

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin  
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Matthias Nauck)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Metabolomsignaturen zur Identifizierung und Stratifizierung von  
Patienten mit eingeschränkter Glukosetoleranz**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2021

vorgelegt von:

Charlotte Luise Wildberg

geboren am: 15.04.1992

in: Bad Oldesloe

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: PD Dr. rer. med. Nele Friedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Rathmann

Ort, Raum: Greifswald, Universitätsmedizin, Raum 10.0.16

Tag der Disputation: Dienstag, 09.08.2022, 14.00 Uhr

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1. Diabetes und Prädiabetesformen .....	5
1.2. Diagnoseverfahren und die Bedeutung des oralen Glukosetoleranztests.....	8
1.3. Metabolomics .....	11
1.4. (Prä)diabetes assoziierte Metabolite und deren pathophysiologische Bedeutung .....	13
1.5. Zielsetzung .....	15
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1. Studiendesign und -population .....	16
2.2. Klinisch-chemische Analysen .....	17
2.3. Metabolomanalysen .....	17
2.4. Qualitätskontrolle .....	18
2.5. Datenintegration .....	18
2.6. Statistische Analyse .....	19
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
3.1. Charakteristika der Studienpopulation.....	21
3.2. Assoziationen von Metaboliten zu 2-Stunden Glukose-/Insulinkonzentrationen.....	22
3.3. Clustering der Population mit einer gestörten Glukosetoleranz (IGT) .....	26
3.4. Vorhersage einer gestörten Glukosetoleranz.....	26
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>28</b>
4.1. Phosphatidylcholine (PCs) und Lipoproteinpartikel.....	30
4.2. Metabolite mit Verbindung zu Entzündungsprozessen.....	31
4.3. Clustering der Population mit einer gestörten Glukosetoleranz (IGT) .....	32
4.4. Vorhersage einer gestörten Glukosetoleranz.....	33
4.5. Stärken und Schwächen der vorliegenden Arbeit.....	34
4.6. Schlussfolgerung und Ausblick .....	34
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>35</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>36</b>
<b>7. Anhang</b> .....	<b>44</b>
7.1. Wissenschaftliche Publikation.....	44
7.2. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift .....	59
7.3. Eidesstattliche Erklärung.....	60
7.4. Danksagung.....	61

## Abkürzungsverzeichnis

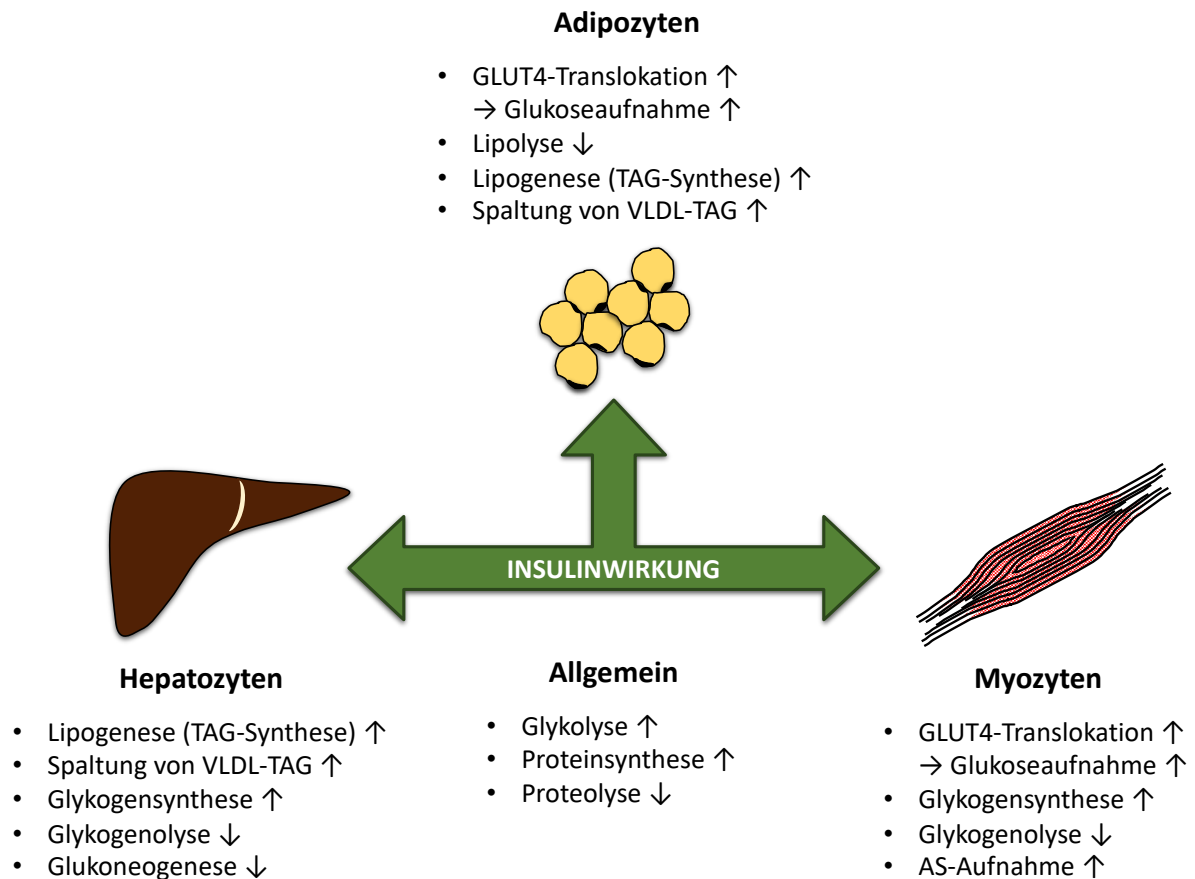
<sup>1</sup> H-NMR	<sup>1</sup> H Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy ( <i>dt.</i> <sup>1</sup> H magnetische Kernresonanzspektroskopie; auch Kernspinresonanzspektroskopie)
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AUC	Area Under the Curve ( <i>dt.</i> Fläche unter der Kurve)
BCAA	Branched-chain Amino Acid ( <i>dt.</i> verzweigt-kettige Aminosäuren)
BCKA	Branched-chain $\alpha$ -Keto Acid ( <i>dt.</i> verzweigt-kettige $\alpha$ -Ketosäure)
C3	Komplementkomponente C3
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
cNRI	Continuous Net Reclassification Improvement
eGFR	Estimated Glomerular Filtration Rate ( <i>dt.</i> geschätzte glomeruläre Filtrationsrate)
FDR	False Discovery Rate ( <i>dt.</i> Falscherkennungsrate)
FPG	Fasting Plasma Glucose ( <i>dt.</i> Nüchternplasmaglukose; auch Nüchternblutzucker)
HbA <sub>1c</sub>	Hämoglobin A <sub>1c</sub> (glykosyliertes Hämoglobin)
HCA	Hierarchische Clusteranalyse
HDL	High-Density Lipoprotein ( <i>dt.</i> Lipoprotein hoher Dichte)
HOMA-IR	Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance ( <i>dt.</i> homöostatische Modellbewertung zur Quantifizierung der Insulinresistenz)
hsCRP	Hochsensitives C-reaktives Protein
(i)IFG	(isolated) Impaired Fasting Glucose ( <i>dt.</i> (isoliert) gestörte Nüchtern-glukose)
(i)IGT	(isolated) Impaired Glucose Tolerance ( <i>dt.</i> (isoliert) gestörte Glukosetoleranz)
KI	Konfidenzintervall
L-GPC	Linoleoyl-Glycerophosphocholin
LASSO	Least Absolute Shrinkage and Selection Operator
LC	Liquid Chromatography ( <i>dt.</i> Flüssigchromatographie)
LDL	Low-Density Lipoprotein ( <i>dt.</i> Lipoprotein niederer Dichte)
LysoPCs	Lysophosphatidylcholine
MS	Massenspektrometrie
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin ( <i>dt.</i> mechanistische Ziel von Rapamycin)
NEFAs	Non-esterified Fatty Acids ( <i>dt.</i> unveresterte Fettsäuren)
NGT	Normal Glucose Tolerance ( <i>dt.</i> normale Glukosetoleranz)
oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PCs	Phosphatidylcholine
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
ROC	Receiver Operating Characteristics
SHIP	Study of Health in Pomerania
T1DM	Typ-1-Diabetes mellitus
T2DM	Typ-2-Diabetes mellitus
TGs	Triglyceride
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein ( <i>dt.</i> Lipoprotein sehr geringer Dichte)

# 1. Einleitung

## 1.1. Diabetes und Prädiabetesformen

Der Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM) – früher auch als insulinabhängiger oder Alters- bzw. Erwachsenendiabetes bezeichnet – ist eine der größten Gesundheitsbelastungen weltweit. Die Prävalenz dieser chronischen Erkrankung nahm während der letzten 40 Jahre sowohl in der westlichen Welt, als auch in Teilen Afrikas und Asiens kontinuierlich zu (1). T2DM stellt nicht nur eine enorme finanzielle Herausforderung für die Gesundheitssysteme dar, sondern gilt zudem als bedeutender Risikofaktor u.a. für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Niereninsuffizienz, erhöhte Infektanfälligkeit und Wundheilungsstörungen (1–3). Anders als bei Typ-1-Diabetes mellitus (T1DM) ist der T2DM nicht durch einen absoluten Insulinmangel aufgrund autoimmunologischer Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas gekennzeichnet. Vielmehr resultiert T2DM aus einer ineffektiven Wirkung von Insulin in den verschiedenen peripheren Körperzellen, was sich zunächst als Insulinresistenz manifestiert (4). Folge dieser verminderten Insulinwirkung sind erhöhte Glukosespiegel im Blut, die für den Patienten oftmals klinisch symptomlos verlaufen und damit zu einer z.T. jahrelangen Verzögerung der Diagnose eines T2DM führen. So werden T2DM Patienten häufig erst nach Auftreten von mikrovaskulären Komplikationen, wie einer diabetischen Retinopathie, diagnostiziert (1). In **Abbildung 1** und **Abbildung 2** sind die physiologischen Effekte von Insulin auf verschiedene metabolisch aktive Gewebe und der Zustand der Insulinresistenz und dessen Auswirkungen auf unterschiedliche Stoffwechselprozesse gegenübergestellt.

Meist entwickelt sich ein T2DM aus einer progressiv fortschreitenden Insulinresistenz heraus. Im Rahmen der Insulinresistenz kommt es zunächst zu einem kompensatorischen Anstieg der Insulinsekretion. Eine konsekutiv zunehmende Insuffizienz der  $\beta$ -Zellfunktion, d.h. letztendlich eine unzureichende Insulinproduktion, führt dann zur T2DM-Manifestation (siehe **Abbildung 3**) (2). Die daraus resultierende Fehlregulation des Glukosemetabolismus geht mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von mikro- und makrovaskulären Erkrankungen einher. Ein unbehandelter T2DM bzw. unkontrollierte Glukosespiegel können schwerwiegende Schäden für das Blutgefäßsystem (diabetische Mikro- bzw. Makroangiopathie), das Herz (Koronare Herzkrankheit, diabetische Kardiomyopathie), die Augen (diabetische Retinopathie), die Nieren (diabetische Nephropathie) und das Nervengewebe (diabetische Neuropathie) zur Folge haben (1,2,5).

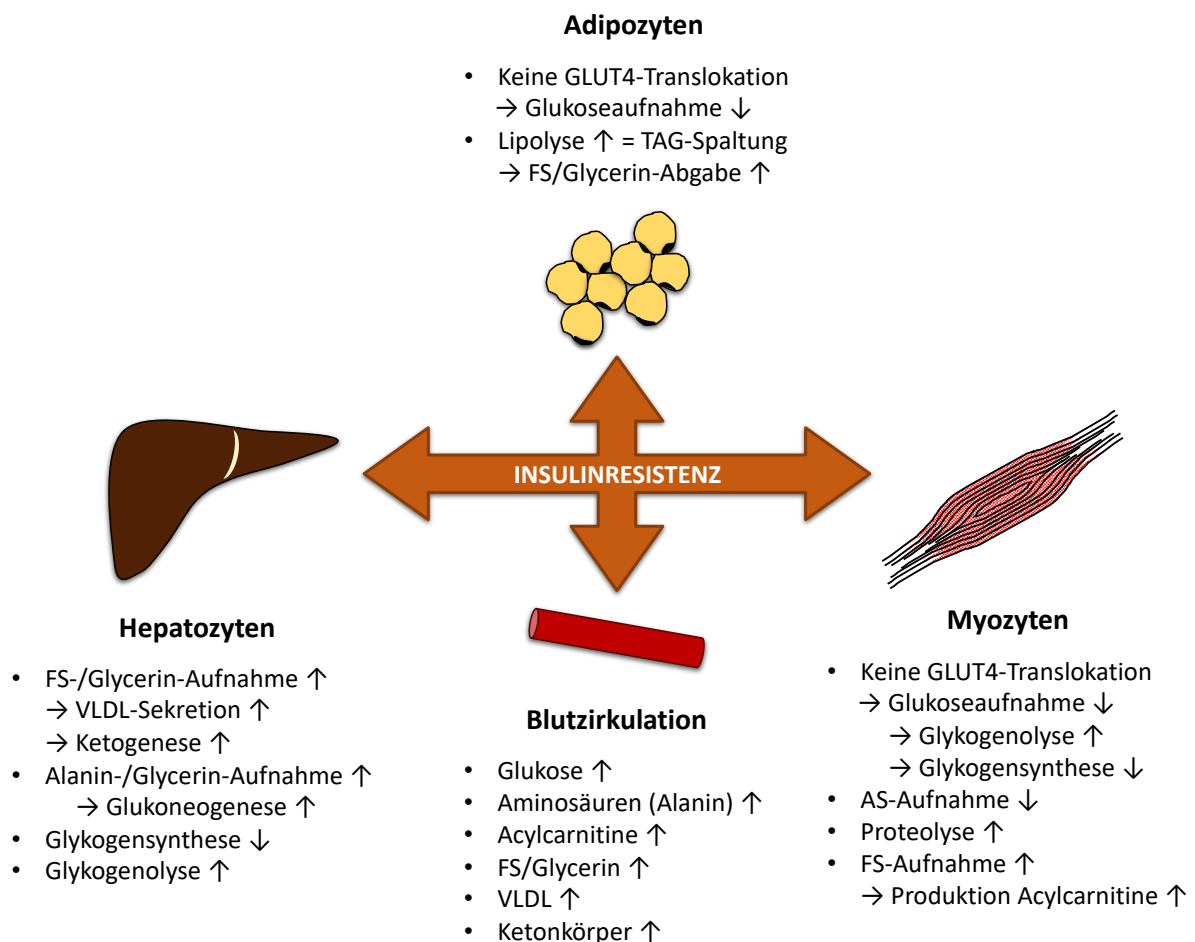


**Abbildung 1** In einem insulinsensitiven Zustand bewirkt Insulin grundsätzlich eine Hochregulierung der Glykolyse, Proteinsynthese und eine Hemmung der Proteolyse. V.a. in Muskel- und Fettgewebe kommt es außerdem zur gesteigerten Translokation von insulinabhängigen GLUT4-Transportern, die eine vermehrte Glukoseaufnahme in die Zellen ermöglichen. Ebenso ist die Aufnahme von Aminosäuren (AS) v.a. in die Skelettmuskeln gesteigert. Die Lipolyse wird in den Fettzellen supprimiert, während die Lipogenese, sprich Triglyceridsynthese (bzw. Triacylglycerole, TAG) gesteigert ist. Durch Aktivierung der Lipoproteinlipase kommt es außerdem zur vermehrten Spaltung von Very low-density Lipoprotein (VLDL)-TAGs. Durch das bestehende Glukoseangebot ist die Glykogensynthese sowohl im Muskel als auch in der Leber gesteigert, während die Glykogenolyse gehemmt ist. Auch die hauptsächlich in der Leber stattfindende Glukoneogenese ist durch die Wirkung von Insulin supprimiert (4,6,7).

