TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik

Targeted Metabolomics in Mensch, Maus und Rind: Bioinformatische Methodenentwicklung und Datenanalyse

Elisabeth Altmaier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H.-R. Fries

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H.-W. Mewes
2. Univ.-Prof. Dr. K. Suhre (Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 08.09.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.11.2008 angenommen.

Danksagung

Meine Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2005 bis Juli 2008 am Helmholtz Zentrum München auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Hans-Werner Mewes. Ihm möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit an seinem Institut für Bioinformatik und Systembiologie durchzuführen, sowie für den gewährten wissenschaftlichen Gestaltungsfreiraum.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Karsten Suhre, der mir stets mit Rat und fachlicher Unterstützung zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Firma BIOCRATES Life Sciences AG (Innsbruck), hier vor allem bei Herrn Dr. Klaus Weinberger, für die gute Zusammenarbeit und für die Bereitstellung von metabolischen Daten.

Ebenfalls für eine gute Zusammenarbeit danken möchte ich Frau Dr. Christa Kühn vom FBN Dummerstorf und Herrn Prof. Dr. Hans-Rudolf Fries vom Lehrstuhl für Tierzucht (TUM).

Herzlich danken möchte ich auch meinen Kollegen, vor allem Gabi Kastenmüller, Gitti Wägele und Werner Römisch-Margl, für ihre fachliche und moralische Unterstützung.

Lieben Dank auch an meine Eltern für ihre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**
1.1 Entwicklung der Metabolomics 4
1.2 Analytik 7
1.3 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) 9
2 Diabetes mellitus am Mausmodell **17**
2.1 Mäuse als Modellorganismen 17
2.2 Diabetes und Rosiglitazon 18
2.3 Experimenteller Aufbau und Metabolitenspektrum 21
2.4 Bioinformatische Datenanalyse 22
2.5 Ergebnisse 24
2.5.1 Analyse einzelner Metabolite mit Fokus auf den Diabetes-Phänotyp 24
2.5.2 Analyse einzelner Metabolite mit Fokus auf die Medikation mit Rosiglitazon 29
2.5.3 Identifizierung möglicher neuer Biomarker durch Quotientenbildung 33
2.5.4 Identifizierung von Metabolitengruppen 36
2.6 Diskussion 41
3 Populationsstudie am Menschen (KORA) **45**
3.1 Kaffee 47
3.2 Datensatz 49
3.3 Datenanalyse 50
3.4 Ergebnisse 51
3.5 Diskussion 56
4 Metabolomics am Modellorganismus Rind **58**
4.1 Nahrungsaufnahme und Verdauung 59
4.2 Datensatz 60
4.3 Datenanalyse 63
4.4 Ergebnis 63
4.4.1 Überblick 63
4.4.2 Phospholipide und der Verdauungsapparat des Kalbs 68
4.5 Diskussion 72
5 Zusammenfassung **75**

Abbildungsverzeichnis **79**
Tabellenverzeichnis **81**
Literatur **82**

1 Einleitung

Metabolomics zählt zu den Disziplinen der "-omics" und zielt auf die Identifizierung, Quantifizierung und Analyse des *Metaboloms* eines biologischen Systems ab. Das Metabolom wiederum setzt sich aus der Gesamtheit aller *Metabolite* (Moleküle mit geringem Molekulargewicht (Griffiths, Karu et al. 2007); vom altgriechischen *metabol* = Umwandlung, Veränderung) zusammen, die das biologische System in einem bestimmten Zustand und zu einem bestimmten Zeitpunkt synthetisiert. Analog zur Definition des Transkriptoms und des Proteoms kann das Metabolom für alle Ebenen der Komplexität, vom gesamten Organismus über die Gewebe und Zellen bis hin zu den Zellkompartimenten, bestimmt werden (Fiehn 2002; Tolstikov, Tanaka et al. 2003; Hollywood, Brison et al. 2006; Oldiges, Lutz et al. 2007).

In der molekularen Biologie galt lange Zeit das Dogma, dass ein linearer, nur in eine Richtung verlaufender Informationsfluss vom Gen über das Transkript zum Protein besteht. Die Proteine beeinflussen als Enzyme wiederum metabolische Stoffwechselvorgänge, was letztendlich zum vorliegenden Phänotyp eines Organismus führt. Diese Auffassung wurde jedoch durch die Erkenntnis überholt, dass zelluläre Prozesse ein dichtes Netzwerk mit post-transkriptionalen und post-translationalen Modifikationen sowie mit vielen feedback-loops darstellen (Cornish-Bowden and Cardenas 2001; Hollywood, Brison et al. 2006; Goodacre 2007). Metabolite beeinflussen beispielsweise als Kofaktoren oder Inhibitoren von Enzymen und Transkriptionsfaktoren sowohl das Transkriptom als auch das Proteom und damit wiederum die Zusammensetzung des Metaboloms. (Abb. 1)

Zusätzlich zeichnet sich neben der individuellen genetischen Prädisposition die Wirkung von Umweltfaktoren, wie Medikation, sportliche Aktivität und Ernährung, oft deutlich im Metabolom ab, so dass dieses als funktioneller Endpunkt aller biologischen Ereignisse im jeweiligen biologischen System gilt (Fiehn 2002; Bogumil, Koal et al. 2008). Dieser funktionelle Endpunkt bewirkt auch den von *Urbanczyk-Wochniak, Luedemann et al. 2003* gezeigten Effekt, dass sich Änderungen im Metabolom im Vergleich zu Änderungen im Transkriptom und Proteom verstärken. Im Gegensatz zu Transkriptom und Proteom, die hauptsächlich auf die mögliche Ursache eines bestimmten Phänotyps hinweisen, besitzt das Metabolom also die engste und direkteste Bindung an den Phänotyp und kann somit Einflüsse auf diesen widerspiegeln. Nimmt man die Informationen über das Transkriptom

und das Proteom noch zum Metabolom hinzu, so kann die Systembiologie ein äußerst umfassendes Bild der biologischen Ereignisse in der Zelle zeichnen (Goodacre 2007).
Der Einfluss von Umweltfaktoren bewirkt aber auch, dass ein komplettes Metabolom für einen Organismus nicht festgelegt und nicht wie im Falle des Transkriptoms vollständig auf einem Chip gebunden werden kann (Cornish-Bowden and Cardenas 2001; Dettmer, Aronov et al. 2007). Vielmehr wird zwischen primären und sekundären Metaboliten, die nicht unmittelbar für das Überleben der Zelle notwendig sind, unterschieden (Karlovsky 2008). Diese primären Metaboliten werden dann in vielen Analysen als Basis für einen Vergleich von Individuen verwendet.

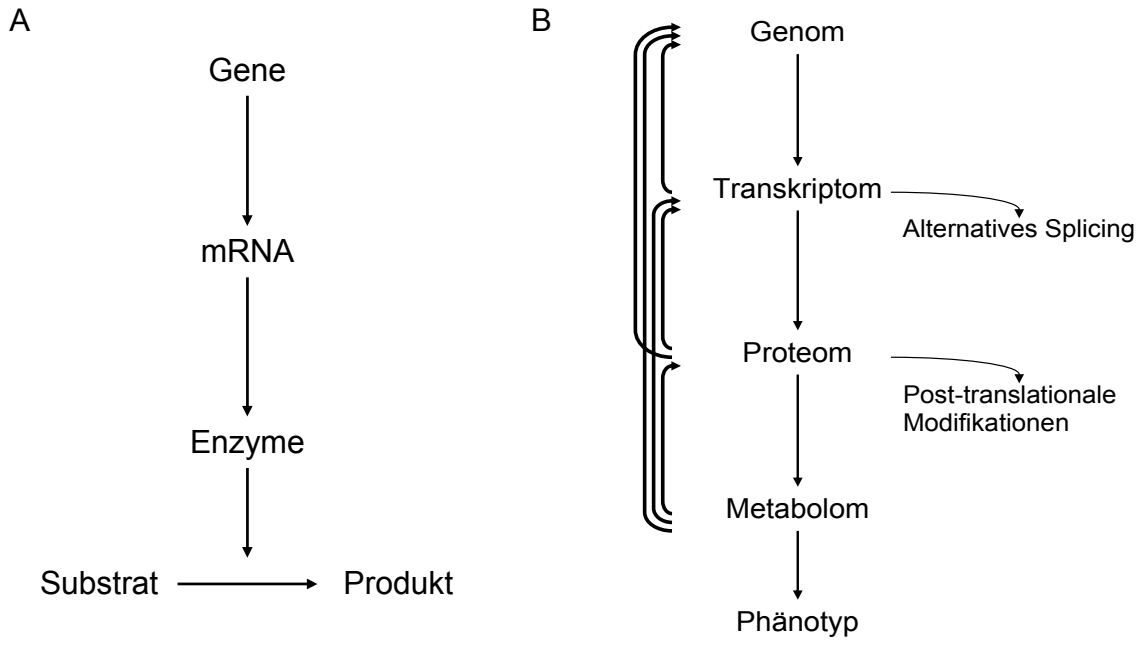


Abb. 1: (A) Traditionelles zentrales Dogma der Molekularbiologie mit linearem Informationsfluss vom Gen bis zum Enzym; (B) aktualisiertes Schema mit feedback-loops (verändert nach *Hollywood, Brison et al. 2006*).

In silico-Simulationen des Stoffwechsels des Menschen und Modelle der Systembiologie weisen auf einen zusätzlichen Vorteil der Analyse des Metaboloms hin, nämlich dass „nur" einige Tausend Markermetabolite ausreichen, um das Stoffwechselgeschehen zu einem bestimmten Zeitpunkt funktionell aussagekräftig und repräsentativ darzustellen. Die Human Metabolome Database (HMDB) beispielsweise sammelt alle bisher verfügbaren Informationen über die Metabolite des Menschen (Wishart, Tzur et al. 2007). 2008 enthielt diese Datenbank fast 2500 Metaboliten-Einträge (http://www.hmdb.ca). Dem stehen im Menschen etwa 25000 Gene und aufgrund von alternativem Splicen und post-translationalen Modifikationen 100000 bis einige Millionen verschiedene Proteine

entgegen. Somit besitzt der Stoffwechsel im Hinblick auf die Analyse überschaubarere Dimensionen. Auch ist er nach ca. 150 Jahren der wissenschaftlichen Betätigung im Bereich Biochemie weitgehender erforscht als Transkriptom und Proteom. Dies verdeutlicht beispielsweise die Roche Applied Science „Biochemical Pathways“ Karte (Michal 1999), die den Großteil des bisher bekannten Stoffwechsels zeigt (Weinberger 2005).

Im Bereich der Genanalyse stellt sich bei den meisten Organismen das Problem, dass ungefähr 30-40% der open reading frames keine Funktion zugeordnet werden kann. Bisher wurden Kandidatengene nur isoliert betrachtet, wobei bereits existierendes Wissen über die Funktion des Gens mit in die Analyse einfloss. Obwohl auch dieser Ansatz nützliche Informationen liefert, kann doch kein umfassendes Bild davon erstellt werden, in welcher Weise sich das jeweilige Gen auf das gesamte biologische System und dessen Stoffwechsel auswirkt. Die Analyse des Metaboloms dagegen ist in der Lage, solch eine umfassende Momentaufnahme der Wirkungsweise eines Gens zu liefern (Hollywood, Brison et al. 2006; Goodacre 2007).

Für Transkriptom und Proteom gilt weiter, dass sie aufgrund der Sequenzunterschiede für jeden Organismus in einer spezifischen Ausprägung vorliegen. Metabolite dagegen sind nicht an diese Spezies-Barrieren gebunden, sondern gelten als universell in der gesamten Natur. Dies wiederum erleichtert den Vergleich metabolischer Phänomene in verschiedenen Spezies (Goodenowe 2004; Weinberger 2005).

Dieses Potenzial von Metababolomics legt dessen Anwendung in der Diagnostik nahe. So könnten latente Krankheiten schon in einem frühen Stadium erkannt und rechzeitig behandelt werden. Auch eine individuelle Metaboliten-Analyse mit einer auf den Patienten zugeschnittenen und damit effizienteren Therapie wäre möglich. Gleiche Bedeutung kommt dem Metabolom bei der Erforschung komplexer Stoffwechsel-Krankheiten zu, deren Ursache auf verschiedenen Faktoren beruht. Darüber hinaus kann Metabolomics vor allem im Pharmabereich für die Entwicklung von Medikamenten eingesetzt werden: die Effektivität von Medikamenten sowie eine mögliche toxische Wirkung, die von ihnen ausgeht, kann beobachtet und mit Hilfe von geeigneter bioinformatischer und statistischer Auswertung detailliert beschrieben werden. Dies ermöglicht eine effizientere Gestaltung der verschiedenen Phasen des klinischen Tests von Medikamenten. Metabolomics findet seine Anwendung aber nicht mehr nur in der Pharma- und Biotechindustrie, sondern auch in den Ernährungs-, Agrar- und Tierzuchtwissenschaften, die bioaktive Nahrung

(„functional food“) erforschen, die gezielt den menschlichen Stoffwechsel beeinflussen soll (Harrigan 2006; Weinberger, Graber et al. 2006).

Die wachsende Bedeutung von Metabolomics zeichnet sich auch in der stark ansteigenden Anzahl der Veröffentlichungen in Journalen ab. So konnten für das Jahr 2007 über 450 Publikationen im Bereich Metabolomics und Metabonomics gefunden werden. Damit sind zwar die Publikationszahlen der anderen drei „-omics“ noch lange nicht erreicht, jedoch lässt die stete Zunahme der Veröffentlichungen annehmen, dass Metabolomics heute an dem Punkt angelangt ist, an dem sich die Transcriptomics vor ca. sieben Jahren befand (Abb. 2), was wiederum auf einen ähnlichen Erfolg für die Zukunft hoffen lässt.

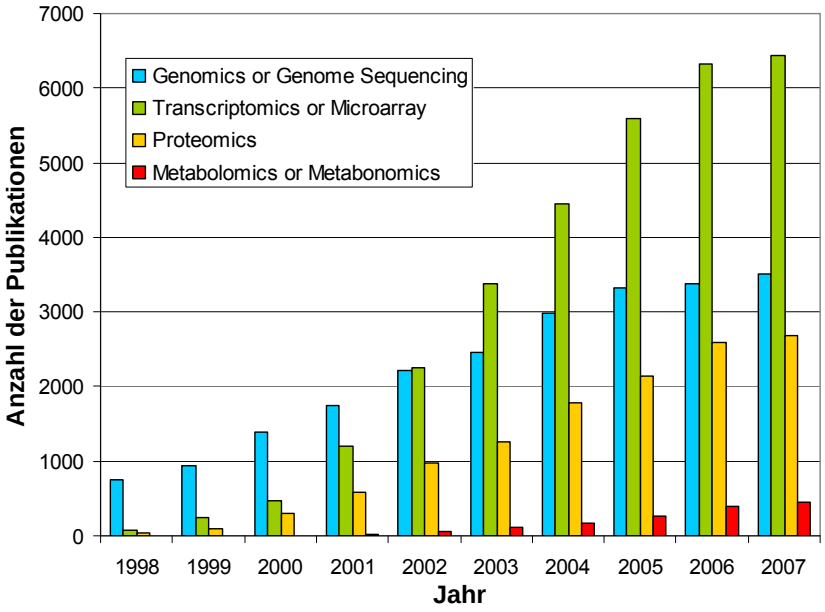


Abb. 2: Anzahl der Publikationen pro Jahr basierend auf der ISI Web-of-Science Datenbank.

1.1 Entwicklung der Metabolomics

Der Begriff „Metabolom“ wurde von *Oliver, Winson et al. 1998* geprägt, die Metabolomics noch als Methode der funktionellen Genomics betrachteten, sowie von *Tweeddale, Notley-McRobb et al. 1998* im Rahmen ihrer Erforschung des Phänotyps von *E.coli*. Allerdings wurden bereits vor diesem Zeitpunkt Analysen betrieben, die sich auf das Metabolom bezogen. Schon seit der Einführung der Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie Mitte der 1960er wurden die Blut- und Urinkomponenten von Menschen und Tieren in Hinblick auf mögliche angeborene Stoffwechselkrankheiten oder

Toxizität analysiert (Gates and Sweeley 1978). Diese anfänglichen biochemischen Untersuchungen mit Blick auf einzelne Metabolite können allerdings noch nicht als Metabolomics im heutigen Sinn verstanden werden. Seither wurden metabolische Analysen hauptsächlich für Pflanzen und Mikroorganismen durchgeführt, jedoch wurden relativ wenige Studien an Tieren und Menschen betrieben (Fiehn 2001).

Im Bereich „Pflanzen“ beschreiben *Rizhsky, Liang et al. 2004* beispielsweise die Reaktion von *Arabidopsis* auf durch Dürre und Hitze bedingten Stress, der zu einer Akkumulation von Saccharose und anderen Zuckern wie Maltose und Glukose führt. *Catchpole, Beckmann et al. 2005* untersuchten den Effekt genetischer Manipulation und verglichen dazu genetisch veränderte insulinproduzierende Kartoffeln mit einer herkömmlichen Kartoffelsorte.

Das Wachstumsverhalten von Mikroorganismen wurde an den Beispielen *Escherichia coli* (Tweeddale, Notley-McRobb et al. 1998) und *Saccharomyces cerevisiae* (Martins, Camacho et al. 2004) analysiert. Ebenfalls anhand dieser beiden Modellorganismen gingen *Buchholz, Hurlebaus et al. 2002* und *Theobald, Mailinger et al. 1997* der Frage der metabolischen Dynamik in der Zelle nach. Eine weitere Studie an *Saccharomyces cerevisiae* (Raamsdonk, Teusink et al. 2001) beschäftigt sich mit Phänotypen, die nach außen hin nicht sichtbar sind und daher auch „silent phenotypes“ genannt werden. Betrachtet man jedoch das Metabolitenprofil, so können Änderungen in den Metabolitenkonzentrationen aufgefunden werden, was wiederum ermöglicht, auf die Wirkungsweise eines Gens mit „silent phenotype“ zu schließen.

Metabolomics findet seine Anwendung auch im Bereich der Ernährungswissenschaften: *Solanky, Bailey et al. 2003* untersuchten den Effekt von grünem Tee, indem sie den bioaktiven Teebestandteil Epicatechin an Ratten fütterten und anschließend deren Metabolitenprofil im Urin maßen. Die Analyse ergab, dass die Gabe von Epicatechin mit einer Reduzierung der Urinkonzentrationen von Taurin, Citrat, Dimethylamin und 2-Oxoglutarat einhergeht. Auch wenn dieses Ergebnis noch nicht viel über den Einfluss von grünem Tee auf die Gesundheit aussagt, so kann es doch nützliche Hinweise für eine ähnliche Studie am Menschen geben (Davis and Milner 2004). Am Menschen selbst wurden die Folgen des Konsums von Soja betrachtet. Dazu wurde das Metabolitenprofil im Plasma vor und nach der Aufnahme von Soja bestimmt, und die Analyse ergab, dass, trotz individueller Unterschiede, deutliche Änderungen in den Saccharid- und Aminosäurekonzentrationen zu beobachten waren. Zusammen mit sojabedingten Abweichungen der Lipoproteinkonzentrationen lässt dies auf eine Wirkung von Soja auf

den Energiestoffwechsel schließen (Solanky, Bailey et al. 2003). *Shi, Vigneau-Callahan et al. 2002* richteten ihr Interesse auf das Thema energiearmer Ernährung. Sie verglichen in ihrer Studie Ratten, die einer energiearmen Diät unterzogen wurden mit solchen, denen Nahrung *ad libitum* angeboten wurde und konnten eine Reihe von Metaboliten identifizieren, die es ermöglichen, die beiden Gruppen voneinander zu unterscheiden. Motiviert wurde diese Studie durch die Kenntnis, dass energiearm gefütterte Tiere seltener an Krebs erkranken. Einen weiteren Beitrag zum Verständnis des Tumor-Metabolismus haben auch *Mazurek and Eigenbrodt 2003* geleistet, indem sie Änderungen im Stoffwechsel während des Tumorwachstums analysierten (Davis and Milner 2004). In einer Pilotstudie verglichen *Paige, Mitchell et al. 2007* depressive, mit Antidepressiva behandelte, sowie vollkommen gesunde ältere Menschen miteinander. Die Analyse von ca. 800 Metaboliten ergab, dass vor allem einige Fettsäuren, Glycerol und Gamma-Aminobuttersäure einen Unterschied zwischen den depressiven und den gesunden Menschen anzeigen. Der Vergleich der behandelten mit den gesunden Menschen zeigt zudem, dass die Medikation die von der Krankheit beeinträchtigten Irritationen der Stoffwechselwege auszugleichen scheint. *Kaddurah-Daouk, McEvoy et al. 2007* verwendeten eine besonders spezialisierte Metabolomics-Platform für die Quantifizierung von mehr als 300 polaren und unpolaren Lipiden. Durch diesen Ansatz konnten sie globale Veränderungen im Lipidstoffwechsel von schizophrenen Patienten sowohl vor als auch nach der Gabe von drei verschiedenen Medikamenten analysieren. *Rozen, Cudkowicz et al. 2005* konzentrierten ihre Forschung auf Krankheiten, die das motorische Nervensystem betreffen, insbesondere auf die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Sie konnten zeigen, dass sowohl krankheitsbedingte als auch durch die Medikation hervorgerufene Änderungen des Metaboloms aufgefunden werden können. Ebenfalls mit der Amyotrophen Lateralsklerose beschäftigten sich *Lawton, Paige et al. 2006* , die mit Hilfe einer kommerziellen Metabolomics-Plattform Zellkomponenten identifizieren konnten, die statistisch signifikante Unterschiede zwischen ALS-Patienten und gesunden Probanden aufwiesen und somit als mögliche Biomarker für ALS gelten können. Mit dem Ziel metabolische Nebeneffekte von Protease-Inhibitoren auf die Homeostase von Glukose und Lipiden besser verstehen zu lernen, bestimmten *Flint, Elosua et al. 2006* das endogene Metabolom von Hepatozyten und Adipozyten, nachdem diese mit den Therapeutika für HIV-Infektion Atazanavir oder Lopinavir (Protease-Inhibitor) behandelt worden waren. Das Ergebnis dieser Analyse verglichen sie anschließend mit dem Plasma-Metabolom von HIV-Patienten, die ebenfalls mit diesen Medikamenten therapiert worden waren. Eine

weitere Anwendung fand Metabolomics in der Erforschung der Muskeldystrophie des Typs Duchenne (Griffin, Williams et al. 2001; Griffin, Sang et al. 2002). An einem Mausmodell konnte festgestellt werden, dass bestimmte Metabolitenprofile mit der Expression der Muskelfasermembran-Proteine Dystrophin and Utrophin assoziiert werden können. Dieses Resultat gibt einen Hinweis darauf, dass die Duchenne Muskeldystrophie durch eine auf Utrophin basierende Gentherapie behandelt werden könnte (Burton and Davies 2002). Diese Studien verdeutlichen also die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Metabolomics und deren Potential für die Zukunft.

1.2 Analytik

Anders als in Transkriptomics und Proteomics muss bei der Messung von Metaboliten die große Diversität des Metaboloms beachtet werden. Zusätzlich sind starke Unterschiede in der Konzentration der Metabolite zu bewältigen (pmol-mmol) (Dunn and Ellis 2005). Dadurch und durch unterschiedliche Zielvorgaben für die Messung haben sich im Laufe der Jahre mehrere verschiedene analytische Methoden etabliert, die sich zum Teil ergänzen. *Fiehn 2002* gibt einen Überblick über die verschiedenen Analysemethoden, die hauptsächlich in vier verschiedene Ansätze unterteilt werden können (Abb. 3): (1) „Metabolite target analysis“ beschreibt einen Ansatz, der sich auf nur eine oder zumindest wenige metabolische Komponenten konzentriert, wie es beispielsweise bei einem Enzym-System der Fall wäre, das direkt von einem störenden Eingriff betroffen ist (Hollywood, Brison et al. 2006). (2) „Metabolite profiling“ fokussiert entweder auf eine bestimmte Klasse von Metaboliten oder auf eine Gruppe von Metaboliten, die von einem bestimmten Stoffwechselweg betroffen ist. In der Pharmazeutik dient diese Methode hauptsächlich dazu, den katabolischen Weg eines Medikaments nachzuvollziehen. (3) Als „Metabolomics“ bezeichnet *Fiehn 2002* die umfassende Analyse des gesamten Metaboloms. Dieser Begriff wird jedoch inzwischen auch allgemeiner verwendet und umfasst, wie am Anfang des Kapitels bereits beschrieben, alle verschiedenen Arten der Analyse des Metaboloms eines biologischen Systems. In diesem Sinne soll dieser Begriff hier auch weiterhin verwendet werden. (4) „Metabolic fingerprinting“ gibt nicht notwendigerweise Informationen über einzelne Metabolite an, sondern ermöglicht die Klassifikation von Proben aufgrund ihres für sie typischen Profils.

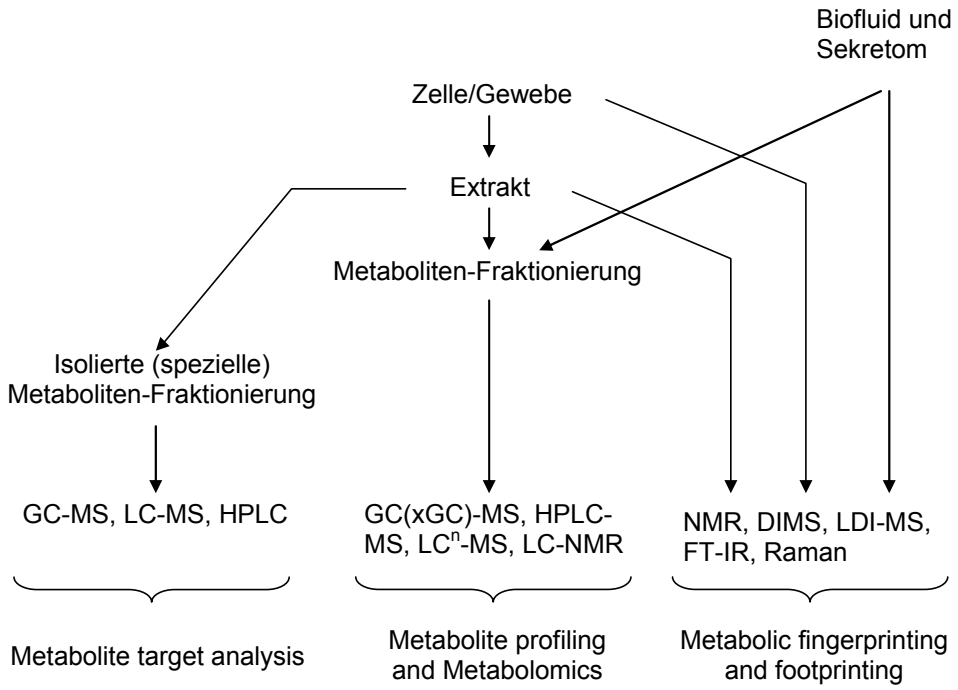


Abb. 3: Überblick über die verschiedenen Analyseansätze in der Erforschung des Metaboloms (verändert nach *Hollywood, Brison et al. 2006*); GC: gas chromatography; LC: Liquid chromatography; HPLC: high performance liquid chromatography; MS: mass spectrometry; NMR: Nuclear magnetic resonance spectroscopy; DI: Desorption ionization; LDI: Laser Desorption Ionisation; FT-IR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy.

Das „Footprinting“ zielt im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Methoden auf die Messung der extra-zellulären Metabolite ab, wie es zum Beispiel bei der Analyse des Mediums, auf dem ein Organismus wächst, der Fall ist (Hollywood, Brison et al. 2006).
Die Messmethode die zur Erzeugung der in dieser Arbeit analysierten Metabolitendaten verwendet wurde, lässt sich zwar nicht ganz leicht in obiges Schema einordnen, würde aber nach der Einteilung von Fiehn am ehesten einem erweiterten Metabolite profiling zugeordnet werden. In letzter Zeit hat sich jedoch die Bezeichnung „quantitative targeted metabolomics“ durchgesetzt. Das heißt, dass eine Vielzahl bekannter Metabolite, momentan bis zu Tausend, durch Elektrosprayionisations-Tandem-Massenspektroskopie im Hochdurchsatzverfahren zielgerichtet identifiziert und vor allem quantifiziert werden kann (Bogumil, Koal et al. 2008).

Für diese verschiedenen Analyseverfahren stehen verschiedene experimentelle Techniken bereit, von denen einige kurz vorgestellt werden sollen: *Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)* bestimmt mit Hilfe eines Magnetfeldes für jeden Atomkern eines Moleküls dessen Resonanzfrequenzen. Diese Frequenzen eines Atomkerns hängen auch von seiner chemischen Umgebung ab, so dass Kernresonanzspektroskopie zur Strukturaufklärung von

Molekülen eingesetzt werden kann. Weitere wichtige Verfahren zur Metabolitenanalyse bietet die Massenspektroskopie. Die *Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS)* beispielsweise, die zur Ionenfallen-Massenspektrometrie gehört, basiert auf der Identifizierung der für jedes Ion charakteristischen, massenabhängigen Kreisbahn und Umlauffrequenz im Zyklotron, die durch Anlegen eines homogenen Magnetfeldes beobachtet werden kann. Diese Methode ermöglicht eine extreme Massenauflösung und hohe Massengenauigkeit. *Flugzeitmassenspektrometer (TOF = time of flight)* nutzen die Tatsache, dass Teilchen mit unterschiedlicher Masse aber gleicher kinetischer Energie auch unterschiedlich viel Flugzeit benötigen, um den Detektor zu erreichen. Die *Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)*, durch die die hier verwendeten Datensätze generiert wurden, wird anschließend ausführlich beschrieben. Die erwähnten Massenspektrometer können mit Chromatographieverfahren gekoppelt werden. Üblich ist die Kopplung mit *Gas- oder Flüssigkeits-Chromatographen (GC/MS bzw. LC/MS)* , wogegen die Verbindung des Massenspektrometers mit *Kapillarelektrophorese (CE/MS)* und *Ionenmobilitäts-Spektrometrie (IMS/MS)* eher selten verwendet wird.

1.3 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

1.3.1 Technik

Das Grundprinzip eines Massenspektrometers (MS) besteht darin, geladene Teilchen zunächst in einem Hochvakuum zu beschleunigen und anschließend die unterschiedliche Ablenkung dieser Teilchen in einem elektro-magnetischen Feld zu messen. Die Ablenkung erfolgt dabei proportional zum Verhältnis Masse/Ladung.

Konventionelle Geräte sind für ein Massenscreening nicht geeignet, da sie weder einen hohen Probendurchsatz, noch einen möglichst geringen Probenverbrauch und eine einfache Probenvorbereitung ermöglichen. Daher wird für Massenscreenings ein Quadrupol-Tandem-Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisierung (Abb. 4) verwendet (Roscher, Fingerhut et al. 2001).

Abb. 4: Schematischer Aufbau eines ESI-MS/MS (© Applied Biosystems).

Elektrospray (ES) ist eine sanfte Ionisierungsmethode, durch die, anders als bei herkömmlicher MS-Analyse, eine Fragmentierung der Moleküle während des Ionisierungsprozesses verhindert wird. Als erstes wird die betreffende Blutprobe in Methanol gelöst. Durch anschließendes Zentrifugieren werden die Metabolite, die sich daraufhin im Überstand befinden, vom restlichen Zellinhalt, wie z.B. Proteinen getrennt. Eine anschließende Butyl-Veresterung der Aminosäuren verhindert die Bildung von Zwitterionen und erhöht die Effizienz der späteren Ionisierung im ES (Nagy, Takats et al. 2003). Das Lösungsmittel wird daraufhin von den Metaboliten abgezogen und durch MS/MS-Flussmittel, beispielsweise bestehend aus Methanol-Wasser ($MeOH/H_2O$) und Ammoniumacetat (NH4Ac), ersetzt. Anschließend wird die Lösung durch eine dünne Kapillare (Innendurchmesser ca.0,1 mm) mit hoher elektrischer Spannung (4kV) gepumpt und somit geladen. Kleine, nun geladene Tröpfchen werden von dieser Kapillare aus in ein

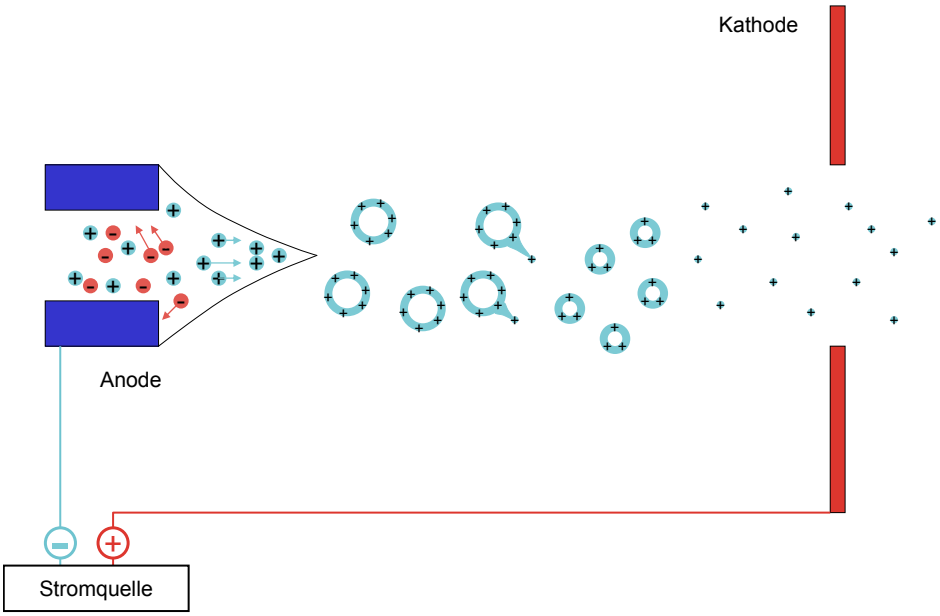


Abb. 5: Schematische Darstellung des Elektrospray-Prozesses (verändert nach *Griffiths, Jonsson et al. 2001*).

Gasbad mit Atmosphärendruck gesprüht und wandern anschließend einen Druck- und Spannungsgradienten hinab. Dadurch verringert sich die Größe der Tröpfchen dermaßen, dass die Kräfte der Oberflächenladung größer werden als die der Oberflächenspannung, was den Zerfall in immer kleinere Tröpfchen zur Folge hat. Dieser Prozess wird fortgesetzt, bis sich entweder das Ion vom Tropfen trennt oder die Lösung vollständig verdampft ist (Abb. 5). Welche dieser beiden Varianten tatsächlich stattfindet, wird von der Wissenschaft noch diskutiert (Griffiths, Jonsson et al. 2001).

Die so generierten Ionen verlassen daraufhin dieses System und gelangen in den ersten Quadrupol (Q1), in dem sie in einem hochfrequenten elektrischen Feld aufgetrennt und wunschgemäß ausselektiert werden können. Ein Quadrupol besteht im Wesentlichen aus vier hyperbolischen Metallstäben, die paarweise als Elektroden dienen (Abb. 6). An die jeweils gegenüberliegenden Stäbe wird eine positive bzw. negative Gleichspannung angelegt, die mit einer Wechselspannung überlagert ist: $U_s := +/-U + V * \cos(wt)$. Die entstandenen elektrischen Felder regen die Ionen zu oszillierenden Flugbahnen an, die im Innenbereich der vier Elektroden nur für einen bestimmten Massenbereich stabil sind. Nur Ionen, deren Masse/Ladungs-Verhältnis eine solche stabile Flugbahn erlaubt, können diesen Massenfilter passieren. Alle anderen Ionen prallen auf die Stäbe und werden entladen. Durch Variation der Spannungen U und V oder durch Variation der Frequenz w kann der gesamte Massenbereich gescannt werden (Lohninger, Fröhlich et al. 2003).

