

Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE)  
Abteilung Klinische Ernährung

---

**Bioinformatische Analyse der NUGAT-Studie**  
*(NUTriGenomic Analysis in Twins)*

-

**Verfahren zur Integration lipidomischer,  
transkriptomischer und metabolischer Daten**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
Turid Frahnow

Potsdam, Oktober 2016

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-394902  
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-394902>

*Meinem Vater und Herrn Hans-Peter Joos*



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Einfluss der Ernährung auf den Metabolismus . . . . .	1
1.1.1 Diätinduzierte metabolische Erkrankungen . . . . .	1
1.1.2 Makronährstoff Fett . . . . .	2
1.1.2.1 Hochfett- vs. hyperkalorische Diät . . . . .	2
1.1.3 Lipide . . . . .	4
1.1.3.1 Charakterisierung der Lipide . . . . .	4
1.1.3.2 <i>Lipidomics</i> . . . . .	7
1.1.3.3 Lipide im Blut . . . . .	8
1.1.3.4 Lipidabhängige Pathomechanismen . . . . .	9
1.1.4 Fettgewebe als endokrines Organ . . . . .	11
1.1.4.1 Charakterisierung . . . . .	11
1.1.4.2 Hypertrophie und Hyperplasie des weißen Fettgewebes	12
1.1.4.3 <i>Toll-like receptors</i> und Inflammasom . . . . .	13
1.2 Zusammenspiel von Ernährung und Genetik . . . . .	15
1.2.1 Zwillingsstudien . . . . .	15
1.2.2 Erblichkeit (Heritabilität) . . . . .	15
1.2.3 Nutrigenetik/Nutrigenomik . . . . .	16
1.3 Zielstellung dieser Arbeit . . . . .	17
1.4 Bisherige Ergebnisse der NUGAT-Studie . . . . .	18
1.4.1 Einhaltung der Diäten . . . . .	18
1.4.2 Weitere Ergebnisse . . . . .	19
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1 Material . . . . .	20

2.2	Methoden . . . . .	20
2.2.1	Ziel der Studie . . . . .	20
2.2.2	Probandenauswahl . . . . .	21
2.2.3	Kohorte der Studienteilnehmer . . . . .	22
2.2.4	Studienverlauf . . . . .	23
2.2.5	<i>Compliance</i> der Studienteilnehmer . . . . .	25
2.2.6	Methoden zur Datenerhebung . . . . .	26
2.2.6.1	Blutparameter . . . . .	26
2.2.6.2	<i>Lipidomics</i> . . . . .	26
2.2.6.3	Genexpressionsdaten . . . . .	28
2.2.7	Statistik . . . . .	30
2.2.7.1	Allgemein . . . . .	30
2.2.7.2	Netzwerkanalyse . . . . .	32
2.2.7.3	Heritabilität . . . . .	32
2.2.7.4	Lineare gemischte Modelle (LMMs) . . . . .	35
2.2.7.5	Verfahren zur Dimensionsreduktion . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Metabolische Reaktion auf die Hochfettdiät . . . . .	39
3.1.1	Anthropometrie . . . . .	39
3.1.2	Routinelabor . . . . .	41
3.1.2.1	Glukosestoffwechsel . . . . .	41
3.1.2.2	Fettstoffwechsel . . . . .	42
3.2	Transkriptomische Reaktion im subkutanen, weißen Fettgewebe . . . . .	43
3.2.1	Inflammatorisches Netzwerk . . . . .	43
3.2.1.1	Visualisierung als diätunabhängige Netzwerke . . . . .	45
3.2.1.2	Verifizierung . . . . .	46
3.3	<i>Lipidomics</i> . . . . .	49
3.3.1	Entwicklung der Lipidkonzentrationen unter einer Hochfettdiät . . . . .	49
3.3.2	Einflussfaktoren auf Lipidkonzentrationen . . . . .	52
3.3.3	Erblichkeit der Lipide . . . . .	56
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1	Metabolische Reaktionen auf Hochfettdiäten . . . . .	59
4.2	Transkriptom und die Interaktion mit Hochfettdiäten . . . . .	62
4.3	Lipidom und die Interaktion mit Hochfettdiäten . . . . .	64
4.4	Methodik . . . . .	68

<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<i>Summary</i>	<b>73</b>
	<b>Literatur</b>	<b>75</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>i</b>
	Abbildungen . . . . .	i
	Tabellen . . . . .	viii
	Eidesstattliche Versicherung . . . . .	xxii
	Danksagung . . . . .	xxiii
	Lebenslauf . . . . .	xxiv
	Veröffentlichungen . . . . .	xxv
	Publikationen . . . . .	xxv
	Kongressbeiträge . . . . .	xxv

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Allgemeine Strukturformeln der häufigsten Lipidklassen. . . . .	6
1.2	<i>Lipidomics</i> im Kontext der <i>Omics</i> -Familie. . . . .	7
1.3	Schematische Darstellung des TLR-Signalwegs und des Inflammasoms. . . . .	14
2.1	Studiendesign. . . . .	23
2.2	Definition der Erbllichkeit (Heritabilität). . . . .	33
3.1	Geschlechtsspezifische Gewichtsentwicklung. . . . .	40
3.2	Individuelle Entwicklung der Lipoproteine zwischen LF und HF6. . . . .	43
3.3	Überlagertes Netzwerk der basalen Genexpressionen (LF, HF1, HF6) der 17 Kandidatenbiomarker. . . . .	45
3.4	Überlagertes Netzwerk der Genexpressionsveränderungen ( $\Delta_{LF, HF1}$ , $\Delta_{HF1, HF6}$ , $\Delta_{LF, HF6}$ ) der 17 Kandidatenbiomarker. . . . .	46
3.5	Individuelle Veränderung der Genexpression von Caspase1 zwischen LF und HF6. . . . .	47
3.6	Abhängigkeit der Genexpression innerhalb des Netzwerks. . . . .	48
3.7	Entwicklung der Konzentrationen der Lipidklassen. . . . .	50
3.8	Kreisdiagramme der klassenabhängigen Veränderungen der Lipidkonzentrationen. . . . .	51
3.9	Relative Flexibilität der Lipidspezies (n = 150). . . . .	52
3.10	Einfluss von Alter und BMI auf die Plasmakonzentrationen der Lipidklassen. . . . .	54
3.11	Einfluss von Alter, Geschlecht und BMI auf die Plasmakonzentrationen der Lipidspezies. . . . .	55
3.12	Verteilung der Varianz der Konzentrationen der Lipidklassen(A) und der Lipidspezies (B). . . . .	57
A.1	Flussdiagramm der vorangehenden Analyse des Lipidomdatensatzes. . . . .	i
A.2	Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an LF. . . . .	ii
A.3	Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an HF1. . . . .	ii

---

A.4	Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an HF6. . . . .	iii
A.5	Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an $\Delta_{LF, HF1}$ . . . . .	iii
A.6	Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an $\Delta_{HF1, HF6}$ . . . . .	iv
A.7	Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an $\Delta_{LF, HF6}$ . . . . .	iv
A.8	Abhängigkeit der Genexpression innerhalb des Netzwerks von der Caspase1-Änderung. . . . .	v
A.9	Individuelle Veränderung der Genexpression von CD11c zwischen LF und HF6. . . . .	v
A.10	Abhängigkeit der Genexpression innerhalb des Netzwerks von der CD11c-Stratifizierung. (Teil 1) . . . . .	vi
A.11	Abhängigkeit der Genexpression innerhalb des Netzwerks von der CD11c-Stratifizierung. (Teil 2) . . . . .	vii

# Tabellenverzeichnis

1.1	Vergleich der Zusammensetzung der Makronährstoffe mit den Studienvorgaben. . . . .	19
2.1	Materialliste NUGAT-Studie. . . . .	20
2.2	Deskriptive der Studienkohorte zum <i>Screening</i> . . . . .	22
2.3	Angestrebte Zusammensetzung der Diät in den einzelnen Studienphasen.	23
2.4	Charakterisierung der gemessenen Lipide in der NUGAT-Studie. . . .	28
2.5	Auflistung der Gene, deren Expression mittels quantitativer <i>realtime</i> Polymerasekettenreaktion gemessen wurden. . . . .	29
3.1	Verlauf anthropometrischer Daten während der Studie. . . . .	39
3.2	Verlauf klassischer Marker des Glukosestoffwechsels während der Studie.	41
3.3	Verlauf klassischer Marker des Fettstoffwechsels während der Studie.	42
3.4	Exemplarische Darstellung der Zusammenhänge im inflammatorischen Netzwerk. . . . .	44
3.5	Einfluss von BMI, Geschlecht und Alter (linear und quadratisch) auf die Plasmakonzentrationen der Lipidklassen. . . . .	53
3.6	Varianzverteilung anhand der linearen gemischten Modelle basierend auf der CID-abhängigen ACE-Modellierung (LF, HF1, HF6) für die Plasmakonzentrationen der Lipidklassen. . . . .	58
A.1	Methoden zur Bestimmung der Blutparameter. . . . .	viii
A.2	Auswahl der verglichenen Modelle. . . . .	ix
A.3	Darstellung der Zusammenhänge im inflammatorischen Netzwerk. . .	x
A.4	Varianzverteilung anhand der linearen gemischten Modelle basierend auf der CID-abhängigen ACE-Modellierung (LF, HF1, HF6) für die Plasmakonzentrationen der Lipidspezies. . . . .	xvii

# Abkürzungsverzeichnis

♀/♂	: weiblich/männlich
Abb.	: Abbildung
Acetyl-CoA	: Acetyl-Coenzym A
AIC	: Akaikes Informationskriterium (engl. <i>Akaike information criterion</i> )
ALT	: Alanin-Aminotransferase
ANOVA	: Varianzanalyse (engl. <i>analysis of variance</i> )
arith.Mittel	: arithmetisches Mittel/Mittelwert
ASC	: <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i> (engl.), Synonym: PYCARD
AST	: Aspartat-Aminotransferase
BH	: Benjamini-Hochberg
BIC	: Bayes'sches Informationskriterium (engl. <i>Bayesian information criterion</i> )
BMI	: Körpermasseindex (engl. <i>body mass index</i> )
c	: Konzentration
CCL5	: <i>Chemokine (C-C Motif) Ligand 5</i> (engl.), Synonym des Gens: <i>RANTES</i>
CCR2	: <i>C-C motif chemokine receptor 2</i> (engl.)
CD11c	: <i>cluster of differentiation 11c</i> (engl.), Synonym des Gens: <i>ITGAX</i>
CD14	: <i>cluster of differentiation 14</i> (engl.)
cDNA	: komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CER	: Ceramid
CID	: klinischer Untersuchungstag (engl. <i>clinical investigation day</i> )
CRP	: C-reaktives Protein
$\Delta$	: Differenz
DAG	: Diacylglycerid
DAMPs	: Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>Damage-associated molecular patterns</i> )

DEXA	:	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
DGE	:	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DIfE	:	Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
DNA	:	Desoxyribonukleinsäure, Träger der Erbinformation
DZ	:	dizygote/zweieiige Zwillinge
ELISA	:	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMR1	:	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone 1 receptor-like 1</i> (engl.) Synonym des Gens: <i>F4/80</i>
engl.	:	englisch
ER	:	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	:	und andere (lat. <i>et alii</i> )
F <sub>1</sub> -Generation	:	Tochtergeneration 1.Ordnung (lat. <i>filia</i> )
FDR	:	<i>false discovery rate</i> (engl.)
γGT	:	γ-Glutamyltransferase
h <sup>2</sup>	:	Heritabilitätskoeffizient
HbA <sub>1c</sub>	:	ein Glykohämoglobin
HDL	:	Lipoprotein hoher Dichte (engl. <i>high-density lipoprotein</i> )
HDL/Chol	:	HDL-Gesamtcholesterin-Verhältnis
HF1	:	zweiter klinischer Untersuchungstag nach einer Woche kohlenhydratarmer, fettreicher Ernährung (engl. <i>high-fat</i> )
HF6	:	dritter klinischer Untersuchungstag nach sechs Wochen kohlenhydratarmer, fettreicher Ernährung (engl. <i>high-fat</i> )
HFD	:	Diät mit hohem Fettgehalt (engl. <i>high fat diet</i> )
HOMA-IR	:	<i>Homeostatic model assessment - Insulin resistance</i> (engl.)
HSD	:	<i>Honestly Significant Difference</i> (engl.)
IHL	:	intrahepatischer Lipidgehalt
IKBα	:	<i>Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B cells inhibitor alpha</i> (engl.), Synonym: NFKBIA
IL1β	:	Interleukin 1 beta
IL1ra	:	Interleukin 1 Rezeptorantagonist
IL6	:	Interleukin 6
IL18	:	Interleukin 18
IQR	:	Interquartilsabstand
ivGTT	:	intravenöser Glukosetoleranztest
Kap.	:	Kapitel
kcal	:	Kilokalorie
kJ	:	Kilojoule

---

lat.	: latein(isch)
LDL	: Lipoprotein niederer Dichte (engl. <i>low-density lipoprotein</i> )
LF	: erster klinischer Untersuchungstag nach sechs Wochen kohlenhydratreicher, fettarmer Ernährung (engl. <i>low-fat</i> )
LFD	: Diät mit niedrigem Fettgehalt (engl. <i>low fat diet</i> )
LMMs	: Lineare gemischte Modelle (engl. <i>linear mixed model</i> )
ln	: natürlicher Logarithmus
log	: Logarithmus mit nicht soezifizierter Basis
LPA	: Lysophosphatidsäure
LPC	: Lysophosphatidylcholin
LPE	: Lysophosphatidylethanolamin
LPS	: Lipopolysaccharide
MAG	: Monoacylglycerid
MCP1	: Monozyten-chemoattraktives Protein 1, Synonym: CCL2
MRC1	: <i>mannose receptor, C type 1</i> (engl.)
mRNA	: Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger RNA</i> )
Mrd.	: Milliarden ( $10^9$ )
MRT	: Magnetresonanztomographie
MS	: Massenspektrometrie
MS/MS	: Tandem-Massenspektrometrie
MTT	: Mahlzeitentoleranztest
MUFA	: einfachungesättigte Fettsäuren (engl. <i>monounsaturated fatty acids</i> )
MZ	: monozygote/eineiige Zwillinge
n	: Stichprobengröße
n.s.	: nicht signifikant
N/A	: nicht verfügbar (engl. <i>not available</i> )
NAFLD	: nicht-alkoholinduzierte Fettleber (engl. <i>non-alcoholic fatty liver disease</i> )
NALP3	: <i>NACHT, LRR and PYD domains containing protein 3</i> (engl., Synonym: Cryopyrin, Gen: <i>NLRP3</i> )
NC	: Ernährungsberatung (engl. <i>nutritional counseling</i> )
NEFAs	: freie, unveresterte Fettsäuren (engl. <i>Non Esterified Fatty Acids</i> )
NF $\kappa$ B	: <i>Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i> (engl.)
<i>NLRP3</i>	: <i>NLR family, pyrin domain containing 3</i> (engl., Gen von NALP3/Cryopyrin)

NUGAT	:	<i>NUtriGenomic Analysis in Twins</i> (Studie)
oGTT	:	oraler Glukosetoleranztest
P-Generation	:	Elterngeneration (lat. <i>parental</i> )
PAMPs	:	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> )
PC	:	Phosphatidylcholin
PC-O	:	Phosphatidylcholinether
PCA	:	Hauptkomponentenanalyse (engl. <i>principal component analysis</i> )
PCR	:	Polymerasekettenreaktion
PE	:	Phosphatidylethanolamin
PE-O	:	Phosphatidylethanolaminether
PI	:	Phosphatidylinositol
PUFA	:	mehrfachungesättigte Fettsäuren (engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
QDC	:	Quartilsdispersionskoeffizient (engl. <i>quartile dispersion coefficient</i> )
QTL	:	Region eines quantitativen Merkmals (engl. <i>Quantitative Trait Locus</i> )
rel.	:	relativ(e)
REML	:	<i>restricted maximum likelihood</i> (engl.)
RNA	:	Ribonukleinsäure
ROS	:	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
<i>RPL32</i>	:	60s ribosomales Protein L32
<i>RPLP0</i>	:	ribosomales Phosphoprotein 0
Scr	:	Erstuntersuchung/ <i>Screening</i>
SD	:	Standardabweichung
SE	:	Sterolester
SFA	:	gesättigte Fettsäuren (engl. <i>saturated fatty acids</i> )
SM	:	Sphingomyelin
Sn	:	<i>stereospecific numbering</i> (engl.)
SNP	:	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
ST	:	Sterol
STP	:	standardisierte Ernährungsphase
Tab	:	Tabelle
TAG	:	Triacylglycerid
TLR2	:	<i>toll-like receptor 2</i> (engl.)

TLR4	: <i>toll-like receptor 4</i> (engl.)
TNF $\alpha$	: Tumornekrosefaktor alpha
V	: Volumen
vgl.	: vergleiche
vLDL	: Lipoprotein sehr niederer Dichte (engl. <i>very low-density lipoprotein</i> )
WAT	: weißes Fettgewebe (engl. <i>white adipose tissue</i> )
WHO	: Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>world health organisation</i> )
WHR	: Taille-Hüft-Verhältnis (engl. <i>waist-to-hip ratio</i> )



# 1 Einleitung

## 1.1 Einfluss der Ernährung auf den Metabolismus

Nahrung ist die Grundlage jedes heterotrophen Organismus, einschließlich des Menschen. Dabei erfüllen die Nahrungsmittel, die sich zu einem Großteil aus Wasser und sechs Nährstoffgruppen (Kohlenhydrate, Fett, Proteine, Vitamine, Mineralstoffe und Spurenelemente) zusammensetzen, die Aufgabe das Wachstum und die Entwicklung von Geweben zu gewährleisten und Energie zum Aufrechterhalten des Stoffwechsels bereitzustellen (BIESALSKI, 2015). Ein wichtiger Faktor ist hierbei die Energiehomöostase, das heißt das Gleichgewicht von Energieaufnahme und Energieverbrauch. Sowohl die Unter- als auch die Überversorgung kann zu Störungen des Metabolismus und damit zu klinischen Symptomen führen, welche wiederum unter bestimmten Rahmenbedingungen metabolische Erkrankungen nach sich ziehen können.

### 1.1.1 Diätinduzierte metabolische Erkrankungen

Nach HASLAM & JAMES (2005) ist ein exzessives Körpergewicht der sechst wichtigste Risikofaktor für die weltweite Gesamtlast von Krankheiten. Exzessives Körpergewicht wird durch eine positive Energiebilanz verursacht (Energieaufnahme > Energieverbrauch), da der Metabolismus die überschüssige Energie in Form von Körperfett speichert, um die Energiehomöostase zu gewährleisten.

Zu unterscheiden sind dabei die beiden über den *body mass index* (BMI) definierten Kategorien des Übergewichts ( $25 \leq \text{BMI} < 30$ ) und der Adipositas ( $\text{BMI} \geq 30$ ), wobei über den BMI das Körpergewicht in Relation zur Körpergröße gesetzt wird (BIESALSKI, 2015).

Bei Übergewicht und Adipositas besteht ein erhöhtes Risiko für metabolische Folgeerscheinungen wie Insulinresistenz, Hyperglykämie und eine eingeschränkte Funktion der  $\beta$ -Zellen (GALLAND, 2010; KIM *et al.*, 2007). Insbesondere aber eine Adipositas gilt als ein multifaktorielles Gesundheitsproblem basierend auf genetischen, umwelt- und verhaltensbedingten Faktoren, das verschiedene Erkrankungen wie die nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD), Diabetes mellitus, Osteoarthritis, kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs begünstigt (NAM *et al.*, 2015).

Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ergaben, dass 2005 etwa 1,1 Mrd. Menschen über 18 (ca. 17 % der damaligen Weltbevölkerung) und 10 % der Kinder übergewichtig oder adipös waren (HASLAM & JAMES, 2005), wobei die Tendenz weiter steigt und für Erwachsene für 2030 auf 57,8 % weltweit geschätzt wird (CHEN *et al.*, 2011). Neuere Schätzungen der WHO für 2014 gehen zudem davon aus, dass weltweit 10,7 % der Männer und 15,2 % der Frauen adipös sind, wobei die Werte für Deutschland bei 21,9 % für Männer und 18,5 % für Frauen zumindest für die Männer deutlich über dem Median der 194 Mitgliedsstaaten von 17,2 % (Ländermedian für Frauen: 22,9 %) liegen (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Neben der Fettleibigkeit kann es über eine positive Energiebilanz zu weiteren metabolischen Störungen kommen, wie etwa zur Dyslipidämie/Dyslipoproteinämie oder auch Hyperlipidämie. Diese ist über hohe Serumkonzentrationen des Cholesterols und der Triacylglyceride, sowie hohe Konzentration der Lipoproteine (sehr) niedriger Dichte (LDL und vLDL) und niedrige Konzentrationen der Lipoproteine hoher Dichte (HDL) charakterisiert (ESTEVE *et al.*, 2005). Die Hyperlipidämie gilt dabei als Hauptrisikofaktor für eine koronare Herzerkrankung (MIAO *et al.*, 2015).

DE LORGERIL *et al.* (1999) hatten allerdings früher gezeigt, dass eine kardioprotektive Diät die Rate eines wiederholten Vorfalles bei koronarer Herzerkrankung unabhängig der anderen Risikofaktoren verringern kann.

Damit beeinflusst Ernährung das Risiko für sowohl metabolische als auch kardiovaskuläre Erkrankungen maßgeblich (ESTRUCH *et al.*, 2013; DE LORGERIL *et al.*, 1999).

### 1.1.2 Makronährstoff Fett

Zu den Makronährstoffen - relativ große Verbindungen, die der Organismus aufnimmt, um Energie produzieren zu können - gehören Proteine, Kohlenhydrate und Fette (BIESALSKI, 2015). Fette stellen dabei die größte Menge physiologisch verwertbarer Energie zur Verfügung mit etwa 37 kJ/g (9 kcal/g), während die physiologische Energiedichte von Proteinen und Kohlenhydraten etwa bei 17 kJ/g (4 kcal/g) liegt (HALLER *et al.*, 2013).

#### 1.1.2.1 Hochfett- vs. hyperkalorische Diät

Die Ernährungsrichtlinien verschiedener Länder (u.a. auch Deutschland vertreten durch die Deutsche Gesellschaft für Ernährung [DGE]) sehen dabei insbesondere eine fettreiche Ernährung als ungesund an (WOLFRAM *et al.*, 2015; MCGUIRE, 2011), da sie in Relation zu einer Diät reich an Kohlenhydraten mit einer verstärkten Dyslipidämie und Insulinresistenz, sowie einer subklinischen Inflammation verknüpft werden

kann und darüber hinaus die Entwicklung einer Adipositas fördert (HASLAM & JAMES, 2005; GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; MCGUIRE, 2011).

Etwas differenzierter legen die (deutschen) Ernährungsrichtlinien nahe, nicht nur auf die Quantität sondern auch auf die Qualität der Fette zu achten und etwa gesättigte Fette und Fettsäuren mit Doppelbindungen der trans-Konfiguration (sogannte trans-Fettsäuren) zu meiden und an ihrer Stelle mehrfach-ungesättigte Fettsäuren zu konsumieren (WOLFRAM *et al.*, 2015). Der Konsum von etwa 18 % gesättigter Fette, wie es derzeit etwa einer westlichen Diät entspricht (CHOWDHURY *et al.*, 2014), liegt damit deutlich über den Empfehlungen der Richtlinien und gilt als krankheitsfördernd.

Wie KNOWLER *et al.* (2005) und TUOMILEHTO *et al.* (2001) in ihren Interventionsstudien zeigen konnten, manifestierte sich ein Diabetes Typ 2 seltener, wenn die Probanden eine mediterrane Diät konsumierten. ESTRUCH *et al.* (2013) konnten zusätzlich ein verringertes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zeigen. Eine mediterrane Diät ist dabei gekennzeichnet durch den Verzehr von Gemüse, Obst und Fisch, sowie die Verwendung von Olivenöl und das Vermeiden von rotem Fleisch, wodurch die Einnahme von gesättigten Fetten zu Gunsten von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren reduziert wird.

Allerdings wird in vielen Studien, die sich mit dem Einfluss einer bestimmten Ernährungsform befassen, das Gewicht und damit auch die Energiebilanz nur mangelhaft berücksichtigt. In den Ernährungsstudien geht eine Hochfettdiät häufig Hand in Hand mit einer hyperkalorischen Energieaufnahme und damit einer positiven Energiebilanz oder die physische Aktivität der Probanden wird bei gleichbleibender Energieaufnahme gefördert, was wiederum zu einem mit einer hypokalorischen Energieaufnahme verbundenen Gewichtsverlust führen kann. Auf beide Arten wird der Metabolismus *per se* über zwei Einflussgrößen manipuliert, die in der Datenanalyse nicht mehr voneinander unterschieden werden können (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; LUMENG *et al.*, 2006).

So konnte eine Metaanalyse von epidemiologischen Studien keine Verbindung zwischen einer Hochfettdiät und dem Risiko für koronare Erkrankungen nachweisen (CHOWDHURY *et al.*, 2014). Darüber hinaus konnten HARCOMBE *et al.* (2015) über eine Reevaluierung der damaligen Datenlage zeigen, dass die in den Ernährungsrichtlinien der 1970er und 1980er postulierten Zusammenhänge zwischen der reduzierten Aufnahme von Fetten und dem sinkenden Risiko einer koronaren Erkrankung nicht von den damaligen Studien unterstützt wurde und somit zu einer Missinformation der Öffentlichkeit führte.

In den deutschen Richtlinien (WOLFRAM *et al.*, 2015) wird ebenfalls darauf verwiesen, dass die Kontrolle der Energiezufuhr maßgeblich die Ergebnisse zur Risikobewertung beeinflussen kann. Grundsätzlich ist also zwischen einer zum Bedarf isokalorischen Hochfettdiät und einer hyperkalorischen Diät zu unterscheiden.

### 1.1.3 Lipide

Was in den Ernährungswissenschaften als Makronährstoff Fett bezeichnet wird, sind im chemischen Sinne Lipide. Lipide haben als Gruppe von bioaktiven Molekülen neben der Funktion als Energielieferanten noch die Funktion der Energiespeicherung und sind selbst der Grundbaustein jeder biologischen Membran (HORN, 2009). Darüber hinaus sind sie als Botenstoffe aktiv und können Einfluss auf elektrochemische Gradienten in ihrer Umgebung nehmen (WATSON, 2006).

#### 1.1.3.1 Charakterisierung der Lipide

Die Gruppe der Lipide ist schwierig zu definieren, da es viele unterschiedliche Formen und eine hohe Diversität innerhalb der Gruppe gibt. Grob werden sie als hydrophob (wasserunlöslich) oder "löslich in organischen Lösungen" (z.B. Chloroform und Ether) definiert (VANCE & VANCE, 2008). WENK (2005) bietet als Alternative an, Lipide als Fettsäuren, ihre Derivate und Substanzen, die biosynthetisch und funktionell verbunden sind, zu betrachten.

Die Fettsäuren sind dabei als aliphatische Monocarbonsäuren mit zumeist unverzweigter Kohlenstoffkette die strukturell einfachsten Lipide und gleichzeitig Hauptbestandteil anderer Lipidklassen und die kleinste Form der chemischen Energie (WENK, 2005, Abb. 1.1 a)). Sie werden endogen im Zytosol über die Fettsäuresynthetase aus Acetyl-CoA synthetisiert oder in den Mitochondrien über die  $\beta$ -Oxidation abgebaut. Fettsäuren werden über ihre Länge charakterisiert und lassen sich anhand ihres Sättigungsgrades (Anzahl der Doppelbindungen) weiter unterteilen in gesättigte (SAT,  $n = 0$ ), einfach-ungesättigte (MUFA,  $n = 1$ ) und mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (PUFA  $n \geq 2$ ) (BERG *et al.*, 2013).

Über eine Veresterung können Fettsäuren an Cholesterol binden, wodurch die sogenannten (Chole-)Sterolester entstehen (Abb. 1.1 b)). Sie dienen als Zwischenprodukt und Speicherklasse und werden zum Beispiel über Lipoproteine zur Leber transportiert, um dort abgebaut zu werden (MURRAY *et al.*, 2009).

Weitere Moleküle sind als sogenanntes *backbone* (Grundgerüst) zur Bindung von freien Fettsäuren möglich. Sehr viele Lipidklassen nutzen hier Glycerol und werden daher zu den Glycerolipiden gezählt. Entsprechend der Anzahl der kovalent gebundenen

Fettsäurereste, werden sie als Mono- ( $n = 1$ , MAG), Di- ( $n = 2$ , DAG) oder Triacylglyceride ( $n = 3$ , TAG) bezeichnet (Abb. 1.1 c)). Die TAGs stellen dabei die größte Klasse der Speicher- bzw. Reservelipide, während DAGs und MAGs eher als Botenmoleküle fungieren (HORN, 2009).

Ebenfalls zu den Glycerolipiden gehört ein Großteil der Phosphatidsäurederivate oder auch (Glycero-)Phospholipide (Abb. 1.1 d)), die zwei Fettsäurereste binden und eine Kopfgruppe an der Sn3-Position (engl. *stereospecific numbering*) des Glycerolmoleküls aufweisen, die aus einem phosphorylierten Alkohol besteht (z.B. Cholin, Inositol oder Ethanolamin) (CHOWDHURY *et al.*, 2014; BERG *et al.*, 2013). Diese Lipidklassen stellen einen Großteil der Lipide, die zum Aufbau der Zellmembran benötigt werden und gehören damit zu den Strukturlipiden (BERG *et al.*, 2013).

Bildet ein Sphingosin-Molekül das Grundgerüst, spricht man von Sphingolipiden, die sich unter anderem in Ceramide und Sphingomyeline unterteilen. Sphingomyeline unterscheiden sich dabei nur durch die zusätzliche phosphorylierte Kopfgruppe von den Ceramiden (Abb. 1.1 e)). Angehörige beider Klassen nehmen neben der Aufgabe als Membranbausteine Einfluss auf Zellkommunikation, Zellwachstum sowie apoptotische Prozesse (Zelltod) (WATSON, 2006).

Insbesondere bei den Phospholipiden treten Unterklassen auf, wie etwa die Lyso-phospholipide, die statt der möglichen zwei Fettsäurereste nur einen an der Sn1-Position gebunden haben, sowie Etherphospholipide (z.B. Plasmalogene), deren Sn1-Fettsäurerest nicht über eine Esterbindung, sondern eine Etherbindung mit dem *backbone*-Molekül verbunden ist. Somit können sich Lipidspezies (teilweise auch derselben Klasse) deutlich in ihren physikalischen Eigenschaften und ihren biologischen Effekten unterscheiden (CAMPBELL & FARRELL, 2005).

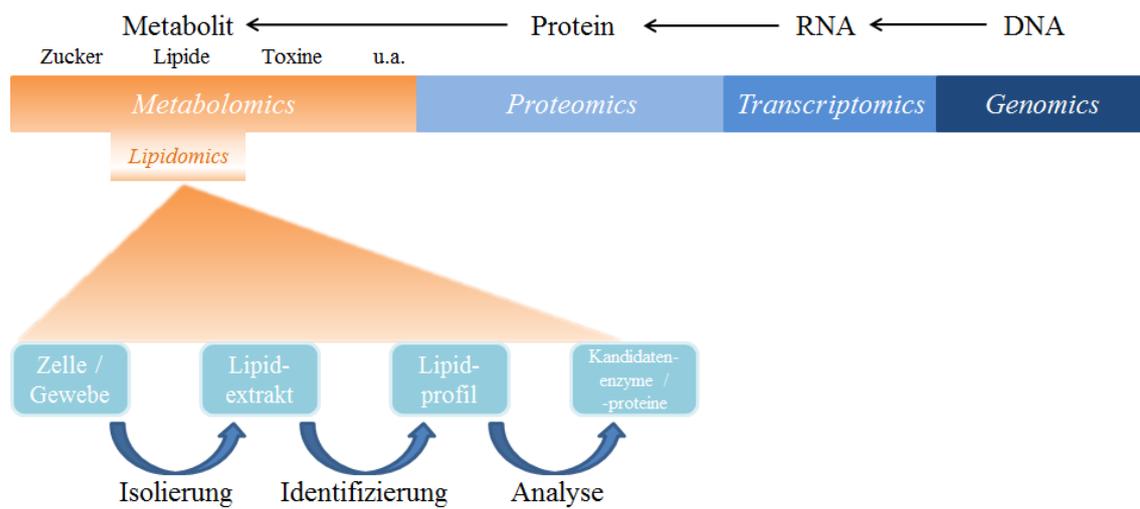
Lipide haben eine bedeutende Rolle in Zellen, Geweben und der Organphysiologie. Darüber hinaus sind Lipidkonzentrationen stark reguliert. Dies gilt sowohl räumlich als auch zeitlich (WENK, 2005).

Durch die Entwicklung modernerer, hochauflösender Methoden hat auch die Erforschung der Lipide in den letzten Jahren eine deutliche Entwicklung durchgemacht, die dazu führt, dass Lipidkonzentrationen sowie -kompositionen in Experimenten und Studien besser adressiert werden können.



### 1.1.3.2 Lipidomics

Eine dieser modernen Techniken, die Zugang zu einem besseren Verständnis des Zusammenspiels der Lipide und dem (menschlichen) Metabolismus liefern sollen, sind die *Lipidomics*. Es handelt sich dabei um eine spezielle Teilmenge der *Metabolomics* (Abb. 1.2), die sich mit der systematischen Charakterisierung von Lipiden und ihrer Stoffwechselprodukte, sowie ihrer Funktion in einem biologischen System beschäftigt (WENK, 2005; WATSON, 2006).



**Abbildung 1.2: Lipidomics im Kontext der Omics-Familie.** *Lipidomics* gehört als spezifische Untergruppe zu den *Metabolomics*, der Messung und Analyse von Metaboliten, zu denen neben den Lipiden auch Kohlenhydrate, Toxine und weitere Untergruppen gehören. *Lipidomics* umfassen dabei die Isolierung, Messung und Analyse der Lipide im Medium, wobei sich letzteres teilweise mit den *Proteomics* überschneiden kann, indem Kandidatenenzyme und -proteine betrachtet werden. (Abbildung geändert nach WENK, 2005)

Dabei ist zu beachten, dass im Gegensatz zu dem ebenfalls häufig adressierten Genom und Proteom (über *Genomics* und *Proteomics*), das Metabolom und in diesem speziellen Fall das Lipidom die Endprodukte der Stoffwechselwege abbilden und damit die Effekte von posttranslationeller Regulation berücksichtigen (WATSON, 2006). Die Verfahren basieren meist auf einer massenspektrometrischen Messung, der mitunter ein chromatographisches Trennsystem vorausgeht, und werden sowohl für tierische als auch pflanzliche Proben verwendet, wobei die Proben sowohl aus Blutserum bzw. -plasma als auch aus Gewebeschnitten oder subzellulären Kompartimenten bestehen können (NAM *et al.*, 2015; HORN & CHAPMAN, 2012). Das so erfasste Lipidprofil (oder auch Lipidom) ermöglicht dabei die Identifizierung der in der Probe vorhandenen Lipidspezies, teilweise bis hin zu den anhängenden Fettsäureresten.

In der Medizin und den Lebenswissenschaften hat sich der Fokus insbesondere auf die Untersuchung des Plasma- bzw. Serumlipidoms gelegt, da über das Blut nicht nur das zirkulierende System sondern auch periphere Gewebe adressiert werden können. *Lipidomics* des Blutes sollten es also ermöglichen den metabolischen Status eines Individuums allgemeiner zu charakterisieren (PURI *et al.*, 2012; QUEHENBERGER & DENNIS, 2011). Dadurch bieten *Lipidomics* auch einen vielversprechenden Ansatz für Wirkstoff- und Biomarkeretablierung (WENK, 2005).

### 1.1.3.3 Lipide im Blut

Da die meisten Lipide wasserunlöslich sind, verläuft der Transport im zirkulierenden System unter anderem über Lipoproteine. Dabei handelt es sich um eine meist sehr diverse Anhäufung von verschiedensten Lipidspezies und (Apolipo-)Proteinen, die sich im Blut durch ihre chemischen Eigenschaften zu Mizellenähnlichen Partikeln zusammenschließen und anhand ihrer physikalischen Dichte grob klassifiziert werden. In den letzten Jahrzehnten wurden daher die Lipoproteine hoher und niedriger Dichte (inkl. ihrer Abstufungen) sowie das Gesamtcholesterin als Stellvertreter für die Lipide im Blut untersucht.

Mit dem Fortschritt der Technik und der Analyse des Lipidoms auf molekularer Ebene kann dabei nicht nur die große Diversität der Lipide adressiert werden, sondern auch genauer die Komposition der Lipidspezies und deren Veränderung unter verschiedensten Bedingungen untersucht werden (MIAO *et al.*, 2015).

Dabei muss beachtet werden, dass das Lipidom nicht allein durch die Aufnahme von Nahrung bestimmt wird, sondern sich aus dem Konsum lipidhaltiger Nahrung und den Produkten des endogenen Metabolismus zusammensetzt, wobei letzterem eine größere Rolle beigemessen werden muss (PARKS & HELLERSTEIN, 2000). Zudem setzt sich der Anteil der aus der Nahrung stammenden Lipidspezies zum Großteil aus Triacylglyceriden (TAG) zusammen. Diese durchlaufen metabolische Prozesse, ehe sie überhaupt ins zirkulierende System gelangen, sodass der stattfindende Umbau zu Fettsäuren, sowie deren Transport und die Speicherung diejenigen Faktoren sind, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Energiehomöostase haben (WENK, 2005).

Über die Komposition des Lipidoms und interventions- oder krankheitsbedingte Änderungen können zudem neue Erkenntnisse des Metabolismus der Lipide erlangt und Verknüpfungen untersucht werden, die zu einem besseren Verständnis spezifischer Erkrankungen führen und vielleicht auch für diagnostische Zwecke genutzt werden können (JOVE *et al.*, 2014; MEIKLE *et al.*, 2011). So zeigten FAROOQUI *et al.* (1997) und MURPHY *et al.* (2000), dass die Konzentrationen von Etherlipidklassen reduziert sind in Alzheimerpatienten und Menschen mit Trisomie 21 (Down-Syndrom). Eine

australische Arbeitsgruppe sieht zudem negative Assoziationen mit Fällen von Diabetes Typ 2 und koronaren Herzkrankheiten (MEIKLE *et al.*, 2013, 2011). Als mögliche Erklärung sehen sie, wie auch WALLNER & SCHMITZ (2011) beschreiben, die Fähigkeit der Etherlipidklassen als Antioxidantien in Membranen und Lipoproteinen zu wirken, indem die Etherbindung über reaktive Sauerstoffspezies (oxidativer Stress) oxidiert werden kann (FORD, 2010; SKAFF *et al.*, 2008).

Ebenso wurden Änderungen im Lipidprofil mit Adipositas und metabolischen Erkrankungen wie dem metabolischen Syndrom, Arteriosklerose und weiteren kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (PIETILÄINEN *et al.*, 2007; JOVE *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2004). In der *Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle*-Studie konnte über den Einschluss von spezifischen Lipidspezies die Risikoschätzung für die Entwicklung eines Diabetes Typ 2 signifikant verbessert werden (WONG *et al.*, 2013), was auch von anderen Studiengruppen bestätigt werden konnte (FLOEGEL *et al.*, 2012; RHEE *et al.*, 2011). WENK (2005) fasst es dahingehend zusammen, dass Lipide als Lipidmediatoren agieren können, so wie Ceramide zum Beispiel apoptotische Prozesse triggern können und für Lysophosphatidylcholine mitogene Eigenschaften nachgewiesen wurden, die entsprechend zur T-Zell-Aktivierung führen.

Mehrere Studien konnten bestätigen, dass Lysophospholipide das Immunsystem beeinflussen (GRÄLER & GOETZL, 2002; HEIMERL *et al.*, 2014; SIGRUENER *et al.*, 2014), wobei Lysophospholipide als antiinflammatorisch charakterisiert werden und entsprechend sinkende Konzentrationen mit einer proinflammatorischen Antwort verknüpft wurden. SIGRUENER *et al.* (2014) identifiziert hierbei explizit spezifische Lysophosphatidylcholine.

Zu vernachlässigen ist hierbei auch nicht, dass Fettsäuren die Vorstufe bereits bekannter, biologisch aktiver Lipide wie den Icosanoiden (z.B. Prostaglandinen und Leukotrienen) sind, die ebenfalls als Immunmodulatoren und Neurotransmitter wirken (WENK, 2005).

#### **1.1.3.4 Lipidabhängige Pathomechanismen**

Da *Lipidomics* erst seit 2003 untersucht werden, fehlt das fundierte Wissen über die mechanistischen Hintergründe der beschriebenen Zusammenhänge derzeit fast völlig (HAN, 2016). Insbesondere gilt dies auf der Ebene einzelner Lipidspezies. Betrachtet man zum Beispiel die in Studien und Experimenten nachgewiesene Verknüpfung von Insulinresistenz und (freien) Fettsäuren, geht man inzwischen davon aus, dass abhängig von der Kettenlänge der Fettsäuren der Insulin-Signalweges inhibiert wird (ESTADELLA *et al.*, 2013), dennoch ist das Wirkprinzip noch nicht genügend unter-

sucht und verstanden, um einen Mechanismus benennen zu können (UNGER, 2010). Die Rolle einzelner Lipidklassen bleibt sogar völlig unklar (HAN, 2016). Drei Konzepte werden jedoch im Zusammenhang mit Lipiden immer wieder in der Literatur genannt und könnten die Basis lipidabhängiger Pathomechanismen bilden:

- Lipotoxizität,
- Lipoperoxidation,
- Lipoapoptose.

Bei der Lipotoxizität handelt sich um ein Ungleichgewicht der Lipidproduktion bzw. -aufnahme und des Lipidverbrauchs bzw. -transports in Organen und Geweben, die nicht für die Lipidspeicherung vorgesehen sind. Insbesondere sind die Nieren, das Herz, die Leber und Muskelzellen durch die vermehrte Akkumulation von Lipiden betroffen, wobei Diacylglyceride und Ceramide die vorherrschenden Klassen in lipotoxischen Zellen zu sein scheinen (KUSMINSKI *et al.*, 2009). ESTADELLA *et al.* (2013) beschreiben dabei wie gesättigte und trans-Fettsäuren aus der Nahrung die Lipotoxizität in Zellen und damit auch die Entstehung von metabolischen und degenerativen Erkrankungen fördern könnten. Sie sehen dabei eine Ursache darin, dass der lipotoxische Zustand die eng miteinander verknüpften Lipid-Signalwege stören würde. Ebenfalls scheinen lipotoxische Zellen vermehrt unter ER-Streß (endoplasmatisches Retikulum) zu stehen (WEI *et al.*, 2007).

