

Diss. ETH No. 27323

**Metabolic Insights Related to Sleep and Circadian Clocks
from Mass Spectrometry-Based Analysis of Blood and
Breath**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Nora Kristina Nowak

MSc in Chemistry, Friedrich Schiller Universität Jena, Germany

born on 02.07.1991

German citizen

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Renato Zenobi, examiner
Prof. Dr. Steven Brown, co-examiner
Prof. Dr. Emma Wetter Slack, co-examiner

2021

Abstract

Most physiological processes in humans are synchronized with their environment by so-called circadian clocks. These molecular time-keeping machineries are present in almost every cell. While light is the most important external stimulus to reset the circadian clocks, they can also be entrained by other stimuli, such as feeding or rest/activity cycles. Sleep is both, one of the major outputs of circadian clocks and also an independently regulated recuperative neurobiological process. Both, circadian clocks and sleep are closely intertwined with metabolic regulation and their disruption is associated with adverse effects on metabolic health, such as type 2 diabetes, metabolic syndrome, obesity and cardiovascular diseases. Since sleep restriction and disruption of circadian clocks are common issues in a modern 24/7 society, their negative metabolic consequences constitute a major concern of public health. However, despite clear evidence for the association between sleep, circadian clocks and metabolism, many aspects of this relationship remain unclear.

In this thesis, novel insights into metabolic processes related to sleep and circadian clocks were gained using cutting-edge high-resolution mass spectrometry (HRMS) techniques. The combination of high resolution and high mass accuracy enables the analysis of complex mixtures and delivers molecular information. HRMS therefore provides a powerful tool for metabolic profiling. Here, two HRMS approaches were used. Metabolites in exhaled breath were measured in real time by secondary electrospray ionization high-resolution mass spectrometry (SESI-HRMS), offering a non-invasive technique with a virtually unlimited sampling frequency for studying systemic metabolic processes. Moreover, metabolic profiling from blood samples was performed using electrospray ionization mass spectrometry coupled to ultra-high performance liquid chromatography. Thereby, chromatography adds an additional dimension of separation, which improves unambiguous compound identification.

Within this thesis, a setup for the analysis of exhaled breath during sleep by SESI-HRMS was developed. This allowed an unprecedented monitoring of metabolome-wide regulation during sleep with a ten-second time resolution. Major metabolic pathways were found to undergo rapid and reversible changes upon sleep stage transitions. It seems likely that the relevance of this complex synchronization of metabolism and sleep architecture for human health and performance is higher than previously thought.

The non-invasive fashion of SESI-HRMS and its capability for real-time information qualify this technique also as a promising tool for clinical diagnostics. Here, breath biomarkers for obstructive sleep apnea (OSA) were validated in a larger and broader cohort of patients confirming the previously stated association between breath levels of these metabolites and the severity of the disease. These findings suggest that breath analysis by SESI-HRMS may

add a substantial objective value, especially for OSA screening, and bring SESI-HRMS a step closer to its clinical application.

By analyzing breath, it was possible to unravel metabolic processes related to sleep architecture and obstructive sleep apnea, while the metabolic profiling of blood provided insights into the connection between circadian clocks and metabolism. An elongating effect on the circadian period length was observed for a range of metabolic factors in serum from metabolically unhealthy obese patients. The combination of the molecular information provided by HRMS and results from genome-wide association revealed insulin resistance as central aspect of this association.

In contrast to humans, arctic species, such as Norwegian reindeer, have always been exposed to seasonally occurring conditions of constant light. Therefore, they might have developed strategies to cope with this reoccurring circadian disruption. In the scope of this thesis circadian regulation of metabolism in arctic reindeer was investigated in combination with their behavior across all seasons. In contrast their activity patterns, metabolism in reindeer was not synchronized with the experienced light schedule. While less rhythmic metabolites were found during constant light in summer, a surprisingly high number of metabolites displayed circadian rhythms in winter. These findings suggest that reindeer have developed mechanisms to decouple circadian regulation of metabolism from behavioral rhythmicity.

In conclusion, this thesis demonstrates the value of breath analysis and the versatility of high-resolution mass spectrometry for the field of metabolomics. By using this technique, metabolic processes related to sleep and circadian clocks were unraveled and the diagnostic value of metabolic profiling in exhaled breath by SESI-HRMS was further validated.

Zusammenfassung

Die meisten physiologischen Prozesse im Menschen werden durch die sogenannte zirkadiane oder innere Uhr mit der Umgebung synchronisiert. Solche molekularen Schrittmacher sind in fast jeder Zelle des Körpers vorhanden. Licht ist zwar der wichtigste Zeitgeber für die innere Uhr, aber auch andere Stimuli, wie zum Beispiel Nahrungsaufnahme oder Ruhe-/Aktivitätszyklen können die Uhr beeinflussen. Schlaf ist nicht nur ein von der zirkadianen Uhr bestimmter Prozess, sondern gleichzeitig ein davon unabhängig regulierter, erholfördernder neurobiologischer Prozess. Sowohl die innere Uhr als auch Schlaf sind eng mit dem menschlichen Stoffwechsel verflochten, und eine Beeinträchtigung beider Prozesse geht mit negativen Auswirkungen auf die Gesundheit einher. Diese äussern sich beispielsweise durch das Auftreten von Typ-2-Diabetes, metabolischem Syndrom, Adipositas oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Da Schlafmangel und Unterbrechungen des Tagesrhythmus in einer modernen, rund um die Uhr funktionierenden Gesellschaft weitverbreitet sind, stellen ihre negativen Folgen einige wichtige Herausforderungen für das aktuelle Gesundheitswesen dar. Trotz eindeutiger wissenschaftlicher Belege für einen bestehenden Zusammenhang zwischen Schlaf, zirkadianen Uhren und dem Stoffwechsel sind jedoch viele Aspekte dieser Interaktionen noch wenig erforscht.