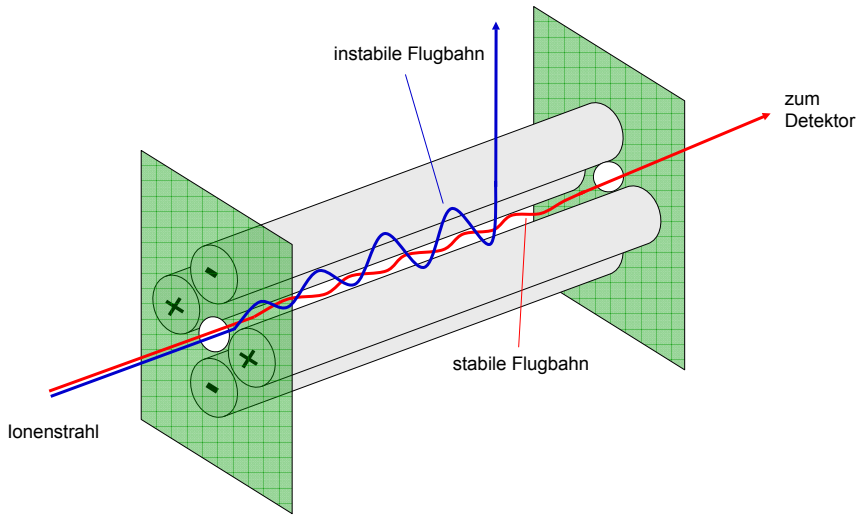


Abb. 6: Aufbau eines Quadrupols (verändert nach *Lohninger, Fröhlich et al. 2003*).

Die Ionen, die den ersten Quadrupol passieren konnten, treten anschließend in die Kollisionszelle (Q2) ein. In diese Kollisionszelle wird Inertgas eingeleitet, dessen Moleküle mit den Ionen kollidieren. Bei diesen Kollisionen kann ein Teil der Bewegungsenergie des Ions in innere Energie umgewandelt werden, so dass das Ion in einen unstabilen, angeregten Zustand übergeht und in spezifische Bruchstücke zerfällt. Dabei kann sowohl der Druck in der Kollisionszelle, als auch die Energie, mit der die Gasmoleküle einschlagen sollen, variiert werden. Acylcarnitine beispielsweise spalten bei der Kollision den Fettsäurerest und die terminale Aminogruppe ab, wodurch ein Fragment der Masse m/z = 85 übrig bleibt, während die meisten Aminosäuren ein ungeladenes Teilchen der Masse 102 Dalton abspalten (Rolinski, Arnecke et al. 2000).
Die Zerfallsprodukte gelangen anschließend in den zweiten Quadrupol (Q3). Hier besteht nun die Möglichkeit, analog zum ersten Quadrupol, durch Anlegen verschiedener Spannungen den gesamten Massenbereich zu scannen und die jeweils passierenden Ionen mit dem Detektor zu messen. Somit erhält man neben der Information über die Masse, mit der der erste Quadrupol passiert werden konnte, auch die Information über die Massen der geladenen Zerfallsprodukte des jeweiligen Metaboliten. Mit Hilfe der Kenntnis der spezifischen Fragmentierung der Metabolite in der Kollisionszelle kann nun aus diesen Informationen geschlossen werden, um welchen Metaboliten es sich handelt. Da im Detektor auch die Aufschlagsintensität für ein Ion einer bestimmten Masse gemessen wird, erhält man somit auch eine gewisse Information über die Menge eines Metaboliten. Die tatsächliche Konzentration eines Metaboliten erhält man jedoch erst, wenn zusätzlich ein isotopenmarkierter interner Standard im gleichen Ansatz mit gemessen wird, dessen Menge von Anfang an bekannt ist. Durch Vergleich mit den Signalintensitäten der internen Standards kann anschließend die Metabolitenkonzentration berechnet werden.

Bei diesem Verfahren müssen verschiedene kritische Punkte beachtet werden: Probenextraktion und Probenvorbereitung müssen äußerst sorgfältig durchgeführt werden, da hier einmal verloren gegangenes Material der weiteren Analyse nicht mehr zur Verfügung steht. Ist ein Chromatograph vor das Massenspektrometer geschaltet, so muss die Schnittstelle zwischen beiden Geräten problemlos funktionieren. Bei der anschließenden Ionisierung der zu messenden Moleküle können bei der Elektrospray-Ionisation Mehrfachladungen entstehen, die durch mathematische Nachbehandlung der Spektren korrigiert werden müssen. Auch die eigentliche Messung der Masse kann beispielsweise durch Spannungseinbrüche in den Quadrupolen zur Fehlerquelle werden,

ebenso wie die darauf folgende richtige Identifikation und Quantifizierung der Metaboliten. Die vorgestellte Methode bedarf also der sensiblen Einstellung und aufeinander Abstimmung der einzelnen Geräte.

1.3.2 Scan-Modi

Ein Tandem-Massenspektrometer kann in verschiedenen Scan-Modi betrieben werden, von denen die folgenden drei Modi zur Anwendung kamen (Abb. 7): Im „Multiple Reaction Monitoring"-Modus filtern sowohl das erste als auch das zweite Quadrupol (Q3) nach einer bestimmten vorher festgelegten molekularen Masse, wodurch eine quantitative Messung mit hoher Selektivität ermöglicht wird. Für Q1 ist die Masse des Precursorions Ausschlag gebend, während Q3 nach der Masse der in der Kollisionszelle entstandenen Fragmente selektiert. „Precursor Ion Scan" und „Neutral Loss Scan" dienen der Analyse chemisch ähnlicher Metabolite. Im Fall des „Precursor Ion Scan" scannt nur das Q1, Q2 fragmentiert, und Q3 filtert die Fragmente nach einer bestimmten Masse. Bei dieser Betriebsart werden also alle Moleküle erfasst, die dasselbe geladene Fragment bei der

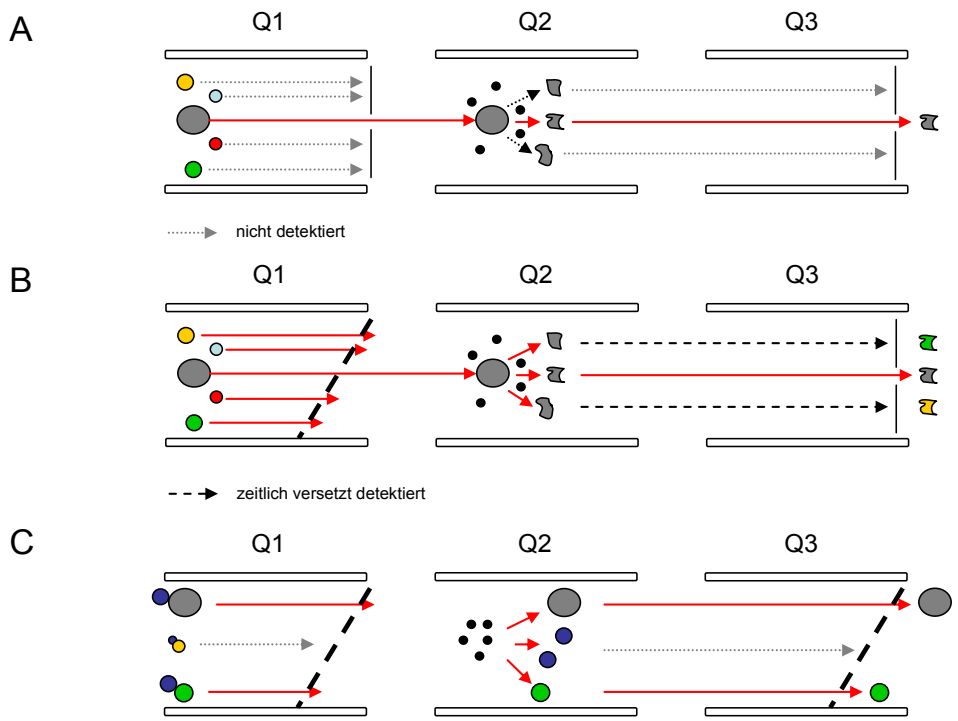


Abb. 7: MS-Scan-Modi: (A) Multiple Reaction Monitoring, (B) Precursor Ion Scan, (C) Neutral Loss Scan (nach Applied Biosystems).

Kollision im Q2 abgeben. Im Modus des „Neutral Loss Scan“ scannen Q1 und Q3 parallel mit einem Massenunterschied, der der Masse des neutralen Fragments entspricht, das in der Kollisionszelle abgespalten wurde. Dies führt dazu, dass nur diejenigen Metabolite quantifiziert werden, die dasselbe neutrale Fragment in der Kollisionszelle abspalten.

Die Messung der in dieser Arbeit verwendeten Datensätze wurde von der Firma *Biocrates Life Sciences GmbH*, Österreich, durchgeführt und basiert auf der oben beschriebenen Analysemethode. Eine detaillierte Darstellung dieser Technik befindet sich auch im Patent US 2007/0004044 (online verfügbar unter http://www.freepatentsonline.com/20070004044.html).

1.3.3 Metabolitenspektrum

Gemessen werden sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Acylcarnitine (C*x:y* mit der Kettenlänge *x* und *y* Doppelbindungen), Hydroxylacylcarnitine (C(OH)*x:y*), Dicarboxylacylcarnitine (C*x:y*-DC), freies Carnitin (C0), biogene Amine, Prostaglandine, reduzierende Mono-, Di- und Oligosaccharide (abgekürzt als H*n* für *n*-Hexose, dH für Desoxyhexose, UA für Uronsäure, HNAc für N-Acetylglucosamin), sowie Lipide. Diese Lipide unterteilen sich in verschiedene Ceramide (Cer) und Glucosyl-ceramide (GlcCer), verschiedene Sphingomyeline (SM*x:y*) und Sphingomyelin-Derivate, wie N- Hydroxyldicarboacyloylsphingosyl-Phosphocholin (SM(OH,COOH)*x:y*) und N-Hydroxylacyloylsphingosyl-Phosphocholin (SM(OH)*x:y*), sowie mehrere Klassen von Glycero-Phospholipiden. Die Grundform des Glycero-Phospholipids besteht aus einem mit zwei Fettsäuren verbundenen Glycerins, an dessen dritter Hydroxylgruppe ein Phosphat hängt, das wiederum mit einer Alkohol-Komponente verestert ist. Entsprechend der Alkohol-Komponente untergliedern sich die Glycero-Phospholipide in Glycero-Phosphatidylsäuren (PA), Glycero-Phosphatidylcholine (PC), Glycero-Phosphatidylethanolamine (PE), Glycero-Phosphatidylglycerole (PG), Glycero-Phosphatidylinositole (PI), Glycero-Phosphatidylinositol-bisphosphate (PIP2) und -triphosphate (PIP3) und Glycero-Phosphatidylserine (PS), die über mehrere metabolische Pfade miteinander verbunden sind. (Abb. 8) Die genannten Glycero-Phospholipide werden nochmals unterschieden, je nachdem ob die Fettsäurereste mit einer Ester (a) - oder einer Ether (e) - Bindung an den Glycerinrest gebunden sind. Zwei Buchstaben (*aa*, *ea* oder *ee*) bedeuten, dass an zwei Positionen des Glycerins Fettsäurereste hängen, während nur ein

Buchstabe (*a* oder *e*) für ein Lyso-Glycero-Phospholipid mit nur einem Fettsäurerest steht. Beispielsweise beschreibt die Abkürzung PC_ea_33:1 ein Glycero-Phosphatidylcholin mit 33 Kohlenstoffatomen in den beiden Fettsäureseitenketten und einer einzelnen Doppelbindung in einer der beiden Ketten.

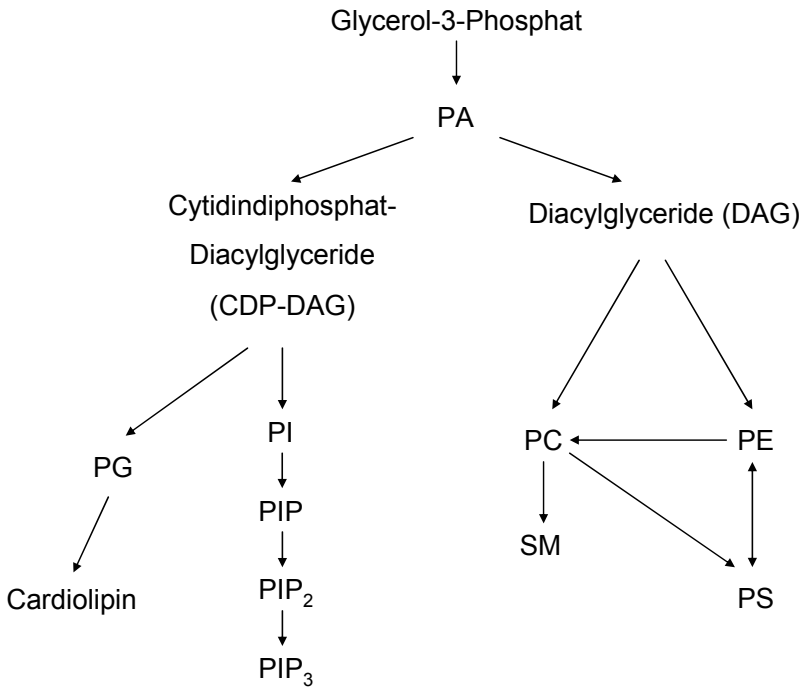


Abb. 8: Vereinfachte Darstellung der Glycero-Phospholipid-Biosynthese (verändert nach Roche Applied Science „Biochemical Pathways“ Karte (Michal 1999) und nach *Vance 2001*).

Die Stärke des hier vorgestellten Ansatzes „targeted Metabolomics“ liegt gegenüber der „non-targeted Metabolomics“ (nach Fiehn: „Metabolomics“) in der *quantitativen* Messung von Metaboliten gepaart mit einem Hochdurchsatzverfahren. Diese Quantifizierung der Metabolite ist zwar nur durch die Verwendung von internen Standards zu erreichen, die *a priori* bekannt und aufgereinigt sein müssen, wodurch die Anzahl der gemessenen Metabolite limitiert wird. Durch die Weiterentwicklung der Produktion interner Standards wird jedoch das Spektrum der quantifizierbaren Metabolite zukünftig immer mehr erweitert werden, so dass umfassende repräsentative Momentaufnahmen des Stoffwechselzustandes eines biologischen Systems möglich werden. Zudem existieren bei der Arbeit mit internen Standards nur sehr gering Grenzen in der Detektierbarkeit der bekannten Metabolite. Durch dieses Potenzial wird „targeted Metabolomics“ in Zukunft wachsende Bedeutung zukommen (Shulaev 2006).

Die Menge der Metabolitendaten, die durch diese Technik anfällt, verlangt nach bioinformatischen Analysemethoden, die in dieser Arbeit entwickelt werden sollten. Zugleich galt das Interesse der Erforschung der Möglichkeiten, die „targeted Metabolomics“ durch die Auswertung solcher Datensätze bieten kann. Als Modellorganismen wurden dazu Maus (Kapitel 2), Mensch (Kapitel 3) und Rind (Kapitel 4) verwendet.

2 Diabetes mellitus am Mausmodell

Stoffwechselkrankheiten wie der Typ II Diabetes mellitus zählen zu den bekanntesten Krankheiten, für die eine Analyse des gesamten metabolischen Profils zu einer bedeutenden Verbesserung des Verständnisses führen kann. Von konkretem Interesse ist dabei die Frage, welche Auswirkungen auf den Metabolismus Medikamente wie z.B. Insulin-Sensitizer nach sich ziehen. Ziel dieses Kapitels ist es, Biomarker für Diabetes zu finden sowie metabolische Pfade zu identifizieren, auf die sich der Insulin-Sensitizer Rosiglitazon auswirkt. Durch die Analyse einzelner Metabolite wird zunächst gezeigt, dass bereits bekannte metabolische Einflüsse von Diabetes und Rosiglitazon aufgrund der experimentellen Daten wieder entdeckt werden können. In einem zweiten Schritt werden als Grundlage der Berechnungen die Quotienten aller möglichen Metabolitenpaare verwendet, da sich diese oftmals als bessere Indikatoren für eine Krankheit erwiesen haben als die absoluten Einzelkonzentrationen (Schulze, Lindner et al. 2003). Als ein bekanntes Beispiel für die Verwendung von Quotientenbildung in der medizinischen Diagnose gilt der Quotient aus Phenylalanin und Tyrosin, der Phenylketonurie anzeigt (Chace, Sherwin et al. 1998). Abschließend wird ein allgemeinerer Ansatz vorgestellt, der es erlaubt, auf Basis der Quotientenbildung und daraus abgeleiteter statistischer Parameter das Verhalten ganzer Gruppen von Metaboliten unter Diabetes bzw. unter Medikation zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in der Fachzeitschrift *Endocrinology* (Altmaier, Ramsay et al. 2008) veröffentlicht.

2.1 Mäuse als Modellorganismen

In der folgenden Studie wird als Modellorganismus die Hausmaus (Mus musculus) verwendet. Zu den Gründen dafür zählt vor allem, dass die Maus eine sehr hohe physiologische Ähnlichkeit zum Menschen aufweist, welche sich auch im Genom widerspiegelt. So liegt der Anteil der Maus-Gene, die eine strikte 1:1 Orthologie im Menschen besitzen bei ca. 80% (Waterston, Lindblad-Toh et al. 2002). Zusätzlich gelang es, durch die vielfältigen Möglichkeiten der Manipulation des Genoms, eine große Auswahl an Modellen für menschliche Krankheiten zu erstellen (Bedell, Jenkins et al. 1997). Neben der erwähnten Ähnlichkeit zum Menschen, zählen auch die relativ kurze Generationszeit, hohe Wurfgrößen sowie die kostengünstige Haltung zu den Vorteilen der

Maus als Modellorganismus. Für einige komplexe menschliche Krankheiten, wie z.B. Aids, kann die Maus jedoch nicht als perfektes Modell dienen, so dass auf andere Modellorganismen, wie z.B. Ratte, Schwein und Affe, zurückgegriffen werden muss (Herman 2002).

2.2 Diabetes und Rosiglitazon

Als Diabetes mellitus bezeichnet man eine Gruppe von Regulationsstörungen des Stoffwechsels, die durch einen erhöhten Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie) charakterisiert werden. Der Name „Diabetes mellitus“ stammt von dem griechischen Wort *diabetes* (= fließen) und dem lateinischen *mellitus* (= honigsüß) ab und bedeutet demnach in etwa „honigsüßer Durchfluss“. Dieser erhöhte Blutzuckerspiegel wird entweder durch eine Insulinresistenz, einen Insulinmangel oder beides ausgelöst und führt bei einem chronisch überhöhten Wert unter anderem zu Folgeerkrankungen an Nieren, Augen und Nervensystem sowie an den peripheren Arterien, Herz und Gehirn. Es gibt zwei wesentliche Formen von Diabetes: Beim Typ 1 Diabetes werden die insulinproduzierenden β-Zellen der Langerhansschen Inseln in der Bauchspeicheldrüse teilweise zerstört, so dass nicht mehr genügend Insulin hergestellt werden kann, was wiederum zu einer stark verminderten Aufnahme von Glucose in die Zellen und zu Hyperglykämie führt. Als Ursache für diesen Diabetestyp wird in den meisten Fällen ein Autoimmunprozess vermutet, der sich gegen die körpereigenen β-Zellen richtet und teilweise durch die genetische Konstellation begünstigt wird (Atkinson and Eisenbarth 2001; Staeva-Vieira, Peakman et al. 2007). Die Häufigkeit und Inzidenz des Typ 1 Diabetes liegt in Deutschland weit unter der des Typ 2 Diabetes.

Beim Typ 2 Diabetes, auch Alterdiabetes genannt, bleiben dagegen die β-Zellen der Langerhansschen Inseln zunächst unbeschadet, und es kann somit ausreichend Insulin produziert werden. Es liegt vielmehr eine Resistenz der Körperzellen gegen das Hormon Insulin vor, d.h. die Zellen sprechen nur noch schlecht auf Insulin an, so dass die Aufnahme von Glucose in die Zellen vermindert wird. Anfangs kann diese Insulinresistenz noch durch eine erhöhte Produktion von Insulin kompensiert werden, was auch dazu führt, dass die Krankheit vorerst unentdeckt bleibt und meistens erst bei älteren Menschen sichtbar wird. In fortgeschrittenem Stadium können die β-Zellen der Langerhansschen Inseln diese hohe Produktionsleistung an Insulin jedoch nicht mehr aufrechterhalten, so

dass sich ein erhöhter Blutzuckerspiegel einstellt und in schwereren Fällen auch eine Insulinbehandlung nötig wird.

Als Ursachen für den Typ 2 Diabetes gelten neben einer genetischen Determinierung, deren Einzelheiten jedoch noch unbekannt sind, vor allem Übergewicht, Mangel an Bewegung und falsche Ernährung. Letztere scheinen auch die Ursache für eine vermehrte Diagnose von Typ 2 Diabetes bei Jugendlichen zu sein.

Die International Diabetes Federation (IDF) berichtet Ende 2006 von 246 Millionen Menschen weltweit, die von Diabetes betroffen sind. Betrachtet man nur die erwachsenen Diabetiker, so ergibt dies einen Anteil von 5,9% an der gesamten Weltbevölkerung. Die höchste Diabetesrate weisen die östlichen Mittelmeerländer, der Nahe Osten, der westliche Pazifikraum und Mexiko auf (Abb. 9). Außer in den Industrieländern in Nordamerika und Europa treten vor allem in Entwicklungs- und Schwellenländern wie Indien, Brasilien und Russland immer mehr Fälle von Diabetes auf (http://www.idf.org/home/index.cfm?unode=7F22F450-B1ED-43BB-A57C-B975D16A812D).

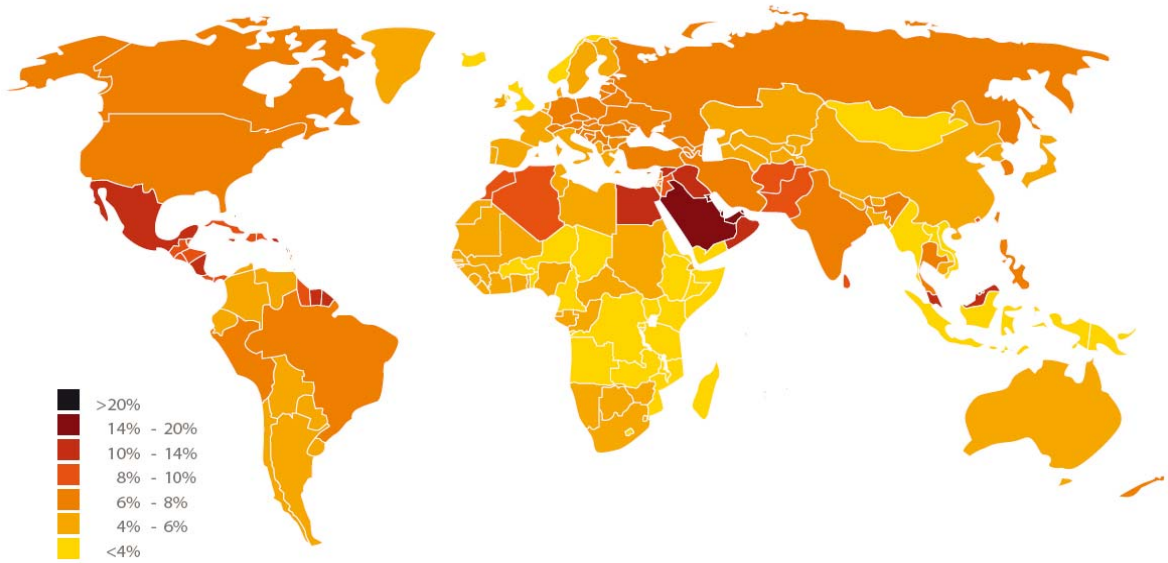


Abb. 9: Diabetes Atlas: geschätzte Verbreitung von Diabetes im Jahr 2007; © International Diabetes Federation.

In Deutschland sind laut dem Deutschen Diabetes-Zentrum im Jahr 2005 mehr als 5 Millionen Menschen von Diabetes betroffen gewesen, von denen über 90% zu den Typ-2-Diabetikern gehörten. Da man jedoch davon ausgeht, dass 40-50% aller Diabetiker unerkannt bleiben, müsste die tatsächliche Anzahl auf sieben bis acht Millionen erhöht werden. Dies bedeutet, dass 2005 in etwa 10 % der deutschen Bevölkerung an Diabetes

erkrankt war (http://www.diabetes.uniduesseldorf.de/wasistdiabetes/grundlagen/index.html ?TextID=1993).

Im Zusammenhang mit Diabetes wird auch häufig das „metabolische Syndrom“ erwähnt. In der Literatur wird dieser Begriff noch diskutiert und daher existieren mehrere, jedoch nur leicht voneinander abweichende Definitionen. Eine mögliche Definition fasst dieses Syndrom durch folgende Merkmale zusammen: Fettleibigkeit (Adipositas) und/oder Fettstoffwechselstörungen (Dyslipoproteinämie), Glukoseintoleranz, sowie Bluthochdruck (essentielle arterielle Hypertonie) (Koller 2003; Kerner, Brückel et al. 2004).

Der hier verwendete Datensatz diente dem Drug-Testing des Medikaments Rosiglitazon, das eine Möglichkeit bietet, Typ 2 Diabetes zu behandeln. Rosiglitazon ist ein Vertreter der Substanzklasse der Thiazolidinedione und wurde von GlaxoSmithKline unter dem Namen „Avandia“ auf den Markt gebracht. Thiazolidinedione wirkt, indem es den intrazellularen Rezeptor „Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor gamma“ (PPARγ) aktiviert. Dadurch wird zum einen das von Fettzellen (Adipozyten) gebildete Hormon Adiponektin exprimiert und somit dessen Konzentration im Blutplasma erhöht (Terauchi 2007). Ein erhöhter Adiponektinlevel wiederum verbessert die Insulinsensitivität der Zellen (Hernandez, Teruel et al. 2003), wohingegen niedrige Adiponektinwerte mit Fettsucht und gesteigertem Diabetesrisiko in Verbindung gebracht werden (Pajvani, Hawkins et al. 2004). Abgesehen von diesem Effekt auf die Insulinresistenz der Zellen (Hernandez, Teruel et al. 2003), induziert Rosiglitazon die Reifung von kleinen Präadipozyten zu Adipozyten (Okuno, Tamemoto et al. 1998), wodurch wiederum das Speicherpotenzial des Fettgewebes erhöht wird (de Souza, Eckhardt et al. 2001). Die Aktivierung von PPARγ durch Rosiglitazon hat demnach zur Folge, dass Fettsäuren von nicht-adipozytärem Gewebe ins Fettgewebe umverteilt werden (Okuno, Tamemoto et al. 1998).
Rosiglitazon stand in den letzten Jahren jedoch aufgrund seiner Nebenwirkungen vermehrt in der Kritik. 2005 wies das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte darauf hin, dass Studien ein gesteigertes Risiko für Knochenfrakturen bei Frauen ergaben (http://www.bfarm.de/cln_029/nn_421158/DE/Pharmakovigilanz/risikoinfo/2007/rosiglitazon-frakturen.html__nnn=true). Eine Metastudie über 42 Einzelstudien berichtet zusätzlich von einem um 43 % erhöhten Herzinfarktrisiko bei Einnahme von Rosiglitazon (Nissen and Wolski 2007).

2.3 Experimenteller Aufbau und Metabolitenspektrum

Der hier verwendete Datensatz stammt aus einer präklinischen Studie, die zum Ziel hatte, ein neues potentielles Diabetesmedikament an Mäusen zu testen und mit unbehandelten sowie mit mit Rosiglitazon behandelten Tieren als Referenzen zu vergleichen. In dieser Arbeit wurden aus Konfidenzgründen nur die Referenzgruppen zur Analyse herangezogen. Somit besteht der analysierte Datensatz aus folgenden vier verschiedenen Gruppen mit je zehn Mäusen pro Gruppe: unbehandelte Diabetesmutante (M-U), unbehandelter Wildtyp (W-U), mit Rosiglitazon behandelte Diabetesmutante (M-T), mit Rosiglitazon behandelter Wildtyp (W-T). Als Modellorganismus für Diabetes wurde die klassische männliche homozygote db-/db- Maus des Stammes C57BL/6 verwendet (Hummel, Dickie et al. 1966). Diese Mausmutante besitzt eine Punktmutation im Leptinrezeptor, was zur Folge hat, dass die Signalwirkung des Hormons Leptin im Hypothalamus ausbleibt. Dies führt letztendlich zu anhaltender, ungewöhnlich gesteigerter Nahrungsaufnahme, Fettleibigkeit mit hohem Insulinlevel und somit zu Diabetes (Koranyi, James et al. 1990). Die Wildtyp-Gruppen bestanden aus männlichen heterozygoten db-/db+ Mäusen. Allen Tieren wurde die ganze Studie hindurch Nahrung und Wasser *ad libitum* angeboten, so dass die db-/db-Mutanten den beschriebenen Diabetes-Phänotyp entwickeln konnten (Sharma, McCue et al. 2003), der auch durch ein verdoppeltes Körpergewicht und eine doppelte Glukosekonzentration im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen bestätigt wird. Die Verabreichung des Medikaments Rosiglitazon erfolgte ab einem Alter von zehn Wochen über einen Zeitraum von zehn Tagen und in für Tierversuche üblichen Dosen (wie z.B. in *Chaput, Saladin et al. 2000* beschrieben).

Insgesamt wurden durch die Firma *Biocrates Life Sciences GmbH*, Österreich, 802 Metabolite gemessen: 18 Aminosäuren, 50 reduzierende Mono-, Di- und Oligosaccharide, 16 Acylcarnitine (C*x*:*y*), fünf Hydroxylacylcarnitine (C(OH)*x*:*y*), fünf Dicarboxylacyl-carnitine (C*x*:*y*-DC), freies Carnitin (C0) und 707 Lipide. Diese Lipide unterteilen sich in 82 verschiedene Ceramide (Cer) und Glucosylceramide (GlcCer), 110 verschiedene Sphingomyeline (SM*x*:*y*) und Sphingomyelin-Derivate, wie N-Hydroxyldicarbo-acyloylsphingosyl-Phosphocholin (SM(OH,COOH)*x*:*y*) und N-Hydroxyl-acyloylsphingosyl-Phosphocholin (SM(OH)*x*:*y*), 95 Glycero-Phosphatidylsäuren (PA), 85 Glycero-Phosphatidylcholine (PC), 103 Glycero-Phosphatidylethanolamine (PE), elf Glycero-Phosphatidylglycerole (PG), 177 Glycero-Phosphatidylinositole (PI), Glycero-

Phosphatidylinositol-bisphosphate (PIP2) und -triphosphate (PIP3) und 44 Glycero-Phosphatidylserine (PS).

2.4 Bioinformatische Datenanalyse

Die Grundidee des bioinformatischen Ansatzes liegt in der Verwendung von Quotienten als Basis der weiteren Analyse. So werden zuerst für alle möglichen Paare von Metaboliten die Quotienten ihrer Konzentrationen berechnet. Da auch die Konzentration von einzelnen Metaboliten bei der anschließenden Analyse berücksichtigt werden soll, wird der virtuelle Metabolit „1“ mit dem Wert „1“ für alle Beobachtungen der Metabolitenliste hinzugefügt. Auf den so erstellte Datensatz, der nunmehr 802^2 Metaboliten-Quotienten umfasst, wird eine zweifaktorielle ANOVA angewandt mit den Faktoren „Diabetes-Status“ (Diabetesmutante/Wildtyp; M/W) und „Medikation“ (unbehandelt/behandelt mit Rosiglitazon; U/T). Da die alleinige Verwendung des p-Wertes zusätzliche Berechnungen für das multiple Testen erforderlich machen würde, wird hier das partielle η^2 als primärer Deskriptor zur Identifizierung interessanter Metabolite herangezogen. η^2 ist ein guter Schätzer dafür, wie hoch der Anteil der in den Daten beobachteten Varianz ist, der tatsächlich durch den jeweiligen Faktor erklärt werden kann.
Um Metaboliten-Quotienten ausfindig zu machen, die mehr Information enthalten als ein einzelner Metabolit, wird für jeden Metaboliten-Quotienten die Zunahme von η^2 (“η^2-gain”) wie folgt berechnet:

$$\eta^2 - gain\left(\frac{M_1}{M_2}\right) = \min\left(\frac{\eta^2\left(\frac{M_1}{M_2}\right)}{\eta^2\left(\frac{M_1}{1}\right)}, \frac{\eta^2\left(\frac{M_1}{M_2}\right)}{\eta^2\left(\frac{1}{M_2}\right)}\right)$$

wobei M_1 und M_2 für jedes mögliche Paar von Metaboliten steht. η^2-gain Werte mit einem Wert weit über Eins weisen auf solche Metabolitenpaare hin, die möglicherweise durch nur wenige Reaktionsschritte im Stoffwechsel eng miteinander verbunden sind. Ein hoher η^2-Wert zusammen mit einem hohen η^2-gain lassen demnach auf eine gesteigerte Bedeutung dieser Reaktionsfolgen für den betrachteten Faktor schließen.

Es sollen jedoch nicht nur einzelne von den Faktoren „Diabetes-Status“ und „Medikation“ betroffene Metabolite gefunden werden, sondern es werden zusätzlich ganze Gruppen von Metaboliten mit gleichem Verhalten gesucht, die wiederum in Korrelation zu einer oder mehreren anderen Gruppen stehen. Hierfür wird eine Matrix von η^2-Werten generiert, deren Zeilen mit den Metaboliten an der Zählerposition der Quotienten gekennzeichnet sind und deren Spalten die Metabolitennamen der Nennerposition der Quotienten tragen. Die Matrixeinträge enthalten für den jeweils betrachteten Faktor die η^2-Werte für jedes Metabolitenpaar. Demnach gibt es für jeden Faktor sowie für jede im Regressionsmodell von ANOVA mögliche Interaktion eine Matrix. Im Rahmen dieser Arbeit sollen jedoch nur die Matrizen für die Faktoren „Diabetes-Status“ und „Medikation“ betrachtet werden.

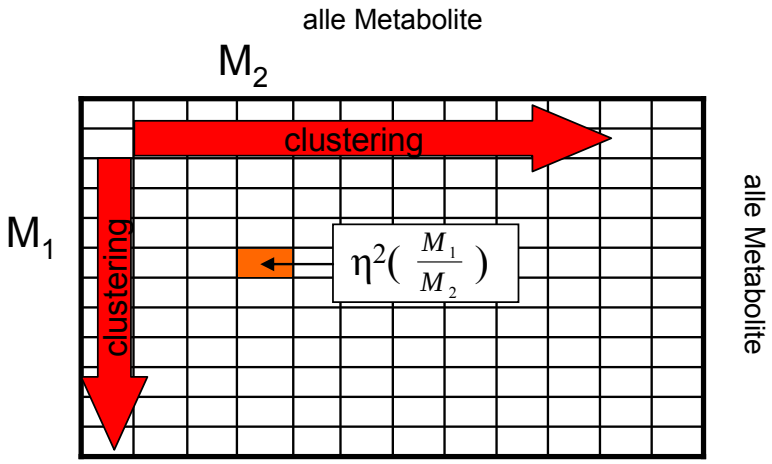


Abb. 10: Schematische Darstellung des 2D-Clusterings für η^2-Matrizen.

Auf jede dieser Matrizen wird anschließend ein zweidimensionales hierarchisches „average linkage“ Clustering mit der euklidischen Distanz als Distanzmaß angewandt (Abb. 10). Das hierarchische Clustering stellt nur eine von mehreren Möglichkeiten dar und kann in Zukunft durch ausgefeiltere Clusteringmethoden ersetzt werden. Ein Cluster wird hier dadurch definiert, dass alle in ihm enthaltenen Metabolitenpaare einen η^2-Wert höher als 0,3 besitzen müssen, d.h., dass der jeweilige Faktor mindestens 30% der Varianz in den Quotienten erklärt. Jeder Cluster definiert dann zwei Gruppen, deren Metabolite sich innerhalb jeder Gruppe ähnlich verhalten, und für die darüber hinaus die Vermutung besteht, mit der jeweils anderen Gruppe über kurze metabolische Pfade eng verbunden zu sein.

2.5 Ergebnisse

In diesem Abschnitt sollen zunächst einzelne Metabolite analysiert und das Ergebnis mit bereits bekannten metabolischen Eigenschaften von Diabetes und Rosiglitazon verglichen werden. Darauf folgt die Analyse aller Metaboliten-Quotienten, die neben bekannten Phänomenen auch neue Beobachtungen liefert, besonders hinsichtlich von Metaboliten, die durch kurze metabolische Pfade verbunden sind. Abschließend sollen durch das Clustering der η^2-Matrizen, definiert durch alle möglichen Paare von Metaboliten, bekannte wie neue Gruppen von Metaboliten mit ähnlichem Profil in Bezug auf Krankheit und Medikation gefunden werden.

