

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Nauck)

der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Assoziationen zwischen der Menge abdomineller Fettkompartimente und dem Metabolom
in Plasma und Urin – Untersuchungen von Daten aus einer gesunden Normalbevölkerung**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald
2022

vorgelegt von

Lerina Malaika Otto

geb. am 27.04.1990

in Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. GutachterIn: Frau PD Dr. Nele Friedrich

2. GutachterIn: Herr Prof. Dr. Carsten Oliver Schmidt

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Klinischen Chemie 10.0.16

Tag der Disputation: 02.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. Epidemiologie von Übergewicht und Adipositas	1
1.2. Fettgewebe: Ein endokrines und metabolisch aktives Organ - Aufbau, Funktion und Lokalisation.....	2
1.3. Metabolomik	4
1.4. Der Zusammenhang zwischen Übergewicht, dessen assoziierte Krankheiten und dem menschlichen Metabolom.....	5
1.5. Fragestellung/Ziele der vorliegenden Arbeit.....	6
2. Material und Methoden.....	7
2.1. Studienpopulation	7
2.2. Datenerhebung und Labormethodik.....	8
2.3. Quantifizierung der Fettkompartimente.....	8
2.4. Metabolom-Analysen	9
2.5. Statistische Analysen	9
3. Ergebnisse	10
3.1. Überblick über die Anzahl der signifikanten Assoziationen zwischen den Fettkompartimenten und den untersuchten Metaboliten im Plasma und Urin.....	11
3.2. Assoziationen zwischen VAT und Plasma- und Urinmetaboliten.....	13
3.3. Assoziationen zwischen SAT und Plasma- und Urinmetaboliten	16
3.4. Geschlechtsspezifische Assoziationen.....	17
4. Diskussion.....	18
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	18

4.2. VAT und Assoziationen zu BCAAs - wie veränderte metabolische Signaturen den metabolisch gesunden Status von Übergewicht in Frage stellen	18
4.3. VAT und Assoziation zu gamma-glutamyl-Aminosäuren als Stellvertreter für oxidativen Stress.....	20
4.4. Piperin, ein natürlicher und potentiell pharmakologisch aktiver Metabolit aus schwarzem Pfeffer, und die Assoziation zum VAT	21
4.5. VAT und Assoziation zur Darmflora – der Zusammenhang zwischen Adipositas und dem Mikrobiom	22
4.6. Veränderter Kohlenhydratstoffwechsel und Assoziation zu VAT	24
4.7. O-Methylascorbat - wie Vitamin C und Fettmasse zusammenhängen.....	24
4.8. Freie Fettsäuren und VAT – wie der Zusammenhang zur Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 entsteht	25
4.9. SAT und spezifische Assoziation zu N1-Methyl-2-Pyridon-5-Carboxamid und 3`-Sialyllactose	26
4.10. Die Assoziation zwischen VAT bzw. SAT und Kortisol	27
4.11. Urat und Fettmasse	28
4.12. VAT – ein wichtiges endokrines Organ	29
4.13. Stärken und Limitationen der Arbeit.....	29
4.14. Schlussfolgerung und Translation in den klinischen Kontext.....	30
5. Zusammenfassung.....	31
6. Literaturverzeichnis.....	32
7. Anhang.....	47
7.1. Ergänzende Abbildungen und Tabellen.....	47
7.2. Publikation	52

Abkürzungsverzeichnis

ATC-Klassifikationssystem	Anatomisch-Therapeutisch-Chemisches-Klassifikationssystem
BCAAs	verzweigt-kettige Aminosäuren <i>(englisch: branched-chain amino acids)</i>
BMI	Body Mass Index
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate <i>(englisch: estimated glomerular filtration rate)</i>
FDR	false discovery rate
GGM	Graphisches Gauß Modell
HDL- Cholesterin	high-density lipoprotein-Cholesterin
LDL- Cholesterin	low-density lipoprotein-Cholesterin
LC	Flüssigkeitschromatographie <i>(englisch: liquid chromatography)</i>
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
SAT	subkutanes Fett <i>(englisch: subcutaneous adipose tissue)</i>
SHIP	Study of Health in Pomerania
VAT	viszerales Fett <i>(englisch: visceral adipose tissue)</i>
WC	Bauchumfang <i>(englisch: waist circumference)</i>
11 β -HSD	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Geschlechterspezifische Verteilung der Messwerte von viszeralem und subkutanem Fettgewebe	11
Abbildung 2 Darstellung der Anzahl signifikanter Assoziationen zwischen den Fettkompartimenten und Metaboliten verschiedener Stoffklassen aus Plasma und Urin	12
Abbildung 3 Signifikante Assoziationen zwischen viszeralem Fettgewebe und Metaboliten im Plasma und Urin	15
Abbildung 4 Signifikante Assoziationen zwischen subkutanem Fettgewebe und Metaboliten im Plasma und Urin	16
Abbildung A 1 Flussdiagramm zur Selektion der Studienpopulation	47
Abbildung A 2 Signifikante Assoziationen zwischen viszeralem Fettgewebe und unbekanntem Metaboliten im Plasma und Urin	48
Abbildung A 3 Signifikante Assoziationen zwischen subkutanem Fettgewebe und unbekanntem Metaboliten im Plasma und Urin.....	49
Abbildung A 4 Subnetzwerk aus dem GGM mit Schwerpunkt auf Kortison und Piperin	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle A1 Allgemeine Charakteristika der Studienpopulation	51
---	----

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie von Übergewicht und Adipositas

Übergewicht und Fettleibigkeit ist weltweit ein zunehmendes Phänomen mit weitreichenden gesundheitlichen und finanziellen Folgen. Übergewicht wird definiert als eine über eine normierte Masse hinausgehende Ansammlung von Körperfett. Der Begriff Fettleibigkeit bzw. Adipositas ist die Steigerung dessen. Übergewicht und Adipositas entstehen durch ein Ungleichgewicht von Energiezufuhr und Energieverbrauch. Alimentäre Gewohnheiten, ein einfacher und erschwinglicher Zugang zu hochkalorischer Nahrung in Verbindung mit verringerter körperlicher Aktivität sind die Hauptursachen für Übergewicht [1]. Es lassen sich jedoch auch viele weitere Auslöser (z.B. psychische, genetische, toxische, soziodemographische Faktoren [2]) identifizieren, die der Erkrankung zugeschrieben werden. Zur Einschätzung des Ernährungszustandes dient - neben anderen Kategorisierungen - in erster Linie der Body-Mass-Index (BMI). Personen mit einem BMI über 25 kg/m² werden als übergewichtig eingestuft. Von Adipositas wird ab einem BMI von 30 kg/m² gesprochen [3].

Nach Angaben der *World Health Organization* galten 2016 weltweit mehr als 1,9 Milliarden der erwachsenen Bevölkerung als übergewichtig, davon wurden 650 Millionen als adipös eingestuft [4]. Das bedeutet, dass mittlerweile ca. 1/3 der globalen Bevölkerung einen BMI über 25 kg/m² aufweist [5]. Aufgrund eines grundlegenden Wandels des Lebensstils in den letzten Jahrzehnten und damit einhergehenden kontinuierlich steigenden Prävalenzen, wird Übergewicht und Adipositas mittlerweile als „globale Epidemie“ eingestuft [6],[7].

Übergewicht ist einer der größten Risikofaktoren für die Entwicklung von chronischen Erkrankungen wie dem metabolischen Syndrom, inklusive Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämie oder arterieller Hypertonie [7]. Zudem ist Übergewicht mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von kardiovaskulären Ereignissen sowie onkologischen Erkrankungen verbunden [8] und folglich mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert [9]. Im Jahr 2015 trug Übergewicht weltweit direkt zu 4 Millionen (7,2 %) Todesfällen und 120 Millionen disability-adjusted life-years ((DALY), deutsch: Behinderungsbereinigte Lebensjahre) bei [10]. Damit stellt der massive Anstieg der weltweiten Prävalenz von Übergewicht nicht nur ein zentrales Problem für die Gesundheitssysteme dar, sondern führt auch zu gesamtgesellschaftlichen und –ökonomischen Konflikten, da die Folgekosten der direkt mit Übergewicht- assoziierten Erkrankungen sowie die indirekten Kosten durch

Produktivitätseinbußen und frühe Mortalität konkordant zum BMI steigen [11].

Umso wichtiger ist vielfältige wissenschaftliche Forschung auf diesem Gebiet. Nur auf diese Weise lassen sich frühzeitig Effekte aufdecken und Modulatoren entwickeln, die die ungünstigen Folgen von Adipositas abmildern könnten.

1.2. Fettgewebe: Ein endokrines und metabolisch aktives Organ - Aufbau, Funktion und Lokalisation

Das Fettgewebe ist ein wichtiges Organ, welches vielfältige Aufgaben im Körper übernimmt. Histologisch lassen sich zwei Arten des Fettgewebes unterscheiden, die jeweils verschiedenen Funktionen unterliegen. Das braune Fettgewebe dient durch die vermehrte Anzahl von Mitochondrien [12] in erster Linie der Thermoregulation [13] und spielt bei Adipositas eine eher untergeordnete Rolle [14]. Lange Zeit gab es die Annahme, dass braunes Fettgewebe ausschließlich bei Neugeborenen zu finden sei. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch auch ein Vorkommen bei Erwachsenen [15], vor allem supraklavikulär und subscapular [18]. Eine aktuelle Studie liefert zudem Hinweise darauf, dass durch die Aktivierung von braunem Fettgewebe (z.B. durch Koffein) dieses eine wichtige Rolle im menschlichen Energiehaushalt und damit auch in der Kontrolle von Übergewicht spielen könnte [16]. Das weiße Fettgewebe ist vor allem für die Speicherung von übermäßiger Energie in Form von Lipiden verantwortlich und dadurch in den menschlichen Energiehaushalt eingebunden. Darüber hinaus übernimmt es eine Polsterungsfunktion und dient als Wärmeisolator. Es konnte zudem aufgezeigt werden, dass das weiße Fettgewebe das größte endokrine Organ des Menschen darstellt und zahlreiche bioaktive Peptidhormone sezerniert [17],[18].

Für die Entstehung von mit Adipositas- vergesellschafteten Krankheiten ist der Ort der Fettansammlung entscheidender als die absolute Masse an Körperfett, da sich je nach Lokalität Unterschiede in der strukturellen Zusammensetzung, der Zellgröße sowie der biologischen Funktion des Fettgewebes beobachten lassen [19]. Unterschieden wird zwischen dem viszeralen Depot (VAT), der subkutanen Ansammlung von Fettmasse (SAT) und den ektopen Fettdepots [20].

Weißes Fettgewebe wird vor allem als VAT im Abdomen um die inneren Organe, im Omentum majus sowie perikardial gespeichert [19]. Es kann sich aber auch als subkutanes Fettgewebe im Unterhautfettgewebe des Abdomens oder gluteofemoral befinden [19].

Vor allem die Akkumulation von abdominellem Fett wurde mit metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht [21]. So ließ sich beispielsweise beobachten, dass die Menge des VAT mit der Entwicklung einer Insulinresistenz korreliert [19]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Adipozyten von VAT lipolytisch aktiver sind als die von SAT und demzufolge zu einer vermehrten Entstehung von freien Fettsäuren im Plasma beitragen [19]. Darüber hinaus ist bekannt, dass das VAT mehr Adipokine ausschüttet und über Rezeptoren für Katecholamine, Insulin, Glukokortikoide und Testosteron verfügt [22]. Hinzu kommt, dass VAT über das Pfortadersystem drainiert wird und damit über die direkte Verbindung zur Leber einen Einfluss auf den hepatischen Glukose- und Lipid-Metabolismus hat [9],[23].

Bedingt durch die subkutane Lage, dient SAT des Schutzes und der Thermoregulation und bei übermäßiger Energiezufuhr als Speicherorgan. SAT ist weniger metabolisch aktiv als VAT [9]. Mittels moderner bildgebender Verfahren kann eine genaue Aussage zur Differenzierung der Fettdepots getroffen werden [23]. Studien zeigen, dass Männer mehr VAT akkumulieren, während Frauen eher SAT ansammeln [22]. Mit zunehmendem Alter tendieren jedoch beide Geschlechter dazu, Fettmasse als VAT zu speichern [22]. Dies lässt sich auf den unterschiedlichen Einfluss von Östrogenen bei postmenopausalen Frauen und auf das Mitwirken der Hypothalamus-Hypophysen-Achse zurückführen [22].

Männliche Jugendliche und Erwachsene, bei denen sich eine vermehrte Akkumulation von VAT beobachten lässt, weisen vergrößerte Adipozyten sowie eine gesteigerte Adipokin-Sekretion auf [24]. Insgesamt scheint das Risiko für Adipositas-assoziierte Erkrankungen beim männlichen Geschlecht höher zu sein als bei Frauen [24]. Letztlich ist eine Ansammlung von VAT jedoch bei beiden Geschlechtern stark mit einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und einer höheren Mortalität verbunden [25]–[27].

Fettmasse wird generell durch Hyperplasie und Hypertrophie aus Adipozyten-Progenitorzellen gebildet, jedoch existieren unterschiedliche Annahmen wie die unterschiedlichen Loci des VAT und SAT entstehen. Zum einen gibt es die Theorie unterschiedlicher Ursprünge, zum anderen die Annahme, dass die veränderte Insulinsensitivität oder der unterschiedliche Metabolismus eine Differenzierung des Fettgewebes erst ermöglichen [12].

Interessant ist es nun, Hypothesen zu generieren, warum eine erhöhte Akkumulation von VAT im Gegensatz zu SAT ein offensichtlich ungünstigeres gesundheitliches Resultat bei Menschen

zeigt. Ebenso bedeutsam ist es, geschlechtsspezifische Unterschiede herauszuarbeiten. Um dies zu erforschen, gilt es Stoffwechselprozesse im menschlichen Körper genauer zu untersuchen, um möglicherweise frühzeitig in einen ungünstigen Verlauf bzw. in den Beginn einer Erkrankung präventiv einzugreifen und Folgeschäden sowie -kosten zu vermeiden.

1.3. Metabolomik

Der Begriff „-omics“ fasst molekularbiologische wissenschaftliche Methoden zusammen, die den Anspruch erheben, mit Hilfe eines integrierten Ansatzes die Struktur und Dynamik einer spezifischen Entität umfassend abzubilden [28]. Durch die Methode der Metabolomik ist es dabei möglich, spezifische molekulare Stoffwechselzwischen- und -endprodukte (Metabolite) von sehr kleiner Größe (< 1500 Dalton) in Zellen, Geweben, Organen oder Körperflüssigkeiten umfassend und systematisch zu identifizieren und quantifizieren [28],[29]. Die Gruppe der Metabolite ist sehr heterogen und beinhaltet beispielsweise Aminosäuren, Kohlenhydrate, Lipide, Nukleotide, Xenobiotika sowie zahlreiche weitere unbekannte Stoffwechselprodukte. Aufgrund der Vielzahl der zu ermittelnden Substanzen und der hohen Diversität der Metabolite, ist die Charakterisierung und Quantifizierung herausfordernd und stellt hohe Anforderungen an die verwendeten analytischen Methoden. Das „Metabolic Profiling“ erfolgt entweder gezielt für chemisch und strukturell bekannte, zuvor definierte Metabolite oder ungezielt. Die letztere Variante ermöglicht die Erfassung einer größeren Anzahl sowie die Identifikation bisher unbekannter Metabolite [30].

Für die Quantifizierung der Metabolite haben sich zwei verschiedene spektroskopische Techniken etabliert: Die Flüssigkeits- (LC-, englisch: liquid chromatography-) oder Gaschromatographie (GC-) gekoppelte Massenspektrometrie (MS) und die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR, englisch: nuclear magnetic resonance) [31]. Die NMR ist im Vergleich zur MS eher kostengünstiger, schneller und weniger aufwendig in der Handhabung [32]. Die MS weist dagegen eine höhere Sensitivität auf, sodass auch kleinste Moleküle detektiert werden können und somit eine größere Summe von Metaboliten sichtbar gemacht werden kann [32]. Durch die genaue Analyse der Metabolite wird eine sehr heterogene Gruppe von Stoffklassen dargestellt. Außerdem kann der Einfluss körpereigener Faktoren (z.B. Geschlecht, Alter) als auch externe Einflüsse (z.B. Lebensstilfaktoren, diätetische Unterschiede, Krankheiten) auf die Stoffwechsellage und das menschliche Metabolom untersucht und Hypothesen bezüglich der zugrundeliegenden Mechanismen und

Stoffwechselwege generiert werden [28]. Durch die mit Hilfe von Metabolomics erfassten Daten kann der pathophysiologische Zustand eines Organismus umfassend abgebildet werden, da bereits kleinste Veränderungen im Stoffwechsel dargestellt werden können und physiologische Dysfunktionen widergespiegelt werden [33]. Mit Hilfe epidemiologischer Studien können zudem Assoziationen zwischen dem Metabolitenprofil und vorliegenden Krankheiten analysiert werden. Es ist denkbar, dass im Zuge dieser Analysen, spezifische Metabolite als neue Biomarker für Erkrankungen identifiziert werden [34].

1.4. Der Zusammenhang zwischen Übergewicht, dessen assoziierte Krankheiten und dem menschlichen Metabolom

In der vorhandenen Literatur lassen sich bereits einige wissenschaftliche Untersuchungen finden, die den Zusammenhang zwischen Aminosäuren, insbesondere den verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAAs, englisch: branched-chain amino acids), und einer bestehenden Insulinresistenz bzw. der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 bei übergewichtigen Proband:innen untersucht haben [35],[36]. Allerdings konnte in diesen Studien noch nicht abschließend geklärt werden, ob die Veränderungen im Aminosäure-Profil Ursache oder Folge der Insulinresistenz sind. Ähnliche Untersuchungen zeigten darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus Typ 2, Übergewicht und Fettsäuren, Derivaten aus dem Citrat-Zyklus, Kohlenhydraten sowie Cholin [37]. 2019 wurde eine groß angelegte Studie (832/882/861 Proband:innen zu drei verschiedenen Zeitpunkten) veröffentlicht, die beschrieb, dass sich der Zusammenhang zwischen einem ungünstigen metabolischen Profil und einem erhöhten Risiko für (kardiovaskuläre) Erkrankungen nicht nur bei übergewichtigen Individuen, sondern auch bei schlanken Proband:innen beobachten lässt [38]. Es gelang, ein spezifisch verändertes Metabolitenprofil zu identifizieren, das zu ca. 80 % das Vorliegen eines erhöhten BMI mit entsprechendem kardiovaskulären Risikoprofil voraussagte [38]. Die Autor:innen der Studie konnten zeigen, dass nicht nur anthropometrische Parameter wie der BMI, sondern vor allem ein spezifisch verändertes Metabolom frühzeitig Hinweise auf die Ausbildung (zukünftiger) Erkrankungen liefert. In einer ebenfalls groß angelegten Studie in Großbritannien wurde zudem gezeigt, dass übergewichtige Personen ohne vorliegende metabolische Erkrankungen (Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie) ein höheres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse haben als normalgewichtige gesunde Menschen [39]. Nicht nur die Akkumulation von Fettmasse an sich, sondern auch Veränderungen im

Metabolom scheinen folglich einen Einfluss für die Entwicklung von Adipositas-assoziierten Krankheiten zu haben.

Um die Assoziation von molekularen Stoffwechselprozessen mit der Akkumulation von VAT und/oder SAT zu untersuchen, wurden bereits in vorhergehenden Studien zielgerichtete und nicht-zielgerichtete metabolische Analysen herangezogen. Hierbei ließen sich signifikante Zusammenhänge mit BCAAs sowie Kataboliten von Tryptophan, Glutamat oder verschiedenen Lipiden identifizieren [40]–[48]. Allerdings basieren die Ergebnisse dieser Untersuchungen zumeist auf vergleichsweise kleinen Studienpopulationen [41],[42],[45] oder einer limitierten Menge an untersuchten Stoffwechselprodukten [47]. Darüber hinaus wurden die Untersuchungen zumeist nur in einem spezifischen Probenmaterial durchgeführt [40],[46]. Vorherige Studien konzentrierten sich zudem häufig nur auf die Analyse der Zusammenhänge mit einem spezifischen Fettkompartiment [40],[43] und/oder vernachlässigten geschlechtergetrennte Untersuchungen der Zusammenhänge [41],[42].

1.5. Fragestellung/Ziele der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, in einer Stichprobe einer als metabolisch gesund definierten Normalbevölkerung, die Assoziationen zwischen der Quantität und Topographie der Fettdepots (VAT, SAT) und einem umfangreichen Metabolitenpanel aus Plasma- und Urinproben zu untersuchen. Dafür wurden die Proben von ca. 500 gesunden Proband:innen aus der Basisuntersuchung der zweiten Kohorte der populationsbasierten SHIP-Studie (SHIP-TREND-0) ausgewertet. Mittels einer MS-gestützten Analyse erfolgte eine ungerichtete Identifizierung von niedermolekularen Signaturen in diesen Proben. Auf diese Weise konnte eine große Anzahl unterschiedlicher Metabolite und deren Derivate (z.B. Aminosäuren, Fettsäuren, Nukleotide, Xenobiotika sowie unbekannte Verbindungen) identifiziert und in Assoziationen zu den Fettdepots gesetzt werden. Eventuelle geschlechtsspezifische Effekte wurden in den vorliegenden Analysen ebenfalls geprüft. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung von Hypothesen über die Zusammenhänge von VAT bzw. SAT und dem Stoffwechsel des menschlichen Organismus, um Ansätze für zukünftige Forschung auf diesem Gebiet zu liefern. Diese könnten Grundlagen für eine frühzeitige Detektion von Adipositas-assoziierten Erkrankungen darstellen.

2. Material und Methoden

2.1. Studienpopulation

Die Study of Health in Pomerania (SHIP) ist eine populationsbasierte wissenschaftliche Studie in West-Vorpommern, einer ländlichen Region im deutschen Bundesland Mecklenburg-Vorpommern [49]. Ziel dieser longitudinalen Studie ist es, Prävalenzen und Inzidenzen einer Vielzahl von Erkrankungen zu ermitteln und deren Zusammenhänge zu verschiedenen Risikofaktoren zu untersuchen.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Baseline-Daten der zweiten, unabhängigen Kohorte der SHIP-Studie (SHIP-TREND-0) ausgewertet. Die SHIP-Trend-Kohorte basiert auf einer stratifizierten randomisierten Stichprobe der Einwohner:innen der Studienregion im Alter von 20 bis 79 Jahren, die auf Basis der Daten des Einwohnermelderegisters gezogen wurde. Stratifiziert wurde dabei für die Faktoren Alter, Geschlecht und (Wohn-) Ort. Die Nettostichprobe umfasste 8826 Proband:innen. 4420 der eingeladenen Proband:innen nahmen an den Basisuntersuchungen im Zeitraum zwischen 2008 und 2012 teil (50,1 % Beteiligung).

Mit den teilnehmenden Proband:innen wurden ausführliche computerassistierte persönliche Interviews zu den individuellen sozioökonomischen Verhältnissen, der Krankheitsgeschichte und dem Risikoverhalten durch speziell geschultes Personal durchgeführt. Darüber hinaus durchliefen die Proband:innen umfangreiche medizinische Untersuchungen, welche auch die Teilnahme an einem Ganzkörper-MRT freistellte. Außerdem wurden den Proband:innen Plasma-, Urin-, Speichel- und Serumproben entnommen. Für weiterführende Details bezüglich des Studiendesigns und der Studienpopulation wird auf andere Arbeiten verwiesen [51],[52]. Für eine Subgruppe von 1000 SHIP-TREND-0-Proband:innen ohne anamnestisch identifizierten Diabetes mellitus, wurde eine erweiterte Phänotypisierung vorgenommen. Diese umfasste u.a. die Quantifizierung der Metabolite in den Plasma- und Urinproben mittels MS. Um eine für die vorliegende Analyse gesunde Stichprobe zu generieren, wurden von diesen 1000 Proband:innen jene ausgeschlossen, bei denen sich eine arterielle Hypertension, ein metabolisches Syndrom oder eine Nierenfunktionsstörung (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) < 50 ml/min/1,73 m²) beobachten ließ (n = 455). Nach weiterem Ausschluss von Proband:innen mit unvollständigen Daten, standen für die vorliegenden Analysen Daten von 491 Proband:innen (192 Männer, 299 Frauen) zur Verfügung (Abbildung A1).

2.2. Datenerhebung und Labormethodik

Teilnehmende wurden entsprechend ihres Rauchverhaltens, Alkoholkonsums und ihrer sportlichen Aktivität in Gruppen klassifiziert. Die Messung der anthropometrischen Daten (Bauchumfang (WC), Größe, Gewicht) sowie die Entnahme der Blut- und Urinproben erfolgte nach einem standardisierten Verfahren. Die Proben wurden entweder sofort analysiert oder bei -80°C in einer Biobank gelagert.

Das Gesamtcholesterin, HDL-(high-density lipoprotein-), LDL-(low-density lipoprotein-) Cholesterin und Kreatinin wurde im Serum der Proband:innen photometrisch mittels Dimension VISTA (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland) gemessen. Die Berechnung der eGFR erfolgte auf Basis der 4-Variablen Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)- Formel [51]. Die HbA1c-Konzentration (glykiertes Hämoglobin) wurde durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ermittelt (Diamat Analyzer, Bio-Rad, München, Deutschland).

Alle Medikamente, die die Proband:innen in der Woche vor dem Untersuchungszeitpunkt eingenommen hatten, wurden mit Hilfe des Anatomisch-Therapeutisch-Chemischen-Klassifikationssystems (ATC-Klassifikationssystem) ihren Wirkstoffen zugeordnet. Ein Metabolisches Syndrom wurde nach Alberti et al. [55] sowie dem *National Cholesterol Education Program (NCEP)* [54] definiert. Eine arterielle Hypertension lag bei einem erhöhten systolischen Blutdruck (≥ 140 mmHg) oder erhöhten diastolischen Blutdruck (≥ 90 mmHg) oder der anamnestischen Einnahme von Antihypertensiva vor.

Eine Dyslipidämie wurde definiert als Gesamtcholesterin $\geq 5,2$ mmol/l, LDL-Cholesterin $\geq 3,4$ mmol/l, HDL-Cholesterin $\leq 1,04$ mmol/l oder bei Einnahme von Lipidsenkern.

Ausführlichere Beschreibungen der hier vorgestellten Methodik sind der Publikation zu entnehmen [54].