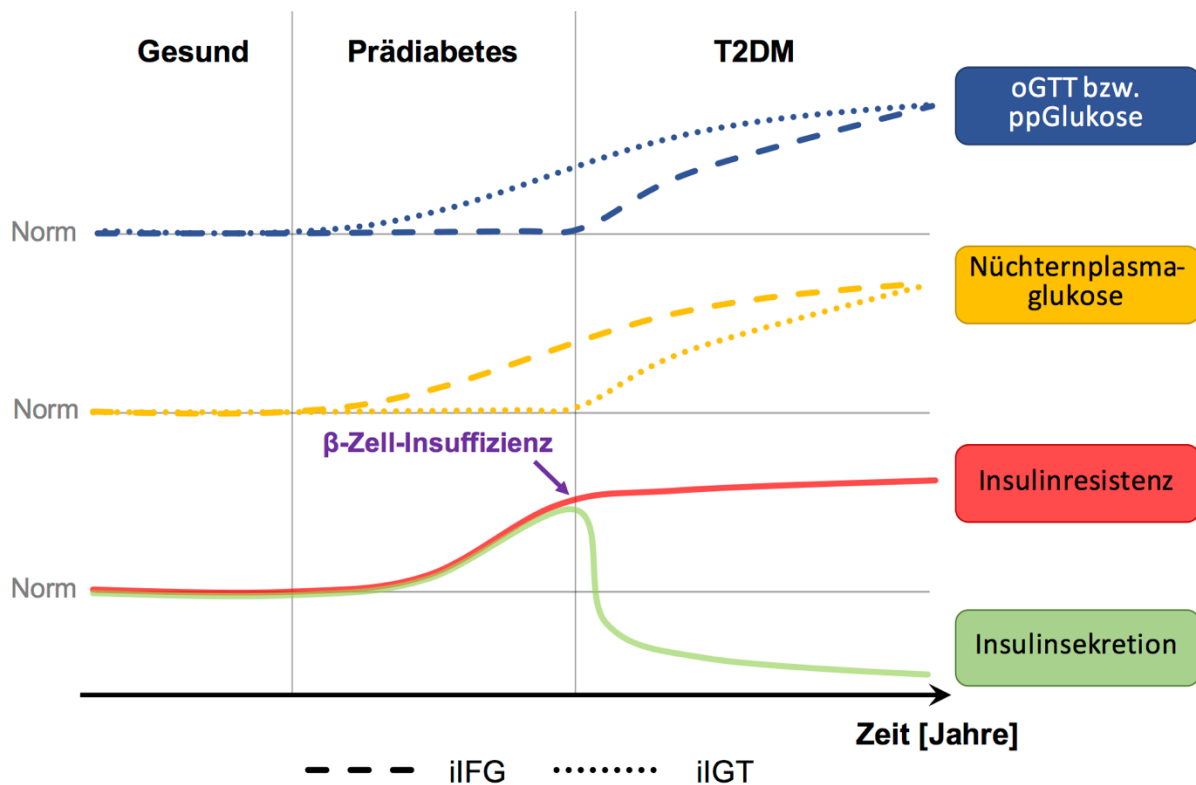
Dem manifesten T2DM geht häufig ein langes präsymptomatisches Stadium voraus. Dieses ist entweder durch erhöhte Nüchternglukosewerte (*engl.* Impaired Fasting Glucose, IFG) und/oder durch eine gestörte Glukosetoleranz (*engl.* Impaired Glucose Tolerance, IGT) gekennzeichnet. Beiden Zuständen liegt eine unzureichende Wirkung von Insulin in Zielgeweben, insbesondere dem Skelettmuskel, zu Grunde (5). Neben der obenerwähnten Insulinresistenz und der damit einhergehenden gestörten intrazellulären Weiterleitung des Insulinsignalling-Pathways kann eine verminderte Insulinsekretion aus dem Pankreas infolge eines Funktionsverlustes der  $\beta$ -Zellen in den Langerhansschen Inseln hinzukommen (2). Allerdings sind IFG und IGT nicht als manifester T2DM einzustufen und werden als Prädiabetes bezeichnet, da diese Zustände

noch als reversibel gelten (z.B. durch Lebensstiländerung und Gewichtsreduktion) (5) (siehe **Abbildung 3**).

Laut einer Kohortenstudie auf Mauritius entwickeln etwa 46% der IGT-Patienten innerhalb von 11 Jahren einen manifesten T2DM, ca. 26% verbleiben im Zustand der eingeschränkten Glukosetoleranz, 4% gehen in eine IFG über und bei etwa 24% kommt es zur vollständigen Rückbildung von IGT (8).



**Abbildung 2** Im Zustand der Insulinresistenz sind die Stoffwechselaktivitäten genau gegensätzlich zum Zustand der Insulinsensitivität (siehe Abbildung 1). Folglich ist durch die verminderte Aufnahme von Glukose aus dem Blut ins periphere Gewebe die Blutzuckerkonzentration erhöht. Es kommt durch die vermehrte Lipolyse und das konsequente Überangebot an Metaboliten wie Fettsäuren (FS) und Glycerin zu einer erhöhten VLDL-Synthese und Ketogenese in der Leber, dessen Stoffwechselprodukte (v.a. Ketonkörper) im Blut anfallen (4,6,7). Durch eine teilweise inkomplette  $\beta$ -Oxidation kommt es zu vermehrten Acylarnitinhäufung im Blut (9). Die verminderte Aufnahme von Aminosäuren (AS) und fehlende Suppression der Proteolyse im Muskelgewebe führt zum Anstieg von Aminosäuren (wie z.B. Alanin) im Blut, welche dann je nach glukogener und/oder ketogener Eigenschaft von der Leber aufgenommen und weiter verstoffwechselt werden (4,6,7).



**Abbildung 3** Graphische Darstellung der Verläufe verschiedener Parameter während der zeitlichen Entwicklung eines Prädiabetes bis hin zu Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM). Im gesunden (insulinsensitiven) Zustand sind alle Werte der Parameter innerhalb des Normbereiches. Die breitgestrichelten Linien repräsentieren den Zustand der isolierten IFG (engl. Isolated Impaired Fasting Glucose) (iIFG), die gepunktete Linie den Zustand der isolierten IGT (engl. Isolated Impaired Glucose Tolerance) (iIGT). Im Zustand der iIFG liegen die Werte des oralen Glukosetoleranztest (oGTT) bzw. postprandiale Glukosewerte (ppGlukose) weiterhin im Normbereich. Im Zustand der iIGT sind dagegen Nüchternplasmaglukosewerte trotz manifestem Prädiabetes normwertig. Während die Insulinresistenz im prädiabetischen Stadium ansteigt, kommt es zunächst kompensatorisch zur erhöhten Insulinsekretion, die allerdings nach Erreichen einer  $\beta$ -Zellen-Insuffizienz drastisch absinkt. Linienfarbencodierung: blau: oGTT-Outcome bzw. ppGlukose-Werte, gelb: Nüchternplasmaglukose, rot: Insulinresistenz, grün: Insulinsekretion. Modifiziert nach (10)

## 1.2. Diagnoseverfahren und die Bedeutung des oralen Glukosetoleranztests

Neben der Bestimmung von glykosyliertem Hämoglobin A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) und der Messung des Nüchternblutzuckers (engl. Fasting Plasma Glucose, FPG), stellt der orale Glukosetoleranztest (oGTT) das Goldstandardverfahren zur Diagnose der prädiabetischen Zustände sowie T2DM dar. Für eine IGT ist der oGTT sogar das einzige etablierte Diagnoseverfahren. **Abbildung 4** zeigt eine Übersicht der verschiedenen laboratoriumsmedizinischen Tests zur Beurteilung der prädiabetischen Zustände sowie zur Diagnostik und Verlaufskontrolle des T2DM.



LABORANALYTIK

		oGTT	FPG	HbA <sub>1c</sub>	Gelegenheits- blutzucker
KLINISCHE EINGNUNG	Diagnose iIGT	✓			
	Diagnose iIFG	✓	✓		
	Diagnose IGT/IFG	✓	✓	✓	
	Diagnose T2DM	✓	✓	✓	✓
	Verlaufskontrolle T2DM	✓	✓	✓	✓

**Abbildung 4** Laboranalytik zur Beurteilung der Prädiabetesformen (isoliert gestörte Glukosetoleranz (engl. Isolated Impaired Glucose Tolerance, iIGT), isoliert gestörte Nüchtern glukose (engl. Isolated Impaired Fasting Glucose, iIFG) und die kombiniert gestörte Glukosetoleranz und Nüchtern glukose (IGT/IFG)) sowie zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM). Die bevorzugten Testverfahren für die jeweiligen Diagnosen bzw. der Verlaufskontrolle werden durch die roten Haken hervorgehoben (11). oGTT = oraler Glukosetoleranztest; FPG = Fasting Plasma Glucose (dt. Nüchternplasmaglukose; auch Nüchternblutzucker); HbA<sub>1c</sub> = glykosyliertes Hämoglobin A1c.

Der HbA<sub>1c</sub> gibt Auskunft über den prozentualen Anteil an glykosyliertem Hämoglobin im Blut und eignet sich zur Einschätzung des durchschnittlichen Blutzuckerspiegels während der vorangegangenen 2-3 Monate. Bei der Diabetesdiagnostik sollte initial eine gemeinsame Bestimmung der FPG (Nüchternzeit von 8–12 Stunden) und des HbA<sub>1c</sub> erfolgen. Zeigen beide Messgrößen das Vorliegen eines Diabetes mellitus an, kann die Diagnostik als abgeschlossen betrachtet werden. Geben die Messgrößen jedoch widersprüchliche oder unklare Ergebnisse, sollte ein oGTT erfolgen (11). Der HbA<sub>1c</sub> kann auch einen Prädiabetes (ohne Unterscheidung zwischen IGT oder FPG) kenntlich machen, dient jedoch im klinischen Alltag hauptsächlich der Verlaufskontrolle eines bereits diagnostizierten T2DM. Der HbA<sub>1c</sub> kann zu jeder Tageszeit und ohne besondere Vorkehrungen (z.B. Einhalten einer Nüchternzeit) bestimmt werden und wird nicht durch vermehrte Muskelarbeit verfälscht. Jedoch können verschiedene anderen Einflussfaktoren, wie u.a. variierende Hämoglobinkonzentrationen (bspw. bei Substratmangel oder hämolytischen Anämien), strukturelle Veränderungen des Hämoglobins im Rahmen von Hämoglobinopathien (z.B. Thalassämien und Sichelzellsyndrom), das Patientenalter oder Medikamente die Interpretation des HbA<sub>1c</sub>-Wertes erschweren (5,11).

Eine weitere Alternative bei der initialen Diabetesdiagnostik stellt die Messung eines Spontanblutzuckerwerts, auch Gelegenheitsblutzucker genannt, dar. Dieser kann unabhängig von Mahlzeiten zu jeder Tageszeit bestimmt werden. Ab einem Wert von  $\geq 200$  mg/dL ( $\geq 11,1$  mmol/L) und entsprechenden Symptomen (Polyurie, Polydipsie etc.) ist eine Diabeteserkrankung wahrscheinlich (11,12).

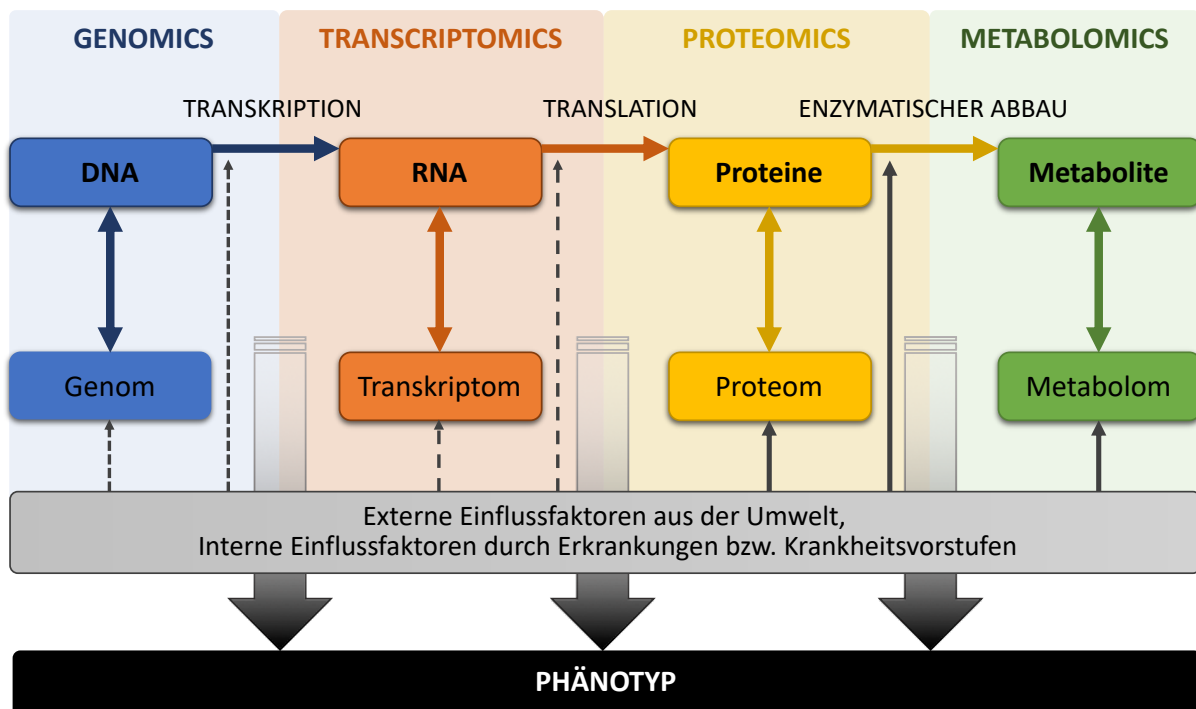
Die Messung des FPG-Wertes ermöglicht die Identifizierung von Patienten mit IFG oder T2DM, während der oGTT die unmittelbare Reaktion des Körpers auf eine Glukosezufuhr

widerspiegelt und damit eine IGT oder aber auch T2DM aufdecken kann (5). Zur Durchführung des oGTT wird dem Patienten zunächst eine Blutprobe im nüchternen Zustand (von mindestens 8 Stunden) entnommen, um den FPG zu bestimmen. Nachdem der Patient eine standardisierte Menge Glukoselösung (75 g Glukose auf ca. 250–300 mL Wasser) innerhalb von 5 min zu sich genommen hat, erfolgt nach 2 Stunden eine erneute venöse Blutentnahme zur Blutzuckerbestimmung. Damit kann die Glukoseclearance aus dem Blutkreislaufsystem über einen definierten Zeitraum bestimmt und somit letztendlich auf die Glukosetoleranz geschlossen werden (13). Von einer eingeschränkten Glukosetoleranz spricht man definitionsgemäß dann, wenn der 2-Stunden Glukosewert zwischen 7,8 bis 11,0 mmol/L liegt. Werte unter 7,8 mmol/L werden als Normalbefund gewertet, während Werte  $\geq 11,1$  mmol/L als T2DM gelten (5). Störfaktoren, welche das Ergebnis des oGTT verfälschen können, sind u.a. eine vermehrte Muskelarbeit und Rauchen vor oder während der Testdurchführung (11). Obwohl der oGTT eine Standardmethode zur Diagnose von T2DM und IGT ist, verliert dieser zunehmend an Bedeutung und bedauerlicherweise ist dessen Einsatz im klinischen Alltag in den letzten Jahren zurückgegangen. Grund dafür ist die verhältnismäßig kostenintensive und komplexe Durchführung und der damit einhergehende Zeitaufwand (14–16). Stattdessen werden oftmals lediglich der wesentlich einfacherer bestimmbare HbA<sub>1c</sub> oder die FPG bei Patienten gemessen. Für eine Subgruppe von Patienten mit isolierter IGT (iIGT) ist dieses Vorgehen allerdings ungeeignet, da sich bei diesen Patienten die gestörte Glukosetoleranz ausschließlich im oGTT zeigt. Zwar tritt eine IGT häufig in Kombination mit einer IFG auf (11), eine (i)IGT würde jedoch durch eine alleinige Messung des HbA<sub>1c</sub> und FPG unentdeckt bleiben. IGT-Patienten weisen ein zweifach-erhöhtes Mortalitätsrisiko auf (17) und ein spätere Progression der IGT bis hin zu einem manifesten T2DM ist nicht unwahrscheinlich (14,15,18). Das jährliche relative Risiko eines iIGT-Patienten einen T2DM zu entwickeln, ist im Vergleich zu Menschen mit normaler Glukosetoleranz (*engl.* Normal Glucose Tolerance, NGT) sogar um ein 6-faches erhöht. Bei einer Dysglykämie durch eine Kombination von IGT und IFG ist das relative Risiko sogar um das 12-fache erhöht (5). Außerdem besteht bereits während eines Prädiabetes ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung von makrovaskulären Komplikationen (1).

Wie oben bereits erwähnt, ist der oGTT derzeit die einzige Methode, um eine IGT nachzuweisen. Die Entwicklung neuer Testverfahren bzw. die Identifikation molekularer Marker für eine iIGT könnten zu einer verbesserten Früherkennung beitragen, woraufhin rechtzeitig therapeutische Interventionen bei diesen Patienten eingeleitet werden könnten.