2.5.1 Analyse einzelner Metabolite mit Fokus auf den Diabetes-Phänotyp

Die Analyse einzelner Metabolite zeigt Störungen in der Plasmakonzentration von Aminosäuren, Acylcarnitinen und Saccharidien an, die mit dem Phänotyp von Diabetes übereinstimmen. Die Ergebnisse in nachstehender Tabelle aufgeführt:

Metabolite	Abkürzung	η^2 (M/W)	η^2 (U/T)	η^2 (M/W*U/T)
Hexose	H1	0,644	0,012	0,050
Glycin	Gly	0,625	0,036	0,033
Serin	Ser	0,214	0,045	0,023
Alanin	Ala	0,187	0,220	0,077
Leucin/ Isoleucin	Leu/Ile	0,626	0,164	0,001
Valin	Val	0,607	0,106	0,005
Phenylalanin	Phe	0,735	0,084	0,001
Ornithin	Orn	0,518	0,001	0,062
Arginin	Arg	0,341	0,390	0,006
Methylmalonylcarnitin	C3-DC-M	0,693	0,032	0,102
Hydroxylpropionylcarnitin	C3(OH)	0,540	0,011	<0,001
Pimeloylcarnitin	C7-DC	0,654	0,004	0,050
Butenoylcarnitin	C4:1	0,558	0,003	0,037

Tab. 1: Partielle η^2-Werte für die zwei Faktoren " Diabetes-Status" (Mutante oder Wildtyp; M/W) und "Medikation" (unbehandelt oder behandelt mit Rosiglitazon; U/T) und für die Interaktion beider Faktoren (M/W * U/T). Aufgeführt werden ausgewählte Metabolite, die einen starken Unterschied in den Plasmakonzentrationen zwischen Wildtyp- und diabetischen Mäusen zeigen.

Entsprechend dem Hauptmerkmal von Diabetes zeigen die diabetischen Mäuse eine stark erhöhte Konzentration von Glukose im Plasma. Zusätzlich sind die Konzentrationen der

glukogenen Aminosäuren Glycin, Serin und Alanin verglichen mit den Wildtyp-Mäusen vermindert. Der erhöhte Glukosespiegel lässt sich zum einen dadurch erklären, dass durch die Insulinresistenz weniger Glukose aus dem Blut in die Zellen gelangen kann und schon allein dadurch die Konzentration von Glukose im Blutplasma steigt. Zum anderen bewirkt der Glukosemangel in den Zellen eine gesteigerte Aktivität der Glukoneogenese (Magnusson, Rothman et al. 1992). Diese produziert Glukose, indem sie Alanin zu den Intermediaten Pyruvat und 3-Phosphoglycerat, sowie Serin und Glycin zu 3-Phosphoglycerat, einer Vorstufe von Glukose, abbaut (Abb. 11).

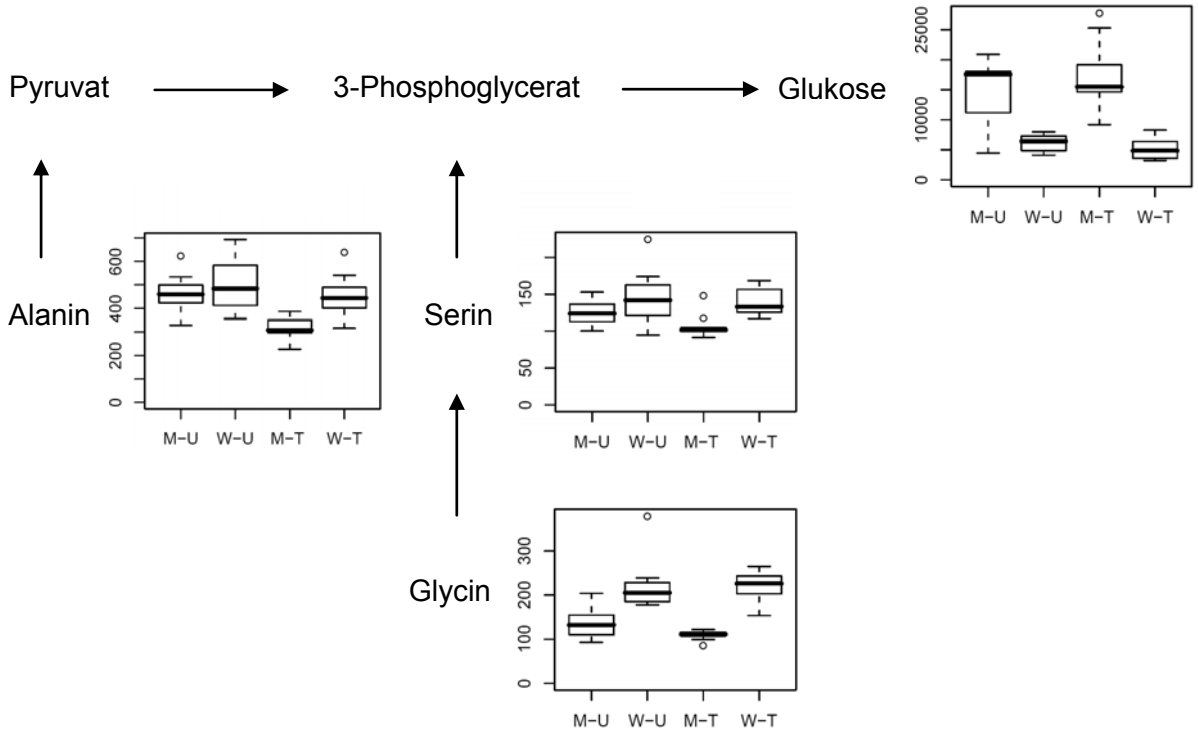


Abb. 11: Glukoneogenese: Boxplots der Plasmakonzentrationen [µM] der Glukose und der glykogenischen Aminosäuren Glycin, Serin und Alanin in Diabetesmutanten (M) und Wildtyp-Mäusen (W), unbehandelt (U) und behandelt mit Rosiglitazon (T).

Die Plasmakonzentration der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA) Leucin/Isoleucin und Valin dagegen ist, wie auch aus der Literatur bekannt (Borghi, Lugari et al. 1985; Glanville and Anderson 1985), in den Diabetesmutanten erhöht (Abb. 12). Die BCAA sind essentielle Aminosäuren, die speziell für den Aufbau der Muskelproteine benötigt werden und in Säugetieren ca. 35% der für Muskelproteine notwendigen Aminosäuren stellen (Harper, Miller et al. 1984). Sie regen die Bildung von Muskelproteinen an und inhibieren den Abbau dieser Proteine. Bei anderen Aminosäuren konnte dagegen diese Wirkung nicht beobachtet werden (Adibi 1980). Es wird vermutet, dass der Grund für die erhöhte

Plasmakonzentration der verzweigtkettigen Aminosäuren im Zusammenhang mit einer durch Diabetes induzierten Störung des für den Muskelaufbau spezifischen Stoffwechsels steht.

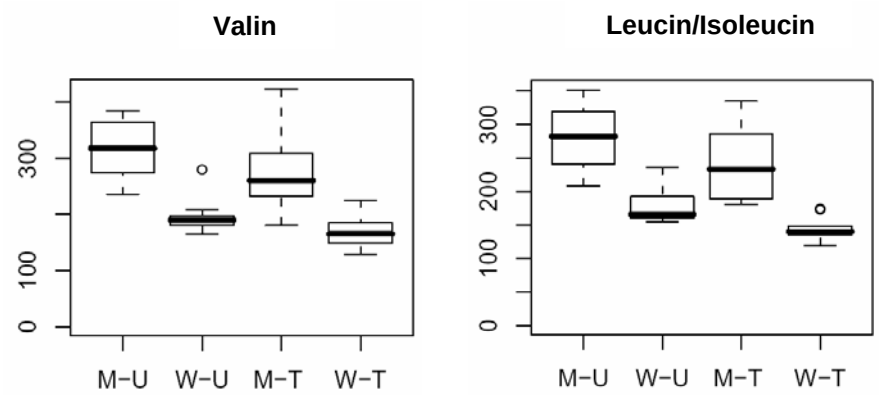


Abb. 12: Boxplots der Plasmakonzentrationen [µM] der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Leucin/Isoleucin.

Weiter ergab die Analyse der Aminosäuren, dass der Plasmawert von Arginin bei den diabetischen Mäusen vermindert ist, was bereits sowohl von Experimenten mit diabetischen Ratten (Mans, DeJoseph et al. 1987) als auch von Studien an Menschen mit Diabetes (Grill, Bjorkman et al. 1992) bekannt ist. Ornithin dagegen weist bei den Diabetes-Mutanten eine erhöhte Plasmakonzentration auf. Diese Beobachtungen lassen eine gesteigerte Aktivität der Arginase (EC 3.5.3.1) vermuten (Kashyap, Lara et al. 2008), die im Harnstoffzyklus die Reaktion von Arginin zu Ornithin katalysiert. Eine alternative Erklärung, nämlich ein verstärkter Abbau von Arginin zu Citrullin durch die NO-Synthase (EC 1.14.13.39) kann ausgeschlossen werden, da sich für Citrullin keinerlei Unterschied zwischen den vier verschiedenen Mausgruppen zeigt. Der bereits an diabetischen Ratten beobachtete Effekt einer reduzierten Aktivität der Ornithin-Decarboxylase (EC 4.1.1.17), die den Abbau von Ornithin zu Putrescin katalysiert (Conover, Rozovski et al. 1980), kann dagegen zusätzlich die erhöhte Konzentration an Ornithin erklären. (Abb. 13)

Für Phenylalanin ergab die Analyse einen erhöhten Plasmaspiegel bei den diabetischen Mäusen. Dies liegt darin begründet, dass Diabetes mit oxidativem Stress einhergeht (Kaneto, Matsuoka et al. 2005), was wiederum dazu führt, dass die Verfügbarkeit von Tetrahydrobiopterin (BH_4) sinkt (Ihlemann, Rask-Madsen et al. 2003). BH_4 jedoch dient der Phenylalanin-Hydroxylase (EC 1.14.16.1), die Phenylalanin in Tyrosin umwandelt, als Cofaktor (Miranda, Kolberg et al. 2005), so dass ein Mangel an BH_4 eine verminderte

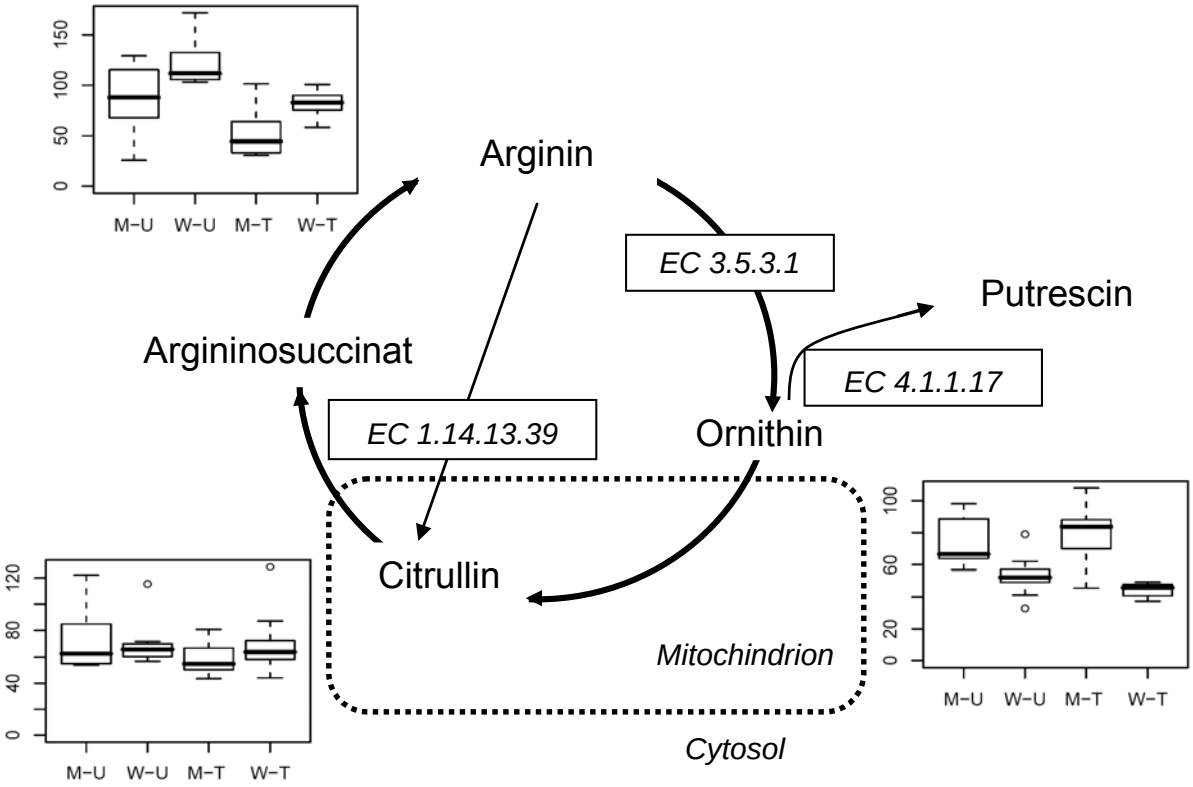


Abb. 13: Der Ureazyklus: Plasmakonzentrationen [µM] des Arginin und Citrullin und der nicht-proteinogenen Aminosäure Ornithin.

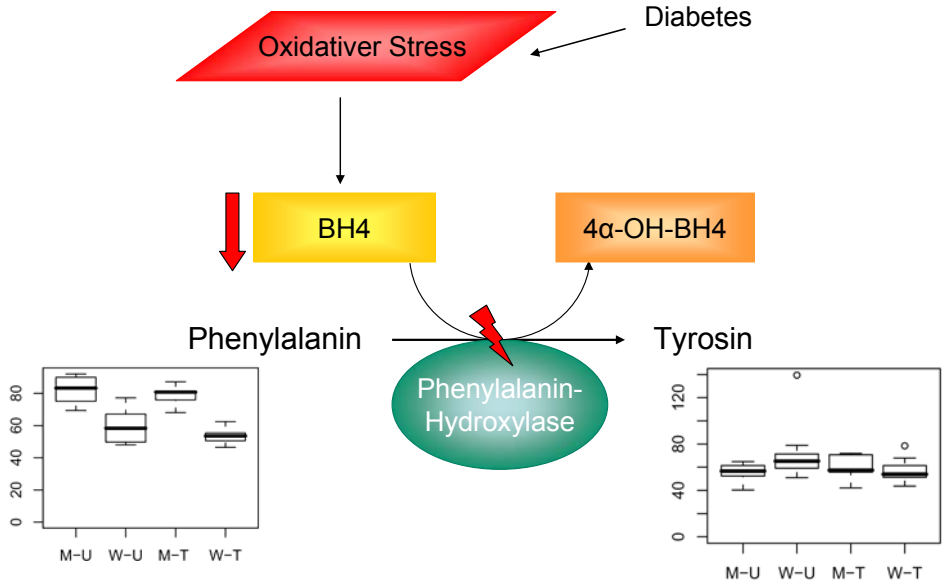


Abb. 14: Durch Diabetes bedingte eingeschränkte Funktionsfähigkeit der Phenylalanin-Hydroxylase: Plasmakonzentrationen [µM] des Phenylalanin und Tyrosin; BH4: Tetrahydro-biopterin, 4α-OH-BH4: 4α-Hydroxy-Tetrahydrobiopterin.

Aktivität des Enzyms und somit einen Anstieg an Phenylalanin bewirkt (Abb. 14). Zwar zeigt Tyrosin nur sehr geringe Differenzen zwischen den diabetischen und den Wildtyp-Gruppen, Phenylalanin und Tyrosin zusammen betrachtet (beispielsweise als Quotient) könnten jedoch als Biomarker für oxidativen Stress in Betracht gezogen werden.

Wie die Analyse zeigt, hat Diabetes nicht nur Auswirkungen auf den Metabolismus der Aminosäuren, sondern auch auf den der Acylcarnitine. So weist beispielsweise Methylmalonylcarnitin (C3-DC-M) eine erhöhte Konzentration in den diabetischen Gruppen auf (Abb. 15). Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine diabetesbedingte Ketose sein. Diabetes zieht neben der bereits erwähnten Hyperglykämie und der Glukoneogenese auch eine gesteigerte Lipolysis mit sich. Die Oxidation der so freigesetzten freien Fettsäuren wiederum fördert einerseits die Glukoneogenese und generiert andererseits die Ketonkörper Acetoacetat und β-Hydroxybutyrat (Wolfsdorf, Glaser et al. 2006). C3-DC-M kann in Acetoacetat umgewandelt werden (Zhang and Reynolds 2001) und dürfte daher als Indikator für Ketose gelten. Studien neueren Datums zeigen, dass sich, anders als bisher angenommen, das Auftreten von Ketose nicht nur auf

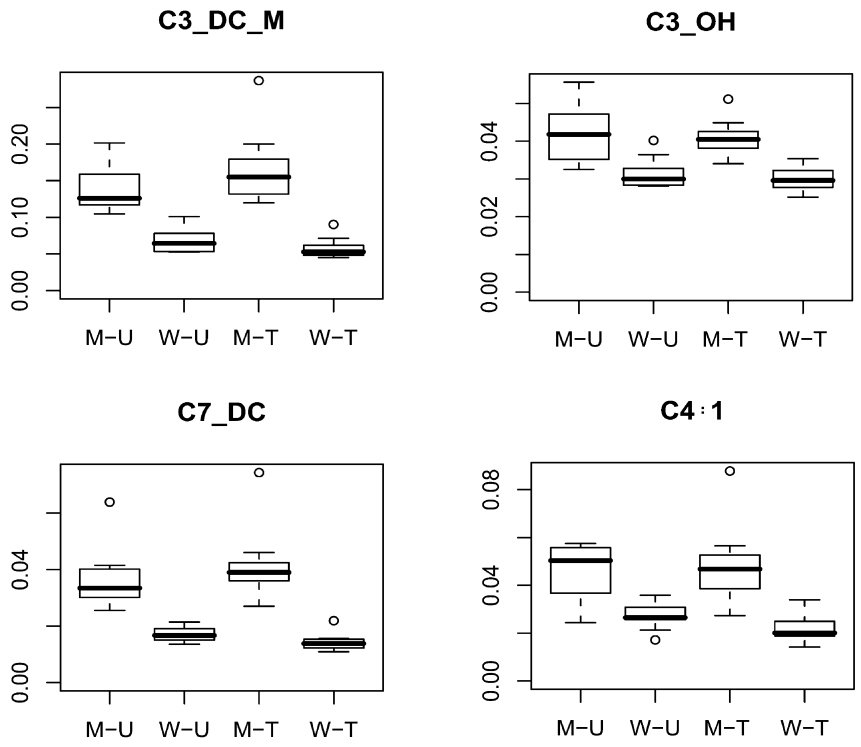


Abb. 15: Plasmakonzentrationen [µM] des Methylmalonylcarnitin (C3-DC-M), Hydroxylpropionylcarnitin (C3(OH)), Pimeloylcarnitin (C7-DC) und Butenoylcarnitin (C4:1).

Patienten mit Typ1-Diabetes beschränkt, sondern auch bei Typ2-Diabetikern anzutreffen ist (Newton and Raskin 2004).

Neben C3-DC-M sind auch die Plasmakonzentrationen für drei weitere kurzkettige Acylcarnitine, nämlich Hydroxylpropionylcarnitine (C3(OH)), Pimeloylcarnitine (C7-DC) und Butenoylcarnitine (C4:1), in den diabetischen Gruppen erhöht. Eine plausible Erklärung für diese Beobachtung konnte bisher nicht gefunden werden (Abb. 15), so dass noch weitere Nachforschungen nötig werden.

2.5.2 Analyse einzelner Metabolite mit Fokus auf die Medikation mit Rosiglitazon

Rosiglitazon beeinflusst den Lipidmetabolismus, indem es den Transkriptionsfaktor PPARγ aktiviert, was wiederum die Reifung von Präadipozyten zu Adipozyten bewirkt. Somit entsteht letztendlich ein höheres Speicherpotenzial des Fettgewebes, und dadurch die Voraussetzung für eine Umverteilung von Fettsäuren aus nicht-adipozytärem Gewebe ins Fettgewebe.

Metabolite	Abkürzung	η^2 (M/W)	η^2 (U/T)	η^2 (M/W*U/T)
Octadecenylcarnitin	C18:1	0,041	0,548	0,002
Stearoylcarnitin	C18:0	0,047	0,511	0,047
Octadecadienylcarnitin	C18:2	0,003	0,475	<0,001
Palmitoylcarnitin	C16:0	0,017	0,461	0,013
Myristoylcarnitin	C14:0	0,010	0,447	0,008
Tetradecenylcarnitin	C14:1	0,298	0,315	0,039
Hexadecenylcarnitin	C16:1	0,172	0,292	0,018
Diacylphosphatidylinositoltriphosphat	PIP3_aa_C42:3	0,179	0,439	0,129
Diacylphosphatidylinositolbisphosphat	PIP2_aa_C36:0	0,068	0,338	0,078
Dialkylphosphatidylcholin	PC_ee_C42:6	0,093	0,381	0,089
Diacylphosphatidylcholin	PC_aa_C40:5	0,164	0,352	0,122
Diacylphosphatidylcholin	PC_aa_C40:6	0,070	0,350	0,060
Dialkylphosphatidylcholin	PC_ee_C42:5	0,176	0,334	0,117

Tab. 2: Wie Tab. 1; aufgeführt werden ausgewählte Metabolite, die einen starken Unterschied in den Plasmakonzentrationen zwischen unbehandelten und mit Rosiglitazon behandelten Mäusen zeigen.

Die Analyse der einzelnen Metabolite mit Blick auf die Medikation zeigt (Tab. 2), dass Rosiglitazon sowohl bei diabetischen wie auch bei gesunden Mäusen die

Plasmakonzentration von verschiedenen langkettigen Acylcarnitinen reduziert. Im Detail sind dies Myristoyl- (C14), Palmitoyl- (C16) und Stearoylcarnitin (C18) mit gesättigten Seitenketten sowie Hexadecenyl- (C16:1), Octadecenyl- (C18:1) und Octadecadienylcarnitin (C18:2) mit ungesättigten Seitenketten (Abb. 16).

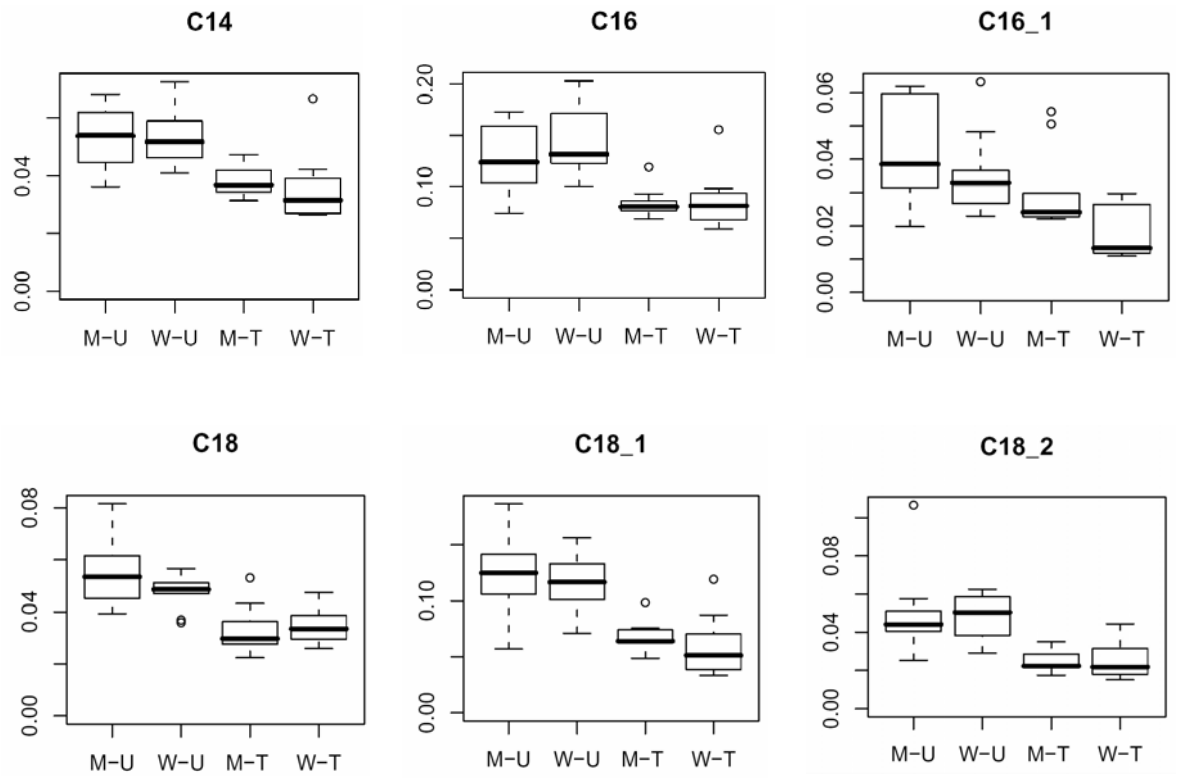


Abb. 16: Plasmakonzentrationen [µM] langkettiger Acylcarnitine.

Langkettige Acylcarnitine entstehen beim Transport von langkettigen freien Fettsäuren ins Mitochondrium, wo sie zur Energiegewinnung in die β-Oxidation eintreten und abgebaut werden (Abb. 17). Dieser Transportprozess beginnt mit der Aktivierung der freien Fettsäuren durch Anhängen des Coenzyms A (CoA), so dass das nun entstandene Acyl-CoA die äußere Mitochondrienmembran passieren kann. Um auch die innere Mitochondrienmembran passieren zu können, wird CoA, katalysiert durch die Carnitine-Palmitoyltransferase I (EC 2.3.1.21, CPT I), durch freies Carnitin (C0) ersetzt (Bremer 1983; Bieber 1988). Die beobachtete verminderte Konzentration langkettiger Acylcarnitine stimmt also mit dem erwarteten Effekt von Rosiglitazon, nämlich der Reduzierung der Konzentration freier Fettsäuren in Diabetespatienten (Raskin, Rappaport et al. 2000), überein. Eine alternative oder auch zusätzliche Erklärung wird durch eine erhöhte Konzentration von freiem Carnitin in der Leber der behandelten Mäuse gestützt.

Dieser Anstieg an freiem Carnitin könnte auf eine hemmende Wirkung von Rosiglitazon auf die Carnitine-Palmitoyltransferase I hinweisen und auch den damit verbundenen Mangel an langkettigem Acylcarnitin erklären.

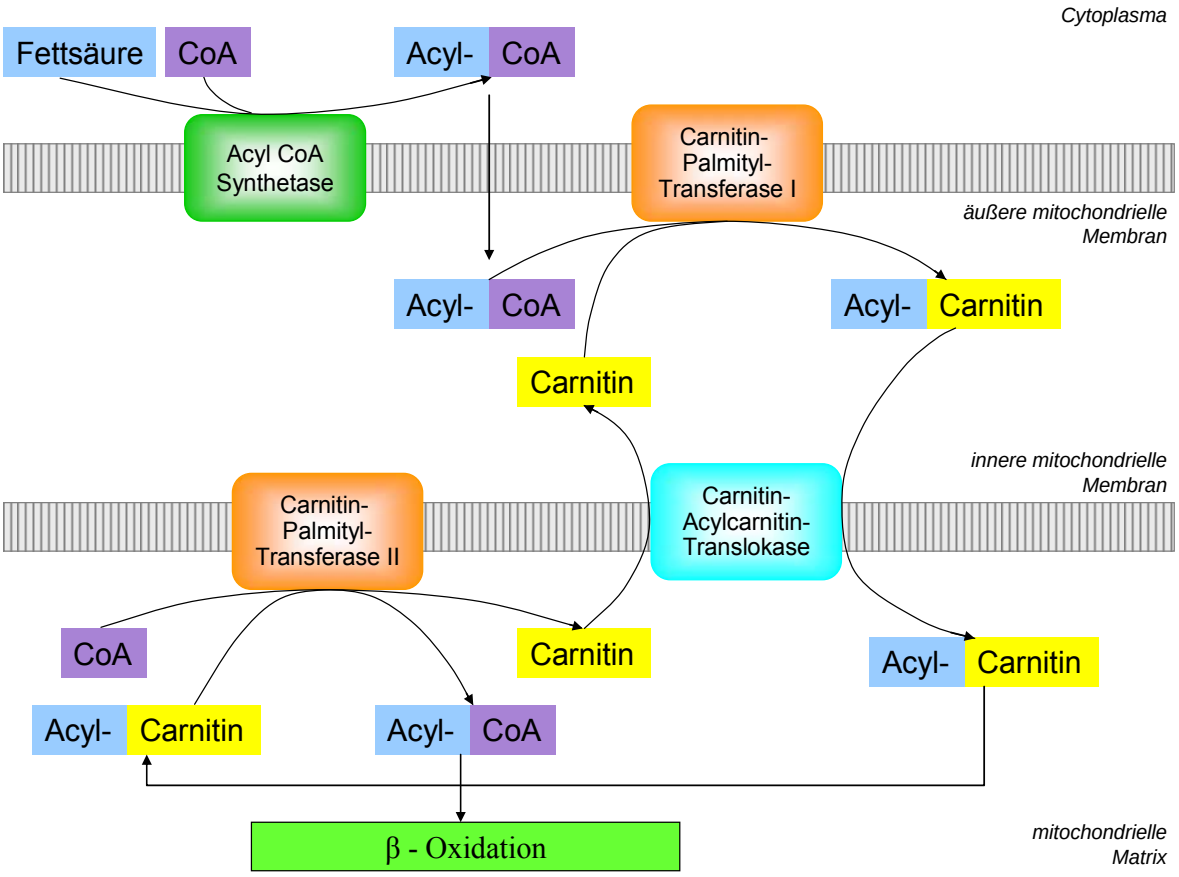


Abb. 17: Schematische Darstellung des Transports von langkettigen Fettsäuren ins Mitochondrium (verändert nach *Brookes*).

Die weitere Analyse der mit Rosiglitazon behandelten Mäusegruppen ergab einen verminderten Plasmawert für Glycero-Phosphatidylcholine (PC) und einen erhöhten Wert für Glycero-Phosphatidylinositole (PI), Glycero-Phosphatidylinositolbi- (PIP2) und triphosphate (PIP3). Diese Beobachtungen können im Kontext der oben beschriebenen Wirkung von Rosiglitazon auf den Lipidstoffwechsel interpretiert werden. PI, PIP2 und PIP3 spielen zusätzlich eine wichtige Rolle als sekundäre Botenstoffe wie zum Beispiel bei der durch Rosiglitazon ausgelösten Sensibilisierung der Zelle für die Aufnahme von Glukose (Rieusset, Auwerx et al. 1999; Bevan 2001; Iwata, Haruta et al. 2001).

Zusätzlich zur Analyse der einzelnen Faktoren „Diabetes-Status“ und „Medikation“ ermöglicht es die Verwendung einer ANOVA Metabolite zu finden, die durch eine Wechselwirkung beider Faktoren beeinflusst werden (Tab. 3). Ein interessantes Beispiel stellt Methylglutarylcarnitine (C5-M-DC), dessen Plasmakonzentration in diabetischen Mäusen durch eine Behandlung mit Rosiglitazon ansteigt, wohingegen die Plasmawerte gesunder Tiere bei gleicher Medikation sinken (Abb. 18).

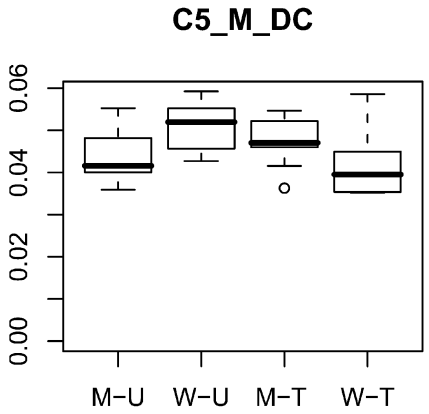


Abb. 18: Plasmakonzentrationen [µM] des Methylglutarylcarnitin (C5-M-DC).

Metabolite	Abkürzung	η^2 (M/W)	η^2 (U/T)	η^2 (M/W*U/T)
Diacylphosphatidylinositol-bisphosphat	PIP2_aa_C24:1	0,063	0,005	0,274
Alkylacylphosphatidylcholin	PC_ea_C20:4	<0.001	0,073	0,259
Methylglutarylcarnitin	C5_M_DC	0,004	0,068	0,232

Tab. 3: Wie Tab. 1; aufgeführt werden ausgewählte Metabolite, die eine starke Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren, jedoch nur einen geringen Einfluss eines einzelnen Faktors zeigen.

Solche Wechselwirkungen sind vor allem für klinische Tests neuer Medikament von Interesse. Zum einen können sie schon frühzeitig auf eventuelle Nebeneffekte eines Medikaments hinweisen, die anderenfalls erst in der zweiten Phase klinischer Tests aufgedeckt würden. Umgekehrt würde ein Test, der in der ersten Phase leichte Nebenwirkungen bei gesunden Versuchspersonen zeigt, abgebrochen werden, obwohl solche Nebenwirkungen bei kranken Personen vielleicht nicht auftreten würde. Letzteres bliebe jedoch ungetestet, wenn das Wissen allein auf den Ergebnissen der Phase I basierte.

2.5.3 Identifizierung möglicher neuer Biomarker durch Quotientenbildung

Nun sollen nicht mehr nur einzelne Metabolite betrachtet werden, sondern auch in welchem Bezug sie zueinander stehen. Dazu wird für alle möglichen Paare von Metaboliten der Quotient ihrer Konzentrationen berechnet und als Grundlage für die Varianzanalyse (ANOVA) verwendet (Tab. 4).

Metabolite im Zähler	Metabolite im Nenner	η^2 M/W	η^2 U/T	η^2 M/W * U/T	η^2 gain M/W	η^2 gain U/T	η^2 gain M/W * U/T
SM_(OH)_28:0	SM_(OH)_26:0	0,791	0,176	0,007	3,8	75,6	0,1
SM_(OH)_28:1	SM_(OH)_26:0	0,729	0,072	0,067	4,5	13,3	0,5
SM_C26:4	SM_(OH)_28:0	0,736	0,481	0,296	6,2	7,4	3,2
PC_ea_C38:8	PC_e_C32:1	0,736	0,220	0,072	2,6	0,9	0,9
PC_aa_C36:1	PC_e_C32:1	0,733	0,189	0,052	2,7	0,9	0,8
PC_ee_C38:1	PC_e_C32:1	0,727	0,153	0,031	2,9	0,8	0,6
PC_ee_C38:2	PC_e_C32:1	0,722	0,276	0,121	2,8	1,1	1,4
PC_aa_C36:2	PC_e_C32:1	0,722	0,263	0,114	2,7	1,1	1,3
PC_ee_C40:3	PC_e_C32:1	0,706	0,238	0,102	2,4	1,1	1,0
PC_a_C18:2	PC_a_C22:6	0,706	0,544	0,352	8,5	8,8	41,1
PC_a_C22:6	PC_a_C18:2	0,703	0,410	0,026	49,5	11,6	2,7
PA_a_C26:6	SM_C22:3	0,698	0,611	0,789	10,4	18,9	10,5
UA_HNS_UA_HNAc_UA	PS_aa_C38:1	0,736	0,178	0,192	4,1	6,7	4,7

Tab. 4: Ausgewählte Paare von Metaboliten, die eine starke Zunahme im partiellen η^2-Wert für *M/W* zeigen, falls die Quotienten der Konzentrationen betrachtet werden. Die Variabilität der Konzentration jedes dieser Komponenten kann nicht durch den betreffenden Faktor allein, jedoch durch ihre Quotienten erklärt werden.

