

Aus dem

Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Geschäftsführende Direktorin:

Prof. Dr. Dr. Elisabeth Binder

Interim Ärztlicher Leiter/Chefarzt:

Prof. Dr. Peter Falkai

**Untersuchungen des Haut-Metaboloms
von Patient*innen mit Multipler Sklerose und
Gesunden im Vergleich**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christina Schmitt

aus München

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Ludwig Schaaf
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Andreas Wollenberg PD Dr. Robert Besch
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. Christoph Turck Dr. Frederik Dethloff
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	21.12.2023

„Daten sind nicht gleich Informationen; Information ist nicht gleich Wissen; und vor allem ist Wissen nicht gleich Weisheit. Wir haben Ozeane an Daten, Flüsse an Informationen, Pfützen an Wissen und den ein oder anderen Tropfen Weisheit.“ – Henry Nix, 1990.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Multiple Sklerose.....	7
1.1.1	Prävalenz und Verlauf der Erkrankung.....	7
1.1.2	Bedeutung der MS in Gesellschaft und Wirtschaft.....	8
1.1.3	Pathogenese und Risikofaktoren.....	10
1.1.4	Symptomatik und Diagnostik.....	12
1.1.5	Therapiemöglichkeiten und ihre Grenzen.....	15
1.2	Metabolom und Mikrobiom.....	19
1.2.1	Hintergrund von Mikrobiota und Mikrobiom.....	19
1.2.2	Metabolomik.....	24
1.2.3	Massenspektrometrie.....	28
1.2.3.1	Ablauf der Messung.....	28
1.2.3.2	Datenanalyse und Interpretation.....	29
1.2.3.3	Direktinfusion und ungezielte Massenspektrometrie.....	31
1.2.4	Metabolom bei Multipler Sklerose.....	32
2	Zielsetzung.....	33
3	Material und Methoden.....	34
3.1	Studiendesign und Ethikvotum.....	34
3.2	Untersuchungskollektiv.....	35
3.2.1	Ein – und Ausschlusskriterien.....	35
3.2.2	Rekrutierung.....	37
3.3	Ablauf der Studie.....	39
3.3.1	Anamnese und Untersuchung.....	39
3.3.2	Durchführung der Hautabstriche.....	39
3.4	Extraktion und Prozessierung der Proben.....	41

3.5	Vorbereitung zur Messung im Massenspektrometer	43
3.6	Messung im Massenspektrometer	44
3.7	Statistische Analyse	46
4	Ergebnisse	49
4.1	Untersuchungskollektiv	49
4.2	Signifikante Ergebnisse des Hautmetaboloms	51
4.2.1	Unterarme	51
4.2.1.1	Glutaryl-Glutaminsäure	53
4.2.2	Stirn	54
4.2.2.1	Myo-Inositol und D-Glucose	57
4.2.3	Mastoid	58
4.2.4	Mundschleimhaut	60
4.2.4.1	Mannitol	63
4.2.4.2	Raffinose	65
4.2.4.3	Stearinsäure	66
4.2.4.4	L-2-Aminoadipat	69
4.2.4.5	5,6-Dihydrothymin	70
4.3	Pathway enrichment analysis	72
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
5	Diskussion	76
5.1	Überblick	76
5.2	Interpretation	77
5.2.1	Unterscheidung nicht therapierter Patient*innen von Gesunden ..	77
5.2.2	Patient*innen und Proband*innen	81
5.2.3	Details der Varianzanalyse	87
5.2.4	Signifikante Metaboliten im Kontext der Mikrobiota	91
5.3	Stärken und Herausforderungen der Studie	93

5.3.1	Analyse der Methoden.....	93
5.3.2	Stärken und Schwächen der Ergebnisse.....	94
5.4	Ausblick.....	96
6	Zusammenfassung	98
7	Anhang	99
7.1	Details der Materialien.....	99
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	101
7.3	Tabellenverzeichnis.....	103
7.4	Abkürzungsverzeichnis	104
7.5	Patienteneinwilligung und -information.....	106
7.6	Probandeneinwilligung und -information	114
7.7	Anamnesebogen	122
8	Literaturverzeichnis.....	124
9	Danksagung.....	135
10	Eidesstaatliche Erklärung	136

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Prävalenz und Verlauf der Erkrankung

Weltweit leben etwa 2.8 Millionen Menschen mit der Erkrankung Multiple Sklerose (Abb. 1) (Federation, 2020).

Diese ist eine der häufigsten neurologischen Krankheiten. Menschen jeden Alters sind von Multipler Sklerose (MS) betroffen und sie gilt als eine der Hauptursachen für neurologische nicht-traumatische Behinderungen im jungen Erwachsenenalter (Browne et al., 2014).

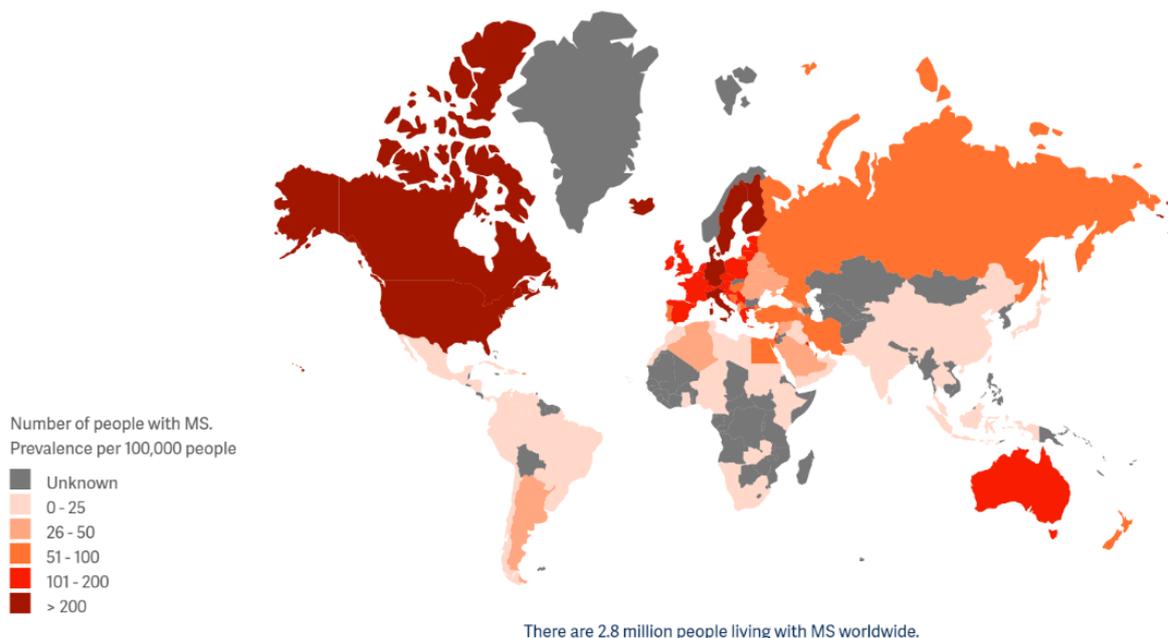


Abbildung 1: Anzahl an Menschen mit MS weltweit im Jahr 2020. Prävalenz der MS pro 100.000 Einwohner, siehe seitliche Legende. Open source, Multiple Sclerosis International Federation - Atlas of MS - 3rd Edition, September 2020 (Federation, 2020).

Die Hälfte der Patient*innen benötigt innerhalb von 15 Jahren nach Beginn der Symptome eine Gehhilfe (Noseworthy et al., 2000). Daran zeigen sich die Beeinträchtigungen, die mit der Erkrankung einhergehen können, unter anderem in sozialen und ökonomischen Bereichen.

Die Multiple Sklerose ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die mit Demyelinisierungen und degenerativen Prozessen einhergeht. Die häufigste Verlaufsform ist die schubförmig verlaufende MS (RRMS: relapse remitting multiple sclerosis). Diese betrifft 80% der Patient*innen und tritt meist in einem Alter zwischen 20 und 40 Jahren erstmalig auf. Frauen erkranken mit einem Verhältnis von 2:1 deutlich häufiger an MS als Männer. Bei etwa 20% der Patient*innen ist von Beginn der Erkrankung an eine primär progressive Verlaufsform zu beobachten (PPMS: primary progressive multiple sclerosis). Diese seltenere Form schreitet kontinuierlich voran und tritt bei Männern und Frauen ähnlich häufig auf (Noseworthy et al., 2000).

Die RRMS kann zehn bis zwanzig Jahre nach Erkrankungsbeginn einen Übergang in eine sekundär progressive Verlaufsform zeigen (SPMS: secondary progressive MS). Die schubförmige Verlaufsform RRMS ist charakterisiert durch ein plötzliches Auftreten von Schüben mit neurologischen Symptomen, die reversibel oder permanent sein können. Häufige Symptome sind ein Sehverlust oder Doppeltsehen, Muskelschwäche, Ataxien oder Sensibilitätsverluste.

Nach wie vor gibt es keine kurative Therapie der Erkrankung, aber inzwischen gibt es zunehmend mehr krankheitsmodulierende Therapien für die RRMS (s. 1.1.5). Diese können die Häufigkeit der Schübe und die Anzahl von nachweisbaren Läsionen in der Magnetresonanztomographie (MRT) nachweisbar reduzieren. Die MS kann jedoch nicht in jedem Fall vollständig aufgehalten werden (Reich et al., 2018).

1.1.2 Bedeutung der MS in Gesellschaft und Wirtschaft

In Ergebnissen eines MS-Registers in Deutschland zeigte sich nach einer auf fünf Zentren basierenden Schätzung, dass nach einer mittleren Krankheitsdauer von 13 Jahren und einem durchschnittlichen Alter von 43 Jahren nur noch zwei Fünftel der Erkrankten vollständig in der Lage waren, ihren Beruf auszuüben, wohingegen ein Drittel Erwerbsunfähigkeits- oder Berufsrente erhielt

(Flachenecker et al., 2005).

Dies hat soziale sowie wirtschaftliche Konsequenzen. Verursacht durch die Erkrankung entstehen ungefähr 40.000€ an Kosten jährlich pro Patient*in (Kobelt et al., 2006). Davon sind fast 40 %, also knapp 16.000€ bzw. ca. 13.000€ pro Patient*in jährlich durch das frühe Ausscheiden aus dem Berufsleben bedingt (Flachenecker et al., 2005). Die Arbeitskapazität nimmt mit zunehmender Beeinträchtigung durch die MS deutlich ab, siehe Tabelle 1.

Die Hochrechnung von Hein und Hopfenmüller erfasste etwa 122.000 an MS Erkrankte in Deutschland (Hein and Hopfenmüller, 2000).

Damit kann man die jährlichen Kosten in Deutschland, die durch MS entstehen, auf 122.000 mal 40.000€ schätzen, das ergibt etwa 4,88 Milliarden Euro, berechnet nach (Kobelt et al., 2006, Hein and Hopfenmüller, 2000). Im Vergleich zu 1990 zeigte sich bis 2008 nahezu eine Verdoppelung der jährlichen Kosten pro Patient*in mit MS innerhalb von weniger als 20 Jahren. Dies ist unter anderem durch die Einführung multipler Therapien innerhalb der letzten zwei Dekaden bedingt (Kobelt et al., 2017). In den USA werden die jährlichen Kosten, die im Zusammenhang mit Multipler Sklerose und ihrer Behandlung entstehen auf etwa 10 Milliarden US-Dollar geschätzt (Reich et al., 2018).

Arbeitsfähigkeit in Relation zum EDSS Score		
EDSS Score	Anteil unter 65-jähriger MS Patient*innen [%]	Anteil unter 65-Jähriger Arbeitnehmer*innen [%]
0-1	86	73
2-3	85,5	59
4	83	43
5-6	82	21
6.5	80	15
7	80	10
8-9	73	4

Tabelle 1: Arbeitsfähigkeit und Arbeitskapazität der unter 65-jährigen MS-Patient*innen in Relation zum EDSS Score. Der EDSS eignet sich anhand der Beurteilung von Beeinträchtigungen zur Verlaufsbeurteilung der Erkrankung, siehe 1.1.4, (Ruano et al., 2017). Ein niedriger EDSS ist mit einem hohen Anteil arbeitsfähiger Patient*innen verbunden. Bei höherem EDSS ist der Prozentsatz der Arbeitenden drastisch reduziert. Zusammenfassung und Anfertigung nach (Kobelt et al., 2006).

Wie durch die beschriebenen sozialen, beruflichen und ökonomischen Folgen deutlich wird, ist weitere Forschung in Bereichen wie der Therapie, Früherkennung und Verlaufsbestimmung von Patient*innen mit MS von hoher Relevanz.

1.1.3 Pathogenese und Risikofaktoren

Die MS gilt als organspezifische Autoimmunerkrankung (Hemmer et al., 2015). An der Entstehung und Pathogenese der MS sind multiple Faktoren beteiligt, deren Zusammenspiel noch nicht gänzlich verstanden ist. Bekannt ist, dass neurodegenerative und entzündliche Prozesse eine große Rolle spielen (Katz Sand, 2015). Von entscheidender Bedeutung ist die Demyelinisierung der Axone, die eine Verlangsamung oder eine Blockierung der axonalen Weiterleitung von Nervenimpulsen zur Folge hat. In den demyelinisierten Bereichen entstehen unter anderem inflammatorische Ödeme und astrozytische Narben. Die im Rahmen der entzündlichen Prozesse freigesetzten Zytokine können die Fortleitung der axonalen Signale zusätzlich hemmen (Noseworthy et al., 2000).

Es ist derzeit Gegenstand der Forschung, wie die weitere Entwicklung eines demyelinisierten Axons beeinflusst wird, denn es kann zu einer Rückbildung oder einer Remyelinisierung kommen, oder aber zu chronisch aktiven entzündlichen Prozessen, den „smoldering lesion[s]“ (Reich et al., 2018).

In entzündlichen Läsionen des ZNS sind insbesondere CD8-positive T-Lymphozyten und in geringerer Zahl B-Lymphozyten nachweisbar (Dobson and Giovannoni, 2019). Die CD8-positiven T-Zellen bedingen eine durch MHC I vermittelte Zytotoxizität. Auch CD4-positive T-Lymphozyten sind an der Pathogenese der MS beteiligt. Die Ausbildung von Autoantikörpern durch B-Lymphozyten führt schließlich zu der Demyelinisierung und Zytolyse, unter

anderem vermittelt durch Komplementfaktoren. Von Bedeutung für die entzündlichen Prozesse sind ebenfalls Zytokine wie der Tumornekrosefaktor α und Interferon γ , welche die Entstehung von Sauerstoff- und Stickstoff-Radikalen begünstigen (Noseworthy et al., 2000). B-Lymphozyten können proinflammatorische Effekte auf Läsionen zeigen, inzwischen erzielen erfolgreiche Therapieansätze eine Depletion der B-Zellen (Krumbholz et al., 2012).

Sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren spielen eine Rolle für die Entstehung und den Verlauf der MS. Das Verständnis für die Risikofaktoren wächst seit den letzten Jahren. Ein niedriger Vitamin D Spiegel, oft bedingt durch verringerte Sonneneinstrahlung, und Tabakkonsum gelten als Faktoren, die sich negativ auf eine Multiple Sklerose auswirken oder ihre Entstehung begünstigen. Eine bekannte Hypothese zur MS besagt, dass die Assoziation von einem erniedrigten Vitamin D Spiegel mit der Erkrankung erklären könnte, dass die Häufigkeit der MS mit zunehmender Entfernung vom Äquator steigt. Der reduzierte Vitamin D Spiegel beeinflusst wahrscheinlich die Differenzierung der T-Lymphozyten.

Als weiterer Risikofaktor gilt Fettleibigkeit in der Kindheit, sie scheint das Risiko für die Entwicklung einer MS zu verdoppeln. Übergewicht wiederum ist mit einem erniedrigten Vitamin D Spiegel assoziiert, sodass eine wechselseitige Interaktion dieser Umweltfaktoren das Risiko beeinflussen könnte (Thompson et al., 2018b, Hemmer et al., 2015, Jacobs et al., 2021).

Die Hygiene-Hypothese nimmt an, dass multiple Infektionen in der frühen Kindheit das Risiko für die Entwicklung von Allergien und Autoimmunerkrankungen senken. Dies wäre insbesondere in tropischen und subtropischen Gegenden der Fall (Thompson et al., 2018b).

Im Gegensatz dazu wurde ein Zusammenhang zwischen einer Infektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) und dem Auftreten von Multipler Sklerose festgestellt, EBV kann als kausaler Faktor vermutet werden (Bjornevik et al., 2022). In einer Kohorte von über 10 Millionen jungen Erwachsenen war nach einer Infektion mit EBV das Risiko mehr als dreißigfach erhöht (Bjornevik et al., 2022).

Bei an MS Erkrankten treten symptomatische EBV-Infektionen häufiger auf, auch die serologisch bestätigte Prävalenz von EBV ist im Vergleich zur Gesamtbevölkerung erhöht (Jacobs et al., 2020).

Neben den umweltbedingten und äußerlichen Faktoren, die mit der Erkrankung assoziiert sind, gibt es auch Beobachtungen zu genetischen Risikofaktoren. Erstgradig Verwandte eines Menschen mit MS sind mit einem 10-25-fachem Risiko behaftet, selbst an MS zu erkranken (Ramagopalan et al., 2010).

Als ein bekannter genetischer Faktor für viele Autoimmunerkrankungen gilt die human leucocyte antigen (HLA) Region des sechsten Chromosoms. Sie ist auch in der Entstehung der MS relevant. Ein bestimmtes Allel der HLA Klasse II, das als „HLA-DRB1*15:01“ bezeichnet wird, bewirkt - im Gegensatz zu Menschen ohne diese genetische Ausprägung - ein etwa dreifach erhöhtes Risiko, an MS zu erkranken (Thompson et al., 2018b, Hemmer et al., 2015).

Man weiß inzwischen, dass die genannte HLA-Ausprägung insbesondere in Nordeuropa verbreitet ist, wohingegen in anderen Regionen wie beispielsweise Sardinien andere Ausprägungen dominieren, zum Beispiel HLA-DRB1*0301. Die MS wird jedoch nicht durch ein einzelnes Gen, sondern durch multiple Genlokalisierungen, auch außerhalb des HLA-Lokus, beeinflusst. Zudem wird eine Interaktion zwischen dem HLA-Genotyp und EBV diskutiert (Ramagopalan et al., 2010, Thompson et al., 2018b, Jacobs et al., 2020).

1.1.4 Symptomatik und Diagnostik

Im Folgenden wird die schubförmig-remittierende Verlaufsform der MS (RRMS) beschrieben. Das erstmalige Auftreten von Symptomen, die für eine RRMS sprechen, wird als „Klinisch isoliertes Syndrom“ (KIS bzw. CIS: Clinically isolated syndrome) bezeichnet. Da das CIS den ersten Schub der Erkrankung umfasst, ist die MS zu diesem Zeitpunkt noch nicht diagnostiziert. Ein Schub ist definiert als eine Phase mit neurologischen Symptomen, die mindestens 24 Stunden anhalten und typisch für eine MS sind. Ein Schub kann nur als ein solcher

bezeichnet werden, wenn die Symptome unabhängig von einer Infektion und von Fieber auftreten. Die Symptomatik ist abhängig von der Lokalisation der entzündlichen Läsion des zentralen Nervensystems (Thompson et al., 2018a).

Typische neurologische Symptome im Rahmen eines CIS sind ein Sehverlust durch eine Sehnervenentzündung (Optikus Neuritis), Rückenmarksyndrome mit z.B. Sensibilitätsstörungen in den Extremitäten oder Hirnstammsyndrome, die zu dem Auftreten von Doppelbildern führen können. In der Regel entwickeln sich die Symptome über Stunden oder Tage, halten dann über Wochen an und bilden sich anschließend schrittweise zurück. Oft bleiben nach einem Schub residuale Symptome oder Einschränkungen zurück. Mit der zunehmenden Dauer der Erkrankung sinkt die neuronale regenerative Fähigkeit, sich von Schüben zu erholen und die Behinderungen nehmen zu. Ein klinisch symptomatischer Schub sowie eine in der Magnetresonanztomographie (MRT) sichtbare bzw. eine symptomatische Läsion wird in der Regel zugleich von weiteren asymptomatischen Läsionen begleitet (Dobson and Giovannoni, 2019, Katz Sand, 2015).

MRT Diagnosekriterien der MS	
Örtliche Dissemination	Mindestens eine T2-hyperintense Läsion in mindestens zwei von vier definierten Arealen*
Zeitliche Dissemination	Zeitgleiches Auftreten von KM-aufnehmenden und nicht-aufnehmenden Läsionen im MRT <u>oder</u> Nach einer stattgefundenen Voraufnahme in einer weiteren MRT-Aufnahme neue T2-hyperintense oder KM-aufnehmende Läsion(en)

Tabelle 2: MRT Diagnosekriterien der MS nach den McDonald Kriterien 2017.

* Definierte Areale zur Erfüllung der örtlichen Dissemination: *periventriculäre, infratentorielle, kortikale oder juxtakortikale und spinale Bereiche*.

KM: Kontrastmittel (Gadolinium); Tabelle angefertigt nach (Thompson et al., 2018a).

Entscheidend für die Diagnose einer RRMS ist neben den klinischen Zeichen die zeitliche und örtliche Dissemination. In der Diagnostik nehmen die neurologische Untersuchung und die MRT (s. Tab. 2) einen großen Stellenwert ein. Maßgebend in der Diagnostik der MS sind die Kriterien nach McDonald. Seit deren

Aktualisierung im Jahr 2017 ist es nicht mehr entscheidend, ob es sich bei den im MRT nachweisbaren Läsionen um symptomatische oder asymptomatische Läsionen handelt. Eine Läsion ist definiert als ein mindestens 3 mm messendes Areal, welches im MRT bei einer T2-Wichtung als hyperintens erscheint. Im Rahmen eines CIS kann die Diagnose mittels klinischer Symptomatik und zusätzlich mittels MRT laut McDonald Kriterien 2017 wie in Tabelle 2 dargestellt erfolgen (Thompson et al., 2018a).

Bei 80 % der Patient*innen mit CIS, die sich im Anfangsstadium der MS befinden, sind Auffälligkeiten im MRT nachweisbar. Wegweisend für die Diagnosestellung können außerdem elektrophysiologische Untersuchungen und die Analyse des Liquors sein. Die folgenden Befunde der zerebrospinalen Flüssigkeit können die Diagnosestellung stützen: z.B. Immunglobulin G (IgG) - oligoklonale Banden, die nicht im Serum nachweisbar sind; ein erhöhter IgG Index oder eine normale bis leicht erhöhte Leukozytenzahl (Brownlee et al., 2017).

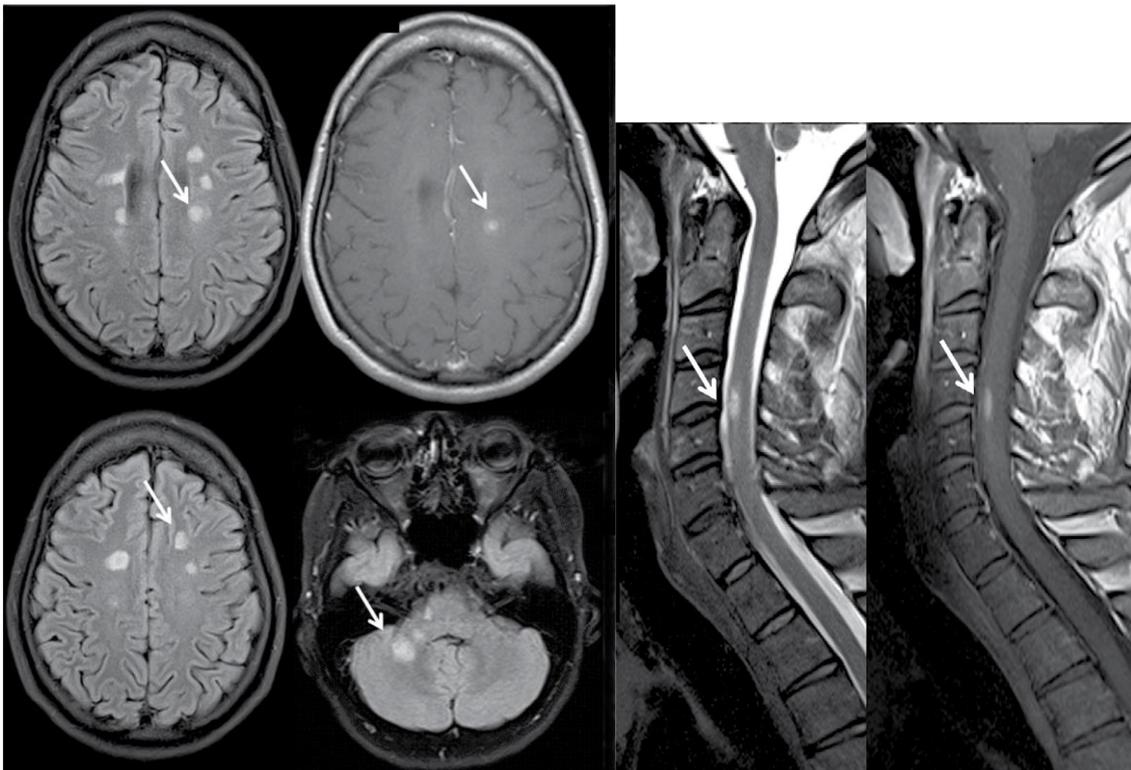


Abbildung 2: Typische MS Läsionen in Gehirn (links) und Rückenmark (rechts).

Die Pfeile deuten auf umschriebene hyperintense Läsionen. Linkes Bild: Axiale MRT Aufnahmen. Obere Reihe: Periventrikuläre Läsionen, oben rechts mit Kontrastmittelaufnahme, Untere Reihe: links juxtakortikale, rechts infratentoriale Läsionen.

Rechtes Bild: Sagittale MRT-Aufnahmen des zervikalen Rückenmarks, rechts mit Kontrastmittelanreicherung. Lizenz und Genehmigung zur Verwendung durch Elsevier (Lizenznummer: 5451780886879) (Brownlee et al., 2017).

Die Einteilung der MS kann durch den EDSS, den „Expanded Disability Status Scale“ erfolgen. Dieser gibt neurologische Beeinträchtigungen und das Ausmaß der Behinderung durch die MS auf einer Skala von Null bis Zehn an. Der EDSS basiert auf acht neurologischen Funktionen, welche klinisch untersucht werden. Darunter zählen unter anderem die Funktionen des Kleinhirns, der Blase oder des Sehens. Beispielsweise ein Grad 5 nach EDSS bedeutet eine schwere Behinderung mit deutlichen Alltagseinschränkungen, jedoch ist ein selbstständiges Gehen von 200 Metern möglich. Ein Grad 10 bedeutet den Tod durch MS (Kurtzke, 1983, Gold, 2014).

Der EDSS eignet sich zur objektiven Verlaufsbeurteilung der Erkrankung, jedoch unter starker Berücksichtigung der Gehstrecke (Ruano et al., 2017).

1.1.5 Therapiemöglichkeiten und ihre Grenzen

Nach wie vor ist die MS eine unheilbare Erkrankung. Heutzutage gibt es eine zunehmende Anzahl an verlaufsmodifizierenden Medikamenten für die RRMS. Interferone stellten 1993 die ersten dieser Behandlungsmöglichkeiten dar (s. Abb. 3). Die verlaufsmodifizierenden Therapien werden angewandt, um die Anzahl der Schübe zu verringern und das Voranschreiten der Behinderung zu bremsen (Montalban et al., 2018).

Zur verlaufsmodifizierenden Behandlung zugelassen sind unter anderem Interferon beta, Glatirameracetat, Cladribin und oral verabreichte Präparate wie Fingolimod, Dimethylfumarat und Teriflunomid (s. Tab. 3). Einen zunehmenden Stellenwert nehmen monoklonale Antikörper ein: Natalizumab, Alemtuzumab und Daclizumab (Reich et al., 2018).

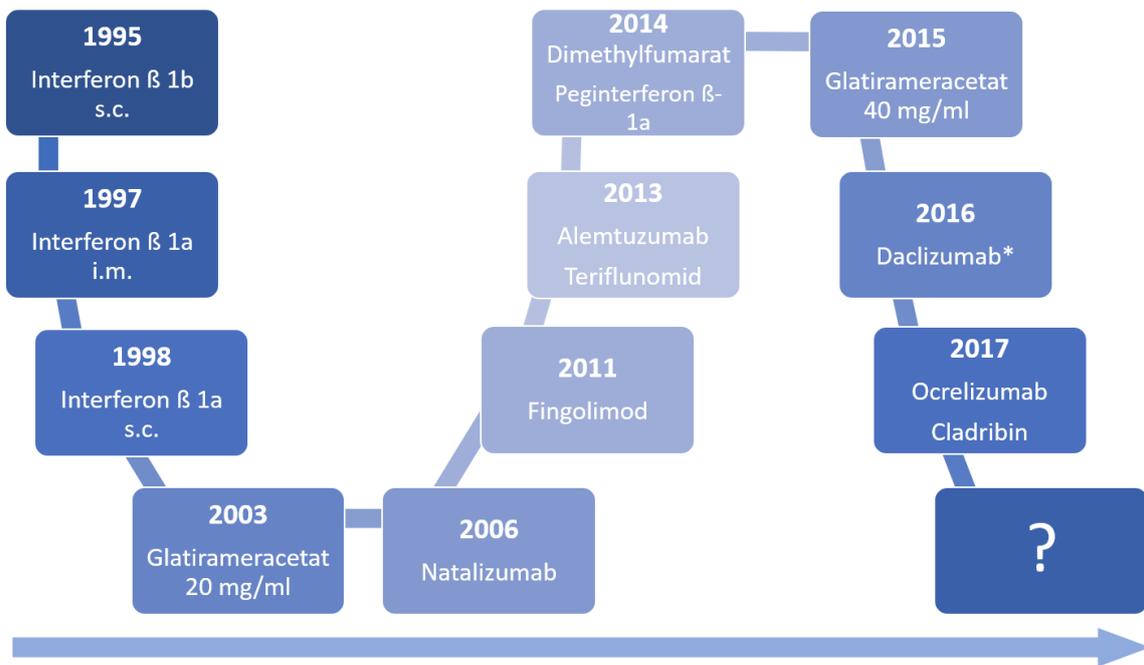


Abbildung 3: Zeitliche Entwicklung/Zulassung der verlaufsmodifizierenden Medikamente gegen MS. Bei den genannten Therapien handelt es sich um Zulassungen für die schubförmige Form (RRMS). Eine Ausnahme hierfür ist Ocrelizumab, welches auch zusätzlich für die progressive Verlaufsform (PPMS) zugelassen ist. * Daclizumab: die Zulassung wurde später aufgrund inflammatorischer ungeklärter Nebenwirkungen zurückgezogen. Eigene Anfertigung nach (Thompson et al., 2018b).

Die bisher genannten Therapiemöglichkeiten sind für die schubförmig-remittierende Verlaufsform zugelassen (s. Tab. 3). Cladribin ist seit 2017 in Deutschland für die Therapie der MS neu zugelassen. Als Zytostatikum wurde es zuvor in der Therapie der Haarzell-Leukämie angewendet (KKNMS, 2022). Der Antikörper Ocrelizumab erhielt als einziges Medikament zusätzlich die Zulassung für die primär progressive Verlaufsform der MS und gilt als erste B-Lymphozyten-spezifische Therapie. Der Grund für seine Wirksamkeit bei der PPMS ist bisher unklar. Es ist anzunehmen, dass ein vollständiges Aufhalten der Progression bisher nicht möglich ist (Reich et al., 2018). Ein frühzeitiger Behandlungsansatz geht für Patient*innen mit MS mit einer langfristig besseren Prognose einher (He et al., 2020).

Prinzipiell wird die RRMS sowie das KIS nach dem folgenden Schema behandelt:

Verlaufsmodifizierende Therapien

Verlaufsform	KIS	RRMS
(Hoch-)aktiv Erst-sowie Zweitlinientherapie		<u>Gepulste Therapien</u> <ul style="list-style-type: none"> • Alemtuzumab • Cladribin • Ocrelizumab <u>Kontinuierliche Therapien</u> <ul style="list-style-type: none"> • Ofatumumab • Natalizumab • S1P-Modulatoren (Fingolimod, Ozanimod, Ponesimod)
Mild/ Moderat Basistherapie	<ul style="list-style-type: none"> • Interferon β 1a (i.m. und s.c.) • Interferon β 1b (s.c.) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dimethylfumarat /Diroximelfumarat • Glatirameracetat • Interferone • Teriflunomid • (Azathioprin)

Tabelle 3: Verlaufsmodifizierende Therapiemöglichkeiten der RRMS sowie des KIS. Darstellung der aktuellen Therapiemöglichkeiten der zwei hier beschriebenen und in dieser Studie untersuchten Formen. KIS: Klinisch isoliertes Syndrom. RRMS: schubförmig verlaufende MS. Anfertigung und Verwendung nach Genehmigung durch das KKNMS (KKNMS, 2022).

Die Wirkung der meisten verlaufsmodifizierenden Medikamente beruht auf einer Hemmung der Neuroinflammation. Dadurch könnte additiv die Neurodegeneration beeinflusst werden. Gegen die Entwicklung der Gehirnatrophie zeigten die Medikamente bisher mäßige Wirksamkeit (Thompson et al., 2018b). Die stärker wirksamen Medikamente zur Behandlung der MS bergen auch ein größeres Risiko an schwerwiegenden Nebenwirkungen, beispielsweise bei Alemtuzumab oder bei Natalizumab. Alemtuzumab kann potenziell schwere Infektionen mit Listerien hervorrufen. Natalizumab, aber selten auch Ocrelizumab, Rituximab, Dimethylfumarat oder Fingolimod konnten mit der Nebenwirkung einer progressiv multifokalen Leukenzephalopathie (PML) in Verbindung gebracht werden (Thompson et al., 2018b).

Die PML ist eine demyelinisierende Erkrankung, die mit der Lyse und Infektion von Gliazellen einhergeht und durch den humanen Polyomavirus JC verursacht wird, benannt nach John Cunningham. Nach einer asymptomatischen Erstinfektion in der Kindheit kann das JC-Virus in Organen persistieren und

später bei starker Immunsuppression eine oft tödlich verlaufende PML verursachen. Äußern kann sich eine PML durch neurologische Symptome, wie eine Muskelschwäche oder Aphasie, jedoch im Gegensatz zur MS meist ohne das Rückenmark oder die Sehnerven zu betreffen (Tan and Korolnik, 2010). Präventiv wird bei Patient*innen mit geplanter Natalizumab Therapie vor und während der Behandlung der Antikörper-Titer des JC-Virus bestimmt und die Therapie entsprechend angepasst (Thompson et al., 2018b).

Ein akuter Schub im Rahmen der RRMS wird mit Corticosteroiden behandelt. Dies kann die Rückbildung der Symptome beschleunigen und zu einer schnelleren Erholung beitragen. Verabreicht werden üblicherweise 1000 mg Methylprednisolon intravenös für drei Tage. Laut aktueller Studienergebnisse ist allerdings die intravenöse Gabe des Methylprednisolons unerwarteterweise nicht zwingend vorteilhaft gegenüber der oralen Verabreichung. Bei fehlender Besserung der Symptome kann ein zweiter Zyklus mit Methylprednisolon erwogen werden. Als dritte Eskalationsstufe kann bei Symptompersistenz die Plasmapherese angewendet werden, die bei fast drei Viertel der Patient*innen im MS-Schub Erfolge zeigte (Thompson et al., 2018b).

Eine neue Entwicklung in der Therapie der MS stellt die autologe hämatopoetische Stammzell-Transplantation dar. Dadurch konnte die entzündliche Aktivität der MS bei etwa drei Viertel der Patient*innen für bis zu vier oder fünf Jahre unterdrückt werden (Muraro et al., 2017). Somit könnte die Stammzell-Transplantation nach der Durchführung einer Immunoablation insbesondere für junge Patient*innen mit kurzer Krankheitsdauer eine langfristig wirksame Therapie sein, wobei weitere Forschung in diesem Gebiet erforderlich ist (Muraro et al., 2017). Andere neuartige Therapieansätze haben die Remyelinisierung der beschädigten Neurone als Ziel (Reich et al., 2018).

1.2 Metabolom und Mikrobiom

1.2.1 Hintergrund von Mikrobiota und Mikrobiom

Unter dem Begriff „Mikrobiota“ versteht man den Komplex aus Mikroorganismen, zusammengesetzt aus Bakterien, Archaeen, Protisten aber auch Viren und Pilzen, die eine ökologische Nische oder einen Körper besiedeln (Byrd et al., 2018, Skolnick and Greig, 2019). Das „Mikrobiom“ bezeichnet die Gesamtheit der Gene dieser Mikroorganismen (Byrd et al., 2018). Andererseits wird der Begriff „Mikrobiom“ häufig als Synonym für Mikrobiota verwendet wie auch im folgenden Text (Skolnick and Greig, 2019).

Es ist bekannt, dass die Mikroorganismen des menschlichen Körpers Einfluss auf unsere Gesundheit haben. Die Diversität der Mikrobiota konnte bisher nur teilweise erfasst werden. 2019 wurden durch Pasolli et al. 4930 verschiedene Spezies gefunden, wobei davon mehr als drei Viertel erstmalig beschrieben wurden (Pasolli et al., 2019).

In bekannten Schätzungen, die auf Hochrechnungen aus den 1970er Jahren beruhen, wurde angenommen, dass die Anzahl an Bakterien zehnfach oder sogar hundertfach höher sei als die Anzahl menschlicher Zellen im Körper (Savage, 1977, Luckey, 1972). Entgegen diesen Erwartungen zeigte sich in neuen Berechnungen aus dem Jahr 2016 mit einer höheren Anzahl an empirischen Daten durch Sender et al., dass das früher angenommene Verhältnis von 10:1 durch ein neues Verhältnis von 1,3:1 von Bakterien zu menschlichen Zellen ersetzt werden sollte (Sender et al., 2016b, Sender et al., 2016a). Der menschliche Körper enthält etwa $3,0 \times 10^{13}$ Zellen, wobei Erythrozyten den größten Anteil ausmachen. Der Großteil der Bakterien des menschlichen Körpers befindet sich im Dickdarm und wird auf etwa $3,8 \times 10^{13}$ geschätzt. Bezüglich der übrigen Organe des menschlichen Körpers geht man zusätzlich von einer Menge von 10^{12} Bakterien aus. Damit ergibt sich eine Menge von 0,2 kg Bakterien des menschlichen Körpers, angewandt auf einen 70 kg schweren erwachsenen Mann (Sender et al., 2016b).

Jedoch muss auch die Menge an Viren, Pilzen und anderen Mikroorganismen

einbezogen werden, die ebenfalls Teil des Mikrobioms sind. Diese umfassen eine Größenordnung, die mindestens der der Bakterien entspricht. Insgesamt stammen im und auf dem menschlichen Körper etwa zwei Millionen Gene von Mikroben, jedoch nur etwa 20 000 vom Menschen, siehe Abbildung 4 (Gilbert et al., 2018).

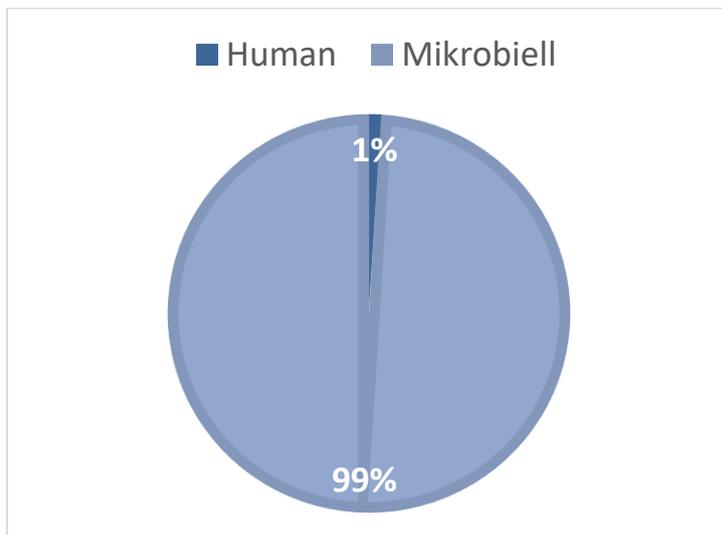


Abbildung 4: Gene in und auf dem menschlichen Körper. Verhältnis der Gene humanen und mikrobiellen Ursprungs. Eigene Anfertigung nach (Gilbert et al., 2018).