### 1.3. Metabolomics

Metabolite sind kleine Biomoleküle, welche die End- bzw. Zwischenprodukte zellulärer Regulations- und Stoffwechselprozesse darstellen. Konzentrationsspiegel verschiedener Metabolite sind zum einen aufgrund genetischer Prädisposition und zum anderen als Reaktion auf biochemische bzw. hormonelle Prozesse und auf exogene Einflüsse (wie z.B. Nahrungszufuhr oder Nikotinabusus) intraindividuell variabel (19,20). Parallel zu den Begriffen Genom, Transkriptom und Proteom – die Gesamtheit der genetischen Informationen (DNA), des Transkriptionsmaterials (RNA) und der Proteine im Organismus – bilden die in einem biologischen System vorkommenden Metabolite das sogenannte Metabolom (19,21). Das Metabolom umfasst sowohl Kohlenhydrate, Aminosäuren als auch Lipide, aber auch hormonelle bzw. immunologische Spaltprodukte und Xenobiotika. Die einzelnen o.g. molekularen Ebenen sind durch Umweltfaktoren und Erkrankungen veränderbar. Der Umwelteinfluss nimmt von der Genom- bis hin zur Metabolomebene stetig zu (22) (siehe **Abbildung 5**). Die Begriffe Genomics, Transcriptomics, Proteomics und die hier im Fokus stehenden Metabolomics als Analyseverfahren leiten sich von dem untersuchten molekularen Material (DNA, RNA, Proteine oder Metabolite) ab (siehe **Abbildung 5**).



*Abbildung 5* Übersicht der verschiedenen „-omics“-Ebenen und die daraus resultierenden Begrifflichkeiten. Die einzelnen molekularen Ebenen sind durch externe Faktoren wie Umweltreize und interne Faktoren wie Krankheiten bzw. deren Vorstufen beeinflussbar, was sich letztendlich auf den Phänotyp auswirkt. Der externe Einfluss nimmt von der Genom- bis hin zur Metabolomebene stetig zu (hier durch die verschiedenen schwarzen Pfeile dargestellt). Modifiziert nach (22)

Die einzelnen Analyseebenen sind wichtige Instrumente, um die Biologie eines Organismus und seine Reaktion auf Umweltreize, genetische Störungen oder pathophysiologischen Mechanismen zu verstehen (21) und daher von entscheidendem Interesse in der Systembiologie. Metabolite kommen in allen Körperflüssigkeiten wie bspw. Blutplasma/-serum, Urin, Speichel und Liquor cerebrospinalis vor und können nach erfolgter Probenvorbereitung mithilfe verschiedener Metabolomics-Analysetechniken nachgewiesen werden (23). Die zwei Hauptmethoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten sind die Massenspektrometrie (MS) und die Kernspinresonanzspektroskopie (*engl.*  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy,  $^1\text{H}$ -NMR). Hierbei kann sowohl ein „targeted approach“ (gerichtete Analyse), d.h. eine gezielte Quantifizierung (Konzentrationsmessungen) von vordefinierten Metaboliten, oder aber ein „non-targeted approach“ (ungerichtete Analyse) gewählt werden. Bei Letzterem, dem sogenannten „non-targeted metabolomic profiling“, handelt es sich um eine umfangreiche Analyse der Proben mit dem Ziel möglichst viele Metabolite zu annotieren. Dies geschieht allerdings nur in Form einer relativen Quantifizierung, d.h. mit dem Verlust der Konzentrationsangabe (Einheit). Non-targeted metabolomics erlauben die Detektion eines breiten Spektrums an Biomolekülen, welches u.U. auch bisher unbekannte Metabolite (sog. Unknowns) beinhalten kann (21,23,24).

Metabolomicsanalysen gehören zu den neuen Analysetechnologien, welche durch ihre umfangreiche Charakterisierung von Biosystemen Aufschluss über die Pathophysiologie vieler Erkrankungen geben können (21,23). So wurden zum Beispiel umfassende Untersuchungen auf dem Gebiet der Onkologie durchgeführt (25). Insbesondere steht hierbei die Identifikation von neuen Biomarkern im Fokus, welche nach klinischer Prüfung im Verlauf zur (frühzeitigen) Diagnostik der entsprechenden Erkrankung beitragen können (23).

In Hinblick auf den Diabetes mellitus, lassen sich durch die Identifikation positiver bzw. inverser Assoziationen zwischen diversen Metaboliten und gestörter Glukosehomöostase, Rückschlüsse auf die komplexe Pathophysiologie, die verschiedenen Ätiologien und auf die Progression von Prädiabetesformen bzw. T2DM ziehen. Eine zuverlässigere T2DM-Risikoprognose mithilfe von Metabolitsignaturen bietet die Möglichkeit, mit entsprechenden präventiven Maßnahmen zeitgerecht zu intervenieren.

Metabolomics-Studien sind demnach ein vielversprechendes Instrument, um die Patientenversorgung in Bezug auf Komfort und diagnostische Sicherheit von (i)IGT zu verbessern.

#### **1.4. (Prä)diabetes assoziierte Metabolite und deren pathophysiologische Bedeutung**

In einer Vielzahl von Metabolomicsstudien wurden verschiedene Metabolite im Zusammenhang mit T2DM oder Prädiabetes untersucht (15,26–32). So berichteten Studien wiederholt, dass erhöhte Plasmakonzentrationen von verzweigtkettigen Aminosäuren (*engl.* Branched-chain Amino Acid, BCAA), wie Valin, Leucin und Isoleucin, entweder mit inzidentem Diabetes oder mit prädiabetischen Zuständen assoziiert sind (15,27,28,31–37). Interessanterweise konnten erhöhte Aminosäurekonzentrationen bereits bis zu zehn Jahre vor T2DM Diagnosestellung detektiert werden (27,28,31,33,34). Diese Befunde wurden auf weitere BCAA-Katabolite wie z.B. 3-Hydroxyisobutyrat (38), verzweigtkettige  $\alpha$ -Ketosäuren (*engl.* Branched-chain  $\alpha$ -Keto Acids, BCKAs) oder Ketonkörper ausgedehnt (15,35,37,39).

Eine fehlende Insulin-vermittelte Suppression der Proteolyse in der Skelettmuskulatur könnte die erhöhten BCAA-Konzentrationen bei (Prä-)Diabetikern erklären (40). Zu den erhöhten Plasmakonzentrationen tragen möglicherweise auch BCAA-synthetisierende Darmbakterien wie *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus* bei (41). In einem Mäusemodell konnte gezeigt werden, dass das Einbringen von bestimmten Darmspezies wie *P. copri* in den Gastrointestinaltrakt zu erhöhten BCAA-Plasmakonzentrationen führte und eine Glukoseintoleranz bzw. Insulinresistenz induzierte (41). Eine weitere Studie zeigte signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Darmflora von gesunden Probanden und T2DM-Patienten. Die im Stuhl der T2DM-Patienten vorherrschenden Spezies waren u.a. die Gram-negativen *P. copri* und *B. vulgatus* (42).

Die genannten Prozesse erhöhen die BCAA-Mengen im Blut und damit wahrscheinlich auch die Konzentration des ersten BCAA-Abbauprodukts: BCKAs, wie 3-Methyl-2-oxovalerat.

Auf Basis genetischer Variationen, welche den Stoffwechsel von BCAAs beeinflussen, wurde zudem ein möglicher Beitrag des BCAA-Stoffwechsels in der Ätiopathogenese einer Insulinresistenz und eines T2DM impliziert (43,44). Experimentelle Befunde deuten darauf hin, dass eine durch BCAAs vermittelte Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) zu einer Entkopplung der downstream Signaltransduktion von Insulin am Insulinrezeptor führen (40). Weiterhin wird diskutiert, dass BCAAs eine Hochregulation und Aktivierung von Glukosetransportern in Darm- und Muskelgewebe bewirken, welche die im Rahmen einer Insulinresistenz ausbleibende GLUT4-Translokation in den Geweben kompensieren würde (45).

Auch bestimmte Lipide wie etwa Lysophosphatidylcholine (LysoPCs) wurden mit IGT und/oder Insulinresistenz assoziiert (15,28). Untersuchungen berichteten überwiegend inverse

Assoziationen der LysoPCs u.a. zu einer Dysglykämie (46) und zum T2DM-Risiko (47). In einer Lipidomicsanalyse konnte gezeigt werden, dass LysoPC-Konzentrationen im Plasma von adipösen bzw. diabetischen Patienten nachweislich reduziert sind (48). LysoPC 18:2, auch als Linoleoyl-Glycerophosphocholin (L-GPC) bezeichnet, erscheint bisher am bedeutsamsten und stellte sich als wichtiger inverser Prädiktor für IGT heraus (28). Kurzum, sind LysoPCs Katabolite von Phosphatidylcholinen (PC), die in Zellmembranen oder auf der Oberfläche von Lipoproteinpartikeln vorkommen (47,49,50). Der PC-Abbau wird durch die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) katalysiert (50). Bemerkenswerterweise wurden niedrigere Transkriptionsraten von zytoplasmatischem PLA<sub>2</sub> in Vollblutproben von Patienten mit IGT und T2DM beobachtet (28). Weniger PLA<sub>2</sub> erklärt möglicherweise die niedrigeren Konzentrationen an LysoPCs bei (prä-)diabetischen Patienten. Untersuchungen zeigten, dass LysoPCs die glukoseabhängige Insulinfreisetzung aus den  $\beta$ -Zellen aktivieren können (46,51).

Ebenso wurden zahlreiche Fettsäuren und Acylcarnitine als Intermediate der  $\beta$ -Oxidation (Oxidation von Fettsäuren) oder auch Moleküle mit bisher nicht identifizierter Strukturformel mit IGT und/oder Insulinresistenz assoziiert (15,26,28,52). Mögliche Pathomechanismen umfassen eine mit einer Insulinresistenz bzw. IGT einhergehende unvollständige oder beeinträchtigte  $\beta$ -Oxidation, die mit einer Akkumulation von ungesättigten bzw. unveresterten Fettsäuren (*engl.* non-esterified fatty acids, NEFAs) und Acylcarnitinen einhergeht (9,53). Die als NEFAs bezeichneten freien Fettsäuren werden durch die Spaltung von gespeicherten Triglyceriden während der Lipolyse freigesetzt. Im Rahmen einer Insulinresistenz findet die Lipolyse durch die fehlende Insulin-vermittelte Suppression vermehrt statt und führt somit zur Akkumulation von NEFAs (54). Auch gesättigte Fettsäuren wie Palmitinsäure scheinen mögliche Mediatoren zu sein. So können sie Toll-like-Rezeptoren aktivieren und infolgedessen die Insulin-Signaltransduktion z.T. inhibieren (55,56). Darüber hinaus hängt die Stimulation von Toll-like-Rezeptoren mit der Aktivierung des angeborenen Immunsystems zusammen, dessen Überaktivität im Rahmen der Insulinresistenz (6) und T2DM (57) bekannt ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Konzentrationsänderungen vieler zuvor beschriebener Metabolite höchstwahrscheinlich das Ergebnis fortschreitender Insulinresistenz sind (z.B. BCAAs), während andere Metabolite mit regulatorischen Dysfunktionen bei IGT-betroffenen Personen (z.B. LysoPCs, Fettsäuren und Acylcarnitine) im Zusammenhang stehen (28). Zahlreiche Metabolomics-Studien haben demnach zur Verbesserung des Verständnisses von

biochemischen Signalwegen, die schon Jahre vor der klinischen Manifestation von T2DM gestört sein können, beigetragen.

### **1.5. Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine molekulare Signatur im Blutplasma von ca. 800 nicht-diabetischen Probanden aus der Allgemeinbevölkerung zu ermitteln, die zur Vorhersage für das Resultat eines oGTT dient. Besonderer Fokus lag dabei auf der Prädiabetesform IGT und einer dafür charakteristischen Metabolitsignatur. Dies sollte über die Integration komplementärer Technologien zur Bestimmung zirkulierender Metabolite im Blut in Kombination mit statistischen Analysen sowie Verfahren des maschinellen Lernens erreicht werden (siehe Abschnitt 2. Material und Methoden). Darüber hinaus sollten metabolische Untergruppen (Cluster) innerhalb der IGT-Gruppe identifiziert werden. Dabei wurde ein Augenmerk auf die vielfältige Ätiologie einer gestörten Glukosehomöostase gelegt, wie eine Reihe kürzlich durchgeführter Clustering-Studien angedeutet haben (58–60).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studiendesign und -population

Die verwendeten Daten stammen aus der populationsbasierte Kohortenstudie Study of Health in Pomerania (SHIP). Die Gesundheitsstudie ist in Nord-Ostvorpommern angesiedelt und beinhaltet die ehemaligen Landkreise Stralsund-Land, Greifswald-Land und Anklam-Land sowie die Städte Stralsund, Greifswald und Anklam. Die SHIP Studie beschäftigt sich mit häufigen bzw. relevanten Risikofaktoren verschiedenster Erkrankungen und mit subklinisch bzw. symptomatisch verlaufenden Krankheitsmanifestationen in der Allgemeinbevölkerung der genannten Regionen. Hierbei werden jedoch nicht die einzelnen Erkrankungen untersucht, sondern vielmehr gesundheitsbezogene Merkmale, mögliche (molekulare) Krankheitsdeterminanten und -vorstufen im Detail beschrieben. SHIP besteht aus zwei Kohorten: der initialen SHIP-Kohorte und der SHIP-TREND-Kohorte (61–63). In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich Daten der SHIP-TREND-Kohorte analysiert.

SHIP-TREND basiert auf einer Zufallsstichprobe von 8016 Erwachsenen im Alter von 20–79 Jahren und wurde zwischen 2008 und 2012 durchgeführt. Letztendlich wurden 4420 Probanden (bereinigte Teilnehmerate 50,1%) in die Studie eingeschlossen (61–63). Alle Probanden gaben vor der Teilnahme an der Studie eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Greifswald genehmigt und entsprach den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki.

Von 1000 Probanden ohne Angabe von T1DM oder T2DM in der Anamnese wurden Plasmametabolomdaten mittels MS und <sup>1</sup>H-NMR erhoben. Von diesen wurden für die statistischen Analysen alle Teilnehmer mit einem der folgenden Kriterien ausgeschlossen:

- 1) fehlende Werte des oGTT oder Störgrößen (n = 54)
- 2) eine Fastenzeit von weniger als 8 Stunden (n = 71)
- 3) neu diagnostizierte Diabetiker ( $HbA_{1c} \geq 6,5 \%$  oder Gelegenheitsblutzucker  $\geq 11,1 \text{ mmol/L}$ ) oder Einnahme von Antidiabetika (n = 26)
- 4) unzureichende Qualität der Metabolomdaten (n = 22).

Insgesamt wurde Daten von 827 Probanden in die Analysen einbezogen. Laut aktueller Richtlinien gelten klar definierte 2-Stunden Glukosewerte von  $\geq 11,1 \text{ mmol/L}$  als manifester Diabetes (5). Probanden mit einem solchen Messwert (n = 23) wurden dennoch in die Analysen integriert, da sie nur durch den oGTT identifiziert wurden und da es Ziel dieser Studie war, nach metabolischen Markern zu suchen, welche die dynamische Reaktion auf einen Glukosebelastungstest vorhersagen (64).



## 2.2. Klinisch-chemische Analysen

Nüchternblutproben ( $\geq 8$  Stunden Fastenzeit) wurden zwischen 6:00 und 13:00 Uhr aus der Kubitalvene von Probanden in Rückenlage entnommen. Die Plasmaglukosekonzentrationen wurde sofort aus den frischen Blutproben bestimmt, während die Metabolomanalysen aus Proben erfolgte, die zunächst bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in der Integrated Research Biobank (Liconic, Liechtenstein) der Universitätsmedizin Greifswald gelagert wurden. Unmittelbar nach der Blutprobengewinnung erhielten die nicht-diabetischen Teilnehmer eine standardisierte 75 mg Glukoselösung (Dextro OGT, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) zum Trinken. Serumkonzentrationen von Cystatin C, Molekülen des Lipidstoffwechsels (Gesamtcholesterin, High-density lipoprotein (HDL)- und Low-density lipoprotein (LDL)-Cholesterin, Triglyceride (TGs)), hochsensitivem C-reaktiven Protein (hsCRP) und die katalytische Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALAT) wurden mittels Standardmethoden (Dimension VISTA, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland) gemessen. Plasma-Insulinkonzentrationen wurden bestimmt (Centaur XP von Siemens Healthcare Diagnostics) und die Insulinresistenz (*engl.* homeostatic model assessment of insulin resistance, HOMA-IR) mit folgender Formel berechnet (65,66):

$$HOMA-IR = \frac{Insulin (\mu U/mL) \times Glukose (mmol/L)}{22,5}$$

Die HbA<sub>1c</sub>-Werte wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt (64).