Die Vorteile der Quotientenbildung werden nun am Beispiel der Sphingomyeline SM(OH)28:0 und SM(OH)26:0 demonstriert (Abb. 19). Betrachtet man die beiden Metabolite getrennt, so verdeckt die große Varianz *innerhalb* der Gruppen jeden möglichen Unterschied *zwischen* den Gruppen, wohingegen die Verwendung des Quotienten eine Reduzierung der Varianz sowie deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen zeigt. Diese Konstellation könnte man idealisierter Weise auch durch eine Gleichgewichtsnäherung (steady-state approximation) folgendermaßen beschreiben: Zeigt ein Paar von Metaboliten bei der Quotientenbildung eine gering Varianz innerhalb der Gruppen, aber eine große Variation zwischen den Gruppen, so wird das Gleichgewicht

zwischen den beiden Metaboliten durch den jeweils entsprechenden Faktor („Diabetes-Status“ oder „Medikation“) bestimmt.

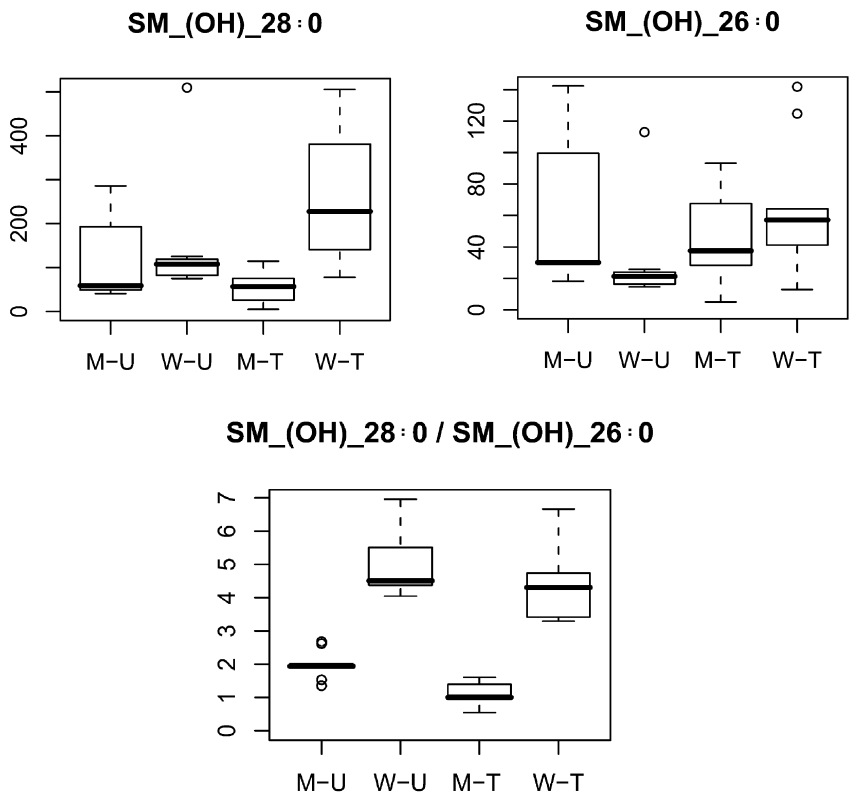


Abb. 19: Plasmakonzentrationen [µM] von N-hydroxyacyloylsphingosyl-phosphocholin (SM(OH)28:1) und (SM(OH)26:0) – obere Reihe – und der Quotient beider Konzentrationen – untere Reihe.

Im gewählten Beispiel variieren die Plasmakonzentrationen der einzelnen Metaboliten SM(OH)28:0 und SM(OH)26:0 in der Gruppe der unbehandelten diabetischen Mäuse sehr stark. Der Quotient SM(OH)28:0/SM(OH)26:0 dagegen zeigt nur eine sehr geringe Varianz innerhalb aller vier Gruppen, wobei dieser Effekt für die Gruppe der – bereits erwähnten – unbehandelten diabetischen Mäuse eine besonders starke Wirkung aufweist. Erst durch diese Varianzreduktion wird der Einfluss des Faktors „Diabetes-Status“ sichtbar: der Quotient der beiden Konzentrationen liegt bei den diabetischen Mäusen weit unter dem der Wildtypen. Dieser verminderte Wert des Quotienten kann als Indikator dafür gelten, dass in diabetischen Mäusen kürzere Fettsäuren häufiger auftreten und somit eine höhere Aktivität der β-Oxidation, in deren Ablauf die Fettsäuren pro Zyklus um zwei Kohlenstoffatome verkürzt werden, vorliegt. Da diese gesteigerte β-Oxidation bekanntermaßen tatsächlich in Diabetes auftritt (Wolfsdorf, Glaser et al. 2006), wäre der

Quotient SM(OH)28:0/SM(OH)26:0 ein möglicher Biomarker für Änderungen in der Aktivität der β-Oxidation. Die Stärken der Quotientenbildung, Reduzierung der Variabilität und Informationsgewinn, werden zusätzlich durch ein zweites Beispiel, nämlich der Metabolite SM(OH)28:1 und SM(OH)26:0, demonstriert. Für diese beiden Sphingomyeline, deren Fettsäurereste sich auch hier nur durch zwei Kohlenstoffatome sowie eine Doppelbindung unterscheiden, mag eine ähnliche biochemische Erklärung gelten wie für das erste Beispiel.

Weitere Metabolitenpaare, für die der Quotient ihrer Konzentrationen hinsichtlich des Faktors „Diabetes-Status“ einen deutlichen Unterschied zwischen den Gruppen aufdeckt, werden hauptsächlich von Glycero-Phosphatidylcholinen gestellt. Wie in Abschnitt 2.5.4 noch näher erläutert werden wird, basieren diese Unterschiede wahrscheinlich auf einer unterschiedlichen Regulation bestimmter Acyltransferasen. Vorerst soll hier nur festgehalten werden, dass diese Metabolite allein durch die Analyse einzelner Metabolite nicht aufzufinden sind. Dies wiederum lässt darauf schließen, dass sich Quotienten aus Metabolitenkonzentrationen gut als Kandidaten für Biomarker, beispielsweise für Enzymaktivität, eignen.

Betrachtet man die Ergebnisse der Quotientenbildung hinsichtlich des Faktors „Medikation“, so stellt man fest, dass in diesen fast ausschließlich Glycero-Phospholipide auftreten (Tab. 5).

Metabolite im Zähler	**Metabolite im Nenner**	**η^2 M/W**	**η^2 U/T**	**η^2 M/W * U/T**	**η^2 gain M/W**	**η^2 gain U/T**	**η^2 gain M/W * U/T**
PG_aa_C44:7	PI_aa_C40:3	0,191	0,822	0,020	0,5	2,1	0,1
PIP2_aa_C36:0	UA_HNAc	0,008	0,774	0,008	0,1	2,2	0,1
PI_a_C18:0	PG_aa_C44:7	0,184	0,715	0,227	1,4	5,5	3,5
UA_HNAc	PIP3_aa_C20:1	0,269	0,706	0,452	1,8	3,0	11,9
PIP2_aa_C36:0	PE_a_C30:3	0,037	0,701	0,212	0,5	2,0	2,7
PC_a_C18:1	PC_aa_C40:6	0,135	0,683	0,356	0,8	2,3	8,3
UA_HNAc	PS_aa_C36:1	0,447	0,660	0,253	1,8	4,0	39,9
PC_a_C16:0	PC_aa_C40:6	0,008	0,653	0,206	0,3	2,2	4,8
PC_a_C16:0	PC_ee_C40:4	0,057	0,641	0,15	2,2	2,2	2,2
PC_a_C16:0	PC_aa_C38:4	0,058	0,638	0,149	2,2	2,1	1,9
PC_a_C18:1	PC_ee_C40:4	0,115	0,615	0,240	0,6	2,1	3,5
PC_a_C18:1	PC_aa_C38:4	0,114	0,612	0,237	0,6	2,0	3,0
LacCer_C18:0	SM_(OH)_26:3	0,347	0,612	0,583	1,5	2,1	4,5
PI_aa_C40:3	PE_aa_C40:5	0,029	0,612	0,030	0,1	2,6	0,3
PA_a_C26:6	SM_C22:3	0,698	0,611	0,789	10,4	18,8	10,5
UA_HNAc	PIP2_aa_C28:0	0,517	0,604	0,459	4,3	3,7	60,8

Tab. 5: Wie Tab. 4, aber für U/T.

Im Detail sind dies Glycero-Phosphatidylinositole mit ein oder zwei veresterten Seitenketten (PI_a und PI_aa), PIP2 und PIP3, sowie die Glycero-Phosphatidylcholine PC_a, PC_aa und PC_ee. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich auf verschiedene, zusammenwirkende Modifikationen im gesamten Lipidstoffwechsel zurückzuführen, auf den Rosiglitazon u.a. durch die Aktivierung der Adipozytenreifung einwirkt. Diese Beobachtungen können nun als Ausgangspunkt für eine ausführlichere Analyse der zugrunde liegenden Prozesse verwendet werden, was hier jedoch über den Rahmen der Arbeit hinausgehen würde.

2.5.4 Identifizierung von Metabolitengruppen

Bisher wurden ausschließlich einzelne Metabolite oder Quotienten von ebenfalls einzelnen Metaboliten betrachtet. Oft jedoch wird eine ganze Gruppe von Metaboliten in der gleichen Weise von einem Faktor beeinflusst. Daher besteht das Ziel des nächsten Analyseschrittes darin, mit Hilfe eines Clusteringverfahrens solche Gruppen aufzufinden, die sowohl innerhalb der eigenen Gruppe als auch zu anderen Gruppen ein ähnliches Verhalten zeigen. Ein Cluster, definiert durch jeweils zwei Gruppen, besagt demnach, dass alle Metabolite der einen Gruppe in einem ähnlichen Verhältnis zu allen Metaboliten der zweiten Gruppe stehen.

Die geclusterte η^2-Matrix für den Faktor „Diabetes-Status“ enthält mindestens 13 dieser Gruppen (Tab. 6, Tab. 7), von denen einige solche Metabolite beinhalten, deren Beeinflussung durch Diabetes bereits oben diskutiert wurde. So setzen beispielsweise die Gruppen 4 und 6 die glukogenen Aminosäuren Serin und Alanin mit mehreren Sacchariden sowie mit C3-DC-M in Verbindung. Gruppe 7 enthält neben den verzweigtkettigen Aminosäuren und Phenylalanin auch Ornithin, das, wie bereits beschrieben, mit Arginin aus Gruppe 5 in Zusammenhang gebracht wird. Für einige der aufgefundenen Cluster fällt der η^2-gain der Quotienten, aus denen sie bestehen, sehr niedrig aus. Diese Cluster liefern somit keine neuen Informationen, bestätigen jedoch bereis bekannte metabolische Gegebenheiten.

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 5	Gruppe 8	Gruppe 9
PC_aa_C34:0	PC_a_C20:4	Alanin	C0	C4_OH
PC_aa_C34:1	PC_a_C22:6	Arginin	C2:0	C8:0
PC_aa_C34:2	PC_e_C20:0	Serin	C3	C8_DC
PC_aa_C36:1	PC_e_C22:1		C5_M_DC	C10:1
PC_aa_C36:2	PC_e_C26:0		C6	C14:0
PC_aa_C36:3	PC_e_C30:0	**Gruppe 6**	Citrullin	C16:0
PC_aa_C38:3	PC_e_C30:1	C3_DC_M	Lysin	C18:0
PC_aa_C38:5	PC_e_C32:0	C7_DC	Tryptophan	C18:2
PC_aa_C40:5	PC_e_C32:1	H1	Tyrosin	Asparaginsäure
PC_ea_C36:7		H3_HNAc2_NANA	PC_ea_C30:7	Glutaminsäure
PC_ea_C36:8	**Gruppe 3**	HNAc_H2_dH	PC_ee_C30:0	Histidin
PC_ea_C38:8	SM_C28_2	PC_aa_C36:5	PIP3_aa_C20:7	Methionin
PC_ee_C36:0	SM_OH_COOH_C24:0	PC_ee_C38:5		Prolin
PC_ee_C36:1	SM_OH_COOH_C24:1			Threonin
PC_ee_C36:2	SM_OH_COOH_C24:4			
PC_ee_C36:3		**Gruppe 7**		
PC_ee_C38:1	**Gruppe 4**	C3_OH		
PC_ee_C38:2	Alanin	C4:1		
PC_ee_C38:3	Arginin	Leucin/Isoleucin		
PC_ee_C40:3	Serin	Ornithin		
PC_ee_C40:5	UA_HNS_UA_HNAc_UA	Phenylalanin		
PC_ee_C42:5	Pentose	Valin		

Gruppe 10	Gruppe 11	Gruppe 12	Gruppe 13
PC_aa_C32:0	GlcCer_OH_COOH_C8:1	GlcCer_OH_COOH_C8:1	PC_aa_C34:1
PC_aa_C38:2	GlcCer_OH_COOH_C20:2	GlcCer_OH_COOH_C20:2	PC_aa_C36:1
PC_aa_C38:6	GlcCer_C24:0	PC_a_C16:0	PC_aa_C36:2
PC_ea_C32:8	HNAc_H4_dH2	PC_a_C18:0	PC_aa_C36:3
PC_ea_C34:7	PC_a_C16:0	SM_OH_28:0	PC_aa_C38:3
PC_ee_C32:1	PC_a_C18:0	SM_OH_28:1	PC_aa_C38:5
PC_ee_C34:0	PI_aa_C18:1		PC_ea_C36:8
PC_ee_C40:2	PI_aa_C20:6		PC_ea_C38:8
PC_ee_C40:6	PIP2_aa_C36:1		PC_ee_C36:1
			PC_ee_C38:1
			PC_ee_C38:2
			PC_ee_C38:3
			PC_ee_C40:3
			PC_ee_C40:5

Tab. 6: Gruppen von Metaboliten, die hinsichtlich des Faktors “Diabetes-Status” (M/W) mit hohem η^2-Wert clustern.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6	Gruppe 7	Gruppe 8	Gruppe 9	Gruppe 10	Gruppe 11	Gruppe 12	Gruppe 13
Gruppe 1													
Gruppe 2	x												
Gruppe 3	x												
Gruppe 4													
Gruppe 5													
Gruppe 6		x	x	x	x								
Gruppe 7					x								
Gruppe 8						x	x						
Gruppe 9						x	x						
Gruppe 10						x							
Gruppe 11						x							
Gruppe 12	x												
Gruppe 13		x	x							x		x	

Tab. 7: Gruppen, die hinsichtlich des Faktors "Diabetes-Status" (M/W) einen Cluster bilden.

In der Clustering-Matrix für den Faktor „Medikation" können vier verschiedene Metabolitengruppen identifiziert werden (Tab. 8, Tab. 9). Zwei Gruppen (Gruppe 14 und Gruppe 15) bestehen hauptsächlich aus Glycero-phosphatidylinositolen (PI, PIP2, PIP3), während die beiden anderen Gruppen größtenteils langkettige Acylcarnitine und Glycero-

Gruppe 14	Gruppe 15	Gruppe 16	Gruppe 17
PI_aa_C20:7	C4:1	Arginin	PC_aa_C18:7
PI_aa_C32:1	C6_OH	C14:0	PC_aa_C36:1
PI_aa_C40:4	Ornithin	C14:1	PC_aa_C36:2
PIP2_aa_C26:6	PC_e_C22:1	C16:0	PC_aa_C38:3
PIP2_aa_C26:8	PC_e_C26:0	C16:1	PC_aa_C38:4
PIP2_aa_C36:1	PC_e_C30:0	C18:0	PC_aa_C38:6
PIP3_aa_C10:2	PC_e_C30:1	C18:1	PC_ea_C18:0
PIP3_aa_C20:4	PI_a_C20:0	C18:2	PC_ea_C38:8
PIP3_aa_C36:4	PI_aa_C38:2	PC_aa_C40:5	PC_ee_C20:7
PS_a_C26:0	PI_aa_C40:3	PC_aa_C40:6	PC_ee_C38:1
PIP3_aa_C18:8	PI_e_C22:0	PC_ee_C42:5	PC_ee_C38:2
PIP3_aa_C20:2	PIP2_aa_C16:4	PC_ee_C42:6	PC_ee_C40:3
PC_a_C18:0	PIP2_aa_C26:0		PC_ee_C40:4
PC_e_C32:0	PIP2_aa_C28:0		
SM_C20:2	PIP3_aa_C20:0		
SM_C26:3	PIP3_aa_C20:6		
SM_C30:4	PIP3_aa_C20:7		
SM_OH_28:0	PIP3_aa_C42:3		
SM_OH_COOH_16:3			
SM_OH_COOH_26:0			

Tab. 8: Gruppen von Metaboliten, die für den Faktor "Medikation" (U/T) clustern.

Phosphocholine (PC_aa, PC_ea, PC_ee) beinhalten. Wurden die Mäuse mit Rosiglitazon behandelt, so lässt sich eine verminderte Konzentration von Acylcarnitinen und Glycero-Phosphocholinen beobachten, wohingegen der Plasmaspiegel der Glycero-phosphatidylinositole in diesen Mäusen ansteigt.

	Gruppe 14	**Gruppe 15**	**Gruppe 16**	**Gruppe 17**
Gruppe 14				
Gruppe 15				
Gruppe 16	X	X		
Gruppe 17	X			

Tab. 9: Gruppen, die für den Faktor "Medikation" (U/T) einen Cluster bilden.

Dass sowohl für den Faktor „Diabetes-Status" als auch für den Faktor „Medikation" durch eine automatisierte und damit größtenteils objektive Methode bereits bekannte Metaboliteninteraktionen festgestellt werden konnten, bestätigt die Leistungsfähigkeit dieses Ansatzes und zeigt dessen Potential auf.

Die Clusteranalyse liefert neben bereits bekannten Phänomenen jedoch auch neue Informationen über Diabetes. Als besonders interessant kann dabei derjenige Cluster gewertet werden, der durch die Gruppen 1 und 2 definiert wird (Abb. 20).

Gruppe 1 besteht ausschließlich aus Glycero-Phosphatidylcholinen mit zwei Fettsäureresten als Seitenketten (PC_aa, PC_ea und PC_ee), während Gruppe 2 nur Lysophosphatidylcholine (PC_e und PC_a) enthält. Einige dieser Metabolite erwiesen sich schon in der Quotientenanalyse als für Diabetes signifikant und können als Representanten für diese beiden Gruppen interpretiert werden. Die Plasmakonzentrationen der Metabolite aus Gruppe 1 zeigen für die diabetischen Mäuse einen erhöhten Wert, wohingegen die Plasmaspiegel der Metabolite aus Gruppe 2 abfallen. Diese Konstellation sowie die Tatsache, dass fast alle Quotienten dieses Clusters einen η^2-gain größer als 2 besitzen und damit das Verhältnis beider Gruppen zueinander zusätzliche Information liefert, weist auf eine mögliche direkte Verbindung beider Metabolitengruppen durch einen kurzen metabolischen Pfad hin. Tatsächlich katalysieren die Enzyme 1- bzw. 2-Acylglycerophosphocholine-O-acyltransferase (EC 2.3.1.23, EC 2.3.1.62) (Lands and Hart 1965; Miki, Hosaka et al. 1977; Bell and Coleman 1980) und

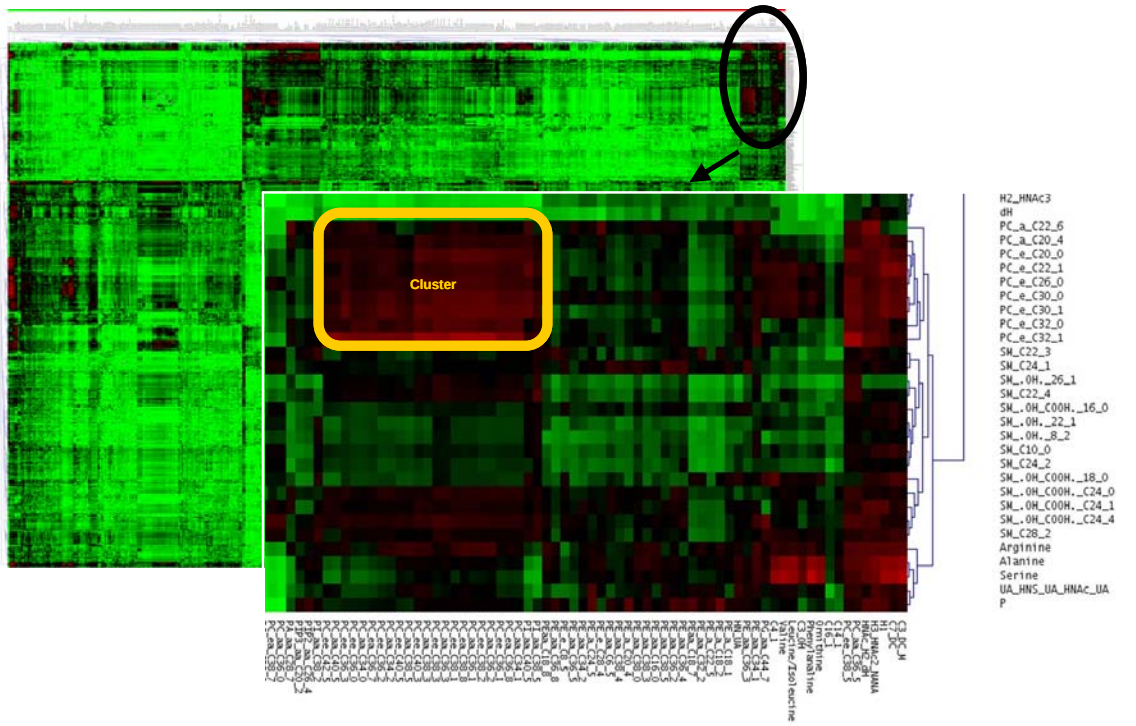


Abb. 20: Clustering-Beispiel anhand der η^2-Matrix für den Faktor „Diabetes-Status“ (M/W); markiert wurde der durch Gruppe 1 und 2 definierte Cluster.

Alkylglycerophosphocholine-O-acyltransferase (EC 2.3.1.63) (Waku and Nakazawa 1970; Waku and Nakazawa 1972) die Umwandlung der PC_e und PC_a zu PC_ea und PC_aa (Abb. 21, Abb. 22). Hier könnte also eine gesteigerte Aktivität dieser Enzyme vorliegen. Alternativ könnten aber auch die für die umgekehrte Reaktionsrichtung zuständigen Enzyme Phospholipase A1 bzw. A2 (EC 3.1.1.32, EC 3.1.1.4) (van den Bosch 1980) und Lecithin-cholesterol-acyltransferase mit einem Sterol, wie z.B. Cholesterol, als Cofaktor (EC 2.3.1.43) (Vahouny and Treadwell 1968) von einer durch Diabetes bedingten Störung betroffen sein.

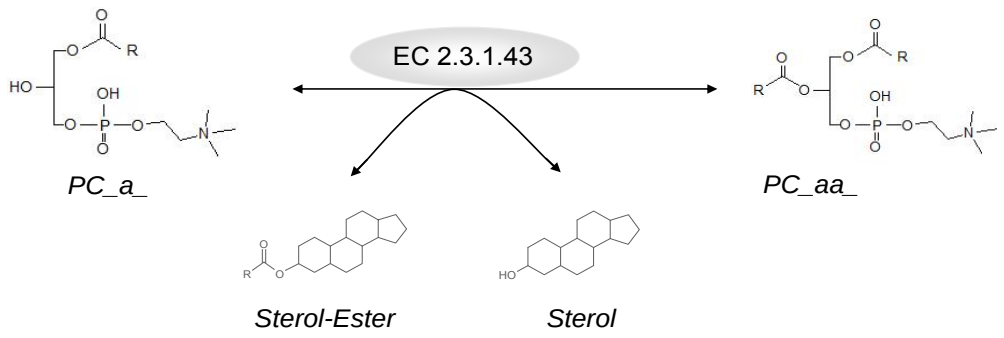


Abb. 21: Umwandlung von PC_a zu PC_aa durch das Enzyme Lecithin-cholesterol-acyltransferase (EC 2.3.1.43).

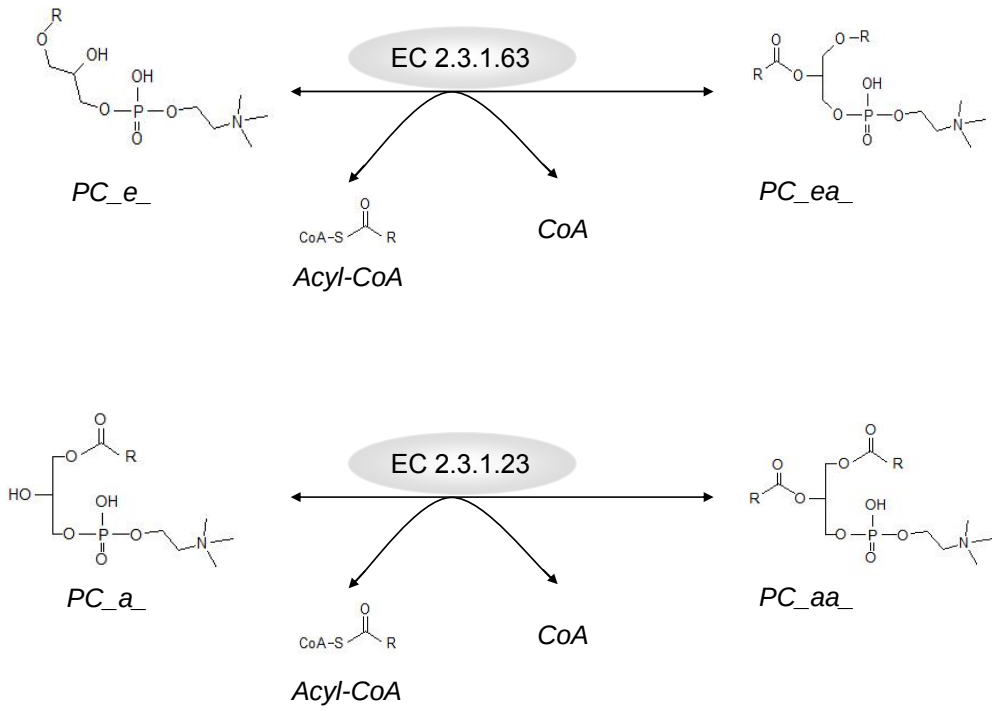


Abb. 22: Umwandlung von PC_e zu PC_ea und von PC_a zu PC_aa durch die 1-Alkyl-glycerophosphocholine O-acyltransferase (EC 2.3.1.63) und die 1-Acylglycerophosphocholine O-acyltransferase (EC 2.3.1.23).

Mit Sicherheit kann festgehalten werden, dass sich das Gleichgewicht der Glycero-Phosphocholine in diabetischen Mäusen in Richtung PC_aa/PC_ea/PC_ee verschiebt. Die beobachtete Verschiebung im Gleichgewicht der Glycero-Phosphocholine erfordert weitere Nachforschungen und könnte zu neuen Erkenntnissen darüber führen, wie metabolische Pfade von Diabetes beeinflusst werden.

2.6 Diskussion

In diesem Kapitel wurde ein bioinformatischer Analyseansatz für eine Studie vorgestellt, die als Prototyp für einen präklinischen Medikamententest gelten kann. Untersucht wurden die Auswirkungen der beiden Faktoren „Diabetes-Status“ (Diabetesmutante/Wildtyp) und „Medikation“ (unbehandelt/behandelt mit Rosiglitazon) auf das ca. 800 Komponenten umfassende metabolische Profil von Labormäusen. Vor allem aufgrund der Laborhaltung zeigte der Datensatz generell eine geringe Variabilität innerhalb der Mäusegruppen,

wodurch eine sehr gute Voraussetzung für eine automatisierte und damit objektive Analyse gegeben war.

Zunächst sollten bereits bekannte Auswirkungen sowohl von Diabetes als auch von dessen Medikation durch Rosiglitazon im vorliegenden Datensatz wieder gefunden werden. Dies wurde mehrfach erreicht: So zeigte die Analyse einzelner Metabolite für den Faktor „Diabetes-Status“ bekannte Phänomene, wie eine erhöhte Aktivität der Glukoneogenese, eine gestörte Aufnahme von verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA) in das Muskelgewebe, eine verringerte Aktivität der Phenylalanin-Hydroxylase sowie der Ornithine-Decarboxylase, eine erhöhte Aktivität der Arginase sowie ein Anstieg an Ketonkörpern im Plasma. Hinsichtlich der Medikation durch Rosiglitazon ergab die Analyse einzelner Metabolite eine Verminderung der Konzentration langkettiger Acylcarnitine. Dies kann durch die bereits bekannten Auswirkungen von Rosiglitazon auf den Stoffwechsel unveresterter Fettsäuren und die damit verbundene Reduzierung langkettiger Acylcarnitine erklärt werden.

Das Auffinden dieser bereits bekannten Effekte untermauert nicht nur die Leistungsfähigkeit der gewählten Analysemethode, sondern bestätigt auch die Qualität und Reproduzierbarkeit der Metabolitenmessungen.

Abgesehen davon brachte die Analyse einzelner Metabolite durch eine zweifaktorielle ANOVA auch neue Erkenntnisse über mögliche Wechselwirkungen der beiden Faktoren, was besonders am Beispiel des Methylglutarylcarnitine (C5-M-DC) sichtbar wurde. Solche automatisch vorhergesagten Wechselwirkungen können in klinischen Tests mitunter schon frühzeitig auf eventuelle Nebeneffekte eines Medikaments hinweisen, die anderenfalls erst in der zweiten Phase klinischer Tests aufgedeckt würden. Umgekehrt würde ein Test, der in der ersten Phase leichte Nebenwirkungen bei gesunden Versuchspersonen zeigt, abgebrochen werden, obwohl solche Nebenwirkungen bei kranken Personen nicht auftreten würde. Letzteres bliebe jedoch unbekannt, wenn das Wissen allein auf den Ergebnissen der Phase I basierte.

Im nächsten Schritt sollten neue, durch einen der beiden Faktoren beeinflusste Metabolite gefunden werden, die sich vor allem dadurch auszeichnen, dass sie durch kurze metabolische Pfade eng miteinander verbunden sind. Dadurch kann es ermöglicht werden auf vom jeweiligen Faktor betroffene Enzyme rückzuschließen. Um dies zu erreichen, wurden als Basis der Analyse nicht mehr einzelne Metabolite, sondern die Quotienten aller möglicher Metabolitenpaare verwendet und anschließend mit einer ANOVA ausgewertet. Nachdem das Ergebnis durch die Einführung des Indikators η^2-gain auf

tatsächlichen Informationsgewinn hin untersucht worden war, konnten signifikante Quotienten identifiziert werden, deren Komponenten nicht durch die Analyse einzelner Metabolite aufzufinden waren. Der Einfluss von Diabetes zeigte sich dabei vor allem bei Glycero-Phosphocholinen und einigen Sphingomyelinen. Als besonders hervorzuhebendes Beispiel kann der Quotient der beiden Sphingomyeline SM(OH)28:0 und SM(OH)26:0 gewertet werden, der eine Verschiebung der Konzentration von SM(OH)28:0 zu SM(OH)26:0 in diabetischen Mäusen aufzeigt und damit als möglicher Indikator für eine erhöhte β-Oxidation sowie für Diabetes an sich gelten könnte. Erreicht wurde dieser Informationsgewinn vor allem dadurch, dass die Quotientenbildung die Variabilität innerhalb jeder Gruppe mitunter stark reduzierte. Für den Faktor „Medikation“ konnten ebenfalls Quotienten gefunden werden, deren Metabolite nicht im Ergebnis der Analyse einzelner Metabolite enthalten war. Diese Metabolite umfassen hauptsächlich PI-, PIP2-, PIP3- und PC- Komponenten.

Im letzten Schritt sollten nicht mehr einzelne Metabolite betrachtet, sondern ganze Gruppen von Metaboliten gefunden werden, die einerseits innerhalb einer Gruppe gleichermaßen von einem Faktor beeinflusst werden und andererseits ein bestimmtes Verhältnis zu anderen Gruppen aufweisen. Dadurch wird das Ergebnis der Analyse der Quotienten mehr generalisiert, und das Verhalten ganzer Gruppen von Metaboliten kann besser beschrieben werden. Erkenntnisse über solche interagierende Gruppen können einen tieferen Einblick in die grundlegenden metabolischen Prozesse, die durch Diabetes oder Rosiglitazon beeinflusst werden, liefern. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden aus den η^2-Werten der ANOVA Matrizen gebildet, die anschließend hierarchisch geclustert wurden. Das hierarchische Clustering stellt nur eine von vielen Möglichkeiten dar und kann durch andere Clusteringmethoden ersetzt werden. Bestätigt wurde dieser Ansatz durch das Auffinden von Metabolitengruppen, deren Komponenten bereits aufgrund der Analyse einzelner Metabolite und ihrer Quotienten bekannt waren. So enthält die η^2-Matrix für den Faktor „Diabetes-Status“ beispielsweise einen Cluster mit Aminosäuren und Saccharide, die auf eine verstärkte Glukoneogenese hinweisen, sowie einen Cluster mit Aminosäuren, die als Indikatoren für eine Störung hinsichtlich des Ureazyklus gelten. Zusätzlich konnten neue Metabolitengruppen indentifiziert werden, zu denen für den Status „Diabetes“ auch Gruppen aus Glycero-Phosphocholinen zählen. Diese Gruppen decken eine Verschiebung des PC-Gleichgewichtes von einkettigen PC_e und PC_a zu zweikettigen PC_ea und PC_aa auf und lassen auf eine veränderte Regulierung der Enzyme 1- bzw. 2-Acylglycerophosphocholine-O-acyltransferase (EC 2.3.1.23, EC 2.3.1.62), Alkyl-

glycerophosphocholine-O-acyltransferase (EC 2.3.1.63), Phospholipase A1 bzw. A2 (EC 3.1.1.32, EC 3.1.1.4) und Lecithin-cholesterol-acyltransferase (EC 2.3.1.43) schließen, die die Umwandlung von PC_e und PC_a zu PC_ea und PC_aa, bzw. umgekehrt, katalysieren. Dieses Phänomen bedarf nun genauerer Erklärungen und kann als Ausgangspunkt für weiterführende Nachforschungen herangezogen werden.

3 Populationsstudie am Menschen (KORA)

Die Abkürzung KORA steht für die Forschungsplattform „Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg“, die 1996 von der GSF („Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit“, Neuherberg) initiiert wurde und populations-basierte Kohortenstudien zu Themen der Gesundheitsökonomie, Epidemiologie und Versorgungsforschung durchführt. Die Wahl Augsburgs als Zielregion für das KORA-Projekt wurde dadurch bestimmt, dass KORA an das WHO-Projekt MONICA Augsburg („Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease“) anknüpft. Für dieses Projekt MONICA wurden von 1984/85 bis 1999/2001 im Raum Augsburg vier bevölkerungsbasierte MONICA-Surveys (S1-S4) durchgeführt, in deren Rahmen Daten zur Mortalität, Letalität und Inzidenz an koronarer Herzkrankheit erhoben wurden. Die Region Augsburg gilt als gutes Spiegelbild der demographischen und sozialen Struktur in Deutschland und umfasste zur Zeit der Datenerhebung 430000 Einwohner zwischen 25 und 74 Jahren. Aus dieser Altersgruppe wurden die Studienteilnehmer folgendermaßen ausgewählt: Zunächst wurden 16 Gemeinden aus den an die Stadt Augsburg angrenzenden Landkreisen (Landkreise Augsburg und Aichach-Friedberg) per Zufallsprinzip bestimmt. Diese 16 Gemeinden stellten anschließend zusammen mit der Stadt Augsburg die Bevölkerungsgruppe, aus der wiederum zufällig die endgültigen Studienteilnehmer für die Surveys S1-S4 selektiert wurden. (Abb. 23)

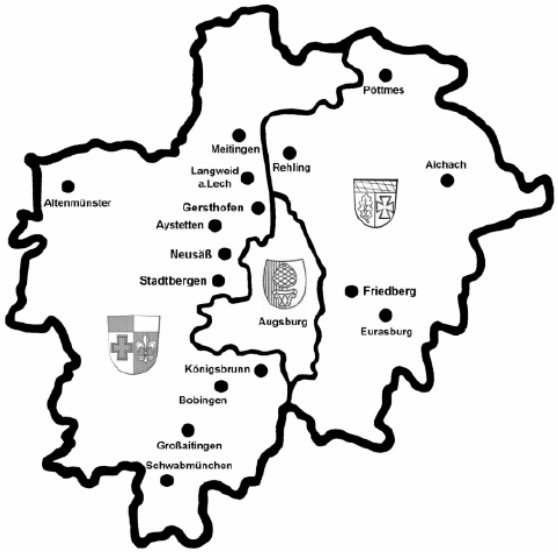


Abb. 23: Studienregion Augsburg, die die Teilnehmer für die Projekte MONICA und KORA stellt (Holle, Happich et al. 2005).