2.3. Quantifizierung der Fettkompartimente

Die Ganzkörper-MRT-Untersuchung wurde mit einem kommerziellen 1,5 Tesla-MR-System (Magnetom Avanto, Siemens Healthcare AG, Erlangen, Deutschland, Software Version Syngo MRB15) unter Verwendung einer Body-Phased-Array-Spule (Ganzkörperspule) durchgeführt. Die Quantifizierung von SAT und VAT erfolgte mithilfe der automatischen Gewebe- und Markierungsanalyse-Software ATLAS (Universität Ulm) [55]. Im Anschluss wurden die Ergebnisse durch zertifizierte Studierende manuell optimiert und gegebenenfalls korrigiert [56].

2.4. Metabolom-Analysen

Die Quantifizierung des Metaboloms erfolgte in Kooperation mit dem Genome Analysis Center am Helmholtz Zentrum, München. Um eine möglichst große Bandbreite an Metaboliten zu bestimmen, wurden die Plasma- und Urinproben ungerichtet mittels Flüssigkeitschromatographie und Tandemmassenspektroskopie vermessen [57]. Die Quantifizierung der Metabolite erfolgte durch Metabolon Inc. (Durham, NC, USA) auf Basis einer umfassenden Spektralbibliothek. Eine detaillierte Beschreibung der zugrundeliegenden Messungen und Datenverarbeitungsschritte findet sich im Anhang der Originalpublikation [54] sowie in verschiedenen weiteren Forschungsarbeiten [30],[59].

Insgesamt ließen sich mit diesem ungerichteten Ansatz 475 Metabolite im Plasma und 558 im Urin bestimmen. Die identifizierten Metabolite umfassten eine große Bandbreite an verschiedenen Stoffklassen wie Lipide, Kohlenhydrate, Vitamine, Aminosäuren oder Xenobiotika. 177 der Metabolite im Plasma und 302 im Urin ließen sich nicht eindeutig einer chemischen Identität zuordnen. Diese Metabolite wurden mit einem „X“ und einer darauffolgenden eindeutigen Nummer gekennzeichnet.

2.5. Statistische Analysen

Für die deskriptiven Statistiken wurden die kontinuierlichen Daten als Median (25. Perzentil; 75. Perzentil) und kategoriale Daten in Prozent angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern wurden dabei mittels Mann-Whitney-U-Test (kontinuierliche Daten) oder χ^2 Test (kategoriale Daten) geprüft. Die Assoziationen zwischen VAT- bzw. SAT (unabhängige Variablen) und den verschiedenen Plasma- und Urinmetaboliten (abhängige Variablen) wurden mit Hilfe linearer Regressionsmodelle untersucht. Die Konzentrationen der Metabolite wurden dafür vorab gemäß ihrer Standardabweichung skaliert (z-Transformation). Auf diese Weise lassen sich die Ergebnisse der Regressionsanalysen besser vergleichen. Alle Regressionsmodelle wurden für Alter, Geschlecht, Rauchverhalten, sportliche Aktivität, Alkoholkonsum, systolischen Blutdruck, LDL-Cholesterin und eGFR adjustiert. Da die Menge beider Fettkompartimente stark geschlechterspezifisch ist (Abbildung 1) wurde zudem bei allen Regressionsanalysen der Interaktionsterm zwischen VAT bzw. SAT und dem Geschlecht geprüft. Wenn sich dabei ein statistisch signifikanter Effekt beobachten ließ ($p < 0,05$), wurden zusätzlich geschlechtergetrennte Regressionsmodelle berechnet. Da Mehrfachtestungen der identischen Population mit dem Auftreten von falsch-positiven Befunden einhergeht, wurden

alle p-Werte der Regressionsanalysen über die false discovery rate (FDR) mit Hilfe des Benjamini-Hochberg-Verfahrens korrigiert [59]. Ein FDR-Wert $< 0,05$ wurde in den vorliegenden Analysen als statistisch signifikant interpretiert und bedeutet, dass im Mittel weniger als 5 % der beschriebenen Ergebnisse falsch-positive Befunde sind.

Um die Vielzahl der Ergebnisse dieser metabolomweiten Assoziationsstudie besser einordnen zu können, wurden Graphische Gauß Modelle (GGMs) für die Metabolom-Daten modelliert [54]. Diese GGMs bilden die partiellen Korrelationen zwischen allen identifizierten Metaboliten ab. Auf diese Weise lässt sich erkennen, welche Metabolite unabhängig von allen anderen Metaboliten miteinander korrelieren. Um eventuell physiologische Abhängigkeiten zu identifizieren [61],[62], wurden die Ergebnisse der vorliegenden Regressionsanalysen zum Zusammenhang zwischen VAT bzw. SAT und den untersuchten Metaboliten in den GGMs mit dargestellt. Die statistischen Analysen wurden unter Zuhilfenahme des Datenverarbeitungsprogrammes R (Version 3.5.2; R Foundation for statistical computing, Wien, Österreich) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die allgemeinen Charakteristika der zugrundeliegenden Studienpopulation sind in Tabelle A1 geschlechtergetrennt dargestellt. Männer und Frauen wiesen ein vergleichbares Alter sowie eine ähnliche sportliche Aktivität auf. Frauen zeigten allerdings einen gesünderen Lebensstil mit weniger Zigaretten- und Alkoholkonsum. Nur kleine geschlechtsspezifische Unterschiede wurden bei der Betrachtung der Blutfette und des Blutzuckers sichtbar. Männer wiesen im Vergleich zu Frauen einen leicht höheren arteriellen Blutdruck, eine höhere eGFR sowie einen höheren BMI und einen größeren Bauchumfang auf. Von den 192 Männern der Studienpopulation waren 114 (59,4 %) übergewichtig, 18 (9,4 %) von ihnen adipös. Von den 299 Frauen waren 133 (44,5 %) übergewichtig, darunter 38 (12,7 %) adipös.

Bei vergleichender Betrachtung der Fettkompartimente zwischen den Geschlechtern (Abbildung 1) zeigte sich, dass bei Frauen mehr SAT und bei Männern mehr VAT eingelagert wird.

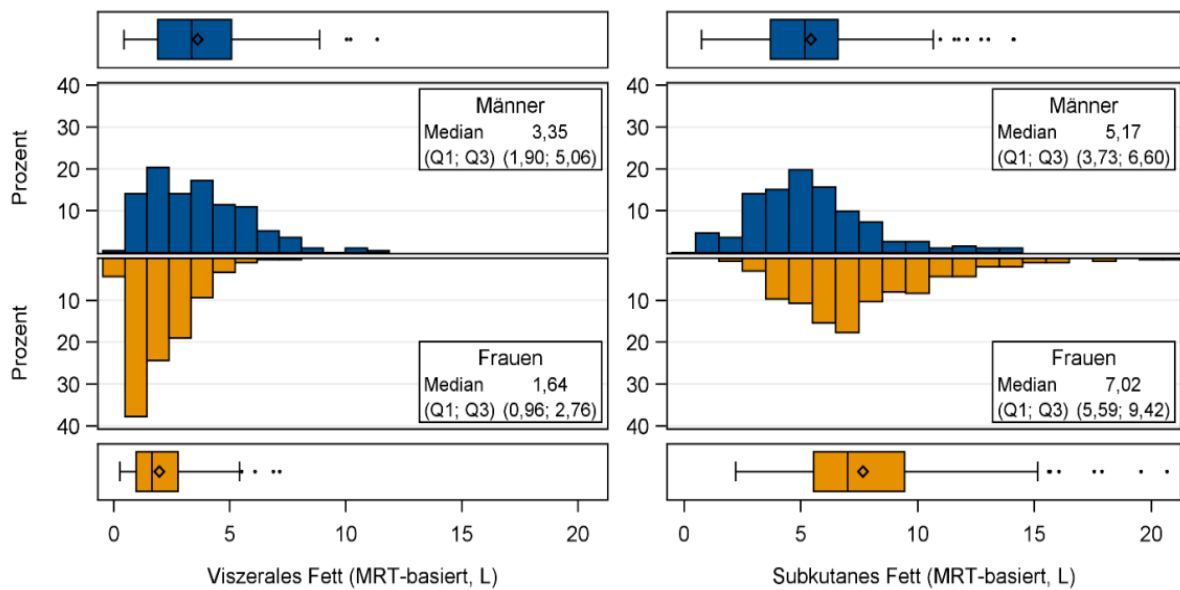


Abbildung 1 Geschlechterspezifische Verteilung der Messwerte von viszeralem und subkutanem Fettgewebe

Dargestellt ist die Verteilung der quantifizierten Menge von viszeralem (links) und subkutanem (rechts) Fettgewebe bei Männern (oben, blau) und Frauen (unten, gelb). Q1 = 1. Quartil, Q3 = 3. Quartil

3.1. Überblick über die Anzahl der signifikanten Assoziationen zwischen den Fettkompartimenten und den untersuchten Metaboliten im Plasma und Urin

Mit Hilfe linearer Regressionsanalysen wurden die Assoziationen zwischen VAT bzw. SAT und den Metaboliten der verschiedenen Stoffklassen in Plasma und Urin untersucht.

In Abbildung 2 ist überblickartig die Anzahl der signifikanten Assoziationen mit Metaboliten der unterschiedlichen Stoffklassen separat für Plasma und Urin dargestellt. Im Vergleich zeigte sich, dass sich für VAT deutlich mehr signifikante Assoziationen mit den verschiedenen Metaboliten des Plasmas und Urins beobachten lassen als für SAT. Bei einem Großteil der identifizierten Assoziationen ließen sich dabei keine geschlechtsspezifischen Unterschiede erkennen. Insgesamt waren 54 Plasmametabolite mit VAT und 20 Plasmametabolite mit SAT assoziiert. Dieses Ungleichgewicht der Anzahl assoziierter Metabolite zu den beiden unterschiedlichen Orten der Fettansammlung wurde im Urin noch deutlicher. Hier waren 101 Metabolite signifikant mit VAT und 29 Metabolite mit SAT assoziiert (Abbildungen 3, 4, A2, A3). Auffallend viele Aminosäuren, Lipide und unbekannte Stoffwechselverbindungen waren im Plasma mit VAT assoziiert. Für einige von ihnen ließen sich auch Assoziationen zu SAT beobachten. Bei den Urinmetaboliten zeigte sich, dass viele Aminosäuren, unbekannte Stoffwechselverbindungen und Xenobiotika signifikant mit VAT assoziiert sind.

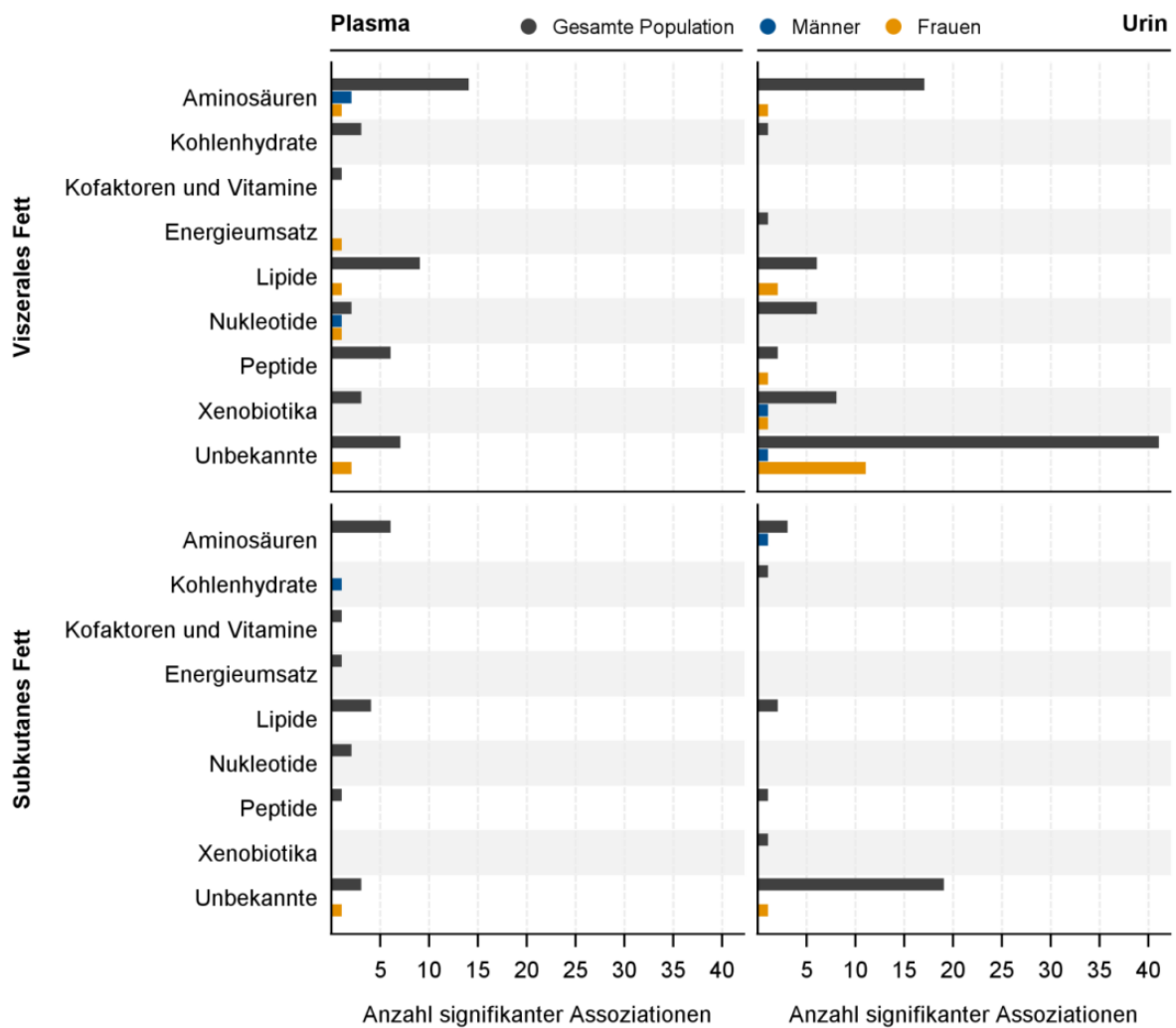


Abbildung 2 Darstellung der Anzahl signifikanter Assoziationen zwischen den Fettkompartimenten und Metaboliten verschiedener Stoffklassen aus Plasma und Urin

Dargestellt ist die mittels linearer Regressionsmodelle ermittelte Anzahl signifikanter Assoziationen zwischen der Menge des viszeralen (oben) und subkutanen (unten) Fetts und den Metaboliten verschiedener Stoffklassen aus dem Plasma (links) und Urin (rechts). Die Regressionsmodelle wurden für Alter, Geschlecht, Rauchverhalten, sportliche Aktivität, Alkoholkonsum, systolischen Blutdruck, LDL-Cholesterin und eGFR adjustiert. Bei Vorliegen eines signifikanten Interaktionseffekts zwischen SAT bzw. VAT und dem Geschlecht wurden die Regressionsmodelle geschlechtergetrennt berechnet. Die identifizierten Assoziationen für beide Geschlechter zusammen sind in diesen Fällen nicht mit abgebildet.

3.2. Assoziationen zwischen VAT und Plasma- und Urinmetaboliten

In Abbildung 3 sind die Assoziationen zwischen VAT und den Plasma- und Urinmetaboliten dargestellt.

Es zeigte sich, dass der Großteil der signifikanten Assoziationen zwischen VAT und den Metaboliten im Plasma in eine positive Richtung verläuft. Neben verschiedenen Fettsäure-Abkömmlingen (z.B. Arachidonat, Palmitat oder Butyryl-Carnitin) waren überwiegend Produkte aus dem Stoffwechsel von BCAAs (z.B. Valin oder Leucin) und die dazugehörigen Zwischenprodukte (z.B. 3-Methyl-2-Oxobutyrat) positiv mit VAT assoziiert. Weiterhin waren positive Assoziationen zwischen VAT und den aromatischen Aminosäuren Tyrosin oder Phenylalanin sowie Alanin und Glutamat sichtbar.

Auch γ -glutamyl-Aminosäuren und Metabolite aus dem Kohlenhydratstoffwechsel (Laktat, Pyruvat und Hexosen) waren im Plasma positiv mit der VAT-Konzentration assoziiert (Abbildung 3). Zudem ließen sich positive Assoziationen mit einer Vielzahl unbekannter Metabolite beobachten (Abbildung A2).

Die visuelle Darstellung der Analyseergebnisse mittels GGM ließ eine Ballung von Metaboliten um Piperin erkennen (Abbildung A4). Es zeigte sich, dass mehrere unbekannte Metabolite in enger Verbindung zu Piperin stehen und vor allem X-01911 als unbekannter Plasma- und Urinmetabolit eine starke Assoziation zu VAT aufwies.

Inverse Assoziationen zwischen VAT und Plasmametaboliten wurden nur vereinzelt beobachtet. Signifikante Effekte zeigten sich hier zwischen VAT und Indolepropionat, Citrat, den Lipiden Caprat und Glycerophosphocholin sowie den Xenobiotika Cotinin und Catechol Sulfat (Abbildung 3). Darüber hinaus ließen sich inverse Assoziationen zwischen VAT und zwei weiteren, aktuell noch unbekanntem, Plasmametaboliten beobachten (Abbildung A2).

Einige der identifizierten positiven Assoziationen zwischen VAT und den Metaboliten im Plasma ließen sich auch im Urin beobachten (z.B. BCAAs, Laktat). Es dominierten jedoch im Gegensatz zum Plasma bei den Urinmetaboliten inverse Assoziationen zu VAT. Diese beinhalteten mehrere Aminosäuren wie Glutamin sowie verwandte Katabolite der BCAAs (z.B. Phenylpropionylglycin und glycin-konjugierte Zwischenprodukte).

Außerdem fanden sich im Urin Abbauprodukte der Aminosäuren, in Form von Metaboliten aus dem Harnstoffzyklus (Urea), signifikant mit VAT assoziiert. Weiterhin zeigten sich im Urin inverse Assoziationen von VAT mit verschiedenen Nukleotiden, wie Pyrimidinnucleotid Uracil

und Purinnucleotid Guanin sowie mit den Abbauprodukten Xanthin und Urat aus dem Stoffwechsel der Purine. Auch eine große Menge an Xenobiotika wie Catechol Sulfat, Hippurat und Cinnamoylglycin waren invers mit VAT assoziiert. Ebenso fanden sich signifikante Assoziationen zu VAT bei den Steroiden (z.B. Kortisol, Kortison) und anderen Fettsäuren (z.B. Sebacat).

Im Subnetzwerk aus dem GGM (Abbildung A4) werden die Verbindungen zwischen Kortison und einer Vielzahl verwandter unbekannter Metabolite ersichtlich. Diese waren jedoch genauso wie Tetrahydrocortison im Urin positiv mit VAT assoziiert (Abbildung A2).

Zusammenfassend zeigte sich im Urin eine sehr viel größere Anzahl signifikanter Assoziationen zu VAT als im Plasma. Die große Anzahl identifizierter Assoziationen zwischen VAT und diversen unbekanntem Stoffwechselverbindungen (Abbildung A2) liefert Hinweise auf eine veränderte Ausscheidung von Stoffwechselprodukten.

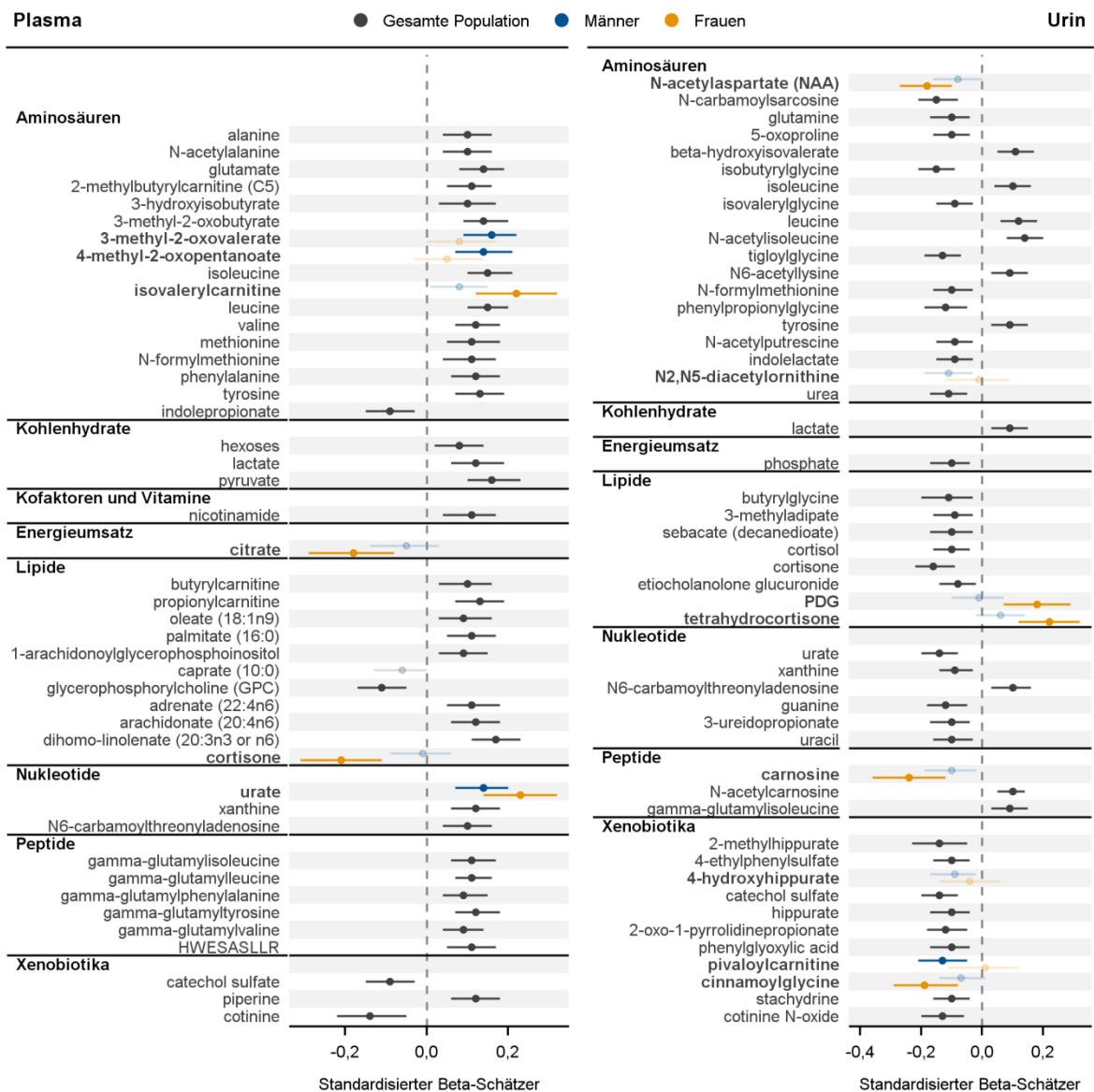


Abbildung 3 Signifikante Assoziationen zwischen viszeralem Fettgewebe und Metaboliten im Plasma und Urin

Dargestellt sind die Beta-Schätzer inklusive ihres 95%-igen Konfidenzintervalls aus den linearen Regressionsmodellen zwischen VAT und jenen Plasma- und Urinmetaboliten, bei denen sich eine signifikante Assoziation in der Gesamtpopulation, bei Frauen oder bei Männer, beobachten ließ. Regressionsmodelle wurden adjustiert für Alter, Geschlecht, Nikotinabusus, Alkoholkonsum, LDL-Cholesterin, systolischen Blutdruck und eGFR. In allen Regressionsmodellen wurde die Interaktion zwischen VAT und Geschlecht geprüft. Bei Vorliegen eines signifikanten Interaktionseffektes ($FDR < 0,05$; betreffende Metabolite sind fett gedruckt) wurden die geschlechtergetrennten Schätzer dargestellt (blau = Männer; gelb = Frauen). In allen anderen Fällen sind nur die Schätzer für die Gesamtpopulation abgebildet (dunkelgrau). Signifikante Assoziationen sind fett gedruckt. PDG = 5beta-pregnan-3alpha, 21-diol-11,20-dione 21-glucosiduronat

3.3. Assoziationen zwischen SAT und Plasma- und Urinmetaboliten

Wie eingangs beschrieben, zeigte sich im Vergleich zu VAT eine geringere Anzahl signifikanter Assoziationen zwischen SAT und den untersuchten Plasma- und Urinmetaboliten. Der Schwerpunkt lag dabei auf Aminosäuren und unbekannten Metaboliten (Abbildung 4). Analog zu den mit VAT assoziierten Metaboliten waren auch mit SAT mehr unbekannte Verbindungen im Urin assoziiert als im Plasma (Abbildung A3). In Abbildung 4 wird deutlich, dass sich jeweils nur zwei neue signifikante Assoziationen zu SAT im Plasma und Urin fanden, die noch nicht für VAT beschrieben wurden. Zum einen zeigte sich im Plasma eine inverse Assoziation von Kortisol zu SAT sowie eine positive Assoziation von N1-Methyl-2-Pyridon-5-Carboxamid zum SAT. Zum anderen ließ sich im Urin die positive Assoziation zwischen SAT und Trisaccharid 3`-Sialyllactose (Abbildung 4) sowie zu der unbekannten Verbindung X-12840 beobachten (Abbildung A3).