## 2.3. Metabolomanalysen

Eine detaillierte Beschreibung aller angewandten Messtechniken wurde bereits mehrfach durch das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin Greifswald publiziert (67). Eine Besonderheit dieser Studie lag in der Kombination verschiedener spektroskopischer Technologien zur Erfassung des Plasmametaboloms, um eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen. Zu diesem Zweck wurden Daten basierend auf non-targeted Flüssigchromatographie (*engl.* Liquid Chromatography, LC) mit Tandem-MS-Kopplung (MS/MS) (LC-MS/MS), targeted LC-MS/MS, sowie <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie integriert. Neben der höheren Abdeckung von erfassten Metaboliten erlaubte die <sup>1</sup>H-NMR außerdem eine detaillierte Auflösung von Lipoproteinpartikeln und ihren Kernmerkmalen weit über klassische klinisch-chemische Analysen hinaus (64).

## 2.4. Qualitätskontrolle

Unterschiede bei den Metabolitmessungen aufgrund von geringfügigen Abweichungen der Messbedingungen über den Analysezeitraum wurden durch Median-Normalisierung pro Messtag für jeden Metaboliten minimiert. Dieses Verfahren beruht auf der Annahme, dass die statistische Verteilung von Messwerten jedes einzelnen Messtages in etwa ähnlich ist, da Proben nach dem Zufallsprinzip Messtagen zugeordnet wurden. Die globale Verschiebung von relativen Intensitäten wie sie mittels MS gemessen werden, können dann über die Normalisierung eines Parameters korrigiert werden. Die Verwendung des Medians bietet hier den Vorteil der geringeren Empfindlichkeit gegenüber Ausreißern, welche andere Parameter wie etwa den Mittelwert stark beeinflussen. Anschließend wurden die normalisierten Metabolitmessungen log<sub>2</sub>-transformiert. Zur Identifikation von Proben mit einem stark abweichend Metabolitprofil im Vergleich zur Gesamtstichprobe, auch als Ausreißeranalyse bezeichnet, wurde die Daten mittels Hauptkomponentenanalyse ausgewertet und Ausreißer basierend auf der Mahalanobis-Distanz identifiziert. Proben deren Abweichung größer als die 3-fache Standardabweichung war, wurden von allen Analysen ausgeschlossen. Weiterhin wurden nur Metabolite mit weniger als 20 % an Fehlwerten einbezogen und die restlichen imputiert. Nach dieser Qualitätskontrolle wurden jeweils 13, 4 und 6 Proben für die non-targeted MS, targeted MS und <sup>1</sup>H-NMR ausgeschlossen (64,67).

## 2.5. Datenintegration

Der besondere Mehrwert der hier verwendeten Integration von verschiedenen technologischen Plattformen zeigte sich in der sehr geringen Überlappung in der Abdeckung der Metaboliten. Lediglich 44 Metabolite wurden von mehr als einer Plattform gemessen. Zur Harmonisierung der Daten wurden alle Metabolite anhand ihrer biochemischen Klasse (d.h. Lipide, Aminosäuren und Kohlenhydrate) gruppiert und für jeden Metaboliten der Intraklassenkorrelationskoeffizient berechnet, sprich die Korrelation mit allen anderen Metaboliten in der gegebenen Stoffklasse. Der Mittelwert kann dann als Maß für die Ähnlichkeit eines Metaboliten mit allen stoffverwandten Metaboliten gesehen werden. Für Metabolite, welche auf mindestens zwei Plattformen gemessen wurden, wurde jener mit dem höheren mittleren Intraklassenkorrelationskoeffizienten für weitere Analysen ausgewählt. Dieses Vorgehen vermeidet eine postanalytische Auswahl von Messwerten basierend auf den Ergebnissen von statischen Analysen und damit einen möglichen Bias in der Präsentation der Ergebnisse.

Nach Abschluss der Qualitätskontrolle und der Datenvorverarbeitung standen 613 Plasmametabolite für die statistischen Analysen zur Verfügung. Die Daten zu den Lipoproteinpartikeln umfassten 117 Messungen, die den Dichtegradienten von Lipoproteinpartikeln (very low-density lipoprotein (VLDL) bis zu HDL) und deren assoziierte Eigenschaften, wie etwa Gehalt an Triglyceriden, Phospholipiden, Cholesterin (verestert und nicht verestert) und einigen Apolipoproteinen beschreiben (64).

## 2.6. Statistische Analyse

Eine detaillierte Beschreibung der angewandten statistischen Methoden ist der Veröffentlichung zu entnehmen (siehe Wildberg et al. (64), Statistical analysis). Lineare Regressionsanalysen zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Metabolitkonzentrationen (unabhängige Variable) und der 2-Stunden Plasmaglukose- bzw. Plasmainsulinkonzentration (abhängige Variable) nach oGTT stellen die Basis der statistischen Analysen dar. Um die Voraussetzungen der linearen Regression zu erfüllen, wurden Metabolit- und Plasmainsulinkonzentrationen log-transformiert. Alle Modelle wurden für die Nüchternkonzentration von Glukose bzw. Insulin, sowie für Alter, Geschlecht, Taillenumfang, körperliche Aktivität, Rauchverhalten, Serum-ALAT-Aktivität, die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (*engl.* estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR) und hsCRP adjustiert. Für die logistischen Regressionsmodelle (gleichermaßen adjustiert) wurde die Studienpopulation zunächst anhand der 2-Stunden Plasmaglukosewerte in Probanden mit NGT ( $< 7,8$  mmol/l,  $n = 668$ ) und Teilnehmer mit IGT ( $\geq 7,8$  mmol/l,  $n = 159$ ) unterteilt. Um eine Kumulation des  $\alpha$ -Fehlers aufgrund der vielen Test zu berücksichtigen, wurden die p-Werte aus den Regressionsmodellen unter Verwendung des Verfahrens von Benjami-Hochberg transformiert und eine Falscherkennungsrate (*engl.* False discovery rate, FDR) von unter 5% als statistische Signifikanz festgelegt.

In einem weiteren Schritt wurden alle IGT-Fälle ( $n = 159$ ) mithilfe eines k-means-Algorithmus, sowie einer hierarchischer Clusteranalyse (HCA) einer ungerichteten Clusteranalyse unterzogen. Hierbei wurden lediglich diejenigen Metabolite einbezogen, die eine signifikante Assoziation in der linearen oder logistischen Regression zeigten und weniger als 20 % fehlende Werte (Imputation mittels k-Nearest-Neighbor-Algorithmus) aufwiesen. Um die optimale Anzahl an Clustern zu bestimmen, wurden 30 verschiedene Maße zur Cluster-Trennung ausgewertet, die im R-Paket NbClust (68) implementiert sind. Da mehrdimensionale Clusteranalysen in der Regel keinen direkten Aufschluss über die bedeutenden Variablen zur Trennung der Cluster oder Gruppen liefern, wurde zuerst eine binäre Variable erstellt, die die

Zugehörigkeit für jeden Probanden zu einem Cluster beschreibt. Diese Variable war dann der Outcome für eine Random-Forest Analyse, um ein Bedeutungsmaß (variable importance) für jeden Metaboliten abzuleiten.

Zur Ableitung eines verbesserten Algorithmus zur Identifikation von IGT wurde ein mehrstufiges Verfahren des maschinellen Lernens verwendet. Aufgrund der ausgeprägten Korrelationsstruktur der Metabolite wurde eine regularisierte Form der logistischen Regression, namentlich Least Absolute Shrinkage and Selection Operator (LASSO), zur Ableitung einer minimalen aber aussagekräftigen Signatur für IGT (2-Stunden Glukose  $\geq 7,8$  mmol/L) innerhalb der Studienpopulation verwendet. Als Maß für die Variablenperformance diente der Grad an Klassifizierungsperformance des finalen Modells gemessen anhand der Fläche unter der Kurve (*engl.* Area Under the Curve, AUC) der ROC-Analyse (*engl.* Receiver Operating Characteristics), sofern diese Variable in das endgültige Modell integriert wurde.

Drei verschiedene Variablenzusammensetzungen wurden getestet, um die beste Klassifizierung zu identifizieren: eine beruhte nur auf etablierten klinischen Parametern, eine weitere lediglich auf Metaboliten und eine dritte berücksichtigte eine Kombination aus beidem. Schließlich wurden drei logistische Regressionsmodelle mit einem minimalen Satz an Variablen erstellt, um eine IGT zu identifizieren. Die Leistungen der einzelnen Modelle wurden mittels ROC-Kurven beurteilt (DeLong-Tests, Continuous Net Reclassification Improvement (cNRI)).

Alle statistischen Auswertungen wurden mit R 3.3.2 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) durchgeführt (64).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakteristika der Studienpopulation

**Tabelle 1** fasst die Merkmale der Studienpopulation zusammen. Probanden mit einer IGT waren älter, weniger häufig Raucher, hatten einen größeren Taillenumfang und zeigten signifikant höhere Werte in den Parametern der Glukosehomöostase bzw. der Insulinresistenz wie etwa HbA<sub>1c</sub> und HOMA-IR. Darüber hinaus wiesen sie höhere ALAT-Aktivität, TG-, hsCRP-, 2-Stunden Insulin- und Glukosekonzentrationen sowie eine niedriger eGFR im Vergleich zur NGT Gruppe auf.

*Tabelle 1 Charakteristika der Studienpopulation nach Glukosetoleranz (normale Glukosetoleranz (NGT) bzw. gestörte Glukosetoleranz (IGT)).*

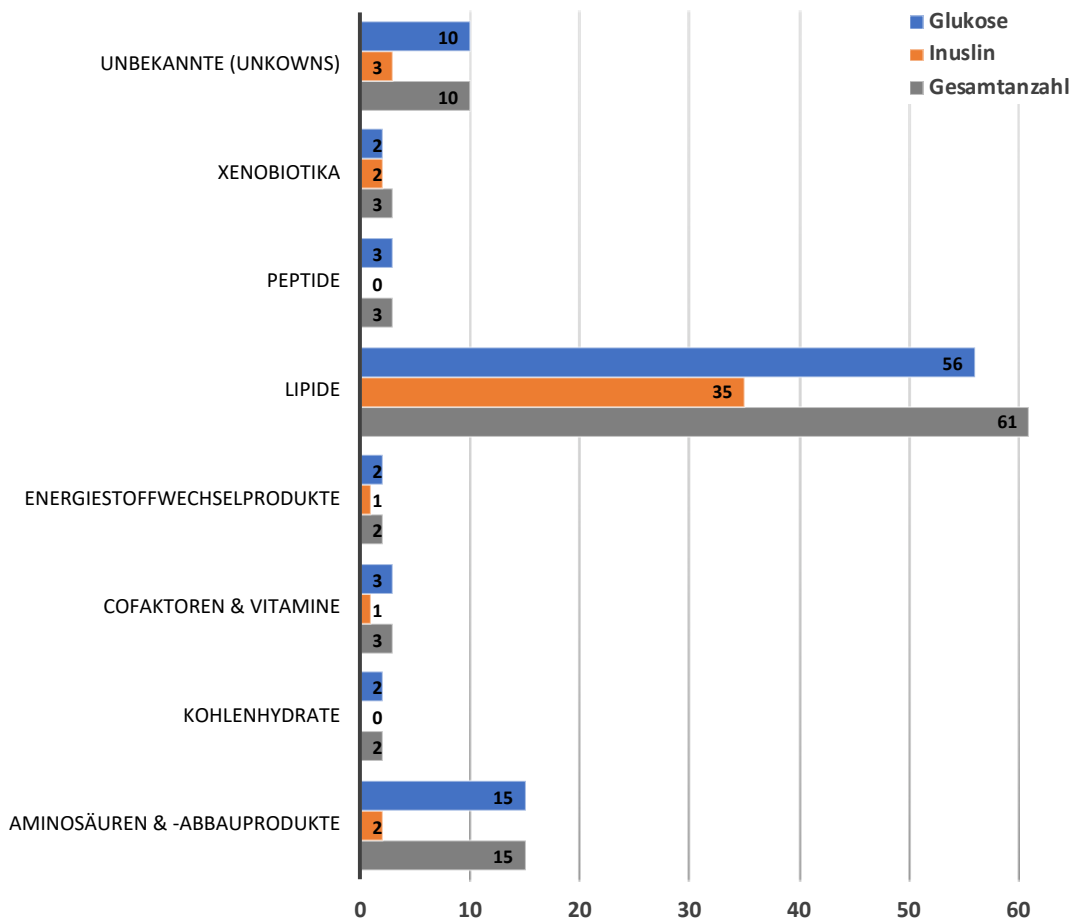
<b>Merkmal</b>	<b>NGT (n = 668)</b>	<b>IGT (n = 159)</b>	<b>p*</b>
Alter (Jahre)	49 (40; 58)	60 (50; 68)	<0,01
Frauen (%)	57,3	52,8	0,35
Nikotinabusus (%)			<0,01
nie geraucht	41,4	52,2	
ehem. Raucher	36,1	39,6	
Raucher	22,5	8,2	
Körperlich aktiv (%)	73,3	75,5	0,66
Taillenumfang (cm)	86 (77; 95)	95 (85; 102)	<0,01
Nüchternglukosekonzentration (mmol/L)	5,3 (5,0; 5,6)	5,8 (5,3; 6,3)	<0,01
2-Stunden Glukosekonzentration (mmol/L)	5,8 (5,1; 6,5)	8,9 (8,2; 10,5)	<0,01
Nüchterninsulinkonzentration (µU/mL)	8,3 (6,0; 11,9)	13,5 (9,1; 18,1)	<0,01
2-Stunden Insulinkonzentration (µU/mL)	45,0 (30,0; 65,6)	134,0 (76,4; 184,3)	<0,01
HOMA-IR	1,97 (1,4; 2,9)	3,4 (2,2; 4,9)	<0,01
HbA <sub>1c</sub> (%)	5,1 (4,8; 5,4)	5,4 (5,1; 5,7)	<0,01
Triglyceride (mmol/L)	1,16 (0,84; 1,61)	1,46 (1,09; 1,96)	<0,01
LDL-Cholesterin (mmol/L)	3,36 (2,76; 3,98)	3,47 (2,90; 4,00)	0,27
Gesamtcholesterin (mmol/L)	5,4 (4,8; 6,2)	5,5 (4,9; 6,1)	0,17
hsCRP (mg/L)	1,08 (0,57; 2,12)	1,66 (0,94; 3,90)	<0,01
ALAT-Aktivität (µkatal/L)	0,36 (0,27; 0,50)	0,42 (0,31; 0,60)	<0,01
eGFR (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	114 (106; 123)	108 (99; 117)	<0,01

ALAT = Alanin-Aminotransferase; eGFR = Estimated Glomerular Filtration Rate (*dt.* geschätzte glomeruläre Filtrationsrate); HOMA-IR = Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (*dt.* homöostatische Modellbewertung zur Quantifizierung der Insulinresistenz); HbA<sub>1c</sub> = Hämoglobin A1c (glykosyliertes Hämoglobin); hsCRP = hochsensitives C-reaktives Protein. Metrisch skalierte Daten werden als Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) ausgedrückt. Nominalskalierte Daten werden in Prozent angegeben. \* Ein  $\chi^2$ -Test (nominalskalierte Daten) oder ein Mann-Whitney-U-Test (metrisch skalierte Daten) wurden durchgeführt.

### 3.2. Assoziationen von Metaboliten zu 2-Stunden Glukose-/Insulinkonzentrationen

Die Resultate dieser Studie sind ausführlich in der angehängten Publikation dieser Arbeit beschrieben (siehe Wildberg et al. (64), Figure 2 und Table 2). Im Folgenden werden nur einige der Kernbefunde thematisiert.

Insgesamt zeigten Ausgangskonzentrationen von 99 Metaboliten signifikant positive oder inverse Assoziationen mit den 2-Stunden Glukose- und /oder Insulinkonzentrationen (siehe **Abbildung 6**). Die Mehrheit der Metabolite (insgesamt 93) war dabei mit der 2-Stunden Glukosekonzentration assoziiert, während einige Stoffwechselprodukte zusätzlich bzw. ausschließlich eine signifikante Assoziation zur Insulinkonzentration nach 2 Stunden zeigten (insgesamt 44 Metabolite). **Abbildung 6** fasst die Verteilung der assoziierten Metabolite auf die verschiedenen biochemischen Stoffklassen und deren Assoziation zu 2-Stunden Insulin- bzw. Glukosekonzentrationen zusammen.