Für KORA bot sich die Möglichkeit, auf diesen MONICA-Studien neue Follow-up-Studien aufzusetzen (Abb. 24).

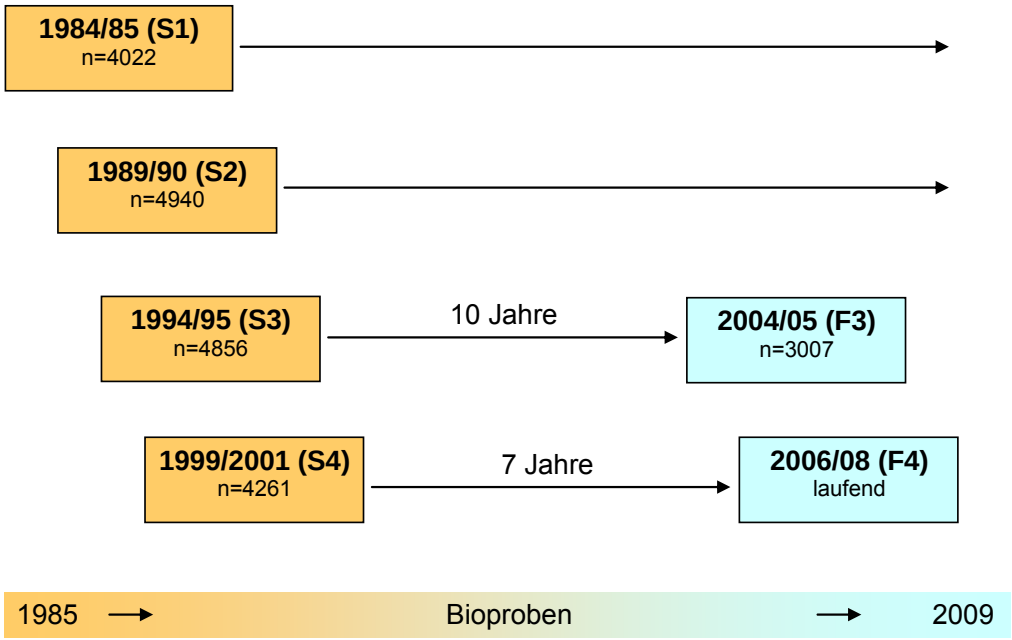


Abb. 24 MONICA/KORA-Studien in Augsburg; S1-S4: Surveys; F3, F4: Follow-ups (verändert nach *Wichmann 2005*).

Diese Follow-up-Studien umfassen neben den Informtionen zu Herz-Kreislauferkrankungen eine Vielzahl von Parametern aus den Bereichen Soziodemographie, Umweltfaktoren, Ernährung, Rauchverhalten, Krankheiten und Medikation, sowie Labormesswerte mit Relevanz für verschiedene Erkrankungen. Die in dieser Arbeit analysierten Daten stammen aus der Follow-up-Kohorte F3, die im Abstand von 10 Jahren auf das MONICA-Survey S3 folgte. Von 4856 Teinehmern des Surveys S3 konnten im Jahr 2004 4000 Menschen in das KORA Study Center eingeladen werden, von denen wiederum 3007 für F3 ein zweites mal befragt und untersucht werden konnten (Holle, Happich et al. 2005; Wichmann 2005; Wichmann, Löwel et al. 2005). Für eine Subpopulation dieser Follow-up-Studie F3 wurde nun durch die Firma *Biocrates Life Sciences GmbH*, Österreich, ein Screening der Metabolitenprofile der einzelnen Studienteilnehmer durchgeführt. Diese Metabolitenprofile wurden anschließend in Hinblick auf verschiedene Parameter, wie z.B. Rauchverhalten, Alkoholkonsum, Diabetes, LDL-/HDL-/Cholesterin-Konzentrationen und den hier vorgestellten Kaffeekonsum analysiert.

3.1 Kaffee

Diese Arbeit konzentriert sich bei der Auswertung von F3-Daten auf die Analyse des Kaffeekonsums und dessen Auswirkungen auf den Metabolismus des Menschen. In der Literatur sind sowohl gesundheitsfördernde als auch die Gesundheit beeinträchtigende Folgen des Kaffeekonsums beschrieben und sollen hier zusammengefasst werden.

Zu den gesundheitsfördernden Effekten von Kaffee wird die Prävention von Diabetes mellitus Typ 2 gezählt. Sechs von neun Kohortenstudien zeigen eine signifikante inverse Assoziation zwischen Kaffeekonsum und dem Risiko an Diabetes Typ 2 zu erkranken. So ergab beispielsweise eine Studie mit 17000 Niederländern eine Verringerung der Diabeteserkrankungen um 50%, falls die tägliche Aufnahme von Kaffee mehr als sieben Tassen pro Tag betrug (im Vergleich zu höchstens zwei Tassen pro Tag) (van Dam and Feskens 2002). Auch in einer finnischen Studie mit 10000 Zwillingen konnte für diejenigen, die mehr als sieben Tassen Kaffee pro Tag tranken, verglichen mit ihrer Kontrollgruppe (höchstens zwei Tassen/Tag), ein um 35% verringertes Diabetesrisiko festgestellt werden (Carlsson, Hammar et al. 2004). Eine solche Reduzierung des Risikos an Diabetes Typ 2 zu erkranken, lässt sich auch in weiteren Studien an US-Amerikanern (Salazar-Martinez, Willett et al. 2004), Schweden (Rosengren, Dotevall et al. 2004) und Finnen (Tuomilehto, Hu et al. 2004) auffinden. Allerdings bedarf es noch weiterer Forschung, bevor von Kaffee als sicherem Mittel zur Diabetesprävention gesprochen werden kann.

Eine Verbesserung der Glukosetoleranz oder der Insulinsensitivität durch Kaffee konnte zwar in Kurzzeit-Studien nicht ausgemacht werden (Higdon and Frei 2006), dagegen legen jedoch mehrere epidemiologische Langzeit-Studien aus Japan (Yamaji, Mizoue et al. 2004), Spanien (Soriguer, Rojo-Martinez et al. 2004), Schweden (Agardh, Carlsson et al. 2004) und den Niederlanden (van Dam, Dekker et al. 2004) die Vermutung nahe, dass Kaffeekonsum die Aufrechterhaltung einer normalen Glukosetoleranz unterstützt.

Einen Hinweis auf eine mögliche positive Funktion des Kaffees bei der Prävention der Parkinson-Krankheit liefern beispielsweise Studien an US-Amerikanern (Ascherio, Zhang et al. 2001; Ascherio, Chen et al. 2003; Ascherio, Weisskopf et al. 2004), zu denen auch eine Analyse von ausschließlich japanisch-stämmigen US-Amerikanern (Ross, Abbott et al. 2000) gehört.

Auch auf die Wahrscheinlichkeit, einen Suizid zu begehen, scheint Kaffee einen vermindernden Einfluss auszuüben. Gestützt wird diese Vermutung von zwei Kohorten-

Studien mit 128000 (Klatsky, Armstrong et al. 1993) bzw. 86000 (Kawachi, Willett et al. 1996) US-Amerikanern, sowie durch eine Studie mit 43000 Finnen (Tanskanen, Tuomilehto et al. 2000).

Die Auswirkungen von Kaffeekonsum auf Krebs sind je nach dem Gewebe, in dem er auftritt, unterschiedlich. Im Bezug auf das kolorektale Karzinom zeigen nur Fall-Kontroll-Studien („case-control studies“) eine inverse Assoziation dieses Krebses mit Kaffeekonsum, wohingegen dieser Effekt in Kohortenstudien nicht sichtbar wird. So konnte eine Meta-Analyse von 12 Fall-Kontroll-Studien mit insgesamt 5261 Erkrankten aus Nordamerika, Europa und Asien diesen Einfluss von Kaffee beobachten, da häufige Kaffeetrinker ein um 28% geringeres Risiko für die Bildung eines kolorektalen Karzinoms aufwiesen als gelegentliche Kaffeetrinker. Die fünf Kohortenstudien aus den USA und Norwegen mit insgesamt 931 Krankheitsfällen unterstützten diese Assoziation jedoch nicht (Giovannucci 1998). *Tavani and La Vecchia 2004* stellen in ihrem Review ein ähnliches Ergebnis vor. Auch sie können eine inverse Assoziation zwischen Kaffeekonsum und Kolonkarzinom zwar in neun Fall-Kontroll-Studien mit insgesamt 517 Krebsfällen auffinden, jedoch nicht in drei Kohorten-Studien mit insgesamt 307 Erkrankten.

Ein vermindertes Risiko für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms bei starken Kaffeetrinkern konnte dagegen sowohl in Fall-Kontroll-Studien als auch in Kohorten-Studien festgestellt werden. *Gallus, Bertuzzi et al. 2002* führten zwischen 1984 und 1998 zwei Fall-Kontroll-Studien in Italien und Griechenland mit insgesamt 834 Krebsfällen durch, deren Ergebnis, ebenso wie das Resultat einer Fall-Kontroll-Studie aus Norditalien (Gelatti, Covolo et al. 2005), diese Wirkung von Kaffee nahe legt. Eine Kohorten-Studie mit mehr als 90000 Japanern konnte ebenfalls die inverse Assoziation zwischen Kaffeekonsum und hepatozellulärem Karzinom bestätigen (Inoue, Yoshimi et al. 2005). Interessanterweise war die stärkste inverse Assoziation für diejenigen Studienteilnehmer zu beobachten, die mit dem Leber schädigenden Hepatitis C Virus infiziert waren. Dieses Phänomen trat auch in einer zweiten Kohorten-Studie mit mehr als 50000 Japanern (Shimazu, Tsubono et al. 2005) auf. Hier zeigte sich, dass nur für Menschen, die vor Studienbeginn bereits einmal an der Leber erkrankt waren, der Konsum von mindestens einer Tasse Kaffee pro Tag das Risiko für die Bildung eines hepatozellulären Karzinoms um 48% reduzierte. Trotz der positiven Ergebnisse dieser Studien kann eine direkte Verbindung zwischen Kaffeekonsum und verringertem Krebsrisiko nicht endgültig bestätigt werden. Ebenso sind mögliche Mechanismen für einen solchen Effekt noch unklar und bedürfen weiterer wissenschaftlicher Forschung (Higdon and Frei 2006). Eine

Krebs fördernde Wirkung von Kaffee konnte in mehreren Studien nicht beobachtet werden (Leviton 1990; Tavani and La Vecchia 2000; Zeegers, Kellen et al. 2004).
Eine für die Gesundheit schädliche Wirkung besitzt Kaffee vermutlich bezüglich der koronaren Herzkrankheit. Die meisten Fall-Kontroll-Studien lassen darauf schließen, dass Menschen, die mehr als 5 Tassen Kaffee pro Tag trinken, ein erhöhtes Risiko für das Auftreten der koronaren Herzkrankheit besitzen. Die Mehrheit der Kohorten-Studien zu diesem Thema kann eine solche Assoziation jedoch nicht bestätigen (Higdon and Frei 2006). Auch die Annahme, dass Kaffee erhöhten Blutdruck auslöst, kann nur durch Fall-Kontroll-Studien gestützt werden (Jee, He et al. 1999; Nurminen, Niittynen et al. 1999; James 2004; Noordzij, Uiterwaal et al. 2005). Epidemiologische Langzeitstudien liefern dagegen kein eindeutiges Ergebnis (Higdon and Frei 2006).
Die bisherigen Studien liefern also Hinweise darauf, dass Kaffee mannigfaltige Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen besitzt, die noch weiterer Erforschung bedürfen.

3.2 Datensatz

Die in dieser Arbeit analysierten Daten stammen aus der F3-Follow-up-Studie des MONICA/KORA-Projektes. Insgesamt wurden die Metabolitenprofile von 297 Studienteilnehmern durch die Firma *Biocrates Life Sciences GmbH*, Österreich, gemessen. Die Auswahl dieser Teilnehmer wurde durch ein verstärktes Interesse an der Erforschung von Diabetes bestimmt, so dass die Anzahl der Diabetesfälle im ursprünglichen Datensatz überdurchschnittlich vertreten ist. Um eine von Diabetes unbeeinflusste Analyse der Auswirkungen von Kaffeekonsum auf den Metabolismus zu ermöglichen, wurde der endgültige Datensatz auf die Nichtdiabetiker beschränkt. Somit enthält dieser Datensatz 256 ausschließlich männliche Studienteilnehmer im Alter zwischen 55 und 79 Jahren, die zum Zeitpunkt der Probennahme nüchtern waren. Von diesen machten 220 Personen Angaben zu ihrem Kaffeekonsum. Demnach tranken 76 (~34,5%) Teilnehmer ein bis zwei Tassen Kaffee pro Tag, 99 (45%) Personen konsumierten drei bis neun Tassen/Tag, bei vier (~1,8%) Teilnehmern stieg die Aufnahme von Kaffee auf zehn und mehr Tassen/Tag und 41 (~18,6%) Personen verzichteten gänzlich auf Kaffee (Abb. 25).

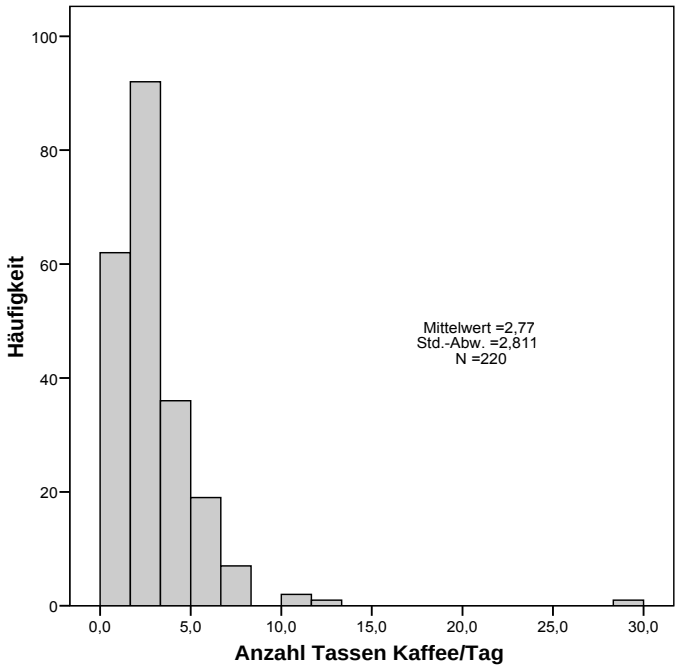


Abb. 25: Verteilung des Kaffeekonsums im verwendeten Datensatz.

Insgesamt wurden 363 Metabolite gemessen: 18 Aminosäuren, neun reduzierende Mono-, Di- und Oligosaccharide, 21 Acylcarnitine (C*x:y*), sieben Hydroxylacylcarnitine (C(OH)*x:y*) und Dicarboxylacylcarnitine (C*x:y*-DC), freies Carnitin (C0), sieben biogene Amine, sieben Prostaglandine und 293 Lipide. Diese Lipide unterteilen sich in 14 verschiedene Ceramide (Cer) und Glucosylceramide (GlcCer), 71 verschiedene Sphingomyeline (SM*x:y*) und Sphingomyelin-Derivate, wie N-Hydroxyldicarboacyloylsphingosyl-Phosphocholin (SM(OH,COOH)*x:y*) und N-Hydroxylacyloylsphingosyl-Phosphocholin (SM(OH)*x:y*), fünf Glycero-Phosphatidylsäuren (PA), 124 Glycero-Phosphatidylcholine (PC), 42 Glycero-Phosphatidylethanolamine (PE), vier Glycero-Phosphatidylglycerole (PG), 30 Glycero-Phosphatidylinositole (PI) und Glycero-Phosphatidylinositol-bisphosphate (PIP2) und drei Glycero-Phosphatidylserine (PS).

3.3 Datenanalyse

Das Ziel der Analyse besteht darin, diejenigen Metabolite aufzufinden, die durch Kaffeekonsum signifikant beeinflusst werden. Dazu wurde für jeden Metaboliten eine lineare Regression (Chambers 1992) mit der Metabolitenkonzentration als abhängiger Variable und der Anzahl der konsumierten Tassen Kaffee/Tag als unabhängige Variable

durchgeführt. Zusätzlich zum hierbei erhaltenen p-value wurde der q-value (*positive false discovery rate pFDR*) berechnet, der den Anteil der Falsch-Positiven misst, welche auch dann anfallen, wenn der Test als signifikant bezeichnet wurde (Storey 2003). Da nicht angenommen werden kann, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen der abhängigen und der unabhängigen Variable immer linear verläuft und dazu der Kaffeekonsum nicht normalverteilt ist, wurde zusätzlich der Kendalls Test (Hollander and Wolfe 1973) auf jeden Metaboliten angewandt. Der Kendalls Test ist ein parameterfreier Test, der die Korrelation zwischen zwei Variablen aufgrund der Rangzahlen ihrer Daten ermittelt. Die Variablenwerte müssen keine Normalverteilung aufweisen und dürfen auf Ordinalskalenniveau gemessen sein. Auch für diesen Test wurden p- und q-value, sowie der Rangkorrelationskoeffizient Kendalls Tau berechnet.
Eine allgemein gebräuchliche Korrektur hinsichtlich des Alters und Geschlechts der Studienteilnehmer ist aufgrund der Homogenität des Alters und der ausschließlich männlichen Personen nicht erforderlich.

3.4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Analyse der Metabolitenkonzentrationen mittels Kendalls Test sind in Tab. 10 aufgeführt. Signifikante Werte lieferte hauptsächlich der Kendalls Test, dessen bester p-value bei E-06 liegt.
Es fällt auf, dass besonders die Metabolite aus den Sphingomyelin-Klassen SM(OH,COOH)x:y und SM(OH)x:y niedrige Kendall p-values aufweisen. Zusätzlich bescheinigt der Kendall q-value eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für Falsch-Positive. Das Kendalls Tau, das den Grad des Zusammenhangs zwischen der Konzentration des jeweiligen Metaboliten und dem Kaffeekonsum angibt, nimmt für alle in Tab. 10 aufgeführten Sphingomyeline positive Werte an. Dies lässt vermuten, dass alle Vertreter der Sphingomyelin-Klassen SM(OH,COOH)x:y und SM(OH)x:y mit dem Konsum von Kaffee positiv korreliert sind. Um diese Annahme zu überprüfen wird sowohl die Summe der Konzentrationen aller SM(OH,COOH)x:y als auch die Summe der Konzentrationen aller SM(OH)x:y berechnet und jeweils durch lineare Regression und Kendalls Test auf ihre Signifikanz hinsichtlich des Kaffeekonsums getestet. Der Annahme entsprechend korrelieren auch die beiden Summen der Sphingomyelin-Klassen positiv mit der

Metabolit	Kendall p-value	Kendall q-value	Kendalls Tau
SM (OH,COOH) 20:2	5,6E-06	5,7E-04	0,203
SM (OH,COOH) 16:2	7,3E-06	5,7E-04	0,200
SM (OH,COOH) 18:2	1,3E-05	7,8E-04	0,194
Sum(SM(OH,COOH)x:y)	1,7E-05	8,0E-04	0,192
SM (OH) 22:1	3,2E-05	1,1E-03	0,186
SM (OH,COOH) 24:0	6,4E-05	1,7E-03	0,178
SM (OH) 20:3	6,1E-05	1,7E-03	0,179
SM (OH,COOH) 18:1	7,6E-05	1,8E-03	0,177
Sum(SM(OH)x:y)	8,7E-05	1,9E-03	0,175
SM (OH) 28:0	4,6E-04	8,2E-03	0,156
C16:1	4,5E-04	8,2E-03	-0,157
C14:1	4,9E-04	8,2E-03	-0,156
C14:2	7,5E-04	1,2E-02	-0,150
C12:1	8,6E-04	1,3E-02	-0,149
SM (OH,COOH) 20:4	9,4E-04	1,3E-02	0,148
C10:1	1,3E-03	1,4E-02	-0,143
SM (COOH) 18:3	1,4E-03	1,4E-02	0,143
PC aa 38:1	1,3E-03	1,4E-02	0,144
C18:2	1,3E-03	1,4E-02	-0,144
Sum(Cx10:y)	1,5E-03	1,5E-02	-0,142
SM (OH,COOH) 16:1	1,5E-03	1,5E-02	0,141
SM (OH) 22:0	1,9E-03	1,8E-02	0,139

Tab. 10: Ergebnisse des Kendalls Tests, mit p- und q-value, sowie mit dem Kendalls Tau; es werden alle Metabolite mit einem Kendall p-value kleiner als 2E-03 gezeigt. Die Summen der SM(OH,COOH)x:y, der SM(OH)x:y und aller Cx:y mit x≥10 sind kursiv gedruckt.

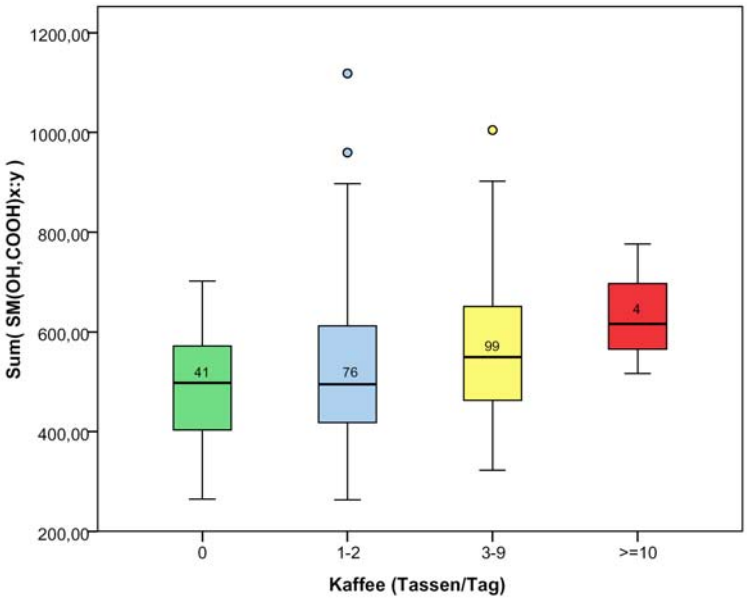


Abb. 26: Boxplots der Plasmakonzentrationen [µM] der Sphingomyelin-Klasse SM(OH,COOH)x:y.

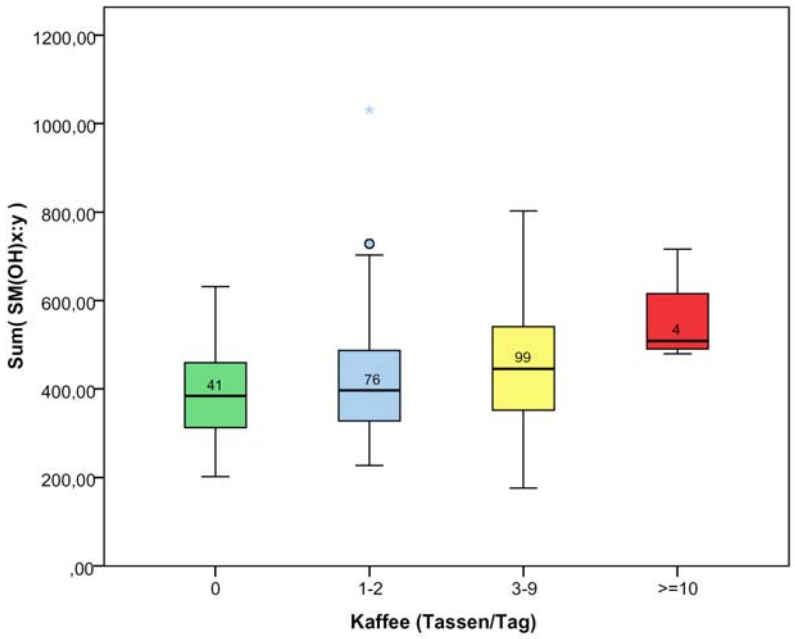


Abb. 27: Boxplots der Plasmakonzentrationen [µM] der Sphingomyelin-Klasse SM(OH)x:y.

Aufnahme von Kaffee (Tab. 10). Um dies graphisch verdeutlichen zu können wurden die Studienteilnehmer in vier Gruppen eingeteilt: keine Kaffeetrinker (0 Tassen/Tag), mäßige (1-2 Tassen/Tag), starke (3-9 Tassen/Tag) und übermäßige Kaffeetrinker (>= 10 Tassen/Tag) (Abb. 26, Abb. 27).

Die Synthese von Sphingomyelin findet im Golgi-Apparat statt (Futerman, Stieger et al. 1990). Sie beruht auf einem Transfer des Phosphorylcholins vom Phosphatidylcholin zum Ceramid, wobei Diacylglycerol als Nebenprodukt entsteht (Pagano 1988). Ceramide wiederum bestehen aus einem Sphingosin und einer Fettsäure, die mittels N-Acylierung an das C2 des Sphingosins angehängt ist (Goni, Contreras et al. 2005) (Abb. 28).
SM(OH)x:y entsteht durch das Anhängen einer am α-Ende hydroxilierten Fettsäure (Uchida, Hara et al. 2000), die bei SM(OH,COOH)x:y zusätzlich eine Carboxylgruppe am ω-Ende der Fettsäure besitzt (Abb. 29). SM(OH,COOH)x:y ist im Gegensatz zu SM(OH)x:y in der Literatur noch nicht im Detail beschrieben. Die Messung von SM(OH,COOH)x:y geht auf das in Kapitel 1 beschriebene und von *Biocrates Life Sciences GmbH* implementierte Messprotokoll zurück.
Sphingomyeline sind vor allem in biologischen Membranen anzutreffen, die sich aus Proteinen und verschiedenen Lipiden zusammensetzen. Zu diesen Lipiden zählt auch Cholesterin, von dem wohlbekannt ist, dass es mit Phospholipiden interagiert, sie dadurch

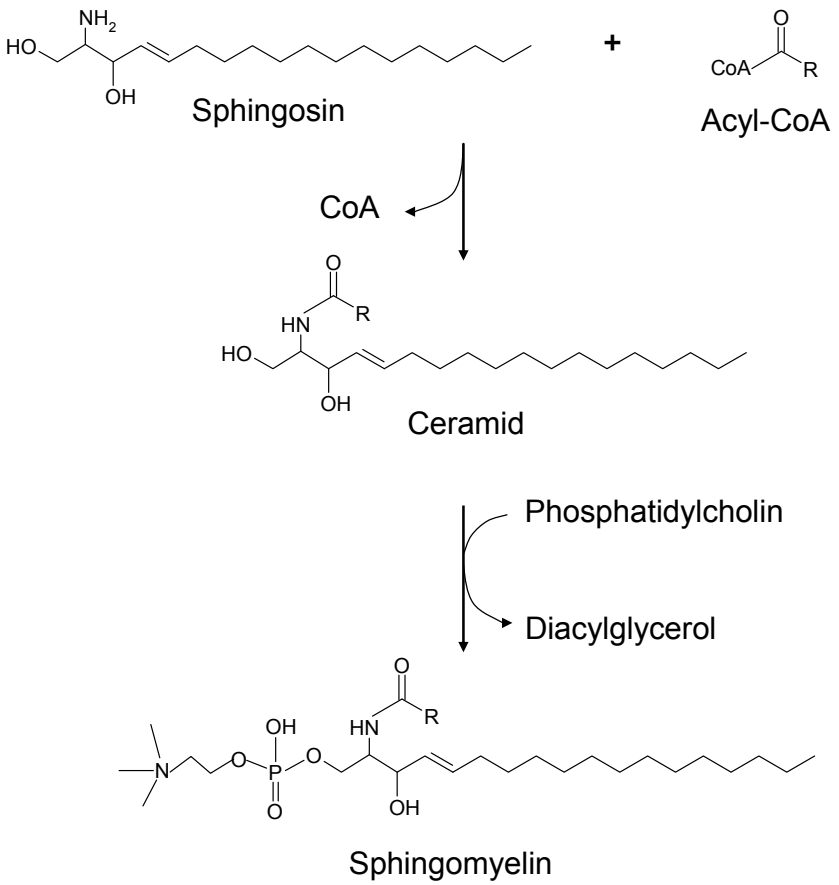
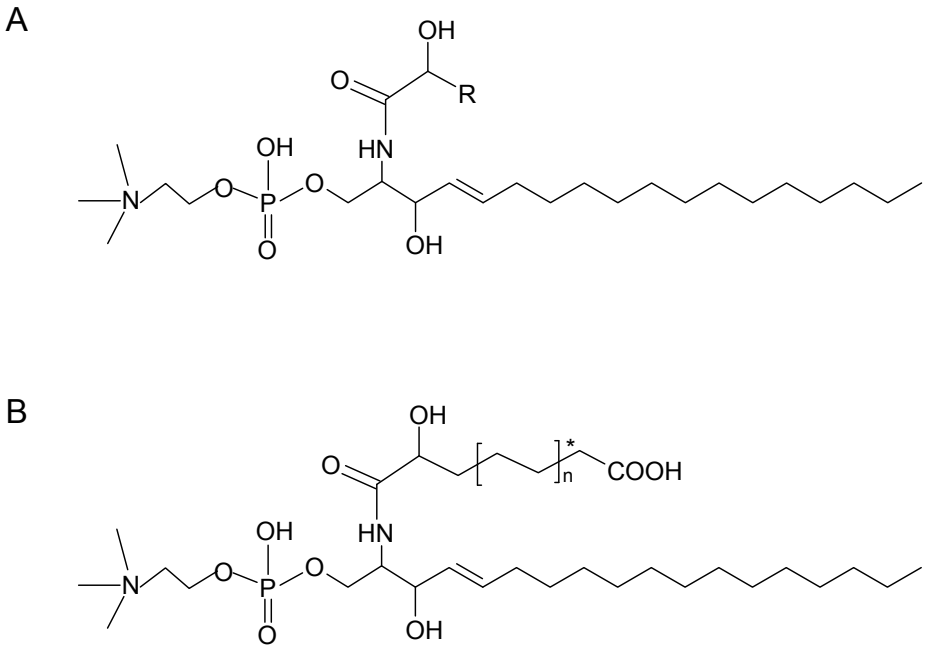


Abb. 28: Synthese von Sphingomyelin.



* kann auch ungesättigt sein

Abb. 29: Struktur von SM(OH)x:y (A) und SM(OH,COOH)x:y (B).

stabilisiert und somit ihre Fähigkeit, Membranen zu bilden, unterstützt. Die Interaktionen zwischen Cholesterin und Phospholipiden sind jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Mehrere Studien zeigen, dass Cholesterin und Sphingomyelin im Vergleich zu anderen Phospholipiden am stärksten interagieren (Sankaram and Thompson 1990; Gronberg, Ruan et al. 1991). Die Analysen von (Gronberg, Ruan et al. 1991) ergaben zudem, dass Cholesterin die Verdichtung von SM(OH)x:y in der Membran erhöhen kann. Im hier verwendeten Datensatz kann eine leichte Zunahme des Cholesterin bei steigendem Kaffeekonsum festgestellt werden (Abb. 30). Dies ließe aufgrund der beschriebenen

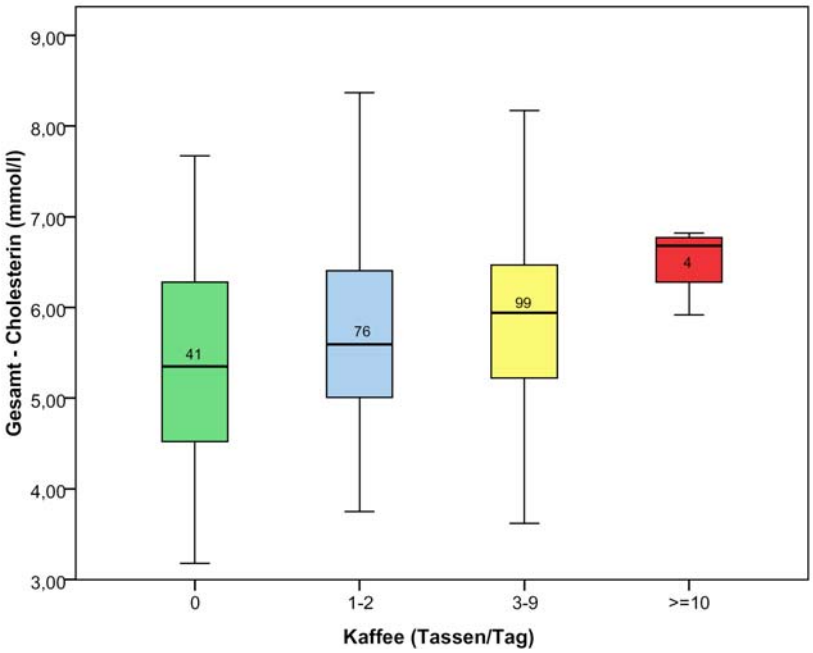


Abb. 30: Plasmakonzentration des Gesamt-Cholesterins.

Funktion des Cholesterins in Membranen möglicherweise auf einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Cholesterin- und erhöhtem SM(OH)x:y - bzw. SM(OH,COOH)x:y - Spiegel schließen. Ob die Aufnahme des in Süddeutschland üblicherweise gefilterten Kaffees tatsächlich die Konzentration von Cholesterin erhöht, wird in der Wissenschaft jedoch noch diskutiert. Schon in den 1980er Jahren wurde nachgewiesen, dass Kaffeekonsum das Gesamt-Cholesterin im Blut erhöht (Thelle, Arnesen et al. 1983). Darauf folgende Studien stellten jedoch fest, dass dieser Effekt hauptsächlich auf die Diterpene Cafestol und Kahweol zurückzuführen ist, die nur in ungefiltertem Kaffee auftreten (Zock, Katan et al. 1990; Ahola, Jauhiainen et al. 1991; Urgert and Katan 1997). Ein genau entgegengesetztes Ergebnis, nämlich eine Assoziation zwischen der Aufnahme gefilterten Kaffees und der Cholesterin-Konzentration im Blut, lieferten dagegen die

Studien von (Superko, Bortz et al. 1991), (Fried, Levine et al. 1992), (Christensen, Mosdol et al. 2001) und (Strandhagen and Thelle 2003). Es existieren demnach also Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Kaffeekonsum und dem Anstieg des Cholesterin-Spiegels. Dieser Zusammenhang ist tendenziell auch in den hier analysierten Daten zu erkennen und könnte möglicherweise einen Ansatzpunkt für eine Erklärung der erhöhten Konzentration von SM(OH)x:y und SM(OH,COOH)x:y liefern.

Neben den Sphingomyelinen weisen auch langkettige Acylcarnitine signifikante Ergebnisse im Bezug auf Kaffeekonsum auf (Tab. 10). Sowohl für die einzelnen langkettigen Acylcarnitine als auch für deren Summe liefert das Kendalls Tau negative Werte, also eine inverse Assoziation zwischen Kaffeeaufnahme und der Konzentration langkettiger Acylcarnitine. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Wirkung des in Kaffee enthaltenen Vitamins Niacin (Casal, Oliveira et al. 2000) liefern, das die Konzentration von Triglyceriden und freien Fettsäuren im Blut senkt (Carlson and Oro 1962; Grundy, Mok et al. 1981; DiPalma and Thayer 1991; Wahlberg and Walldius 1992; Hwang, Bakr et al. 2002). Wie bereits im Kapitel 2.5.2 beschrieben, zieht eine verminderte Konzentration von Triglyceriden und freien Fettsäuren auch eine geringere Konzentration von Acylcarnitinen mit sich, die beim Transport der Fettsäuren ins Mitochondrium entstehen.
Sowohl die Konzentrationen der Sphingomyeline als auch der langkettigen Acylcarnitine geben Hinweise auf mögliche Wirkungsweisen des Kaffees, die jedoch noch weiterer Erforschung bedürfen.