Das Mikrobiom des Darms ist bereits längere Zeit Gegenstand der Forschung. Dubos et al. veröffentlichten bereits 1965 eine Studie, in der bei Mäusen festgestellt wurde, dass die Bakterienflora je nach Mäusekolonie und je nach Abschnitt des Gastrointestinaltrakts unterschiedliche vorherrschende Bakterienstämme zeigte. Beispielsweise kamen Lactobazillen im gesamten Verdauungsapparat vor, wohingegen Bacteroides nur im Kolon vorkamen (Dubos et al., 1965).

Multiple Faktoren sind an der Interaktion zwischen unserer Gesundheit und dem Darmmikrobiom beteiligt, so ist unsere Ernährung entscheidend für die Zusammensetzung des Mikrobioms. Es wird angenommen, dass dieses bei Dysbiose, also einem Ungleichgewicht zugunsten ungünstiger Bakterienstämme, relevant in der Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen und Infektionen ist (Thursby and Juge, 2017).

Wichtige Funktionen des Darmmikrobioms für den Menschen sind unter anderem der Schutz gegen pathogene Erreger, die Produktion von Vitaminen wie z.B. Vitamin B12 oder Folsäure und die Erhaltung epithelialer Integrität der Darmwand. Bedeutsam ist auch die wechselseitige Interaktion der Mikrobiota mit unserem Immunsystem, denn bei keimfreien Mäusen ohne Darmmikrobiom wurden deutlich reduzierte Anzahlen der CD4+ T-Lymphozyten festgestellt, die eine wesentliche Rolle für die Immunabwehr innehaben (Thursby and Juge, 2017).

Evolutionär bedingt ist eine Symbiose zwischen den gastrointestinalen Mikrobiota und dem Menschen entstanden (Dubos et al., 1965).

Multiple weitere Faktoren haben Einfluss auf die Zusammensetzung und Diversität der Mikroben, z.B. Rauchen, Wohnumgebung, Operationen, Medikamente und Depression (Abb. 5). Die Diversität und Menge der Mikrobiota wird durch Antibiotika drastisch reduziert (Thursby and Juge, 2017).

Aber auch Medikamente wie Antihistaminika, Hormonpräparate und andere formen das Mikrobiom, beispielsweise beeinflusst Metformin die Zusammensetzung stärker als die damit behandelte Erkrankung, Diabetes mellitus Typ 2 (Schmidt et al., 2018).

Einprägsame Beispiele für Erkrankungen, die mit einer Dysbiose des Darmmikrobioms einhergehen, sind zum einen die Adipositas, bei der Erkrankte eine deutliche Reduktion der Diversität und Menge aufweisen (Kau et al., 2011, Schmidt et al., 2018). Zum anderen wurde eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Depressionen und einer Dysbiose beobachtet (Valles-Colomer et al., 2019). Es wird von einer Verbindung zwischen dem Darmmikrobiom und dem zentralen Nervensystem ausgegangen, auch bekannt als „gut-brain-axis“ (Valles-Colomer et al., 2019). Es bleibt Gegenstand der Forschung, ob eine Erkrankung durch Veränderungen der Mikrobiota entsteht oder ob die Krankheit ursächlich für die Dysbiose ist (Schmidt et al., 2018).

Hochinteressant ist die Beobachtung, dass unser Mikrobiom die Effektivität eines Medikaments und somit das Ansprechen auf die Therapie erheblich beeinflussen kann. Beispielsweise kann das Darmmikrobiom durch veränderten Medikamentenmetabolismus das Ansprechen auf L-Dopa bei Morbus Parkinson

oder auch das Ansprechen auf Immuntherapien gegen Krebs bestimmen (Lee-Sarwar et al., 2020). Es wurde nachgewiesen, dass bei Melanompatient*innen mit relevantem Therapieansprechen auf anti-PD1-Immuntherapien eine signifikant höhere Diversität des Darmmikrobioms vorlag (Gopalakrishnan et al., 2018).

Bisher deutlich unbekannter als das Darmmikrobiom ist das Hautmikrobiom. Die Haut als größtes Organ des Menschen beherbergt eine Anzahl von etwa 10^{11} Mikroorganismen (Schmidt, 2020, Sender et al., 2016b).

Das Hautmikrobiom zeigt eine intrapersonelle Stabilität von bis zu zwei Jahren, vergleichbar mit der des Darmmikrobioms (Oh et al., 2016).

Viele verschiedene Schichten und Hautanhängsel wie Drüsen oder Haarfollikel dienen als Nischen für unterschiedliche Arten an Mikroorganismen, beispielsweise finden sich in Schweißdrüsen Propionibakterien, Staphylokokken und Corynebakterien, wohingegen Haarfollikel zusätzlich Malassezia als Hefepilze enthalten (Byrd et al., 2018). Herausfordernd für die Analyse des Hautmikrobioms sind die Variationen der Arten abhängig von der Lokalisation der Hautstelle und vom hygienischen Zustand der Person. Neben der Aufrechterhaltung der Symbiose mit den Mikrobiota besitzt die Haut noch viele weitere Funktionen wie den Schutz vor äußeren Einflüssen und vor pathogenen Erregern (Schmidt, 2020).

Für Hauterkrankungen wurden bereits einige interessante Entdeckungen offengelegt, die ein Potenzial zur Vertiefung besitzen. Beispielsweise konnte 2017 gezeigt werden, dass die Erkrankung Atopische Dermatitis, als Neurodermitis bekannt, topisch effektiv mit *Staphylokokkus hominis* behandelt werden kann, sodass es zu einer deutlichen Reduktion der Symptome kommt. Man weiß, dass im Falle dieser Erkrankung häufig ein Ungleichgewicht des Hautmikrobioms zugunsten von *Staphylokokkus aureus* besteht.

Anstatt diese Bakterien mittels antibiotischer Substanzen zu eliminieren, ist dieser neue Ansatz vielversprechend: ein Ausgleich der Dysbiose durch topische Anwendung von *Staphylokokkus hominis* (Schmidt, 2020).

Weitere dermatologische Erkrankungen wie z.B. Allergien werden ebenfalls maßgeblich durch das Mikrobiom beeinflusst (Lehtimäki et al., 2017).

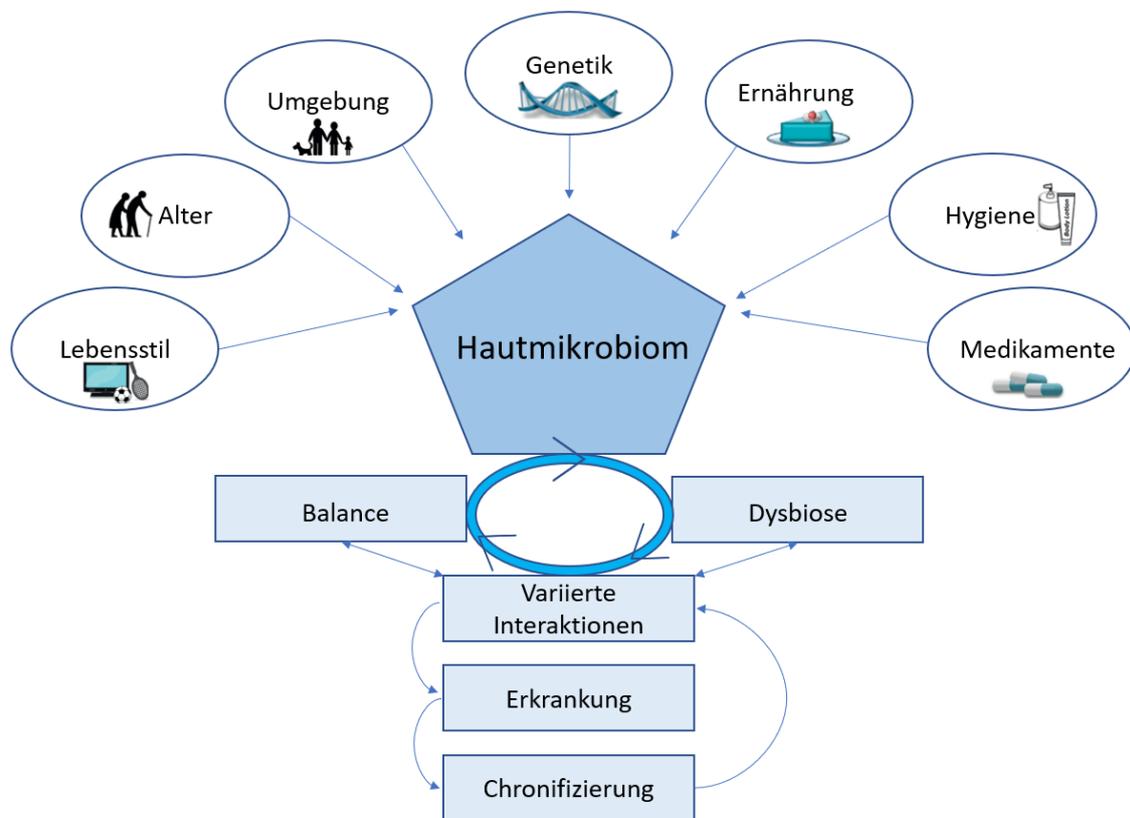


Abbildung 5: Interaktionen des Hautmikrobioms. Einflussfaktoren auf die Mikrobiota sowie mögliche Folgen wie Dysbiose und Erkrankung. Variable Interaktionen zwischen Hautmikrobiom und Immunsystem. Angefertigt und ergänzt nach (Schommer and Gallo, 2013).

Ebenfalls von Interesse sind die Pathomechanismen der Erkrankung Rosazea, eine häufige chronische inflammatorische Hauterkrankung. Die Erkrankten zeigen eine Dysbiose des Hautmikrobioms zugunsten von *Demodex folliculorum*, sodass von einem Zusammenhang zwischen diesen Mikroorganismen und der Erkrankung ausgegangen wird. Sie tritt oft gemeinsam mit Komorbiditäten auf: kardiovaskuläre, psychische, gastrointestinale und neurologische Krankheiten sind bei Patient*innen mit Rosazea deutlich gehäuft. Anhand dieses Beispiels wurde die Hypothese der vorher erwähnten „Gut-Brain-Axis“ erweitert zu der „Gut-Brain-Skin-Axis“ (Woo et al., 2020). Diese soll auf wechselseitigen Interaktionen zwischen Darm, Gehirn und Haut beruhen und zeigt sich in den Komorbiditäten bei Rosazea: eine erhöhte Prävalenz von *Helicobacter pylori* -

ein gastrointestinal auftretendes Bakterium, das Gastritis, Magenulcera und Magentumore auslösen kann - könnte zeigen, dass genannte Infektion ein Risikofaktor für die Entwicklung der Rosazea ist. Die Eradikation des *Helicobacter pylori* führte zu einer Verbesserung der Symptome der Rosazea (Woo et al., 2020).

Einen bedeutenden Ansatz zur Erforschung der Komplexität des Mikrobioms stellt das Metabolom dar.

1.2.2 Metabolomik

Das Metabolom ist die Summe aller Metabolite, Fett- und Aminosäuren sowie Kohlenhydrate, die in einem System enthalten sind. Bei diesem System kann es sich zum Beispiel um einen menschlichen Körper, um eine Zelle, um einzelne Organe oder um andere Lebewesen handeln. Unter dem Begriff Metabolomik versteht man die Analyse und wissenschaftliche Erforschung von Metabolitenprofilen (Rochfort, 2005, Fiehn, 2001, Hasin et al., 2017).

Metabolomik gilt in der Forschung als vielversprechender Ansatz für die Identifizierung von Biomarkern für Erkrankungen (Kaddurah-Daouk et al., 2008, Hasin et al., 2017).

Die Größe des menschlichen Metaboloms ist nach wie vor Gegenstand der Forschung, verschiedene Untersuchungen schwanken zwischen wenigen Tausenden bis mehreren Zehntausenden Metaboliten (Kaddurah-Daouk et al., 2008). Im Pflanzenreich geht man von bis zu 200 000 Metaboliten aus (Goodacre et al., 2004).

Die Metaboliten einer Probe haben verschiedene Quellen: die besiedelnden Mikrobiota, die Zellen des Wirts, oder aber die Kombination oder Interaktion von Wirt und Mikrobiom. Die Analyse des Metaboloms gibt somit einen Einblick in die Funktionen des Mikrobioms und deren Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen (Lee-Sarwar et al., 2020).

Interessanterweise wurde festgestellt, dass keimfrei gezüchtete Mäuse, denen

faktisch das Mikrobiom entzogen wurde, ein gänzlich anderes Metabolom aufweisen als konventionelle Mäuse, die ein natürliches Mikrobiom besitzen. Nicht nur im Darm oder Plasma, sondern auch in Organen wie Leber oder Niere wurden Unterschiede der Biosignaturen beobachtet (Lee-Sarwar et al., 2020).

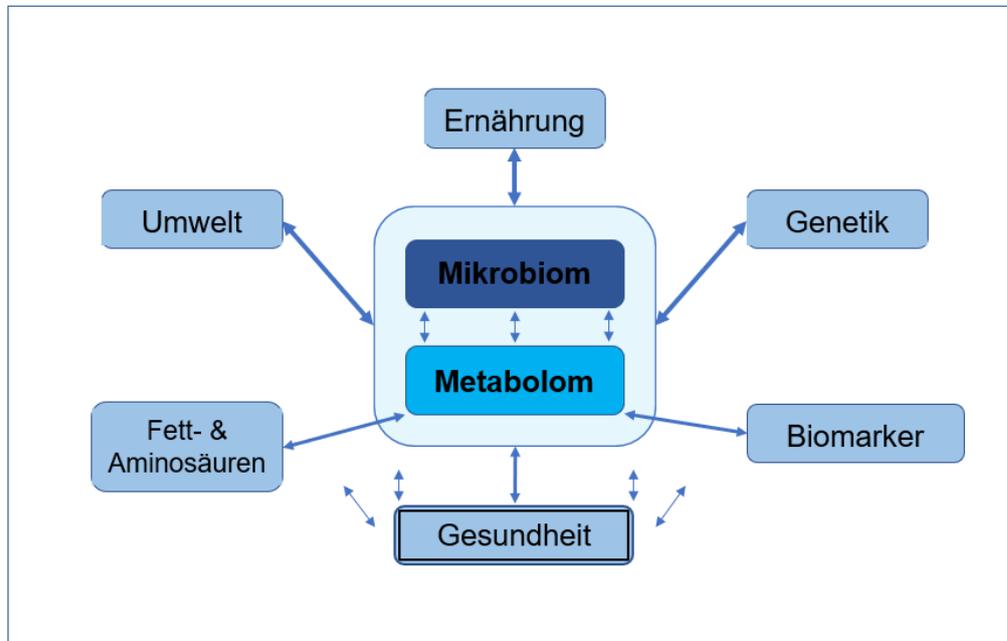


Abbildung 6: Relationen von Metabolom und Mikrobiom. Zwischen allen dargestellten Faktoren bestehen Interaktionen. Eigene Anfertigung und Ergänzung, orientierend an: (Lee-Sarwar et al., 2020).

Das Vorkommen der Metaboliten hängt zum einen von einer vermehrten oder reduzierten Expression der zuständigen Gene ab (Oliver et al., 1998). Zum anderen basiert es auf der Interaktion dieser Gene mit verschiedenen Umweltfaktoren (Abb. 6) (Rochfort, 2005).

Der sogenannte "Omics"-Forschungsansatz für Erkrankungen begann ursprünglich mit der Untersuchung des Genoms, den „Genomics“. Die Endung „-Omics“ steht für die Erforschung der Anordnung einer Gruppe von Molekülen. Wie in Abbildung 7 dargestellt, ist das Genom als einzige Ebene nicht primär von Umweltfaktoren abhängig, wohingegen die weiteren Ebenen auf der Interaktion der Genetik mit Umweltfaktoren beruhen. Für alle der dargestellten Ebenen eines Systems, die sich wechselseitig beeinflussen können, sind Assoziationen mit verschiedenen Erkrankungen bekannt. Das Epigenom umfasst Modifizierungen der DNA, beispielsweise durch Methylierung. Das Transkriptom beschreibt das Intermediat zwischen DNA und Protein, die RNA. Das Proteom ist die Summe

der Proteine sowie ihrer Funktionen. Das Metabolom beinhaltet die kleinen Moleküle als Stoffwechselprodukte der Zellen, wohingegen das Mikrobiom die Mikroorganismen eines Systems umschreibt. Alle diese Ebenen wirken sich einzeln und zusammen auf den Phänotyp, also die Erscheinung einer Erkrankung aus, somit ist das Zusammenspiel hochkomplex (Hasin et al., 2017).

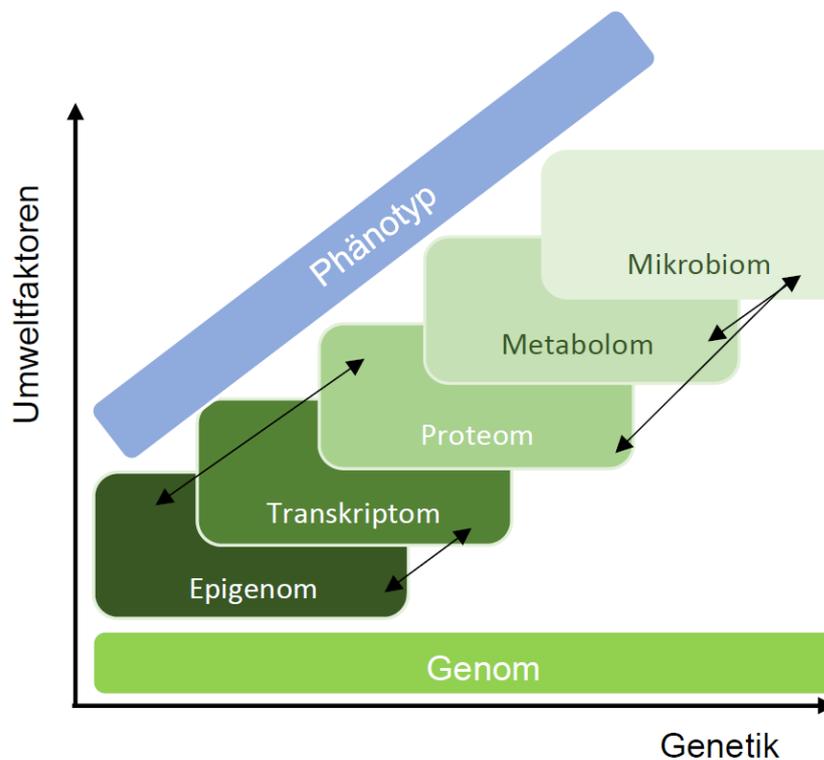


Abbildung 7: Verschiedene Ebenen des Omics Forschungsansatzes für Erkrankungen. Zwischen allen Ebenen können Wechselwirkungen bestehen, dargestellt als schwarze Pfeile. Übersetzt und angefertigt mit Genehmigung (open access) nach (Hasin et al., 2017).

Bei direktem Vergleich verschiedener „Omics“ Strategien zur Erforschung signifikanter Unterschiede auf molekularer Ebene zwischen Menschen mit einer bestimmten Krankheit und Gesunden, zeigte die Metabolom-Forschung interessanterweise die stärkste Aussagekraft als einzeln angewandte „Omics“-Strategie (Lee-Sarwar et al., 2020).

Durch die Anwendung der Metabolomik können diagnostische Marker für Erkrankungen entwickelt werden, die der Früherkennung und Prävention einer Erkrankung oder der Objektivierung des Therapieansprechens dienen sollen. Weitere wichtige Ziele sind therapeutisches Drug Monitoring oder die

Individualisierung der Pharmakotherapie. Dabei besteht der Biomarker für eine Erkrankung oft nicht aus einem einzelnen, sondern aus einem Muster mehrerer Metaboliten (Kaddurah-Daouk et al., 2008, Jarmusch et al., 2019).

Bereits für einige Erkrankungen konnten mittels Metabolomik Biosignaturen gefunden werden, beispielsweise für Depression, Schizophrenie, Bluthochdruck, Diabetes mellitus Typ 2, Brustkrebs und für Morbus Alzheimer (Kaddurah-Daouk et al., 2008, Nielsen et al., 2021).

Ein weiteres Beispiel ist der Morbus Parkinson. Menschen mit besonders gutem Geruchssinn konnten diese Erkrankung anhand des veränderten Körpergeruchs der Erkrankten feststellen. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass veränderte Moleküle der Körperoberfläche hierfür eine Erklärung bieten könnten. Daraufhin entdeckten 2019 Trivedi et al., dass anhand einer metabolischen Biosignatur die Unterscheidung der Patient*innen mit M. Parkinson von Gesunden erfolgen kann. Talg-Proben des oberen Rückens zeigten unter anderem Auffälligkeiten der Metaboliten Perillinsäurealdehyd und Eicosan (Trivedi et al., 2019).

Die komplexe Analyse des Metaboloms beginnt mit dem Sammeln der Proben, zum Beispiel Gewebeproben oder Plasma, mit anschließender Extraktion der gewünschten Moleküle (Kaddurah-Daouk et al., 2008). Zur Messung der Metabolitenprofile kann danach die Tandem-Massenspektrometrie herangezogen werden, siehe Kapitel 1.2.3 (Oliver et al., 1998). Die Flüssigkeitschromatographie (LC=Liquid chromatography) separat oder in Kombination mit Massenspektrometrie (LC-MS), Gaschromatographie (GC) sowie Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) werden zur Metaboliten Analyse herangezogen. Die LC-MS bringt den Vorteil mit sich, dass man das größtmögliche biochemische Profil erhält (Kaddurah-Daouk et al., 2008).

Nach der Messung der Metabolitenprofile werden die Datensätze gesammelt, organisiert und ausgewertet. Die Auswertung erfolgt mithilfe von Programmen, die eigens für die Analyse sehr großer Datensätze bestimmt sind und eine vorhandene Datenbank nutzen können. Nun werden die Daten im Hinblick auf gewünschte Fragestellungen untersucht, beispielsweise können Kranke mit

Gesunden verglichen werden, um einen Biomarker für die Erkrankung zu entwickeln. Oder es können Gruppenzugehörigkeiten sowie Interaktionen untersucht werden, zwecks Interpretation der Daten (Kaddurah-Daouk et al., 2008).

1.2.3 Massenspektrometrie

1.2.3.1 *Ablauf der Messung*

Pauling et al. nutzten im Jahr 1971 erstmalig ein Massenspektrometer zur Messung der Metaboliten im Urin, um anhand dieser den funktionellen Status eines Organismus festzustellen (Pauling et al., 1971).

Das Massenspektrometer ist ein sehr sensibles Messinstrument zur Identifikation und Quantifizierung von Molekülen. Mittels Bestimmung der Molekülmasse und des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses erfolgt die Charakterisierung der Moleküle, nachdem aus den Bestandteilen der Probe gasförmige Ionen mit oder ohne Fragmentierung gebildet wurden. Die Flüssigkeitschromatographie und Gaschromatographie dienen zur Auftrennung der einzelnen Bestandteile einer Probe (Todd, 1991, Kaddurah-Daouk et al., 2008).

Der Ablauf einer massenspektrometrischen Messung beginnt mit der Ionisierung, häufig mittels Elektrospray-Ionisierung. Dabei wird die gelöste Probe elektrischer Spannung ausgesetzt, sodass kleine geladene Tropfen entstehen, welche schließlich die gasförmigen Ionen bilden. Hierbei fallen viele Addukte und Fragmente an, welche die spätere Analyse erschweren können. Bekannte Systeme der Massenspektrometrie zur Beeinflussung der Ionen im elektrischen Feld sind z.B. Orbitrap, TOF (time of flight) und Quadrupol. Letztere haben zwar eine niedrigere Auflösung, aber Quadrupole können als Massenfilter alle bis auf die gewünschten Ionen herausfiltern. Häufig wird ein Quadrupol mit einem Massenanalysator kombiniert (Q-TOF=quadrupol-time-of-flight), sodass die Analyse der fragmentierten Ionen mit einer hohen Auflösung erfolgt (Jang et al.,

2018). Die Besonderheit des Triple Quadrupols ist, dass er nur eine vordefinierte Teilmenge von Ionen misst, aber die beste Sensitivität liefert, um einzelne Metaboliten zu analysieren (Jang et al., 2018, Fenn et al., 1989).

Insbesondere wenn für die detektierten Metaboliten bereits biochemische Standards vorhanden sind, kann für diese eine Identifikation und Quantifizierung anhand der Molekülmasse und anhand der Retentionszeit erfolgen (Kaddurah-Daouk et al., 2008).

Der Ionisierung und Messung im Massenspektrometer vorgeschaltet kann eine Chromatographie erfolgen, welche die einzelnen Metaboliten einer Probe mittels einer Säule auftrennt, um die Genauigkeit der Messung unter anderem durch die Unterscheidung von Isomeren zu verbessern (Jang et al., 2018).

Die LC-MS (liquid-chromatography mass spectrometry) findet zunehmend Anwendung, insbesondere die HPLC-MS (high-performance-liquid-chromatography Massenspektrometrie) (Rochfort, 2005). Die LC-MS ermöglicht dank ihrer Flexibilität die Analyse einer großen Anzahl an Metaboliten (Kaddurah-Daouk et al., 2008).

Anstatt der LC-MS wurde auch die Direktinfusion (DI) in Kombination mit Elektrospray Ionisierung bereits erfolgreich genutzt, siehe 1.2.3.3 (Rochfort, 2005).

1.2.3.2 Datenanalyse und Interpretation

Nach der Messung der Proben erfolgt die Prozessierung und Auswertung der Daten (s. Abb. 8). Als erstes werden die Roh-Daten in eine Tabelle transformiert. Diese beinhaltet die Intensitäten (Anzahl der Ionen) und die m/z -Werte (Masse-zu-Ladung-Verhältnisse) der sogenannten „Peaks“, der Molekül-Ionen-Signale. Ein Großteil der Peaks erscheint aufgrund von Kontaminationen oder Addukten und wird nicht in die Analyse mit einbezogen. Die zu untersuchenden Peaks können eine bekannte Identität besitzen und somit einem bestimmten Molekül aufgrund der Datenbank direkt zugeordnet werden, zudem können sie

signifikante Unterschiede zwischen untersuchten Populationen aufweisen (Jang et al., 2018).

Unter Zuhilfenahme sensitiver Algorithmen wie des hierarchischen Clusterings oder der Hauptkomponentenanalyse (PCA=principal component analysis) kann eine erste Visualisierung und Einordnung der Daten erfolgen, um z.B. Ausreißer zu erkennen (Kaddurah-Daouk et al., 2008). Die PCA filtert auffällige Metaboliten heraus, die sich in Gruppen ähneln oder voneinander unterscheiden und somit potentielle Biomarker sein können.

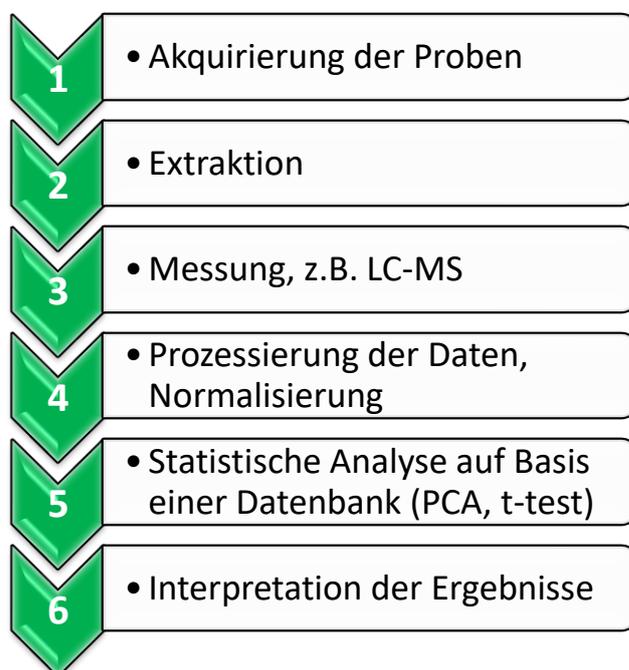


Abbildung 8: Metabolomik Workflow. Darstellung einzelner Schritte im Prozess einer Metabolomik Messung. Angefertigt nach: (Jarmusch et al., 2019, Kaddurah-Daouk et al., 2008).

Für die Interpretation der Ergebnisse werden statistische Tests wie der studentische t-Test oder Varianzanalysen wie ANOVA herangezogen, unter Anwendung eines Fehlerkorrekturverfahrens wie Benjamini-Hochberg-Korrektur und einem p-Wert von $<0,05$. Nun werden die auffälligen Metaboliten genauer untersucht, zum Beispiel durch einen Abgleich mit einer Datenbank wie der Kyoto

Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) und Recherche in z.B. PubMed (Jang et al., 2018).

1.2.3.3 Direktinfusion und ungezielte Massenspektrometrie

Wie in 1.2.3.1 beschrieben ist die Direktinfusion eine Alternativmethode zu der chromatographie-gestützten Massenspektrometrie. Die Methode der Direktinfusion im Bereich der Massenspektrometrie ist ein Verfahren von wachsender Bedeutung, da sie eine detaillierte Ergründung pathogenetischer Mechanismen ermöglicht, das Potential zur Messung großer Probenmengen besitzt und sehr sensitive und präzise Ergebnisse über das gesamte Metabolom liefern kann (Howlett et al., 2017, González-Domínguez et al., 2017).

Besonders an der Direktinfusion ist, dass die Auftrennung der Proben mittels Chromatographie entfällt. Stattdessen werden die Proben z.B. mittels Spritzenpumpe direkt in die Quelle der Ionisierung des Massenspektrometers eingeleitet. Vorteilhaft daran ist, dass dies den Ablauf der Vorbereitung und der Messung vereinfacht und eine deutlich größere Menge an Proben in viel kürzerer Zeit gemessen werden kann. Probleme, wie das Verstopfen der Chromatographie-Säule, werden umgangen.

Somit lässt sich die DI-Methode besonders gut auf groß angelegte Studien anwenden, um einen ersten Überblick über ein sehr weites Spektrum an Metaboliten zu bekommen. Allerdings birgt diese nicht nur Vorteile, denn als problematisch gestaltet sich die Ionenunterdrückung. Die Ionisation kann durch z.B. nicht flüchtige Stoffe erschwert sein. Dies ruft eine Signalunterdrückung oder -verstärkung hervor, welche die Analyse behindert. Außerdem kann keine Unterscheidung zwischen chemischen Isomeren vollzogen werden. Jedoch gibt es keine Belege dafür, dass dieser Faktor bei der DI-Methode stärker ist als bei herkömmlichen Verfahren mit Chromatographie. Zusammenfassend kommt die DI als Methode zunehmend zur Anwendung, weil sie Zeitersparnis, einen hohen Durchsatz, gute Reproduzierbarkeit sowie die Möglichkeit der Analyse ungezielter Metabolomik bietet (González-Domínguez et al., 2017).

Zur Ergründung der Mechanismen von Bioaktivität ist untargeted Metabolomik eine vielversprechende Möglichkeit (Mallick et al., 2017).

Die Idee der ungezielten Massenspektrometrie ist es, alle vorhandenen Moleküle einer Probe zu detektieren ohne vorheriges Wissen über mögliche Bestandteile oder Metaboliten. Die Methode ist für Hautabstriche besonders vorteilhaft um eine große Anzahl an Metaboliten zu detektieren (Jarmusch et al., 2019, Mallick et al., 2017).

1.2.4 Metabolom bei Multipler Sklerose

Neue Ansätze sind nötig, um die Multiple Sklerose (siehe 1.1) besser zu verstehen und frühzeitig effektiv zu behandeln. Bisher gibt es keinen Test, mit dem man die Krankheit anhand einer alleinigen Untersuchung des Bluts oder des Liquors feststellen kann, stattdessen mussten die McDonalds Kriterien (s.1.1.4) entwickelt werden, die die Kombination mehrerer Kriterien zur Diagnosestellung erfordern (Thompson et al., 2018a).

Die Anwendung der Metabolomik auf die Multiple Sklerose zeigte bereits mehrfach, dass deutliche Veränderungen des Metaboloms beobachtet worden sind. Bisher wurden nur kleinere Kohorten untersucht (Bhargava and Anthony, 2020). Bereits 1972 wurden signifikante Veränderungen der Lipid-Zusammensetzung der grauen und weißen Substanz des Gehirns bei post mortem Analysen festgestellt (Gerstl et al., 1972).

1993 wurde durch Lynch et al. das Metabolitenprofil des Liquors, der zerebrospinalen Flüssigkeit, untersucht. Dies stellt für die Patient*innen einen invasiven Eingriff dar, aber zeigte in besagter Studie signifikante Ergebnisse: der Liquor der Kranken wies ein signifikant erhöhtes Acetat und erniedrigtes Formiat auf (Lynch et al., 1993).

Später entdeckten Gonzalo et al. 2012, dass im Liquor von Patient*innen mit MS verschiedene Marker für oxidativen Stress erhöht waren, unter anderem ein Marker für Lipidperoxidation, 8-isoprostaglandin F_{2α} (Gonzalo et al., 2012).

Neue Untersuchungen aus dem Jahr 2020 zeigten signifikante Unterschiede der Metabolitenprofile des Blutplasmas im Vergleich von Erkrankten mit RRMS mit gesunden Versuchspersonen: neun Metaboliten, unter anderem die Aminosäuren Arginin, Phenylalanin und Asparagin waren bei Vorliegen der Erkrankung deutlich reduziert. Diese Ergebnisse wurden mittels ungezielter Massenspektrometrie erhoben (Sylvestre et al., 2020).

Neu und bisher nicht in Bezug auf RRMS untersucht, ist das Metabolom der Haut. Hautabstriche sind einfach durchzuführen und im Gegensatz zur Untersuchung des Bluts oder des Liquors nicht invasiv (Jarmusch et al., 2019). Die chemische Zusammensetzung der Hautoberfläche ist bisher wenig definiert (Bouslimani et al., 2015), obwohl die Haut mit einer Größe von 1,5 bis 2 m² das größte Organ des Menschen ist (Bouslimani et al., 2015, Lehtimäki et al., 2017, Stacy and Belkaid, 2019).

Das Metabolom ist in der Lage eine Brücke zwischen Genetik und Phänotyp zu schlagen, denn durch die Dynamik der Metaboliten kann ein System in seiner Vollständigkeit und Funktion verstanden werden (Goodacre et al., 2004). Gerade für eine stark beeinträchtigende Erkrankung wie Multiple Sklerose könnte das Metabolom der Haut der Schlüssel zur Entwicklung besserer Möglichkeiten zur Früherkennung, Therapieoptimierung und Verlaufsbeobachtung sein (Bhargava and Anthony, 2020).

2 Zielsetzung

Ziel der Studie war die Prüfung, inwieweit sich das Metabolom der Haut von Patient*innen mit schubförmig-remittierender Multipler Sklerose von alters- und geschlechts-parallelierten gesunden Versuchspersonen unterscheidet. Hierfür wurden aus Hautabstrichen Proben der Haut-Metaboliten gewonnen und mittels Direktinfusions-Massenspektrometrie gemessen. Das Ziel war, einen Biomarker zur Erkennung oder Prävention der Erkrankung zu identifizieren.

Außerdem sollten langfristig durch eine Aufschlüsselung des Haut-Metaboloms Aussagen über die Pathogenese der Erkrankung und über Interaktionen mit dem Mikrobiom getroffen werden, um damit die Diagnostik und Therapie zu verbessern. Es wurden vier verschiedenen therapierte Untergruppen von Patient*innen mit RRMS sowie gesunde Proband*innen untersucht mit den folgenden Zielsetzungen:

- ❖ Identifizierung eines Biomarkers zur Unterscheidung krank/gesund als potenzielle zukünftige Screening-Methode für RRMS
- ❖ Untersuchung des Metaboloms in vier Untergruppen der diagnostizierten Patient*innen: Vergleich der Gruppen: 1) ohne verlaufsmodifizierendes Medikament gegen Multiple Sklerose, 2) Einnahme von Interferon-beta 1a/b, 3) von Natalizumab, 4) von Dimethylfumarat; zusätzlich als Gruppe 5) gesunde Studienteilnehmer*innen zum Vergleich
- ❖ Unterstützung der Diagnosestellung oder Therapie durch Hinweise des Metaboloms auf Stoffwechsellaskaden und daraus möglicher Manipulation der Metaboliten

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign und Ethikvotum

Die Erhebung der Daten erfolgte durch eine explorative, monozentrische, offene und kontrollierte klinische Querschnittsstudie. Es wurden Patient*innen mit diagnostizierter schubförmig-remittierender MS mit gesunden Versuchspersonen verglichen.

Bei allen Studienteilnehmer*innen wurden einmalig Hautabstriche an denselben acht vorher definierten und standardisierten Körperstellen durchgeführt (s.3.3.2, Abb. 9).

Durch eine Parallelisierung der gesunden Proband*innen bezüglich Alter und Geschlecht zu den Patient*innen mit MS wurde eine Vergleichbarkeit geschaffen.

Vor dem Beginn der Pilotstudie wurde diese durch die zuständige Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München geprüft und genehmigt (Projekt Nr.: 757-16).

3.2 Untersuchungskollektiv

3.2.1 Ein – und Ausschlusskriterien

Die Einschlusskriterien bestanden für teilnehmende Patient*innen aus einer gesicherten Diagnose der schubförmig remittierenden Verlaufsform der Multiplen Sklerose (RRMS) nach den McDonald Kriterien (s.1.1.4), codiert mittels ICD-Codierung G35.10, und einem Alter von 18 bis 55 Jahren.

Die eingeschlossenen untersuchten Therapieformen umfassten die drei Medikamente Dimethylfumarat, Natalizumab und Interferon beta. Ebenfalls eingeschlossen wurden diagnostizierte Patient*innen ohne spezifische Therapie der RRMS.

Diese drei Therapieformen (s. Tab. 4) wurden ausgewählt, da sie drei verschiedene Stufen der Effektivität in der Reduktion der Schubfrequenz zeigen und außerdem drei verschiedene Formen der Verabreichung umfassen (Dobson and Giovannoni, 2019).

Wirkstoff (Handelsname)	Wirkung	Wirksamkeit*	Anwendung	UAW
Interferon β (z.B. Avonex®, Rebif®, Plegridy®, Betaferon®)	Reduktion der T-Zell-Proliferation und der Antigenpräsentation	30-34%	s.c. oder i.m., 2-4 x wöchentlich bis zu alle 2 Wochen Milde/moderate RRMS; SPMS; KIS	Grippe-Symptomatik, Hautreaktion, erhöhte Leberenzyme Selten: lebertoxisch
Dimethylfumarat (Tecfidera®)	Antioxidativ, reduzierte Zytokinausschüttung	51%	p.o., 2 x täglich Milde/moderate RRMS	Flush, Gastrointestinale Symptome, Lymphopenie Selten: PML (1:50.000)
Natalizumab (Tysabri®)	Humaner monoklonaler Antikörper, α -4 Integrinblockade →verhindert Einwanderung der Lymphozyten ins ZNS	68%	i.v., alle 4 Wochen, in einer Klinik hochaktive RRMS	Infektionsrisiko, Übelkeit, Juckreiz, Schwindel Selten: PML (4,19:1000), Hypersensitivitätsreaktionen

Tabelle 4: Überblickstabelle der drei untersuchten Medikamente.

„Wirkung“ bezieht sich auf den Wirkmechanismus. Anwendung: Anwendungsform, zeitliches Intervall der Medikamenteneinnahme und Indikation. Abkürzungen: **s.c.**: subkutane Injektion, **i.m.**: intramuskuläre Injektion, **p.o.**: per os, **i.v.**: intravenös. **UAW**: unerwünschte Arzneimittelwirkungen, bezieht sich auf die häufigen und schwerwiegenden UAW. **RRMS**: schubförmig verlaufende MS, **SPMS**: sekundär progrediente MS, **KIS**: klinisch isoliertes Syndrom, **PML**: progressive multifokale Leukenzephalopathie. Kein Anspruch auf Vollständigkeit.

* Die Wirksamkeit bezieht sich auf die Reduktion der Schübe im Vergleich zur Gabe eines Placebo oder eines aktiven Vergleichsmedikaments. Die Daten der Tabelle beziehen sich auf unabhängige klinische Studien. Angefertigt nach: (Dobson and Giovannoni, 2019, Thompson et al., 2018b, KKNMS, 2022).

Ausgeschlossen wurden Patient*innen, welche innerhalb der letzten 4 Wochen vor Studieneintritt eine topische dermatologische oder jegliche Therapie mit

einem Glukokortikoid, z.B. Methylprednisolon, oder einem Antibiotikum in jeglicher Anwendungsform erhalten hatten.