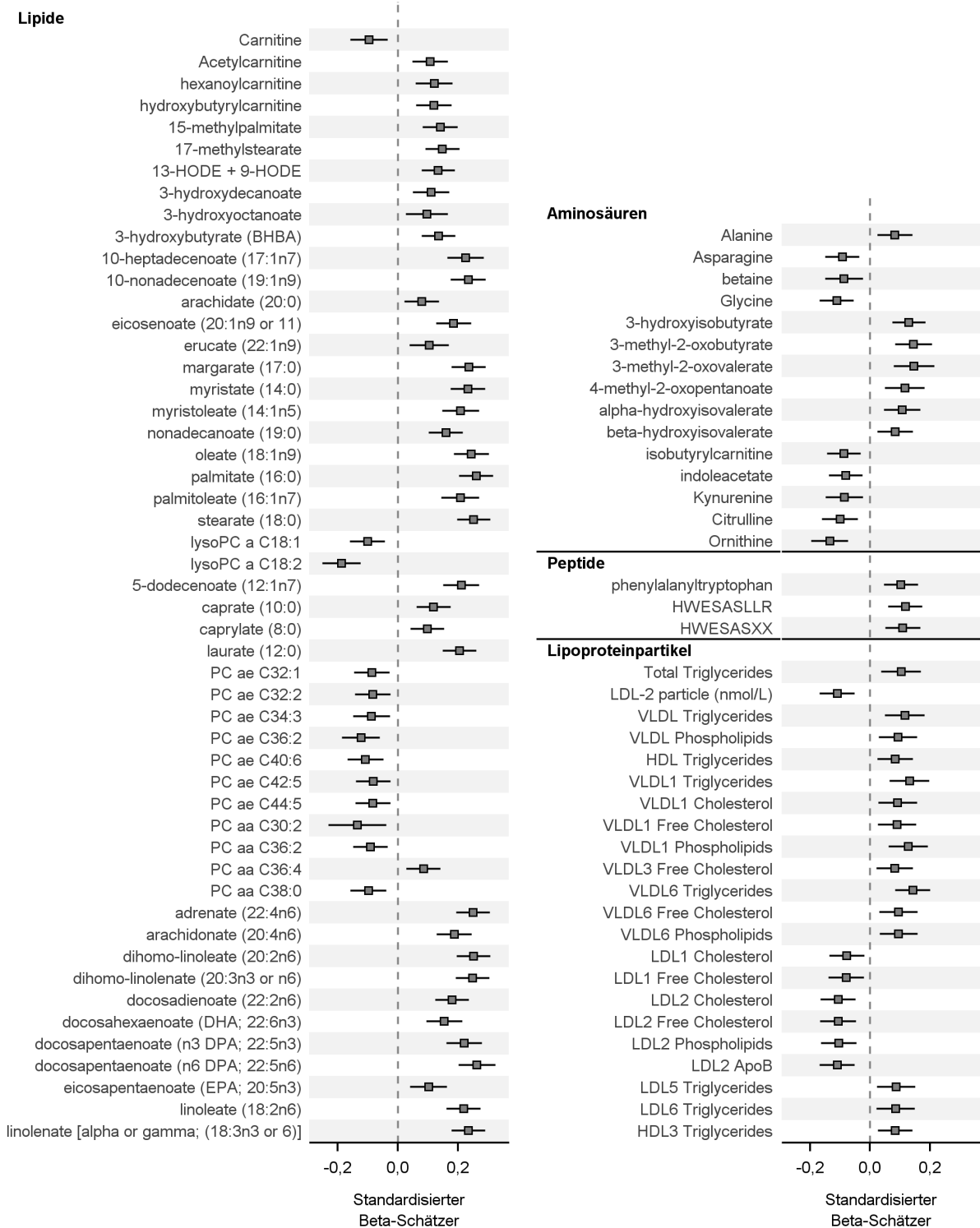
**Abbildung 6** Anzahl assoziierter Metabolite der verschiedenen Stoffgruppen mit 2-Stunden Insulin- bzw. Glukosekonzentrationen. Für jede Substanzklasse wird die Anzahl der Metabolite angegeben, deren Konzentrationen mit 2-Stunden Insulinkonzentrationen (orange) und 2-Stunden Glukosekonzentrationen (blau) assoziiert waren. In grau dargestellt ist die Gesamtanzahl an assoziierten Metaboliten innerhalb einer Substanzklasse.

Die zahlreichsten und auch stärksten positiven Assoziationen zu den 2-Stunden Glukosekonzentrationen zeigten sich bei den Molekülen aus der Gruppe der Lipide (siehe **Abbildung 6** und **Abbildung 7**). Darunter waren auch prominente NEFAs wie Palmitolein- (*engl.* palmitoleate), Linol- (*engl.* linoleate), Ölsäure (*engl.* oleate) mit standardisiertem  $\beta$ -Schätzer um 0,22. Diese ungesättigten Fettsäuren waren ebenso wenn auch weniger signifikant positiv mit den 2-Stunden Insulinkonzentrationen assoziiert (siehe **Abbildung 8**). Weiterhin zeigten alle untersuchten Plasma-Acylcarnitine positive Assoziation sowohl mit den 2-Stunden Glukose- als auch den 2-Stunden Insulinkonzentrationen.

Eine der stärksten inversen Assoziationen konnte zwischen LysoPC 18:2 (bzw. L-GPC) und den 2-Stunden Glukosekonzentrationen (mit einem standardisierten  $\beta$ -Schätzer von ca. -0,19) beobachtet werden. L-GPC wies darüber hinaus eine signifikante inverse Assoziation zu 2-Stunden Insulinkonzentrationen auf (standardisierter  $\beta$ -Schätzer ca. -0,17).

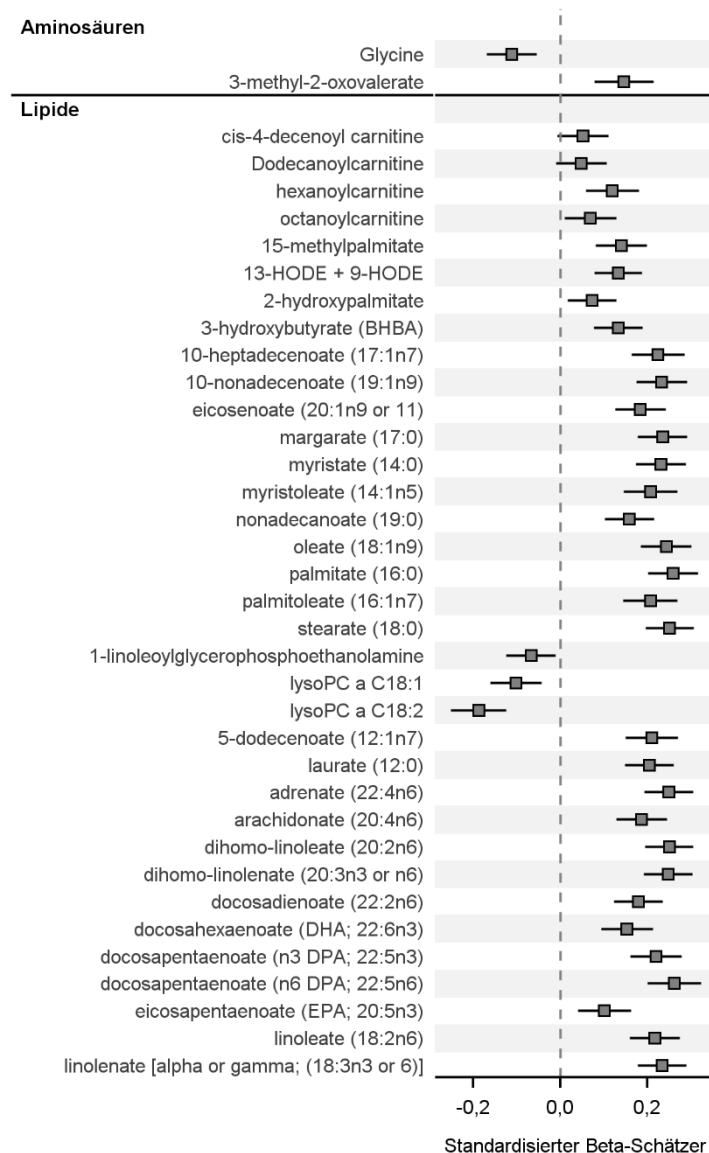
Zwar waren auch inverse Assoziationen mehrerer PCs zu 2-Stunden Glukosekonzentrationen zu verzeichnen, jedoch waren die Effektstärken geringer (siehe **Abbildung 7**) und die Analysen konnten keine derartigen Assoziationen zu den 2-Stunden Insulinkonzentrationen aufdecken.

Weiterhin waren Abbauzwischenprodukte von BCAAs, z.B. 3-Hydroxyisobutyrat (38), 3-Methyl-2-oxobutyrat und 3-Methyl-2-oxovalerat (eine BCKA (35)) und Peptidfragmenten der inflammatorischen Komplementkomponente C3 (HWESASLLR und HWESASXX\* (69)) positiv mit 2-Stunden Glukosekonzentrationen assoziiert (siehe **Abbildung 7**).



**Abbildung 7** Assoziationen von 22 Lipoproteinpartikeln und ausgewählten Metaboliten (69 von 93) zu 2-Stunden Glukosekonzentrationen. Dargestellt sind die standardisierten  $\beta$ -Schätzer (Regressionskoeffizienten) mit 95%-Konfidenzintervall der linearen Regressionsanalysen. Für die vollständige Abbildung mit Darstellung aller 99 Metabolite und deren Assoziationen sowohl zu 2-Stunden Glukosekonzentrationen als auch 2-Stunden Insulinkonzentrationen siehe Wildberg et al. (64), Figure 2.





**Abbildung 8** Assoziationen ausgewählter Metabolite (37 von 44) zu 2-Stunden Insulinkonzentrationen. Dargestellt sind die standardisierten  $\beta$ -Schätzer (Regressionskoeffizienten) mit 95%-Konfidenzintervall der linearen Regressionsanalysen. Für die vollständige Darstellung aller 99 Metabolite und der 22 Lipoproteinpartikel und deren Assoziationen sowohl zu 2-Stunden Glukosekonzentrationen als auch 2-Stunden Insulinkonzentrationen siehe Wildberg et al. (64), Figure 2 und 3B.

In Bezug auf die Lipoproteinsubfraktionen waren 22 Parameter mit 2-Stunden Glukosekonzentrationen assoziiert (siehe **Abbildung 7**). Inverse Assoziationen wurden mit dem Cholesteringehalt von LDL-Partikeln beobachtet, wohingegen der TG-Gehalt in großen VLDL<sub>(1-3)</sub>- und kleinen LDL<sub>(5 bzw. 6)</sub>-Partikeln positiv assoziiert war. Auch Messungen kleiner VLDL<sub>6</sub>-Partikel waren positiv assoziiert. Mit Ausnahme von VLDL<sub>1</sub>-TG ließen sich diese Ergebnisse jedoch nicht in Bezug auf die 2-Stunden Insulinkonzentrationen bestätigen (siehe Wildberg et al. (64), Figure 3B).

### 3.3. Clustering der Population mit einer gestörten Glukosetoleranz (IGT)

Innerhalb der IGT-Population zeigten der k-Means-Algorithmus ( $n = 88$  und  $71$ ) und die HCA ( $n = 90$  und  $69$ ) jeweils zwei Cluster. Wie aus den Jaccard-Indizes von  $0,73$  bzw.  $0,67$  hervorgeht, weisen diese Untergruppen eine robuste Übereinstimmung untereinander auf. Basierend auf der Zuordnung durch den k-means-Algorithmus, unterschieden sich die Teilnehmer nur geringfügig in ihren 2-Stunden Glukosekonzentrationen sowie im Taillenumfang. Letzteres lag wahrscheinlich an einer höheren Anzahl an Männern in Cluster 2. In allen anderen Parametern, welche die Glukosehomöostase betreffen (z.B.  $HbA_{1c}$ , HOMA-IR, Nüchternplasmaglukose), unterschieden sich die beiden Cluster nicht signifikant. Die Random-Forest-Klassifizierung ergab, dass insbesondere (un-)gesättigten freie Fettsäuren für die Unterscheidung zwischen den beiden Untergruppen eine große Rolle spielten. So hatten Mitglieder von Cluster 1 signifikant höhere Fettsäurekonzentrationen im Blutplasma (siehe Wildberg et al. (64), Figure 4).

### 3.4. Vorhersage einer gestörten Glukosetoleranz

Es wurden drei Modellvarianten etabliert, die eine Vorhersage für eine eingeschränkte Glukosetoleranz ermöglichten (**Tabelle 2**).

Die Modelle, die entweder auf etablierten klinischen Parametern oder auf Metaboliten beruhten, zeigten eine vergleichbare Performance in der ROC-Analyse mit einer AUC von ca.  $0,79$  (siehe Wildberg et al. (64), Figure 5A). Das Kombinationsmodell, welches klinische Parameter mit Metaboliten kombinierte, zeigte hingegen eine signifikante Verbesserung der Vorhersagbarkeit im Vergleich zum rein klinischen ( $p < 0,002$ ) oder metabilitenbasierten ( $p < 0,0001$ ) Modell, mit einer AUC von  $0,84$  (95%-Konfidenzintervall (KI):  $0,81 - 0,87$ ) (siehe Wildberg et al. (64), Figure 5A). Eine bessere Prädiktion durch das kombinierte Modell im Vergleich zu dem rein klinischen Modell zeigte sich auch bei der Bewertung des cNRI:  $0,47$  (95%-KI:  $0,30 - 0,64$ ,  $p < 0,001$ ). Stoffwechselprodukte, die in beiden Modelltypen gleichermaßen enthalten waren, umfassten Alanin, LysoPC C18:2 und 2-Oleoylglycerophosphocholin. Der Einschluss von 3-Methyl-2-oxobutyrat und Trigonellin trug ferner zu einer besseren Unterscheidungsleistung bei. Der unbekannte Metabolit X-11727 könnte aus ätiologischer Sicht von Bedeutung sein, da dieser eine Verbindung zwischen Hexosen und Harnstoff im metabolischen Netzwerk herstellte (siehe Wildberg et al. (64), Figure 5B).

**Tabelle 2** Übersicht der Prädiktoren, die zusammen eine eingeschränkte Glukosetoleranz (IGT) abgrenzen können und damit für die verschiedenen Vorhersagemodelle ausgewählt wurden.

Variable, pro SD Anstieg	Score	OR (95%-KI) für eine IGT
<b>Klinische Parameter</b>		
Nüchternplasmaglukose	0,77	2,49 (2,06;3,03)
hsCRP	0,75	1,56 (1,31;1,85)
Alter	0,62	2,07 (1,70;2,53)
HOMA-IR	0,49	2,20 (1,84;2,67)
Raucher (aktuell)	0,33	0,63 (0,48;0,78)
<b>Metabolite</b>		
Alanin	0,77	1,63 (1,36;1,97)
LysoPC a C18:2	0,77	0,55 (0,45;0,65)
Hexosen	0,69	2,12 (1,76;2,58)
X - 11727	0,51	1,97 (1,63;2,40)
2-Oleoylglycerophosphocholin	0,33	0,79 (0,66;0,94)
<b>Kombiniert</b>		
Nüchternplasmaglukose	0,80	2,49 (2,06;3,03)
Alter	0,75	2,07 (1,70;2,53)
LysoPC a C18:2	0,72	0,55 (0,45;0,65)
Alanin	0,67	1,63 (1,36;1,97)
3-Methyl-2-oxobutyrat	0,43	1,89 (1,57;2,30)
HOMA-IR	0,40	2,20 (1,84;2,67)
Trigonellin	0,37	0,75 (0,63;0,90)
2-Oleoylglycerophosphocholin	0,32	0,79 (0,66;0,94)

hsCRP = hochsensitives C-reaktives Protein; LysoPC = Lysophosphatidylcholin.; OR = odds ratio; KI = Konfidenzintervall; SD = Standardabweichung; HOMA-IR = Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (*dt.* homöostatische Modellbewertung zur Quantifizierung der Insulinresistenz). Ergebnisse aus nicht adjustierten logistischen Regressionsmodellen. Score = definiert als durchschnittliche Fläche unter der Kurve (*engl.* Area Under the Curve, AUC) im finalen Klassifikationsdurchlauf, falls die Variable in das LASSO-Modell aufgenommen wurde (siehe 2. Material und Methoden und Wildberg et al. (64)).