3.5 Diskussion

Die Analyse einer Subpopulation bestehend aus 297 Teilnehmern einer Kohorten-Studie am Menschen zeigt, dass Metabolomics mit automatischen und damit objektiven Methoden nicht nur für Organismen möglich ist, die unter gleichbleibenden, einheitlichen Laborbedingungen leben. Teilnehmer einer Kohorten-Studie unterliegen bekanntermaßen einer Vielzahl von Umwelteinflüssen, die je nach Individuum variieren, wie z.B. unterschiedliche Medikation, Ernährung und sportliche Aktivität. Trotz dieser suboptimalen Bedingungen lassen sich für einen zu analysierenden Faktor, wie hier den Kaffeekonsum, signifikante Metabolite auffinden. Zu diesen gehören langkettige

Acylcarnitine, deren Plasmakonzentration mit steigender Aufnahme von Kaffee abnimmt. Es gibt Hinweise, dass dieser Effekt durch das in Kaffee enthaltene Vitamin Niacin erklärt werden könnte. Die beiden Sphingomyelin-Klassen SM(OH)x:y und SM(OH,COOH)x:y weisen eine positive Assoziation mit Kaffeekonsum auf. Während SM(OH)x:y in der Literatur beschrieben wird, ist SM(OH,COOH)x:y kaum bekannt. Hier wird vermutet, dass SM(OH,COOH)x:y durch das Anhängen einer α-hydroxy-1,ω-dicarboxyl Fettsäure an das C2 des Sphingosins entstehen könnte. Von α-hydroxy-1,ω-dicarboxyl Fettsäuren wiederum berichten (Sonesson, Moll et al. 1993), dass sie als Komponenten der Zellwand von Legionellen fungieren. Da Sphingomyeline ebenfalls zu den Bestandteilen einer biologischen Membran gehören, stützt dies obige Theorie zur Entstehung von SM(OH,COOH)x:y. Dass sowohl SM(OH)x:y als auch SM(OH,COOH)x:y mit der Aufnahme von Kaffee assoziiert sind, könnte möglicherweise mit einem ebenfalls leicht erhöhten Cholesterin-Spiegel in Zusammenhang stehen, da Cholesterin Shingomyeline stabilisiert und verdichtet und somit die Bildung von Membranen fördert. Dies ist jedoch nur eine Vermutung und bedarf noch weiterer wissenschaftlicher Untersuchung. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit der Entstehung von SM(OH,COOH)x:y bestünde in einem radikalischen oxidativen Angriff eines Sauerstoffradikals auf eine Doppelbindung des Fettsäurerestes, bei dem die Carboxylgruppe am ω-Ende gebildet werden könnte. Somit würde SM(OH,COOH)x:y dann als Radikalfänger fungieren und möglicherweise das Krebsrisiko vermindern. Dass Sphingomyeline Cholesterin vor einer Oxidation schützen können, wird zwar von (Sargis and Subbaiah 2006) berichtet, der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt.

Die Bedeutung der Sphingomyeline in Bezug auf Kaffeekonsum lässt also noch viele Fragen offen und bietet ein interessantes Thema für weitere Forschungen, beispielsweise im Rahmen des geplanten Metabolomics-Projekts für die KORA Follow-up-Studie F4.

4 Metabolomics am Modellorganismus Rind

Rinder eignen sich besonders gut zur Untersuchung der Regulationsmechanismen bei Nahrungsaufnahme und Verdauung. Zwar werden für Ernährungs- und Stoffwechsel-experimente meistens Nager, wie z.B. Ratten, herangezogen (Gallaher 1992), in mancher Hinsicht sind sich Rind und Mensch jedoch ähnlicher als Ratte und Mensch. Beispielsweise besitzen Mensch und Rind ähnliche zirkadiane Muster in der Nahrungsaufnahme, eine vergleichbarere Körpermasse und somit Metabolisierungsrate als Mensch und Nager, sowie eine sich entsprechende Anzahl an Nachkommen pro Geburt. Darüber hinaus weisen die Genome von Mensch und Rind eine höhere Kollinearität und eine größere Sequenzhomologie auf als die Genome von Maus und Mensch (Gibbs, Weinstock et al. 2003). Regulationsmechanismen hinsichtlich der Nahrungsaufnahme könnten somit zwischen dem Menschen und größeren Tieren wie dem Rind stärker konserviert sein, da unterschiedlicher evolutionärer Druck zu einer Divergenz in der Nahrungs- und somit Energieaufnahme besonders zwischen kleinen und großen Tieren führte. Wie *Speakman, Stubbs et al. 2002* vermuten, ist speziell für kleine Tiere ein System von Vorteil, das die Körpermasse strikt innerhalb bestimmter Grenzen hält. Sie sind einerseits aufgrund ihrer geringen Körpermasse anfällig für Hungerperioden, andererseits hängt ihr Risiko, Beute von Räubern zu werden, stärker von ihrer Körpermasse ab, als dies bei großen Tieren der Fall ist. Die Gefahr durch Räuber bewirkte zusätzlich, dass sich Nager zu nachtaktiven Tieren entwickelten, was wiederum die Divergenz zwischen menschlicher Nahrungsaufnahme und der von Nagern erhöht.

Obwohl auch Rind und Mensch deutliche Unterschiede in der Nahrungsaufnahme und Verdauung aufweisen, so scheinen doch die grundlegenden Mechanismen über die Spezies-Grenzen hinweg konserviert geblieben zu sein. Dadurch bietet das Rind die Möglichkeit, diese Vorgänge zu studieren und Rückschlüsse auf die Regulierung von Nahrungsaufnahme und Verdauung des Menschen zu ziehen (Allen, Bradford et al. 2005). Schon seit je her fokussierte sich die Erforschung der Physiologie des Rinds hauptsächlich auf komplexe, polygenische Merkmale (Gibbs, Weinstock et al. 2003). Da die mit der Nahrungsaufnahme verbundenen Krankheiten des Menschen, wie z.B. Fettleibigkeit, oft polygenen Ursprungs sind (Challis and Yeo 2002), bietet das Rind auch in dieser Hinsicht Vorteile. Mausmodelle, die meist monogen vererbte Erkrankungen aufweisen, können dagegen oft nur zur Untersuchung des Defekts eines einzelnen Mechanismus verwendet werden.

4.1 Nahrungsaufnahme und Verdauung

Rinder besitzen vier verschiedene Mägen, von denen drei – Pansen, Netzmagen und Blättermagen – als Vormägen dienen (Abb. 31). Die aufgenommene Nahrung gelangt zuerst in den Pansen, wo Zellulose mit Hilfe von Bakterien zu Essigsäure sowie Kohlenhydrate zu den flüchtigen Fettsäuren Propion- und Buttersäure abgebaut werden. Die Proteine aus der Nahrung werden zu Ammoniak umgewandelt, welches von den Bakterien zur Bildung der für das Rind lebensnotwendigen Aminosäuren verwendet wird (Allen, Bradford et al. 2005). Lipide durchlaufen im Pansen zwei wichtige Transformationen: Die Hydrolyse, die die Lösung von Esterbindungen und damit die Abspaltung der freien Fettsäuren von Lipiden bewirkt, sowie die Biohydrogenation. Die Aufgabe der Biohydrogenation ist es, unter Mitwirkung von Bakterien die Anzahl der Doppelbindungen in den freien Fettsäuren zu reduzieren und in eine gesättigtere Form zu bringen (Jenkins 1993; Bauman, Perfield et al. 2003). Es werden im Pansen jedoch nicht nur die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide abgebaut, sondern auch neue Fettsäuren synthetisiert. Diese Synthese wird ebenfalls von Bakterien durchgeführt, wobei hauptsächlich gesättigte und monoungesättigte, aber keine polyungesättigten Fettsäuren entstehen. Die Mehrzahl der so gebildeten Fettsäuren wird anschließend in Phospholipide integriert (Jenkins 1993; Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition et al. 2001). Der Netzmagen schiebt durch Kontraktionen die angedaute Nahrung zurück ins Maul, wo sie gut durchgekaut wird. Ist sie genügend zerkleinert, so wird diese

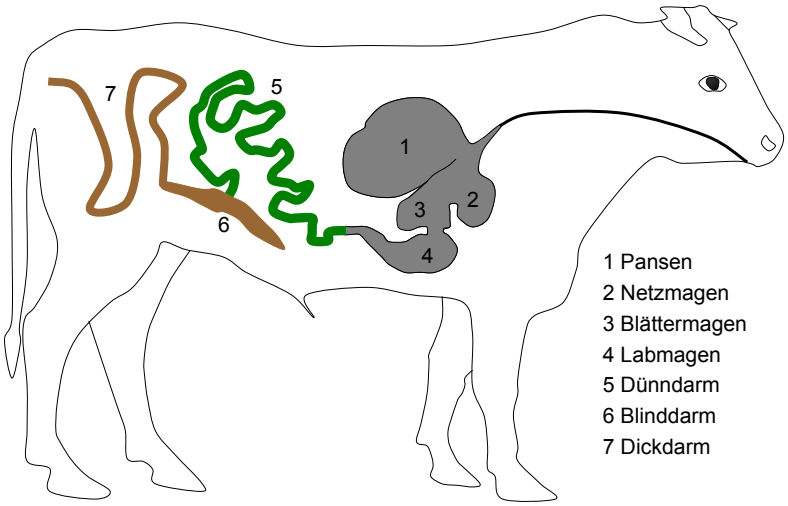


Abb. 31: Schematische Darstellung der Verdauungsorgane des Rindes.

Masse vom Netzmagen zum Blättermagen befördert, wo ihr hauptsächlich die Feuchtigkeit entzogen wird. Der letzte der vier Mägen, der Labmagen, gilt als eigentlicher Magen, der, ebenso wie der anschließende Dünn- und Dickdarm, dieselbe Funktion wie bei einem Nicht-Wiederkäuer übernimmt.

Die Größe dieses Verdauungsapparates und die Langsamkeit, mit der die Nahrungsmasse diesen passiert, bewirken eine gleichmäßige Aufnahme der Nährstoffe. Dies ermöglicht wiederum eine bessere Beobachtung der Verdauungsmechanismen, als dies bei Nicht-Wiederkäuern, wie z.B. Nagern, der Fäll wäre (Allen, Bradford et al. 2005).

4.2 Datensatz

Der in dieser Arbeit verwendete Datensatz wurde im Rahmen des Projekts FUGATO/QuaLIPID erstellt, das die Identifizierung von produktqualitätsrelevanter DNA-Variation in Rind und Schwein als Ziel hat und sich hierfür besonders auf den Lipidstoffwechsel konzentriert.

Weltweit werden Rinder entweder hinsichtlich ihrer Milch- oder ihrer Fleischproduktion gezüchtet, so dass sich zwei verschiedene Rinder-Typen entwickelten, die sich im Bezug auf diese Merkmale phänotypisch stark unterscheiden. Milchrassen bieten den Vorteil, dass sie Hauptnährstoffe wie Kohlenhydrate, Fette und Proteine in ihre Milch abgeben und werden somit der Kategorie Sekretionstyp zugeordnet. Dagegen zeichnen sich Fleischrassen durch das Ansetzen des Futters als Muskelfleisch aus und werden daher als Ansatztyp bezeichnet. Die Gründe für diese unterschiedliche Futterauswertung sind bisher unbekannt. Sie herauszufinden ist jedoch von größter Wichtigkeit für die Zucht, da ein möglichst effizienter Einsatz des Futters angestrebt wird.

Als Vertreter des Sekretionstyps wurde das Deutsche Holstein-Rind ausgewählt. Dieses schwarz-weiß oder rot-weiß gefleckte Rind ist für seine außerordentlich hohe Milchleistung bekannt und wird weltweit am häufigsten gezüchtet. Sein Ursprung liegt in den beiden niederländischen Provinzen Nordholland und Friesland.

Für den Ansatztyp fiel die Entscheidung auf das Charolais-Rind, das aus den französischen Provinzen Charolles und Nievre stammt. In Frankreich wurden die Rinder lange Zeit nach Größe und Muskelwachstum selektiert, so dass mit den Charolais eine der besten Fleischrassen entstand, die heute in mehr als 60 Ländern verwendet wird.

Als relevant für die Auswahl der beiden Rassen Deutsches Holstein und Charolais galt, dass beide eine ähnliche Größe besitzen und ungefähr im gleichen Alter geschlechtsreif werden. Zusätzlich unterscheiden sich die beiden Rassen größtmöglich in Hinblick auf das Zuchtziel Milch bzw. Fleisch (Kühn, Bellmann et al. 2002).

Um ein geeignetes Tiermodell für genetische und physiologische Untersuchungen zu erzeugen, wurden Charolais-Bullen mit Deutschen Holstein-Kühen gekreuzt und somit F_2-Familien generiert (Abb. 32, Abb. 33).

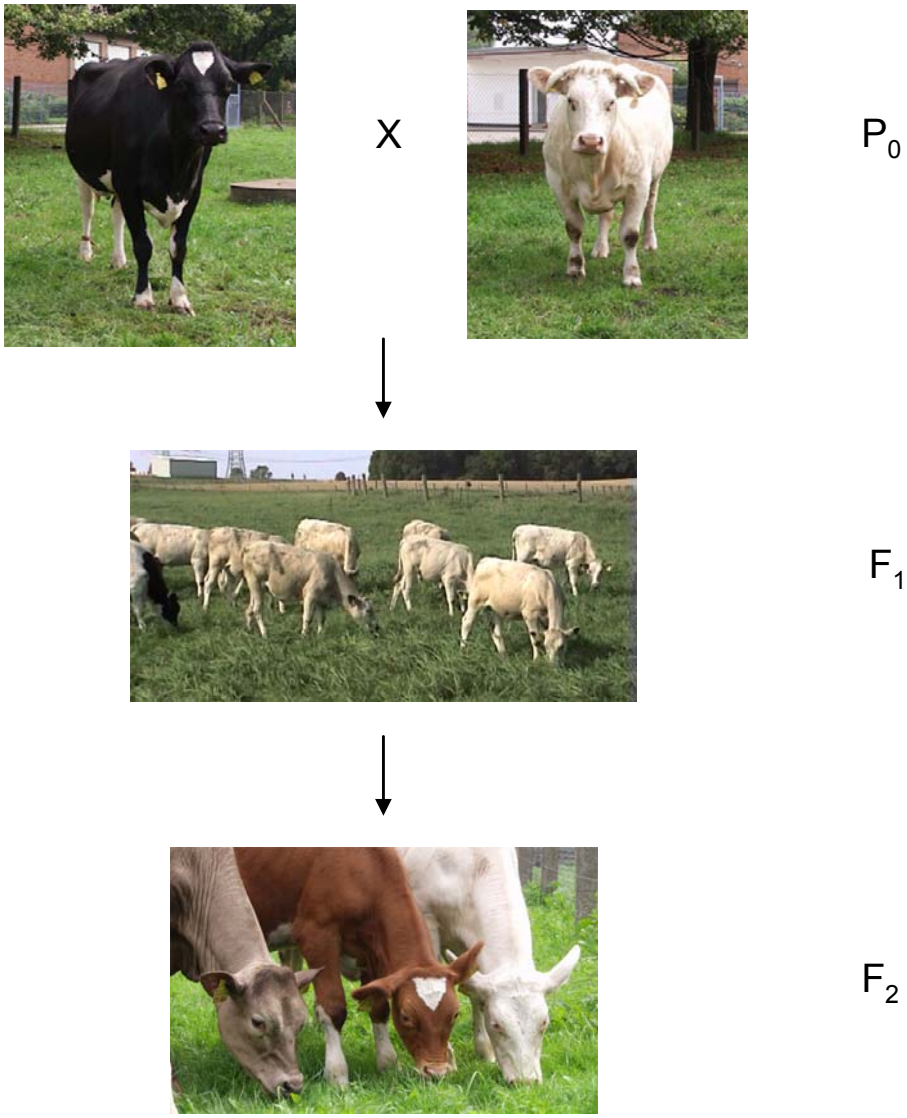


Abb. 32: Tiere der Parental-, F_1- und F_2- Generation; die Parentalgeneration besteht aus Holstein-Friesen (links) und Charolais (rechts); Foto: Christa Kühn.

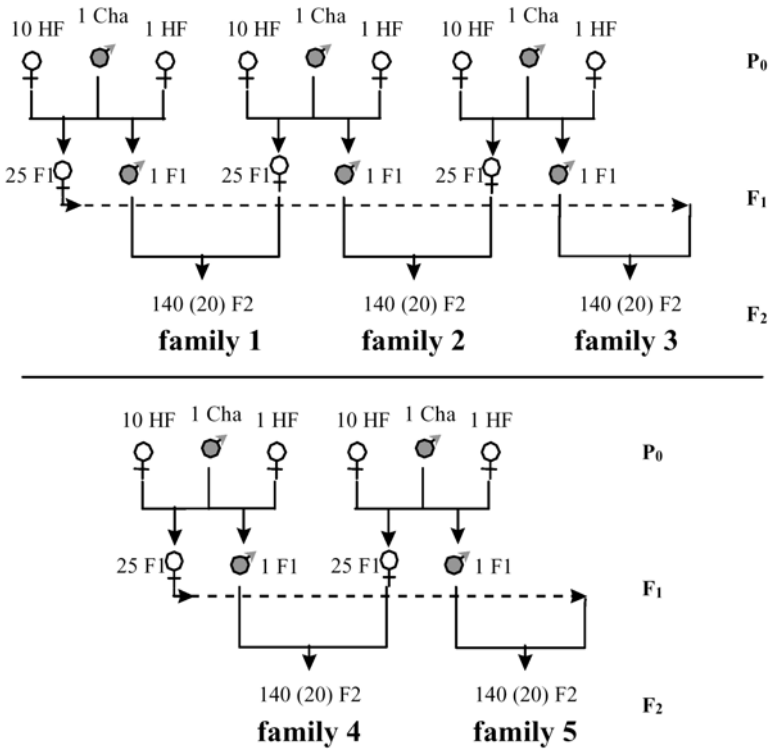


Abb. 33: Anpaarungsstruktur zur Erzeugung der F_2-Generation; HF: Holstein-Friesen; Cha: Charolais (Kühn, Bellmann et al. 2002).

Aus dieser F_2-Generation wurde für den hier verwendetetn Datensatz eine Gruppe von 156 männlichen Rindern im Alter von neun Monaten ausgewählt. Für bessere Vergleichsmöglichkeiten wurde der Datensatz um drei Gruppen erweitert: 11 männliche Rinder im Alter von höchstens drei Monaten, 12 mindestens 14 Monate alte ebenfalls männliche Rinder und 18 laktierende Milchkühe.

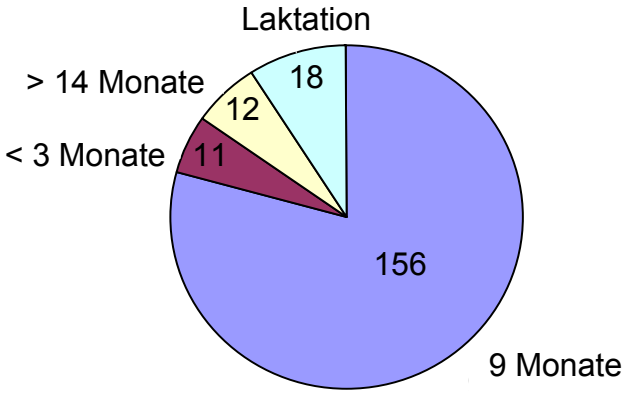


Abb. 34: Zusammensetzung des Datensatzes aus unterschiedlich alten männlichen Rindern und laktierenden Kühen.

Im Plasma wurden durch *Biocrates Life Sciences GmbH* folgende 228 Metabolite gemessen: 18 Aminosäuren, 52 reduzierende Mono-, Di- und Oligosaccharide, 27 Acylcarnitine (C*x:y*), 12 Hydroxylacylcarnitine (C(OH)*x:y*) und 10 Dicarboxylacyl-carnitine (C*x:y*-DC), freies Carnitin (C0), acht biogene Amine, fünf Prostaglandine und 95 Lipide. Diese Lipide unterteilen sich in 16 Sphingomyeline (SM*x:y*) und N-Hydroxyl-acyloylsphingosyl-Phosphocholine (SM(OH)*x:y*), sowie 79 Glycero-Phosphatidylcholine (PC).

4.3 Datenanalyse

Die Analyse des Datensatzes konzentriert sich hier auf mögliche Unterschiede im metabolischen Profil zwischen den Kälbern und den über 14 Monate alten Rindern. Dazu wurden, wie schon für die Auswertung der diabetischen Mäuse in Kapitel 2.4, für alle möglichen Paare von Metaboliten die Quotienten ihrer Konzentrationen berechnet. Auf diesen Daten wurde anschließend ein T-Test für die beiden Rinder-Gruppen durchgeführt, einmal mit der Annahme, dass die Varianzen der beiden Gruppen gleich sind (p-value (eq)) und einmal ohne diese Annahme (p-value (ne)). Um pro Metaboliten-Quotient feststellen zu können, inwieweit sich die Konzentrationen der beiden Gruppen durchschnittlich unterscheiden, wird zusätzlich die Differenz der beiden Mittelwerte, normiert durch den Gesamtmittelwert, angegeben (change). Der Informationsgewinn, den die Verwendung der Quotienten mit sich bringen kann, wurde analog zu Kapitel 2.4 berechnet.

4.4 Ergebnis

4.4.1 Überblick

Für den hier vorgestellten Rinder-Datensatz wurde eine Vielzahl von Metaboliten gemessen, zu denen Aminosäuren, Saccharide, Acylcarnitine und Lipide gehören. Eine Auswahl der konzentrationsmäßig am häufigsten auftretenden Metabolite wird in Abb. 35 gezeigt.

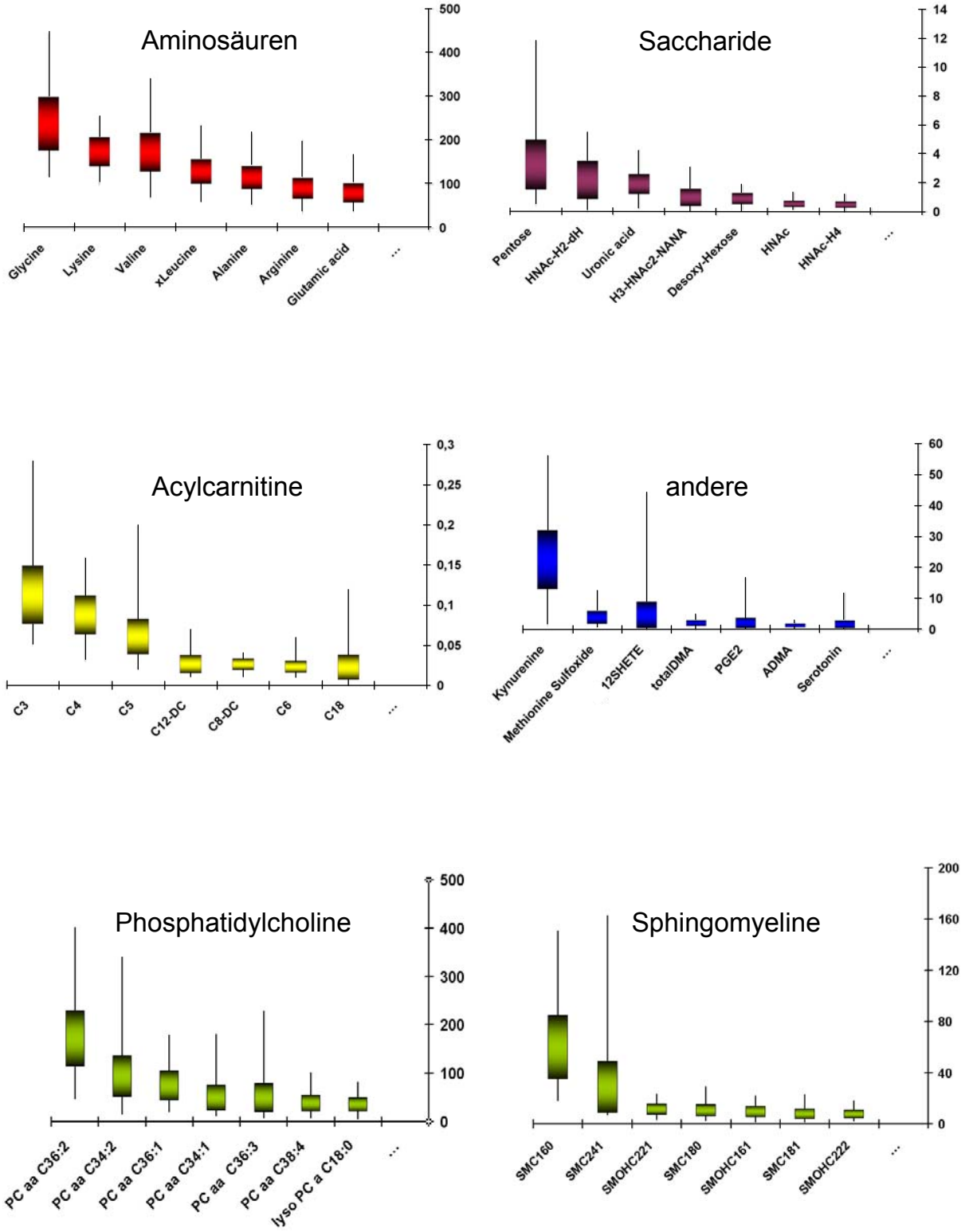


Abb. 35: Auswahl der konzentrationsmäßig am häufigsten auftretenden gemessenen Metabolite und ihre Plasmakonzentrationen [µM]; sortiert nach dem Mittelwert.

Um die Reproduzierbarkeit der Daten durch die verwendete Messmethode zu überprüfen, wurde für eine Probe ein Duplikat zusammen mit den übrigen Proben gemessen. Das dazu

verwendete Maß für die Reproduzierbarkeit wurde für die beiden identischen Proben x1 und x2 je Metabolit wie folgt definiert:

$$\frac{\textit{normalisierte Differenz der Duplikate}}{\textit{normalisierte Standardabweichung}} = \frac{\frac{|x1 - x2|}{(x1 + x2)/2}}{\frac{\sigma}{\bar{x}}}$$

Das Maß der Reproduzierbarkeit wurde in Abb. 36 für alle Aminosäuren aufgetragen. Diese Abbildung zeigt, dass alle Werte weit unter der Grenze von Eins liegen, so dass für diese Metabolitengruppe auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Daten geschlossen werden kann.

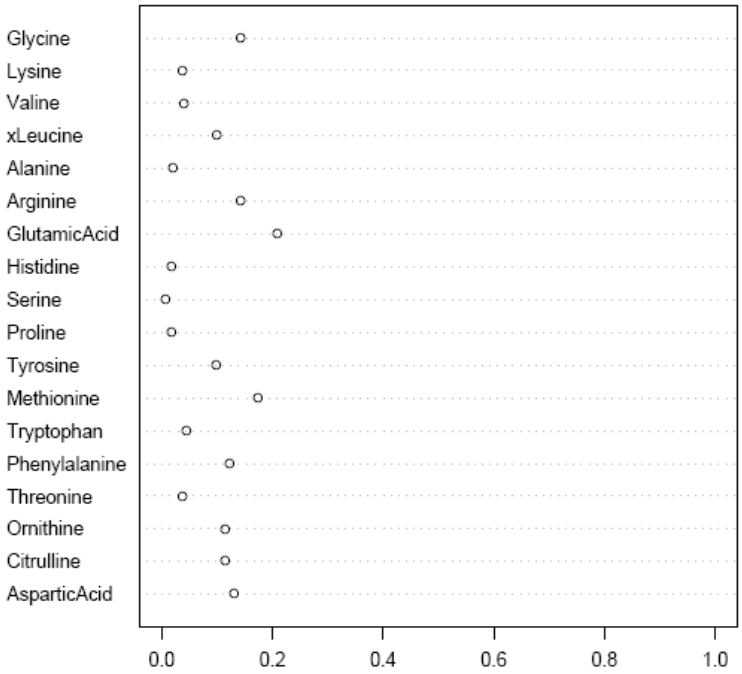


Abb. 36: Maß der Reproduzierbarkeit für alle Aminosäuren.

Der Datensatz besteht aus vier verschiedenen Gruppen von Rindern: Kälber (< 3 Monate), 9 Monate und mehr als 14 Monate alte Rinder, sowie laktierende Kühe. Diese Gruppen-Unterschiede lassen sich auch im metabolischen Profil der Rinder deutlich erkennen. Vor allem die Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin, Valin und Arginin zeigen beispielhaft die großen Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 37). Auch die Glycero-Phosphocholine und Sphingomyeline, für die als Beispiele die Metabolite mit der höchsten

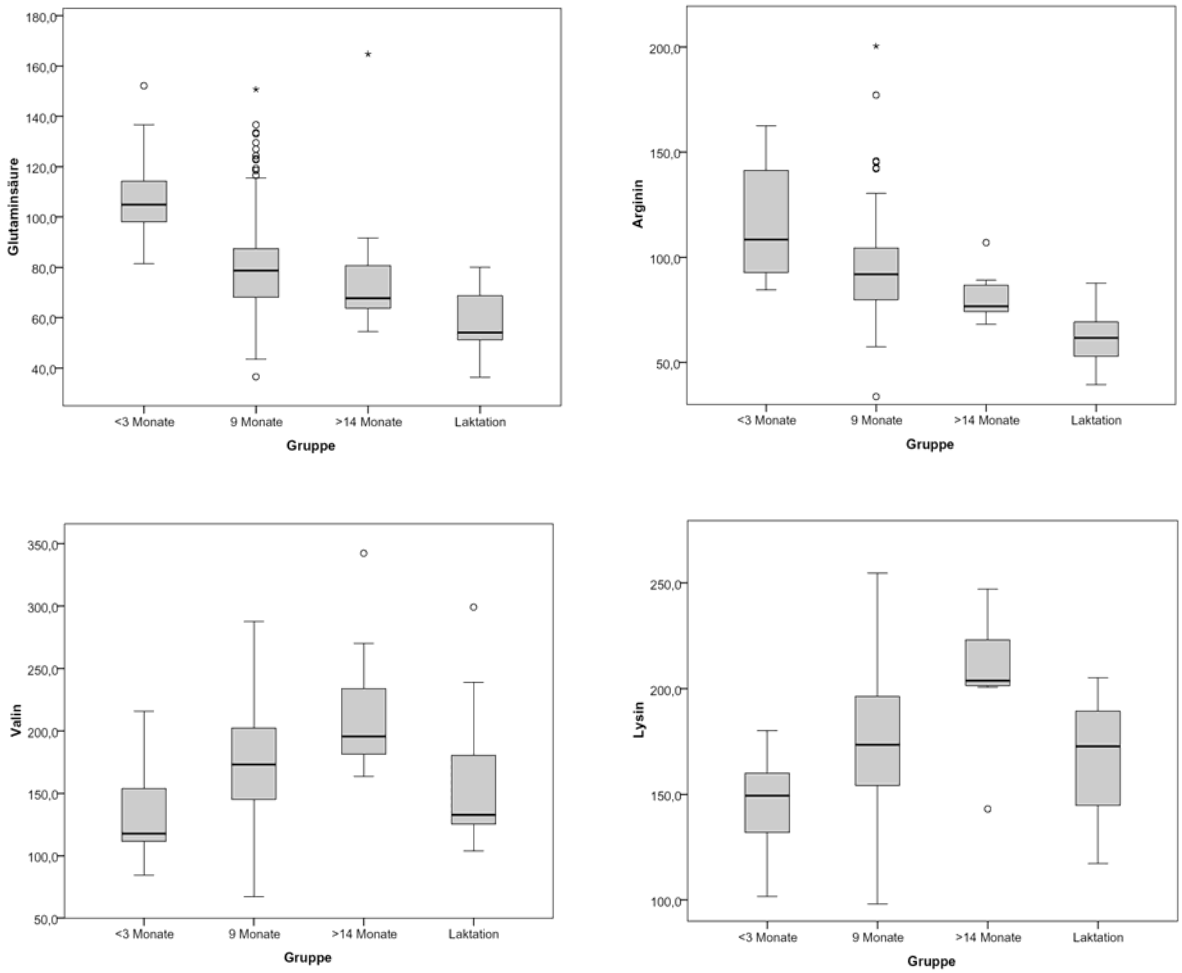


Abb. 37: Plasmakonzentrationen [µM] der Amonisäuren Glutaminsäure, Arginin, Valin und Lysin.

Konzentration in Abb. 38 und Abb. 39 gezeigt werden, weisen diese Unterschiede auf. Unter den Sphingomyelinen fällt auf, dass die Plasmakonzentration der N-Hydroxyl-acyloylsphingosyl-Phosphocholine (SM(OH)*x:y*) mit zunehmendem Alter der Rinder wächst. Für die Sphingomyeline, deren Fettsäurerest keine Hydroxylgruppe (SM*x:y*) besitzt, lässt sich bezüglich des Alters kein Trend feststellen. Betrachtet man dagegen den Quotienten der Konzentrationen von SM(OH)*x:y* und SM*x:y*, so wird der Unterschied zwischen Kälbern und ausgewachsenen Rindern noch deutlicher als im Falle der einzelnen Metabolitenkonzentrationen (Abb. 40).

Diese Ergebnisse lassen also einen klaren Bezug der Metabolitenprofile zum jeweiligen Phänotyp erkennen, und bieten den Ausgangspunkt für weitere Forschung seitens der Tierzuchtwissenschaft.

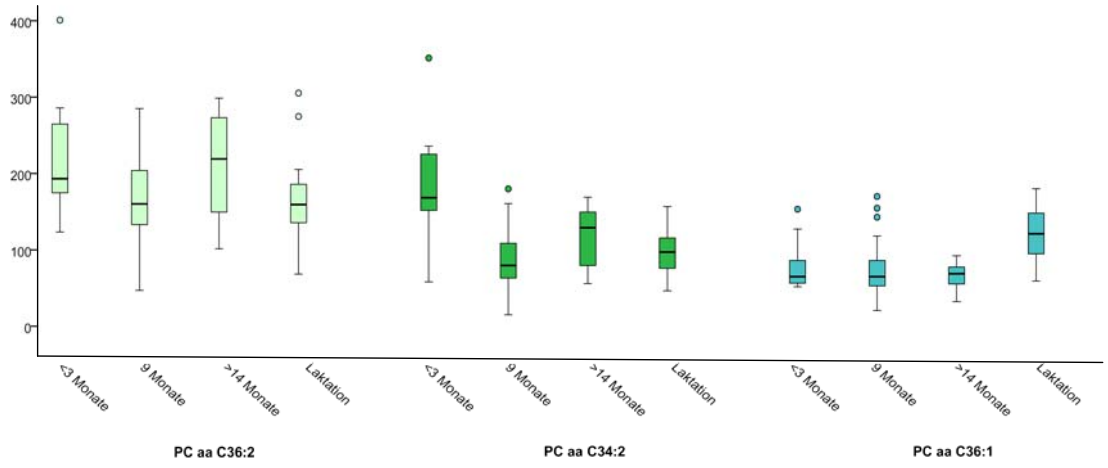


Abb. 38: Plasmakonzentrationen [µM] einiger Glycero-Phosphocholine; sortiert nach häufigstem Auftreten im Datensatz.

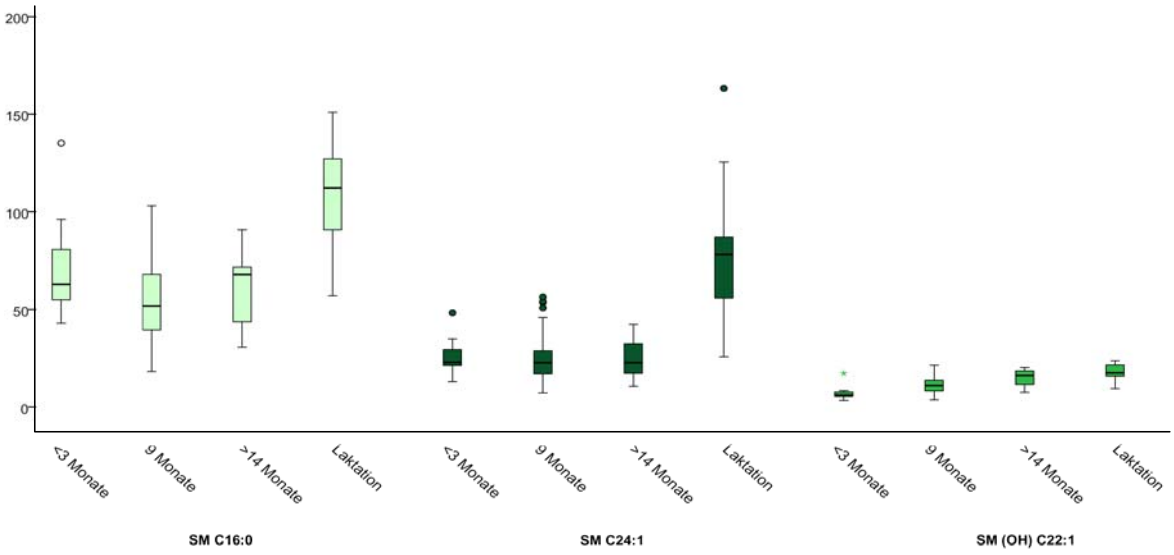


Abb. 39: Plasmakonzentrationen [µM] einiger Sphingomyeline; sortiert nach häufigstem Auftreten im Datensatz.