Für einen Vergleich der Patient*innen mit gesunden Kontrollpersonen wurden über Websites und Aushänge gesunde Proband*innen rekrutiert. Es wurden Proband*innen eingeschlossen, die sowohl körperlich als auch psychisch gesund waren und parallelisiert zu den Patient*innen zwischen 18 und 55 Jahre alt waren.

Die Ausschlusskriterien für gesunde Kontrollproband*innen umfassten psychiatrische, neurologische und dermatologische Erkrankungen sowie chronische oder akute somatische Erkrankungen. Eine Medikamenteneinnahme innerhalb der letzten drei Monate mit einer Dauer von über zwei Tagen, sowie innerhalb des letzten Monats vor Studieneintritt als auch ein Konsum von Drogen innerhalb der letzten vier Monate führten ebenfalls zum Ausschluss.

3.2.2 Rekrutierung

Die Rekrutierung der Patient*innen mit RRMS erfolgte im Zeitraum von September 2018 bis März 2019 in der Spezialambulanz für entzündliche ZNS-Erkrankungen im Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München. Über die reguläre Terminvergabe der Ambulanz erfolgte bei Einverständnis zur Teilnahme zufällig die Auswahl und Befragung der Patient*innen. Im Gegensatz dazu wurden die gesunden Kontrollproband*innen rekrutiert, indem sie sich freiwillig meldeten, nachdem sie durch einen der Aufrufe aufmerksam geworden waren. Die Gesuche wurden sowohl auf der Website des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie als auch auf der Website der Fachschaft der Ludwig-Maximilians-Universität veröffentlicht, zudem wurden sie in Gebäuden der Ludwig-Maximilians-Universität ausgehängen. Insgesamt konnten 50 Patient*innen in die Studie aufgenommen werden, 10 weitere mussten nachträglich ausgeschlossen werden (s. 3.2.1).

Wenn möglich wurden die Versuchspersonen und Patient*innen am Vortag des Termins telefonisch vorab über die Studie informiert und bei Interesse zur Teilnahme gebeten, vor dem Hautabstrich auf Kosmetikprodukte, Make-Up und seifenhaltige Produkte zu verzichten. Diese Maßnahme wurde zur Verringerung der Kontaminierung der Hautabstriche durchgeführt.

Die Patient*innen der Spezialambulanz nahmen ihre regulären Termine zur Kontrolle, Besprechung oder Therapieanpassung wahr. Durch eine ausführliche Anamnese wurde erfragt, ob die Patient*innen für die Studie geeignet waren und sich zu einer freiwilligen Teilnahme bereit erklärten.

Anschließend erfolgte die Erklärung, Aushändigung und bei Zustimmung die Unterschrift der Patienteninformation und Einwilligungserklärung (siehe 7.5). Nach der Klärung von Fragen erfolgte die schriftliche Dokumentation des beidseitigen Einverständnisses.

Die Daten und Informationen der Patient*innen wurden mithilfe eines Verschlüsselungscodes pseudonymisiert, dessen Zugriff auf die Studienleiter Herr Prof. Dr. Schaaf und Herr Prof. Dr. Turck beschränkt ist.

Die rekrutierten gesunden Kontrollpersonen meldeten sich freiwillig zur Studienteilnahme, nachdem sie über einen der beschriebenen Aufrufe aufmerksam geworden waren. Hierbei wurden 20 gesunde Proband*innen befragt, von denen 19 die Einschlusskriterien (s. 3.2.1) erfüllten und an der Studie teilnahmen sowie Probandeninformation und Einwilligungserklärung erhielten und ausfüllten (s. 7.6). Es wurde eine Parallelisierung der gesunden Studienteilnehmer*innen bezüglich Alter und Geschlecht zu den eingeschlossenen Patient*innen durchgeführt, sodass die Rekrutierung dementsprechend zeitversetzt nach dem Beginn der Rekrutierung der Patient*innen begonnen wurde. Die Abstrichentnahmen erfolgten zufällig in der Reihenfolge, in der die Kontrollproband*innen Kontakt mit dem Max-Planck-Institut aufnahmen. Im Zeitraum von November 2018 bis März 2019 wurden diese in die Studie eingeschlossen.

3.3 Ablauf der Studie

3.3.1 Anamnese und Untersuchung

Vor der Abnahme der Hautabstriche wurde bei den Studienteilnehmer*innen eine Anamnese durchgeführt. Dabei wurden die in 3.2.1 erläuterten Ein- und Ausschlusskriterien abgefragt (s. 7.7). Außerdem wurde beantwortet, ob innerhalb der letzten vier Wochen eine Einnahme von Präparaten stattgefunden habe, die eine antibiotische oder Kortikosteroid-haltige Substanz in jeglicher Anwendungsform enthielten. Sowohl Alter, Vorerkrankungen, sowie eingenommene Medikamente wurden dokumentiert. Des Weiteren wurde festgehalten, ob eine Besonderheit der Ernährung vorlag und, ob und wie viel der/die Teilnehmer*in an Alkohol und an Nikotin konsumierte. Der Zeitpunkt zuletzt verwendeter Kosmetikprodukte wie Cremes oder Lotionen sowie Make-Up wurden dokumentiert, um die Erkennung möglicher Kontaminierungen zu erleichtern. Die ausführliche Darstellung des Anamnesebogens ist im Anhang zu sehen (s. 7.7).

Zusätzlich wurde bei Patient*innen, die im Rahmen ihres regulären Termins in der Spezialambulanz für entzündliche Erkrankungen des Zentralen Nervensystems an der Studie teilnahmen, der EDSS-Score (siehe 1.1.4) sowie die Dauer der RRMS erhoben.

3.3.2 Durchführung der Hautabstriche

Nach dem Abschluss der beschriebenen Anamnese wurden die Hautabstriche mithilfe von Abstrichtupfern durchgeführt. Für Details verwendeter Materialien, Geräte und Reagenzien siehe Anhang 7.1.

Die Wattestäbchen wurden mindestens eine Woche vor Abnahme der Abstriche vorbereitet, indem sie mehrfach mit 50%igem Ethanol in einem Glasbehälter gewaschen wurden. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen am ersten Tag und anschließendem Auffüllen des Behälters mit den enthaltenen Stäbchen mit 100

ml 50%igem Ethanol. An den anschließenden Tagen drei und fünf wurde das Ethanol erneut durch 100 ml 50%igen Ethanols ersetzt. Eine Woche nach dem ersten Tag des Waschvorgangs wurde das Ethanol entleert und die Stäbchen anschließend im gereinigten geschlossenen Glasbehälter bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt. Am Tag vor der Nutzung eines solchen befüllten Behälters wurde dieser erneut mit 100 ml des 50%igen Ethanols aufgefüllt, um die Abstriche mit befeuchteten Wattestäbchen durchzuführen.

Für den Mundabstrich wurden gleichermaßen gewaschene und anschließend getrocknete Stäbchen verwendet. Die Trocknung der Stäbchen erfolgte über eine mehrtägige Lagerung der gereinigten Stäbchen in genanntem Glasbehälter bei nicht dicht verschlossenem Deckel.

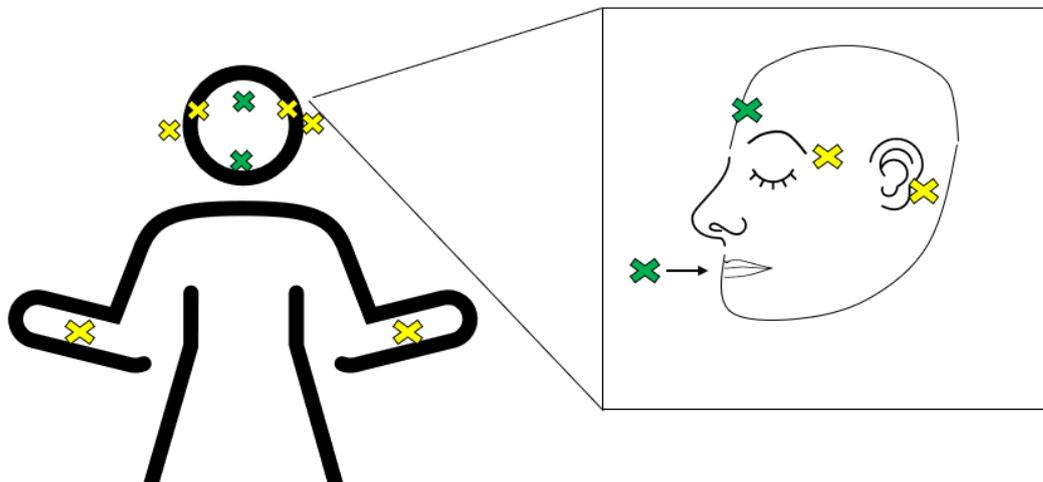


Abbildung 9: Lokalisation der acht Hautabstriche. Jede Abstrich-Lokalisation ist mit einem Kreuz markiert. Links: Überblick. Rechts: Seitliche Detailaufnahme der Gesichtsabstriche. Farbbedeutung: gelb: symmetrisch beidseits durchgeführt. grün: einzelner Hautabstrich, nicht beidseits abgenommen. Die grüne Markierung auf Höhe des Mundes mit Pfeil in Richtung Lippen zeigt an, dass ein einzelner Abstrich im Mund an der Wangenschleimhaut durchgeführt wurde, s. Text. Angefertigt mittels Microsoft Powerpoint.

Die Abstriche der 8 Körperstellen erfolgten jeweils einzeln, indem 20 Sekunden lang der Watteanteil eines Stäbchens mit konstantem leichtem Druck auf einer ein bis zwei Quadratzentimeter großen Hautfläche auf und ab bewegt wurde. Die 8 einheitlich verwendeten Körperstellen (s. Abb. 9) waren wie folgt definiert: mittig links und rechts auf der Innenfläche der Unterarme, mittig auf der Stirn direkt oberhalb der Augenbrauen, die Schläfen beidseitig neben dem Ende der Augenbrauen und beidseitig hinter den Ohren auf Höhe des Mastoids. Der achte Abstrich wurde auf der Mundschleimhaut der Wangen mit einem getrockneten

Stäbchen durchgeführt. Dieser wurde mithilfe eines einzelnen getrockneten Abstrichtupfers durchgeführt, oberhalb der unteren Zahnreihe mittig in der Wange und etwa zwei Zentimeter vom Mundwinkel entfernt. Hierbei wurde linksseitig und rechtsseitig jeweils 10 Sekunden mit einem gemeinsamen Stäbchen durch Hin- und Herbewegen abgestrichen.

Die Abstriche wurden immer in besagter Reihenfolge durchgeführt. Nach jeweils einem Abstrich wurde der Watteanteil des Abstrichtupfers direkt über einem 2 ml Safe-Lock-Röhrchen mit einer Schneidzange abgetrennt, sodass der Watteanteil in das vorher mit 500 µl 50%igem Ethanol gefüllte Röhrchen glitt. Die Eppendorf-Röhrchen wurden während des Abstrichs und direkt danach zwischen +4 und -20°C gelagert.

Um Hintergrund-Metaboliten von bedeutenden Metaboliten differenzieren zu können, wurden Leer-Proben angefertigt. Hierfür wurde für jede Leer-Probe ein Holzstäbchen, ebenso nach Abtrennung des Watteanteils, ohne die vorherige Durchführung eines Hautabstrichs, mitverarbeitet und gemessen. Dies wurde in regelmäßigen Zeitabständen von ca. zwei Wochen und bei der Öffnung eines neu gefüllten Glasbehälters mit Stäbchen durchgeführt. Auf diese Weise wurden insgesamt 12 Leer-Proben der getränkten Stäbchen und 11 Leer-Proben der getrockneten Stäbchen verarbeitet und analysiert. Dies diente der Qualitätskontrolle und der Differenzierung von Hintergrund-Metaboliten, die unter anderem durch Kontaminationen der verwendeten Holzstäbchen entstanden und somit später aus der Analyse entfernt werden konnten.

3.4 Extraktion und Prozessierung der Proben

Direkt nach der Durchführung der Abstriche wurden die Proben für ca. zwei Stunden bei +4°C gelagert, um die Metaboliten aus dem Watteanteil zu extrahieren (Kaddurah-Daouk et al., 2008). Anschließend wurden die Proben für 48 Stunden bei -20°C gelagert.

Für die weitere Verarbeitung der Proben wurden Ultrafiltrations-Röhrchen mit

0.22 µm Membran verwendet (s. 7.1). Die Röhrrchen wurden mit jeweils 10 µl des 50%igen Ethanol befüllt. Das Ethanol wurde durch Zentrifugieren der Röhrrchen für zwei Minuten bei 1100 relativer Zentrifugalbeschleunigung (rcf) im Filter verteilt. Die vorbereiteten Ultrafiltrations-Röhrrchen wurden nun mit den Proben befüllt. Der hierbei verwendete Anteil der Probe bestand ausschließlich aus dem 50%igen Ethanol, das mit den Metaboliten und Molekülen der Haut aus dem darin gelagerten Wattestäbchenkopf angereichert war. Der Watteanteil sowie das ursprüngliche Eppendorf-Röhrrchen der Probe wurden verworfen.

Dabei wurden jeweils beide Proben einer beidseitigen Lokalisation, also z.B. die zwei Proben der Schläfen links und rechts à jeweils 500 µl Flüssigkeit, in ein Ultrafiltrations-Röhrrchen zusammengeführt. Gleichermaßen wurden die zwei Proben der Unterarme und separat die zwei Proben der Mastoidfortsätze zusammen in ein Ultrafiltrations-Röhrrchen gefüllt.

Bei einer zentralen Lokalisation wie der Stirn wurde eine Probe mit ca. 500 µl in ein einzelnes Ultrafiltrations-Röhrrchen überführt, da im Gegensatz zu obigen Lokalisationen der Abstrich nicht beidseits entnommen wurde. Gleichermaßen wurde bei der Mundschleimhaut-Probe verfahren.

Um größere Partikel wie beispielsweise Staub oder Fasern aus den Proben zu filtern, wurden die Ultrafiltrations-Röhrrchen inklusive der Proben für zehn Minuten bei einer Temperatur von +4°C und einer Geschwindigkeit von 1100 rcf zentrifugiert. Daraufhin wurde der Filter des Ultrafiltrations-Röhrrchens entfernt und verworfen. Die vorhandenen fünf Ultrafiltrations-Röhrrchen jedes/jeder Studienteilnehmer*in (Unterarme, Stirn, Schläfen, Mastoidfortsätze und Mundschleimhaut) wurden jeweils in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrrchen umgefüllt und im Speed Vac® Konzentratormithilfe von getrocknetem Ethanol für vier bis fünf Stunden bei geöffnetem Deckel getrocknet. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert und gesammelt, bis die Rekrutierung und Verarbeitung aller Proben abgeschlossen war.

3.5 Vorbereitung zur Messung im Massenspektrometer

Nach der Verarbeitung der Proben der insgesamt 60 Patient*innen, 20 Kontrollpersonen und 23 Leer-Proben fand die Messung mittels Direkt-Injektion im Massenspektrometer statt (siehe 1.2.3.3).

Zur Vorbereitung der Messung wurde jede Probe in 100 µl Methanol gelöst, unter Nutzung eines Laborschüttlers für jeweils 20 Sekunden. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei +4°C für eine Dauer von fünf Sekunden und einer Geschwindigkeit von 1100 rcf. Von den besagten 100 µl jeder Probe wurden zwei Anteile à 25 µl mittels Speed Vac® getrocknet und bei -20°C verwahrt, der größte Anteil à 50 µl hingegen wurde zur aktuellen Messung weiterverwendet.

Nun wurden die Proben in 96-Well-Platten transferiert. Auf einer dieser Platten wurden alle vorhandenen Proben zu einer einzelnen Körperstelle aufgetragen, folglich die Proben der Patient*innen, der gesunden Proband*innen, der Leer-Proben sowie die Verdünnungsreihe zur Qualitätskontrolle (siehe unten). Daraus ergaben sich insgesamt acht Platten, jeweils Positiv- und Negativmodus der vier untersuchten Körperstellen: Unterarminnenseiten, Stirn, Mastoidfortsätze und Wangenschleimhaut. Die Proben der Schläfen wurden vorerst von der Messung ausgeschlossen, da diese Lokalisation sehr nah zu der Stirn war und somit nicht mit einem signifikanten Unterschied dieser beiden Körperstellen zu rechnen war.

Darauffolgend wurden 10 µl des besagten 50 µl Anteils der gelösten Probe genutzt, um auf der 96-Well-Platte eine Verdünnung herzustellen (1:10). Für die Verdünnung wurden folgende Lösungen verwendet: zur Positivmessung 60% Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure, dabei wurde die Konzentration jeweils durch Verdünnung mit Wasser hergestellt. Für die Negativmessung ein Puffer mit pH 9 bestehend aus 5 mM Ammonium Acetat und 60% Acetonitril (s. 7.1). Die 96 Vertiefungen einer 96 Well Platte wurden mittels Transferpipette mit jeweils 90 µl Puffer befüllt. Zu den jeweils 90 µl Puffer wurden 10 µl einer einzelnen Probe gegeben.

Zur Qualitätskontrolle wurde für jede gemessene Körperstelle eine QC-Probe (Quality Control, Pool) angefertigt und auf jeder Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe aufgetragen. Die QC-Probe bestand aus einer Mischung von jeweils 4 µl aller verwendeten unverdünnten Proben einer Körperstelle. Allerdings wurden hierbei nur die Proben der Patient*innen und der gesunden Proband*innen verwendet, die Leer-Proben wurden nicht eingeschlossen. Für die QC-Verdünnungsreihe einer Körperstelle wurden fünf Wells einer Platte befüllt, indem die QC-Probe und der Puffer in folgenden Verhältnissen aufgetragen wurden: Das Verhältnis der ersten Verdünnungsprobe von QC-Probe zu Puffer betrug 1:40, dementsprechend 2,5 µl „QC“ und 97,5 µl Puffer. Im zweiten Well betrug das Verhältnis 1:30 (3,3 µl:96,7 µl), im dritten 1:20 (5 µl:95 µl), im vierten 1:10 (10 µl:90 µl) und im fünften 1:5 (20 µl:80 µl).

Die gesamten Vorgänge wurden für jede der vier gemessenen Körperstellen zweimal durchgeführt, separat für die Negativmessung und die Positivmessung.

3.6 Messung im Massenspektrometer

Die acht 96-Well-Platten wurden bei +4 °C zwischengelagert. Im Anschluss fanden die Messungen der Proben einer Platte im Massenspektrometer randomisiert statt.

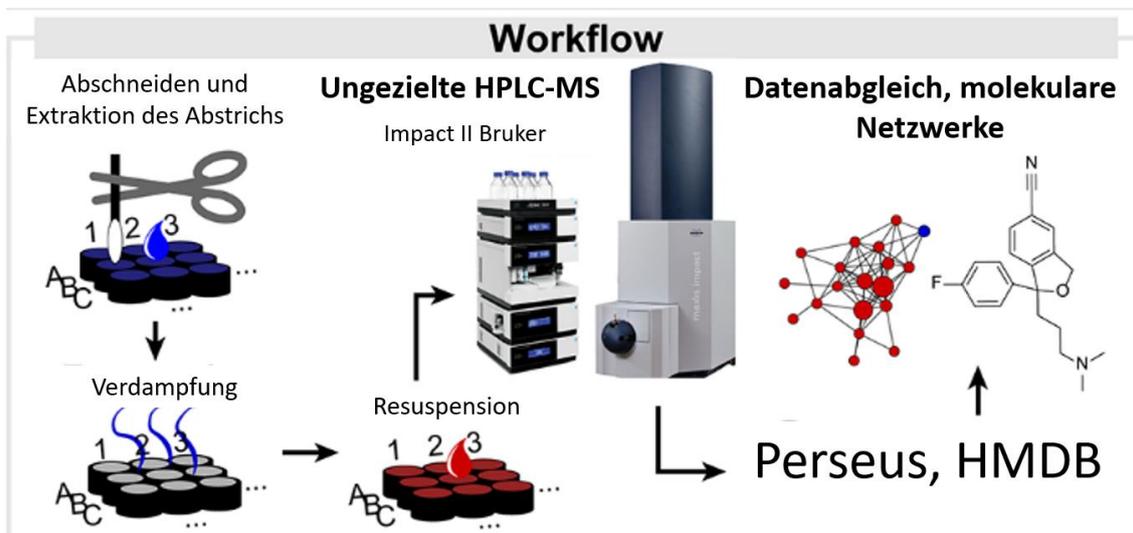


Abbildung 10: Workflow Hautabstriche. Chronologischer Ablauf der Arbeitsschritte. Abbildung übersetzt und angepasst mit Genehmigung durch American Chemical Society (ACS) (Jarmusch et al., 2019).

Für die Messung wurde ein 1100 HPLC-System mit einem Bruker Impact II TOF Massenspektrometer-System verbunden. Gesteuert wurde die Analyse von der Bruker Hystar 3.2 Software (Details s. Anhang 7.1). Die HPLC lieferte bei einem konstanten Fluss von 150µl/min eine isokratische Elution ohne Säule in das Massenspektrometer: im Positivmodus 60% Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure, im Negativmodus 5 mM Ammonium Acetat in 60% Acetonitril.

Die Agilent 1100 HPLC bestand aus einem Pumpenmodul, einem gekühlten Autosampler und einem Entgaser. Der Autosampler wurde über ein 6-Port-Ventil direkt mit dem Massenspektrometer verbunden, um die interne online Massenkali­brierung des Massenspektrometers zu ermöglichen. Für alle Verbindungen wurden 0,13-ID-Kapillaren verwendet. An das 6-Port-Ventil wurde eine 2,5 µl Schleife (Loop), eine Spritzenpumpe und ein Abfallbehälter angeschlossen. Die Spritzenpumpe wurde verwendet, um die genannte Schleife mit einer 10 mM Formiat Lösung zu füllen (interne Massenkali­brierung). Schließlich wurde das 6-Port-Ventil mit der Elektrospray-Ionisations-Quelle verbunden. Die Probenbestandteile wurden mit einem Endplattenoffset von 500 V und einer Kapillarspannung von 3500 V im Negativmodus und 4500 V im Positivmodus ionisiert. Das Zerstäubergas strömte hierbei mit 9 l/min und einem Druck von 2 Bar erhitzt auf 210°C in die Quelle. Die Gesamtlaufzeit betrug 1,5

Minuten pro Injektion. Nach einer Minute erfolgte eine Kalibrierung mit einer Dauer von 10 Sekunden über die 6-Port-Ventil-Schaltung.

Zur Datenakquisition wurde ein hochauflösendes qTOF-MS im Full-Scan-Modus (MS1) verwendet, welches mittels Bruker Compass 1.9 gesteuert wurde (s. 7.1). Mit einer Spektrenrate von 1 Hz wurden die Massen zu Ladungsverhältnisse (m/z) in einem Bereich von 50-900 m/z erfasst. Die interne Kalibrierung unter Verwendung von Clustern im Natriumformat im ESI-Positiv- und ESI-Negativ-Modus ermöglichte eine Anpassung der Massengenauigkeit mithilfe der Software Bruker Compass DataAnalysis 4.4. Nach der Kalibrierung wurden die Daten in das CDF (computable document formate) Dateiformat exportiert.

3.7 Statistische Analyse

Vor der statistischen Analyse wurden die Rohdaten prä-prozessiert mithilfe des Programms RStudio und dem proFIA R Paket (RStudio-Team, 2020, Delabrière et al., 2017).

Die daraus entstandene Datentabelle zeigte die einzelnen Metaboliten der Proben an, mit dem jeweiligen m/z Wert und der Intensität, außerdem enthielt die Tabelle wenn vorhanden die Annotation nach exaktem Wert der Masse, basierend auf einer hausinternen und zusätzlich auf der KEGG-Datenbank (Kanehisa et al., 2002). Wie bereits beschrieben wurden die QC-Proben zur Gewährleistung der Qualität gemeinsam mit den Proben gemessen.

Ebenfalls zur Verbesserung der Analyse wurde eine Subtraktion des Hintergrunds vorgenommen, indem die Metaboliten der in 3.3.2 beschriebenen Leer-Proben als Hintergrundsignale angenommen wurden.

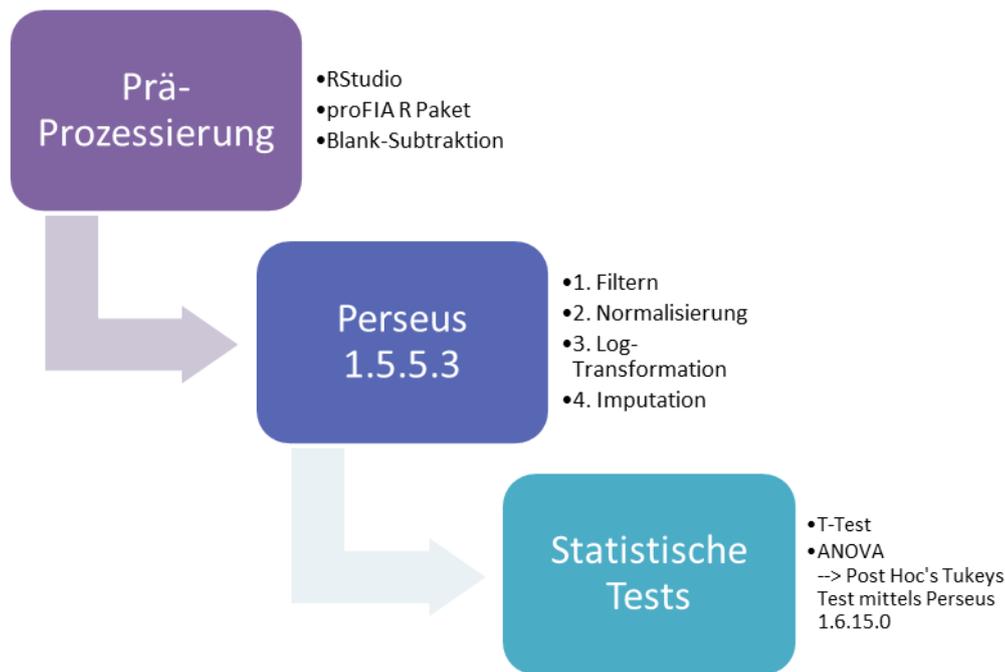


Abbildung 11: Metabolomik – Statistische Analyseschritte. Durchführung der Prozessierung und Analyse der Daten nach dem Zeitpunkt der massenspektrometrischen Messungen, in chronologischer Reihenfolge.

Mithilfe des Programms „Perseus“ Version 1.5.5.3 wurde die statistische Auswertung durchgeführt. Perseus wurde zur hochdimensionalen Datenanalyse von Proteinprofilen, der Proteomik, entwickelt und dient ebenfalls zur Auswertung für Metabolomik (Tyanova et al., 2016).

Ein Filtern der Daten wurde vorgenommen, indem kontaminierende Metaboliten, die durch die interne Datenbank erkennbar waren, aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Es wurden des weiteren Metaboliten exkludiert, deren Werte in einer Untersuchungsgruppe mehr als 30% fehlende Werte aufwiesen. Außerdem wurden die Leer-Proben, QC-Proben und die Werte exkludierter Studienteilnehmer*innen herausgefiltert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Im Anschluss wurden die Daten zur Normalisierung medianzentriert und logarithmiert, um eine Annäherung an eine Normalverteilung zu ermöglichen. Zudem wurden die nicht annotierten Metaboliten herausgefiltert, sodass fokussiert die annotierten Metaboliten ausgewertet wurden.

Vor der statistischen Analyse erfolgte eine Ersetzung (Imputation) der Fehlwerte durch die in Perseus vorgegebenen Schritte (Tyanova et al., 2016). Hierbei wurden Fehlwerte unter Annahme einer Gaußschen Normalverteilung zufällig

anhand dieser ersetzt. Abhängig von der Standardabweichung der Daten wurden sowohl die Breite der Normalverteilung reduziert als auch die ersetzenden Daten anhand des Standards von 1,8 herabgesetzt (Cox, 2018).

Die Durchführung von t-Tests ermöglichte zum einen die Untersuchung von signifikanten Unterschieden des Metaboloms zwischen Gesunden und Kranken. Zum anderen war eine Bestätigung der ausgeführten Varianzanalysen möglich. Außerdem konnte die Differenzierung zwischen Patient*innen ohne MS-spezifische Therapie und gesunden Versuchspersonen erfolgen, um eine signifikante Beeinflussung des Metaboloms allein durch die Erkrankung zu erkennen, ohne dass eine MS-spezifische Therapie die Signifikanz erklären könnte.

Festgelegt war für die t-Tests eine Falscherkennungsrate (FDR: False Discovery Rate) nach Benjamini-Hochberg von 0,1. Die FDR wurde angewendet, da es insbesondere bei Datensätzen einer Größenordnung wie bei Metabolomik oder Proteomik, zum Problem des multiplen Testens und somit zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Zur Vermeidung wird mittels der FDR nach Benjamini-Hochberg eine Anpassung des Signifikanzlevels oder p-Werts vorgenommen (Rudolph and Cox, 2018).

Zudem wurde die einfache Varianzanalyse, ANOVA, angewendet. Dadurch konnten die fünf Untersuchungsgruppen miteinander verglichen werden: therapierte Patient*innen mit Natalizumab (1), Dimethylfumarat (2), Interferon-beta (3), nicht-therapierte Patient*innen (4), und Gesunde (5). Zudem konnten die vier Patientengruppen (1-4) miteinander verglichen werden ohne Berücksichtigung der gesunden Versuchspersonen. Die in der ANOVA verwendete FDR nach Benjamini-Hochberg betrug ebenfalls 0,1.

Hauptkomponentendarstellungen (Principal component analysis; PCA) ermöglichten das Clustering zur primären Einordnung abweichender oder signifikanter Metaboliten und die graphische Darstellung hiervon.

Zur Bestätigung und genaueren Einordnung wurde nach einem signifikanten Ergebnis in der einfachen Varianzanalyse (ANOVA) ein Post-Hoc's-Tukeys-Test durchgeführt, mittels Datenexport und Anwendung der Perseus Version 1.6.15.0.

Die Visualisierung erfolgte mittels Perseus 1.5.5.3 für Volcano plots und PCAs sowie mittels GraphPad Prism 9.3.1 für Boxplots. Anschließende Analysen der Stoffwechselwege erfolgten durch MetaboAnalyst 5.0 (s. 7.1).

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungskollektiv

Es wurden insgesamt 60 Patient*innen rekrutiert, von denen 10 nachträglich wegen genannter Kriterien (s. 3.2.1) ausgeschlossen wurden. Dies ergab 50 eingeschlossene Patient*innen, von denen 34 (68%) weiblich und 16 (32%) männlich waren. Die Geschlechterverteilung im untersuchten Patientenkollektiv entsprach durch die zufällige Auswahl der Studienteilnehmer*innen in etwa der der Erkrankung (s. 1.1.1).

Jeweils 12 Patient*innen mit den Therapien Interferon beta und Dimethylfumarat sowie 12 Patient*innen ohne Multiple Sklerose spezifische Therapie wurden in die Studie aufgenommen. Die Gruppe der mit Natalizumab behandelten Patient*innen umfasste insgesamt 14 Patient*innen, davon 10 weibliche (71,43%) und 4 männliche (28,57%). Hierbei ist zu erwähnen, dass bei zwei der mit Natalizumab behandelten Patient*innen kein Mundabstrich durchgeführt wurde, sodass der Mundabstrich auch in dieser Therapiegruppe 12 Patient*innen umfasst. Für die übrigen 7 der 8 Körperstellen, an denen Hautabstriche genommen wurden, wurden in der Gruppe mit Natalizumab-Behandlung 14 Patient*innen aufgenommen.

Unter den mit Dimethylfumarat behandelten rekrutierten Patient*innen waren 75,0% Frauen (9 von 12) und 25,0% (3 von 12) Männer. Die gleiche Anzahl an Frauen (9 von 12) und Männern (3 von 12) fand sich unter den Patient*innen, die keine spezifische Therapie der Multiplen Sklerose erhielten. Von den mit Interferon beta behandelten Patient*innen waren 50% weiblich (6 von 12) und 50 % männlich (6 von 12).

Gruppe	n			Alter	EDSS-Score	Dauer der MS in Jahren
Natalizumab	14 *	71,43% (10/14)	28,57% (4/14)	40,33 8,50	± 2,08 ± 1,41	12,07 ± 5,70
Dimethylfumarat	12	75,0% (9/12)	25,0% (3/12)	37,83 8,59	± 2,08 ± 1,56	6,58 ± 5,02
Interferon beta	12	50,0% (6/12)	50,0% (6/12)	43,00 7,86	± 1,85 ± 1,47	5,63 ± 5,36
Unbehandelte Pt.	12	75,0% (9/12)	25,0% (3/12)	36,83 9,29	± 1,29 ± 1,29	8,71 ± 5,19
Pt. gesamt	50 *	68,00% (34/50)	32,00% (16/50)	39,00 8,60	± 1,79 ± 1,40	8,40 ± 5,77
Ctrl.	19	68,42% (13/19)	31,58% (6/19)	39,16 9,36	±	
Pt. und Ctrl. gesamt	69	68,12% (47/69)	31,88% (22/69)	39,00 8,80	±	

Tabelle 5: Patientencharakteristik der inkludierten Studienteilnehmer*innen. Jeweils Darstellung der durchschnittlichen Werte \pm Standardabweichung. Erkrankungsdauer angegeben in Jahren bezogen auf die Erstdiagnose. Bei unbekannter Erstdiagnose bezogen auf die Erstmanifestation. Anteile der weiblichen und männlichen Studienteilnehmer*innen der jeweiligen Untergruppen, Angaben in Prozent sowie absolute Anzahlen. EDSS-Score von 0 bis 10, s. 1.1.4. Pt. = Patient*innen. Ctrl. = (Control) gesunde Kontrollproband*innen. MS = Multiple Sklerose. n = Anzahl der Studienteilnehmer*innen. *bei zwei Patient*innen der genannten Teilmenge wurden nur 7 der 8 üblichen Abstriche durchgeführt, Details s. Text.

Die drei unterschiedlichen Indikationen und Anwendungsspektren führten zu der Auswahl der drei erläuterten Medikamente (s. 3.2.1 und Tab. 4).

Bei allen eingeschlossenen Patient*innen in der Multiple-Sklerose-Ambulanz ergab sich ein durchschnittliches Alter von 39,00 ($\pm 8,60$ SD) Jahren. Der EDSS-Score (s. 1.1.4) lag durchschnittlich bei 1,79 ($\pm 1,40$ SD) und die Erkrankung bestand im Mittel seit 8,40 ($\pm 5,77$ SD) Jahren.

Das gesunde Kontrollkollektiv bestand aus 20 Proband*innen, von denen 19 die Einschlusskriterien erfüllten. Davon waren 13 Studienteilnehmer*innen weiblich

(68,42%) und 6 männlich (31,58%), die Geschlechterverteilung entsprach somit fast exakt der des Patientenkollektivs (68,00 % weiblich und 32,00 % männlich). Das Alter des Kontrollkollektivs betrug durchschnittlich 39,16 (\pm 9,36 SD) Jahre, was ebenfalls dem Alter der teilnehmenden Patient*innen nahezu gleichkam.

4.2 Signifikante Ergebnisse des Hautmetaboloms

4.2.1 Unterarme

Nach Durchführung der t-Tests zum Vergleich zweier Gruppen zeigte sich an der Lokalisation Unterarme kein signifikanter Unterschied zwischen Patient*innen mit RRMS und gesunden Kontrollproband*innen.

Jedoch zeigte sich in der Positivmessung eine Signifikanz des Metaboliten Glutamyl-Glutaminsäure im Vergleich der gesunden Kontrollpersonen mit den MS-Patient*innen ohne MS-spezifische Therapie (s. Tab. 6).

In der Anwendung der ANOVA als einfache Varianzanalyse auf die fünf im Folgenden genannten verschiedenen Untergruppen zeigte sich kein statistisch signifikantes Ergebnis: therapierte Patient*innen mit Natalizumab (1), Dimethylfumarat (2), Interferon-beta (3), nicht-therapierte Patient*innen (4), und Gesunde (5). Bei separater Anwendung der ANOVA auf die Untergruppen 1-4 zeigte sich ebenfalls keine statistische Signifikanz. Wie in 3.7 beschrieben betrug die für t-Tests und ANOVA angewendete FDR nach Benjamini-Hochberg 0,1.

<i>Signifikanter Metabolit Unterarme</i>	<i>Statistische Signifikanz in</i>	<i>m/z</i>	<i>p-Wert</i>	<i>KEGG-ID</i>	<i>Modus</i>
Glutamyl-Glutaminsäure	t-Test: Untherapierte vs. Kontrollen	M277. 1037	0,000218	C01425	Positiv

Tabelle 6: Überblick über signifikante annotierte Metaboliten der Hautabstriche der Unterarme. Untherapierte: Patient*innen mit diagnostizierter RRMS ohne Multiple-Sklerose-spezifische Therapie. Kontrollen: parallelisierte gesunde Versuchsproband*innen. m/z: Angabe der spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse des Metaboliten. KEGG-ID: Code zur Identifikation anhand der KEGG-Datenbank. Modus der Messungen im Massenspektrometer.

Zum Clustering und zur primären Einordnung wurden Hauptkomponentendarstellungen, PCA (Principal component analysis) genutzt. Im Folgenden ist separat die PCA der Positivmessung (Abb. 12) sowie die PCA der Negativmessung (Abb. 13), entsprechend dem Modus der Massenspektrometrie, zu sehen. Jedes Kästchen stellt eine*n Studienteilnehmer*in dar. Eine sichtbare Gruppierung wäre ein erster Hinweis auf Ähnlichkeiten oder Unterschiede verschiedener Gruppen.

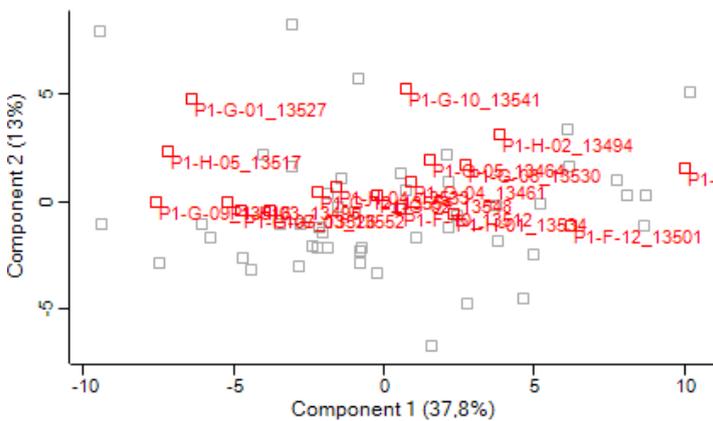


Abbildung 12: Principal component analysis der Hautabstriche der Unterarme. Positivmessung. Darstellung der gesunden Kontrollpersonen als rote Kästchen. Darstellung der Patient*innen mit RRMS als graue Kästchen.

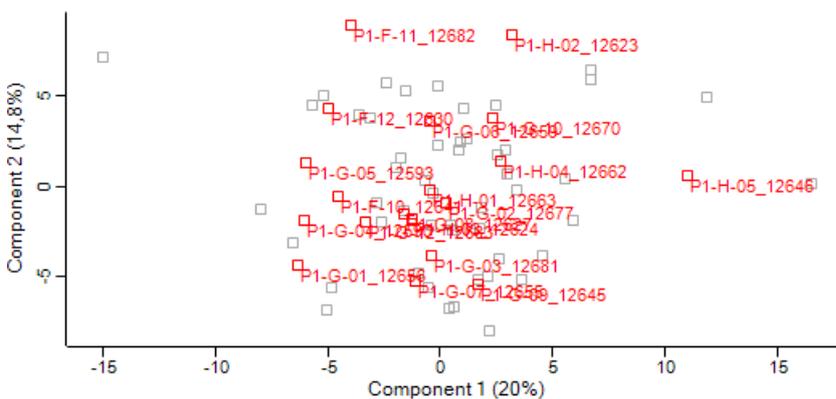


Abbildung 13: Principal component analysis der Hautabstriche der Unterarme. Negativmessung. Darstellung der gesunden Kontrollpersonen als rote Kästchen. Darstellung der Patient*innen mit RRMS als graue Kästchen.

Eine Gruppierung in den PCA für die Lokalisation der Unterarme war hierbei nicht eindeutig sichtbar (s. Abb. 12 und 13).

4.2.1.1 Glutaryl-Glutaminsäure

Wie in 4.2.1 beschrieben, zeigte sich der Metabolit Glutaryl-Glutaminsäure im Unterarmabstrich der Patient*innen mit RRMS ohne MS-Therapie als signifikant erniedrigt im Vergleich mit gesunden Kontrollproband*innen ($p=0,000218$). Der Volcano plot in Abbildung 14 stellt diese Beobachtung graphisch dar, der rot markierte Wert mit dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis M277.1037 repräsentiert die Glutaryl-Glutaminsäure.

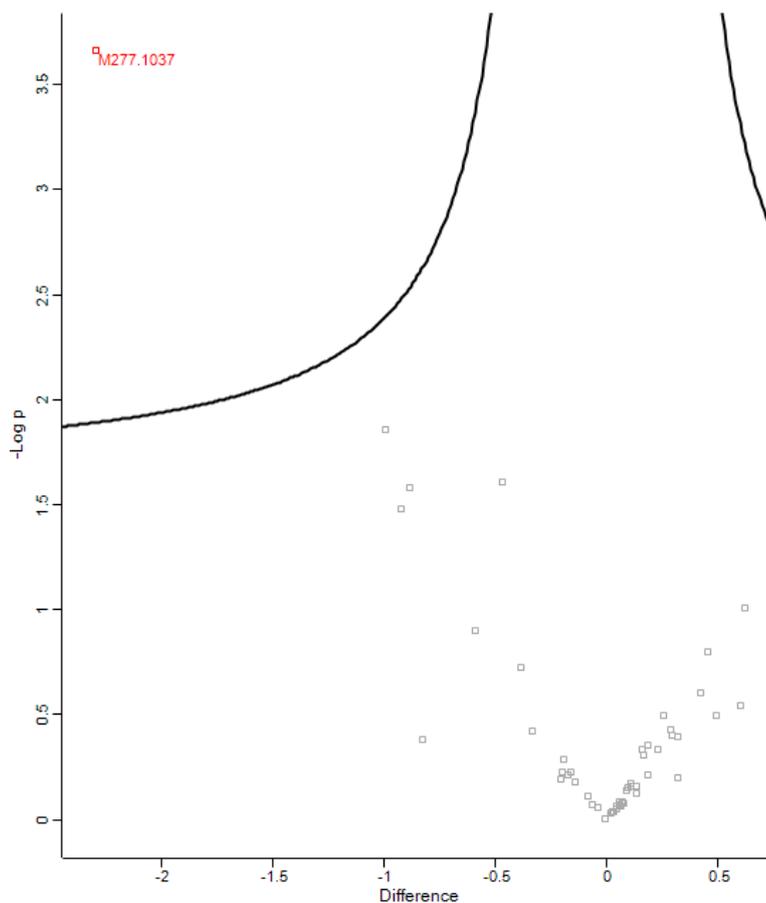


Abbildung 14: Volcano plot. Hautabstriche der Unterarme, Positivmessung. Vergleich der Patient*innen mit RRMS ohne MS-spezifische Therapie mit den gesunden Kontrollpersonen. $FDR=0,1$;

$s_0=0,1$. Difference: Unterschied. $-\log p$: negativer Logarithmus des p -Werts. Rote Markierung des signifikanten Metabolits. Angefertigt mit Perseus 1.5.5.3.

Die Glutamygl-Glutaminsäure (HMDB0028818) ist ein Dipeptid mit der Summenformel $C_{10}H_{16}N_2O_7$, bestehend aus zwei Glutamat Aminosäuren (National Center for Biotechnology Information, 2022, Wishart et al., 2018).

Unterarme - Glutamygl-Glutaminsäure

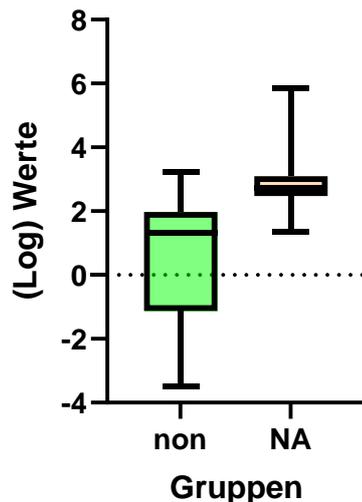


Abbildung 15: Unterarme - Glutamygl-Glutaminsäure – Boxplot der untherapierten Patient*innen und Gesunden. Positivmessung der Unterarmabstriche. Boxplot, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Werte nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung. non: Patient*innen mit Multipler Sklerose (RRMS) ohne MS-spezifische Therapie. NA: gesunde Kontrollproband*innen. $p=0,000218$. Angefertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

Der Boxplot (Kastengrafik) in Abbildung 15 zeigt die Streuung, oberes und unteres Quartil, sowie Minimal- und Maximalwerte an. Die signifikante Veränderung zeigt sich hier in erhöhten Werten der gesunden Kontrollproband*innen (NA) im Vergleich zu den Patient*innen mit RRMS ohne Therapie (non).

4.2.2 Stirn

Die Abstriche der Lokalisation Stirn wurden ebenfalls mittels Durchführung beschriebener t-Tests und einfachen Varianzanalysen untersucht.

Bei Anwendung der t-Tests zeigte sich ähnlich wie an der Lokalisation Unterarme an der Lokalisation Stirn kein signifikanter Unterschied zwischen Patient*innen mit RRMS und gesunden Kontrollproband*innen.

Im Vergleich der gesunden Kontrollpersonen mit den Patient*innen ohne MS-spezifische Therapie wurde allerdings in der Positivmessung ein signifikantes Ergebnis erkennbar: der Metabolit mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis M181.0720. Hierbei handelte es sich um myo-Inositol oder D-Glucose, die beide die selbe Summenformel sowie das selbe Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufweisen. Wie in 1.2.3.3 dargelegt, kann in der Direktinfusion nicht zwischen solchen chemischen Isomeren unterschieden werden (s. auch 5.2.1, 5.3). Dennoch bietet die Direktinfusion deutliche Vorteile gegenüber anderen Methoden (s. 1.2.3.3).

In der Anwendung der ANOVA als einfache Varianzanalysen waren wie für die Abstriche der Unterarme in 4.2.1 beschrieben keine der Ergebnisse statistisch signifikant. Sowohl in der Anwendung auf die fünf Untergruppen, davon vier verschieden therapierte Patientengruppen und eine Kontrollgruppe, als auch in der Anwendung auf lediglich die vier Patientengruppen, zeigten sich keine Metaboliten als statistisch signifikant. Die FDR nach Benjamini-Hochberg betrug wie in 3.7 beschrieben für t-Tests und ANOVA 0,1.

<i>Signifikanter Metabolit Stirn</i>	<i>Statistische Signifikanz in</i>	<i>m/z</i>	<i>p-Wert</i>	<i>KEGG-ID</i>	<i>Modus</i>
<i>Myo-Inositol oder D-Glucose</i>	t-Test: Untherapierte vs. Kontrollen	M181.0720	0,000672	C00137	Positiv
			0,000559	C00031	

Tabelle 7: Überblick über signifikante annotierte Metaboliten der Hautabstriche der Stirn. Untherapierte: Patient*innen mit diagnostizierter RRMS ohne Multiple-Sklerose-spezifische Therapie. Kontrollen: parallelisierte gesunde Versuchsperson*innen. m/z: Angabe der spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse des Metaboliten. na: non available, keine KEGG-ID verfügbar. KEGG-ID: Code zur Identifikation anhand der KEGG-Datenbank. Modus der Messungen im Massenspektrometer.

Zum Clustering wurden erneut Hauptkomponentendarstellungen, PCA, genutzt. Wie vorangegangen ist die PCA der Positivmessung (Abb. 16) sowie die PCA der Negativmessung (Abb. 17) zu sehen, ohne eindeutige Sichtbarkeit einer Gruppierung.

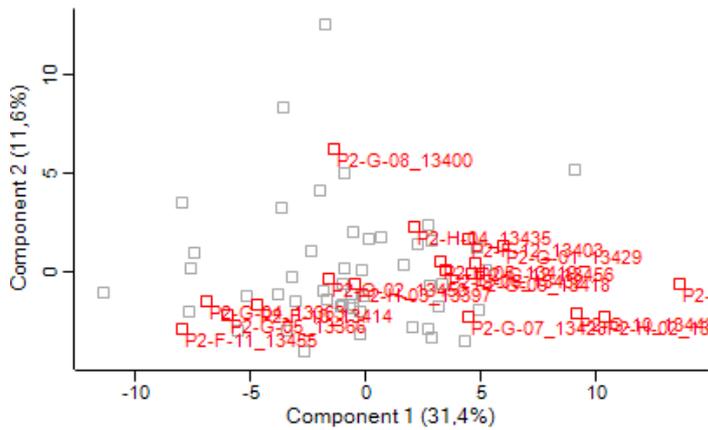


Abbildung 16: Principal component analysis des Stirnabstrichs. Positivmessung. Darstellung der gesunden Kontrollpersonen als rote Kästchen. Darstellung der Patient*innen mit RRMS als graue Kästchen.

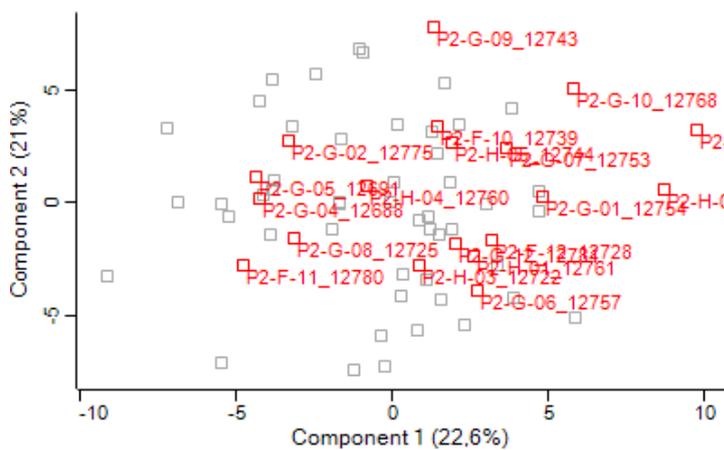


Abbildung 17: Principal component analysis des Stirnabstrichs. Negativmessung. Darstellung der gesunden Kontrollpersonen als rote Kästchen. Darstellung der Patient*innen mit RRMS als graue Kästchen.

4.2.2.1 Myo-Inositol und D-Glucose

Der Metabolit myo-Inositol bzw. D-Glucose (s. 4.2.2) war signifikant im Vergleich der untherapierten MS-Patient*innen (non) mit gesunden Kontrollpersonen (NA). Die Boxplots der Abbildung 19 zeigen die graphische Darstellung dieser Beobachtung. Der gemeinsame Volcano Plot der zwei Metaboliten ist in Abbildung 18 zu sehen.

Der Monosaccharid D-Glucose (HMDB0000122) ist ein fundamentaler Metabolit der Energiegewinnung und trägt wie myo-Inositol die Summenformel $C_6H_{12}O_6$ (Wishart). Myo-Inositol (HMDB0000211) ist ein Zuckeralkohol (Wishart).

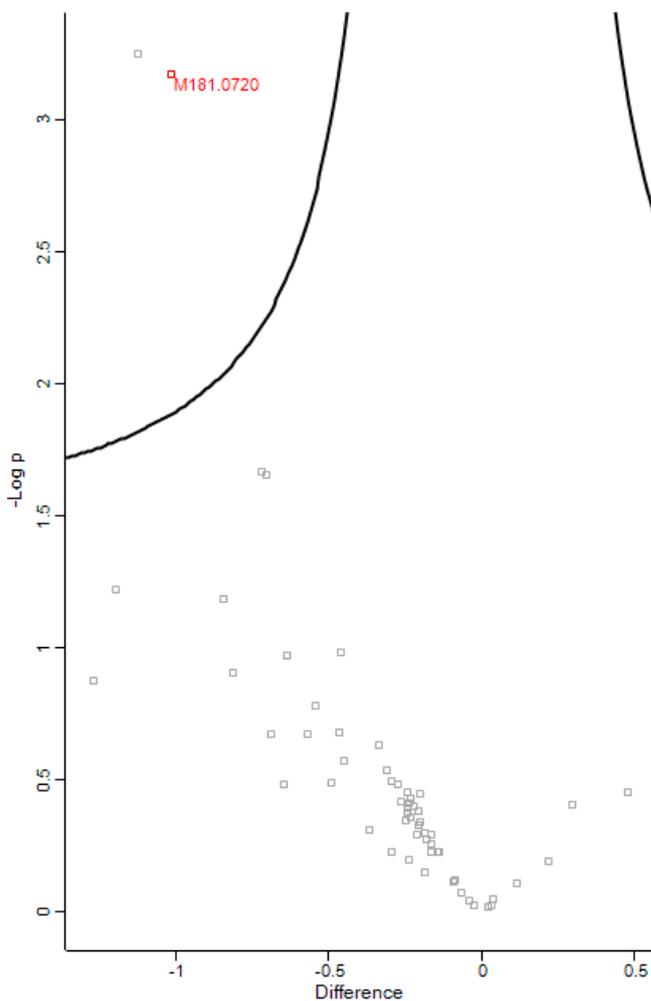


Abbildung 18: Volcano plot. Stirnabstrich Positivmessung. Vergleich der Patient*innen mit RRMS ohne MS-spezifische Therapie mit den gesunden Kontrollpersonen. $FDR=0,1$; $s_0=0,1$. Difference: Unterschied. -Log p: negativer Logarithmus des p-Werts. Rote Markierung des signifikanten Metabolits. Angefertigt mit Perseus 1.5.5.3.

Im Vergleich der zwei genannten Gruppen ist im Volcano Plot der Metabolit mit dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis M181.0720 (myo-Inositol oder D-Glucose) als signifikant zu sehen ($p=0,000672$).

In ähnlicher Relation wie die Glutanyl-Glutaminsäure im Unterarmabstrich (s. 4.2.1) sind die Werte für myo-Inositol bzw. D-Glucose bei gesunden Kontrollpersonen höher als die Werte der Patient*innen mit MS ohne MS-spezifische Therapie (s. Abb. 19).

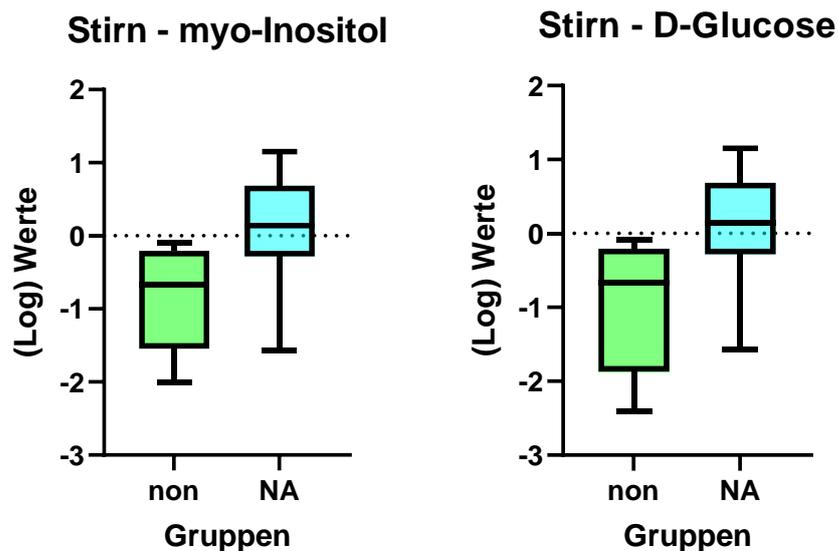


Abbildung 19: Stirn – myo-Inositol und D-Glucose – Boxplots der untherapierten Patient*innen und Gesunden. Positivmessung der Stirnabstriche. Boxplot, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Werte nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung. non: Patient*innen mit Multipler Sklerose (RRMS) ohne MS-spezifische Therapie. NA: gesunde Kontrollproband*innen. $p=0,000672$ (myo-Inositol) bzw. $p=0,000559$ (D-Glucose). Angefertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

4.2.3 Mastoid

Die Positiv- und Negativ-Messungen der Abstriche der Lokalisation Mastoid beidseits wurden ebenfalls statistisch ausgewertet. Weder die t-Tests noch die Durchführung der einfachen Varianzanalysen ergaben statistisch signifikante Ergebnisse. In den t-Tests wurden sowohl die gesammelte Patientenkohorte als auch einzeln die Patient*innen ohne MS-spezifische Therapie mit den Kontrollproband*innen verglichen. Auch die ANOVA wurde wie bereits

beschrieben auf die fünf (1-5) und separat auf die vier (1-4) Patientengruppen angewendet und zeigte kein signifikantes Ergebnis: therapierte Patient*innen mit Natalizumab (1), Dimethylfumarat (2), Interferon-beta (3), nicht-therapierte Patient*innen (4), und Gesunde (5). Die für t-Tests und ANOVA angewendete FDR nach Benjamini-Hochberg betrug 0,1 bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

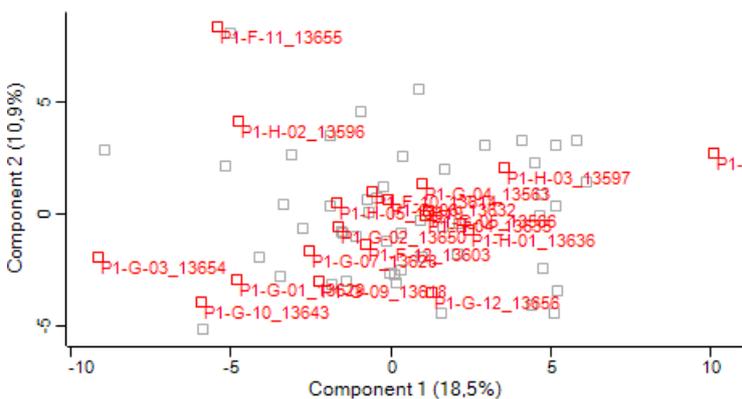


Abbildung 20: Principal component analysis der Hautabstriche des Mastoids. Positivmessung. Darstellung der gesunden Kontrollpersonen als rote Kästchen. Darstellung der Patienten mit RRMS als graue Kästchen.

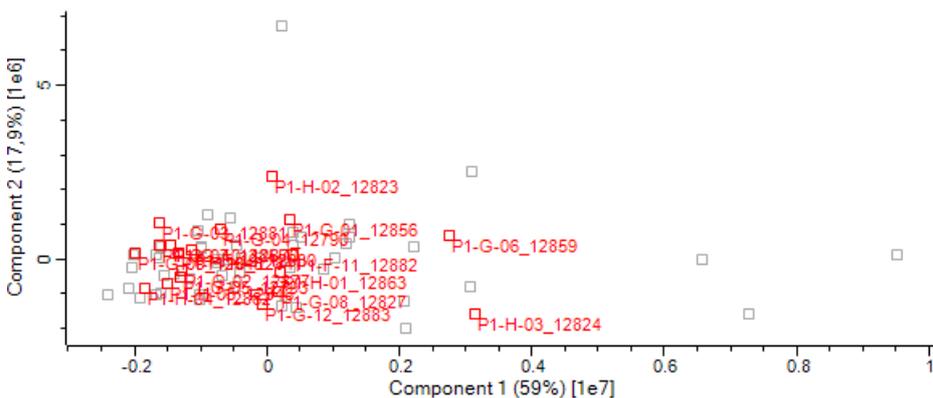


Abbildung 21: Principal component analysis der Hautabstriche des Mastoids. Negativmessung. Darstellung der gesunden Kontrollpersonen als rote Kästchen. Darstellung der Patienten mit RRMS als graue Kästchen.

Die primäre Einordnung erfolgte erneut mittels PCA. Auch hierbei waren keine Gruppierungen oder Muster zu erkennen, weder in der Positiv- (Abb. 20) noch in der Negativmessung (Abb. 21).

4.2.4 Mundschleimhaut

Die Messungen der Abstriche der Mundschleimhaut zeigten als einzige Abstrichlokalisation sowohl in der Positiv- als auch in der Negativmessung der Direktinjektions-Massenspektrometrie signifikante Ergebnisse nach Durchführung des t-Tests zum Vergleich der Patient*innen mit den gesunden Kontrollproband*innen (s. Tab. 8). Hierbei konnten in der Positivmessung ein Metabolit, Mannitol, und in der Negativmessung drei Metaboliten, Raffinose, Stearinsäure und L-2-Aminoadipat, als signifikant festgestellt werden.

Bei Anwendung des t-Tests auf Patient*innen ohne MS-spezifische Therapie und gesunde Kontrollproband*innen im Vergleich zeigte sich kein signifikantes Ergebnis.

In der einfachen Varianzanalyse, ANOVA, zeigten sich mehrere signifikante Metaboliten, angewendet auf die fünf Untergruppen der Patient*innen und Proband*innen: therapierte Patient*innen mit Natalizumab (1), Dimethylfumarat (2), Interferon-beta (3), nicht-therapierte Patient*innen (4), und Gesunde (5). Dabei waren drei Metaboliten in der Negativmessung signifikant: Stearinsäure, L-2-Aminoadipat und 5,6-Dihydrothymidin.

Bei einfacher Varianzanalyse der vier Patientengruppen 1-4 zeigten sich keine Metaboliten als statistisch signifikant.

Die FDR nach Benjamini-Hochberg betrug für t-Tests und ANOVA 0,1 mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

Durch die ANOVA waren signifikante Metabolite erkennbar, aber nicht, zwischen welchen der fünf Gruppen signifikante Unterschiede vorherrschten. Zur Differenzierung der signifikanten Paare nach genannten drei signifikanten

Metaboliten der ANOVA erfolgte der Post Hoc Tukey Test in Perseus der Version 1.6.15.0.

Signifikante Metaboliten Mund	Statistische Signifikanz in	m/z	p-Wert	KEGG-ID	Modus
Mannitol	t-Test: PT vs. CTRL	M183.0854	0,002164	C00392	Positiv
Raffinose	t-Test: PT vs. CTRL	M503.1621	0,005666	C00492	Negativ
Stearinsäure	t-Test: PT vs. CTRL & ANOVA MED	M283.2643	0,000005 & 0,000210	C01530	Negativ
L-2-Aminoacidipat	t-Test: PT vs. CTRL & ANOVA MED	M160.0618	0,002456 & 0,001045	C00956	Negativ
5,6-Dihydrothymin	ANOVA MED	M127.0513	0,003988	C00906	Negativ

Tabelle 8: Überblick über signifikante annotierte Metaboliten der Mundabstriche. PT: Patient*innen mit diagnostizierter RRMS. CTRL: (Control) parallelisierte gesunde Versuchsperson*innen. m/z: Angabe des spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses des Metaboliten. KEGG-ID: Code zur Identifikation anhand der KEGG-Datenbank. Modus der Messungen im Massenspektrometer. ANOVA MED: Einfache Varianzanalyse, angewendet auf die fünf beschriebenen Untergruppen (davon vier Patientengruppen und eine Kontrollgruppe).

Nach Durchführung des Post Hoc Tests (s. Tab. 9) stellte sich zu 5,6-Dihydrothymin heraus, dass die Signifikanz im Vergleich der folgenden Paare bestand: (a) RRMS-Patient*innen mit Interferon beta und gesunden Kontrollproband*innen sowie (b) Patient*innen mit Interferon beta und Dimethylfumarat.

Für L-2-Aminoacidipat waren die signifikanten Paare: (A) Patient*innen mit Interferon beta und gesunden Kontrollproband*innen, (B) Patient*innen mit Interferon beta und Dimethylfumarat sowie (C) Patient*innen mit Interferon beta verglichen mit nicht therapierten Patient*innen.

Bei dem dritten in der ANOVA signifikanten Metaboliten, der Stearinsäure zeigten sich in der Post Hoc Analyse Signifikanzen zwischen folgenden Paaren: (I.) nicht MS-spezifisch therapierte RRMS-Patient*innen und gesunde Proband*innen, (II.)

mit Dimethylfumarat therapierte Patient*innen und Gesunde, (III.) mit Natalizumab behandelte Patient*innen und Gesunde, sowie (IV.) mit Interferon beta therapierte RRMS-Patient*innen und gesunde Proband*innen.

Der in Tabelle 9 bezeichnete q-Wert stellt einen korrigierten p-Wert im Rahmen der ANOVA dar, welcher in Bezug auf gemessene und permutierte Daten anhand lokaler FDR-Werte angepasst wurde (Tyanova and Cox, 2018).

Metabolit	ANOVA q-Wert	ID m/z	KEGG-ID	Signifikante Paare nach Post Hoc Tukey Test
5,6-Dihydrothymidin	0,05983	M127.0513	C00906	Inf-beta_NA; Inf-beta_Dim
L-2-Aminoadipat	0,02353	M160.0618	C00956	Inf-beta_NA; Inf-beta_Dim; Inf-beta_non
Stearinsäure	0,02353	M283.2643	C01530	non_NA; Dim_NA; Nat_NA; Inf-beta_NA

Tabelle 9: Signifikante Metaboliten der ANOVA der Mundabstriche. Darstellung signifikanter Paare nach dem Post Hoc Tukey Test. Durchgeführt für signifikante Ergebnisse der ANOVA (einfache Varianzanalyse) auf fünf verschiedene Gruppen: RRMS-Patient*innen mit Natalizumab (Nat), Dimethylfumarat (Dim), Interferon-beta (Inf-beta), nicht-therapierte Patient*innen (non), und gesunde Kontrollproband*innen (NA). Angefertigt nach Perseus Version 1.6.15.0.

Das Clustering erfolgte erneut mittels PCA. Hierbei konnten insbesondere in der PCA der Negativmessung des Mundabstrichs (Abb. 26) erste Gruppierungen und Abweichungen vor Durchführung der statistischen Analyse visualisiert werden.

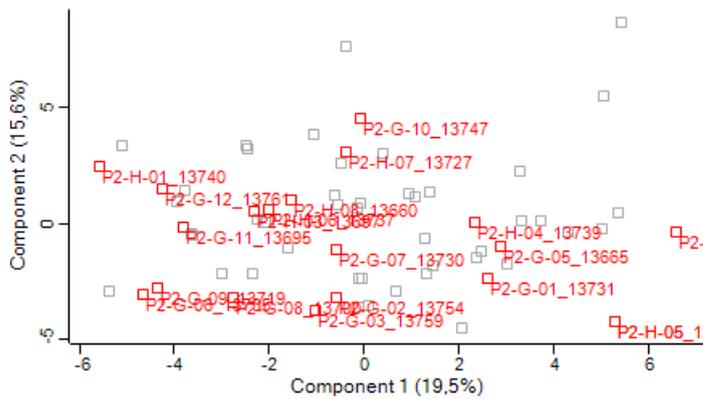


Abbildung 22: Principal component analysis des Mundabstrichs. Positivmessung. Darstellung der gesunden Kontrollpersonen als rote Kästchen. Darstellung der Patient*innen mit RRMS als graue Kästchen.

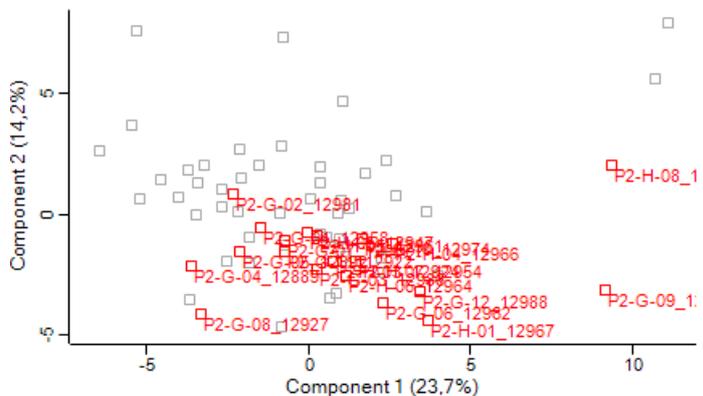


Abbildung 23: Principal component analysis des Mundabstrichs. Negativmessung. Darstellung der gesunden Kontrollpersonen als rote Kästchen. Darstellung der Patient*innen mit RRMS als graue Kästchen.

Im Vergleich der PCA der Positiv- und der Negativmessung fällt in Abbildung 23, der Negativmessung, eine stärker gruppierte Anordnung der gesunden Kontrollproband*innen auf, wohingegen in Abbildung 22, der Positivmessung, eine stärkere Streuung zu sehen ist.

4.2.4.1 Mannitol

Der Metabolit Mannitol zeigte in der Positivmessung des Mundabstriches eine Signifikanz im t-Test bei einem Vergleich der Patient*innen mit RRMS mit gesunden Kontrollproband*innen ($p=0,002164$). Diese Signifikanz ist im Volcano

plot (Abb. 24) und Boxplot (Abb. 25) visualisiert. Die Werte der Patient*innen waren signifikant höher als die Werte der Gesunden.

Das für Mannitol charakteristische Masse-zu-Ladungs-Verhältnis liegt bei 183.0854 m/z. Die Summenformel des Zuckers mit der KEGG-ID C00392 beträgt $C_6H_{14}O_6$ (Wishart).

Bei Mannitol (HMDB0000765) handelt es sich um einen ubiquitären Zuckeralkohol, der unter anderem von verschiedenen Mikroorganismen produziert wird (Wishart, Wishart et al., 2007).

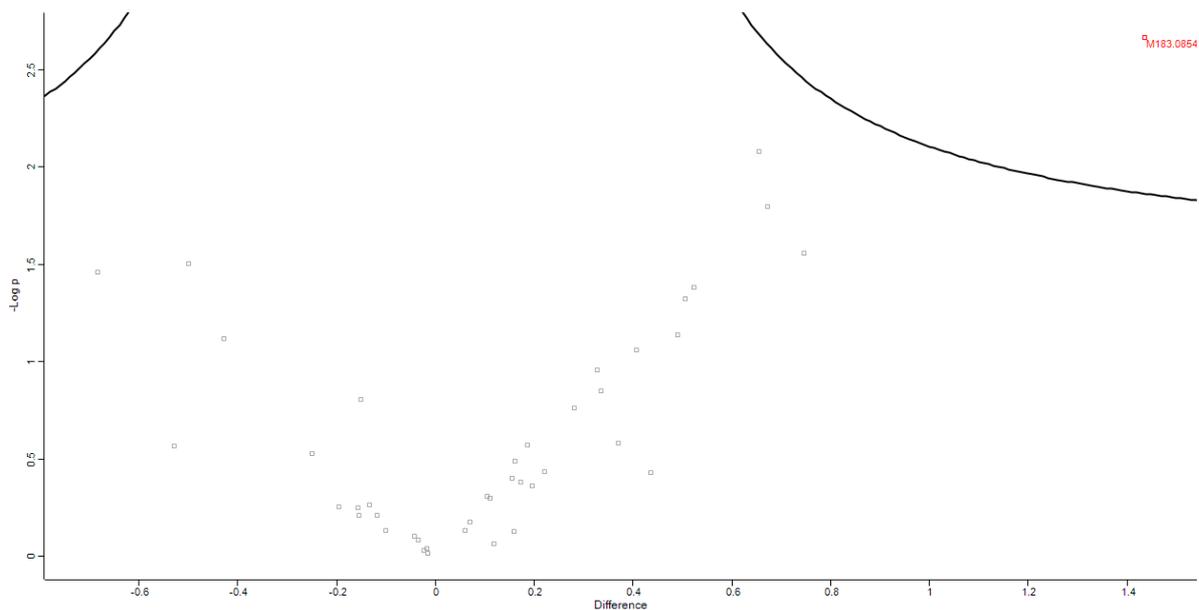


Abbildung 24: Volcano plot der Positivmessung des Mundabstrichs. Visualisierung signifikanter Ergebnisse im Vergleich der Patient*innen mit RRMS und gesunden Kontrollpersonen. $FDR=0,1$; $s_0=0,1$. Difference: Unterschied. -Log p: negativer Logarithmus des p-Werts. Rote Markierung des signifikanten Metabolits Mannitol M183.0854. Anfertigt mit Perseus 1.5.5.3.

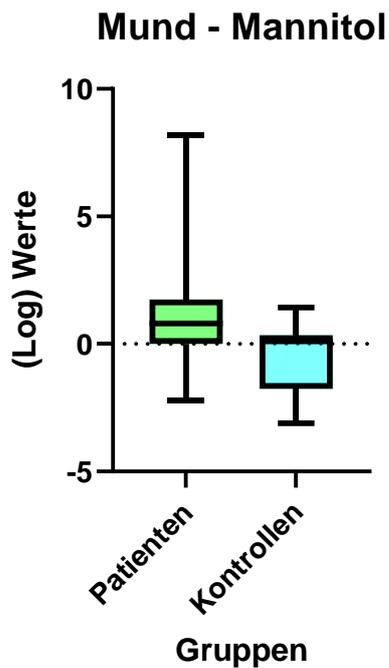


Abbildung 25: Mund – Mannitol – Boxplot der Patient*innen und Proband*innen. Positivmessung der Mundabstriche. Boxplot, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Daten nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung. Patienten: Patient*innen mit Multipler Sklerose (RRMS). Kontrollen: gesunde Kontrollproband*innen. $p=0,002164$. Angefertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

4.2.4.2 Raffinose

In der Negativmessung des Mundabstriches zeigten sich bezüglich eines Vergleichs Erkrankter und Gesunder im t-Test drei signifikante Metaboliten, davon ist einer die Raffinose ($p=0,005666$). In Abbildung 26 ist zu sehen, dass die Werte der Patient*innen signifikant erhöht waren verglichen mit Proband*innen der Kontrollkohorte.

Raffinose (HMDB0003213) ist ein Trisaccharid der Summenformel $C_{18}H_{32}O_{16}$. Bestehend aus Galactose, Fructose und Glucose trägt sie die KEGG-ID C00492 und weist ein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von M503.1621 m/z auf (Wishart).

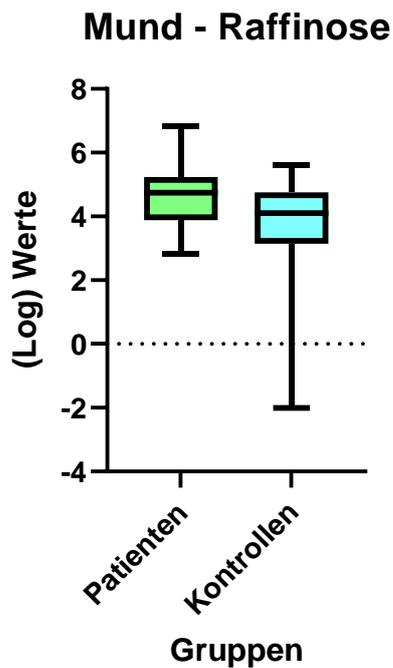


Abbildung 26: Mund – Raffinose – Boxplot der Patient*innen und Proband*innen. Negativmessung der Mundabstriche. Boxplot, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Werte nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung. Patienten: Patient*innen mit Multipler Sklerose (RRMS). Kontrollen: gesunde Kontrollproband*innen. $p=0,005666$. Angefertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

4.2.4.3 Stearinsäure

Der Metabolit Stearinsäure ist eine gesättigte langkettige Fettsäure mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von M283.2643 (HMDB0000827). Der auch als Octadecansäure bekannte Metabolit trägt die Summenformel $C_{18}H_{36}O_2$ (Wishart).

Die Stearinsäure zeigte eine Signifikanz in der Negativmessung des Mundabstriches im Vergleich der Patient*innen und der Kontrollpersonen durch den t-Test ($p=0,000005$). Dies ist im Volcano plot (Abb. 27) zu sehen. Die Werte der Patient*innen waren signifikant höher als die der Proband*innen (s. Abb. 28).

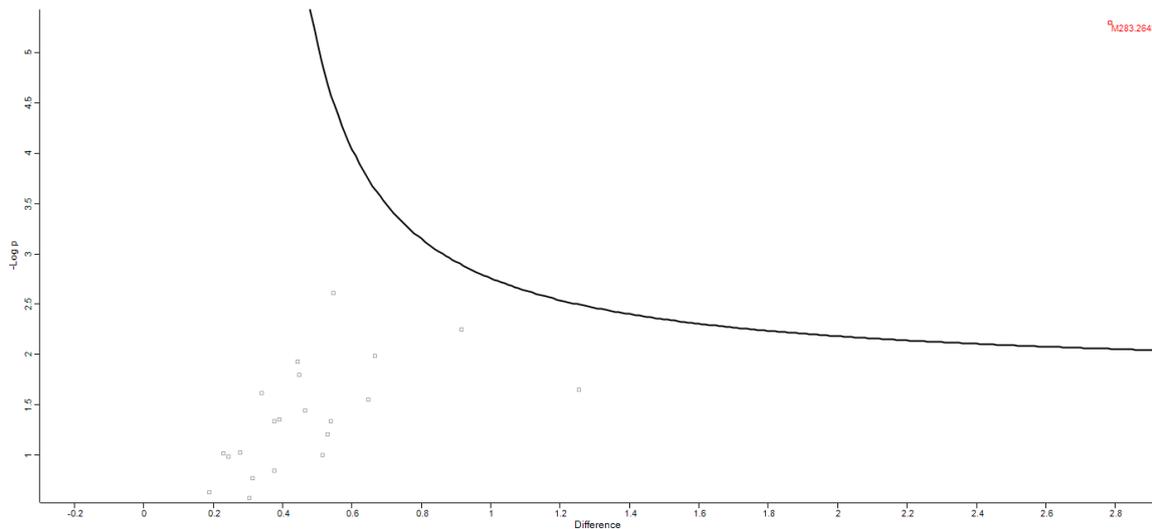


Abbildung 27: Volcano plot der Negativmessung des Mundabstrichs. Visualisierung signifikanter Ergebnisse im Vergleich der Patienten mit RRMS und gesunden Kontrollpersonen. $FDR=0,1$; $s_0=0,1$. Difference: Unterschied. -Log p: negativer Logarithmus des p-Werts. Rote Markierung des signifikanten Metaboliten Stearinsäure M238.2643. Angefertigt mit Perseus 1.5.5.3.

Zusätzlich zum t-Test (s. Abb. 27, 28) war die Stearinsäure ebenfalls in der einfachen Varianzanalyse, ANOVA, signifikant ($p=0,000210$), angewandt auf die beschriebenen fünf untersuchten Untergruppen: therapierte Patient*innen mit Natalizumab (Nat), Dimethylfumarat (Dim), Interferon-beta (Inf-beta), nicht-therapierte Patient*innen (non), und gesunde Proband*innen (NA). Der Post Hoc Test nach Tukey zeigte die Signifikanz der ANOVA im Vergleich der folgenden Gruppen: (I.) nicht therapierte RRMS-Patient*innen (non) und gesunde Proband*innen (NA), (II.) mit Dimethylfumarat therapierte Patient*innen (Dim) und Gesunde, (III.) mit Natalizumab behandelte (Nat) und Gesunde, sowie (IV.) mit Interferon beta (Inf-beta) therapierte RRMS-Patient*innen und gesunde Proband*innen (s. Abb. 29). Der q-Wert für den Post Hoc Tukey Test betrug 0,024.

Mund - Stearinsäure

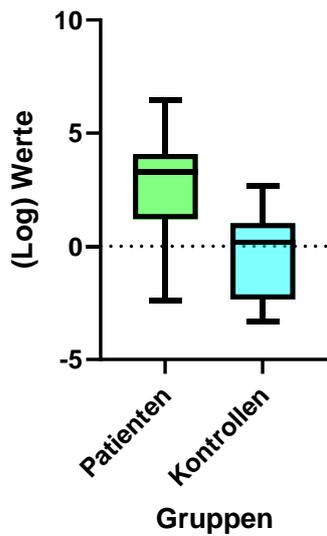


Abbildung 28: Mund – Stearinsäure – Boxplot der Patient*innen und Proband*innen. Negativmessung der Mundabstriche. Boxplot, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Daten nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung. Patienten: Patient*innen mit Multipler Sklerose (RRMS). Kontrollen: gesunde Kontrollproband*innen. $p=0,000005$. Angefertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

Mund - Stearinsäure

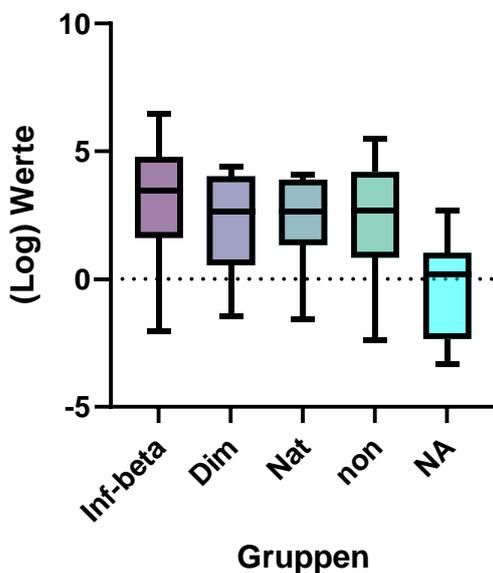


Abbildung 29: Mund – Stearinsäure – Boxplot der fünf Untergruppen. Negativmessung der Mundabstriche. Boxplot der fünf untersuchten Untergruppen, da sich bezogen auf diese die ANOVA signifikant zeigte. Boxplot, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Daten nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung. Untergruppen: Inf-beta: mit Interferon- β therapierte Patient*innen (Pt.); Dim: mit Dimethylfumarat therapierte Pat.; Nat: Pt. Unter Therapie mit Natalizumab; non: Pt. mit Multipler Sklerose (RRMS) ohne MS-spezifische Therapie; NA: gesunde Kontrollproband*innen. $q=0,02353$. Angefertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

4.2.4.4 L-2-Aminoadipat

Auch der Metabolit L-2-Aminoadipat war im t-Test bei Patient*innen mit RRMS signifikant höher im Vergleich mit den gesunden Kontrollproband*innen ($p=0,002456$). Dies zeigte sich wie die Stearinsäure in der Negativmessung der Mundabstriche und ist in Abbildung 30 als Boxplot dargestellt. L-2-Aminoadipat (HMDB0000510) ist ein Metabolit des Lysin-Stoffwechselweges (KEGG-ID C00956). Die Summenformel beträgt $C_6H_{11}NO_4$ und das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis M160.0618 (Wishart).

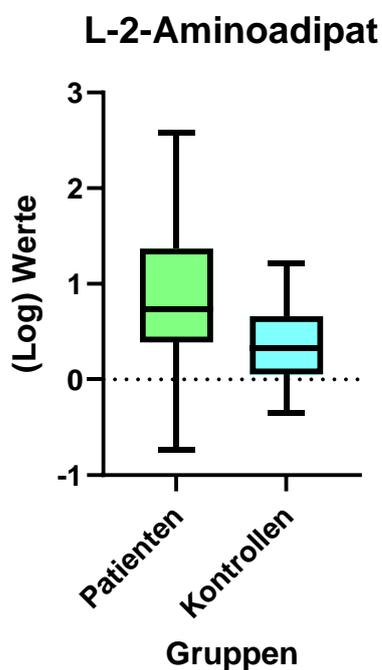


Abbildung 30: Mund – L-2-Aminoadipat – Boxplot der Patient*innen und Proband*innen. Negativmessung der Mundabstriche. Boxplot, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Daten nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung. Patienten: Patient*innen mit Multipler Sklerose (RRMS). Kontrollen: gesunde Kontrollproband*innen. $p=0,002456$. Angefertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

L-2-Aminoadipat war ebenfalls in der einfachen Varianzanalyse signifikant ($p=0,001045$). Die fünf untersuchten und mehrfach beschriebenen Untergruppen (s. 4.2.4.3) wurden mittels ANOVA analysiert und als Boxplot visualisiert (s. Abb. 31).

Im Post Hoc Test nach Tukey zeigten sich für L-2-Aminoadipat weniger signifikante Paare als bei der Stearinsäure. L-2-Aminoadipat war im Post Hoc

Test signifikant im Vergleich folgender Gruppen: (A) RRMS-Patient*innen mit Interferon beta und gesunden Kontrollproband*innen, (B) Patient*innen mit Interferon beta und Dimethylfumarat sowie (C) Patient*innen mit Interferon beta verglichen mit nicht therapierten Patient*innen. Der angepasste p-Wert (q-Wert) betrug 0,024.

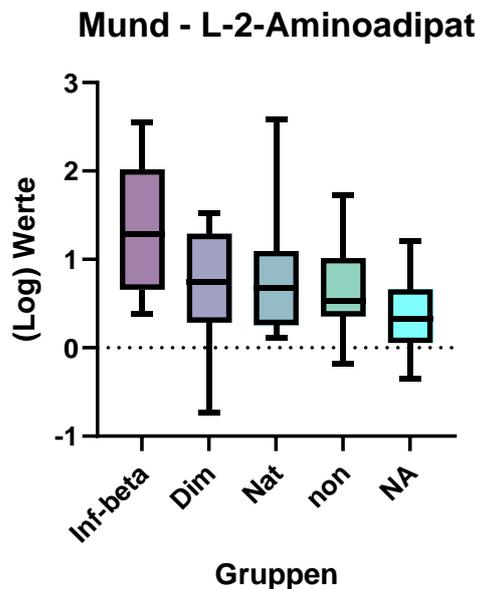


Abbildung 31: Mund – L-2-Aminoadipat – Boxplot der fünf Untergruppen. Negativmessung der Mundabstriche. Boxplot der fünf untersuchten Untergruppen, da sich bezogen auf diese die ANOVA signifikant zeigte. Boxplot, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Daten nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung.

Untergruppen: Inf-beta: mit Interferon- β therapierte Patient*innen (Pt.); Dim: mit Dimethylfumarat therapierte Pat.; Nat: Pt. Unter Therapie mit Natalizumab; non: Pt. mit Multipler Sklerose (RRMS) ohne MS-spezifische Therapie; NA: gesunde Kontrollproband*innen. $q=0,02353$. Anfertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

4.2.4.5 5,6-Dihydrothymin

5,6-Dihydrothymin ist ein Hydropyrimidin und enthält einen hydrogenierten Pyrimidinring (HMDB0304210). Der Metabolit ist am Pyrimidin-Stoffwechsel beteiligt (KEGG-ID C00906). Summenformel und Masse-zu-Ladung-Verhältnis betragen $C_5H_8N_2O_2$ und M127.0513 (Wishart).

Der genannte Metabolit stellte sich im Vergleich von Patient*innen mit RRMS und Kontrollproband*innen in der Negativmessung des Mundabstrichs im t-Test nicht

als signifikant heraus (Abb. 32).

Der Metabolit 5,6-Dihydrothymin präsentierte sich als einziger Metabolit in dieser Studie ausschließlich in der einfachen Varianzanalyse als signifikant ($p=0,003988$). Die ANOVA wurde erneut auf die genannten fünf Untergruppen angewandt (s. 4.2.4): therapierte Patient*innen mit Natalizumab (Nat), Dimethylfumarat (Dim), Interferon-beta (Inf-beta), nicht-therapierte Patient*innen (non), und gesunde Proband*innen (NA).

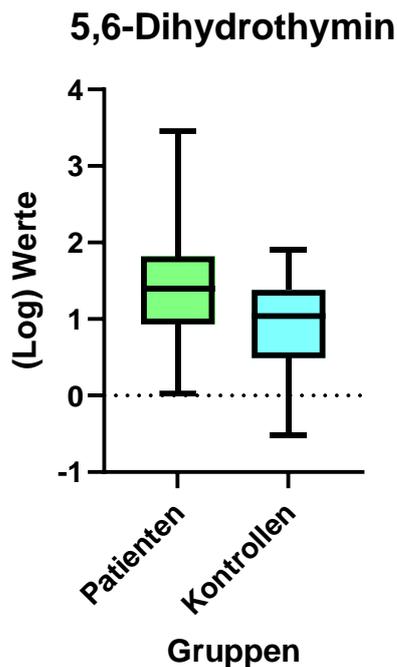


Abbildung 32: Mund – 5,6-Dihydrothymin – Boxplot der Patient*innen und Proband*innen – nicht signifikant. Negativmessung der Mundabstriche, keine Signifikanz im t-Test. Boxplot, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Daten nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung. Patienten: Patient*innen mit Multipler Sklerose (RRMS). Kontrollen: gesunde Kontrollproband*innen. $p > 0,05$; nicht signifikant. Angefertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

Im Post Hoc Test nach Tukey (Abb. 33) waren die folgenden Paare signifikant: (a) RRMS-Patient*innen mit Interferon beta und gesunden Kontrollproband*innen sowie (b) Patient*innen mit Interferon beta und Dimethylfumarat. Der q-Wert des Post Hoc Test nach Tukey betrug 0,059.

Mund - 5,6-Dihydrothymin

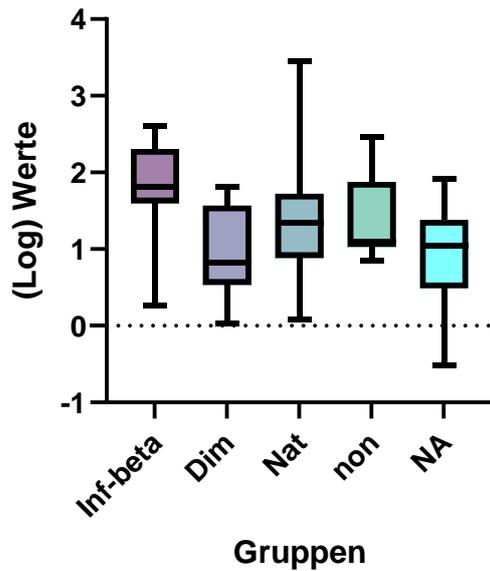


Abbildung 33: Mund – 5,6-Dihydrothymin – Boxplot der fünf Untergruppen. Negativmessung der Mundabstriche. Boxplot der fünf untersuchten Untergruppen, da sich bezogen auf diese die ANOVA signifikant zeigte. Boxplot, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Daten nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung.
Untergruppen: Inf-beta: mit Interferon- β therapierte Patient*innen (Pt.); Dim: mit Dimethylfumarat therapierte Pat.; Nat: Pt. Unter Therapie mit Natalizumab; non: Pt. mit Multipler Sklerose (RRMS) ohne MS-spezifische Therapie; NA: gesunde Kontrollproband*innen. $q=0,05983$. Angefertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

4.3 Pathway enrichment analysis

Im Rahmen der Auswertung wurde eine Stoffwechselwegs-Analyse (pathway-enrichment-analysis) durchgeführt, um beteiligte biochemische Prozesse und Signalkaskaden zu spezifizieren. Die bereits aufgeführten signifikanten Metaboliten (s. 4.2 und 4.4) wurden analysiert, um hoch- oder herunter-regulierte und gemeinsame Stoffwechselwege zu erkennen.

Mittels Metaboanalyst konnte gezeigt werden, dass verschiedene Stoffwechselwege verändert bzw. hochreguliert waren (s. Abb. 34) (Pang et al., 2021, Xia et al., 2009).

Signifikant verändert war der Galaktose-Stoffwechsel, an dem zwei der beschriebenen signifikanten Metaboliten beteiligt waren: D-Glucose bzw. myo-Inositol sowie Raffinose ($p=0,0023$).

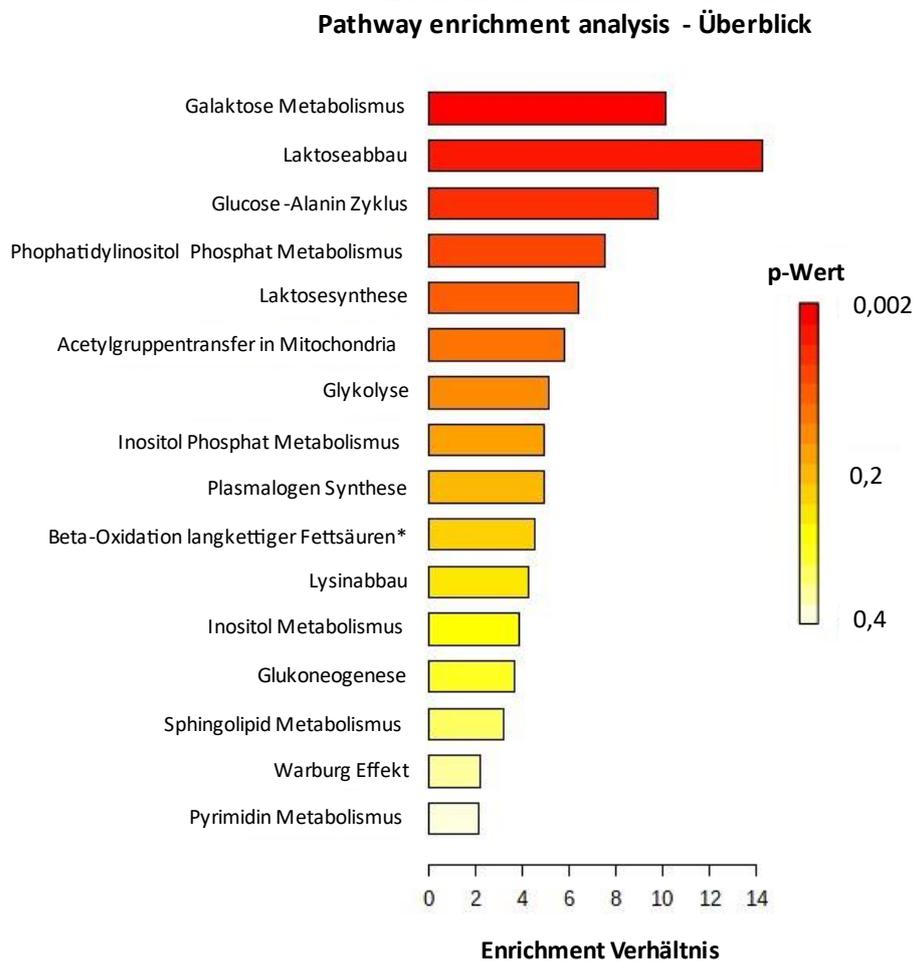


Abbildung 34: Pathway enrichment analysis - Überblick. Balkendiagramm. Zu sehen sind die Top 25 der beteiligten Stoffwechselwege, welche mittels Metaboanalyst in der Pathway enrichment analysis erkannt wurden. Y-Achse: Stoffwechselwege, X-Achse: Enrichment Verhältnis. Anhand der Farbintensität wird der p-Wert visualisiert, der p-Wert des Galaktose-Stoffwechsels beträgt hier 0,002.

* Mitochondriale beta-Oxidation langkettiger gesättigter Fettsäuren. Angefertigt durch und mithilfe von Metaboanalyst Version 5.

Weitere Stoffwechselwege, die eine Tendenz zur Veränderung zeigten, jedoch nicht signifikant verändert waren (s. Tab. 10), sind für die D-Glucose sowohl Lactose-Abbau als auch -Synthese, der Glucose-Alanin-Zyklus, Acetylgruppentransfer ins Mitochondrium, Glykolyse, Glukoneogenese, Sphingolipid Metabolismus und der Warburg Effekt.

Der Metabolit myo-Inositol ist zusätzlich im Phosphatidylinositol Phosphat Metabolismus, im Inositol Phosphat Metabolismus und im Inositol Metabolismus präsent. Für die Stearinsäure zeigten sich als Stoffwechselwege insbesondere die Plasmalogen Synthese und die mitochondriale beta-Oxidation langkettiger gesättigter Fettsäuren. L-2-Aminoadipat ist Metabolit des Lysinabbaus und 5,6-Dihydrothymin ist Teil des Pyrimidin Stoffwechsels.

Stoffwechselwege	N Metaboliten	Treffer	Beteiligte signifikante Metaboliten	p-Wert
Galaktose Metabolismus	38	3	D-Glucose, Raffinose, myo-Inositol	0.0023
Laktoseabbau	9	1	D-Glucose	0.0684
Glucose-Alanin Zyklus	13	1	D-Glucose	0.0975
Phosphatidylinositol Phosphat Metabolismus	17	1	myo-Inositol	0.126
Laktose Synthese	20	1	D-Glucose	0.146
Acetylgruppentransfer ins Mitochondrium	22	1	D-Glucose	0.16
Glykolyse	25	1	D-Glucose	0.18
Inositol Phosphat Metabolismus	26	1	myo-Inositol	0.187
Plasmalogen Synthese	26	1	Stearinsäure	0.187
Mitochondriale Beta-Oxidation langkettiger gesättigter Fettsäuren	28	1	Stearinsäure	0.2
Lysinabbau	30	1	L-2-Aminoadipat	0.212
Inositol Metabolismus	33	1	myo-Inositol	0.231
Glukoneogenese	35	1	D-Glucose	0.244
Sphingolipid Metabolismus	40	1	D-Glucose	0.274
Warburg Effekt	58	1	D-Glucose	0.374
Pyrimidin Metabolismus	59	1	Dihydrothymin	0.379

Tabelle 10: Ergebnisse der Pathway enrichment analysis. Übersicht der mittels Pathway enrichment analysis ermittelter Stoffwechselwege, an denen die signifikanten Metaboliten der Hautabstriche beteiligt sind. N Metaboliten: Anzahl der an diesem Stoffwechselweg insgesamt beteiligten Metaboliten. Treffer: Anteil der in dieser Studie signifikanten Metaboliten, bezogen auf N.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Insgesamt sieben Metabolite zeigten eine Signifikanz in dieser Studie zum Metabolom der Haut (Tab. 11).

Sign. in der Analyse	Metaboliten	Stelle	p-Wert	m/z	KEGG-ID	Modus (+)/(-)
Non vs. CTRL	<i>Glutaryl-Glutaminsäure</i>	Unterarme	0,000218	M277.1037	C01425	(+)
	<i>Myo-Inositol bzw. D-Glucose</i>	Stirn	0,000672 0,000559	M181.0720	C00137 C00031	(+)
PT vs. CTRL	<i>Mannitol</i>	Mund	0,002164	M183.0854	C00392	(+)
	<i>Raffinose</i>	Mund	0,005666	M503.1621	C00492	(-)
	<i>Stearinsäure</i>	Mund	0,000005	M283.2643	C01530	(-)
	<i>L-2-Aminoadipat</i>	Mund	0,002456	M160.0618	C00956	(-)
ANOVA MED	<i>Stearinsäure</i>	Mund	0,000210	M283.2643	C01530	(-)
	<i>L-2-Aminoadipat</i>	Mund	0,001045	M160.0618	C00956	(-)
	<i>5,6-Dihydrothymidin</i>	Mund	0,003988	M127.0513	C00906	(-)

Table 11: Ergebnisübersicht. Darstellung der signifikanten (sign.) Ergebnisse der Hautabstriche, geordnet nach signifikantem Testverfahren. Non vs. CTRL: Patient*innen mit RRMS ohne MS-spezifische Therapie (non) im Vergleich mit gesunden Kontrollproband*innen (CTRL). Hierbei zeigten sich die zwei dargestellten Metaboliten signifikant verändert. PT vs. CTRL: Patient*innen mit RRMS jeder eingeschlossenen Therapie (PT) gegen Kontrollproband*innen: Dabei waren vier Metaboliten signifikant. ANOVA MED: In der einfachen Varianzanalyse der verglichenen fünf Untergruppen (s.4.2.4) stellten sich drei Metaboliten als signifikant dar. Angewandte FDR (false discovery rate) nach Benjamini-Hochberg von 0,1.

Stelle: bezieht sich auf die Abnahmestelle des Hautabstrichs, an der ein Metabolit als signifikant festgestellt wurde. m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis, massenspektrometrisch gemessen. KEGG-ID: Identifikationscode in der KEGG Datenbank (Kyoto Enzyklopädie der Gene und des Genoms) (Kanehisa et al., 2002). Modus: Positiver (+) oder Negativer (-) Modus der massenspektrometrischen Messung.

Dabei waren im Vergleich der Patient*innen ohne MS-spezifische Therapie mit gesunden Proband*innen zwei Metabolite signifikant verändert, davon stammte

ein Metabolit von der Lokalisation der Unterarme und einer von der Stirn (s. 5.2.1). Im Vergleich der Patient*innen insgesamt mit den Proband*innen waren vier Metabolite der Mundschleimhaut signifikant aberriert (s. 5.2.2). Zudem ließen sich drei signifikante Metabolite in der Varianzanalyse und nach Durchführung des Post Hoc Tests zwischen einzelnen Therapiegruppen darstellen (s. 5.2.3). Von diesen dreien waren zwei zugleich im t-Test signifikant. Die Varianzanalyse bezog sich auf die fünf Therapiegruppen: RRMS-Patient*innen behandelt mit Natalizumab (Nat), Dimethylfumarat (Dim), Interferon-beta (Inf-beta), nicht-therapierte Patient*innen (non), und gesunde Kontrollproband*innen (NA). In Bezug auf die analysierten signifikanten Metaboliten war der Galaktoseabbau als Stoffwechselweg signifikant beteiligt.

5 Diskussion

5.1 Überblick

In dieser Studie konnten multiple Veränderungen des Metaboloms bei Patient*innen mit schubförmig verlaufender Multipler Sklerose im Vergleich zu Gesunden festgestellt werden (s. 4.4). Die Anwendung von Hautabstrichen stellte sich in dieser Studie als nützliche, vorteilhafte aber auch herausfordernde Methode heraus, um Biomarker für die RRMS zu etablieren (s. 5.3.1). Grundannahme für die Hautabstriche und die folgende Interpretation der Ergebnisse ist, dass hauptsächlich mikrobielle, bspw. bakterielle Metaboliten durch die Abstriche abgetragen und analysiert wurden. Die Zusammensetzung der Mikrobiota beeinflusst die Metaboliten der Haut wesentlich. Körpereigene Metaboliten können zu einem kleinen Anteil ebenfalls vorhanden sein. Analysiert und ausgewertet wurden annotierte - somit bereits definierte „identifizierbare“-Metaboliten, für die unter anderem die KEGG Datenbank und die HMDB (Human Metabolome Database) herangezogen wurden (Wishart et al., 2018, Kanehisa et al., 2002). Angenommen wurde, dass die Mikrobiota insbesondere Metaboliten des Primärstoffwechsels produzieren.

5.2 Interpretation

5.2.1 Unterscheidung nicht behandelter Patient*innen von Gesunden

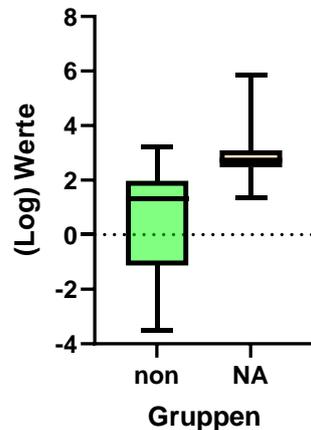
Bei einem Vergleich der Patient*innen mit RRMS ohne MS-spezifische Therapie mit gesunden Proband*innen waren insgesamt zwei Metaboliten in den Hautabstrichen signifikant verändert (s. Abb. 35). Sowohl Glutaryl-Glutaminsäure an den Unterarmen (s. 4.2.1), als auch die D-Glucose bzw. myo-Inositol an der Stirn (s. 4.2.2) zeigten sich bei den Gesunden in der Positivmessung signifikant erhöht. Relevant ist, dass aufgrund des gleichen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses bei gleicher chemischer Summenformel in der Methode der Direktinfusion nicht zwischen den zwei Metaboliten myo-Inositol und D-Glucose unterschieden werden konnte (s. 1.2.3.3 und 4.2.2).

Glutaryl-Glutaminsäure entsteht als Dipeptid aus zwei Glutaminsäure-Resten und gilt als Zwischenprodukt der Proteolyse oder katabolischer Stoffwechselwege (Wishart). In Bezug auf Assoziationen zu Erkrankungen ist laut HMDB wenig bekannt (HMDB0028818). Das Dipeptid wird bevorzugt durch Bakterien umgesetzt, die mit dem Auftreten von Gingivitis oder Parodontitis assoziiert sind, wie *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Fusobacterium nucleatum* und *Prevotella intermedia*. Durch Zink kann diese Umsetzung gehemmt werden (Takahashi and Sato, 2002, Sheng et al., 2005). *P. gingivalis* setzt Glutaryl-Glutaminsäure zu Butyrat, Propionat und Ammonium um, welche als zytotoxisch gelten (Takahashi et al., 2000). Eine direkte Assoziation des Metaboliten Glutaryl-Glutaminsäure zur MS ist bisher nicht bekannt.

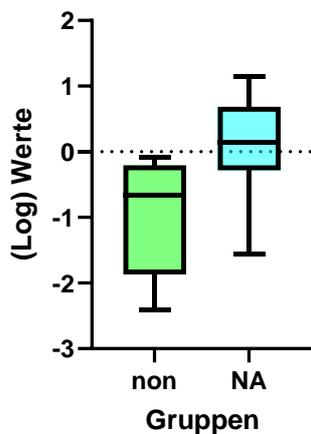
In dieser Studie war bei den Gesunden signifikant mehr Glutaryl-Glutaminsäure auf der Haut der Unterarme nachweisbar als bei den MS Patient*innen ohne spezifische Therapie (s. 4.2.1; Abb. 35). Dieser Unterschied war möglicherweise dadurch bedingt, dass bei bekannter MS eine größere Menge an pathogenen Keimen wie *P. gingivalis* vorlag, welche zu einer gesteigerten Umsetzung und somit geringeren nachweisbaren Menge des Metaboliten führte. Somit könnten

bei MS Patient*innen vermehrt entzündliche Prozesse wie Gingivitis und Parodontitis, bedingt durch eine Dysbiose, vorherrschen.

Unterarme - Glutamy-Glutaminsäure



Stirn - D-Glucose



Stirn - myo-Inositol

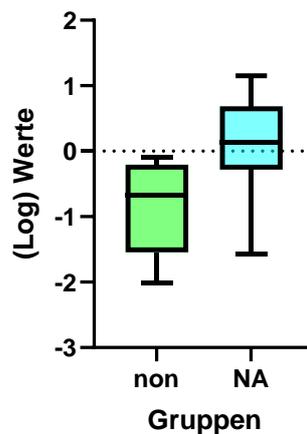


Abbildung 35: Ergebnisübersicht: Boxplots signifikanter Metabolite im Vergleich untherapierter Patient*innen mit gesunden Proband*innen. Zusammenfassung signifikanter Metabolite im Vergleich der Hautabstriche von Patient*innen mit Multipler Sklerose (RRMS) ohne MS-spezifische Therapie (non) gegen gesunde Kontrollproband*innen (NA). Insgesamt waren zwei Metabolite in genanntem Vergleich signifikant: Glutamy-Glutaminsäure ($p=0,000218$) im Abstrich der Unterarme (Positivmessung), sowie D-Glucose ($p=0,000559$) bzw. myo-Inositol ($p=0,000672$) im Abstrich der Stirn (Positivmessung). Für diese drei Metaboliten waren die Werte der Gesunden signifikant höher als die der untherapierten Patient*innen. FDR 0,1. Boxplots, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Daten nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung. Anfertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

Myo-Inositol (s. 4.2.2, Abb.35) ist ein Zuckeralkohol, der als vorherrschende isomere Form von Inositol in der Natur und in einer Vielzahl von Lebensmitteln

vorkommt (Gonzalez-Uarquin et al., 2020). Er wird im menschlichen Körper hauptsächlich in den Nieren aus Glucose hergestellt (HMDB0000211) (Wishart). Unter anderem übernimmt dieser Metabolit Funktionen im Glucose- und Insulinstoffwechsel sowie in der Osmolarität (Gonzalez-Uarquin et al., 2020).

Myo-Inositol wird therapeutisch bei Vorliegen eines Polyzystischen Ovarialsyndroms (PCOS) angewandt und erhöht die Insulinsensitivität (Merviel et al., 2021, Croze and Soulage, 2013). Erhöhte Konzentrationen wurden bei Patient*innen mit Schizophrenie im Serum festgestellt (Xuan et al., 2011), wohingegen reduzierte Konzentrationen bei Depression festgestellt wurden (Robillard et al., 2017, Chiappelli et al., 2015). Auch im Tiermodell für therapieresistente Depression wurden signifikant reduzierte Konzentrationen von myo-Inositol gemessen, welche mit den Bakterienstämmen Akkermansia und Lactobacillus korrelierten (Song et al., 2019). Die dargelegten Veränderungen könnten auf eine in Mikrobiota und Metaboliten sichtbar gewordene Vergesellschaftung der MS mit Depression hindeuten (Thompson et al., 2018b). In weiteren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen veränderten myo-Inositol Spiegeln und bei Parodontitis veränderten Mikrobiota wie *Aggregatibacter*, *Bacteroidaceae* (Shi et al., 2020) oder im Kontext einer Zirrhose *Enterobacteriaceae* (Ahluwalia et al., 2016) dargelegt.

Bei Patient*innen mit MS wurden im Plasma reduzierte Konzentrationen von myo-Inositol bzw. D-Glucose im Vergleich zu Gesunden gemessen (Yang et al., 2021b, Poddighe et al., 2017). Dies entspricht der Beobachtung dieser Studie zu myo-Inositol im Hautabstrich der Stirn im Vergleich der Patient*innen mit MS ohne spezifische Therapie mit den gesunden Proband*innen. Im Liquor hingegen wurden teils erhöhte Werte für myo-Inositol festgestellt (Reinke et al., 2014). Zusätzlich wurden erhöhte Werte im Liquor von Patient*innen mit einem CIS und späterem Übergang in eine MS festgestellt (Probert et al., 2021). Dies könnte für eine zentrale Akkumulation des Metaboliten bei MS im ZNS oder Liquor sprechen mit daraus folgender peripher im Blut und auf der Haut erniedrigter Konzentration (Yang et al., 2021b). Myo-Inositol könnte als Biomarker für die MS auf eine Dysbiose, möglicherweise in Zusammenhang mit einer Depression, hinweisen.

D-Glucose trägt die gleiche chemische Summenformel wie myo-Inositol und ist im menschlichen Körper essenziell für die Energiegewinnung durch den Glucosestoffwechsel. In vorliegender Studie konnte aufgrund der nicht möglichen Unterscheidung zwischen chemischen Isomeren in der Direktinfusion nicht spezifiziert werden, ob es sich bei dem signifikant veränderten Metaboliten der Stirn um D-Glucose oder myo-Inositol handelte. D-Glucose ist ein Monosaccharid mit ubiquitärem Vorkommen wird über Nahrungsmittel aufgenommen sowie von Lebewesen aus Polysacchariden hergestellt (HMDB0000122) (Wishart). Eine Dysbalance im Glucosestoffwechsel ist mit einer Vielzahl an Erkrankungen assoziiert, wie Diabetes mellitus (Haythorne et al., 2019), Krebserkrankungen (Li and Zhang, 2016) oder Morbus Alzheimer (Kapogiannis and Mattson, 2011). Ein fehlregulierter Glucose-Stoffwechsel kann zu kardiovaskulären Erkrankungen, Adipositas, Neuropathie und Nierenerkrankungen führen (López-Gamero et al., 2019).

Für den Prozess der Neurodegeneration, die in der MS eine zentrale Rolle spielt, scheint eine Verschiebung des Stoffwechsels von Glucose hin zu Lipiden von Bedeutung zu sein (Trabjerg et al., 2020). In einem Modell für Resistenz gegen Neurodegeneration waren signifikante Unterschiede der Glucose Werte mit Veränderungen der Stämme des Darmmikrobioms assoziiert, unter anderem mit Firmicutes, Bacteroidetes und Actinobakterien (Trabjerg et al., 2020). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass ein gestörter Glucosestoffwechsel in der Pathogenese der MS relevant sein könnte (Jones et al., 1950, Regenold et al., 2008, Mathur et al., 2014). Die Menge der über Nahrung aufgenommenen Glucose scheint ebenfalls von Bedeutung zu sein. Im Tiermodell für MS konnte bei Verabreichung einer hohen Menge an Glucose eine Zunahme der Autoimmunität, vermittelt durch TGF- β und Th17 Zellen, gezeigt werden (Zhang et al., 2019). Im Gegensatz dazu wurden in dieser Studie (s. 4.2.2 und Abb. 35) allerdings erniedrigte Werte bei MS Erkrankten ohne spezifische Therapie im Vergleich zu Gesunden festgestellt. Jedoch ist davon auszugehen, dass der Glucosestoffwechsel bei MS verändert ist.

Assoziierte parallele Veränderungen der Metaboliten Glutaryl-Glutaminsäure, myo-Inositol und D-Glucose sind bisher nicht bekannt. Jedoch wurden sowohl für

Glutamyl-Glutaminsäure (Takahashi and Sato, 2002) als auch für myo-Inositol (Shi et al., 2020) signifikante Veränderungen bei Parodontitis gezeigt, welche in Zusammenhang mit einer Dysbiose im Mundraum steht.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Hypothese ableiten, dass die Erkrankung Multiple Sklerose selbst ursächlich für eine Dysbiose der Mikrobiota und daraus folgendem veränderten Metabolom sein könnte. Durch die gleichartigen Veränderungen der beschriebenen, bei Gesunden erhöhten, Metaboliten könnte durch diese Kombination eine Unterscheidung zwischen untherapierten Patient*innen und Gesunden erfolgen. Da sich die signifikante Veränderung explizit bei den Patient*innen ohne spezifische Therapie zeigte, könnte die Kombination der genannten Metaboliten potenziell zur Überprüfung für die Wirksamkeit der Therapie und der Compliance angewendet werden.

Vor bzw. zu Beginn einer Therapie würde man signifikant erhöhte Werte der zwei Metaboliten im Vergleich zu Gesunden erwarten. Hingegen wäre bei konsequenter Anwendung der Therapie eine potentielle Angleichung erwartbar, da in dieser Studie bei Patient*innen unter Therapie keine signifikante Veränderung dieser Metaboliten im Vergleich zu Gesunden sichtbar war.

5.2.2 Patient*innen und Proband*innen

Bei den Patient*innen insgesamt im Vergleich zu den gesunden Proband*innen zeigten sich vier Metaboliten im Mundabstrich (s. 4.2.4) signifikant erhöht (s. Abb. 36). Diese vier Metaboliten umfassten Mannitol in der Positivmessung sowie Raffinose, L-2-Aminoadipat und Stearinsäure in der Negativmessung. Der Mundabstrich bzw. die Metaboliten der Mundschleimhaut scheinen von Bedeutung zu sein, um Gesunde von Patient*innen mit RRMS zu differenzieren.

Mannitol (4.2.4.1) zeigt als Zuckeralkohol ein breit gefächertes Vorkommen und wird unter anderem von Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Viren produziert sowie als Energiequelle und -speicher genutzt (HMDB0000765). Mannitol ist osmotisch wirksam und wird als Süßungsmittel genutzt, da es für den Menschen

unverdaulich ist (Song and Vieille, 2009).

In der Medizin findet Mannitol bereits multiple Anwendungsgebiete: als Diuretikum wird es unter anderem in der Intensivmedizin zur Drucksenkung bei Schädel-Hirn-Trauma eingesetzt (Huang et al., 2020). Es gilt als kardioprotektiv (Torregroza et al., 2021), wohingegen die nephroprotektive Wirkung bei paralleler Anwendung einer Cisplatin Therapie umstritten ist (Morgan et al., 2012). Im Gegensatz dazu kann Mannitol zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion führen (Karajala et al., 2009). Es wird therapeutisch bei Obstipation (Every-Palmer et al., 2017) und bei Mukoviszidose angewendet (Nevitt et al., 2020).

Man vermutet, dass Mannitol einen bakteriellen Ursprung im Darmmikrobiom hat und unter anderem von Streptococcus sp. M143 und M334 sowie Clostridium sp. HGF2 stammt. Eine Assoziation zur Koronaren Herzerkrankung wurde gefunden, eine solche zur MS bisher nicht (Feng et al., 2016). Somit können wir davon ausgehen, dass die signifikante Erhöhung des Mannitols im Mundabstrich bei MS Patient*innen Ausdruck einer Dysbiose der Mikrobiota des Darms sein kann.

Raffinose (HMDB0003213) ist ein Trisaccharid (4.2.4.2) , bestehend aus Glucose, Fructose und Galactose. Als komplexes Kohlenhydrat kommt es in Vollkorngetreide und in Gemüsesorten, z.B. Bohnen oder Kohl, vor (Wishart). Zudem konnten in Studien protektive Eigenschaften gegen Allergien, Atopische Dermatitis und Adipositas gezeigt werden (Elango et al., 2022, Nagura et al., 2002). Ein Zusammenhang zwischen der Verabreichung von Raffinose und einer veränderten Ausschüttung von Interleukinen konnte im Tiermodell bereits gezeigt werden, sodass vermutet wird, dass Raffinose eine Rolle in der Differenzierung von T-Lymphozyten spielt (Nagura et al., 2002). Zudem konnte eine positive Beeinflussung der intestinalen Stammzellen durch eine Zufuhr von Raffinose dargestellt werden (Hou et al., 2021). Eine Assoziation der MS mit dem Metaboliten Raffinose ist laut aktueller Literatur nicht bekannt.

Jedoch kann von einer immunologischen Relevanz der Raffinose im Zusammenhang mit einer Beeinflussung des Darmmikrobioms ausgegangen werden. Für den Menschen ist die Raffinose unverdaulich, jedoch gelten Oligosaccharide der Raffinose-Familie als präbiotisch wirksame Substanzen, die

einen positiven Einfluss auf das Wachstum protektiver Bakterienstämme im Darmmikrobiom haben, wie Bifidobakterien (Elango et al., 2022). In keimfrei gezüchteten Mäusen wurde eine Erhöhung des Metaboliten Raffinose im Darm nachgewiesen (Claus et al., 2008). Eine direkte Beeinflussung des Darmmikrobioms durch Raffinose in Kombination mit Lactulose und Galacto-Oligosacchariden wurde bereits festgestellt, unter anderem erhöht die Gabe dieser Kombination die Anzahl an Bifidobakterium breve Bakterien (Izumi et al., 2019). Auch in einer Studie zu Frühgeborenen wurden protektive Eigenschaften von Bifidobakterien in Korrelation mit Raffinose im Bezug auf die Entwicklung einer Sepsis festgestellt (Stewart et al., 2017). Folglich ist ein Zusammenhang der Raffinose mit mikrobiotischen Stämmen wie insbesondere Bifidobakterien denkbar.

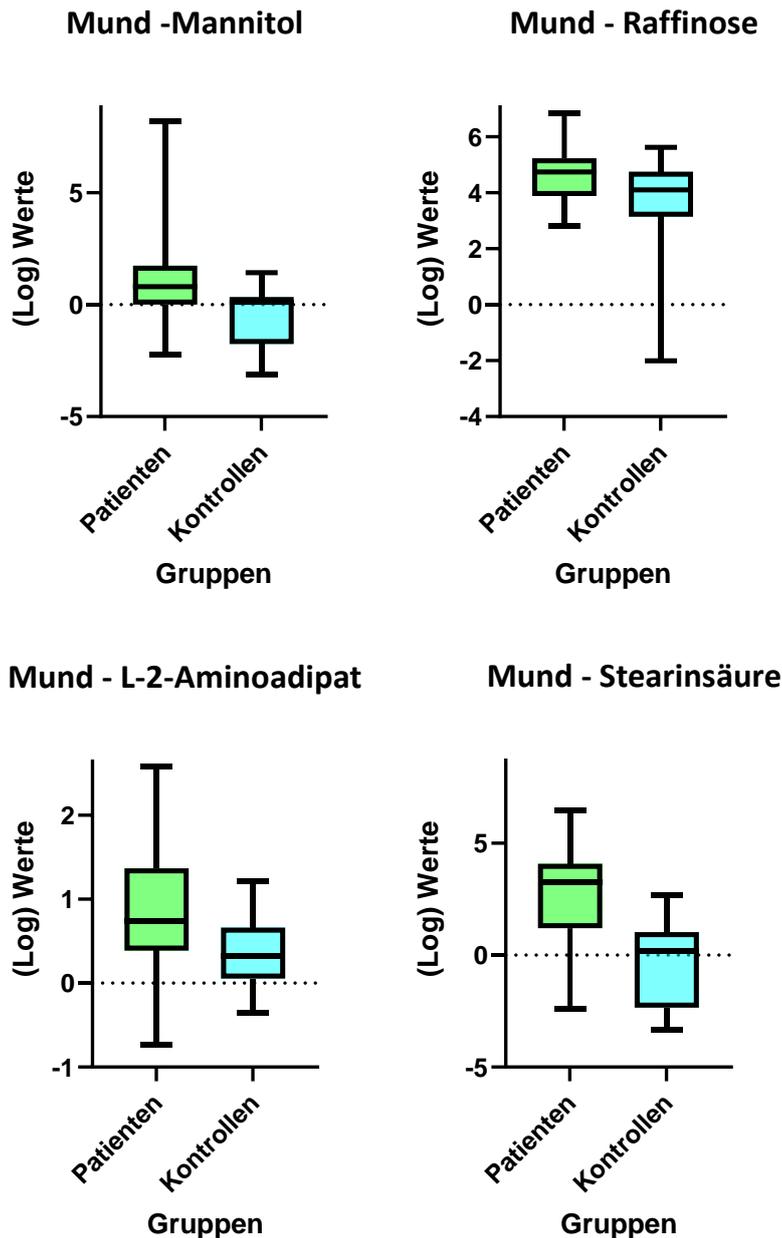


Abbildung 36: Ergebnisübersicht: Boxplots signifikanter Metabolite im Vergleich der Patient*innen mit RRMS und gesunden Proband*innen. Darstellung der signifikanten Metaboliten im Vergleich der Hautabstriche von Patient*innen mit Multipler Sklerose (RRMS) (Patienten) gegen gesunde Kontrollproband*innen (Kontrollen).

Insgesamt zeigten sich vier Metaboliten des Mundabstrichs in genanntem Vergleich signifikant: Mannitol (Positivmessung), Raffinose, L-2-Aminoadipat sowie Stearinsäure (Negativmessung). Für diese vier Metaboliten waren die Werte der Patient*innen signifikant höher als die Werte der gesunden Proband*innen. Boxplots, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Daten nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung. Angefertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

L-2-Aminoadipat (s. 4.2.4.4) ist eine Aminosäure des Lysinstoffwechsels und kann als Antagonist des exzitatorischen NMDA-Rezeptors (Glutamat Rezeptor N-methyl-D-Aspartat) wirken (Wishart). Die Synthese des Lysins beginnt mit mitochondrialer Bildung des L-2-Aminoadipats und findet im menschlichen

Körper überwiegend in der Leber statt (Matthews, 2020). Signifikante Veränderungen des Metabolits waren in bisherigen Studien mit Diabetes mellitus Typ 2, Prostatakarzinom und Atherosklerose assoziiert (Jung et al., 2013, Wijekoon et al., 2004, Lin et al., 2017). L-2-Aminoacidipat zählte in einer Studie zu den 20 Metaboliten, die am meisten mit kolorektalem Karzinom-assoziierten Bakterienstämmen korrelierten (Sinha et al., 2016). Zuvor wurde L-2-Aminoacidipat als potentieller Biomarker für die Colitis ulcerosa eingeschätzt, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die ebenfalls wie die MS zu den Autoimmunerkrankungen zählt (Kolho et al., 2016). Bisher wurde eine Assoziation des Metabolits zur MS nicht beschrieben.

In der Lysinbiosynthese wird L-2-Aminoacidipat insbesondere durch speziell entwickelte Enzyme von Pilzen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Candida albicans* umgesetzt (Nishida and Nishiyama, 2000, Rząd and Gabriel, 2015). Folglich könnte die signifikante Erhöhung des Metabolits im Mund der Patient*innen mit MS (s. 4.2.4.4) möglicherweise von einer vermehrten Kolonisation durch diese Pilze stammen.

Die Stearinsäure, auch bekannt als Octadecansäure, ist eine langkettige (C18:0), gesättigte Fettsäure mit ubiquitärem Vorkommen (HMDB0000827) (Wishart). Im menschlichen Körper wird sie aus Palmitinsäure oder Acetyl-CoA hergestellt oder durch Lebensmittel aufgenommen. Funktionell dient sie primär als Energiespeicher und -quelle (Sampath and Ntambi, 2005).

Die Stearinsäure besitzt in dieser Studie einen hohen Stellenwert, da sie im Vergleich der Patient*innen mit den Kontrollproband*innen das Ergebnis von höchster Signifikanz war ($p=0,000005$), siehe auch 4.2.4.3 und 4.4.

Mehrere Studien sprechen für protektive Eigenschaften der Stearinsäure gegen das Wachstum von Krebszellen (Habib et al., 1987, Lope et al., 2020, Nůsková et al., 2021). Eine Assoziation eines geringeren Brustkrebsrisikos zu einem hohen Spiegel an Stearinsäure im Blut konnte gezeigt werden (Lope et al., 2020). Auch für die Schizophrenie wurden erhöhte Werte der Stearinsäure im Blut festgestellt. Dabei wurde vermutet, dass aufgrund einer fehlerhaften Verwertung von Glucose im Gehirn vermehrt Fettsäuren abgebaut werden (Yang et al., 2013). In einem Tiermodell für Graft-versus-Host-Disease führte jedoch eine mit Stearinsäure angereicherte Diät zu einer erhöhten Mortalität (Yang et al., 2021a).

Auch in Bezug auf die MS waren bereits mehrfach veränderte Werte der Stearinsäure nachweisbar (s. Tab. 12): In ersten Studien wurden erniedrigte Werte der Stearinsäure bei Patient*innen gemessen, in Gehirngewebe, in Blutplasma sowie später in Liquor (Baker et al., 1963, Cumings et al., 1965, Gonzalo et al., 2012).

Studien	Gewebe/Material	Stearinsäure
Baker et al., 1963	Gehirngewebe p.m.	Erniedrigt bei MS
Cumings et al., 1965	Plasma	Erniedrigt bei MS
Gonzalo et al., 2012	Liquor	Erniedrigt bei MS
Tsoukalas et al., 2019	Serum	Erniedrigt bei AD, u.a. MS
Navarro and Segura, 1989	Erythrozyten	Vermehrt ges. FS bei MS
Nightingale et al., 1990	Erythrozyten	Erhöht bei MS
Gerstl et al., 1972	Gehirngewebe p.m.	Erhöht bei MS
Sargent et al., 1994	Gehirngewebe p.m.	Erhöht bei MS und ALD
McNamara et al., 2014	Gehirngewebe p.m.	Erhöht bei MS und BS

Table 12: Literaturanalyse zu Stearinsäure im Kontext der MS. Überblick über bisher veröffentlichte Ergebnisse zu Veränderungen der Stearinsäure im Zusammenhang mit MS. Die neun Studien beziehen sich auf Untersuchungen am Menschen. Abkürzungen: p.m.: post mortem, ges. FS: gesättigte Fettsäuren, ALD: Adrenoleukodystrophie, AD: Autoimmune Diseases (Autoimmunerkrankungen), BS: Bipolare Störung. Für detaillierte Beschreibung siehe Text.

In roten Blutzellen wurden bei MS hingegen sowohl vermehrt gesättigte Fettsäuren nachgewiesen (Navarro and Segura, 1989), als auch erhöhte Spiegel der Stearinsäure (Nightingale et al., 1990). Mehrere Studien konnten erhöhte Werte für Stearinsäure bei MS in Gehirngewebe feststellen, welches postmortem analysiert wurde (Gerstl et al., 1972, Sargent et al., 1994), eine Studie zeigte dieses Ergebnis sowohl für Bipolare Störung als auch für MS (McNamara et al., 2014). In einer Studie zu Autoimmunerkrankungen, in der neben MS auch beispielsweise Psoriasis und Rheumatoide Arthritis untersucht wurden, wurden hingegen erniedrigte Werte bei Autoimmunerkrankungen dargelegt, wobei Stearinsäure als prädiktiver Marker für Autoimmunerkrankungen gewertet wurde (Tsoukalas et al., 2019). Auch wenn diese Ergebnisse zum Teil kontrovers sind (s. Tab. 15), so überwiegt knapp die Anzahl an Studien, bei denen eine Erhöhung der Stearinsäure bei MS nachgewiesen werden konnte. Die Stearinsäure scheint folglich von Bedeutung für die Erkrankung sein.

Die fehlerhafte Verwertung von Glucose im Gehirn als Ursache für den vermehrten Abbau von Fettsäuren (Yang et al., 2013) könnte auch für die MS eine Rolle spielen und die Erhöhung der Stearinsäure erklären. Es ist davon auszugehen, dass die Stearinsäure Bestandteil unseres Gehirns ist (Sargent et al., 1994, McNamara et al., 2014). Die Stearinsäure könnte peripher, beispielsweise in der Mundschleimhaut, bei Patient*innen mit MS erhöht sein, da es zu zentralen Abbauprozessen im ZNS kommt, was eine Freisetzung der Stearinsäure bedingt.

Andererseits könnte diese potenzielle Freisetzung der Stearinsäure auch direkt mit der mikrobiellen Kolonisation der Darm- und Mundschleimhaut zusammenhängen. Gesättigte langkettige Fettsäuren wie die Stearinsäure oder Heptadecansäure konnten im Tiermodell die Darmmotilität und Stuhlfrequenz erhöhen und waren zugleich mit Bakterienstämmen wie *Prevotella*, *Alistipes* oder *Lactobazillen* assoziiert (Zhao et al., 2018). Bei Fütterung einer fettreichen Diät an Mäuse wurden signifikant erhöhte Mengen von Zytokinen aber auch von proinflammatorischen Metaboliten wie der Stearinsäure festgestellt. Diese Veränderungen waren mit dem Auftreten von Stämmen des Darmmikrobioms wie *Bacteroides*, *Akkermansia* und *Enterokokken* assoziiert. Eine Stuhltransplantation auf regulär ernährte Mäuse führte zu einer vermehrten Obstipation und Inflammation des Darms, welche durch eine normale Ernährung wieder aufgehoben werden konnte (Tan et al., 2021). Dies demonstriert die inflammatorische Wirkung einer fettreichen Ernährung mit unmittelbarer Auswirkung auf das Darmmikrobiom und assoziierte Metaboliten, welche sich in der Stearinsäure zeigen kann.

5.2.3 Details der Varianzanalyse

Insgesamt drei Metaboliten der Mundschleimhautabstriche zeigten eine Signifikanz in der einfachen Varianzanalyse (s. 4.2.4, Tab. 9; Abb. 37). Sowohl die Stearinsäure (4.2.4.3) als auch L-2-Aminodadipat (4.2.4.4) hatten sich zuvor

bereits im t-Test zwischen gesund und krank als signifikant erwiesen (s. 5.1 und 5.2.2) und zeigten eine erneute Signifikanz in der Varianzanalyse. Zusätzlich war 5,6-Dihydrothymin signifikant im Mundabstrich.

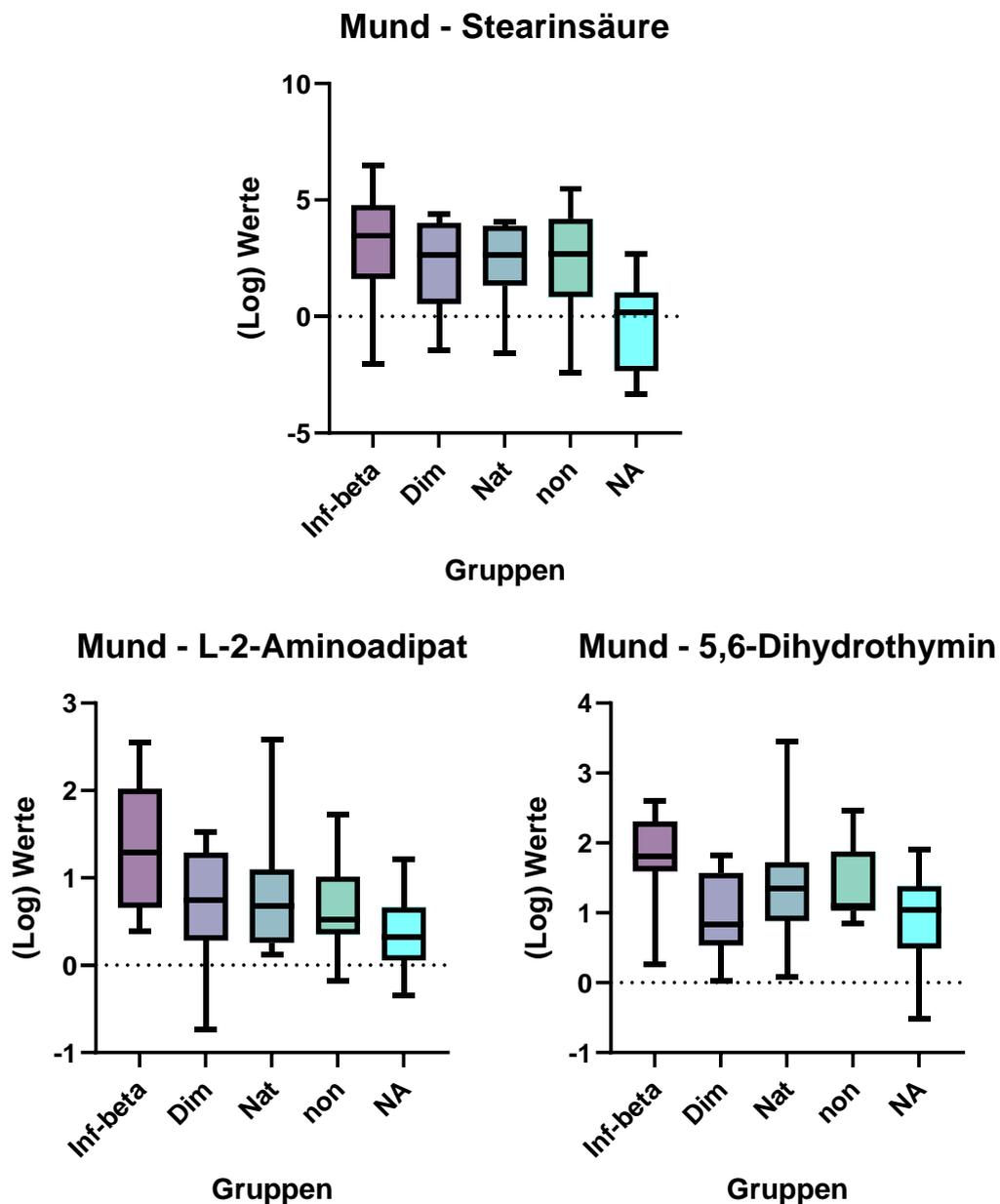


Abbildung 37: Ergebnisübersicht: Boxplots signifikanter Metabolite der ANOVA zum Vergleich der fünf untersuchten Untergruppen. Visualisierung und Zusammenfassung der Metaboliten, welche sich in der einfachen Varianzanalyse (ANOVA) als signifikant zeigten. Anwendung der ANOVA auf die fünf in 4.2.4 beschriebene Untergruppen: therapierte RRMS-Patient*innen mit Interferon-beta (Inf-beta), Dimethylfumarat (Dim), Natalizumab (Nat), nicht-therapierte Patient*innen (non), und Gesunde (NA). Drei Metaboliten des Mundabstrichs waren in der einfachen Varianzanalyse signifikant: Stearinsäure (4.2.4.3), L-2-Aminoadipat (4.2.4.4) und 5,6-Dihydrothymin (4.2.4.5) (Negativmessung). Boxplots, Median als Mittellinie dargestellt. Min bis Max. (Log) Werte: Verwendete Daten nach Verarbeitung, Normalisierung und Logarithmierung. Angefertigt mit GraphPad Prism 9.3.1.

Nach Durchführung des Post Hoc Test nach Tukey konnten die Signifikanzen der Varianzanalyse differenziert werden: Für 5,6-Dihydrothymin (s. 4.2.4.5) ergab sich hierbei eine signifikante Unterscheidung zwischen den Therapiegruppen Interferon-beta und Dimethylfumarat sowie Interferon-beta und Gesunden.

5,6-Dihydrothymin ist ein Pyrimidon und ein Abbauprodukt von Thymin (HMDB00079). Über die Dihydropyrimidinase erfolgt die Hydrolyse von 5,6-Dihydrothymin zu Carbamyl-beta-Alanin (Wishart). Eine Defizienz dieses Enzyms geht mit einer Erhöhung des Metaboliten 5,6-Dihydrothymin in Plasma, Urin und Liquor einher und kann neurologische sowie gastrointestinale Symptome hervorrufen (Wishart, van Kuilenburg et al., 2007). Es finden sich Hinweise darauf, dass Dihydrothymin bei Asthma signifikant verändert ist (Kelly et al., 2018). Für solide Tumore wie das Ösophaguskarzinom und das Ovarialkarzinom kann der Metabolit als prognostischer Marker dienen (Basbous et al., 2020, Liu et al., 2019, Liu et al., 2021). Zudem wurde er als ein Biomarker für das Altern (Wilkinson et al., 2020) und als spezifisch für die ischämische Herzerkrankung beschrieben (Fromentin et al., 2022). Eine Veränderung bei neurologischen Erkrankungen oder MS ist bisher nicht bekannt. Auch der Zusammenhang zu den Mikrobiota ist unklar aufgrund des ubiquitären Vorkommens (Wishart). Lediglich eine Studie an Pferden zeigte eine Assoziation zu Laktobazillen und Megasphaera auf (Tuniyazi et al., 2021).

Wie bereits in 5.2.2 und 4.2.4.4 beschrieben, war L-2-Aminoacidipat bereits signifikant im direkten Vergleich der Patient*innen und Proband*innen über den t-Test.

Im Post Hoc Test nach Durchführung der Varianzanalyse zeigte L-2-Aminoacidipat wie 5,6-Dihydrothymin die Signifikanz im Vergleich der Therapiegruppen Interferon beta mit Dimethylfumarat sowie Interferon beta mit Kontrollproband*innen. Zusätzlich war der Unterschied zwischen den nicht MS-spezifisch therapierten Patient*innen und den mit Interferon-beta behandelten Patient*innen signifikant.

Insbesondere die Gruppe der Patient*innen, die mit Interferon-beta behandelt wurde, zeigte in der Varianzanalyse signifikante Unterschiede im Vergleich zu anderen Therapiegruppen, was sich in den Metaboliten 5,6-Dihydrothymin und L-2-Aminoacidipat spiegelte (s. Tab. 9, Abb. 37). Möglicherweise verursacht Interferon-beta als Therapie eine Dysbiose mit daraus folgendem veränderten Metabolom der Mundschleimhaut.

In 5.2.2 wurde bereits detailliert auf eine mögliche Bedeutung der Stearinsäure für die Multiple Sklerose eingegangen (s. auch 4.2.4.3 und 5.1).

Die Ergebnisse des t-Tests für die Stearinsäure wurden durch die Varianzanalyse und den Post Hoc Test bestätigt. Nicht nur für die RRMS-Patient*innen insgesamt im t-Test, sondern auch für jede Therapiegruppe einzeln in der Varianzanalyse zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Werte der Patient*innen im Vergleich mit den gesunden Proband*innen (4.2.4.2; Abb. 37).

Die Stearinsäure war in dieser Studie der aussagekräftigste Biomarker und nimmt einen großen Stellenwert als möglicher Biomarker für die RRMS ein. Als Teil des Metaboloms spielt die Stearinsäure für Autoimmunerkrankungen wie die MS eine noch nicht gänzlich verstandene Rolle im Kontext des Mikrobioms. Jedoch kann man aufgrund dieser beschriebenen Ergebnisse von einem Zusammenhang zwischen inflammatorischen sowie neurodegenerativen Prozessen und einer Dysbiose ausgehen.

5.2.4 Signifikante Metaboliten im Kontext der Mikrobiota

In Tabelle 13 ist ein Überblick der in 5.2.1 bis 5.2.3 diskutierten signifikanten Metaboliten im Zusammenhang mit der beschriebenen Literatur zu assoziierten Erkrankungen sowie Mikrobiota zu sehen. Diese Tabelle stellt eine Zusammenfassung des Kapitels 5.2 dar.

Signifikante Metaboliten	Sign. in	Ass. Erkrankungen	Mögliche ass. Mikrobiota
<i>Glutaryl-Glutaminsäure</i>	Non vs. Ctrl.	<ul style="list-style-type: none"> - Gingivitis - Parodontitis* 	<ul style="list-style-type: none"> - Porphyromonas gingivalis - Fusobacterium nucleatum - Prevotella intermedia#
<i>Myo-Inositol</i>	Non vs. Ctrl.	<ul style="list-style-type: none"> - MS* - PCOS (T) - Schizophrenie* - Depression - Parodontitis* - Zirrhose 	<ul style="list-style-type: none"> - Akkermansia# - Lactobazillen# - Aggregatibacter - Bacteroidaceae# - Enterobacteriaceae
<i>D-Glucose</i>		<ul style="list-style-type: none"> - MS* - DM* - Malignome* - M. Alzheimer - KVD* - Adipositas* - Neuropathie - Nierenerkrankung* 	<ul style="list-style-type: none"> - Firmicutes, - Bacteroidetes# - Actinobakterien
<i>Mannitol</i>	Pt. vs. Ctrl.	<ul style="list-style-type: none"> - SHT (T) - KHK (KVD)* - Nierenerkrankung* - Obstipation (T) - Mukoviszidose (T) 	<ul style="list-style-type: none"> - Streptococcus sp. M143, M334 - Clostridium sp. HGF2
<i>Raffinose</i>	Pt. vs. Ctrl.	Protektiv gegen: <ul style="list-style-type: none"> - Allergien - Atopische Dermatitis - Adipositas* 	<ul style="list-style-type: none"> - Bifidobakterium (breve)

Stearinsäure	Pt. vs. Ctrl. & ANOVA	<ul style="list-style-type: none"> - MS* - Schizophrenie* - GvHD - Inflammation Protektiv gegen: <ul style="list-style-type: none"> - Malignome* 	<ul style="list-style-type: none"> - Prevotella# - Alistipes - Lactobazillen# - Bacteroides# - Akkermansia# - Enterokokken
L-2-Aminoadipat	Pt. vs. Ctrl. & ANOVA	<ul style="list-style-type: none"> - DM* - Prostatakarzinom* - Atherosklerose (KVD)* - KRK* - Colitis ulcerosa 	<ul style="list-style-type: none"> - Saccharomyces cerevisiae - Candida albicans
5,6-Dihydrothymidin	ANOVA	<ul style="list-style-type: none"> - Asthma bronchiale - Malignome* - Altern - Ischämische Herzerkrankung (KVD)* 	<ul style="list-style-type: none"> - Laktobazillen# - Megasphaera

Tabelle 13: Ergebnisübersicht im Kontext möglicherweise veränderter Mikrobiota. Zusammenfassung der in 5.2 diskutierten Ergebnisse. In dieser Studie signifikant veränderte Metaboliten, jeweilige Zuordnung der Ergebnisse der Literaturrecherche. Ass. Erkrankungen: in der Literatur beschriebene Zusammenhänge des Metaboliten mit Erkrankungen. Mögliche ass. Mikrobiota: mit dem Metaboliten potenziell assoziierte Mikroorganismen. Für Details und Literaturnachweise siehe Kapitel 5.2;

Abkürzungen: Sign.: Signifikant; Pt.: Patient*innen; Ctrl.: Kontrollproband*innen; Non: Patient*innen ohne MS-spezifische Therapie; ANOVA: einfache Varianzanalyse; PCOS: polyzystisches Ovarialsyndrom; DM: Diabetes mellitus; M.: Morbus; KVD: kardiovaskuläre Erkrankungen; SHT: Schädel-Hirn-Trauma; (T): als Therapeutikum eingesetzter Metabolit; KHK: Koronare Herzerkrankung; KRK: Kolorektales Karzinom; GvHD: Graft-versus-Host-Disease

*: auch bei einem der anderen Metaboliten beschrieben

#: auch mit anderem signifikanten Metaboliten assoziiert

Wie in Tabelle 13 zu sehen, gab es multiple Überschneidungen in Bezug auf Erkrankungen, für die Veränderungen der hier signifikanten Metaboliten vorherbeschrieben waren. Insbesondere für Malignome, aber auch für kardiovaskuläre Erkrankungen gab es zu einigen der hier signifikanten Metaboliten bereits eine Assoziation in vorangegangenen Studien. Ebenso gab es mehrere Metaboliten, die mit Diabetes mellitus, Parodontitis, Adipositas, Nierenerkrankungen und Schizophrenie in Verbindung gebracht worden waren.

Für die MS waren in der Literatur bereits Veränderungen der Metaboliten myo-Inositol, D-Glucose und Stearinsäure diskutiert, was sich in dieser Studie bestätigte.

Sowohl Prevotella, Akkermansia, Laktobazillen als auch Bacteroidaceae, zu denen auch die Bacteroidetes und Bacteroides zählen, zeigten in dieser Studie eine Relevanz im Hinblick auf mehrere der signifikant veränderten Metaboliten,

die mit diesen Bakterien bereits in vorangegangenen Studien assoziiert waren. Diese Bakterien könnten also besonders hinweisend sein, um eine Dysbiose bei Patient*innen mit MS zu erkennen. Bifidobakterien, Bacteroides und insbesondere Prevotella wurden in einer neuen Studie als bei MS verändert beschrieben, was sich mit den hier gewonnenen Erkenntnissen deckt (Cantoni et al., 2022). Der Fettsäurestoffwechsel war sowohl in der Studie von Cantoni et al., als auch hier potentiell verändert (Cantoni et al., 2022).

5.3 Stärken und Herausforderungen der Studie

5.3.1 Analyse der Methoden

Herausfordernd im Hinblick auf die Analyse des Metaboloms ist insbesondere die Größendimension der Datensätze in Kombination mit erschwerter Annotation einiger Metaboliten (Lee-Sarwar et al., 2020).

Als vorteilhaft stellte sich die Methode der Hautabstriche heraus, da insbesondere der Mundabstrich als Quelle für Biomarker im Hinblick auf neurologische Erkrankungen wie die MS bisher nicht untersucht worden ist. Die Haut- und Mundabstriche waren einfach anzuwenden und bieten gegenüber einer Blutentnahme in Hinblick auf Invasivität und zeitliche Dauer große Vorteile. Allerdings gibt es Faktoren, die eine zuverlässige Durchführung einschränken können: die den Abstrich nehmende Person sollte diese bei allen Patient*innen an den gleichen Stellen abnehmen, bei Durchführung den gleichen Druck anwenden sowie eine gleich große Fläche abstreichen. Dies wurde in dieser Studie ermöglicht, indem eine Person alle Abstriche nach den festen Vorgaben der genauen Lokalisationen durchführte. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit könnte zukünftig beispielsweise die Nutzung einer Schablone in Erwägung gezogen werden.

Zusätzlich bot auch die angewendete Direktinfusion als massenspektrometrische Methode Vor- und Nachteile (s. 1.2.2.3). Zwar ist die einheitliche und präzise

Messung einer großen Anzahl an Proben möglich, allerdings ist auch die Ionenunterdrückung als Herausforderung zu nennen, welche die Unterscheidung zwischen Isomeren erschwert, sodass in dieser Studie die Differenzierung zwischen myo-Inositol und D-Glucose nicht möglich war (s. 1.2.3.3, 4.2.2 sowie 5.2.1) (Jang et al., 2018). Dennoch scheint die Direktinfusion bei Durchführung einer ungezielten Messung vorteilhaft gegenüber anderen Methoden zu sein (1.2.3.3) (González-Domínguez et al., 2017).

In Bezug auf die Pathway Analyse (s. 4.3) ist relevant, jedoch schwer zu differenzieren, dass sich die Körperstellen hinsichtlich der veränderten Pathways unterscheiden könnten. Da es laut aktuellem Wissensstand keine veröffentlichte Literatur zu verschiedenen Lokalisationen für Hautabstriche und einem Zusammenhang zu veränderten Pathways gab, wurde dies in der aktuellen Studie nicht tiefergehend untersucht.

Als zusätzliche Herausforderung für die Massenspektrometrie muss eine mögliche Kontamination genannt werden (Cui et al., 2018). Unter anderem Kosmetika, Seife oder verwendete Reagenzien können die Analyse des Metaboloms beeinflussen (Collins et al., 2021). Deshalb sollte die Anwendung von den auf die Haut aufgetragenen Produkte vor der Durchführung der Hautabstriche minimiert werden. Dies wurde durch Vorabinformation der Studienteilnehmer*innen ermöglicht, allerdings bedeutete dies einen zusätzlichen zeitlichen Aufwand für Durchführende und war nicht im Nachhinein überprüfbar. Aufgrund der hohen Kooperationsbereitschaft der Teilnehmenden konnte die Reduktion der Kontamination realisiert werden.

5.3.2 Stärken und Schwächen der Ergebnisse

Auch wenn die Durchführung der Hautabstriche vielsprechende Ergebnisse lieferte, sollte zur zukünftigen Validierung und Erhöhung der statistischen Aussagekraft eine noch größere Anzahl an Studienteilnehmer*innen

herangezogen werden. Für eine Pilotstudie, in der erstmalig das Hautmetabolom von Patient*innen mit MS untersucht wurde, war die Anzahl von 69 Teilnehmenden jedoch als positiv zu werten. Die Zusammensetzung der hier untersuchten Kohorten erwies sich als repräsentativ, da die Geschlechterverteilung der inkludierten Patient*innen ebenfalls der der MS Patient*innen entsprach (s. 1.1.1 und 4.1).

In Bezug auf den EDSS-Score (s. 1.1.4) ergab sich in dieser Studie keine signifikante Korrelation mit den beschriebenen Ergebnissen. Die signifikanten Metaboliten zeigten keinen Zusammenhang mit der Höhe des Scores.

Auch wenn im Bereich der Metabolomik Forschung häufig eine FDR (False Discovery Rate) von 0,05 verwendet wird, so wurde auch in vielen Studien erfolgreich der Wert von 0,1 als Cut-Off verwendet, wie in dieser Studie (Carrillo et al., 2016, Shao et al., 2018). Nichtsdestotrotz sollte man dabei berücksichtigen, dass die Rate von Falsch Positiven bei dem hier gewählten Wert von 0,1 höher ist.

Mögliche Einflussfaktoren, die in Bezug auf die Ergebnisse zu berücksichtigen sind, sind auch Inhaltsstoffe der Medikamente, die sich möglicherweise auf das Mikrobiom und somit Metabolom der Haut ausgewirkt haben könnten. Hierfür wurde ein Screening der Inhaltsstoffe durchgeführt (s. Tab. 14).

Handelsname	Wirkstoff	Weitere Inhaltsstoffe
Rebif	Interferon-beta 1a	Benzylalkohol, Mannitol , Poloxamer 188, L-Methionin, Benzylalkohol, Natriumacetat, Essigsäure, Natriumhydroxid, H ₂ O
Avonex	Interferon-beta 1a	Natriumacetat-Trihydrat, Essigsäure, Argininhydrochlorid, Polysorbat, H ₂ O
Plegridy	Peginterferon beta 1a	Natriumacetat-Trihydrat, Essigsäure 99%, Argininhydrochlorid, Polysorbat, H ₂ O
Betaferon	rekombinantes Interferon beta-1b	Albumin, Mannitol , Lösungsmittel (Natriumchloridlösung 5,4 mg/ml (0,54 % G/V)), Natriumchlorid, H ₂ O
Tysabri	Natalizumab	Natriumdihydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumchlorid Polysorbat 80 (E 433), H ₂ O

Tecfidera	Dimethylfumarat	mikrokristalline Cellulose, Croscarmellose-Natrium, Talkum, hochdisperses Siliciumdioxid, Magnesiumstearat (Ph. Eur.), Triethylcitrat, Methacrylsäure-Methylmethacrylat-Copolymer (1 zu 1), Methacrylsäure-Ethylacrylat-Copolymer-(1 zu 1)-Dispersion 30 %, Simecicon, Natriumdodecylsulfat, Polysorbat 80, Gelatine, Titandioxid (E171), Brillantblau FCF (E133), Eisen(III)-hydroxid-oxid mal H ₂ O (E172), Schellack, Kaliumhydroxid und Eisen(II,III)-oxid (E172).
------------------	-----------------	---

Tabelle 14: Inhaltsstoffe der Medikamente. In Bezug auf die in dieser Studie untersuchten Therapeutika gegen RRMS wurde ein Screening durchgeführt, um Einflussfaktoren zu eruiieren. Als Quellen für die Inhaltsstoffe dienten die im Internet einsehbaren Fachinformationen (Rote Liste®). H₂O: Wasser für Injektionszwecke.

Für die Interferon-Derivate Rebif (Interferon beta-1a) und Betaferon (rekombinantes Interferon beta-1b) ist Mannitol, welches in dieser Studie signifikant war (s. 4.2.4.1, 5.2.2), als Inhaltsstoff bekannt (Rote Liste®, Baum, 2006). Allerdings zeigte sich Mannitol in der hier beschriebenen Studie lediglich bei den MS Patient*innen insgesamt signifikant erhöht im Vergleich zu Gesunden (s. 4.4, 5.2.2). Im Vergleich der einzelnen Therapiegruppen durch die Varianzanalyse zeigte sich Mannitol jedoch nicht als signifikant verändert. Auch die Inhaltsstoffe der anderen Medikamente waren nicht unter den signifikanten Metaboliten nachweisbar. Dies spricht gegen eine Beeinflussung der signifikanten Ergebnisse des Hautmetaboloms durch Inhaltsstoffe der hier untersuchten Medikamente.

Zukünftig wäre es interessant, eine detaillierte Ernährungsanamnese bei Studieneinschluss für jede(n) Proband*in und Patient*in zu ergänzen, um einen Zusammenhang der Ernährung zum Metabolom parallel zu untersuchen. Andere Einflussfaktoren, wie Einnahmen von Antibiotika wurden anamnestisch abgefragt, sollten jedoch zukünftig unter anderem durch eine Abfrage einer Einnahme von Prä- und Probiotika ergänzt werden.

5.4 Ausblick

Zusammenfassend war durch die Studie eine Beantwortung der Zielsetzung überwiegend möglich (s. Kap. 2). Es konnten signifikante Unterschiede zwischen

Patient*innen mit RRMS und Gesunden im Mundabstrich festgestellt werden. Zudem konnte in den Hautabstrichen der Unterarme und der Stirn eine Differenzierung zwischen gesunden Proband*innen und Patient*innen mit RRMS ohne MS-spezifische Therapie erfolgen. Die ebenfalls im Mundabstrich signifikante Varianzanalyse zeigte zusätzliche signifikante Vergleiche der Untergruppen und konnte die Ergebnisse der t-Tests zum Teil bestätigen (s. 5.2).

Die Lokalisation eines Hautabstrichs ist entscheidend. So war das Mastoid möglicherweise durch Kontaminationen am wenigsten vielversprechend und sollte nicht weiter verfolgt werden (s. 4.2.3). Der Mundabstrich hingegen lieferte die größte Summe an signifikant veränderten Metaboliten (4.2.4, 5.2.2 und 5.2.3). Unabhängig von der Therapie der Patient*innen erwies sich der Mundabstrich als Verbindung zum Darmmikrobiom in dieser Studie als vielversprechendste Quelle für Biomarker, um eine Unterscheidung von Patient*innen mit MS von gesunden Proband*innen zu ermöglichen.

Herausfordernd im Bereich der Metabolomik Forschung ist, nach der Beobachtung signifikanter Ergebnisse einen kausalen Zusammenhang oder eine Korrelation bestimmen und verstehen zu können. Auch longitudinale Studien sollten hierfür in Betracht gezogen werden (Knight et al., 2018). Zukünftig könnte die Erfassung des Metaboloms der Haut mittels Abstrichtupfern abgelöst werden durch neuere Ansätze wie transepidermale Mikroprojektionsarrays. Hierdurch ist zusätzlich eine Erfassung von tieferliegenden Schichten und Vertiefungen der Haut möglich (Liang et al., 2022).

Die Assoziation der MS mit einer Dünndarmfehlbesiedlung („Small Intestinal Bacterial Overgrowth“) und auch Erfolge durch Stuhltransplantationen bei MS und anderen neurologischen Erkrankungen unterstreichen den hohen Stellenwert des Darmmikrobioms sowie deren produzierten Metaboliten (Zhang et al., 2016, Vendrik et al., 2020). In der hier dargestellten Studie wurde deutlich, dass wie bereits in der Literatur beschrieben, bei neurologischen Erkrankungen wie der MS eine Dysbalance des Glucose- und des Fettstoffwechsels vorliegen könnte (Trabjerg et al., 2020). Dies zeigte sich hier in signifikanten Veränderungen des Galaktosestoffwechsels (s. 4.3) sowie der Metaboliten Glucose bzw. myo-Inositol und insbesondere der Stearinsäure (s. 5.2). Die

Dysbiose der Mikrobiota bei Vorliegen einer MS wurde im Metabolom der Haut und Mundschleimhaut sichtbar und bedarf weiterer Forschung um das Verständnis für die Rolle des Metaboloms und Mikrobioms der Haut zu vertiefen.

6 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose ist eine potenziell schwerwiegend verlaufende entzündliche Erkrankung des ZNS, die zu einem großen Anteil für Behinderungen in jungem Alter verantwortlich ist. Daher ist Forschung im Bereich von Biomarkern bezüglich der MS von substantiellem Wert für die Verbesserung der Früherkennung, Diagnose und somit einem frühzeitigem Behandlungsbeginn für eine bessere Prognose.

Die Komplexität der Mikrobiota und deren mit verschiedenen Erkrankungen assoziierten Stämmen zeigt sich im Metabolom, den von Mikroorganismen produzierten Metaboliten. Das Metabolom der Haut wurde in der Vergangenheit in Bezug auf Hauterkrankungen untersucht, jedoch fehlten bisher Untersuchungen zu neurologischen Erkrankungen wie der MS. Durch Anwendung der Massenspektrometrie in Form der Direktinfusions-Technik wurden die jeweils acht Hautabstriche von insgesamt 69 Teilnehmenden mittels ungezielter Metabolomik in jeweils Positiv- und Negativmessung analysiert. Es wurden 50 Patient*innen mit diagnostizierter schubförmig verlaufender Multipler Sklerose in die Studie aufgenommen, davon 14 unter der Therapie Natalizumab und jeweils 12 unter Therapie mit Dimethylfumarat, Interferon beta sowie ohne spezifische MS-Therapie. Zudem konnten 19 gesunde Teilnehmer*innen in die Studie eingeschlossen werden.

In den Analysen zeigten sich sieben verschiedene Metaboliten der Haut signifikant verändert ($FDR < 0,1$; $p \leq 0,05$). Zwei davon waren im Vergleich der Patient*innen ohne MS-spezifische Therapie mit gesunden Proband*innen verändert: Glutamyl-Glutaminsäure sowie myo-Inositol bzw. D-Glucose. Im Vergleich der Patient*innen insgesamt mit den Proband*innen waren vier

Metabolite der Mundschleimhaut signifikant erhöht: Mannitol, Raffinose, L-2-Aminoadipat und Stearinsäure. Die Varianzanalyse lieferte detaillierte Informationen zu dem Vergleich der fünf genannten Therapiegruppen untereinander und wies nach Durchführung des Post Hoc Tests nach Tukey Signifikanzen für die Metaboliten L-2-Aminoadipat, 5,6-Dihydrothymin und Stearinsäure auf. Die Unterscheidung der Patient*innen von Proband*innen konnte anhand der Stearinsäure auch für jede Therapiegruppe einzeln im Vergleich zu den Gesunden bestätigt werden. Die Auffälligkeit der Stearinsäure bei MS Patient*innen konnte in dieser Studie wie bereits in vorangegangenen Studien beobachtet werden (Nightingale et al., 1990, McNamara et al., 2014) und weist auf eine Dysbalance des Fettstoffwechsels hin (Yang et al., 2013, Cantoni et al., 2022). Sowohl Stearinsäure als auch myo-Inositol bzw. D-Glucose waren für die MS bereits als auffällig beschrieben worden und lassen auf einen veränderten Zucker- und Fettstoffwechsel schließen (Trabjerg et al., 2020, Cantoni et al., 2022). Eine Dysbiose bei MS könnte insbesondere die Mikrobiota *Prevotella*, *Akkermansia*, Laktobazillen als auch *Bacteroidaceae* betreffen (Zhao et al., 2018, Tan et al., 2021, Cantoni et al., 2022).

Aufgrund der Komplexität des Metaboloms sowie des Mikrobioms ist die Etablierung von Biomarkern herausfordernd, kann aber am ehesten durch eine Kombination mehrerer Metaboliten – in dieser Studie durch myo-Inositol bzw. D-Glucose, Mannitol, Raffinose, L-2-Aminoadipat und vor allem durch die Stearinsäure – realisiert werden.

7 Anhang

7.1 Details der Materialien

Im Folgenden sind die Details der in der Studie verwendeten Materialien, Reagenzien, Softwares und Geräte einzusehen. Dabei können alle im Kapitel 3 beschriebenen Materialien eingesehen werden.

Reagenzien	Hersteller, Ort	CAS-No.
Acetonitril gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv® Reag. Ph Eur.	Merck KGaA, Darmstadt, D	75-05-08
Ameisensäure for LC-MS LiChropur™, 97.5-98.5% (T)	Merck KGaA, Darmstadt, D	64-18-6
Ammonium Acetat (Optima LC/MS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	631-61-8
EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur Ethanol (absolute for analysis)	Merck KGaA, Darmstadt, D	64-17-5Wa
Ethanol, getrocknet (max. 0,01% H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt, D	64-17-5
LiChrosolv® Methanol for liquid chromatography	Merck KGaA, Darmstadt, D	67-56-1
Wasser, CHROMASOLV™ LC-MS, Honeywell Riedel-de Haën	Honeywell International Inc., Muskegon, MI, USA	7732-18-5

Tabelle 15: Details der in der Studie verwendeten Reagenzien. Inklusive CAS-Nummer (Chemical Abstracts Society).