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war die Evaluierung, ob komplexe Metabolomicsdaten zur besseren Diagnose und Stratifizierung von Probanden mit IGT beitragen können und wie Assoziationen zwischen einzelnen Metaboliten und dem Outcome des oGTTs (bzw. 2-Stunden Glukose- und /oder Insulinkonzentration) im Einzelnen aussehen. Hierzu wurde eine gesunde Probandengruppe ohne manifesten T2DM untersucht. Unabhängig vom Ausgangszustand der Teilnehmer bezüglich der Plasmakonzentrationen von Glukose und Insulin waren insgesamt 99 Metabolite und 22 Lipoproteinsubfraktionen im Plasma mit dem Outcome des oGTTs und/oder mit 2-Stunden Insulinkonzentrationen assoziiert. Unter den assoziierten Metaboliten fanden sich Moleküle verschiedenster Stoffklassen wie u.a. Lipide, Aminosäuren und Peptide. Eine Reihe dieser Assoziationen wurden bereits in früheren Studien beschrieben wie etwa, BCAA-Abbauprodukte (wie BCKAs) (15,35,37,39,40), (un)gesättigte freie Fettsäuren und Acylcarnitine (9,28,52,55,70,71), LysoPCs (15,28,37,46,47,52) und Lipoproteine (72–75) und konnten durch die vorliegenden Ergebnisse weitestgehend bestätigt werden. Jedoch ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass frühere Untersuchungen sich häufig nicht spezifisch auf die Assoziationen zwischen Metaboliten und IGT bzw. das oGTT-Outcome beziehen, sondern oftmals auf deren Assoziation zu bereits manifestem T2DM oder IFG beruhen. Das hervorzuhebende Merkmal der vorgelegten Studie besteht nicht nur in den hohen Standards der Methodik, sondern auch in der hohen Fallzahl der Studienpopulation, welche eine Stichprobe der Normalbevölkerung darstellt. Darüber hinaus wurden komplementierende Plattformen zur Bestimmung zirkulierender Moleküle integriert, welche durch zeitgemäße bioinformatische Verfahren miteinander verknüpft wurden, um so neue Erkenntnisse zur Ätiologie und Diagnose der IGT zu identifizieren.

Im Vergleich zur Anwendung von rein klinischen Parametern in einem Vorhersagemodell konnte durch die Einbeziehung von Nüchternplasmakonzentrationen von fünf Metaboliten die Klassifizierung von IGT-Probanden zwar geringfügig, aber signifikant verbessert werden.

Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass erhöhte Plasmakonzentrationen an BCAA-Derivaten, wie 3-Hydroxyisobutyrat (38), 3-Methyl-2-oxobutyrat und 3-Methyl-2-oxovalerat (35) bei nüchternen Probanden in direkter Assoziation zu erhöhten 2-Stunden Glukosekonzentrationen stehen. Die Bedeutung von BCAA-Abbauprodukten spiegelt sich außerdem in dem prädiktiven Wert von 3-Methyl-2-oxobutyrat für das kombinierte IGT-Vorhersagemodell wider. Hervorzuheben ist, dass BCAAs selbst nicht zu den IGT-Vorhersagemodellen beigetragen haben, was mit Befunden früherer Studien übereinstimmt

(28,37). Die hier fehlende Assoziation zwischen BCAAs und 2-Stunden Glukosekonzentrationen könnte durch eine zunehmende Leberverfettung (Steatose) bedingt sein. Die Serum-ALAT-Aktivität, als Marker für eine eingeschränkte Leberfunktion, dessen Erhöhung in dieser Studienpopulation am wahrscheinlichsten durch eine Lebersteatose zu erklären wäre, hat sehr wahrscheinlich durch die Aufnahme als Störfaktor ins lineare Regressionsmodell zu einer Abschwächung der Assoziation geführt. So wurde zuvor beobachtet, dass Patienten mit einer beginnenden Steatosis hepatis geringfügigere Abweichungen in BCAA-Plasmakonzentrationen aufweisen (67).

Weiterhin wurde in verschiedenen Studien zu (prä)diabetischen Metabolitensignaturen gezeigt, dass LysoPCs inverse Assoziationen zu dysglykämischen Zuständen wie IGT (15,46) und zum T2DM-Risiko aufwiesen (47). Die Grundlage für diese Befunde ist bisher noch nicht ausreichend geklärt (15,28,46,71). Vermutlich unterstützen LysoPCs physiologischerweise die glukoseabhängige Insulinsekretion aus dem Pankreas (46,51). Somit könnten erniedrigte LysoPC-Konzentrationen eine verminderte Insulinsekretion und damit eine eingeschränkte Glukosetoleranz erklären. Reduzierte LysoPC-Konzentrationen bei IGT-/T2DM-Patienten könnten durch eine verminderte PLA<sub>2</sub>-Aktivität bedingt sein (28), welche für die Spaltung von PCs zu LysoPCs verantwortlich ist (50). Mit den oben genannten früheren Publikationen übereinstimmend, waren in der vorliegenden Studie die Konzentrationen von LysoPCs (18:1 und 18:2) invers sowohl mit der 2-Stunden Glukose- als auch -Insulinkonzentration assoziiert. Neben bestätigenden Befunden konnten zudem einige bisher wenig thematisierte Assoziationen detektiert werden, wie z.B. zu Fragmenten der Komplementkomponente C3 (C3) und mehreren Verbindungen oder Abbauprodukten des Hämstoffwechsels (siehe Abschnitt 4.2. Metabolite mit Verbindung zu Entzündungsprozessen).

Basierend auf den detektierten assoziierten Metaboliten konnten die Probanden mit nachgewiesener IGT in zwei verschiedene Cluster aufgeteilt werden, die sich nur geringfügig in den 2-Stunden Glukosekonzentrationen unterschieden. Die Clusterbildung war insbesondere auf starke Konzentrationsunterschiede an Fettsäuren (v.a. NEFAs) zurückzuführen.

Freie Fettsäuren wie NEFAs wurden schon häufiger mit Insulinresistenz bzw. T2DM in Zusammenhang gebracht (54,76). Es gibt Hinweise darauf, dass NEFAs den Glukosetransport beeinflussen und ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhten NEFA-Konzentrationen im Plasma und einem gestörten Glukosetransport besteht, was zur Entwicklung eines T2DM beiträgt. Auf molekularer Ebene verringern NEFAs den Insulin-vermittelten Glukosetransport, indem sie die Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase herabsetzen. Dieses v.a. durch

Insulin regulierte Enzym ist für die GLUT4-Translokation in die Zellmembran essentiell (7,54,77).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NEFAs eine hepatische Insulinresistenz induzieren, indem sie die Fähigkeit von Insulin die Glucokinase zu aktivieren beeinträchtigen. Die Glucokinase stellt ein wichtiges hepatisches Enzym für die Glykolyse dar, dessen Aktivität normalerweise v.a. durch Insulin erhöht und somit der intrazelluläre Glukoseabbau gesteigert wird (54,78).

Die Vielfalt der Ausprägungen und Pathogenese von T2DM wurde kürzlich durch das „Palettenmodell“ veranschaulicht (79). Dieses illustriert wie die Genese eines T2DM bei einem Individuum von nur einem einzelnen pathophysiologischen Prozess dominiert sein kann, während bei anderen Individuen mehrere geringfügig derangierte Stoffwechselprozesse zur Manifestation eines T2DM führen.

#### **4.1. Phosphatidylcholine (PCs) und Lipoproteinpartikel**

Die Kombination komplementärer Metabolomicstechnologien stellt einen besonderen Mehrwert der vorliegenden Studie dar und erlaubte assoziierte Metabolite in Bezug zu größeren Stoffwechselwegen zu setzen. Insbesondere konnten so bisher unzureichend charakterisierte Assoziationen von PCs in Zusammenhang mit spezifischen Änderungen im Lipoproteinstoffwechsel gesetzt werden.

Eine Reihe von Ether- (ae) und Ester-PCs (aa) waren signifikant invers mit 2-Stunden Glukosekonzentrationen assoziiert. Eine Ausnahme war ausschließlich bei PC aa C36:4 mit einer positiven Assoziation zu verzeichnen. Über ähnliche Beobachtungen bezüglich PCs und einem gestörten Glukosestoffwechsel wurde in einer weiteren aktuellen Metabolomics-Studie berichtet (80). Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl erhöhte Nüchternglukosewerte als auch eine Insulinresistenz (mittels HOMA-IR) mit verminderten Plasmakonzentrationen von diversen PCs assoziiert sind. Darunter waren z.T. dieselben PCs wie in der vorliegenden Studie (alkyl-acyl (ae) C32:1, C32:2, C34:3, C36:2, C40:6, C42:5) (80).

PCs sind für den Aufbau und die Sekretion von Lipoproteinen essentiell und regulieren sogar die Menge an Lipoproteinen, die in den Blutkreislauf gelangen (49). Daher stehen PCs in enger Verbindung mit dem Lipoproteinprofil, welches ebenfalls in der vorliegenden Studie analysiert wurde. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass Insulinresistenz starke Auswirkungen auf den Lipoproteinstoffwechsel hat, einschließlich der TG-Anreicherung in kleinen LDL-Partikeln. Grund dafür ist vermutlich die erhöhte hepatische Sekretion von TG-reichen VLDL-Partikeln, da VLDLs bekanntermaßen letztendlich zu LDLs umgewandelt werden. Der

veränderte Lipoproteinmetabolismus bei Insulinresistenz geht oftmals mit einer Abnahme des Cholesteringehalts in HDL-Partikeln einher (74,81). Dies war jedoch aus den vorliegenden Analysen nicht ersichtlich. Stattdessen wurde ein erhöhter TG-Gehalt in HDL<sub>3</sub>-Partikeln verzeichnet. Eine Erhöhung der Aktivität des Cholesterinester-Transferproteins (CETP), welches den Transfer von Cholesterinestern von HDLs zu TG-reichen Lipoproteinen im Austausch gegen TG vermittelt (72), wurde zuvor bei IGT-Patienten beobachtet (81,82). Die erhöhte CETP-Aktivität könnte demnach für die Anreicherung von TG in HDL<sub>3</sub>-Partikeln verantwortlich sein.

#### **4.2. Metabolite mit Verbindung zu Entzündungsprozessen**

Wie oben erwähnt, konnten, neben den für Insulinresistenz, prädiabetischen Zuständen und T2DM charakteristischen Metaboliten, auch weitere assoziierte Molekülgruppen detektiert werden. So wurde beobachtet, dass L-Urobilin und Bilirubin (Abbauprodukte von Hämoglobin) positiv mit der 2-Stunden Glukosekonzentration, aber nicht mit der 2-Stunden Insulinkonzentration assoziiert waren. Bilirubin wurde zuvor als antioxidativ und entzündungshemmend beschrieben und gilt daher als Schutzfaktor gegen periphere Gefäßerkrankungen (83,84). Das für den Hämoglobinstoffwechsel essentielle Hämoxxygenase-System könnte bei (prä)diabetischen Personen kompensatorisch überaktiv sein, da es vermutlich die Insulinsensitivität und die Glukoseaufnahme erhöht und inflammatorische Prozesse supprimiert (84,85).

Zusätzlich wurde für Fragmente von C3 eine positive Assoziation zu 2-Stunden Glukosekonzentrationen beobachtet. Interessanterweise wurde zuvor in einer Längsschnittstudie festgestellt, dass Plasma-C3-Konzentrationen positiv mit einer Insulinresistenz (HOMA-IR), dem oGTT-Outcome, FPG und sogar mit T2DM assoziiert sind (86). Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems geht mit anderen entzündungsfördernden Prozessen einher, wie der Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren durch Fettsäuren (55,56) und der Erhöhung der CRP-Konzentration (57). Die erhöhten Fettsäure- und CRP-Konzentrationen könnten eine Verbindung zur inflammatorischen Komponente von Insulinresistenz bzw. T2DM darstellen (6). Diese Ergebnisse sind insofern bemerkenswert, da alle Regressionsmodelle für hsCRP-Spiegel adjustiert wurden, was möglicherweise darauf hindeutet, dass Proteine wie C3 auf alternativen Wegen der Entzündungsreaktion die Insulinsensitivität beeinträchtigen könnten.

### 4.3. Clustering der Population mit einer gestörten Glukosetoleranz (IGT)

Innerhalb der Teilnehmergruppe mit IGT wurden zwei Gruppen von Probanden mittels k-means Clustering identifiziert und teilweise durch HCA verifiziert. Beide Gruppen unterschieden sich durch eine charakteristische Fettsäuresignatur, wohingegen keine Unterschiede bezüglich der FPG, HbA<sub>1c</sub> oder HOMA-IR vorlagen. Die 2-Stunden Glukosekonzentrationen waren jedoch geringfügig unterschiedlich, weswegen man nicht vollständig ausschließen kann, dass Mitglieder des Clusters mit höheren Plasmakonzentrationen an Fettsäuren bereits ein fortgeschrittenes Stadium der IGT erreicht hatten. Hervorzuheben ist, dass der Unterschied in den Fettsäurekonzentrationen zwischen den Clustern deutlich ausgeprägter war, als der Unterschied in den 2-Stunden Glukosekonzentrationen (siehe Wildberg et al. (64), Figure 4). Anzumerken ist jedoch, dass deutlich mehr Teilnehmer mit einem diabetischen oGTT-Outcome ( $\geq 11,1$  mmol/L) in Cluster 1 vertreten waren (Exakter Fisher-Test, 3,2-fach angereichert,  $p = 0,02$ ).

In neueren Studien wurden bereits Untergruppen innerhalb von Patientengruppen mit T2DM identifiziert (58–60). Diese Untergruppen unterschieden sich im Krankheitsverlauf (58) und in der Rate an diabetischen Komplikationen wie Nephropathie, Retinopathie und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (58,59). In einer genetischen Studie wurden Cluster anhand von Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert, welche zuvor mit einem erhöhten Risiko für T2DM assoziiert waren. Je nach Polymorphismus unterschieden sich die Cluster(-Mitglieder) in ihrer  $\beta$ -Zellfunktion, ihren Merkmalen für Insulinresistenz (Body-Mass-Index, Taillenumfang, TG- und Lipoproteinprofil) und dem Leberlipidstoffwechsel (60). Diese Befunde lassen vermuten, dass die Probanden der hier dargestellten IGT-Cluster, sich (sofern sie einen T2DM entwickeln) möglicherweise in verschiedene T2DM-Untergruppen aufteilen würden.

Die potenzielle klinische Bedeutung dieses Befundes kann jedoch nur anhand von Längsschnittdaten zu wichtigen Endpunktmerkmalen überprüft werden. Dazu gehören der Zeitpunkt des Auftretens eines T2DM und die konsekutiven Komplikationen. Weitere ausschlaggebende klinische Endpunktmerkmale wären das Ansprechen auf Behandlungsschemata oder viel wichtiger noch die Wirksamkeit von Präventionsmaßnahmen einschließlich Ernährungs- und Lebensstilumstellungen. Könnte man Assoziationen zwischen derartigen langfristigen Auswirkungen und bestimmten IGT-Untergruppen herstellen, wäre eine metabolomische Charakterisierung von Patienten für eine individualisierte Risikoprognose für T2DM von großem Nutzen.

Wie bereits beschrieben, stellen Fettsäuren eine Verbindung zum angeborenen Immunsystem dar. Auch die vorliegenden Ergebnisse sprechen für ein putatives Entzündungsgeschehen im



Rahmen einer IGT, da sich der Inflammationsmarker hsCRP als positiver IGT-Prädiktor herausstellte und höhere Nüchternkonzentrationen an C3 in Plasmaproben von IGT-betroffenen Probanden vorlagen.

#### **4.4. Vorhersage einer gestörten Glukosetoleranz**

Die Anwendung eines Verfahrens des maschinellen Lernens ergab drei IGT-Vorhersagemodelle, die auf unterschiedlichen klinischen und metabolischen Merkmalen basierten. Während die beiden Modelle, welche entweder auf Metaboliten oder auf klinischen Merkmalen beruhten, eine annähernd gleiche Vorhersagegenauigkeit erbrachten, konnte die Prädiktionsgenauigkeit für IGT mithilfe eines kombinierten Ansatzes zur Merkmalsauswahl verbessert werden. Das sich daraus ergebene dritte Modell beinhaltet sowohl Metabolitmarker als auch klinische Parameter.