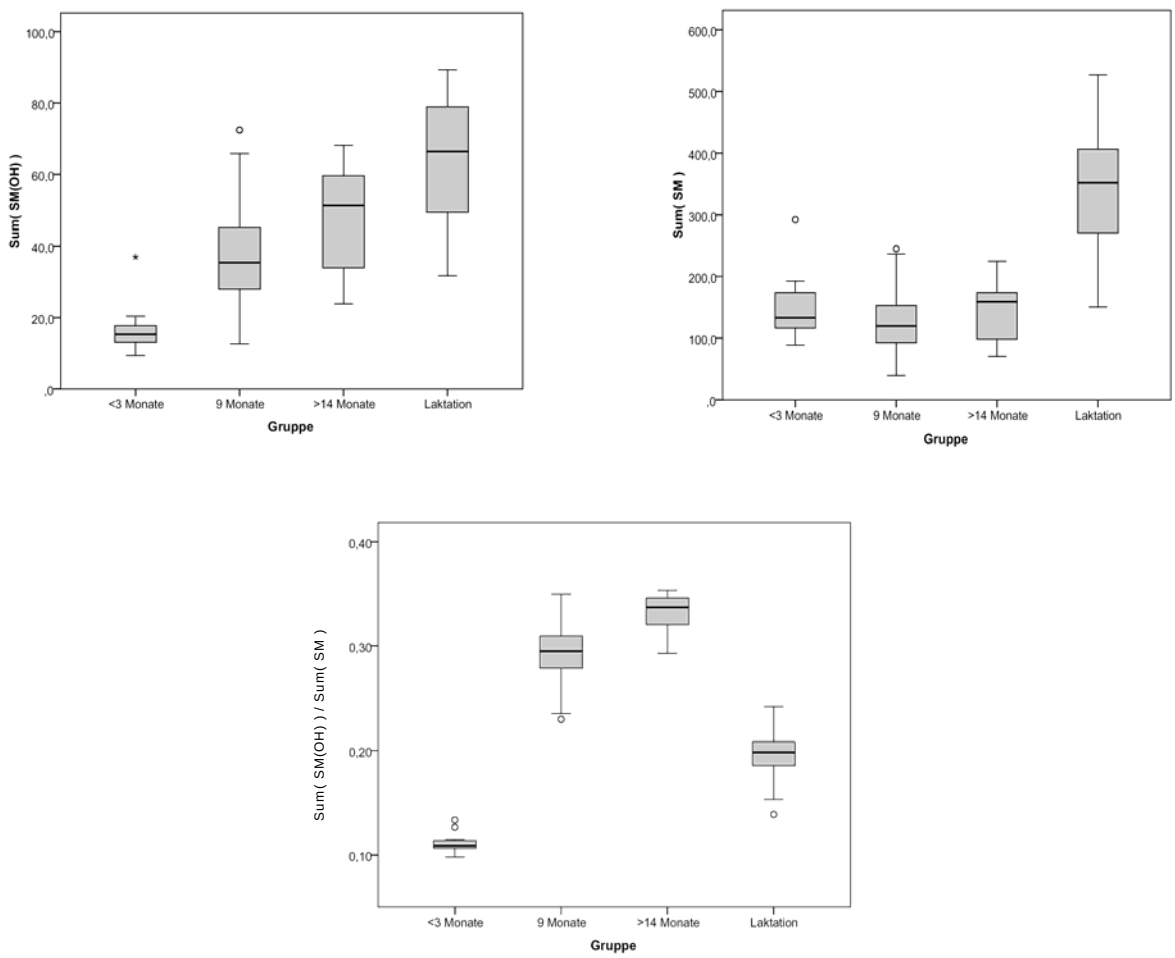


Abb. 40: Plasmakonzentrationen [µM] der N-Hydroxylacyloylsphingosyl-Phosphocholine (SM (OH)*x:y*) und der Sphingomyeline (SM*x:y*) – obere Reihe – und der Quotient beider Konzentrationen – untere Reihe.

4.4.2 Phospholipide und der Verdauungsapparat des Kalbs

Der Zusammenhang zwischen Metabolitenprofil und Phänotyp soll nun an einem konkreten Beispiel gezeigt werden. Für den vorliegenden Datensatz wurde mittels oben beschriebener Datenauswertung der Unterschied in den Metaboliten-Profilen zwischen männlichen Kälbern und ebenfalls männlichen mehr als 14 Monate alten Rindern analysiert. Der dazu verwendete T-Test liefert p-values mit Werten bis zu 9,2E-20 (Tab. 11), welche also auch nach einer Korrektur für multiples Testen hochsignifikant sind.

Unter den signifikantesten Ergebnissen des T-Tests befinden sich vor allem Quotienten aus Glycero-Phosphocholinen (PC). Aus diesen ist mit Hilfe der normierten Differenz der Mittelwerte („change“) abzulesen, dass zum einen das Verhältnis von PCs mit langen

Fettsäureresten zu PCs mit kürzeren Fettsäureresten bei den Kälbern kleiner ist als bei den älteren Rindern. Abb. 41 zeigt dies am Beispiel des Quotienten PCaeC40:5/PCaaC38:5.

Metaboliten-Quotienten	p-value	q-value	change	p_gain
PC ae C40:4 / PC ae C40:6	9,2E-20	2,7E-15	-1,40	5,86E+13
SM (OH) C16:1 / PC aa C38:6	1,8E-18	1,6E-14	-1,72	1,64E+11
PC ae C40:5 / PC aa C38:5	2,3E-18	1,6E-14	-1,26	8,50E+13
PC aa C36:4 / PC ae C36:2	2,7E-18	1,6E-14	1,59	1,19E+12
SM (OH) C14:1 / PC aa C36:4	2,8E-18	1,6E-14	-1,32	1,43E+12
SM C24:0 / SM (OH) C24:1	4,0E-18	1,6E-14	1,06	2,23E+12
PC ae C36:1 / PC aa C36:1	4,6E-18	1,6E-14	-1,16	2,75E+11
PC ae C38:4 / PC aa C38:6	4,8E-18	1,6E-14	-1,55	6,14E+10
PC aa C40:5 / PC aa C40:6	4,8E-18	1,6E-14	-1,22	1,73E+10
PC ae C40:4 / PC aa C38:5	6,1E-18	1,7E-14	-1,61	8,78E+11
PC ae C32:2 / PC aa C32:0	6,5E-18	1,7E-14	-1,47	6,95E+10
SM (OH) C14:1 / PC aa C38:6	7,7E-18	1,9E-14	-1,61	3,88E+10
PC aa C34:1 / SM (OH) C14:1	8,9E-18	2,0E-14	1,60	4,59E+11
PC ae C36:1 / PC aa C34:1	9,9E-18	2,1E-14	-1,50	1,28E+11
PC ae C38:3 / PC aa C38:6	2,3E-17	4,5E-14	-1,51	1,29E+10
PC ae C38:1 / PC aa C34:1	3,4E-17	6,4E-14	-1,31	1,50E+11

Tab. 11: Ergebnisse des T-Tests; es sind p- und q-value angegeben, sowie die normierte Differenz der beiden Mittelwerte (change) und der Informationsgewinn; angezeigt werden die Ergebnisse mit dem besten p-value.

Bei fast allen dieser PC-Quotienten unterscheidet sich die Anzahl der Kohlenstoffatome in den Fettsäureresten zwischen den beiden PCs nur um zwei. Während der Elongation von Fettsäuren werden in der Regel zwei C-Atome angehängt, so dass angenommen werden kann, dass der Unterschied in der Anzahl der Kohlenstoffatome durch die Elongation (oder auch Verkürzung) einer der beiden Fettsäuren des PCs bewirkt wird. Durch das integrieren von Fettsäuren in PCs gelten diese als Indikator für die Zusammensetzung der Fettsäurevorkommen im jeweiligen Gewebe, so dass angenommen werden kann, dass Kälber eine höhere Konzentration an kürzeren Fettsäuren besitzen als ältere Rinder.

Zum andern fällt auf, dass bei Kälbern das Verhältnis von PCs mit weniger ungesättigten Fettsäureresten zu solchen mit höher ungesättigten Fettsäureresten kleiner ist als bei den ausgewachsenen Rindern (Abb. 42). Das bedeutet, dass Kälber mehr höher ungesättigte Fettsäuren in ihrem Plasma besitzen als ältere Rinder.

Beide Phänomene kombiniert findet man im Quotienten PC ae C40:4 / PC aa C38:5 (Tab. 11), der mit -1,61 den stärksten „change“-Wert unter den aufgeführten PC-Quotienten aufweist.

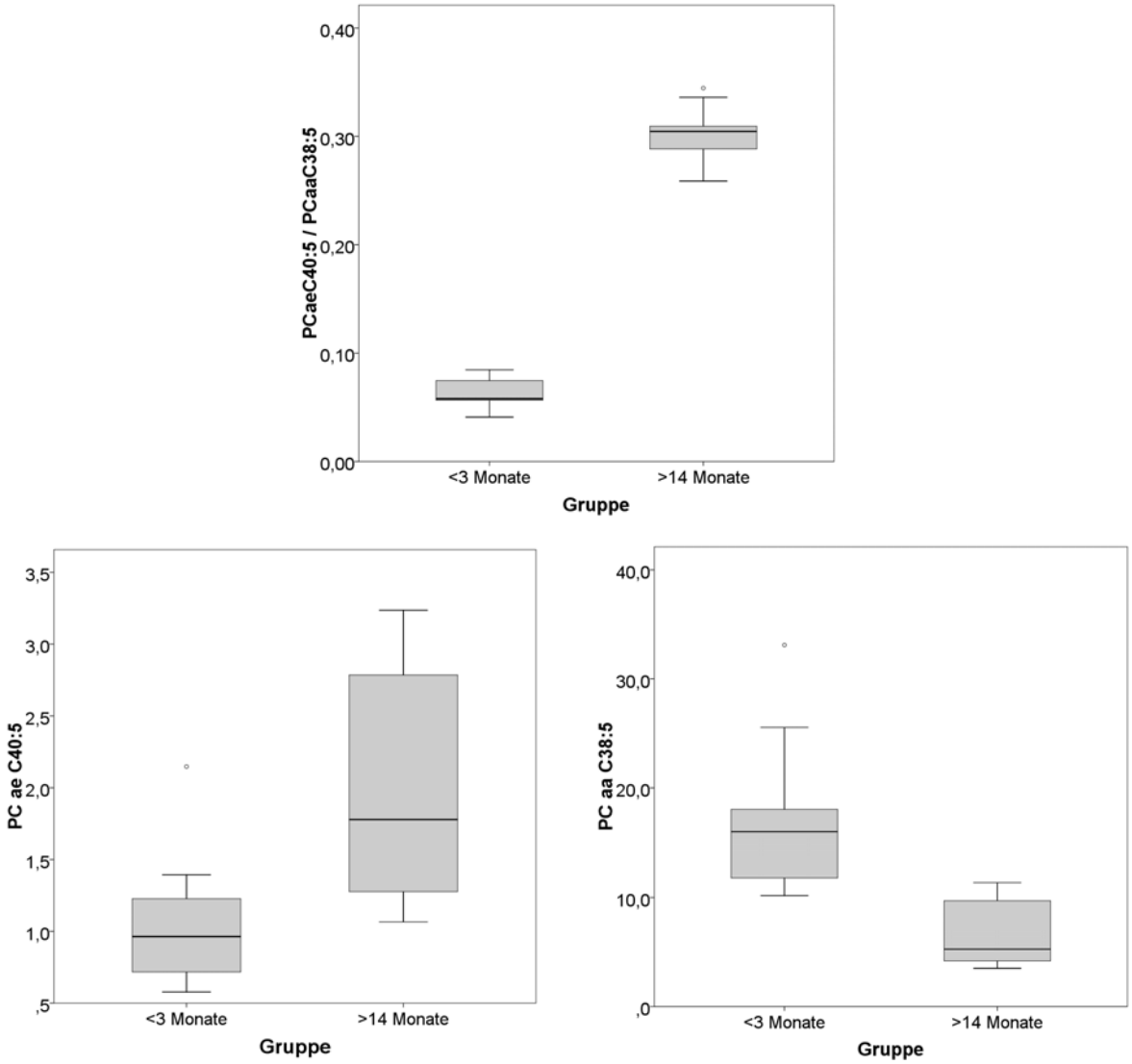


Abb. 41: Plasmakonzentrationen [µM] der Glycero-Phosphocholine PCaeC40:5 und PCaaC38:5 – untere Reihe – und der Quotient beider Konzentrationen – obere Reihe.

Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Lipidkonstellation lässt sich finden, wenn man den Verdauungsapparat des Kalbes mit dem des ausgewachsenen Rindes vergleicht. Beim Kalb sind Pansen, Netz- und Blättermagen noch unentwickelt und weitgehend funktionslos (Warner, Flatt et al. 1956; Tamate, McGilliard et al. 1962). Es kann also als monogastrisch bezeichnet werden, da es gleich Nicht-Wiederkäuern nur einen funktionierenden Magen, den Labmagen, besitzt. Dadurch entfällt die Biohydrogenation, die bei ausgewachsenen Rindern im Pansen stattfindet und durch die Doppelbindungen aus den Fettsäuren entfernt werden (Garton 1967). Zusätzlich entfällt die Produktion von gesättigten und monoungesättigten Fettsäuren durch Bakterien des Pansen und deren Einbau in Phospholipide, so dass auch dadurch der Anteil an PCs mit gesättigten oder niedrig ungesättigten Fettsäuren sinkt. Dass Kälber trotz des Wegfalls der Pansen-Aktivität und somit der Aufspaltung von Lipiden hohe Milchfettsäurekonzentrationen verdauen und

nutzen können, liegt an einer Kombination von prägastrischen Esterasen im Labmagen. Diese Esterasen hydrolysiern ca. 20% aller Esterbindungen der Lipide und spalten dabei hauptsächlich kurzkettige Fettsäuren ab (Hill, Noakes et al. 1970; Pitas and Jensen 1970; Toothill, Thompson et al. 1976; Bondi 1987).

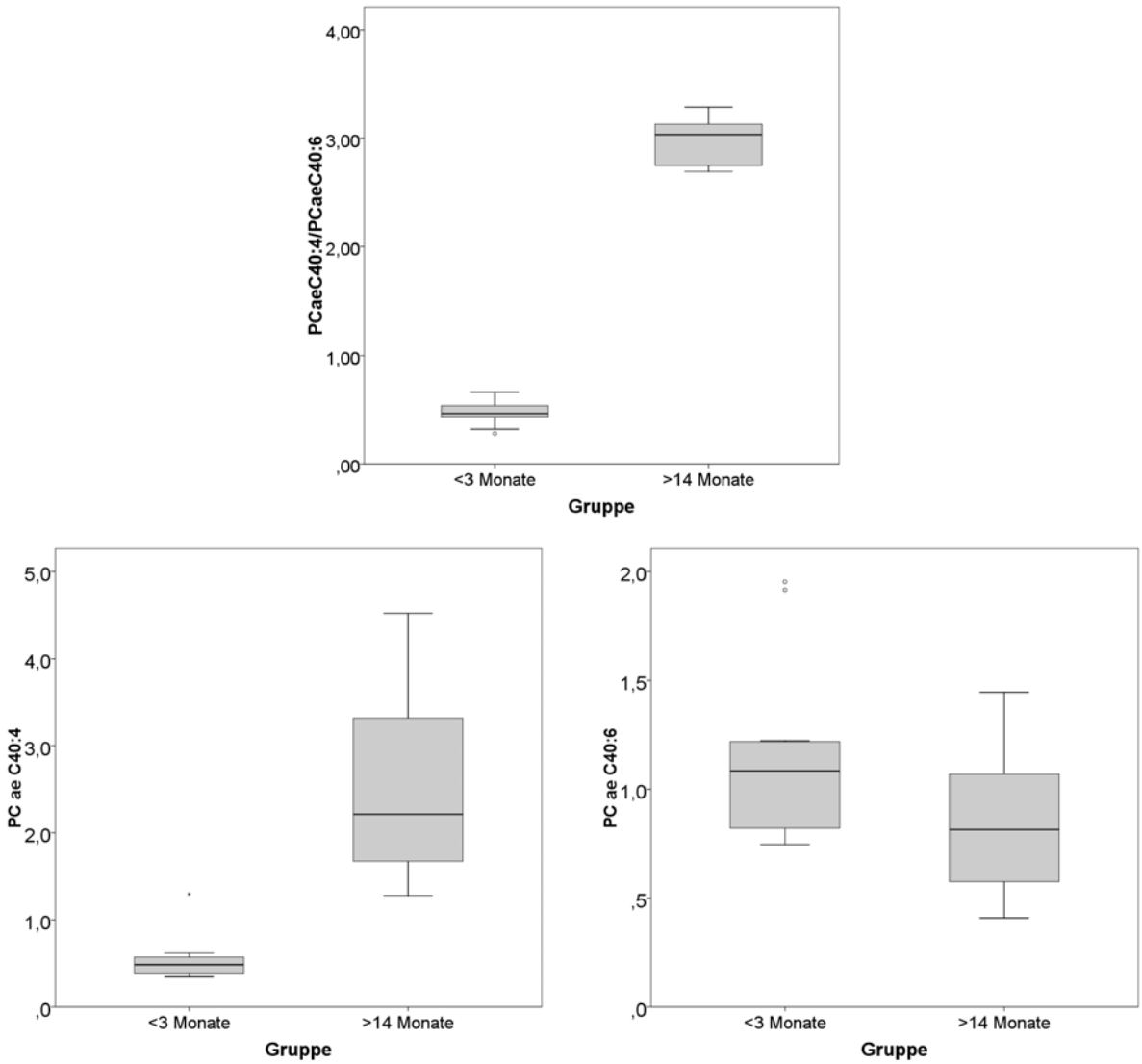


Abb. 42: Plasmakonzentrationen [µM] der Glycero-Phosphocholine PCaeC40:4 und PCaeC40:6 – untere Reihe – und der Quotient beider Konzentrationen – obere Reihe.

Dies könnte eine mögliche Erklärung für das erhöhte Auftreten von PCs mit kurzkettigen Fettsäuren bei Kälbern bieten. Zusätzlich könnte dieses Phänomen durch eine noch eingeschränkte Aktivität der Elongasen verursacht werden, so dass die Verlängerung der absorbierten Fettsäuren noch nicht richtig funktioniert.

Die beschriebenen Unterschiede im Verhältnis der Konzentrationen verschiedener Glycero-Phosphocholine zueinander sind demnach wahrscheinlich auf den noch nicht voll funktionsfähigen Verdauungsapparat des Kalbes zurückzuführen.

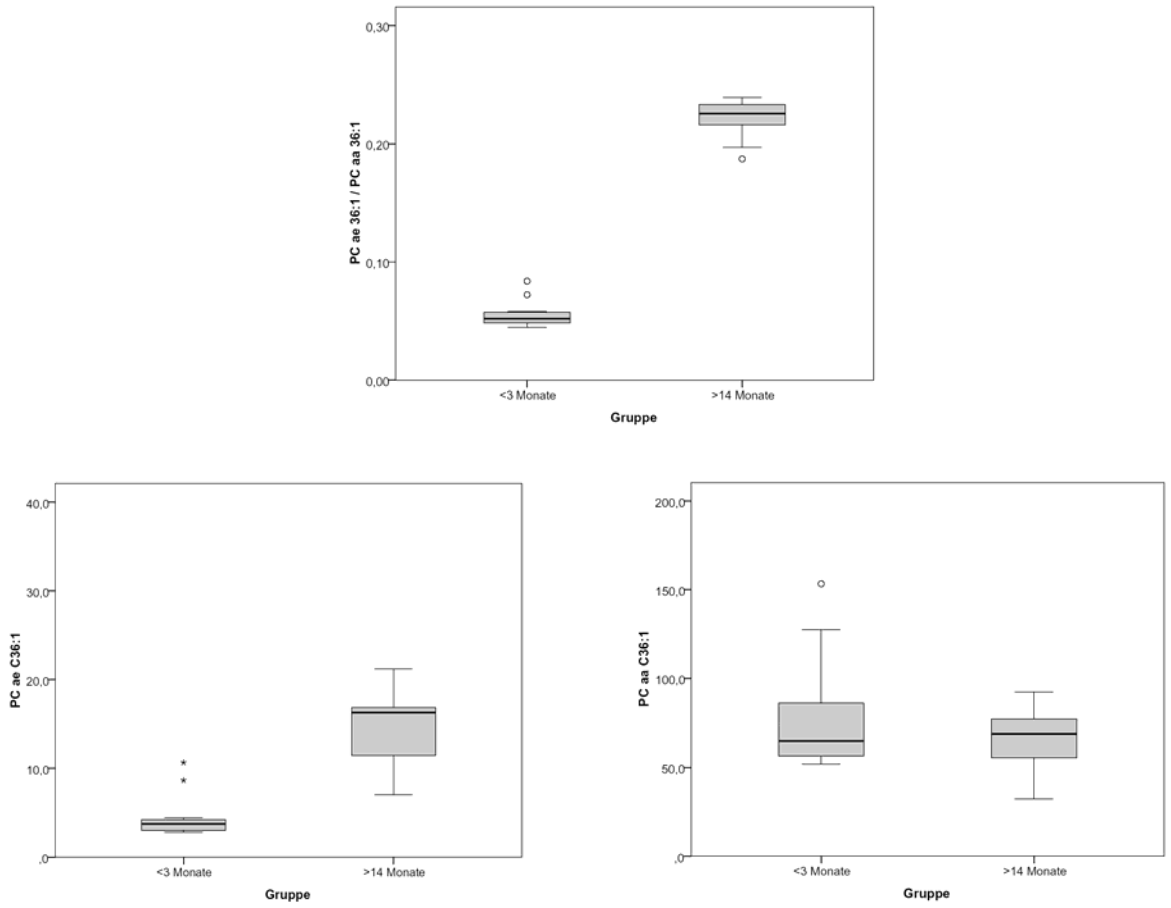


Abb. 43: Plasmakonzentrationen [µM] der Glycero-Phosphocholine PCaeC36:1 und PCaaC36:1 – untere Reihe – und der Quotient beider Konzentrationen – obere Reihe.

Zusätzlich fällt auf, dass sich das Verhältnis von Glycero-Phosphatidylcholinen mit einer Ester- und einer Etherbindung zu PCs mit zwei Esterbindungen zwischen den beiden Altersklassen der Rinder stark unterscheidet. Der Quotient PC ae C36:1 / PC aa C36:1 lässt diesen Effekt deutlich sichtbar werden (Abb. 43). Das PC-Gleichgewicht ist bei den Kälbern offensichtlich von den PC_ae hin zu den PC_aa verschoben. Eine Erklärung dafür konnte bisher noch nicht gefunden werden, so dass noch weitere Nachforschungen in diesem Gebiet erforderlich sind.

4.5 Diskussion

Mit der Analyse des metabolischen Profils von Rindern wurde ein Tiermodell untersucht, das mit Hinsicht auf die Komplexität der äußeren Einflüsse zwischen Maus und Mensch einzuordnen ist. Einerseits unterliegen Rinder nicht den strengen Bedingungen einer

Laborhaltung, wie dies bei Mäusen der Fall ist, so dass sie stärker verschiedenen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Andererseits lassen sich viele Faktoren, wie z.B. die Futteraufnahme, durch die Stallhaltung sehr viel genauer kontrollieren als beim Menschen.

Die Analyse des hier verwendeten Datensatzes konzentrierte sich vor allem auf den Zusammenhang zwischen dem metabolischen Profil der Rinder und deren Alter. Dass ein solcher Zusammenhang auffindbar ist, konnte anhand von Beispielen für verschiedene Metabolitenklassen, wie Aminosäuren, Glycero-Phosphocholine und Sphingomyeline, gezeigt werden.

Besonderes Interesse galt dem Vergleich des Metaboliten-Profils von Kälbern mit dem von mehr als 14 Monate alten Rindern. Diese beiden Modelle bieten die Möglichkeit, gleichzeitig quasi-monogastrische und ruminierende Verhältnisse zu studieren. Dabei zeigte sich, dass Kälber mehr Glycero-Phosphatidylcholine mit mehrfach ungesättigten und zudem kürzeren Fettsäuren besitzen als ältere Rinder. Diese wiederum integrieren mehr langkettige Fettsäuren mit weniger Doppelbindungen in ihre PCs. Die höhere Anzahl an Doppelbindungen in den Fettsäuren des Kalbs kann durch den noch unterentwickelten Pansen und den damit verbundenen Ausfall der (Doppelbindung lösenden) Biohydrogenation von Lipiden erklärt werden. Zusätzlich entfällt die Produktion von gesättigten und monoungesättigten Fettsäuren und deren Einbau in Phospholipide durch Pansen-Bakterien. Das erhöhte Auftreten von kürzeren Fettsäuren (integriert in PCs) könnte möglicherweise auf der Aktivität der nur dem Kalb eigenen prägastischen Esterasen im Labmagen beruhen, die hauptsächlich kurzkettige Fettsäuren von Lipiden abspalten. Zusätzlich ließe sich vermuten, dass die Elongasen und damit das System zur Verlängerung von Fettsäuren beim Kalb ebenfalls noch nicht voll funktionsfähig sind.

Zur Auffindung dieser Ergebnisse wurden, wie schon in Kapitel 2, die Quotienten der Konzentrationen aller möglichen Paare von Metaboliten als Basis der automatischen und damit objektiven Analyse verwendet. Auch hier zeigt sich wieder das Potential von Metaboliten-Quotienten: Die Varianz innerhalb der einzelnen Gruppen wird stark reduziert, wodurch der Unterschied zwischen den Gruppen deutlicher hervortritt.

Die Verwendung von Rindern als Modellorganismus zeigt, dass eine metabolische Analyse nicht nur für die beiden Extreme Mensch und Maus gelingen kann, sondern auch für Organismen, die einem moderaten Umwelteinfluss ausgesetzt sind. Die Auswertung der Daten wird daher noch weiter fortgesetzt werden. Zum einen stehen weitere zuchtrelevante Parameter wie der intramuskuläre Fettgehalt, die Zunahme des Lebendgewichtes, sowie die Halb- und Vollgeschwister-Konstellationen in der F_2-Generation zur Verfügung.

Darüber hinaus wird die Studie durch ein Genotyping von ausgewählten SNPs komplettiert werden, so dass zusätzlich zur Analyse des Zusammenhangs von Metabotyp und Phänotyp signifikante Assoziationen zwischen Metabotyp- und Gen-Variationen gefunden werden können.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit dem noch jungen und aufstrebenden Gebiet der Metabolomics, das durch neue Technologien in der Tandem-Massenspektroskopie, die ein quantitatives Screening von mehreren hundert Metaboliten pro Probe erlauben, zusätzlich an Bedeutung gewinnt. Die Menge der dadurch anfallenden Metabolitendaten verlangt nach bioinformatischen Analysemethoden, die hier entwickelt werden sollten. Zugleich galt das Interesse der Erkundung der Möglichkeiten, die targeted Metabolomics durch die Auswertung solcher Datensätze bieten kann. Als Modellorganismen wurden dazu Maus (Kapitel 2), Mensch (Kapitel 3) und Rind (Kapitel 4) verwendet.

Die Maus diente als Tiermodell für einen präklinischen Medikamententest, der die Wirkungsweise des Diabetes-Medikaments Rosiglitazon untersuchte. Besonderes Interesse galt dem Einfluss der beiden Faktoren Diabetes (Diabetesmutante/Wildtyp) und Medikation (unbehandelt/behandelt mit Rosiglitazon) auf das metabolische Profil der Labormäuse. Vor allem aufgrund der Laborhaltung zeigte der Datensatz generell eine geringe Variabilität innerhalb der Mäusegruppen, wodurch eine sehr gute Voraussetzung für eine automatisierte und damit objektive bioinformatische Analyse gegeben war.
Zunächst wurde die entwickelte Methode anhand ihrer Anwendung auf alle einzelnen Metabolite auf ihre Leistungsfähigkeit hin überprüft. Diese konnte durch das Auffinden von bereits bekannten Auswirkungen von Diabetes und Rosiglitazon auf Stoffwechselwege (z.B. Glukoneogenese, Harnstoffzyklus, verzweigtkettige Aminosäuren, Ketonkörper-synthese, langkettige Acylcarnitine, u.a.) bestätigt werden. Zusätzlich konnten durch die verwendete Methode Wechselwirkungen zwischen den beiden Faktoren Diabetes und Medikation festgestellt werden.
Die Basis für die Identifizierung neuer, durch einen der beiden Faktoren hervorgerufenen metabolischen Phänomene, bildeten anschließend jedoch nicht mehr die einzelnen Metabolite, sondern die Quotienten aller möglichen Paare von Metaboliten. Die Verwendung dieser Quotienten ermöglicht es nämlich, signifikant beeinflusste Metabolite zu finden, die durch kurze metabolische Pfade eng miteinander verbunden sind. Dadurch kann anschließend auf diejenigen Enzyme geschlossen werden, die von Diabetes oder der Medikation durch Rosiglitazon betroffen sind. Für den Faktor Diabetes wurden aufgrund von Quotienten bestehend aus Metaboliten, die bei der Analyse einzelner Metabolite noch nicht als signifikant identifiziert worden waren, Hinweise auf eine möglicherweise erhöhte

β-Oxidation bei den diabetischen Mäusen gefunden. Anhand dieses Ergebnisses konnten deutlich die Vorteile der Quotientenbildung gezeigt werden: eine Reduktion der Varabilität innerhab der Gruppen, die die Unterschiede zwischen den Gruppen sichtbar werden lässt. Auch für den Faktor Medikation konnten mit verschiedenen Glycero-Phosphatidylinositol- und Glycero-Phosphatidylcholin-Komponenten der Quotienten „neue“ relevante Metabolite gefunden werden.

Über die Betrachtung von einzelnen Metaboliten und deren Quotienten hinaus, bestand das Ziel der Analyse darin, ganze Gruppen von Metaboliten und deren Interaktionen unter den Bedingungen der Faktoren Diabetes bzw. Rosiglitazon zu identifizieren. Aus solchen Erkenntnissen über die Beziehungen von Metabolitengruppen zueinander können grundlegende metabolische Mechanismen, die durch Diabetes oder dessen Medikation beeinflusst werden, besser verstanden werden. Zur Ermittlung solcher Gruppen wurde basierend auf den Ergebnissen der Quotienten-Analyse ein Clusteringalgorithmus angewandt. Einer der interessantesten ermittelten Cluster für den Faktor Diabetes wird von zwei Glycero-Phosphatidylcholin-Gruppen gebildet, die eine Verschiebung des Glycero-Phosphatidylcholin-Gleichgewichts von einkettigen Lyso-Glycero-Phosphatidylcholinen zu zweikettigen Glycero-Phosphatidylcholinen anzeigen. Da die Umwandlung dieser einkettigen zu zweikettigen Glycero-Phosphatidylcholinen bzw. umgekehrt durch Acyltransferasen bewirkt wird, lässt die beobachtete Verschiebung des Glycero-Phosphatidylcholin-Gleichgewichts auf einen Einfluß von Diabetes auf diese Enzyme schließen. Diese Ergebnisse können nun als Ausgangspunkt für weitere Studien zu Diabetes verwendet und auf ihre Bedeutung für den Menschen hin untersucht werden.

Die Analyse dieses Datensatzes zeigt für unter kontrollierten Laborbedingungen gehaltene Mäuse zudem, dass Metabolomics in der Lage ist, einen tieferen Einblick in metabolische Stoffwechselprozesse zu ermöglichen, die von einer Krankheit und/oder deren Medikation beeinflusst sind. Dadurch kann eine metabolische Analyse wertvolle Arbeit für präklinische Medikamententests und die frühzeitige Aufdeckung von eventuellen Nebenwirkungen liefern.

Es stellte sich daraufhin die Frage, ob diese Leistungsfähigkeit auch auf das andere Extrem, den Menschen, zutrifft, der einer Vielzahl von individuell variierenden Umwelteinflüssen, wie z.B. unterschiedlicher sportlicher Betätigung, Ernährung und Medikation, ausgesetzt ist. Dies wurde anhand von Probanden einer Populations-Studie untersucht, die dem Projekt KORA (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region

Augsburg) angehört. KORA ist eine Forschungsplattform für bevölkerungsbasierte Populations- sowie Follow-up-Studien zu den Themen Gesundheitsökonomie, Versorgungsforschung und Epidemiologie und umfasst eine Vielzahl an Parametern aus Bereichen wie Ernährung, Krankheit und Umwelteinflüsse. In dieser Arbeit galt das Interesse den Auswirkungen des Kaffeekonsums auf den menschlichen Stoffwechsel. Trotz der erwähnten sehr uneinheitlichen Bedingungen, unter denen die Studienteilnehmer, verglichen mit den Labormäusen, standen, konnten signifikante Metabolite identifiziert werden. Unter diesen sind besonders die beiden Sphingomyelinklassen N-Hydroxylacyloylsphingosyl-Phosphocholin und N-Hydroxyldicarboacyloylsphingosyl-Phosphocholin hervorzuheben. Anders als N-Hydroxylacyloylsphingosyl-Phosphocholine sind N-Hydroxyldicarboacyloylsphingosyl-Phosphocholine in der Literatur noch weitgehend unbekannt und über ihre Aufgabe im Stoffwechsel können nur Vermutungen angestellt werden. Es wird jedoch angenommen, dass die zukünftige Erforschung der Funktion dieser Sphingomyelinklassen äußerst bedeutende Ergebnisse für das Verständnis des menschlichen Stoffwechsels liefern wird. Dabei kann bioinformatische Metaboliten-Analyse, wie das Beispiel Kaffeekonsum zeigt, einen wichtigen Beitrag leisten. Eine Fortsetzung der Analyse des menschlichen Stoffwechsels ist daher in Form eines Metabolomics-Projekts für die KORA Follow-up-Studie F4 geplant.

Als dritter Modellorganismus wurde das Rind gewählt, da in mancher Hinsicht Rind und Mensch eine größere Ähnlichkeit aufweisen als Mensch und Nager. Neben einem ähnlichen zirkadianen Muster in der Nahrungsaufnahme und einer vergleichbareren Körpermasse, besitzen Mensch und Rind eine höhere Kollinearität und eine größere Sequenzhomologie in ihren Genomen als Mensch und Maus.
Mit Blick auf die Komplexität der Umwelteinflüsse sind Rinder zwischen Mensch und Maus zu sehen. Der Stoffwechsel der einzelnen Individuen wird einerseits weit weniger durch unterschiedliche äußere Faktoren beeinflusst als dies beim Menschen der Fall ist. Andererseits erfordert die Stallhaltung nicht die strengen Bedingungen, die für die Haltung von Mäusen im Labor notwendig ist.
Zur Verfügung standen verschiedene Altersgruppen der Rinder, deren Analyse deutliche altersabhängige Unterschiede im Metabolitenprofil aufdeckte. So konnten beispielsweise im Profil der Glycero-Phosphatidylcholine Hinweise auf die noch größtenteils unterentwickelte Funktionalität des Verdauungsapparats des Kalbes gefunden werden. Im Metabolitenprofil der Kälber zeigte sich nämlich, dass diese mehr Glycero-

Phosphatidylcholine mit mehrfach ungesättigten und zudem kürzeren Fettsäureresten besitzen als ältere Tiere. Dies lässt sich vermutlich durch den noch unterentwickelten Pansen und den damit einhergehenden Ausfall der Doppelbindung lösenden Biohydrogenation von Lipiden, sowie durch eine möglicherweise ebenfalls verminderte Funktionalität der Elongasen erklären.
Für die Zukunft ist die Auswertung der Metaboliten-Profile der Rinder hinsichtlich weiterer zuchtrelevanter Parameter, wie z.B. Halb- und Vollgeschwister-Konstellationen oder intramuskulärer Fettgehalt, geplant. Durch ein Genotyping ausgewählter SNPs wird der Rinder-Datensatz komplettiert werden, so dass zusätzlich die Identifikation von signifikanten Assoziationen zwischen Gen- und Metabotyp-Variationen möglich wird.