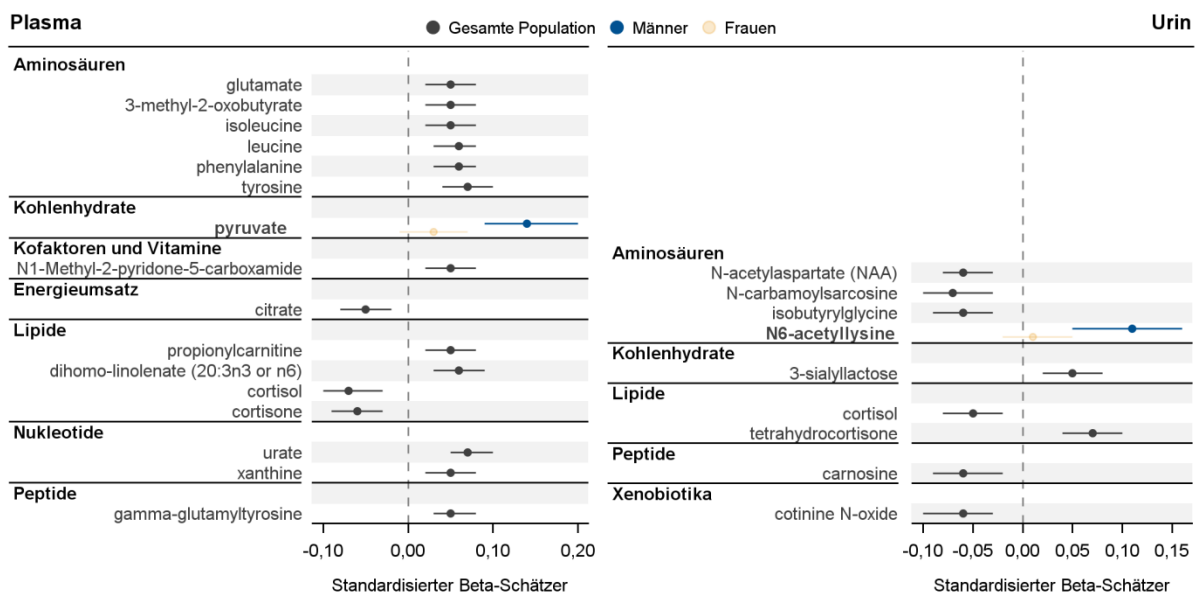


Abbildung 4 Signifikante Assoziationen zwischen subkutanem Fettgewebe und Metaboliten im Plasma und Urin

Dargestellt sind die Beta-Schätzer inklusive ihres 95%-igen Konfidenzintervalls aus den linearen Regressionsmodellen zwischen SAT und jenen Plasma- und Urinmetaboliten, bei denen sich eine signifikante Assoziation in der Gesamtpopulation, bei Frauen oder bei Männern, beobachten ließ. Regressionsmodelle wurden adjustiert für Alter, Geschlecht, Nikotinabusus, Alkoholkonsum, LDL-Cholesterin, systolischen Blutdruck und eGFR. In allen Regressionsmodellen wurde die Interaktion zwischen SAT und Geschlecht geprüft. Bei Vorliegen eines signifikanten Interaktionseffektes ($FDR < 0,05$; betreffende Metabolite sind fett gedruckt), wurden die geschlechtergetrennten Schätzer dargestellt (blau = Männer; gelb = Frauen). In allen anderen Fällen sind nur die Schätzer für die Gesamtpopulation abgebildet (dunkelgrau). Signifikante Assoziationen sind fett gedruckt.

3.4. Geschlechtsspezifische Assoziationen

Da die Verteilung der Fettkompartimente nachweislich stark geschlechterspezifisch ist, wurde bei allen Regressionsanalysen eine Interaktion zwischen VAT bzw. SAT und dem Geschlecht geprüft. Bei signifikanten Interaktionseffekten mit dem jeweiligen Fettkompartiment wurden geschlechtergetrennte Modelle berechnet und deren Ergebnisse abgebildet. Die Analysen zeigten bei 8 Plasmametaboliten und 19 Urinmetaboliten einen geschlechtsspezifischen Effekt zu VAT (Abbildungen 3, A2). Im Vergleich dazu wurde nur bei jeweils 2 Plasma- und Urinmetaboliten ein Interaktionseffekt zwischen SAT und dem Geschlecht beobachtet (Abbildungen 4, A3).

Die inverse Assoziation zwischen VAT und den Plasmametaboliten Kortison und Citrat war nur bei Frauen erkennbar. Darüber hinaus ließen sich im Plasma auch die positiven Assoziationen zwischen der Menge an VAT und Isovalerylcarnitin sowie den unbekanntem Metaboliten X-12104 und X-12844 nur bei Frauen beobachten. Die Anzahl der zu VAT assoziierten Urinmetabolite war bei Frauen höher als bei Männern. Diese beinhalteten verschiedene Steroide, wie 5beta-pregnan-3alpha,21-diol-11,20-dione 21-glucosiduronate (PDG), Tetrahydrokortison (positiv) und davon verwandte unbekannte Verbindungen wie X-17340 und X-17341 (beide positiv; siehe Abbildungen 3, A2, A4), deren Verbindung durch das GGM abgeleitet werden konnte. Weiterhin wurden die inversen Assoziationen zwischen VAT und den Urinmetaboliten Carnosin, N-Acetylaspartat und Cinnamoylglycin nur bei Frauen detektiert. Darüber hinaus ließen sich bei Frauen eine Vielzahl signifikanter Assoziationen zwischen VAT und diversen unbekanntem Urinmetaboliten identifizieren (positive Assoziationen mit VAT: X-11444, X-11593, X-12844, X-14302, X-16774, X-17357; inverse Assoziationen mit VAT: X-11835, X-19144; siehe Abbildung A2).

Die positiven Assoziationen zwischen VAT und den Plasmametaboliten 3-Methyl-2-Oxovalerat und 4-Methyl-2-Oxopentanoat, die beide am BCAA-Katabolismus beteiligt sind, wurden nur bei Männern detektiert. Weiterhin konnte bei Männern beobachtet werden, dass eine geringe Ausscheidung von Pivaloylcarnitin im Urin mit VAT assoziiert war. Ausschließlich bei Frauen wurden positive Assoziationen zwischen SAT und zwei unbekanntem Metaboliten sichtbar: X-12104 (im Plasma) und X-14302 (im Urin) (Abbildung A3). Bei Männern war eine gesteigerte Exkretion des Urinmetaboliten N6-Acetyllysin mit SAT assoziiert und im Plasma zeigte Pyruvat einen positiven Zusammenhang zum SAT (Abbildung 4).

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Assoziationen zwischen VAT bzw. SAT und einer großen Anzahl von Plasma- und Urinmetaboliten untersucht, um die umfangreichen molekularen Stoffwechselprozesse darzustellen, die mit einer Akkumulation von VAT und SAT assoziiert sind. Für die Analysen wurden Daten einer großen Gruppe asymptomatischer Proband:innen aus der Normalbevölkerung Nordostdeutschlands herangezogen.

Die Ergebnisse zeigten, dass molekulare Veränderungen mit einer zunehmenden Menge von VAT assoziiert sind. Dazu zählen beispielsweise Fettsäureabkömmlinge, Metabolite aus dem BCAA-Katabolismus, aromatische Aminosäuren, Stoffwechselprodukte von Kohlenhydraten sowie eine Vielzahl unbekannter Metabolite. Weiterhin war VAT mit Piperin und damit verwandten Metaboliten assoziiert. Die Assoziationen zu SAT wurden bereits fast vollständig in denen für VAT abgebildet. Die Evidenz für geschlechtsspezifische Assoziationen zwischen den beiden Fettkompartimenten und dem Metabolom war nur gering.

4.2. VAT und Assoziationen zu BCAAs - wie veränderte metabolische Signaturen den metabolisch gesunden Status von Übergewicht in Frage stellen

Bereits in früheren Untersuchungen wurden bei übergewichtigen, komorbiden Proband:innen Assoziationen zwischen der Menge an VAT und Plasma-BCAAs sowie deren verwandter Metabolite festgestellt. Verglichen mit schlanken Proband:innen, wiesen diese Menschen sichtbar geringere Plasma-Konzentrationen der genannten Metabolite auf [38],[48],[62]–[66]. Im Unterschied zu diesen Studien untersuchte die vorliegende Arbeit ausschließlich metabolische Profile von Proband:innen, die sich in einem metabolisch gesunden Zustand befanden. Bei jenen ließen sich positive Assoziationen zwischen VAT und verschiedenen BCAAs sowie Aromatischen Aminosäuren beobachten, die zum Teil auch mit der Menge von SAT assoziiert waren. Weitere Metabolite aus dem Stoffwechsel von BCAAs (z.B. 3-Methyl-2-Oxovalerat, 4-Methyl-2-Oxopentooat) waren darüber hinaus signifikant bei Männern mit VAT assoziiert. Eine der möglichen Erklärungen für die Assoziationen zwischen VAT und den Aminosäuren scheint ein höherer Proteinumsatz bei Übergewichtigen zu sein, wodurch mehr Zerfallsprodukte von Aminosäuren in die Blutbahn strömen [60],[69].

Freie BCAAs im Plasma sind in der Lage *mechanistic target signaling* von Rapamycin (mTOR) herbeizuführen und dadurch zur Entwicklung einer Insulinresistenz beizutragen [69],[71].

Höhere Plasma-Konzentrationen von BCAAs wurden zudem unabhängig von klassischen Risikofaktoren (z.B. Alter, Übergewicht, Ernährungsgewohnheiten, familiäre Vorbelastung [68]) bereits häufiger mit einem höheren Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 und anderen metabolischen Funktionsstörungen in Verbindung gebracht [36],[60],[63],[69]. She et al. [70] konnten zeigen, dass die veränderten Konzentrationen von BCAAs nach Gewichtsreduktion reversibel sind und sich infolge eines bariatrischen Eingriffs oder einer Fastenkur eine Verringerung der Plasma-BCAAs beobachten lässt [70]. Dies ist eine bereits bekannte Beobachtung, die durch einen verminderten Abbau von Isoleucin, Leucin und Valin in peripherem Gewebe (z.B. Skelettmuskulatur) erklärt werden kann [70]. Die anschließende Akkumulation von α -Ketosäuren, wie 3-Methyl-2-Oxobutyrat, könnte die Pathophysiologie der Insulinresistenz und damit folglich die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 befördern. Dies wurde in einem Tierversuch [71] sowie in einer groß angelegten humanen Genom-Studie, die mit Metabolomics- Untersuchungen gepaart war, dargelegt [72].

Eine aktuelle Studie beschreibt darüber hinaus eine bislang unbekannte Rolle des braunen Fettgewebes im Metabolismus von BCAAs bei Menschen und Mäusen [13]. BCAAs in den Mitochondrien werden zur Energiegewinnung genutzt. Ein Defekt im BCAA-Katabolismus des braunen Fettgewebes führt zu einer verminderten Ausscheidung der BCAAs. Infolgedessen werden die Aufgaben des braunen Fettgewebes (z.B. Thermogenese) heruntergefahren, sodass ein diätetisch-induziertes Übergewicht sowie eine verminderte Glukosetoleranz eintritt [13]. Der BCAA-Katabolismus wird über den mitochondrialen Transporter SLC25A44 geregelt, somit wirkt das braune Fettgewebe als metabolischer Filter, der den Stoffwechsel von BCAAs kontrolliert [13]. Die inverse Korrelation zwischen VAT und braunem Fettgewebe [73] könnte Hinweise dafür liefern, dass der oben genannte Mechanismus die Beobachtungen einer Assoziation zwischen VAT und BCAAs aus der hier vorliegenden Arbeit unterstützt. Ein gesteigertes Angebot von BCAAs (z.B. durch vermehrten Proteinabbau, erhöhte Zufuhr im Rahmen der Ernährung [71] oder in Form von Nahrungsergänzungsmitteln zum Muskelaufbau [74]) könnte unabhängig von der Quelle andere metabolische Stoffwechselwege verstärken. Durch eine gesteigerte Glukoneogenese würde damit die Homöostase des Blutzuckerspiegels negativ beeinflusst werden.

Auch vorangegangene Metabolomics-Studien unterstützen die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen BCAAs und der Entwicklung von Adipositas [75].

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit Hinweise auf eine molekulare Kennzeichnung von metabolisch gesund erscheinenden Proband:innen, die laut vorangegangener Studienergebnisse einer Insulinresistenz und einem Diabetes mellitus Typ 2 vorausgehen könnte. Diese molekulare Signatur passt zu der unabhängigen Rolle von viszeralem Übergewicht in der Ausbildung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 [79],[80]. Dies stellt die metabolische Gesundheit von Proband:innen, insbesondere derer mit einem hohen Anteil von VAT, in Frage.

4.3. VAT und Assoziation zu gamma-glutamyl-Aminosäuren als Stellvertreter für oxidativen Stress

Abgesehen vom Stoffwechsel der BCAAs, stellt die vorliegende Studie auch einen geschlechtsunabhängigen, positiven Zusammenhang zwischen der Menge von VAT und einer Akkumulation von mit den BCAAs verwandten γ -glutamyl-Dipeptiden im Plasma her [78]. Die Bildung von γ -glutamyl-Dipeptiden ist ein Teil des γ -glutamyl-Zyklus, der zusammen mit anderen Mechanismen für die Wiederherstellung des intrazellulären Antioxidans Glutathion zuständig ist [78]. Höchstwahrscheinlich führt Überernährung und anschließender Substratüberschuss zu einer gesteigerten Substratoxidation in den Mitochondrien. Dies führt wiederum zu einer gesteigerten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS stimuliert die Produktion von Glutathion mittels NRF2-Signalen und führt folglich zu einer gesteigerten Expression von γ -Glutamylcystein-Ligase, dem Schlüsselenzym der Glutathion Produktion [79]. Demnach könnte eine vermehrte Akkumulation von γ -glutamyl-Dipeptiden zu gesteigertem oxidativen Stress führen [80].

Lee et al. [81] postulierten zwei weitere interessante Hypothesen, in dem sie in einer Studie den Einfluss von Xenobiotika auf ein erhöhtes Diabetes-Risiko untersuchten: Zum einen wird durch den vermehrten oxidativen Stress mehr Glutathion benötigt, welches zu mehr γ -glutamyl-Dipeptiden führt. Zum anderen führt die Speicherung der Xenobiotika in der Fettmasse zu einer mitochondrialen Dysfunktion, die wiederum in einer Störung des Lipid- und Glukosestoffwechsels mündet. Dies könnte folglich zusammen mit epigenetischen Veränderungen das individuelle Diabetes-Risiko erhöhen. Eine vorangegangene Metabolomics-Studie [80] schlug γ -glutamyl-Dipeptide zudem als sensitiven Marker für die Leberfunktion vor, der

eine Steatosis hepatis von einem hepatozellulären Karzinom unterscheiden kann. Auch in anderen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen γ -glutamyl-Dipeptiden und dem Vorliegen einer Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) aufgezeigt werden [82]. Eine ektope Akkumulation von Fett in der Leber wurde darüber hinaus häufig mit viszeralem Übergewicht in Verbindung gebracht [83] und könnte die vorliegende Beobachtung eines veränderten Lebermetabolismus in Beziehung setzen.

4.4. Piperin, ein natürlicher und potentiell pharmakologisch aktiver Metabolit aus schwarzem Pfeffer, und die Assoziation zum VAT

Ein weiteres in dieser Arbeit identifiziertes molekulares Kennzeichen beinhaltete ein Cluster um den Plasma-Metaboliten Piperin (Abbildung A4). Im GGM ließen sich positive Assoziationen mit einer Vielzahl korrelierender Metabolite und VAT bzw. SAT aufzeigen, wobei Piperin selbst nur mit VAT signifikant assoziiert war. Die stärksten Assoziationen wurden dabei zwischen den beiden Fettkompartimenten und der Verbindung X-01911 im Plasma und Urin beobachtet. Solch ein Cluster könnte auf Zusammenhänge mit dem gesamten Stoffwechsel des Metabolismus von Piperin hindeuten.

Piperin ist ein Alkaloid und kann aus den Abbauprodukten von schwarzem Pfeffer abgeleitet werden [84]. In vorangegangenen Studien wurde Piperin bereits als vielversprechender pharmakologischer Wirkstoff für verschiedene Anwendungen diskutiert [85]–[87]. Hinsichtlich der Fettmassenverteilung zeigte eine Studie in Mäusen, dass infolge der Zufuhr von Piperin bzw. schwarzem Pfeffer, eine Reduzierung des Körperfetts beobachtet werden kann [88]. Die Fettspeicherung wurde dabei vor allem in den 3T3-L1-Zellen reduziert. Außerdem ließ sich beobachten, dass im Rahmen dieses Prozesses die Adipozytendifferenzierung blockiert wird [88]. Piperin scheint also in die Genregulation einzugreifen [84]. Die beschriebenen Zusammenhänge widersprechen allerdings den Beobachtungen einer positiven Assoziation zwischen Plasma-Piperin und VAT in der vorliegenden Studie. Es kann vermutet werden, dass die hier aufgezeigten positiven Effekte von Piperin [89] den objektiv metabolisch gesunden Status der Studienpopulation dieser Arbeit erklären, ungeachtet eines hohen Anteils von VAT bzw. SAT. Ein ähnliches Argument findet man in der traditionellen chinesischen Medizin [90].

4.5. VAT und Assoziation zur Darmflora – der Zusammenhang zwischen Adipositas und dem Mikrobiom

Es ist bekannt, dass eine Dysbalance der Darmflora einen Einfluss auf den gesamten Organismus mit chronischen Entzündungen sowie metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen hat [91],[92]. Folglich wird eine unausgeglichene Darmflora häufig auch mit Adipositas, Überernährung und Diabetes mellitus in Zusammenhang gebracht und eine veränderte Diversität der Darmflora als Biomarker für diese Erkrankungen gewertet [93],[94]. Erste Untersuchungen liefern zudem Hinweise darauf, dass eine aktive Veränderung der Darmflora zu einem Gewichtsverlust beitragen kann [94].

Als „Mikrobiom“ bezeichnet man die heterogene Fülle der Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Protozoen, Hefen), die den menschlichen Körper besiedeln und mit ihm in einer symbiotischen Beziehung interagieren [91]. Das Mikrobiom ist ein wichtiger Faktor, der die Verdauung von exogen zugeführten Stoffen beeinflusst. Daher gibt es derzeit viele Forschungsansätze, die versuchen mit veränderten Nahrungsmittelgewohnheiten einen Einfluss auf das Darmmikrobiom zu untersuchen. Diese Studien liefern Hinweise darauf, dass externe Stimuli wie Antibiotika [95], Probiotika, weitere Supplemente oder Mikrobiom-Transplantationen [96], einen Einfluss auf das eigentliche Mikrobiom eines Menschen haben [91]. Vorangegangene Untersuchungen konnten darüber hinaus eine wechselseitige Verbindung zwischen der Physiologie des Magen-Darm-Traktes und dem Gehirn beobachten, die als „Mikrobiom-Darm-Hirn-Achse“ bezeichnet wird [97]. Dieser bidirektionale Weg ist wichtig für die Kontrolle des Appetits, das Schmerzempfinden, die gastrointestinale Physiologie und die Immunantwort und nimmt daher eine zentrale Rolle im menschlichen Organismus ein.

Der Metabolismus von Mikroben im Darm trägt wesentlich zu der Menge des Metaboloms im Plasma und Urin bei [98],[99]. Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms basieren vor allem auf einem veränderten Verhältnis der Bakteriengruppen Firmicutes zu Bacteroidetes [100]. Bacteroidetes sind für den Abbau von Phenolen zuständig. Bedenkt man, dass Hippurat im Urin eines der größten Abbauprodukte im Stoffwechsel von Phenolen ist [101], könnte dies eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit identifizierten inversen Assoziationen zwischen mikrobiellen (Urin-)Metaboliten und VAT liefern. So war in der vorliegenden Studie bei beiden Geschlechtern neben Hippurat auch 2-Methylhippurat, Catechol Sulfat und Phenylpropionylglycin (im Urin) invers mit VAT assoziiert.

Im Plasma ließ sich zudem eine inverse Assoziation zwischen Indolepropionat und VAT identifizieren. Für die Urinmetabolite Cinnamoylglycin und Carnosin konnte nur bei Frauen eine inverse Assoziation zu VAT beobachtet werden. Letzterer war als einziger Urinmetabolit bei beiden Geschlechtern auch mit SAT invers assoziiert. Die genannten Metabolite resultieren aus der mikrobiellen Verdauung von Nahrungsmittelfasern, Phenolen oder Cholin [101],[99]. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Fettmasse - vor allem VAT - und einer verringerten Diversität an Stoffwechselprodukten aus dem menschlichen Verdauungstrakt beobachtet werden. Folglich kann die Hypothese aufgestellt werden, dass übergewichtige Menschen weniger faserreiche Kost und mehr einseitige, verarbeitete Lebensmittel zu sich nehmen. Shen et al. [94] konnten zeigen, dass übergewichtige Menschen im Vergleich zu schlanken Individuen eine verringerte Vielfalt im Darmmikrobiom aufweisen.

Mehrere Studien [101],[102],[103] liefern darüber hinaus Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Hippurat und Übergewicht sowie Diabetes mellitus Typ 2. Eine britische Studie bei Zwillingen konnte zudem die Hypothese aufstellen, dass der Gehalt von Hippurat im Plasma eine mögliche Verknüpfung zwischen den Nahrungsmittelgewohnheiten und der Funktion der Adipozyten darstellt [44]. Die Expression von Neuroglobin stellt dabei einen möglichen Regulator dar und das Bakterium *Eubacterium dolichum* scheint eine wichtige Rolle zu spielen [44].

Ergänzend zu den beschriebenen Veränderungen in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms sind weitere Erklärungen für den beobachteten inversen Zusammenhang zwischen VAT und den Stoffwechselprodukten aus der Verdauung von Nahrungsmittelfasern, Phenolen und Cholin denkbar. So kann die Auswirkung einer möglicherweise veränderten Nierenfunktion auf die vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend beurteilt werden. In den zugrundeliegenden Regressionsmodellen wurde die eGFR zwar als Störfaktor berücksichtigt, allerdings muss eine veränderte Nierenfunktion nicht unbedingt direkt in der eGFR abgebildet sein. Eine verminderte tubuläre Sekretion von Hippurat und Cinnamoylglycin bei übergewichtigen Proband:innen könnte demnach eine weitere, vom Metabolismus der Darmmikroben unabhängige, Erklärung für den beobachteten Zusammenhang liefern [103],[104].

4.6. Veränderter Kohlenhydratstoffwechsel und Assoziation zu VAT

In der vorliegenden Studie zeigten sich Hinweise für einen Zusammenhang zwischen einem veränderten Kohlenhydratstoffwechsel und der Menge von VAT. Das Triplet Laktat, Pyruvat und Nikotinamid war geschlechterunabhängig mit einer erhöhten Konzentration von VAT assoziiert. Einen Zusammenhang zu SAT zeigte nur Pyruvat. Allerdings ließ sich diese Assoziation nur bei Männern beobachten.

Der gegenseitige Austausch zwischen im Muskel anfallendem Laktat und Glukose aus der Leber wird als Corizyklus bezeichnet. Glukose wird in den Muskeln in der anaeroben Glykolyse über Pyruvat in Laktat umgewandelt und in die Blutbahn abgegeben. In der Leber kann Laktat in Pyruvat umgewandelt und anschließend im Rahmen der Glukoneogenese zu Glukose konvertiert werden. Nikotinamid ist als Co-Faktor essentiell für die reversible Interkonversion von Pyruvat und Laktat mit Hilfe der Laktatdehydrogenase. Dies ist ein wichtiger Schritt in der Glykolyse bzw. Glukoneogenese [106].

Zusammengefasst hebt die beobachtete positive Assoziation zwischen den verschiedenen Kohlenhydraten und der Menge des VAT den veränderten Glukosestoffwechsel hervor, indem es alternative Stoffwechselwege zur Energiegewinnung aus der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten aufzeigt.

4.7. O-Methylascorbat - wie Vitamin C und Fettmasse zusammenhängen

Bei der positiven Assoziation zwischen VAT und X-11593 im Urin von Frauen handelte es sich um eine der wenigen identifizierten metabolischen Signaturen, die einen geschlechtsspezifischen Effekt aufwies. X-11593 konnte mittlerweile als O-Methylascorbat identifiziert werden [30]. O-Methylascorbat ist ein Produkt aus dem Stoffwechsel von Ascorbinsäure (Vitamin C), welches durch O-Methylierung entsteht [107]. Es ist beispielsweise denkbar, dass das involvierte Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT) in der untersuchten (soweit metabolisch gesunden) Population der vorliegenden Arbeit aktiver ist als bei vergleichbaren Proband:innen mit Vorerkrankungen und damit mehr O-Methylascorbat generiert würde. Alternativ kann vermutet werden, dass die untersuchten Proband:innen vermehrt Vitamin C zuführten, sodass mehr Abbauprodukte entstünden. Auch dies könnte die beobachtete Assoziation zwischen O-Methylascorbat im Urin mit VAT erklären.

Verringerte Plasma-Spiegel von Vitamin C wurden bereits mehrfach mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht [108], [109]. Zudem konnte der Ascorbinsäure eine

protektive Rolle in Verbindung mit kardiovaskulären Ereignissen zugeschrieben werden [110]. Ascorbinsäure ist als potentes Antioxidans und Koenzym im menschlichen Organismus [111] an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt [112]. Im Fall der irreversiblen Oxidation von Ascorbinsäure, beispielsweise in Zeiten, in denen hohe Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies im Körper vorhanden sind, würde der Bedarf an exogen zugeführtem Vitamin C steigen [113]. Weshalb die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Signatur ausschließlich bei Frauen sichtbar war, bleibt allerdings offen.

Weiterhin ist COMT im Dopamin Stoffwechsel involviert. Dieser reguliert den Appetit und ist dadurch für die Entstehung von Übergewicht entscheidend [114]. Einzelne Varianten von Genen, die COMT kodieren, wurden in einer vorhergehenden Studie mit Nahrungsmittelgewohnheiten, inklusive einer Vorliebe für ungesundes Essen, assoziiert [115]. Allerdings konnte eine andere genetische Studie, in der ähnliche Genvarianten von COMT untersucht wurden, keine Assoziation dieser Gene mit dem BMI oder Körpergewicht aufzeigen [114].

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass eine ausgewogene Diät der Proband:innen zu einem metabolisch gesunden Status beigetragen haben könnte. Andererseits könnte die frauenspezifische Beobachtung von mit VAT-assoziiertem Gehalt von O-Methylascorbat auch durch eine übliche genetische Architektur von anthropometrischen Eigenschaften und vermittelndem Metabolismus erklärbar sein.

4.8. Freie Fettsäuren und VAT – wie der Zusammenhang zur Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 entsteht

Bei den freien Fettsäuren ließen sich mehr signifikante Assoziationen mit VAT als mit SAT aufzeigen. Einzig die Plasmametabolite Propionylcarnitin und Dihomo-linolenat waren mit beiden Fettkompartimenten signifikant assoziiert.

Aufgrund der höheren lipolytischen Aktivität des VAT, die durch Hormone, Katecholamine und Insulin beeinflusst wird, erfolgt die Mobilisation der freien Fettsäuren schneller aus VAT als aus SAT und erklärt damit vermutlich die Befunde der vorliegenden Arbeit [116]. Freie Fettsäuren werden direkt über die Portalvene drainiert, wodurch sie zu einer Verminderung der hepatischen Insulin-Extraktion und zu einer systemischen Hyperglykämie führen [116]. Zusätzlich führen höhere Mengen freier Fettsäuren zu einer vermehrten Glukoneogenese, da mehr Substrat zur Verfügung steht. Somit verursachen sie eine verminderte Insulinsensibilität im Skelettmuskel, welche wiederum in einer Hyperglykämie münden kann [22].

Dies alles könnte bei anhaltend hohem Blutzuckerspiegel und folglich hohem Insulinspiegel, die Dysfunktion der Beta-Zellen des Pankreas befördern und damit die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 zur Folge haben [117],[118].

4.9. SAT und spezifische Assoziation zu N1-Methyl-2-Pyridon-5-Carboxamid und 3`-Sialyllactose

Die Mehrzahl der Metabolite, für die sich signifikante Assoziationen mit VAT beobachten ließen, zeigten auch signifikante Assoziationen zum SAT auf.