Zu den ausgewählten Metaboliten gehörten die bereits als IGT-spezifisch beschriebenen Metabolite LysoPC 18:2 (L-GPC) und das BCAA-Derivat 3-Methyl-2-oxobuytrat (15,28,35,37). Das finale metabolitenbasierte und das kombinierte IGT-Vorhersagemodell beinhalteten beide die Aminosäure Alanin, welche bereits im Rahmen einer umfassenden Metaanalyse mit einem erhöhten Risiko für T2DM in Verbindung gebracht wurde (87). Weiterhin wurde bereits beschrieben, dass vergleichsweise hohe Plasmakonzentrationen an Alanin einer IGT bis zu 6,5 Jahre vorausgehen können (33). Der enge Zusammenhang zwischen Alanin und der Glukosehomöostase ist naheliegend, da Alanin für die Glukoneogenese als alternative Quelle statt Glukose verwendet werden kann (88). Geringere Alaninaufnahmen in peripheren Geweben und damit höhere Konzentrationen im Blutkreislauf könnten durch eine hohe (intrazelluläre) Glukoseverfügbarkeit oder supprimierte Glukoneogenese bedingt sein. Eine solche Konstellation könnte im Zustand einer peripheren Insulinresistenz aber noch insulinsensitiven Leber auftreten.

2-Oleoglycerophosphocholin ist wie das bekannte L-GPC ein Glycerophosphocholin und zeigt wie ebenjenes eine inverse Assoziation (odds ratio von 0,79) mit der IGT. Anders als L-GPC wurde es bisher noch nicht in Zusammenhang mit T2DM, IGT oder Insulinresistenz beschrieben. Möglicherweise weist es aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu L-GPC dieselben molekularen Effekte auf.

Auch das Xenobiotikum Trigonellin, eine mit Niacin (Vitamin B3) verwandte Verbindung und Bestandteil von Kaffeebohnen (89,90), konnte mit einer odds ratio von 0,75 zur besseren Prädiktionsleistung des Modells beitragen. In einer Kohortenstudie konnte gezeigt werden, dass ein vermehrter Kaffeekonsum das Risiko an T2DM zu erkranken, senkt (91). Ebenso konnte

Trigonellin kürzlich mit einer Senkung des HbA<sub>1c</sub>-Anteils im Blut (92) und mit einer reduzierten Glukose- und Insulinreaktion während eines oGTTs in Verbindung gebracht werden (93).

Im Allgemeinen zeigt das Vorhersageverfahren die metabolische Heterogenität, die eine gestörte Stoffwechselreaktion auf einen oGTT zur Folge haben kann. Diese wird vermutlich entweder durch eine gestörte Insulinsekretion bzw.  $\beta$ -Zellfunktion oder durch Insulinresistenz verursacht.

#### **4.5. Stärken und Schwächen der vorliegenden Arbeit**

Eine Stärke der vorliegenden Studie liegt im non-targeted Metabolomics-Ansatz mit Einbeziehung verschiedener metabolischer Verbindungen, einschließlich noch unbekannter Metabolite wie X-11727 und unter Berücksichtigung von Lipoproteinsubfraktionen. Dies bietet einen detaillierten Einblick in die Veränderungen im Lipoproteinprofil in direktem Zusammenhang mit einem pathologischen oGTT-Ergebnis. Jedoch erlaubte die relativ geringe Anzahl an IGT-Probanden keine Abgrenzung zu putativen IFG-betroffenen Personen, was die Probandengruppe möglicherweise weiter stratifiziert hätte und eine Limitation der vorliegenden Studie darstellt. Alle vorliegenden Analysen wurden in einem ethnisch homogenen Sample untersucht. Die Übertragung der Ergebnisse auf andere Ethnien sollte daher überprüft werden. Des Weiteren fanden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich querschnittliche Analysen statt. Eine Erweiterung auf mehrere Messzeitpunkte wäre vorteilhaft und würde es erlauben die Stabilität der Ergebnisse im Längsschnitt zur prüfen.

#### **4.6. Schlussfolgerung und Ausblick**

Zusammengenommen konnte in der hier präsentierten Arbeit die Stratifizierung von IGT-Probanden und die Vorhersage einer IGT mithilfe von Metaboliten verbessert werden. Jedoch müssen die vorliegenden Ergebnisse durch Replikationen in unabhängigen Kohortenstudien auf den klinischen Nutzen des Clustering-Ansatzes geprüft werden. Gleiches gilt für die Bewertung der metabolischen IGT-Prädiktoren auf deren Vorhersageleistung und deren Konzentrationsstabilität bzw. -veränderungen über die Zeit. Daher bedürfen die Vorhersagemodelle einer Validierung in unabhängigen metabolischen aber insbesondere auch klinischen Studien. Eine genaue Auftrennung der Prädiabetespopulation in iIGT und iIFG bzw. kombiniertem IGT/IFG sollte in zukünftigen Studien verfolgt werden, um für die unterschiedlichen Prädiabetesformen charakteristische Metabolitsignaturen ausfindig zu machen. So könnten Rückschlüsse auf potenziell unterschiedliche Ätiopathogenesen von IGT und IFG gezogen werden.

## 5. Zusammenfassung

Die gestörte Glukosetoleranz (*engl.* impaired glucose tolerance, IGT) ist eines der präsymptomatischen Zustände des Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM) und erfordert zur Diagnose einen oralen Glukosetoleranztest (oGTT). Ziele dieser Arbeit waren:

- 1) die Identifikation einer Metabolitsignatur zur Vorhersage einer IGT,
- 2) die pathophysiologische Einordnung der bedeutendsten Assoziationen und
- 3) die Identifizierung von Untergruppen innerhalb der IGT-Population, um so erste Hinweise auf eine Patientenstratifizierung anhand objektivierbarer Metabolitmarker im Blut zu erlangen.

Dazu dienten Metabolomdaten basierend auf Massenspektrometrie und Kernspinresonanzspektroskopie von 827 Teilnehmern der Study of Health in Pomerania (SHIP)-TREND. Durch einen targeted und non-targeted Analyseansatz konnte ein breites Spektrum an Metaboliten erfasst und mithilfe statistischer und bioinformatischer Methoden die Assoziationen zum oGTT-Outcome, zur 2-Stunden Insulinkonzentration und daraus abgeleitet zur IGT, ausgewertet werden. Aus über 100 assoziierten Molekülen konnten beteiligte Stoffwechselwege, wie etwa der Katabolismus von verzweigtkettigen Aminosäuren und Veränderungen im Lipoprotein- und Fettstoffwechsel herausgearbeitet werden. Zudem konnte eine integrative Signatur zur Vorhersage einer IGT abgeleitet werden. Es wurde ein verbessertes IGT-Prädiktionsmodell etabliert, welches auf einer Kombination von Metaboliten und klinischen Merkmalen basiert. Diese Befunde sind jedoch in klinischen Studien zu prüfen. Über Verfahren des maschinellen Lernens konnten zwei Cluster innerhalb der IGT-Population identifiziert werden. Die IGT-Cluster spiegeln möglicherweise unterschiedlich fortgeschrittene IGT-Stadien oder verschiedene Ätiopathogenesen wider. Metabolitsignaturen könnten demnach gegebenenfalls eine frühzeitige Patientenstratifizierung ermöglichen. Somit wären bereits IGT-Patienten einem Risikoprofil zuzuordnen, was eine zuverlässigere T2DM-Risikoprognose erlauben würde. Durch rechtzeitige Präventivmaßnahmen bei IGT-betroffenen Personen könnte die Manifestation eines T2DM unter Umständen verhindert werden.

Die hier vorgestellten Befunde sind jedoch als vorläufig zu betrachten und bedürfen einer Replikation in unabhängigen Studien. Die Subtypen-Klassifizierung sollte idealerweise in einer längsschnittlichen Follow-up-Studie examiniert werden, um eine tatsächliche klinische Relevanz zu belegen. Von besonderer Bedeutung wäre dabei die Untersuchung der IGT-Cluster im Follow-up hinsichtlich eines Ansprechens auf allgemeine Interventionsmaßnahmen wie z.B. Lebensstiländerungen aber auch hinsichtlich einer spontanen IGT-Regredienz oder Progression zu einem T2DM und damit einhergehenden Komplikationen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. *Global Report on Diabetes*. (Roglic G, ed.). Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2016. ISBN:978-92-4-156525-7.
2. Mudaliar S, Edelman SV. Insulin therapy in type 2 diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2001;30(4):935-982. doi:10.1016/s0889-8529(05)70222-x.
3. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2018;138:271-281. doi:10.1016/j.diabres.2018.02.023.
4. Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*. 2019;576(7785):51-60. doi:10.1038/s41586-019-1797-8.
5. World Health Organization. *Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycaemia: Report of a WHO/IDF Consultation*. (International Diabetes Federation, World Health Organization, eds.). Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2006. ISBN:978-92-4-159493-6.
6. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*. 2012;148(5):852-871. doi:10.1016/j.cell.2012.02.017.
7. Löffler G. 17.5 Regulation des Intermediärstoffwechsels. In: *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie*. 7., komplett überarbeitete Auflage. Springer-Lehrbuch. Heidelberg: Springer Medizin; 2008:348-356. ISBN:978-3-540-76511-0.
8. Söderberg S, Zimmet P, Tuomilehto J, et al. High incidence of type 2 diabetes and increasing conversion rates from impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance to diabetes in Mauritius. *Journal of Internal Medicine*. 2004;256(1):37-47. doi:10.1111/j.1365-2796.2004.01336.x.
9. Schooneman MG, Vaz FM, Houten SM, Soeters MR. Acylcarnitines: Reflecting or Inflicting Insulin Resistance? *Diabetes*. 2013;62(1):1-8. doi:10.2337/db12-0466.
10. Ramlo-Halsted BA, Edelman SV. THE NATURAL HISTORY OF TYPE 2 DIABETES. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 1999;26(4):771-790. doi:10.1016/S0095-4543(05)70130-5.
11. Nauck M, Gerdes C, Petersmann A, et al. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus: Update 2020. *Diabetologie und Stoffwechsel*. 2020;15(S 01):9-17. doi:10.1055/a-1193-3185.
12. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2009;32(Supplement 1):62-67. doi:10.2337/dc09-S062.
13. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*. 1998;15(7):539-553. doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-

- DIA668>3.0.CO;2-S.
14. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2012. *Diabetes Care*. 2012;35(Supplement 1):11-63. doi:10.2337/dc12-s011.
  15. Cobb J, Eckhart A, Perichon R, et al. A Novel Test for IGT Utilizing Metabolite Markers of Glucose Tolerance. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2015;9(1):69-76. doi:10.1177/1932296814553622.
  16. Rich PA, Shaefer CF, Parkin CG, Edelman SV. Using a Quantitative Measure of Diabetes Risk in Clinical Practice to Target and Maximize Diabetes Prevention Interventions. *Clinical Diabetes*. 2013;31(2):82-89. doi:10.2337/diaclin.31.2.82.
  17. Shaw JE, Hodge AM, de Courten M, Chitson P, Zimmet PZ. Isolated post-challenge hyperglycaemia confirmed as a risk factor for mortality. *Diabetologia*. 1999;42(9):1050-1054. doi:10.1007/s001250051269.
  18. Cederberg H, Saukkonen T, Laakso M, et al. Postchallenge Glucose, A1C, and Fasting Glucose as Predictors of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. *Diabetes Care*. 2010;33(9):2077-2083. doi:10.2337/dc10-0262.
  19. Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 2002;48(1):155-171. doi:10.1023/A:1013713905833.
  20. Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR in Biomedicine*. 2005;18(3):143-162. doi:10.1002/nbm.935.
  21. Roessner U, Bowne J. What is metabolomics all about? *BioTechniques*. 2009;46(5):363-365. doi:10.2144/000113133.
  22. Maltesen R. Postoperative Lung Injury- The path from Initiation to Clinical Diagnosis: a molecular view on a complex pathophysiological process. Aalborg Universitetsforlag, ed. *The PhD Series of the Faculty of Engineering and Science, Aalborg University*. 2016:1-75. doi:10.5278/vbn.phd.engsci.00156.
  23. Smolinska A, Blanchet L, Buydens LMC, Wijmenga SS. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: from data acquisition to biomarker discovery: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2012;750:82-97. doi:10.1016/j.aca.2012.05.049.
  24. Evans AM, DeHaven CD, Barrett T, Mitchell M, Milgram E. Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Analytical Chemistry*. 2009;81(16):6656-6667. doi:10.1021/ac901536h.
  25. Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Vander Heiden MG, Locasale JW. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(4):333-358. doi:10.3322/caac.21670.
  26. Peddinti G, Cobb J, Yengo L, et al. Early metabolic markers identify potential targets for the

- prevention of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(9):1740-1750. doi:10.1007/s00125-017-4325-0.
27. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature Medicine*. 2011;17(4):448-453. doi:10.1038/nm.2307.
  28. Wang-Sattler R, Yu Z, Herder C, et al. Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Molecular Systems Biology*. 2012;8(1):615. doi:10.1038/msb.2012.43.
  29. Yousri NA, Mook-Kanamori DO, Selim MME-D, et al. A systems view of type 2 diabetes-associated metabolic perturbations in saliva, blood and urine at different timescales of glycaemic control. *Diabetologia*. 2015;58(8):1855-1867. doi:10.1007/s00125-015-3636-2.
  30. Merino J, Leong A, Liu C-T, et al. Metabolomics insights into early type 2 diabetes pathogenesis and detection in individuals with normal fasting glucose. *Diabetologia*. 2018;61(6):1315-1324. doi:10.1007/s00125-018-4599-x.
  31. Rebholz CM, Yu B, Zheng Z, et al. Serum metabolomic profile of incident diabetes. *Diabetologia*. 2018;61(5):1046-1054. doi:10.1007/s00125-018-4573-7.
  32. Palmer ND, Okut H, Hsu F-C, et al. Metabolomics Identifies Distinctive Metabolite Signatures for Measures of Glucose Homeostasis: The Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study (IRAS-FS). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2018;103(5):1877-1888. doi:10.1210/jc.2017-02203.
  33. Würtz P, Tiainen M, Mäkinen V-P, et al. Circulating metabolite predictors of glycemia in middle-aged men and women. *Diabetes Care*. 2012;35(8):1749-1756. doi:10.2337/dc11-1838.
  34. Guasch-Ferré M, Hruby A, Toledo E, et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care*. 2016;39(5):833-846. doi:10.2337/dc15-2251.
  35. Menni C, Fauman E, Erte I, et al. Biomarkers for Type 2 Diabetes and Impaired Fasting Glucose Using a Nontargeted Metabolomics Approach. *Diabetes*. 2013;62(12):4270-4276. doi:10.2337/db13-0570.
  36. Allalou A, Nalla A, Prentice KJ, et al. A Predictive Metabolic Signature for the Transition From Gestational Diabetes Mellitus to Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2016;65(9):2529-2539. doi:10.2337/db15-1720.
  37. Cobb J, Eckhart A, Motsinger-Reif A, Carr B, Groop L, Ferrannini E.  $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid Is a Selective Metabolite Biomarker of Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Care*. 2016;39(6):988-995. doi:10.2337/dc15-2752.
  38. Nilsen MS, Jersin RÅ, Ulvik A, et al. 3-Hydroxyisobutyrate, A Strong Marker of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes and Obesity That Modulates White and Brown Adipocyte Metabolism. *Diabetes*. 2020;69(9):1903-1916. doi:10.2337/db19-1174.
  39. Lanza IR, Zhang S, Ward LE, Karakelides H, Raftery D, Nair KS. Quantitative Metabolomics by 1H-NMR and LC-MS/MS Confirms Altered Metabolic Pathways in Diabetes. Wang Y, ed.