Materialien	Hersteller, Ort
Abstrichtupfer	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Costar® Spin-X® Centrifuge Tube Filters, 0.22 µm Pore CA Membrane in 2.0 ml Polypropylene Tube, non-sterile, 100/Case	Corning Incorporated, Salt Lake City, USA
Eppendorf Research® Family	Eppendorf AG, Hamburg, D
Glasflasche GLS80 Duran®	SCHOTT, Mainz, D
Nunc™ 96-Well MicroWell™ Platten aus Polypropylen	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Nunc™ 96-Well Noppenmatten	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
PK-30-E Schneidzange, 125 mm	Proskit, Virginia, USA
Safe-Lock Tubes 1.5 ml	Eppendorf SE, Hamburg, D
Safe-Lock Tubes 2.0 ml	Eppendorf SE, Hamburg, D
Semperguard® Nitrile Xpert puderfrei Handschuhe	SATRA Technology Centre, Northamptonshire, United Kingdom

Transferpette® -12, 20-200 µl	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, D
-------------------------------	------------------------------------

Tabelle 16: In der Studie verwendete Materialien.

Geräte, Software	Ursprung/Hersteller, Ort
1100 HPLC-System	Agilent Technologies; Santa Clara CA, USA
Bruker Compass 1.9	Bruker Corporation; Billerica (MA), USA
Bruker Compass DataAnalysis 4.4	Bruker Corporation; Billerica (MA), USA
Bruker HyStar 3.2	Bruker Corporation; Billerica (MA), USA
Bruker Impact II TOF MS-System	Bruker Corporation; Billerica (MA), USA
GraphPad Prism 9.3.1	GraphPad Software; San Diego (CA), USA
Hochgeschwindigkeits-Tischzentrifuge Centrifuge 5804 R	Eppendorf SE, Hamburg, D
Janke & Kunkel IKA Labortechnik VF2 Laborschüttler D 365 DL	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, D
MetaboAnalyst 5.0	University of Alberta, Canada
Perseus Version 1.5.5.3	MPI of Biochemistry, Martinsried, D
Perseus Version 1.6.15.0	MPI of Biochemistry, Martinsried, D
RStudio	RStudio, Boston (MA), USA
Thermo Scientific Savant SC210A Speed Vac® Plus Konzentrator	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA

Tabelle 17: Informationen verwendeter Geräte und Softwares.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl an Menschen mit MS weltweit im Jahr 2020.....	7
Abbildung 2: Typische MS Läsionen in Gehirn (links) und Rückenmark (rechts).	14
Abbildung 3: Zeitliche Entwicklung/ Zulassung der verlaufsmodifizierenden Medikamente gegen MS.....	16
Abbildung 4: Gene in und auf dem menschlichen Körper.	20

Abbildung 5: Interaktionen des Hautmikrobioms.	23
Abbildung 6: Relationen von Metabolom und Mikrobiom.	25
Abbildung 7: Verschiedene Ebenen des Omics Forschungsansatzes für Erkrankungen.	26
Abbildung 8: Metabolomik Workflow.	30
Abbildung 9: Lokalisation der acht Hautabstriche.	40
Abbildung 10: Workflow Hautabstriche.	45
Abbildung 11: Metabolomik – Statistische Analyseschritte.	47
Abbildung 12: Principal component analysis der Hautabstriche der Unterarme. Positivmessung.	52
Abbildung 13: Principal component analysis der Hautabstriche der Unterarme. Negativmessung.	52
Abbildung 14: Volcano plot. Hautabstriche der Unterarme, Positivmessung.	53
Abbildung 15: Unterarme - Glutamyl-Glutaminsäure – Boxplot der untherapierten Patient*innen und Gesunden.	54
Abbildung 16: Principal component analysis des Stirnabstrichs. Positivmessung.	56
Abbildung 17: Principal component analysis des Stirnabstrichs. Negativmessung.	56
Abbildung 18: Volcano plot. Stirnabstrich Positivmessung.	57
Abbildung 19: Stirn – myo-Inositol und D-Glucose – Boxplots der untherapierten Patient*innen und Gesunden.	58
Abbildung 20: Principal component analysis der Hautabstriche des Mastoids. Positivmessung.	59
Abbildung 21: Principal component analysis der Hautabstriche des Mastoids. Negativmessung.	59
Abbildung 22: Principal component analysis des Mundabstrichs. Positivmessung.	63
Abbildung 23: Principal component analysis des Mundabstrichs. Negativmessung.	63
Abbildung 24: Volcano plot der Positivmessung des Mundabstrichs.	64
Abbildung 25: Mund – Mannitol – Boxplot der Patient*innen und Proband*innen.	65

Abbildung 26: Mund – Raffinose – Boxplot der Patient*innen und Proband*innen.	66
Abbildung 27: Volcano plot der Negativmessung des Mundabstrichs.	67
Abbildung 28: Mund – Stearinsäure – Boxplot der Patient*innen und Proband*innen.....	68
Abbildung 29: Mund – Stearinsäure – Boxplot der fünf Untergruppen.	68
Abbildung 30: Mund – L-2-Aminoadipat – Boxplot der Patient*innen und Proband*innen.....	69
Abbildung 31: Mund – L-2-Aminoadipat – Boxplot der fünf Untergruppen.	70
Abbildung 32: Mund – 5,6-Dihydrothymin – Boxplot der Patient*innen und Proband*innen – nicht signifikant.	71
Abbildung 33: Mund – 5,6-Dihydrothymin – Boxplot der fünf Untergruppen.....	72
Abbildung 34: Pathway enrichment analysis - Überblick.	73
Abbildung 35: Ergebnisübersicht: Boxplots signifikanter Metabolite im Vergleich untherapierter Patient*innen mit gesunden Proband*innen.....	78
Abbildung 36: Ergebnisübersicht: Boxplots signifikanter Metabolite im Vergleich der Patient*innen mit RRMS und gesunden Proband*innen.	84
Abbildung 37: Ergebnisübersicht: Boxplots signifikanter Metabolite der ANOVA zum Vergleich der fünf untersuchten Untergruppen.	88

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Arbeitsfähigkeit und Arbeitskapazität der unter 65-jährigen MS- Patient*innen in Relation zum EDSS Score.	10
Tabelle 2: MRT Diagnosekriterien der MS nach den McDonald Kriterien 2017.	13
Tabelle 3: Verlaufsmodifizierende Therapiemöglichkeiten der RRMS sowie des KIS.	17
Tabelle 4: Überblickstabelle der drei untersuchten Medikamente.	36
Tabelle 5: Patientencharakteristik der inkludierten Studienteilnehmer*innen. ...	50
Tabelle 6: Überblick über signifikante annotierte Metaboliten der Hautabstriche der Unterarme.	51

Tabelle 7: Überblick über signifikante annotierte Metaboliten der Hautabstriche der Stirn.....	55
Tabelle 8: Überblick über signifikante annotierte Metaboliten der Mundabstriche.	61
Tabelle 9: Signifikante Metaboliten der ANOVA der Mundabstriche. Darstellung signifikanter Paare nach dem Post Hoc Tukey Test.....	62
Tabelle 10: Ergebnisse der Pathway enrichment analysis.	74
Tabelle 11: Ergebnisübersicht.....	75
Tabelle 12: Literaturanalyse zu Stearinsäure im Kontext der MS.....	86
Tabelle 13: Ergebnisübersicht im Kontext möglicherweise veränderter Mikrobiota.....	92
Tabelle 14: Inhaltsstoffe der Medikamente.....	96
Tabelle 15: Details der in der Studie verwendeten Reagenzien.....	100
Tabelle 16: In der Studie verwendete Materialien.	101
Tabelle 17: Informationen verwendeter Geräte und Softwares.	101

7.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	einfache Varianzanalyse
BS	Bipolare Störung
Ctrl.; NA	Kontrollproband*innen
DI	Direktinfusion
Dim	Patient*innen mit Dimethylfumarat als Therapie
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ESI	Elektrospray-Ionisation
FDR	False Discovery Rate, Falscherkennungsrate
GC	Gaschromatographie
GvHD	Graft-versus-Host-Disease

H. pylori	Helicobacter pylori
HLA	Human leucocyte antigen (Genlokus)
HMDB	Human Metabolome Database
HPLC-MS	High performance liquid chromatography mass spectrometry
i.m.	intramuskulär, Applikationsform
i.v.	intravenös, Applikationsform
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IgG	Immunglobulin G
Inf-beta	Patient*innen mit Interferon als Therapie
JC-Virus	Virus benannt nach John Cunningham
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KHK	Koronare Herzerkrankung
KIS, CIS	Klinisch isoliertes Syndrom
KKNMS	Kompetenznetz Multiple Sklerose
KRK	Kolorektales Karzinom
KVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen
LC-MS	Liquid-Chromatographie Massenspektrometrie
M.	Morbus
m/z-Werte	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
Nat	Patient*innen mit Natalizumab als Therapie
NMDA-Rezeptor	Glutamat Rezeptor N-methyl-D-Aspartat
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
Non	Patient*innen ohne MS-spezifische Therapie
P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
p.o.	perioral, Applikationsform
PCA	Principal component analysis, Hauptkomponentenanalyse
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie

PPMS	Primary Progressive Multiple Sclerosis (primär progredient)
Pt.	Patient*innen mit RRMS
p-Wert	Signifikanzwert
QC	Quality control, Qualitätskontrolle
Q-TOF	Quadrupol-time-of-flight
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RNA	Ribonukleinsäuren
RRMS	Relapse Remitting Multiple Sclerosis (schubförmig)
s.c.	subkutan, Applikationsform
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
Sign.	Signifikant
SPMS	Secondary Progressive Multiple Sclerosis (sekundär progredient)
(T)	Als Therapeutikum eingesetzter Metabolit
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β
Th17-Zellen	T-Helfer-17-Zellen
TOF	Time-of-flight
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.5 Patienteneinwilligung und -information



DIREKTOR DER KLINIK UND CHEFARZT
PROF. DR. DR. MARTIN E. KECK

Prof. Dr. Axel Steiger
Oberarzt und Studienleiter
Max-Planck-Institut •
Kraepelinstr. 2-10 • D-80804 München

Tel. +49(0)89 30622-236
Fax. +49(0)89 30622-552
Email: steiger@psych.mpg.de
Internet: www.mpipsykl.mpg.de
Unser Zeichen: St/aha

Patienteninformation und Einwilligungserklärung zu „Untersuchungen des Haut- und Darm-Mikrobioms von Patienten mit Multipler Sklerose und gesunden Probanden“

Sehr geehrte Patientin,

Sehr geehrter Patient,

Sie befinden sich in unserer ambulanten oder stationären Behandlung. Man nimmt an, dass Multiple Sklerose mit Veränderungen der Besiedelung der Haut und des Darms mit künstlichen und natürlichen Elementen einhergehen, die mit dem bloßen Auge nicht zu erkennen sind. Um unseren noch geringen Kenntnisstand zu diesem Gebiet zu vermehren, planen wir eine Untersuchung und bitten Sie dafür um Ihre Mithilfe.

Wir möchten die Hautbesiedelung und Darmbesiedelung (Stuhlproben) von Patienten/innen, die mit verschiedenen Medikamenten behandelt werden, untersuchen.

Der Hautabstrich erfolgt nach Ihrem Einverständnis. Um die Hautoberfläche zu untersuchen, wird mit einem in Alkohol getränkten

Wattebausch an mehreren Körperstellen ein Hautabstrich abgenommen. Hierbei handelt es sich um ein ungefährliches und Sie nicht belastendes Verfahren. Anschließend wird die Bakterienbesiedelung des Wattebausches im Labor untersucht.

Risiko-Nutzen-Abwägung

Der individuelle Nutzen für den einzelnen Patienten ist gering, für die medizinische Wissenschaft aber wird ein hoher Erkenntnisgewinn erwartet. Die Hautabstriche gehen nicht mit einem Risiko einher. Einem sehr geringen Risiko steht ein hoher wissenschaftlicher Erkenntnisgewinn gegenüber.

Informationen zum Datenschutz

Seit dem 25.05.2018 gilt die neue EU-Datenschutz-Grundverordnung. Diese sorgt für mehr Transparenz bei der Verarbeitung, Nutzung, Aufbewahrung und Löschung Ihrer persönlichen Daten.

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten.

1) Rechtsgrundlage und Verarbeitungszweck:

Auf Basis Ihres freiwilligen Einverständnisses werden von Ihnen Stammdaten und Forschungsdaten ausschließlich zum Zweck der Organisation und Durchführung der Studie sowie zur Beantwortung der Forschungsfragen erhoben.

2) Verantwortlichkeiten für die Datenverarbeitung:

Prof. Dr. Christoph Turck
Max-Planck-Institut für Psychiatrie
Forschungsgruppe Proteomik und Biomarker
Kraepelinstr. 2-10, 80804 München
Tel.: 089/30622-317

E-Mail: turck@psych.mpg.de

Prof. Dr. Axel Steiger

Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und
Neurologie

Kraepelinstr. 2 -10

80804 München

Tel.: 089/30622-236

Fax: 089/30622-552

E-Mail: steiger@psych.mpg.de

3) Zuständige Datenschutzbeauftragte:

Ass.-jur. Heidi Schuster

Datenschutzbeauftragte für die Max-Planck-Gesellschaft
e.V.Generalverwaltung

Hofgartenstr. 8, 80539 München

Tel.: 089-2108-1554

Fax: 089-2108- 1399

4) Zuständige Aufsichtsbehörde:

Bayerisches Landesamt für Datenschutzaufsicht (BayLDA)

Promenade 27, 91522 Ansbach

Tel.: 098-1531300

Fax: 098-153981300

5) Empfänger Ihrer Daten:

Eine Weitergabe der Ihre Person identifizierenden Daten an Forscher oder andere unberechtigte Dritte, etwa Versicherungsunternehmen oder Arbeitgeber, erfolgt nicht.

6) Schutz Ihrer Daten:

Die persönlichen Daten und Befunde werden nur in verschlüsselter (pseudonymisierter) Form weitergegeben, d.h. weder der Name noch die Initialen noch das exakte Geburtsdatum erscheinen im

Verschlüsselungscode. Eine persönliche Zuordnung ist nur über eine separate Datenbank möglich. Diese befindet sich zum einen in schriftlicher Form in den Räumlichkeiten des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, zum anderen in elektronischer Form auf einem gesicherten Server des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie. Der Zugang zu den Originaldaten und den Verschlüsselungscode sind auf den Studienleiter Prof. Dr. Steiger und Prof. Dr. Turck beschränkt.

Wenn Sie zustimmen, dass Ihre persönlichen Daten, Proben und Fragebögen auch für zukünftige Studien zur Verfügung stehen (siehe Einwilligungserklärung), muss die Verschlüsselung zukünftig aufgehoben werden können. Eine Entschlüsselung kann aus medizinischen oder wissenschaftlichen Gründen erforderlich sein. Falls medizinische Gründe vorliegen, kann die Entschlüsselung über die oben genannten Personen zeitnah erfolgen. Vor einer Entschlüsselung aus wissenschaftlichen Gründen muss für das spezifische Forschungsvorhaben ein zustimmendes Votum einer Ethikkommission vorliegen.

Unsere Untersuchungen werden teilweise auch in Zusammenarbeit mit anderen Forschungsgruppen durchgeführt, die über neue oder andere technische Methoden zur Analyse verfügen. In diesem Fall werden die in dieser Studie erhobenen Daten (Fragebögen, Befunde der Hautabstriche und Stuhlproben) in anonymisierter Form an wissenschaftliche Kooperationspartner weitergegeben.

Wenn Sie zustimmen (s. Einwilligungserklärung), dürfen Ihre Daten und Proben in anonymisierter Form auch für kommerzielle Zwecke an Biotechnologiefirmen oder die pharmazeutische Industrie abgegeben werden. Durch Ihre Zustimmung zu diesem letztgenannten Punkt erklären Sie sich damit einverstanden, dass diese Firmen Entwicklungen und Erfindungen, die aus diesen Ergebnissen hervorgehen, verwenden können. Für kollaborierende Gruppen oder Firmen ist eine Zuordnung der Daten zu den Patienten nicht möglich.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

7) Speicherung Ihrer Daten:

Während der klinischen Prüfung werden medizinische Befunde und persönliche Informationen von Ihnen erhoben und in der Prüfstelle in Ihrer persönlichen Akte niedergeschrieben oder elektronisch gespeichert. Die für die klinische Prüfung wichtigen Daten werden zusätzlich in pseudonymisierter Form gespeichert und ausgewertet. Die Aufbewahrung erfolgt im Max-Planck-Institut für Psychiatrie für die Dauer von höchstens 25 Jahren, welches der gesetzlichen Aufbewahrungsfrist entspricht.

8) Ihre Rechte:

Sie haben jederzeit das Recht auf die Sperrung, Berichtigung und ggf. Löschung oder Vernichtung Ihrer Daten, Fragebögen und Proben. Sie können der Verarbeitung Ihrer Daten, Fragebögen und Proben jederzeit widersprechen und Ihre Einwilligung ohne Angabe von Gründen formlos widerrufen. Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung werden die gespeicherten Daten (inklusive Fragebögen) gelöscht und Ihre Proben vernichtet, sofern keine wissenschaftliche Gründe oder Aufbewahrungsfristen dem entgegenstehen. Nach vollständiger Anonymisierung ist eine Löschung und Vernichtung Ihrer Daten und Proben nicht mehr möglich.

Außerdem haben Sie das Recht, jederzeit Auskunft über Ihre Daten zu erhalten und sich diese in einem gängigen Format ausgeben zu lassen bzw. an jemand anderen zu übertragen. Sollten Sie der Ansicht sein, dass die Verarbeitung Ihrer Daten nicht rechtmäßig erfolgt, haben Sie das Recht, sich jederzeit bei der zuständigen Aufsichtsbehörde für den Datenschutz zu beschweren (siehe Punkt 4).

Einwilligungserklärung

Ich bin über Sinn und Ablauf der Studie **„Untersuchungen des Haut- und Darm-Mikrobioms von Patienten mit Multipler Sklerose und gesunden Probanden“** aufgeklärt worden. Ich erkläre mich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden und weiß, dass die Teilnahme freiwillig ist. Ich weiß, dass ich mein Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne irgendwelche Nachteile widerrufen kann. Mir ist bekannt, dass meine Identität geheim gehalten wird und dass meine Daten nur über eine individuelle Kennnummer identifiziert werden. Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.

Meine Daten und Proben werden in doppelter Kodierung in der Biobank am Max-Planck-Institut für Psychiatrie gelagert, die in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München betrieben wird und von dieser zustimmend bewertet wurde.

Meine Daten und Proben sind in irreversibel anonymisierter Form auch für zukünftige wissenschaftliche Studien verfügbar, sofern diese von einer Ethikkommission genehmigt wurden.

Ja Nein

Meine Daten und Proben dürfen in irreversibel anonymisierter Form im Rahmen von wissenschaftlichen Kooperationen oder für kommerzielle Zwecke an Biotechnologiefirmen oder die pharmazeutische Industrie abgegeben werden.

Ja Nein

Das vorliegende Informationsblatt wurde mir ausgehändigt, einschließlich der Zusatzinformation zum Datenschutz.

Ich bin mir im Klaren, dass keine Wegeversicherung für diese Studie besteht*. Außerdem wurde darüber aufgeklärt, dass für meine Teilnahme an der Studie kein gesonderter Versicherungsschutz besteht, da eine Gefährdung durch die Teilnahme nicht zu erwarten ist. Für Schäden, die durch Mitarbeiter des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie verursacht werden, besteht jedoch Schutz über eine betriebliche Haftpflichtversicherung.

München, den

Patient/in

Aufklärende Person

Unterschrift

Unterschrift

*Dieser Hinweis gilt für ambulante Patienten, die an der Studie teilnehmen.

7.6 Probandeneinwilligung und -information



DIREKTOR DER KLINIK UND CHEFARZT

PROF. DR. DR. MARTIN E. KECK

Prof. Dr. Axel Steiger

Oberarzt und Studienleiter

Max-Planck-Institut •

Kraepelinstr. 2-10 • D-80804 München

Tel. +49(0)89 30622-236

Fax. +49(0)89 30622-552

Email: steiger@psych.mpg.de

Internet: www.mpipsykl.mpg.de

Unser Zeichen: St/aha

Probandeninformation und Einwilligungserklärung zu „Untersuchungen des Haut- und Darm-Mikrobioms von Patienten mit neurologischen sowie psychiatrischen Erkrankungen und gesunden Probanden“

Sehr geehrte Dame,

Sehr geehrter Herr,

Man nimmt an, dass neurologische und psychiatrische Erkrankungen mit Veränderungen der Besiedelung der Haut und der Darmoberfläche mit künstlichen und natürlichen Elementen einhergehen, die mit dem bloßen Auge nicht zu erkennen sind. Um unseren noch geringen Kenntnisstand auf diesem Gebiet zu vermehren, planen wir Untersuchungen zur Hautbesiedelung bei Patienten mit Multipler Sklerose sowie psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen. Zum Vergleich der Befunde bei den Patienten soll die Haut gesunder freiwilliger Versuchspersonen untersucht werden und wir fragen Sie, ob Sie für eine solche Untersuchung zur Verfügung stehen. Um die Hautoberfläche zu untersuchen, wird mit einem in Alkohol getränkten

Wattebausch an mehreren Körperstellen ein Hautabstrich genommen. Hierbei handelt es sich um ein ungefährliches und Sie nicht belastendes Verfahren. Anschließend wird die Besiedelung der Hautoberfläche im Labor untersucht.

Zur Teilnahme an dieser Studie suchen wir gesunde erwachsene Männer und Frauen. Sie werden von uns eingehend über die Untersuchung informiert. Die Teilnahme an der Untersuchung wird mit 20 € honoriert.

Risiko-Nutzen-Abwägung

Der individuelle Nutzen für den einzelnen Probanden ist gering, für die medizinische Wissenschaft wird ein hoher Erkenntnisgewinn erwartet. Die Hautabstriche gehen nicht mit einem Risiko einher. Einem sehr geringen Risiko steht ein hoher wissenschaftlicher Erkenntnisgewinn gegenüber.

Informationen zum Datenschutz

Seit dem 25.05.2018 gilt die neue EU-Datenschutz-Grundverordnung. Diese sorgt für mehr Transparenz bei der Verarbeitung, Nutzung, Aufbewahrung und Löschung Ihrer persönlichen Daten.

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten.

1) Rechtsgrundlage und Verarbeitungszweck:

Auf Basis Ihres freiwilligen Einverständnisses werden von Ihnen Stammdaten und Forschungsdaten ausschließlich zum Zweck der Organisation und Durchführung der Studie sowie zur Beantwortung der Forschungsfragen erhoben.

2) Verantwortlichkeiten für die Datenverarbeitung:

Prof. Dr. Christoph Turck

Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Forschungsgruppe Proteomik und Biomarker

Kraepelinstr. 2-10, 80804 München

Tel.: 089/30622-317

E-Mail: turck@psych.mpg.de

Prof. Dr. Axel Steiger

Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und
Neurologie

Kraepelinstr. 2 -10

80804 München

Tel.: 089/30622-236

Fax: 089/30622-552

E-Mail: steiger@psych.mpg.de

3) Zuständige Datenschutzbeauftragte:

Ass.-jur. Heidi Schuster

Datenschutzbeauftragte für die Max-Planck-Gesellschaft
e.V.Generalverwaltung

Hofgartenstr. 8, 80539 München

Tel.: 089-2108-1554

Fax: 089-2108- 1399

4) Zuständige Aufsichtsbehörde:

Bayerisches Landesamt für Datenschutzaufsicht (BayLDA)

Promenade 27, 91522 Ansbach

Tel.: 098-1531300

Fax: 098-153981300

5) Empfänger Ihrer Daten:

Eine Weitergabe der Ihre Person identifizierenden Daten an Forscher
oder andere unberechtigte Dritte, etwa Versicherungsunternehmen
oder Arbeitgeber, erfolgt nicht.

6) Schutz Ihrer Daten:

Die persönlichen Daten und Befunde werden nur in verschlüsselter (pseudonymisierter) Form weitergegeben, d.h. weder der Name noch die Initialen noch das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode. Eine persönliche Zuordnung ist nur über eine separate Datenbank möglich. Diese befindet sich zum einen in schriftlicher Form in den Räumlichkeiten des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, zum anderen in elektronischer Form auf einem gesicherten Server des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie. Der Zugang zu den Originaldaten und den Verschlüsselungscode sind auf den Studienleiter Prof. Dr. Steiger und Prof. Dr. Turck beschränkt.

Wenn Sie zustimmen, dass Ihre persönlichen Daten und Proben auch für zukünftige Studien zur Verfügung stehen (siehe Einwilligungserklärung), muss die Verschlüsselung zukünftig aufgehoben werden können. Eine Entschlüsselung kann aus medizinischen oder wissenschaftlichen Gründen erforderlich sein. Falls medizinische Gründe vorliegen, kann die Entschlüsselung über die oben genannten Personen zeitnah erfolgen. Vor einer Entschlüsselung aus wissenschaftlichen Gründen muss für das spezifische Forschungsvorhaben ein zustimmendes Votum einer Ethikkommission vorliegen.

Unsere Untersuchungen werden teilweise auch in Zusammenarbeit mit anderen Forschungsgruppen durchgeführt, die über neue oder andere technische Methoden zur Analyse verfügen. In diesem Fall werden die in dieser Studie erhobenen Daten (Befunde der Hautabstriche und Stuhlproben) in anonymisierter Form an wissenschaftliche Kooperationspartner weitergegeben.

Wenn Sie zustimmen (s. Einwilligungserklärung), dürfen Ihre Daten und Proben in anonymisierter Form auch für kommerzielle Zwecke an Biotechnologiefirmen oder die pharmazeutische Industrie abgegeben werden. Durch Ihre Zustimmung zu diesem letztgenannten Punkt erklären Sie sich damit einverstanden, dass diese Firmen

Entwicklungen und Erfindungen, die aus diesen Ergebnissen hervorgehen, verwenden können. Für kollaborierende Gruppen oder Firmen ist eine Zuordnung der Daten zu den Studienteilnehmern nicht möglich.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

7) Speicherung Ihrer Daten:

Während der klinischen Prüfung werden medizinische Befunde und persönliche Informationen von Ihnen erhoben und in der Prüfstelle in Ihrer persönlichen Akte niedergeschrieben oder elektronisch gespeichert. Die für die klinische Prüfung wichtigen Daten werden zusätzlich in pseudonymisierter Form gespeichert und ausgewertet. Die Aufbewahrung erfolgt im Max-Planck-Institut für Psychiatrie für die Dauer von höchstens 25 Jahren, welches der gesetzlichen Aufbewahrungsfrist entspricht.

8) Ihre Rechte:

Sie haben jederzeit das Recht auf die Sperrung, Berichtigung und ggf. Löschung oder Vernichtung Ihrer Daten und Proben. Sie können der Verarbeitung Ihrer Daten und Proben jederzeit widersprechen und Ihre Einwilligung ohne Angabe von Gründen formlos widerrufen. Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung werden die gespeicherten Daten gelöscht und Ihre Proben vernichtet, sofern keine wissenschaftliche Gründe oder Aufbewahrungsfristen dem entgegenstehen. Nach vollständiger Anonymisierung ist eine Löschung und Vernichtung Ihrer Daten und Proben nicht mehr möglich.

Außerdem haben Sie das Recht, jederzeit Auskunft über Ihre Daten zu erhalten und sich diese in einem gängigen Format ausgeben zu lassen bzw. an jemand anderen zu übertragen. Sollten Sie der Ansicht sein, dass die Verarbeitung Ihrer Daten nicht rechtmäßig erfolgt, haben Sie das Recht, sich jederzeit bei der zuständigen Aufsichtsbehörde für den Datenschutz zu beschweren (siehe Punkt 4).

Einwilligungserklärung

Ich bin über Sinn und Ablauf der Studie „**Untersuchungen des Haut- und Darm-Mikrobioms von Patienten mit neurologischen sowie psychiatrischen Erkrankungen und gesunden Probanden**“ aufgeklärt worden. Ich erkläre mich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden und weiß, dass die Teilnahme freiwillig ist. Ich weiß, dass ich mein Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne irgendwelche Nachteile widerrufen kann. Mir ist bekannt, dass meine Identität geheim gehalten wird und dass meine Daten nur über eine individuelle Kennnummer identifiziert werden. Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Probandeninformation einverstanden.

Meine Daten und Proben werden in doppelter Kodierung in der Biobank am Max-Planck-Institut für Psychiatrie gelagert, die in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München betrieben wird und von dieser zustimmend bewertet wurde.

Meine Daten und Proben sind in irreversibel anonymisierter Form auch für zukünftige wissenschaftliche Studien verfügbar, sofern diese von einer Ethikkommission genehmigt wurden.

Ja Nein

Meine Daten und Proben dürfen in irreversibel anonymisierter Form im Rahmen von wissenschaftlichen Kooperationen oder für kommerzielle Zwecke an Biotechnologiefirmen oder die pharmazeutische Industrie abgegeben werden.

Ja Nein

Das vorliegende Informationsblatt wurde mir ausgehändigt, einschließlich der Zusatzinformation zum Datenschutz.

Ich bin mir im Klaren, dass keine Wegeversicherung für diese Studie besteht.* Außerdem wurde darüber aufgeklärt, dass für meine Teilnahme an der Studie kein gesonderter Versicherungsschutz besteht, da eine Gefährdung durch die Teilnahme nicht zu erwarten ist. Für Schäden, die durch Mitarbeiter des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie verursacht werden, besteht jedoch Schutz über eine betriebliche Haftpflichtversicherung.

München, den

Proband/in

Aufklärende Person

Unterschrift

Unterschrift

*Dieser Hinweis gilt für ambulante Patienten, die an der Studie teilnehmen.

7.7 Anamnesebogen

Fragebogen für Teilnehmer*innen der Studie „Untersuchungen des Haut-Metaboloms von Patient*innen mit Multipler Sklerose und gesunden Probanden“

Vorname:

Nachname:

Geburtsdatum:

Geschlecht: männlich weiblich

Bitte beantworten Sie folgende Fragen:

1. Besteht bei Ihnen die Multiple Sklerose in schubförmiger Verlaufsform?
2. Wann wurde die Erkrankung Multiple Sklerose bei Ihnen diagnostiziert?
3. Leiden Sie zurzeit unter anderen körperlichen oder neurologischen Erkrankungen (z.B. Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Migräne, Herzinfarkt, Schlaganfall, Tumorerkrankung, etc.)? Wenn ja, unter welcher? Gab es in Ihrer Vergangenheit andere gravierende Erkrankungen?
4. Leiden Sie derzeit unter einer Hauterkrankung, für die Sie regelmäßig medizinische Salben, Cremes, Lotionen etc. verwenden müssen?

5. Bestehen oder bestanden psychiatrische Erkrankungen (z.B. Depression, bipolare Störung, Schizophrenie etc.)? Wenn ja, unter welcher?

6. Welche Medikamente nehmen Sie aktuell ein? Bitte geben Sie die Dosierungen an.
(bitte auch Vitamin D etc. angeben)

7. Haben Sie innerhalb der letzten 4 Wochen ein Antibiotikum oder Cortison-Präparat eingenommen oder angewendet? (Tablette, Infusion, Creme...) Wenn ja, welches und wann?

8. Nehmen Sie Drogen oder andere suchterzeugende Substanzen ein?
Wie viel Alkohol konsumieren Sie schätzungsweise in einer Woche?

9. Rauchen Sie? Wenn ja, wieviel und seit wann?

10. Haben Sie spezielle Ernährungsgewohnheiten? Zum Beispiel vegetarische, vegane Ernährung? Leben Sie mit Haustieren zusammen? Wenn ja, welche?

11. Wann haben Sie zuletzt geduscht/gebadet, sowie Lotionen, Kosmetika u. Ä. verwendet?

12. Wann haben Sie zuletzt Zähne geputzt und gegessen?

Mit meiner Unterschrift bestätige ich, dass ich alle Fragen vollständig und wahrheitsgemäß beantwortet habe.

Ort und Datum:

Unterschrift des Studienteilnehmers/der Studienteilnehmerin:

Aktueller/letzter EDSS-Score:

8 Literaturverzeichnis

- AHLUWALIA, V., BETRAPALLY, N. S., HYLEMON, P. B., WHITE, M. B., GILLEVET, P. M., UNSER, A. B., FAGAN, A., DAITA, K., HEUMAN, D. M., ZHOU, H., SIKAROODI, M. & BAJAJ, J. S. 2016. Impaired Gut-Liver-Brain Axis in Patients with Cirrhosis. *Sci Rep*, 6, 26800.
- BAKER, R. W., THOMPSON, R. H. & ZILKHA, K. J. 1963. Fatty-acid composition of brain lecithins in multiple sclerosis. *Lancet*, 1, 26-7.
- BASBOUS, J., AZE, A., CHALOIN, L., LEBDY, R., HODROJ, D., RIBEYRE, C., LARROQUE, M., SHEPARD, C., KIM, B., PRUVOST, A., MOREAUX, J., MAIORANO, D., MECHALI, M. & CONSTANTINO, A. 2020. Dihydropyrimidinase protects from DNA replication stress caused by cytotoxic metabolites. *Nucleic Acids Res*, 48, 1886-1904.
- BAUM, K. 2006. Safety and tolerability of a 'refrigeration-free' formulation of interferon beta-1b--results of a double-blind, multicentre, comparative study in patients with relapsing-remitting or secondary progressive multiple sclerosis. *J Int Med Res*, 34, 1-12.
- BHARGAVA, P. & ANTHONY, D. C. 2020. Metabolomics in multiple sclerosis disease course and progression. *Mult Scler*, 26, 591-598.
- BJORNEVIK, K., CORTESE, M., HEALY, B. C., KUHLE, J., MINA, M. J., LENG, Y., ELLEDGE, S. J., NIEBUHR, D. W., SCHER, A. I., MUNGER, K. L. & ASCHERIO, A. 2022. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375, 296-301.
- BOUSLIMANI, A., PORTO, C., RATH, C. M., WANG, M., GUO, Y., GONZALEZ, A., BERG-LYON, D., ACKERMANN, G., MOELLER CHRISTENSEN, G. J., NAKATSUJI, T., ZHANG, L., BORKOWSKI, A. W., MEEHAN, M. J., DORRESTEIN, K., GALLO, R. L., BANDEIRA, N., KNIGHT, R., ALEXANDROV, T. & DORRESTEIN, P. C. 2015. Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, E2120.
- BROWNE, P., CHANDRARATNA, D., ANGOOD, C., TREMLETT, H., BAKER, C., TAYLOR, B. V. & THOMPSON, A. J. 2014. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*, 83, 1022-4.
- BROWNEE, W. J., HARDY, T. A., FAZEKAS, F. & MILLER, D. H. 2017. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*, 389, 1336-1346.
- BYRD, A. L., BELKAID, Y. & SEGRE, J. A. 2018. The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 143-155.
- CANTONI, C., LIN, Q., DORSETT, Y., GHEZZI, L., LIU, Z., PAN, Y., CHEN, K., HAN, Y., LI, Z., XIAO, H., GORMLEY, M., LIU, Y., BOKOLIYA, S., PANIER, H., SUTHER, C., EVANS, E., DENG, L., LOCCA, A., MIKESSELL, R., OBERT, K., NEWLAND, P., WU, Y., SALTER, A., CROSS, A. H., TARR, P. I., LOVETT-RACKE, A., PICCIO, L. & ZHOU, Y. 2022. Alterations of host-gut microbiome interactions in multiple sclerosis. *EBioMedicine*, 76, 103798.
- CARRILLO, J. A., HE, Y., LI, Y., LIU, J., ERDMAN, R. A., SONSTEGARD, T. S. & SONG, J. 2016. Integrated metabolomic and transcriptome analyses reveal finishing forage affects metabolic pathways related to beef quality and animal welfare. *Scientific Reports*, 6, 25948.
- CHIAPPELLI, J., ROWLAND, L. M., WIJTENBURG, S. A., MUELLERKLEIN, F., TAGAMETS, M., MCMAHON, R. P., GASTON, F., KOCHUNOV, P. & HONG, L. E. 2015. Evaluation of Myo-Inositol as a Potential Biomarker for Depression in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 40, 2157-64.
- CLAUS, S. P., TSANG, T. M., WANG, Y., CLOAREC, O., SKORDI, E., MARTIN, F. P., REZZI, S., ROSS, A., KOCHHAR, S., HOLMES, E. & NICHOLSON, J. K. 2008. Systemic multicompartmental effects of the gut microbiome on mouse metabolic phenotypes. *Mol Syst Biol*, 4, 219.

- COLLINS, S. L., KOO, I., PETERS, J. M., SMITH, P. B. & PATTERSON, A. D. 2021. Current Challenges and Recent Developments in Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 14, 467-487.
- COX, J. 2018. *Perseus documentation* [Online]. Available: <http://coxdocs.org/doku.php?id=perseus:start> [Accessed 16.12.2021].
- CROZE, M. L. & SOULAGE, C. O. 2013. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie*, 95, 1811-27.
- CUI, L., LU, H. & LEE, Y. H. 2018. Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases. *Mass Spectrom Rev*, 37, 772-792.
- CUMINGS, J. N., SHORTMAN, R. C. & SKRBIC, T. 1965. Lipid studies in the blood and brain in multiple sclerosis and motor neurone disease. *J Clin Pathol*, 18, 641-4.
- DELABRIÈRE, A., HOHENESTER, U. M., COLSCH, B., JUNOT, C., FENAILLE, F. & THÉVENOT, E. A. 2017. proFIA: a data preprocessing workflow for flow injection analysis coupled to high-resolution mass spectrometry. *Bioinformatics*, 33, 3767-3775.
- DOBSON, R. & GIOVANNONI, G. 2019. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol*, 26, 27-40.
- DUBOS, R., SCHAEGLER, R. W., COSTELLO, R. & HOET, P. 1965. INDIGENOUS, NORMAL, AND AUTOCHTHONOUS FLORA OF THE GASTROINTESTINAL TRACT. *J Exp Med*, 122, 67-76.
- ELANGO, D., RAJENDRAN, K., VAN DER LAAN, L., SEBASTIAR, S., RAIGNE, J., THAIPARAMBIL, N. A., EL HADDAD, N., RAJA, B., WANG, W., FERELA, A., CHITERI, K. O., THUDI, M., VARSHNEY, R. K., CHOPRA, S., SINGH, A. & SINGH, A. K. 2022. Raffinose Family Oligosaccharides: Friend or Foe for Human and Plant Health? *Front Plant Sci*, 13, 829118.
- EVERY-PALMER, S., NEWTON-HOWES, G. & CLARKE, M. J. 2017. Pharmacological treatment for antipsychotic-related constipation. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, Cd011128.
- FEDERATION, M. S. I. 2020. *Atlas of MS – 3rd Edition (September 2020)* [Online]. London. Available: <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms> [Accessed 02.08.2021].
- FENG, Q., LIU, Z., ZHONG, S., LI, R., XIA, H., JIE, Z., WEN, B., CHEN, X., YAN, W., FAN, Y., GUO, Z., MENG, N., CHEN, J., YU, X., ZHANG, Z., KRISTIANSEN, K., WANG, J., XU, X., HE, K. & LI, G. 2016. Integrated metabolomics and metagenomics analysis of plasma and urine identified microbial metabolites associated with coronary heart disease. *Sci Rep*, 6, 22525.
- FENN, J. B., MANN, M., MENG, C. K., WONG, S. F. & WHITEHOUSE, C. M. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246, 64-71.
- FIEHN, O. 2001. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics*, 2, 155-68.
- FLACHENECKER, P., ZETTL, U. K., GÖTZE, U., HAAS, J., SCHIMRIGK, S., ELIAS, W., PETTE, M., EULITZ, M., HENNIG, M., BERTRAM, J., HOLLWECK, R., NEISS, A., DAUMER, M., PITSCHNAU-MICHEL, D. & RIECKMANN, P. 2005. [MS registry in Germany--design and first results of the pilot phase]. *Nervenarzt*, 76, 967-75.
- FROMENTIN, S., FORSLUND, S. K., CHECHI, K., ARON-WISNEWSKY, J., CHAKAROUN, R., NIELSEN, T., TREMAROLI, V., JI, B., PRIFTI, E., MYRIDAKIS, A., CHILLOUX, J., ANDRIKOPOULOS, P., FAN, Y., OLANIPEKUN, M. T., ALVES, R., ADIOUCH, S., BAR, N., TALMOR-BARKAN, Y., BELDA, E., CAESAR, R., COELHO, L. P., FALONY, G., FELLAHI, S., GALAN, P., GALLERON, N., HELFT, G., HOYLES, L., ISNARD, R., LE CHATELIER, E., JULIENNE, H., OLSSON, L., PEDERSEN, H. K., PONS, N., QUINQUIS, B., ROUAULT, C., ROUME, H., SALEM, J. E., SCHMIDT, T. S. B., VIEIRA-SILVA, S., LI, P., ZIMMERMANN-KOGADEEVA, M., LEWINTER, C., SØNDERTOFT, N. B., HANSEN, T. H., GAUGUIER, D., GÖTZE, J. P., KØBER, L., KORNOWSKI, R., VESTERGAARD, H., HANSEN, T., ZUCKER, J. D., HERCBERG, S., LETUNIC, I., BÄCKHED, F., OPPERT, J. M., NIELSEN, J., RAES, J., BORK, P., STUMVOLL, M., SEGAL, E., CLÉMENT, K., DUMAS, M. E., EHRLICH, S. D. & PEDERSEN, O. 2022. Microbiome and metabolome features of the cardiometabolic disease spectrum. *Nat Med*, 28, 303-314.

- GERSTL, B., TAVASTSTJERNA, M. G., ENG, L. F. & SMITH, J. K. 1972. Sphingolipids and their precursors in human brain (Normal and MS). *Zeitschrift für Neurologie*, 202, 104-120.
- GILBERT, J. A., BLASER, M. J., CAPORASO, J. G., JANSSON, J. K., LYNCH, S. V. & KNIGHT, R. 2018. Current understanding of the human microbiome. *Nat Med*, 24, 392-400.
- GOLD, R. 2014. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose.
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R., SAYAGO, A. & FERNÁNDEZ-RECAMALES, Á. 2017. Direct infusion mass spectrometry for metabolomic phenotyping of diseases. *Bioanalysis*, 9, 131-148.
- GONZALEZ-UARQUIN, F., RODEHUTSCORD, M. & HUBER, K. 2020. Myo-inositol: its metabolism and potential implications for poultry nutrition-a review. *Poult Sci*, 99, 893-905.
- GONZALO, H., BRIEVA, L., TATZBER, F., JOVE, M., CACABELOS, D., CASSANYE, A., LANAU-ANGULO, L., BOADA, J., SERRANO, J. C., GONZALEZ, C., HERNANDEZ, L., PERALTA, S., PAMPLONA, R. & PORTERO-OTIN, M. 2012. Lipidome analysis in multiple sclerosis reveals protein lipoxidative damage as a potential pathogenic mechanism. *J Neurochem*, 123, 622-34.
- GOODACRE, R., VAIDYANATHAN, S., DUNN, W. B., HARRIGAN, G. G. & KELL, D. B. 2004. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol*, 22, 245-52.
- GOPALAKRISHNAN, V., SPENCER, C. N., NEZI, L., REUBEN, A., ANDREWS, M. C., KARPINETS, T. V., PRIETO, P. A., VICENTE, D., HOFFMAN, K., WEI, S. C., COGDILL, A. P., ZHAO, L., HUDGENS, C. W., HUTCHINSON, D. S., MANZO, T., PETACCIA DE MACEDO, M., COTECHINI, T., KUMAR, T., CHEN, W. S., REDDY, S. M., SZCZEPANIAK SLOANE, R., GALLOWAY-PENA, J., JIANG, H., CHEN, P. L., SHPALL, E. J., REZVANI, K., ALOUSI, A. M., CHEMALY, R. F., SHELBURNE, S., VENCE, L. M., OKHUYSEN, P. C., JENSEN, V. B., SWENNES, A. G., MCALLISTER, F., MARCELO RIQUELME SANCHEZ, E., ZHANG, Y., LE CHATELIER, E., ZITVOGEL, L., PONS, N., AUSTIN-BRENNEMAN, J. L., HAYDU, L. E., BURTON, E. M., GARDNER, J. M., SIRMANS, E., HU, J., LAZAR, A. J., TSUJIKAWA, T., DIAB, A., TAWBI, H., GLITZA, I. C., HWU, W. J., PATEL, S. P., WOODMAN, S. E., AMARIA, R. N., DAVIES, M. A., GERSHENWALD, J. E., HWU, P., LEE, J. E., ZHANG, J., COUSSENS, L. M., COOPER, Z. A., FUTREAL, P. A., DANIEL, C. R., AJAMI, N. J., PETROSINO, J. F., TETZLAFF, M. T., SHARMA, P., ALLISON, J. P., JENQ, R. R. & WARGO, J. A. 2018. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*, 359, 97-103.
- HABIB, N. A., WOOD, C. B., APOSTOLOV, K., BARKER, W., HERSHMAN, M. J., ASLAM, M., HEINEMANN, D., FERMOR, B., WILLIAMSON, R. C., JENKINS, W. E. & ET AL. 1987. Stearic acid and carcinogenesis. *Br J Cancer*, 56, 455-8.
- HASIN, Y., SELDIN, M. & LUSIS, A. 2017. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*, 18, 83.
- HAYTHORNE, E., ROHM, M., VAN DE BUNT, M., BRERETON, M. F., TARASOV, A. I., BLACKER, T. S., SACHSE, G., SILVA DOS SANTOS, M., TERRON EXPOSITO, R., DAVIS, S., BABA, O., FISCHER, R., DUCHEN, M. R., RORSMAN, P., MACRAE, J. I. & ASHCROFT, F. M. 2019. Diabetes causes marked inhibition of mitochondrial metabolism in pancreatic β -cells. *Nat Commun*, 10, 2474.
- HE, A., MERKEL, B., BROWN, J. W. L., ZHOVITS RYERSON, L., KISTER, I., MALPAS, C. B., SHARMIN, S., HORAKOVA, D., KUBALA HAVRDOVA, E., SPELMAN, T., IZQUIERDO, G., EICHAU, S., TROJANO, M., LUGARESI, A., HUPPERTS, R., SOLA, P., FERRARO, D., LYCKE, J., GRAND'MAISON, F., PRAT, A., GIRARD, M., DUQUETTE, P., LAROCHELLE, C., SVENNINGSSON, A., PETERSEN, T., GRAMMOND, P., GRANELLA, F., VAN PESCH, V., BERGAMASCHI, R., MCGUIGAN, C., COLES, A., HILLERT, J., PIEHL, F., BUTZKUEVEN, H. & KALINCIK, T. 2020. Timing of high-efficacy therapy for multiple sclerosis: a retrospective observational cohort study. *Lancet Neurol*, 19, 307-316.
- HEIN, T. & HOPFENMÜLLER, W. 2000. [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt*, 71, 288-94.

- HEMMER, B., KERSCHENSTEINER, M. & KORN, T. 2015. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 14, 406-19.
- HOU, Y., WEI, W., GUAN, X., LIU, Y., BIAN, G., HE, D., FAN, Q., CAI, X., ZHANG, Y., WANG, G., ZHENG, X. & HAO, H. 2021. A diet-microbial metabolism feedforward loop modulates intestinal stem cell renewal in the stressed gut. *Nat Commun*, 12, 271.
- HOWLETT, R. M., DAVEY, M. P. & KELLY, D. J. 2017. Metabolomic Analysis of *Campylobacter jejuni* by Direct-Injection Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol*, 1512, 189-197.
- HUANG, X., YANG, L., YE, J., HE, S. & WANG, B. 2020. Equimolar doses of hypertonic agents (saline or mannitol) in the treatment of intracranial hypertension after severe traumatic brain injury. *Medicine (Baltimore)*, 99, e22004.
- IZUMI, H., EHARA, T., SUGAHARA, H., MATSUBARA, T., MITSUYAMA, E., NAKAZATO, Y., TSUDA, M., SHIMIZU, T., ODAMAKI, T., XIAO, J. Z. & TAKEDA, Y. 2019. The Combination of *Bifidobacterium breve* and Three Prebiotic Oligosaccharides Modifies Gut Immune and Endocrine Functions in Neonatal Mice. *J Nutr*, 149, 344-353.
- JACOBS, B. M., GIOVANNONI, G., CUZICK, J. & DOBSON, R. 2020. Systematic review and meta-analysis of the association between Epstein-Barr virus, multiple sclerosis and other risk factors. *Mult Scler*, 1352458520907901.
- JACOBS, B. M., NOYCE, A. J., BESTWICK, J., BELETE, D., GIOVANNONI, G. & DOBSON, R. 2021. Gene-Environment Interactions in Multiple Sclerosis: A UK Biobank Study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 8.
- JANG, C., CHEN, L. & RABINOWITZ, J. D. 2018. Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell*, 173, 822-837.
- JARMUSCH, A. K., ELIJAH, E. O., VARGAS, F., BOUSLIMANI, A., DA SILVA, R. R., ERNST, M., WANG, M., DEL ROSARIO, K. K., DORRESTEIN, P. C. & TSUNODA, S. M. 2019. Initial Development toward Non-Invasive Drug Monitoring via Untargeted Mass Spectrometric Analysis of Human Skin. *Anal Chem*, 91, 8062-8069.
- JONES, H. H., JONES, H. H., JR. & BUNCH, L. D. 1950. Biochemical studies in multiple sclerosis. *Ann Intern Med*, 33, 831-40.
- JUNG, K., RESZKA, R., KAMLAGE, B., BETHAN, B., STEPHAN, C., LEIN, M. & KRISTIANSEN, G. 2013. Tissue metabolite profiling identifies differentiating and prognostic biomarkers for prostate carcinoma. *Int J Cancer*, 133, 2914-24.
- KADDURAH-DAOUK, R., KRISTAL, B. S. & WEINSHILBOUM, R. M. 2008. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48, 653-83.
- KANEHISA, M., GOTO, S., KAWASHIMA, S. & NAKAYA, A. 2002. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res*, 30, 42-6.
- KAPOGIANNIS, D. & MATTSON, M. P. 2011. Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 10, 187-198.
- KARAJALA, V., MANSOUR, W. & KELLUM, J. A. 2009. Diuretics in acute kidney injury. *Minerva Anesthesiol*, 75, 251-7.
- KATZ SAND, I. 2015. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 28, 193-205.
- KAU, A. L., AHERN, P. P., GRIFFIN, N. W., GOODMAN, A. L. & GORDON, J. I. 2011. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474, 327-36.
- KELLY, R. S., SORDILLO, J. E., LASKY-SU, J., DAHLIN, A., PERNG, W., RIFAS-SHIMAN, S. L., WEISS, S. T., GOLD, D. R., LITONJUA, A. A., HIVERT, M. F., OKEN, E. & WU, A. C. 2018. Plasma metabolite profiles in children with current asthma. *Clin Exp Allergy*, 48, 1297-1304.
- KKNMS. 2022. *Qualitätshandbuch MS / NMOSD. Empfehlungen zur Therapie der Multiplen Sklerose / Neuro-myelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen für Ärzte* [Online].

- Krankheitsbezogenes Kompetenznetz Multiple Sklerose e. V. (KKNMS). Available: <https://ms-qualitaetshandbuch.de/therapieschema-ms/> [Accessed 18.12.2022 2022].
- KNIGHT, R., VRBANAC, A., TAYLOR, B. C., AKSENOV, A., CALLEWAERT, C., DEBELIUS, J., GONZALEZ, A., KOSCIOLEK, T., MCCALL, L. I., MCDONALD, D., MELNIK, A. V., MORTON, J. T., NAVAS, J., QUINN, R. A., SANDERS, J. G., SWAFFORD, A. D., THOMPSON, L. R., TRIPATHI, A., XU, Z. Z., ZANEVELD, J. R., ZHU, Q., CAPORASO, J. G. & DORRESTEIN, P. C. 2018. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol*, 16, 410-422.
- KOBELT, G., BERG, J., LINDGREN, P., ELIAS, W. G., FLACHENECKER, P., FREIDEL, M., KÖNIG, N., LIMMROTH, V. & STRAUBE, E. 2006. Costs and quality of life of multiple sclerosis in Germany. *Eur J Health Econ*, 7 Suppl 2, S34-44.
- KOBELT, G., THOMPSON, A., BERG, J., GANNEDAHL, M. & ERIKSSON, J. 2017. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Mult Scler*, 23, 1123-1136.
- KOLHO, K.-L., PESSIA, A., JAAKKOLA, T., DE VOS, W. M. & VELAGAPUDI, V. 2016. Faecal and Serum Metabolomics in Paediatric Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11, 321-334.
- KRUMBHOLZ, M., DERFUSS, T., HOHLFELD, R. & MEINL, E. 2012. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol*, 8, 613-23.
- KURTZKE, J. F. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33, 1444-52.
- LEE-SARWAR, K. A., LASKY-SU, J., KELLY, R. S., LITONJUA, A. A. & WEISS, S. T. 2020. Metabolome-Microbiome Crosstalk and Human Disease. *Metabolites*, 10.
- LEHTIMÄKI, J., KARKMAN, A., LAATIKAINEN, T., PAALANEN, L., VON HERTZEN, L., HAAHTELA, T., HANSKI, I. & RUOKOLAINEN, L. 2017. Patterns in the skin microbiota differ in children and teenagers between rural and urban environments. *Scientific Reports*, 7, 45651.
- LI, Z. & ZHANG, H. 2016. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol Life Sci*, 73, 377-92.
- LIANG, K., LEONG, C., LOH, J. M., CHAN, N., LIM, L., LAM, Y. I., DAWSON, T. L., JR. & TEY, H. L. 2022. A 3D-printed transepidermal microprojection array for human skin microbiome sampling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119, e2203556119.
- LIN, H., LEVISON, B. S., BUFFA, J. A., HUANG, Y., FU, X., WANG, Z., GOGONEA, V., DIDONATO, J. A. & HAZEN, S. L. 2017. Myeloperoxidase-mediated protein lysine oxidation generates 2-aminoadipic acid and lysine nitrile in vivo. *Free Radic Biol Med*, 104, 20-31.
- LIU, M., LIU, Y., FENG, H., JING, Y., ZHAO, S., YANG, S., ZHANG, N., JIN, S., LI, Y., WENG, M., XUE, X., WANG, F., YANG, Y., JIN, X. & KONG, D. 2021. Clinical Significance of Screening Differential Metabolites in Ovarian Cancer Tissue and Ascites by LC/MS. *Front Pharmacol*, 12, 701487.
- LIU, Y. Y., YANG, Z. X., MA, L. M., WEN, X. Q., JI, H. L. & LI, K. 2019. (1)H-NMR spectroscopy identifies potential biomarkers in serum metabolomic signatures for early stage esophageal squamous cell carcinoma. *PeerJ*, 7, e8151.
- LOPE, V., GUERRERO-ZOTANO, Á., CASAS, A., BAENA-CAÑADA, J. M., BERMEJO, B., PÉREZ-GÓMEZ, B., CRIADO-NAVARRO, I., ANTOLÍN, S., SÁNCHEZ-ROVIRA, P., RAMOS-VÁZQUEZ, M., ANTÓN, A., CASTELLÓ, A., GARCÍA-SAÉNZ, J., MUÑOZ, M., DE JUAN, A., ANDRÉS, R., LLOMBART-CUSSAC, A., HERNANDO, B., FRANQUESA, R. M., CABALLERO, R., PRIEGO-CAPOTE, F., MARTÍN, M. & POLLÁN, M. 2020. Serum Phospholipids Fatty Acids and Breast Cancer Risk by Pathological Subtype. *Nutrients*, 12.
- LÓPEZ-GAMBERO, A. J., MARTÍNEZ, F., SALAZAR, K., CIFUENTES, M. & NUALART, F. 2019. Brain Glucose-Sensing Mechanism and Energy Homeostasis. *Mol Neurobiol*, 56, 769-796.
- LUCKEY, T. D. 1972. Introduction to intestinal microecology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 25, 1292-1294.
- LYNCH, J., PEELING, J., AUTY, A. & SUTHERLAND, G. R. 1993. Nuclear magnetic resonance study of cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*, 20, 194-8.

- MALLICK, H., MA, S., FRANZOSA, E. A., VATANEN, T., MORGAN, X. C. & HUTTENHOWER, C. 2017. Experimental design and quantitative analysis of microbial community multiomics. *Genome Biol*, 18, 228.
- MATHUR, D., LÓPEZ-RODAS, G., CASANOVA, B. & MARTI, M. B. 2014. Perturbed glucose metabolism: insights into multiple sclerosis pathogenesis. *Front Neurol*, 5, 250.
- MATTHEWS, D. E. 2020. Review of Lysine Metabolism with a Focus on Humans. *J Nutr*, 150, 2548s-2555s.
- MCNAMARA, R. K., RIDER, T., JANDACEK, R. & TSO, P. 2014. Abnormal fatty acid pattern in the superior temporal gyrus distinguishes bipolar disorder from major depression and schizophrenia and resembles multiple sclerosis. *Psychiatry Res*, 215, 560-7.
- MERVIEL, P., JAMES, P., BOUÉE, S., LE GUILLOU, M., RINCE, C., NACHTERGAELE, C. & KERLAN, V. 2021. Impact of myo-inositol treatment in women with polycystic ovary syndrome in assisted reproductive technologies. *Reprod Health*, 18, 13.
- MONTALBAN, X., GOLD, R., THOMPSON, A. J., OTERO-ROMERO, S., AMATO, M. P., CHANDRARATNA, D., CLANET, M., COMI, G., DERFUSS, T., FAZEKAS, F., HARTUNG, H. P., HAVRDOVA, E., HEMMER, B., KAPPOS, L., LIBLAU, R., LUBETZKI, C., MARCUS, E., MILLER, D. H., OLSSON, T., PILLING, S., SELMAJ, K., SIVA, A., SORENSEN, P. S., SORMANI, M. P., THALHEIM, C., WIENDL, H. & ZIPP, F. 2018.ECTRIMS/EAN guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Eur J Neurol*, 25, 215-237.
- MORGAN, K. P., BUIE, L. W. & SAVAGE, S. W. 2012. The role of mannitol as a nephroprotectant in patients receiving cisplatin therapy. *Ann Pharmacother*, 46, 276-81.
- MURARO, P. A., MARTIN, R., MANCARDI, G. L., NICHOLAS, R., SORMANI, M. P. & SACCARDI, R. 2017. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 13, 391-405.
- NAGURA, T., HACHIMURA, S., HASHIGUCHI, M., UEDA, Y., KANNO, T., KIKUCHI, H., SAYAMA, K. & KAMINOGAWA, S. 2002. Suppressive effect of dietary raffinose on T-helper 2 cell-mediated immunity. *British Journal of Nutrition*, 88, 421-426.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2022. *PubChem Compound Summary for CID 439500, Glu-glu* [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glu-glu> [Accessed 12.01.2022 2022].
- NAVARRO, X. & SEGURA, R. 1989. Red blood cell fatty acids in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 79, 32-7.
- NEVITT, S. J., THORNTON, J., MURRAY, C. S. & DWYER, T. 2020. Inhaled mannitol for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 5, Cd008649.
- NIELSEN, J. E., MALTESEN, R. G., HAVELUND, J. F., FÆRGEMAN, N. J., GOTFREDSEN, C. H., VESTERGÅRD, K., KRISTENSEN, S. R. & PEDERSEN, S. 2021. Characterising Alzheimer's disease through integrative NMR- and LC-MS-based metabolomics. *Metabolism Open*, 12, 100125.
- NIGHTINGALE, S., WOO, E., SMITH, A. D., FRENCH, J. M., GALE, M. M., SINCLAIR, H. M., BATES, D. & SHAW, D. A. 1990. Red blood cell and adipose tissue fatty acids in mild inactive multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 82, 43-50.
- NISHIDA, H. & NISHIYAMA, M. 2000. What is characteristic of fungal lysine synthesis through the alpha-aminoadipate pathway? *J Mol Evol*, 51, 299-302.
- NOSEWORTHY, J. H., LUCCHINETTI, C., RODRIGUEZ, M. & WEINSHENKER, B. G. 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 343, 938-52.
- NŮSKOVÁ, H., SEREBRYAKOVA, M. V., FERRER-CAELLES, A., SACHSENHEIMER, T., LÜCHTENBORG, C., MILLER, A. K., BRÜGGER, B., KORDYUKOVA, L. V. & TELEMAN, A. A. 2021. Stearic acid blunts growth-factor signaling via oleoylation of GNAI proteins. *Nat Commun*, 12, 4590.
- OH, J., BYRD, A. L., PARK, M., KONG, H. H. & SEGRE, J. A. 2016. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell*, 165, 854-66.

- OLIVER, S. G., WINSON, M. K., KELL, D. B. & BAGANZ, F. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*, 16, 373-8.
- PANG, Z., CHONG, J., ZHOU, G., DE LIMA MORAIS, D. A., CHANG, L., BARRETTE, M., GAUTHIER, C., JACQUES, P., LI, S. & XIA, J. 2021. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res*, 49, W388-w396.
- PASOLLI, E., ASNICAR, F., MANARA, S., ZOLFO, M., KARCHER, N., ARMANINI, F., BEGHINI, F., MANGHI, P., TETT, A., GHENSI, P., COLLADO, M. C., RICE, B. L., DULONG, C., MORGAN, X. C., GOLDEN, C. D., QUINCE, C., HUTTENHOWER, C. & SEGATA, N. 2019. Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell*, 176, 649-662.e20.
- PAULING, L., ROBINSON, A. B., TERANISHI, R. & CARY, P. 1971. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 2374-6.
- PODDIGHE, S., MURGIA, F., LOREFICE, L., LIGGI, S., COCCO, E., MARROSU, M. G. & ATZORI, L. 2017. Metabolomic analysis identifies altered metabolic pathways in Multiple Sclerosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 93, 148-155.
- PROBERT, F., YEO, T., ZHOU, Y., SEALEY, M., ARORA, S., PALACE, J., CLARIDGE, T. D. W., HILLENBRAND, R., OECHTERING, J., LEPPERT, D., KUHLE, J. & ANTHONY, D. C. 2021. Integrative biochemical, proteomics and metabolomics cerebrospinal fluid biomarkers predict clinical conversion to multiple sclerosis. *Brain Commun*, 3, fcab084.
- RAMAGOPALAN, S. V., DOBSON, R., MEIER, U. C. & GIOVANNONI, G. 2010. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol*, 9, 727-39.
- REGENOLD, W. T., PHATAK, P., MAKLEY, M. J., STONE, R. D. & KLING, M. A. 2008. Cerebrospinal fluid evidence of increased extra-mitochondrial glucose metabolism implicates mitochondrial dysfunction in multiple sclerosis disease progression. *J Neurol Sci*, 275, 106-12.
- REICH, D. S., LUCCHINETTI, C. F. & CALABRESI, P. A. 2018. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 378, 169-180.
- REINKE, S. N., BROADHURST, D. L., SYKES, B. D., BAKER, G. B., CATZ, I., WARREN, K. G. & POWER, C. 2014. Metabolomic profiling in multiple sclerosis: insights into biomarkers and pathogenesis. *Mult Scler*, 20, 1396-400.
- ROBILLARD, R., LAGOPOULOS, J., HERMENS, D. F., NAISMITH, S. L., ROGERS, N. L., WHITE, D., CARPENTER, J. S., KAUR, M., SCOTT, E. M. & HICKIE, I. B. 2017. Lower In vivo Myo-Inositol in the Anterior Cingulate Cortex Correlates with Delayed Melatonin Rhythms in Young Persons with Depression. *Front Neurosci*, 11, 336.
- ROCHFORT, S. 2005. Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J Nat Prod*, 68, 1813-20.
- ROTE LISTE®. *Fachinfo-Service, Fachinformationsverzeichnis Deutschland*
- Arzneimittelinformationen für Deutschland* [Online]. Rote Liste® Service GmbH. Available: <https://www.fachinfo.de/> [Accessed 2022].
- RSTUDIO-TEAM. 2020. *RStudio: Integrated Development for R* [Online]. Available: <http://www.rstudio.com/> [Accessed 16.12.2021].
- RUANO, L., PORTACCIO, E., GORETTI, B., NICCOLAI, C., SEVERO, M., PATTI, F., CILIA, S., GALLO, P., GROSSI, P., GHEZZI, A., ROSCIO, M., MATTIOLI, F., STAMPATORI, C., TROJANO, M., VITERBO, R. G. & AMATO, M. P. 2017. Age and disability drive cognitive impairment in multiple sclerosis across disease subtypes. *Mult Scler*, 23, 1258-1267.
- RUDOLPH, J. & COX, J. 2018. A network module for the Perseus software for computational proteomics facilitates proteome interaction graph analysis. *bioRxiv*, 447268.
- RZĄD, K. & GABRIEL, I. 2015. Characterization of two aminotransferases from *Candida albicans*. *Acta Biochim Pol*, 62, 903-12.

- SAMPATH, H. & NTAMBI, J. M. 2005. The fate and intermediary metabolism of stearic acid. *Lipids*, 40, 1187-91.
- SARGENT, J. R., COUPLAND, K. & WILSON, R. 1994. Nervonic acid and demyelinating disease. *Med Hypotheses*, 42, 237-42.
- SAVAGE, D. C. 1977. MICROBIAL ECOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT. *Annual Review of Microbiology*, 31, 107-133.
- SCHMIDT, C. 2020. Out of your skin. *Nat Biotechnol*, 38, 392-397.
- SCHMIDT, T. S. B., RAES, J. & BORK, P. 2018. The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. *Cell*, 172, 1198-1215.
- SCHOMMER, N. N. & GALLO, R. L. 2013. Structure and function of the human skin microbiome. *Trends Microbiol*, 21, 660-8.
- SENDER, R., FUCHS, S. & MILO, R. 2016a. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 164, 337-340.
- SENDER, R., FUCHS, S. & MILO, R. 2016b. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*, 14, e1002533.
- SHAO, Y., YE, G., REN, S., PIAO, H.-L., ZHAO, X., LU, X., WANG, F., MA, W., LI, J., YIN, P., XIA, T., XU, C., YU, J. J., SUN, Y. & XU, G. 2018. Metabolomics and transcriptomics profiles reveal the dysregulation of the tricarboxylic acid cycle and related mechanisms in prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 143, 396-407.
- SHENG, J., NGUYEN, P. T. & MARQUIS, R. E. 2005. Multi-target antimicrobial actions of zinc against oral anaerobes. *Arch Oral Biol*, 50, 747-57.
- SHI, M., WEI, Y., NIE, Y., WANG, C., SUN, F., JIANG, W., HU, W. & WU, X. 2020. Alterations and Correlations in Microbial Community and Metabolome Characteristics in Generalized Aggressive Periodontitis. *Front Microbiol*, 11, 573196.
- SINHA, R., AHN, J., SAMPSON, J. N., SHI, J., YU, G., XIONG, X., HAYES, R. B. & GOEDERT, J. J. 2016. Fecal Microbiota, Fecal Metabolome, and Colorectal Cancer Interrelations. *PLoS One*, 11, e0152126.
- SKOLNICK, S. D. & GREIG, N. H. 2019. Microbes and Monoamines: Potential Neuropsychiatric Consequences of Dysbiosis. *Trends Neurosci*, 42, 151-163.
- SONG, J., MA, W., GU, X., ZHAO, L., JIANG, J., XU, Y., ZHANG, L., ZHOU, M. & YANG, L. 2019. Metabolomic signatures and microbial community profiling of depressive rat model induced by adrenocorticotrophic hormone. *J Transl Med*, 17, 224.
- SONG, S. H. & VIEILLE, C. 2009. Recent advances in the biological production of mannitol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84, 55-62.
- STACY, A. & BELKAID, Y. 2019. Microbial guardians of skin health. *Science*, 363, 227-228.
- STEWART, C. J., EMBLETON, N. D., MARRS, E. C. L., SMITH, D. P., FOFANOVA, T., NELSON, A., SKEATH, T., PERRY, J. D., PETROSINO, J. F., BERRINGTON, J. E. & CUMMINGS, S. P. 2017. Longitudinal development of the gut microbiome and metabolome in preterm neonates with late onset sepsis and healthy controls. *Microbiome*, 5, 75.
- SYLVESTRE, D. A., SLUPSKY, C. M., AVIV, R. I., SWARDFAGER, W. & TAHA, A. Y. 2020. Untargeted metabolomic analysis of plasma from relapsing-remitting multiple sclerosis patients reveals changes in metabolites associated with structural changes in brain. *Brain Res*, 1732, 146589.
- TAKAHASHI, N. & SATO, T. 2002. Dipeptide utilization by the periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol*, 17, 50-4.
- TAKAHASHI, N., SATO, T. & YAMADA, T. 2000. Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate- and aspartate-containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 182, 4704-10.

- TAN, C. S. & KORALNIK, I. J. 2010. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol*, 9, 425-37.
- TAN, R., DONG, H., CHEN, Z., JIN, M., YIN, J., LI, H., SHI, D., SHAO, Y., WANG, H., CHEN, T., YANG, D. & LI, J. 2021. Intestinal Microbiota Mediates High-Fructose and High-Fat Diets to Induce Chronic Intestinal Inflammation. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 654074.
- THOMPSON, A. J., BANWELL, B. L., BARKHOF, F., CARROLL, W. M., COETZEE, T., COMI, G., CORREALE, J., FAZEKAS, F., FILIPPI, M., FREEDMAN, M. S., FUJIHARA, K., GALETTA, S. L., HARTUNG, H. P., KAPPOS, L., LUBLIN, F. D., MARRIE, R. A., MILLER, A. E., MILLER, D. H., MONTALBAN, X., MOWRY, E. M., SORENSEN, P. S., TINTORE, M., TRABOULSEE, A. L., TROJANO, M., UITDEHAAG, B. M. J., VUKUSIC, S., WAUBANT, E., WEINSHENKER, B. G., REINGOLD, S. C. & COHEN, J. A. 2018a. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*, 17, 162-173.
- THOMPSON, A. J., BARANZINI, S. E., GEURTS, J., HEMMER, B. & CICCARELLI, O. 2018b. Multiple sclerosis. *Lancet*, 391, 1622-1636.
- THURSBY, E. & JUGE, N. 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*, 474, 1823-1836.
- TODD, J. F. J. 1991. Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectroscopy (including an appendix of terms used in vacuum technology). (Recommendations 1991). *Pure and Applied Chemistry*, 63, 1541-1566.
- TORREGROZA, C., GLASHOERSTER, C. O., FEIGE, K., STROETHOFF, M., RAUPACH, A., HEINEN, A., HOLLMANN, M. W. & HUHN, R. 2021. Mediation of the Cardioprotective Effects of Mannitol Discovered, with Refutation of Common Protein Kinases. *Int J Mol Sci*, 22.
- TRABJERG, M. S., MØRKHOLT, A. S., LICHOTA, J., OKLINSKI, M. K. E., ANDERSEN, D. C., JØNSSON, K., MØRK, K., SKJØNNEMAND, M. N., KROESE, L. J., PRITCHARD, C. E. J., HUIJBERS, I. J., GAZERANI, P., CORTHALS, A. & NIELAND, J. D. V. 2020. Dysregulation of metabolic pathways by carnitine palmitoyl-transferase 1 plays a key role in central nervous system disorders: experimental evidence based on animal models. *Sci Rep*, 10, 15583.
- TRIVEDI, D. K., SINCLAIR, E., XU, Y., SARKAR, D., WALTON-DOYLE, C., LISCIO, C., BANKS, P., MILNE, J., SILVERDALE, M., KUNATH, T., GOODACRE, R. & BARRAN, P. 2019. Discovery of Volatile Biomarkers of Parkinson's Disease from Sebum. *ACS Cent Sci*, 5, 599-606.
- TSOUKALAS, D., FRAGOULAKIS, V., SARANDI, E., DOCEA, A. O., PAPAKONSTANINO, E., TSILIMIDOS, G., ANAMATEROU, C., FRAGKIADAKI, P., ASCHNER, M., TSATSAKIS, A., DRAKOULIS, N. & CALINA, D. 2019. Targeted Metabolomic Analysis of Serum Fatty Acids for the Prediction of Autoimmune Diseases. *Front Mol Biosci*, 6, 120.
- TUNIYAZI, M., HE, J., GUO, J., LI, S., ZHANG, N., HU, X. & FU, Y. 2021. Changes of microbial and metabolome of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *BMC Vet Res*, 17, 11.
- TYANOVA, S. & COX, J. 2018. Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. In: VON STECHOW, L. (ed.) *Cancer Systems Biology: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York.
- TYANOVA, S., TEMU, T., SINITCYN, P., CARLSON, A., HEIN, M. Y., GEIGER, T., MANN, M. & COX, J. 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, 13, 731-740.
- VALLES-COLOMER, M., FALONY, G., DARZI, Y., TIGCHELAAR, E. F., WANG, J., TITO, R. Y., SCHIWECK, C., KURILSHIKOV, A., JOOSSENS, M., WIJMENGA, C., CLAES, S., VAN OUDENHOVE, L., ZHERNAKOVA, A., VIEIRA-SILVA, S. & RAES, J. 2019. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nat Microbiol*, 4, 623-632.
- VAN KUILENBURG, A. B., MEIJER, J., DOBRITZSCH, D., MEINSMA, R., DURAN, M., LOHKAMP, B., ZOETEKOUW, L., ABELING, N. G., VAN TINTEREN, H. L. & BOSCH, A. M. 2007. Clinical,

- biochemical and genetic findings in two siblings with a dihydropyrimidinase deficiency. *Mol Genet Metab*, 91, 157-64.
- VENDRIK, K. E. W., OOIJEVAAR, R. E., DE JONG, P. R. C., LAMAN, J. D., VAN OOSTEN, B. W., VAN HILTEN, J. J., DUCARMON, Q. R., KELLER, J. J., KUIJPER, E. J. & CONTARINO, M. F. 2020. Fecal Microbiota Transplantation in Neurological Disorders. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 98.
- WIJEKON, E. P., SKINNER, C., BROSNAN, M. E. & BROSNAN, J. T. 2004. Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: effects of insulin resistance and of type 2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*, 82, 506-14.
- WILKINSON, D. J., RODRIGUEZ-BLANCO, G., DUNN, W. B., PHILLIPS, B. E., WILLIAMS, J. P., GREENHAFF, P. L., SMITH, K., GALLAGHER, I. J. & ATHERTON, P. J. 2020. Untargeted metabolomics for uncovering biological markers of human skeletal muscle ageing. *Aging (Albany NY)*, 12, 12517-12533.
- WISHART, D. S. *HMDB The Human Metabolome Database* [Online]. Available: <https://hmdb.ca/> [Accessed 12.01.2022 2022].
- WISHART, D. S., FEUNANG, Y. D., MARCU, A., GUO, A. C., LIANG, K., VÁZQUEZ-FRESNO, R., SAJED, T., JOHNSON, D., LI, C., KARU, N., SAYEEDA, Z., LO, E., ASSEMPOUR, N., BERJANSKII, M., SINGHAL, S., ARNDT, D., LIANG, Y., BADRAN, H., GRANT, J., SERRA-CAYUELA, A., LIU, Y., MANDAL, R., NEVEU, V., PON, A., KNOX, C., WILSON, M., MANACH, C. & SCALBERT, A. 2018. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*, 46, D608-d617.
- WISHART, D. S., TZUR, D., KNOX, C., EISNER, R., GUO, A. C., YOUNG, N., CHENG, D., JEWELL, K., ARNDT, D., SAWHNEY, S., FUNG, C., NIKOLAI, L., LEWIS, M., COUTOULY, M. A., FORSYTHE, I., TANG, P., SHRIVASTAVA, S., JERONCIC, K., STOTHARD, P., AMEGBEY, G., BLOCK, D., HAU, D. D., WAGNER, J., MINIACI, J., CLEMENTS, M., GEBREMEDHIN, M., GUO, N., ZHANG, Y., DUGGAN, G. E., MACINNIS, G. D., WELJIE, A. M., DOWLATABADI, R., BAMFORTH, F., CLIVE, D., GREINER, R., LI, L., MARRIE, T., SYKES, B. D., VOGEL, H. J. & QUERENGESSER, L. 2007. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res*, 35, D521-6.
- WOO, Y. R., HAN, Y. J., KIM, H. S., CHO, S. H. & LEE, J. D. 2020. Updates on the Risk of Neuropsychiatric and Gastrointestinal Comorbidities in Rosacea and Its Possible Relationship with the Gut-Brain-Skin Axis. *Int J Mol Sci*, 21.
- XIA, J., PSYCHOGIOS, N., YOUNG, N. & WISHART, D. S. 2009. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res*, 37, W652-60.
- XUAN, J., PAN, G., QIU, Y., YANG, L., SU, M., LIU, Y., CHEN, J., FENG, G., FANG, Y., JIA, W., XING, Q. & HE, L. 2011. Metabolomic profiling to identify potential serum biomarkers for schizophrenia and risperidone action. *J Proteome Res*, 10, 5433-43.
- YANG, B., ZHANG, X., GONG, H., HUANG, Y., WANG, C., LIU, H., DONG, C., MA, S., WU, X. & WU, D. 2021a. High stearic acid diet modulates gut microbiota and aggravates acute graft-versus-host disease. *Signal Transduct Target Ther*, 6, 277.
- YANG, F., WU, S. C., LING, Z. X., CHAO, S., ZHANG, L. J., YAN, X. M., HE, L., YU, L. M. & ZHAO, L. Y. 2021b. Altered Plasma Metabolic Profiles in Chinese Patients With Multiple Sclerosis. *Front Immunol*, 12, 792711.
- YANG, J., CHEN, T., SUN, L., ZHAO, Z., QI, X., ZHOU, K., CAO, Y., WANG, X., QIU, Y., SU, M., ZHAO, A., WANG, P., YANG, P., WU, J., FENG, G., HE, L., JIA, W. & WAN, C. 2013. Potential metabolite markers of schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 18, 67-78.
- ZHANG, D., JIN, W., WU, R., LI, J., PARK, S. A., TU, E., ZANVIT, P., XU, J., LIU, O., CAIN, A. & CHEN, W. 2019. High Glucose Intake Exacerbates Autoimmunity through Reactive-Oxygen-Species-Mediated TGF- β Cytokine Activation. *Immunity*, 51, 671-681.e5.

- ZHANG, Y., LIU, G., DUAN, Y., HAN, X., DONG, H. & GENG, J. 2016. Prevalence of Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Multiple Sclerosis: a Case-Control Study from China. *J Neuroimmunol*, 301, 83-87.
- ZHAO, L., HUANG, Y., LU, L., YANG, W., HUANG, T., LIN, Z., LIN, C., KWAN, H., WONG, H. L. X., CHEN, Y., SUN, S., XIE, X., FANG, X., YANG, H., WANG, J., ZHU, L. & BIAN, Z. 2018. Saturated long-chain fatty acid-producing bacteria contribute to enhanced colonic motility in rats. *Microbiome*, 6, 107.

9 Danksagung

Meinen Dank möchte ich gegenüber Frau Prof. Dr. Dr. Binder sowie Herrn Prof. Dr. Falkai aussprechen, die mir die klinisch-experimentelle Forschung am Max-Planck-Institut für Psychiatrie ermöglicht haben.

Ich danke allen Studienteilnehmer*innen, die durch Ihre Teilnahme zu diesem Forschungsprojekt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

Zudem geht mein herzlicher Dank an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Schaaf und an Herrn Prof. Dr. Turck, die mir diese Dissertation zu einem hochinteressanten Thema ermöglicht haben und mich wissenschaftlich beraten und unterstützt haben. Ich danke Herrn Prof. Dr. Steiger für die Initiierung dieser klinischen Studie, die mir diese Dissertation erst möglich gemacht hat.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Nischwitz, Herrn Dr. Knop und Frau Stauer bedanken für die freundliche Einarbeitung und Zusammenarbeit im Rahmen der Multiple Sklerose Sprechstunde.

An alle Mitarbeiter*innen des Max-Planck-Instituts, aber besonders an Herrn Dr. Dethloff, Frau Yeoh, Frau Yu, Herrn Dr. Xiao, Herrn Dr. Yu und an Herrn Novak möchte ich meinen besten Dank aussprechen für die Einarbeitung im Labor und in der statistischen Auswertung.

Großer Dank geht zuletzt aber insbesondere an meine Familie, die mich mit großer Motivation unterstützt hat und immer für mich da war.

10 Eidesstaatliche Erklärung



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Schmitt, Christina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 14.01.2024

Ort, Datum

Schmitt, Christina

Unterschrift Doktorandin/Doktorand