In dieser Arbeit wurden mit modernster hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) neue Einblicke in Stoffwechselforgänge im Zusammenhang mit Schlaf und zirkadianen Uhren gewonnen. Die Kombination von hoher Auflösung und hoher Massengenauigkeit ermöglicht die Analyse komplexer Stoffgemische und liefert zudem Informationen über deren molekulare Zusammensetzung. HRMS ist daher ein leistungsstarkes Werkzeug für eine möglichst umfassende Analyse von Stoffwechselprodukten (Metabolomik). Hier wurden zwei verschiedene HRMS-Methoden verwendet: Metabolite in der Atemluft wurden in Echtzeit mittels hochauflösender Sekundärelektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (SESI-HRMS) gemessen, zur Analyse von Blutproben wurde Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie mit Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt. Während SESI-HRMS die Untersuchung systemischer Stoffwechselprozesse auf nicht-invasive Weise und mit nahezu unbegrenzter Probennahmefrequenz ermöglichte, konnten durch den zusätzlichen Trennungsschritt bei der Kopplung mit Chromatographie chemischen Verbindungen eindeutiger identifiziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Analyse von Atemluft von Schlafenden ein Versuchsaufbau mittels SESI-HRMS entwickelt. Dieser ermöglichte eine bislang beispiellose simultane Überwachung vieler verschiedener Stoffwechselforgänge während des Schlafs mit einer zeitlichen Auflösung von zehn Sekunden. Es zeigte sich, dass bei Übergängen zwischen verschiedenen Schlafphasen

schnelle und reversible Veränderungen in Hauptstoffwechselwegen stattfinden. Diese komplexe Orchestrierung von Stoffwechsel und Schlafarchitektur könnte für die menschliche Gesundheit und Leistungsfähigkeit von höherer Relevanz sein als bislang angenommen.

Da SESI-HRMS nicht invasiv ist und Echtzeit-Informationen liefert, ist die Technologie auch für die klinische Diagnostik von grossem Interesse. In dieser Arbeit wurden Biomarker für obstruktive Schlafapnoe (OSA) validiert, indem die Atemluft einer größeren und breiteren Patientenkohorte analysiert wurde. Auf diese Weise konnte der zuvor bei einer kleinen Gruppe festgestellte Zusammenhang zwischen der Menge dieser Stoffwechselprodukte in der Atemluft und dem Schweregrad der Erkrankung bestätigt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Atemanalyse mittels SESI-HRMS insbesondere zur Früherkennung von OSA eine bedeutende objektive Diagnosegrundlage beisteuern könnte. Durch diese erstmalige Validierungsstudie wurde SESI-HRMS ihrer klinischen Anwendung einen entscheidenden Schritt näher gebracht.

Während mittels Atemanalyse neue Erkenntnisse zu Stoffwechselprozessen im Zusammenhang mit Schlaf und Schlafapnoe gewonnen werden konnten, lieferte die Analyse von Metaboliten in Blutproben neue Einblicke in den Zusammenhang zwischen Stoffwechsel und zirkadianen Uhren. Für eine Reihe von Metaboliten in Blutproben adipöser Patienten wurde ein verlängernder Effekt auf die zirkadiane Periode festgestellt. Die Kombination der von der HRMS gelieferten molekularen Informationen mit den Ergebnissen einer genomweiten Assoziationsstudie ergab, dass Insulinresistenz hier eine zentrale Rolle spielt.

Während beim Menschen Verschiebungen des Tagesrhythmus mit gesundheitlichen Problemen einhergehen, waren arktische Spezies wie zum Beispiel das Norwegische Rentier schon immer saisonal auftretenden Bedingungen mit konstantem Licht ausgesetzt. Daher könnten solche Arten interessante Strategien entwickelt haben, um mit der immer wieder auftretenden Veränderung des Tagesrhythmus umzugehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die zirkadiane Regulierung des Stoffwechsels bei arktischen Rentieren sowie deren Verhalten über alle Jahreszeiten hinweg untersucht. Während die Verhaltensmuster den Lichtverhältnissen folgten, zeigten Metaboliten in allen Jahreszeiten zirkadiane Rhythmen, und das in besonderem Masse bei konstanter Dunkelheit im Winter. Besonders viele wurden überraschenderweise bei konstanter Dunkelheit im Winter beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Rentiere Mechanismen entwickelt haben, um die zirkadiane Kontrolle des Stoffwechsels von ihren Verhaltensmustern zu entkoppeln.

Insgesamt demonstriert die vorliegende Arbeit die Bedeutung und die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten der hochauflösenden Massenspektrometrie für das Gebiet der Metabolomik. Mit Hilfe dieser Technik konnten hier zum einen mit Schlaf und zirkadianen Rhythmen einhergehende Stoffwechselprozesse nachgewiesen werden und zum anderen wurde der Wert der Atemanalyse mittels SESI-HRMS für die klinische Diagnostik bestätigt.