- PLoS ONE*. 2010;5(5):e10538 1-10. doi:10.1371/journal.pone.0010538.
40. Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*. 2014;10(12):723-736. doi:10.1038/nrendo.2014.171.
  41. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016;535(7612):376-381. doi:10.1038/nature18646.
  42. Leite AZ, Rodrigues N de C, Gonzaga MI, et al. Detection of Increased Plasma Interleukin-6 Levels and Prevalence of *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus* in the Feces of Type 2 Diabetes Patients. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:1107 1-12. doi:10.3389/fimmu.2017.01107.
  43. Wang Q, Holmes MV, Davey Smith G, Ala-Korpela M. Genetic Support for a Causal Role of Insulin Resistance on Circulating Branched-Chain Amino Acids and Inflammation. *Diabetes Care*. 2017;40(12):1779-1786. doi:10.2337/dc17-1642.
  44. Lotta LA, Scott RA, Sharp SJ, et al. Genetic Predisposition to an Impaired Metabolism of the Branched-Chain Amino Acids and Risk of Type 2 Diabetes: A Mendelian Randomisation Analysis. *PLoS Medicine*. 2016;13(11):e1002179 1-22. doi:10.1371/journal.pmed.1002179.
  45. Zhang S, Zeng X, Ren M, Mao X, Qiao S. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2017;8(1):10 1-12. doi:10.1186/s40104-016-0139-z.
  46. Ferrannini E, Natali A, Camastra S, et al. Early Metabolic Markers of the Development of Dysglycemia and Type 2 Diabetes and Their Physiological Significance. *Diabetes*. 2013;62(5):1730-1737. doi:10.2337/db12-0707.
  47. Floegel A, Stefan N, Yu Z, et al. Identification of Serum Metabolites Associated With Risk of Type 2 Diabetes Using a Targeted Metabolomic Approach. *Diabetes*. 2013;62(2):639-648. doi:10.2337/db12-0495.
  48. Barber MN, Risis S, Yang C, et al. Plasma Lysophosphatidylcholine Levels Are Reduced in Obesity and Type 2 Diabetes. Waki H, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e41456 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0041456.
  49. Cole LK, Vance JE, Vance DE. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2012;1821(5):754-761. doi:10.1016/j.bbalip.2011.09.009.
  50. Mehta D. Lysophosphatidylcholine: an enigmatic lysolipid. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2005;289(2):L174-L175. doi:10.1152/ajplung.00165.2005.
  51. Soga T, Ohishi T, Matsui T, et al. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications*. 2005;326(4):744-751. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.120.
52. Gall WE, Beebe K, Lawton KA, et al. a-Hydroxybutyrate Is an Early Biomarker of Insulin Resistance and Glucose Intolerance in a Nondiabetic Population. *PLoS ONE*. 2010;5(5):e10883 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0010883.
  53. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, et al. Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Metabolism*. 2008;7(1):45-56. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.013.
  54. Carlson OD, David JD, Schrieder JM, Muller DC, Kim B-J, Egan JM. Contribution of Non-Esterified Fatty Acids to Insulin Resistance in the Elderly with Normal Fasting but Diabetic 2h Post Challenge Plasma Glucose Levels: Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2007;56(10):1444-1451. doi:10.1016/j.metabol.2007.06.009.
  55. Holland WL, Knotts TA, Chavez JA, Wang L-P, Hoehn KL, Summers SA. Lipid Mediators of Insulin Resistance. *Nutrition Reviews*. 2008;65:39-46. doi:10.1111/j.1753-4887.2007.tb00327.x.
  56. Senn JJ. Toll-like Receptor-2 Is Essential for the Development of Palmitate-induced Insulin Resistance in Myotubes. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(37):26865-26875. doi:10.1074/jbc.M513304200.
  57. Pradhan AD. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of the American Medical Association*. 2001;286(3):327-334. doi:10.1001/jama.286.3.327.
  58. Ahlqvist E, Storm P, Käräjämäki A, et al. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2018;6(5):361-369. doi:10.1016/S2213-8587(18)30051-2.
  59. Li L, Cheng W-Y, Glicksberg BS, et al. Identification of type 2 diabetes subgroups through topological analysis of patient similarity. *Science Translational Medicine*. 2015;7(311):311ra174 1-15. doi:10.1126/scitranslmed.aaa9364.
  60. Udler MS, Kim J, von Grotthuss M, et al. Type 2 diabetes genetic loci informed by multi-trait associations point to disease mechanisms and subtypes: A soft clustering analysis. *PLoS Medicine*. 2018;15(9):e1002654 1-23. doi:10.1371/journal.pmed.1002654.
  61. John U, Greiner B, Hensel E, et al. Study of Health In Pomerania (SHIP): a health examination survey in an east German region: objectives and design. *Sozial- Und Praventivmedizin*. 2001;46(3):186-194. doi:10.1007/bf01324255.
  62. Völzke H, Alte D, Schmidt CO, et al. Cohort profile: The Study of Health in Pomerania. *International Journal of Epidemiology*. 2011;40(2):294-307. doi:10.1093/ije/dyp394.
  63. Forschungsverbund Community Medicine. SHIP: Studienbeschreibung. [medizini.uni-greifswald. https://www2.medizin.uni-greifswald.de/cm/fv/ship/studienbeschreibung/](https://www2.medizin.uni-greifswald.de/cm/fv/ship/studienbeschreibung/). Accessed September 24, 2021.



64. Wildberg C, Masuch A, Budde K, et al. Plasma Metabolomics to Identify and Stratify Patients With Impaired Glucose Tolerance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2019;104(12):6357-6370. doi:10.1210/jc.2019-01104.
65. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-419. doi:10.1007/BF00280883.
66. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care*. 2004;27(6):1487-1495. doi:10.2337/diacare.27.6.1487.
67. Pietzner M, Budde K, Homuth G, et al. Hepatic Steatosis Is Associated With Adverse Molecular Signatures in Subjects Without Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2018;103(10):3856-3868. doi:10.1210/jc.2018-00999.
68. Charrad M, Ghazzali N, Boiteau V, Niknafs A. **NbClust**: An R Package for Determining the Relevant Number of Clusters in a Data Set. *Journal of Statistical Software*. 2014;61(6):1-36. doi:10.18637/jss.v061.i06.
69. Dousset B, Straczek J, Maachi F, et al. Purification from Human Plasma of a Hexapeptide That Potentiates the Sulfation and Mitogenic Activities of Insulin-like Growth Factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;247(3):587-591. doi:10.1006/bbrc.1998.8834.
70. Qiu G, Zheng Y, Wang H, et al. Plasma metabolomics identified novel metabolites associated with risk of type 2 diabetes in two prospective cohorts of Chinese adults. *International Journal of Epidemiology*. 2016;45(5):1507-1516. doi:10.1093/ije/dyw221.
71. Nowak C, Salihovic S, Ganna A, et al. Effect of Insulin Resistance on Monounsaturated Fatty Acid Levels: A Multi-cohort Non-targeted Metabolomics and Mendelian Randomization Study. *PLoS Genetics*. 2016;12(10):e1006379 1-19. doi:10.1371/journal.pgen.1006379.
72. Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2011;22(9):353-363. doi:10.1016/j.tem.2011.04.007.
73. Lehmann R, Engler H, Honegger R, Riesen W, Spinass GA. Alterations of lipolytic enzymes and high-density lipoprotein subfractions induced by physical activity in type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*. 2001;31(1):37-44. doi:10.1046/j.1365-2362.2001.00752.x.
74. Ginsberg HN, Huang L-S. The Insulin Resistance Syndrome: Impact on Lipoprotein Metabolism and Atherothrombosis. *European Journal of Cardiovascular Risk*. 2000;7(5):325-331. doi:10.1177/204748730000700505.
75. Colhoun HM, Otvos JD, Rubens MB, Taskinen MR, Underwood SR, Fuller JH. Lipoprotein Subclasses and Particle Sizes and Their Relationship With Coronary Artery Calcification in Men and Women With and Without Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2002;51(6):1949-1956.

- doi:10.2337/diabetes.51.6.1949.
76. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation. *Diabetes*. 2011;60(10):2441-2449. doi:10.2337/db11-0425.
  77. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(2):253-259. doi:10.1172/JCI5001.
  78. Lam TKT, Van de Werve G, Giacca A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2003;284(2):E281-E290. doi:10.1152/ajpendo.00332.2002.
  79. McCarthy MI. Painting a new picture of personalised medicine for diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(5):793-799. doi:10.1007/s00125-017-4210-x.
  80. Semba RD, Gonzalez-Freire M, Moaddel R, et al. Altered Plasma Amino Acids and Lipids Associated With Abnormal Glucose Metabolism and Insulin Resistance in Older Adults. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2018;103(9):3331-3339. doi:10.1210/jc.2018-00480.
  81. Pietzsch J, Fuecker K. Increased cholesteryl ester transfer protein activity in impaired glucose tolerance: relationship to high density lipoprotein metabolism. *Croatian Medical Journal*. 2003;44(2):171-177.
  82. Dullaart RPF, de Vries R, Kwakernaak AJ, Perton F, Dallinga-Thie GM. Increased large VLDL particles confer elevated cholesteryl ester transfer in diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*. 2015;45(1):36-44. doi:10.1111/eci.12377.
  83. Abbasi A, Deetman PE, Corpeleijn E, et al. Bilirubin as a potential causal factor in type 2 diabetes risk: A Mendelian randomization Study. *Diabetes*. 2015;64(4):1459-1469. doi:10.2337/db14-0228.
  84. Cheriya P. High Total Bilirubin as a Protective Factor for Diabetes Mellitus: An Analysis of NHANES Data From 1999 - 2006. *Journal of Clinical Medicine Research*. 2010;2(5):201-206. doi:10.4021/jocmr425w.
  85. Ndisang JF. Role of Heme Oxygenase in Inflammation, Insulin-Signalling, Diabetes and Obesity. *Mediators of Inflammation*. 2010;2010:1-18. doi:10.1155/2010/359732.
  86. Wlazlo N, van Greevenbroek MMJ, Ferreira I, et al. Complement Factor 3 Is Associated With Insulin Resistance and With Incident Type 2 Diabetes Over a 7-Year Follow-up Period: The CODAM Study. *Diabetes Care*. 2014;37(7):1900-1909. doi:10.2337/dc13-2804.
  87. Park J-E, Lim HR, Kim JW, Shin K-H. Metabolite changes in risk of type 2 diabetes mellitus in cohort studies: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2018;140:216-227. doi:10.1016/j.diabres.2018.03.045.
  88. Dashty M. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clinical Biochemistry*.

- 2013;46(15):1339-1352. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.04.027.
89. Guertin KA, Loftfield E, Boca SM, et al. Serum biomarkers of habitual coffee consumption may provide insight into the mechanism underlying the association between coffee consumption and colorectal cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2015;101(5):1000-1011. doi:10.3945/ajcn.114.096099.
90. Allred KF, Yackley KM, Vanamala J, Allred CD. Trigonelline Is a Novel Phytoestrogen in Coffee Beans. *The Journal of Nutrition*. 2009;139(10):1833-1838. doi:10.3945/jn.109.108001.
91. Bhupathiraju SN, Pan A, Manson JE, Willett WC, van Dam RM, Hu FB. Changes in coffee intake and subsequent risk of type 2 diabetes: three large cohorts of US men and women. *Diabetologia*. 2014;57(7):1346-1354. doi:10.1007/s00125-014-3235-7.
92. Friedrich N, Skaaby T, Pietzner M, et al. Identification of urine metabolites associated with 5-year changes in biomarkers of glucose homeostasis. *Diabetes & Metabolism*. 2018;44(3):261-268. doi:10.1016/j.diabet.2017.05.007.
93. van Dijk AE, Olthof MR, Meeuse JC, Seebus E, Heine RJ, van Dam RM. Acute Effects of Decaffeinated Coffee and the Major Coffee Components Chlorogenic Acid and Trigonelline on Glucose Tolerance. *Diabetes Care*. 2009;32(6):1023-1025. doi:10.2337/dc09-0207.

## 7. Anhang

### 7.1. Wissenschaftliche Publikation

#### **Plasma Metabolomics to Identify and Stratify Patients With Impaired Glucose Tolerance**

Charlotte Wildberg<sup>1</sup>, Annette Masuch<sup>1,1</sup>, Kathrin Budde<sup>1,2</sup>, Gabi Kastenmüller<sup>3</sup>, Anna Artati<sup>4</sup>, Wolfgang Rathmann<sup>5</sup>, Jerzy Adamski<sup>4,6,7</sup>, Thomas Kocher<sup>8</sup>, Henry Völzke<sup>2,9,10</sup>, Matthias Nauck<sup>1,2</sup>, Nele Friedrich<sup>1,2</sup>, Maik Pietzner<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, 17475 Greifswald, Germany

<sup>2</sup>German Centre for Cardiovascular Research, partner site Greifswald, 17475 Greifswald, Germany

<sup>3</sup>Institute of Bioinformatics and Systems Biology, Helmholtz Zentrum München, 85764 Neuherberg, Germany

<sup>4</sup>Institute of Experimental Genetics, Genome Analysis Center, Helmholtz Zentrum München, 85764 Neuherberg, Germany

<sup>5</sup>Institute of Biometrics and Epidemiology, German Diabetes Center, Leibniz Center for Diabetes Research at Heinrich-Heine-University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

<sup>6</sup>Lehrstuhl für Experimentelle Genetik, Technische Universität München, 85354 Freising-Weihenstephan, Germany

<sup>7</sup>German Center for Diabetes Research, 85764 Neuherberg, Germany

<sup>8</sup>Unit of Periodontology, Department of Restorative Dentistry, Periodontology, Endodontology, and Pediatric and Preventive Dentistry, Dental School, University Medicine Greifswald, 17475 Greifswald, Germany

<sup>9</sup>Institute for Community Medicine, University Medicine Greifswald, 17475 Greifswald, Germany

<sup>10</sup>German Center for Diabetes Research, site Greifswald, 17475 Greifswald, Germany

<https://doi.org/10.1210/jc.2019-01104>

## 7.2. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin unter Betreuung von Frau PD Dr. Nele Friedrich, sowie unter Mitarbeit von Herrn Dr. Maik Pietzner durchgeführt.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten SHIP-TREND-Daten wurden federführend von der Abteilung SHIP-KEF (Institut für Community Medicine, Universitätsmedizin Greifswald) erhoben. Die gesammelten Daten werden vom Forschungsverbund Community Medicine (<http://www2.medizin.uni-greifswald.de/cm/fv/forschungsverbund/>) verwaltet und können von internen sowie externen Wissenschaftlern beantragt werden.

Gemeinsam mit meiner Betreuerin habe ich das Thema für die vorliegende Arbeit entwickelt und einen positiv begutachteten Datennutzungsantrag beim Forschungsverbund Community Medicine gestellt. Die statistischen Analysen erfolgten am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. Die Interpretation der Studienergebnisse als auch die Einordnung in den aktuellen Stand der Literatur habe ich selbstständig vorgenommen. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgte in enger Rücksprache mit der Betreuerin am Institut. Das publizierte Manuskript habe ich eigenständig verfasst. Es wurde durch meine Co-Autoren (Frau Dr. A. Masuch, Frau Dr. K. Budde, Frau Dr. G. Kastenmüller, Frau Dr. A. Artati, Herrn Prof. W. Rathmann, Herrn Prof. J. Adamski, Herrn Prof. T. Kocher, Herrn Prof. H. Völzke, Herrn Prof. M. Nauck, Frau PD Dr. N. Friedrich, Herrn Dr. M. Pietzner) anschließend revidiert. Darauf basierend habe ich selbstständig diese Arbeit verfasst.

---

Datum

---

Charlotte Luise Wildberg

### **7.3. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

---

Datum

---

Charlotte Luise Wildberg

## 7.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Danke an Alle, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen!

Herzlichen Dank an Herrn Professor Dr. Matthias Nauck als Institutsleiter, Frau PD Dr. Nele Friedrich und Herrn Dr. Maik Pietzner für das wissenschaftliche Thema und für die intensive Betreuung meiner Arbeit!

Danke an den Forschungsverbund Community Medicine für die Genehmigung der Datennutzung und an Herrn Professor Dr. Henry Völzke und allen Mitwirkenden für die Verwaltung der SHIP-Studie und Rekrutierung der Studienteilnehmer/-innen, denen ich auch danken möchte.

Allen Laborleitenden und den jeweiligen Labormitarbeiter/-innen danke ich außerdem für die Metabolit-Quantifizierung und Bereitstellung der Daten. Ein besonderer Dank gilt außerdem all jenen, die an der Datenverarbeitung und statistischen Analysen beteiligt waren.

Ein großes Dankeschön für die außerordentliche Betreuung, wissenschaftlichen Hilfestellungen und Korrekturlesungen der Manuskripte an Frau PD Dr. Nele Friedrich, Herrn Dr. Maik Pietzner, Frau Dr. Annette Masuch, Frau Dr. Anke Hannemann und Frau Dr. Stephanie Zylla. Meinem Hauptansprechpartner, Herrn Dr. Maik Pietzner und meiner Betreuerin Frau PD Dr. Nele Friedrich gelten nochmals mein besonderer Dank für die sehr geschätzte stets freundliche Unterstützung, das ausführliche Erklären der Daten und statistischen Auswertungen und für die zuverlässige und besonders hilfreiche Überarbeitung der zahlreichen Manuskripte.

Vielen Dank schließlich meinen engen Freunden, die mich während des Studiums durchgehend begleitet und motiviert haben. Herzlich danken möchte ich außerdem meinen Geschwistern, Friederike und Dr. Johannes Wildberg! Und ein besonders herzliches Dankeschön meinen Eltern, Ulrike und Dr. Hans Jürgen Wildberg, die mich stets unterstützt und ermutigt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten!