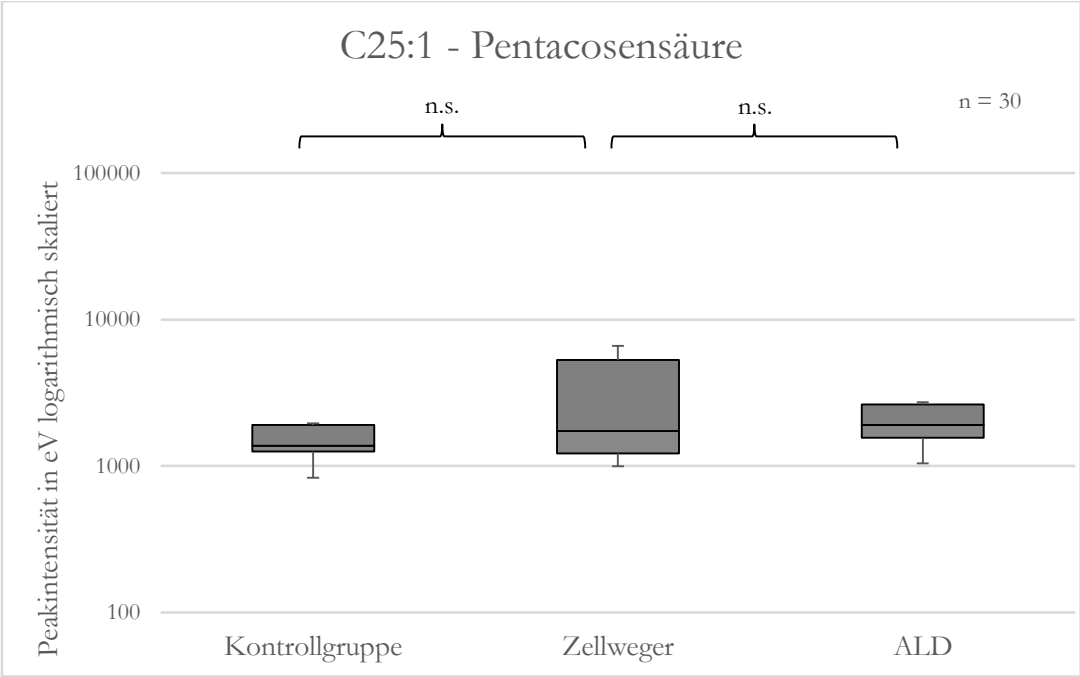


Abbildung 42: Biomarker C25:1. Dieser kann nicht als signifikantes Unterscheidungskriterium zwischen Zellweger- und Adrenoleukodystrophiepatienten herangezogen werden. Betrachtet man die Peakintensitäten des Moleküls Pentacosensäure C25:1 bei insgesamt n = 30 Patienten, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Zellwegergruppe und Kontrollgruppe. Die Y-Achse wurde logarithmisch (log10) skaliert. Median: Kontrollgruppe = 1375 eV, Zellweger = 1735 eV, ALD = 1905 eV. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich ausgewertet. Nach der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests werden die korrigierten Siginifikanzwerte für das Signifikanzniveau p = 0,05 wie folgt gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant, *: p-Wert ≤ 0,05, **: p-Wert ≤ 0,01, ***: p-Wert ≤ 0,001.

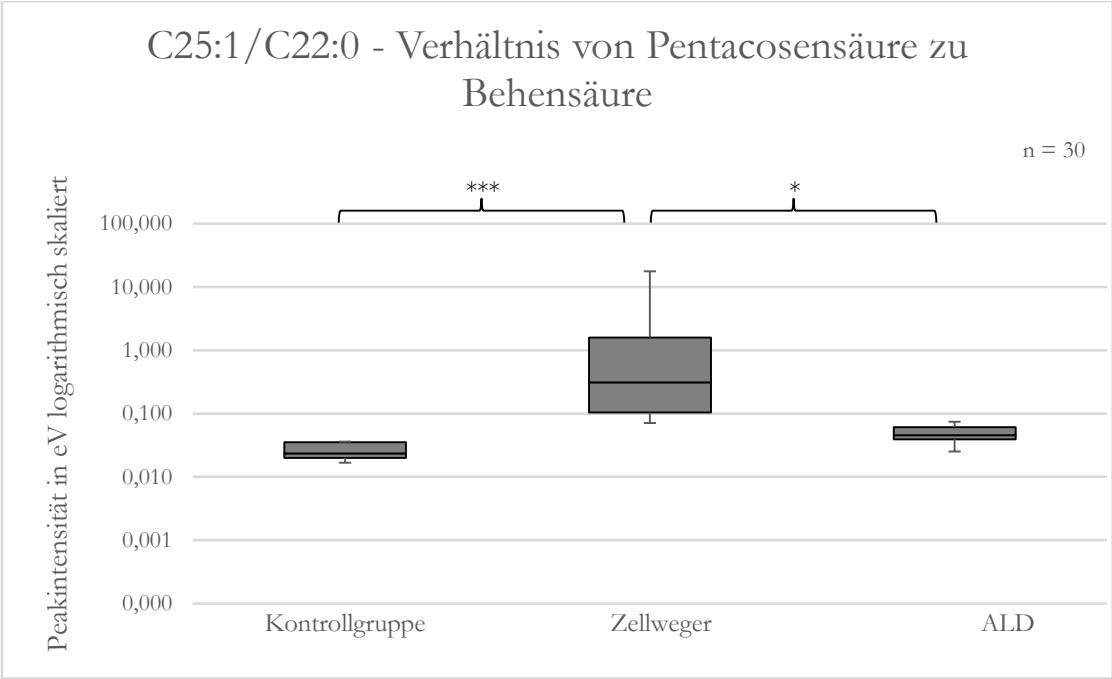


Abbildung 43: Eine Differenzierung der untersuchten Gruppen ist anhand signifikanter Unterschiede der Biomarkerverhältnisse C25:1/C22:0 möglich. Das Verhältnis C25:1 zu C22:0 weist signifikante Unterschiede zwischen Zellwegergruppe und Kontrollgruppe auf. Ebenso unterscheiden sich Zellweger- und ALD-Patienten signifikant. Die Y-Achse wurde logarithmisch (log10) skaliert. Median: Kontrollgruppe = 2,36 x10^{-2} eV, Zellweger = 3,13 x 10^{-1} eV, ALD = 4,57 x 10^{-2} eV. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich ausgewertet. Nach der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests werden die korrigierten Siginifikanzwerte für das Signifikanzniveau p = 0,05 wie folgt gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant, *: p-Wert ≤ 0,05, **: p-Wert ≤ 0,01, ***: p-Wert ≤ 0,001.

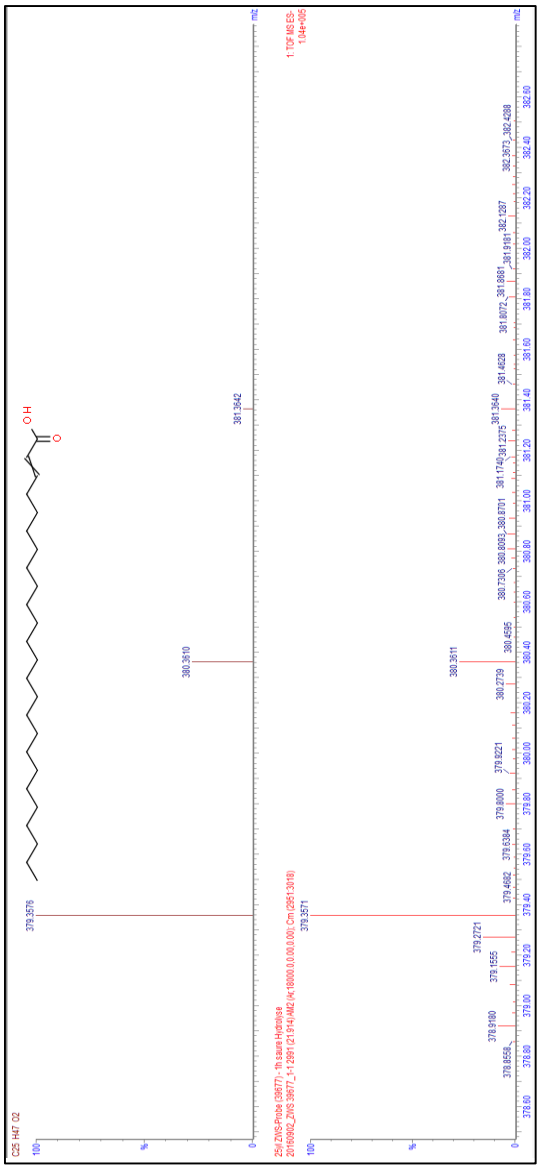


Abbildung 44: Das Massenspektrum des Biomarkers Pentacosensäure (C25:1). Dargestellt ist die Spur einer repräsentativen Probe eines Zellwegerpatienten (unten) im Vergleich mit dem Peak der monoisotopischen Masse der Summenformen C25H48O2 (oben). Die geringe Massenabweichung zum Isotopenmodell von -0,5 mDa, -1,3 ppm zeigt, dass der Peak für die gesuchte Masse die Summenformel C25H48O2 darstellt.

Die folgenden zwei Boxplotdiagramme zeigen den als Calcitriol identifizierten Biomarker mit der Summenformel C27H44O3. Seine Masse beträgt $[M-H]^-$ 415,3212 Da und seine Retentionszeit 5,3 min. Obwohl er ein größeres Molekulargewicht als die vorhergehenden Biomarker hat, ist seine Retentionszeit geringer, was mit seiner Steroidstruktur bzw. der Interaktion mit mobiler und stationären Phase zusammenhängen kann. Auch hier gibt es einen signifikanten Unterschied der Peakintensitäten ($p < 0{,}001$).

Die Gruppe der an Zellwegersyndrom leidenden Patienten zeigt erhöhte Konzentrationen im Vergleich zur Kontroll- und Adrenoleukodystrophiegruppe, was in den Boxplotdiagrammen Abbildung 45 und 46 dargestellt ist.

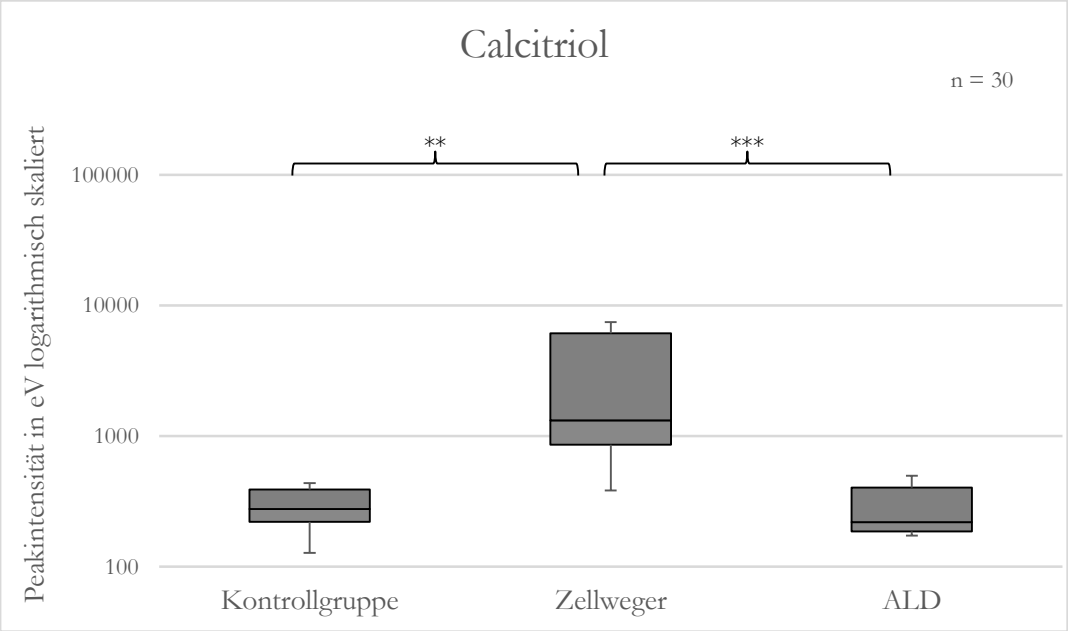


Abbildung 45: Calcitriol als Biomarker kann als Unterscheidungskriterium zwischen Zellwegerpatienten und Kontrollgruppe sowie ALD-Patienten genutzt werden. Die Peakintensität von Calcitriol zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Y-Achse wurde logarithmisch skaliert. Median: Kontrollgruppe = 276 eV, Zellweger = 1330 eV, ALD = 219 eV. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich ausgewertet. Nach der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests werden die korrigierten Siginifikanzwerte für das Signifikanzniveau p = 0,05 wie folgt gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant, *: p-Wert ≤ 0,05, **: p-Wert ≤ 0,01, ***: p-Wert ≤ 0,001.

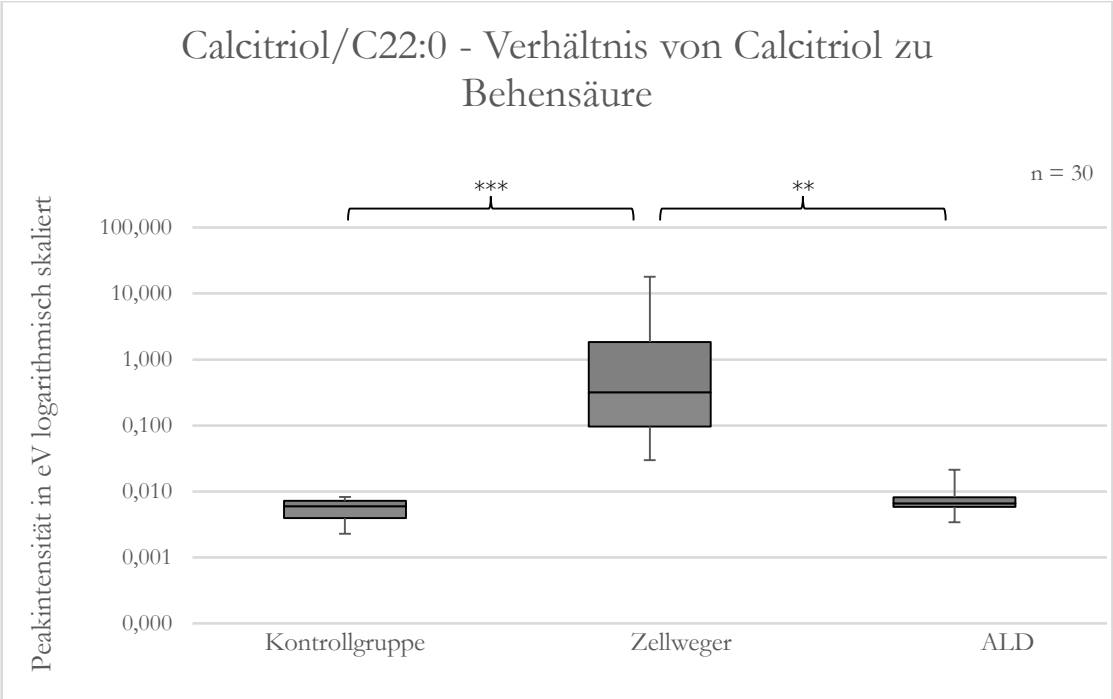


Abbildung 46: Signifikant unterschiedliche Verhältnisse des Biomarkers Calcitriol zu Behensäure. Der Biomarker Calcitriol kann sowohl zwischen Zellweger- und Kontrollgruppe, als auch zwischen ALD- und Zellwegerpatienten differenzieren. Die Y-Achse wurde logarithmisch skaliert. Median: Kontrollgruppe = 5,93 $x10^{-3}$ eV, Zellweger = 3,2 x 10^{-1} eV, ALD = 6,59 x 10^{-3} eV. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich ausgewertet. Nach der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests werden die korrigierten Siginifikanzwerte für das Signifikanzniveau p = 0,05 wie folgt gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant, *: p-Wert ≤ 0,05, **: p-Wert ≤ 0,01, ***: p-Wert ≤ 0,001.

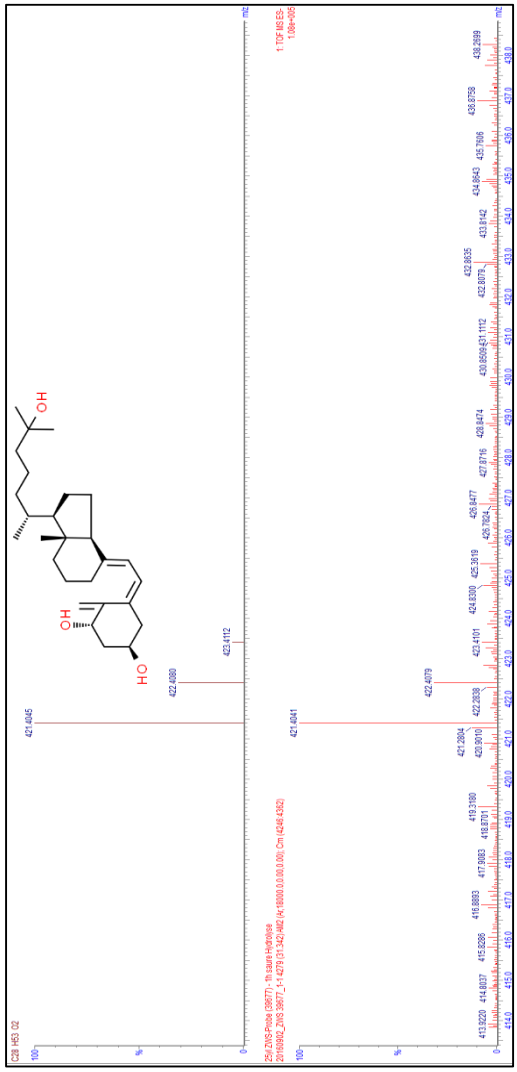


Abbildung 47: Massenspektrum des Biomarkerpeaks C27H44O3 (Calcitriol) einer repräsentativen Probe eines Zellwegerpatienten (unten) im Vergleich mit dem Peak der monoisotopischen Masse der Summenformen C27H44O3 (oben). Aufgrund der niedrigen Massenabweichung zwischen dem Isotopenmodell und dem Massenspektrum des detektierten Moleküls von 0,3 mDa, 0,7 ppm, kann die Summenformel C27H44O3 angenommen werden.

3.7.1. Targeted Metabolomics - Sphingomyeline

Um die untersuchten Krankheiten Zellwegersyndrom und Adrenoleukodystrophie weiter zu charakterisieren, wurde nach Sphingomyelinen gesucht und dafür ein interner Standard des Sphingomyelin d18:1/24:1 (C42H81NO3) nach der Probenvorbereitung von Abschnitt 2.3.1.4 mit der lipophilen UPLC-MS/MS-Methode (siehe Abschnitt 2.3.2) gemessen. Für Sphingomyelin wurde im Gegensatz zur Methode von Abschnitt 2.3.2 im positiven Modus gemessen, da dort deutlichere Peaks detektierbar waren. Sphingomyelin weist mehrere Peaks im Chromatogramm auf. Das Maximum der Peaks liegt bei ca. 40 Minuten und hat eine monoisotopische Masse $[M+H]^+$ von 813,6850 Da (s. Abbildung 48). Es konnte für Sphingomyelin d18:1/24:1 ein charakteristisches Fragment von $[M+H]^+$ 184.07 Da in der zweiten MS-Spur identifiziert werden (s. Abbildung 49), welches die Kopfgruppe (Phosphocholin) der Sphingolipide repräsentiert. Dieses charakteristische Fragment wurde zur Identifizierung von Sphingomyelin 24:1 verwendet.

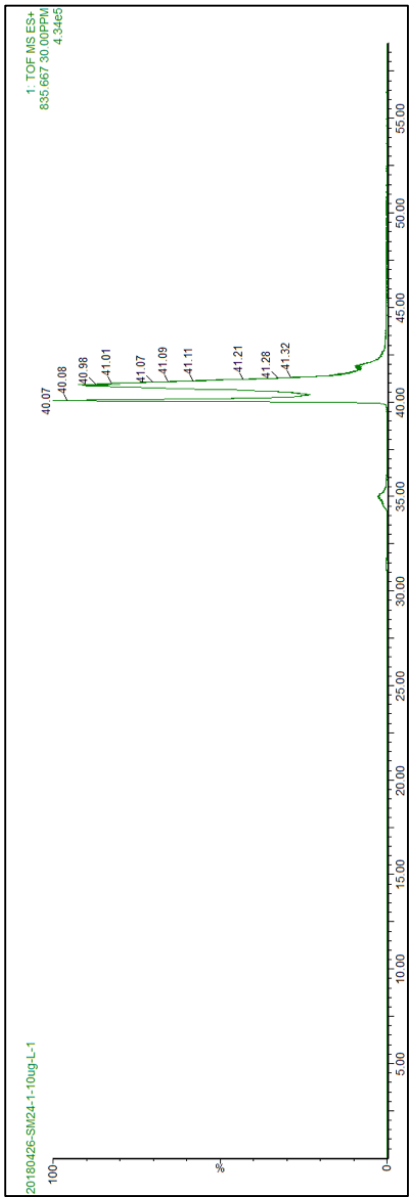


Abbildung 48: Chromatogramm von SM 24:1 im positiven Modus in der Konzentration 10 µg/L. Hauptpeak bei 40 und 40,1 Minuten. Nebenpeak bei 34,97 Minuten. Peakintensität beträgt $4{,}34 \times 10^5$ bei 30 ppm Suchfenster.

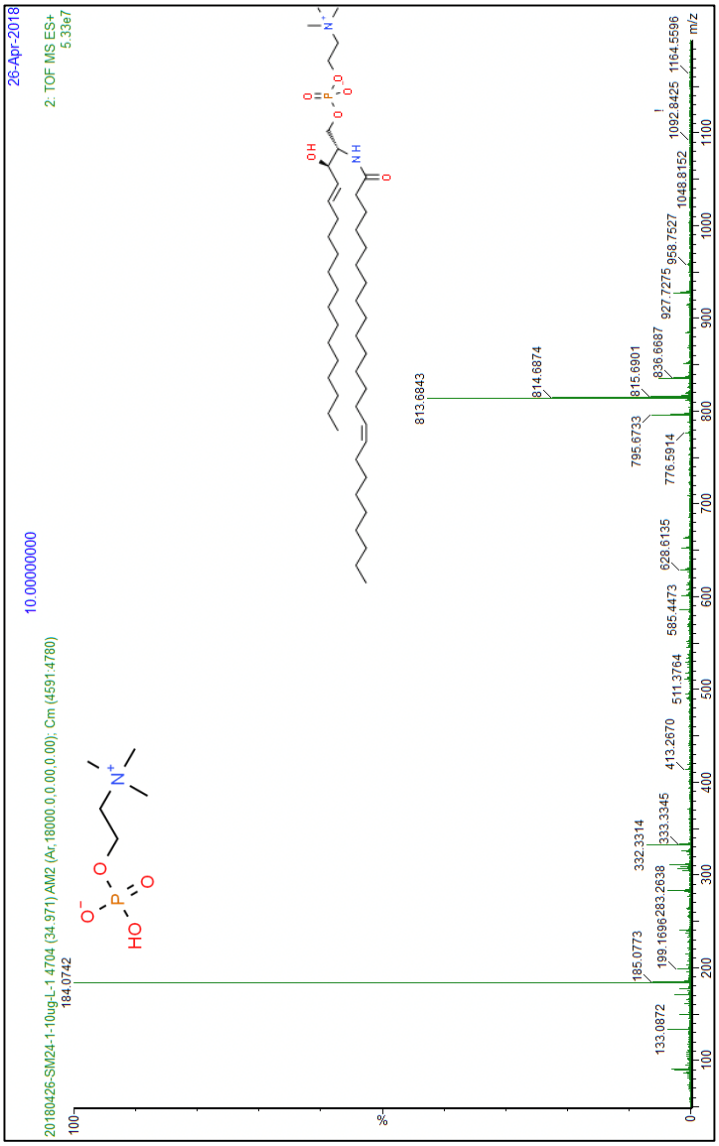


Abbildung 49: Massenspektrum von SM 24:1 in der zweiten MS-Spur. Fragmentierte Kopfgruppe Phosphocholin bei 184.0742 Da und „Mutterion"/*Precursor* bei 813.6843 Da.

4. Diskussion

Zunächst konnte wie in Abschnitt 3.3 erläutert eine präanalytische Vorgehensweise entwickelt werden, welche durch saure Hydrolyse Fettsäuren freisetzt, von anderen Verbindungen Proteine trennt und freie Fettsäuren damit quantitativ messbar macht. Die Zuverlässigkeit der Methode ist gegeben und zeigt deren Stabilität, was der Vergleich der Poolsamples/Qualitychecks verdeutlicht. Mit dieser Methode können also Blutproben für die analytische Messung mit dem UPLC-MS/MS-Verfahren vorbereitet werden. Bekannte Biomarker wie die überlangkettigen Fettsäuren, die aktuell zur Diagnostik der peroxisomalen Erkrankungen benutzt werden, konnten mittels dieser präanalytischen und analytischen Methode zuverlässig detektiert werden. Zurzeit wird vor allem die gaschromatographische Massenspektrometrie zur Routinediagnostik von Erkrankungen wie Zellwegersyndrom und Adrenoleukodystrophie verwendet. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit den publizierten Ergebnissen in Bezug auf bisher bekannte Biomarker überein. Gesättigte überlangkettige Fettsäuren wie Hexacosansäure C26:0 liegen bei an Zellwegersyndrom leidenden Patienten mit einer nachgewiesenen PEX1 Mutation in erhöhten Konzentrationen vor. Auch die Verhältnisse der überlangkettigen Fettsäuren C26:0 und C24:0 zu C22:0 zeigten erhöhte Werte in der Gruppe der Zellweger- und X-ALD Patienten.

Die Blutproben, welche für die Messungen verwendet wurden, waren teilweise über mehrere Jahre bei -20° C archiviert. Dorow et al. zeigten 2016, dass die Langzeitlagerung (nach 30 Tagen) von Blutproben bei -20° C zu Erhöhungen von Eicosanoiden führten, was durch Denaturierung der Proteine vor Lagerung verhindert werden könne. Des Weiteren konnte kein Vorteil gegenüber konventionellen Gefriermethoden bzgl. Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff gezeigt werden. Kronenberg et al. fanden bei einem Vergleich 1994 heraus, dass es keinen Unterschied zwischen der Lagerung von Blutproben bei -20° C und -80° C bezüglich der Analyse von Lipoproteinen, Cholsterol und Triglyceriden gibt. Ebenso wurde zehnfaches Einfrieren bei -20° C und ebenso häufiges Auftauen unter Raumtemperatur von Blutproben analysiert. Lipide wie Triglyceride zeigten dabei keine statistisch klinisch relevanten Veränderungen (Cuhadar et al. 2013). Bei einem Vergleich zwischen gefrorenen Proben, welche bei -20° C, -70° C und in flüssigem Stickstoff gelagert wurden und ungefrorenen Proben, die bis zu 433 Tage gelagert wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede bzgl. Konzentrationen dieser Metabolite festgestellt werden. Untersucht wurden hier Lipide wie Cholesterol, Triglyceride und HDL-Cholesterol in Plasma und Serum, die bei Raumtemperatur aufgetaut und auf unterschiedliche Art und Weise für Messungen aufbereitet wurden. Die Analysen zeigten keinen signifikanten Unterschied bzgl. der Ausbeute an Lipiden wie Triglyceriden und Cholesterol zwischen Proben, die bei -20° C und Proben, die in flüssigem Stickstoff gelagert wurden (Nanjee und Miller 1990). Daher ist anzunehmen, dass die Lagerung der Blutproben bei -20° C keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen der gemessenen Metabolite hat.

Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben wurde die Reproduzierbarkeit und Stabilität der Messungen der überlangkettigen Fettsäuren und anderer Metabolite anhand der Peakintensitäten untersucht. Gibt man zur Suche einer Verbindung die monoisotopische Masse in die Suche (MassLynx) ein und grenzt dabei die Massengenauigkeit unzureichend ein, so ist es möglich, dass die Peakintensität nicht durch die gesuchte Masse, sondern durch eine innerhalb der ppm *(parts per million)* -Grenze deutlicher vorkommende Masse hervorgerufen wird. Die Intensität der Peaks schwankt also, sobald man die Sensitivität der Suche erhöht und die Grenzen der Massengenauigkeit in ppm erniedrigt/erhöht. Die Vergleiche der Peakintensitäten wurden daher stets mit dem Suchfenster 30 ppm durchgeführt. Um genaue quantitative Aussagen zu treffen und genaue Angaben zur Konzentration der Metabolite im Blut der Patienten treffen zu können, hätten sogenannte deuteriert interne Standards zur Quantifizierung verwendet werden müssen. Diese müssten bei jedem Lauf mitgemessen werden. Anschließend kann eine Software die Fläche der Metabolitenpeaks durch Integration berechnen und mit der Fläche des gemessenen internen Standards vergleichen. Über die bekannte Konzentration des Standards kann die Konzentration des Analyten bestimmt werden. Man kann die Peakintensität als Äquivalent der Konzentration im Blut ansehen, da die Peakintensität bei gut aufgelösten Peaks zur Konzentration proportional ist. Es besteht also eine Proportionalität zur Fläche des Peaks bzw. der Peakintensität. Da ein Teil des Projektes aber als „*untargeted metabolomics*“ (ungezielt) durchgeführt wurde und somit vor der Messung noch nicht klar war, nach welchen Metaboliten gesucht wird, konnte kein interner Standard mitgemessen werden. Hinzu kommt, dass einige neu identifizierte Biomarker nicht als reine Substanz käuflich sind und damit eine Quantifizierung ausgeschlossen ist. Aus den genannten Gründen wurden die Peakintensitäten nach automatischer Normierung verglichen, was das Verhältnis der Biomarker innerhalb der Patientengruppen annähernd quantitativ widerspiegelt und einer relativen Quantifizierung gleichkommt.

Abbildung 20 (Vergleich der über-/langkettigen Fettsäuren in Poolsamples) zeigt die Stabilität der Messungen. Schwankungen zwischen und innerhalb einer Probe sind sichtbar. Da die Peakintensitäten auch innerhalb der gleichen Probe, also bei dem technischen Replikat leicht schwanken, kann eine Messungenauigkeit für diese Analytik abgeschätzt werden. Gründe dafür können beispielsweise Verunreinigungen der Säule, Temperaturschwankungen der Räumlichkeiten oder Ablagerungen an dem Kegel der ESI-Nadel sein. Teils schwanken die Werte der Peakintensitäten auch zwischen verschiedenen Probenaufbereitungen, was auf Ungenauigkeiten in der Probenvorbereitung deuten lässt. Dennoch sind die gemessenen Effekte deutlich höher als die experimentellen Schwankungen. Die Schwankungen können aber auch auf die unterschiedliche Stoffwechsellage der verschiedenen Patienten zurückzuführen sein. Ebenso können Therapien die Schwankungen erklären.

Abbildung 21 (LC/GC Vergleich) zeigt, dass die Werte der gemessenen Blutproben gleicher Patienten bei der verwendeten Flüssigchromatographie mit der der Gaschromatographie in einem gewissen Rahmen übereinstimmen. Zu beachten ist außerdem, dass zwischen den Messungen der LC und GC mehrere Jahre liegen und dennoch ein ähnliches Ergebnis erzielt werden konnte. Die Messmethodik der Proben, die mit der gaschromatographischen Massenspektrometrie oder der Tandem-MS (MS/MS) gemessen werden, ist bereits etabliert und wird zur Diagnostik von Stoffwechselerkrankungen wie dem Zellwegersyndrom verwendet. Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass auch die bisher nicht zur Diagnostik eingesetzte neue qTOF-Methode für diagnostische Zwecke eingesetzt werden könnte. Dafür müsste dann das Verfahren mit gekauften Standards hinzugefügt werden, um die Biomarker zu quantifizieren.

Die dargestellten Ergebnisse von Abbildung 25 (DHA u. PUFAs) korrelieren mit den von Martinez 1995 publizierten Ergebnissen. Martinez benutzte damals die Gaschromatographie zur Quantifizierung überlangkettiger Fettsäuren und mehrfach ungesättigter Fettsäuren im Blutplasma und Erythrozyten. Die Werte wurden zwischen Patienten mit peroxisomalen Biogenesestörungen und denen mit Adrenoleukodystrophie verglichen. Das Ergebnis zeigte erniedrigte Werte der Docosahexaensäure bei Patienten mit peroxisomaler Biogenesestörung, wohingegen Patienten mit Adrenoleukodystrophie normale Werte der Docosahexaensäure hatten. Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben fanden Ferdinandusse et al. 2001 heraus, dass die Umwandlung von C24:5 zu C22:6 ein im Peroxisom stattfindender Schritt ist. Auch Abbildung 4 (PUFA Stoffwechselweg) zeigt, dass der letzte Schritt durch Beta-Oxidation im Peroxisom stattfindet. Nimmt man an, dass dies tatsächlich der Fall sei, so müsste bei Patienten ohne funktionelle Peroxisomen die Fettsäure C24:6, der Vorgänger der DHA, erhöht vorhanden sein. Abbildung 25 (PUFAs Vergleich) zeigt bei Zellweger- und ALD-Patienten aber keine signifikante Erhöhung der beiden Metaboliten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dafür sind die Ausgangsverbindung alpha-Linolensäure und das Zwischenprodukt Arachidonsäure signifikant erhöht.

Bezugnehmend auf Abschnitt 3.7.1 (targeted metabolomics), wurden im Rahmen einer Masterarbeit von H. Klemp 2018 Messungen mit einem Kit der Firma Biocrates durchgeführt. Präanalytik und Analytik unterschieden sich in Klemp's Arbeit im Vergleich zu den hier verwendeten. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.7.1 zeigen Chromatogramm und Massenspektrum von Sphingomyelin C24:1 (SM 24:1). Die hier beschriebene Methode zeigt also auch die Möglichkeit zur gezielten Detektion von Biomarkern und kann damit als Ansatz für weitere quantifizierende Messungen dienen. In der Masterarbeit von H. Klemp wurden weitere und andere Sphingomyeline sowie Phosphatidylsäuren unterschiedlich langer Kettenlänge quantifiziert. Es wurde deutlich, dass die hier quantifizierten Sphingomyeline SM C16:0, C18:0, 24:0 und 24:1 bei Zellwegerpatienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant erniedrigt waren. Bisher wurden erhöhte Konzentrationen der Sphingolipide, an denen überlangkettige Fettsäuren wie C26:0 gebunden waren, vor allem an Zellmembranen gefunden (Tanaka et al. 1990, Sassa et al. 2014).

Abbildung 14 der Masterarbeit von H. Klemp verdeutlicht, dass die Konzentration von Sphingomyelin C26:0 im Plasma von Zellwegerpatienten höher ist als bei der Kontrollgruppe. Dies zeigten die Ergebnisse von Sassa et al. 2014 und Tanaka et al. 1990 zwar nicht im Blutplasma, dafür aber in Zellmembranen.

2018 wurden erstmals von Wangler et al. erniedrigte Werte der Sphingolipide im Blut von Patienten mit peroxisomalen Erkrankungen nachgewiesen. Diagnostisch können die Werte nun auch für die Ergebnisse dieser Arbeit als Orientierungshilfe für etwaige neue Messungen der Biomarker genutzt werden. Außerdem wurde Sphingomyelin (d18:0/24:1) mit der in Abschnitt 2.3.2 beschrieben Methode gemessen. Dabei wurden dieselben Patientenproben wie in Abschnitt 2.3.1 verwendet. Sphingomyelin (d18:0/24:1) konnte bei zehn von zehn Zellwegerproben nicht nachgewiesen werden und lag damit unter der Nachweisgrenze. Wohingegen bei der Kontrollgruppe eine mittlere SM 24:1 Konzentration von 53,12 µg/l festgestellt werden konnte. Die Quantifizierung funktionierte nicht bei allen Proben, da die Peakintensität zu gering war. Fraglich ist, ob dies an der Methodik liegt oder aber die Konzentrationen von Sphingmyelin tatsächlich so gering ist und unter der Nachweisgrenze liegt. Dennoch konnte bei einer Retentionszeit von ca. 26 Minuten ein Peak für das Natrium-Addukt von Sphingomyelin 24:1 mit der Masse von 837,23 Da $[M+Na^+]^+$ detektiert werden, bei dem zusätzlich in der Kollisionsspur *(Trace 2)* das charakteristische Fragment von 184,074 Da auftaucht. Gegen die Theorie, dass es sich um SM24:1 + Natrium handelt, spricht, dass die Retentionszeitverschiebung zwischen SM 24:1 bei ca. 40 Minuten und SM 24:1 + Natrium bei ca. 26 Minuten sehr groß ist. Das quantifizierte Natrium-Addukt von Spingomyelin 24:1 ergab bei allen Zellwegerproben erniedrigte Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Masterarbeit von H. Klemp (2018) ergab die Quantifizierung durch das Biocrates-Kit für Sphingomyelin 24:1 eine mittlere Konzentration von 26,86 µmol/l bei Zellweger-Patienten und 65,51 µmol/l bei der Kontrollgruppe.

Da Sphingolipide und mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Docosahexaensäure und Sphingomyelin sowohl an der Myelenisierung von zentralen und peripheren Nervenfortsätzen, als auch im prä- und postzentralen Kortex sowie anderen wichtigen Hirnregionen eine entscheidende Rolle spielen, ist ein Mangel möglicherweise mit den Symptomen der Erkrankten in Verbindung zu bringen. Diese Arbeit konnte mit den Ergebnissen von H. Klemp übereinstimmend, bei beiden Metaboliten eine verminderte Konzentration im Vergleich zu gesunden Probanden im Blut feststellen. Dies weist darauf hin, dass sich dieser Mangel nicht nur im Blut, welches als Transportorgan der Metabolite dient, sondern auch in den genannten Strukturen manifestiert. Auch Martinez traf 1995 die Aussage, dass von einem Defizit im Blut auf ein Defizit in anderen Geweben wie dem Gehirn geschlossen werden könne. Symptome wie Hypo-/Areflexie, hypotoner Muskeltonus, Visus- und Hörverlust, Schluckstörungen und vieles mehr zeigen die Folge eines während der Entwicklung des Embryos gestörten Zellorganells – dem Peroxisom. Sicherlich ist der Mangel an Sphingolipiden und mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowie ein Überschuss an überlangkettigen Fettsäuren,

welcher sich toxisch auf Nervengewebe auswirkt, nicht alleine für das heterogene Krankheitsbild verantwortlich. Man kann es aber als einen Baustein einer dysfunktionellen pathophysiologischen Eklärung eines multifaktoriellen Syndroms wie das des Zellweger-Syndroms sehen.

Neue Biomarker können helfen, die seltenen peroxisomalen Erkrankungen besser zu verstehen, zu charakterisieren, zu diagnostizieren und möglicherweise zu therapieren. Besonders die Therapie konnte bisher nicht kausal erfolgen. Vielmehr werden verschiedene Ansätze versucht, welche meist symptomatisch helfen können. Interaktionen der Peroxisomen mit anderen Zellorganellen hinsichtlich ihrer Stoffwechselwege können untersucht werden. So könnte es bzgl. des Stoffwechselweges der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) Aufschluss geben, wieso die Konzentration der Fettsäure C24:6 bei Dysfunktion der peroxisomalen Beta-Oxidation nicht erhöht ist. Es könnte z. B. möglich sein, dass Mitochondrien bei einem Überangebot überlangkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren, diese intrazelluläre Akkumulation kompensieren und diese Verbindungen weiter verstoffwechseln. Außerdem ist es möglich, dass C24:6 in anderen Stoffwechselwegen teilnimmt oder erst gar nicht in den Intravasalraum gelangt.

Die neu entdeckten Moleküle, welche signifikant für das Zellwegersyndrom sind, könnten als Biomarker dienen und sollten zum weiteren Test einer Eignung mit synthetischen Standards quantifiziert und vor allem hinsichtlich Retentionszeit und Massenspektrum verglichen werden. Sie bieten Ansatzpunkte für weitere Forschung, die beispielsweise die Wirkung der neuen Biomarker auf neurologische Gewebe, Protein-/Enzymuntersuchungen in Fibroblasten bzgl. der Stoffwechselwege oder Therapieversuche beinhalten. Des weiteren können die neuen Biomarker für zukünftige Diagnostikprozesse verwendet werden und eine Ergänzung zu den bisher bekannten bieten.

5. Zusammenfassung

Von den heute 15 bekannten peroxisomalen Erkrankungen zählt man das Zellwegersyndrom-Spektrum zu den peroxisomalen Biogenesestörungen und die x-Adrenoleukodystrophie zu einer Gruppe, die durch einzelne peroxisomale Proteindysfunktion gekennzeichnet ist. Peroxisomen sind unter anderem für die Beta-Oxidation überlangkettiger Fettsäuren zuständig. Sie spielen aber auch eine wichtige Rolle in der Synthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Gallensäuren. Typischerweise akkumulieren überlangkettige Fettsäuren, welche neurotoxisch-inflammatorische und demyelenisierende Prozesse verursachen, in verschiedenen Geweben und vor allem in neuronalem Gewebe der Patienten. Des weiteren kommt es zu schweren Fehlbildungen und Dysfunktionen mehrerer Organe im Neugeborenen- und Säuglingsalter, welche sich unter anderem klinisch als Krampfanfälle, muskuläre Hypotonie, Sehverlust, Hepatosplenomegalie oder kraniofazialen Dysmorphien manifestieren. Dabei ist die Prognose der an Zellwegersyndrom erkrankten Patienten meist schlecht und viele Patienten erreichen nicht das erste Lebensjahr. Die Diagnostik erfolgt aktuell mittels Massenspektrometrie und Genanalysen. Meist müssen dafür Proben oder Patienten an spezifische Kliniken mit Speziallaboren überwiesen werden. Therapeutisch gibt es einige Ansätze, welche allerdings nur symptomatisch helfen und die Erkrankung nicht kausal behandeln. Auch Gentherapien brachten bisher nicht die gewünschten Erfolge. Aufgrund der aufwendigen Diagnostik und der fehlenden Therapie gibt es noch vieles über peroxisomale Erkrankungen wie Zellwegersyndrom und x-Adrenoleukodystrophie zu lernen. Daher sollen neue Biomarker die Erkrankungen besser charakterisieren und helfen, die metabolischen Veränderungen zu verstehen. Sie können als Ansatz für neue sensitivere Diagnostikverfahren oder gar Therapieverfahren dienen und die Erkrankungen besser untereinander unterscheiden.

Es wurden Blutproben von jeweils 12 Zellwegersyndrom-Patienten mit der am häufigsten vorkommenden Mutation (PEX1), 12 an x-Adrenoleukodystrophie leidenden und 12 Kontrollproben untersucht. Präanalytisch wurden die Blutproben hydrolysiert und anschließend ein Verfahren der Ultra-Performance-Liquid-Chromatography mit gekoppelter Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) verwendet. Die Daten wurden am Chromatogramm und mit Datenverarbeitungssoftware, sowie deskriptiver Statistik ausgewertet.

Es konnte zunächst die Stabilität des Messverfahrens dargestellt und einige der bisher bekannten Biomarker detektiert und in Einklang mit anderen Forschungsergebnissen gebracht werden. Außerdem wurden mit dem Messverfahren neue Biomarker im Blut der Patienten gefunden, welche als Hexacosadiensäure, Calcitriol, Pentacosensäure und Octacosensäure interpretiert werden können. Des weiteren wurde Sphingomyelin 24:0 im Blut der Patienten analysiert, was als Ansatzpunkt für weitere quantifizierende Messungen dienen kann.

6. Literaturverzeichnis

Al-Sayed M, Al-Hassan S, Rashed M, Qeba M, Coskun S (2007): Preimplantation genetic diagnosis for Zellweger syndrome. Fertil Steril 87, 1468.e1-3

Barkovich AJ, Peck WW (1997): MR of Zellweger syndrome. AJNR Am J Neuroradiol 18, 1163-70

Bazinet RP, Layé S (2014): Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. Nat Rev Neurosci 15, 771-85

Benolken RM, Anderson RE, Wheeler TG (1973): Membrane fatty acids associated with the electrical response in visual excitation. Science 182, 1253-4

Berendse K, Ebberink MS, Ijlst L, Poll-The BT, Wanders RJ, Waterham HR (2013): Arginine improves peroxisome functioning in cells from patients with a mild peroxisome biogenesis disorder. Orphanet J Rare Dis 8, 138

Berendse K, Engelen M, Linthorst GE, van Trotsenburg AS, Poll-The BT (2014): High prevalence of primary adrenal insufficiency in Zellweger spectrum disorders. Orphanet J Rare Dis 9, 133

Berendse K, Klouwer FC, Koot BG, Kemper EM, Ferdinandusse S, Koelfat KV, Lenicek M, Schaap FG, Waterham HR, Vaz FM (2016): Cholic acid therapy in Zellweger spectrum disorders. J Inherit Metab Dis 39, 859-868

Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD, Kass NE, Moser HW (2001): Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. Ann Neurol 49, 512-7

Bowen P, Lee CS, Zellweger H, Lindenberg R (1964): A familial syndrome of multiple congenital defects. Bull Johns Hopkins Hosp 114, 402-14

Braverman N, Eichler F: Perosixomal disorders and neurological disease. In: Squire LR (Hrsg.): Encyclopedia of Neuroscience; Elsevier, Amsterdamm 2009, 579-588

Braverman NE, Raymond GV, Rizzo WB, Moser AB, Wilkinson ME, Stone EM, Steinberg SJ, Wangler MF, Rush ET, Hacia JG et al. (2016): Peroxisome biogenesis disorders in the Zellweger spectrum: An overview of current diagnosis, clinical manifestations, and treatment guidelines. Mol Genet Metab 117, 313-21

Breckenreidge WC, Gombos G, Morgan IG (1971): The docosahexaenoic acid of the phospholipids of synaptic membranes, vesicles and mitochondria. Brain Res 33, 581-3

Brown FR 3rd, McAdams AJ, Cummins JW, Konkol R, Singh I, Moser AB, Moser HW (1982): Cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy: similarities in phenotype and accumulation of very long chain fatty acids. Johns Hopkins Med J 151, 344-51

Catalá A (2013): Five decades with polyunsaturated Fatty acids: chemical synthesis, enzymatic formation, lipid peroxidation and its biological effects. J Lipids 2013, 710290

Chen CT, Bazinet RP (2015): β-oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 92, 33-40

Chen CT, Kitson AP, Hopperton KE, Domenichiello AF, Trépanier MO, Lin LE, Ermini L, Post M, Thies F, Bazinet RP (2015): Plasma non-esterified docosahexaenoic acid is the major pool supplying the brain. Sci Rep 5, 15791

Clayton PT (1991): Inborn errors of bile acid metabolism. J Inherit Metab Dis 14, 478-96

Cuhadar S, Koseoglu M, Atay A, Dirican A (2013): The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. Biochem Med (Zagreb) 23, 70-7