Eine Folge und ein weiteres lipidabhängiges Konzept ist die Lipoapoptose. Dabei ist der programmierte Zelltod (Apoptose) gemeint, der durch eine hohe Lipidkonzentration innerhalb der Zelle ausgelöst wird (UNGER *et al.*, 2010; KUSMINSKI *et al.*, 2009). Die Lipoperoxidation ist die oxidative Degradation von Lipiden, die durch freie Radikale (z.B. bei ROS-(Reaktive Sauerstoffspezies)-induziertem Streß) ausgelöst wird, die extrem reaktiv sind und einen Elektronenaustausch mit dem Lipid erzwingen. Dies führt, da Lipide Grundbaustein jeder Membran sind, zu Zellschäden und Funktionsbeeinträchtigungen wie etwa beeinträchtigte strukturelle Integrität und verminderte Fluidität bzw. Permeabilität der Membran (ESTADELLA *et al.*, 2013). Zudem handelt es sich um eine Kettenreaktion, da die entstehenden Lipidperoxide wiederum extrem reaktiv sind. Die Reaktion bricht erst bei hohen Konzentrationen der Lipidperoxide oder durch den Einsatz von Antioxidantien (z.B. Vitamin C/Ascorbinsäure und Vitamin E/Tocopherol) ab. Lipoperoxide stehen zudem unter dem Verdacht sowohl mutagen als auch karzinogen zu wirken (MARNETT, 1999).

Interessanterweise konnten NAKBI *et al.* (2010) bereits zeigen, dass Nahrungsfette die Anfälligkeit der Zellen für ROS-induziertem Streß modulieren können, möglicherweise indem die Zusammensetzung der Membranen beeinflusst wird. Damit könnte auch

die Anfälligkeit für Lipoperoxidation beeinflusst werden. Das Lipoapoptose und Lipoperoxidation zusammenhängen, konnte von JAESCHKE (2011) nachgewiesen werden, indem er zeigt, dass gesättigte Fettsäuren in Hepatozyten Apoptose auslösen, was gleichzeitig zu ROS-induziertem Streß führt. Dies führt zu einer höheren Rate von Lipoperoxidation, was zu weiteren Zellschäden und Zellsterben führen kann.

Interessant ist ebenfalls, dass bereits gezeigt werden konnte, dass Lipide auch einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Gesundheit des Darmmikrobioms haben (CANI *et al.*, 2007; DE WIT *et al.*, 2012), sodass über lipidinduzierten Mechanismen im Mikrobiom auch der Metabolismus des Wirtsorganismus beeinflusst werden könnte. Das Mikrobiom wird in dieser Arbeit jedoch nicht weiter betrachtet.

### **1.1.4 Fettgewebe als endokrines Organ**

Das Fettgewebe spielt eine bedeutende Rolle für die Energiehomöostase und den Lipidstoffwechsel. Dabei ist die Auffassung, dass das Fettgewebe nur zur Energiespeicherung und Energiebereitstellung dient, längst überholt und seine Funktion als endokrines Organ rückt stärker in den Fokus (KERSHAW & FLIER, 2004).

#### **1.1.4.1 Charakterisierung**

Im Allgemeinen ist mit dem Fettgewebe das weiße oder univakuoläre Fettgewebe gemeint, dass in allen Vertebraten vorkommt. Bei vielen Säugetieren ist zudem noch das braune oder plurivakuoläre Fettgewebe zu finden, welches sich durch einen unterschiedlichen zellulären Aufbau und seine Funktion in der Thermogenese, sowie seine sehr spezifische Lokalisation vom weißen Fettgewebe abgrenzen lässt.

Das weiße Fettgewebe (WAT) besteht aus Adipozyten und der sogenannten stroma-vaskulären Fraktion, die sich wiederum aus sehr heterogenen Zelltypen wie Präadipozyten, Immunzellen (u.a. Leukozyten, Monozyten, Makrophagen und T-Zellen), Endothelzellen sowie Fibroblasten, Fibrozyten und mesenchymalen Stammzellen zusammensetzt (WILLIAMS & FRÜHBECK, 2009; MCARDLE *et al.*, 2013). Beide Bestandteile, sowohl Adipozyten als auch die Mitglieder der stroma-vaskulären Funktion, regulieren über Faktoren, die sie exprimieren und/oder sezernieren, endokrine Funktionen. Beispiele für diese sogenannten Adipokine sind etwa Leptin, Resistin, Adiponectin und Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  und verschiedene Interleukine (KERSHAW & FLIER, 2004).

Anhand seiner Lokalisation kann das WAT - neben kleineren Depots - nochmals in zwei Hauptkompartimente, das subkutane und intraabdominelle (viszerale) Fettgewebe unterteilt werden. Dabei galt das viszerale Fett lange Zeit als Schutzschicht der

inneren Organe (lat. *viscera* = Eingeweide) und das subkutane Fettgewebe (lat. *sub* = unter, *cutis* = Haut) als primäres Reservedepot. Studien und Experimente der letzten Jahre zeigen aber deutlich, dass sich beide Depots auch in ihrer endokrinen Funktion unterscheiden und dass die Betrachtung des Fettgewebes als Gruppe von homologen, endokrinen Organen der Zusammenfassung zu einem einzelnen endokrinaktiven Organ vorzuziehen sei (KERSHAW & FLIER, 2004). Unterstützt wird diese Hypothese von der Identifikation einer viszeralen Adipositas als unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes Typ 2 (KLÖTING *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu scheint eine subkutane Adipositas teilweise das metabolische Profil zu verbessern (KIM *et al.*, 2007).

### 1.1.4.2 Hypertrophie und Hyperplasie des weißen Fettgewebes

Um die Effekte einer isokalorischen, fettreichen Ernährungsform von einer hyperkalorischen Diät unterscheiden bzw. diese vergleichen zu können, muss zunächst geklärt werden, wie sich ein Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -verbrauch auf das Fettgewebe auswirkt, wobei im Hinblick auf diese Arbeit nur die positive Energiebilanz berücksichtigt wird. Um die Energiehomöostase auszugleichen wird die überschüssige Energie in Form von Triacylglyceriden gespeichert und zur Lagerung zum Fettgewebe transportiert. Dieses reagiert mit zwei Mechanismen auf die Zufuhr von Speicherlipiden: Die Hypertrophie und die Hyperplasie (GANTEN & RUCKPAUL, 2006). Mit der Hyperplasie ist die Vermehrung der Adipozyten und damit das Wachstum in der Zellanzahl gemeint, während die Hypertrophie die Vergrößerung der Zellen und damit das Wachstum im Zellumfang beschreibt.

Die Fähigkeit zur Hyperplasie hängt dabei von der Anzahl der vorhandenen Stammzellen- bzw. Präadipozyten ab und unterscheidet sich zwischen subkutanem und viszeralem Fettdepot (JO *et al.*, 2009).

Wie JERNAS *et al.* (2006) bereits 2006 zeigte, führt insbesondere die Hypertrophie zu einem veränderten Sekretionsmuster der Adipozyten zugeordneten Adipokine, die wiederum auch eine Signalkaskade in der stroma-vaskulären Fraktion auslösen. Als Folge kommt es zur Infiltration des Fettgewebes durch proinflammatorische (M1-polarisierte) Makrophagen ins Fettgewebe, die die bereits anlaufende Entzündungsreaktion des Fettgewebes weiter verstärken, indem weitere Zytokine sezerniert werden (WENTWORTH *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2011).

Als Beispiel ist hier das proinflammatorische Interleukin 6 (IL6) zu nennen, das unter anderem auch als Antagonist des Insulin-Signalwegs wirkt (DE MELLO *et al.*, 2009). Ebenfalls konnte mehrfach gezeigt werden, dass MCP1 (auch CCL2, Monozytenchemoattraktives Protein 1) und sein Rezeptor *C-C motif chemokine receptor 2*

(CCR2) vermehrt im Fettgewebe von adipösen Probanden sezerniert werden und damit die Makrophageninfiltration weiter begünstigen (KANDA *et al.*, 2006; WEISBERG *et al.*, 2006; GÖGEBAKAN *et al.*, 2015).

KIM *et al.* (2007) verweist in diesem Zusammenhang darauf, dass Adipozyten, die ihr maximales Fassungsvermögen erreicht haben, zudem apoptotisch werden können und so ebenfalls Makrophagen rekrutieren würden.

Die hier beschriebenen Veränderungen im Fettgewebe werden in der Medizin unter dem Begriff der chronischen, subklinischen Inflammation zusammengefasst, die unter anderem auch als Verknüpfungspunkt zwischen Adipositas und Insulinresistenz gilt (XU *et al.*, 2003; WEISBERG *et al.*, 2003; LUMENG *et al.*, 2007).

#### 1.1.4.3 *Toll-like receptors* und Inflammasom

Die chronische, subklinische Inflammation wird maßgeblich durch zwei Signalwege initiiert - den der *Toll-like receptors* (TLRs) und den des Inflammasoms. Beide gehören dem angeborenen bzw. unspezifischen Immunsystem an und bedingen gemeinsam die Zytokinausschüttung im Fettgewebe.

TLRs sind Oberflächenrezeptoren und werden zum Großteil von mononukleären Phagozyten (z.B. Makrophagen) und dendritischen Zellen exprimiert. Derzeit sind zehn Versionen dieser Rezeptorfamilie bekannt, wobei sie in ihrer Substratspezifität divergieren. Als Liganden werden sowohl PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster, z.B. Lipoproteine und Lipopolysaccharide) und DAMPs (Schaden-assoziierte molekulare Muster) als auch NEFAs (freie, unveresterte Fettsäuren) genannt (SUERBAUM *et al.*, 2012).

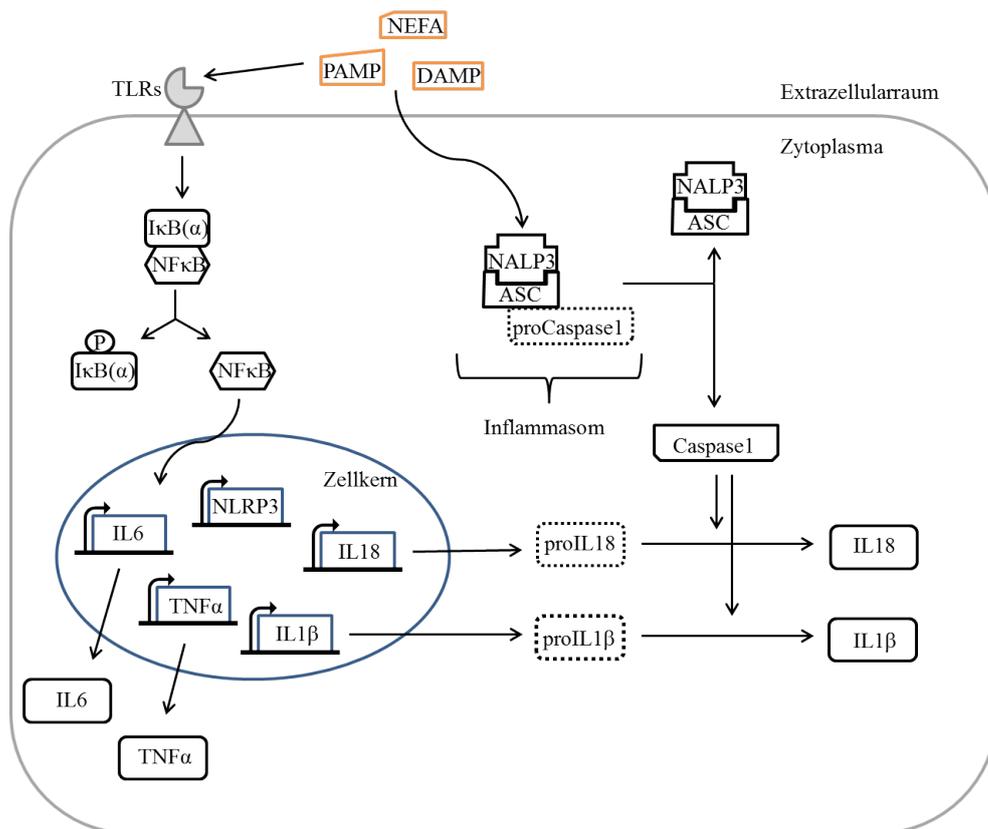
Der über die TLRs aktivierte Signalweg führt zur Phosphorylierung von  $I\kappa B\alpha$  (*Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B cells inhibitor alpha*), den Inhibitor von  $NF\kappa B$  (*Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells*), wodurch  $NF\kappa B$  in den Zellkern translozieren und als Transkriptionsfaktor aktiv werden kann. Zu den Zielgenen dieses Transkriptionsfaktors, von denen es über 100 gibt, gehören Zytokine, Chemokine (z.B.  $TNF\alpha$  [Tumornekrosefaktor alpha]) und Interferone. Darunter befinden sich auch die inaktiven Formen der Interleukine  $1\beta$  (pro-IL $1\beta$ ), 18 (pro-IL18) und 33 (pro-IL33) (KAYSER *et al.*, 2014).

PAMPs, DAMPs und NEFAs aktivieren gleichzeitig zu den TLRs auch das Inflammasom. Dabei handelt es sich um einen zytosolischen Proteinkomplex hauptsächlich bestehend aus ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), NALP3 (*NACHT, LRR and PYD domains containing protein 3*) und pro-Caspase1( $\alpha$ ) (MARTINON *et al.*, 2002). NALP3 wirkt in diesem Komplex als Sensor, ASC als Adapter und proCaspase1 als Effektormolekül. Durch die Aktivierung

des Proteinkomplexes wird Caspase1 abgespalten und kann dann wiederum proIL1 $\beta$ , proIL18 und proIL33 in ihre aktiven Formen IL1 $\beta$ , IL18 und IL33 überführen (KAYSER *et al.*, 2014).

Wie SUERBAUM *et al.* (2012) erläutern, stimuliert dann IL18 T-Helferzellen vom Typ 1 (u.a. T-Lymphozyten- und Makrophagen-Aktivierung) und IL33 T-Helferzellen vom Typ 2 (B-Lymphozyten-Aktivierung). Infolgedessen werden weitere Entzündungsprozesse angeregt.

Eine schematische Darstellung beider Signalwege ist in Abbildung 1.3 dargestellt.



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des TLR-Signalwegs und des Inflammasoms.** PAMP - Pathogen-assoziierte molekulare Muster; DAMP - Schaden-assoziierte molekulare Muster; NEFAs - freie, unveresterte Fettsäuren; TLR - *Toll-like receptors*; P - Phosphor; I $\kappa$ B( $\alpha$ ) - *Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B cells inhibitor (alpha)*; NF $\kappa$ B - *Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells*; IL - Interleukin; TNF $\alpha$  - Tumornekrosefaktor alpha; proX - inaktive Form von X; ASC - *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*; NALP3 - *NACHT, LRR and PYD domains containing protein 3*. (Abbildung geändert nach KAYSER *et al.*, 2014)

Trotz der offensichtlich überwiegend negativen Auswirkungen einer exzessiven Fettgewebsakkumulation, sollte auch beachtet werden, dass das gegenteilige Extrem eines Fettgewebsmangels (Lipodystrophie) ebenso negative Auswirkungen auf den Meta-

bolismus hat und damit ein ebensolches medizinisches Problem darstellt (KERSHAW & FLIER, 2004; GRUNDY, 2011).

## 1.2 Zusammenspiel von Ernährung und Genetik

### 1.2.1 Zwillingsstudien

Das humane (haploide) Genom besteht etwa aus 3,3 Mrd. Basenpaaren und umfasst nach neueren Schätzungen etwa 25000 Gene (KLUG *et al.*, 2007). Interessanterweise unterscheiden sich dabei zwei menschliche Individuen nur in etwa 0,1 % ihres Genoms (ALBERTS *et al.*, 2012).

Ein Sonderfall sind monozygote Mehrlinge, die durch die Entstehung aus einer einzelnen befruchteten Zygote theoretisch genetisch identisch sein müssten. Zwar konnten unter anderem BRUDER *et al.* (2008) und KAMINSKY *et al.* (2009) anhand von eineiigen Zwillingen bereits zeigen, dass diese Aussage nicht exakt zutrifft, dennoch sind sich die Genome monozygoter Mehrlinge deutlich ähnlicher, als dies für die Genome polyzygoter Mehrlinge gilt, die aus mehreren befruchteten Zygoten entstehen und damit eher den Status von Vollgeschwistern haben.

Zu unterscheiden ist hier auch noch einmal das Genom von dem diploiden Chromosomensatz, der bei monozygoten Mehrlingen von den Eltern identisch vererbt wird, während bei polyzygoten Mehrlingen der Chromosomensatz im Mittel nur zu 50 % deckungsgleich ist.

Trotz der beschriebenen Unterschiede im Genom sind Studien an humanen Mehrlingen seit Jahrzehnten ein etabliertes Äquivalent zu Zuchtstudien in Modellorganismen wie Tauffliegen, Zebrafischen, Mäusen und Ratten. Entsprechend der relativ geringen Wahrscheinlichkeit für Mehrlinge höherer Ordnung ( $\geq 3$ ), werden dabei Zwillingsstudien bevorzugt, die entweder monozygote Zwillinge innerhalb der Paare oder aber monozygote Zwillinge mit dizygoten Zwillingen vergleichen.

Der Vorteil gegenüber Studien in einer zufällig gewählten Stichprobe der Bevölkerung ist dabei, dass sowohl mono- wie dizygoten Zwillinge unabhängig von der Genetik in den meisten Fällen einen Großteil ihrer Umwelt teilen und damit die Verzerrung durch umweltbedingte Faktoren minimiert wird.

### 1.2.2 Erbllichkeit (Heritabilität)

Die Zwillingsstudien bieten neben der generationsübergreifenden Betrachtung von Familienstammbäumen einen Ansatz zur Schätzung von Erbllichkeiten. Die (allgemeine) Erbllichkeit oder Heritabilität ist dabei zunächst definiert als der Anteil der

Varianz eines Merkmals, der über additive genetische Effekte determiniert ist und zur phänotypischen Variation führt. Sie beschreibt dagegen nicht zu welchem Anteil ein Merkmal genetisch oder der Phänotyp durch den Genotyp bestimmt wird (KLUG *et al.*, 2007). Zudem ist die Schätzung begrenzt auf die untersuchte Population in der untersuchten Umgebung und lässt sich nur bedingt auf die Grundgesamtheit übertragen.

Schätzungen der Vererbarkeit werden schon seit Jahrzehnten durchgeführt, wobei die adressierten Merkmale inzwischen vom makroskopischen (z.B. Körpergröße) zum submikroskopischen (z.B. einzelne Metabolitkonzentrationen) tendieren.

Für einige Merkmale wie die Körpergröße eines Menschen konnte bereits in verschiedenen Populationen und unter unterschiedlichen Bedingungen eine relativ stabile und starke Erbliehkeiten nachgewiesen werden (SILVENTOINEN *et al.*, 2003). Ebenfalls scheinen die Konzentrationen der Lipoproteine geringer Dichte (LDL) und hoher Dichte (HDL) vererbbar zu sein (BEEKMAN *et al.*, 2002; DESPRES *et al.*, 1988). Für Merkmale wie etwa die Konzentrationen einzelner molekularer Lipidspezies sind dagegen Heritabilitäten bisher nicht gründlich untersucht worden und daher - insbesondere im Menschen - fast völlig unbekannt.

### 1.2.3 Nutrigenetik/Nutrigenomik

Mit wachsendem Verständnis der genetischen Grundlage, haben sich als zwei Disziplinen in den Lebenswissenschaften die Nutrigenetik und die Nutrigenomik herausgebildet, die das Ziel haben das Zusammenspiel von Ernährung und Genetik zu untersuchen und besser zu verstehen.

Die Begriffe Nutrigenetik und Nutrigenomik sind jedoch in der Fachwelt derzeit noch nicht bijektiv definiert und voneinander abgegrenzt. Verschiedene wissenschaftliche Disziplinen verstehen unter den Begriffen teilweise sehr unterschiedliche Zusammenhänge oder nutzen sie auch als Synonym füreinander, daher soll für diese Arbeit folgende Definitionen nach HALLER *et al.* (2013) festgelegt werden:

1. **Nutrigenetik:** Nutrigenetik beschreibt den Zusammenhang von Ernährung und dem genetischen Hintergrund auf Ebene der Gene, SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismen) und Genvarianten.
2. **Nutrigenomik:** Nutrigenomik beschreibt den Zusammenhang von Ernährung und dem genetischen Hintergrund auf Ebene der Genexpression.

Die Nutrigenomik wählt daher einen eher systembiologischen Ansatz, um das Zusammenspiel von Ernährung und Metabolismus zu verstehen. Der Ansatz der Nutrigenetik ist dagegen eher der Populationsgenetik und -ökologie zuzuordnen.

### 1.3 Zielstellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollen zwei Gesichtspunkte untersucht werden. In den vorangegangenen Abschnitten wurde bereits beschrieben, dass der Einfluss des Makronährstoffes Fett - insbesondere bei einer zum Bedarf isokalorischen Ernährung - noch nicht hinreichend untersucht wurde, um zu klären, wie und inwieweit eine fettbetonte Ernährung Einfluss auf den menschlichen Metabolismus nimmt. Der biologische Schwerpunkt dieser Arbeit wird dem entsprechend auf dem Einfluss einer solchen Ernährungsform auf verschiedene Teile des Metabolismus (metabolische Marker, Transkriptom, Lipidom) liegen, wobei auch nutrigenetische bzw. nutrigenomische Effekte berücksichtigt werden könnten.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit befasst sich mit der adäquaten Datenverarbeitung. Durch die Entwicklung immer leistungsfähigerer und hochauflösender Messmethoden wie den verschiedenen *omics*-Messverfahren nimmt die Größe der Informationsmenge, die man aus einer Probe gewinnen kann, stetig zu, während die Entwicklung von Verfahren zur Auswertung und die Interpretation der Daten bezüglich ihrer Relevanz deutlich dahinter zurückbleibt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher mathematische und statistische Verfahren zu etablieren, die den Umgang mit großen Datensätzen ermöglichen, wie sie in klinischen Studien generiert werden.

Die *NUtriGenomic Analysis in Twins*-Studie (kurz NUGAT-Studie) ist eine sequentielle Ernährungsinterventionsstudie in Zwillingen, bei der große Datensätze in Abhängigkeit von einer Umstellung auf eine dem Bedarf angepasste, fettreiche Ernährung generiert wurden, die sowohl metabolische als auch transkriptomische und lipidomische Informationen enthalten. Sie eignete sich damit als Grundlage für diese Arbeit. Die Analyse der Daten sollte dabei insbesondere unter folgenden Fragestellungen vorgenommen werden:

1. Zeigen sich nach der Ernährungsumstellung auf eine Hochfettdiät spezifische Antwortmuster metabolischer, transkriptomischer oder lipidomischer Art? Wenn ja, können diese Antwortmuster miteinander zu einem allgemeineren Antwortmuster verknüpft werden?
2. Lassen sich verschiedene Antworttypen auf die Ernährungsumstellung identifizieren? Wenn ja, wie können diese Antworttypen charakterisiert werden?
3. Welche Verfahren eignen sich, um die oben genannten, biologischen Fragestellungen zu realisieren?

Die erste Frage ist dabei auf eine Verknüpfung der einzelnen Subsysteme ausgerichtet, während die zweite Frage die individuellen Unterschiede der Probanden, z.B. als

Responder/Non-Responder-System, fokussiert. Die dritte Fragestellung zielt auf die Wahl der Verfahren ab.

## 1.4 Bisherige Ergebnisse der NUGAT-Studie

Zu der Studie, die dieser Arbeit zugrunde liegt, erschien bereits 2013 die Dissertationsschrift von Frau A.-C. Seltmann (SELTMANN, 2013), sodass kurz auf das Ziel und einen Teil der Ergebnisse dieser Arbeit eingegangen werden soll, da sie als Grundlage für weiterführende Analysen der vorliegenden Dissertationsschrift dienen.

Ziel der Arbeit war es den Einfluss einer zum Bedarf isokalorischen, fettbetonten Diät bei gesunden Zwillingen auf metabolische, hormonelle sowie immunologische Antworten im Vergleich zum Einfluss einer ebenfalls zum Bedarf isokalorischen, kohlenhydratreichen Diät zu untersuchen und dabei eine genetische Determination dieser Veränderungen zu berücksichtigen. Ebenfalls gehörte zu der Arbeit ein Großteil der labortechnischen Analyseverfahren und damit die Generierung der Daten, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

### 1.4.1 Einhaltung der Diäten

Eine wichtige Teilanalyse in SELTMANN (2013) für die vorliegende Arbeit befasste sich dabei mit dem Vergleich der Makronährstoffzusammensetzung der Diäten. Um Aussagen über die Auswirkungen einer überwiegend gesättigten Hochfettdiät treffen zu können, muss und musste zunächst gezeigt werden, dass die Probanden die Vorgaben in den einzelnen Phasen der Studie eingehalten hatten. In SELTMANN (2013) wurde dazu die tatsächlich im Mittel konsumierte Makronährstoffzusammensetzung der einzelnen Studienphasen mit den Vorgaben des Studiendesigns, wie in Kapitel 2.2.4 näher erläutert, verglichen (Tab.1.1).

Die Zusammensetzung der tatsächlich konsumierten Diäten wurde dabei anhand der Ernährungsprotokolle und der Nährwertangaben der bereitgestellten Lebensmittel mittels PRODI 4.5. LE 2001 Expert (Firma Nutri-Science, Hausach) berechnet.

SELTMANN (2013) konnte zeigen, dass die maximale mittlere Abweichungen vom Sollwert bei 2,5 % (Kohlenhydrate, freie Phase während der fettreichen Intervention) lag.

Damit ist auch für die vorliegende Arbeit eine Analyse der Daten unter dem Gesichtspunkt, die Ergebnisse hinsichtlich eines Wechsels zu einer Hochfettdiät zu untersuchen, gerechtfertigt.

**Tabelle 1.1: Vergleich der Zusammensetzung der Makronährstoffe mit den Studienvorgaben.** Dargestellt ist die durchschnittliche Aufnahme der Makronährstoffe (Kohlenhydrate, Fett, Protein) für die beiden Diäten. Unterschieden wird zusätzlich für die freie Ernährung in den Wochen 1 bis 5 und 8 bis 11 und den supplementierten Wochen 6, 7 und 12. Werte als arithmetisches Mittel, n=92. (Tabelle geändert nach SELTMANN, 2013)

	Standardisierung (LFD)			Intervention (HFD)		
	Vorgabe	Woche 1-5	Woche 6	Vorgabe	Woche 8-11	Woche 7 & 12
Kohlenhydrate [%]	55,0	54,3	55,9	40,0	42,5	41,2
Fett [%]	30,0	29,0	30,2	45,0	42,7	46,6
Protein [%]	15,0	16,4	15,7	15,0	15,7	14,5

### 1.4.2 Weitere Ergebnisse

In SELTMANN (2013) wurde außerdem gezeigt, dass die Ernährungsintervention keinen oder nur einen geringen und biologisch nicht-relevanten Einfluss auf die Parameter des Routinelabors, wie etwa die Leberenzyme, Blutzellen und den Elektrolythaushalt hatte. In der vorliegenden Arbeit wird im Ergebnisteil daher nur kurz auf die Nüchternparameter des Glukose- und Fettstoffwechsels (vgl. Kap.3.1.2) eingegangen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 2.1 angegebenen Materialien verwendet.

**Tabelle 2.1: Materialliste NUGAT-Studie.** Aufgeführt sind nur die Materialien, die explizit für diese Arbeit Verwendung fanden.

<b>Software</b>	
Sigma Plot 11.0	Systat Software inc, Foster City, USA
IBM SPSS Statistics Version 20.0	IBM, Armonk, USA
R Version 2.15.0	The R Project for Statistical Computing, Wien, Österreich
R Version 3.1.2	The R Project for Statistical Computing, Wien, Österreich
RStudio Version 0.98.1091	RStudio Inc., Boston, USA
Pajek64 3.11	V. Batagelj and A. Mrvar, Ljubljana, Slowenien
Graphpad Prism 6.05	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
MiKTeX 2.9	C. Schenk, Berlin, Deutschland
TeXstudio 2.3	B. van der Zander, Düsseldorf, Deutschland
ChemDraw Professional 15.0.0.106	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Ziel der Studie

Bei der NUGAT-(*NU*tri*Ge*nomic *A*nalysis in *T*wins-)Studie, die von der Ethikkommission der Charité Berlin nach den gesetzlichen Vorgaben geprüft und genehmigt wurde, handelte es sich um eine klinische Interventionsstudie mit Zwillingsdesign in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki von 1975 in der überarbeiteten Version von 1983. Die Studie wurde durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Ernährungsformen auf den menschlichen Metabolismus zu untersuchen und möglicherweise existierende, sich voneinander unterscheidende Antwortmuster zu identifizieren, um Phänomene wie die metabolisch gesunde Adipositas, d.h. bestehendes

exzessives Körpergewicht ohne klinisch-auffällige, bzw. metabolisch ungesunde Folgeerscheinungen, besser charakterisieren, erklären und verstehen zu können. Zusätzlich ermöglichte das Zwillingsdesign eine Betrachtung der Nutrigenetik und Nutrigenomik, dem Zusammenspiel aus ernährungsabhängiger Umwelt und Genetik auf Gen- und Genexpressionsebene.

## 2.2.2 Probandenauswahl

Die Probanden wurden mit Hilfe der Firma HealthTwiSt GmbH, Berlin, im Großraum Berlin-Brandenburg rekrutiert. Dazu wurde eine der Firma gehörende Zwillingsdatenbank genutzt und weitere Interessenten über lokale Zeitungsannoncen und in der Umgebung verteilte Informationsbroschüren zur geplanten Studie gesucht. Die Probanden sollten dabei zwischen 18 und 70 Jahren alt sein, einen BMI (*body mass index*) zwischen 18,5 und 37 haben und sich innerhalb des Paares im BMI nicht mehr als 3 kg/m<sup>2</sup> unterscheiden.

Die sich daraufhin meldenden, interessierten Zwillingspaare wurden in schriftlicher und mündlicher Form über die Studie (Inhalt, Ziele, Umfang und potentielle Risiken) aufgeklärt und nach Abgabe einer schriftlichen Einverständniserklärung in die Studie eingeschlossen. Es folgte eine ärztliche Untersuchung, die verbunden mit einer ausführlichen Anamnese, die Probanden charakterisieren und die zusätzlichen Ausschlusskriterien prüfen sollte (*Screening*). Teil dieser Untersuchungen waren die Messung der Routineparameter nach einer Blutentnahme, die Erfassung anthropometrischer Daten, sowie ein oGTT (oraler Glukosetoleranztest) für 120 Minuten, eine Sonographie der Halsgefäße und eine Grundumsatzmessung durch indirekte Kalorimetrie. Ein Zwillingspaar wurde ausgeschlossen, sofern für bereits einen der Zwillinge eines oder mehrere der folgenden Kriterien vorlag:

- Die regelmäßige Einnahme stoffwechselbeeinflussender und/oder gerinnungshemmender Medikamente,
- stoffwechselbeeinflussende, chronische Erkrankungen (z.B. Diabetes Typ 1 oder 2)
- Schwangerschaft sowie Stillzeit,
- Gewichtsveränderung > 3 kg innerhalb 3 Monate vor der Studie.
- Hochgradige Infektionskrankheiten
- Hochgradige Anämie

- Allergien (einschließlich Nahrungsmittelallergien)

Insgesamt wurden auf diese Weise 94 Probanden (47 Zwillingspaare) eingeschlossen, von denen ein Zwillingpaar die Studie vorzeitig als *drop out* abbrach.

### 2.2.3 Kohorte der Studienteilnehmer

Bei den 92 Probanden, die die Studie erfolgreich beendeten, handelte es sich um 34 monozygote und 12 dizygote Zwillingspaare. Der Zygotiestatus wurde dabei mittels Mikrosatelliten-(DNA)-Analyse verifiziert<sup>1</sup>. 46 der monozygoten Probanden waren weiblich und 22 männlich, während das Geschlechterverhältnis bei den dizygoten Zwillingen gleich war (12 weiblich, 12 männlich). Die Probanden waren alle metabolisch gesund und hatten keine Adipositas ( $BMI \leq 30$ ). Weitere Charakteristika der Studienkohorte sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

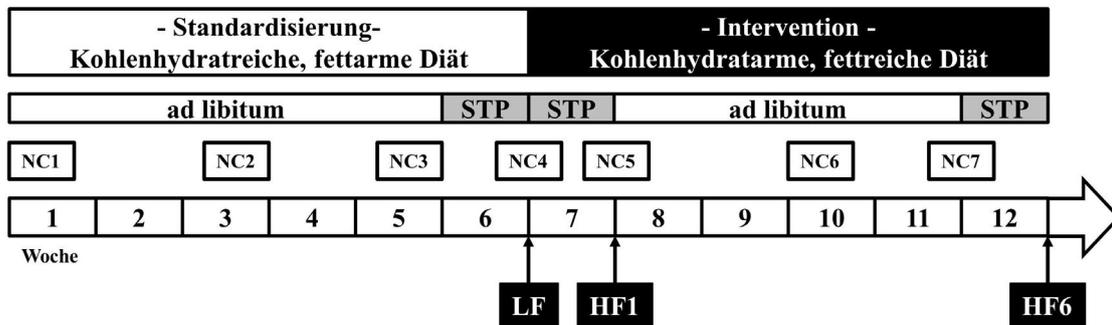
**Tabelle 2.2: Deskriptive der Studienkohorte zum *Screening*.** Werte angegeben als n oder Median  $[Q_{0,25}; Q_{0,75}]$ . MZ - monozygote Zwillinge; DZ - dizygote Zwillinge BMI - *body mass index*; WHR - Taille-Hüft-Verhältnis; HbA<sub>1c</sub> - ein Glykohämoglobin; HDL - Lipoprotein hoher Dichte; LDL - Lipoprotein geringer Dichte; NEFAs - freie, unveresterte Fettsäuren; CRP - C-reaktives Protein.

Merkmal	Gesamtkohorte	MZ	DZ
Geschlecht [♀/♂]	58/34	46/22	12/12
Alter [Jahre]	25 [21; 43]	28 [21; 45]	23 [19; 26]
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	22,5 [20,9; 24,6]	22,6 [20,9; 25,0]	22,4 [20,7; 23,9]
WHR [ ]	0,80 [0,76; 0,86]	0,80 [0,76; 0,86]	0,80 [0,76; 0,86]
Systole [mm Hg]	117 [108; 126]	116 [108; 126]	119 [110; 133]
Diastole [mm Hg]	74 [68; 80]	74 [68; 80]	75 [68; 80]
Nüchterninsulin [mU/l]	3,83 [2,90; 5,83]	3,71 [2,76; 5,84]	4,66 [3,47; 5,74]
Nüchtern glukose [mmol/l]	4,31 [3,99; 4,64]	4,29 [3,98; 4,70]	4,37 [4,08; 4,55]
HbA <sub>1c</sub> [%]	5,0 [4,8; 5,3]	5,0 [4,8; 5,3]	5,0 [4,7; 5,2]
Cholesterin [mmol/l]	4,53 [3,84; 5,32]	4,65 [4,09; 5,48]	3,90 [3,37; 4,84]
HDL [mmol/l]	1,28 [1,14; 1,61]	1,41 [1,16; 1,67]	1,19 [1,01; 1,30]
LDL [mmol/l]	2,68 [2,13; 3,24]	2,75 [2,28; 3,32]	2,27 [1,94; 3,07]
Triacylglyceride [mmol/l]	0,94 [0,66; 1,21]	1,01 [0,67; 1,20]	0,80 [0,63; 1,31]
NEFAs [mmol/l]	0,49 [0,36; 0,64]	0,49 [0,36; 0,64]	0,44 [0,34; 0,60]
CRP [mg/dl]	0,50 [0,17; 1,49]	0,52 [0,17; 1,43]	0,39 [0,18; 3,14]

<sup>1</sup>durchgeführt von der Firma HealthTwiSt GmbH, Berlin

## 2.2.4 Studienverlauf

Die Studie verlief über insgesamt 12 Wochen, bestehend aus einer sechswöchigen Standardisierungsphase und einer Interventionsphase von ebenfalls 6 Wochen (Abb. 2.1).



**Abbildung 2.1: Studiendesign.** Die zwölfwöchige Studie unterteilte sich in eine sechswöchige Standardisierungsphase mit kohlenhydratreicher, fettarmer Diät, worauf nach einem Untersuchungstag (LF) die Probanden für wiederum sechs Wochen zu einer Hochfett diät, angereichert mit gesättigten Fetten, wechselten. Weitere Untersuchungen fanden bereits nach einer Woche (HF1) und nach insgesamt sechs Wochen (HF6) unter der fettreichen Ernährung statt. NC - Ernährungsberatung; STP - standardisierte Ernährungsphase.

Die Ernährungsumstellung wurde direkt vollzogen, da eine *wash-out*-Phase zwischen den beiden Ernährungstypen, die angestrebte Standardisierung der Ernährungsweise der Probanden unwirksam gemacht hätte.

Zu Beginn der Studie wurden die Probanden aufgefordert sich für sechs Wochen über eine kohlenhydratreiche, fettarme Diät zu ernähren, die den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) entsprach und die Probanden bezüglich ihres Ernährungsmusters einander angleichen sollte (Tab. 2.3).

**Tabelle 2.3: Angestrebte Zusammensetzung der Diät in den einzelnen Studienphasen.** Neben den Makronährstoffen Fett, Kohlenhydrate und Protein ist der Fettanteil angegeben, der aus gesättigten Fetten (SFA) bestehen sollte.

Diät	Anteil der Gesamtenergie [%]		
	Fett (davon SFA)	Kohlenhydrate	Protein
Standardisierung	30 (10)	55	15
Intervention	45 (18)	40	15

Das Verhältnis gesättigter zu einfach- und mehrfachungesättigten Fettsäuren war dabei ausgeglichen. Die Diät wurde zudem dem individuellen Energiebedarf eines Probanden entsprechend der indirekten Kalorimetriemessung des *Screenings* angepasst und war folglich isokalorisch, um Einflüsse von Gewichtsveränderungen minimieren zu können.

Am Ende der so durchgeführten Standardisierung folgte ein erster klinischer Untersuchungstag (LF), ehe die Probanden ihre Ernährung auf eine ebenfalls isokalorische, aber kohlenhydratarme, fettreiche Ernährung umstellten, die für weitere sechs Wochen eingehalten werden sollte. Zusätzlich sollte die Mehrheit des hier anvisierten Fettanteils aus gesättigten Fettsäuren bestehen.

Bereits eine Woche nach der Umstellung wurden die Probanden zu einem weiteren klinischen Untersuchungstag (HF1) eingeladen, um etwaige akute Änderungen im Metabolismus beobachten und charakterisieren zu können. Am Ende der Interventionsphase folgte dann ein letzter Untersuchungstag (HF6), um auch eine längerfristige Antwort der Probanden zu untersuchen.

Eine weitere 6-wöchige Interventionsphase mit einer proteinreichen, fettarmen Diät anschließend an HF6 wurde nur noch von einer Subkohorte des Kollektivs ( $n = 24$ ) durchgeführt und wird daher in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

Je eine Woche vor den klinischen Untersuchungstagen wurden den Probanden etwa 70 % der Lebensmittel vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (DIfE), Nuthetal, bereitgestellt, um die Ausgangssituation für die Untersuchungstage einander anzugleichen und individuelle Essgewohnheiten, die die Daten beeinflussen könnten, zu reduzieren. Die Untersuchungstage selbst setzten sich neben einer allgemeinen ärztlichen Untersuchung und Befragung nach Änderung des Allgemeinbefindens aus folgenden Untersuchungen zusammen:

- Nüchternblutentnahme (Nahrungskarenz seit 22 Uhr am Vortag)
- anthropometrische Datenerfassung (Größe, Gewicht, DEXA [Dual-Röntgen-Absorptiometrie]<sup>2</sup>, Taille- und Hüftumfang)
- Blutdruckmessung
- Indirekte Kalorimetrie
- Intravenöser Glukosetoleranztest (ivGTT)
- Mahlzeitentoleranztest (MTT)
- periumbilikale Fettgewebsbiopsie
- Magnetresonanztomographie (MRT) des Abdomen <sup>3</sup>

---

<sup>2</sup>nicht an HF1

<sup>3</sup>durchgeführt durch die Abteilung für Radiologie des Ernst von Bergmann Klinikums in Potsdam

Neben den Standardmessgrößen (Größe, Gewicht, Taille- und Hüftumfang) an allen drei Untersuchungstagen wurde am ersten und dritten zusätzlich ein DEXA-Scan der Probanden durchgeführt. Bei der DEXA handelt es sich um ein röntgen-diagnostisches Verfahren, mit dem man die Körperzusammensetzung bestimmen kann. Es wird die Knochendichte, sowie die Fettmasse und fettfreie Masse (Muskelmasse) bestimmt.

Mittels der Magnetresonanztomographie wurden Schnittbilder des Abdomen erstellt, durch die das Bauchfett berechnet und der intrahepatische Lipidgehalt bestimmt werden konnten.

Der ivGTT und der MTT sind Toleranztests, bei denen dem Probanden nach einer klar definierten Zeit entweder intravenös eine Glukoselösung (ivGTT) oder oral eine standardisierte Mahlzeit (MTT) verabreicht werden. In beiden Verfahren wird dabei engmaschig Blut entnommen, um unter anderem Glukose- und Insulinkonzentrationen zu messen und so Aussagen über die Reaktionsprofile der Probanden treffen zu können. Der Unterschied liegt darin, dass bei dem ivGTT durch die intravenöse Verabreichung der obere Magen-Darm-Trakt umgangen wird, dieser beim MTT jedoch in die Stoffwechselantwort miteinbezogen wird.

Bei der periumbilikalen Fettgewebsbiopsie wurde eine Gewebeprobe entnommen, die zur Transkriptomanalyse verwendet wurde.

Sowohl die Blutproben (nüchtern und aus ivGTT und MTT) als auch die Proben der Fettgewebsbiopsien wurden genutzt um in verschiedenen Analyseverfahren Biomarker zu messen (vgl. Kap.2.2.6).

### **2.2.5 Compliance der Studienteilnehmer**

Die Probanden wurden während der Studie durchgängig vom Team der Ernährungsberatung der Abteilung Klinische Ernährung des DiE betreut. Es fanden insgesamt sieben Ernährungsberatungen statt, wobei eine telefonisch durchgeführt wurde (NC2, 14 Tage nach Beginn der Studie, vgl. Abb. 2.1) und der Abstand zwischen zwei Beratungen 14 Tage nicht überschritt. Bei den Ernährungsberatungen erhielten die Probanden Listen mit zu bevorzugenden und zu meidenden Lebensmitteln entsprechend der jeweiligen Diät.

Zusätzlich wurden die Studienteilnehmer dazu angehalten, Verzehrshäufigkeitsfragebögen sowie ausführlichere Ernährungsprotokolle (drei 5-Tagesprotokolle und drei 6-Tagesprotokolle) auszufüllen und täglich selbstständig ihr Körpergewicht zu protokollieren. Über die Analyse der Ernährungsprotokolle mittels des Programmes PRO-DI 4.5. LE 2001 Expert (Firma Nutri-Science, Hausach) konnte die Einhaltung der Diäten quantifiziert werden.

## 2.2.6 Methoden zur Datenerhebung

### 2.2.6.1 Blutparameter

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Proben wurden nach etablierten Standardmethoden analysiert. Neben den Parametern eines kleinen Blutbildes wurden Glukose, Insulin, CRP (C-reaktives Protein), sowie die Standardlipidparameter (Cholesterin, HDL, Triglyceride, freie Fettsäuren) und die Elektrolytkonzentrationen bestimmt.

Aus den Glukose- und Insulinwerten nach zwölfstündiger Nahrungskarenz wurde zudem als Index für die Insulinresistenz der HOMA-IR (*Homeostatic model assessment - Insulin resistance*) über die Gleichung

$$\text{HOMA-IR} = \frac{c_{\text{Insulin[mU/l]}} * c_{\text{Glukose[mmol/l]}}}{22,5}$$

berechnet (MATTHEWS *et al.*, 1985).

Ebenfalls wurden über Standardlabormethoden die Konzentrationen weiterer Parameter wie Kreatinin, Harnstoff, Albumin und die Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ GT) ermittelt. Eine detailliertere Auflistung der für die genannten Parameter verwendeten Methoden befindet sich in Tabelle A.1.

Einzig die Konzentrationen des LDL wurde anhand der Friedewald-Formel aus den Cholesterin-, HDL- und Triacylglyceridkonzentrationen rechnerisch bestimmt:

$$c_{\text{LDL}} = c_{\text{Gesamtcholesterin}} - c_{\text{HDL}} - \frac{c_{\text{TAGs}}}{5}$$

(FRIEDEWALD *et al.*, 1972).

In den gewonnenen Serumproben wurden des weiteren mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) die Konzentrationen von Zytokinen, Adipokinen und weiteren Serumproteinen bestimmt (alle R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland, außer Chemerin: Biovendor, Brünn, Tschechien).

### 2.2.6.2 Lipidomics

Die Messung des Lipidprofils und damit der Lipidkonzentrationen im Blutplasma im Nüchternzustand der Probanden wurde durch den Kooperationspartner Lipotype GmbH, Dresden durchgeführt. Die Proben wurden über ein massenspektrometrisches Verfahren (*quadrupole Orbitrap tandem mass spectrometry*) analysiert, das in SURMA *et al.* (2015) genauer beschrieben und im Weiteren nur zusammengefasst wird.

Die Lipide wurden zunächst nach der Methode von MATYASH *et al.* (2008) mit 2-Methoxy-2-methylpropan/Methanol (7:2, V:V) aus den Proben extrahiert. Da die

Proben 50-fach mit 150 mM Ammoniumhydrogencarbonat (in Wasser) verdünnt waren, wurde für die Lipidextraktion das Äquivalent für 1  $\mu$ L des unverdünnten Plasma verwendet. Interne Standards wurden mit den organischen Lösungsmitteln vorge-mischt und enthielten:

Cholesterol-D6, Cholesterolester 20:0, Ceramide 18:1;2/17:0, Diacylglycerid 17:0/17:0, Phosphatidylethanolamin 17:0/17:0, Phosphatidylcholin 17:0/17:0, Lysophosphatidylcholin 12:0, Lysophosphatidylethanolamin 17:1, Triacylglycerid 17:0/17:0/17:0 und Sphingomyelin 18:1;2/12:0.

Nach der Extraktion wurde die organische Phase auf eine Infusionsplatte transferiert und in einem Vakuumkonzentrator getrocknet. Das getrocknete Extrakt wurde dann mit in Chloroform/Methanol/Propanol (1:2:4, V:V:V) gelöstem 7,5 mM Ammoniumacetat resuspendiert. Die oben genannten Schritte wurden mittels der Roboterplattform Hamilton Robotics STARlet mit *Anti Droplet Control* für das Pipettieren organischer Substanzen durchgeführt.

Die so gewonnenen Proben wurden über direkte Infusion in ein QExactive Massenspektrometer (Thermo Scientific, Waltham, USA), das mit einer TriVersa Nano Mate Ionenquelle (Advion Biosciences, Ithaca, USA) ausgestattet war, überführt und analysiert. In einem Einzelschritt wurde sowohl eine positive als auch negative Ionisation mit einem Auflösungsvermögen von  $R_{m/z=200} = 280000$  für die Massenspektrometrie (MS) und  $R_{m/z=200} = 17500$  für die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) verwendet.  $m/z$  beschreibt dabei das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Die MS/MS wurde entsprechend einer Aufnahmeliste, die den Massenbereich der MS in 1 Dalton-langen Abschnitten überspannte, durchgeführt. Sowohl für die Durchführung der MS als auch der MS/MS wurden die Ionen der Cholesterolester, Di- und Triacylglyceride als Ammoniumaddukte, die Ionen der Phosphatidylcholins und deren Ether als Acetataddukte und die Ionen der Phosphatidylethanolamine, deren Ether und der Phosphatidylinositole als deprotonierte Anionen betrachtet. Zusätzlich wurden in der MS die Ionen der Lysophosphatidylethanolamine als deprotonierte Anionen und sowohl die Ionen der Ceramide als auch die der Sphingomyeline und Lysophosphatidylcholins als Acetataddukte dargestellt.

Eine von der Lipotype GmbH entwickelte Software, die auf LipidXplorer basiert, wurde zur Identifizierung der Lipide verwendet (HERZOG *et al.*, 2011, 2012), bevor mit einem ebenfalls bei der Lipotype GmbH entwickelten Datenmanagementsystem eine Nachbearbeitung und Normalisierung der Rohdaten durchgeführt wurde. Hierbei wurden nur Lipide berücksichtigt, deren Signal-zu-Rauschen-Verhältnis größer als 5 war und die eine mindestens fünffach höhere Signalintensität gegenüber der entsprechenden Leerprobe hatten.

Im ersten Ansatz konnten so 307 Lipide aus 18 verschiedenen Klassen identifiziert werden. Ein möglicher Messfehler durch die Nutzung mehrerer Messplatten wurde mit internen Standards eliminiert. Zudem wurde der Datensatz nochmals reduziert, indem seltene und damit nicht-repräsentative Spezies ausgeschlossen wurden, sofern sie nur in weniger als 80 % der insgesamt 276 Proben (92 Probanden, 3 Messpunkte [LF, HF1, HF6]) gemessen werden konnten (vgl. Anhang Abb. A.1).

Entsprechend der Identifikation der Lipidspezies und teilweise der gebundenen Fettsäuren umfasst das gemessene Lipidprofil nicht nur die verschiedenen Lipidklassen (Phospholipide, Shingolipide, Glycolipide, usw.), sondern ermöglicht auch die Unterscheidung der verschiedenen Sättigungsgrade (gesättigt, einfach- und mehrfachungesättigt) sowie der Lipide mit gerad- und ungeradzahligen Fettsäuren. In Tabelle 2.4 befindet sich eine genauere Auflistung der gemessenen und in die Auswertung übernommenen Lipide (150 Spezies aus 13 Klassen).

**Tabelle 2.4: Charakterisierung der gemessenen Lipide in der NUGAT-Studie.**

Name der Klasse	Abkürzung	n <sub>Spezies</sub>	Intervall
Ceramide	Cer	5	[38:1] bis [42:2]
Phosphatidylcholines	PC	34	[30:0] bis [38:6]
Phosphatidylcholiner	PC-O	20	[32:0] bis [38:5]
Lysophosphatidylcholine	LPC	9	[14:0] bis [22:6]
Phosphatidylethanolamine	PE	2	[36:2] bis [38:4]
Phosphatidylethanolaminether	PE-O	5	[34:3] bis [38:6]
Lysophosphatidylethanolamine	LPE	6	[16:0] bis [22:6]
Phosphatidylinositole	PI	7	[34:1] bis [38:4]
Diacylglyceride	DAG	3	[34:1] bis [36:3]
Triacylglyceride	TAG	32	[46:1] bis [56:7]
Sphingomyeline	SM	12	[32:1] bis [42:2]
Sterolester	SE	14	[41:1] bis [49:7]
Sterole	ST	1	[27:1]

### 2.2.6.3 Genexpressionsdaten

Die in dieser Arbeit verwendeten Genexpressionsdaten wurden im subkutanen Fettgewebe gemessen, das mittels einer Biopsie gewonnen wurde. Hierfür wurde periumbilikal, d.h. in der Nabelgegend, ein 2 x 2 cm großes Hautareal lokalanästhesiert (Lidocain-Infiltration), ehe durch einen ca. 3 mm langen Skalpell-Schnitt eine 2,1 mm Kanüle eingeführt wurde, die an eine Vakuumspritze mit steriler Kochsalzlösung gekoppelt war (LARSEN *et al.*, 2010).

Die Biopsien wurden mit steriler isotoner Kochsalzlösung gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Im nächsten Schritt wurde aus den in einer Kugelmühle (Speedmill P12, Analytik Jena, Jena, Deutschland) homogenisierten Proben die Gesamt-RNA (Ribonukleinsäure) isoliert (RNeasy<sup>®</sup> Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Reinheit der RNA wurde mit Spektralphotometrie (NanoDrop<sup>®</sup>ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) und Kapillar-Elektrophorese (*Lab-on-chip-Instrument* 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) überprüft, bevor die RNA über reverse Transkription in die für die folgende Analyse notwendige cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) umgeschrieben wurde (High-Capacity cDNA Reverse Transkriptionskit, Applied Biosystems, Carlsbad, USA).

Die Expression verschiedener Gene wurde dann mithilfe der quantitativen *realtime* Polymerasekettenreaktionen (PCR) bestimmt (Abi Prism ViiA7, Applied Biosystems Inc, Forster City, USA). Zur Normierung wurden dabei *RPL32* (60s ribosomales Protein L32) und *RPLP0* (ribosomales Phosphoprotein) als Referenzgene verwendet. Die gewonnenen Ergebnisse aus der PCR wurden mittels Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese validiert (SELTMANN, 2013).

In Tabelle 2.5 findet sich eine Auflistung der Gene, deren Expression aufbauend auf einer Microarray-Transkriptomanalyse (Agilent SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarrays, Agilent Technologies, Deutschland) über dieses Verfahren gemessen wurde und die in dieser Arbeit Verwendung finden.

**Tabelle 2.5: Auflistung der Gene, deren Expression mittels quantitativer *realtime* Polymerasekettenreaktion gemessen wurden.** Eine Liste der verwendeten Primersequenzen findet sich bei SELTMANN (2013).

Genname	Synonym	Klassifizierung
<i>ASC</i>	<i>PYCARD</i>	Inflammasom
<i>CCL5</i>	<i>RANTES</i>	Chemokin
<i>CD11c</i>	<i>ITGAX</i>	Makrophagenmarker
<i>CD14</i>		Makrophagenmarker
<i>EMR1</i>	<i>F4/80</i>	Makrophagenmarker
<i>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></i>	<i>NFKBIA</i>	TLR-Signalweg
<i>IL1<math>\beta</math></i>		Zytokin
<i>IL1ra</i>		Zytokin(antagonist)
<i>IL6</i>		Zytokin
<i>MCP1</i>	<i>CCL2</i>	Chemokin
<i>MRC1</i>		Makrophagenmarker
<i>NF<math>\kappa</math>B</i>		TLR-Signalweg
<i>NLRP3</i>		Inflammasom
<i>RPL32</i>		Referenzgen
<i>RPLP0</i>		Referenzgen
<i>TLR2</i>		TLR-Signalweg
<i>TLR4</i>		TLR-Signalweg
<i>TNF<math>\alpha</math></i>		Zytokin

## 2.2.7 Statistik

### 2.2.7.1 Allgemein

Die Daten wurden zunächst einer Plausibilitätsanalyse unterzogen. Insbesondere wurde hier auf Ausreißer geachtet, die entsprechend der Regel des dreifachen Interquartilsabstandes (IQR) für Extremwerte definiert wurden. Gefundene Ausreißer wurden in der weiteren Analyse zunächst nicht weiter berücksichtigt, da insbesondere arithmetische Maße wie der Mittelwert, Standardabweichungen und Standardfehler und mit diesen verbundene statistische Verfahren (z.B. *Student's T-Test*) besonders anfällig für Extremwerte sind. Die so ausgeschlossenen Daten wurden gesondert noch einmal betrachtet, wobei dies kein Teil dieser Arbeit sein wird.

Parametrische Verfahren haben häufig die Bedingungen, dass die Daten normalverteilt und varianzhomogen bzw. sphärisch sind, sodass beides vorab getestet werden muss. Für die Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Sofern keine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte, wurden die Daten über den natürlichen Logarithmus ( $\ln$ ) transformiert, um ggf. eine Lognormalverteilung zu zeigen. Die Bedingung der Varianzhomogenität/Sphärizität wurde mit Hilfe des Fligner-Killeen- bzw. Mauchly-Tests überprüft. Bei varianzinhomogenen bzw. nicht-sphärischen, aber (log-)normalverteilten Daten wurde die Bedingung über eine Greenhouse-Geisser-Korrektur erfüllt. Gemäß dem Fall, dass dennoch eine der beiden Bedingungen verletzt blieb, wurden alternative, nicht-parametrische Verfahren zur Analyse herangezogen.

Eine Ausnahme bildete hier das parametrische Verfahren der Varianzanalyse (ANOVA). Bei der ANOVA handelt es sich um ein besonders robustes Verfahren, dessen Ergebnisse von der Verletzung der Bedingungen nicht beeinflusst werden, sofern  $n$  groß genug und ausbalanciert ist, wie bereits hinlänglich untersucht wurde (UNDERWOOD, 2005). Nichtsdestotrotz wurden bei verletzten Bedingungen und dennoch durchgeführten ANOVAs für eine zufällig ausgewählte Stichprobe der Variablen Kruskal-Wallis-Tests (ungepaarte Daten) oder Friedeman-Tests (gepaarte Daten) durchgeführt, um die Ergebnisse der ANOVAs zu verifizieren.

Insbesondere wurde ein Spezialfall der Varianzanalyse, die ANOVA mit Messwiederholung, angewandt, um die Entwicklung verschiedener Parameter über den Zeitverlauf der Studie hinweg zu untersuchen, da Messwiederholungen *per se* abhängig voneinander sind. Verfügte die ANOVA über einen weiteren, nicht-binären, aber signifikanten Faktor, wurde der so nachgewiesene Unterschied mittels nachgeschalteter Post-hoc-Tests lokalisiert. Für varianzhomogene Daten fand der Tukey's HSD-

(*Honestly Significant Difference*)-Test Verwendung, im varianzinhomogenen Fall wurde der Dunnett's T3-Test benutzt.

Zusammenhänge zwischen zwei Variablen wurden im normalverteilten Fall mittels Pearson Korrelation untersucht oder alternativ bei fehlender Normalverteilung über den Korrelationskoeffizienten nach Kendall  $\tau$ . Kendall  $\tau$  wurde dabei gegenüber dem ebenfalls nicht-parametrischen Korrelationskoeffizienten Spearman  $\rho$  favorisiert, da allgemein gilt, dass  $|\tau| < |\rho|$  und somit  $\tau$  gleichzeitig eine untere Abschätzung des Zusammenhangs darstellt. Sowohl für den parametrischen, als auch für den nicht-parametrischen Fall wurden nur signifikante Korrelationen mit einem Korrelationskoeffizienten  $|r|$  bzw.  $|\rho| > 0,30$  berücksichtigt. 0,30 ist dabei ein häufig genutzter Schwellenwert, da ab hier von einem moderaten Zusammenhang gesprochen werden kann (COHEN, 1988).

Da insbesondere das Geschlecht und das Alter der Probanden einen verzerrenden Einfluss auf verschiedene Parameter nehmen können, wurde der Einfluss beider Störgrößen mittels linearer Regressionen untersucht und ggf. für diese adjustiert (Korrelation) oder sie wurden als Kovariaten ins Modell eingefügt (ANOVA).

Die Flexibilität eines Biomarkes wurde definiert als der CID abhängige Quartilsdispersionskoeffizient (QDC), der berechnet wird als

$$\text{QDC}_{\text{Biomarker,CID}} = \left[ \frac{0,5(\text{Quartile}_{0,75} - \text{Quartile}_{0,25})}{0,5(\text{Quartile}_{0,75} + \text{Quartile}_{0,25})} \right]_{\text{Biomarker,CID}}$$

(BENESCH, 2013). Über die Flexibilität können Aussagen über die sich im Verlauf der Studie ändernde Variation des Biomarkers in der Kohorte getroffen werden, wobei dieses Verfahren in dieser Arbeit auf die Konzentrationen der Lipidspezies angewendet wurde.

Sofern nicht anders angegeben, gilt für das Signifikanzniveau - wie allgemein üblich in den Naturwissenschaften -  $\alpha < 0,05$ , Mittelwerte werden als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung (SD) und Mediane als Mediane mit [Interquartilabstand] angegeben. Multiples Testen wurde gemäß der Methode von Benjamini-Hochberg berücksichtigt und das Signifikanzniveau entsprechend angepasst (HOCHBERG & BENJAMINI, 1990). Diese Methode, bei der das Signifikanzniveau über die sogenannte *false discovery rate* (FDR) angepasst wird, wird insbesondere bei hochdimensionalen Datensätzen der Methode von Bonferroni vorgezogen, da Bonferroni ein sehr konservatives Verfahren ist, bei dem das Signifikanzniveau bei vielen, multiplen Vergleichen stark überschätzt wird.

Für die Berechnung der Verfahren wurden die in den Materialien (vgl. Kap.2.1) aufgeführten Versionen von R, sowie die R gebundene Programmierumgebung RStudio

und SPSS verwendet. Die Graphen wurden mittels SigmaPlot oder Graphpad Prism erstellt.

### 2.2.7.2 Netzwerkanalyse

Zusammenhänge größerer Dimension bzw. höherer Ordnung wurden mittels einer Netzwerkanalyse untersucht. Dabei wurden zunächst drei Annahmen getroffen:

1. Zusammenhänge sind symmetrisch, d.h. für zwei Variablen  $x_i$  und  $x_j$  gilt:  $(x_i, x_j) = (x_j, x_i)$ ,
2. Schleifen werden ausgeschlossen, d.h. für eine Variable  $x_i$  gilt:  $(x_i, x_i) = 0$  und
3. Transitivität wurde zugelassen.

Zunächst wurden für  $n$  Variablen  $x_i$  und  $x_j$  mit  $i, j \in (1, \dots, n), i \neq j$  die so verbliebenen  $\binom{n}{2}$ , binären Korrelationen nach Kendall  $\tau$  berechnet und auf multiples Testen angepasst. Im Netzwerk wurden die  $n$  Variablen dann durch die Knoten  $(v_1, \dots, v_n)$  repräsentiert und zwei Knoten  $v_i$  und  $v_j$  mit  $i, j \in (1, \dots, n), i \neq j$  durch eine Kante  $e_{ij}$  verbunden, sofern gilt  $|\tau_{x_i, x_j}| > 0,30$  mit  $p_{BH} < 0,05$ . Die Größe und Orientierung des Korrelationskoeffizienten bestimmte dabei die Breite und Art der Kante, wobei negative Korrelationskoeffizienten durch eine gestrichelte und positive Korrelationskoeffizienten durch eine durchgängige Kante repräsentiert werden. Die Lage der Knoten zueinander wurde über den Kamada-Kawai-Algorithmus dahingehend optimiert, dass sich möglichst wenige der Kanten überschneiden. Die Anzahl der verwendeten Iterationen wurde dabei auf maximal 400 begrenzt. Dies entspricht der Standardeinstellung und gewährleistet eine Balance zwischen Rechenzeit bzw. -aufwand und eine gute Annäherung der Ergebnisse.

Galt für einen Knoten  $v_i$ , dass der Knotengrad  $d(v_i) = 0$ , d.h. war  $v_i$  mit keinem anderen Knoten  $v_j$  verbunden, so wurde  $v_i$  aus dem Netzwerk entfernt.

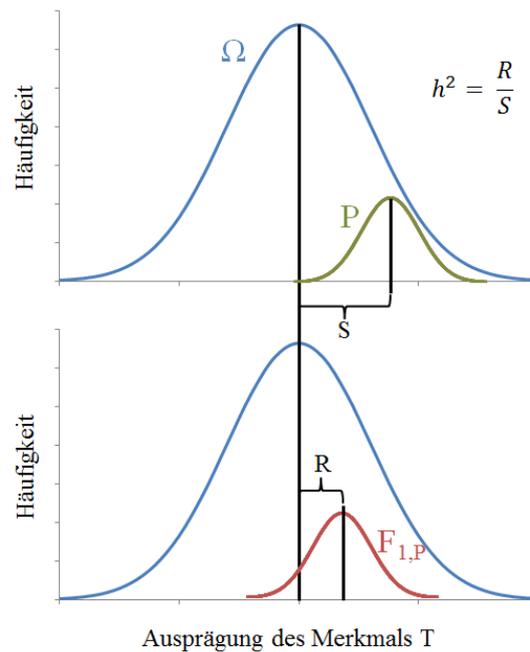
Die Korrelationen wurden mit R berechnet und die Netzwerke über PAJEK generiert.

### 2.2.7.3 Heritabilität

Aufgrund des gewählten Zwillingsdesigns lag ein Hauptaugenmerk der Studie auf der Schätzung der Heritabilität ( $h^2$ , Erblichkeit, von lat. *heres, heredis*) von Merkmalen. Die Heritabilität beschreibt dabei den Anteil der Varianz eines phänotypisch ausgeprägten Merkmals in einer Population, der auf genetische Effekte zurückgeführt werden kann. Die explizit infrage kommenden Gene oder Gencluster spielen dagegen keine Rolle und müssen in späteren Analysen gesondert z.B. als QTL (*Quantitative Trait Loci*) identifiziert werden. Dennoch liefert eine Betrachtung der Erblichkeit

wichtige Informationen, um grundlegende biologische Prozesse aber auch Krankheitsbilder besser zu verstehen und letztere möglicherweise auch gezielter behandeln oder ihnen vorbeugen zu können.

Dabei wird davon ausgegangen, dass die untersuchten Merkmale in der Grundgesamtheit normalverteilt sind und somit auch aussagekräftige Mittelwerte existieren. Definiert ist die Heritabilität als der Quotient des Selektionserfolges ( $R$ ) und der Selektionsdifferenz ( $S$ ), wobei die Selektionsdifferenz der Mittelwertabweichung einer zufällig ausgewählten Subpopulation ( $P$ -Generation) zur Grundgesamtheit entspricht und der Selektionserfolg der Mittelwertabweichung der aus der Subpopulation hervorgehenden, direkten Nachkommenschaft ( $F_1$ -Generation) zur Grundgesamtheit (FALCONER, 1960; KIMBALL, 1993, Abb. 2.2).



**Abbildung 2.2: Definition der Ererblichkeit (Heritabilität).** Für eine Grundgesamtheit  $\Omega$  ist ein beliebiges Merkmal  $T$  normalverteilt. Die Selektionsdifferenz  $S$  ist definiert, als die Abweichung des Mittelwertes einer zufälligen Stichprobe  $P$  vom Mittelwert der Grundgesamtheit. Der Selektionserfolg ist dann die Abweichung des Mittelwertes der aus der zufälligen Stichprobe  $P$  hervorgegangenen Nachkommenschaft  $F_1$  zum Mittelwert der Grundgesamtheit. Der Ererblichkeit  $h^2$  des Merkmals  $T$  für die Stichprobe  $P$  ergibt sich als Quotient aus  $R$  und  $S$ . (Abbildung nach KIMBALL, 1993)

Da beide Terme schwierig zu erfassen sind, gibt es verschiedene Schätzverfahren, die sich in ihrer Komplexität und damit ihrem Arbeitsaufwand sowie in den vorab getroffenen Annahmen und der erforderlichen Ausgangssituation unterscheiden. Neben der Untersuchung aufeinanderfolgender Generationen von Familien, hat sich der Forschungsansatz etabliert, mono- und dizygote Zwillingspaare zu untersuchen. Der

Vorteil gegenüber der Generationsbetrachtung liegt darin, dass Zwillinge einen Großteil ihrer Umwelt teilen und viele Störfaktoren wie etwa Alterseffekte nur zwischen den Paaren zu berücksichtigen sind. Überdies sind monozygote Zwillinge aufgrund ihrer Entstehung aus einer einzelnen Zygote in der Theorie genetisch identisch, während dizygote Zwillinge als Vollgeschwister im Mittel 50 % ihres Genoms teilen. Die Falconer-Formel

$$h^2 = 2(r_{MZ} - r_{DZ})$$

als relativ einfaches Schätzverfahren für die Heritabilität setzt entsprechend die Konkordanz, bzw. Diskordanz der monozygoten Zwillinge mit denen der dizygoten Zwillinge für ein bestimmtes Merkmal in Form der Korrelationskoeffizienten zueinander ins Verhältnis. Daraus resultiert auch die vereinfachte Betrachtung, dass Merkmale, die in monozygoten stark und in dizygoten Zwillingen schwach bis gar nicht korrelieren, meist stark von den Genen beeinflusst werden. Ein solches Beispiel wäre etwa die Körpergröße als phänotypisches Merkmal, das bereits hinlänglich untersucht wurde. In dieser Arbeit wurde zur Schätzung der Heritabilität das ACE-Modell benutzt (MAES, 2005). Es gehört zu den Struktur-Gleichungs-Modellen und betrachtet die Kovarianzen der mono- und dizygoten Zwillinge der folgenden allgemeinen Form:

$$\text{Var}_{MZ} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2 & \sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_c^2 \\ \sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_c^2 & \sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2 \end{pmatrix}$$

und

$$\text{Var}_{DZ} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2 & \frac{\sigma_a^2}{2} + \frac{\sigma_d^2}{4} + \sigma_c^2 \\ \frac{\sigma_a^2}{2} + \frac{\sigma_d^2}{4} + \sigma_c^2 & \sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2 \end{pmatrix}$$

mit  $x_i$  als die Merkmalsausprägung der Zwillinge  $i \in \{1,2\}$  und  $\sigma_j^2$  als Varianzanteil des Merkmals, der zurückgeführt wird auf additive genetische Effekte ( $\sigma_a^2$ ), dominant-genetische Effekte ( $\sigma_d^2$ ), sowie auf die geteilte ( $\sigma_c^2$ ) und die individuelle Umwelt ( $\sigma_e^2$ ) der Zwillinge. Das ACE-Modell beschreibt dabei den Sonderfall, dass die dominant-genetischen Effekte vernachlässigt und damit gleich Null gesetzt werden.

Um Aussagen über die Heritabilität treffen zu können, werden die errechneten Varianzanteile noch ins Verhältnis zur Gesamtvarianz gesetzt, sodass man die Komponenten  $A_t$  (additive genetische Effekte),  $C_t$  (gemeinsame Umwelt) und  $E_t$  (individuelle Umwelt) mit  $t \in \{LF, HF1, HF6\}$  erhält, die Werte zwischen 0 und 1 annehmen können und sich zu 1 summieren.

Für die Bewertung der Heritabilität  $A$  gibt es keine einheitlichen Grenzen, daher wird für diese Arbeit folgende Definition verwendet:

$0,00 \leq A < 0,20$	geringe Heritabilität
$0,20 \leq A < 0,50$	moderate Heritabilität
$0,50 \leq A$	hohe Heritabilität

Erst wenn die additiven genetischen Effekte 50 % oder mehr der Gesamtvarianz eines Merkmals in der Kohorte erklären, wird also von einer hohen Erblichkeit des Merkmals gesprochen.

Zur vereinfachten Darstellung und da es schwierig ist im biologischen Sinne zwischen geteilter und individueller Umwelt zu unterscheiden, wird im Weiteren nur die Komponente A betrachtet. Die Umweltkomponente M ergibt sich entsprechend als  $M = C + E = 1 - A$ .

Das Modell wurde mit der Software R (Version 2.15.0) berechnet, da das benötigte Paket OpenMX (Version 1.3.2-2301) nicht aufwärtskompatibel ist.

#### 2.2.7.4 Lineare gemischte Modelle (LMMs)

Für die Lipiddaten wurde versucht über lineare gemischte Modelle (LMM) der Einfluss verschiedener Faktoren zu schätzen. Die Modelle werden insbesondere bei Datenerhebungen mit einem longitudinalen Design (Messwiederholungen) oder bei der Untersuchung einer Stichprobe von Clustern verwendet (WEST *et al.*, 2014; CNAAN *et al.*, 1997; VERBEKE & GEERT, 2009; OBERG & MAHONEY, 2007). Beiden Ansätzen gemein ist die Tatsache, dass sich korrelierende bzw. voneinander abhängige Daten ergeben, d.h. dass sich die Messwiederholungen eines Subjekts ähnlicher sind, als die Daten zweier Subjekte bzw. sich zwei Angehörige eines Clusters ähnlicher sind, als die Angehörigen verschiedener Cluster. Entsprechend können zwei Bestandteile eines LMMs unterschieden werden, von denen eines die sogenannten festen Faktoren (*fixed factors*) und eines die sogenannten zufälligen Effekte (*random effects*) beinhaltet.

Mit Rücksicht auf diese Arbeit wird im Weiteren nur noch das LMM für das longitudinale Design beschrieben. Die festen Faktoren dienen hierbei der Schätzung der interindividuellen Variabilität und die zufälligen Effekte der Schätzung der intraindividuellen Variabilität. Damit ergibt sich ein Modell der allgemeinen Form

$$y_{ij} = \underbrace{\beta_0 + \beta_1 x_{ij}^{(1)} + \beta_2 x_{ij}^{(2)} + \dots + \beta_p x_{ij}^{(p)}}_{\text{feste Faktoren}} + \underbrace{u_{1j} z_{ij}^{(1)} + u_{2j} z_{ij}^{(2)} + \dots + u_{qj} z_{ij}^{(q)}}_{\text{zufällige Effekte}} + \epsilon_{ij}$$

für  $p$  feste Faktoren und  $q$  zufällige Effekte und  $y_{ij}$  als Ausprägung der abhängigen Variable zum Messpunkt  $i$  des Subjekts  $j$ .  $x_{ij}^{(k)}$  mit  $k \in (1, \dots, p)$  entspricht dabei der Ausprägung des  $k$ -ten festen Faktors zum Messpunkt  $i$  des Subjekts  $j$ ,  $\beta_k$  den zum  $k$ -ten festen Faktor gehörigen Regressionskoeffizienten sowie  $z_{ij}^{(l)}$  mit  $l \in (1, \dots, q)$  der

Ausprägung des  $l$ -ten zufälligen Faktors zum Messpunkt  $i$  des Subjekts  $j$ ,  $u_{ij}$  den zum  $l$ -ten zufälligen Faktor gehörigen Regressionskoeffizienten des Subjekts  $j$  und  $\epsilon_{ij}$  der Summe der Residuen zum Messpunkt  $i$  des Subjekts  $j$ .

Im speziellen wurden in dieser Arbeit als feste Faktoren das Alter, der BMI und das Geschlecht der Probanden sowie die Art der Diät in Form der klinischen Untersuchungstage (LF, HF1, HF6) betrachtet. Das Alter der Probanden wurde hierbei durch einen linearen und quadratischen Faktor berücksichtigt, um die Alterseffekte besser beschreiben zu können, die häufig einen nicht-linearen Verlauf nehmen, und um mögliche Wendepunkte zu berechnen. Da die Daten bereits durch den Kooperationspartner Lipotype GmbH auf einen möglichen Plattenfehler hin korrigiert wurden, wurde auf einen solchen Faktor in den Modellen verzichtet.

Um eine Multikollinearität auszuschließen, wurden Varianzinflationsfaktoren berechnet, die nicht  $\geq 10$  sein durften. Die festen, nicht-metrischen Faktoren (Geschlecht und CID) wurden durch Dummy-Variablen codiert und die weiblichen Probanden an LF als Referenzgruppe genutzt.

Als zufällige Faktoren wurden die im ACE-Modell errechneten, absoluten Varianzanteile der additiven, genetischen Effekte ( $\sigma_a^2$ ), der geteilten ( $\sigma_c^2$ ) und der individuellen Umwelt ( $\sigma_e^2$ ) gewählt, wobei diese abhängig vom klinischen Untersuchungstag modelliert wurden und damit die individuumspezifische Messwiederholung darstellen. Da insbesondere die Varianzanteile für die verschiedenen Lipide stark variieren und sich in ihrer Größenordnung stark unterscheiden, wurden diese reskaliert und über den jeweiligen Median zentriert. Als Schätzverfahren wurde die Methode des *restricted maximum likelihood* (REML) gewählt.

Für jeden Lipidparameter wurden durch schrittweises Entfernen der festen Faktoren 23 der 31 möglichen Testmodelle konzipiert und durchgeführt. Die nicht betrachteten Testmodelle waren Kombinationen mit dem quadratischen aber ohne den linearen Alterseffekt.

Um das Modell zu wählen, dass die Daten am besten beschrieb, wurde für jedes der Testmodelle das dazugehörige Akaikes Informationskriterium (AIC) berechnet. Hierbei gilt, je kleiner AIC, umso besser beschreibt das Modell die Daten, wobei dem Wert selbst keine Information entnommen werden kann. AIC wurde im Gegensatz zu dem ebenfalls häufig verwendeten Bayes'schen Informationskriterium (BIC) benutzt, da BIC nicht nur den Informationsverlust minimiert, sondern dabei auch das sparsamere Modell favorisiert, was in diesem Fall nicht zwingend nötig war.

Eine genauere Auflistung der betrachteten Testmodelle findet sich im Anhang A.2. Zur Berechnung wurde die Software R (Version 3.1.2) mit den zusätzlichen Paketen

nlme (Version 3.1-121) und usdm (Version 1.1-12) sowie die Programmierumgebung RStudio (Version 0.98.1091) verwendet.

Wie die allgemeine Formel des Modells zeigt, wurde für die zufälligen Effekte auch ein Varianzanteil  $\epsilon$  geschätzt, der von keinem der zugeführten zufälligen Effekte beschrieben wird. Setzt man nun die Varianzanteile der zufälligen Effekte und  $\epsilon$  ins Verhältnis zur Gesamtvarianz, erhält man - anders als beim ACE-Modell - nicht drei sondern vier Komponenten A (additive genetische Effekte), C (gemeinsame Umwelt), E (individuelle Umwelt) und U (Unbekannt), deren Werte zwischen 0 und 1 liegen, sich zu 1 summieren und die zudem unabhängig vom Messpunkt sind. Die genaue Ursache für U kann dabei mit den vorliegenden Daten nicht endgültig geklärt werden. Mögliche Erklärungen sind jedoch kurzzeitige Konzentrationsschwankungen in der abhängigen Variable, Messungenauigkeiten, aber auch Einflussfaktoren, die nicht berücksichtigt wurden wie epigenetische Unterschiede oder die genetisch dominanten Effekte, die im ACE-Modell gleich Null gesetzt wurden.

#### **2.2.7.5 Verfahren zur Dimensionsreduktion**

Verfahren zur Dimensionsreduktion werden genutzt, um Daten anhand einer ähnlichen Typologie in homogenen Gruppen zusammenzufassen und damit hochdimensionale Daten ohne gravierenden Informationsverlust durch niedriger-dimensionale Daten darzustellen. Die bekanntesten Verfahren sind dabei die Clusteranalyse und - teilweise bereits dazugezählt - die Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. *principal component analysis*).

Bei den Clusteranalysen ist insbesondere die hierarchische Clusteranalyse verbreitet. Die Cluster, also Gruppen einander ähnlicher Objekte, entstehen dabei über eine definierte Distanz. Je ähnlicher sich zwei Objekte sind, umso geringer ist die Distanz und die Zugehörigkeit zum gleichen Cluster gegeben. Ziel ist dabei, dass die Objekte innerhalb eines Clusters möglichst ähnlich, die verschiedenen Cluster jedoch möglichst unähnlich zueinander sind. Die Verfahren werden anhand der definierten Distanz, bzw. der verwendeten Metrik (z.B. euklidische Metrik, Manhattan-Metrik) und der Richtung ihrer Generierung beschrieben. Zu unterscheiden ist hier der Ansatz, dass jedes Objekt zunächst ein eigenes Cluster besitzt und im nächsten Schritt ähnliche Cluster zu größeren Clustern zusammengefasst werden, und der Ansatz, nach dem zunächst alle Objekte in einem Cluster sind, das dann schrittweise zerteilt wird in kleinere Cluster (BACKHAUS *et al.*, 2015). Für diese Arbeit wurde der erste Ansatz gewählt mit der euklidischen Metrik.

Bei der Hauptkomponentenanalyse wird die Dimensionsreduktion und damit die vereinfachte Darstellung der hochdimensionalen Daten dadurch erreicht, dass die Daten

mit Hilfe von Linearkombinationen zusammengefasst werden. Die Linearkombinationen stellen die sogenannten Hauptkomponenten dar und können über ihre Eigenwerte und anhand der von ihnen erklärten Varianz der ursprünglichen Daten bewertet werden. Allgemein ist üblich nur Hauptkomponenten mit einem Eigenwert größer 1 zu betrachten und mindestens soviele Hauptkomponenten in weiterführende Analysen einzuschließen, sodass mindestens 95 % der Varianz der ursprünglichen Daten erklärt werden. Bevor die Hauptkomponentenanalyse durchgeführt wird, ist es jedoch anzuraten, die Daten zunächst zu standardisieren (VENABLES & RIPLEY, 2013). In dieser Arbeit wurden dazu sowohl eine log-Transformation als auch alternativ eine Box-Cox-Transformation (BOX & COX, 1964) verwendet.

Sowohl die hierarchische Clusteranalysen als auch die PCAs wurde über das Standardpaket *stats* von R (Version 3.1.2), sowie die R gebundene Programmierumgebung RStudio (Version 0.98.1091) durchgeführt. Beide Methoden wurden unter anderem für die Analyse der Lipidspezies benutzt, um hier Cluster bzw. Hauptkomponenten von sich in ihrer Reaktion einander ähnelnder Lipidspezies zu identifizieren und Parameter wie etwa chemische Eigenschaften festzulegen, die diese Ähnlichkeit hauptsächlich bestimmen. Letzteres wurde durchgeführt, indem die Cluster bzw. Hauptkomponenten der sich in ihrer Reaktion ähnelnder Lipidspezies auf relative Deckungsgleichheit mit Clustern bzw. Hauptkomponenten der Lipidspezies anhand ihrer chemischen Eigenschaften untersucht wurden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Metabolische Reaktion auf die Hochfettdiät

#### 3.1.1 Anthropometrie

Ein wichtiger Punkt in der Konzeption der NUGAT-Studie war, den Einfluss von Gewichtsveränderungen zu minimieren und so den isolierten Einfluss einer Hochfettternährung zu beschreiben. Dies sollte erreicht werden, indem die Diäten isokalorisch an die individuellen Energiebedürfnisse der Probanden angepasst waren.

Die in Tabelle 3.1 zusammengefassten anthropometrischen Daten zeigten jedoch, dass das Körpergewicht signifikant (rep.M. ANOVA:  $p < 0,001$ ) nach insgesamt 6 Wochen anstieg.

**Tabelle 3.1: Verlauf anthropometrischer Daten während der Studie.** Dargestellt ist die Entwicklung der wichtigsten anthropometrischen Marker über die sechs Wochen HFD hinweg. Die Analyse erfolgte über eine rep.M. ANOVA mit Bonferroni-Anpassung. Der angegebene p-Wert ist eine obere Grenze der signifikanten, binären Gruppenvergleiche im Post-hoc-Test, sofern die ANOVA zuvor signifikant war. Die unterschiedlichen Buchstaben identifizieren dabei die Lage des signifikanten Unterschieds. Werte angegeben als Median  $[Q_{0,25}; Q_{0,75}]$ . n.s. - nicht signifikant; N/A - nicht verfügbar; BMI - *body mass index*; WHR - Taille-Hüft-Verhältnis; IHL - intrahepatischer Lipidgehalt. Die relativ konstanten Mediane des Körpergewichts zu allen drei Zeitpunkten, könnte zudem darauf schließen lassen, dass die signifikante Gewichtsveränderung auf einzelne Individuen zurückzuführen ist.

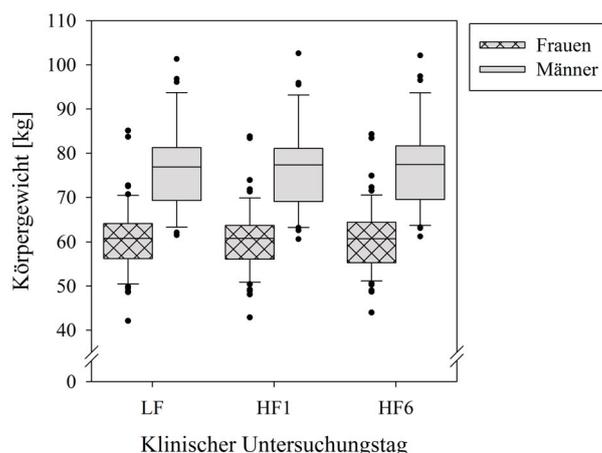
	LF	HF1	HF6	p-Wert
Gewicht [kg]	64,0 [58,6; 74,9] <sup>a</sup>	63,4 [59,1; 74,5] <sup>a</sup>	64,2 [58,6; 76,2] <sup>b</sup>	< 0,001
BMI $[\frac{\text{kg}}{\text{m}^2}]$	22,2 [20,6; 24,2] <sup>a</sup>	22,1 [20,6; 24,0] <sup>a</sup>	22,5 [20,6; 24,4] <sup>b</sup>	< 0,001
WHR [ ]	0,80 [0,75; 0,85]	0,80 [0,75; 0,84]	0,79 [0,74; 0,84]	n.s.
IHL [%]	0,94 [0,56; 1,63]	0,84 [0,56; 1,77]	0,98 [0,53; 2,16]	n.s.
rel. Fettmasse [%]	25,1 [19,6; 29,8]	N/A	25,4 [19,6; 30,1]	n.s.

Die gemessene Gewichtszunahme ist jedoch nicht physiologisch relevant. Die ebenfalls signifikante Erhöhung des BMI (rep.M. ANOVA:  $p < 0,001$ ) war dabei eine Folgeerscheinung dieses Ergebnisses, da der BMI aus dem Körpergewicht und einer in der Studie konstanten Körpergröße errechnet wurde. Dem gegenüber veränderte

sich weder das Taille-Hüft-Verhältnis (WHR) noch der intrahepatische Lipidgehalt (IHL) oder die relative Körperzusammensetzung aus Fettmasse und fettfreier Masse, die mittels DEXA für LF und HF6 bestimmt wurde.

Bei der signifikanten Gewichtsveränderung zwischen HF1 und HF6 handelt es sich um eine Zunahme von im Mittel  $0,477 \pm 1,032$  kg bzw. im Median  $0,300$   $[-0,175; 1,000]$  kg. Eine in der ANOVA ebenfalls signifikante Geschlecht-Zeit-Interaktion ( $p < 0,05$ ) führte dazu, dass die Kohorte in einem weiteren Schritt nach dem Geschlecht der Probanden stratifiziert wurde, um ausschließen zu können, dass nur eine der Subkohorten die Signifikanz induzierte.

Es erwies sich, dass sowohl die Männer als auch die Frauen ihr Gewicht signifikant veränderten (rep.M. ANOVAs, ♀:  $p < 0,05$ ; ♂:  $p < 0,001$ ), dies aber bei den männlichen Probanden stärker ausfiel. So nahmen die Männer zwischen HF1 und HF6 durchschnittlich  $0,794 \pm 1,213$  kg bzw. im Median  $0,550$   $[-0,100; 1,675]$  kg zu, während die weiblichen Probanden ihr Gewicht im Mittel um  $0,291 \pm 0,869$  kg, bzw. mit einem Median von  $0,200$   $[-0,300; 0,825]$  kg veränderten (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1: Geschlechtsspezifische Gewichtsentwicklung.** Das Gewicht veränderte sich statistisch signifikant für beide Geschlechter, wobei der Anstieg jeweils im Bereich natürlicher, täglicher Fluktuationen lag.

Nichtsdestotrotz sollte diese Signifikanz bezüglich ihrer biologischen Relevanz kritisch betrachtet werden, da das Körpergewicht eines Menschen auch völlig natürlichen Schwankungen unterworfen ist.

### 3.1.2 Routinelabor

#### 3.1.2.1 Glukosestoffwechsel

Wichtige Marker des Glukosestoffwechsels sind neben der Nüchterninsulin- und Nüchternglukosekonzentration im Blut auch der daraus errechnete HOMA-IR, ein Index zur Bewertung der Insulinresistenz des Probanden, und der HbA<sub>1c</sub>. Der HbA<sub>1c</sub> beschreibt dabei den Anteil am Gesamthämoglobin bei dem Glukose an den Blutfarbstoff (Glykohämoglobin) gebunden ist. Über ihn können rückwirkende Aussagen über einen längerfristigen Blutzuckerspiegel von etwa 100 bis 120 Tagen getroffen werden, was dem mittleren Alter der Erythrozyten entspricht.

In der NUGAT-Studie veränderte sich nur die Nüchterninsulinkonzentration, während die Nüchternglukosekonzentration über die sechs Wochen Hochfettdiät statistisch stabil blieb (Tab.3.2).

**Tabelle 3.2: Verlauf klassischer Marker des Glukosestoffwechsels während der Studie.** Dargestellt ist die Entwicklung der wichtigsten Marker über die sechs Wochen HFD hinweg. Die Glukose- und Insulinwerte wurden nach zwölfstündiger Nahrungskarenz gemessen. Die Analyse erfolgte über eine rep.M. ANOVA mit Bonferroni-Anpassung. Der angegebene p-Wert ist eine obere Grenze der binären Gruppenvergleiche im Post-hoc-Test, sofern die ANOVA zuvor signifikant war. Die unterschiedlichen Buchstaben identifizieren dabei die Lage des signifikanten Unterschieds. Werte angegeben als Median [Q<sub>0,25</sub>; Q<sub>0,75</sub>]. HbA<sub>1c</sub> - ein Glykohämoglobin; HOMA-IR - *Homeostatic model assessment - Insulin resistance*; n.s. - nicht signifikant. <sup>1</sup> Für den HbA<sub>1c</sub> konnte im Post-hoc-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungstagen festgestellt werden, obwohl die rep.M. ANOVA eine signifikante Veränderung im Zeitverlauf nahelegte.

	LF	HF1	HF6	p-Wert
Insulin [mU/l]	3,90 [2,83; 5,55] <sup>a</sup>	4,75 [3,45; 6,63] <sup>b</sup>	4,55 [2,93; 5,86] <sup>a,b</sup>	< 0,001
Glukose [mmol/l]	5,03 [4,77; 5,56]	5,18 [4,77; 5,53]	5,13 [4,75; 5,58]	n.s.
HOMA-IR [ ]	0,90 [0,61; 1,36] <sup>a</sup>	1,09 [0,75; 1,53] <sup>b</sup>	1,08 [0,64; 1,41] <sup>a,b</sup>	< 0,001
HbA <sub>1c</sub> [%] <sup>1</sup>	5,0 [4,8; 5,2]	5,1 [4,8; 5,2]	5,1 [4,9; 5,4]	n.s.

Passend dazu konnten auch keine Veränderungen für den HbA<sub>1c</sub> im direkten Gruppenvergleich (Post-hoc-Test) nachgewiesen werden. Der HOMA-IR verhielt sich, wie das Nüchterninsulin, was auf die Berechnung des Indizes und die stabile Nüchternglukose zurückzuführen ist. Interessant war zudem, dass nur für die Akutantwort des Insulins, also nach einer Woche Hochfettdiät, ein signifikanter Anstieg in der Kohorte verzeichnet werden konnte (LF: 3,90 [2,83; 5,55] mU/l vs. HF1: 4,75 [3,45; 6,63] mU/l, p < 0,001, rep.M. ANOVA). Am Ende der Intervention unterschied sich der Insulinspiegel (4,55 [2,93; 5,86] mU/l) weder vom Ausgangswert noch von der Akutantwort. Die gleiche Entwicklung konnte für den HOMA-IR beobachtet werden, der

zudem mit medianen Werten um 1 in einem vollkommen normalen, insulinsensitiven Bereich lag.

### 3.1.2.2 Fettstoffwechsel

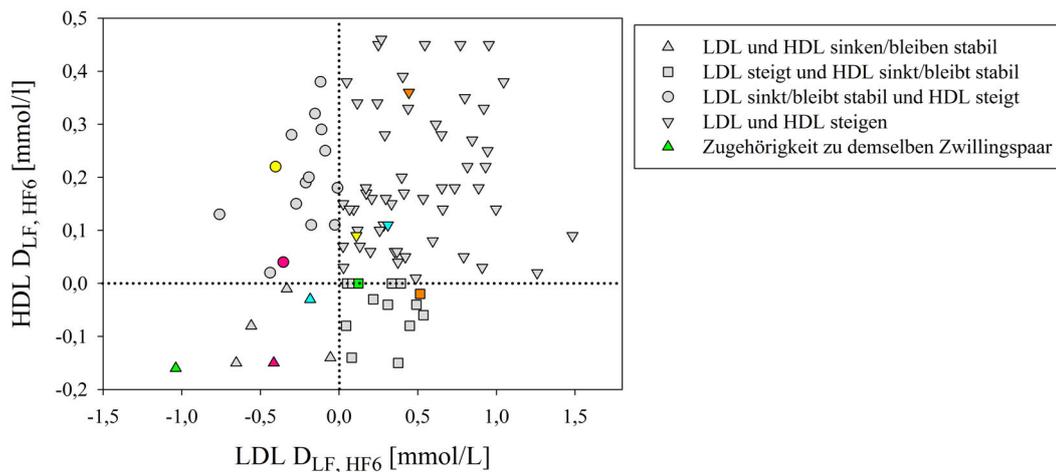
Der Fettstoffwechsel wurde, wie auch in der klinischen Routine üblich, über die nüchternen Plasmakonzentrationen des Gesamtcholesterins, sowie denen des LDL und HDL charakterisiert, wobei ergänzend noch die Menge der Triglyceride und der freien, unveresterten Fettsäuren (NEFAs) bestimmt wurde (Tab.3.3).

**Tabelle 3.3: Verlauf klassischer Marker des Fettstoffwechsels während der Studie.** Die Konzentrationen von Gesamtcholesterin, HDL, Triacylglyceride und NEFAs wurden nach zwölfstündiger Nahrungskarenz gemessen. Die Analyse erfolgte über eine rep.M. ANOVA mit Bonferroni-Anpassung. Der angegebene p-Wert ist eine obere Grenze der binären Gruppenvergleiche im Post-hoc-Test, sofern die ANOVA zuvor signifikant war. Die unterschiedlichen Buchstaben identifizieren dabei die Lage des signifikanten Unterschieds. Werte angegeben als Median  $[Q_{0,25}; Q_{0,75}]$ . HDL - Lipoprotein hoher Dichte; LDL - Lipoprotein geringer Dichte; HDL/Chol - HDL-Gesamtcholesterin-Verhältnis; NEFAs - freie, unveresterte Fettsäuren; n.s. - nicht signifikant.

	LF	HF1	HF6	p-Wert
Cholesterin [mmol/l]	4,26 [3,63; 4,86] <sup>a</sup>	4,48 [3,88; 4,95] <sup>b</sup>	4,66 [3,95; 5,35] <sup>c</sup>	< 0,001
LDL [mmol/l]	2,45 [2,09; 3,06] <sup>a</sup>	2,70 [2,14; 3,26] <sup>b</sup>	2,78 [2,23; 3,33] <sup>c</sup>	< 0,05
HDL [mmol/l]	1,18 [1,01; 1,48] <sup>a</sup>	1,27 [1,11; 1,56] <sup>b</sup>	1,36 [1,11; 1,64] <sup>c</sup>	< 0,001
HDL/Chol [ ]	0,29 [0,24; 0,34]	0,29 [0,25; 0,34]	0,31 [0,25; 0,35]	n.s.
Triglyceride [mmol/l]	0,86 [0,64; 1,19]	0,81 [0,67; 1,05]	0,82 [0,61; 1,10]	n.s.
NEFAs [mmol/l]	0,59 [0,43; 0,77] <sup>a</sup>	0,55 [0,45; 0,68] <sup>a</sup>	0,49 [0,37; 0,62] <sup>b</sup>	< 0,05

Wie nach einer Umstellung auf eine erhöhte Fettaufnahme zu erwarten war, stiegen sowohl die Konzentrationen des Gesamtcholesterins als auch die des LDL und HDL stetig und signifikant an. Das statistisch stabile Verhältnis von HDL zum Gesamtcholesterin zeigt dabei, dass der Anstieg relativ gleichmäßig stattfand und HDL im Median durchgängig etwa 30 % des Gesamtcholesterins ausmachte. Die Triglyceridkonzentration blieb über die sechs Wochen Hochfett-diät stabil, während die freien Fettsäuren um eine Woche verzögert auf die Ernährungsumstellung reagierten und zwischen HF1 und HF6 signifikant weniger NEFAs gemessen werden konnten ( $NEFAs_{\Delta HF1, HF6} : -0,06 [-0,26; 0,11]$  mmol/l).

Betrachtete man die Reaktionen der Fettstoffwechselmarker auf individueller Ebene konnten insbesondere für die Veränderungen von HDL und LDL zwischen LF und HF6 deskriptiv Individuen für jedes der vier möglichen Antwortmuster – wie in Abbildung 3.2 gezeigt - identifiziert werden, die zudem unabhängig von der Zugehörigkeit zu einem Zwillingspaar waren.



**Abbildung 3.2: Individuelle Entwicklung der Lipoproteine zwischen LF und HF6.** Dargestellt ist die individuelle Veränderung von LDL in Abhängigkeit der individuellen Veränderung des HDL. Alle vier möglichen Antwortmuster sind vertreten. Gleiche Farben identifizieren fünf, exemplarische Zwillingspaare. LDL - Lipoprotein geringer Dichte; HDL - Lipoprotein hoher Dichte;  $\Delta$  - Differenz.

## 3.2 Transkriptomische Reaktion im subkutanen, weißen Fettgewebe

Aufbauend auf eine Microarray-Transkriptomanalyse im subkutanen, weißen Fettgewebe wurden Marker mittels quantitativer *realtime* PCR verifiziert. Zum Zeitpunkt der statistischen Analyse standen so die Genexpressionsdaten von 61 Biomarkern verschiedener Sektionen des Transkriptoms (u.a. Zytokine, Chemokine, T-Zell- und Makrophagenmarker) im subkutanen Fettgewebe für die drei klinischen Untersuchungstage zur Verfügung.

Anhand der basalen Expression und der Veränderung zwischen den Untersuchungstagen sollten Zusammenhänge dieser Marker untersucht und möglicherweise Netzwerke identifiziert werden, sowie deren ebenfalls mögliche Abhängigkeit von der Diätintervention.

### 3.2.1 Inflammatorisches Netzwerk

Bei der Netzwerkanalyse der 61 Biomarker konnte ein Cluster von 15 Biomarkern identifiziert werden basierend auf den starken Verknüpfungen, die sowohl für die basalen Genexpressionen als auch für die Genexpressionsveränderungen im subkutanen Fettgewebe auftraten. Bei den Variablen handelte es sich um:

- Mitglieder des Inflammasoms (NLRP3, Caspase1 und ASC)

- Biomarker für inflammatorische Prozesse (CCL5, IL1 $\beta$ , IL1ra, NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , TNF $\alpha$ , TLR2 und TLR4) und
- Makrophageninfiltrationsmarker (MRC1, EMR1, CD11c, CD14),

sodass auch ein thematischer und damit biologischer Zusammenhang nahe lag. Die Analyse wurde um zwei weitere Variablen (IL6 und MCP1) ergänzt, die ausschließlich auf der Ebene der basalen Genexpressionen Verknüpfungen zeigten und ebenfalls zu den Inflammationsmarkern gehören.

In Tabelle 3.4 sind die Korrelationskoeffizienten nach Kendall  $\tau$ , die der Netzwerkanalyse zu Grunde lagen, exemplarisch für die Genexpression des Biomarker ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) dargestellt.

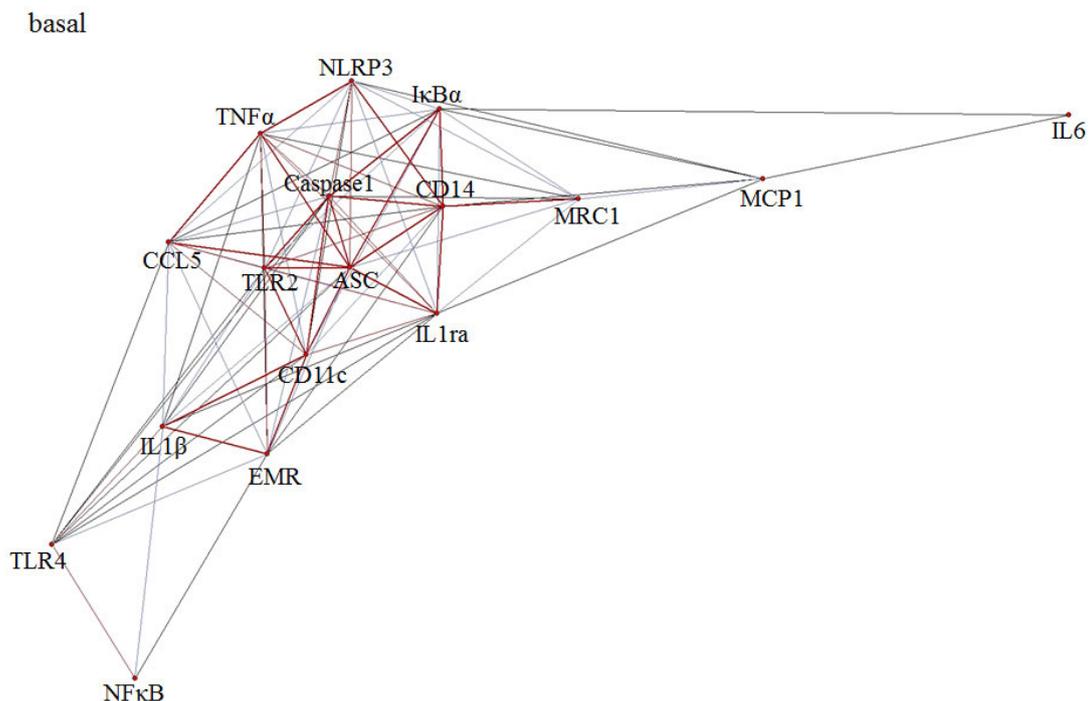
**Tabelle 3.4: Exemplarische Darstellung der Zusammenhänge im inflammatorischen Netzwerk.** Die Genexpression des Inflammasommitglieds ASC zeigte starke Zusammenhänge mit den anderen Mitgliedern des identifizierten Genexpressionsclusters, die teilweise unabhängig vom gemessenen Zeitpunkt bzw. der Diät waren und sowohl in den basalen Genexpressionen, als auch bei den Veränderungen auftraten. Für alle dargestellten Korrelationskoeffizienten nach Kendall  $\tau$  gilt:  $8,3 \cdot 10^{-15} \leq p_{BH} \leq 7,3 \cdot 10^{-5}$ . Eine vollständige Auflistung der Korrelationskoeffizienten zwischen Mitgliedern des Netzwerkes befindet sich im Anhang Tab.A.3.

	ASC					
	LF	HF1	HF6	$\Delta_{LF, HF1}$	$\Delta_{HF1, HF6}$	$\Delta_{LF, HF6}$
Caspase1	0,67	0,72	0,61	0,56	0,66	0,51
CCL5	0,48	0,56	0,51	0,56	0,54	0,37
CD11c	0,65	0,74	0,68	0,70	0,75	0,65
CD14	0,67	0,71	0,57	0,67	0,61	0,66
EMR1	0,37	0,50	0,44	0,62	0,64	0,46
I $\kappa$ B $\alpha$	0,54	0,47	0,56	0,36	0,57	0,50
IL1 $\beta$	0,37	0,40	0,44	0,49	0,56	0,45
IL1ra	0,60	0,58	0,53	0,47	0,59	0,58
IL6						
MCP1						
MRC1	0,43	0,41	0,34			
NF $\kappa$ B					0,33	
NLRP3	0,49	0,58	0,41	0,35	0,46	0,43
TLR2	0,67	0,72	0,67	0,65	0,73	0,66
TLR4		0,37		0,40	0,43	0,43
TNF $\alpha$	0,60	0,63	0,49	0,61	0,51	0,38

Bereits an diesem Beispiel kann man anhand der Anzahl ihrer Verknüpfungen tendenziell zwischen Markern unterscheiden, die zum Kern des Netzwerkes gehören müssten (z.B. ASC und CD11c), und Markern, die eher periphär liegen würden (z.B. NF $\kappa$ B und MRC1).

### 3.2.1.1 Visualisierung als diätunabhängige Netzwerke

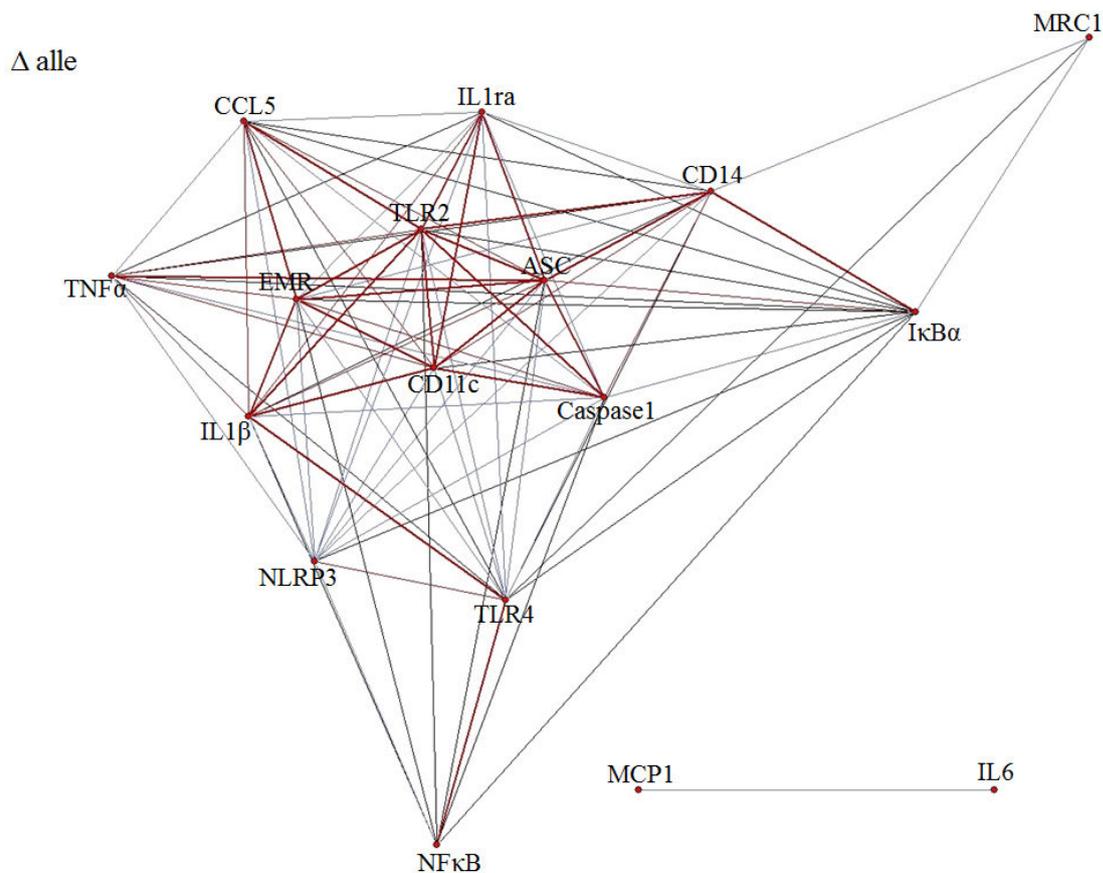
Zunächst wurde das Netzwerk für jeden betrachteten Zeitpunkt, also sowohl basal als auch in der Veränderung, visualisiert (vgl. Abb. A.2 bis A.7). Im nächsten Schritt wurde jeweils eine Überlagerung vollzogen für die basalen Genexpressionen (LF, HF1 und HF6) und für die Genexpressionsveränderungen ( $\Delta_{LF, HF1}$ ,  $\Delta_{HF1, HF6}$  und  $\Delta_{LF, HF6}$ ), das heißt für Kanten, die zu mehreren Zeitpunkten existierten, wurden die entsprechenden Korrelationskoeffizienten summiert. Auf diesem Wege wurden zwei Netzwerke generiert, die stetige Zusammenhänge stärker gewichten als nur sporadisch auftretende. Die beiden Überlagerungsnetzwerke sind in den Abbildungen 3.3 (basal) und 3.4 (Veränderung) dargestellt.



**Abbildung 3.3: Überlagertes Netzwerk der basalen Genexpressionen (LF, HF1, HF6) der 17 Kandidatenbiomarker.** Zur Überlagerung wurden die Korrelationskoeffizienten der Zusammenhänge summiert. Zudem wurde ein Farbschema nach Stärke und Stetigkeit des Zusammenhangs eingeführt: rot - starker/stetiger Zusammenhang, blau - moderater Zusammenhang, schwarz - schwacher/nicht stetiger Zusammenhang.

Beiden Netzwerken gemein war die zentrale Rolle der Inflammationmarker ASC und Caspase1, sowie des proinflammatorischen M1-Makrophagenmarkers CD11c, während der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B und der antiinflammatorische M2-Makrophagenmarker MRC1 nur periphär in den Netzwerken auftauchten.

Die beiden zusätzlich eingefügten Inflammationmarker IL6 und MCP1 zeigten darüber hinaus ebenfalls nur eine periphäre Verknüpfung zu dem basalen Überlagerungs-



**Abbildung 3.4:** Überlagertes Netzwerk der Genexpressionsveränderungen ( $\Delta_{\text{LF}}$ ,  $\text{HF1}$ ,  $\Delta_{\text{HF1}}$ ,  $\text{HF6}$ ,  $\Delta_{\text{LF}}$ ,  $\text{HF6}$ ) der 17 Kandidatenbiomarker. Zur Überlagerung wurden die Korrelationskoeffizienten der Zusammenhänge summiert. Zudem wurde ein Farbschema nach Stärke und Stetigkeit des Zusammenhangs eingeführt: rot - starker/stetiger Zusammenhang, blau - moderater Zusammenhang, schwarz - schwacher/nicht stetiger Zusammenhang.

netzwerk, während sie von dem Netzwerk der Genexpressionsveränderungen ganz isoliert waren.

Eine weitere Beobachtung betraf die beiden *Toll-like receptors* TLR2 und TLR4, da sie in beiden Netzwerken einerseits deutlich voneinander entfernt lagen und dabei andererseits TLR2 eine zentralere Position als TLR4 einnahm.

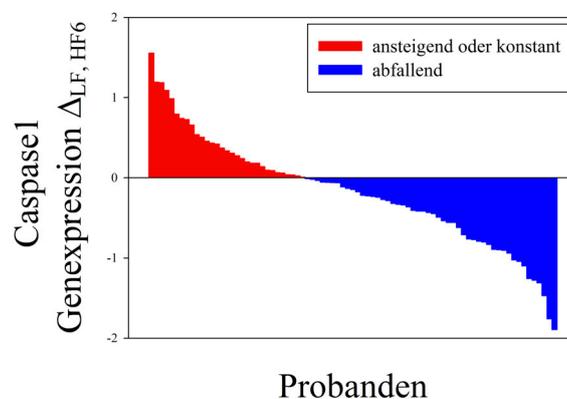
### 3.2.1.2 Verifizierung

Die genaue Funktionsweise, z.B. die Hierarchie oder Kausalität, solcher hypothetischer Netzwerke kann über mathematische Methoden nicht analysiert werden und bedarf weiterer zielgerichteter Experimente (z.B. Zellkulturversuche oder Tiermodelle).

Darüber hinaus kann mathematisch aber eine Verifizierung der Netzwerke vorgenommen werden, die zumindest eine Kausalität nahe legt.

Gezeigt werden soll dies am Beispiel des Überlagerungsnetzwerkes der Genexpressionsveränderungen (vgl. Abb. 3.4) und Caspase1.

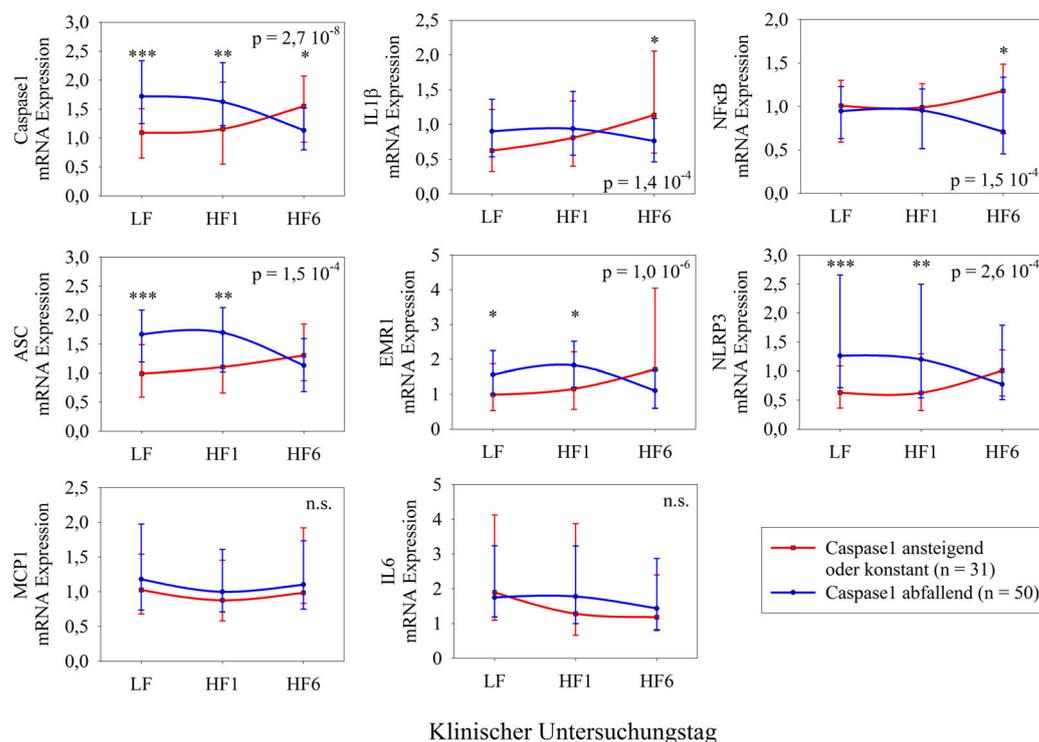
Die in Abbildung 3.5 dargestellte individuelle Veränderung der Caspase1-Genexpression zwischen LF und HF6 wurde genutzt, um die Studienkohorte in zwei Subkohorten zu trennen. Die blau markierte Subkohorte bestand aus 50 Probanden, deren gemessene Genexpression von Caspase1 zwischen LF und HF6 abfiel, während die Genexpression der 31 Probanden der rot markierten Kohorte entweder konstant blieb oder zunahm über die sechs Wochen HFD.



**Abbildung 3.5: Individuelle Veränderung der Genexpression von Caspase1 zwischen LF und HF6.** Über die Veränderung der Genexpression zwischen LF und HF6 konnte die Kohorte in zwei Subkohorten aufgetrennt werden, die zur Stratifizierung genutzt wurde. Rot - Individuen, deren Genexpression von Caspase1 zwischen LF und HF6 konstant blieb oder anstieg ( $n = 31$ ); blau - Individuen, deren Genexpression von Caspase1 zwischen LF und HF6 abfiel ( $n = 50$ ).

Anhand der Zuordnung zu einer der beiden Subkohorten wurde der Verlauf der Genexpression der anderen Netzwerkmitglieder stratifiziert und der Einfluss der Gruppenzuordnung untersucht (Abb. 3.6).

Mit Ausnahme von  $\text{TNF}\alpha$  zeigte für alle anderen Mitglieder des Überlagerungsnetzwerkes der Genexpressionsveränderungen die Gruppenzugehörigkeit nach Caspase1-Stratifizierung einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf über die sechs Wochen HFD (für alle gilt:  $2,7 \cdot 10^{-8} \leq p \leq 0,024$ ). In dem Post-hoc durchgeführten Gruppenvergleich gab es dabei interessanterweise zwei Arten von Reaktionsmustern. Bei Markern wie  $\text{EMR1}$ ,  $\text{NLRP3}$  und  $\text{ASC}$  zeigten sich die signifikanten Gruppenunterschiede an LF und HF1, während sie zu HF6 nicht signifikant und damit synchronisiert waren.  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{NF}\kappa\text{B}$  waren dagegen zu Beginn der Studie gleich expremiert und



**Abbildung 3.6: Abhängigkeit der Genexpression innerhalb des Netzwerks.** Dargestellt ist der Verlauf der Genexpression abhängig von einem Anstieg, bzw. Konstanz (rot) oder Abfall (blau) der Genexpression von Caspase1 zwischen LF und HF6. Caspase1 ist dargestellt zur Verifizierung der vorgenommenen Stratifizierung. MCP1 und IL6 fungieren als Gegenbeispiele, da beide Marker nicht mit dem Überlagerungsnetzwerk der Genexpressionsänderungen verbunden sind. Eine Abbildung der übrigen Mitglieder des Netzwerkes befindet sich im Anhang (vgl. Abb. A.8). Der angegebene p-Wert bezieht sich auf den Einfluss der Gruppenzuordnung auf den Verlauf der Genexpression des jeweiligen Markers (zweifaktorielle, rep.M. ANOVA) und die Sternchen auf den Post-hoc-Vergleich zwischen den Gruppen zu dem jeweiligen Zeitpunkt (Mann-Whitney-U-Test; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die Werte sind angegeben als Median  $[Q_{0,25}; Q_{0,75}]$ .

ihre Genexpression divergierte erst zu HF6 signifikant. Im Gegensatz zu den Mitgliedern des Netzwerkes konnte für IL6 und MCP1, die beide isoliert vom betrachteten Netzwerk lagen, keine solche Abhängigkeit nachgewiesen werden.

Ein zweites Beispiel, bei dem die Kohorte anhand der Genexpressionsänderung von CD11c stratifiziert wurde, ist im Anhang zu finden (vgl. Abb. A.9 bis A.11).

### 3.3 *Lipidomics*

Die Analyse der Plasmalipidkonzentrationen aufgeteilt in die Konzentrationen ganzer Lipidklassen und spezieller Lipidspezies (anhand ihrer anhängigen Fettsäuren) wurde unter drei Aspekten durchgeführt:

1. die Entwicklung der Lipidkonzentrationen unter den Bedingungen einer Hochfettdiät,
2. der Einfluss von Geschlecht, BMI und Alter auf die Plasmakonzentrationen und
3. die Erbllichkeit von Plasmakonzentrationen in Relation zu dem Einfluss von Umweltfaktoren.

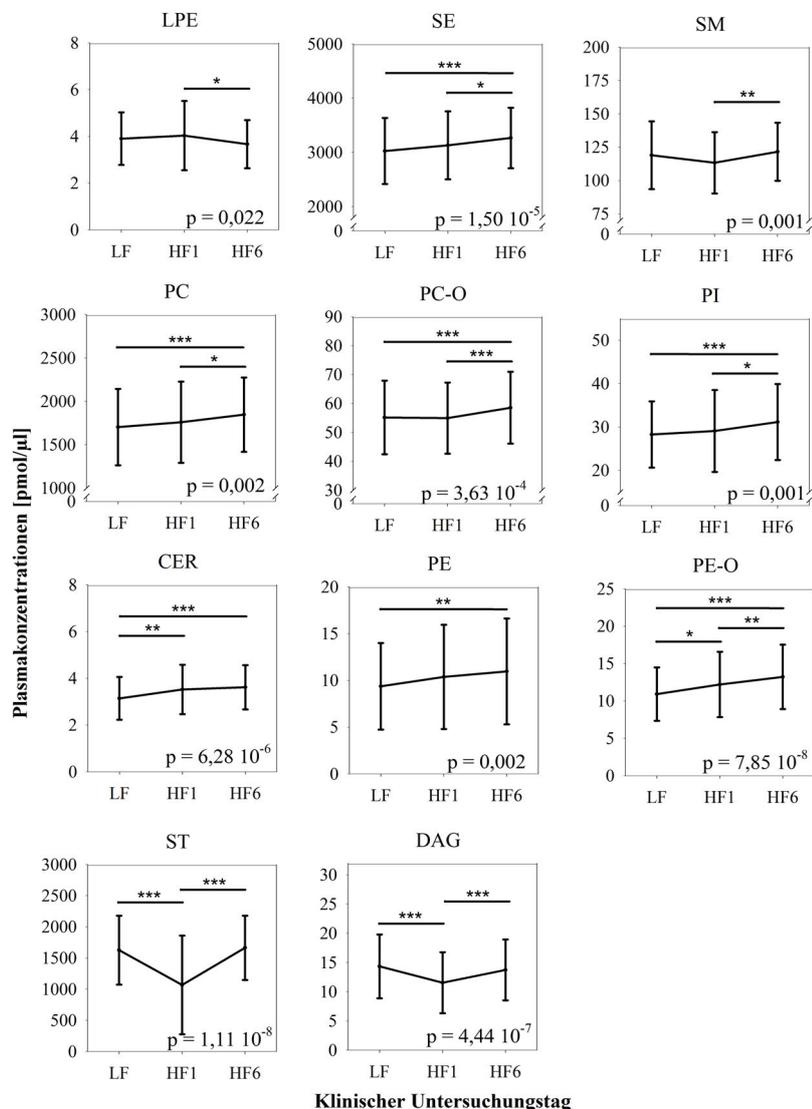
Auf diese Weise sollte die Beziehung von Nahrung/Ernährung und den im Blut vorkommenden Lipiden genauer beschrieben werden, um das Potential der *Lipidomics* als klinisches Untersuchungsmedium zu ergründen und erste methodische Schritte zu einer solchen Umsetzung - sofern möglich - zu etablieren.

#### 3.3.1 Entwicklung der Lipidkonzentrationen unter einer Hochfettdiät

Infolge der Hochfettdiät stieg die Plasmakonzentration der gemessenen Lipide als Gesamtkonzentration betrachtet zwischen HF1 und HF6 signifikant an (HF1: 7186,4 [5653,4; 8539,1] vs. HF6: 7923,8 [6950,1; 8580,6] pmol/ $\mu$ L,  $p < 0,01$ , rep.M. ANOVA), während die einzelnen Lipidklassen ein deutlich inhomogeneres Antwortmuster zeigten. Insgesamt konnten, wie auch in den Abbildungen 3.7 dargestellt, 6 Antwortmuster identifiziert werden:

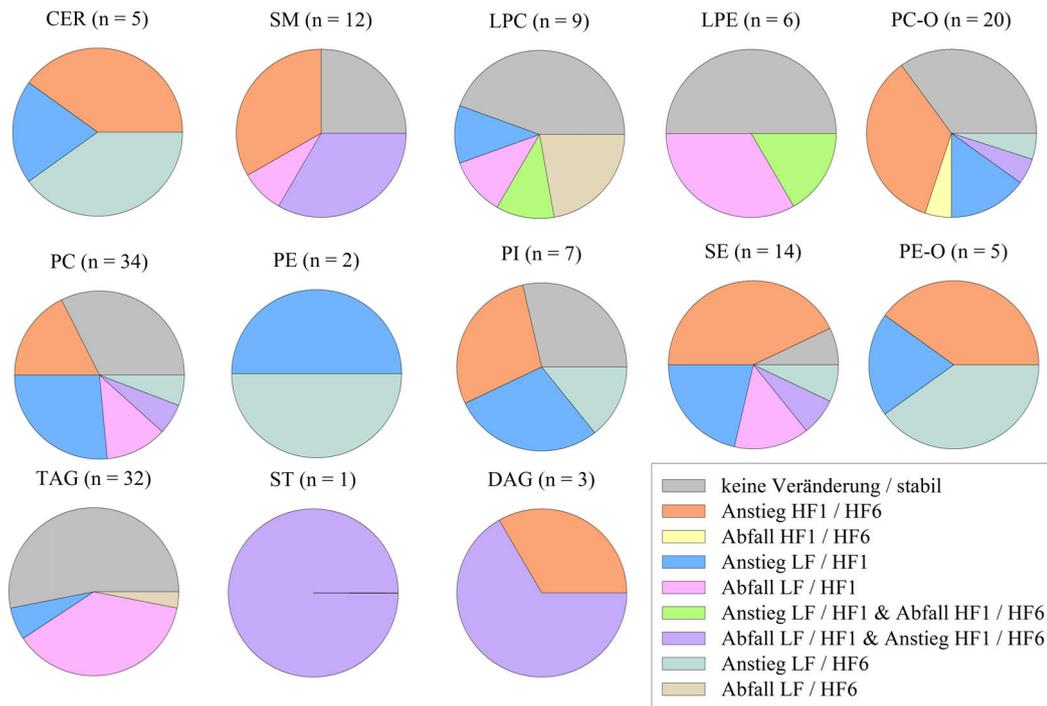
1. eine Plateauphase in der ersten Woche mit anschließendem Abfall über die nächsten fünf Wochen (LPE,  $p < 0,05$ ),
2. eine Plateauphase in der ersten Woche mit verzögerter Akkumulation innerhalb der nächsten fünf Wochen (PC, PC-O, PI, SE und SM, alle  $p < 0,01$ ),
3. eine akute Akkumulation innerhalb einer Woche HFD mit folgender Plateauphase zwischen HF1 und HF6 (CER,  $p < 0,001$ ),
4. ein monotoner Anstieg (PE, PE-O, alle  $p < 0,01$ ),
5. eine Gegenregulation innerhalb der letzten fünf Wochen des zunächst nach einer Woche auftretenden Abfalls (DAG und ST, alle  $p < 0,001$ ) und

6. stabile Konzentrationen über die sechs Wochen HFD hinweg (LPC und TAG, alle  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 3.7: Entwicklung der Konzentrationen der Lipidklassen.** Dargestellt ist die Entwicklung der Konzentrationen der Lipidklassen nach der Standardisierung. Die Klassen mit (statistisch) stabilen Konzentrationen (TAG und LPC) sind hier nicht gezeigt. Am häufigsten reagierten die Klassen um eine Woche verzögert mit signifikanten Änderungen zwischen HF1 und HF6, rep.M. ANOVA; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ , arith.Mittel  $\pm$  SD.

Zusätzlich zu den sich ändernden Konzentrationen der Lipidklassen konnten auch Änderungen in der Komposition dieser Klassen beobachtet werden, indem die einzelnen Lipidspezies individuelle Reaktionsmuster auf die Hochfettdiät zeigten (Abb. 3.8). Insgesamt reagierten 102 der 150 gemessenen Spezies (68 %) auf die Diätumstellung und änderten sich signifikant (alle  $p < 0,05$ ), wobei der Großteil der Spezies entweder



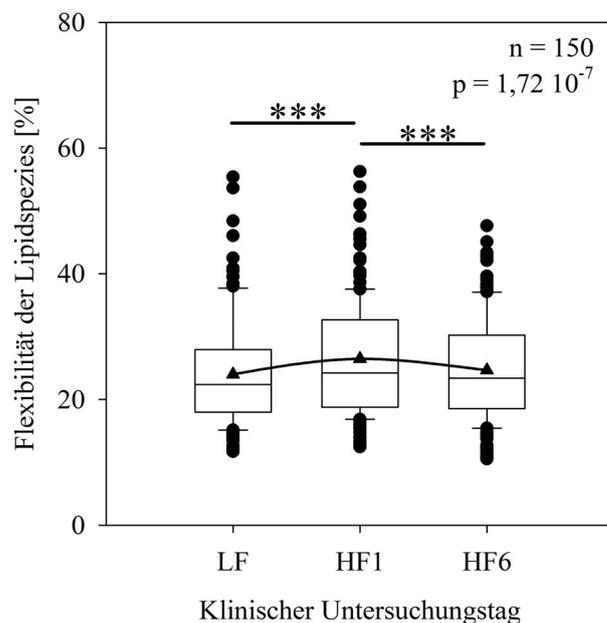
**Abbildung 3.8: Kreisdiagramme der klassenabhängigen Veränderungen der Lipidkonzentrationen.** Obwohl sich teilweise die Plasmakonzentration der Lipidklasse nicht änderte (TAG und LPC), zeigten die Lipidspezies ein deutlich variables Antwortmuster auf die HFD (rep. M. ANOVA).

nur akut auf die Hochfettdiät reagierte ( $n = 45$ ) oder verzögert ( $n = 31$ ) mit einer entsprechenden Plateauphase danach bzw. davor. Nur 13 Spezies reagierten monoton und weitere 13 zeigten adaptive Tendenzen, indem die Akutreaktion nach einer Woche HFD im weiteren Verlauf negiert wurde. Die Lipide mit den stabilen Konzentrationen gehörten hauptsächlich zu den TAGs und LPEs, die damit weniger sensitiv sind für eine Ernährungsumstellung.

Der Versuch die verschieden reagierenden Lipidspezies anhand bestimmter Merkmale zu clustern, bzw. Merkmale zu identifizieren, anhand derer man vorherzusagen vermag, wie sich eine bestimmte Lipidspezies verhalten müsste, erwiesen sich als zu indifferent, um allgemeinere Aussagen treffen zu können. Weder das Vorhandensein einer bestimmten Kopfgruppe, noch der Sättigungsgrad der Fettsäurereste bestimmte das Antwortmuster. Gleiches galt für die Länge der Fettsäuren oder das Vorhandensein einer spezifischen Fettsäure (z.B. Docosahexaensäure [22:6]).

Dafür zeigte das Lipidom als solches eine adaptive Tendenz in der relativ jungen und gesunden Kohorte. Hierzu wurde die Flexibilität der Lipidspezies, d.h. die Variation der Lipidkonzentrationen innerhalb der Kohorte, untersucht (Abb. 3.9).

Diese stieg nach einer Woche HFD signifikant an (LF: 0,22 [0,18; 0,28] vs. HF1: 0,24 [0,19; 0,33],  $p < 0,001$ , rep.M. ANOVA), was gleichbedeutend war mit einer höheren



**Abbildung 3.9: Relative Flexibilität der Lipidspezies (n = 150).** Die Flexibilität verdeutlicht die Fähigkeit der Probanden an die Bedingungen der HFD zu adaptieren. Der Anstieg nach einer Woche HFD verschwindet nach weiteren fünf Wochen unter der Diät völlig (rep.M. ANOVA). Die Flexibilität ist dargestellt als spezies- und CID-abhängiger Quartilsdispersionskoeffizient. Die dreieckigen Symbole repräsentieren dabei zusätzlich das arithmetische Mittel der Lipidspezies.

Variabilität in den speziesabhängigen Lipidkonzentrationen der Probanden. Im weiteren Verlauf der Studie verschwand dieser Anstieg aber wieder (HF6: 0,23 [0,19; 0,30]; LF vs. HF6: nicht signifikant, HF1 vs. HF6:  $p < 0,001$ ) und fiel zurück auf den Ausgangswert, sodass die Konzentrationen der Lipidspezies innerhalb der Kohorte nach sechs Wochen HFD nicht stärker variierten als direkt nach der Standardisierung.

### 3.3.2 Einflussfaktoren auf Lipidkonzentrationen

Um das Potential einer Methode als klinischer Standard zu ergründen, musste zunächst untersucht werden, ob und inwieweit Individuen sich unterscheiden und welche Faktoren grundlegenden Einfluss auf die untersuchten Parameter nehmen. Alter und Geschlecht sind dabei bekannte Faktoren, die aufgrund ihrer starken, biologischen Relevanz berücksichtigt werden mussten. In einem ernährungs- bzw. gesundheitswissenschaftlichen Umfeld ist zudem der BMI eine wichtige Einflussgröße.

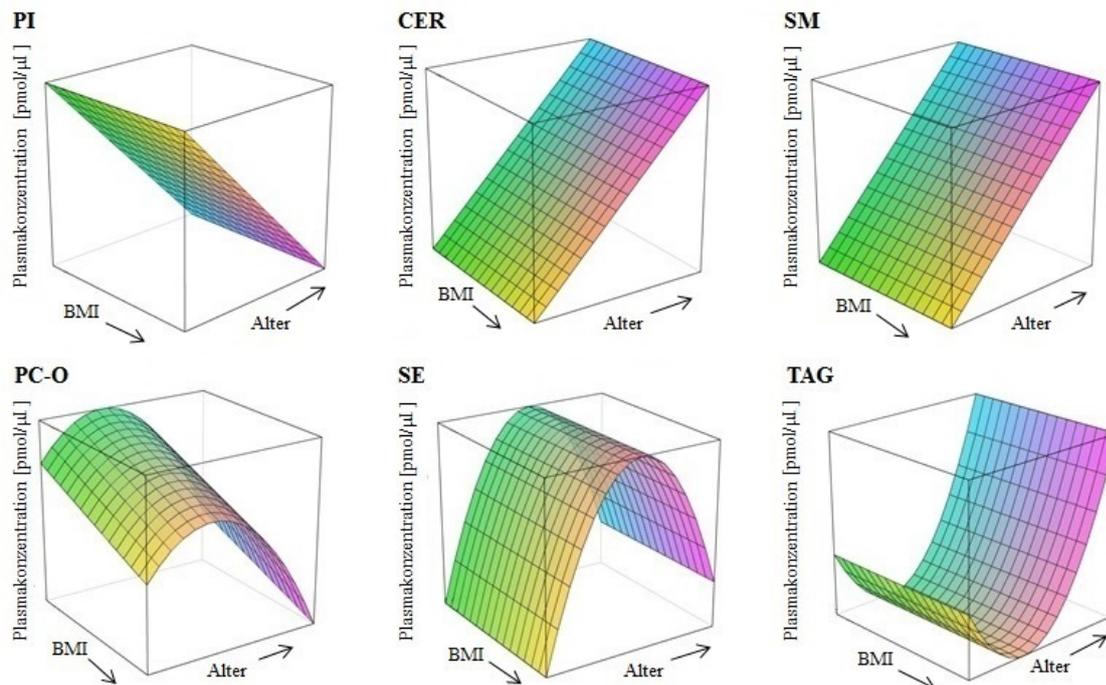
Untersucht wurden die genannten Parameter als feste Faktoren in den linearen gemischten Modellen sowohl für die Lipidklassen (Tab.3.5) als auch die Lipidspezies.

**Tabelle 3.5: Einfluss von BMI, Geschlecht und Alter (linear und quadratisch) auf die Plasmakonzentrationen der Lipidklassen.** Dargestellt sind die  $\beta$ -Werte der festen Faktoren Alter, Geschlecht und BMI sowie das Interzept (Y-Achsenabschnitt) der LMMs. Faktoren mit freien Zellen wurden in das am besten angepasste Modell nicht eingeschlossen. Als Referenz galten junge Frauen mit niedrigem BMI. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ; n.s. - nicht signifikant.

	Interzept		BMI		Geschlecht		Alter		Alter <sup>2</sup>	
Gesamt	6302,95	***	-45,47	n.s.	-919,95	**	137,61	*	-1,45	*
CER	2,51	***					0,02	***		
DAG	14,33	***								
LPC	97,58	***	-1,06	n.s.	27,78	***				
LPE	3,92	***								
PC-O	51,45	***	-1,44	**	-0,34	n.s.	2,16	***	-0,03	***
PC	2340,91	***	-21,76	n.s.	-377,47	***	-0,16	n.s.		
PE-O	10,90	***								
PE	10,98	***			-4,27	***				
PI	34,97	***			-7,25	***	-0,13	*		
SE	2217,37	***	-15,92	n.s.	-376,55	***	65,36	**	-0,64	*
SM	116,91	***			-23,89	***	0,33	**		
ST	1190,58	**	7,08	n.s.	-83,86	n.s.	10,20	**		
TAG	1124,04	**	21,89	n.s.	-117,29	n.s.	-33,77	*	0,41	*

Die Gesamtkonzentration der gemessenen Lipide war geschlechtsabhängig und niedriger in männlichen Probanden ( $p < 0,01$ ). Gleiches galt für die Klassen der PC, PE, PI, SE und SM (alle  $p < 0,001$ ), während die Klasse der LPC als einzige niedrigere Konzentrationen in Frauen aufwies ( $p < 0,001$ ). Mit 6 von 13 Klassen erwies sich das Geschlecht damit als stärkerer Einflussfaktor als der BMI, der nur die Phosphatidylcholinether signifikant beeinflusste ( $\beta_{\text{BMI}} = -1,44$ ,  $p_{\text{BMI}} < 0,01$ ), indem die Konzentrationen in Probanden mit niedrigerem BMI höher waren (Abb. 3.10).

Die Klassen der CER, SM und ST zeigten zudem eine positive Altersabhängigkeit mit höheren Konzentrationen in älteren Probanden (alle  $p < 0,01$ ), während die Konzentrationen der Phosphatidylinositole mit steigendem Alter sanken ( $p < 0,05$ ). Die Klassen der PC-O, SE und TAG wurden neben dem signifikanten linearen Alterseffekt auch quadratisch vom Alter der Probanden beeinflusst, wobei die linearen und quadratischen Einflüsse jeweils gegenläufig waren (PC-O:  $\beta_{\text{Alter}} = 2,16$ ,  $p_{\text{Alter}} < 0,001$  vs.  $\beta_{\text{Alter}^2} = -0,03$ ,  $p_{\text{Alter}^2} < 0,001$ ; SE:  $\beta_{\text{Alter}} = 65,36$ ,  $p_{\text{Alter}} < 0,001$  vs.  $\beta_{\text{Alter}^2} = -0,64$ ,  $p_{\text{Alter}^2} < 0,05$ ; TAG:  $\beta_{\text{Alter}} = -33,78$ ,  $p_{\text{Alter}} < 0,05$  vs.  $\beta_{\text{Alter}^2} = 0,41$ ,  $p_{\text{Alter}^2} < 0,05$ ). Für die PC-O, SE und TAG beschrieb damit der Alterseffekt einen parabolischen Verlauf, wobei dieser für die TAG konvex und für die PC-O und SE konkav verlief. Berechnete man die lokalen Extrempunkte bzw. Wendepunkte für die Klassenkonzentrationen, so zeigten Probanden bis zu einem Alter zwischen 40 und 41

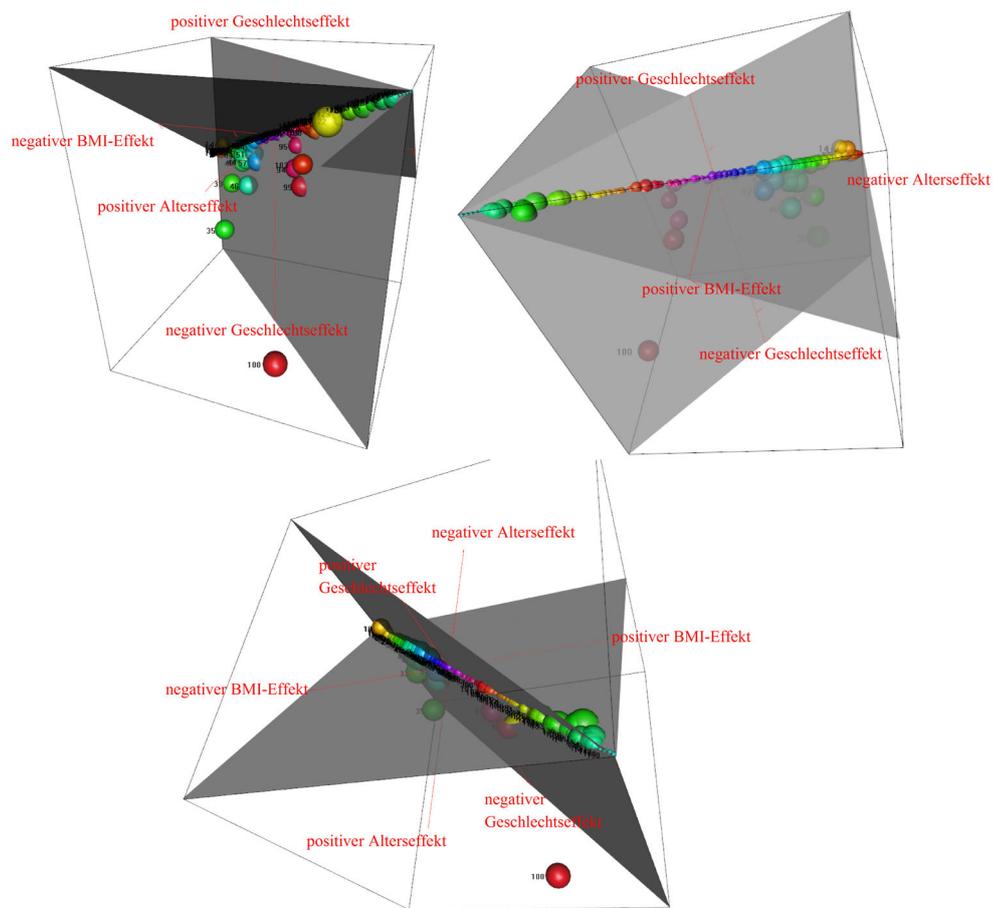


**Abbildung 3.10: Einfluss von Alter und BMI auf die Plasmakonzentrationen der Lipidklassen.** Basierend auf den Berechnungen der linearen gemischten Modellen für die Lipidklassen wurden die Hyperebenen der Alters- und BMI-Effekte dargestellt. Die Funktion spannt dabei das Alter von 18 bis 80 Jahren und den BMI von 17,5 bis  $30 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ . Die Gitterlinien entsprechen jeweils  $0,8\bar{3} \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$  und  $4,1\bar{3}$  Jahren. Nicht gezeigt sind Klassen ohne signifikanten Einfluss beider Faktoren. BMI - *body mass index*.

Jahren einen negativen Zusammenhang, bevor mit höherem Alter die Triacylglyceridkonzentrationen wieder anstiegen. Dagegen erreichten die Plasmakonzentration der PC-O und SE ihr Maximum jeweils bei einem Alter zwischen 40 und 41 bzw. 51. Auch die Gesamtkonzentrationen der gemessenen Plasmalipide war quadratisch abhängig vom Alter mit den höchsten Konzentrationen bei 47-jährigen Probanden (Gesamt:  $\beta_{\text{Alter}} = 137,61$ ,  $p_{\text{Alter}} < 0,05$  vs.  $\beta_{\text{Alter}^2} = -1,45$ ,  $p_{\text{Alter}^2} < 0,05$ ). Die Klassenkonzentration der DAG und PE-O waren hingegen von keinem der untersuchten Faktoren außer der Diät beeinflusst.

Auf Ebene der Spezieskonzentrationen ergab sich ein deutlich differenziertes Bild von Abhängigkeiten, das in Abbildung 3.11 dargestellt ist.

Es wurde für 25 der 150 Lipidspezies eine signifikante Altersabhängigkeit nachgewiesen (alle  $p < 0,05$ ), wobei 24 dieser Spezies zu Klassen gehörten, die ebenfalls als altersabhängig analysiert wurden. Dabei spiegelten die Effekte in den Spezies ohne Ausnahme die Richtung der Klasseneffekte wider. PC [36:5, (16:0, 20:5)] war die einzige Lipidspezies, die zusätzlich einen Alterseffekt aufwies mit höheren Konzentrationen in älteren Probanden ( $\beta_{\text{Alter}} = 0,14$ ,  $p_{\text{Alter}} < 0,001$ ).



**Abbildung 3.11: Einfluss von Alter, Geschlecht und BMI auf die Plasmakonzentrationen der Lipidspezies.** Basierend auf den Berechnungen der linearen gemischten Modelle für die Lipidspezies wurden die (linearen) Alters-, Geschlechts- und BMI-Effekte dargestellt. Die Abweichung einer Lipidspezies (Sphäre) von der Winkelhalbierenden beschreibt die Art und Größe des Effekts entsprechend der Achsenausrichtung. Die Größe der Sphären repräsentiert die  $\ln$ -transformierte, mediane Plasmakonzentration an LF. Als Referenz galten junge Frauen mit niedrigem BMI. Der dreidimensionale Plot wird an dieser Stelle durch drei Perspektiven dargestellt.

Interessanterweise konnte die polynomiale Altersabhängigkeit, die für die Klassenkonzentration der PC-O und SE gezeigt wurde, nur für Einzelne der spezifischen Spezies nachgewiesen werden, sodass diese Spezies entweder dominant sein oder der Effekt synergetisch innerhalb der Klasse zustande kommen müsste. PC-O [36:5] ( $\beta_{\text{Alter}} = 0,45$ ,  $p_{\text{Alter}} < 0,001$  vs.  $\beta_{\text{Alter}^2} = -0,01$ ,  $p_{\text{Alter}^2} < 0,001$ ), SE [45:3, (27:1, 18:2)] ( $\beta_{\text{Alter}} = 0,41$ ,  $p_{\text{Alter}} < 0,001$  vs.  $\beta_{\text{Alter}^2} = -0,41$ ,  $p_{\text{Alter}^2} < 0,001$ ) und SE [47:5, (27:1, 20:4)] ( $\beta_{\text{Alter}} = 8,88$ ,  $p_{\text{Alter}} < 0,001$  vs.  $\beta_{\text{Alter}^2} = -0,10$ ,  $p_{\text{Alter}^2} < 0,001$ ) waren die einzigen Spezies mit einem polynomialen Alterseffekt und erreichten die höchsten Konzentrationen bei Probanden, die 42, 51 bzw. 44 Jahre alt waren. Im Gegensatz dazu konnte für keine der Spezieskonzentrationen der TAG ein solcher polynomialer Alterseinfluss

nachgewiesen werden und nur zwei der Spezies zeigten überhaupt einen linearen Einfluss des Probandenalters (TAG[52:4]:  $\beta_{\text{Alter}} = -0,69$ ,  $p_{\text{Alter}} < 0,05$ , TAG[54:4]:  $\beta_{\text{Alter}} = -0,39$ ,  $p_{\text{Alter}} < 0,05$ ), sodass hier der Effekt, der für die Konzentration der Lipidklassen gezeigt wurde, synergetisch zustande gekommen sein muss.

Zusammenfassend spielte das Alter für die Konzentrationen der Lipidspezies eine weit geringere Rolle, als dies für die Konzentrationen der Lipidklassen der Fall war, und schien auch weniger dominant als die Effekte, die das Geschlecht oder der BMI auf die Plasmakonzentrationen der Lipidspezies ausübten.

Von den 150 gemessenen Spezies waren 44 abhängig vom BMI der Probanden, wobei jeweils die Hälfte ( $n = 22$ ) mit steigendem BMI abfielen bzw. anstiegen. Die mit steigendem BMI in ihren Konzentrationen abfallenden Spezies gehörten dabei ausschließlich zu den Phospholipiden, während die Spezies, deren Konzentrationen positiv mit dem BMI assoziiert waren, sich aus drei SE, 17 TAG und zwei PC mit höherem Kohlenstoffatomanteil ( $n_{\text{C-Atome}} \geq 38$ ) zusammensetzten.

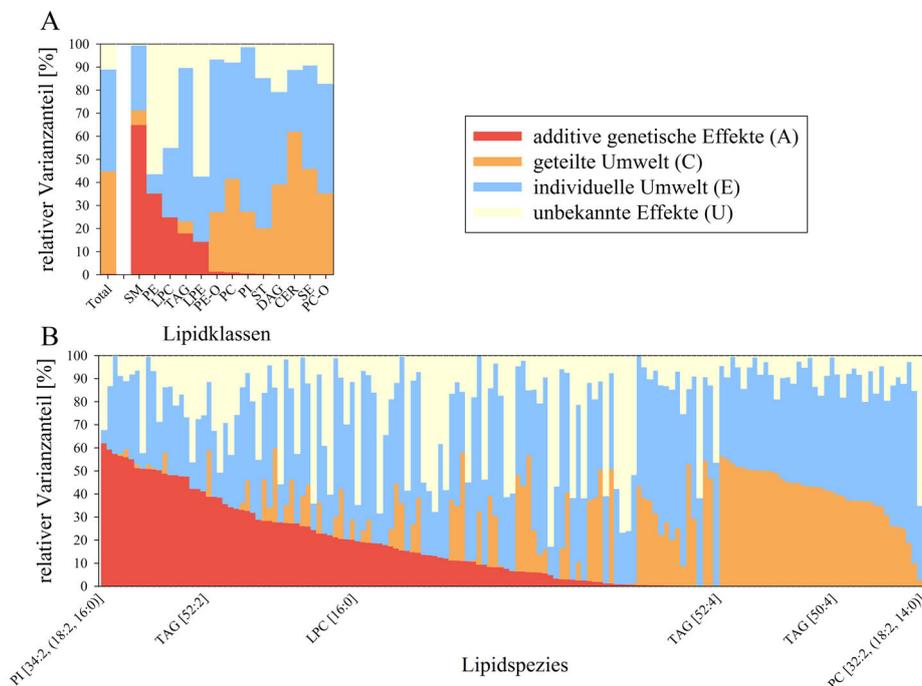
Den deutlichsten Einfluss hatte das Geschlecht auf die Lipidspezieskonzentrationen. 75 und damit 50 % des gemessenen Lipidoms war abhängig davon, ob der Proband männlich oder weiblich war, wobei 8 der 75 Spezies zu nicht geschlechtsabhängigen Klassen gehörten (1 TAG, 3 PC-O, 4 LPE). Die verbliebenen 67 Spezies spiegelten dagegen das Verhalten in der Klassenkonzentration wider und ihre Konzentrationen waren niedriger in männlichen Probanden.

Trotz der nachgewiesenen Effekte von Geschlecht, Alter und BMI legte das Interzept (Y-Achsenabschnitt), das für alle Klassen und 80 % ( $n = 120$ ) der Spezies signifikant in den Modellen war, nahe, dass es weitere Einflussfaktoren gibt, die die Plasmakonzentrationen von Lipiden maßgeblich beeinflussen und die in den Analysen noch nicht berücksichtigt wurden.

### 3.3.3 Erbllichkeit der Lipide

Das Design der NUGAT-Studie in der Weise, dass Zwillinge gleich behandelt wurden, ermöglichte die Schätzung der Erbllichkeit der verschiedenen Lipidklassen und -spezies. Da die Schätzung über das klassische ACE-Model dabei CID-abhängig war, wurden lineare gemischte Modelle der Analyse nachgeschaltet, um die Erbllichkeit nicht nur CID-unabhängig zu betrachten, sondern auch um eine vierte Komponente (U) der Varianzverteilung hinzuzufügen. Diese erfasst Effekte, die nicht über A, C oder E beschrieben werden können, womit eine Überschätzung der anderen Komponenten reduziert wird.

Sowohl für die Plasmakonzentrationen der Lipidklassen als auch die der Lipidspezies wurde so eine starke Variabilität in der Erbllichkeit nachgewiesen, die zwischen 0 und 65 % (Klassen) bzw. 62 % (Spezies) variierte (Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12: Verteilung der Varianz der Konzentrationen der Lipidklassen(A) und der Lipidspezies (B).** Basierend auf den Berechnungen der CID-abhängigen ACE-Modelle (LF, HF1 und HF6) wurde anhand von linearen gemischten Modellen der CID-unabhängige Varianzanteil bestimmt, der jeweils auf die additiven genetischen Effekte (A, rot), die geteilte (C, orange), sowie individuelle Umwelt (E, blau) zurückzuführen war. U (beige) beschreibt den Anteil der Varianz, der auf keiner der drei zuvor genannten Komponenten basierte. Zu sehen ist hierbei, dass die Erbllichkeit (rot) sowohl der Lipidklassen, als auch der Lipidspezies stark variierte.

Entsprechend der Definition für hohe Erbllichkeit ( $A > 0,4$ ; vgl. Kap.2.2.7.3) war nur die Klassenkonzentration der SM hauptsächlich von additiven genetischen Effekten bestimmt ( $A_{SM} = 0,650$ , Tab. 3.6), wobei der zweitgrößte Varianzanteil mit etwa 28 % auf die Einflüsse individueller Umwelt zurückzuführen war.

LPC und PE zeigten eine eher moderate Heritabilität mit 25 bzw. 35 %, während die anderen Klassen eher von Umweltfaktoren beeinflusst wurden und die Klassenkonzentrationen von SE, CER und PC-O keinerlei Erbllichkeit aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten drei der Klassen starke Einflüsse von unbekanntem Effekten ( $U_{LPC} = 0,449$ ,  $U_{PE} = 0,562$ ,  $U_{LPE} = 0,574$ ).

Wurden die Plasmakonzentrationen der Lipidspezies betrachtet, ergab sich, dass 19 der 150 Spezies stark vererbbar waren (vgl. Tab.A.4), wobei 16 von diesen zu den Phospholipiden gehörten, einschließlich beider gemessener Phosphatidylethanolami-

**Tabelle 3.6: Varianzverteilung anhand der linearen gemischten Modelle basierend auf der CID-abhängigen ACE-Modellierung (LF, HF1, HF6) für die Plasmakonzentrationen der Lipidklassen.** Die Lipidklassen zeigten eine starke Variabilität für additive genetische Effekte (Heritabilität, A) mit Werten zwischen 0 und 65 %. Die Parameter sind nach den gerundeten Anteilen für Heritabilität (A), geteilte Umwelt (C), individuelle Umwelt (E) und unbekannte Effekte (U) sortiert. Werte gegeben als Anteile.

	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>U</b>
Gesamt	0,005	0,444	0,442	0,108
SM	0,650	0,063	0,282	0,004
PE	0,353	0,000	0,084	0,562
LPC	0,250	0,000	0,301	0,449
TAG	0,180	0,053	0,664	0,103
LPE	0,144	0,000	0,283	0,574
PE-O	0,014	0,259	0,661	0,067
PC	0,011	0,406	0,504	0,079
PI	0,007	0,268	0,713	0,011
ST	0,005	0,197	0,652	0,146
DAG	0,002	0,390	0,401	0,207
CER	0,000	0,621	0,268	0,111
SE	0,000	0,460	0,448	0,092
PC-O	0,000	0,354	0,475	0,171

nen. Überraschenderweise gehörte die Spezies mit der am stärksten vererbaren Plasmakonzentration (PI [34:2, (18:2, 16:0)];  $A_{PI[34:2, (18:2, 16:0)]} = 0,621$ ) zu einer Klasse, die in ihrer Gesamtkonzentration keinerlei Erblichkeit zeigte ( $A_{PI} = 0,007$ ). Im Gegensatz dazu waren die Konzentrationen von 38 der Spezies ausschließlich durch Umwelt und unbekannte Effekte bestimmt, einschließlich 7 (50 %) der SEs und 15 (47 %) der TAGs.

33 der 150 Spezies (22 %) zeigten zudem auch einen starken Einfluss der unbekanntem Effekte mit bis zu 83 % der Gesamtvarianz ( $U_{PC-O[32:0, (18:0, 14:0)]} = 0,827$ ).

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob auch die Art der Veränderungen in den Plasmakonzentrationen der Spezies vererbbar waren. Hierzu wurde das ACE-Modell für die Änderungen von LF zu HF1, HF1 zu HF6 und LF zu HF6 berechnet. Nur die Konzentrationen von PE[38:4, (20:4, 18:0)] (monoton ansteigend,  $c_{LF} = 6,23 \pm 3,10$  vs.  $c_{HF6} = 6,78 \pm 3,65$  pmol/ $\mu$ L,  $p < 0,05$ ) war stark erblich über alle drei Veränderungen ( $A_{\Delta LF, HF1} = 0,54$ ,  $A_{\Delta HF1, HF6} = 0,48$ ,  $A_{\Delta LF, HF6} = 0,53$ ). Für 113 der 150 Spezies konnte dagegen keinerlei Erblichkeit für die Konzentrationsänderung nachgewiesen werden und die Ergebnisse für die verbliebenen 36 Spezies waren zu inkonsistent, um gesicherte Aussagen treffen zu können. Die Analyse wurde daher an dieser Stelle abgebrochen und die LMMs nicht für die Veränderungen modelliert.

## 4 Diskussion

In der NUGAT-Studie konnte gezeigt werden, dass auch die dem Bedarf eines Menschen angepasste und damit isokalorische Ernährung mit einem hohen Anteil an (gesättigten) Fetten Einfluss auf den humanen Metabolismus nimmt. Zwar wurde eine leichte Gewichtszunahme (und eine daraus resultierende Zunahme im BMI) in der Studienkohorte festgestellt, jedoch rangierte diese im Bereich natürlicher Fluktuationen des Körpergewichts und sollte damit nur eine untergeordnete physiologische Rolle spielen bzw. zu vernachlässigen sein.

Die der Hochfettdiät vorangehende Standardisierung durch eine ebenfalls dem Bedarf angepasste Diätintervention nach DGE-Richtlinien glich die Ernährungsweisen der Probanden einander an und homogenisierte damit die Kohorte. Darüber hinaus minimierte die Standardisierung zusätzlich den Fehler für die eigentliche Intervention, der allein dadurch auftreten und die Daten beeinflussen kann, indem für eine Untersuchung kontrollierte Bedingungen hergestellt werden und zusätzlich das Bewusstsein für Ernährung bei den Probanden verstärkt wird.

### 4.1 Metabolische Reaktionen auf Hochfettdiäten

Durch die Trennung von hyperkalorischer Energiezufuhr und einem relativen Überangebot des Makronährstoffes Fett, zeigte sich, dass die Auswirkungen von letzterem auf die von uns gemessenen Parameter des Metabolismus der Probanden deutlich moderater ausfiel, als es in früheren Studien gezeigt und Ernährungsrichtlinien propagiert wird (vgl. Kap.1.1.2.1).

Eine Erklärung für die Ergebnisse in NUGAT kann dabei natürlich in der Kohorte selbst gesehen werden, die nicht nur relativ jung sondern auch nach medizinischen Maßstäben metabolisch gesund war. Liegen bereits Stoffwechselstörungen (z.B. eine Adipositas oder gestörte Glukosetoleranz) vor, ist der Metabolismus möglicherweise nicht mehr fähig, adverse Effekte durch die Aufnahme von überwiegend gesättigten Fetten zu kompensieren.

Betrachtet man die beiden Systeme, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zeigen die Probanden der Studie insbesondere für den Glukosestoffwechsel adaptive Tenden-

zen: Der akute Anstieg des Nüchterninsulins und die daraus resultierende verringerte Insulinsensitivität (HOMA-IR) nach einer Woche der Hochfettdiät waren nach weiteren fünf Wochen nicht mehr nachzuweisen und auf den Ausgangswert nach der kohlenhydratreichen Diät zurückgefallen. Dabei ist anzumerken, dass die Konzentrationen des Nüchterninsulins und der Index der Insulinsensitivität der Probanden zu allen drei Zeitpunkten im Normalbereich beider Parameter lagen. Ein Schwellenwert für den HOMA-IR hängt dabei stark vom Geschlecht sowie der Ethnie und dem Alter ab. Sowohl MÖHLIG *et al.* (2006) als auch KESKIN *et al.* (2005) sehen aber einen *Cut-off* von  $< 2,5$  als durchaus angemessen an, um zwischen insulinsensitiven und insulinresistenten Europäern zu unterscheiden. Im Vergleich dazu liegen die NUGAT-Probanden mit einem maximalen Median von etwa 1,1 (HF1) deutlich unter diesem Schwellenwert und sind damit im insulinsensitiven Bereich.

Eine Änderung im HbA<sub>1c</sub> war darüber hinaus nicht zu erwarten, da die Dauer der Studie mit 6 Wochen pro Intervention deutlich unter der Zeitspanne liegt, über die mit dem HbA<sub>1c</sub> Aussagen getroffen werden können. Entsprechend der mittleren Lebensdauer eines Erythrozyten liegt diese bei etwa 3 bis 4 Monaten (SHEMIN & RITTENBERG, 1946).

Der Fettstoffwechsel, repräsentiert durch die Konzentrationen von Cholesterol und den Lipoproteinen, zeigte deutlichere und anhaltende Veränderungen unter der Hochfettdiät. Interessanterweise stiegen dabei nicht nur die Konzentrationen von Cholesterol und dem Lipoprotein geringer Dichte (LDL), sondern auch die Konzentration des Lipoproteins hoher Dichte (HDL) an. Dabei war der Anstieg zueinander relativ gleich (konstanter LDL/HDL-Quotient). Insbesondere der letzte Punkt lässt die Schlussfolgerung nicht zu, dass gesättigte Fette eine Dyslipidämie induzieren. Unsere Ergebnisse stehen damit im Widerspruch zu sowohl Studien als auch Ernährungsrichtlinien (OOI *et al.*, 2015; MARAIS, 2013; MCGUIRE, 2011).

Die Metaanalyse von MENSINK *et al.* (2003) unterstützt jedoch unsere Beobachtungen, indem sie nachweisen konnten, dass beim isokalorischen Austausch von Kohlenhydraten gegen Fett auch das HDL einen signifikanten Anstieg verzeichnet. Gleichzeitig zeigen GÖGEBAKAN *et al.* (2011), dass eine Gewichtsreduktion zum parallelen Abfall von HDL und LDL führen kann. Da eine Dyslipidämie ebenfalls häufig mit einer ausgeprägten Adipositas assoziiert wird (KLOP *et al.*, 2013), bleiben berechnete Zweifel bestehen, ob es tatsächlich das relative Überangebot des Makronährstoffes Fett ist und nicht eher die häufig positive Energiebilanz von untersuchten Hochfettdiäten, die die Dyslipidämie induziert.

Die Ursache der Dyslipidämie hinreichend zu klären, wäre insofern wichtig, da sie als unabhängiger Risikofaktor unter anderem auch für Diabetes Typ 2 gilt (RHEE

*et al.*, 2011; MEIKLE *et al.*, 2013) und Schätzungen davon ausgehen, dass 2030 etwa 439 Mio Menschen an Diabetes (davon 90 % an Typ 2) erkrankt sein werden (SHAW *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011), wodurch eines der weltweiten Hauptprobleme für Krankheitshäufigkeit und Mortalität mitadressiert werden würde (ROGLIC *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2011).

Zwei weitere interessante Beobachtungen in NUGAT waren einerseits die stabilen Plasmakonzentrationen der Triacylglyceride (TAG) und die sinkenden Konzentrationen der freien, unveresterte Fettsäuren (NEFA). Die Triacylglyceridkonzentrationen unterstreichen dabei die relative Unabhängigkeit der zirkulierenden TAGs von der Nahrung, wie auch (PARKS & HELLERSTEIN, 2000) beschreiben, die die TAG-Konzentrationen im Blut insbesondere als Produkt des endogenen Metabolismus sehen.

Eine mögliche Erklärung für die sinkenden NEFA-Konzentrationen hätte eine vermehrte Speicherung und damit Reduktion im Blut sein können. Allerdings veränderte sich weder der intrahepatische Lipidgehalt, was für eine Einlagerung in der Leber sprechen würde, noch die relative Fettmasse oder das Taille-Hüft-Verhältnis, was auf eine vermehrte Aufnahme oder eine Umlagerung des Fettgewebes hindeuten würde. SELTMANN (2013) zeigt in ihrer Dissertationsschrift zudem, dass der Abfall begrenzt ist auf das jüngste Tertil (18 - 23 Jahre,  $n = 36$ ) der NUGAT-Kohorte.

Betrachtete man das Lipidprofil für die einzelnen Probanden konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass zwar die Mehrheit ( $n = 56$ ) eine Zunahme in den Konzentrationen von HDL und LDL zeigten, dass aber auch die drei möglichen anderen Antwortmuster vertreten waren. Insbesondere die kleinste Gruppe aus sieben Probanden, deren Lipoproteinkonzentrationen in beiden Spezies abfiel, und die fünfzehn Probanden deren LDL-Konzentration unverändert blieb oder sank, während eine erhöhte Menge von HDL nachgewiesen wurde, scheinen von besonderem Interesse. Beide Antworttypen unterstützen die Hypothese von Menschen, die besser mit den postulierten adversen Effekten einer Hochfettdiät umgehen können als andere (*responder vs. non-responder*). Zudem zeigt es das Potential der jungen Kohorte zur Adaptation und unterstreicht die Notwendigkeit auch in der Medizin den Patienten als Individuum zu betrachten. Da sich zudem die Zwillinge innerhalb ihres Paares deutlich unterschiedlich verhielten, scheinen die Antwortmuster von Umweltfaktoren bedingt zu werden.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit sind - entsprechend der betrachteten Parameter - auf einzelne, spezifische Teilsysteme des Metabolismus begrenzt. Weitere Parameter, wie etwa die Leberenzyme, Blutzellkonzentrationen und der Elektrolythaushalt, blieben jedoch unbeeinträchtigt durch die Ernährungsumstellung und die Probanden zeigten

auch nach sechs Wochen der Hochfettdiät ein insgesamt unauffälliges Blutbild (SELT-MANN, 2013). Dies könnte einerseits an einem fehlenden Effekt der Nahrungsfette auf diese Parameter liegen oder andererseits zeigen, dass alle Probanden etwaige Effekte relativ gut kompensieren konnten.

## 4.2 Transkriptom und die Interaktion mit Hochfettdiäten

Dass das Inflammasom und die *Toll-like receptors* (TLR) über Signalwege sowohl mit der Makrophageninfiltration des Fettgewebes als auch der Induktion von Zytokinen und inflammatorischen Signalprozessen zusammenhängen, ist bekannt und wurde bereits im Kapitel 1.1.4.3 näher beschrieben. Die in dieser Arbeit verwendete Netzwerkanalyse verdeutlicht diese Zusammenhänge, gewichtet die Komponenten aber auch zusätzlich, was anhand ihrer Lage im Netzwerk gesehen werden kann. Interessanterweise zeigten IL6 und MCP1 keine bzw. kaum Verknüpfung zu den anderen Komponenten des Netzwerkes, obwohl sie sowohl als Zielgene des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (KAYSER *et al.*, 2014) als auch als wichtige Komponenten in der subklinischen Inflammation des Fettgewebes gelten (GHOSH *et al.*, 2006). IL6 gilt zudem auch als *downstream target* von IL1 $\beta$  (MCGEOUGH *et al.*, 2012).

Dagegen nahmen alle drei gemessenen Komponenten des Inflammasoms eine relativ zentrale Positionen in den Netzwerken ein. Dies traf sowohl auf ihre basale Genexpression als auch auf die Veränderung über die Hochfettdiät zu. Eine weitere interessante Beobachtung in den Netzwerken betraf die Lage der Makrophagenmarker, die die Gewichtung der M1-Polarisation der Makrophagen in einer proinflammatorischen Umgebung verdeutlichten, indem CD11c als Marker der M1-Makrophagen (WENTWORTH *et al.*, 2010) deutlich zentraler im Netzwerk positioniert und stärker vernetzt war als MRC1, einem Marker für M2-Makrophagen (RÖSZER, 2015). Auch CD14 und EMR1 sind relativ zentral gelegen, wobei KHAZEN *et al.* (2005) zu bedenken geben, dass EMR1 deutlich makrophagenspezifischer ist als CD14. JANSSENS & BEYAERT (2003) zeigen darüber hinaus eine funktionelle Verknüpfung von CD14 mit dem *Toll-like receptor* 4, indem CD14 in seiner Form als Membranprotein zusammen mit TLR4 einen Signalkomplex bildet, der LPS-(Lipopolysaccharid)-induzierte Signale vermittelt.

Derzeit sind im Menschen neben TLR4 neun weitere *Toll-like receptors* bekannt (JANSSENS & BEYAERT, 2003), wobei nochmals vier weitere in anderen Spezies (z.B. Maus und japanische Flunder) beschrieben wurden (HWANG *et al.*, 2011). Für TLR2 und TLR4, die in NUGAT gemessen wurde, konnten MUZIO *et al.* (2000) zeigen, dass

die Genexpression von TLR2 von LPS induziert wird, während die Genexpression von TLR4 insbesondere durch proinflammatorische Zytokine erhöht wird. Dagegen sprechen unsere Beobachtungen der Netzwerkanalyse, die in einem proinflammatorischen Umfeld eher die Gewichtung von TLR2, d.h. eine stärkere Verknüpfung zwischen TLR2 mit Komponenten des Inflammasoms und proinflammatorischer Prozesse, zeigte, während TLR4 in dem proinflammatorischen Umfeld eine eher periphere Rolle einnimmt im Vergleich zu TLR2. Über das Netzwerk lässt sich allerdings keine Richtung des Zusammenhangs oder Kausalität nachweisen. Weitere Experimente sind nötig, um nachzuweisen, ob die stärkere Verknüpfung der Genexpression von TLR2 mit proinflammatorischen Parametern eher Ursache oder Folge ist. Dessen ungeachtet verweisen JANSSENS & BEYAERT (2003) darauf, dass insbesondere TLR2 Heterodimere mit TLR1 und TLR6 bildet und damit seine Ligandenspezifität erweitert.

Weitere Limitationen der Analyse bestehen darin, dass die Genexpression im Fettgewebe keinerlei Aussage über die tatsächlich im System zirkulierenden Konzentrationen liefert. Einerseits wird die stattfindende Regulation durch zum Beispiel posttranslationale Modifikation nicht berücksichtigt und andererseits ist das Fettgewebe nur eines der Organe, die zu der systemischen Produktion beitragen und somit die zirkulierenden Konzentrationen bestimmen. Hinzu kommt ebenfalls, dass es sich um Proben aus dem subkutanen Fettdepot handelt und zudem nicht zwischen dem Expressionsmuster der Adipozyten und Mitgliedern der stroma-vaskulären Fraktion unterschieden werden kann. Ein Vergleich mit der Genexpression im viszeralen Fettdepot wäre durchaus interessant.

Dennoch können über die Betrachtung der Genexpression Ansatzpunkte für weitere Analysen aufgetan werden und Netzwerkanalysen im Besonderen bieten Hinweise auf divergente Subgruppen in der Kohorte und Hierarchien innerhalb der bekannten Signalwege, wie es auch in dieser Arbeit gezeigt wurde. Interessanterweise war dabei in NUGAT zu beobachten, dass die Subgruppe, deren Caspase1-Genexpression während der Hochfettdiät sank, bereits nach der Standardisierung eine höhere relative Genexpression in den Inflammasomkomponenten sowie TLR2, CD11c, TNF $\alpha$  und IL1ra zeigten, gleichzeitig aber über eine Herunterregulation der Genexpression von IL1 $\beta$ , NF $\kappa$ B und TLR4 reagierten. Beide Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass in dieser Subgruppe durch die Hochfettdiät scheinbar eine Deaktivierung der inflammatorischen Signalkaskade oder deren Gegenregulation induziert wurde.

### 4.3 Lipidom und die Interaktion mit Hochfettdiäten

Durch die massenspektrometrische Analyse des menschlichen Plasmalipidoms war es in der NUGAT-Studie möglich, die Beziehung zwischen Lipiden und einer fettreichen Ernährungsweise zu untersuchen. Dabei wurde nicht nur die hohe Variabilität der Lipidspezies, sondern auch die Erbllichkeit der Plasmakonzentrationen adressiert, sodass auch die genetische Komponente, die sich phänotypisch ausprägt, untersucht wurde.

Die Daten der NUGAT-Studie zeigten, dass die Lipidspezies sensibel auf eine Ernährungsumstellung reagierten und dies teilweise bereits innerhalb einer Woche geschah, sodass sich ein starker Einfluss der Ernährung auf das Lipidom nachweisen ließ, der nicht begrenzt war auf Lipide mit Speicherfunktion.

Interessanterweise reagierten die Lipidspezies dabei teilweise biphasisch, indem sie sich akut zwischen LF und HF1 änderten, dann aber nach weiteren fünf Wochen HFD auf ihren Ausgangswert zurückfielen. Zusätzlich konnte dieses Verhalten für die zunächst ansteigende und dann wieder absinkende Flexibilität des Lipidoms gezeigt werden, was gleichzusetzen ist mit einer erneuten Synchronisation der Probanden zwischen HF1 und HF6. Beides spricht dafür, dass die relativ junge und gesunde NUGAT-Kohorte die Möglichkeit zur Gegenregulation und damit adaptives Potential im Umgang mit der Ernährungsumstellung hatte. Diese Fähigkeit zur Kompensation der mitunter ungünstigen Effekte, könnte eine Erklärung sein, dass in Studien das kardiovaskuläre Risiko unter einer Hochfettdiät nur moderat erhöht war (CHOWDHURY *et al.*, 2014).

Eine weiterführende Untersuchung, ob ein ähnliches Potential in älteren Probanden oder bei Probanden mit metabolischer Vorbelastung (z.B. Insulinresistenz), wäre von Interesse. Darüber hinaus muss neben der Quantität der Fette auch die Qualität der Fette inklusive ihrer Herkunft berücksichtigt werden, da Assoziationen zwischen der Qualität der Fette und Bluthochdruck sowie kardiovaskulären Erkrankungen gezeigt werden konnten (SVETKEY *et al.*, 1999; RASMUSSEN *et al.*, 2006). Bezogen auf ihre Quelle gelten insbesondere gesättigte Fette aus Käse und Milchprodukten als risikomindernd, während der Konsum von gesättigten Fetten aus Fleisch und Fleischprodukten das Krankheitsrisiko unter anderem auch für koronare Herzerkrankungen zu erhöhen scheint (DE OLIVEIRA OTTO *et al.*, 2012; MOZAFFARIAN *et al.*, 2010, 2011). Eine Unterscheidung bezüglich der Qualität der gesättigten Fette bezüglich ihrer Herkunft war in NUGAT allerdings nicht möglich, da sowohl Fleisch- als auch Milchprodukte erlaubt waren.

Die Plasmakonzentrationen der Lipide wurden maßgeblich vom Alter, Geschlecht und dem BMI der Probanden beeinflusst. Der Effekt des Geschlechts könnte zurückzufüh-

ren sein auf Unterschiede der Gonosomen, genomische Prägung oder eine Abhängigkeit von den Geschlechtssteroiden, -hormonen und dem Ovarialzyklus, da der Großteil der weiblichen Probanden premenopausal war. Zudem konnten ISHIKAWA *et al.* (2014), LAPPAS *et al.* (2015) und MIAO *et al.* (2015) bereits deutliche Unterschiede des Lipidmetabolismus zwischen Männern und Frauen nachweisen, die unter anderem die anthropometrische Verteilung des subkutanen und viszeralen Fettes, sowie die Gesamtmenge von Lipiden und den Stoffwechselumsatz betrafen.

Eine Isolierung oder Gewichtung der Faktoren scheint aber wenig sinnvoll, da die Faktoren auch in ihrer Interaktion betrachtet werden müssen (ISHIKAWA *et al.*, 2014). Die Heritabilität von Lipoproteinen wurde bereits hinlänglich untersucht und sowohl HDL als auch LDL gelten als hocherblich (PIETILÄINEN *et al.*, 2009; KAESS *et al.*, 2008; HELLER *et al.*, 1993). Ergebnisse zu der Erblichkeit einzelner Lipidspezies wurden dagegen noch nicht publiziert.

In NUGAT konnte gezeigt werden, dass die Heritabilität sowohl für die Lipidklassen als auch für die Lipidspezies stark für die basalen Messpunkte variierte. Dies könnte auf eine Variabilität in den biosynthetischen Stoffwechselwegen hindeuten und Ansatzpunkte für eine gerichtete Suche nach Genvarianten, z.B. QTLs, liefern, für die allerdings weitere Studien benötigt werden würden.

SCHEITZ *et al.* (2013) wiesen für 92 Inzuchtlinien der Tauffliege *D. melanogaster* nach, dass das Lipidprofil stark vererbbar war, wobei aber Spezies der Phosphatidylethanolamine und -choline eine deutlich höhere Variabilität in den additiven genetischen Effekten zeigten. Da es sich bei diesen beiden Klassen um die Hauptkomponenten der Membranstruktur handelt, fungiert neben dem Sättigungsgrad auch das Verhältnis der beiden Klassen als integraler Regulator für die Membranfluidität. Die Fähigkeit die Konzentrationen und damit das Verhältnis der PCs und PEs der Umwelt anzupassen, ist damit gleichbedeutend wichtig für die homoviskose und thermale Adaptation in poikilothermen bzw. ektothermen Organismen wie *D. melanogaster* (COOPER *et al.*, 2012; OVERGAARD *et al.*, 2008; SCHEITZ *et al.*, 2013). Bei endothermen bzw. homoiothermen Organismen, wie dem Menschen, spielt die Membranfluidität insofern eine Rolle, dass über sie die Aktivität von Membranproteinen und die Membranpermeabilität reguliert und kontrolliert wird (LENAZ, 1987; JOHNSON *et al.*, 2011).

Eine genetische Studie in 1212 Individuen aus 42 mexikanischen Familien untersuchte 319 Lipidspezies aus 23 Klassen und konnte dabei eine Erblichkeit nachweisen, die im Median 0,37 betrug (BELLIS *et al.*, 2014). BELLIS *et al.* (2014) gehen zudem davon aus, dass das Lipidprofil pleiotrop kontrolliert wird, da eine Klassifizierung der Lipidspezies anhand ihrer chemischen Eigenschaften nicht möglich war. Der dabei genutzte Ansatz über eine generationenübergreifende Familienbetrachtung ist aber

deutlich anfälliger für Störeffekte des Alters und altersabhängiger Faktoren (z.B. Lebensstilfaktoren) als ein Zwillingsdesign.

Interessanterweise kommen sowohl SCHEITZ *et al.* (2013) als auch BELLIS *et al.* (2014) zu dem Ergebnis, dass das Verhältnis von geradzahligen zu ungeradzahligen Lipiden fast ausschließlich von der Umwelt abhängt.

Eine ähnliche Heritabilitätsverteilung, wie sie in der NUGAT-Studie für das Lipidom geschätzt wurde, beobachteten LIU *et al.* (2015) für 342 Plasmaproteine und damit eine andere Untergruppe der *Metabolomics*, mit einem Maximalwert für Lipoprotein a ( $A = 0,66$ ).

Die Veränderungen in den Lipidspezies, die auf die Nahrungsumstellung zurückzuführen waren, zeigten dagegen kaum eine nennenswerte Erblichkeit. Dies kann einerseits an den relativ subtilen Veränderungen liegen, die über die Messmethode und das Modell nicht ausreichend erfasst werden können. Andererseits könnten die Antworten des Metabolismus insofern konserviert sein, dass die Probanden synchron antworten und eine Schätzung der Erblichkeit unmöglich ist, da kein Unterschied zwischen mono- und dizygoten Zwillingspaaren erfasst wird.

Bisher ist die Komplexität, sowie Interaktion und Funktion des Lipidoms noch nicht ausreichend verstanden (BELLIS *et al.*, 2014; SCHEITZ *et al.*, 2013), obwohl Lipide immer häufiger mit spezifischen Pathologien, Erkrankungsrisiken und Krankheitsentstehungen verknüpft werden können. Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Lipiden und einer Risikobewertung für Krankheiten und Krankheitsentwicklung, eröffnet ein großes Feld neuer Untersuchungsmöglichkeiten in der Medizin, muss aber in Relation zu dem Lipidom eines gesunden Metabolismus gesetzt werden können, um gültige Aussagen treffen zu können. Des Weiteren wurde bisher noch kein Standard in Bezug auf Labormethoden und -verfahren etabliert, der es ermöglicht Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen direkt zu vergleichen (WATSON, 2006). So wurde in einer finnischen Zwillingskohorte (PIETILÄINEN *et al.*, 2007) der Zusammenhang von Adipositas und steigenden Konzentrationen von Lysophosphatidylcholinen beschrieben, während BARBER *et al.* (2012) die gegensätzliche Assoziation beobachteten, indem niedrigere LPC-Konzentrationen mit Adipositas und Diabetes Typ 2 verknüpft waren.

In NUGAT erwies sich außerdem, dass die Betrachtung einzelner Lipidspezies weit informativer war als die Zusammenfassung zu Lipidklassen und dass die Klassifizierung über chemische Eigenschaften, wie der Sättigungsgrad, die Kettenlänge der Fettsäuren oder die Präsenz einer spezifischen Kopfgruppe in der Kohorte ebenfalls nicht zweckmäßig war. Eine ähnliche Divergenz zeigte sich in der Betrachtung der Erblichkeit der Konzentrationen von Lipidklassen und -spezies. Insbesondere gehörte die

Lipidspezies mit der maximalen Heritabilität (PI[34:2, (18:2, 16:0)]) zu einer Klasse mit nicht nachweisbarer Heritabilität ( $A_{PI} = 0,007$ ), deren andere Mitglieder ebenfalls nur eine geringe oder moderate Erblichkeit aufwiesen ( $A < 0,39$ ), was möglicherweise einen Hinweis auf eine zentrale Rolle dieser speziellen Spezies liefern könnte. Dass die Diversität der Lipide im Laufe der Evolution konserviert wurde, legt nahe, dass eine Verallgemeinerung und Klassifizierung möglicherweise wichtige Spezialisierungen ignoriert und zu einem irreführenden Informationsverlust im Datensatz führt.

Die Erkenntnisse aus der NUGAT-Studie legen zudem nahe, dass Studien in Menschen, die das Lipidom adressieren, detaillierte Ernährungsinformationen benötigen und, sofern möglich, eine standardisierte Ernährungsform der Probanden. Sie unterstreichen die Bedeutung einer standardisierten Messtechnik, die die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit mit anderen Datensätzen und Kohorten gewährleistet und so die Möglichkeit eröffnet, die spezifische Rolle einzelner Lipidspezies im normalen bzw. gesunden Zustand zu charakterisieren. Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht und BMI sollten dabei berücksichtigt werden können.

Die Ergebnisse sind allerdings dadurch limitiert, dass die Probanden der NUGAT-Studie ausschließlich kaukasischer Ethnie waren. Zudem wurde in die Heritabilitätsanalyse eine Komponente U eingeschlossen, die nicht genauer klassifiziert werden konnte, da es unbekannte Effekte auf die Plasmakonzentrationen der Lipide zusammenfasst. Mögliche Erklärungen sind hier kurzzeitige Konzentrationsfluktuationen, technische Variabilität, aber auch der Einfluss dominant-genetischer Effekte, die im ACE-Modell vernachlässigt wurden, oder der Einfluss weiterer Lebensstilfaktoren (z.B. Rauchverhalten [25 Raucher, 12 Ex-Raucher] und Alkoholkonsum), die nicht berücksichtigt wurden. Mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren der Proben für andere Messtechniken können für die Proben vor der Messung des Lipidoms ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, wobei ZIVKOVIC *et al.* (2009) keinen Einfluss solcher Frostwechselzyklen auf die Messbarkeit der *Lipidomics* beobachten konnte.

Fasst man die das Lipidom betreffenden Ergebnisse zusammen, konnte in NUGAT durchaus ein Potential der *Lipidomics* als klinisches und wenig-invasives Untersuchungsmedium nachgewiesen werden. Zudem bieten lineare gemischte Modelle eine gute Möglichkeit zur mathematisch-statistischen Auswertung von den so generierten, großen Datensätzen. Dennoch befindet sich die Analyse des Lipidoms, d.h. das Verständnis der Lipidspezies, ihrer Aufgaben und Interaktionen im Fall von Gesundheit und Krankheiten, wie auch der Umgang mit ihnen in Messtechnik und adäquater mathematischer Analyse, noch in seinen Anfängen und muss in den nächsten Jahren weiter ausgebaut und etabliert werden.

## 4.4 Methodik

Einige Limitationen dieser Arbeit wurden bereits im vorangegangenen Abschnitt im biologischen Zusammenhang betrachtet (z.B. die fehlende Standardisierung bei der Messung von *Lipidomics*). In diesem Abschnitt soll darüber hinaus auf einige Punkte eingegangen werden, die diese Arbeit und die zu Grunde liegende Studie allgemein betreffen, bzw. sollen auch mögliche, methodische Alternativen diskutiert werden.

Zunächst sollen Schwächen des Studiendesign betrachtet werden. Auffällig ist hier zunächst die ungleiche Anzahl von mono- und dizygoten Zwillingspaaren ( $n_{\text{mono}} = 34$  vs.  $n_{\text{di}} = 12$ ), die sich auch auf die Schätzung der Erbllichkeit über das ACE-Modell auswirkt. Allerdings ist die Rekrutierung von Probanden für Humanstudien stark von der Bereitschaft der Zielgruppe abhängig und damit deutlich schwieriger als in Studien mit Modellorganismen. Ernährungsinterventionen haben zudem den Nachteil, dass sie für den Probanden mit einem großen Zeitaufwand, viel Eigeninitiative und Disziplin verbunden sind.

Ebenfalls ein Kritikpunkt an der Studienkohorte sind die dizygoten Zwillingspaare gemischten Geschlechts ( $n_{\text{paare}} = 4$ ). Wie NEALE & CARDON (2010) genauer erläutern, ist das ACE-Modell hier besonders anfällig, wie man auch am Beispiel der Körpergröße sehr gut veranschaulichen kann. Im Durchschnitt sind beim Menschen Männer größer als Frauen (LAMB, 2015), sodass dizygoter Zwillinge gemischten Geschlechts in der Körpergröße schon *per se* stärker variieren als dies für dizygoter Zwillinge gleichen Geschlechts oder monozygoter Zwillinge der Fall ist. Der genetische Einfluss würde in diesem Fall aufgrund des sexuellen Dimorphismus überschätzt werden. Dies gilt auch für andere Parameter die stark vom Geschlecht abhängen. Eine Alternative wären sogenannte *sex-limitation models*, die als eine Erweiterung des ACE-Modells betrachtet werden können und auch Geschlechtsunterschiede berücksichtigen (NEALE & CARDON, 2010). Von der Anwendung wurde jedoch abgesehen, da die Anzahl der dizygoten Zwillingspaare, insbesondere derer mit unterschiedlichem Geschlecht nicht ausreichen, um das Modell adäquat anzupassen. ZYPHUR *et al.* (2013) schlagen zudem vor, zu dem klassischen Zwillingsdesign noch zusätzlich Informationen über die Familie zu sammeln, um in sogenannten *twin family models* die Schwächen des Zwillingsdesigns auszugleichen und bessere Schätzungen von genetischen und umweltbedingten Effekten vorzunehmen.

Ein weiterer Punkt der in der Studie fehleranfällig ist, ist - wie bei jeder Ernährungsstudie - die Genauigkeit der Ernährungsprotokolle bzw. das Einhalten der Diäten. *Under-* bzw. *Overreporting*, also das bewusste oder unbewusste Weglassen bzw. zusätzliche Hinzufügen von Nahrungsmitteln in den Protokollen, sind bekannte Probleme in den Ernährungswissenschaften und verwandten Disziplinen (JOHANSSON *et al.*,

1998; FERRARI *et al.*, 2002; FERRUZZI *et al.*, 2013). Wie in Kapitel 2.2.5 genauer erläutert, wurden die Probanden in der NUGAT-Studie engmaschig von einem Team aus Ernährungsberatern betreut und zudem auch in der jeweiligen Woche vor den Untersuchungstagen mit Lebensmitteln unterstützt, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eines der oben genannten Phänomene aufgetreten ist.

Im Ergebnisteil konnte gezeigt werden, dass sich die Ernährungsintervention über sechs Wochen bereits nachweisbar auf verschiedene Teile des Metabolismus der Probanden auswirkt. Dennoch könnte ebenfalls eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum von Interesse sein, da einige Veränderungen erst verzögert einsetzen könnten und damit innerhalb der sechs Wochen noch nicht auftraten.

Ein Ziel der Arbeit war es, die Ergebnisse der verschiedenen Teile des Metabolismus miteinander zu verknüpfen, wobei sich aber das Transkriptom im weißen Fettgewebe unabhängig von den *Lipidomics* im Blutplasma und anderen Parametern, die im Blut gemessen wurden, zeigte. Die sogenannten *Cross-* oder *Multiomics*, also die Verknüpfung mehrerer *omics*-Datensätze scheinen deutlich erfolgreicher zu sein, wenn weniger Variabilität in den Datensätzen herrscht, d.h. wenn die verschiedenen *omics*-Datensätze entweder aus dem gleichen Medium (z.B. Gewebe) entnommen wurden oder in verschiedenen Medien die gleiche *omics*-Messmethode (z.B. *Transkriptomics*) verwendet wurde (BARTEL *et al.*, 2015; KRUMSIEK *et al.*, 2016).

Betrachtet man die mathematischen Methoden, die verwendet wurden, ergeben sich die meisten statistischen Tests aus der Beschaffenheit der Datensätze und/oder Fragestellung. Für einige, wenige Methoden, wie oben bereits für das ACE-Modell gezeigt, hätten aber auch Alternativen zur Verfügung gestanden. In Kapitel 2.2.7.4 wurde bereits darauf eingegangen, dass das Informationskriterium nach Akaike dem nach Bayes vorgezogen wurde, da im biologischen Zusammenhang nicht immer das sparsamste Modell auch zwingend zu favorisieren ist. Darüber hinaus hätte die Möglichkeit bestanden, statt eines Informationskriteriums eine Regularisierung zur Anpassung des Modells zu nutzen. Dabei wird das Modell mit einem Strafterm versehen, der abhängig von der Komplexität des Modells, eine Korrektur der Schätzung vornimmt. Bekannte und häufig verwendete Methoden sind die Ridge- und Lasso-Regularisierung bzw. eine Verknüpfung der beiden Methoden. Der Strafterm der Regularisierung basiert dabei auf der L1- (im Falle der Lasso-Regularisierung) oder L2-Norm (Ridge-Regularisierung) (Has, 2009). Die Methode wurde nicht gewählt, da sowohl Ridge- als auch Lasso-Regressionen Annahmen über die (*a-priori*-)Verteilung der Daten verlangen, die über den derzeitigen Wissensstand für Lipidkonzentrationen im Blutplasma hinausgehen und damit willkürlich hätten getroffen werden müssen.

## 5 Schlussfolgerungen

Die Arbeit hatte zum Ziel spezifische Antwortmuster und Antworttypen nach der Ernährungsumstellung auf eine zum Bedarf isokalorischen Hochfett-diät zu untersuchen. Dabei war es möglich nachzuweisen, dass sich tatsächlich Änderungen im Vergleich zu einer ebenfalls dem Bedarf angepassten kohlenhydratreichen, fettarmen Ernährung zeigten. Insbesondere konnte ein Netzwerk der Genexpression inflammatorischer Marker im subkutanen Fettgewebe identifiziert werden und Änderungen in den Plasmakonzentrationen der Lipidspezies beschrieben werden, die von Alter, BMI und dem Geschlecht der Probanden abhängig waren und teils auch Effekten der Nutrigenetik/-genomik unterlagen.

Nicht möglich war es dagegen, diese Antwortmuster und -typen innerhalb der Subsysteme direkt zu verknüpfen, was einerseits an der Heterogenität der Daten liegen könnte, andererseits daran, dass die Datensätze aus verschiedenen (Gewebe-)Proben stammten und damit untereinander relativ unabhängig waren, bzw. der Einfluss anderer endokrin-aktiver Organe (z.B. der Leber) nicht berücksichtigt werden konnte. Darüber hinaus muss auch die Vergleichbarkeit der verschiedenen Messmethoden untereinander kritisch betrachtet werden.

Dessen ungeachtet konnte der Nutzen von mathematischen Modellen gezeigt werden, um biologische Fragestellungen adäquat zu realisieren. Entsprechend der Datenstruktur können relativ komplexe biologische Zusammenhänge auf diese Weise vereinfacht dargestellt werden und Zusammenhänge identifiziert werden, die dann über weitere Experimente zu validieren wären.

## 6 Zusammenfassung

Durch die Zunahme metabolischer Stoffwechselstörungen und Erkrankungen in der Weltbevölkerung wird in der Medizin und den Lebenswissenschaften vermehrt nach Präventionsstrategien und Ansatzpunkten gesucht, die die Gesundheit fördern, Erkrankungen verhindern helfen und damit auch die Gesamtlast auf die Gesundheitssysteme erleichtern. Ein Ansatzpunkt wird dabei in der Ernährung gesehen, da insbesondere der Konsum von gesättigten Fetten die Gesundheit nachträglich zu beeinflussen scheint. Dabei wird übersehen, dass in vielen Studien Hochfett-diäten nicht ausreichend von den Einflüssen einer zum Bedarf hyperkalorischen Energiezufuhr getrennt werden, sodass die Datenlage zu dem Einfluss von (gesättigten) Fetten auf den Metabolismus bei gleichbleibender Energieaufnahme noch immer unzureichend ist.

In der *NUtriGenomic Analysis in Twins*-Studie wurden 46 Zwillingspaare (34 monozygot, 12 dizygot) über einen Zeitraum von sechs Wochen mittels einer kohlenhydratreichen, fettarmen Diät nach Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Ernährung für ihr Ernährungsverhalten standardisiert, ehe sie zu einer kohlenhydratarmen, fettreichen Diät, die insbesondere gesättigte Fette enthielt, für weitere sechs Wochen wechselten. Beide Diäten waren dem individuellen Energiebedarf der Probanden angepasst, um so sowohl akut nach einer Woche als auch längerfristig nach sechs Wochen Änderungen des Metabolismus beobachten zu können, die sich in der vermehrten Aufnahme von (gesättigten) Fetten begründeten.

Die über die detaillierte Charakterisierung der Probanden an den klinischen Untersuchungstagen generierten Datensätze wurden mit statistischen und mathematischen Methoden (z.B. lineare gemischte Modellierung) analysiert, die der Größe der Datensätze und damit ihrem Informationsvolumen angepasst waren.

Es konnte gezeigt werden, dass die metabolisch gesunden und relativ jungen Probanden, die eine gute *Compliance* zeigten, im Hinblick auf ihren Glukosestoffwechsel adaptieren konnten, indem die Akutantwort nach einer Woche im Nüchterninsulin und dem Index für Insulinresistenz in den weiteren fünf Wochen ausgeglichen wurde. Der Lipidstoffwechsel in Form der klassischen Marker wie Gesamtcholesterin, LDL und HDL war dagegen stärker beeinflusst und auch nach insgesamt sechs Wochen deutlich erhöht.

Letzteres unterstützt die Beobachtung im Transkriptom des weißen, subkutanen Fettgewebes, bei der eine Aktivierung der über die *Toll-like receptors* und das Inflammation vermittelten subklinischen Inflammation beobachtet werden konnte.

Die auftretenden Veränderungen in Konzentration und Komposition des Plasmalipids zeigte ebenfalls nur eine teilweise und auf bestimmte Spezies begrenzte Gegenregulation.

Diesbezüglich kann also geschlussfolgert werden, dass auch die isokalorische Aufnahme von (gesättigten) Fetten zu Veränderungen im Metabolismus führt, wobei die Auswirkungen in weiteren (Langzeit-)Studien und Experimenten noch genauer untersucht werden müssen. Insbesondere wäre dabei ein längerer Zeitraum unter isokalorischen Bedingungen von Interesse und die Untersuchung von Probanden mit metabolischer Vorbelastung (z.B. Insulinresistenz).

Darüber hinaus konnte in NUGAT aber ebenfalls gezeigt werden, dass die Nutrigenetik und Nutrigenomik zwei nicht zu vernachlässigende Faktoren darstellen. So zeigten unter anderem die Konzentrationen einiger Lipidspezies eine starke Erblichkeit und Abhängigkeit der Diät.

Zudem legen die Ergebnisse nahe, dass laufende wie geplante Präventionsstrategien und medizinische Behandlungen deutlich stärker den Patienten als Individuum mit einbeziehen müssen, da die Datenanalyse interindividuelle Unterschiede identifizierte und Hinweise lieferte, dass einige Probanden die nachteiligen, metabolischen Auswirkungen einer Hochfett-diät besser ausgleichen konnten als andere.

## 7 Summary

Based on the increasing incidence of metabolic disorders and diseases in the world population, medicine and life sciences aim for (new) prevention strategies and targets to promote health, prevent diseases and thereby ease the overall financial burden on health systems. One approach is seen in diet and nutrition. According to recent studies and nutritional guide lines, especially the consumption of saturated fats affects health negatively. Nevertheless, in many studies high fat diets are not separated from the influences of a hypercaloric energy intake. In conclusion the available data for the isolated effects of (saturated) fats on metabolism are still insufficient.

In the *NUtriGenomic Analysis in Twins* study, 46 healthy twin pairs (34 monozygotic, 12 dizygotic) were standardized for their nutritional behavior over a period of six weeks on a high-carbohydrate, low-fat diet according to the DGE guidelines. This standardization was followed by an interventional low-carbohydrate, high-fat diet for another six weeks. Both diets were isocaloric to the individuals' requirements in order to evaluate rapid (after 1 week) and long-term (after 6 weeks) effects on metabolism, which were based on the higher intake of (saturated) fatty acids.

The data sets, which were generated by a detailed characterization of the subjects at the clinical investigation days, were analyzed with statistical and mathematical methods (e.g. linear mixed modeling), which aimed to cover the size of the data sets and thereby the whole amount of information within the data sets.

We could show that the metabolically healthy and relatively young subjects, who showed good compliance, were able to adapt in terms of their glucose metabolism, since the acute increase after one week in fasting insulin and the loss of insulin sensitivity was balanced after additional five weeks. In contrast, lipid metabolism, represented by the classical marker total cholesterol as well as LDL and HDL, was more strongly influenced and still increased after six weeks on high-fat diet.

The latter supports the observations in the transcriptome of white, subcutaneous adipose tissue, where Toll-like receptors and inflammasome seemed to mediate the activation of a low-grade inflammation.

The changes occurring in the concentration and composition of the plasma lipidome also showed a partial counterregulation limited to certain lipid species.

In this regard, we conclude that independent of the energy intake, the consumption of (saturated) fatty acids leads to changes in metabolism, although further studies and experiments are needed to investigate the isolated effects further. Especially studies of extended periods under isocaloric conditions and studies in patients with pathological conditions (e.g. insulin resistance) would be of interest.

Nevertheless, the results in NUGAT emphasize the importance of nutrigenetics and nutrigenomics, since the concentrations of some lipid species seemed to be highly heritable and diet-dependent.

Moreover, our results suggest that ongoing and planned prevention strategies and medical treatments have to treat patients much more as individuals. Our analysis identified interindividual differences and indicated that some participants were able to compensate the adverse and unfavorable metabolic effects of a high fat diet better than others.

# Literaturverzeichnis

- (2009): *The Elements of Statistical Learning - Data Mining, Inference, and Prediction*. 2. Aufl.
- ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. (2012): *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- BACKHAUS, K., ERICHSON, B., PLINKE, W. & WEIBER, R. (2015): *Multivariate Analysemethoden - Eine anwendungsorientierte Einführung*. 14. Aufl. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- BARBER, M. N., RISIS, S., YANG, C., MEIKLE, P. J., STAPLES, M., FEBBRAIO, M. A. & BRUCE, C. R. (2012): *Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes*. In: PLoS One, **7**, 7: e41456.
- BARTEL, J., KRUMSIEK, J., SCHRAMM, K., ADAMSKI, J., GIEGER, C., HERDER, C., CARSTENSEN, M., PETERS, A., RATHMANN, W., RODEN, M., STRAUCH, K., SUHRE, K., KASTENMÜLLER, G., PROKISCH, H. & THEIS, F. J. (2015): *The Human Blood Metabolome-Transcriptome Interface*. In: PLoS Genetics, **11**, 6: e1005274.
- BEEKMAN, M., HEIJMANS, B. T., MARTIN, N. G., PEDERSEN, N. L., WHITFIELD, J. B., DEFAIRE, U., VAN BAAL, G. C., SNIEDER, H., VOGLER, G. P., SLAGBOOM, P. E. & BOOMSMA, D. I. (2002): *Heritabilities of apolipoprotein and lipid levels in three countries*. In: Twin Research, **5**, 2: 87–97.
- BELLIS, C., KULKARNI, H., MAMTANI, M., KENT, J., J. W., WONG, G., WEIR, J. M., BARLOW, C. K., DIEGO, V., ALMEIDA, M., DYER, T. D., GÖRING, H. H., ALMASY, L., MAHANEY, M. C., COMUZZIE, A. G., WILLIAMS-BLANGERO, S., MEIKLE, P. J., BLANGERO, J. & CURRAN, J. E. (2014): *Human plasma lipidome is pleiotropically associated with cardiovascular risk factors and death*. In: Circulation: Cardiovascular Genetics, **7**, 6: 854–863.

- BENESCH, T. (2013): *Schlüsselkonzepte zur Statistik: die wichtigsten Methoden, Verteilungen, Tests anschaulich erklärt*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- BERG, J. M., STRYER, L. & TYMOCZKO, J. L. (2013): *Stryer Biochemie*. 7. Aufl. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- BIESALSKI, H. K. (2015): *Mikronährstoffe als Motor der Evolution*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- BOX, G. & COX, D. (1964): *An Analysis of Transformations*. In: Journal of the Royal Statistical Society, **26**, 2: 211–252.
- BRUDER, C. E., PIOTROWSKI, A., GIJSBERS, A. A., ANDERSSON, R., ERICKSON, S., DIAZ DE STÄHL, T., MENZEL, U., SANDGREN, J., VON TELL, D., POPLAWSKI, A., CROWLEY, M., CRASTO, C., PARTRIDGE, E. C., TIWARI, H., ALLISON, D. B., KOMOROWSKI, J., VAN OMMEN, G.-J. B., BOOMSMA, D. I., PEDERSEN, N. L., DEN DUNNEN, J. T., WIRDEFELDT, K. & DUMANSKI, J. P. (2008): *Phenotypically Concordant and Discordant Monozygotic Twins Display Different DNA Copy-Number-Variation Profiles*. In: The American Journal of Human Genetics, **82**, 3: 763–771.
- CAMPBELL, M. K. & FARRELL, S. O. (2005): *Biochemistry*. Brooks Cole, Belmont.
- CANI, P. D., NEYRINCK, A. M., FAVA, F., KNAUF, C., BURCELIN, R. G., TUOHY, K. M., GIBSON, G. R. & DELZENNE, N. M. (2007): *Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia*. In: Diabetologia, **50**, 11: 2374–2383.
- CHEN, L., MAGLIANO, D. J. & ZIMMET, P. Z. (2011): *The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives*. In: Nature Reviews Endocrinology, **8**, 4: 228–236.
- CHOWDHURY, R., WARNAKULA, S., KUNUTSOR, S., CROWE, F., WARD, H. A., JOHNSON, L., FRANCO, O. H., BUTTERWORTH, A. S., FOROUHI, N. G., THOMPSON, S. G., KHAW, K. T., MOZAFFARIAN, D., DANESH, J. & DI ANGELANTONIO, E. (2014): *Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis*. In: Annals of Internal Medicine, **160**, 6: 398–406.
- CNAAN, A., LAIRD, N. M. & PETER, S. (1997): *Using the general linear mixed model to analyse unbalanced repeated measures and longitudinal data*. In: Statistics in Medicine, **16**: 2349–2380.

- COHEN, J. (1988): *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2. Aufl. Lawrence Erlbaum Associates Inc, New Jersey.
- COOPER, B. S., HAMMAD, L. A., FISHER, N. P., KARTY, J. A. & MONTTOOTH, K. L. (2012): *In a variable thermal environment selection favors greater plasticity of cell membranes in *Drosophila melanogaster**. In: *Evolution*, **66**, 6: 1976–1984.
- DE LORGERIL, M., SALEN, P., MARTIN, J.-L., MONJAUD, I., DELAYE, J. & MAMMELLE, N. (1999): *Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction : Final Report of the Lyon Diet Heart Study*. In: *Circulation*, **99**, 6: 779–785.
- DE MELLO, V. D. F., LANKINEN, M., SCHWAB, U., KOLEHMAINEN, M., LEHTO, S., SEPPÄNEN-LAAKSO, T., OREŠIČ, M., PULKKINEN, L., UUSITUPA, M. & ERKKILÄ, A. T. (2009): *Link between plasma ceramides, inflammation and insulin resistance: association with serum IL-6 concentration in patients with coronary heart disease*. In: *Diabetologia*, **52**, 12: 2612–2615.
- DE OLIVEIRA OTTO, M. C., MOZAFFARIAN, D., KROMHOUT, D., BERTONI, A. G., SIBLEY, C. T., JACOBS, D. R. & NETTLETON, J. A. (2012): *Dietary intake of saturated fat by food source and incident cardiovascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. In: *The American Journal of Clinical Nutrition*, **96**, 2: 397–404.
- DE WIT, N., DERRIEN, M., BOSCH-VERMEULEN, H., OOSTERINK, E., KESHTKAR, S., DUVAL, C., DE VOGEL-VAN DEN BOSCH, J., KLEEREBEZEM, M., MULLER, M. & VAN DER MEER, R. (2012): *Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine*. In: *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, **303**, 5: G589–G599.
- DESPRES, J. P., MOORJANI, S., TREMBLAY, A., POEHLMAN, E. T., LUPIEN, P. J., NADEAU, A. & BOUCHARD, C. (1988): *Heredity and changes in plasma lipids and lipoproteins after short-term exercise training in men*. In: *Arteriosclerosis*, **8**, 4: 402–409.
- ESTADELLA, D., DA PENHA OLLER DO NASCIMENTO, C. M., OYAMA, L. M., RIBEIRO, E. B., DÁMASO, A. R. & DE PIANO, A. (2013): *Lipotoxicity: Effects of Dietary Saturated and Transfatty Acids*. In: *Mediators of Inflammation*, **2013**: 1–13.

- ESTEVE, E., RICART, W. & FERNANDEZ-REAL, J. M. (2005): *Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism*. In: *Clinical Nutrition*, **24**, 1: 16–31.
- ESTRUCH, R., ROS, E., SALAS-SALVADO, J., COVAS, M. I., CORELLA, D., AROS, F., GOMEZ-GRACIA, E., RUIZ-GUTIERREZ, V., FIOLE, M., LAPETRA, J., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., SERRA-MAJEM, L., PINTO, X., BASORA, J., MUÑOZ, M. A., SORLI, J. V., MARTINEZ, J. A., MARTINEZ-GONZALEZ, M. A. & INVESTIGATORS, P. S. (2013): *Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet*. In: *New England Journal of Medicine*, **368**, 14: 1279–1290.
- FALCONER, D. S. (1960): *Introduction to quantitative genetics*. Ronald Press Company, New York.
- FAROOQUI, A. A., RAPOPORT, S. I. & HORROCKS, L. A. (1997): *Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens*. In: *Neurochemical Research*, **22**, 4: 523–527.
- FERRARI, P., SLIMANI, N., CIAMPI, A., TRICHOPOULOU, A., NASKA, A., LAURIA, C., VEGLIA, F., BUENODE-MESQUITA, H., OCKE, M., BRUSTAD, M., BRAATEN, T., TORMO, M. J., AMIANO, P., MATTISSON, I., JOHANSSON, G., WELCH, A., DAVEY, G., OVERVAD, K., TJØNNELAND, A., CLAVEL-CHAPELON, F., THIEBAUT, A., LINSEISEN, J., BOEING, H., HEMON, B. & RIBOLI, E. (2002): *Evaluation of under- and overreporting of energy intake in the 24-hour diet recalls in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)*. In: *Public Health Nutrition*, **5**, 6b: 1329–1345.
- FERRUZZI, M., COULSTON, A. M. & BOUSHEY, C. J. [Hrsg.] (2013): *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*. 3. Aufl. Academic Press, Amsterdam, Boston.
- FLOEGEL, A., STEFAN, N., YU, Z., MÜHLENBRUCH, K., DROGAN, D., JOOST, H.-G., FRITSCH, A., HÄRING, H.-U., HRABE DE ANGELIS, M., PETERS, A., RODEN, M., PREHN, C., WANG-SATTLER, R., ILLIG, T., SCHULZE, M. B., ADAMSKI, J., BOEING, H. & PISCHON, T. (2012): *Identification of Serum Metabolites Associated With Risk of Type 2 Diabetes Using a Targeted Metabolomic Approach*. In: *Diabetes*, **62**, 2: 639–648.
- FORD, D. A. (2010): *Lipid oxidation by hypochlorous acid: chlorinated lipids in atherosclerosis and myocardial ischemia*. In: *Clinical lipidology*, **5**, 6: 835–852.

- FRIEDEWALD, W. T., LEVY, R. I. & FREDRICKSON, D. S. (1972): *Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge*. In: *Clinical Chemistry*, **18**, 6: 499–502.
- GALLAND, L. (2010): *Diet and Inflammation*. In: *Nutrition in Clinical Practice*, **25**, 6: 634–640.
- GANTEN, D. & RUCKPAUL, K. [Hrsg.] (2006): *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen* -. 1. Aufl. Springer Science & Business Media, Berlin Heidelberg.
- GÖGEBAKAN, Ö., KOHL, A., OSTERHOFF, M. A., VAN BAAK, M. A., JEBB, S. A., PAPADAKI, A., MARTINEZ, J. A., HANDJIEVA-DARLENSKA, T., HLAVATY, P., WEICKERT, M. O., HOLST, C., SARIS, W. H., ASTRUP, A. & PFEIFFER, A. F. (2011): *Effects of Weight Loss and Long-Term Weight Maintenance With Diets Varying in Protein and Glycemic Index on Cardiovascular Risk Factors: The Diet, Obesity, and Genes (DiOGenes) Study: A Randomized, Controlled Trial*. In: *Circulation*, **124**, 25: 2829–2838.
- GÖGEBAKAN, Ö., OSTERHOFF, M. A., SCHÜLER, R., PIVOVAROVA, O., KRUSE, M., SELTMANN, A.-C., MOSIG, A. S., RUDOVICH, N., NAUCK, M. & PFEIFFER, A. F. H. (2015): *GIP increases adipose tissue expression and blood levels of MCP-1 in humans and links high energy diets to inflammation: a randomised trial*. In: *Diabetologia*, **58**, 8: 1759–1768.
- GHOSH, T. K., MICKELSON, D. J., FINK, J., SOLBERG, J. C., INGLEFIELD, J. R., HOOK, D., GUPTA, S. K., GIBSON, S. & ALKAN, S. S. (2006): *Toll-like receptor (TLR) 2-9 agonists-induced cytokines and chemokines: I. Comparison with T cell receptor-induced responses*. In: *Cellular Immunology*, **243**, 1: 48–57.
- GREGOR, M. F. & HOTAMISLIGIL, G. S. (2011): *Inflammatory mechanisms in obesity*. In: *Annual Review of Immunology*, **29**: 415–445.
- GRÄLER, M. H. & GOETZL, E. J. (2002): *Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity*. In: *Biochimica et Biophysica Acta*, **1582**, 1–3: 168–174.
- GRUNDY, S. M. [Hrsg.] (2011): *Atlas of Atherosclerosis and Metabolic Syndrome*. 5. Aufl. Springer Verlag, New York.
- HALLER, D., GRUNE, T. & RIMBACH, G. [Hrsg.] (2013): *Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.

- HAN, X. (2016): *Lipidomics for studying metabolism*. In: Nature Reviews Endocrinology, **12**, 11: 668–679.
- HARCOMBE, Z., BAKER, J. S., COOPER, S. M., DAVIES, B., SCULTHORPE, N., DINICOLANTONIO, J. J. & GRACE, F. (2015): *Evidence from randomised controlled trials did not support the introduction of dietary fat guidelines in 1977 and 1983: a systematic review and meta-analysis*. In: Open Heart, **2**, 1: e000196.
- HASLAM, D. W. & JAMES, W. P. (2005): *Obesity*. In: Lancet, **366**, 9492: 1197–1209.
- HEIMERL, S., FISCHER, M., BAESSLER, A., LIEBISCH, G., SIGRUENER, A., WALLNER, S. & SCHMITZ, G. (2014): *Alterations of plasma lysophosphatidylcholine species in obesity and weight loss*. In: PLoS One, **9**, 10: e111348.
- HELLER, D. A., DE FAIRE, U., PEDERSEN, N. L., DAHLEN, G. & MCCLEARN, G. E. (1993): *Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins*. In: New England Journal of Medicine, **328**, 16: 1150–1156.
- HERZOG, R., SCHUHMANN, K., SCHWUDKE, D., SAMPAIO, J. L., BORNSTEIN, S. R., SCHROEDER, M. & SHEVCHENKO, A. (2012): *LipidXplorer: A Software for Consensual Cross-Platform Lipidomics*. In: PLoS ONE, **7**, 1: e29851.
- HERZOG, R., SCHWUDKE, D., SCHUHMANN, K., SAMPAIO, J. L., BORNSTEIN, S. R., SCHROEDER, M. & SHEVCHENKO, A. (2011): *A novel informatics concept for high-throughput shotgun lipidomics based on the molecular fragmentation query language*. In: Genome Biology, **12**, 1: R8.
- HOCHBERG, Y. & BENJAMINI, Y. (1990): *More powerful procedures for multiple significance testing*. In: Statistics in Medicine, **9**, 7: 811–818.
- HORN, F. (2009): *Biochemie des Menschen*. Thieme Georg Verlag, Stuttgart.
- HORN, P. J. & CHAPMAN, K. D. (2012): *Lipidomics in tissues, cells and subcellular compartments*. In: The Plant Journal, **70**, 1: 69–80.
- HWANG, S. D., KONDO, H., HIRONO, I. & AOKI, T. (2011): *Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 14 in Japanese flounder, Paralichthys olivaceus*. In: Fish & Shellfish Immunology, **30**, 1: 425–429.
- ISHIKAWA, M., MAEKAWA, K., SAITO, K., SENOO, Y., URATA, M., MURAYAMA, M., TAJIMA, Y., KUMAGAI, Y. & SAITO, Y. (2014): *Plasma and serum lipidomics of healthy white adults shows characteristic profiles by subjects' gender and age*. In: PLoS One, **9**, 3: e91806.

- JAESCHKE, H. (2011): *Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts*. In: Journal of Gastroenterology and Hepatology, **26**: 173–179.
- JANSSENS, S. & BEYAERT, R. (2003): *Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition*. In: Clinical Microbiology Reviews, **16**, 4: 637–646.
- JERNAS, M., PALMING, J., SJÖHOLM, K., JENNISCHE, E., SVENSSON, P., GABRIELSSON, B., LEVIN, M., SJÖGREN, A., RUDEMO, M., LYSTIG, T., CARLSSON, B., CARLSSON, L. & LÖNN, M. (2006): *Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression*. In: The FASEB Journal, **20**, 9: 1540–1542.
- JO, J., GAVRILOVA, O., PACK, S., JOU, W., MULLEN, S., SUMNER, A. E., CUSHMAN, S. W. & PERIWAL, V. (2009): *Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth*. In: PLoS Computational Biology, **5**, 3: e1000324.
- JOHANSSON, L., SOLVOLL, K., BJØRNEBOE, G. E. & DREVON, C. A. (1998): *Under- and overreporting of energy intake related to weight status and lifestyle in a nationwide sample*. In: The American Journal of Clinical Nutrition, **68**, 2: 266–74.
- JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & ALBERTS, P. W. B. (2011): *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- JOVE, M., NAUDI, A., PORTERO-OTIN, M., CABRE, R., ROVIRA-LLOPIS, S., BANULS, C., ROCHA, M., HERNANDEZ-MIJARES, A., VICTOR, V. M. & PAMPLONA, R. (2014): *Plasma lipidomics discloses metabolic syndrome with a specific HDL phenotype*. In: Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, **28**, 12: 5163–5171.
- KAESS, B., FISCHER, M., BAESSLER, A., STARK, K., HUBER, F., KREMER, W., KALBITZER, H. R., SCHUNKERT, H., RIEGGER, G. & HENGSTENBERG, C. (2008): *The lipoprotein subfraction profile: heritability and identification of quantitative trait loci*. In: Journal of Lipid Research, **49**, 4: 715–723.
- KAMINSKY, Z. A., TANG, T., WANG, S.-C., PTAK, C., OH, G. H. T., WONG, A. H. C., FELDCAMP, L. A., VIRTANEN, C., HALFVARSON, J., TYSK, C., MCRAE, A. F., VISSCHER, P. M., MONTGOMERY, G. W., GOTTESMAN, I. I., MARTIN, N. G. & PETRONIS, A. (2009): *DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins*. In: Nature Genetics, **41**, 2: 240–245.

- KANDA, H., TATEYA, S., TAMORI, Y., KOTANI, K., ICHI HIASA, K., KITAZAWA, R., KITAZAWA, S., MIYACHI, H., MAEDA, S., EGASHIRA, K. & KASUGA, M. (2006): *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. In: The Journal of Clinical Investigation, **116**: 1494–1505.
- KAYSER, F. H., BÖTTGER, E. C., HALLER, O., DEPLAZES, P. & ROERS, A. (2014): *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. 13. Aufl. Thieme Georg Verlag, Stuttgart.
- KERSHAW, E. E. & FLIER, J. S. (2004): *Adipose Tissue as an Endocrine Organ*. In: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, **89**, 6: 2548–2556.
- KESKIN, M., KURTOGLU, S., KENDIRCI, M., ATABEK, M. E. & YAZICI, C. (2005): *Homeostasis Model Assessment Is More Reliable Than the Fasting Glucose/Insulin Ratio and Quantitative Insulin Sensitivity Check Index for Assessing Insulin Resistance Among Obese Children and Adolescents*. In: PEDIATRICS, **115**, 4: e500–e503.
- KHAZEN, W., M'BIKA, J.-P., TOMKIEWICZ, C., BENELLI, C., CHANY, C., ACHOUR, A. & FOREST, C. (2005): *Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes*. In: FEBS Letters, **579**, 25: 5631–5634.
- KIM, J.-Y., VAN DE WALL, E., LAPLANTE, M., AZZARA, A., TRUJILLO, M. E., HOFMANN, S. M., SCHRAW, T., DURAND, J. L., LI, H., LI, G., JELICKS, L. A., MEHLER, M. F., HUI, D. Y., DESHAIES, Y., SHULMAN, G. I., SCHWARTZ, G. J. & SCHERER, P. E. (2007): *Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue*. In: The Journal of Clinical Investigation, **117**, 9: 2621–2637.
- KIMBALL, J. W. (1993): *Biology*. 6. Aufl. William C Brown Pub, Dubuque.
- KLOP, B., ELTE, J. W. F. & CASTRO CABEZAS, M. (2013): *Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets*. In: Nutrients, **5**, 4: 1218–1240.
- KLÖTING, N., STUMVOLL, M. & BLÜHER, M. (2007): *Biologie des viszeralen Fetts*. In: Der Internist, **48**, 2: 126–133.
- KLUG, W. S., CUMMINGS, M. R. & SPENCER, C. A. (2007): *Genetik (Pearson Studium - Biologie)*. 8. Aufl. Pearson Studium, München.

- KNOWLER, W. C., HAMMAN, R. F., EDELSTEIN, S. L., BARRETT-CONNOR, E., EHRMANN, D. A., WALKER, E. A., FOWLER, S. E., NATHAN, D. M., KAHN, S. E. & DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH, G. (2005): *Prevention of type 2 diabetes with troglitazone in the Diabetes Prevention Program*. In: *Diabetes*, **54**, 4: 1150–1156.
- KRUMSIEK, J., BARTEL, J. & THEIS, F. J. (2016): *Computational approaches for systems metabolomics*. In: *Current Opinion in Biotechnology*, **39**: 198–206.
- KUSMINSKI, C. M., SHETTY, S., ORCI, L., UNGER, R. H. & SCHERER, P. E. (2009): *Diabetes and apoptosis: lipotoxicity*. In: *Apoptosis*, **14**, 12: 1484–1495.
- LAMB, B. C. (2015): *Human Diversity - Its Nature, Extent, Causes and Effects on People*. World Scientific, Singapur.
- LAPPAS, M., MUNDRA, P. A., WONG, G., HUYNH, K., JINKS, D., GEORGIU, H. M., PERMEZEL, M. & MEIKLE, P. J. (2015): *The prediction of type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus using lipidomics*. In: *Diabetologia*, **58**, 7: 1436–1442.
- LARSEN, T. M., DALSKOV, S.-M., VAN BAAK, M., JEBB, S. A., PAPADAKI, A., PFEIFFER, A. F., MARTINEZ, J. A., HANDJIEVA-DARLENSKA, T., KUNEŠOVÁ, M., PIHLGÅRD, M., STENDER, S., HOLST, C., SARIS, W. H. & ASTRUP, A. (2010): *Diets with High or Low Protein Content and Glycemic Index for Weight-Loss Maintenance*. In: *New England Journal of Medicine*, **363**, 22: 2102–2113.
- LENAZ, G. (1987): *Lipid Fluidity and Membrane Protein Dynamics*. In: *Bioscience Reports*, **7**, 11: 823–837.
- LIU, Y., BUIL, A., COLLINS, B. C., GILLET, L. C., BLUM, L. C., CHENG, L. Y., VITEK, O., MOURITSEN, J., LACHANCE, G., SPECTOR, T. D., DERMITZAKIS, E. T. & AEBERSOLD, R. (2015): *Quantitative variability of 342 plasma proteins in a human twin population*. In: *Molecular Systems Biology*, **11**, 1: 786–803.
- LUMENG, C. N., BODZIN, J. L. & SALTIEL, A. R. (2007): *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. In: *Journal of Clinical Investigation*, **117**, 1: 175–184.
- LUMENG, C. N., DEYOUNG, S. M., BODZIN, J. L. & SALTIEL, A. R. (2006): *Increased Inflammatory Properties of Adipose Tissue Macrophages Recruited During Diet-Induced Obesity*. In: *Diabetes*, **56**, 1: 16–23.

- MAES, H. H. (2005): *ACE Model*. In: EVERITT, B. S. & HOWELL, D. [Hrsg.]: *Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science*. John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken.
- MARAIS, A. D. (2013): *Dietary lipid modification for mild and severe dyslipidaemias*. In: *Proceedings of the Nutrition Society*, **72**, 3: 337–341.
- MARNETT, L. J. (1999): *Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde*. In: *Mutation research*, **424**, 1–2: 83–95.
- MARTINON, F., BURNS, K. & TSCHOPP, J. (2002): *The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- $\beta$* . In: *Molecular Cell*, **10**, 2: 417–426.
- MATTHEWS, D., HOSKER, J., RUDENSKI, A., NAYLOR, B., TREACHER, D. & TURNER, R. (1985): *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. In: *Diabetologia*, **28**, 7: 412–419.
- MATYASH, V., LIEBISCH, G., KURZCHALIA, T. V., SHEVCHENKO, A. & SCHWUDKE, D. (2008): *Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics*. In: *The Journal of Lipid Research*, **49**, 5: 1137–1146.
- MCARDLE, M. A., FINUCANE, O. M., CONNAUGHTON, R. M., MCMORROW, A. M. & ROCHE, H. M. (2013): *Mechanisms of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: Insights into the Emerging Role of Nutritional Strategies*. In: *Frontiers in Endocrinology*, **4**, 52.
- MCGEOUGH, M. D., PENA, C. A., MUELLER, J. L., POCIASK, D. A., BRODERICK, L., HOFFMAN, H. M. & BRYDGES, S. D. (2012): *Interleukin-6 is a Marker of Inflammation with No Direct Role in Inflammasome-Mediated Mouse Models*. In: *Journal of Immunology*, **189**, 6: 2707–2711.
- MCGUIRE, S. (2011): *U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services, Dietary Guidelines for Americans, 2010. 7th Edition, Washington, DC: U.S. Government Printing Office, January 2011*. In: *Advances in Nutrition*, **2**, 3: 293–294.
- MEIKLE, P. J., WONG, G., BARLOW, C. K., WEIR, J. M., GREEVE, M. A., MACINTOSH, G. L., ALMASY, L., COMUZZIE, A. G., MAHANEY, M. C., KOWALCZYK, A., HAVIV, I., GRANTHAM, N., MAGLIANO, D. J., JOWETT, J. B. M., ZIMMET, P., CURRAN, J. E., BLANGERO, J. & SHAW, J. (2013): *Plasma Lipid*

- Profiling Shows Similar Associations with Prediabetes and Type 2 Diabetes.* In: PLoS ONE, **8**, 9: 1–11.
- MEIKLE, P. J., WONG, G., TSOROTES, D., BARLOW, C. K., WEIR, J. M., CHRISTOPHER, M. J., MACINTOSH, G. L., GOUDEY, B., STERN, L., KOWALCZYK, A., HAVIV, I., WHITE, A. J., DART, A. M., DUFFY, S. J., JENNINGS, G. L. & KINGWELL, B. A. (2011): *Plasma Lipidomic Analysis of Stable and Unstable Coronary Artery Disease.* In: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, **31**, 11: 2723–2732.
- MENSINK, R. P., ZOCK, P. L., KESTER, A. D. & KATAN, M. B. (2003): *Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials.* In: The American Journal of Clinical Nutrition, **77**, 5: 1146–1155.
- MÖHLIG, M., SPRANGER, J., RISTOW, M., PFEIFFER, A. F. H., SCHILL, T., SCHLÖSSER, H. W., MOLTZ, L., BRABANT, G. & SCHÖFL, C. (2006): *Predictors of abnormal glucose metabolism in women with polycystic ovary syndrome.* In: European Journal of Endocrinology, **154**, 2: 295–301.
- MIAO, H., CHEN, H., PEI, S., BAI, X., VAZIRI, N. D. & ZHAO, Y. Y. (2015): *Plasma lipidomics reveal profound perturbation of glycerophospholipids, fatty acids, and sphingolipids in diet-induced hyperlipidemia.* In: Chemico-Biological Interactions, **228**: 79–87.
- MOZAFFARIAN, D., APPEL, L. J. & VAN HORN, L. (2011): *Components of a Cardioprotective Diet: New Insights.* In: Circulation, **123**, 24: 2870–2891.
- MOZAFFARIAN, D., MICHA, R. & WALLACE, S. (2010): *Effects on Coronary Heart Disease of Increasing Polyunsaturated Fat in Place of Saturated Fat: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.* In: PLoS Medicine, **7**, 3: 1–10.
- MURPHY, E. J., SCHAPIRO, M. B., RAPOPORT, S. I. & SHETTY, H. U. (2000): *Phospholipid composition and levels are altered in Down syndrome brain.* In: Brain Research, **867**, 1–2: 9–18.
- MURRAY, R. K., BENDER, D. A., BOTHAM, K. M., KENNELLY, P. J., RODWELL, V. W. & WEIL, P. A. [Hrsg.] (2009): *Harpers Illustrated Biochemistry.* 28. Aufl. McGraw-Hill Medical, New York.

- MUZIO, M., BOSISIO, D., POLENTARUTTI, N., D'AMICO, G., STOPPACCIARO, A., MANCINELLI, R., VAN'T VEER, C., PENTON-ROL, G., RUCO, L. P., ALLAVENA, P. & MANTOVANI, A. (2000): *Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells*. In: The Journal of Immunology, **164**, 11: 5998–6004.
- NAKBI, A., TAYEB, W., GRISSA, A., ISSAOUI, M., DABBOU, S., CHARGUI, I., ELLOUZ, M., MILED, A. & HAMMAMI, M. (2010): *Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats*. In: Nutrition & Metabolism, **7**, 1: 80.
- NAM, M., CHOI, M.-S., JUNG, S., JUNG, Y., CHOI, J.-Y., RYU, D. H. & HWANG, G.-S. (2015): *Lipidomic Profiling of Liver Tissue from Obesity-Prone and Obesity-Resistant Mice Fed a High Fat Diet*. In: Scientific Reports, **5**: 16984 EP.
- NEALE, M. & CARDON, L. (2010): *Methodology for Genetic Studies of Twins and Families*. Softcover reprint of hardcover 1st ed. 1992 Aufl. Springer Netherlands, Dordrecht Heidelberg London New York.
- OBERG, A. L. & MAHONEY, D. W. (2007): *Linear mixed effects models*. In: Methods in Molecular Biology, **404**: 213–234.
- OH, D. Y., MORINAGA, H., TALUKDAR, S., BAE, E. J. & OLEFSKY, J. M. (2011): *Increased Macrophage Migration Into Adipose Tissue in Obese Mice*. In: Diabetes, **61**, 2: 346–354.
- OOI, E. M., WATTS, G. F., NG, T. W. & BARRETT, P. H. R. (2015): *Effect of Dietary Fatty Acids on Human Lipoprotein Metabolism: A Comprehensive Update*. In: Nutrients, **7**, 6: 4416–4425.
- OVERGAARD, J., TOMCALA, A., SORENSEN, J. G., HOLMSTRUP, M., KROGH, P. H., SIMEK, P. & KOSTAL, V. (2008): *Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster**. In: Journal of Insect Physiology, **54**, 3: 619–629.
- PARKS, E. J. & HELLERSTEIN, M. K. (2000): *Carbohydrate-induced hypertriglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms*. In: American Journal of Clinical Nutrition, **71**, 2: 412–433.
- PIETILÄINEN, K. H., SÖDERLUND, S., RISSANEN, A., NAKANISHI, S., JAUHAINEN, M., TASKINEN, M. R. & KAPRIO, J. (2009): *HDL subspecies in young adult twins: heritability and impact of overweight*. In: Obesity, **17**, 6: 1208–1214.

- PIETILÄINEN, K. H., SYSI-AHO, M., RISSANEN, A., SEPPÄNEN-LAAKSO, T., YKI-JÄRVINEN, H., KAPRIO, J. & ORESIC, M. (2007): *Acquired obesity is associated with changes in the serum lipidomic profile independent of genetic effects—a monozygotic twin study*. In: PLoS One, **2**, 2: e218.
- PURI, R., DUONG, M., UNO, K., KATAOKA, Y. & NICHOLLS, S. J. (2012): *The emerging role of plasma lipidomics in cardiovascular drug discovery*. In: Expert Opinion on Drug Discovery, **7**, 1: 63–72.
- QUEHENBERGER, O. & DENNIS, E. A. (2011): *The human plasma lipidome*. In: New England Journal of Medicine, **365**, 19: 1812–1823.
- RASMUSSEN, B. M., VESSBY, B., UUSITUPA, M., BERGLUND, L., PEDERSEN, E., RACCARDI, G., RIVELLESE, A. A., TAPSELL, L. & HERMANSEN, K. (2006): *Effects of dietary saturated, monounsaturated, and n-3 fatty acids on blood pressure in healthy subjects*. In: American Journal of Clinical Nutrition, **83**, 2: 221–226.
- RHEE, E. P., CHENG, S., LARSON, M. G., WALFORD, G. A., LEWIS, G. D., MCCABE, E., YANG, E., FARRELL, L., FOX, C. S., O'DONNELL, C. J., CARR, S. A., VASAN, R. S., FLOREZ, J. C., CLISH, C. B., WANG, T. J. & GERSZTEN, R. E. (2011): *Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans*. In: The Journal of Clinical Investigation, **121**, 4: 1402–1411.
- ROGLIC, G., UNWIN, N., BENNETT, P. H., MATHERS, C., TUOMILEHTO, J., NAG, S., CONNOLLY, V. & KING, H. (2005): *The Burden of Mortality Attributable to Diabetes: Realistic estimates for the year 2000*. In: Diabetes Care, **28**, 9: 2130–2135.
- RÖSZER, T. (2015): *Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms*. In: Mediators of Inflammation, **2015**: 1–16.
- SCHEITZ, C. J., GUO, Y., EARLY, A. M., HARSHMAN, L. G. & CLARK, A. G. (2013): *Heritability and inter-population differences in lipid profiles of Drosophila melanogaster*. In: PLoS One, **8**, 8: e72726.
- SELTMANN, A.-C. (2013): *Nutrigenetik der metabolischen Adaptation an eine isokalorische Hochfettdiät bei gesunden Zwillingen*. Dissertation, Universität Potsdam, Potsdam.

- SHAW, J., SICREE, R. & ZIMMET, P. (2010): *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. In: Diabetes Research and Clinical Practice, **87**, 1: 4–14.
- SHEMIN, D. & RITTENBERG, D. (1946): *The life span of the human red blood cell*. In: Journal of Biological Chemistry, **166**, 2: 627–636.
- SIGRUENER, A., KLEBER, M. E., HEIMERL, S., LIEBISCH, G., SCHMITZ, G. & MAERZ, W. (2014): *Glycerophospholipid and sphingolipid species and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study*. In: PLoS One, **9**, 1: e85724.
- SILVENTOINEN, K., SAMMALISTO, S., PEROLA, M., BOOMSMA, D. I., CORNES, B. K., DAVIS, C., DUNKEL, L., DE LANGE, M., HARRIS, J. R., HJELMBORG, J. V., LUCIANO, M., MARTIN, N. G., MORTENSEN, J., NISTICO, L., PEDERSEN, N. L., SKYTTHE, A., SPECTOR, T. D., STAZI, M. A., WILLEMSSEN, G. & KAPRIO, J. (2003): *Heritability of adult body height: a comparative study of twin cohorts in eight countries*. In: Twin Research, **6**, 5: 399–408.
- SKAFF, O., PATTISON, D. I. & DAVIES, M. J. (2008): *The Vinyl Ether Linkages of Plasmalogens Are Favored Targets for Myeloperoxidase-Derived Oxidants: A Kinetic Study*. In: Biochemistry, **47**, 31: 8237–8245.
- SUERBAUM, S., HAHN, H., BURCHARD, G.-D., KAUFMANN, S. H. & SCHULZ, T. F. (2012): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 7. Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- SURMA, M. A., HERZOG, R., VASILJ, A., KLOSE, C., CHRISTINAT, N., MORIN-RIVRON, D., SIMONS, K., MASOODI, M. & SAMPAIO, J. L. (2015): *An automated shotgun lipidomics platform for high throughput, comprehensive, and quantitative analysis of blood plasma intact lipids*. In: European Journal of Lipid Science & Technology, **117**, 10: 1540–1549.
- SVETKEY, L., SIMONS-MORTON, D., VOLLMER, W., APPEL, L. J., CONLIN, P. R., RYAN, D. H., ARD, J. & KENNEDY, B. M. (1999): *Effects of dietary patterns on blood pressure: Subgroup analysis of the dietary approaches to stop hypertension (dash) randomized clinical trial*. In: Archives of Internal Medicine, **159**, 3: 285–293.
- TUOMILEHTO, J., LINDSTROM, J., ERIKSSON, J. G., VALLE, T. T., HAMALAINEN, H., ILANNE-PARIKKA, P., KEINANEN-KIUKAANNIEMI, S., LAAKSO, M.,

- LOUHERANTA, A., RASTAS, M., SALMINEN, V., UUSITUPA, M. & FINNISH DIABETES PREVENTION STUDY, G. (2001): *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance*. In: New England Journal of Medicine, **344**, 18: 1343–1350.
- UNDERWOOD, A. J. (2005): *Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance*. University Press, Cambridge.
- UNGER, R. H. (2010): *Gluttony, Sloth and the Metabolic Syndrome: A Roadmap to Lipotoxicity*. In: Trends in Endocrinology & Metabolism, **21**, 6: 345–352.
- UNGER, R. H., CLARK, G. O., SCHERER, P. E. & ORCI, L. (2010): *Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome*. In: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, **1801**, 3: 209–214.
- VANCE, D. & VANCE, J. [Hrsg.] (2008): *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5. Aufl. Elsevier Science, Amsterdam.
- VENABLES, W. N. & RIPLEY, B. D. (2013): *Modern Applied Statistics with S-PLUS*. Springer Science & Business Media, Berlin Heidelberg.
- VERBEKE, G. & GEERT, M. (2009): *Linear Mixed Models for Longitudinal Data*. Springer Verlag, New York.
- WALLNER, S. & SCHMITZ, G. (2011): *Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species*. In: Chemistry and Physics of Lipids, **164**, 6: 573–589.
- WATSON, A. D. (2006): *Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems*. In: Journal of Lipid Research, **47**, 10: 2101–2111.
- WEI, Y., WANG, D. & PAGLIASSOTTI, M. J. (2007): *Saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis are augmented by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in liver cells*. In: Molecular and Cellular Biochemistry, **303**, 1–2: 105–113.
- WEISBERG, S. P., HUNTER, D., HUBER, R., LEMIEUX, J., SLAYMAKER, S., VADDI, K., CHARO, I., LEIBEL, R. L. & FERRANTE, A. W. (2006): *CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding*. In: Journal of Clinical Investigation, **116**, 1: 115–124.
- WEISBERG, S. P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. & FERRANTE, A. W. (2003): *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. In: Journal of Clinical Investigation, **112**, 12: 1796–1808.

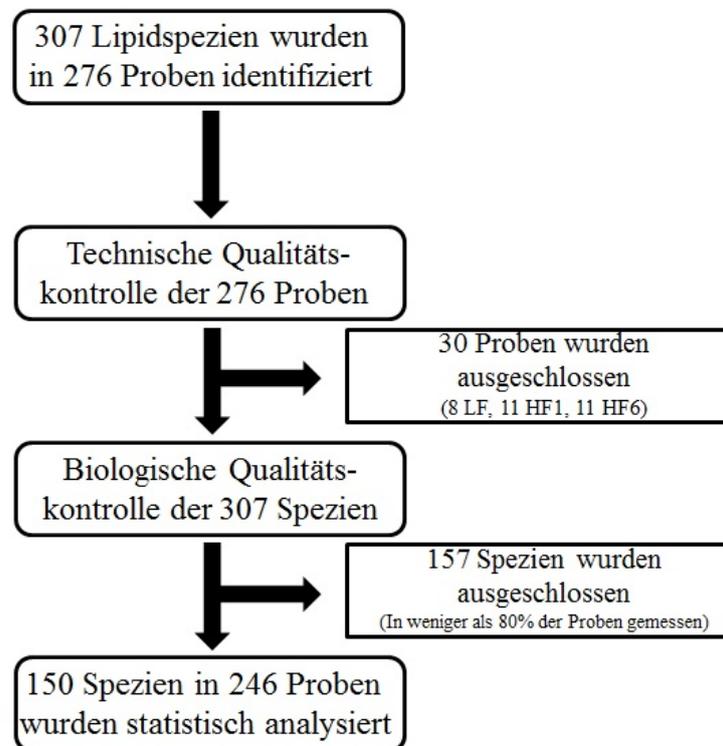
- WENK, M. R. (2005): *The emerging field of lipidomics*. In: Nature Reviews Drug Discovery, **4**, 7: 594–610.
- WENTWORTH, J. M., NASELLI, G., BROWN, W., DOYLE, L., PHIPSON, B., SMYTH, G., WABITSCH, M., O'BRIEN, P. & HARRISON, L. (2010): *Pro-Inflammatory CD11c+CD206+ Adipose Tissue Macrophages Are Associated With Insulin Resistance in Human Obesity*. In: Diabetes, **59**, 7: 1648–1656.
- WEST, B. T., WELCH, K. B. & GALECKI, A. T. (2014): *Linear Mixed Models - A Practical Guide Using Statistical Software*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton.
- WILLIAMS, G. & FRÜHBECK, G. [Hrsg.] (2009): *Obesity: Science to Practice*. 1. Aufl. Wiley, New York.
- WOLFRAM, G., BECHTHOLD, A., BOEING, H., ELLINGER, S., HAUNER, H., KROCKE, A., LESCHIK-BONNET, E., LINSEISEN, J., LORKOWSKI, S., SCHULZE, M., STEHLE, P. & DINTER, J. (2015): *Evidence-Based Guideline of the German Nutrition Society: Fat Intake and Prevention of Selected Nutrition-Related Diseases*. In: Annals of Nutrition and Metabolism, **67**, 3: 141–204.
- WONG, G., BARLOW, C. K., WEIR, J. M., JOWETT, J. B. M., MAGLIANO, D. J., ZIMMET, P., SHAW, J. & MEIKLE, P. J. (2013): *Inclusion of Plasma Lipid Species Improves Classification of Individuals at Risk of Type 2 Diabetes*. In: PLoS ONE, **8**, 10: e76577.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2015): *World Health Statistics 2015 (World Health Statistics Annual)*. World Health Organization, Genf.
- XU, H., BARNES, G. T., YANG, Q., TAN, G., YANG, D., CHOU, C. J., SOLE, J., NICHOLS, A., ROSS, J. S., TARTAGLIA, L. A. & CHEN, H. (2003): *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. In: Journal of Clinical Investigation, **112**, 12: 1821–1830.
- YANG, J., XU, G., HONG, Q., LIEBICH, H. M., LUTZ, K., SCHMÜLLING, R. M. & WAHL, H. G. (2004): *Discrimination of Type 2 diabetic patients from healthy controls by using metabolomics method based on their serum fatty acid profiles*. In: Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, **813**, 1–2: 53–58.
- ZIVKOVIC, A. M., WIEST, M. M., NGUYEN, U. T., DAVIS, R., WATKINS, S. M. & GERMAN, J. B. (2009): *Effects of sample handling and storage on quantitative lipid analysis in human serum*. In: Metabolomics, **5**, 4: 507–516.

ZYPHUR, M. J., ZHANG, Z., BARSKY, A. P. & LI, W.-D. (2013): *An ACE in the hole: Twin family models for applied behavioral genetics research*. In: *The Leadership Quarterly*, **24**: 572–594.

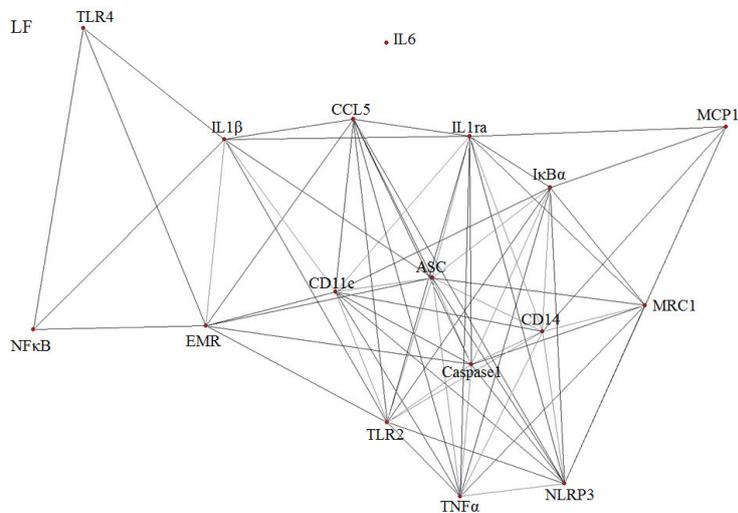


# A Anhang

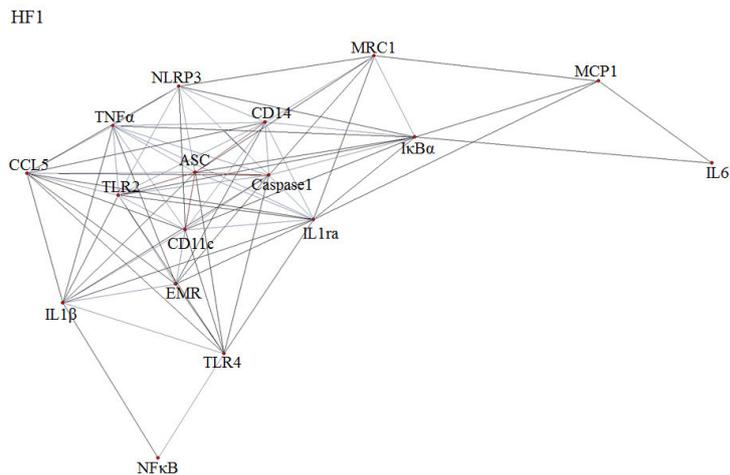
## Abbildungen



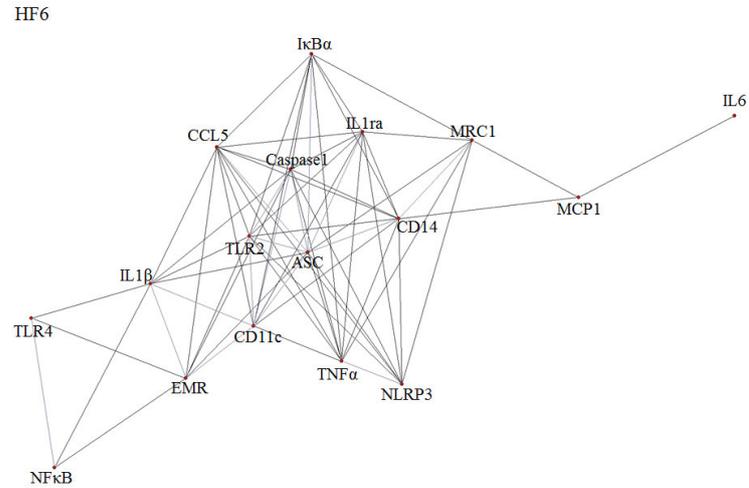
**Abbildung A.1: Flussdiagramm der vorangehenden Analyse des Lipidomdatensatzes.** Zunächst wurde der Datensatz auf technische Qualität überprüft und Proben ausgeschlossen, die die Kontrollen nicht bestanden. Im zweiten Schritt wurde dann die biologische Qualität untersucht und es wurden nur Lipidspezies zugelassen, die in mindestens 80 % der verbliebenen Proben gemessen werden konnten.



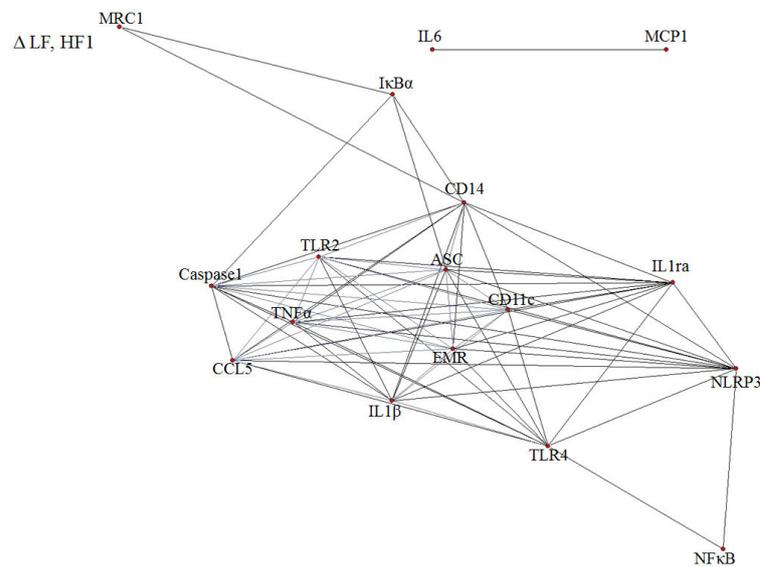
**Abbildung A.2: Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an LF.** Die Lage der Knoten wurde mittels des Kamada-Kawai-Algorithmus optimiert. Das Farbschema richtet sich nach der Stärke des Zusammenhangs: rot -  $|\tau| \geq 0,70$ , blau -  $0,70 > |\tau| \geq 0,50$ , schwarz -  $0,50 > |\tau| > 0,30$ .



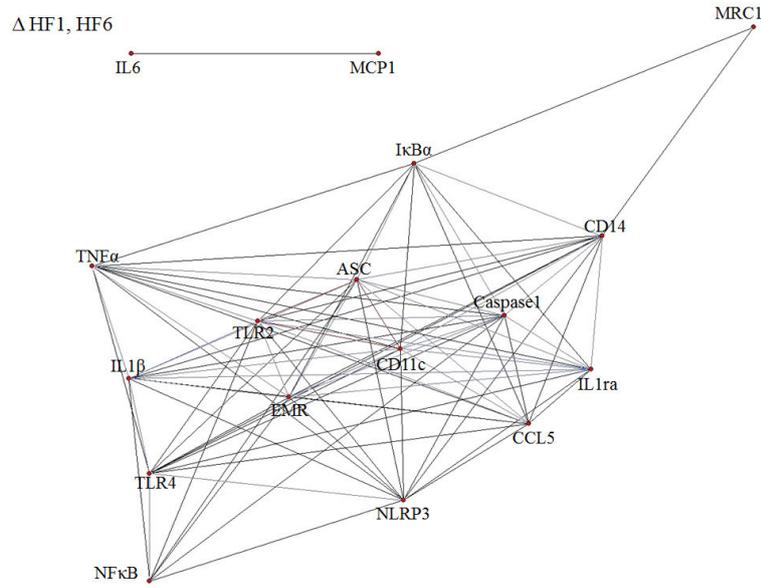
**Abbildung A.3: Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an HF1.** Die Lage der Knoten wurde mittels des Kamada-Kawai-Algorithmus optimiert. Das Farbschema richtet sich nach der Stärke des Zusammenhangs: rot -  $|\tau| \geq 0,70$ , blau -  $0,70 > |\tau| \geq 0,50$ , schwarz -  $0,50 > |\tau| > 0,30$ .



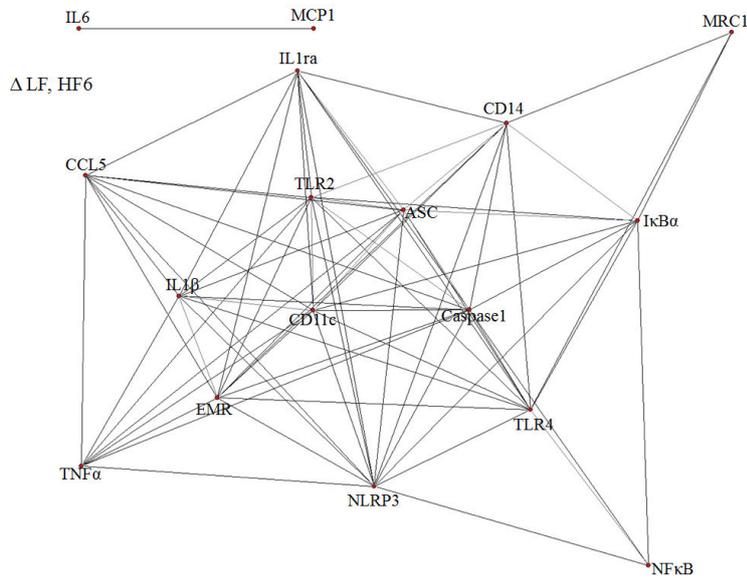
**Abbildung A.4: Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an HF6.** Die Lage der Knoten wurde mittels des Kamada-Kawai-Algorithmus optimiert. Das Farbschema richtet sich nach der Stärke des Zusammenhangs: rot -  $|\tau| \geq 0,70$ , blau -  $0,70 > |\tau| \geq 0,50$ , schwarz -  $0,50 > |\tau| > 0,30$ .



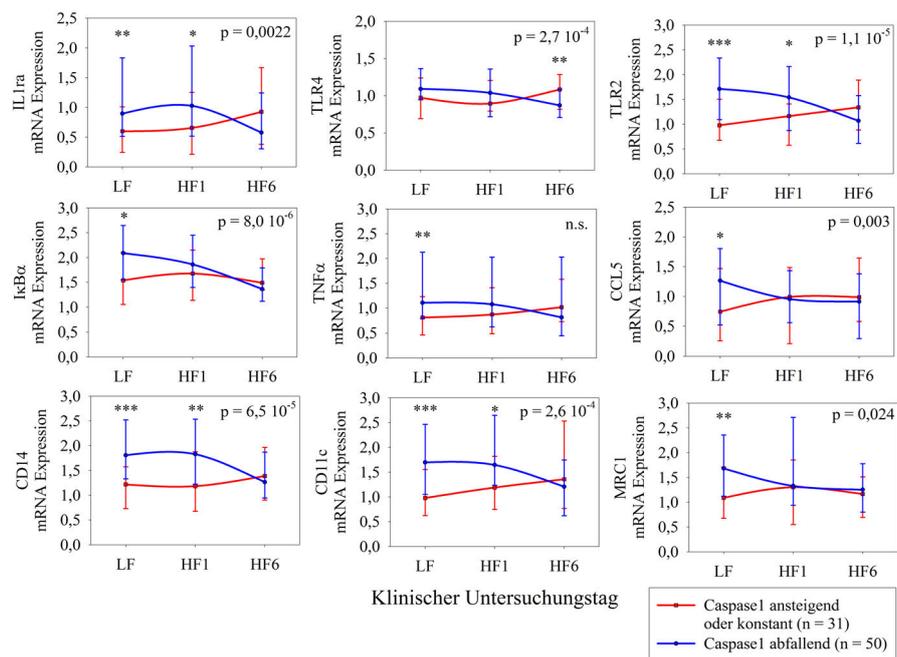
**Abbildung A.5: Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an  $\Delta_{LF}$ , HF1.** Die Lage der Knoten wurde mittels des Kamada-Kawai-Algorithmus optimiert. Das Farbschema richtet sich nach der Stärke des Zusammenhangs: rot -  $|\tau| \geq 0,70$ , blau -  $0,70 > |\tau| \geq 0,50$ , schwarz -  $0,50 > |\tau| > 0,30$ .



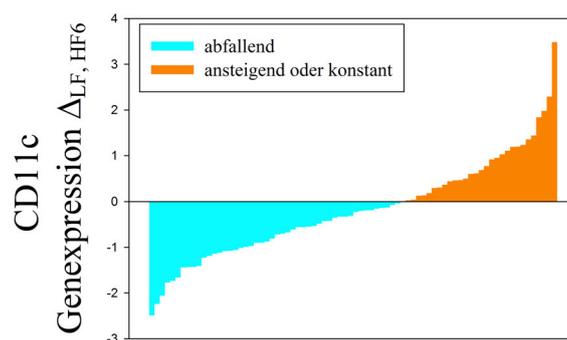
**Abbildung A.6: Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an  $\Delta HF1, HF6$ .** Die Lage der Knoten wurde mittels des Kamada-Kawai-Algorithmus optimiert. Das Farbschema richtet sich nach der Stärke des Zusammenhangs: rot -  $|\tau| \geq 0,70$ , blau -  $0,70 > |\tau| \geq 0,50$ , schwarz -  $0,50 > |\tau| > 0,30$ .



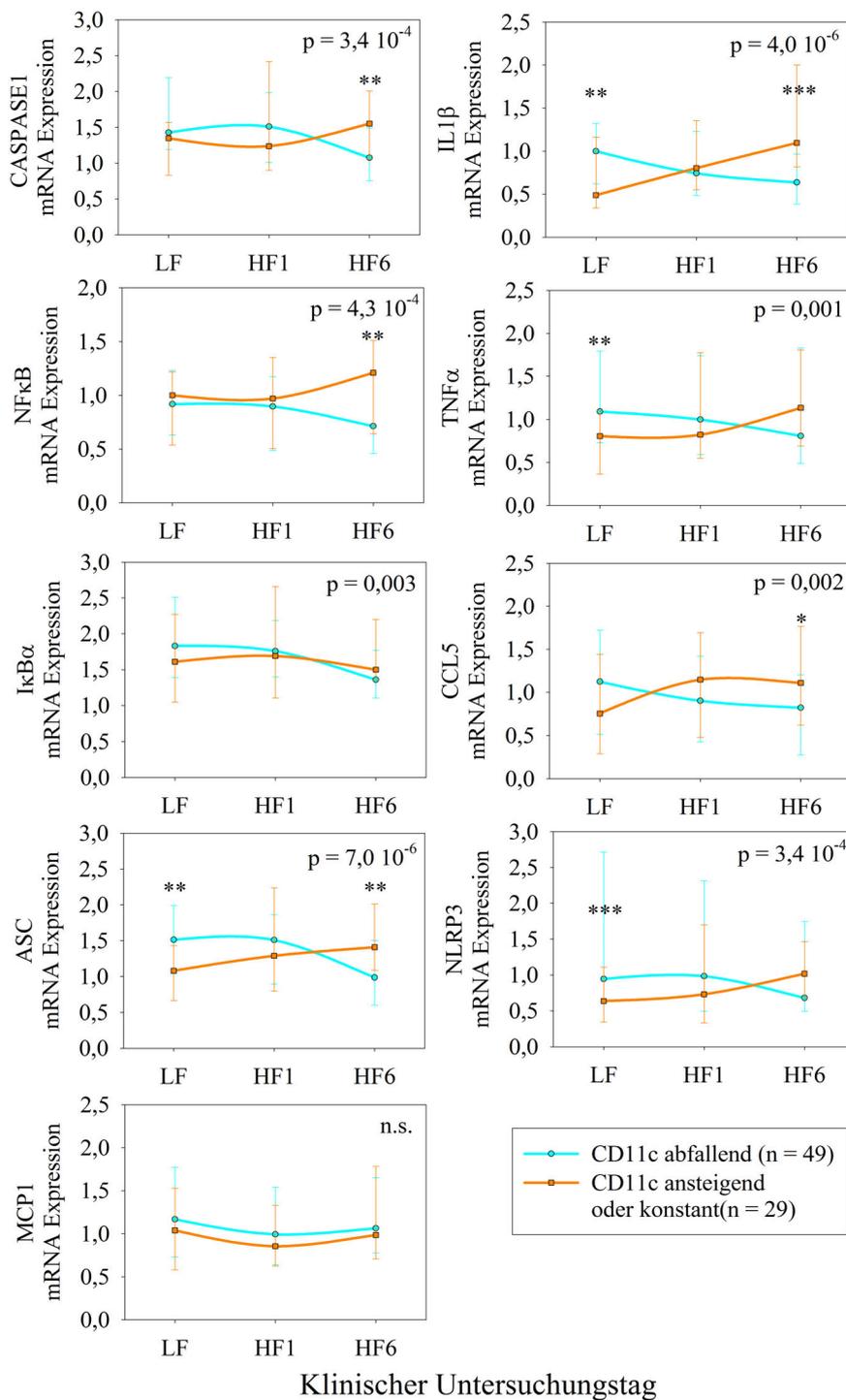
**Abbildung A.7: Netzwerk der basalen Genexpressionen der 17 Kandidatenbiomarker an  $\Delta LF, HF6$ .** Die Lage der Knoten wurde mittels des Kamada-Kawai-Algorithmus optimiert. Das Farbschema richtet sich nach der Stärke des Zusammenhangs: rot -  $|\tau| \geq 0,70$ , blau -  $0,70 > |\tau| \geq 0,50$ , schwarz -  $0,50 > |\tau| > 0,30$ .



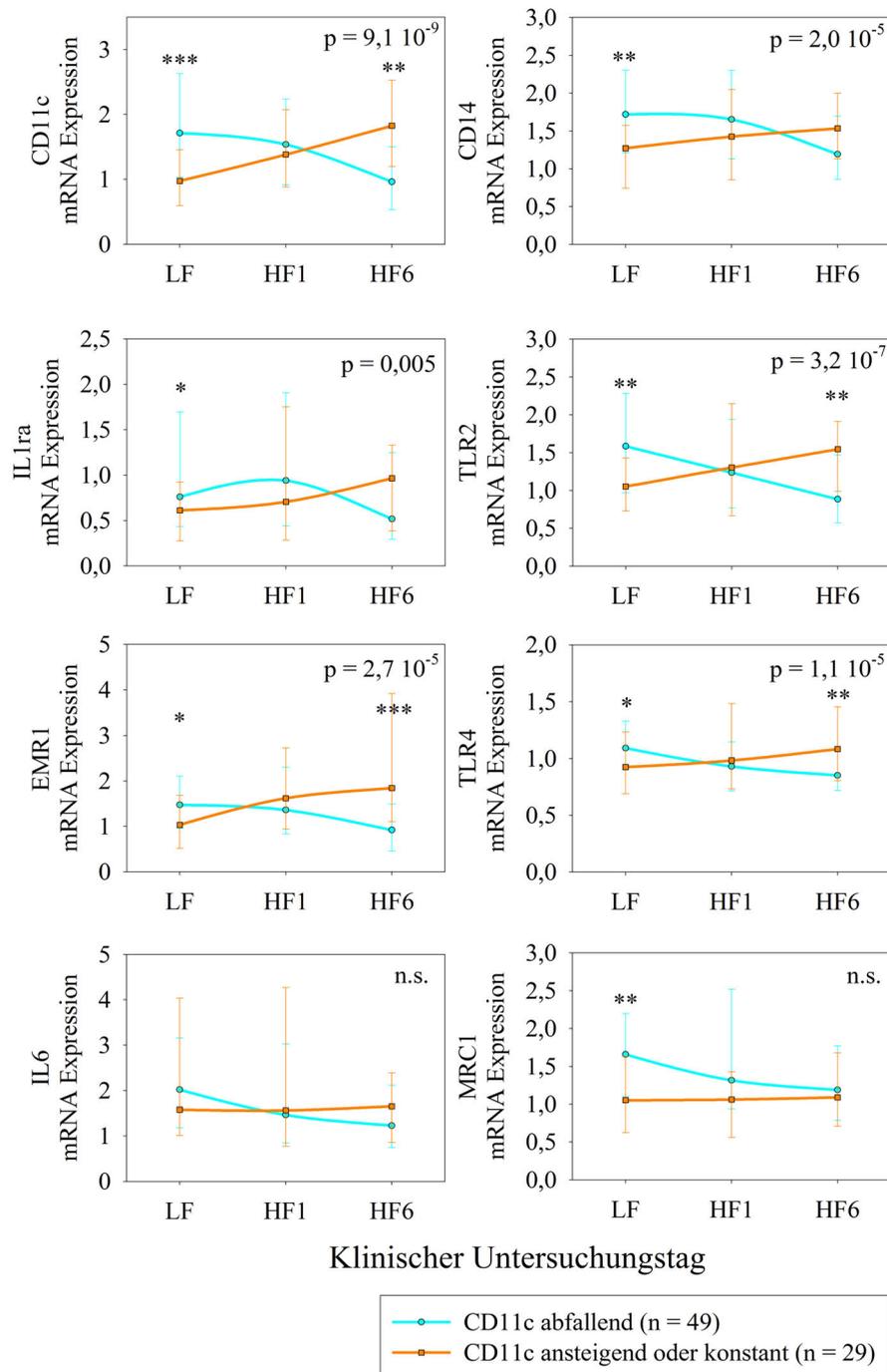
**Abbildung A.8: Abhängigkeit der Genexpression innerhalb des Netzwerks von der Caspase1-Änderung.** Dargestellt ist der Verlauf der Genexpression abhängig von einem Anstieg (rot) oder Abfall (blau) der Genexpression von Caspase1 zwischen LF und HF6. Der angegebene p-Wert bezieht sich auf den Einfluss der Gruppenzuordnung auf den Verlauf der Genexpression des jeweiligen Markers (zweifaktorielle, rep.M. ANOVA) und die Sternchen auf den Post-hoc-Vergleich zwischen den Gruppen zu dem jeweiligen Zeitpunkt (Mann-Whitney-U-Test; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die Werte sind angegeben als Median [ $Q_{0,25}$ ;  $Q_{0,75}$ ].



**Abbildung A.9: Individuelle Veränderung der Genexpression von CD11c zwischen LF und HF6.** Über die Veränderung der Genexpression zwischen LF und HF6 konnte die Kohorte in zwei Subkohorten aufgetrennt werden, die zur Stratifizierung genutzt wurde. Orange - Individuen, deren Genexpression von CD11c zwischen LF und HF6 konstant blieb oder anstieg ( $n = 29$ ); türkis - Individuen, deren Genexpression von CD11c zwischen LF und HF6 abfiel ( $n = 49$ ).



**Abbildung A.10: Abhängigkeit der Genexpression innerhalb des Netzwerks von der CD11c-Stratifizierung. (Teil 1)** Dargestellt ist der Verlauf der Genexpression abhängig von einem Anstieg, bzw. Konstanz (orange) oder Abfall (türkis) der Genexpression von CD11c zwischen LF und HF6. Der angegebene p-Wert bezieht sich auf den Einfluss der Gruppenzuordnung auf den Verlauf der Genexpression des jeweiligen Markers (zweifaktorielle, rep.M. ANOVA) und die Sternchen auf den Post-hoc-Vergleich zwischen den Gruppen zu dem jeweiligen Zeitpunkt (Mann-Whitney-U-Test; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die Werte sind angegeben als Median [ $Q_{0,25}$ ;  $Q_{0,75}$ ].



**Abbildung A.11: Abhängigkeit der Genexpression innerhalb des Netzwerks von der CD11c-Stratifizierung. (Teil 2)** Dargestellt ist der Verlauf der Genexpression abhängig von einem Anstieg, bzw. Konstanz (orange) oder Abfall (türkis) der Genexpression von CD11c zwischen LF und HF6. Der angegebene p-Wert bezieht sich auf den Einfluss der Gruppenzuordnung auf den Verlauf der Genexpression des jeweiligen Markers (zweifaktorielle, rep.M. ANOVA) und die Sternchen auf den Post-hoc-Vergleich zwischen den Gruppen zu dem jeweiligen Zeitpunkt (Mann-Whitney-U-Test; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die Werte sind angegeben als Median [ $Q_{0,25}$ ;  $Q_{0,75}$ ].

## Tabellen

**Tabelle A.1: Methoden zur Bestimmung der Blutparameter.** Sortiert nach Nennung im Text. Sowohl für die Bestimmung der Elektrolyte als auch für das Lipidprofil, Kreatinin, Harnstoff, Albumin, AST, ALT und  $\gamma$ GT wurde das Gerät ABX Pentra 4000 (HORIBA ABX SAS, Montepellier, Frankreich) verwendet. u.a. - unter anderem; ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; CRP - C-reaktives Protein; HDL - Lipoprotein hoher Dichte; NEFAs - freie, unveresterte Fettsäuren; UV - Ultraviolettstrahlung; AST - Aspartat-Aminotransferase; ALT - Alanin-Aminotransferase;  $\gamma$ GT -  $\gamma$ -Glutamyltransferase.

<b>Parameter</b>	<b>Methode</b>	<b>Firma</b>
Kleines Blutbild	ABX Micros 60 (Gerät)	HORIBA ABX SAS, Montepellier, Frankreich
Glukose	Glukoseanalysator SuperGL (Gerät)	Dr.Müller Gerätebau, Freital, Deutschland
Insulin	Sandwich-ELISA-Technik	Mercodica, Uppsala, Schweden
CRP	Latex-Agglutinationstest	
Cholesterin	ABX Diagnostics Cholesterin 100 (Kit)	ABX Diagnostics, Montepellier, Frankreich
HDL	ABX Diagnostics HDL Cholesterin (Kit)	ABX Diagnostics, Montepellier, Frankreich
Triglyceride	ABX Pentra Triglycerides (Kit)	ABX Diagnostics, Montepellier, Frankreich
NEFAs	NEFA C (Kit)	WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland
Elektrolyte	Direkte Potentiometrie	
Kreatinin	Jaffé-Methode	
Harnstoff	Enzymatischer UV-Test	
Albumin	Kalorimetrie mit Bromkresolgrün	
AST	Enzymatischer UV-Test	
ALT	Enzymatischer UV-Test	
$\gamma$ GT	Kinetischer kolorimetrischer Farbttest	

**Tabelle A.2: Auswahl der verglichenen Modelle.** 23 der 31 möglichen Modelle wurden durchgeführt und mittels des AIC verglichen. Das Modell mit dem kleinsten AIC wurde als das am besten angepasste Modell betrachtet und für die Analyse verwendet. AIC - Akaiikes Informationskriterium; CID - klinischer Untersuchungstag.

Model-ID	Feste Faktoren	Zufallseffekte
M1	BMI, Geschlecht, Alter, Alter <sup>2</sup> , CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M2	Geschlecht, Alter, Alter <sup>2</sup> , CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M3	BMI, Alter, Alter <sup>2</sup> , CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M4	BMI, Geschlecht, Alter, Alter <sup>2</sup>	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M5	BMI, Geschlecht, Alter, CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M6	Alter, Alter <sup>2</sup> , CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M7	Geschlecht, Alter, Alter <sup>2</sup>	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M8	Geschlecht, Alter, CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M9	BMI, Alter, Alter <sup>2</sup>	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M10	BMI, Alter, CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M11	BMI, Geschlecht, CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M12	BMI, Geschlecht, Alter	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M13	Alter, Alter <sup>2</sup>	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M14	Alter, CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M15	Geschlecht, CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M16	Geschlecht, Alter	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M17	BMI, CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M18	BMI, Alter	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M19	BMI, Geschlecht	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M20	CID	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M21	Alter	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M22	Geschlecht	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$
M23	BMI	$\sigma_a^2, \sigma_c^2, \sigma_e^2$

**Tabelle A.3: Darstellung der Zusammenhänge im inflammatorischen Netzwerk.** Die Genexpressionen des Clusters zeigte starke Zusammenhänge untereinander, die teilweise unabhängig vom gemessenen Zeitpunkt bzw. der Diät waren und sowohl in den basalen Genexpressionen, als auch bei den Veränderungen auftraten. Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten nach Kendall  $\tau$  mit angepasstem p-Wert nach Benjamini-Hochberg, wobei nur signifikante Korrelationen mit  $|\tau| > 0,30$  berücksichtigt wurden.

	LF		HF1		HF6		$\Delta$ LF, HF1		$\Delta$ HF1, HF6		$\Delta$ LF, HF6			
	Partner 1	Partner 2	$\tau$	PBH	$\tau$	PBH	$\tau$	PBH	$\tau$	PBH	$\tau$	PBH		
ASC		Caspase1	0,67	8,8E-15	0,72	8,3E-15	0,61	4,7E-14	0,56	7,0E-12	0,66	3,1E-14	0,51	7,5E-10
ASC		CCL5	0,48	8,7E-10	0,56	8,9E-13	0,51	1,4E-10	0,56	7,0E-12	0,54	5,2E-11	0,37	6,0E-06
ASC		CD14	0,67	8,8E-15	0,71	8,3E-15	0,57	1,0E-12	0,67	5,1E-14	0,61	3,1E-14	0,66	5,8E-14
ASC		EMR1	0,37	4,2E-06	0,50	1,3E-10	0,44	5,5E-08	0,62	5,1E-14	0,64	3,1E-14	0,46	3,0E-08
ASC		I $\kappa$ B $\alpha$	0,54	5,1E-12	0,47	2,0E-09	0,56	5,6E-12	0,36	1,6E-05	0,57	4,9E-12	0,50	2,4E-09
ASC		IL1 $\beta$	0,37	3,2E-06	0,40	3,3E-07	0,44	6,0E-08	0,49	3,5E-09	0,56	9,8E-12	0,45	6,4E-08
ASC		IL1ra	0,60	4,4E-14	0,58	1,4E-13	0,53	5,9E-11	0,47	2,6E-08	0,59	1,1E-12	0,58	1,0E-11
ASC		IL6												
ASC		CD11c	0,65	8,8E-15	0,74	8,3E-15	0,68	1,1E-14	0,70	5,1E-14	0,75	3,1E-14	0,65	5,8E-14
ASC		MCP1												
ASC		MRC1	0,43	9,6E-08	0,41	2,4E-07	0,34	2,7E-05						
ASC		NF $\kappa$ B									0,33	7,3E-05		
ASC		NLRP3	0,49	5,6E-10	0,58	2,3E-13	0,41	3,4E-07	0,35	2,8E-05	0,46	3,7E-08	0,43	2,1E-07
ASC		TLR2	0,67	8,8E-15	0,72	8,3E-15	0,67	1,1E-14	0,65	5,1E-14	0,73	3,1E-14	0,66	5,8E-14
ASC		TLR4			0,37	4,7E-06			0,40	2,2E-06	0,43	2,2E-07	0,43	2,8E-07
ASC		TNF $\alpha$	0,60	2,1E-14	0,63	8,3E-15	0,49	1,2E-09	0,61	5,1E-14	0,51	2,8E-10	0,38	5,9E-06
Caspase1		CCL5	0,41	2,7E-07	0,48	1,5E-09	0,39	1,8E-06	0,48	7,1E-09	0,45	6,2E-08	0,33	6,9E-05

Caspase1	CD14	0,60	3,3E-14	0,69	8,3E-15	0,49	1,7E-09	0,46	1,9E-08	0,54	3,1E-11	0,49	4,1E-09
Caspase1	EMR1	0,31	1,2E-04	0,43	3,7E-08	0,43	9,7E-08	0,54	7,2E-11	0,56	1,1E-11	0,40	2,3E-06
Caspase1	I $\kappa$ B $\alpha$	0,61	8,8E-15	0,53	1,7E-11	0,50	9,9E-10	0,35	2,7E-05	0,51	1,2E-09	0,48	1,3E-08
Caspase1	IL1 $\beta$			0,36	4,3E-06	0,37	4,6E-06	0,46	3,9E-08	0,48	8,4E-09	0,34	6,7E-05
Caspase1	IL1ra	0,49	8,8E-10	0,55	2,6E-12	0,42	2,4E-07	0,38	6,9E-06	0,51	1,2E-09	0,40	3,7E-06
Caspase1	IL6												
Caspase1	CD11c	0,46	1,4E-08	0,58	1,6E-13	0,55	5,6E-12	0,51	1,0E-09	0,60	2,2E-13	0,43	3,6E-07
Caspase1	MCP1												
Caspase1	MRC1	0,41	3,2E-07	0,42	1,2E-07								
Caspase1	NF $\kappa$ B									0,35	2,3E-05	0,34	5,4E-05
Caspase1	NLRP3	0,45	1,2E-08	0,55	2,0E-12	0,41	3,4E-07	0,36	1,5E-05	0,50	1,8E-09	0,42	3,3E-07
Caspase1	TLR2	0,66	8,8E-15	0,64	8,3E-15	0,65	1,1E-14	0,61	1,4E-13	0,62	5,4E-14	0,59	1,7E-12
Caspase1	TLR4			0,34	2,6E-05			0,40	2,3E-06	0,44	1,8E-07	0,42	5,7E-07
Caspase1	TNF $\alpha$	0,52	5,0E-11	0,57	2,7E-13	0,36	1,2E-05	0,47	1,1E-08	0,42	4,3E-07	0,31	2,6E-04
CCL5	CD14			0,43	5,2E-08	0,31	1,2E-04	0,41	7,3E-07	0,36	1,4E-05		
CCL5	EMR1	0,41	2,3E-07	0,40	4,7E-07	0,40	6,2E-07	0,56	1,1E-11	0,47	1,3E-08	0,49	4,7E-09
CCL5	I $\kappa$ B $\alpha$					0,31	1,9E-04			0,37	1,4E-05		
CCL5	IL1 $\beta$	0,44	3,3E-08	0,37	3,3E-06	0,38	1,9E-06	0,53	1,2E-10	0,48	5,2E-09	0,43	3,2E-07
CCL5	IL1ra	0,41	3,8E-07	0,40	5,8E-07	0,34	3,0E-05	0,40	2,3E-06	0,38	5,1E-06	0,32	2,1E-04
CCL5	IL6												
CCL5	CD11c	0,46	1,4E-08	0,49	9,3E-10	0,45	2,0E-08	0,56	3,9E-11	0,51	7,5E-10	0,43	5,0E-07
CCL5	MCP1												





IL1 $\beta$	CD11c	0,51	2,2E-10	0,53	2,6E-11	0,55	5,6E-12	0,56	3,9E-11	0,57	4,5E-12	0,54	2,0E-10
IL1 $\beta$	MCP1												
IL1 $\beta$	MRC1												
IL1 $\beta$	NF $\kappa$ B	0,37	3,4E-06	0,34	2,4E-05	0,41	4,3E-07			0,36	1,5E-05		
IL1 $\beta$	NLRP3							0,38	5,5E-06	0,43	3,3E-07	0,42	6,5E-07
IL1 $\beta$	TLR2	0,33	3,9E-05	0,43	5,4E-08	0,45	1,7E-08	0,45	9,3E-08	0,63	3,1E-14	0,47	1,4E-08
IL1 $\beta$	TLR4	0,46	7,9E-09	0,55	6,8E-12	0,45	3,9E-08	0,52	7,0E-10	0,58	3,8E-12	0,45	8,7E-08
IL1 $\beta$	TNF $\alpha$			0,32	6,7E-05			0,48	7,1E-09	0,53	1,4E-10	0,45	9,2E-08
IL1ra	IL6												
IL1ra	CD11c	0,52	2,7E-10	0,56	1,3E-12	0,42	3,4E-07	0,44	3,7E-07	0,61	1,9E-13	0,49	1,3E-08
IL1ra	MCP1	0,32	8,2E-05	0,32	8,4E-05								
IL1ra	MRC1	0,40	9,1E-07	0,37	3,4E-06	0,38	3,1E-06						
IL1ra	NF $\kappa$ B												
IL1ra	NLRP3	0,42	2,0E-07	0,46	4,0E-09	0,37	6,5E-06	0,36	2,2E-05	0,36	2,1E-05	0,33	1,4E-04
IL1ra	TLR2	0,46	1,5E-08	0,49	3,6E-10	0,46	1,9E-08	0,45	1,5E-07	0,58	2,7E-12	0,50	4,7E-09
IL1ra	TLR4			0,39	1,3E-06			0,35	6,6E-05	0,42	6,3E-07	0,34	7,4E-05
IL1ra	TNF $\alpha$	0,46	9,4E-09	0,50	1,6E-10	0,43	1,8E-07	0,39	5,1E-06	0,39	3,2E-06		
IL6	CD11c												
IL6	MCP1			0,46	8,9E-09	0,34	6,0E-05	0,37	2,0E-05	0,43	5,5E-07	0,37	3,0E-05
IL6	MRC1												
IL6	NF $\kappa$ B												
IL6	NLRP3												





**Tabelle A.4: Varianzverteilung anhand der linearen gemischten Modelle basierend auf der CID-abhängigen ACE-Modellierung (LF, HF1, HF6) für die Plasmakonzentrationen der Lipidspezies.** Die Lipidspezies zeigten eine starke Variabilität für additive genetische Effekte (Heritabilität, A) mit Werten zwischen 0 und 62 %. Die Parameter sind nach den gerundeten Anteilen für Heritabilität (A), geteilte Umwelt (C), individuelle Umwelt (E) und unbekannte Effekte (U) sortiert. Werte gegeben als Anteile.

	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>U</b>
PI [34:2, (18:2, 16:0)]	0,621	0,000	0,058	0,321
PE [36:2, (18:2, 18:0)]	0,594	0,000	0,275	0,131
PC-O [32:0, (16:0, 16:0)]	0,575	0,000	0,423	0,003
PC-O [34:3, (16:1, 18:2)]	0,567	0,008	0,338	0,087
PE-O [36:5, (16:1, 20:4)]	0,561	0,035	0,295	0,109
PC [33:1, (17:1, 16:0)]	0,552	0,000	0,368	0,081
SM [36:1]	0,514	0,014	0,408	0,064
PE [38:4, (20:4, 18:0)]	0,511	0,000	0,068	0,421
PI [36:2, (18:0, 18:2)]	0,510	0,019	0,467	0,003
PC-O [36:3, (18:1, 18:2)]	0,508	0,007	0,419	0,066
PC-O [34:1, (18:1, 16:0)]	0,504	0,000	0,210	0,287
SE [47:4, (27:1, 20:3)]	0,490	0,091	0,283	0,136
LPE [16:0]	0,483	0,000	0,384	0,133
PC-O [34:1, (16:0, 18:1)]	0,483	0,000	0,302	0,215
LPC [18:1]	0,478	0,000	0,355	0,166
SM [40:1]	0,477	0,000	0,257	0,266
LPE [18:1]	0,424	0,000	0,115	0,461
PC [38:4, (20:3, 18:1)]	0,423	0,000	0,303	0,274
LPC [20:4]	0,413	0,000	0,330	0,257
TAG [52:2]	0,389	0,202	0,296	0,113
LPC [18:0]	0,389	0,000	0,286	0,325
PI [36:1, (18:0, 18:1)]	0,386	0,000	0,108	0,507
PC [38:3, (18:0, 20:3)]	0,358	0,000	0,352	0,291
LPE [18:0]	0,344	0,000	0,227	0,428
PC [36:3, (20:3, 16:0)]	0,337	0,000	0,407	0,256
SM [38:1]	0,333	0,029	0,502	0,136
SM [36:2:b]	0,328	0,132	0,466	0,074
PI [38:3, (18:0, 20:3)]	0,320	0,000	0,483	0,197
PC [36:1, (18:0, 18:1)]	0,290	0,000	0,260	0,450

TAG [49:2]	0,285	0,180	0,375	0,160
PC [36:2, (20:2, 16:0)]	0,285	0,058	0,616	0,042
TAG [56:6]	0,279	0,321	0,263	0,136
LPE [20:4]	0,278	0,000	0,166	0,555
PC [33:2, (18:2, 15:0)]	0,276	0,078	0,631	0,015
SM [36:2:a]	0,274	0,189	0,397	0,139
DAG [34:1, (16:0, 18:1)]	0,274	0,000	0,301	0,425
PC [38:6, (22:6, 16:0)]	0,262	0,132	0,599	0,007
TAG [54:6]	0,260	0,181	0,440	0,118
LPC [20:3]	0,245	0,000	0,115	0,640
DAG [36:2, (18:1, 18:1)]	0,230	0,135	0,555	0,079
LPC [18:2]	0,229	0,000	0,381	0,390
LPC [16:1]	0,223	0,000	0,176	0,601
SM [34:1]	0,214	0,089	0,687	0,009
PC [34:1, (18:1, 16:0)]	0,207	0,216	0,483	0,094
PC [32:1, (16:0, 16:1)]	0,205	0,000	0,498	0,296
TAG [52:5]	0,203	0,087	0,597	0,113
LPC [16:0]	0,197	0,000	0,157	0,646
CER [40:2]	0,193	0,051	0,691	0,065
TAG [56:5]	0,190	0,100	0,627	0,083
PC [33:1, (18:1, 15:0)]	0,188	0,000	0,653	0,159
PE-O [38:6, (18:2, 20:4)]	0,187	0,000	0,130	0,684
PC [36:4, (20:4, 16:0)]	0,180	0,000	0,477	0,343
PC-O [34:2, (16:1, 18:1)]	0,175	0,074	0,563	0,188
PE-O [36:4, (18:2, 18:2)]	0,165	0,280	0,438	0,117
TAG [54:3]	0,157	0,205	0,635	0,003
SE [43:2, (27:1, 16:1)]	0,155	0,000	0,261	0,584
TAG [54:4]	0,149	0,122	0,622	0,107
CER [40:1]	0,147	0,239	0,544	0,071
SM [40:2]	0,138	0,000	0,313	0,549
PC [36:5, (16:0, 20:5)]	0,136	0,000	0,278	0,587
PC-O [34:1, (17:0, 17:1)]	0,133	0,000	0,191	0,676
LPE [22:6]	0,126	0,000	0,492	0,382
PC [37:3, (20:3, 17:0)]	0,122	0,000	0,296	0,583
SM [42:2]	0,113	0,237	0,536	0,114
PC-O [34:2, (18:2, 16:0)]	0,113	0,263	0,460	0,165

PE-O [36:3, (18:1, 18:2)]	0,111	0,470	0,263	0,155
SM [32:1]	0,110	0,000	0,342	0,548
TAG [54:2]	0,108	0,008	0,705	0,179
PC-O [32:1, (16:1, 16:0)]	0,095	0,000	0,369	0,535
PC [38:5, (18:1, 20:4)]	0,095	0,231	0,673	0,001
SM [34:2]	0,085	0,308	0,467	0,140
PC-O [36:4, (16:0, 20:4)]	0,084	0,222	0,661	0,033
TAG [51:1]	0,084	0,006	0,738	0,172
PI [36:2, (18:1, 18:1)]	0,077	0,000	0,311	0,612
PC-O [36:3, (16:0, 20:3)]	0,067	0,000	0,337	0,597
PC [37:4, (17:0, 20:4)]	0,066	0,417	0,472	0,045
PC-O [34:2, (16:0, 18:2)]	0,065	0,372	0,542	0,021
PE-O [34:3, (16:1, 18:2)]	0,063	0,506	0,282	0,149
PC [36:2, (18:1, 18:1)]	0,062	0,182	0,610	0,146
SM [34:0]	0,061	0,078	0,655	0,205
PC [38:5, (22:5, 16:0)]	0,057	0,105	0,745	0,094
PC-O [32:0, (18:0, 14:0)]	0,050	0,000	0,123	0,827
LPE [18:2]	0,035	0,000	0,399	0,566
PC [38:6, (20:4, 18:2)]	0,032	0,133	0,778	0,057
SE [42:1, (27:1, 15:0)]	0,031	0,377	0,519	0,072
TAG [50:1]	0,030	0,000	0,354	0,615
TAG [49:1]	0,027	0,080	0,681	0,212
LPC [14:0]	0,027	0,000	0,356	0,617
PC [32:0, (16:0, 16:0)]	0,025	0,348	0,510	0,117
SE [45:4, (27:1, 18:3)]	0,021	0,365	0,426	0,188
CER [42:2]	0,020	0,486	0,383	0,111
PC [32:1, (18:1, 14:0)]	0,014	0,000	0,378	0,608
SE [45:3, (27:1, 18:2)]	0,013	0,497	0,415	0,075
PC [38:4, (22:4, 16:0)]	0,010	0,000	0,413	0,576
PI [34:1, (18:1, 16:0)]	0,010	0,000	0,224	0,765
PC-O [32:0, (17:0, 15:0)]	0,009	0,000	0,232	0,759
TAG [50:2]	0,008	0,006	0,470	0,517
PC [34:2, (18:1, 16:1)]	0,007	0,379	0,565	0,049
SE [45:2, (27:1, 18:1)]	0,007	0,428	0,565	0,000
TAG [48:3]	0,006	0,218	0,649	0,126
SE [45:1, (27:1, 18:0)]	0,006	0,311	0,619	0,064

---

SM [38:2]	0,006	0,366	0,527	0,102
ST [27:1]	0,005	0,197	0,652	0,146
PC [36:4, (18:2, 18:2)]	0,005	0,274	0,590	0,131
PC [34:2, (18:2, 16:0)]	0,004	0,250	0,678	0,067
PC-O [38:4, (18:1, 20:3)]	0,004	0,084	0,660	0,253
TAG [48:1]	0,003	0,527	0,326	0,144
TAG [52:3]	0,002	0,292	0,617	0,088
PC [30:0, (16:0, 14:0)]	0,002	0,000	0,381	0,617
PC-O [36:4, (18:2, 18:2)]	0,001	0,001	0,535	0,464
TAG [53:2]	0,001	0,468	0,403	0,128
LPC [22:6]	0,001	0,544	0,363	0,093
TAG [52:4]	0,000	0,565	0,391	0,044
PI [38:4, (18:0, 20:4)]	0,000	0,500	0,418	0,082
PC [36:2, (18:0, 18:2)]	0,000	0,252	0,627	0,121
TAG [50:3]	0,000	0,504	0,489	0,007
TAG [54:5]	0,000	0,437	0,512	0,051
SE [47:5, (27:1, 20:4)]	0,000	0,369	0,564	0,067
CER [38:1]	0,000	0,370	0,431	0,199
TAG [56:3]	0,000	0,190	0,784	0,026
SE [43:1, (27:1, 16:0)]	0,000	0,348	0,607	0,045
SE [44:1, (27:1, 17:0)]	0,000	0,029	0,321	0,650
TAG [48:2]	0,000	0,517	0,340	0,143
PC-O [38:4, (18:0, 20:4)]	0,000	0,419	0,495	0,085
TAG [56:4]	0,000	0,504	0,415	0,081
SE [49:7, (27:1, 22:6)]	0,000	0,535	0,460	0,006
PC-O [38:5, (18:1, 20:4)]	0,000	0,450	0,430	0,120
PC [34:3, (16:0, 18:3)]	0,000	0,372	0,546	0,082
TAG [50:4]	0,000	0,399	0,521	0,079
PC [38:4, (18:0, 20:4)]	0,000	0,467	0,437	0,096
SE [47:6, (27:1, 20:5)]	0,000	0,453	0,454	0,093
TAG [53:4]	0,000	0,432	0,434	0,133
PC [35:2, (17:0, 18:2)]	0,000	0,310	0,496	0,195
PC [36:3, (18:1, 18:2)]	0,000	0,435	0,557	0,008
DAG [36:3, (18:2, 18:1)]	0,000	0,518	0,433	0,048
SE [44:2, (27:1, 17:1)]	0,000	0,374	0,548	0,078
PC-O [36:3, (18:2, 18:1)]	0,000	0,372	0,574	0,053

---

TAG [51:2]	0,000	0,554	0,353	0,093
TAG [48:0]	0,000	0,492	0,319	0,189
TAG [54:7]	0,000	0,260	0,648	0,092
PC [32:2, (18:2, 14:0)]	0,000	0,013	0,441	0,546
PC [34:0, (18:0, 16:0)]	0,000	0,507	0,443	0,050
TAG [51:3]	0,000	0,449	0,527	0,024
PC-O [36:5, (16:1, 20:4)]	0,000	0,352	0,485	0,163
TAG [46:1]	0,000	0,413	0,580	0,007
CER [42:1]	0,000	0,430	0,398	0,171
PC [34:3, (18:2, 16:1)]	0,000	0,502	0,471	0,027
TAG [56:7]	0,000	0,101	0,747	0,152
SE [41:1, (27:1, 14:0)]	0,000	0,393	0,426	0,181
TAG [53:3]	0,000	0,262	0,610	0,127

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die Promotionsschrift mit dem Thema

**"Bioinformatische Analyse der NUGAT-Studie (*NU*tri*Ge*nomic *Anal*ysis  
*in* *Tw*ins)**

-

**Verfahren zur Integration lipidomischer, transkriptomischer und  
metabolischer Daten"**

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken, dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angabe der Quelle, auch der Sekundärliteratur, als Entlehnung kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht und noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Nuthetal, 22. Oktober 2016

Turid Frahnw

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof.Dr. Andreas F.H. Pfeiffer für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung anzufertigen. Weiterhin danke ich ihm für die stetige und intensive Betreuung, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof.Dr. Matthias Schulze danke ich für die bereitwillige und freundliche Betreuung über die Universität Potsdam.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Martin Osterhoff und Frau Dr. Rita Schüler, die beide immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir jederzeit bereitwillig mit Wort und Tat geholfen haben. Danke für eure Geduld, Hilfsbereitschaft und Anregungen.

Frau Dr. Anne-Cathrin Seltmann danke ich für die Vorarbeit, die sie bereits im Rahmen ihrer eigenen Promotion geleistet hat und die mir die Einarbeitung in die Thematik erleichtert hat.

Ebenso möchte ich den Kooperationspartnern der NUGAT-Studie danken. Insbesondere seien hier Herr Prof. Dr. Kai Simons und das Team der Lipotype GmbH, Dresden, genannt. Mein Dank gilt auch den Probanden der Studie und den Kollegen der Ambulanz und Ernährungsberatung, die die Studie praktisch erst möglich gemacht haben.

Frau Dr. Farnaz Keyhani-Nejad, Frau Katharina Keßler, Frau Mariya Markova, sowie allen nicht namentlich genannten (Ex-)Doktorand(inn)en danke ich für ihre Unterstützung, Zusammenarbeit und so manches motivierende Wort. Ohne euch wäre das Arbeitsklima nicht das gleiche gewesen!

Auf keinen Fall möchte ich meinen Vater, Dieter Frahnw, unerwähnt lassen, der mich nicht nur während der Promotion, sondern in so ziemlich allen Lebenslagen unterstützt und mir den Rücken gestärkt und freigehalten hat. Danke, Paps!

Herrn Hans-Peter Joos möchte ich dafür danken, dass er meine letzten Schuljahre deutlich geprägt und sowohl mein Interesse an Naturwissenschaften als auch meinen Ehrgeiz reanimiert hat. Ohne Ihre manchmal nicht ganz so subtilen Stupser in die richtige Richtung, gäbe es diese Arbeit nicht - aber Gymnasiallehrerin werde ich dennoch nicht.

Ebenfalls sollen sich Sue, Tine und Lasse umarmt fühlen. Obwohl wir inzwischen etwas über Europa verstreut sind, hattet ihr immer Geduld, Zeit und Muße für ein wenig Motivationsarbeit, wenn ich mal wieder den Wald vor lauter Bäumen nicht gesehen habe.

## Lebenslauf

### **Turid Monika Konstanze Frahnw**

geboren am 23.Oktober 1987 in Frankfurt (Oder)

Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

08/1994-01/1998 Anne-Frank-Schule Essen, Essen  
01/1998-06/1998 St.Petrus-Grundschule Aldekerk, Kerken-Aldekerk  
08/1998-10/2001 Louise-von-Duesberg-Gymnasium Kempen, Kempen  
10/2001-06/2007 Städtisches Gymnasium Straelen, Straelen  
06/2007 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife  
am Städtischen Gymnasium Straelen, Straelen

### **Studium**

10/2007-06/2012 Studium der Biomathematik (Diplom)  
an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Greifswald

Diplomarbeit am Institut für Mathematik und Informatik und  
Zoologisches Institut und Museum,  
betreut von Herrn Prof.Dr. Klaus Fischer und  
Herrn Prof.Dr. Volkmar Liebscher zum Thema:  
"Umwelteinflüsse auf Stressresistenzen bei dem tropischen  
Tagfalter *Bicyclus anynana*"  
(in Kooperation mit Frau Susanne Leyh)

### **Promotion**

seit 02/2013 Promotion  
in der Abteilung Klinische Ernährung  
unter der Leitung von Herrn Prof.Dr. Andreas F.H. Pfeiffer  
am Deutschen Institut für Ernährungsforschung  
Potsdam-Rehbrücke, Nuthetal

## Preise

- *Travelgrant* 2014 Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie
- *Travelgrant* 2014 *European Association for the Study of Diabetes*
- *Travelgrant* 2015 Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie
- *Travelgrant* 2015 *European Association for the Study of Diabetes*

---

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Stand: 10. Oktober 2016

- **FRAHNOW T**, OSTERHOFF MA, HORNEMANN S, KRUSE M, SURMA MA, KLOSE C, SIMONS K, PFEIFFER AFH (*under review*): *Heritability and responses to high fat diet of plasma lipidomics in a twin study*. In: Scientific Reports
- SCHÜLER R, OSTERHOFF MA, **FRAHNOW T**, SELTMANN A-C, BUSJAHN A, KABISCH S, XU L, MOSIG AS, SPRANGER J, MÖHLIG M, HORNEMANN S, KRUSE M, PFEIFFER AFH (*under review*): *Human circulating angiotensin converting enzyme is increased by high saturated fat diets and further enhanced in carriers of the rs4343 polymorphism defining persons at risk for nutrient dependent elevation of blood pressure*. In: Journal of the American Heart Association
- MARKOVA M, PIVOVAROVA O, HORNEMANN S, SUCHER S, **FRAHNOW T**, WEGNER K, MACHANN J, PETZKE KJ, HIERHOLZER J, LICHTINGHAGEN R, HERDER C, CARSTENSEN-KIRBERG M, RODEN M, RUDOVICH N, KLAUS S, THOMANN R, SCHNEEWEISS R, ROHN S, PFEIFFER AFH (*in press*): *Isocaloric high animal or plant protein diets potently reduce liver fat in type 2 diabetes: a randomized clinical trial*. In: Gastroenterology

### Kongressbeiträge<sup>1</sup>

Stand: 10. Oktober 2016

- **FRAHNOW T**, OSTERHOFF M, SALES S, SAMPAIO J, HORNEMANN S, KRUSE M, PFEIFFER AFH (2014): *Einfluss gesättigter Fettsäuren auf Komposition und Konnektivität des Lipidoms in der NUGAT-(NUTriGenomics Analysis in Twins)-Studie*, 49. Diabetes Kongress der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Posterpräsentation
- **FRAHNOW T**, OSTERHOFF M, SALES S, SAMPAIO J, HORNEMANN S, KRUSE M, PFEIFFER AFH (2014): *Human rapid and long-term response in blood lipid composition under an isocaloric high-fat diet in the NUGAT-(NutriGenomic Analysis in Twins)-study*, 57. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Kurzvortrag

---

<sup>1</sup>Kongressbeiträge als Coautor sind nicht gelistet.

- **FRAHNOW T**, OSTERHOFF M, SELTMANN A-C, HORNEMANN S, KRUSE M, SALES S, SAMPAIO JL, PFEIFFER AFH (2014): *Lysophospholipids in human blood and their interaction with white adipose tissue under an isocaloric high-fat diet in the NUGAT-study*, 50th EASD Annual Meeting, Posterpräsentation
- **FRAHNOW T**, OSTERHOFF MA, SELTMANN A-C, SALES S, SAMPAIO JL, HORNEMANN S, KRUSE M, PFEIFFER AHF (2015): *Sinkende Lysophospholipidkonzentrationen begleiten die Aktivierung inflammatorischer Prozesse während einer Hochfettdiät in der NUGAT-(NUtriGenomics Analysis in Twins)-Studie*, 50. Diabetes Kongress der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Posterpräsentation
- **FRAHNOW T**, OSTERHOFF M, SELTMANN A-C, HORNEMANN S, KRUSE M, SALES S, SAMPAIO JL, PFEIFFER AFH (2015): *Decreasing lysophospholipids accompany the activation of inflammation and the immune system after higher fat intake in the NUGAT (NutriGenomics Analysis in Twins) study*, 58. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Posterpräsentation
- **FRAHNOW T**, OSTERHOFF MA, SELTMANN A-C, HORNEMANN S, KRUSE M, SALES S, SAMPAIO JL, SIMONS K, PFEIFFER AFH (2015): *Heritability of human serum lysophospholipids and ether phospholipids*, 51st EASD Annual Meeting, Posterpräsentation