Die Analyse der drei Datensätze von Mensch, Maus und Rind zeigt, dass Metabolomics für verschiede Modellorganismen mit unterschiedlich starker Beeinflussung von außen möglich ist. Vor allem die Verwendung von Metaboliten-Quotienten als Basis der weiteren Analyse führte zu neuen und interessanten Erkenntnissen über die Auswirkungen verschiedener Faktoren auf den Stoffwechsel. Die Bedeutung der Metabolomics in unterschiedlichen Bereichen, von der Erforschung multifaktorieller Krankheiten über die Entwicklung Evidenz-basierter Medikamente bis hin zu bioaktiver Nahrung („functional food“), wird daher auch in Zukunft noch weiter zunehmen.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: (A) Traditionelles zentrales Dogma der Molekularbiologie mit linearem Informationsfluss vom Gen bis zum Enzym; (B) aktualisiertes Schema mit feedback-loops (verändert nach *Hollywood, Brison et al. 2006*). 2
Abb. 2: Anzahl der Publikationen pro Jahr basierend auf der ISI Web-of-Science Datenbank. 4
Abb. 3: Überblick über die verschiedenen Analyseansätze in der Erforschung des Metaboloms (verändert nach *Hollywood, Brison et al. 2006*); GC: gas chromatography; LC: Liquid chromatography; HPLC: high performance liquid chromatography; MS: mass spectrometry; NMR: Nuclear magnetic resonance spectroscopy; DI: Desorption ionization; LDI: Laser Desorption Ionisation; FT-IR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy. 8
Abb. 4: Schematischer Aufbau eines ESI-MS/MS (© Applied Biosystems). 10
Abb. 5: Schematische Darstellung des Elektrospray-Prozesses (verändert nach *Griffiths, Jonsson et al. 2001*). 10
Abb. 6: Aufbau eines Quadrupols (verändert nach *Lohninger, Fröhlich et al. 2003*). 11
Abb. 7: MS-Scan-Modi: (A) Multiple Reaction Monitoring, (B) Precursor Ion Scan, (C) Neutral Loss Scan (nach Applied Biosystems). 13
Abb. 8: Vereinfachte Darstellung der Glycero-Phospholipid-Biosynthese (verändert nach Roche Applied Science „Biochemical Pathways“ Karte (Michal 1999) und nach *Vance 2001*). 15
Abb. 9: Diabetes Atlas: geschätzte Verbreitung von Diabetes im Jahr 2007; © International Diabetes Federation. 19
Abb. 10: Schematische Darstellung des 2D-Clusterings für η^2-Matrizen. 23
Abb. 11: Glukoneogenese: Boxplots der Plasmakonzentrationen [µM] der Glukose und der glykogenischen Aminosäuren Glycin, Serin und Alanin in Diabetesmutanten (M) und Wildtyp-Mäusen (W), unbehandelt (U) und behandelt mit Rosiglitazon (T). 25
Abb. 12: Boxplots der Plasmakonzentrationen [µM] der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Leucin/Isoleucin. 26
Abb. 13: Der Ureazyklus: Plasmakonzentrationen [µM] des Arginin und Citrullin und der nicht- proteinogenen Aminosäure Ornithin. 27
Abb. 14: Durch Diabetes bedingte eingeschränkte Funktionsfähigkeit der Phenylalanin-Hydroxylase: Plasmakonzentrationen [µM] des Phenylalanin und Tyrosin; BH4: Tetrahydrobiopterin, 4α-OH-BH4: 4α-Hydroxy-Tetrahydrobiopterin. 27
Abb. 15: Plasmakonzentrationen [µM] des Methylmalonylcarnitin (C3-DC-M), Hydroxylpropionylcarnitin (C3(OH)), Pimeloylcarnitin (C7-DC) und Butenoylcarnitin (C4:1). 28
Abb. 16: Plasmakonzentrationen [µM] langkettiger Acylcarnitine. 30
Abb. 17: Schematische Darstellung des Transports von langkettigen Fettsäuren ins Mitochondrium (verändert nach *Brookes*). 31
Abb. 18: Plasmakonzentrationen [µM] des Methylglutarylcarnitin (C5-M-DC). 32
Abb. 19: Plasmakonzentrationen [µM] von N-hydroxyacyloylsphingosyl-phosphocholin (SM(OH)28:1) und (SM(OH)26:0) – obere Reihe – und der Quotient beider Konzentrationen – untere Reihe. 34
Abb. 20: Clustering-Beispiel anhand der η^2-Matrix für den Faktor „Diabetes-Status“ (M/W); markiert wurde der durch Gruppe 1 und 2 definierte Cluster. 40

Abb. 21: Umwandlung von PC_a zu PC_aa durch die Enzyme Lecithin-cholesterol-acyltransferase (EC 2.3.1.43). 40
Abb. 22: Umwandlung von PC_e zu PC_ea und von PC_a zu PC_aa durch die 1-Alkylglycerophosphocholine O-acyltransferase (EC 2.3.1.63) und die 1-Acylglycerophosphocholine O-acyltransferase (EC 2.3.1.23). 41
Abb. 23: Studienregion Augsburg, die die Teilnehmer für die Projekte MONICA und KORA stellt (Holle, Happich et al. 2005) 45
Abb. 24 MONICA/KORA-Studien in Augsburg; S1-S4: Surveys; F3, F4: Follow-ups (verändert nach *Wichmann 2005*) 46
Abb. 25: Verteilung des Kaffeekonsums im verwendeten Datensatz 50
Abb. 26: Boxplots der Plasmakonzentrationen [µM] der Sphingomyelin-Klasse SM(OH,COOH)x:y. 52
Abb. 27: Boxplots der Plasmakonzentrationen [µM] der Sphingomyelin-Klasse SM(OH)x:y. 53
Abb. 28: Synthese von Sphingomyelin 54
Abb. 29: Struktur von SM(OH)x:y (A) und SM(OH,COOH)x:y (B) 54
Abb. 30: Plasmakonzentration des Gesamt-Cholesterins. 55
Abb. 31: Schematische Darstellung der Verdauungsorgane des Rindes. 59
Abb. 32: Tiere der Parental-, F_1- und F_2- Generation; die Parentalgeneration besteht aus Holstein-Friesen (links) und Charolais (rechts); Foto: Christa Kühn. 61
Abb. 33: Anpaarungsstruktur zur Erzeugung der F_2-Generation; HF: Holstein-Friesen; Cha: Charolais (Kühn, Bellmann et al. 2002). 62
Abb. 34: Zusammensetzung des Datensatzes aus unterschiedlich alten männlichen Rindern und laktierenden Kühen. 62
Abb. 35: Auswahl der konzentrationsmäßig am häufigsten auftretenden gemessenen Metabolite und ihre Plasmakonzentrationen [µM]; sortiert nach dem Mittelwert. 64
Abb. 36: Maß der Reproduzierbarkeit für alle Aminosäuren 65
Abb. 37: Plasmakonzentrationen [µM] der Amonisäuren Glutaminsäure, Arginin, Valin und Lysin. 66
Abb. 38: Plasmakonzentrationen [µM] einiger Glycero-Phosphocholine; sortiert nach häufigstem Auftreten im Datensatz. 67
Abb. 39: Plasmakonzentrationen [µM] einiger Sphingomyeline; sortiert nach häufigstem Auftreten im Datensatz. 67
Abb. 40: Plasmakonzentrationen [µM] der N-Hydroxylacyloylsphingosyl-Phosphocholine (SM (OH)*x:y*) und der Sphingomyeline (SM*x:y*) – obere Reihe – und der Quotient beider Konzentrationen – untere Reihe. 68
Abb. 41: Plasmakonzentrationen [µM] der Glycero-Phosphocholine PCaeC40:5 und PCaaC38:5 – untere Reihe – und der Quotient beider Konzentrationen – obere Reihe. 70
Abb. 42: Plasmakonzentrationen [µM] der Glycero-Phosphocholine PCaeC40:4 und PCaeC40:6 – untere Reihe – und der Quotient beider Konzentrationen – obere Reihe. 71
Abb. 43: Plasmakonzentrationen [µM] der Glycero-Phosphocholine PCaeC36:1 und PCaaC36:1 – untere Reihe – und der Quotient beider Konzentrationen – obere Reihe. 72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Partielle η^2-Werte für die zwei Faktoren " Diabetes-Status" (Mutante oder Wildtyp; M/W) und "Medikation" (unbehandelt oder behandelt mit Rosiglitazon; U/T) und für die Interaktion beider Faktoren (M/W * U/T). Aufgeführt werden ausgewählte Metabolite, die einen starken Unterschied in den Plasmakonzen-trationen zwischen Wildtyp- und diabetischen Mäusen zeigen..... 24
Tab. 2: Wie Tab. 1; aufgeführt werden ausgewählte Metabolite, die einen starken Unterschied in den Plasmakonzen- trationen zwischen unbehandelten und mit Rosiglitazon behandelten Mäusen zeigen..... 29
Tab. 3: Wie Tab. 1; aufgeführt werden ausgewählte Metabolite, die eine starke Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren, jedoch nur einen geringen Einfluss eines einzelnen Faktors zeigen. 32
Tab. 4: Ausgewählte Paare von Metaboliten, die eine starke Zunahme im partiellen η^2-Wert für *M/W* zeigen, falls die Quotienten der Konzentrationen betrachtet werden. Die Variabilität der Konzentration jedes dieser Komponenten kann nicht durch den betreffenden Faktor allein, jedoch durch ihre Quotienten erklärt werden. 33
Tab. 5: Wie Tab. 4, aber für U/T. 35
Tab. 6: Gruppen von Metaboliten, die hinsichtlich des Faktors "Diabetes-Status" (M/W) mit hohem η^2-Wert clustern..... 37
Tab. 7: Gruppen, die hinsichtlich des Faktors "Diabetes-Status" (M/W) einen Cluster bilden. 38
Tab. 8: Gruppen von Metaboliten, die für den Faktor "Medikation" (U/T) clustern. 38
Tab. 9: Gruppen, die für den Faktor "Medikation" (U/T) einen Cluster bilden. 39
Tab. 10: Ergebnisse des Kendalls Tests, mit p- und q-value, sowie mit dem Kendalls Tau; es werden alle Metabolite mit einem Kendall p-value kleiner als 2E-03 gezeigt. Die Summen der SM(OH,COOH)x:y, der SM(OH)x:y und aller Cx:y mit x≥10 sind kursiv gedruckt. 52
Tab. 11: Ergebnisse des T-Tests; es sind p- und q-value angegeben, sowie die normierte Differenz der beiden Mittelwerte (change) und der Informationsgewinn; angezeigt werden die Ergebnisse mit dem besten p-value. 69

Literatur

Adibi, S. A. (1980). Die Rolle der verzweigtkettigen Aminosäuren bei der Stoffwechselregulation. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* **19**: 251-258.

Agardh, E. E., S. Carlsson, et al. (2004). Coffee consumption, type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Swedish men and women. *J Intern Med* **255**(6): 645-52.

Ahola, I., M. Jauhiainen, et al. (1991). The hypercholesterolaemic factor in boiled coffee is retained by a paper filter. *J Intern Med* **230**(4): 293-7.

Allen, M. S., B. J. Bradford, et al. (2005). The cow as a model to study food intake regulation. *Annu Rev Nutr* **25**: 523-47.

Altmaier, E., S. L. Ramsay, et al. (2008). Bioinformatics analysis of targeted metabolomics - uncovering old and new tales of diabetic mice under medication. *Endocrinology* **149**(7): 3478-89.

Ascherio, A., H. Chen, et al. (2003). Caffeine, postmenopausal estrogen, and risk of Parkinson's disease. *Neurology* **60**(5): 790-5.

Ascherio, A., M. G. Weisskopf, et al. (2004). Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. *Am J Epidemiol* **160**(10): 977-84.

Ascherio, A., S. M. Zhang, et al. (2001). Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Ann Neurol* **50**(1): 56-63.

Atkinson, M. A. and G. S. Eisenbarth (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* **358**(9277): 221-9.

Bauman, D. E., J. W. Perfield, et al. (2003). New Perspectives on Lipid Digestion and Metabolism in Ruminants. *Proceedings of the Cornell Nutritional Conference*: 175–189.

Bedell, M. A., N. A. Jenkins, et al. (1997). Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev* **11**(1): 1-10.

Bell, R. M. and R. A. Coleman (1980). Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **49**: 459-87.

Bevan, P. (2001). Insulin signalling. *J Cell Sci* **114**(Pt 8): 1429-30.

Bieber, L. L. (1988). Carnitine. *Annu Rev Biochem* **57**: 261-83.

Bogumil, R., T. Koal, et al. (2008). Massenspektrometrische Analyse von Blutplasma in Kitformat. *LABORWELT* **2**.

Bondi, A. A. (1987). The nutritional requirements for production of body gain. *Animal nutrition*: 370-412.

Borghi, L., R. Lugari, et al. (1985). Plasma and skeletal muscle free amino acids in type I, insulin-treated diabetic subjects. *Diabetes* **34**(8): 812-5.

Bremer, J. (1983). Carnitine - metabolism and functions. *Physiol Rev* **63**(4): 1420-80.

Brookes, S. *Fatty acid oxidation.* http://www.dentistry.leeds.ac.uk/biochem/lecture/faox/faox.htm

Buchholz, A., J. Hurlebaus, et al. (2002). Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomol Eng* **19**(1): 5-15.

Burton, E. A. and K. E. Davies (2002). Muscular dystrophy - reason for optimism? *Cell* **108**(1): 5-8.

Carlson, L. A. and L. Oro (1962). The effect of nicotinic acid on the plasma free fatty acid; demonstration of a metabolic type of sympathicolysis. *Acta Med Scand* **172**: 641-5.

Carlsson, S., N. Hammar, et al. (2004). Coffee consumption and risk of type 2 diabetes in Finnish twins. *Int J Epidemiol* **33**(3): 616-7.

Casal, S., M. B. Oliveira, et al. (2000). Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. *J Agric Food Chem* **48**(8): 3420-4.

Catchpole, G. S., M. Beckmann, et al. (2005). Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(40): 14458-62.

Chace, D. H., J. E. Sherwin, et al. (1998). Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. *Clin Chem* **44**(12): 2405-9.

Challis, B. G. and G. S. Yeo (2002). Past, present and future strategies to study the genetics of body weight regulation. *Brief Funct Genomic Proteomic* **1**(3): 290-304.

Chambers, J. M. (1992). *Statistical Models in S: Linear Models (Chapter 4)*. Pacific Grove, CA, Wadsworth and Brooks/Cole.

Chaput, E., R. Saladin, et al. (2000). Fenofibrate and rosiglitazone lower serum triglycerides with opposing effects on body weight. *Biochem Biophys Res Commun* **271**(2): 445-50.

Christensen, B., A. Mosdol, et al. (2001). Abstention from filtered coffee reduces the concentrations of plasma homocysteine and serum cholesterol - a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* **74**(3): 302-7.

Conover, C. A., S. J. Rozovski, et al. (1980). Ornithine decarboxylase activity in insulin-deficient states. *Biochem J* **192**(2): 725-32.

Cornish-Bowden, A. and M. L. Cardenas (2001). Complex networks of interactions connect genes to phenotypes. *Trends Biochem Sci* **26**(8): 463-5.

Davis, C. D. and J. Milner (2004). Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. *Mutat Res* **551**(1-2): 51-64.

de Souza, C. J., M. Eckhardt, et al. (2001). Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* **50**(8): 1863-71.

Dettmer, K., P. A. Aronov, et al. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* **26**(1): 51-78.

DiPalma, J. R. and W. S. Thayer (1991). Use of niacin as a drug. *Annu Rev Nutr* **11**: 169-87.

Dunn, W. B. and D. I. Ellis (2005). Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry* **24**(4): 285-294.

Fiehn, O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics* **2**: 155-168.

Fiehn, O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* **48**(1-2): 155-71.

Flint, O. P., C. Elosua, et al. (2006). *HIV Protease Inhibitors and the Hepatic Metabolome*, 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, Colorado, 2006.

Fried, R. E., D. M. Levine, et al. (1992). The effect of filtered-coffee consumption on plasma lipid levels. Results of a randomized clinical trial. *JAMA* **267**(6): 811-5.

Futerman, A. H., B. Stieger, et al. (1990). Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **265**(15): 8650-7.

Gallaher, D. D. (1992). Animal models in human nutrition research. *Nutr Clin Pract* **7**(1): 37-9.

Gallus, S., M. Bertuzzi, et al. (2002). Does coffee protect against hepatocellular carcinoma? *Br J Cancer* **87**(9): 956-9.

Garton, G. A. (1967). The digestion and absorption of lipid in ruminant animals. *World Review of Nutr. and Diet.* **7**: 225-250.

Gates, S. C. and C. C. Sweeley (1978). Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clin Chem* **24**(10): 1663-73.

Gelatti, U., L. Covolo, et al. (2005). Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. *J Hepatol* **42**(4): 528-34.

Gibbs, R., G. Weinstock, et al. (2003). Bovine genomic sequencing initiative: cattle-izing the human genome. *http://www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/BovineSEQ.pdf*

Giovannucci, E. (1998). Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. *Am J Epidemiol* **147**(11): 1043-52.

Glanville, N. T. and G. H. Anderson (1985). The effect of insulin deficiency, dietary protein intake, and plasma amino acid concentrations on brain amino acid levels in rats. *Can J Physiol Pharmacol* **63**(5): 487-94.

Goni, F. M., F. X. Contreras, et al. (2005). Biophysics (and sociology) of ceramides. *Biochem Soc Symp*(72): 177-88.

Goodacre, R. (2007). Metabolomics of a superorganism. *J Nutr* **137**(1 Suppl): 259S-266S.

Goodenowe, D. B. (2004). Delivering on the Promise of metabolomics. *Business Briefing: PHARMATECH*.

Griffin, J. L., E. Sang, et al. (2002). Metabolic profiles of dystrophin and utrophin expression in mouse models of Duchenne muscular dystrophy *FEBS Letters* **530**(1-3): 109-116.

Griffin, J. L., H. J. Williams, et al. (2001). Metabolic profiling of genetic disorders: a multitissue (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopic and pattern recognition study into dystrophic tissue. *Anal Biochem* **293**(1): 16-21.

Griffiths, W. J., A. P. Jonsson, et al. (2001). Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J* **355**(Pt 3): 545-61.

Griffiths, W. J., K. Karu, et al. (2007). Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* **13**(1): 45-50.

Grill, V., O. Bjorkman, et al. (1992). Brain uptake and release of amino acids in nondiabetic and insulin-dependent diabetic subjects: important role of glutamine release for nitrogen balance. *Metabolism* **41**(1): 28-32.

Gronberg, L., Z. S. Ruan, et al. (1991). Interaction of cholesterol with synthetic sphingomyelin derivatives in mixed monolayers. *Biochemistry* **30**(44): 10746-54.

Grundy, S. M., H. Y. Mok, et al. (1981). Influence of nicotinic acid on metabolism of cholesterol and triglycerides in man. *J Lipid Res* **22**(1): 24-36.

Harper, A. E., R. H. Miller, et al. (1984). Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr* **4**: 409-54.

Harrigan, G. G. (2006). METABOLOMICS a 'systems' contribution to pharmaceutical discovery and drug development. *Drug Discovery World*: 39-46.

Herman, G. E. (2002). Mouse models of human disease: lessons learned and promises to come. *ILAR J* **43**(2): 55-6.

Hernandez, R., T. Teruel, et al. (2003). Rosiglitazone produces insulin sensitisation by increasing expression of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in brown adipocytes. *Diabetologia* **46**(12): 1618-28.

Higdon, J. V. and B. Frei (2006). Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr* **46**(2): 101-23.

Hill, K. J., D. E. Noakes, et al. (1970). Gastric digestive physiology of the calf and piglet. *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*: 166-179.

Hollander, M. and D. A. Wolfe (1973). *Nonparametric statistical inference*. New York, Jhon Wiley & Sons.

Holle, R., M. Happich, et al. (2005). KORA - A Research Platform for Population Based Health Research *Das Gesundheitswesen* **S 01**: 19-25.

Hollywood, K., D. R. Brison, et al. (2006). Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics* **6**(17): 4716-23.

http://www.hmdb.ca.

Hummel, K. P., M. M. Dickie, et al. (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* **153**(740): 1127-8.

Hwang, Y. C., S. Bakr, et al. (2002). Relative importance of enhanced glucose uptake versus attenuation of long-chain acyl carnitines in protecting ischemic myocardium. *Coron Artery Dis* **13**(6): 313-8.

Ihlemann, N., C. Rask-Madsen, et al. (2003). Tetrahydrobiopterin restores endothelial dysfunction induced by an oral glucose challenge in healthy subjects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**(2): H875-82.

Inoue, M., I. Yoshimi, et al. (2005). Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study in Japan. *J Natl Cancer Inst* **97**(4): 293-300.

Iwata, M., T. Haruta, et al. (2001). Pioglitazone ameliorates tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance by a mechanism independent of adipogenic activity of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* **50**(5): 1083-92.

James, J. E. (2004). Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. *Psychosom Med* **66**(1): 63-71.

Jee, S. H., J. He, et al. (1999). The effect of chronic coffee drinking on blood pressure: a meta-analysis of controlled clinical trials. *Hypertension* **33**(2): 647-52.

Jenkins, T. C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *J Dairy Sci*. **76:** 3851-63.

Kaddurah-Daouk, R., J. McEvoy, et al. (2007). Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia. *Mol Psychiatry* **12**(10): 934-45.

Kaneto, H., T. A. Matsuoka, et al. (2005). Oxidative Stress and the JNK Pathway in Diabetes. *Curr Diabetes Rev* **1**(1): 65-72.

Karlovsky, P. H. (2008). *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. Heidelberg, Springer Verlag.

Kashyap, S. R., A. Lara, et al. (2008). Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **31**(1): 134-9.

Kawachi, I., W. C. Willett, et al. (1996). A prospective study of coffee drinking and suicide in women. *Arch Intern Med* **156**(5): 521-5.

Kerner, W., J. Brückel, et al. (2004). Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus, *Deutsche Diabetes Gesellschaft*.

Klatsky, A. L., M. A. Armstrong, et al. (1993). Coffee, tea, and mortality. *Ann Epidemiol* **3**(4): 375-81.

Koller, U. (2003). Diabetes mellitus - Häufig unerkannte Volkskrankheit. *FLUGS, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit*.

Koranyi, L., D. James, et al. (1990). Glucose transporter levels in spontaneously obese (db/db) insulin-resistant mice. *J Clin Invest* **85**(3): 962-7.

Kühn, C., O. Bellmann, et al. (2002). An experimental approach for studying the genetic and physiological background of nutrient transformation in cattle with respect to nutrient secretion and accretion type. *Archiv für Tierzucht* **45**(4): 317-330

Lands, W. E. and P. Hart (1965). Metabolism of Glycerolipids. Vi. Specificities of Acyl Coenzyme a: Phospholipid Acyltransferases. *J Biol Chem* **240**: 1905-11.

Lawton, K. A., L. A. M. Paige, M.W., et al. (2006). *Identification of Metabolic Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis*. The Second Scientific Meeting of the Metabolomics Society, Harvard Medical School - The Conference Center, Boston, USA, 24-29 June 2006.

Leviton, A. (1990). Methylxanthine consumption and the risk of ovarian malignancy. *Cancer Lett* **51**(2): 91-101.

Lohninger, H., J. Fröhlich, et al. (2003). *Teach/Me - Instrumentelle Analytik*. Heidelberg, Springer electronic media.

Magnusson, I., D. L. Rothman, et al. (1992). Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A 13C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest* **90**(4): 1323-7.

Mans, A. M., M. R. DeJoseph, et al. (1987). Regional amino acid transport into brain during diabetes: effect of plasma amino acids. *Am J Physiol* **253**(5 Pt 1): E575-83.

Martins, A. M., D. Camacho, et al. (2004). A Systems Biology Study of Two Distinct Growth Phases of Saccharomyces cerevisiae Cultures. *Current Genomics* **5**: 649-663.

Mazurek, S. and E. Eigenbrodt (2003). The tumor metabolome. *Anticancer Res* **23**(2A): 1149-54.

Michal, G. (1999). *Biochemical Pathways*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Verlag.

Miki, Y., K. Hosaka, et al. (1977). Acyl-acceptor specificities of 1-acylglycerolphosphate acyltransferase and 1-acylglycerophosphorylcholine acyltransferase resolved from rat liver microsomes. *Eur J Biochem* **81**(3): 433-41.

Miranda, F. F., M. Kolberg, et al. (2005). The active site residue tyrosine 325 influences iron binding and coupling efficiency in human phenylalanine hydroxylase. *J Inorg Biochem* **99**(6): 1320-8.

Nagy, K., Z. Takats, et al. (2003). Direct Tandem Mass Spectrometric Analysis of Amino Aacids in Dried Blood Spots Without Chemical Derivatization for Neonatal Screening. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**: 983–990.

Newton, C. A. and P. Raskin (2004). Diabetic ketoacidosis in type 1 and type 2 diabetes mellitus: clinical and biochemical differences. *Arch Intern Med* **164**(17): 1925-31.

Nissen, S. E. and K. Wolski (2007). Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes. *N Engl J Med* **356**(24): 2457-71.

Noordzij, M., C. S. Uiterwaal, et al. (2005). Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens* **23**(5): 921-8.

Nurminen, M. L., L. Niittynen, et al. (1999). Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. *Eur J Clin Nutr* **53**(11): 831-9.

Okuno, A., H. Tamemoto, et al. (1998). Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* **101**(6): 1354-61.

Oldiges, M., S. Lutz, et al. (2007). Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**(3): 495-511.

Oliver, S. G., M. K. Winson, et al. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* **16**(9): 373-8.

Pagano, R. E. (1988). What is the fate of diacylglycerol produced at the Golgi apparatus? *Trends Biochem Sci* **13**(6): 202-5.

Paige, L. A., M. W. Mitchell, et al. (2007). A preliminary metabolomic analysis of older adults with and without depression. *Int J Geriatr Psychiatry* **22**(5): 418-23.

Pajvani, U. B., M. Hawkins, et al. (2004). Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* **279**(13): 12152-62.

Pitas, R. E. and R. G. Jensen (1970). Action of pregastric esterase on synthetic triglycerides containing butyric acid. *J Dairy Sci* **53**(8): 1083-5.

Raamsdonk, L. M., B. Teusink, et al. (2001). A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* **19**(1): 45-50.

Raskin, P., E. B. Rappaport, et al. (2000). Rosiglitazone short-term monotherapy lowers fasting and post-prandial glucose in patients with type II diabetes. *Diabetologia* **43**(3): 278-84.

Rieusset, J., J. Auwerx, et al. (1999). Regulation of gene expression by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma with rosiglitazone (BRL 49653) in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **265**(1): 265-71.

Rizhsky, L., H. Liang, et al. (2004). When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* **134**(4): 1683-96.

Rolinski, B., R. Arnecke, et al. (2000). The biochemical metabolite screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: determination of amino acids and acylcarnitines by tandem mass spectrometry. *Mamm Genome* **11**(7): 547-51.

Roscher, A. A., R. Fingerhut, et al. (2001). Erweiterung des Neugeborenenscreenings durch Tandemmassenspektroskopie. *Monatsschrift Kinderheilkunde* **149**: 1297-1303.

Rosengren, A., A. Dotevall, et al. (2004). Coffee and incidence of diabetes in Swedish women: a prospective 18-year follow-up study. *J Intern Med* **255**(1): 89-95.

Ross, G. W., R. D. Abbott, et al. (2000). Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *JAMA* **283**(20): 2674-9.

Rozen, S., M. Cudkowicz, et al. (2005). Metabolomic analysis and signatures in motor neuron disease. *Metabolomics* **1**(2): 101–108.

Salazar-Martinez, E., W. C. Willett, et al. (2004). Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* **140**(1): 1-8.

Sankaram, M. B. and T. E. Thompson (1990). Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry* **29**(47): 10670-5.

Sargis, R. M. and P. V. Subbaiah (2006). Protection of membrane cholesterol by sphingomyelin against free radical-mediated oxidation. *Free Radic Biol Med* **40**(12): 2092-102.

Schulze, A., M. Lindner, et al. (2003). Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* **111**(6 Pt 1): 1399-406.

Sharma, K., P. McCue, et al. (2003). Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**(6): F1138-44.

Shi, H., K. E. Vigneau-Callahan, et al. (2002). Characterization of diet-dependent metabolic serotypes: primary validation of male and female serotypes in independent cohorts of rats. *J Nutr* **132**(5): 1039-46.

Shimazu, T., Y. Tsubono, et al. (2005). Coffee consumption and the risk of primary liver cancer: pooled analysis of two prospective studies in Japan. *Int J Cancer* **116**(1): 150-4.

Shulaev, V. (2006). Metabolomics technology and bioinformatics. *Brief Bioinform* **7**(2): 128-39.

Solanky, K. S., N. J. C. Bailey, et al. (2003). Application of biofluid 1H nuclear magnetic resonance-based metabonomic techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile. *Analytical Biochemistry* **323**(2): 197-204.

Solanky, K. S., N. J. C. Bailey, et al. (2003). NMR-based metabonomic studies on the biochemical effects of epicatechin in the rat *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(14): 4139-4145.

Sonesson, A., H. Moll, et al. (1993). Long-chain alpha-hydroxy-(omega-1)-oxo fatty acids and alpha-hydroxy-1,omega-dioic fatty acids are cell wall constituents of Legionella (L. jordanis, L. maceachernii and L. micdadei). *FEMS Microbiol Lett* **106**(3): 315-20.

Soriguer, F., G. Rojo-Martinez, et al. (2004). Coffee consumption and type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* **141**(4): 321-3; author reply 323-4.

Speakman, J. R., R. J. Stubbs, et al. (2002). Does body mass play a role in the regulation of food intake? *Proc Nutr Soc* **61**(4): 473-87.

Staeva-Vieira, T., M. Peakman, et al. (2007). Translational mini-review series on type 1 diabetes: Immune-based therapeutic approaches for type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* **148**(1): 17-31.

Storey, J. D. (2003). The positive false discovery rate: A Bayesian interpretation and the q-value. *The Annals of Statistics* **31**(6): 2013–2035.

Strandhagen, E. and D. S. Thelle (2003). Filtered coffee raises serum cholesterol: results from a controlled study. *Eur J Clin Nutr* **57**(9): 1164-8.

Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, et al. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. Washington, D.C., National Academy Press.

Superko, H. R., W. Bortz, Jr., et al. (1991). Caffeinated and decaffeinated coffee effects on plasma lipoprotein cholesterol, apolipoproteins, and lipase activity: a controlled, randomized trial. *Am J Clin Nutr* **54**(3): 599-605.

Tamate, H., A. D. McGilliard, et al. (1962). Effect of Various Dietaries on the Anatomical Development of the Stomach in the Calf. *Journal of Dairy Science* **45**(3): 408-420

Tanskanen, A., J. Tuomilehto, et al. (2000). Heavy coffee drinking and the risk of suicide. *Eur J Epidemiol* **16**(9): 789-91.

Tavani, A. and C. La Vecchia (2000). Coffee and cancer: a review of epidemiological studies, 1990-1999. *Eur J Cancer Prev* **9**(4): 241-56.

Tavani, A. and C. La Vecchia (2004). Coffee, decaffeinated coffee, tea and cancer of the colon and rectum: a review of epidemiological studies, 1990-2003. *Cancer Causes Control* **15**(8): 743-57.

Terauchi, Y. (2007). [PPARgamma and metabolic syndrome]. *Rinsho Byori* **55**(5): 447-51.

Thelle, D. S., E. Arnesen, et al. (1983). The Tromso heart study. Does coffee raise serum cholesterol? *N Engl J Med* **308**(24): 1454-7.

Theobald, U., W. Mailinger, et al. (1997). In vivo analysis of metabolic dynamics in Saccharomyces cerevisiae. 1. Experimental observations. *Biotechnology and Bioengineering* **55**: 305-316.

Tolstikov, V. V., N. Tanaka, et al. (2003). *Metabolomics: LC-MS analysis development*. Joint BTS/Cereal Chemistry Symposium, Adelaide.

Toothill, J., S. Y. Thompson, et al. (1976). Studies on lipid digestion in the preruminant calf. The source of lipolytic activity in the abomasum. *Br J Nutr* **36**(3): 439-47.

Tuomilehto, J., G. Hu, et al. (2004). Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus among middle-aged Finnish men and women. *JAMA* **291**(10): 1213-9.

Tweeddale, H., L. Notley-McRobb, et al. (1998). Effect of slow growth on metabolism of Escherichia coli, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *J Bacteriol* **180**(19): 5109-16.

Uchida, Y., M. Hara, et al. (2000). Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res* **41**(12): 2071-82.

Urbanczyk-Wochniak, E., A. Luedemann, et al. (2003). Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology. *EMBO Rep* **4**(10): 989-93.

Urgert, R. and M. B. Katan (1997). The cholesterol-raising factor from coffee beans. *Annu Rev Nutr* **17**: 305-24.

Vahouny, G. V. and C. R. Treadwell (1968). Enzymatic synthesis and hydrolysis of cholesterol esters. *Methods Biochem Anal* **16**: 219-72.

van Dam, R. M., J. M. Dekker, et al. (2004). Coffee consumption and incidence of impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Diabetologia* **47**(12): 2152-9.

van Dam, R. M. and E. J. Feskens (2002). Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet* **360**(9344): 1477-8.

van den Bosch, H. (1980). Intracellular phospholipases A. *Biochim Biophys Acta* **604**(2): 191-246.

Vance, J. E. (2001). *Membrane Lipid Biosynthesis* John Wiley & Sons, Ltd.

Wahlberg, G. and G. Walldius (1992). Effects of nicotinic acid treatment on fatty acid composition of plasma lipids and adipose tissue in hyperlipidaemia. *Scand J Clin Lab Invest* **52**(6): 547-53.

Waku, K. and Y. Nakazawa (1970). Acyltransferase activity to 1-O-alkyl-glycero-3-phosphorylcholine in sarcoplasmic reticulum. *J Biochem (Tokyo)* **68**(4): 459-66.

Waku, K. and Y. Nakazawa (1972). Acyltransferae activity to 1-acyl-, 1-O-alkenyl-, and 1-O-alkyl-glycero-3-phosphorylcholine in Ehrlich ascites tumor cells. *J Biochem (Tokyo)* **72**(2): 495-7.

Warner, R. G., W. P. Flatt, et al. (1956). Dietary factors influencing the development of the ruminant stomach. *Agric. Food Chem.* **4**: 788–792.

Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**(6915): 520-62.

Weinberger, K. (2005). Metabolomics: auf dem Weg zur systematischen quantitativen Beschreibung des Stoffwechsels. *BIOforum* **4**.

Weinberger, K., A. Graber, et al. (2006). Targeted Metabolomics. *BIOspectrum* **2**: 231-232.

Wichmann, H. E. (2005). *Research Report 2003-2005: Institute of Epidemiology*. Munich/Neuherberg, GSF.

Wichmann, H. E., H. Löwel, et al. (2005). 20 Jahre MONICA/KORA - ein wichtiges Jubiläum für die epidemiologische Forschung in der GSF. *GSF-Jahresbericht 2004*: 27-30.

Wishart, D. S., D. Tzur, et al. (2007). HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* **35**(Database issue): D521-6.

Wolfsdorf, J., N. Glaser, et al. (2006). Diabetic ketoacidosis in infants, children, and adolescents: A consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care* **29**(5): 1150-9.

Yamaji, T., T. Mizoue, et al. (2004). Coffee consumption and glucose tolerance status in middle-aged Japanese men. *Diabetologia* **47**(12): 2145-51.

Zeegers, M. P., E. Kellen, et al. (2004). The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol* **21**(6): 392-401.

Zhang, W. and K. A. Reynolds (2001). MeaA, a putative coenzyme B12-dependent mutase, provides methylmalonyl coenzyme A for monensin biosynthesis in Streptomyces cinnamonensis. *J Bacteriol* **183**(6): 2071-80.

Zock, P. L., M. B. Katan, et al. (1990). Effect of a lipid-rich fraction from boiled coffee on serum cholesterol. *Lancet* **335**(8700): 1235-7.