Diau GY, Hsieh AT, Sarkadi-Nagy EA, Wijendran V, Nathanielsz PW, Brenna JT (2005): The influence of long chain polyunsaturate supplementation on docosahexaenoic acid and arachidonic acid in baboon neonate central nervous system. BMC Med 3, 11

Distel B, Erdmann R, Gould SJ, Blobel G, Crane DI, Cregg JM, Dodt G, Fujiki Y, Goodman JM, Just WW, Kiel JA, Kunau WH, Lazarow PB et al. (1996): A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. J Cell Biol 135, 1-3

Ebberink MS, Csanyi B, Chong WK, Denis S, Sharp P, Mooijer PA, Dekker CJ, Spooner C, Ngu LH, De Sousa C et al. (2010): Identification of an unusual variant peroxisome biogenesis disorder caused by mutations in the PEX16 gene. J Med Genet 47, 608-15

Ferdinandusse S, Denis S, Mooijer PA, Zhang Z, Reddy JK, Spector AA, Wanders RJ (2001): Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. J Lipid Res 42, 1987-95

Ferdinandusse S, Denis S, Van Roermund CW, Wanders RJ, Dacremont G (2004): Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids. J Lipid Res 45, 1104-11

Games DE, Alcock NJ, van der Greef J, Nyssen LM, Maarse H, Ten MC, de Brauw N (1984): Analysis of pepper and capsicum oleoresins by high-performance liquid chromatography—mass spectrometry and field desorption mass spectrometry. Journal of Chromatography A 294, 269–79

Gates SC, Sweeley CC (1978): Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. Clin Chem 24, 1663-73

Ghoneim W, El-Bassyouni HT, Abdel Maksoud SA (2011): Peroxisomal biogenesis disorder biomarkers. Clin Lab 57, 469-80

Gibson RA, Chen W, Makrides M (2001): Randomized trials with polyunsaturated fatty acid interventions in preterm and term infants: functional and clinical outcomes. Lipids 36, 873-83

Godzien J, Ciborowski M, Martínez-Alcázar MP, Samczuk P, Kretowski A, Barbas C (2015): Rapid and Reliable Identification of Phospholipids for Untargeted Metabolomics with LC-ESI-QTOF-MS/MS. J Proteome Res 14, 3204-16

Goldfischer S, Moore CL, Johnson AB, Spiro AJ, Valsamis MP, Wisniewski HK, Ritch RH, Norton WT, Rapin I, Gartner LM (1973): Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. Science 182, 62-4

Gould SJ, Valle D (2000): Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. Trends Genet 16, 340-5

Gould SJ, Raymond GV, Valle D: The peroxisome biogenesis disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Hrsg.): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill, New York 2001, 3181-218

Grønn M, Christensen E, Hagve TA, Christophersen BO (1990): The Zellweger syndrome: deficient conversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) and normal delta 4-desaturase activity in cultured skin fibroblasts. Biochim Biophys Acta 1044, 249-54

Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G (2008): Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. Hum Mol Genet 17, 1750-61

Heubi JE, Bove KE, Setchell KDR (2017): Oral Cholic Acid Is Efficacious and Well Tolerated in Patients With Bile Acid Synthesis and Zellweger Spectrum Disorders. J Pediatr Gastroenterol Nutr 65, 321-326

Lodhi IJ, Semenkovich CF (2014): Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. Cell Metab 19, 380-92

Jedlitschky G, Huber M, Völkl A, Müller M, Leier I, Müller J, Lehmann WD, Fahimi HD, Keppler D (1991): Peroxisomal degradation of leukotrienes by beta-oxidation from the omega-end. J Biol Chem 266, 24763-72

Kemper AR, Brosco J, Comeau AM, Green NS, Grosse SD, Jones E, Kwon JM, Lam WK, Ojodu J, Prosser LA et al. (2017): Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy: evidence summary and advisory committee recommendation. Genet Med 19, 121-126

Kirk EP, Fletcher JM, Sharp P, Carey B, Poulos A (1998): X-linked adrenoleukodystrophy: the Australasian experience. Am J Med Genet 76, 420-3

Klemp H: Metabolomics in rare neurological diseases. Master‘s Thesis (Molekulare Medizin, Master of Science) Universitätsmedizin Göttingen 2018[1]

Klouwer FC, Berendse K, Ferdinandusse S, Wanders RJ, Engelen M, Poll-The BT (2015): Zellweger spectrum disorders: clinical overview and management approach. Orphanet J Rare Dis 10, 151

Klouwer FC, Huffnagel IC, Ferdinandusse S, Waterham HR, Wanders RJ, Engelen M, Poll-The BT (2016): Clinical and Biochemical Pitfalls in the Diagnosis of Peroxisomal Disorders. Neuropediatrics 47, 205-20

Kronenberg F, Lobentanz EM, König P, Utermann G, Dieplinger H (1994): Effect of sample storage on the measurement of lipoprotein[a], apolipoproteins B and A-IV, total and high density lipoprotein cholesterol and triglycerides. J Lipid Res 35, 1318-28

Lieber DS, Hershman SG, Slate NG, Calvo SE, Sims KB, Schmahmann JD, Mootha VK (2014): Next generation sequencing with copy number variant detection expands the phenotypic spectrum of HSD17B4-deficiency. BMC Med Genet 15, 30

[1] Mit freundlicher Genehmigung von Henry Klemp

Marszalek JR, Lodish HF (2005): Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. Annu Rev Cell Dev Biol 21, 633-57

Martinez M (1995): Polyunsaturated fatty acids in the developing human brain, erythrocytes and plasma in peroxisomal disease: therapeutic implications. J Inherit Metab Dis 18, 61-75

Martinez M (2001): Restoring the DHA levels in the brains of Zellweger patients. J Mol Neurosci 16, 309-16

Martínez M, Vázquez E, García-Silva MT, Manzanares J, Bertran JM, Castelló F, Mougan I (2000): Therapeutic effects of docosahexaenoic acid ethyl ester in patients with generalized peroxisomal disorders. Am J Clin Nutr 71, 376S-85S

Mashima R, Tanaka M, Sakai E, Nakajima H, Kumagai T, Kosuga M, Okuyama T (2016): A selective detection of lysophosphatidylcholine in dried blood spots for diagnosis of adrenoleukodystrophy by LC-MS/MS. Mol Genet Metab Rep 7, 16-9

McMillan HJ, Worthylake T, Schwartzentruber J, Gottlieb CC, Lawrence SE, Mackenzie A, Beaulieu CL, Mooyer PA; FORGE Canada Consortium, Wanders RJ, Majewski J et al. (2012): Specific combination of compound heterozygous mutations in 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 4 (HSD17B4) defines a new subtype of D-bifunctional protein deficiency. Orphanet J Rare Dis 7, 90

Morita M, Honda A, Kobayashi A, Watanabe Y, Watanabe S, Kawaguchi K, Takashima S, Shimozawa N, Imanaka T (2018): Effect of Lorenzo's Oil on Hepatic Gene Expression and the Serum Fatty Acid Level in abcd1-Deficient Mice. JIMD Rep 38, 67-74

Moser AB, Borel J, Odone A, Naidu S, Cornblath D, Sanders DB, Moser HW (1987): A new dietary therapy for adrenoleukodystrophy: biochemical and preliminary clinical results in 36 patients. Ann Neurol 21, 240-9

Nanjee MN, Miller NE (1990): Evaluation of long-term frozen storage of plasma for measurement of high-density lipoprotein and its subfractions by precipitation. Clin Chem 36, 783-8

Paker AM, Sunness JS, Brereton NH, Speedie LJ, Albanna L, Dharmaraj S, Moser AB, Jones RO, Raymond GV (2010): Docosahexaenoic acid therapy in peroxisomal diseases: results of a double-blind, randomized trial. Neurology 75, 826-30

Pan Y, Scanlon MJ, Owada Y, Yamamoto Y, Porter CJ, Nicolazzo JA (2015): Fatty Acid-Binding Protein 5 Facilitates the Blood-Brain Barrier Transport of Docosahexaenoic Acid. Mol Pharm 12, 4375-85

Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK (2006): Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. Biochim Biophys Acta 1763, 1413-26

Poll-The BT, Gärtner J (2012): Clinical diagnosis, biochemical findings and MRI spectrum of peroxisomal disorders. Biochim Biophys Acta 1822, 1421-9

Rapoport SI (2013): Translational studies on regulation of brain docosahexaenoic acid (DHA) metabolism in vivo. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 88, 79-85

Rapoport SI, Rao JS, Igarashi M (2007): Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 77, 251-61

Reuber BE, Germain-Lee E, Collins CS, Morrell JC, Ameritunga R, Moser HW, Valle D, Gould SJ (1997): Mutations in PEX1 are the most common cause of peroxisome biogenesis disorders. Nat Genet 17, 445-8

Rizzo WB, Leshner RT, Odone A, Dammann AL, Craft DA, Jensen ME, Jennings SS, Davis S, Jaitly R, Sgro JA (1989): Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. Neurology 39, 1415-22

Rottensteiner H, Theodoulou FL (2006): The ins and outs of peroxisomes: co-ordination of membrane transport and peroxisomal metabolism. Biochim Biophys Acta 1763, 1527-40

Salem N Jr, Litman B, Kim HY, Gawrisch K (2001): Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. Lipids 36, 945-59

Sassa T, Wakashima T, Ohno Y, Kihara A (2014): Lorenzo's oil inhibits ELOVL1 and lowers the level of sphingomyelin with a saturated very long-chain fatty acid. J Lipid Res 55, 524-30

Schrader M, Fahimi HD (2004): Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. Histochem Cell Biol 122, 383-93

Schrader M, Fahimi HD (2006): Peroxisomes and oxidative stress. Biochim Biophys Acta 1763, 1755-66

Siskos AP, Jain P, Römisch-Margl W, Bennett M, Achaintre D, Asad Y, Marney L, Richardson L, Koulman A, Griffin JL et al. (2017): Interlaboratory Reproducibility of a Targeted Metabolomics Platform for Analysis of Human Serum and Plasma. Anal Chem 89, 656-665

Smith DW, Opitz JM, Inhorn SL (1965): A syndrome of multiple developmental defects including polycystic kidneys and intrahepatic biliary dysgenesis in 2 siblings. J Pediatr 67, 617-24

Steinberg SJ, Snowden A, Braverman NE, Chen L, Watkins PA, Clayton PT, Setchell KD, Heubi JE, Raymond GV, Moser AB et al. (2009): A PEX10 defect in a patient with no detectable defect in peroxisome assembly or metabolism in cultured fibroblasts. J Inherit Metab Dis 32, 109-19

Steinberg SJ, Raymond GV, Braverman NE, Moser AB (2003): Zellweger Spectrum Disorder. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al (Hrsg.): GeneReviews, University of Washington, Seattle, 1993-2021

Steinberg S, Jones R, Tiffany C, Moser A (2008): Investigational methods for peroxisomal disorders. Curr Protoc Hum Genet 17, 17.6

Svennerholm L (1968): Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. J Lipid Res 9, 570-9

Takemoto Y, Suzuki Y, Horibe R, Shimozawa N, Wanders RJ, Kondo N (2003): Gas chromatography/mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders. Brain Dev 25, 481-7

Tanaka K, Nishizawa K, Yamamoto H, Naruto T, Izeki E, Taga T, Shimada M, Saeki Y (1990): Analysis of very long-chain fatty acids and plasmalogen in the erythrocyte membrane: a simple method for the detection of peroxisomal disorders and discrimination between adrenoleukodystrophy and Zellweger syndrome. Neuropediatrics 21, 119-23

Theda C, Gibbons K, Defor TE, Donohue PK, Golden WC, Kline AD, Gulamali-Majid F, Panny SR, Hubbard WC, Jones RO et al. (2014): Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy: further evidence high throughput screening is feasible. Mol Genet Metab 111, 55-7

Theil AC, Schutgens RB, Wanders RJ, Heymans HS (1992): Clinical recognition of patients affected by a peroxisomal disorder: a retrospective study in 40 patients. Eur J Pediatr 151, 117-20.

Theodoulou FL, Holdsworth M, Baker A (2006): Peroxisomal ABC transporters. FEBS Lett 580, 1139-55

Van der Greef J, Smilde AK (2005): Symbiosis of chemometrics and metabolomics: past, present, and future. J. Chemometrics 19, 376-386

Van Woerden CS, Groothoff JW, Wijburg FA, Duran M, Wanders RJ, Barth PG, Poll-The BT (2006): High incidence of hyperoxaluria in generalized peroxisomal disorders. Mol Genet Metab 88, 346-50

Voigt RG, Jensen CL, Fraley JK, Rozelle JC, Brown FR, Heird WC (2002): Relationship between omega3 long-chain polyunsaturated fatty acid status during early infancy and neurodevelopmental status at 1 year of age. J Hum Nutr Diet 15, 111-20

Walter C, Gootjes J, Mooijer PA, Portsteffen H, Klein C, Waterham HR, Barth PG, Epplen JT, Kunau WH, Wanders RJ et al. (2001): Disorders of peroxisome biogenesis due to mutations in PEX1: phenotypes and PEX1 protein levels. Am J Hum Genet 69, 35-48

Wanders RJ (2004): Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review. Am J Med Genet A 126A, 355-75

Wanders RJ, Waterham HR (2005): Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. Clin Genet 67, 107-33

Wanders RJ, Waterham HR (2006): Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. Annu Rev Biochem 75, 295-332

Wanders RJ, Poll-The BT (2017): Role of peroxisomes in human lipid metabolism and its importance for neurological development. Neurosci Lett 637, 11-17

Wangler MF, Hubert L, Donti TR, Ventura MJ, Miller MJ, Braverman N, Gawron K, Bose M, Moser AB, Jones RO et al. (2018): A metabolomic map of Zellweger spectrum disorders reveals novel disease biomarkers. Genet Med 20, 1274-1283

Wilson GN, Holmes RG, Custer J, Lipkowitz JL, Stover J, Datta N, Hajra A (1986): Zellweger syndrome: diagnostic assays, syndrome delineation, and potential therapy. Am J Med Genet 24, 69-82

Wolf S, Schmidt S, Müller-Hannemann M, Neumann S (2010): In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. BMC Bioinformatics 11, 148

Yik WY, Steinberg SJ, Moser AB, Moser HW, Hacia JG (2009): Identification of novel mutations and sequence variation in the Zellweger syndrome spectrum of peroxisome biogenesis disorders. Hum Mutat 30, E467-80

Zeharia A, Ebberink MS, Wanders RJA, Waterham HR, Gutman A, Nissenkorn A, Korman SH (2007): A novel PEX12 mutation identified as the cause of a peroxisomal biogenesis disorder with mild clinical phenotype, mild biochemical abnormalities in fibroblasts and a mosaic catalase immunofluorescence pattern, even at 40 degrees C. J Hum Genet 52, 599-606

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Frau Prof. Dr. Jutta Gärtner bedanken, die mir eine Promotion an der medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Göttingen ermöglichte und diese stets unterstützt hat. Ich möchte auch das Bereitstellen der professionellen Ausrüstung des Labors, der verwendeten Utensilien und der Arbeitsbedingungen hervorheben und dafür meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. M. Oellerich danke ich für die Hilfestellung und für die Anregungen während der Promotion als Zweitbetreuer.

Besonders bei Priv. Doz. Dr. R. Krätzner möchte ich mich bedanken, der die Promotion mit großem persönlichem Einsatz, Begeisterung und fachlich hohem Niveau von Anfang bis Ende begleitet hat. Auch nach meinem Standortwechsel an die Universitätsmedizin Rostock, hatte Priv. Doz. Dr. R. Krätzner trotz der erschwerten Bedingungen für alle Fragen immer ein offenes Ohr. Seinen besonderen Einsatz und Unterstützung möchte ich hervorheben und mich dafür ausdrücklich bedanken. Mein Dank gilt nicht zuletzt den Mitarbeitern des Labors, die mich vor allem in der Anfangsphase mit großer Gelassenheit und Geduld eingewiesen und unterstützt haben.