Nur N1-Methyl-2-Pyridon-5-Carboxamid (Plasma, positiv), 3`-Sialyllactose (Urin, positiv), X-12840 (Urin, positiv) und Kortisol (Plasma, invers) waren geschlechterunabhängig ausschließlich mit SAT assoziiert.

N1-Methyl-2-Pyridon-5-Carboxamid stammt aus dem Nicotinamid-Stoffwechsel [119]. Der Metabolit ist folglich am Energiestoffwechsel beteiligt und könnte ebenfalls einen Hinweis für einen veränderten Stoffwechsel bei erhöhtem Körperfettanteil liefern. Auch die Ernährungsgewohnheiten, insbesondere die Zufuhr mit Niacin/Nicotinsäure [120], haben einen Einfluss auf den Gehalt von N1-Methyl-2-Pyridon-5-Carboxamid [121]. Vor allem Kaffee stellt einen verlässlichen Lieferanten von Niacin dar, weshalb bei regelmäßigem Kaffeegenuss eine erhöhte Ausscheidung von N1-Methyl-2-Pyridon-5-Carboxamid beobachtet werden konnte [122]. Toxikologisch ist bekannt, dass hohe Dosen von N1-Methyl-2-Pyridon-5-Carboxamid die Aktivität der Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 (PARP-1) hemmen [123]. Die PARP-1 ist bei Reparaturmechanismen von DNA-Brüchen beteiligt und führt somit bei Inhibition zu genomischer Instabilität und möglicherweise zur Tumorausbildung [123]. Ebenfalls ist bekannt, dass mit einem höheren Alter sowie bei Niereninsuffizienz der Plasmaspiegel von N1-Methyl-2-Pyridon-5-Carboxamid steigt [121]. In der vorliegenden Studie wurden Proband:innen mit einer eingeschränkten Nierenfunktion (eGFR < 50 ml/min/1,73 m²) ausgeschlossen. Die vorliegenden Daten könnten allerdings einen Hinweis darauf geben, dass bereits sehr frühzeitig eine veränderte Nierenfunktion bei erhöhtem SAT mithilfe der durch Metabolomics erfassten Daten beobachtet werden kann. Das Trisaccharid 3`-Sialyllactose stammt aus humaner Milch [124] und wird, biotechnologisch erzeugt, vor allem in Nahrungsergänzungsmitteln gefunden [125]. Hier könnte folglich ein exogener Einfluss auf die Ansammlung von SAT vermutet werden.

4.10. Die Assoziation zwischen VAT bzw. SAT und Kortisol

Kortisol war im Plasma und Urin bei beiden Geschlechtern invers mit SAT und im Urin mit VAT assoziiert (Abbildungen 3, 4). Positive signifikante Assoziationen in beiden Fettkompartimenten mit den Abbauprodukten von Kortisol wie Tetrahydrokortison (im Urin von Frauen zu VAT assoziiert; im Urin beider Geschlechter zu SAT assoziiert) sowie verwandter, unbekannter Verbindungen, vor allem im Urin (Abbildung A4), ließen sich vermehrt für Frauen aufzeigen. Eine derartige geschlechterspezifische Auftrennung der mit Kortisol assoziierten Metabolite könnte bedeuten, dass die Akkumulation von VAT bei Frauen einen veränderten Kortisol-Stoffwechsel und demzufolge eine veränderte Ausscheidung von Stoffwechselprodukten anzeigt.

Eine erhöhte Kortisol-Clearance trotz unveränderter Plasmalevel wurde bereits für übergewichtige Proband:innen beschrieben [126]–[128]. Man vermutet, dass eine Hyperaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Achse, die eine sekundär funktionale Kortisol-Resistenz bei Frauen bewirkt, hierbei eine ursächliche Rolle spielen könnte [126]–[128].

Ein Schlüsselenzym in der Konversion von Kortison zu Kortisol ist die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 β -HSD). Allerdings ist aktuell nicht bekannt, wie stark 11 β -HSD von den unterschiedlichen Fettkompartimenten exprimiert wird.

Eine frühere Arbeit beobachtete eine erhöhte Expression von 11 β -HSD im VAT, die mit einem anhaltend hohen Glukokortikoid-Spiegel in diesem verbunden war [129]. Damit würde die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, die normalerweise an der Regulation des Kortikoid-Kreislaufs beteiligt ist, umgangen. Die Autor:innen sprechen von einer „*Cushing`s disease of the omentum*“, im Rahmen derer über die lokale Produktion von Kortisol durch inaktives Kortison ein gewebeabhängiger Hyperkortisolismus entstünde [129]. Eine neuere Studie [130] liefert jedoch Hinweise darauf, dass die Kortisol-Sekretion von SAT bei Menschen durch eine höhere Aktivität von 11 β -HSD höher liegt als jene von VAT.

Der Ort der Sekretion scheint von besonderer Wichtigkeit zu sein, da von VAT sekretiertes Kortisol im Verdacht steht, zu einer hepatischen Insulinresistenz und Dyslipidämie beizutragen. Von SAT sekretiertes Kortisol soll durch die Hypothalamus-Hypophysen-Achse dem entgegenwirken, indem die im Körper zirkulierende Kortisol-Konzentration stabil gehalten wird [130]. Darüber hinaus scheint die Aktivität der 11 β -HSD auch vom Körpergewicht abhängig zu sein [131].

Wichtig zu bemerken ist, dass die beobachtete inverse Assoziation zwischen den Fettkompartimenten und dem Kortisol-Spiegel im Plasma den oben zitierten Veröffentlichungen widerspricht. Dies könnte durch die Exklusion von Proband:innen mit offensichtlichen metabolischen Komplikationen wie dem Metabolischen Syndrom oder Diabetes mellitus Typ 2 bedingt sein.

4.11. Urat und Fettmasse

In der vorliegenden Arbeit waren bei beiden Geschlechtern die Plasma-Spiegel des Purin-Nukleotids Urat positiv mit VAT und SAT assoziiert. Erhöhte Urat-Spiegel wurden in der Vergangenheit bereits mit viszeralem Übergewicht [38], [132] sowie kardiovaskulären Erkrankungen [133] und Diabetes mellitus Typ 2 [134] in Verbindung gebracht. Es wird vermutet, dass die Komponenten des metabolischen Syndroms einen Einfluss auf die Ausscheidung von Urat haben. Der Urat-Transporter GLUT9 im renalen Tubulus wird durch Hyperinsulinämie und erhöhte Glukosespiegel beeinflusst, sodass weniger Urat und Natrium ausgeschieden wird [135]. Die Konzentration von Urat im Blut könnte folglich vor allem durch die renale Clearance bestimmt werden [135].

Takahashi et al. [136] zeigten zudem, dass die Clearance von Urat vor allem mit VAT und einem veränderten Metabolismus assoziiert ist. Passend zu diesen Befunden, konnte in der vorliegenden Untersuchung eine inverse Assoziation zwischen Urat im Urin und VAT beobachtet werden. Erhöhte Spiegel von Purinen und demzufolge Urat sind mit einem höheren Risiko für eine Gichterkrankung assoziiert [137]. Die zusätzliche Assoziation von Urat zu VAT könnte ein weiterer Mechanismus sein, der den ungünstigen Zusammenhang zwischen Urat und der Erkrankung betont [136].

4.12. VAT – ein wichtiges endokrines Organ

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit betonen die herausragende Rolle von VAT in Bezug auf das Plasma-Metabolom. VAT ist keine passive Fettmasse, sondern wurde bereits mehrfach als metabolisch hochaktives Organ mit endokrinen Funktionen beschrieben [136],[137].

Die vom Fettgewebe synthetisierten Adipozytokine haben nicht nur einen Einfluss auf den Stoffwechsel, sondern tragen auch zu einer veränderten Regulation des Immunsystems bei. Infolgedessen wird eine chronische Entzündungsreaktion beobachtet, die wiederum wahrscheinlich mit einem erhöhten Risiko für Krebserkrankungen einhergeht [140].

Ein weiterer Grund für den größeren Einfluss von aus VAT hervorgehenden Hormonen ist, dass diese Hormone direkt in das Portalsystem sekretiert werden und daher Zugang zur Leber haben, wohingegen Hormone vom SAT in die systemische Zirkulation gelangen [141].

Zusammenfassend wird deutlich, dass VAT alleine bereits eine große Relevanz für die Ausbildung von (chronischen) metabolischen Erkrankungen hat.

4.13. Stärken und Limitationen der Arbeit

Eine klare Stärke der vorliegenden Studie ist die präzise Quantifizierung von SAT und VAT durch den Gebrauch eines Ganzkörper-MRTs in Kombination mit einer umfangreichen ungerichteten LC-MS/MS-basierten Analyse des Metaboloms in einer repräsentativen, breit angelegten, populationsbasierten Studie. Dadurch kann eine große Diversität von kleinsten Molekülen unterschiedlicher Herkunft abgedeckt werden.

Da die Studie als Querschnitt designt wurde, sind die Ursachen der identifizierten Assoziationen zwischen VAT bzw. SAT und den Metaboliten nur eingeschränkt zu beurteilen. Aussagen zu den zugrundeliegenden Stoffwechselprozessen lassen sich an dieser Stelle nicht treffen.

Weiterhin variieren die Ernährungsgewohnheiten der Proband:innen, die jedoch mangels fehlender Daten nicht adäquat abgebildet werden können. Dies beeinflusst vermutlich das untersuchte Metabolom. Die untersuchte Studienpopulation umfasste mehr Frauen (n = 299; 60,90 %) als Männer (n = 192). Es gibt Hinweise darauf, dass Frauen im Vergleich zu Männern einen gesünderen Lebensstil pflegen [142] und dies damit einen Einfluss auf die untersuchten Zusammenhänge hat.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie stellen aufgrund der oben genannten Limitationen Hypothesen dar und sollten in unabhängigen, populationsbasierten Studien sowie Längsschnittstudien weiter erforscht und experimentell untersucht werden. Erst im Anschluss können allgemeingültige Aussagen getroffen und Zusammenhänge sicher dargestellt werden.

4.14. Schlussfolgerung und Translation in den klinischen Kontext

Die vorliegende Arbeit liefert neue Einsichten in die Interaktion des Körperfettgewebes mit dem menschlichen Metabolom und stellt den metabolischen Status von Menschen in Frage, die mit üblichen Laborparametern als „gesund“ klassifiziert werden.

Eine höhere Gesamtmasse von VAT bei Männern und Frauen waren mit verschiedenen molekularen Signaturen assoziiert, die in der Vergangenheit bereits für die Entstehung von metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen verantwortlich gemacht wurden. Dabei waren insbesondere Assoziationen zu Metaboliten auffällig, die Hinweise auf erhöhten oxidativen Stress geben und einen veränderten Aminosäure-Stoffwechsel mit Fokus auf die verzweigtkettigen Aminosäuren anzeigen. Diese Metabolite oder Stoffwechselwege können nun als Zwischenprodukte getestet werden.

Geschlechtsspezifische Assoziationen zwischen den untersuchten Metaboliten und SAT bzw. VAT ließen sich nur in geringem Umfang detektieren und umfangreichere Studien sind nötig, um tiefergehende Geschlechtsunterschiede zu beweisen und unsere Ergebnisse zu bestätigen. Durch die Quantifizierung des Metaboloms ist es möglich, frühzeitig einen Einblick in den metabolischen Status des Menschen zu erhalten und die Entstehung von Adipositas auf molekularer Ebene zu verstehen. Es ist aktuell noch unklar, ob sich das Metabolom positiv durch äußere Umstände (z.B. Ernährung, Bewegung, Medikamente) beeinflussen lässt. Longitudinale Untersuchungen, die Veränderungen des Metaboloms und der Fettkompartimente untersuchen, sollten bei Proband:innen durchgeführt werden, die bereits im Metabolom Auffälligkeiten zeigen, welche für eine Entwicklung von Adipositas typisch sind. Somit könnten Mechanismen identifiziert werden, die bei der frühzeitigen Bekämpfung von Adipositas und deren Folgen von Nutzen sein dürften.

5. Zusammenfassung

Übergewicht ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen. Vor allem eine vermehrte Akkumulation von viszeralem Fettgewebe (VAT) im Vergleich zu subkutanem Fettgewebe (SAT) wird als Hauptursache für Adipositas-assoziierte Erkrankungen vermutet. In der vorliegenden Arbeit wurden ungerichtete metabolische Analysen (Metabolomics) verwendet, um metabolische Stoffwechselwege und kleinste Moleküle zu identifizieren, die mit einer Akkumulation von VAT oder SAT assoziiert sind.

Die Studienpopulation bestand aus 491 Proband:innen ohne metabolische Erkrankungen (192 Männer, 299 Frauen), die im Rahmen einer großen populationsbasierten Studie aus dem Nordosten Deutschlands intensiv untersucht wurden. Mit Hilfe linearer Regressionsmodelle wurden die Assoziationen zwischen der mittels MRT quantifizierten Menge der Fettkompartimente VAT und SAT und dem Metabolom im Plasma und Urin untersucht. Die Metabolite wurden dabei durch massenspektrometrische Verfahren quantifiziert. Insgesamt zeigte sich, dass VAT mehr Assoziationen zum Metabolom des Plasmas (54 Metabolite) und Urins (101 Metabolite) aufwies als SAT (20 Plasmametabolite; 29 Urinmetabolite). Letzteres metabolische Profil wurde fast vollständig von den zu VAT assoziierten Signaturen überlagert. Geschlechtsspezifische Unterschiede ließen sich nur bei einem geringen Anteil der untersuchten Assoziationen identifizieren. Signifikante Assoziationen ließen sich vor allem mit Fettsäure-Abkömmlingen und Zwischenprodukten aus dem Metabolismus von verzweigtkettigen Aminosäuren beobachten. Außerdem waren Metabolite signifikant assoziiert, die einen veränderten Kohlenhydrat- und Kortisol-Metabolismus anzeigen. Darüber hinaus ließen sich Assoziationen mit Markern aus dem Darm-Mikrobiom abbilden, die vermutlich einen ungünstigen Lebensstil widerspiegeln. Zudem konnte eine neuartige positive Assoziation zwischen VAT und den im Plasma gemessenen Gehalt des pharmakologischen Wirkstoffes Piperin nachgewiesen werden. Alles in allem lassen sich Hinweise bezüglich der Entwicklung von Adipositas-bezogenen Krankheiten liefern. Die vorliegende Studie stellt somit die Gesundheit des Metaboloms bei „gesunden“ Personen in Frage und bietet die Möglichkeit, die Entstehung von Adipositas auf molekularer Ebene zu verstehen. Es sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig, um diejenigen Menschen zu identifizieren, deren Metabolom Auffälligkeiten zeigten und so bereits frühzeitig der Entstehung von Krankheiten entgegenwirken zu können.

6. Literaturverzeichnis

- [1] B. Swinburn, G. Sacks, K. D. Hall, K. McPherson, D. T. Finegood, M. L. Moodie, und S. L. Gortmaker, „The global obesity pandemic: Shaped by global drivers and local environments“, *Lancet*, Bd. 378, Nr. 9793, S. 804–814, 2011.
- [2] S. M. Wright und L. J. Aronne, „Causes of obesity“, *Abdom. Imaging*, Bd. 37, Nr. 5, S. 730–732, 2012.
- [3] WHO, „BMI.“ [Online]. Verfügbar unter: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>. [Zugegriffen: 21-Jan-2022].
- [4] WHO, „Obesity and overweight“, 2021. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. [Zugegriffen: 21-Jan-2022].
- [5] M. Ng, T. Fleming, M. Robinson, B. Thomson, N. Graetz, C. Margono, E. Mullany, S. Biryukov, C. Abbafati, S. Abera, J. Abraham, N. Abu-Rmeileh, T. Achoki, F. AlBuhairan, Z. Alemu, R. Alfonso, M. Ali, R. Ali, N. Guzman, W. Ammar, P. Anwari, A. Banerjee, S. Barquera, S. Basu, D. Bennett, Z. Bhutta, J. Blore, N. Cabral, I. C. Nonato, J. Chang, R. Chowdhury, K. Courville, M. Criqui, D. Cundiff, K. Dabhadkar, L. Dandona, A. Davis, A. Dayama, S. Dharmaratne, E. Ding, A. Durrani, A. Esteghamati, F. Farzadfar, D. Fay, V. Feigin, A. Flaxman, M. Forouzanfar, A. Goto, A. Green, R. Gupta, N. Hafezi-Nejad, G. Hankey, H. Harewood, R. Havmoeller, S. Hay, L. Hernandez, A. Husseini, B. Idrisov, N. Ikeda, F. Islami, E. Jahangir, S. Jassal, S. H. Jee, M. Jeffreys, J. Jonas, E. Kabagambe, S. Khalifa, A. Kengne, Y. Khader, Y. Khang, D. Kim, R. Kimokoti, J. Kinge, Y. Kokubo, S. Kosen, G. Kwan, T. Lai, M. Leinsalu, Y. Li, X. Liang, S. Liu, G. Logroscino, P. Lotufo, Y. Lu, J. Ma, N. Mainoo, G. Mensah, T. Merriman, A. Mokdad, J. Moschandreas, M. Naghavi, A. Naheed, D. Nand, K. Narayan, E. Nelson, M. Neuhouser, M. Nisar, T. Ohkubo, S. Oti, A. Pedroza, D. Prabhakaran, N. Roy, U. Sampson, H. Seo, S. Sepanlou, K. Shibuya, R. Shiri, I. Shiue, G. Singh, J. Singh, V. Skirbekk, N. Stapelberg, L. Sturua, B. Sykes, M. Tobias, B. Tran, L. Trasande, H. Toyoshima, S. van de Vijver, T. Vasankari, J. Veerman, G. Velasquez-Melendez, V. Vlassov, S. Vollset, T. Vos, C. Wang, S. Wang, E. Weiderpass, A. Werdecker, J. Wright, Y. Yang, H. Yatsuya, J. Yoon, S. Yoon, Y. Zhao, M. Zhou, S. Zhu, A. Lopez, C. Murray, und E. Gakidou, „Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis“, *Lancet*, Bd. 384, Nr. 9945, S. 766–781, 2014.
- [6] L. Jaacks, S. Vandevijvere, A. Pan, C. McGowan, C. Wallace, F. Imamura, D. Mozaffarian, B. Swinburn, und M. Ezzati, „The obesity transition: stages of the global epidemic“, *Yearb. Paediatr. Endocrinol.*, Bd. 7, Nr. 3, S. 231–240, 2019.

- [7] S. R. Daniels, D. K. Arnett, R. H. Eckel, S. S. Gidding, L. L. Hayman, S. Kumanyika, T. N. Robinson, B. J. Scott, S. S. Jeor, und C. L. Williams, „Overweight in children and adolescents: Pathophysiology, consequences, prevention, and treatment“, *Circulation*, Bd. 111, Nr. 15, S. 1999–2012, 2005.
- [8] S. O’Neill und L. O’Driscoll, „Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies“, *Obes. Rev.*, Bd. 16, Nr. 1, S. 1–12, 2015.
- [9] G. Solomon und E. Manson, „Obesity and mortality : a review of the epidemiologic data“, *Am. J. Clin. Nutr.*, Bd. 66, S. 1044S–50S, 1997.
- [10] A. Afshin, M. Forouzanfar, M. Reitsma, P. Sur, K. Estep, A. Lee, L. Marczak, A. Mokdad, M. Moradi-Lakeh, M. Naghavi, J. Salama, T. Vos, K. Abate, C. Abbafati, M. Ahmed, Z. Al-Aly, A. Alkerwi, R. Al-Raddadi, A. Amare, A. Amberbir, A. Amegah, E. Amini, S. Amrock, R. Anjana, J. Ärnlöv, H. Asayesh, A. Banerjee, A. Barac, E. Baye, D. Bennett, A. Beyene, S. Biadgilign, S. Biryukov, E. Bjertness, D. Boneya, I. Campos-Nonato, J. Carrero, P. Cecilio, K. Cercy, L. Ciobanu, L. Cornaby, S. Damtew, L. Dandona, R. Dandona, S. Dharmaratne, B. Duncan, B. Eshrati, A. Esteghamati, V. Feigin, J. Fernandes, T. Fürst, T. Gebrehiwot, A. Gold, P. Gona, A. Goto, T. Habtewold, K. Hadush, N. Hafezi-Nejad, S. Hay, M. Horino, F. Islami, R. Kamal, A. Kasaeian, S. Katikireddi, A. Kengne, C. Kesavachandran, Y. Khader, Y. Khang, J. Khubchandani, D. Kim, Y. Kim, Y. Kinfu, S. Kosen, T. Ku, B. K. Defo, G. Kumar, H. Larson, M. Leinsalu, X. Liang, S. Lim, P. Liu, A. Lopez, R. Lozano, A. Majeed, R. Malekzadeh, D. Malta, M. Mazidi, C. McAlinden, S. McGarvey, D. Mengistu, G. Mensah, G. Mensink, H. Mezgebe, E. Mirrakhimov, U. Mueller, J. Noubiap, C. Obermeyer, F. Ogbo, M. Owolabi, G. Patton, F. Pourmalek, M. Qorbani, A. Rafay, R. Rai, C. Ranabhat, N. Reinig, S. Safiri, J. Salomon, J. Sanabria, I. Santos, B. Sartorius, M. Sawhney, J. Schmidhuber, A. Schutte, M. Schmidt, S. Sepanlou, M. Shamsizadeh, S. Sheikbahaei, M. Shin, R. Shiri, I. Shiue, H. Roba, D. Silva, J. Silverberg, J. Singh, S. Stranges, S. Swaminathan, R. Tabarés-Seisdedos, F. Tadese, B. Tedla, B. Tegegne, A. Terkawi, J. Thakur, M. Tonelli, R. Topor-Madry, S. Tyrovolas, K. Ukwaja, O. Uthman, M. Vaezghasemi, T. Vasankari, V. Vlassov, S. Vollset, E. Weiderpass, A. Werdecker, J. Wesana, R. Westerman, Y. Yano, N. Yonemoto, G. Yonga, Z. Zaidi, Z. Zenebe, B. Zipkin, und C. Murray, „Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 377, Nr. 1, S. 13–27, 2017.
- [11] A. Dee, K. Kearns, C. O’Neill, L. Sharp, A. Staines, V. O’Dwyer, S. Fitzgerald, und I. J. Perry, „The direct and indirect costs of both overweight and obesity: A systematic review“, *BMC Res. Notes*, Bd. 7, Nr. 242, S. 1–9, 2014.
- [12] J. Sanchez-Gurmaches und D. a. Guertin, „Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat“, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, Bd. 1842, Nr. 3, S. 340–351, 2014.

- [13] T. Yoneshiro, Q. Wang, K. Tajima, M. Matsushita, H. Maki, K. Igarashi, Z. Dai, P. J. White, R. W. McGarrah, O. R. Ilkayeva, Y. Deleye, Y. Oguri, M. Kuroda, K. Ikeda, H. Li, A. Ueno, M. Ohishi, T. Ishikawa, K. Kim, Y. Chen, C. H. Sponton, R. N. Pradhan, H. Majd, V. J. Greiner, M. Yoneshiro, Z. Brown, M. Chondronikola, H. Takahashi, T. Goto, T. Kawada, L. Sidossis, F. C. Szoka, M. T. McManus, M. Saito, T. Soga, und S. Kajimura, „BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44“, *Nature*, Bd. 572, Nr. 7771, S. 614–619, 2019.
- [14] A. Fenzl und F. W. Kiefer, „Brown adipose tissue and thermogenesis“, *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.*, Bd. 19, Nr. 1, S. 25–37, 2014.
- [15] K. Virtanen, M. Lidell, J. Orava, M. Heglind, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N. Savisto, S. Enerbäck, und P. Nuutila, „Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 360, S. 1518–25., 2009.
- [16] L. Van Schaik, C. Kettle, R. Green, H. R. Irving, und J. a. Rathner, „Effects of Caffeine on Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Metabolic Homeostasis: A Review“, *Front. Neurosci.*, Bd. 15, Nr. 621356, S. 1–15, 2021.
- [17] M. Blüher und C. S. Mantzoros, „From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century“, *Metabolism*, Bd. 64, Nr. 1, S. 131–145, 2015.
- [18] J. Kučera, Z. Spáčil, D. Friedecký, J. Novák, M. Pekař, und J. Bienertová-Vašků, „Human White Adipose Tissue Metabolome: Current Perspective“, *Obesity*, Bd. 26, Nr. 12, S. 1870–1878, 2018.
- [19] B. Bjørndal, L. Burri, V. Staalesen, J. Skorve, und R. K. Berge, „Different adipose depots: Their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents“, *J. Obes.*, S. 1–15, 2011.
- [20] M. M. Ibrahim, „Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences“, *Obes. Rev.*, Bd. 11, Nr. 1, S. 11–18, 2010.
- [21] S. M. Grundy, H. B. Brewer, J. I. Cleeman, S. C. Smith, und C. Lenfant, „Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition.“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Bd. 24, Nr. 2, S. e13–e18, 2004.
- [22] B. Wajchenberg, „Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome“, *Endocr. Rev.*, Bd. 21, Nr. 6, S. 697–738, 2013.
- [23] J. P. Després, „Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: An update“, *Circulation*, Bd. 126, Nr. 10, S. 1301–1313, 2012.

- [24] Y. Zhang, J. L. Zitsman, J. Hou, I. Fennoy, K. Guo, J. Feinberg, und R. L. Leibel, „Fat cell size and adipokine expression in relation to gender, depot and metabolic risk factors in morbidly obese adolescents“, *Obes. (Silver Spring)*, Bd. 22, Nr. 3, S. 691–697, 2014.
- [25] A. Koster, R. A. Murphy, G. Eiriksdottir, T. Aspelund, S. Sigurdsson, T. F. Lang, V. Gudnason, L. J. Launer, und T. Harris, „Fat Distribution and Mortality : The AGES-Reykjavik Study“, *Obes. (Silver Spring)*, Bd. 23, Nr. 4, S. 893–897, 2015.
- [26] J. Kuk, P. Katzmarzyk, M. Nichaman, T. Church, S. Blair, und R. Ross, „Visceral Fat Is an Independent Predictor of All-cause Mortality in Men.“, *Obes. (Silver Spring)*, Bd. 14, Nr. 2, S. 336–341., 2006.
- [27] B. F. Palmer und D. J. Clegg, „The sexual dimorphism of obesity“, *Mol. Cell. Endocrinol.*, Bd. 402, S. 113–119, 2015.
- [28] R. Bujak, W. Struck-Lewicka, M. J. Markuszewski, und R. Kaliszan, „Metabolomics for laboratory diagnostics“, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Bd. 113, S. 108–120, 2015.
- [29] H. Knacke, M. Pietzner, K. T. Do, W. Römisch-Margl, G. Kastenmüller, U. Völker, H. Völzke, J. Krumsiek, A. Artati, H. Wallaschofski, M. Nauck, K. Suhre, J. Adamski, und N. Friedrich, „Metabolic fingerprints of circulating IGF-1 and the IGF-1/IGFBP-3 Ratio: A multfluid metabolomics study“, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Bd. 101, Nr. 12, S. 4730–4742, 2016.
- [30] J. Krumsiek, K. Suhre, A. M. Evans, M. W. Mitchell, R. P. Mohny, M. V. Milburn, B. Wägele, W. Römisch-Margl, T. Illig, J. Adamski, C. Gieger, F. J. Theis, und G. Kastenmüller, „Mining the Unknown: A Systems Approach to Metabolite Identification Combining Genetic and Metabolic Information“, *PLoS Genet.*, Bd. 8, Nr. 10, S. e1003005, 2012.
- [31] J. C. Lindon und J. K. Nicholson, „Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery“, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, Bd. 27, Nr. 3, S. 194–204, 2008.
- [32] A. H. Emwas, R. Roy, R. T. McKay, L. Tenori, E. Saccenti, G. a. Nagana Gowda, D. Raftery, F. Alahmari, L. Jaremko, M. Jaremko, und D. S. Wishart, „Nmr spectroscopy for metabolomics research“, *Metabolites*, Bd. 9(7), Nr. 123, S. 1–39, 2019.
- [33] A. Floegel, N. Stefan, Z. Yu, K. Mühlenbruch, D. Drogan, H. G. Joost, A. Fritsche, H. U. Häring, M. H. De Angelis, A. Peters, M. Roden, C. Prehn, R. Wang-Sattler, T. Illig, M. B. Schulze, J. Adamski, H. Boeing, und T. Pischon, „Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach“, *Diabetes*, Bd. 62, Nr. 2, S. 639–648, 2013.

- [34] M. Bictash, T. M. Ebbels, Q. Chan, R. L. Loo, I. K. S. Yap, I. J. Brown, M. De Iorio, M. L. Daviglius, E. Holmes, J. Stamler, J. K. Nicholson, und P. Elliott, „Opening up the ‚black box‘: Metabolic phenotyping and metabolome-wide association studies in epidemiology“, *J. Clin. Epidemiol.*, Bd. 63, Nr. 9, S. 970–979, 2010.
- [35] E. S. Tai, M. L. S. Tan, R. D. Stevens, Y. L. Low, M. J. Muehlbauer, D. L. M. Goh, O. R. Ilkayeva, B. R. Wenner, J. R. Bain, J. J. M. Lee, S. C. Lim, C. M. Khoo, S. H. Shah, und C. B. Newgard, „Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men“, *Diabetologia*, Bd. 53, Nr. 4, S. 757–767, 2010.
- [36] C. Morris, C. O’Grada, M. Ryan, H. M. Roche, M. J. Gibney, E. R. Gibney, und L. Brennan, „The relationship between BMI and metabolomic profiles: a focus on amino acids“, *Proc. Nutr. Soc.*, Bd. 71, Nr. 04, S. 634–638, 2012.
- [37] M. Bakar, M. R. Sarmidi, K. Cheng, A. A. Khan, C. L. Suan, H. Z. Huri, und H. Yaakob, „Metabolomics – the complementary field in systems biology: a review on obesity and type 2 diabetes“, *Mol. Biosyst.*, Bd. 11, S. 1742–1774, 2015.
- [38] E. T. Cirulli, L. Guo, C. Swisher, N. Shah, L. Huang, L. A. Napier, E. F. Kirkness, T. D. Spector, C. T. Caskey, B. Thorens, J. C. Venter, und A. Telenti, „Profound Perturbation of the Metabolome in Obesity Is Associated with Health Risk“, *Cell Metab.*, Bd. 29, Nr. 2, S. 488–500, 2019.
- [39] R. Caleyachetty, G. N. Thomas, K. A. Toulis, N. Mohammed, K. M. Gokhale, K. Balachandran, und K. Nirantharakumar, „Metabolically Healthy Obese and Incident Cardiovascular Disease Events Among 3.5 Million Men and Women“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 70, Nr. 12, S. 1429–1437, 2017.
- [40] S. H. Baek, M. Kim, M. Kim, M. Kang, H. J. Yoo, N. H. Lee, Y. H. Kim, M. Song, und J. H. Lee, „Metabolites distinguishing visceral fat obesity and atherogenic traits in individuals with overweight“, *Obesity*, Bd. 25, Nr. 2, S. 323–331, 2017.
- [41] M. M. Boulet, G. Chevrier, T. Grenier-Larouche, M. Pelletier, M. Nadeau, J. Scarpa, C. Prehn, A. Marette, J. Adamski, und A. Tchernof, „Alterations of plasma metabolite profiles related to adipose tissue distribution and cardiometabolic risk“, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, Bd. 309, Nr. 8, S. E736–E746, 2015.
- [42] I. Maltais-Payette, M. M. Boulet, C. Prehn, J. Adamski, und A. Tchernof, „Circulating glutamate concentration as a biomarker of visceral obesity and associated metabolic alterations“, *Nutr. Metab.*, Bd. 15:78, S. 1–7, 2018.
- [43] C. Menni, M. Migaud, C. A. Glastonbury, M. Beaumont, A. Nikolaou, K. S. Small, M. J. Broxnan, R. P. Mohny, T. D. Spector, und A. M. Valdes, „Metabolomic profiling to dissect the role of visceral fat in cardiometabolic health“, *Obesity*, Bd. 24, Nr. 6, S. 1380–1388, 2016.

- [44] T. Pallister, M. A. Jackson, T. C. Martin, C. A. Glastonbury, A. Jennings, M. Beaumont, R. P. Mohny, K. S. Small, A. MacGregor, C. J. Steves, A. Cassidy, T. D. Spector, C. Menni, und A. M. Valdes, „Untangling the relationship between diet and visceral fat mass through blood metabolomics and gut microbiome profiling“, *Int. J. Obes.*, Bd. 41, Nr. 7, S. 1106–1113, 2017.
- [45] A. Rietman, T. L. Stanley, C. Clish, V. Mootha, M. Mensink, S. K. Grinspoon, und H. Makimura, „Associations between plasma branched-chain amino acids, β -aminoisobutyric acid and body composition“, *J. Nutr. Sci.*, Bd. 5, Nr. e6, S. 1–8, 2016.
- [46] M. Scherer, I. Montoliu, S. D. Qanadli, S. Collino, S. Rezzi, M. Kussmann, V. Giusti, und F. P. J. Martin, „Blood plasma lipidomic signature of epicardial fat in healthy obese women“, *Obesity*, Bd. 23, Nr. 1, S. 130–137, 2015.
- [47] C. Takashina, I. Tsujino, T. Watanabe, S. Sakaue, D. Ikeda, A. Yamada, T. Sato, H. Ohira, Y. Otsuka, N. Oyama-Manabe, Y. M. Ito, und M. Nishimura, „Associations among the plasma amino acid profile, obesity, and glucose metabolism in Japanese adults with normal glucose tolerance“, *Nutr. Metab.*, Bd. 13:5, S. 1–10, 2016.
- [48] M. Yamakado, T. Tanaka, K. Nagao, Y. Ishizaka, T. Mitushima, M. Tani, A. Toda, E. Toda, M. Okada, H. Miyano, und H. Yamamoto, „Plasma amino acid profile is associated with visceral fat accumulation in obese Japanese subjects“, *Clin. Obes.*, Bd. 2, Nr. 1–2, S. 29–40, 2012.
- [49] H. Völzke, D. Alte, C. O. Schmidt, D. Radke, R. Lorbeer, N. Friedrich, N. Aumann, K. Lau, M. Piontek, G. Born, C. Havemann, T. Ittermann, S. Schipf, R. Haring, S. E. Baumeister, H. Wallaschofski, M. Nauck, S. Frick, A. Arnold, M. Jünger, J. Mayerle, M. Kraft, M. M. Lerch, M. Dörr, T. Reffelmann, K. Empen, S. B. Felix, A. Obst, B. Koch, S. Gläser, R. Ewert, I. Fietze, T. Penzel, M. Dören, W. Rathmann, J. Haerting, M. Hannemann, J. Röpcke, U. Schminke, C. Jürgens, F. Tost, R. Rettig, J. a. Kors, S. Ungerer, K. Hegenscheid, J. P. Kühn, J. Kühn, N. Hosten, R. Puls, J. Henke, O. Gloger, A. Teumer, G. Homuth, U. Völker, C. Schwahn, B. Holtfreter, I. Polzer, T. Kohlmann, H. J. Grabe, D. Roskopf, H. K. Kroemer, T. Kocher, R. Biffar, U. John, und W. Hoffmann, „Cohort profile: The study of health in Pomerania“, *Int. J. Epidemiol.*, Bd. 40, Nr. 2, S. 294–307, 2011.
- [50] U. John, B. Greiner, E. Hensel, J. Lüdemann, M. Piek, S. Sauer, C. Adam, G. Born, D. Alte, E. Greiser, U. Haertel, H.-W. Hense, J. Haerting, S. Willich, und C. Kessler, „Study of Health in Pomerania(SHIP): a health examination survey in an east German region: Objectives and design“, *Soz. Präventivmed.*, Bd. 46, Nr. 3, S. 186–194, 2001.
- [51] A. Levey, T. Greene, J. Kusek, und G. Beck, „A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine“, *J. Am. Soc. Nephrol.*, Bd. 11, S. 155A, 2000.

- [52] S. Grundy, D. Becker, L. Clark, R. Cooper, M. Denke, W. Howard, D. Hunninghake, D. Illingworth, R. Luepker, P. McBride, J. McKenney, R. Pasternak, N. Stone, L. Van Horn, H. Brewer, J. Cleeman, N. Ernst, D. Gordon, D. Levy, B. Rifkind, J. Rossouw, P. Savag, und A. Jehle, „Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report“, *Circulation*, Bd. 106, Nr. 25, S. 3143–421, 2002.
- [53] K. G. M. M. Alberti, P. Zimmet, und J. Shaw, „Metabolic syndrome - A new world-wide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation“, *Diabet. Med.*, Bd. 23, Nr. 5, S. 469–480, 2006.
- [54] L. Otto, K. Budde, G. Kastenmüller, A. Kaul, U. Völker, H. Völzke, J. Adamski, J. P. Kühn, J. Krumsiek, A. Artati, M. Nauck, N. Friedrich, und M. Pietzner, „Associations between adipose tissue volume and small molecules in plasma and urine among asymptomatic subjects from the general population“, *Sci. Rep.*, Bd. 10, Nr. 1, S. 1–11, 2020.
- [55] H. P. Müller, F. Raudies, A. Unrath, H. Neumann, A. C. Ludolph, und J. Kassubek, „Quantification of human body fat tissue percentage by MRI“, *NMR Biomed.*, Bd. 24, Nr. 1, S. 17–24, 2011.
- [56] R. M. Berg, H. Wallaschofski, M. Nauck, R. Rettig, M. R. P. Markus, R. Laqua, N. Friedrich, und a. Hannemann, „Positive Association Between Adipose Tissue and Bone Stiffness“, *Calcif. Tissue Int.*, Bd. 97, Nr. 1, S. 40–49, 2015.
- [57] A. M. Evans, C. D. DeHaven, T. Barrett, M. Mitchell, und E. Milgram, „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“, *Anal. Chem.*, Bd. 81, Nr. 16, S. 6656–6667, 2009.
- [58] U. Piontek, H. Wallaschofski, G. Kastenmüller, K. Suhre, H. Völzke, K. Trinh Do, A. Artati, M. Nauck, J. Adamski, N. Friedrich, und M. Pietzner, „Sex-specific metabolic profiles of androgens and its main binding protein SHBG in a middle aged population without diabetes“, *Sci. Rep.*, Bd. 7, Nr. 1, S. 1–11, 2017.
- [59] Y. Benjamini und Y. Hochberg, „Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing“, *R. Stat. Soc.*, Bd. 57, Nr. 1, S. 289–300, 1995.
- [60] K. Do, G. Kastenmüller, D. Mook-Kanamori, N. Yousri, F. Theis, K. Suhre, und J. Krumsiek, „Network-based approach for analyzing intra- and interfluid metabolite associations in human blood, urine, and saliva“, *J. Proteome Res.*, Bd. 14, Nr. 2, S. 1183–1194, 2015.
- [61] J. Krumsiek, K. Suhre, T. Illig, J. Adamski, und F. J. Theis, „Gaussian graphical modeling reconstructs pathway reactions from high-throughput metabolomics data“, *BMC Syst. Biol.*, Bd. 5:21, S. 1–16, 2011.

- [62] A. Halama, M. Horsch, G. Kastenmüller, G. Möller, P. Kumar, C. Prehn, H. Laumen, H. Hauner, M. Hrabe de Angelis, J. Beckers, K. Suhre, und J. Adamski, „Metabolic switch during adipogenesis : From branched chain amino acid catabolism to lipid synthesis“, *Arch. Biochem. Biophys.*, Bd. 589, S. 93–107, 2016.
- [63] C. R. Green, M. Wallace, A. S. Divakaruni, S. A. Phillips, A. N. Murphy, T. P. Ciaraldi, und C. M. Metallo, „Branched chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis“, *Nat. Chem. Biol.*, Bd. 12, Nr. 1, S. 15–21, 2016.
- [64] C. Menni, E. Fauman, I. Erte, J. Perry, G. Kastenmüller, S. Y. Shin, A. K. Petersen, C. Hyde, M. Psatha, K. J. Ward, W. Yuan, M. Milburn, C. Palmer, T. M. Frayling, J. Trimmer, J. T. Bell, C. Gieger, R. P. Mohny, M. J. Brosnan, K. Suhre, N. Soranzo, und T. D. Spector, „Biomarkers for type 2 diabetes and impaired fasting glucose using a nontargeted metabolomics approach“, *Diabetes*, Bd. 62, Nr. 12, S. 4270–4276, 2013.
- [65] C. B. Newgard, J. An, J. R. Bain, M. J. Muehlbauer, R. D. Stevens, L. F. Lien, A. M. Haqq, S. H. Shah, M. Arlotto, C. Slentz, J. Rochon, D. Gallup, O. Ilkayeva, B. R. Wenner, W. S. Yancy, H. Eisenson, G. Musante, R. S. Surwit, D. S. Millington, M. D. Butler, und L. P. Svetkey, „A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance“, *Cell Metab.*, Bd. 9, Nr. 4, S. 311–326, 2009.
- [66] S. C. Moore, C. E. Matthews, J. N. Sampson, R. Z. Stolzenberg-Solomon, W. Zheng, Q. Cai, Y. T. Tan, W. H. Chow, B. T. Ji, D. K. Liu, Q. Xiao, S. M. Boca, M. F. Leitzmann, G. Yang, Y. B. Xiang, R. Sinha, X. O. Shu, und A. J. Cross, „Human metabolic correlates of body mass index“, *Metabolomics*, Bd. 10, Nr. 2, S. 259–269, 2014.
- [67] S. Adams, „Emerging Perspectives on Essential Amino Acid Metabolism in Obesity and the Insulin-Resistant State“, *Adv. Nutr.*, Bd. 2, Nr. 6, S. 445–456, 2011.
- [68] D. Glovaci, W. Fan, und N. D. Wong, „Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease“, *Curr. Cardiol. Rep.*, Bd. 21, Nr. 4, 2019.
- [69] C. T. Wang, M. Larson, R. Vasan, S. Cheng, E. Rhee, E. McCabe, G. Lewis, C. Fox, P. Jacques, C. Fernandez, C. O'Donnell, S. Carr, V. Mootha, J. Florez, A. Souza, O. Melander und R. G. Clish, „Metabolite profiles and the Risk of developing diabetes“, *Nat. Med.*, Bd. 17, Nr. 4, S. 448–453, 2011.
- [70] P. She, C. Van Horn, T. Reid, S. M. Hutson, R. N. Cooney, und C. J. Lynch, „Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism“, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, Bd. 293, Nr. 6, S. E1552–E1563, 2007.
- [71] C. J. Lynch und S. H. Adams, „Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance“, *Nat. Rev. Endocrinol.*, Bd. 10, Nr. 12, S. 723–736, 2014.

- [72] L. A. Lotta, R. A. Scott, S. J. Sharp, S. Burgess, J. Luan, T. Tillin, A. F. Schmidt, F. Imamura, I. D. Stewart, J. R. B. Perry, L. Marney, A. Koulman, E. D. Karoly, N. G. Forouhi, R. J. O. Sjögren, E. Näslund, J. R. Zierath, A. Krook, D. B. Savage, J. L. Griffin, N. Chaturvedi, A. D. Hingorani, K. T. Khaw, I. Barroso, M. I. McCarthy, S. O’Rahilly, N. J. Wareham, und C. Langenberg, „Genetic Predisposition to an Impaired Metabolism of the Branched-Chain Amino Acids and Risk of Type 2 Diabetes: A Mendelian Randomisation Analysis“, *PLoS Med.*, Bd. 13, Nr. 11, 2016.
- [73] A. G. Wibmer, T. Becher, M. Eljalby, A. Crane, P. C. Andrieu, C. S. Jiang, R. Vaughan, H. Schöder, und P. Cohen, „Brown adipose tissue is associated with healthier body fat distribution and metabolic benefits independent of regional adiposity“, *Cell Reports Med.*, Bd. 2, Nr. 7, 2021.
- [74] R. R. Wolfe, „Branched-chain amino acids and muscle protein synthesis in humans: Myth or reality?“, *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, Bd. 14:30, 2017.
- [75] O. D. Rangel-Huerta, B. Pastor-Villaescusa, und A. Gil, „Are we close to defining a metabolomic signature of human obesity? A systematic review of metabolomics studies“, *Metabolomics*, Bd. 15, Nr. 6, 2019.
- [76] P. Mathieu, M.-C. Boulanger, und J.-P. Després, „Ectopic visceral fat: A clinical and molecular perspective on the cardiometabolic risk“, *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, Bd. 15, Nr. 4, S. 289–298, 2014.
- [77] L. Van Gaal, I. Mertens, und C. De Block, „Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease“, *Nature*, Bd. 444, Nr. 7121, S. 875–80, 2006.
- [78] R. J. Bridges und A. Meister, „ γ -Glutamyl Amino Acids“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 260, Nr. 12, S. 7304–7308, 1985.
- [79] A. C. Wild, H. R. Moinova, und R. T. Mulcahy, „Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2.“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 274, Nr. 47, S. 33627–33636, 1999.
- [80] T. Soga, M. Sugimoto, M. Honma, M. Mori, K. Igarashi, K. Kashikura, S. Ikeda, A. Hirayama, T. Yamamoto, H. Yoshida, M. Otsuka, S. Tsuji, Y. Yatomi, T. Sakuragawa, H. Watanabe, K. Nihei, T. Saito, S. Kawata, H. Suzuki, M. Tomita, und M. Suematsu, „Serum metabolomics reveals γ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease“, *J. Hepatol.*, Bd. 55, Nr. 4, S. 896–905, 2011.
- [81] D.-H. Lee, M. W. Steffes, und D. R. Jacobs, „Can persistent organic pollutants explain the association between serum gamma-glutamyltransferase and type 2 diabetes?“, *Diabetologia*, Bd. 51, Nr. 3, S. 402–407, 2008.
- [82] M. Dumas, J. Kinross, und J. Nicholson, „Metabolic Phenotyping and Systems Biology Approaches to Understanding Metabolic Syndrome and Fatty Liver Disease“, *Gastroenterology*, Bd. 146, Nr. 1, S. 46–62, 2014.

- [83] C. D. Byrne, „Ectopic fat, insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease“, *Proc. Nutr. Soc.*, Bd. 72, Nr. 04, S. 412–419, 2013.
- [84] U. H. Park, H. S. Jeong, E. Y. Jo, T. Park, S. K. Yoon, E. J. Kim, J. C. Jeong, und S. J. Um, „Piperine, a component of black pepper, inhibits adipogenesis by antagonizing PPAR gamma activity in 3T3-L1 cells“, *J. Agric. Food Chem.*, Bd. 60, Nr. 15, S. 3853–3860, 2012.
- [85] Z. G. Ma, Y. P. Yuan, X. Zhang, S. C. Xu, S. S. Wang, und Q. Z. Tang, „Piperine Attenuates Pathological Cardiac Fibrosis Via PPAR- γ /AKT Pathways“, *EBioMedicine*, Bd. 18, S. 179–187, 2017.
- [86] X. Tang, J. Drotar, K. Li, C. D. Clairmont, A. S. Brumm, A. J. Sullins, H. Wu, X. S. Liu, J. Wang, N. S. Gray, M. Sur, und R. Jaenisch, „Pharmacological enhancement of KCC2 gene expression exerts therapeutic effects on human Rett syndrome neurons and Mecp2 mutant mice“, *Sci. Transl. Med.*, Bd. 11, Nr. 503, 2019.
- [87] L. Guo, Y. Yang, Y. J. Sheng, J. Wang, S. Ruan, und C. Han, „Mechanism of piperine in affecting apoptosis and proliferation of gastric cancer cells via ROS-mitochondria-associated signalling pathway“, *J. Cell. Mol. Med.*, Bd. 25, Nr. 20, S. 9513–9522, 2021.
- [88] Y. Okumura, M. Narukawa, und T. Watanabe, „Adiposity suppression effect in mice due to black pepper and its main pungent component, piperine.“, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Bd. 74, Nr. 8, S. 1545–1549, 2010.
- [89] L. Gorgani, M. Mohammadi, G. D. Najafpour, und M. Nikzad, „Piperine—The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations“, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, Bd. 16, Nr. 1, S. 124–140, 2017.
- [90] W. L. Zhang, L. Zhu, und J. G. Jiang, „Active ingredients from natural botanicals in the treatment of obesity“, *Obes. Rev.*, Bd. 15, Nr. 12, S. 957–967, 2014.
- [91] A. El-Sayed, L. Aleya, und M. Kamel, „Microbiota and epigenetics: promising therapeutic approaches?“, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, Bd. 28, Nr. 36, S. 49343–49361, 2021.
- [92] J. M. Pickard, M. Y. Zeng, R. Caruso, und G. Núñez, „Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease“, *Immunol. Rev.*, Bd. 279, Nr. 1, S. 70–89, 2017.
- [93] L. Wen und A. Duffy, „Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes“, *J. Nutr.*, Bd. 147, Nr. 7, S. 1468S–1475S, 2017.
- [94] J. Shen, M. S. Obin, und L. Zhao, „The gut microbiota , obesity and insulin resistance“, *Mol. Aspects Med.*, Bd. 34, Nr. 1, S. 39–58, 2013.

- [95] S. R. Modi, J. J. Collins, und D. a. Relman, „Antibiotics and the gut microbiota“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 124, Nr. 10, S. 4212–4218, 2014.
- [96] I. Youngster, J. Sauk, C. Pindar, R. G. Wilson, J. L. Kaplan, M. B. Smith, E. J. Alm, D. Gevers, G. H. Russell, und E. L. Hohmann, „Fecal microbiota transplant for relapsing clostridium difficile infection using a frozen inoculum from unrelated donors: A randomized, open-label, controlled pilot study“, *Clin. Infect. Dis.*, Bd. 58, Nr. 11, S. 1515–1522, 2014.
- [97] A. Zawada, A. M. Rychter, A. E. Ratajczak, A. Lisiecka-Masian, A. Dobrowolska, und I. Krela-Kaźmierczak, „Does gut-microbiome interaction protect against obesity and obesity-associated metabolic disorders?“, *Microorganisms*, Bd. 9, Nr. 18, 2021.
- [98] T. Wilmanski, N. Rappaport, J. C. Earls, A. T. Magis, O. Manor, J. Lovejoy, G. S. Omenn, L. Hood, S. M. Gibbons, und N. D. Price, „Blood metabolome predicts gut microbiome α -diversity in humans“, *Nat. Biotechnol.*, Bd. 37, Nr. 10, S. 1217–1228, 2019.
- [99] J. K. Nicholson, E. Holmes, J. Kinross, R. Burcelin, G. Gibson, W. Jia, und S. Pettersson, „Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions“, *Science.*, Bd. 336, Nr. 6086, S. 1262–1267, 2012.
- [100] G. M. Barlow, A. Yu, und R. Mathur, „Role of the gut microbiome in obesity and diabetes mellitus“, *Nutr. Clin. Pract.*, Bd. 30, Nr. 6, S. 787–797, 2015.
- [101] H. J. Lees, J. R. Swann, I. D. Wilson, J. K. Nicholson, und E. Holmes, „Hippurate: The natural history of a mammalian-microbial cometabolite“, *J. Proteome Res.*, Bd. 12, Nr. 4, S. 1527–1546, 2013.
- [102] R. Calvani, A. Miccheli, G. Capuani, A. Tomassini Miccheli, C. Puccetti, M. Delfini, A. Iaconelli, G. Nanni, und G. Mingrone, „Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype.“, *Int. J. Obes.*, Bd. 34, Nr. 6, S. 1095–1098, 2010.
- [103] R. M. Salek, M. L. Maguire, E. Bentley, D. V Rubtsov, T. Hough, M. Cheeseman, D. Nunez, B. C. Sweatman, J. N. Haselden, R. D. Cox, S. C. Connor, und J. L. Griffin, „A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human.“, *Physiol. Genomics*, Bd. 29, Nr. 2, S. 99–108, 2007.
- [104] A. M. Suchy-Dicey, T. Laha, A. Hoofnagle, R. Newitt, T. L. Sirich, T. W. Meyer, K. E. Thummel, N. D. Yanez, J. Himmelfarb, N. S. Weiss, und B. R. Kestenbaum, „Tubular secretion in CKD“, *J. Am. Soc. Nephrol.*, Bd. 27, Nr. 7, S. 2148–2155, 2016.
- [105] M. B. Rivara, L. R. Zelnick, A. N. Hoofnagle, R. Newitt, R. P. Tracy, M. Kratz, D. S. Weigle, und B. R. Kestenbaum, „Diurnal and long-term variation in plasma concentrations and renal clearances of circulating markers of kidney proximal tubular secretion“, *Clin. Chem.*, Bd. 63, Nr. 4, S. 915–923, 2017.

- [106] R. S. Holmes und E. Goldberg, „Computational analyses of mammalian lactate dehydrogenases: human, mouse, opossum and platypus LDHs“, *Comput. Biol. Chem.*, Bd. 33, Nr. 5, S. 379–385, 2009.
- [107] E. Blaschke und G. Hertting, „Enzymic methylation of L-Ascorbic acid by catechol o-methyltransferase“, *Biochem. Pharmacol.*, Bd. 20, S. 1363–1370, 1971.
- [108] P. G. Hysi, A. P. Khawaja, C. Menni, B. Tamraz, N. Wareham, K. T. Khaw, P. J. Foster, L. Z. Benet, T. D. Spector, und C. J. Hammond, „Ascorbic acid metabolites are involved in intraocular pressure control in the general population“, *Redox Biol.*, Bd. 20, S. 349–353, 2019.
- [109] R. Rodrigo, H. Prat, W. Passalacqua, J. Araya, C. Guichard, und J. P. Bächler, „Relationship between oxidative stress and essential hypertension“, *Hypertens. Res.*, Bd. 30, Nr. 12, S. 1159–1167, 2007.
- [110] A. W. Ashor, J. Lara, J. C. Mathers, und M. Siervo, „Effect of vitamin C on endothelial function in health and disease: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials“, *Atherosclerosis*, Bd. 235, Nr. 1, S. 9–20, 2014.
- [111] B. Frei, L. England, und B. N. Ames, „Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 86, Nr. 16, S. 6377–6381, 1989.
- [112] C. L. Linster und E. Van Schaftingen, „Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals“, *FEBS J.*, Bd. 274, Nr. 1, S. 1–22, 2007.
- [113] S. J. Padayatty und M. Levine, „Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks“, *Oral Dis.*, Bd. 22, Nr. 6, S. 463–493, 2016.
- [114] A. C. Need, K. R. Ahmadi, T. D. Spector, und D. B. Goldstein, „Obesity is associated with genetic variants that alter dopamine availability“, *Ann. Hum. Genet.*, Bd. 70, Nr. 3, S. 293–303, 2006.
- [115] D. L. Wallace, E. Aarts, F. d’Oleire Uquillas, L. C. Dang, S. M. Greer, W. J. Jagust, und M. D’Esposito, „Genotype status of the dopamine-related catechol-O-methyltransferase (COMT) gene corresponds with desirability of ‚unhealthy‘ foods“, *Appetite*, Bd. 92, S. 74–80, 2015.
- [116] P. Arner, „Not all fat is alike“, *Lancet*, Bd. 351, Nr. 9112, S. 1301–1302, 1998.
- [117] R. L. Dobbins, M. W. Chester, M. B. Daniels, J. D. McGarry, und D. T. Stein, „Circulating fatty acids are essential for efficient glucose-stimulated insulin secretion after prolonged fasting in humans“, *Diabetes*, Bd. 47, Nr. 10, S. 1613–1618, 1998.
- [118] P. a. Gerber und G. a. Rutter, „The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus“, *Antioxidants Redox Signal.*, Bd. 26, Nr. 10, S. 501–518, 2017.

- [119] Pubchem, „1-Methyl-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxamide.“ [Online]. Verfügbar unter: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Methyl-6-oxo-1_6-dihydropyridine-3-carboxamide. [Zugegriffen: 21-Jan-2022].
- [120] A. Rennick, R. Kalakeche, L. Seel, und B. Shepler, „Nicotinic acid and nicotinamide: A review of their use for hyperphosphatemia in dialysis patients“, *Pharmacotherapy*, Bd. 33, Nr. 6, S. 683–690, 2013.
- [121] E. M. Slominska, P. Rutkowski, R. T. Smolenski, A. Szutowicz, B. Rutkowski, und J. Swierczynski, „The age-related increase in N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (NAD catabolite) in human plasma“, *Mol. Cell. Biochem.*, Bd. 267, Nr. 1–2, S. 25–30, 2004.
- [122] J. I. Kremer, K. Gömpel, T. Bakuradze, G. Eisenbrand, und E. Richling, „Urinary Excretion of Niacin Metabolites in Humans After Coffee Consumption“, *Mol. Nutr. Food Res.*, Bd. 62, Nr. 7, 2018.
- [123] A. Lenglet, S. Liabeuf, S. Bodeau, L. Louvet, A. Mary, A. Boullier, A. S. Lemaire-Hurtel, A. Jonet, P. Sonnet, S. Kamel, und Z. A. Massy, „N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (2PY) — Major metabolite of nicotinamide: An update on an old uremic Toxin“, *Toxins.*, Bd. 8, Nr. 339, S. 1–9, 2016.
- [124] Pubchem, „3`Sialyllactose.“ [Online]. Verfügbar unter: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_-Sialyllactose. [Zugegriffen: 21-Jan-2022].
- [125] V. N. Perna, C. Dehlholm, und A. S. Meyer, „Enzymatic production of 3'-sialyllactose in milk“, *Enzyme Microb. Technol.*, Bd. 148, Nr. 109829, 2021.
- [126] P. M. Stewart, A. Boulton, S. Kumar, P. M. S. Clark, und C. H. L. Shackleton, „Cortisol Metabolism in Human Obesity : Impaired Cortisone - Cortisol Conversion in Subjects with Central Adiposity“, *J. Clin. Endocrinol.*, Bd. 84, Nr. 3, S. 1022–1027, 1999.
- [127] R. Andrew, D. Phillips, und B. Walker, „Obesity and gender influence cortisol secretion and metabolism in man“, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Bd. 83, Nr. 5, S. 1806–1809, 1998.
- [128] R. Pasquali, S. Cantobelli, F. Casimirri, M. Capelli, L. Bortoluzzi, R. Flamia, A. M. Morselli Labate, und L. Barbara, „The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Obese Women with Different Patterns of Body Fat Distribution“, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Bd. 77, Nr. 2, S. 341–346, 1993.
- [129] I. J. Bujalska, S. Kumar, und P. M. Stewart, „Does central obesity reflect “ Cushing ’ s disease of the omentum ”?“, *Lancet*, Bd. 349, Nr. 9060, S. 1210–1213, 1997.
- [130] R. H. Stimson, J. Andersson, R. Andrew, D. N. Redhead, F. Karpe, P. C. Hayes, T. Olsson, und B. R. Walker, „Cortisol release from adipose tissue by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in humans“, *Diabetes*, Bd. 58, Nr. 1, S. 46–53, 2009.

- [131] S. K. Paulsen, S. B. Pedersen, S. Fisker, und B. Richelsen, „11 β -HSD type 1 expression in human adipose tissue: Impact of gender, obesity, and fat localization“, *Obesity*, Bd. 15, Nr. 8, S. 1954–1960, 2007.
- [132] Y. Turker, D. Baltaci, Y. Turker, S. Ozturk, C. I. Sonmez, M. H. Deler, Y. C. Sariguzel, F. Sariguzel, und H. Ankarali, „Investigation of relationship of visceral body fat and inflammatory markers with metabolic syndrome and its components among apparently healthy individuals.“, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, Bd. 8, Nr. 8, S. 13067–13077, 2015.
- [133] M. R. Hayden und S. C. Tyagi, „Uric acid: A new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: The urate redox shuttle“, *Nutr. Metab.*, 2004.
- [134] E. Albrecht, M. Waldenberger, J. Krumsiek, A. M. Evans, U. Jeratsch, M. Breier, J. Adamski, W. Koenig, S. Zeilinger, C. Fuchs, N. Klopp, F. J. Theis, H.-E. Wichmann, K. Suhre, T. Illig, K. Strauch, A. Peters, C. Gieger, G. Kastenmüller, A. Doering, und C. Meisinger, „Metabolite profiling reveals new insights into the regulation of serum urate in humans“, *Metabolomics*, Bd. 10, Nr. 1, S. 141–151, 2014.
- [135] F. Perez-Ruiz, M. A. Aniel-Quiroga, A. M. Herrero-Beites, S. P. Chinchilla, G. G. Erauskin, und T. Merriman, „Renal clearance of uric acid is linked to insulin resistance and lower excretion of sodium in gout patients“, *Rheumatol. Int.*, Bd. 35, Nr. 9, S. 1519–1524, 2015.
- [136] S. Takahashi, T. Yamamoto, Z. Tsutsumi, Y. Moriwaki, J. Yamakita, und K. Higashino, „Close Correlation Between Visceral Fat Accumulation and Uric Acid Metabolism in Healthy Men“, *Metabolism*, Bd. 46, Nr. 10, S. 1162–1165, 1997.
- [137] A. Abhishek, E. Roddy, und M. Doherty, „Gout - A guide for the general and acute physicians“, *Clin. Med.*, Bd. 17, Nr. 1, S. 54–59, 2017.
- [138] C. S. Fox, J. M. Massaro, U. Hoffmann, K. M. Pou, P. Maurovich-Horvat, C. Y. Liu, R. S. Vasan, J. M. Murabito, J. B. Meigs, L. A. Cupples, R. B. D’Agostino, und C. J. O’Donnell, „Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: Association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study“, *Circulation*, Bd. 116, S. 39–48, 2007.
- [139] F. J. Martin, I. Montoliu, S. Collino, M. Scherer, P. Guy, I. Tavazzi, A. Thorimbert, S. Moco, M. P. Rothney, D. L. Ergun, M. Beaumont, F. Ginty, S. D. Qanadli, L. Favre, V. Giusti, und S. Rezzi, „Topographical body fat distribution links to amino acid and lipid metabolism in healthy non-obese women“, *PLoS One*, Bd. 8, Nr. 9, S. e73445, 2013.
- [140] H. Tilg und A. R. Moschen, „Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 6, Nr. 10, S. 772–783, 2006.

- [141] E. Kershaw und J. Flier, „Adipose Tissue as an Endocrine Organ“, *J. Clin. Endocrinol.*, Bd. 89, Nr. 6, S. 2548–2556, 2004.
- [142] J. Wardle, A. M. Haase, A. Steptoe, M. Nillapun, K. Jonwutiwes, und F. Bellisle, „Gender Differences in Food Choice: The Contribution of Health Beliefs and Dieting“, *Ann. Behav. Med.*, Bd. 27, Nr. 2, S. 107–116, 2004.

7. Anhang

7.1. Ergänzende Abbildungen und Tabellen



Abbildung A 1 Flussdiagramm zur Selektion der Studienpopulation

*Dargestellt ist die Auswahl der Studienpopulation aus SHIP-TREND.
NI = Niereninsuffizienz, aHT = arterielle Hypertonie, MetS = Metabolisches Syndrom*

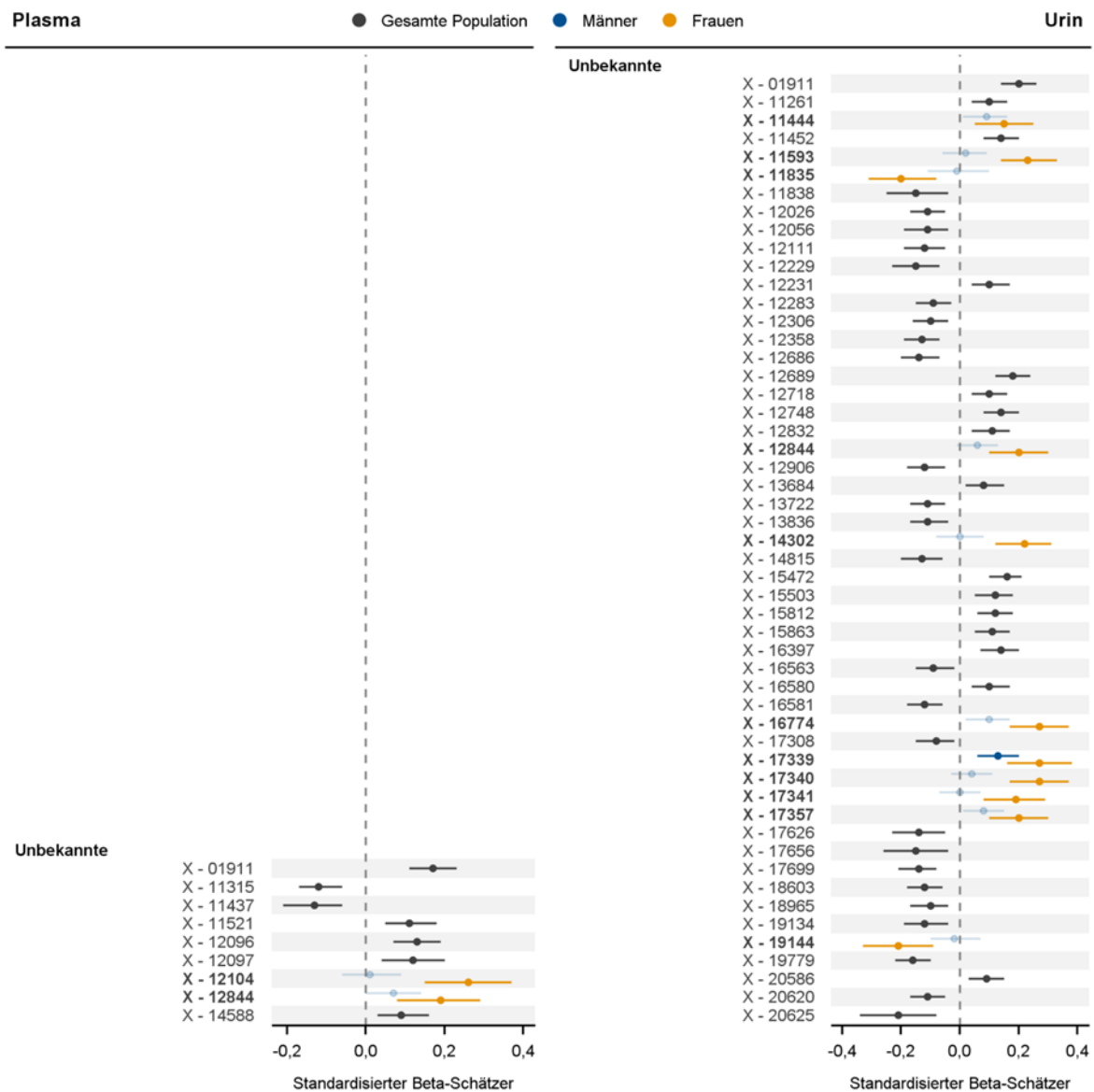


Abbildung A 2 Signifikante Assoziationen zwischen viszeralem Fettgewebe und unbekanntem Metaboliten im Plasma und Urin

Dargestellt sind die Beta-Schätzer inklusive ihres 95%-igen Konfidenzintervalls aus den linearen Regressionsmodellen zwischen VAT und jenen unbekanntem Plasma- und Urinmetaboliten, bei denen sich eine signifikante Assoziation in der Gesamtpopulation, bei Frauen oder bei Männern, beobachten ließ. Regressionsmodelle wurden adjustiert für Alter, Geschlecht, Nikotinabusus, Alkoholkonsum, LDL-Cholesterin, systolischen Blutdruck und eGFR. In allen Regressionsmodellen wurde die Interaktion zwischen VAT und Geschlecht geprüft. Bei Vorliegen eines signifikanten Interaktionseffektes ($FDR < 0,05$; betreffende Metabolite sind fett gedruckt) wurden die geschlechtergetrennten Schätzer dargestellt (blau = Männer; gelb = Frauen). In allen anderen Fällen sind nur die Schätzer für die Gesamtpopulation abgebildet (dunkelgrau). Signifikante Assoziationen sind fett gedruckt.

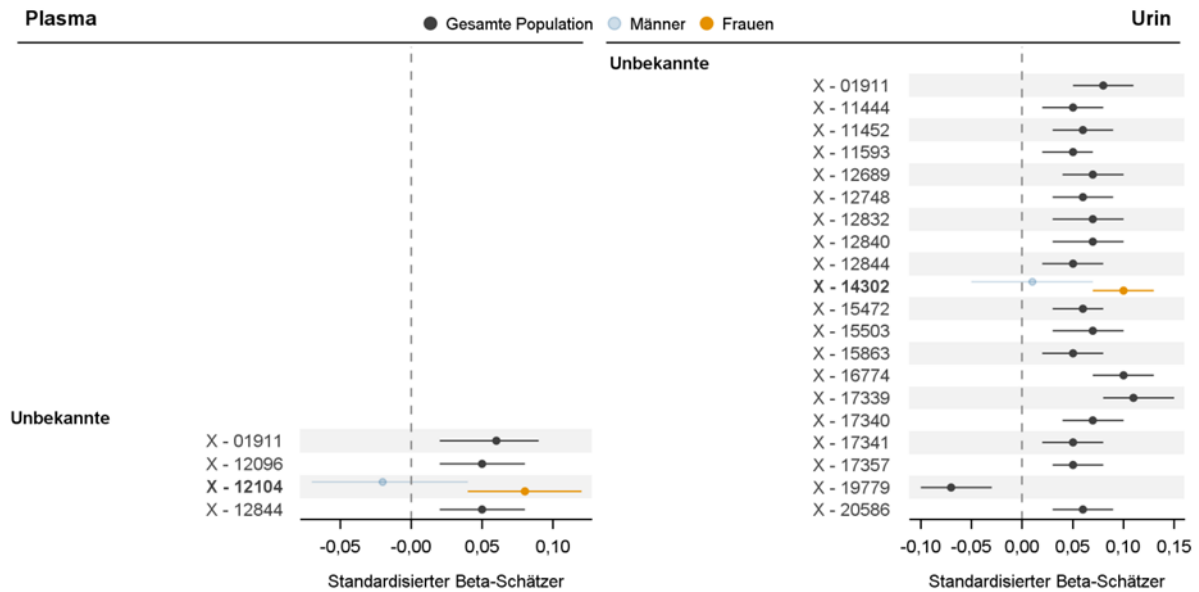


Abbildung A 3 Signifikante Assoziationen zwischen subkutanem Fettgewebe und unbekanntem Metaboliten im Plasma und Urin

Dargestellt sind die Beta-Schätzer inklusive ihres 95%-igen Konfidenzintervalls aus den linearen Regressionsmodellen zwischen SAT und jenen unbekanntem Plasma- und Urinmetaboliten, bei denen sich eine signifikante Assoziation in der Gesamtpopulation, bei Frauen oder bei Männern, beobachten ließ. Regressionsmodelle wurden adjustiert für Alter, Geschlecht, Nikotinabusus, Alkoholkonsum, LDL-Cholesterin, systolischen Blutdruck und eGFR. In allen Regressionsmodellen wurde die Interaktion zwischen SAT und Geschlecht geprüft. Bei Vorliegen eines signifikanten Interaktionseffektes ($FDR < 0,05$; betreffende Metabolite sind fett gedruckt) wurden die geschlechtergetrennten Schätzer dargestellt (blau = Männer; gelb = Frauen). In allen anderen Fällen sind nur die Schätzer für die Gesamtpopulation abgebildet (dunkelgrau). Signifikante Assoziationen sind fett gedruckt.

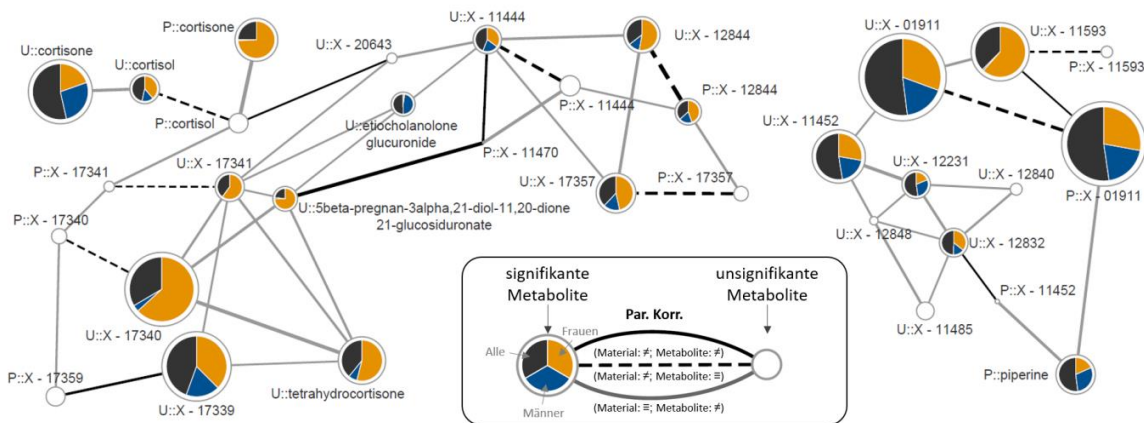


Abbildung A 4 Subnetzwerk aus dem GGM mit Schwerpunkt auf Kortison und Piperin

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem GGM, welches die partiellen Korrelationen zwischen den Plasma- (P) und Urinmetaboliten (U) um Kortisol (links) und Piperin (rechts) abbildet. Die Stärke der Verbindungslinien kennzeichnet die Stärke der partiellen Korrelation zwischen den Metaboliten. Die Linienart verdeutlicht, ob die identifizierte Korrelation zwischen zwei gleichen Metaboliten (gestrichelt) oder zwischen zwei verschiedenen Metaboliten (durchgezogen) besteht. Die Farbe der Verbindungslinie kennzeichnet darüber hinaus, ob es sich bei der Korrelation um zwei Metabolite aus dem gleichen Material (grau) oder aus unterschiedlichen Materialien (schwarz) handelt. Die Knotenpunkte im Netzwerk bilden die Ergebnisse der Regressionsanalysen zwischen VAT und den dargestellten Metaboliten ab. Diese Modelle wurden für die Gesamtpopulation (dunkelgrau) sowie Männer (blau) und Frauen (orange) berechnet und für die Parameter Alter, Geschlecht, Rauchverhalten, sportliche Aktivität, Alkoholkonsum, systolischen Blutdruck, LDL-Cholesterin und eGFR adjustiert. Metabolite, die in keiner der genannten Populationen signifikant mit VAT assoziiert waren, sind in weiß dargestellt. Jene Metabolite, für die sich in mindestens einer Population signifikante Assoziationen mit VAT zeigten, sind farblich hervorgehoben ($FDR < 5\%$). Die Größe der Knoten bildet die maximale Assoziationsstärke in den untersuchten Populationen ab ($-\log_{10}(FDR)$). Je größer der Knoten, desto kleiner war der zugrundeliegende p-Wert.

Tabelle A1 Allgemeine Charakteristika der Studienpopulation

	Männer (n = 192)	Frauen (n = 299)	p
Alter (Jahre)	43 (33; 52)	45 (38; 56)	0,08
Raucherstatus (%)			< 0,01
Nichtraucher	32	47	
Ex-Raucher	41	28	
Raucher	27	25	
Physisch aktiv (%)	77	76	0,26
Alkoholkonsum (g/Tag)	7,3 (2,7; 17,7)	2,6 (0,7; 6,5)	< 0,01
Bauchumfang (cm)	87 (82; 94)	77 (71; 83)	< 0,01
Body-Mass-Index (kg/m ²)	25,6 (23,8; 28,0)	24,5 (22,3; 27,7)	< 0,01
Übergewicht, %	59,4	44,5	< 0,01
Adipositas, %	9,4	12,7	0,26
HbA1c (%)	5,1 (4,8; 5,4)	5,0 (4,8; 5,4)	0,13
Glukose (mmol/L)	5,3 (4,9; 5,5)	5,0 (4,8; 5,3)	< 0,01
Gesamtcholesterin (mmol/L)	5,2 (4,5; 5,9)	5,3 (4,7; 6,1)	0,02
HDL-Cholesterin (mmol/L)	1,35 (1,17; 1,55)	1,67 (1,43; 1,92)	< 0,01
LDL-Cholesterin (mmol/L)	3,28 (2,66; 3,87)	3,20 (2,58; 3,74)	0,26
Triglyzeride (mmol/L)	1,11 (0,78; 1,42)	0,98 (0,72; 1,33)	0,01
eGFR (mL/min/1,73 m ²)	94 (85; 110)	89 (78; 102)	< 0,01
Systolischer Blutdruck (mmHg)	122 (115; 129)	110 (105; 121)	< 0,01
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	75 (70; 80)	72 (67; 77)	< 0,01

Kontinuierliche Daten sind als Median ausgedrückt (25. Perzentil; 75. Perzentil); Kategoriale Daten sind in Prozent angegeben. Der χ^2 -Test (kategoriale Daten) oder Mann-Whitney-U-Test (kontinuierliche Daten) wurde verwendet, um die Messwerte zwischen Männern und Frauen zu vergleichen. Alle Blutproben wurden an nüchternen Proband:innen entnommen. Übergewicht wurde definiert als ein BMI > 25 kg/m², Adipositas als ein BMI > 30 kg/m².

7.2. Publikation

Associations between adipose tissue volume and small molecules in plasma and urine among asymptomatic subjects from the general population

Lerina Otto¹, Kathrin Budde^{1,2}, Gabi Kastenmüller³, Anne Kaul¹, Uwe Völker^{2,4}, Henry Völzke^{2,5,6}, Jerzy Adamski^{7,8,9}, Jens P. Kühn^{10,11}, Jan Krumsiek^{12,13}, Anna Artati⁷, Matthias Nauck^{1,2}, Nele Friedrich^{1,2}, Maik Pietzner^{1,2}

1. Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald
2. DZHK (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e.V.), Greifswald
3. IBIS (Institut für Bioinformatik und Systembiologie) am Helmholtz Zentrum München, Neuherberg
4. Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Universitätsmedizin und Universität Greifswald
5. Institut für Community Medicine, Universitätsmedizin Greifswald
6. DZD (Deutsches Zentrum für Diabetesforschung), Greifswald
7. IEG (Institut für Experimentelle Genetik), Genomanalysezentrum am Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany.
8. Lehrstuhl für Experimentelle Genetik, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan
9. DZD (Deutsches Zentrum für Diabetesforschung), München-Neuherberg
10. Institut für Diagnostische Radiologie und Neuroradiologie, Universitätsmedizin Greifswald
11. Institut und Poliklinik für diagnostische und interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden
12. ICB (Institut für Computational Biology) am Helmholtz Zentrum München, Neuherberg
13. Institute for Computational Biomedicine, Englander Institute for Precision Medicine, Department of Physiology and Biophysics, Weill Cornell Medicine, New York, USA

Scientific Reports, 2020 January, Volume 10, 1487

Reproduced with permission by Springer Nature.

OPEN

Associations between adipose tissue volume and small molecules in plasma and urine among asymptomatic subjects from the general population

Lerina Otto¹, Kathrin Budde^{1,2}, Gabi Kastenmüller³, Anne Kaul¹, Uwe Völker^{2,4}, Henry Völzke^{2,5,6}, Jerzy Adamski^{7,8,9}, Jens P. Kühn^{10,11}, Jan Krumsiek^{12,13}, Anna Artati⁷, Matthias Nauck^{1,2}, Nele Friedrich^{1,2} & Maik Pietzner^{1,2*}

Obesity is one of the major risk factor for cardiovascular and metabolic diseases. A disproportional accumulation of fat at visceral (VAT) compared to subcutaneous sites (SAT) has been suspected as a key detrimental event. We used non-targeted metabolomics profiling to reveal metabolic pathways associated with higher VAT or SAT amount among subjects free of metabolic diseases to identify possible contributing metabolic pathways. The study population comprised 491 subjects [mean (standard deviation): age 44.6 yrs (13.0), body mass index 25.4 kg/m² (3.6), 60.1% females] without diabetes, hypertension, dyslipidemia, the metabolic syndrome or impaired renal function. We associated MRI-derived fat amounts with mass spectrometry-derived metabolites in plasma and urine using linear regression models adjusting for major confounders. We tested for sex-specific effects using interactions terms and performed sensitivity analyses for the influence of insulin resistance on the results. VAT and SAT were significantly associated with 155 (101 urine) and 49 (29 urine) metabolites, respectively, of which 45 (27 urine) were common to both. Major metabolic pathways were branched-chain amino acid metabolism (partially independent of insulin resistance), surrogate markers of oxidative stress and gut microbial diversity, and cortisol metabolism. We observed a novel positive association between VAT and plasma levels of the potential pharmacological agent piperine. Sex-specific effects were only a few, e.g. the female-specific association between VAT and O-methylascorbate. In brief, higher VAT was associated with an unfavorable metabolite profile in a sample of healthy, mostly non-obese individuals from the general population and only few sex-specific associations became apparent.

¹Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany. ²DZHK (German Center for Cardiovascular Research), partner site Greifswald, Greifswald, Germany. ³Institute of Bioinformatics and Systems Biology, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany. ⁴Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, University Medicine and Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald, Greifswald, Germany. ⁵Institute for Community Medicine, University Medicine Greifswald, Greifswald, 17475, Germany. ⁶DZD (German Center for Diabetes Research), site Greifswald, Greifswald, 17475, Germany. ⁷Institute of Experimental Genetics, Genome Analysis Center, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany. ⁸Lehrstuhl für Experimentelle Genetik, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany. ⁹DZD (German Center for Diabetes Research), München-Neuherberg, Germany. ¹⁰Institute of Diagnostic Radiology and Neuroradiology, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany. ¹¹Institute of Diagnostic Radiology, University Medicine, Carl Gustav Carus University Dresden, Dresden, Germany. ¹²ICB (Institute of Computational Biology), Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, 85764, Germany. ¹³Institute for Computational Biomedicine, Engländer Institute for Precision Medicine, Department of Physiology and Biophysics, Weill Cornell Medicine, New York, NY, USA. *email: maik.pietzner@med.uni-greifswald.de

Obesity is one of the major risk factors for the development of chronic diseases like type 2 diabetes mellitus (T2DM), dyslipidemia or hypertension¹ and therefore an accelerating cause of mortality². Apart from overall obesity as measured by the body mass index (BMI) the specific site of excessive fat accumulation seems to be more important for disease risk. Accumulation of visceral adipose tissue (VAT) has been associated with metabolic and cardiovascular diseases (CVD)³ and is suspected to account for sex-specific differences in disease risks^{4,5}. A more recent genetic approach has established a causal link between VAT and metabolic diseases with an astonishingly sex-difference, the odds for having T2DM being about 3-fold higher in women compared to men for the same absolute increase in VAT⁶. Nevertheless, in both sexes accumulation of VAT was strongly related to a higher risk of CVD including myocardial infarction or hypertension as well as mortality^{7–9}. The role of subcutaneous adipose tissue (SAT) remains to be determined.

Previous studies took advantage of targeted and non-targeted metabolomic profiling to investigate molecular pathways associated with higher amounts of VAT and/or SAT identifying multiple associated small molecules, such as branched-chain amino acids (BCAAs), tryptophan catabolites, glutamate or different lipid species^{10–18}. However, study populations were either small, the metabolomics techniques used had only restrictive coverage, e.g. only few dozen measured metabolites, or only one type of bio specimens was used for investigation. Comprehensive non-targeted profiling of plasma and urine samples using mass spectrometry has been shown to gain complementary insights into molecular pathways associated with diverse clinical relevant phenotypes¹⁹. The exclusion of participants with either manifest metabolic diseases, like T2DM, or those being at high risk, i.e. presenting with components of the metabolic syndrome or hypertension, reduces unwanted confounding when investigating VAT/SAT-associated molecular signatures in the metabolome of blood or urine samples²⁰.

We present here a cross-sectional study on the associations between the amount of VAT/SAT and small molecules measured in plasma and urine of about 500 participants from the general population free of T2DM, the metabolic syndrome, hypertension, dyslipidemia or renal impairment. In doing so, we aimed to identify pathways probably involved in the translation of higher VAT or SAT into manifest metabolic disease and to contrast the metabolic signatures associated with higher fat accumulation at different sites.

Results

Applying the just mentioned exclusion criteria 491 participants [mean (standard deviation): age 44.6 yrs (13.0), body mass index 25.4 kg/m² (3.6), 60.1% female] were available for statistical analysis. Sex-specific characteristics of the study population are shown in Table 1 indicating the anticipated sex-specific distribution of adipose tissue at subcutaneous (higher in women) and visceral (higher in men) sites (Supplemental Fig. S1). Women showed a more beneficial lifestyle as indicated by less smoking and less alcohol consumption, whereas men had higher blood pressure, BMI as well as a higher estimated glomerular filtration rate (eGFR). Only small differences in blood lipid levels became apparent.

Sex-specific associations. In sex-interaction analyses 8 plasma and 19 urine metabolites showed at least a nominal significant interaction with VAT (Figs. 1, 2 and S1, 2). Associations unique to women in plasma included cortisone, caprate, citrate (all inversely) and isovalerylcarnitine (positively). The positive association with plasma urate had a stronger effect size in women compared to men, whereas the positive associations with the BCAA metabolites 3-methyl-2-oxovalerate and 4-methyl-2-oxopentanoate were unique to men.

Unique positive associations regarding VAT and urine metabolites in women included several steroids, e.g. tetrahydrocortisone and likely related unknown compounds as indicated from the estimated metabolic network (see Methods, Figs. 2, 3 and S2), as well as piperine along with related unknown compounds (Figs. 3 and S3). Inverse association between VAT and urine levels of, carnosine, N-acetylaspartate and cinnamoylglycine were unique to women as well. Among men only VAT and SAT were inversely associated with urine levels of pivaloylcarnitine and positively with urine levels of N6-acetyllysine.

Consistent associations between the sexes. Linear regression analysis revealed 54 and 20 plasma metabolites to be associated with VAT and SAT, respectively, of which 18 were common to both (Fig. 1). This disproportional number of associated metabolites was even more obvious in urine as 101 metabolites significantly associated with VAT and 29 with SAT, 27 of which being common to both exposures (Fig. 2).

Plasma and urine metabolites associated with VAT. The majority of significant associations of VAT with the plasma metabolome were in positive direction comprising few lipid species (e.g. arachidonate, palmitate or butyrylcarnitine), members of branched-chain amino acids (BCAA; e.g. valine or leucine) and related intermediates (e.g. 3-methyl-2-oxobutyrate), aromatic amino acids like tyrosine or phenylalanine as well as alanine and glutamate. Plasma levels of corresponding γ -glutamyl amino acids were positively associated as well. VAT was further positively associated with plasma levels of carbohydrates and related metabolites such as lactate, pyruvate and the sum of hexoses. Several unknown compounds were positively associated as well (Fig. S2) and visual inspection of the derived metabolic network revealed a cluster containing the annotated metabolite piperine (Fig. 3). Significant inverse associations were limited to glycerophosphocholine, cotinine and catechol sulfate (Fig. 1) as well as several unknown compounds (Fig. S2).

With respect to urine, inverse associations with VAT included steroids, like cortisol, and other fatty acids, e.g. sebacate, members of the urea cycle, e.g. urea itself, as well as purines and pyrimidines, like uracil, guanine or urate. Some of the associations seen in plasma, such as the positive associations with BCAAs, replicated in urine. However, urine levels of closely related catabolites of BCAAs, such as propionylglycine and more in general glycine-conjugated metabolites were inversely associated with VAT. Compared to these known metabolites an

Characteristics	Men (n = 192)	Women (n = 299)	p
Age (years)	43 (33; 52)	45 (38; 56)	0.08
Smoking (%)			<0.01
never smokers	32	47	
former smokers	41	28	
current smokers	27	25	
Physically active (%)	77	76	0.26
Alcohol consumption (g/day)	7.3 (2.8; 17.7)	2.6 (0.7; 6.5)	<0.01
Waist circumference (cm)	87 (82; 94)	77 (71; 83)	<0.01
BMI (kg/m ²)	25.6 (23.8; 28.0)	24.5 (22.3; 27.7)	<0.01
Visceral adipose tissue (l)	3.35 (1.90; 5.06)	1.64 (0.96; 2.76)	<0.01
Subcutaneous adipose tissue (l)	5.17 (3.73; 6.60)	7.02 (5.59; 9.42)	<0.01
HbA1c (%)	5.1 (4.8; 5.4)	5.0 (4.8; 5.4)	0.13
Glucose (mmol/l)	5.3 (4.9; 5.5)	5.0 (4.8; 5.3)	<0.01
Insulin (μ U/ml)	6.7 (4.6; 8.9)	7.2 (5.6; 10.1)	<0.01
Total cholesterol (mmol/l)	5.2 (4.5; 5.9)	5.3 (4.7; 6.1)	0.02
HDL cholesterol (mmol/l)	1.35 (1.17; 1.55)	1.67 (1.43; 1.92)	<0.01
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.28 (2.66; 3.87)	3.20 (2.58; 3.74)	0.26
Triglycerides (mmol/l)	1.11 (0.78; 1.42)	0.98 (0.72; 1.33)	0.01
eGFR (ml/min/1.72 m ²)	94 (85; 110)	89 (78; 102)	<0.01
Systolic BP (mmHG)	122 (115; 129)	110 (105; 121)	<0.01
Diastolic BP (mmHG)	75 (70; 80)	72 (67; 77)	<0.01

Table 1. General characteristics by sex. Continuous data are expressed as median (25th percentile; 75th percentile); nominal data are given as percentages. * χ^2 -test (nominal data) or Mann-Whitney test (interval data) were performed. HbA1c = glycated hemoglobin, HDL = high density lipoprotein, LDL = low density lipoprotein, eGFR = estimated Glomerular Filtration Rate, BP = blood pressure, BMI = body mass index, All parameters were measured from fasting blood samples.

equal amount of unknown compounds showed significant associations with VAT, including those related to either cortisol or piperine in the derived metabolic network (Fig. 3).

Plasma and urine metabolites associated with SAT. Almost all association between SAT and metabolites were already described for VAT. Within each fluid, only two significant observations were unique to SAT (Figs. 1 and 2). Cortisol (inversely) and N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (positively) levels in plasma as well as 3'-sialyllactose and the unknown compound X-12840 (both positively) levels in urine associated with SAT.

Influence of insulin resistance. Inclusion of HOMA-IR in linear regression models did not change significant associations between VAT and plasma and urine levels of 30 and 48 metabolites, respectively, when conducting sex-pooled analysis (Fig. 4). Those included BCAAs (but not their primary degradation products, α -keto acids) and aromatic amino acids, gamma-glutamyl amino acids, glutamate, ω 6-polyunsaturated fatty acids or palmitate in plasma as well as BCAA-catabolites, benzoate metabolites and cortisol metabolites in urine. Strong changes in effect sizes (>50%) were seen for the association between VAT and plasma levels of hexoses as well as lactate (Fig. 4). Three and 13 metabolites in plasma and urine, respectively, remained significantly associated with SAT when conducting sex-pooled analysis. Effect sizes for SAT on plasma 3-methyl-2-oxobutyrates and the urine unknown compound X-15472 were strongly attenuated following adjustment for HOMA-IR (Fig. 4).

The sex-specific effects observed for VAT and the plasma metabolites cortisone, X-12104, 3-methyl-2-oxovalerate, and urate remained unaffected after adjusting for HOMA-IR, similar as those for the urine metabolites tetrahydrocortisone, N-acetylaspartate, carnosine or several unknown compounds such as X-17340 or X-17357.

Discussion

We used comprehensive non-targeted metabolomics profiling of two complementary body fluids to investigate molecular pathways associated with higher amounts of visceral and subcutaneous adipose tissue among a large sample of asymptomatic subjects from the general population. In the absence of metabolic disorders higher VAT was associated with molecular signatures previously implicated in the onset of T2DM and cardiovascular diseases such as impaired BCAA catabolism²¹, surrogates of oxidative stress²² and diminished gut microbial diversity²³, and further with the potential pharmacological agent piperine and related catabolites. We observed only minor evidence for sex-specific associations, i.e. different effect sizes between the sexes for the same amount of increase in either VAT or SAT. With the exception of plasma cortisol, molecular signatures observed with respect to SAT were almost completely included in those seen with VAT.

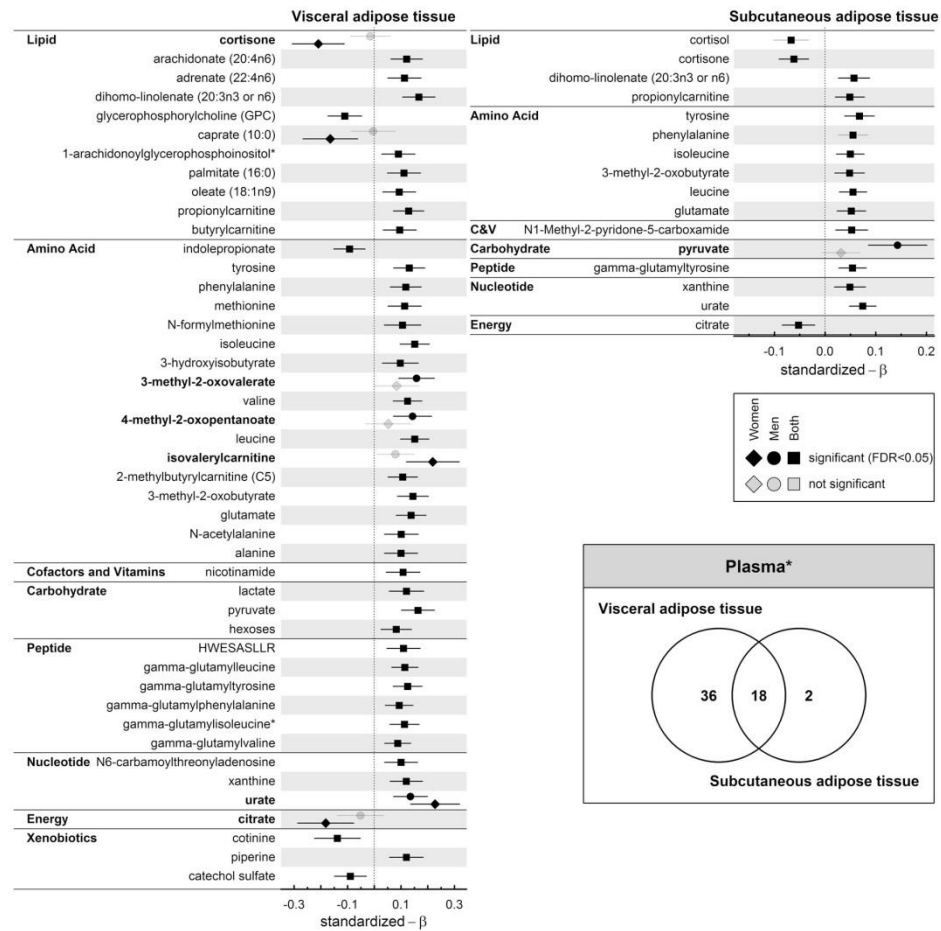


Figure 1. Standardized β -estimates from linear regression analyses with the amount of visceral (VAT; left panel) or subcutaneous (SAT; right panel) adipose tissue as exposure and plasma metabolites as outcome conducting either the whole population (square), only men (circle) or women (diamond). Displayed are only metabolites which were annotated and significant (controlling the false discovery rate (FDR) at 5%) in at least one of the subsets (indicated by darker colors). Metabolites printed in bold showed a nominal significant ($p < 0.05$) interaction term between VAT or SAT and sex. Regression models were adjusted for age, (sex), smoking behavior, alcohol consumption, LDL-cholesterol, systolic blood pressure, and estimated glomerular filtration rate. The Venn diagram displays the overlap in associated metabolites, including unknown(*) compounds.

VAT is associated with BCAA metabolites independently of insulin resistance. Cross-sectional associations between VAT content and plasma BCAAs or related catabolites have been shown among obese subjects with a high burden from multiple diseases, including insulin resistance, and plasma concentrations of those metabolites were further shown to be lower among lean compared to (severely) obese subjects^{18,24–27}. We observed a positive association between primary BCAAs as well as aromatic amino acids with VAT and SAT among subjects free of T2DM or the metabolic syndrome. Moreover, the association with VAT but not SAT persisted upon adjustment for HOMA-IR as a marker of peripheral insulin resistance. This observation might indicate that the association seen with SAT is only secondary to VAT as subjects with high amount of SAT also tend to have higher amounts of VAT. We observed some evidence that the association with downstream catabolites of BCAAs, such as 3-methyl-2-oxoalate or 4-methyl-2-oxopentanoate and VAT were stronger in men compared to women but was attenuated upon adjustment for HOMA-IR. Higher plasma concentrations of BCAAs have been consistently and repeatedly associated with higher risk of T2DM and other metabolic disorders independent of classical risk

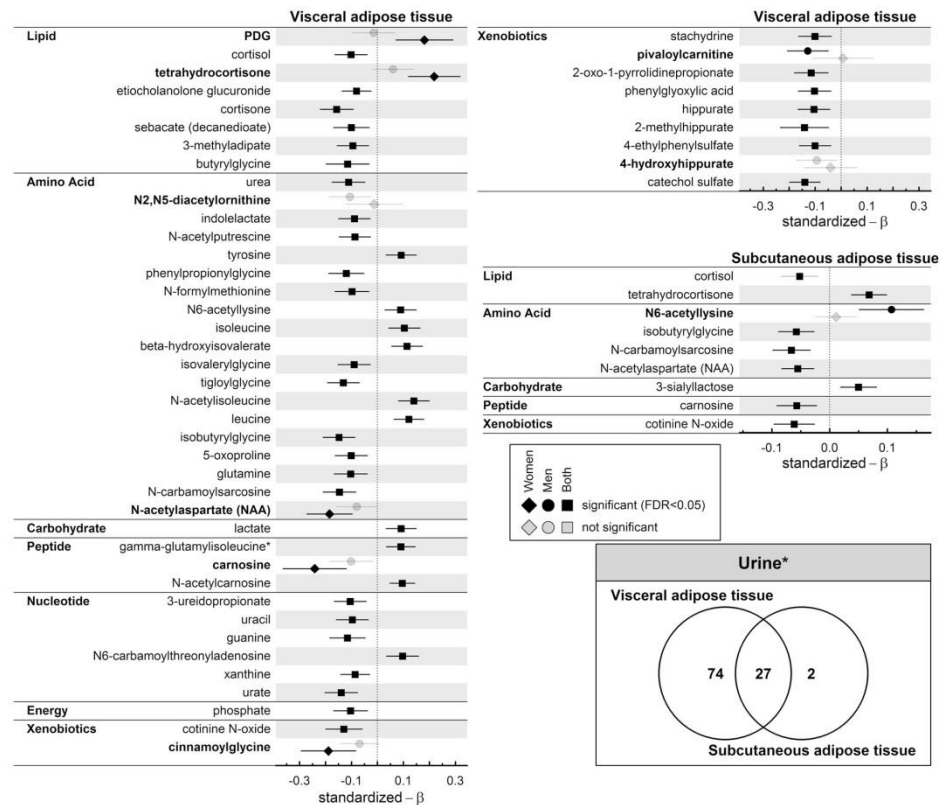


Figure 2. Standardized β -estimates from linear regression analysis with the amount of visceral (VAT; left panel) or subcutaneous (SAT; right panel) adipose tissue as exposure and urine metabolites as outcome conducting either the whole population (square), only men (circle) or women (diamond). Displayed are only metabolites which were annotated and significant (controlling the false discovery rate (FDR) at 5%) in at least one of the subsets (indicated by darker colors). Metabolites printed in bold showed a nominal significant ($p < 0.05$) interaction term between VAT or SAT and sex. Regression models were adjusted for age, (sex), smoking behavior, alcohol consumption, LDL-cholesterol, systolic blood pressure, and estimated glomerular filtration rate. The Venn diagram displays the overlap in associated metabolites, including unknown(*) compounds. PDG = 5beta-pregnan-3alpha,21-diol-11,20-dione 21-glucosiduronate.

factors^{21,26,28}. A common hypothesis implies impaired degradation of isoleucine, leucine, and valine in peripheral tissues, such as skeletal muscle, as responsible mechanism. The subsequent accumulation of α -keto acids, like 3-methyl-2-oxobutyrate, may trigger the pathophysiology of insulin resistance and subsequently T2DM with support from animal models²⁹ and causal assessment using Mendelian randomization³⁰. A recent study using elegant tracer studies in humans and mice revealed a so far unexpected role of brown adipose tissue in whole body catabolism of BCAAs³¹. Given the inverse correlation between VAT and brown adipose tissue mass³² one might speculate that this mechanism contributed to our observations as well. Increased BCAA availability, irrespective of the source (e.g. protein breakdown or nutrition²⁹) might fuel other metabolic pathways including gluconeogenesis upsetting glucose homeostasis. In general, this molecular signature fits to the independent role of visceral obesity in the progression of insulin resistance and T2DM^{33,34} but requires further investigation about ‘the first hit’ leading to either higher VAT or BCAA accumulation in plasma.

VAT associates with surrogates of (hepatic) oxidative stress. Besides the metabolism of BCAAs, the present study associated visceral obesity with an accumulation of closely related γ -glutamyl-dipeptides in plasma consistently across the sexes³⁵. The formation of γ -glutamyl-dipeptides is part of the γ -glutamyl cycle, among others responsible for the restoration of the intracellular anti-oxidant glutathione. One previous metabolomics study²² suggested γ -glutamyl-dipeptides as sensitive markers for liver function, ranging from simple steatosis to

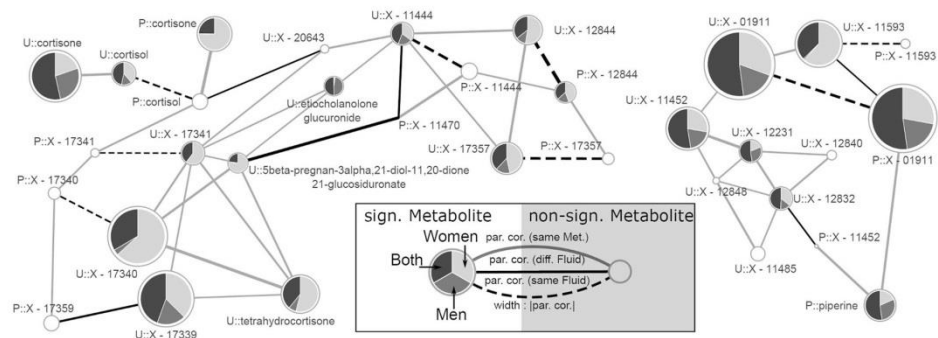


Figure 3. Subnetwork of the derived GGM with emphasis on cortisol as well as piperine and related compounds (e.g. X - 11593 putatively O-methylascorbate). On each node the results from linear regression analyses for visceral fat were mapped for the whole population (black), only women (light grey) or men (dark grey) as portion of the associations strength given as $-\log_{10}(\text{FDR-value})$. Significant results in at least one population, false discovery rate (FDR) below 5%, were highlighted by colors. Node sizes were chosen as maximum association strength. The prefix P denotes plasma metabolites whereas U indicates urine metabolites. Edges represent significant partial correlations (par. cor.) between metabolites. Type and color represent metabolite and fluid dependencies. Regression models were adjusted for age, (sex), smoking behavior, alcohol consumption, LDL-cholesterol, systolic blood pressure, and estimated glomerular filtration rate.

hepatocellular carcinoma. The relation to non-alcoholic fatty liver disease was replicated by others³⁶ and ectopic accumulation of fat within the liver is a condition frequently linked to visceral obesity³⁷ and hence might relate our observations with impaired liver metabolism. Excess intake of food rich in calories and the subsequent availability of fuel likely induce increased mitochondrial substrate oxidation resulting in increased production of reactive oxygen species (ROS). ROS in turn stimulates glutathione production via NRF2 signaling and subsequent increased expression of γ -glutamylcysteine ligase, the key enzyme in glutathione production³⁸. Subsequently, an accumulation of γ -glutamyl-dipeptides would indicate increased (hepatic) oxidative stress, as has been reported previously²². However, in spite of only slightly altered plasma fatty acid profiles the metabolically benign state of the participants might indicate a still adequate handling of the fuel excess.

The black pepper ingredient and potent pharmacological agent piperine associates with VAT.

Data-driven reconstruction of a metabolic network enabled us to reveal a cluster of metabolites positively associated with VAT and SAT which included the annotated plasma metabolite piperine (Fig. 3). The strongest associations with VAT, however, were seen for plasma and urine levels of the unknown compound X-01911. Such an enriched cluster might be indicative for an association with the whole pathway of piperine metabolism. Piperine can be derived from the degradation of black pepper³⁹ and has been suggested as putative pharmacological agent for different applications^{40,41}. With respect to adipose tissue distribution, a study in mice suggested a body fat lowering effect⁴² and piperine-treatment of 3T3-L1 cells reduced lipid storage as well as blocked their differentiation into adipocytes³⁹. However, these observation contrasts our finding of a positive association between VAT and plasma piperine. One might speculate that the frequently described beneficial effects of piperine⁴³ might have contributed to the metabolically healthy state of our study population with respect to major disease traits despite a high amount of VAT/SAT. A similar argument has been stated in traditional Chinese medicine⁴⁴.

VAT is associated with circulating surrogates of diminished gut microbial diversity. Microbial metabolism in the gut contributes to a significant amount to the metabolome of plasma and urine^{45,46}. One of the most consistently reported surrogate metabolites is hippurate²³. Urine hippurate levels, along with other putative metabolites of microbial origin such as indolepropionate (plasma) or 2-methylhippurate (urine), were inversely associated with VAT consistently in both sexes. These metabolites likely result from microbial digestion of dietary fibers, phenols or choline^{23,46}. Several studies (for review see²³) already reported associations between hippurate and obesity as well as T2DM. Obesity in general has been associated with a diminished alpha-diversity of the gut microbiome⁴⁷ reflecting a loss of plurality in microbial species. By the use of triangulation among diet intake, visceral fat mass and gut microbial profiling in the Twins-UK study the authors suggested plasma levels of hippurate as a putative link between dietary habits and adipocyte function with neuroglobin expression as putative candidate regulator¹⁴. Higher relative abundances of the phenol degrading *Eubacterium dolichum* was the single microbial species linking all levels, i.e. diet score, visceral fat mass and plasma hippurate levels. Apart from shifts in the gut microbial composition other explanations of our observations might be considered as well. Despite the adjustment for kidney function in regression models using estimated GFR as a proxy an effect of altered kidney function could not be ruled out entirely. Diminished tubular secretion in obese subjects, which is not necessarily directly related to the GFR^{48,49}, of hippurate and cinnamoylglycine might have accounted for our findings independent of gut microbial metabolism⁴⁹.

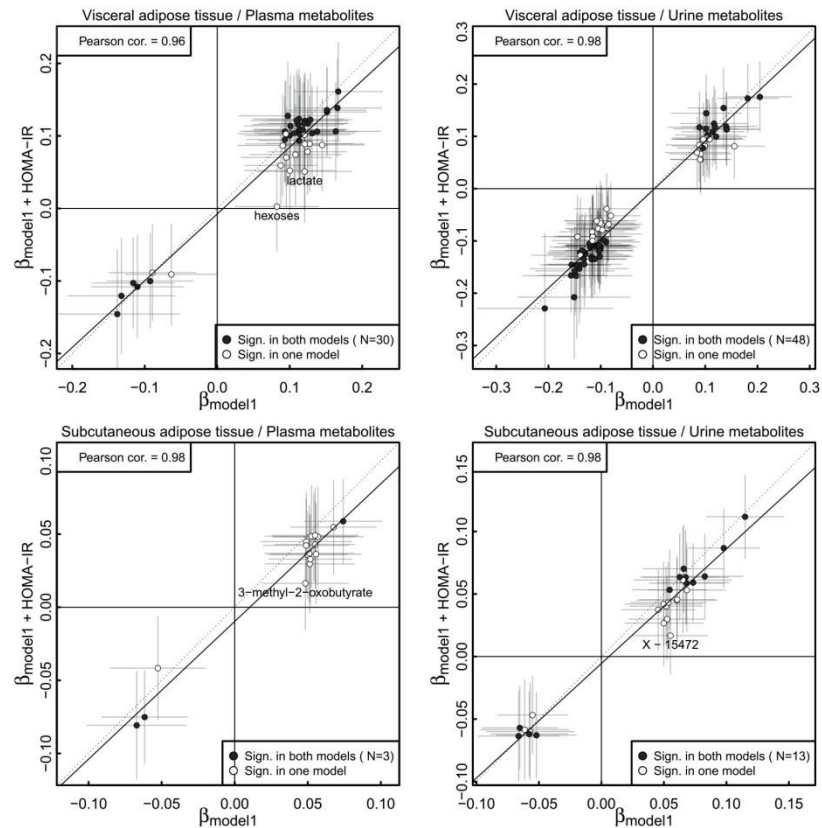


Figure 4. Comparison of the effect sizes (95%-CI indicated by lines) from linear regression models using visceral (VAT, upper panel) or subcutaneous (SAT, lower panel) adipose tissue and metabolite levels as outcome before (x-axis) and after (y-axis) further adjustment for the homeostatic model of insulin resistance (HOMA-IR). Model 1 was adjusted for age, sex, smoking behavior, alcohol consumption, low-density lipoprotein cholesterol, systolic blood pressure, and estimated glomerular filtration rate. Metabolites meeting statistical significance in both models (false discovery rate <5%) are indicated by darker colors and the number is given in brackets. Metabolites with strong attenuation of effect sizes (>50%) have been annotated. The solid line indicates the fit of an ordinary linear regression model between effect estimates from both models. The dotted line would indicate identity of effect estimates.

The female-specific VAT association with O-methylascorbate might indicate a common genetic architecture.

One of the few metabolic signatures with indication of a sex-specific effect was the positive association with VAT/SAT and urine levels of X-11593, meanwhile identified as O-methylascorbate⁵⁰. O-methylascorbate is a product of ascorbate (vitamin C) by O-methylation⁵¹ and one might speculate about higher catechol-O-methyltransferase (COMT) activity and therefore more degradation products in women with higher VAT. Single nucleotide variants (SNV) mapping to *COMT*, the gene encoding COMT, have been associated with food choices including a favour for unhealthy food⁵² but early genetic studies using similar variants at *COMT* failed to show an association with BMI or weight⁵³. The latter might be likely due to limited statistical power since more recent genome-wide association analysis using data from UK Biobank (N > 300k) showed significant associations ($p < 5 \times 10^{-8}$, retrieved via www.phenoscanter.medscl.cam.ac.uk⁵⁴ on 15/09/2019) with several refined anthropometric traits, in particular measures of fat-free mass, with the exact same missense SNV (rs4680) as has been used to annotate X-11593 as O-methylascorbate. However, neither the *COMT* locus nor the SNV appeared to be significant when using predicted VAT mass as an outcome in a genome-wide association study⁶. To conclude, our female-specific observation of VAT-associated levels of O-methylascorbate may be explainable by a common genetic architecture of anthropometric traits and intermediary metabolism but further studies are needed to disentangle the relationship in more detail.

SAT compared to VAT shows sex-consistent associations with cortisol metabolites. Plasma and urine cortisol levels were consistently associated with SAT in both sexes whereas degradation products such as cortisone (plasma), tetrahydrocortisone (urine) as well as likely related unknown compounds (Fig. 3) were associated with VAT only in women. Such a sex-specific segregation of associated metabolites across this pathway might be explained by a switch in cortisol clearance among women with high VAT. Increased clearance of cortisol despite unaltered plasma levels has already been described for (abdominal) obese subjects and hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis suggested as possible explanation^{55–57}. A key enzyme in the conversion of cortisone to cortisol is 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) but its expression levels in adipose tissue are uncertain. Early work suggested high 11 β -HSD expression in omental (i.e. visceral) but not subcutaneous adipose tissue⁵⁸, bypassing the HPA-axis due to local cortisol production from inactive cortisone. The latter would result in tissue-dependent hypercortisolism. More recent work⁵⁹ provided evidence for higher cortisol secretion from SAT rather than VAT in humans. The secretion site might be of particular importance, as cortisol released from VAT is suspected to contribute to hepatic insulin resistance whereas cortisol released from SAT might be counteracted by the HPA-axis⁵⁹. It is important to note, however, that we observed inverse associations for plasma cortisol levels with SAT which is counterintuitive to the literature presented so far and might be attributable to the exclusion of subjects with obvious metabolic complications such as the metabolic syndrome or T2DM.

Strengths and limitations. A clear strength of our study is the precise quantification of SAT and VAT using whole body magnetic resonance imaging in combination with a non-targeted MS-based metabolomics approach covering a huge diversity of small molecules from different origin. As we used a cross-sectional approach it is difficult to determine the causal nature of the associations presented and results should be interpreted with caution. Furthermore, dietary differences among subjects, possibly affecting the measured metabolome, could not be addressed adequately due to the missing of appropriate questionnaires.

Conclusion

Among asymptomatic subjects higher amounts of VAT in both men and women were associated with several molecular signatures which have been previously implied in the onset of metabolic and cardiovascular disorders such as T2DM and those metabolites or pathways can now be tested as intermediate factors. Only few sex-specific associations appeared and larger studies are needed to test for more subtle differences between the sexes and to confirm our results.

Methods

Study population. The Study of Health in Pomerania (TREND) (SHIP-TREND) is a second cohort of a population-based research project in West Pomerania, a rural region in north-east Germany⁶⁰. A stratified random sample of 8826 adults aged 20–79 years was drawn from population registries. Sample selection was facilitated by centralization of local population registries in the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania. Stratification variables were age, sex and city/county of residence. Baseline examinations were conducted between 2008 and 2012. Out of all invitations 4420 chose to participate (50.1% response). All participants gave written informed consent before taking part in the study. The study was approved by the ethics committee of the University of Greifswald and conformed to the principles of the declaration of Helsinki.

For a subsample of up to 1000 subjects without self-reported diabetes plasma as well as urine metabolomics data based on mass spectrometry (see below) were available. The analyses focused on asymptomatic subjects. Therefore, 455 subjects with hypertension, metabolic syndrome or an estimated glomerular filtration rate (eGFR) <50 ml/min/m² were excluded. After further exclusion of subjects with missing values in the exposure variables the final study population comprised 491 subjects (192 men; 299 women).

Measurements. Participants' characteristics and medical histories were recorded using computer-aided personal interviews. Smoking status was categorized as current, former or never smokers. Mean daily alcohol consumption was calculated using beverage-specific pure ethanol volume proportions. Subjects who participated in physical training for at least two hours a week were classified as physically active. Waist circumference (WC) was measured to the nearest 0.1 cm using an inelastic tape midway between the lower rib margin and the iliac crest in the horizontal plane. Height was measured to the nearest 1 cm using a digital ultrasound instrument, and weight was measured using standard digital scales to the nearest 0.1 kg with the subject in light clothing and without shoes. Body mass index was calculated as kg/m². Hypertension was present by either an increased blood pressure (BP) (systolic BP of ≥ 140 mm Hg or a diastolic BP of ≥ 90) or the use of antihypertensive medication (self-report). Dyslipidemia was defined as follows: concentrations of total cholesterol ≥ 5.2 mmol/l (≥ 200 mg/dl), or low-density lipoprotein cholesterol (LDL) ≥ 3.4 mmol/l (≥ 130 mg/dl), or high-density lipoprotein cholesterol (HDL) <1.04 mmol/l (<40 mg/dl), or use of anti-lipidemic medication. Metabolic syndrome (MetS) was defined by three or more of the following five components^{61,62} using fasting blood samples: (1) abdominal obesity: men WC ≥ 94 cm, women WC ≥ 80 cm; (2) elevated triglycerides: ≥ 2.3 mmol/l (fasting time <8 h) or ≥ 1.7 mmol/l (fasting time ≥ 8 h) or lipid-modifying medication (ATC code C10AB or C10AD); (3) reduced high-density lipoprotein (HDL) cholesterol: men <1.03 mmol/l, women <1.29 mmol/l; (4) elevated blood pressure: $\geq 130/85$ mmHg or self-reported antihypertensive medication or (5) elevated glucose: ≥ 6.1 mmol/l or diabetic medication (ATC code A10).

Fasting blood samples (≥ 8 hours) were drawn between 7:00 am and 11:00 am from the cubital vein of subjects in the supine position and analyzed immediately or stored by -80 °C. Total cholesterol levels were measured by photometry (Dimension VISTA, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany). HDL/LDL cholesterol levels were selectively precipitated and then determined by homogenous assays (Dimension VISTA, Siemens

Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany). Plasma insulin levels were measured (Centaur XP by Siemens Healthcare Diagnostics) and the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated as $\text{insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucose (mmol/L)}/22.5$. Serum creatinine levels were measured using an enzymatic assay (Dimension VISTA, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany). The eGFR was calculated as: $\text{eGFR} = 186.3 \times (\text{serum creatinine})^{-1.154} \times (\text{age})^{-0.203} \times (0.742 \text{ if female})$.

Magnetic resonance imaging. Whole body magnetic resonance imaging (MRI) was performed on commercial 1.5-Tesla system (Magnetom Avanto, Siemens Healthcare AG, Erlangen, Germany, software version Syngo MR B15), using a body phased array coil. The quantification of subcutaneous and visceral fat was done using the automatic tissue and labeling analysis software ATLAS and an in-house developed software from the University of Ulm⁶³. Afterwards a manual correction by certified students was applied.

Metabolomics measurements. Non-targeted metabolomics analysis for metabolic profiling was conducted at the Genome Analysis Center, Helmholtz Zentrum München. A detailed description of metabolite measurements, annotations and data processing is given elsewhere^{64,65} and in the Supplemental Information. After preprocessing 475 plasma and 558 urine metabolites remained for the statistical analyses. Note that 177 plasma metabolites and 302 urine metabolites could not be unambiguously assigned to a chemical identity and are referred to hereafter with the notation “X” followed by a unique number. To estimate Gaussian graphical models (GGMs) based on metabolite data, missing values were imputed for metabolites with less than 20% missing values using sampling from truncated log-normal distributions and multiple imputations by chained equations afterwards.

Statistical analysis. For bivariate analyses, the Kruskal-Wallis test (continuous data) or χ^2 test (nominal data) were used to compare women and men. Linear regression models were performed to test the association between VAT as well as SAT (independent) and plasma as well as urine metabolites (dependent). Metabolite levels were rescaled to mean of zero and standard deviation of one. Since both fat compartments strongly differed between the sexes (Table 1) all analyses were performed including an interaction term with sex. If this revealed an at least nominal significant interaction ($p < 0.05$) models were estimated for each sex separately. If not otherwise noted, all models were adjusted for age, smoking, physical activity, alcohol consumption, systolic blood pressure, LDL cholesterol and eGFR. A second model further adjusting for HOMA-IR was used to test for the influence of insulin resistance on the presented results. To account for multiple testing, we corrected the p-values from regression analyses by controlling the false discovery rate (FDR) at 5% using the Benjamini-Hochberg procedure⁶⁶. GGMs for the metabolome data were calculate because of their ability to mirror physiological dependencies⁶⁷. An extensive description of the procedure could be found in the Supplemental Information. Briefly, GGMs rely on full-order partial correlations therefore a correlation between two metabolites only exists if it is independent from all remaining metabolites in the data set. Significant partial correlations after Bonferroni correction were visualized as network using Cytoscape 3.2.1. Statistical analyses were performed using R 3.5.2 (R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria).

Data availability

SHIP data are publicly available for scientific and quality control purposes. Data usage can be applied for via www.community-medicine.de.

Received: 9 July 2018; Accepted: 6 January 2020;

Published online: 30 January 2020

References

- Daniels, S. R. *et al.* Overweight in children and adolescents: pathophysiology, consequences, prevention, and treatment. *Circulation* **111**, 1999–2012, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000161369.71722.10> (2005).
- Solomon, C. G. & Manson, J. E. Obesity and mortality: a review of the epidemiologic data. *Am J Clin Nutr* **66**, 1044S–1050S (1997).
- Grundy, S. M. *et al.* Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, e13–18, <https://doi.org/10.1161/01.ATV.000011245.75752.C6> (2004).
- Zhang, Y. *et al.* Fat cell size and adipokine expression in relation to gender, depot, and metabolic risk factors in morbidly obese adolescents. *Obes.* **22**, 691–697, <https://doi.org/10.1002/oby.20528> (2014).
- White, U. A. & Tchoukalova, Y. D. Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 377–392, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.006> (2014).
- Karlsson, T. *et al.* Contribution of genetics to visceral adiposity and its relation to cardiovascular and metabolic disease. *Nat. Med.* **25**, 1390–1395, <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0563-7> (2019).
- Koster, A. *et al.* Fat distribution and mortality: the AGES-Reykjavik Study. *Obes.* **23**, 893–897, <https://doi.org/10.1002/oby.21028> (2015).
- Kuk, J. L. *et al.* Visceral fat is an independent predictor of all-cause mortality in men. *Obes.* **14**, 336–341, <https://doi.org/10.1038/oby.2006.43> (2006).
- Palmer, B. F. & Clegg, D. J. The sexual dimorphism of obesity. *Mol. Cell Endocrinol.* **402**, 113–119, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.11.029> (2015).
- Baek, S. H. *et al.* Metabolites distinguishing visceral fat obesity and atherogenic traits in individuals with overweight. *Obes.* **25**, 323–331, <https://doi.org/10.1002/oby.21724> (2017).
- Boulet, M. M. *et al.* Alterations of plasma metabolite profiles related to adipose tissue distribution and cardiometabolic risk. *Am. J. physiology. Endocrinol. Metab.* **309**, E736–746, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00231.2015> (2015).
- Maltais-Payette, T., Boulet, M. M., Prehn, C., Adamski, J. & Tchernof, A. Circulating glutamate concentration as a biomarker of visceral obesity and associated metabolic alterations. *Nutr. Metab.* **15**, 78, <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0316-5> (2018).
- Menni, C. *et al.* Metabolomic profiling to dissect the role of visceral fat in cardiometabolic health. *Obes.* **24**, 1380–1388, <https://doi.org/10.1002/oby.21488> (2016).

14. Pallister, T. *et al.* Untangling the relationship between diet and visceral fat mass through blood metabolomics and gut microbiome profiling. *Int. J. Obes.* **41**, 1106–1113, <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.70> (2017).
15. Rietman, A. *et al.* Associations between plasma branched-chain amino acids, beta-aminoisobutyric acid and body composition. *J. nutritional Sci.* **5**, e6, <https://doi.org/10.1017/jns.2015.37> (2016).
16. Scherer, M. *et al.* Blood plasma lipidomic signature of epicardial fat in healthy obese women. *Obes.* **23**, 130–137, <https://doi.org/10.1002/oby.20925> (2015).
17. Takashina, C. *et al.* Associations among the plasma amino acid profile, obesity, and glucose metabolism in Japanese adults with normal glucose tolerance. *Nutr. Metab.* **13**, 5, <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0059-5> (2016).
18. Yamakado, M. *et al.* Plasma amino acid profile is associated with visceral fat accumulation in obese Japanese subjects. *Clin. Obes.* **2**, 29–40, <https://doi.org/10.1111/j.1758-8111.2012.00039.x> (2012).
19. Pietzner, M. *et al.* Comprehensive metabolic profiling of chronic low-grade inflammation among generally healthy individuals. *BMC Med.* **15**, 210, <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0974-6> (2017).
20. Franks, P. W. & Atabaki-Pasdar, N. Causal inference in obesity research. *J. Intern. Med.* **281**, 222–232, <https://doi.org/10.1111/joim.12577> (2017).
21. Wang, T. J. *et al.* Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat. Med.* **17**, 448–453, <https://doi.org/10.1038/nm.2307> (2011).
22. Soga, T. *et al.* Serum metabolomics reveals gamma-glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J. Hepatol.* **55**, 896–905, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.031> (2011).
23. Lees, H. J., Swann, J. R., Wilson, I. D., Nicholson, J. K. & Holmes, E. Hippurate: the natural history of a mammalian-microbial cometabolite. *J. Proteome Res.* **12**, 1527–1546, <https://doi.org/10.1021/pr300900b> (2013).
24. Green, C. R. *et al.* Branched-chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 15–21, <https://doi.org/10.1038/nchembio.1961> (2016).
25. Menni, C. *et al.* Biomarkers for type 2 diabetes and impaired fasting glucose using a nontargeted metabolomics approach. *Diabetes* **62**, 4270–4276, <https://doi.org/10.2337/db13-0570> (2013).
26. Newgard, C. B. *et al.* A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab.* **9**, 311–326, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002> (2009).
27. Moore, S. C. *et al.* Human metabolic correlates of body mass index. *Metabolomics* **10**, 259–269, <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0574-1> (2014).
28. Tai, E. S. *et al.* Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. *Diabetologia* **53**, 757–767, <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1637-8> (2010).
29. Lynch, C. J. & Adams, S. H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat. reviews. Endocrinol.* **10**, 723–736, <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.171> (2014).
30. Lotta, L. A. *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 Med.* **13**, e1002179, <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002179> (2016).
31. Yoneshiro, T. *et al.* BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nat.* **572**, 614–619, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1503-x> (2019).
32. Brendle, C. *et al.* Correlation of Brown Adipose Tissue with Other Body Fat Compartments and Patient Characteristics: A Retrospective Analysis in a Large Patient Cohort Using PET/CT. *Academic radiology* **25**, 102–110, <https://doi.org/10.1016/j.acra.2017.09.007> (2018).
33. Mathieu, P., Boulanger, M. C. & Despres, J. P. Ectopic visceral fat: a clinical and molecular perspective on the cardiometabolic risk. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **15**, 289–298, <https://doi.org/10.1007/s11554-014-9299-3> (2014).
34. Van Gaal, L. F., Mertens, I. L. & De Block, C. E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nat.* **444**, 875–880, <https://doi.org/10.1038/nature05487> (2006).
35. Bridges, R. J. & Meister, A. gamma-Glutamyl amino acids. Transport and conversion to 5-oxoproline in the kidney. *J. Biol. Chem.* **260**, 7304–7308 (1985).
36. Dumas, M. E., Kinross, J. & Nicholson, J. K. Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease. *Gastroenterology* **146**, 46–62, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.001> (2014).
37. Byrne, C. D. Ectopic fat, insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Proc. Nutr. Soc.* **72**, 412–419, <https://doi.org/10.1017/S0029665113001249> (2013).
38. Wild, A. C., Moinova, H. R. & Mulcahy, R. T. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* **274**, 33627–33636 (1999).
39. Park, U. H. *et al.* Piperine, a component of black pepper, inhibits adipogenesis by antagonizing PPARgamma activity in 3T3-L1 cells. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 3853–3860, <https://doi.org/10.1021/jf204514a> (2012).
40. Tang, X. *et al.* Pharmacological enhancement of KCC2 gene expression exerts therapeutic effects on human Rett syndrome neurons and Mecp2 mutant mice. *Science translational medicine* **11**, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau0164> (2019).
41. Ma, Z. G. *et al.* Piperine Attenuates Pathological Cardiac Fibrosis Via PPAR-gamma/AKT Pathways. *EBioMedicine* **18**, 179–187, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.021> (2017).
42. Okumura, Y., Narukawa, M. & Watanabe, T. Adiposity suppression effect in mice due to black pepper and its main pungent component, piperine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1545–1549, <https://doi.org/10.1271/bbb.100117> (2010).
43. Derosa, G., Maffioli, P. & Sahebkar, A. Piperine and Its Role in Chronic Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **928**, 173–184, https://doi.org/10.1007/978-3-319-41334-1_8 (2016).
44. Zhang, W. L., Zhu, L. & Jiang, J. G. Active ingredients from natural botanicals in the treatment of obesity. *Obes. reviews: an. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **15**, 957–967, <https://doi.org/10.1111/obr.12228> (2014).
45. Wilmanski, T. *et al.* Blood metabolome predicts gut microbiome alpha-diversity in humans. *Nat. Biotechnol.* **37**, 1217–1228, <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0233-9> (2019).
46. Nicholson, J. K. *et al.* Host-gut microbiota metabolic interactions. *Sci.* **336**, 1262–1267, <https://doi.org/10.1126/science.1223813> (2012).
47. Wen, L. & Duffy, A. Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes. *The Journal of nutrition*, <https://doi.org/10.3945/jn.116.240754> (2017).
48. Suchy-Dicey, A. M. *et al.* Tubular Secretion in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 2148–2155, <https://doi.org/10.1681/asn.2014121193> (2016).
49. Rivara, M. B. *et al.* Diurnal and Long-term Variation in Plasma Concentrations and Renal Clearances of Circulating Markers of Kidney Proximal Tubular Secretion. *Clin. Chem.* **63**, 915–923, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.260117> (2017).
50. Krumsiek, J. *et al.* Mining the unknown: a systems approach to metabolite identification combining genetic and metabolic information. *PLoS Genet.* **8**, e1003005, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003005> (2012).
51. Blaschke, E. & Hertting, G. Enzymic methylation of L-ascorbic acid by catechol O-methyltransferase. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1363–1370 (1971).
52. Wallace, D. L. *et al.* Genotype status of the dopamine-related catechol-O-methyltransferase (COMT) gene corresponds with desirability of “unhealthy” foods. *Appetite* **92**, 74–80, <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.05.004> (2015).
53. Need, A. C., Ahmadi, K. R., Spector, T. D. & Goldstein, D. B. Obesity is associated with genetic variants that alter dopamine availability. *Ann. Hum. Genet.* **70**, 293–303, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00228.x> (2006).

54. Staley, J. R. *et al.* PhenoScanner: a database of human genotype-phenotype associations. *Bioinforma.* **32**, 3207–3209, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw373> (2016).
55. Stewart, P. M., Boulton, A., Kumar, S., Clark, P. M. & Shackleton, C. H. Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone->cortisol conversion in subjects with central adiposity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 1022–1027, <https://doi.org/10.1210/jcem.84.3.5538> (1999).
56. Andrew, R., Phillips, D. I. & Walker, B. R. Obesity and gender influence cortisol secretion and metabolism in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 1806–1809, <https://doi.org/10.1210/jcem.83.5.4951> (1998).
57. Pasquali, R. *et al.* The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in obese women with different patterns of body fat distribution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 341–346, <https://doi.org/10.1210/jcem.77.2.8393881> (1993).
58. Bujalska, I. J., Kumar, S. & Stewart, P. M. Does central obesity reflect “Cushing’s disease of the omentum”? *Lancet* **349**, 1210–1213, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)11222-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)11222-8) (1997).
59. Stimson, R. H. *et al.* Cortisol release from adipose tissue by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in humans. *Diabetes* **58**, 46–53, <https://doi.org/10.2337/db08-0969> (2009).
60. Völzke, H. *et al.* Cohort Profile: The Study of Health in Pomerania. *Int. J. Epidemiol.* **40**, 294–307, <https://doi.org/10.1093/ije/dyp394> (2011).
61. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, E. & Treatment of High Blood Cholesterol in, A. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **106**, 3143–3421 (2002).
62. IDF International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, <http://www.idf.org/home/index.cfm?node=1429> (2005).
63. Muller, H. P. *et al.* Quantification of human body fat tissue percentage by MRI. *NMR Biomed.* **24**, 17–24, <https://doi.org/10.1002/nbm.1549> (2011).
64. Knacke, H. *et al.* Metabolic Fingerprints of Circulating IGF-1 and the IGF-1/IGFBP-3 Ratio: A Multifluid Metabolomics Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 4730–4742, <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2588> (2016).
65. Piontek, U. *et al.* Sex-specific metabolic profiles of androgens and its main binding protein SHBG in a middle aged population without diabetes. *Sci. Rep.* **7**, 2235, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02367-y> (2017).
66. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Ser. B* **57**, 289–300 (1995).
67. Do, K. T. *et al.* Network-based approach for analyzing intra- and interfluid metabolite associations in human blood, urine, and saliva. *J. Proteome Res.* **14**, 1183–1194, <https://doi.org/10.1021/pr501130a> (2015).

Acknowledgements

This work was funded by grants from the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF, grants 01ZZ0403, 01ZZ0103, 01GI0883, AtheroSysMed 03IS2061B), the Ministry for Education, Research and Cultural Affairs, as well as the Ministry of Social Affairs of the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania. This work is also part of the research project Greifswald Approach to Individualized Medicine (GANI_MED). The GANI_MED consortium is funded by the Federal Ministry of Education and Research and the Ministry of Cultural Affairs of the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania (03IS2061A). A part of this study was supported by the German Center Diabetes Research (DZD e.V.) grant to J.A. We would like to thank Bianca Schmitt from Genome Analysis Center for expert technical assistance.

Author contributions

L.O. and M.P. conceptualized the study and wrote the manuscript. A.K., G.K. and N.F. contributed to the interpretation of the results and assisted in writing the manuscript. G.K., K.B., A.A. and J.A. performed metabolomics measurements and assisted in the interpretation of the results. H.V. is head of the SHIP. M.N. provided laboratory data. J.K. and G.K. reviewed statistical analyses. N.F. and M.P. analyzed the data. J.P. was responsible for MRI measurements. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.


Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58430-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020